

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 9/127 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200380107543.3

[43] 公开日 2006 年 2 月 8 日

[11] 公开号 CN 1731982A

[22] 申请日 2003.10.23

[21] 申请号 200380107543.3

[30] 优先权

[32] 2002.10.25 [33] US [31] 60/421,042

[86] 国际申请 PCT/US2003/033649 2003.10.23

[87] 国际公布 WO2004/039430 英 2004.5.13

[85] 进入国家阶段日期 2005.6.24

[71] 申请人 西摩·J·库尔茨

地址 美国伊利诺伊州

[72] 发明人 西摩·J·库尔茨

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 温宏艳 刘 玥

权利要求书 2 页 说明书 26 页

[54] 发明名称

治疗胰岛素耐受性、成人发作型糖尿病以及代谢综合征 X 的方法

[57] 摘要

一种通过给哺乳动物个体静脉内给药治疗有效量的主要包含磷脂类的脂蛋白小单室脂质体(SUVs)的脂质体混悬液来治疗哺乳动物个体的胰岛素耐受性、成人发作型糖尿病、代谢综合征 X 以及其相关并发症的方法。将该脂质体混悬液给药一定的时期从而使得血糖、胰岛素、总胆固醇、LDL 胆固醇、甘油三酯、肌酸激酶(CK)、肌酸激酶-MB(CK-MB)、Hb-Alc、脂蛋白(a)、SGOT 和 SGPT 中一些或全部的水平都回落到正常范围内或显著降低。

1. 一种治疗哺乳动物个体的胰岛素耐受性、成人发作型糖尿病和代谢综合征 X 以及其相关并发症的方法，其包括给所说的哺乳动物个体静脉内给药治疗有效量的主要包含磷脂类的脂蛋白小单室脂质体 (SUVs) 的脂质体混悬液。
5
2. 如权利要求 1 所述的方法，其中所说的磷脂类选自磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油和磷脂酰丝氨酸。
3. 如权利要求 2 所述的方法，其中所说的磷脂酰胆碱是卵磷脂酰胆碱。
- 10 4. 如权利要求 2 所述的方法，其中所说的磷脂酰胆碱是 1-棕榈酰, 2-油酰磷脂酰胆碱、1-棕榈酰, 2-亚油酰磷脂酰胆碱或其混合物。
5. 如权利要求 2-4 中任意一项所述的方法，其中所说的磷脂酰胆碱具有低于约 37℃ 的转变温度。
6. 如权利要求 5 所述的方法，其中所说的转变温度为约 -10 至 24
15 ℃ 的范围。
7. 如权利要求 1-6 中任意一项所述的方法，其中所说的脂蛋白 SUVs 以小于约 40 摩尔百分比的数量进一步包含鞘磷脂、胆固醇或其它甾醇。
8. 如权利要求 1-7 中任意一项所述的方法，其中所说的脂蛋白 SUVs
20 是空白的。
9. 如权利要求 1-8 中任意一项所述的方法，其中以每次给药约 50 mg-1 g 总脂质 / kg 体重的剂量将所说的脂质体混悬液每周一至三次地给药于所说的哺乳动物个体。
10. 如权利要求 9 所述的方法，其中所说的剂量为约 200-450 mg 总
25 脂质 / kg 体重。
11. 如权利要求 1-10 中任意一项所述的方法，其中所说的脂质体混悬液是通过静脉内注射或静脉内输注给药的。
12. 主要包含磷脂类的脂蛋白小单室脂质体 (SUVs) 的脂质体混悬液在制备用于治疗哺乳动物个体胰岛素耐受性、成人发作型糖尿病和
30 代谢综合征 X 以及其相关并发症的药物中的应用。
13. 如权利要求 12 所述的应用，其中所说的磷脂类选自磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油和磷脂酰丝氨酸。

14. 如权利要求 13 所述的应用, 其中所说的磷脂酰胆碱是卵磷脂酰胆碱。

15. 如权利要求 13 所述的应用, 其中所说的磷脂酰胆碱是 1-棕榈酰, 2-油酰磷脂酰胆碱、1-棕榈酰, 2-亚油酰磷脂酰胆碱或其混合物。

5 16. 如权利要求 13 所述的应用, 其中所说的磷脂酰胆碱具有低于约 37℃ 的转变温度。

17. 如权利要求 16 所述的应用, 其中所说的转变温度为约-10 至 24℃ 的范围。

10 18. 如权利要求 12-17 中任意一项所述的应用, 其中所说的脂蛋白 SUVs 进一步以低于约 40 摩尔百分比的数量包含鞘磷脂、胆固醇或其它甾醇。

19. 如权利要求 12-18 中任意一项所述的应用, 其中所说的脂蛋白 SUVs 是空白的。

15 20. 如权利要求 12-19 中任意一项所述的应用, 其中所说的药物适于以每次给药约 50 mg-1 g 总脂质/ kg 体重的剂量每周一次至三次地给药于所说的哺乳动物个体。

21. 如权利要求 20 所述的应用, 其中所说的剂量为约 200-450 mg 总脂质/kg 体重。

20 22. 如权利要求 12-21 中任意一项所述的应用, 其中所说的药物适于通过静脉内注射或静脉内输注给药。

治疗胰岛素耐受性、成人发作型糖尿病
以及代谢综合症 X 的方法

5

技术领域

本发明涉及一种用主要包含磷脂类的治疗性脂质体混悬液治疗哺乳动物胰岛素耐受性、成人发作型糖尿病和代谢综合症 X 以及其相关并发症的方法。

10

技术背景

对于体内平衡的维持而言，关键是保持葡萄糖向细胞的恒定供应以避免发生血糖代谢障碍以及与其相关代谢失调。如果忽视或不进行治疗，代谢性血糖代谢障碍将导致许多代谢疾病，包括肥胖、心脏病、高血压、糖尿病、慢性疲劳、加速老化、变性疾病、以及许多精神和情感问题。为此，在出现可破坏生命质量并缩短生命质量的费用大的和使残废的变性病症前确定这种病症并同时对其及早进行治疗是很重要的。

血糖代谢障碍和糖尿病十分缓慢、静静地并危险地显露出来。如 American Diabetes Association 所公开的那样，三分之一以上患有糖尿病的美国成人(五百万以上的人口)一点也没有意识到其有病。许多人只是在其出现严重的使人虚弱的病症如心脏病、中风、视力受损、肾疾病、神经损伤或阳萎以后才对他们的疾病情况有所了解。American Diabetes Association: 事实和数字, 2000, 于 www.diabetes.Org/info/facts/facts-natl.jsp。

25

糖尿病(Diabetes 或 diabetes mellitus)是一种当机体不用能血液中的葡萄糖作为能量时发生的疾病，其是因为胰腺不能制造足够的胰岛素或可获得的胰岛素不能被有效利用所产生的。糖尿病的早期迹象是葡萄糖耐受不良和胰岛素耐受性。主要有两种类型的糖尿病：胰岛素依赖型(1型)和非胰岛素依赖型(2型或成人发作型糖尿病)。

30

第三种类型的糖尿病是仅在之前没有糖尿病史的孕妇中发生的妊娠糖尿病。每年几乎有 135,000 名美国妇女产生妊娠糖尿病，妊娠糖尿病一般在妇女在生下她们的宝宝之后自动消失。但是研究表明约 40

%患有妊娠糖尿病的妇女接下来在 15 年内形成 2 型糖尿病 (NIH 出版号 02-3873, 2002 年 5 月)。

在胰岛素依赖型糖尿病 (IDDM; I 型糖尿病) 中, 因为制造胰岛素的 β -细胞已经被破坏, 所以胰腺几乎不制造或不制造胰岛素。其通常出现在任何年龄, 但是通常发生于幼年期和 30 岁以后, 最典型地发生于儿童期或青春期。治疗包括每日注射胰岛素或使用胰岛素泵、有计划的饮食和定期锻炼、以及每日对血糖的自我监控。如果胰岛素的水平长期太低, 则机体开始分解其储藏的脂肪以获得能量。这使得机体释放脂肪酸, 其然后转化成在高水平时有毒的酮体或酮酸。该结果是所谓的酮酸中毒——一种如果不立刻治疗则可能使人昏迷的严重情况。

