



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102481290 A

(43) 申请公布日 2012. 05. 30

-
- (21) 申请号 201080030303. 8 (51) Int. Cl.
A61K 31/4375 (2006. 01)
- (22) 申请日 2010. 06. 30 *A61K 9/00* (2006. 01)
- (30) 优先权数据 *A61K 9/06* (2006. 01)
61/221, 725 2009. 06. 30 US *A61K 9/08* (2006. 01)
- (85) PCT申请进入国家阶段日 *A61P 17/00* (2006. 01)
2011. 12. 30 *A61P 17/06* (2006. 01)
- (86) PCT申请的申请数据 *A61P 17/08* (2006. 01)
PCT/CN2010/000983 2010. 06. 30
- (87) PCT申请的公布数据
W02011/000218 EN 2011. 01. 06
- (71) 申请人 德安生医有限公司
地址 中国台湾桃园县龟山乡大湖村文二三
街 12 号
- (72) 发明人 洪舜郁 钟文宏 张子文
- (74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100
代理人 陶家蓉

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 2 页

(54) 发明名称

用于治疗红斑痤疮或红脸相关皮肤病的含黄连素或其类似物的组合物

(57) 摘要

本发明涉及黄连素及其生物等价类似物如黄藤素和黄连碱的外用药物制剂,用于治疗红斑痤疮和其它红脸相关皮肤疾病。本发明的外用药物制剂含有作为主要活性药物成分、浓度高于 0. 1% 的纯化黄连素。本发明还涉及治疗红斑痤疮和其它红脸相关皮肤病,例如固醇诱导的红斑痤疮样皮炎的方法,包括施用含有黄连素或其生物等价类似物如黄藤素的外用药物制剂。

1. 一种用于治疗红脸相关皮肤病的外用药物组合物,所述组合物含有至少 0.02% w/w 黄连素或其生物等价类似物。
2. 如权利要求 1 所述的外用药物组合物,其特征在于,所述黄连素或其生物等价类似物是主要药物活性组分。
3. 如权利要求 1 所述的外用药物组合物,其特征在于,所述黄连素或其生物等价类似物是唯一药物活性组分。
4. 如权利要求 1 所述的外用药物组合物,其特征在于,所述红脸相关皮肤病选自:红斑痤疮、寻常痤疮、脂溢性皮炎、光照性皮炎、接触性皮炎、类固醇诱导的红斑痤疮样皮炎和 EGFR 抑制物诱导的痤疮样皮炎。
5. 如权利要求 4 所述的外用药物组合物,其特征在于,所述红脸相关皮肤病是红斑痤疮。
6. 如权利要求 1 所述的外用药物组合物,其特征在于,所述黄连素或其生物学等价类似物的浓度为约 0.1% -2% w/w。
7. 如权利要求 1 所述的外用药物组合物,其特征在于,所述组合物还包含选自水、甲醇、乙醇、和二甲亚砜 (DMSO) 的溶剂。
8. 如权利要求 1 所述的外用药物组合物,其特征在于,所述组合物还含有选自增溶剂、乳化剂、润滑剂和润湿剂的一种或多种组分。
9. 如权利要求 8 所述的外用药物组合物,其特征在于,所述组合物还含有甘油、透明质酸和 / 或植物提取物。
10. 如权利要求 1 所述的外用药物组合物,其特征在于,所述组合物还含有一种或多种治疗粉刺和 / 或红斑痤疮的药物。
11. 如权利要求 10 所述的外用药物组合物,其特征在于,所述用于治疗粉刺和 / 或红斑痤疮的药物是抗生素或抗菌剂。
12. 如权利要求 1 所述的外用药物组合物,其特征在于,所述用于治疗粉刺和 / 或红斑痤疮的药物选自壬二酸、维甲酸类、甲硝唑、过氧化苯酰、磺胺醋酰钠和硫磺。
13. 如权利要求 1 所述的外用药物组合物,其特征在于,所述组合物采用溶液、洗液、凝胶、霜、油膏或喷雾的形式。
14. 如权利要求 1 所述的外用药物组合物,其特征在于,所述黄连素的生物学等价类似物选自药根碱、黄藤素、黄连碱、9- 去甲基黄连素、9- 去甲基黄藤素、13- 氢化黄连素、小檗红碱、巴马除宾、9-0- 乙基小檗红碱、9-0- 乙基 -13- 乙基小檗红碱、13- 甲基二氢黄连素 N- 甲基盐、四氢原小檗碱及其 N- 甲基盐、13- 己基黄连素、13- 己基黄藤素、和 9- 月桂酰基氯化小檗红碱。
15. 如权利要求 14 所述的外用药物组合物,其特征在于,所述黄连素的生物等价类似物是黄藤素或黄连碱。
16. 一种治疗红脸相关皮肤病的方法,所述方法包括对受影响的皮肤外部施用治疗有效量的含黄连素或其生物等价类似物的药物组合物。
17. 如权利要求 16 所述的方法,其特征在于,所述红脸相关皮肤病选自:红斑痤疮、寻常痤疮、脂溢性皮炎、光照性皮炎、接触性皮炎、类固醇诱导的红斑痤疮样皮炎和 EGFR 抑制物诱导的痤疮样皮炎。

