(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 1691947 B
(45)授权公告日 2011.11.23

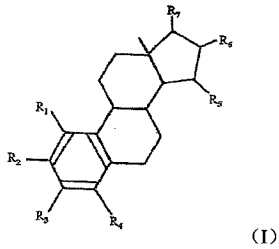
(21)申请号 03818849.X
(22)申请日 2003.06.11
(30)优先权数据
02077272.9 2002.06.11 EP
(85)PCT申请进入国家阶段日
2005.02.05
(86)PCT申请的申请数据
PCT/NL2003/000422 2003.06.11
(87)PCT申请的公布数据
WO2003/103684 EN 2003.12.18
(73)专利权人 潘塔希生物科学股份有限公司
地址 荷兰宰斯特
(72)发明人 埃弗特·约翰内斯·布恩舍滕
赫尔曼·扬·蒂杰门·科林格本宁克
克里斯琴·弗朗兹·霍林卡
(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司 72002
代理人 过晓东
(51)Int.Cl.
A61K 31/565(2006.01)
A61P 25/28(2006.01)
A61P 19/02(2006.01)
A61P 17/06(2006.01)
A61P 19/04(2006.01)
(56)对比文件
WO 0185154 A,2001.11.15, 说明书第6页第2段、第15页第3段、第13－15页、第17－19页,第28－32页,权利要求14、15、33.
WO 0063228 A,2000.10.26, 权利要求1、15、49－50.
审查员 刘鹏
权利要求书 1 页 说明书 26 页

(54)发明名称

雌激素成分在制备用于治疗或预防免疫介导的疾病中的应用以及包含所述雌激素成分的药物组合物

(57)摘要

本发明的一个方面涉及治疗或预防哺乳动物中免疫介导的疾病的方法,所述的方法包括向所述的哺乳动物给药治疗有效量的雌激素成分,其中雌激素成分选自以下组中:下式(I)代表的物质,其中,R_1、R_2、R_3、R_4独立地为氢原子、羟基或1-5个碳原子的烷氧基;R_5、R_6、R_7都是羟基;R_1、R_2、R_3、R_4中的不超过3个为氢原子;当在本方法中使用时能够释放出如前式所示的物质的前体;以及一种或多种前述物质和/或前体的混合物。本发明的另一方面涉及一种包含前述的雌激素成分、免疫治疗剂和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。



(I)

CN 1691947 B

1. 雌激素成分在制备药物组合物中的应用，所述的雌激素成分选自，

雌四醇；

雌四醇的衍生物，其中至少一个羟基的氢原子已经被以下基团取代：含有 1-25 个碳原子的羧酸、磺酸或氨基磺酸的酰基；四氢呋喃基；四氢吡喃基；或每个残基含有 1-20 个糖苷单元的直链的或支链的糖苷残基；以及

雌四醇和所述衍生物或衍生物的混合物的混合物；

所述的药物组合物用于治疗或预防哺乳动物中免疫介导的疾病的方法中，所述免疫介导的疾病选自：多发性硬化、类风湿性关节炎、骨关节炎、胰岛素依赖性糖尿病（I 型糖尿病）、全身性红斑狼疮、银屑病，以及所述的方法包括向所述的哺乳动物给药治疗有效量的雌激素成分。

2. 根据权利要求 1 的应用，其中所述的方法包括在一段为期至少 5 天的时间内不间断地给药所述雌激素成分。

3. 根据权利要求 2 中的应用，其中所述的方法包括在一段为期至少 30 天的时间内不间断地给药所述雌激素成分。

4. 根据权利要求 1-3 中的任一项的应用，其中所述的方法包括口服或皮下给药所述雌激素成分。

5. 根据权利要求 4 的应用，其中所述的方法包括口服给药。

6. 根据权利要求 1-3 中的任一项的应用，其中所述雌激素成分以至少为 1μg/kg 体重 / 天的量给药。

7. 根据权利要求 6 的应用，其中所述雌激素成分以至少为 5μg/kg 体重 / 天的量给药。

8. 一种药物组合物，它包含在权利要求 1 中定义的雌激素成分、免疫治疗剂和药物学可接受的赋形剂。

9. 根据权利要求 8 的药物组合物，其中所述的剂型包含至少 10μg 的所述雌激素成分。

10. 根据权利要求 8 或 9 的药物组合物，其中所述的剂型包含至少 1μg 的所述免疫治疗剂。

11. 根据权利要求 8-9 中的任一项的药物组合物，其中所述的免疫治疗剂选自以下组中：抗炎药、D- 青霉胺、4- 氨基喹啉药、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤、环孢霉素，维生素 D、1α，25- 二羟基维生素 D_3、1α，25- 二羟基维生素 D_2，硫代苹果酸钠金、金硫葡糖和金诺芬。

12. 口服单位剂型，其包含根据权利要求 8-11 中的任一项的药物组合物。

雌激素成分在制备用于治疗或预防免疫介导的疾病中的应用以及包含所述雌激素成分的药物组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及通过向哺乳动物给药有效量的雌激素成分治疗或预防哺乳动物免疫介导的疾病的方法。该方法特别适用于治疗或预防 T 淋巴细胞介导的疾病和 / 或慢性炎性疾病，包括但不限于自身免疫疾病如多发性硬化、类风湿性关节炎、骨关节炎、胰岛素依赖性糖尿病（I 型糖尿病）、全身性红斑狼疮和银屑病，由感染物诱导的免疾病理如蠕虫（例如利什曼病）和某些包括 HIV 的病毒性感染，以及由细菌性感染诱导的免疾病理，包括莱姆病、结核病和瘤型麻风，移植排斥、移植物对抗宿主疾病和特异反应性病症，如哮喘和过敏症，包括过敏性鼻炎、包括食物过敏的胃肠过敏反应，嗜酸粒细胞增多、结膜炎和肾小球肾炎。

[0002] 本发明的另一方面涉及在上述方法中使用的药物组合物，其中该组合物包含雌激素成分、免疫治疗剂和药物学可接受的赋形剂。

[0003] 背景技术

[0004] 雌性性激素在各种免疫介导的疾病中的作用已成为许多科技文献的主题。已经认识到，如多发性硬化和类风湿性关节炎的自身免疫疾病优先影响女性 (Jansson 等，Inflamm Res 1998 Jul ;47(7) :290-301)。另外，还发现在妊娠期，当雌性性激素的水平较高时，细胞介导的自身免疫疾病通常会出现临床症状的缓解，而当分娩后性激素水平降低时，常发现疾病恶化 (Kim 等，Neurology 1999 Apr 12 ;52(6)1230-1238)。而且已经报导，异常高比例的多发性硬化患者的尿中促性腺激素和雌激素值降低 (Poser 等，Geburtshilfe Frauenhielkd 1981 May ;41(5) :353-358)。

[0005] 用去势小鼠进行进一步研究证明，以诱导在妊娠后期可见的血清水平的量给药雌二醇和雌三醇，会延迟实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) 的发病，EAE 是一种 Th1 细胞依赖性自身免疫疾病，用作多发性硬化的模型 (Jansson 等，Inflamm Res 1998 Jul ;47(7) :290-301)。使用 DNA 微阵列评价 17β - 雌二醇对 EAE 基因表达的作用的结果揭示了有限组的已知的和先前未为人知的雌二醇敏感性基因可能对于抑制EAE和潜在的人类疾病——多发性硬化——是至关重要的 (Matejuk 等，Endocrinology 2002Jan ;143(1) :313-319)。

[0006] WO 01/185154 涉及一种通过向哺乳动物给药低剂量的雌激素，特别是低剂量的 17β - 雌二醇、雌三醇或雌酮来改善 Th1 介导的哺乳动物免疾病理的方法。低剂量的这些雌激素被认为是避免高水平的雌激素对生殖系统和循环系统的潜在副作用以及在雄性中预防不良的副作用所必需的。

[0007] 前述的雌激素 17β - 雌二醇、雌三醇和雌酮共同之处为它们都是女性身体内源性的，即它们是生物生成的雌激素。这些生物生成的雌激素表现出严重的药物动力学缺陷。它们的口服生物利用度非常低，并且明显地因人而异，这意味着不能提供通用的推荐剂量。另外一个相关的问题是这些雌激素会很快地从血液中消除。例如，主要的人体生物生成的雌激素 17β - 雌二醇的半衰期为约 1 小时。结果，在间隔（每天）给药事件之间，该生物生成的雌激素的血清水平容易明显地波动。这样，给药后很短的时间内，血清浓度通常比最优浓

度高出数倍。另外，如果拖延下一次给药事件，血清浓度会迅速降低到雌激素不再具有生理活性的水平。

[0008] 除了药物动力学问题外，已知的雌激素还表现出药效学缺陷。从肠腔吸收后，口服给药的活性组分通过肝脏进入机体。该事实对于雌激素药物是特别重要的，因为肝脏是雌激素的靶器官；口服雌激素导致肝中的强烈的雌激素作用。由人肝脏中的雌激素控制的分泌功能包括增加合成转运蛋白 CBG、SHBG、TBG、对血液凝结的生理功能重要的几种因子和脂蛋白。如果将生物生成的雌激素导入雌性机体中且避免通过肝脏 （例如通过透皮给药），所述的肝功能大部分没有改变。当口服应用时给药治疗等效剂量的常见生物生成雌激素会导致明显的肝参数反应，如 SHBG、CBG、血管紧张素原和 HDL（高密度脂蛋白）的升高。

[0009] 因此，需要雌激素物质，它们：

[0010] (a) 在治疗免疫介导的疾病的方法中比前述生物生成的雌激素更有效；和 / 或

[0011] (b) 具有比前述生物生成的雌激素明显更长的半衰期；和 / 或

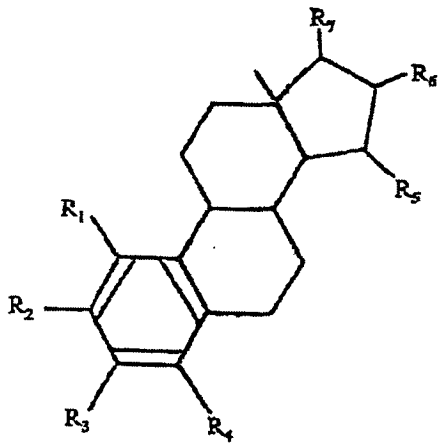
[0012] (c) 可以口服给药，且不会对肝造成明显的影响；和 / 或

[0013] (d) 比前述生物生成的雌激素产生更少的不良的副作用。

发明内容

[0014] 发明人意外地发现，下式代表的雌激素物质能够满足这些要求：

[0015]



(I)

[0016] 其中，R_1、R_2、R_3、R_4 独立地为氢原子、羟基或含有 1-5 个碳原子的烷氧基；R_5、R_6、R_7 各自是羟基；且 R_1、R_2、R_3、R_4 中的不超过 3 个为氢原子。

[0017] 该组雌激素物质的已知的代表是 1,3,5(10)- 雌三烯 -3,15α,16α,17β - 四醇，也被称作雌四醇 (estetrol 或 oestetrol) 和 15α - 羟基雌三醇。雌四醇是在人类妊娠期间由胎儿肝脏生成的雌激素。未结合的雌四醇在母体血浆中的水平在足月妊娠中达到顶峰约 1.2ng/ml，且在胎儿中的水平比在 母体血浆中高约 12 倍 (Tulchinsky 等，1975. J. Clin. Endocrinol. Metab.，40，560-567)。

[0018] 1970 年，Fishman 等人在“Fate of 15α-hydroxyestriol-^{3}H in Adult Man”，J Clin Endocrinol Metab(1970)31，436-438 中报导了研究结果，其中将氚标记的 15α - 羟基雌三醇（雌四醇）经静脉给药于两个成年妇女。发现雌四醇作为葡糖苷酸酯迅速、彻底地从尿中排出，并且事实上除了结合以外没有发生代谢。

[0019] 在1975和1985年之间，几位研究人员研究了雌四醇的属性，并报导了其雌激素效力和亲子宫活性。在此期间公开的最相关文献如下：

[0020] ● Levine 等，1984.Uterine vascular effects of estetrol in nonpregnantewes.Am.J.Obstet.Gynecol.，148：73，735-738：“当由静脉向未怀孕的母羊给药雌四醇时，其在子宫血管舒张中的效力比雌三醇和17β-雌二醇低15～30倍”；

[0021] ● Jozan 等，1981.Different effects of oestradiol，oestriol，oestetrol andof oestrone on human breast cancer cells(MCF-7)in long termtissue culture.Acta Endocrinologica，98，73-80：“雌四醇在体外细胞增殖中的激动效力是17β-雌二醇所观察到的大小的2％”；

[0022] ● Holinka 等，1980.Comparison of effects of estetrol and tamoxifenwith those of estriol and estradiol on the immature rat uterus.Biol.Reprod.22，913-926：“皮下给药雌四醇具有非常弱的亲子宫活性，且其效力被认为低于17β-雌二醇和雌三醇”；

[0023] ● Holinka 等，1979.In vivo effects of estetrol on the immature ratuterus.Biol.Reprod.20，242-246：“皮下给药雌四醇具有非常弱的亲子宫活性，且其效力被认为低于17β-雌二醇和雌三醇”；

[0024] ● Tseng 等，1978.Heterogeneity of saturable estradiol binding sites innuclei of human endometrium.Estetrol studies.J.Steroid Biochem.9，1145-1148：“雌四醇向人子宫内膜中的雌激素受体的相对结合 是17β-雌二醇的1.5％”；