在非胰岛素依赖型糖尿病 (NIDDM; II 型糖尿病或成人发作型糖尿病 (AOD)) 中, 胰腺不能制造足够的胰岛素或机体组织变得对胰岛素有耐受性。因为胰岛素不能被利用或被不正确地使用, 所以血糖水平升高至安全水平以上。患者的血糖水平常常逐渐升高, 经过几年才达到不安全的水平并产生症状。因此, 对一些人而言, 在还没有形成糖尿病情况的情况下, 胰岛素的正常或过高水平补偿了该类耐受性。但是, 随着时间的流逝, 胰岛素的产生常常下降并且耐受性加重。在所有糖尿人群当中约 90 - 95% 的人有 AOD。其在 40 岁以上的人中更常见。

AOD 是由基因、环境、胰岛素异常 (β -细胞中胰岛素分泌减少和在肌细胞中产生胰岛素耐受性)、肝中葡萄糖产生增加、脂肪分解增加、以及可能的肠中有缺陷的激素分泌的复杂的相互作用引起的。最近这种疾病显著增加表明生活方式因素如肥胖和久坐的生活方式在释放引起该疾病的遗传成分中可能是有巨大贡献的因素。

胰岛素刺激的葡萄糖吸收的个体间差异很大 (Stern, M. P. 和 Mitchell, B. D. 胰岛素耐受性遗传性 (Genetics of Insulin Resistance). 在 G. M. Reaven 和 A. Laws (eds). 胰岛素耐受性, 代谢综合征 X, 3-18 页, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 1999)。在正常个体中观察到的胰岛素耐受性的程度可能与在糖尿病个体中看到的程度相等。因此, 现在普遍认为在形成成人发作型糖尿病前优先出现该胰岛素耐受性。其同样也必需承认在从来没有形成过糖尿病的个体中可能也会发现轻度或甚至严重的胰岛素耐受性。基因因素有助于胰岛素

耐受性的这种正常变动。胰岛素耐受性的常见形式包括骨骼肌胰岛素耐受性、肝胰岛素耐受性和脂肪组织胰岛素耐受性。G.M. Reaven 和 A. Laws, (eds), 胰岛素耐受性, 代谢综合征 X, 3-18 页, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 1999 的全部内容在这里被全部引入本文作为
5 参考。

细胞对胰岛素的响应是由质膜中一种特殊的胰岛素受体介导的。当胰岛素激活该受体时, β -亚基在近膜区域、激酶领域和 C-末端领域上被自动磷酸化。完全的受体自磷酸化随后活化了该蛋白酪氨酸激酶受体活性, 其都是细胞对胰岛素产生响应所必需的 (Kahn, C. R. 等人, J. Clin. Invest. 82: 8622-8626, 1988)。
10

胰岛素耐受性是一种对细胞、组织、肝脏或整个机体中外源性或内源性胰岛素正常水平的一种损害响应。其可以由一些因素引起, 即 (1) 肥胖因素 (如游离脂肪酸水平升高以及胰岛素耐受性和细胞因子如抵抗素和来普汀的联合作用 (Mooradian A. D., Growth Horm. IGF Res. 11: 增刊 A: S79-83, 2001; Ravussin, E. 和 Smith, S. R., Ann. N. Y. Acad. Sci. 967: 363-78, 2002)); (2) 蛋白如钙蛋白酶 (Baier, L. J. 等人, J. Clin. Invest. 106: 819-21, 2000); (3) 影响循环系统和神经系统的糊精和降钙素基因相关肽 (CGRP) 的异常调节 (Leighton, B. 和 Cooper, G. J., Nature 335: 632-5, 1988; Haynes, J. M. 等人
15 Diabetologia 40: 256-61, 1997); (4) 作为炎症和损害标记的白介素-6 (IL-6) 和 C-反应性蛋白 (CRP) 水平升高 (Hak, A. E. 等人, J. Clin. Endocrinol. Metab. 86: 4398-405, 2001; Pickup, J. C. 等人, Diabetologia 40: 1286-92, 1997); 和 (5) 青春期过程中生长激素水平增加 (Dunger, D. B. 和 Cheetham, T. D., Horm. Res. 46: 2-6, 1996;
20 Halldin, M. U. 等人, Clin. Endocrinol. (Oxf) 48: 785-94, 1998)。
25

不考虑性别或年龄, 患有 AOD 的人死亡的主要原因是心脏病。与糖尿病有关的其它并发症包括神经损伤 (神经病) 和小血管和大血管中的血管异常。心脏病发作占有所有糖尿病患者死亡的 60%, 中风占 25%。糖尿病患者有出现心脏风险情况的风险, 所说的心脏风险情况包
30 括高血压、甘油三酯水平高和高密度脂蛋白下降、血液凝固问题、神经病、以及无症状局部缺血。为了避免这些并发症中的一些, 用它汀类药物 (statins) 对糖尿病患者进行治疗以改善他们的胆固醇和脂质

水平，所说的它汀类药物例如，普伐它汀(普拉固)、辛伐它汀(舒降之)、氟伐它汀(来适可)、阿伐它汀(立普妥)、以及罗苏伐它汀(Crestor)。还可以使用烟酸来改善该胆固醇水平，但是其也增加了血糖水平。

5 药物治疗是治疗成年发作型糖尿病的一种常见方法。目前在进行或不进行胰岛素替代治疗的情况下可以单独或联合使用口服物质如磺酰脲类(例如, 格列本脲、格列吡嗪、格列美脲)、氯茴苯酸类、双胍类、噻唑啉二酮类物质、以及 α -糖苷酶抑制剂。

一些形式的胰岛素类似物可用于患有成年发作型糖尿病的患者。

10 但是, 胰岛素对重量增加以及心脏的可能的不利影响是令人讨厌的。事实上, 与胰岛素治疗(28%)相比, 用药物处理进行治疗可以降低死亡率(二甲双胍(8%)、磺酰脲类(16%)以及噻唑啉二酮类(14%)。

代谢综合征 X (MS-X) 是一种通综合独立和相关的并发症或病症而促进动脉粥样硬化并增加心血管事件风险的病症。这种病症本身有多种不同的称呼, 包括被称为“综合征 X”、“胰岛素耐受性综合征”(Li, C. 等人, Diabetes Care 24: 2035-2042, 2001)、“Reaven's 综合征”(Home, P. , Diabet. Med. 6: 559-560, 1989)和“代谢性心血管风险综合征”(Hjermann, I. , J. Cardiovasc. Pharmacol. 20: S5-S10, 1992)。MS-X 相关的并发症或病症包括血脂障碍(高甘油三酯血症和低高密度脂蛋白(HDL)-胆固醇)、血栓形成前的状态、2 型糖尿病(成人发作型糖尿病)、胰岛素耐受性/高胰岛素血症、高血压、和腹部肥胖。Grundy, S. M. Am J Cardiol. 81: 18B-25B, 1998。

虽然患者可能没有任何 MS-X 症状, 但主治医生可以将下面的情况确定为病症的迹象: (1) 由于胰岛素耐受性而导致的胰岛素水平升高; (2) II 型糖尿病; (3) 向心性肥胖(腹部区域的机体脂肪数量不成比例); (4) 高脂血症(血液中脂肪(脂质)水平高, 其诱导了 LDL (“不良的(bad)”)胆固醇和甘油三酯。此外, LDL 的程度可能低于正常, 其更有可能促进动脉粥样硬化); (5) 低 HDL (“良好的(good)”)胆固醇水平; (6) 高血压; (7) 促进血液凝固的血液因素如纤溶酶原活化剂抑制剂-1 (PAI-1) 和纤维蛋白原的水平升高; (8) 高尿酸血症(血中尿酸的水平高); 和 (9) 微白蛋白尿(在对尿进行分析时发现少量蛋白白蛋白)。

30 Grundy S. M. , Am. J. Cardiol. 83: 25F- 29F, 1999。

这些并发症或病症各自独立地促进了动脉粥样硬化。然而, 当组合到一起时, 其致动脉粥样化性增加并增加了任何低密度脂蛋白胆固醇水平下心血管疾病 (CVD) 的风险。除增加患者的 CVD 风险外, MS-X 可能会增加中风、2 型糖尿病的发展 (Lebovitz, H. E. , Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes 109: S135-S148, 2001)、糖尿病肾病、视网膜病、和末梢神经病 (Isomaa, B. 等人, Diabetologia 44: 1148-1154, 2001) 的形成。

使用上述特征, 一份评估表明在美国到 2010 年时五千万至七千五百万人可能会表现出显著的 MS-X 迹象。Hansen, B. C. , Ann. N Y Acad. Sci. 892: 1-24, 1999。

根据世界卫生组织 (WHO) 的指导准则, 如果存在下面的特征, 则个体将被诊断为患有 MS-X: a) 高血压 (收缩压 > 140 mm Hg 或舒张压 > 90 mm Hg); (b) 被定义为血浆甘油三酯升高 (150 mg/dL) 和/或低高密度脂蛋白 (HDL) 胆固醇 (男性 < 35 mg/dL, 女性 < 39 mg/dL) 浓度的血脂障碍; 3) 被定义为高体重指数 (BMI) ($30\text{kg}/\text{m}^2$) 和/或高腰臀比 (男性 > 0.90 , 女性 > 0.85) 的肥胖; 和 4) 微白蛋白尿 (尿白蛋白分泌速率 ≥ 20 $\mu\text{g}/\text{min}$)。见 WHO-International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. Guidelines Subcommittee. J Hypertens. 17: 151-183, 1999。根据这种标准, 患有 2 型糖尿病的个体必需仅符合 2 个条件以被诊断为 MS-X。

根据 National Cholesterol Education Program (NCEP ATP III study) 确定的相似指导方针, 如果存在 3 个或多个下面的风险因素, 则确定一个人将患 MS-X: (1) 腰围 > 102 cm (40 英寸 (in) (对男性而言) 或 > 88 cm (37 英寸) (对于女性而言); (2) 甘油三酯水平 ≥ 150 mg/dL; (3) HDL 胆固醇水平 < 40 mg/dL (对于男性而言) 或 < 50 mg/dL (对于女性而言); (4) 血压 $\geq 130/ \geq 85$ mm Hg; 或 (5) 禁食 ≥ 110 mg/dL。见 JAMA 285: 2486-2497, 2001。

这些指导方针宣称腹部肥胖与 MS-X 的相关性比 BMI 升高更高并且表明应当对所有具有腹部肥胖情况的患者出现这种综合征的可能性进行评估。此外, 就某些特征 (即, HDL 胆固醇和高血压) 而言, 方针中的 ATP III 比 WHO 中的诊断阈值水平更低。因此, 对于 MS-X 的诊断而言, 符合 ATP III 标准的人口比例更高。

MS-X 的重要特征都高度相关,需要大量生理学系统,并且显示出复杂的多因子病因学。在也被称为脂质三联体的血脂障碍中,包括其它脂质异常,如甘油三酯中度升高(常常高于正常)、密集的 LDL 小颗粒增加占多数、和低水平 HDL 胆固醇。Grundy, S. M. *Circulation* 95: 1-4, 1997。血脂障碍和胰岛素耐受性与代谢情况有关。Haffner, S. M. *Am. J. Cardiol.* 83: 17F-21F, 1999 以及 Ginsberg, H. N. 和 Huang, L. S., *J. Cardiovasc. Risk* 7: 325-331, 2000。

就血栓形成前的状态而言,对胰岛素有耐受性的患者常常经历可促进动脉血栓形成和炎症的凝结因子的改变。Grundy, S. M. 等人, *Circulation* 100: 1134-1146, 1999。促凝血状态可增加动脉粥样硬化斑块形成和斑块破裂后血栓的大小。在 MS 中通常被确定为与血栓形成前的状态有关的情况包括内皮细胞的活化、LDL 氧化被促进、血小板聚集增加、因子 VII 活化、因子 IX、因子 X、以及凝血酶原水平增加、和 PAI-1 浓度增加。过氧化物酶体增殖蛋白活化受体- α (PPAR- α)——一种细胞内和细胞外脂质代谢的主要调节剂——可能在致动脉粥样硬化性血脂障碍和炎症中起着一定作用。Gervois, P. 等人, *Clin. Chem. Lab. Med.* 38: 3-11, 2000。PPAR- α 配体-结合区域的活化通过促进某些靶基因如脂肪酸结合蛋白的转录而可能有助于肝脏中的脂肪酸代谢。此外,PPARs 还可能在调节 HDL 胆固醇和包含载脂蛋白 (apo) B-20 的脂蛋白之间的相互作用中起着重要作用。Pineda, T. I., 等人, *Curr. Opin. Lipidol.* 10: 151-159, 1999。

胰岛素生产过剩会导致高血压。WHO 指导方针表明接受抗高血压治疗和/或血压升高(收缩压 > 140 mm Hg 或舒张压 > 90 mm Hg)的患者有患 MS 的风险。*J. Hypertens.* 17: 151-183, 1999。已经明确将高血压确定为一种代谢病症并且其是胰岛素耐受性的前兆。Lind, L. and Lithell, H. *Am. Heart J.* 125: 1494-1497, 1993。50% 的抗高血压患者同时具有 (comorbid) 胰岛素耐受性和高胰岛素血症。McLaughlin, T. 和 Reaven, G., *Geriatrics* 55: 28-35, 2000。用适宜的药理学物质降低血压可减轻表现出所说的两种情况的患者的胰岛素耐受性迹象。降低升高的血压还可以改善患者的脂质情况。Weidmann, P. 等人, *Am. Heart J.* 125: 1498-1513, 1993。

血压增加独立地增加了动脉粥样硬化的风险,推测其是通过促进

LDL 进入到皮下空间而造成的，并且其可加剧其它代谢异常。
Hornstra, G. 等人, Br. J. Nutr. 80: S 113-S 146, 1998。

对于 MS-X 的诊断而言, 用许多血液试验来测量葡萄糖、胰岛素、甘油三酯、胆固醇、尿酸、纤维蛋白原和 PAI-1 的水平。此外, 还应当测量血压和体重并对其进行评估。

目前, 试图对 MS-X 的所有因素进行治疗的唯一已知的治疗策略是减轻体重和锻炼。可以使用药物但是医生通常会鼓励 MS-X 患者改变其生活方式如减少其饮食中脂肪和油类的数量、避免将注意力放到甜食上、戒烟并避免过量饮酒。

除上述策略外, 一些研究小组已经公开了使用特定的药物来治疗 MS-X 以及其相关的并发症。下面是对其公开内容的简要概括。

US 专利 No. 6, 166, 049 公开了一种通过使用有效、无毒可药学有效量的过氧化物酶体增殖蛋白活化受体- γ 和- α (PPAR- γ 和 PPAR- α) 的激动剂来治疗或预防人或非人的哺乳动物的综合征 X 的方法。由于增强了低血脂的作用, 在 PPAR- γ 抗高血糖药中包含 PPAR- α 将在综合征 X 的病因学中产生一种增强的治疗可能的试剂。在所说化合物对遗传性糖尿病小鼠血糖和血浆脂质的效力方面, 该发明提供了一个预示性实例。

US 专利 No. 6, 197, 765 公开了一种对 MS-X 以及其包括糖尿病并发症在内的相关并发症进行治疗, 其是通过给药一定剂量的二氮嗪 (diazoxide) 以抑制胰岛素和胰岛素原的释放、降低体重、减少循环中胆固醇和甘油三酯的水平、降低血压并防止和逆转糖尿病并发症来进行的。

US 专利 No. 6, 410, 339 公开了具有糖皮质激素和/或盐皮质激素作用的合成皮质甾醇激动剂例如地塞米松用于制备诊断 MS 以及其相关并发症如腹部肥胖、包括形成老年糖尿病即 II 型糖尿病风险在内的胰岛素耐受性、高血脂和高血压的系统的系统的应用。在与正常值相比, 对患有 MS 的个体自体产生的皮质甾醇的抑制作用中得到一种差异的情况下, 皮质甾醇激动剂的给药是间歇进行的。

Fryburg 等人的 US 申请序号 20020165237 的教导了选择性环尿苷单磷酸 (cGMP) 特异性 5 型磷酸二酯酶抑制剂如昔多芬用于治疗胰岛素耐受性综合征 (IRS) 的应用。已经表明昔多芬在雄性勃起功能障碍的

治疗中有效。昔多芬增加了一氧化氮 (NO) 衍生的 cGMP 的细胞内浓度。这种积聚将放大可获得的一氧化氮和胰岛素的血管舒张 (vasodilatory)、代谢、以及抗-致动脉粥样硬化作用。根据该发明的发明人, 该类治疗可在血压和/或血糖和/或脂质和/或尿酸、和/或促凝血因子方面产生临床相关的改善。这种治疗可以单独进行或者可以与能改善 IRS (其应当又能降低一些患者形成心血管疾病的风险) 以及个体病症的其它并发症 (非限制性地包括糖尿病性神经病、肾病、和视网膜病) 的其它治疗剂联用。