[0025] ● Martucci等，1977.Direction of estradiol metabolism as a control ofits hormonal action-uterotrophic activity of estradiol metabolites.Endocrin.101，1709-1715：“雌四醇从皮下储库型制剂连续给药显示出非常弱的亲子宫活性，且其效力被认为低于17β-雌二醇和雌三醇”；

[0026] ● Tseng 等，1976.Competition of estetrol and ethynylestradiol withestradiol for nuclear binding in human endometrium.J.SteroidBiochem.7，817-822：“雌四醇的人子宫内膜雌激素受体相对结合常数是17β-雌二醇（100％）的6.25％”；

[0027] ● Martucci 等，1976.Uterine estrogen receptor binding of catecholestrogens and of estetrol(1，3，5(10)-estratriene-3，15α，16α，17β-tetrol).Steroids，27，325-333：“雌四醇大鼠子宫胞液雌激素受体相对结合亲和力是17β-雌二醇（100％）的0.5％。而且，雌四醇大鼠子宫细胞核雌激素受体相对结合亲和力是17β-雌二醇（100％）的0.3％”。

[0028] 所有的上述文献的共同点是，作者们已经研究了雌四醇的雌激素效力。没有例外，它们都表明雌四醇是弱雌激素。在一些引用的文献中，已经发现雌四醇的雌激素效力比广泛应用且相对较弱的雌激素17β-雌二醇的效力低许多。考虑到这些发现，就不会对这一情形感到奇怪了：自上世纪八十年代早期以来人们对雌四醇的兴趣已经减少，并且此后再没有发表关于雌四醇的性质的文献。

[0029] 发明人已经意外地发现，尽管它的效力低，雌四醇和相关的雌激素物质可以有利地用在治疗免疫介导的疾病的方法中。尽管发明人不想受理论的约束，还是确信本发明的

雌四醇类物质的意外功效是来自下述因素的组合：这些物质的意外有利的药效学和药物动力学性质，它们对雌激素受体 α（ERα）的亲和力比对雌激素受体 β（ERβ）的亲和力更高。后一特征是在本发明中使用的雌激素物质的独特特征。

[0030] 关于本发明的雌激素物质的药物动力学性质，发明人已经发现，它们的体内半衰期明显地比其它生物生成的雌激素长。因此，即使雌四醇和雌四醇类物质具有相对低的雌激素效力，它们也可以有效地用于治疗免疫介导的疾病的方法中，因为如半衰期长所证明，它们的低效力通过相对高的代谢稳定性得以弥补。

[0031] 发明人认为，本发明的雌激素物质对 ERα 受体相对高的亲和力，或相反地对 ERβ 受体相对低的亲和力，在一定程度上与本发明物质在治疗免疫介导的疾病中的高功效相关。但是，尽管正努力对该领域进行科学研究，如下文将要说明的，仍不清楚控制负责该功效的 ER 信号通道的机制。

[0032] 已知大多数雌激素能结合两种 ER，在存在组织特异性的辅激活物和 / 或辅阻遏物的条件下，ER 与基因调节区的雌激素反应元件或其它的转录因子结合。考虑到 ER 信号以及 ERα 和 ERβ 及其辅因子的组织特异性表达的复杂性，现在已经认识到，ER 配体能以组织特异性的方式作为雌激素激动剂或者甚至雌激素拮抗剂起作用。

[0033] 还已知 ERα 和 ERβ 受体在配体结合域和羧基端转活性域具有明显不同的氨基酸序列（约 56％的氨基酸相同），在它们的氨基端转活性域仅有 20％的同源性。这解释了为什么有些配体对一个受体的亲和力比对其它受体的更高。另外，与辅因子的相互作用可以导致单个配体的非常不同的生物学作用。换句话说，作为激动剂作用于 ERα 的配体不一定也作为激动剂作用于 ERβ，反之亦然。

[0034] 而且，现在已知雌激素通过基因表达调节细胞的药理学，雌激素的作用通过雌激素受体介导。雌激素受体在基因调节上的作用可以通过 ER 直接结合到雌激素反应元件上、ER 结合到其它转录因子如 NF-κB、C/EBPβ 上以及通过包含离子通道受体的非基因组作用来介导。最近几年的进展表明，ER 与辅激活物（例如 SRC-1、CBP 和 SRA）和辅阻遏物（例如 SMRT 和 N-CoR 有关联，它们也以组织特异性和配体特异性的方式调节 ER 的转录活性。另外，目前的证据表明，大多数雌激素调节的基因不具有典型的雌激素反应元件。在这种情况下，ER 与调节这些基因的关键性的转录因子相互作用。已知由 ER 调节其活性的转录因子包括，例如，AP-1、NF-κB、C/EBP 和 Sp-1。

[0035] 考虑到 ER 信号以及各种类型的表达 ER 及其辅因子的组织的复杂性，通常认为，ER 配体不能再简单地分成纯拮抗剂或激动剂。该观点得到了 Paech 等人（Science 277，1508-1510，1997）的发现的支持，他们已经报导，17β- 雌二醇在 ERα 存在下激活 AP-1 位点，但是在 ERβ 存在下则抑制该位点。相反地，ER 配体雷洛昔芬（Eli Lilly & Co.）和他莫西芬以及 ICI-182、780（Zeneca Pharmaceuticals）通过 ERβ 刺激 AP-1 位点，但是在 ERα 存在下则抑制该位点。

[0036] 如主要通过 RT-PCR 或原位杂交所分析的，已知 ERα 和 ERβ 具有重叠的和不同的组织分布。组织经常表达 ERα 和 ERβ 二者，但是受体位于不同的细胞类型中。另外，有些组织（例如肾）不含有 ERα，而其它组织（例如子宫、垂体和附睾）则存在大量的 Erα（Couse 等，Endocrinology138，4613-4621，1997；Kuiper 等，Endocrinology 138.，863-870，1997）。Erg（Korach，Science 266，1524-1527，1994）和 Erβ（Krege 等，Proc.

Natl.AcadSci.USA 95,15677-82,1998) 剔除小鼠的开发已经提供了进一步的证据,表明各个 ER 在不同的组织中具有不同的功能。

[0037] 总之,虽然尚不清楚本发明的雌激素物质发挥其有益效果的机制,显而易见的是,这些物质在至少两个相关方面与其它生物生成的雌激素不同。首先,本发明的雌激素物质表现出出人意料的长的体内半衰期。其次,与对 ERβ 受体的亲和力相比,这些物质对 ERα 受体的亲和力比已经从其它(生物生成的)雌激素观察到的更高。

[0038] 本发明的雌激素物质的另外一个有益性质存在于以下事实,即性激素结合球蛋白(SHBG) 难以结合这些雌激素物质,这意味着,与大多数已 知的雌激素相反,血清水平代表生物活性且独立于 SHBG 水平。

[0039] 本发明的雌激素物质的另外一个重要益处来自它们对其它药物的相互作用(药-药相互作用)的相对不敏感性。众所周知,某些药物会降低雌激素如乙炔基雌二醇的有效性,而其它药物则会增加它们的活性,导致有可能增加副作用。类似地,雌激素会干扰其它药物的代谢。通常,其它药物对雌激素的作用是由于对这些雌激素吸收、代谢或排泄的干扰,而雌激素对其它药物的作用是由于代谢通道的竞争。

[0040] 临床上最重要的雌激素药物相互作用组出现在可以诱导肝微粒体酶的药物中,所述的肝微粒体酶可以将雌激素的血浆水平降低至治疗水平以下(例如,抗惊厥药;苯妥英、扑米酮、巴比妥酸盐、卡马西平、乙琥胺和甲琥胺;抗结核药如利福平;抗真菌药如灰黄霉素)。本发明的雌激素物质较少地依赖于微粒体肝酶(例如 P450 的)的向上-和向下-调节,并且对其它 P450 底物的竞争的敏感性也更低。类似地,它们不明显地干扰其它药物的代谢。

[0041] 大多数雌激素结合物,如在肝中形成的,排泄到胆汁中,并会被结肠中的肠道细菌分解,以释放出活性激素,它可被再吸收(肠肝循环)。已有临床报导支持该观点,即在服用抗生素(例如氨苄青霉素、四环素等)的女性中雌激素的肠肝循环减少。结合物形式的本发明的雌激素物质难以排泄到胆汁中,这意味着它们基本上对影响其它雌激素的肠肝循环的药物不敏感。

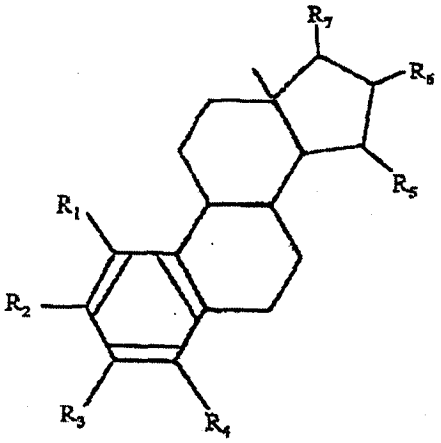
[0042] 上面的发现用于解释为什么本发明的雌激素物质几乎不受药物-药物相互作用的干扰,并从而产生非常一致的,即可预测的效果。

具体实施方式

[0043] 本发明的一个方面涉及治疗或预防哺乳动物的免疫介导的疾病的方法,所述的方法包括向所述的哺乳动物给药治疗有效量的雌激素成分,其中雌激素成分是选自由以下物质组成的组中:

[0044] 如下式所示的物质

[0045]



(I)

[0046] 其中，R_1、R_2、R_3、R_4 独立地为氢原子、羟基或含有 1-5 个碳原子的烷氧基；R_5、R_6、R_7 各自是羟基；且 R_1、R_2、R_3、R_4 中的不超过 3 个为氢原子；本发明还涉及当在本方法中使用时能够释放出如上式所示的物质的前体；以及一种或多种前述物质和 / 或前体的混合物。

[0047] 本发明的雌激素物质不同于通常应用于药物组合物的生物生成的和合成的雌激素之处在于它们含有至少 4 个羟基。本发明的物质的特征在于，甾体骨架中的 5 元环包含 3 个而不是 0-2 个羟基取代基。可商业购得的含有至少 4 个羟基的雌激素和它们的前体的实例是：

[0048] 1,3,5(10)- 雌三烯 -2,3,15α,16α,17β- 五醇 2- 甲基醚

[0049] 1,3,5(10)- 雌三烯 -2,3,15β,16α,17β- 五醇 2- 甲基醚

[0050] 1,3,5(10)- 雌三烯 -2,3,16α,17β- 四醇

[0051] 1,3,5(10)- 雌三烯 -3,4,16α,17β- 四醇 4- 甲基醚

[0052] 1,3,5(10)- 雌三烯 -3,15α,16α,17β- 四醇

[0053] 1,3,5(10)- 雌三烯 -3,15α,16α,17β- 四醇四乙酸酯

[0054] 1,3,5(10)- 雌三烯 -3,15β,16β,17β- 四醇四乙酸酯

[0055] 优选地，用作本发明的组合物的活性成分的雌激素成分是所谓的生物生成的雌激素即自然存在于人体内的雌激素、生物生成的雌激素的前体或它们的混合物。因为生物生成的雌激素自然地存在于胎儿和雌性的 体内，预期不会产生副作用，特别是当外源性给药这种雌激素导致的血清水平没有大大超过自然浓度时。自然存在的雌激素成分典型地表现出 8β,9α,13β,14α 的甾体骨架构型。

[0056] 在本发明的一个优选实施方案中，雌激素物质含有 4 个羟基。同样地，在前述式中，R_1 优选地代表氢原子。在所述的式中，R_1、R_2、R_3、R_4 基中的优选至少 2 个、更优选至少 3 个代表氢原子。

[0057] 因为具有羟基取代基 R_5、R_6 和 R_7 的碳原子是手性活性的，如该式的雌激素物质包含不同的对映异构体。在一个优选实施方案中，本发明的雌激素物质是 15α- 羟基取代的。在另外一个优选实施方案中，该物质是 16α- 羟基取代的。在另外一个优选实施方案中，该物质是 17β- 羟基取代的。最优选地，该雌激素物质是 15α,16α,17β- 三羟基取代的。

[0058] 在本发明的一个优选实施方案中，R_3 代表羟基或烷氧基。在另外一个优选实施方案中，R_1、R_2 和 R_4 代表氢原子，在该情况下，如果 R_3、R_5、R_6 和 R_7 是羟基，该物质是 1,3,5(10)- 雌三烯 -3,15,16,17- 四醇。后一种物质的优选的异构体是 1,3,5(10)- 雌三烯 -3,

15α,16,17β-四醇（雌四醇）。

[0059] 本发明还包括雌激素物质的前体的应用，它用作本发明的方法中的活性成分。例如作为代谢转化的结果，这些前体当用在本发明的方法中时能释放出前述的雌激素物质。这些前体优选地选自本发明的雌激素物质的衍生物，其中至少一个羟基的氢原子已经被以下基团取代：含有1-25个碳原子的羧酸、磺酸或氨基磺酸的酰基；四氢呋喃基；四氢吡喃基；或每个残基含有1-20个糖苷单元的直链或支链的糖苷残基。适用于本发明的前体的典型实例是酯，它可以通过将雌激素物质的羟基与含有一个或多个羧基的物质（M^+-OOC-）反应制得，其中M^+代表氢或（碱）金属阳离子。由此，在特别优选的实施方案中，前体是雌激素物质的衍生物，其中所述式中的至少一个羟基的氢原子被-CO-R取代，其中R是包含1-25个碳原子的烃基。优选地，R是氢或包含1-20个碳原子的烷基、链烯基或芳基。