Plata-Salaman 等人的 US 申请序列号 20020037861 A1 公开了抗惊厥剂衍生物在预防形成 II 型糖尿病和综合征 X 中的应用。已经在人癫痫病的临床试验中证明了所说抗惊厥剂衍生物中的一种, 2,3 : 4,5-二-O-(1-甲基亚乙基)- β -D-吡喃果糖氨基磺酸酯 (被称为托吡酯) 可有效作为简单和复杂的癫痫部分发作和其次的全身发作治疗中的附加疗法或单一疗法。使用一种纯合的糖尿病小鼠模型 (ob/ob), 与没有给予托吡酯的对照 ob/ob 小鼠相比, 用托吡酯进行治疗显著降低了血糖、甘油三酯、以及胰岛素和糖基化血红蛋白的水平。根据该发明的发明人, 这些发现证明托吡酯可降低或阻止与综合征 X 有关的病理生理学迹象。此外, 托吡酯对糖尿病情况的改善不依赖于体重的降低。

虽然已经证明药物治疗可有效降低和治疗胰岛素耐受性、成人发作型糖尿病、以及 MS-X 及其相关并发症, 但是其产生了一些副作用, 如体重增加、水潴留、轻微的心脏事件和低血糖风险、包括恶心、肠胃胀气、以及腹泻在内的胃肠道问题、乳酸性酸中毒、维生素 B12 和叶酸吸收减少、以及铁吸收减少。

因此, 需要提供一种改良的避免了这些副作用或将这些副作用最小化了的治疗上述情况的方法。仍然需要提供用于治疗这些病症的早期方法以避免出现上述高成本和使残废的变性病症。

发明概述

本发明是以通过静脉内给予本文所述类型的脂质体对哺乳动物个体进行治疗在具有可以忽略的副作用或没有副作用的情况下导致降低了胰岛素耐受性并改善了成人发作型糖尿病、和代谢综合征 X 以及其

相关并发症的症状的发现为基础的。

在一个常规的实施方案中,用该方法来对患有上述病症的哺乳动物个体进行治疗,这是通过其降低了哺乳动物个体血糖、胰岛素、总胆固醇、LDL 胆固醇、甘油三酯、肌酸激酶(CK)、肌酸激酶-MB(CK-MB)、
5 Hb-A_{1c}、脂蛋白(a)、SGOT 和 SGPT 中一种或多种的水平所证实的。在一个优选的实施方案中,该方法包括给哺乳动物个体静脉内给药治疗有效量的主要包含磷脂类的脂蛋白小单室脂质体(small unilamellar vesicles)(SUVs)的脂质体混悬液。

在一方面,该脂蛋白 SUVs 的脂质体混悬液包含选自磷脂酰胆碱、
10 磷脂酰甘油和磷脂酰丝氨酸的磷脂类。另一方面,所说的磷脂酰胆碱是 1-棕榈酰,2-油酰磷脂酰胆碱和 1-棕榈酰,2-亚油酰(linoleoyl)磷脂酰胆碱并且可以衍生自蛋类。

在另一个实施方案中,该脂蛋白 SUVs 主要包含转变温度低于约 37 °C,优选约-10 至 24 °C 的磷脂酰胆碱。该脂蛋白 SUVs 脂质体混悬液
15 进一步以小于约 40 摩尔百分比的数量包含鞘磷脂、胆固醇或其它甾醇。在另一个实施方案中,该脂蛋白 SUVs 是空白的。

在一个实施方案中,将该脂质体混悬液以约 50 mg-1 g 总脂质/kg 体重,优选约 200-450 mg 总脂质/kg 体重的剂量每周一至三次地给药于患有上述病症的哺乳动物个体。可以通过静脉内注射或静脉内输注
20 来完成所说的给药。

根据下面本发明的详细描述,本发明的特征和细节对本领域技术人员而言将变得更明见并且更易于被本领域技术人员所领会。

本发明的详细描述

25 I. 定义

在下面的描述中广泛使用了许多术语。提供下面的定义以帮助理解本发明。

除非另外说明,否则一个(“a”或“an”)表示“一个或多个”。

“哺乳动物个体”指的是兽医动物或人。

30 “糖基化或糖化血红蛋白(Hb-A_{1c})”指的是葡萄糖分子以一种非酶的方式附加到其上的正常的血红蛋白。糖化血红蛋白的百分比与血红细胞和葡萄糖的接触时间以及葡萄糖浓度直接成比例。糖化血红蛋

白份数的测量给出了一种在最后 60 天中细胞半衰期过程中平均血糖浓度的综合描述。Hb-A_{1c} 通常是以总血红蛋白百分比的形式被给出的。对葡萄糖具有正常耐受性的个体中的 Hb-A_{1c} 水平具有 4.3% 至 6.3% 的正常范围 (Peters, A. L. 等人 J. Am. Med. Assoc. 276: 1246-52, 1996)。

“血清谷氨酸-草酸乙酰转氨酶” (“SGOT”) 或天冬氨酸氨基转移酶” (“AST”) 是一种主要在肝、心、肾、胰腺、和肌肉中发现的酶。其在患有肌肉疾病, 心肌损伤和肾梗死的患者中升高。在维生素 B 不足和怀孕时可以发现其水平降低。其正常值范围为 0-50 U/l。最理想的成人读数为 21 U/l。

“血清谷氨酸-丙酮酸转氨酶” (“SGPT”) 或丙氨酸氨基转移酶” (“ALT”) 是一种主要在肝中发现的酶, 但是在心和其它组织中也可以找到这种酶。在充血性肝情况中看到 SGPT 降低同时胆固醇水平升高。在单核细胞增多症、酒精中毒、肝损害、肾感染、化学污染或心肌梗死中看到其水平升高。正常值范围为 0-41 U/l。最理想的成人读数为 24 U/l。

“C-反应性蛋白” (“CRP”) 是一种存在于许多急性炎症情况中的蛋白并且在心血管疾病中是一种重要的风险因子。更高的 CRP 水平可能在腹部肥胖和 II 型糖尿病或 AOD 的发作中起一定作用。CRP 的正常范围为 0-0.5 mg/dl。

“肌酸激酶” (“CK”) 是一种在心、脑、和骨骼肌中发现的酶。当肌肉或心细胞受损时血液 CK 水平升高。CK 主要以三种被称为同工酶的形式存在, 即: (1) CK-MB (主要存在于心肌中); (2) CK-BB (主要存在于脑中); 和 (3) CK-MM (存在于心脏和其它肌肉中)。对患有胸痛的人的 CK-MB 水平和总 CK 水平进行测试以确定其是否具有心脏病发作。因为总 CK 水平将表明对心脏或其它肌肉的损害, 所以高 CK-MB 表明该损害是对心肌的损害。CK 和 CK-MB 的正常范围分别为 0-195 U/l 和 0-24 U/l。

“葡萄糖耐受不良” 指的是机体不能利用血液循环中的葡萄糖。在糖尿病和内分泌病症如多囊性卵巢综合征中葡萄糖耐受不良增加。

“胰岛素” 指的是有助于葡萄糖从血液向细胞往返运送的激素。被称为胰岛的胰腺区域中的 β 细胞通常制造胰岛素。

“胰岛素敏感性”(或“胰岛素感受性”)是正常和优选状态,其中机体细胞保持对胰岛素作用的敏感性(或感受性)并且对胰岛素作用有响应。

5 “胰岛素耐受性”指的是一种其中异常高的葡萄糖水平使得胰岛素增加以从血流中除去这种糖的状态。机体细胞常常开始忽视高胰岛素水平并且因此变得对该激素的作用有抵抗力。胰岛素耐受性使得葡萄糖水平升高并且保留在高水平。但是,其不总是导致糖尿病。

高血压被定义为血压升高。

10 血脂障碍被定义为血浆甘油三酯升高和/或低高密度脂蛋白(HDL)胆固醇浓度。

肥胖被定义为高体重指数(BMI)和/或高腰臀比。

“脂质替代疗法”指的是其中该治疗改变了组织培养物以及整个生物体中的细胞膜组成的治疗,所说的生物体特别是非限制性的是红细胞、血管、心细胞和肾细胞,其改变方式为使得胆固醇与磷脂摩尔比以及鞘磷脂与磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine)摩尔比降低并将其恢复至在年轻细胞或年轻生物体组织中发现的值的该类方式。

“空白”脂质体指的是不包含所捕获或包封的药物的脂质体。

20 “小单室脂质体(SUVs)”指的是主要具有 20 至 120 nm 粒度的小单-双层脂质体。本发明的 SUVs 可以是空白的。其包含磷脂类,优选选自磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油、和磷脂酰丝氨酸的磷脂类。该磷脂酰胆碱可以是卵磷脂酰胆碱。

25 短语“毫克或克总脂质/kg 体重”指的是每公斤体重以毫克或克为单位包含脂蛋白 SUVa 的总脂质数量。总脂质可以包括磷脂酰胆碱、鞘磷脂、胆固醇、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油或本发明中描述的其它脂质。

对疾病状态的“显著改善”是在疾病状态中通过临床或生物化学指示器表现出来的可测量的改善程度。一般而言,疾病状态的显著改善是一种可以使得已知与所说疾病状态相关的参数改善至少五个百分比的状态。

30 这里所用的术语“血糖、胰岛素、总胆固醇、LDL 胆固醇、和甘油三酯升高”指的是当在一周内的各种时间进行测量时平均高于正常平均浓度的血糖、胰岛素、总胆固醇、LDL 胆固醇、和甘油三酯的浓

度。葡萄糖的正常范围一般为 55-115 mg/dl;甘油三酯为 0-200 mg/dl;总胆固醇为 00-200 mg/dl;和 LDL 胆固醇为 0-155mg/dl。

“口服葡萄糖耐受性试验(OGTT)”指的是在 2-3 小时的时期内测量四至五次葡萄糖水平的两至三小时葡萄糖耐受性测试。给患者使用口服剂量的葡萄糖溶液(75 至 100 克极甜的饮料),其应在第一个小时

5 中使葡萄糖水平升高,然后,随着机体产生用于将葡萄糖水平正常化的胰岛素而在两至三个小时内回落至正常水平。用这种试验来确诊糖尿病或妊娠糖尿病(和诊断其它代谢疾病)。

OGTT 是一种比禁食血浆葡萄糖试验更敏感的试验,并且涉及多次取血以对胰岛素的产生进行监测,其常常可发现禁食试验可能不能发现的轻度糖尿病情况。最常用的试验方案包括 Wilkerson 点系统;Fajans-Conn 系统、或 the National Institutes of Health(NIH)系统。平均而言,正常葡萄糖水平一般在给药口服剂量葡萄糖后 30 分钟至 1 小时达到 160-180 mg/dl 的峰值,然后,应在 2 至 3 小时内回

10 复至 140 mg/dl 或更低的禁食水平。诸如年龄、体重和种族之类的因素可影响这些结果,正如最近的疾病和进行某些药物治疗可以影响结果一样。例如,年龄高于 50 岁的老年个体每年将葡萄糖耐受性的上限将增加 1 mg/dl。迅速升高到正常水平之上(即,200 mg/dl 或更高)并需要更长的时间来被正常化的葡萄糖水平通常表明患有糖尿病。

20 胰岛素耐受性是通过单独测量胰岛素水平-禁食时的水平,或用葡萄糖耐受试验加胰岛素(有时被称为 IGTT)被诊断出来的。可以仅基于血糖水平诊断出糖尿病。

口服葡萄糖耐受性试验-葡萄糖和胰岛素值

时间 (小时)	正常葡 萄糖值	正常胰 岛素值	结果的解释
禁食	<126 mg/dl	<10 mIU/ml	正常葡萄糖结果为 70-90, 111 或高于其是损害, 126 或高于其是糖尿病。胰岛素水平高于 10 表明胰岛素耐受性。
0.5	<200 mg/dl	40-70 mIU/ml	一种真实的正常葡萄糖响应将不超过 150。
1	<200 mg/dl	50-90 mIU/ml	一些人想将葡萄糖阈值降至<180 以确定早期糖尿病。胰岛素>80, 或禁食水平的 5 倍水平(即, 禁食为 11, 然后 1 小时后>55)表明胰岛素耐受性
2	<140 mg/dl	6-50 mIU/ml	一种真实的正常葡萄糖响应为 110 或更低。胰岛素>60 是 IR。
3	<120 mg/dl		
4	<120 mg/dl		

虽然不希望受到特定理论的束缚, 但本发明的发明人发现已知一种可有效量治疗与年龄有关的情况如心脏病的脂质体混悬液也能用于治疗胰岛素耐受性、成人发作型糖尿病和代谢综合征-X 以及其相关并发症。该治疗使用与现有技术中已知方案相似的方案。但是, 正如对普通医师而言是明显的那样, 必需对这种治疗进行调整以使其适于治疗胰岛素耐受性、成人发作型糖尿病和代谢综合征 X 以及其相关并发症。

II. 脂质体组合物的制备

本发明涉及将治疗性脂质体混悬液静脉内给药于患有胰岛素耐受性、成人发作型糖尿病、和代谢综合征 X 以及其相关并发症的个体。该脂质体混悬液包含脂蛋白小单室脂质体 (SUVs), 所说的小单室脂质体主要包含选自磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油、和磷脂酰丝氨酸的磷脂类。该磷脂酰胆碱可以是卵磷脂酰胆碱。在实施例和下面的部分中对本发

明脂蛋白 SUVs 的制备进行了说明。

A. 脂质体的制备: 组成

脂蛋白是主要负责脂质在血浆中的转运, 即甘油三酯和胆固醇酯形式的胆固醇在血浆中转运的高分子量的微粒。已知主要有五类天然存在的脂蛋白在血浆中循环, 其各自在脂质组成、载脂蛋白组成、密度、大小、以及电泳移动性方面有所不同。

各脂蛋白颗粒是由非极性的核区域、包含少量胆固醇的周围的磷脂表面包衣组成并在表面暴露出来。脂蛋白颗粒在体内可以变得与负责与细胞膜上的受体结合并将该脂蛋白载体定位到其所需的代谢部位的载脂蛋白例如载脂蛋白 A 和 C 相缔合。

在一个优选的实施方案中, 所描述和在下面实施例中所用的该脂蛋白 SUVs 主要包含(高于 50 摩尔百分比, 优选高于 80-90 摩尔百分比)相转化温度低于约 37°C, 优选约-10 至 24°C, 例如约 5°C 的磷脂酰胆碱(PC)。

PC 磷脂包括这些具有胆碱部分并且其中该磷脂的脂肪酸链部分的长度和不饱和度可以发生变化的磷脂。此外, PC 磷脂还包括在体温下不是结晶状的合成 PCs(例如, 这些包含至少一个双键的物质)还有可以抵抗氧化的物质(例如, 这些不具有双键的物质, 如 1-棕榈酰, 2-油酰 PC (POPC))。PC 磷脂还可包括天然或合成磷脂, 其可以单独是磷脂或者可以是具有所补加或替换的仍然可以维持脂质体或胶束结构的疏水性或两亲性材料的混合物。

一种优选的囊泡组合物包括卵 PC, 其具有-5°C 的转变温度, 主要包含 1-棕榈酰, 2-油酰 PC 和 1-棕榈酰, 2-亚油酰 PC。或者, 可以从大鼠肝脏中分离出磷脂酰胆碱(Newman, H. A. I. 等人, J. Lipid Res. (1961) 2: 403-11), 然后用氧化铝对其进行纯化(Shinitzky, M. 等人, J. Biol. Chem. (1974) 249: 2652)。

该脂蛋白 SUVs 可以完全由卵 PC 组成, 或者可以包含其它脂质组分, 所说的其它脂质组分(i)不是致免疫性的, (ii)不会组成具有高相转化温度脂质的主要部分, 即. 高于 25-50 摩尔百分比。另外的组分可以包括负电荷的脂质, 如磷脂酰甘油(PG)或磷脂酰丝氨酸(PS)。加入 PG 将使得该 SUVs 荷负电或使该脂蛋白 SUVs 的其它组分荷电以防止在储