[0060] 当用于治疗或预防慢性免疫介导的疾病时，本发明的方法特别有效。因此，在一个优选实施方案中，该方法包括在一段为期至少为5天、优选地至少为30天的时间内，不间断地给药雌激素成分。

[0061] 本方法可以合适地采用经肠或非胃肠道给药雌激素成分。这里使用的术语“非胃肠道给药”包括透皮、静脉内、鼻内、阴道内、经肺、口腔、皮下、肌肉内、子宫内给药。术语“经肠给药”包括口服和直肠给药。

[0062] 优选地，给药模式选自口服、透皮、静脉内、鼻内、阴道内、经肺、直肠、口腔、皮下、肌肉内或子宫内给药。更优选地，给药模式选自口服、透皮、静脉内、皮下、鼻内、经肺或阴道给药。在一个特别优选的实施方案中，本发明的方法采用口服、透皮、鼻内或皮下给药。甚至更优选地，本发明的方法采用口服或皮下给药。

[0063] 口服、静脉内、皮下、肌肉内、鼻内、直肠、口腔和经肺给药同等地适合于每天给药（至少）一次。透皮给药利于以每天一次至每月一次的频率使用。阴道内和子宫内给药利于以每周一次至每月一次的频率使用。皮下和肌肉内给药也适于以储库型注射剂的形式以1周～6个月、优选地4周～3个月的间隔使用。

[0064] 为了方便起见，本发明的方法优选采用的给药间隔为1天、1周或1个月。特别优选的方案是每天一次口服、皮下、静脉内或鼻内给药，每周一次透皮给药或每月一次阴道内或皮下给药。

[0065] 不考虑给药模式，雌激素成分优选地以可有效达到至少5纳克/升、更优选为至少50纳克/升、最优选为至少500纳克/升的血清浓度的量给药。通常，得到的雌激素成分的血清浓度不会超过200μg/l，优选地不会超过10μg/l，更优选地不会超过50μg/l。

[0066] 根据本发明的方法，雌激素成分通常的给药量低于2mg/kg体重/天，优选为低于0.8mg/kg体重/天。为了使给药雌激素成分达到明显的效果，建议的给药量为至少1μg/kg体重/天，优选为至少5μg/kg体重/天。优选地，给药量至少为25μg/kg体重/天。

[0067] 活性成分的口服给药的优选量为低于800μg/kg体重/天，优选低于400μg/kg体重/天。为了使给药活性成分达到明显的效果，建议的口服给药量为至少10μg/kg体重/天。优选地，口服给药量为至少25μg/kg体重/天。在本方法中，特别是当用于人时，通常给药雌激素成分的平均剂量为至少0.25mg/天，优选为至少0.5mg/天。最大剂量通常保持为低于80mg/天，优选为低于40mg/天。

[0068] 本发明的治疗方法优选地包括向需要该治疗的人给药有效量的雌激素成分。达到

有效所需要的量在个体和个体之间存在差异，并由多种因素决定，如个体的雌激素缺乏水平、体重、给药途径和使用的特定雌激素物质的功效。

[0069] 在本方法中，特别是当用于人时，通常口服给药雌激素成分的平均剂量为 0.05 ～ 40mg/ 天，优选为 0.25 ～ 20mg/ 天。类似地，非胃肠道剂量优选为至少 0.25mg/ 天，优选至少 0.5mg/ 天。平均最大非胃肠道剂量通常保持为低于 80mg/ 天，优选为低于 40mg/ 天。

[0070] 在本发明的一个特别优选实施方案中，该方法采用了口服给药活性雌激素成分。这里使用的术语“口服给药”也包括经口管饲给药。发明人出人意料地发现，尽管它们效力低，但是雌四醇和相关的雌激素物质可利于口服给药。尽管发明人不想受理论的约束，还是确信口服给药雌四醇类物质的意外功效的原因是这些物质的特殊药物动力学 (ADME) 和药效学性质的组合。

[0071] 发明人已经发现，雌四醇类物质的口服生物利用度出人意料地高，并且它们的体内半衰期明显比常用的生物生成的雌激素长。这样，即使雌四醇和雌四醇类物质具有相对较低的雌激素效力，它们也能有效地通过口服给药。

[0072] 雌四醇和雌四醇类物质口服给药的另外一个重要优点在于一个事实，即认为这些物质的肝作用是非常小的，因为它们在所谓的“首过”期间难以代谢。口服给药的药物的首过效应是指药物在从起始摄入到血液 循环的转运过程中被肝降解的过程。从肠道吸收后，口服应用的活性成分经肝进入机体。该事实对雌激素剂是非常重要的，因为肝是雌激素的靶器官；雌激素的口服摄入在肝中产生强烈的雌激素作用。治疗等效剂量的常用生物生成的雌激素在口服给药时，会产生明显的肝参数反应，例如 SHBG、CBG、血管紧张素原和 HDL（高密度脂蛋白）的升高。

[0073] 该方法适用于（预防性地）治疗广泛种类的免疫介导的疾病。这里使用的术语“免疫介导的疾病”指任何不希望发生的免疫反应或病理，它们由淋巴系统（包括 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞）或骨髓系统（包括粒细胞、巨嗜细胞和单核细胞）的细胞介导或部分介导，且它们对于发生这些反应或病理的哺乳动物是有害的。这种不希望发生的免疫反应或病理学可以由 T 淋巴细胞介导或是多因素的，例如慢性炎性疾病，包括但不限于自身免疫疾病、由感染物诱导的免疾病理、同种异体移植引起的免疫反应、遗传性过敏反应、过敏反应和免疫增生病。

[0074] 本方法特别适合用于治疗 T 淋巴细胞介导的疾病和 / 或慢性炎性疾病，包括但不限于自身免疫疾病如多发性硬化、类风湿性关节炎、骨关节炎、胰岛素依赖性糖尿病 (I 型糖尿病）、全身性红斑狼疮和银屑病，由感染物如蠕虫（例如利什曼病）和某些包括 HIV 的病毒性感染诱导的免疾病理，以及由细菌性感染诱导的免疾病理包括莱姆病、结核病和瘤型麻风，移植排斥、移植物对抗宿主疾病和特异反应性病症，如哮喘和过敏症，包括过敏性鼻炎、包括食物过敏的胃肠过敏反应，嗜酸粒细胞增多、结膜炎和肾小球肾炎。

[0075] 许多免疫介导的疾病是多因素的，其特征在于多种类型的炎性细胞、特别是淋巴系统（包括 Th1 淋巴细胞、Th2 淋巴细胞、B- 淋巴细胞）和骨髓系统（包括粒细胞、巨嗜细胞和单核细胞）细胞的激活。（前）炎性介导物包括细胞因子，如肿瘤坏死因子 (TNF) 和白介素 -1(IL-1)，它们由这些被激活的细胞生成，且常见抗体和补体反应。在本发明的一个特别优选的实施方案中，本方法用于治疗 Th1- 介导的免疫介导的疾病 (“Th1 介导的疾病”)。Th1 介导的疾病是其中有害的免疫反应主要地或部分地是 T 辅助细胞 1(Th1) 型免疫反应。

Th1 免疫反应的特征是（前）炎性细胞因子如 IL-12、INF-γ 和 TNF-α 的分泌。Th1 介导的疾病包括大多数自身免疫疾病、许多同种免疫介导的疾病、某些过敏性疾病、某些慢性炎性疾病和某些感染物诱导的免疾病理学。免疫介导的疾病可替换地由 Th2 免疫反应介导。与 Th1- 介导的反应对比，Th2 介导的反应的特征在于抗炎性细胞因子如 IL-4、IL-10、IL-13 和 TGF-β 的分泌。

[0076] 本方法特别适于治疗或预防选自自身免疫病理和慢性炎性反应的免疫介导的疾病。可以有效地治疗的自身免疫病理的实例包括多发性硬化（神经细胞）、类风湿性关节炎（软骨、结合面）、骨关节炎（软骨）、I 型糖尿病（胰腺）、全身性红斑狼疮（多组织）、银屑病（皮肤）、阿尔茨海默氏病（中枢神经系统）、重症肌无力（神经肌肉接头）、克罗恩氏病（肠）、附睾炎（附睾）、血管球性肾炎（肾）、甲状腺机能亢进（甲状腺）、传染性神经元炎（神经细胞）、桥本病（甲状腺）、溶血性贫血（红细胞）、天疱疮（主要是皮肤）、风湿热（心脏和关节）、结节病（多种组织和器官）、皮肌炎（多种组织和器官）、硬皮病（皮肤和结缔组织）、舍格伦综合征（外分泌腺和其它组织）、脊柱关节病（中轴骨和其它组织）、甲状腺炎（甲状腺）、脉管炎（血管）、白癜风（皮肤）、艾迪生氏病（肾上腺）。适合用本方法治疗的慢性炎性反应的实例包括与心血管病伴随的炎性反应、冠心病、肝硬化、关节炎、胆汁郁积、结核病、麻风、梅毒、牙周炎、纤维化、血管球性肾炎和某些癌症以及对感染物如细菌、病毒、真菌、原生动物、蠕虫和朊病毒的慢性炎性反应。

[0077] 本发明的方法被认为特别适合用于治疗导致神经病理的免疫介导的疾病，例如多发性硬化、阿尔茨海默氏病、重症肌无力、传染性神经元炎、肌萎缩性脊髓侧索硬化症。

[0078] 本发明的方法还被认为特别适合用于治疗导致肌骨病理学的免疫介导的疾病，例如类风湿性关节炎、骨关节炎和相关的炎性关节炎病， 包括痛风、脊柱关节病、僵直性脊柱炎、莱特尔综合征、牛皮癣关节病、肠性脊柱炎 (enterapathric spondylitis)、青少年关节病或青少年僵直性脊椎炎、反应性关节病、感染性或后感染性 (post-fectious) 关节炎、淋病性关节炎、结核性关节炎、病毒性关节炎、真菌性关节炎、梅毒性关节炎、莱姆病、与“脉管炎综合症”相关的关节炎、结节性多动脉炎、过敏性脉管炎、Luegenec 氏肉芽肿病、风湿性多肌痛、关节细胞动脉炎、钙结晶沉积关节病、假痛风、非关节风湿病、滑囊炎、腱鞘炎、上髁炎、腕管综合症、重复性使用损伤、混杂形式的关节炎、神经性关节病（盆地 (charco) 和关节）、关节积血（关节处积血的）、亨 - 舍二氏紫癜、肥大性骨关节病、多中心网状组织细胞增多病、与某些疾病相关的关节炎，如 surcoilosis、血色沉着病、镰状细胞病和其它血红蛋白病、高脂蛋白血症、低丙球蛋白血症、甲状旁腺功能亢进、肢端肥大症、家族性地中海热、Behat 氏病、全身性红斑狼疮或复发性多软骨炎。

[0079] 认为本发明的方法在用于（预防性）治疗选自下组的免疫介导的疾病时特别有利：多发性硬化、类风湿性关节炎、骨关节炎、胰岛素依赖性糖尿病 (I 型糖尿病)、全身性红斑狼疮和银屑病。最有利地，本方法用于治疗多发性硬化、类风湿性关节炎或骨关节炎。

[0080] 为了强化雌激素成分的作用，可以有利地共同给药能预防性地或治疗性地抑制免疫反应和 / 或改进免疫病理的免疫治疗剂。这样的药剂是本领域熟知的，包括免疫抑制剂、免疫调节剂、免疫封闭剂和 / 或抗炎剂，并且可以与雌激素成分组合给药，即以单个单位剂量形式，或替换地，这些活性成分分别给药，特别是当给药模式不同时。

[0081] 在一个具体的实施方案中，向患有多发性硬化或对多发性硬化敏感的哺乳动物给

药与一种或多种免疫治疗剂组合的本发明的雌激素成分。与一种或多种免疫治疗剂组合的本发明的雌激素成分的给药会增强治疗的有效性。另外，该组合可能产生更少的显著的副作用，和/或使得可能给药更低剂量的已知免疫治疗剂或雌激素成分，而产生与高得多的剂量 的任何单独组分相同的效果。用于治疗多发性硬化的免疫治疗剂可以合适地为：(1)甾体抗炎药如氢化可的松或地塞米松；(2) 非甾体抗炎药如乙酰水杨酸（阿司匹林）、布洛芬或萘普生；(3)D- 青霉胺；(4)4- 氨基喹啉药如羟氯喹；(5) 硫唑嘌呤；(6) 甲氨蝶呤；(7)环孢霉素；(8)T 淋巴细胞单克隆抗体；(9) 粘着分子的单克隆抗体；(10) 细胞因子和生长因子的单克隆抗体；(11) 肿瘤坏死因子受体 (TNFR)-IgG；(12)IL-1 受体拮抗剂；(13)ICE 抑制剂；(14)β 酶蛋白和/或 (15) 维生素 D、1α，25- 二羟基维生素 D_3 和 1α，25- 二羟基维生素 D_2；(16) 特异性结合选自 T 细胞受体、抗原或 HLA 分子的分子的试剂。