存期间发生聚集。如果该脂蛋白 SUVs 完全是由 PC 组成的,则对于 PC 而言, PG 和 PS 的摩尔百分比低于 1%。但是, 如果 PC 不是该脂蛋白 SUVs 的主要组分, 则对于 PC 而言, PG 和 PS 的摩尔百分比将高于 1%。该脂蛋白 SUVs 还可以以优选低于约 40 摩尔百分比的数量包含鞘磷脂 (SM)、胆固醇或其它甾醇类物质。其它组分还可以包括二酰基甘油、
5 磷脂酰肌醇、被氧化的脂质、溶血磷脂酰胆碱、以及蛋白类物质, 如磷脂转移蛋白 (PLTP; 见生物膜的结构和功能 (Biomembranes Structural and Functional Aspects), M. Shinitzky (主编), 1994, 第 40 页) 和氨基磷脂质 (amniophospholipid) 移位酶 (也被称为 116-kd
10 Mg^{2+} ATPase (Morot, G. 等人, Biochemistry 28: 3456, 1989; Morot, G. 等人, FEBS Lett. 266: 29, 1990) 或被称为 32-kd 蛋白 (Schroit, A. J. 等人, Biochim. Biophys. Acta 1071: 313, 1991))。

在形成所说脂蛋白 SUVs 的脂质中还可以包含脂质保护剂, 如 α -生育酚、 α -生育酚醋酸盐、或 α -生育酚琥珀酸盐以保护该脂质组
15 分不受自由基的伤害。该类物质的摩尔百分比含量一般为约 0.5% 至 2%。可有利地向所说的脂蛋白 SUVs 中加入 α -生育酚以维持该脂蛋白 SUVs 中维生素 E 和多不饱和脂质间的平衡。或者, 可以制备该脂蛋白 SUVs 并将其储存在一种惰性气氛例如氮气、氩气等等中。

20 B. 未进行筛选的脂质体的制备

可以用许多方法来制备脂蛋白 SUVs, 并且已经对这些方法进行了广泛的评论 (Szoka, F. 等人, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. (1980) 9: 467)。一般而言, 这些方法制备了大小为约 0.02 至 10 微米或更大的大小不均匀的脂蛋白 SUVs。正如下面所讨论的那样, 本发明优选使用
25 相对较小并且在粒度上定义明确的脂蛋白 SUVs, 因此, 通常需要进行用于降低脂质体混悬液的大小和大小不均匀性的第二步加工步骤。

在形成实施例 1 所述的初始脂质体混悬液的一种优选方法中, 将成囊的脂质吸收到适宜的有机溶剂系统中, 所说的溶剂系统优选地位于硅化玻璃容器中, 然后将其在真空下或惰性气体下干燥从而形成一
30 种脂质膜。向该膜中加入一种水性混悬介质, 如无菌的盐水溶液, 然后搅动该容器 (例如, 在一种震动器上或使用一种超声波仪) 直至该脂质水合完全, 一般其在约 1-2 小时内水合完全。所加入的水性介质的数

量足以产生一种优选每 100 ml 介质包含约 5 至 30 g 总脂质，优选每 100 ml 介质包含 10 g 总脂质的最终的脂质体混悬液。

在水合阶段中，脂质水合形成大小为约 0.5 微米至约 10 微米或更大的多层脂质体 (MLVs)。一般而言，通过在更剧烈的搅动条件下对脂质进行水合可以使 MLVs 的大小分布略微朝向粒度更小的方向移动。

形成脂蛋白 SUVs 时所用的该水性介质可以包含能增强储存时脂质稳定性的水溶性物质。优选的稳定剂是铁-特异性三羟胺螯合剂，如去铁敏。在 US 4,797,285 中已经报道了用这种化合物来降低包含药物的脂质体中的脂质过氧化和自由基损害。简单地说，表明亲脂性自由基淬灭剂，如 α -生育酚和水溶性螯合剂的组合对脂质过氧化损害的保护比单独使用这些保护剂中的任何一种时的保护作用都好得多。水性介质中所包含螯合剂的摩尔数高于介质中游离铁的数量。一般而言，约 10-200 微摩尔的螯合剂浓度足以降低脂质过氧化和自由基损害。

15

C. 脂质体筛选: SUV 制备

优选地进一步对如上所述那样制备的脂蛋白 SUVs 混悬液进行处理以制备具有所需大小和大小均匀度的脂质体。

通常将该脂质体混合物筛选至获得所选择的小于约 1.2 微米并且优选地小于约 0.8 微米的大小范围的囊泡大小分布。这种大小范围内的脂质体可以容易地通过用深度过滤器过滤来灭菌。较小的囊泡还表现出在储存时较不易聚集的趋势，从而降低了在将本发明最后的脂质体组合物静脉内给药时严重血管阻塞问题的可能性。最后，具有低至亚微米范围粒度的脂蛋白 SUVs 具有更均匀的生物分布和药物清除特性。

25

优选的脂蛋白 SUVs，即，单-双层脂质体具有约 0.02 至 0.12 微米的大小。如于 1994 年 6 月 10 日提交的 US 6,235,308 中所述的那样，已经表明当静脉内给药时，SUVs 具有相对长的血循环半衰期。简单地说，如其中所述的那样，在 IV 注射后测量最高至 1,000 分钟血流中的脂质体滞留图表明即使在 1,000 分钟时在血液中仍然有相当数量的脂质体。

30

可以用一些技术以适于制备本发明脂蛋白 SUVs 的方式来降低脂

质体的大小和大小不均匀性。通过浴或探针超声对脂质体混悬液进行超声辐射产生了低至 SUVs 的渐进性粒度降低。

匀化是另一种依赖于剪切能量来将大脂质体破碎成小脂质体的方法。在典型的匀化操作中,使 MLVs 循环通过一种标准的乳匀器直至观察到所选择的脂质体大小,一般小于 0.1 微米。

通过小孔聚碳酸酯膜将脂质体挤出是一种将脂质体大小降低至具有相对明确定义的粒度分布的有效方法。如实施例 2 中所述的那样,根据该膜的孔大小,平均范围为约 0.03 至 1 微米。一般而言,使该混悬液循环通过该膜几次直至获得所需的脂质体大小分布。可以使该脂蛋白 SUVs 通过连续更小孔的膜被挤出,从而获得脂质体大小的逐渐降低。

可以用许多技术来测定脂质体粒度,包括电子显微镜检查、比较色谱(Bisgaier, C. L. 等人, J. Biol. Chem. (1989) 264 (2): 862-866)和半-弹性光散射。

进行了大小处理的脂质体混悬液可容易地通过用具有约 0.2 μ 颗粒分辨大小的灭菌膜如常规的 0.22 μ 深度滤器过滤来进行灭菌。如果需要的话,可以将该脂质体混悬液冷冻干燥以便储存并在使用前不久重组。

20 III. 治疗胰岛素耐受性、成人发作型糖尿病、和代谢综合征 X 以及相关并发症的方法

这一部分描述了涉及上述脂质体混悬液的静脉内给药的治疗方法。在所有这些方法中,该混悬液是以可以有效在所治疗情况中产生所需改善的剂量和给药频率被静脉内给药的。

25 优选的给药频率为每周一次、两次或三次。这些给药周期例如两周可以被一种洗脱(wash-out)期间断开,所说的洗脱期一般为 1-4 周。该治疗,例如,涉及重复给药和洗脱期的该治疗可以继续长期进行,可以持续进行几个月或更长时间。

在一个优选的实施方案中,以约 50 mg-1 g 总脂质/kg 体重/剂量,30 优选约 200-450 mg 总脂质/kg 体重/剂量的剂量将该脂质体混悬液每周给药一至三次。可以通过 i. v. (静脉内)注射或 i. v. 滴注(输注)来进行给药。可以将该脂蛋白 SUVs 混悬于无菌的盐水或营养的或包含

药物的缓冲剂或介质如葡萄糖/盐介质中来将脂质体治疗与其它胃肠外治疗相结合。

将该脂质体混悬液的给药持续进行至观察到出现该疾病显著和可测量的改善并且其中血糖、胰岛素、总胆固醇、LDL 胆固醇、甘油三酯、肌酸激酶(CK)、肌酸激酶-MB(CK-MB)、Hb-A_{1c}、脂蛋白(a)、SGOT 和 SGPT 中一种或多种的水平回落到正常范围内并且被显著降低。