[0082] 在另外一个具体的实施方案中，给患有多种类风湿性关节炎或对类风湿性关节炎敏感的哺乳动物给药与一种或多种免疫治疗剂组合的本发明的雌激素成分。与一种或多种免疫治疗剂组合的本发明雌激素成分的给药会增强治疗类风湿性关节炎疾病如类风湿性关节炎和骨关节炎的有效性。另外，该组合产生更少的副作用，和/或使得能够给药更低剂量的免疫治疗剂或雌激素成分而产生与高得多的剂量的任一种单独组分相同的效果。用于治疗类风湿性关节炎的免疫治疗剂可以为：(1) 甾体抗炎药如氢化可的松或地塞米松；(2)非甾体抗炎药如乙酰水杨酸（阿司匹林）、布洛芬或萘普生；(3) 有机金衍生物如硫代苹果酸钠金、金硫葡糖或金诺芬；(4)D- 青霉胺；(5)4- 氨基喹啉药如羟氯喹；(6) 硫唑嘌呤；(7)甲氨蝶呤；(8) 环孢霉素；(9) 血管生成抑制剂如 AGM-1470(Ingber 等，1990，Nature 348，555)；(10)T 淋巴细胞的单克隆抗体；(11) 粘着分子的单克隆抗体；(12) 细胞因子和生长因子的单克隆抗体；(13) 肿瘤坏死因子受体 (TNFR)-IgG；(14)IL-1 受体拮抗剂；(15)ICE 抑制剂，和/或 (16) 特异性结合选自 T 细胞受体、抗原或 HLA 分子的分子的试剂。

[0083] 在本发明另外一个优选的实施方案中，本方法包括共同给药孕激素，特别是当该方法用于治疗雌性哺乳动物时。已经将雌激素的给药与女性的子宫内膜增生联系起来，现在普遍接受的是，在延长的时段内给 药“无对抗的”雌激素（雌激素治疗法）大大增加患子宫内膜癌的风险 (Cushing 等，1998.Obstet.Gynecol.91,35-39；Tavani 等，1999.Drugs Aging,14,347-357)。还有证据表明，长期 (10-15 年）使用雌激素疗法会明显增加患乳腺癌的风险 (Tavani 等，1999.Drugs AginG,14,347-357；Pike 等，2000.Steroids,65,659-664)。

[0084] 为了抵消长期的无对抗的雌激素疗法的副作用，目前普遍将附加性孕激素治疗应用到围绝经期和绝经后妇女的激素替代疗法中。正常地给药孕激素被确信会通过抗增生作用抑制雌激素对子宫内膜连续的刺激，而且看来好像能减少接受雌激素替代疗法的绝经后妇女中的子宫内膜癌的发生 (Beral 等，1999.J.Epidemiol.Biostat.,4,191-210)。为了抵消在本发明中给药无对抗的雌激素（特别是长期连续给药）的任何潜在副作用，优选地共同给药孕激素成分来抑制雌激素对子宫内膜的刺激，或至少每 3 个月在至少 10 天内给药孕激素成分。

[0085] 本发明的另一方面涉及一种药物组合物，它包含雌激素成分和此前定义的免疫治疗剂以及药物学可接受的赋形剂。本发明的药物组合物优选地含有至少 10μg 雌激素成分，更优选为至少 25μg 所述的雌激素成分，更优选地，该组合物中雌激素成分的含量是至

少 50μg，最优选是至少 150μg。该组合物中雌激素成分的含量正常情况下不超过 1000mg，优选地，其含量不超过 600mg，最优选为不超过 400mg。

[0086] 免疫治疗剂在组合物中的合适的含量是至少 1μg，优选地至少 10μg。该组合物中的免疫治疗剂的含量通常不超过 50mg，优选为不超过 25mg。

[0087] 根据本发明的药物组合物合适地为固体或半固体剂型如片剂、胶囊、扁囊剂、微型片剂、丸剂、散剂和颗粒剂。术语“固体或半固体剂型”还包括含有液体例如油的胶囊，本发明的雌激素成分溶解或分散于该液体中。片剂或等价的固体和半固体剂型可以合适地含有下列物质，如粘合剂（例如羟丙基甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、其它的纤维素材料和淀粉）、稀释剂（例如乳糖和其它的糖、淀粉、磷酸二钙和纤维素材料）、崩解剂（例如淀粉聚合物和纤维素材料）和润滑剂（例如硬脂酸盐和滑石）。

[0088] 透皮传递系统包括贴剂、凝胶、胶布和乳剂，而且可以含有赋形剂，如增溶剂、促渗剂（例如脂肪酸、脂肪酸酯、脂肪醇和氨基酸）、亲水性聚合物（例如聚卡波非和聚乙烯吡咯烷酮）、粘合剂和增粘剂（例如聚异丁烯、硅氧烷基粘合剂、丙烯酸酯和聚丁烯）。

[0089] 透粘膜（特别是直肠和阴道内的）传递系统包括贴剂、片剂、栓剂、阴道栓(pessary)、凝胶、乳剂，而且可以含有赋形剂，例如增溶剂和增强剂（例如丙二醇、胆汁盐和氨基酸）、和其它载体（例如聚乙二醇、脂肪酸酯和衍生物以及亲水性聚合物，例如羟丙基甲基纤维素和透明质酸）。

[0090] 可注射的或可植入的储库型制剂包括注射液和植入片剂。合适的液体载体成分是生理相容性的稀释剂，活性剂可溶入或悬浮于其中。稀释剂的实例是水，它可以加或者不加电解质盐类或增稠剂。因此，储库型制剂可以是例如水性微晶悬浮液。油类特别适合用作稀释剂，它可以加或者不加增溶剂、表面活性剂、助悬剂或乳化剂。合适的油的实例包括花生油 (arachidis oil)、橄榄油、花生油、棉籽油、大豆油、蓖麻油和芝麻油。增溶剂的实例包括苯甲醇、苯甲酸苄酯。储库型制剂提供的优点是，一次注射或植入可以满足一个月或几个月的需要。储库效果持续的时间取决于雌激素成分的性质（优选酯前体，因为它们释放更慢）、雌激素成分的含量和释放该活性药物的载体物质的类型。通常，持续时间是 10-30 天，但是也能实现更长或更短的时间。

[0091] 可用于给药本发明的药物组合物的其它传递系统包括鼻内和经肺传递系统，例如喷雾剂和微粒。

[0092] 另外，本发明的特别优选的方面涉及口服单位剂量形式，它包含至少 50μg、优选为至少 250μg 雌激素成分和至少 1μg 此前定义的免疫治疗剂以及药物学可接受的赋形剂。

[0093] 下面的实施例进一步解释了本发明，但是它们不应当理解成限制性的。在前面的说明书中、在下文的实施例中和在权利要求书中，无论是分开地还是以其任意结合的方式所公开的特征，对以各种形式实现本发明都是重要的。

[0094] 实施例

[0095] 实施例 1

[0096] 口服和皮下向低雌激素的大鼠给药雌四醇 (E4) 后，选择阴道角质化作为组织特异性和雌激素敏感性的终点，以测定雌四醇的动情力。在这些生物测定中，使用 17α－乙炔基雌二醇 (EE)、17β－雌二醇 (E2) 和载体 (10％的乙醇／芝麻油）作为对照。

[0097] 通常用大鼠子宫重量的增加作为动情力的尺度。但是，子宫重量还响应孕酮、睾酮和其它在特征上不认为是雌激素的物质。在二十世纪二十年代早期，发现来自猪卵巢的卵泡液含有的一些因子会造成大鼠阴道上皮的角质化 / 角化 (Allen and Doisy，1923，JAMA，81，819-821 ；Allen andDoisy，1924，Am. J. Physiol.，69，577-588)。随后，所谓的大鼠的阴道角质化反应提供了测试动情力的生物测定。切除卵巢的大鼠的阴道上皮的角质化 / 角化只能由被认为是真正的雌激素的化合物产生 (Jones 等，1973，Fert. Steril. 24，284-291)。因此，阴道上皮的角质化 / 角化代表着检测雌激素效力的高度选择性的终点 (Reel 等，1996，Fund. Appli. Toxicol. 34，288-305)。

[0098] 切除成年无损伤雌性 CD 大鼠的卵巢以造成雌激素缺乏。每天灌洗阴道持续 7 天，以确保大鼠表现出去势阴道涂片 (白细胞在阴道涂片中占优势，外观与间情期的阴道涂片相似)。去势阴道涂片指示彻底的卵巢切除得以实施。完成 7 天的涂片后开始进行治疗 (第 0 天＝第 1 天给予剂量)。每天给动物用药一次，连续 7 天。开始用药后，继续进行每日阴道灌洗 7 天以检测阴道的角质化，其作为雌激素反应的指征。将一滴阴 道洗液置于载玻片上，用光学显微镜观察，检测角质化的上皮细胞是否存在。在第 0-6 天的用药和第 7 天的尸检之前进行阴道灌洗。

[0099] 进行阴道角质化的生物测定以测定当皮下 (sc) 给予切除卵巢的成年大鼠时 E4 的雌激素功能。E2 用作阳性对照。载体 (10％乙醇 / 芝麻油) 用作阴性对照。将甾体溶于无水乙醇，然后与芝麻油配成终浓度 (芝麻油中的 10％乙醇)。在以 50μg/kg/ 天的剂量皮下注射 E2 7 天的大鼠中，至第 2 天 8/8 只大鼠中发生了阴道雌激素反应，且持续到第 7 天 (表 1)。用载体处理的大鼠未表现出阴道上皮角质化 (表 1)。在以 0.1、0.3、1.0 和 3.0mg/kg/ 天的剂量皮下注射 E4 的大鼠中，阴道上皮角质化的发生是剂量依赖性的，并且始于与 E2 所观察到的治疗的同一天 (第 2 天)(表 1)。到第 7 天，在 0.1mg/kg/ 天 E4 的剂量已经有 4/8 只大鼠且在 0.3mg/kg/ 天 E4 的剂量甚至有 7/8 只大鼠表现出阴道雌激素反应。到第 7 天，在 1.0 和 3.0mg/kg/ 天 E4 的剂量，所有的大鼠都表现出阴道雌激素反应 (表 1)。

[0100] 表 1 ：在用 17β - 雌二醇 (E2) 或雌四醇 (E4) 皮下治疗切除卵巢的大鼠时的阴道雌激素反应。数据表示为表现出阴道角质化的大鼠数目与所治疗的大鼠数目之比。

治疗组	给药途径	表现出刺激素反应的大鼠数目/被治疗大鼠的数目							
		研究的天次							
		第 0 天	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天
0.05mg/kg/天 E2	皮下	0/8	0/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8
载体对照	皮下	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
0.1mg/kg/天 E4	皮下	0/8	0/8	0/8	1/8	1/8	4/8	3/8	4/8
0.3mg/kg/天 E4	皮下	0/8	0/8	1/8	5/8	7/8	6/8	7/8	7/8
1.0mg/kg/天 E4	皮下	0/8	0/8	1/8	6/8	8/8	7/8	8/8	8/8
3.0mg/kg/天 E4	皮下	0/8	0/8	3/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8

[0101] 进行阴道角质化的生物测定以测定当口服(po)给予切除卵巢的成年大鼠时E4的雌激素功能。EE用作阳性对照。载体(10%乙醇/芝麻油)用作阴性对照。将甾体溶解到无水乙醇中,然后与芝麻油配成终浓度(芝麻油中的10%乙醇)。到第7天,以50μg/kg/天的剂量口服给药EE的所有大鼠(8/8)都发生阴道雌激素反应(表2)。类似地,在第7天,在以0.1、0.3、1.0或3.0mg/kg/天的剂量口服E4进行治疗的所有大鼠(8/8)中,都观察到阴道上皮角质化(表2),而用载体处理的大鼠未表现出阴道上皮角质化(0/8)。出人意料地,即使在给药相对较低剂量的E4(例如0.1mg/kg/天)的大鼠中,口服给药的大鼠的阴道角质化的开始(定义为在研究的第1-3天出现反应的动物的数量)也比皮下给药的大鼠快,这证明了雌四醇在口服给药后生物利用度极好的特征。

[0102] 表2:在用17α-乙炔基雌二醇(EE)或雌四醇(E4)口服治疗切除卵巢的大鼠时的阴道雌激素反应。数据表示为表现出阴道角质化的大鼠的数目与被治疗的大鼠的数目之比。

治疗组	给药途径	表现出雌激素反应的大鼠的数目/治疗的大鼠的数目							
		研究的天次							
		第0天	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天	第6天	第7天
0.05mg/kg/天 EE	口服	0/8	1/8	3/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8
载体对照(2ml/kg/天)	口服	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
0.1mg/kg/天 E4	口服	0/8	0/8	1/8	7/8	8/8	8/8	8/8	8/8
0.3mg/kg/天 E4	口服	0/8	0/8	1/8	7/8	8/8	8/8	8/8	8/8
1.0mg/kg/天 E4	口服	0/8	0/8	4/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8
3.0mg/kg/天 E4	口服	0/8	0/8	6/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8

[0103] 实施例2

[0104] 为了评价雌四醇(E4)的口服和皮下的生物利用度和消除半衰期,用雌性Sprague Dawley大鼠进行了单一剂量研究,随后在24小时的间隔中频繁采集血样。