如果被给药的数量是生理学上有显著意义的数量,则认为脂质体混悬液被以“治疗有效量”给药。如果其存在在接受个体的生理学中产生了可察觉的改变,则其是生理学上有显著意义的。具体地讲,如果其降低了血糖、胰岛素、总胆固醇、LDL 胆固醇、甘油三酯、肌酸激酶(CK)、肌酸激酶-MB(CK-MB)、Hb-A_{1c}、脂蛋白(a)、SGOT 和 SGPT 中一种或多种的水平,则本发明脂质体混悬液的给药量是生理学上有显著意义的。

具体实施方式

实施例

用下面的实施例对制备脂质体组合物和在本发明的治疗方法中使用该组合物的各种方法进行了举例说明。用这些实施例对本发明进行说明,而决不是以任何方式用其对本发明的范围进行限制。

材料

卵磷脂酰胆碱(卵 PC)可购自 Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) 或 Lipoid KG (Ludwigshafen, Germany)。测得该卵 PC 的纯度高于 99%。该卵 PC 脂肪酸组成与所报道的组成相似(Hertz, R. 等人, Chem. Phys. Lipid(1975) 15: 138)。该制剂的主要 PCs 包括 1-棕榈酰, 2-油酰 PC 和 1-棕榈酰, 2-亚油酰 PC。

实施例 1. 通过声处理进行的小单室脂质体的制备

将溶解于氯仿中的卵 PC 放置到一个 100 ml 容器中并将其在氮气的惰性气氛下干燥成一种薄膜。向该脂质膜种加入无菌盐水至约 100 mg/ml 的终浓度,并且在搅拌的情况下对该脂质膜进行水合。然后,用 Heat System Sonicator, Model 375W 在全值的 40-50% 的功率设定下

将所得的多层脂质体 (MLV) 混悬液在声浴上处理 1 小时。在进行声处理期间, 将该混悬液的温度维持在约 4℃下。通过在 100,000 g 下超速离心 1 小时将大囊泡或 MLVs 从该进行了声处理的混悬液中分离出来 (Barenholz, Y. 等人, Biochemistry (1977) 16: 2806)。然后, 将剩余的浓度为约 100 mg/ml 的 SUVs 混悬液过滤灭菌。

实施例 2 通过挤出进行的小单室脂质体的制备

在 GH 76-400 压力室 (Nucleopore) 中通过使其通过聚碳酸酯过滤器连续过滤挤出来制备位于 0.15 M NaCl 中的平均直径为 65 nm ± 10 nm 的人用卵 PC 的均匀的小单室脂质体 (SUVs) (Anselem, S., 等人, Gregoriadis, G. (主编). 脂质体技术 (LIPOSOME TECHNOLOGY), 第 501-524 页, CRC Press, Boca Raton, 佛罗里达州. (1993))。这些囊泡是空白 SUVs。

用 Nicomp 亚微米激光粒度分选机, 通过 Quasielectric 光散射或与之相当的方法来测量脂质体粒度。还可以用配有大小分布处理分析器的 Coulter model N4 亚微米颗粒分析器对其进行测定 (Barenholz 等人 In Gregoriadis, G. (主编), 脂质体技术 (LIPOSOME TECHNOLOGY), 第 524-607 页, CRC Press, Boca Raton, 佛罗里达州. (1993))。最后的挤出步骤是通过 0.05 微米孔的聚碳酸酯过滤器来进行的。卵 PC SUVs 应当是无菌和无热源的并且通过用无菌的 0.22 微米微孔过滤器过滤来对其进行灭菌。将其包装于 100 ml 透明的模塑成型的 I 类水解瓶中, 用氮气 (N) 排除空气, 用聚四氟乙烯包覆的标准塞子 (20 mm) 塞上, 并且用具有 PE-盘的 Alu-帽密封。

该终产物具有高于 99% 的纯度。在用 HPLC、GC/FID 或与之相当的方法进行测量时, 总杂质值为 NMT 1%。没有高于 0.3% 的单一杂质。在用 UV/VIS 光谱测定法在 234、268 和 278 nm 下测量时, 总氧化值为 NMT 1%。

下面是一些与最终的 SUV 脂质体产品有关的其它信息:

脂质浓度: 5-20%, 优选 10%。

化学稳定性: 水解和过氧化 <1%。

无菌: 通过了 FDA 要求的无菌溶液标准。每份试验样品 NMT 100 CFU。符合 USP 标准。

存储条件:

室温 (25℃, 60% RH)	冷藏温度 (4℃, 45% RH)	加速温度 (40℃, 75% RH)
1 周	1 周	1 周
		2 周
1 个月	1 个月	1 个月
2 个月	2 个月	2 个月
3 个月	3 个月	3 个月
6 个月	6 个月	6 个月

剂量方案: 50 mg-1 g 总脂质/kg 体重。

剂型: 用于静脉内输注的白色-淡黄色半透明分散体。

5 禁忌症: 对蛋类有变态反应; 具有溶血性红细胞。

不利作用: 没有发现不利作用。

脂质体浓度: 100 mg/ml

卵 PC 的脂肪酸组成(重量):

	棕榈酸	35.6 %
10	硬脂酸	12.6 %
	油酸	27.8 %
	亚油酸	17.9 %
	花生四烯酸	9.5 %
	鲱油酸	0.7 %
15	二十二碳六烯酸	2.0 %

完全的脂质体混悬液:

	10 g	磷脂, 其中:
	9.9 g	卵 PC,
	0.2-0.50 g	胆固醇和
20	0.05-2.0 g	鞘磷脂
	0.012 g	Desferal®
	0.9 g	氯化钠

无菌无热源的注射用水加至 100 ml。

实施例 3 另一种通过挤出进行的小单室脂质体的制备

通过用具有 SuporCap™ 和 SuporDCF™ 系列的用完即可丢弃的系列层滤器 (220 nm, 180 nm 和 80 nm) 的 Aviston EmulsiFlex-C50 匀化器用聚碳酸酯膜滤器过滤挤出来制备平均直径为 $60\text{ nm} \pm 5\text{ nm}$ 的人用卵 PC 的均匀小单室脂质体 s (SUVs)。这些囊泡是空白的 SUVs。

用 Solvias AG, Basel, Switzerland 亚微米激光粒度分选机, 通过 Quasielectric 光散射或可与之相提并论的方法来对脂质体粒度进行测量。其还可以用配有大小分布处理分析器的 Coulter model N4 亚微米粒度分析器 (Barenholz 等人, Gregoriadis, G. (ed), 脂质体技术 (LIPOSOME TECHNOLOGY), 第 524-607 页, CRC Press, Boca Raton, 佛罗里达州. (1993)) 来测量。最后的挤出步骤是通过一种 $0.08\text{ }\mu\text{m}$ 孔聚碳酸酯膜滤器来进行的。卵 PC SUVs 应是无菌、无内毒素 (LAL) 和无热源的并且通过用无菌的 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 孔聚碳酸酯膜滤器过滤来对其进行灭菌。将其包装于 100 ml 透明的模塑成型的 II 类水解瓶中, 用氮气 (N) 排除空气, 用聚四氟乙烯包覆的标准塞子 (20 mm) 塞上, 并且用具有 PE-盘的 Alu-帽密封。

该终产物具有高于 99% 的纯度。在用 HPLC、GC/FID 或与之相当的方法进行测量时, 总杂质值为 NMT 1%。没有高于 0.3% 的单一杂质。在用 UV/VIS 光谱测定法在 215、233 和 279 nm 下测量时, 总氧化值为 NMT 1%。

下面是一些与最终的 SUV 脂质体产品有关的其它信息:

脂质浓度: 5-30%。

化学稳定性: 水解和过氧化 < 1%。

剂型: 用于静脉内输注的白色-淡黄色半透明分散体。

25 无菌: 通过了 FDA 要求的无菌溶液标准。每份试验样品 NMT 100 CFU。符合 USP 标准。

存储条件:

冷藏温度 (4℃, 45 % RH)
1 个月
2 个月
3 个月
5 个月
6 个月
7 个月

剂量方案: 50 mg-1 g 总脂质/kg 体重。

禁忌症: 对蛋类有变态反应; 具有溶血性红细胞。

5 不利作用: 没有发现不利作用。

该卵 PC 的脂肪酸组成(重量):

	棕榈酸	35.6 %
	硬脂酸	12.6 %
	油酸	27.8 %
10	亚油酸	17.9 %
	花生四烯酸	9.5 %
	鯊油酸	0.7 %
	二十二碳六烯酸	2.0 %

完全的脂质体混悬液:

15	10 g	磷脂, 其中
	9.0 g	卵 PC (脂类 (Lipoid))
	0.2-0.5 g	胆固醇和
	0.05-2.0 g	鞘磷脂
	0.018 g	Desferal®
20	0.765 g	氯化钠 (Merck)
	0.279 g	L-组氨酸 (Fluka)

用 1 M 氢氧化钠或 1 M 盐酸将 pH 调至 6.5

88.9945 g 无菌无热源的水(终体积: 100 ml), 和氮气适量。

实施例4 脂质体治疗对胰岛素耐受性和成人发作型糖尿病患者的作用

患者1是身高为160 cm和体重为45 kg的62岁的老年女性。其具有预先知道的脂质代谢失调并且被确诊为具有17年病史的胰岛素-耐受性代谢患者。为了进行治疗, 5 5 3 中所述方法制备的完全的脂质体混悬液(20-50 滴/分钟), 每次输注两个90-ml 体积(400 mg 总脂质/kg 体重), 在30天内进行六次治疗。

患者1对该脂质体疗法具有十分良好的耐受性。其没有表现出任何不希望出现的副作用的迹象或症状。既使在治疗几周后, 其也没有出现任何主观的或临床上的不利症状。其实验室结果表明总胆固醇升高, 但是其LDL和胆固醇水平降低, 同时其脂蛋白(a)水平仍然维持在正常限度内。 10

在治疗前, 其糖化血红蛋白(Hb-A1c)水平表明葡萄糖代谢障碍轻微增加或者可能表现出来。在治疗后, 这种水平回落在正常范围内。

15 表1. 在治疗前和治疗后患者1的实验室结果:

试验	参考范围	治疗前	治疗后
甘油三酯	0-200 mg/dl	114 mg/dl	71 mg/dl
总胆固醇	100-200 mg/dl	349 mg/dl	312 mg/dl
LDL 胆固醇	0-155 mg/dl	219 mg/dl	206 mg/dl
HDL 胆固醇	35-55 mg/dl	107 mg/dl	92 mg/dl
葡萄糖	55-115 mg/dl	94 mg/dl	92 mg/dl
CK	0-195 U/l	102 U/l	84 U/l
CK-MB	3.9	N/A	N/A
Hb-A1c	4.4-6.1	5.6	5.8
脂蛋白(a)	0.3	0.11g/L	0.11 g/L

在用该脂质体治疗几周后, 通过使用适宜剂量的葡萄糖来进行一种口服葡萄糖耐受性试验, 在使用葡萄糖两小时后, 对血清葡萄糖水平和胰岛素分泌进行测量。结果表明葡萄糖水平和胰岛素分泌都增加并在使用葡萄糖两小时后达到正常水平。作为对照, 在进行该脂质体治疗之前三年所获得的结果表明在使用葡萄糖两小时后葡萄糖水平和胰岛素分泌都不能降落到正常水平。 20

下面表明了治疗前和治疗后口服葡萄糖耐受性的比较:

表 2.口服葡萄糖耐受性试验-葡萄糖和胰岛素值

	参考范围	治疗前五年	治疗前三年	治疗后
葡萄糖, 禁食	70 - 120 mg/dl	93	96	96
葡萄糖, 30 分钟	70 - 180 mg/dl	229	116	213
葡萄糖, 60 分钟	70 - 160 mg/dl	176	173	217
葡萄糖, 120 分钟	70 - 130 mg/dl	177	143	82
胰岛素, 禁食	3 - 15 μ U/ml	N/A	3.2	3.6
胰岛素, 30 分钟	10 - 74 μ U/ml	N/A	13.2	28.5
胰岛素, 60 分钟	30 - 71 μ U/ml	N/A	35.4	105.6
胰岛素, 120 分钟	10 - 48 μ U/ml	N/A	84.4	29.0

因此, 治疗改善了该患者的胰岛素耐受性。

实施例 5 脂质体治疗对一名代谢综合征-X 患者的作用

5 第 2 名患者是一名患有高血压和已知的脂质代谢病症的 51 岁的老年男性。其过重, 身高为 175 cm, 体重为 90 kg。其总胆固醇和甘油三酯的初始值十分高。但是, 其 LDL-胆固醇和 HDL-胆固醇在正常限度内。此外, 肝酶——SGPT 升高。

10 为了进行治疗, 给第 2 名患者静脉内输注 (20-50 滴/分钟) 根据实施例 3 所述的方法所制备的完全脂质体混悬液, 每次输注三个 90-ml 体积 (300 mg 总脂质/kg 体重), 在 19 天内治疗六次。

在治疗期间, 该患者的血压、脉搏频率和氧负载表现正常。没有不希望出现的作用的主观或临床症状。

15 治疗后的实验室值表明, 除 SGOT 部分正常化外, 总胆固醇和甘油三酯也降低 (见表 3), 其中治疗开始于 2002 年 5 月 10 日。

表 3. 治疗前和治疗后第 2 名患者的实验室结果

	参考范围	04/22/02	05/10/02	05/17/02	06/28/02	08/28/02	12/14/02
甘油三酯	0-200 mg/dl	314 mg/dl	798 mg/dl	614 mg/dl	342 mg/dl	332 mg/dl	195 mg/dl
总胆固醇	100-200 mg/dl	233 mg/dl	244 mg/dl	356 mg/dl	218 mg/dl	204 mg/dl	197 mg/dl
LDL胆固醇	0-155 mg/dl	125 mg/dl	48 mg/dl	185 mg/dl	103 mg/dl	94 mg/dl	108 mg/dl
HDL胆固醇	35-55 mg/dl	45 mg/dl	36 mg/dl	48 mg/dl	47 mg/dl	44 mg/dl	50 mg/dl
葡萄糖	55-115 mg/dl	101 mg/dl	85 mg/dl	105 mg/dl	110 mg/dl	100 mg/dl	107 mg/dl
CK	0-195 U/l	191 U/l	238 U/l	530 U/l	298 U/l	191 U/l	185 U/l
CK-MB	0-24 U/l		25 U/l	23 U/l			
CRP	0-0.5 mg/dl			0.2 mg/dl	0.0 mg/dl	0.0 mg/dl	0.0 mg/dl
SGOT	0-50 U/l	29.5 U/l	26.8 U/l	40.8 U/l	29.6 U/l	23.9 U/l	27.2 g/l
SGPT	0-41 U/l	50.7 U/l	46.6 U/l	62.6 U/l	57.5 U/l	42.8 U/l	39.5 g/l
脂蛋白(a)	<0.3 g/dl	0.688 g/l	0.5 g/l	0.59 g/dl	0.46 g/l	0.42 g/l	0.56 g/l
纤维蛋白原	200-400 mg/dl	243 mg/dl					
Hb-A1c	4.4-6.1%			5.6%			

就像各公开物特定和各自表明被引入本文作为参考那样，在本文所提及或引用的文章、专利、和专利申请、以及所有其它文件和可电子获得的信息在这里都在相同程度上被全部引入作为参考。申请人保留向本申请中实际引入得自任何该类文章、专利、专利申请、或其它文件的任何和所有材料和信息的权力。

本文所举例描述的本发明可以适宜地在不存在任何这里未特定公开的元素、限制的情况下实施。因此，例如，术语“包含”、“包括”、“含有”等等应被扩大和没有任何限制地理解。因此，本文所用的术语和表达被用作描述性而非限制性术语，并且不是要用该类术语和表达排除任何所示和所述特征的等同物或其一些部分，要意识到在本发明所要保护的范围内可进行各种修改。因此，应当清楚的是，虽然用优选的实施方案和任选的特征对本发明进行了特定公开，但是，本领域技术人员可以采用这里所公开的本发明中所包含的修改和变化，认为该类修改和变化也在本发明的范围之内。

在这里已经对本发明进行了广泛的和一般性的描述。落在该一般公开范围内的各更窄的种类和亚属组也形成了本发明的一部分。不管被排除的物质是不是这里所特定列举的，其包括本发明具有从该属中除去任何主题的附带或否定性限制的一般性描述。

此外，在根据马库什(Markush)基团对本发明的特征或方面进行描述的情况中，本领域技术人员将意识到本发明因此还可以该马库什基团的任何个别成员或成员的亚组的措词来进行描述。