[0105] 如Kuipers等人所述(1985,Gastroenterology,88,403-411),给雌性Sprague Dawley大鼠安装永久性的硅化橡胶(silatic)心脏导管。手术后让大鼠恢复5天,然后以0.05、0.5或5mg/kg的剂量给药在0.5ml花生油中的E4。皮下给药中,使用1ml注射器和20g针头将E4注射到颈部区域。在E4的口服给药中,用氟烷/N_2O/O_2轻度麻醉大鼠,使用塑料胃插管器将E4直接给药到胃内。随后在0.5、1、2、4、8和24小时,通过心脏导管在肝素化的管中收集血样。通过在4℃以5000×g离心10分钟除去红细胞,血浆储存在-20℃。解冻血浆样品后,应用液-液萃取(己烷和乙醚)制备含有E4的血浆样品进行HPLC分析(Perkin Elmer 200)和使用PE Sciex 3000串联质谱仪和APCI界面的串联质谱分析。对于每一个样品批次,记录带有6个校正点的校正曲线。使用线性回归(相关系数>0.98)计算校正曲线,其允许血浆浓度的定量。收集在不同的时间间隔取样的所有大鼠血浆的数据。

[0106] 用“WinNonLin,版本 3.1”和所涉及的药物动力学参数分析血浆 E4 浓度数据以获得 C_{max}、半衰期和 AUC_{0-24}。特别地,使用低和中间剂量水平 0.05、0.5mg/kg,E4 表现出的口服生物利用度等于皮下给药所得到的生物利用度 (80-100％)。在实验的最高剂量水平,5.0mg/kg E4,吸收动力学产生的口服生物利用度约是 E4 皮下给药的 30-60％。令人感兴趣的是,E4 表现出相对较长的 2-3 小时的半衰期,因此在皮下给药实验和口服给药实验中,在 24 小时间隔内的所有时间点都可以测得未结合的 E4 的生物活性水平。

[0107] 实施例 3

[0108] 为了检测雌四醇在口服给药于人后的生物利用度和消除半衰期,在健康的绝经后志愿者中进行渐增单剂量实验。随机地给志愿者 (n ＝ 6) 分配 0.1、1 或 10mg 雌四醇,在 72 小时期间采集血样 (每位志愿者 18 次)。

[0109] 解冻血浆样品后,应用液 - 液萃取 (己烷和乙醚) 制备含有雌四醇的血浆样品进行 HPLC 分析 (Perkin Elmer 200) 和使用 PE Sciex 4000 串联质谱仪和 APCI 界面的串联质谱分析。对于每一个样品批次,记录带有 6 个校正点的校正曲线。使用线性回归 (相关系数＞ 0.98) 计算校正曲线,其允许血浆浓度的定量。

[0110] 当从 0.1 到 1、进而到 10mg 增加口服雌四醇的剂量时,观察到较好的耐受性。AUC 值表现出较好的剂量线性,这表明在整个剂量范围内,口服给药的雌四醇都被较好地吸收。令人感兴趣的是,雌四醇在人绝经后对象中表现出超过 15 小时、即 15-50 小时的长的消除半衰期。

[0111] 实施例 4

[0112] 利用确定的竞争性甾体结合实验测定雌四醇 (E4) 与 17α - 乙炔基雌二醇 (EE) 和 17β - 雌二醇 (E2) 相比同 α - 和 β - 形式的人雌激素受体 (ER) 结合时的相对结合亲和力。

[0113] 使用的方法修改自科技文献,由 Osboum 等人详细地记载 (1993, Biochemistry, 32,6229-6236)。从转染的 Sf9- 细胞纯化重组人 ERα 和 ERβ 蛋白。体外试验包括使用 ERα 或 ERβ 蛋白和作为被标记配体的浓度固定为 0.5nM 的 [^{3}H]E2。将重组人 ERα 或 ERβ 蛋白溶解到结合缓冲液 (10mMTris-HCL、pH 7.5、10％ glycerol、1mM DTT、1mg/ml BSA) 中,然后将其双等份与终浓度为 0.5nM 的 [^{3}H]E2 孵育,同时还有载体对照 (o.4％ DMSO) 或相同量的含有递增浓度的未标记的作为竞争剂的甾体配体的载体。在 25℃孵育 2 小时后,除去未结合的配体,检测结合到 ERα 或 ERβ 蛋白上的 [^{3}H]E2 的量。在每一种竞争剂浓度下结合到 ERα 或 ERβ 蛋白上的 [^{3}H]E2 的平均量用于制作抑制曲线。随后通过非线性的最小二乘回归分析确定 IC50 值。使用 Cheng-Prusoff 方程 (Cheng 等,1973,Biochem.Pharmacol., 22,3099-3108),使用测得的实验化合物的 IC50、实验中使用的放射性配体的浓度、和放射性配体的对于 Erα 和 Erβ 分别为 0.2nM 和 0.13nMKd 的计算值来计算抑制常数 (Ki)。

[0114] E4 的生化试验结果表述为三个独立实验中的特异性结合的抑制百分比 (表 3)。将在实验中得到的 Ki 值列在表 4 中用于比较 E4、EE 和 E2 与人 ERα 和 ERβ 蛋白的结合。与 EE 和 E2 相比,E4 表现出独特的结合功能,其对于结合到 ERα 蛋白具有很强的优势 (400％) (表 4)。相对而言,EE 和 E2 甾体配体对 ERβ 蛋白的 Ki 值更为明显 (表 4)。

[0115] 表 3 :使用 E4 作为未标记的甾体配体和 0.5nM[^{3}H] 作为标记的竞争剂,特异性结合 ERα 和 ERβ 蛋白的抑制百分比。显示了三个独立的实验的结果。

E4 终浓度	特异性结合的抑制百分比					
	ERα 甾体结合实验			ERβ 甾体结合实验		
	实验 1	实验 2	实验 3	实验 1	实验 2	实验 3
1μM	98	nd	nd	87	90	95
0.3μM	92	94	101	74	74	77
0.1μM	83	85	86	56	54	50
0.03μM	64	66	63	19	25	30
10nM	43	32	28	nd	nd	nd
3nM	26	17	11	nd	nd	nd

[0116] nd =未检测到

[0117] 表 4 :实验测定的雌四醇 (E4)、17α - 乙炔基雌二醇 (EE) 和 17β - 雌二醇 (E2) 结合到人 ERα 和 ERβ 蛋白的抑制常数 (Ki)。还显示了结合到 ERα 蛋白的相对优势。

甾体配体	Ki ERα (nM)	Ki ERβ (nM)	相对 ERα /ERβ 优势 (%)
EE	0.23	0.025	11
E2	0.21	0.015	7
E4	4.9	19	400

[0118] 实施例 5

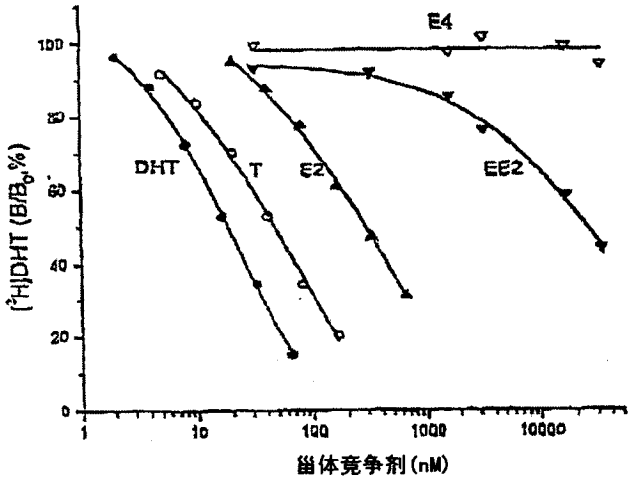
[0119] 用确定的竞争性甾体结合试验 (Hammond and Lahteenmaki. 1983. Clin Chem Acta 132 :101-110) 测定雌四醇 (E4)、17α - 乙炔基雌二醇 (EE2)、17β - 雌二醇 (E2)、睾酮 (T) 和 5α - 二氢睾酮 (DHT) 对人性激素结合球蛋白 (SHBG) 的相对结合亲和力。

[0120] 如先前已有的记载,从转基因小鼠血清中纯化人 SHBG(AvvakumovGV 等,2000. J Biol Chem 275 :25920-25925)。在变性条件下,通过聚丙烯酰胺凝胶电泳确定该方法制备的人 SHBG 的纯度＞ 99%。它的甾体结合特性与人血清中的 SHBG 难以区分 (Avvakumov GV 等,2000. J Biol Chem275 :25920-25925)。体外实验包括使用纯化的人 SHBG 和用作标记配体的 [^{3}H]DHT 或 [^{3}H] 雌二醇。在室温下,用在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中的右旋糖苷包被的活性炭 (DCC) 悬浮液处理人 SHBG 30 分钟,除去任何甾体配体。离心 (2,000×g,10 分钟) 沉淀 DCC 后,根据其甾体结合能力,用 PBS 将含有人 SHBG 的上清液稀释至 1nM 的浓度。

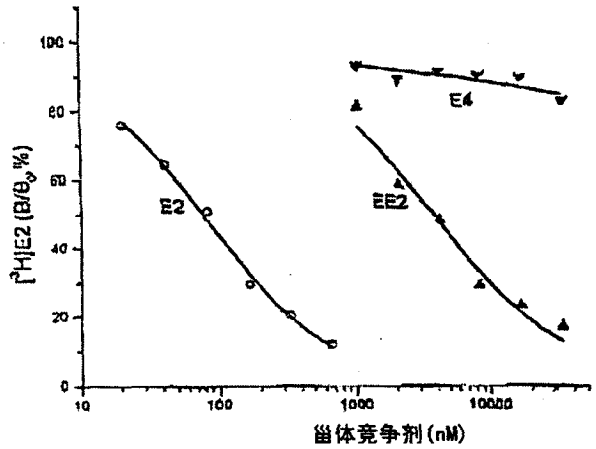
[0121] 然后,在聚苯乙烯试管中,将该人 SHBG 溶液的双等份试样 (100μl) 与等体积 10nM 的 [^{3}H]DHT 或 [^{3}H] 雌二醇孵育,同时还有单独的 100μlPBS 或等量的含有递增浓度的未标记的作为竞争剂的甾体配体的 PBS。在室温孵育 1 小时后,将反应混合物于冰浴中再放置 15 分钟。然后向每个试管中加入等份 DCC 的冰悬浮液 (600μl),简单混合 2 秒后,根据是否用 [^{3}H]DHT 或 [^{3}H] 雌二醇作为标记配体,分别将各试管在冰浴中孵育 10 分钟或 5 分钟。然后通过离心 (2000×g,15 分钟,4℃) 除去与 DCC 结合的未标记的配体,再使用液体闪烁分光光度计在 2ml ACS 闪烁混合物中计算与 SHBG 结合的 [^{3}H] 标记的配体的量。将在每个竞争剂浓度 (B) 结合到 SHBG 上的 [^{3}H] 标记的配体的平均量表达为在没有竞争剂 (B_0) 的条件下结合到 SHBG 上的 [^{3}H] 标记的配体的平均量的百分比,并相对每个实验试管中的竞争

剂的浓度做图。竞争性结合实验的结果如图 1 所示。

[0122]



[0123]



[0124] 图 1 :[^{3}H]DHT (图 A) 和 [^{3}H] 雌二醇 (图 B) 在人性激素结合球蛋白甾体结合部位上的竞争性置换。用作竞争剂的未标记的甾体配体如下 :雌四醇 (E4)、17 α - 乙炔基雌二醇 (EE2)、17 β - 雌二醇 (E2)、睾酮 (T) 和 5 α - 二氢睾酮 (DHT)

[0125] 从这些竞争性结合实验可以清楚地看出,当用 [^{3}H]DHT 或 [^{3}H] 雌二醇作为标记配体进行试验时,雌四醇根本不与人 SHBG 结合。这与参照甾体乙炔基雌二醇、17 β - 雌二醇、睾酮和 5 α - 二氢睾酮形成鲜明的对比,它们以该顺序显示出递增的相对人 SHBG 结合亲和力。重要的是,当与实验的其它雌激素乙炔基雌二醇和 17 β - 雌二醇相比时,雌四醇与 SHBG 的结合是可忽略的。

[0126] 实施例 6

[0127] 实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) 被广泛地用作多发性硬化 (MS) 的动物模型,多发性硬化的特征是中枢神经系统内的炎性过程。除了它在鉴别多发性硬化的疗法中的价值外,它还通常用作炎性模型。其优点是炎性反应局限于中枢神经系统,有利于正确评价炎性反应相对于临床症状的大小。而且,疾病的诱发受到精确的控制,因为它是用蛋白或合成肽免疫而引起的。对动物的临床监控要求不超过 4-6 周,因此可能快速地筛选潜在的抗炎化合物。

[0128] 多发性硬化的特征在于由于围绕着轴突的髓鞘的破坏而加重失能,且随后丧失神

经传导性。炎性损伤证明了淋巴细胞和巨嗜细胞的参与，其通过分泌各种炎性介质来破坏组织。

[0129] 通过用整体髓磷脂或髓磷脂衍生的蛋白和肽来免疫，可以在敏感的动物品系中建立 EAE。在 SJL/J 小鼠中，可以通过来自弗氏完全佐剂中蛋白脂质，即 $PLP_{139-151}$，的肽皮下免疫来再现地诱导 EAE。3 天后，小鼠接受 10^9 个热灭活的百日咳杆菌 (Bordetella pertussis) 微生物 (i.v.) 以增加血脑屏障的渗透性。这激活抗原特异性 T 细胞分泌前炎性细胞因子如淋巴毒素和干扰素 -γ。已知疾病的发展包括下述事件：

[0130] 1. 具有 $PLP_{139-151}$ 的树突细胞和巨嗜细胞激活 T 细胞；

[0131] 2. 白介素 -12 在巨嗜细胞和树突细胞中增加表达；

[0132] 3.T 细胞分化成分泌前炎性细胞并表达独特的趋化因子受体的效应细胞；

[0133] 4. 血脑屏障的渗透性的增加；

[0134] 5. 效应细胞和单核细胞与趋化因子的梯度相反地迁移进入脑实质；

[0135] 6. 炎性细胞的局部（重新）激活；

[0136] 7. 释放炎性介质和破坏少突神经胶质细胞和髓磷脂。

[0137] 典型地，在用 $PLP_{139-151}$ 免疫后 10-20 天之间，有 70-90％的用载体处理的 SJL/J 小鼠发展到疾病的首次发作。令人感兴趣的是，在 28-42 天之间，约 50％的患病动物还发展到 EAE 再次发作（复发）。

[0138] 在 42 天的实验设计中，使用 EAE 的临床严重性（失能分数）作为结果参数评价口服给药雌四醇治疗 EAE 的效果。由 Kono 等人开发的临 床打分系统 (J Exp Med 168, 213-227,1988) 用于监控 SJL/J EAE 模型的失能程度：0：无病；0.5：尾部局部麻痹或部分麻痹；1：完全尾部麻痹；2：下肢轻瘫、肢无力和尾部麻痹；2.5：部分肢麻痹；3：完全后肢或前肢麻痹；3.5：截瘫；4：四肢瘫痪、垂死；5：因 EAE 而死。用 $PLP_{139-151}$ 皮下免疫诱导疾病后，对由 9-10 只雌性 SJL/J 小鼠组成的组每日一次口服给药 3mg/kg、1mg/kg、0.3mg/kg 和 0.1mg/kg 四种不同剂量的雌四醇进行治疗，在全部 42 天监控期内持续进行。用载体 (Cavasol；羟基丙基 -β- 环糊精）治疗的组作为阴性对照。

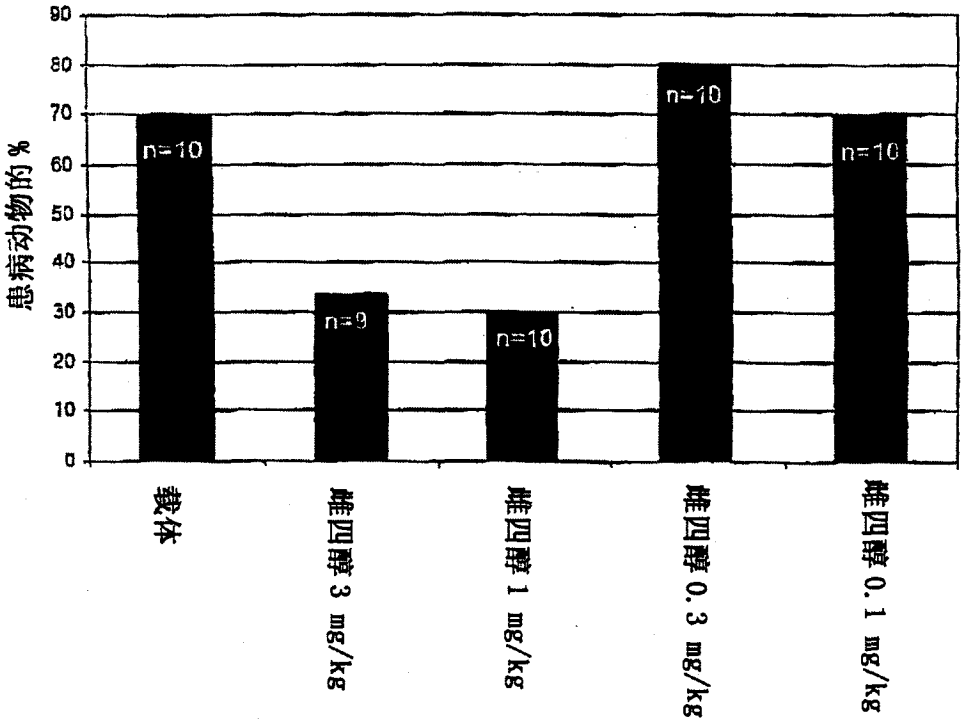
[0139] 从 Harlan（法国）得到 7 周龄雌性 SJL/J 小鼠。在开始实验之前，处理小鼠并适应 2 周，随机分成治疗组。皮下注射 50μg 于完全弗氏佐剂 (CFA，H37Ra Lot-2116643，Difco Laboratories，USA) 中乳化的来自蛋白脂质即 $PLP_{139-151}$ (Isogen Bioscience B.V.) 的合成肽来免疫小鼠。将乳浊液分布到侧腹的 4 个部位。在第 3 天，给小鼠静脉注射 10^9 个百日咳杆菌 (Bordetellapertussis) 细菌 (National Institute for Public Health，Bilthoven，荷兰）。从第 0 天 ($PLP_{139-151}$ 免疫后）直至第 42 天，根据下述计划，口服（每次强饲）0.2ml 雌四醇溶液或载体 (20％重量 / 体积的羟基丙基 -β- 环糊精水溶液）治疗小鼠：组 A：载体 (n = 10)；组 B：雌四醇，3mg/kg/ 天 (n = 9)；组 C：雌四醇，1mg/kg/ 天 (n = 10)；组 D：雌四醇，0.3mg/kg/ 天 (n = 10) 和组 E：雌四醇，0.1mg/kg/ 天 (n = 10)。当需要时，根据动物每日称得的体重调整剂量。对于各只小鼠，每日进行 EAE 失能打分。在治疗和监控阶段结束时，处死小鼠。

[0140] 通过方差分析 (ANOVA) 进行统计学分析，以测定治疗组和载体组之间的失能结果参数差异的显著性。对于 ANOVA 分析显示出显著差异的每一个参数，随后通过事后 (post-hoc)LSD（最小显著差）检验确定哪个组是不同的 ($P \leq 0.05$ 表示统计学上的显著差

异；$P > 0.05$ 则认为不显著）。使用 Windows 下的统计软件 SPSS11.0(SPSS Inc.,Chicago, IL,USA) 进行所有的统计分析。

[0141] 除了与 EAE 相关的症状外，在试验中没有观察到其它的临床症状，这表明雌四醇没有诱导任何显著的副作用。当在 3 个连续日内达到至少 3 的累积分数时，认为小鼠患有 EAE。由此，70％载体治疗的小鼠发展成 EAE（图 2）。用 3mg/kg 和 1mg/kg 雌四醇的治疗抑制了 EAE 的发病率，分别导致 40％和 33％的小鼠患有 EAE（图 2）。在用 0.3mg/kg 和 0.1mg/kg 雌四醇治疗的小鼠中，分别有 80％和 70％发展成 EAE。

[0142]

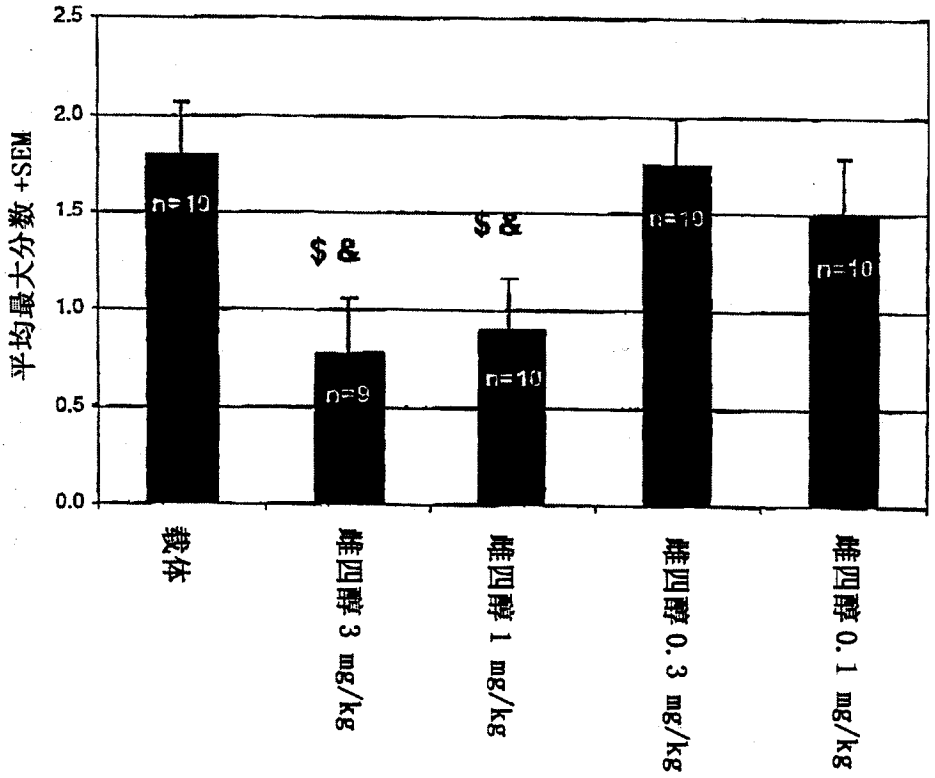


[0143] 图 2：雌四醇治疗对 SJL/J 小鼠 EAE 发病率的影响

[0144] 在免疫后第 12 天，用载体治疗的小鼠出现明显的临床 EAE 症状。在用最高剂量的雌四醇 (3 和 1mg/kg) 治疗的小鼠中，平均的发病日分别延迟到第 15.7 和 14.7 天。与载体治疗的小鼠相比，用两个最低剂量雌四醇 (0.3 和 0.1mg/kg) 治疗也表现出延迟疾病发作的趋势，但是没有统计学显著性。

[0145] 对于每只小鼠，评价其在整个监控阶段的最大临床分数，此后将个 体数据包括在组平均值中（图 3）。载体治疗的小鼠的平均最大临床分数是 1.8±0.3。用 3 和 1mg/kg 雌四醇治疗抑制了平均最大失能分数，得到的分数分别为 0.8±0.3 和 0.9±0.3。与载体治疗的小鼠相比，用两个最低剂量的雌四醇 (0.3 和 0.1mg/kg) 治疗没有表现出统计学显著性差异。以治疗组之间的 ANOVA 对比和事后 LSD 分析为基础，从而得出结论，与载体治疗的小鼠相比，口服雌四醇治疗以剂量依赖性的方式统计学显著地抑制 EAE 最大失能分数（对于 3mg/kg 和 1mg/kg 雌四醇，分别为 $P = 0.011$ 和 $P = 0.021$）。

[0146]



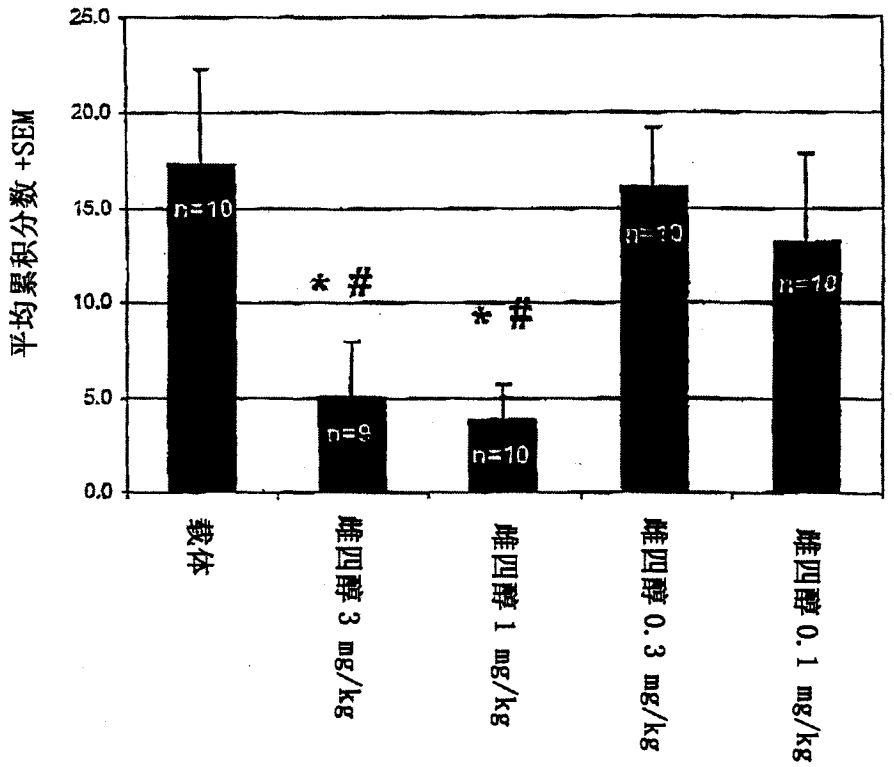
[0147] 图 3 :用雌四醇治疗对 SJL/J 小鼠的最大 EAE 分数的影响

[0148] $ 与载体相比，P = 0.011（雌四醇 3mg/kg）和 P = 0.021（雌四醇 1mg/kg）

[0149] & 与雌四醇 0.3mg/kg 相比，P = 0.016（雌四醇 3mg/kg）和 P = 0.029（雌四醇 1mg/kg）

[0150] 将实验的最大相关临床结果、即各小鼠的累积失能分数表示成图 4 中整个监控阶段（第 0-42 天）的组平均值。当对整个治疗和监控阶段分析时，载体治疗的小鼠发展的平均累积 EAE 分数为 17.4±5.0，而用 3 和 1mg/kg 雌四醇治疗将平均累积 EAE 分数分别降至 5.8±2.9 和 3.9±1.8（图 3）。与载体治疗的小鼠相比，用两个最低剂量的雌四醇（0.3 和 0.1mg/kg）治疗没有表现出统计学显著性差异。以治疗组之间的 ANOVA 对比和事后 LSD 分析为基础，从而得出结论，与载体治疗的小鼠相比，口服雌四醇治疗以剂量依赖性的方式统计学显著地抑制 EAE 累积失能分数（对于 3mg/kg 和 1mg/kg 雌四醇，分别为 P = 0.025 和 P = 0.012）。

[0151]

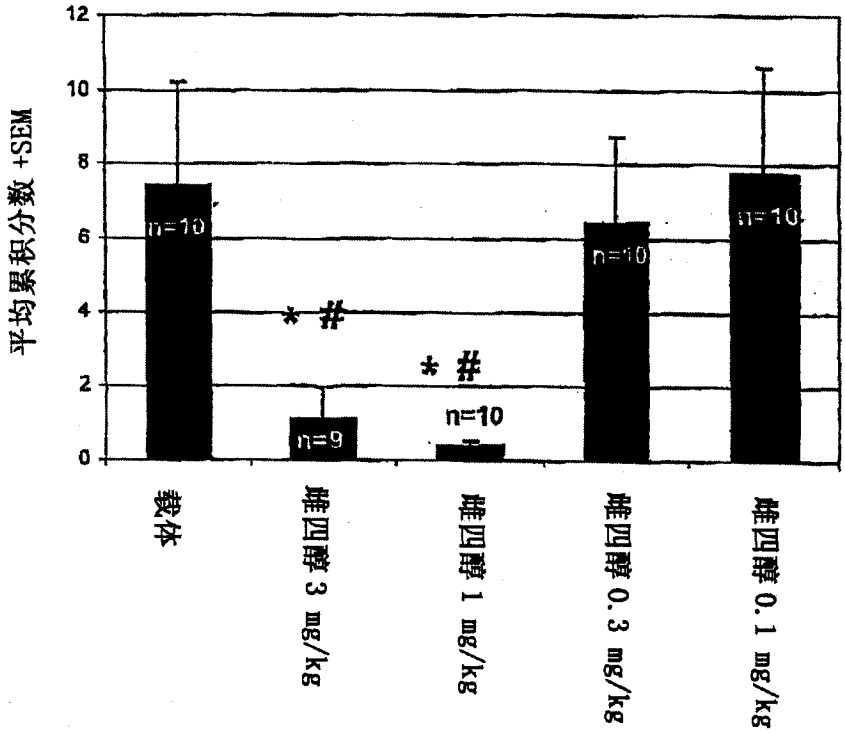


[0152] 图 4 :用雌四醇治疗对 SJL/J 小鼠累积 EAE 分数（第 0-42 天）的影响

[0153] * 与载体相比，P = 0.025（雌四醇 3mg/kg）和 P = 0.012（雌四醇 1mg/kg）# 与雌四醇 0.3mg/kg 相比，P = 0.042（雌四醇 3mg/kg）和 P = 0.022（雌四醇 1mg/kg）

[0154] 如在 SJL/J 小鼠的 $PLP_{139-151}$ EAE 模型中典型的，仅用载体治疗的大量的对照小鼠发展到第二次疾病发作（复发）。评价第二阶段的疾病活性、即第 26-42 天的临床 EAE 分数发现，与用载体治疗的小鼠和其它治疗组不同，用 3mg/kg 和 1mg/kg 雌四醇治疗的小鼠很少表现出疾病活性的证据（图 5）。以治疗组之间的 ANOVA 对比和事后 LSD 分析为基础，从而得出结论，与载体治疗的小鼠相比，口服雌四醇治疗以剂量依赖性的方式统计学显著地抑制 EAE 复发（对于 3mg/kg 和 1mg/kg 雌四醇，分别为 P = 0.045 和 P = 0.023）。

[0155]



[0156] 图 5 :用雌四醇治疗对 SJL/J 小鼠的复发阶段（第 26-42 天）累积临床 EAE 分数的影响

[0157] * 与载体相比，P ＝ 0.045（雌四醇 3mg/kg）和 P ＝ 0.023（雌四醇 1mg/kg）# 与雌四醇 0.3mg/kg 相比，P ＝ 0.050（雌四醇 3mg/kg）和 P ＝ 0.018（雌四醇 1mg/kg）

[0158] 这些数据表明，以能够有效改变内分泌参数（特别是阴道角质化）的量口服给药雌四醇会出人意料地抑制 EAE 的临床发展。而且，雌四醇能减轻患有 EAE 的动物的症状，并防止动物发展为具有严重疾病症状的 疾病复发。

[0159] 实施例 7

[0160] 用患有实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE)——一种自身反应性 T 淋巴细胞诱导触发并广泛地用作人多发性硬化 (MS) 模型的炎性疾病——的 B10.PL 小鼠评价雌四醇 (E4) 减轻免疫介导的疾病的症状和严重性的能力。

[0161] 从 Jackson Laboratories(Bar Harbor,Me.) 得到 8-12 周龄的雌性 B10.PL 小鼠，分成 12 只小鼠的治疗组。在诱导 EAE 疾病前 3 天，用氯胺酮 / 甲苯噻嗪麻醉剂混合物麻醉动物并切除卵巢。贯穿后背皮肤切开单一切口，贯穿腹膜切开双边侧腹切口，然后取出卵巢。

[0162] 按照 Deibler 等人 (Deibler,G.E.,等,Prep.Biochem.2 :139,1972) 的方法，从豚鼠脊髓分离出髓磷脂碱性蛋白 (MBP)。将 MBP 在 -20℃冻干保藏，使用前溶于 0.1M 乙酸使浓度为 8mg/ml。在免疫中，将 MBP 在等体积的含有结核杆菌 (Mycobacterium tuberculosis) H.sub.37 Ra(4mg/ml) 的完全弗氏佐剂 (CFA) 中乳化。

[0163] 为了诱导 EAE，用含有结核杆菌 H.sub.37 Ra 的 CFA 乳浊液 (0.1ml) 中的 400μg MBP 在尾根部皮肤中免疫小鼠。MBP 免疫后立即和 48 小时后，分别再给小鼠腹膜内注射 200ng 百日咳毒素 (Sigma,St.Louis,MO)。每日检查小鼠的 EAE 临床症状，进行 40 天，并根据 Clayton 等人 (J.Exp.Med.169 :1681,1989) 所述对疾病症状打分 :0 :无麻痹，1 :尾部无力 / 迟钝 / 目光呆滞，2 :部分后肢麻痹或肢无力，3 :掉头困难，严重肢无力或轻度麻痹，4 :

严重至全麻痹,5:垂死的/死亡。

[0164] 实验包括预防/治疗组合方案,其中从实验的第1天(MBP-免疫的那天)开始直到且包括第40天向小鼠给药各种量的E4。每日一次用E4(0.1、0.3、1.0或3.0mg/kg/天)口服治疗4组小鼠,一组小鼠每日接受一次口服载体治疗(羟基丙基-β-环糊精20%重量/体积)作为阴性对照。类似地,实验还包括,每日一次用E4(0.1、0.3、1.0或3.0mg/kg/天)皮下 治疗的4组小鼠,以及每日接受一次皮下载体治疗(羟基丙基-β-环糊精20%重量/体积)的一组小鼠作为阴性对照。

[0165] 口服和皮下载体治疗都不能在MBP免疫的小鼠中有效地预防EAE疾病的发展。通常在评价阶段,动物的疾病症状发作迅速并逐渐严重地发展出更多自身免疫疾病的迹象。在第40天,大多数动物患有严重形式的EAE(通常级别为3或更高)。令人感兴趣的是,在40天的评价阶段中,在延迟EAE疾病症状的发作和预防自身免疫病的严重发展方面,皮下和口服E4治疗表现出剂量依赖性效果。对比治疗组和对照组揭示,在受试剂量范围内,E4治疗的小鼠中受疾病折磨的动物数量和/或EAE症状的严重性得以剂量依赖性减少。

[0166] 用未去势雌性B10.PL和雄性B10.PL小鼠单独重复该实验,再次证明了E4在每日皮下和/或口服给药后剂量依赖性地减轻EAE症状和严重性的能力。

[0167] 实施例8

[0168] 在发展出胶原诱导的关节炎(CIA)的小鼠中——另外一种自身免疫和慢性炎性疾病的代表人关节炎疾病、特别是类风湿性关节炎(RA)的实验系统——评价雌四醇减轻免疫介导的疾病的严重性的能力和其可能的副作用,并与地塞米松的作用进行对比。

[0169] 使用两步免疫方案(Joosten等,"Dual role of IL-12 in early and latestages of murine collagen type II arthritis".J Immunol 1997;159:4094-4102;Joosten等,"IL-1β blockade prevents cartilage and bonedestruction in murine type II collagen-induced arthritis,whereas TNFα blockade only ameliorates joint inflammation".J Immunol 1999;163:5049-55)在雄性DBA/1小鼠中诱导关节炎。该品系对用牛II型胶原诱导的CIA高度敏感。在第0天,用在完全弗氏佐剂中乳化的牛II型胶原(100μg)免疫小鼠(在背部皮下注射4次)。在第21天,腹膜内注射100μg在PBS中稀释的II型胶原以加强小鼠。

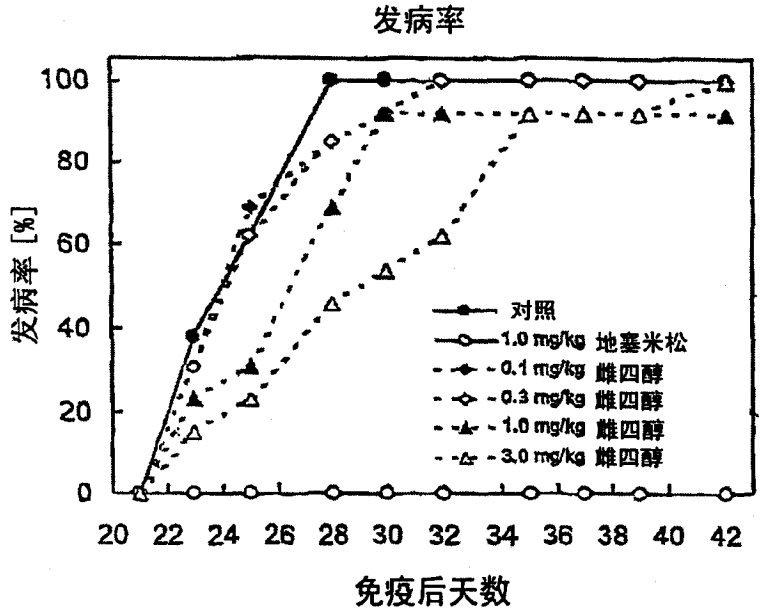
[0170] 在6周的实验方案中,研究了口服雌四醇治疗胶原诱导的关节炎的作用。从第22天直到实验结束(第42天),每日一次用载体(20%重量/体积的羟基丙基-β-环糊精水溶液)治疗动物作为阴性对照,或者每日一次给药四种不同剂量的雌四醇(3mg/kg、1mg/kg、0.3mg/kg和0.1mg/kg)。选择地塞米松(1mg/kg)作为阳性对照,因为它是被充分研究的皮质甾体,它能减少肿胀和发炎,并应用于多种疾病如皮肤病(银屑病、荨麻疹)、过敏症、呼吸困难、癌症、血液病(贫血)、消化问题、眼病,以及用于治疗关节炎。尽管作为抗炎药有效,还已知地塞米松能诱发多种副作用,其中包括在人类中诱发骨质疏松、降低肾上腺功能、头晕、恶心、消化不良、食欲增加、由于水潴留增加引起的体重增加、虚弱和/或睡眠障碍。另外,啮齿类动物中全身性的地塞米松治疗导致易于通过体重减轻而观察到的强烈的分解代谢作用(Orzechowski等2002,"Rats with aglucocorticoid-induced catabolic state show symptoms of oxidative stress andspleen atrophy:the effects of age and recovery".J Vet Med A Physiol PatholClin Med;49:256-63)。

[0171] 在实验中使用的所有组都由 13 只小鼠组成。在实验过程中，对小鼠称重，并监控关节炎的临床症状。根据 Joosten 等人 1997(J. Immunol.，159 :4094-4102) 和 Joosten 等人 1999(J. Immunol.，163 :5049-55) 记载的打分系统，对疾病严重性进行打分（临床关节炎分数）。

[0172] 如下进行基础统计学分析 :通过方差分析 (ANOVA) 检验所有治疗组之间主要临床结果参数上的差异的显著性。每个显著的 ANOVA 都随后进行事后杜凯氏检验 (Tukey tests)，以确定每个治疗组和对照组之间的差异的显著性。而且，使用线性回归分析研究雌四醇治疗效果的剂量依赖性。使用 Windows 下的统计软件 SPSS 11.0(SPSS Inc.，Chicago，IL，USA) 进行所有的统计分析。

[0173] 在第 21 天用 II 型胶原第 2 次免疫后不久，载体治疗的动物（对照）都发展成关节炎。载体治疗的小鼠的平均发病日为 25.4±0.64 天，在第 28 天达到 100％的发病率（图 6)。第 21 天加强之后，地塞米松治疗的动 物（阳性对照）在实验结束前都没有发展成关节炎。治疗组中，直到第 42 天，发病率仍是 0％（图 6)。0.1、0.3、1.0 和 3.0mg/kg 雌四醇治疗组中，雌四醇能剂量依赖性地将平均疾病发作日延迟至第 25.8、26.0、28.2 和 30.7 天。该作用也见于图 6，其中与载体治疗的动物对照组相比，1.0mg 和 3.0mg/kg 雌四醇组明显地延迟了疾病的发病率的增加。

[0174]

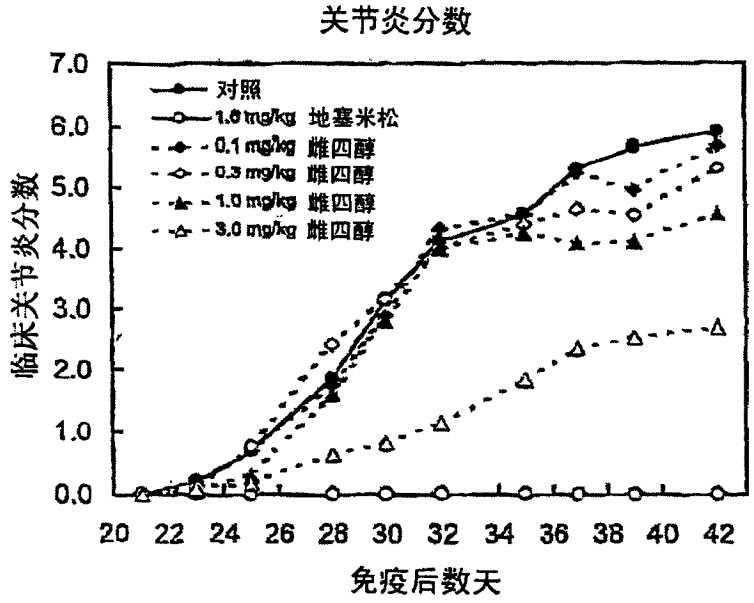


[0175] 图 6 :雌四醇治疗对小鼠 CIA 发病率的影响，显示了所有受试治疗组的发病率对时间的关系，“疾病”定义为宏观关节炎分数大于 0

[0176] 在载体治疗的小鼠中，宏观关节炎分数随着时间而稳步增加，在第 42 天平均分数达到 5.90±0.38(图 7)。在整个监控阶段（第 21-42 天)，载体治疗的小鼠的平均累积关节炎分数是 31.4±1.73(图 8)。因为地塞米松治疗的小鼠没有发展成疾病，直到第 42 天其宏观关节炎分数仍然保持为 0(图 7)。因此，地塞米松治疗的小鼠的平均累积关节炎分数（第 21-42 天）也是 0(图 8)。进一步与关节炎发病的延迟相一致，接受雌四醇的小鼠的宏观关节炎分数的发展也呈剂量依赖性地减少（图 7)。类似地，雌四醇治疗的动物的平均累积关节炎分数（第 21-42 天）也呈剂量依赖性地减少，并且与载体治疗的动物相比显著不

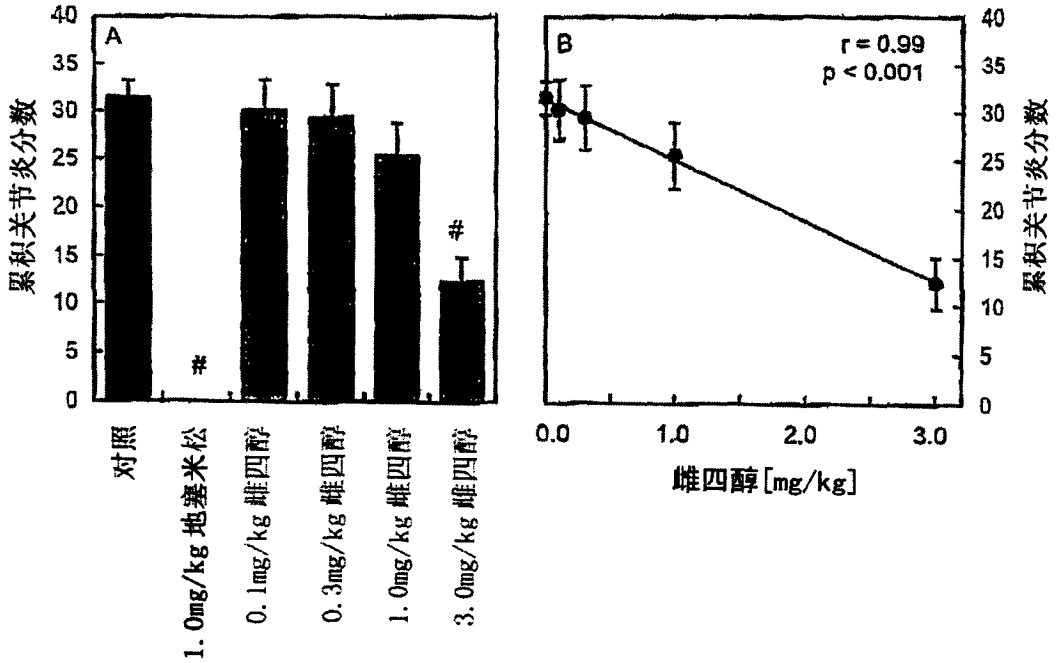
同（图 8A 和 8B）。

[0177]



[0178] 图 7：雌四醇治疗小鼠 CIA 对宏观关节炎分数的影响。每个点都代表组平均值（n = 13）

[0179]

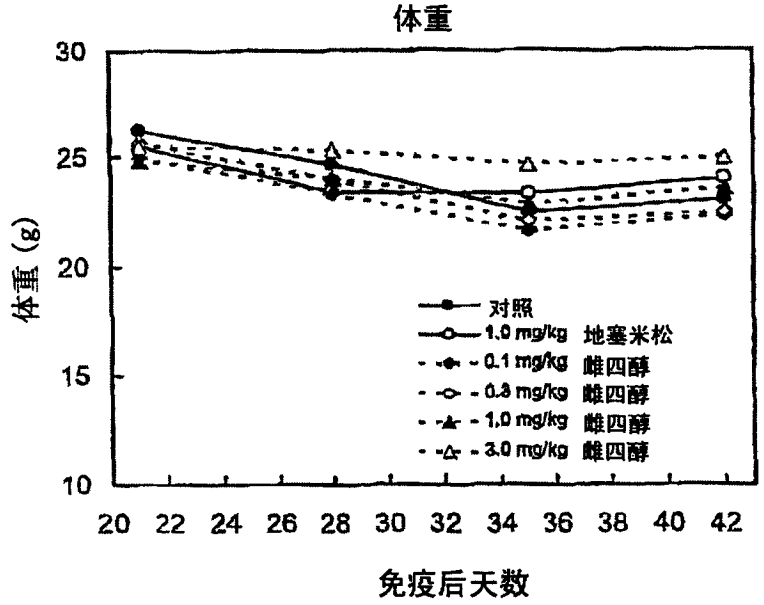


[0180] 图 8A 和 8B：雌四醇治疗小鼠 CIA 对累积关节炎分数的影响。对每只小鼠，通过合计在 10 个时间点每次得到的分数计算出累积分数。图 A：组数据表达为平均值 ±SEM(n = 13)。图 B：雌四醇剂量对累积关节炎分数的线性回归。# 代表根据 ANOVA 和杜凯氏事后检验相对于对照组 $p < 0.001$。

[0181] 每周测定体重，以它作为疾病严重性和 / 或药物诱导的副作用的另外一个临床终点。在第 28、35 和 42 天，用载体治疗的动物（阴性对照）的体重分别减少至它们起始重量（第 21 天）的 94.2%、85.7% 和 87.9%（图 9）。用地塞米松治疗后，小鼠的体重在第 28、35 和 42 天也分别减少至它们起始重量（第 21 天）的 91.5%、91.4% 和 94.0%（图 9）。对于

更低的三个剂量 (0.1、0.3 和 1.0mg/kg)，用雌四醇口服治疗的小鼠的体重减少与阴性和阳性对照动物组相当。但是，最高的雌四醇剂量 (3.0mg/kg) 保护了小鼠免于体重减少：该组小鼠的体重在第 28、35 和 42 天仅分别减少至它们起始重量（第 21 天）的 99.3%、96.7% 和 97.9%（图 9)，这表明关节炎和药物诱导的副作用（例如使用地塞米松所见到的）都没有对用 3.0mg/kg 剂量治疗的动物造成不良影响。

[0182]



[0183] 图 9：用雌四醇治疗对 CIA 小鼠体重的影响。在第 21、28、35 和 42 天称量每组小鼠的体重。

[0184] 总之，这些数据表明，雌四醇以能有效地改变内分泌参数（例如阴道角质化）的量口服给药能令人惊奇地抑制 CIA 中关节炎的发展和关节炎 的严重性。这样，雌四醇可以用作关节治疗炎的不会表现出如见于目前已有药物（例如地塞米松）的副作用的治疗药征 (modality)。

[0185] 实施例 9

[0186] 在发展出用胶原诱导的关节炎 (CIA) 的切除卵巢的小鼠中进一步评价雌四醇 (E4) 减轻免疫介导的疾病的症状和严重性的能力。

[0187] 在开始实验时，将 8-12 周龄的雌性 DBA-1 小鼠分成 12 只小鼠的治疗组。在诱导 CIA 疾病前 3 天，用氯胺酮 / 甲苯噻嗪麻醉剂混合物麻醉动物并切除卵巢。贯穿后背皮肤切开单一切口，贯穿腹膜切开双边侧腹切口，然后取出卵巢。

[0188] 根据 Wooley 等人 (J.Exp.Med.154：688-700，1981) 所述的方法分离和纯化牛 II 型胶原 (CII)。在使用前先将 CII 以 2mg/ml 浓度于 0.1M 乙酸，然后以 1 ： 1 的比例与含有结核杆菌 H.sub.37 Ra(4mg/ml) 的完全弗氏佐剂 (CFA) 乳化，或者与不完全弗氏佐剂 (IFA)1 ： 1 乳化以加强免疫。

[0189] 为了诱导 CIA，在尾根部用在 CFA 中制备的 0.1ml 乳浊液免疫小鼠。21 天后，小鼠接受在 IFA 中制备的 0.1ml 乳浊液加强注射。从实验开始直到首次免疫后第 60 天实验结束，每天观察小鼠的 CIA 临床症状。如 Wooley 等人 (J.Exp.Med.154：688-700，1981) 所述，使用 0-3 的标准对每只足掌的 CIA 临床症状打分：0：无关节炎；1：发红且掌或趾部肿胀；2：

严重肿胀，或足掌畸形；和 3：关节强直。通过总计所有足掌的分数得到每只小鼠的关节炎分数。对于每只小鼠，通过关节炎分数测量的可能的严重性的范围为 0-12。

[0190] 采用预防 / 治疗组合方案，其中从实验的第 1 天（首次 CII- 免疫的那天）开始直到且包括第 60 天向小鼠给药各种量的 E4。每日一次用 E4(0.1、0.3、1.0 或 3.0mg/kg/ 天）口服治疗 4 组小鼠，一组小鼠每日接受一次口服载体治疗（羟基丙基 -β- 环糊精 20％重量 / 体积）作为阴性对照。类似地，实验还包括，每日一次用 E4(0.1、0.3、1.0 或 3.0mg/kg/ 天）皮下治疗的 4 组小鼠，以及每日接受一次皮下载体治疗（羟基丙基 -β- 环糊精 20％重量 / 体积）的一组小鼠作为阴性对照。

[0191] 口服和皮下的载体治疗都不能有效地预防 CII 免疫小鼠的 CIA 疾病的发展。在评价阶段，载体治疗的动物通常疾病症状发作迅速，且发展出更多的 CIA 迹象。在第 60 天，大多数动物患有严重的 CIA（通常为等级为 4 或更高）。令人感兴趣的是，在 60 天的评价阶段中，在延迟 CIA 症状的发作和预防逐渐加重发展成更严重型的关节破损方面，皮下和口服 E4 治疗表现出剂量依赖性效果。治疗组和对照组的比较显示，在 E4 治疗的小鼠中，患病动物的数量和 / 或 CIA 症状的严重性呈剂量依赖性减少。

[0192] 用未去势雌性 DBA-1 单独地重复该实验，再次证明了 E4 在每日皮下和 / 或口服给药后的剂量依赖性减轻 CIA 症状和严重性的能力。

[0193] 实施例 10

[0194] 制备 100 粒胶囊，每粒胶囊含有 2mg 雌四醇和 2mg 地塞米松：

[0195] 将 200mg 雌四醇、200mg 地塞米松（作为磷酸氢二钠盐）和 75mg 二氧化硅胶体 (Aerosil® 200V) 一起混合。将得到的粉末混合物转移到带有体积标记的烧杯中。用微晶纤维素 (Avicel® PH102) 调节体积至 37ml。随后，将粉末混合物装入 100 粒两片式硬明胶胶囊 (Capsugel® 2)。

[0196] 实施例 11

[0197] 制备 100 粒胶囊，每粒胶囊含有 2mg 雌四醇和 3mg 甲氨蝶呤：

[0198] 将 200mg 雌四醇、300mg 甲氨蝶呤（作为二钠盐）和 75mg 二氧化硅胶体 (Aerosil® 200V) 一起混合。将得到的粉末混合物转移到带有体积标记的烧杯中。用微晶纤维素 (Avicel® PH102) 调节体积至 37ml。将得到的粉末混合物装入 100 粒两片式硬明胶胶囊 (Capsugel® 2)。