18. 如权利要求 17 所述的方法,其特征在于,所述红脸相关皮肤病是红斑痤疮。
19. 如权利要求 16 所述的方法,其特征在于,所述药物组合物含有至少 0.02% w/w 的黄连素或其生物等价类似物。
20. 如权利要求 19 所述的方法,其特征在于,所述药物组合物含有至少 0.1% - 约 2% w/w 的黄连素或其生物等价类似物。
21. 如权利要求 16 所述的方法,其特征在于,所述药物组合物中的所述黄连素的生物等价类似物选自药根碱、黄藤素、黄连碱、9-去甲基黄连素、9-去甲基黄藤素、13-氢化黄连素、小檗红碱、巴马除宾、9-0-乙基小檗红碱、9-0-乙基-13-乙基小檗红碱、13-甲基二氢黄连素 N-甲基盐、四氢原小檗碱及其 N-甲基盐、13-己基黄连素、13-己基黄藤素、和 9-月桂酰基氯化小檗红碱。
22. 如权利要求 21 所述的方法,其特征在于,所述黄连素的生物等价类似物是黄藤素或黄连碱。

用于治疗红斑痤疮或红脸相关皮肤病的含黄连素或其类似物的组合物

[0001] 发明背景

[0002] 1. 红斑痤疮及其主要症状：

[0003] 红斑痤疮是一种慢性皮肤病，主要表现为面部，尤其是面部中央区的发红和肿胀。其它受影响区域包括头皮、颈、耳、胸、背和眼。红斑痤疮的特征是面部潮红、红斑、毛细血管扩张和伴有丘疹和脓疱的炎症发作，以及在严重情况下的肥大性酒糟鼻。通常不存在粉刺¹。

[0004] 患有红斑痤疮的病人大部分面部皮肤敏感度增加且干燥，具有脱屑性面部皮炎，面部浮肿，且有肉芽肿性丘疹结节²。根据临床和组织学特征，疾病可分成 4 小类：(a) 红斑毛细血管扩张型、(b) 丘疹脓疱型、(c) 增生肉芽肿型、和 (d) 眼部型，每种都有三种严重程度（轻微、中度、严重）³。疾病过程通常是慢性的，伴有反复的缓解和复发。

[0005] 2. 其它红脸相关皮肤病

[0006] 红斑痤疮是最常见的红脸皮肤病。其它有症状相似性和可能的共同病因的红脸相关皮肤病包括寻常痤疮、脂溢性皮炎、光照性皮炎和接触性皮炎。这些红脸相关疾病可能是有发热感，潮红敏感性或具有强烈敏感性的烧灼感⁴。患有红斑痤疮和其它红脸相关皮肤病的病人常对环境和外部因素极度敏感⁵。类固醇诱导的红斑痤疮样皮炎（或类固醇红斑痤疮）是一种丘疹或脓疱性损伤，具有红斑和水肿基底，伴有或不伴有毛细管扩张，该疾病是由于长期对面部施用外用类固醇，或者是在停止外用类固醇后的反弹症状^{6,7} (Chen AY Zirwas MJ, 2009 ; Lee DH, Li K, Suh DH 2008)。EGFR 抑制物，例如西妥昔单抗、吉非替尼 (gefitinib) 在 30-90% 的病人中导致面部或其它皮肤区域的痤疮样皮炎，包括丘疹脓疱性反应、红斑、毛细血管扩张、和发红，还可能被细菌例如金黄色葡萄球菌 (staphylococcus aureus) 重叠感染^{8,9} (Wollenberg A, Kroth J 等, 2010 ; Lacouture ME, Maitland ML 等, 2010)。

[0007] 3. 红斑痤疮病理

[0008] 红斑痤疮的病因并未被完全理解。已提出各种会引起红斑痤疮发生和表现的因素。但是，其中任何一种都不是绝对肯定的¹。

[0009] 3.1. 遗传学贡献

[0010] 早期研究表明，潮红作为面部红斑痤疮的最早表现，有遗传倾向性¹⁰。另外，报道了谷胱甘肽 S- 转移酶 MU-1 (GSTM1) 和谷胱甘肽 S- 转移酶 θ 1 (GSTT1) 空白基因型与红斑痤疮的风险增加有关¹¹。

[0011] 3.2. 炎症和先天性免疫系统

[0012] 随着红斑痤疮发展，炎症损伤也变得明显。与寻常痤疮不同，炎症性红斑痤疮不是毛囊皮脂腺单元的细菌性疾病。取自红斑痤疮病人的皮肤样品中通常不存在粉刺，而仅鉴定出正常菌群¹²。红斑痤疮的炎症阶段可被认为是慢性无菌蜂窝织炎的一种形式¹³。虽然检测到微生物的存在是红斑痤疮的一种可能诱因，结果并非是排他性的^{1±}。毛囊蠕形螨 (Demodex folliculorum mites) 被认为是共生性的，在红斑痤疮中并不是重要的病因，虽然由于螨的炎症反应可能会加重症状¹⁴。

[0013] Yamasaki 等在红斑痤疮病人的皮肤损伤中通过组织学染色发现了异常高水平的导管素 (cathelicidin)。发现导管素刺激的人表皮角质形成细胞使 IL-8 释放增加。在小鼠皮肤内注射导管素导致炎症变化,伴有在人类红斑痤疮皮肤病中特征性的嗜中性粒细胞浸润和微血管增加¹⁵。导管素在免疫学上可能具有双重作用,因为它可同时杀死微生物和刺激宿主炎症应答,例如诱导 IL-8 释放¹⁶。发现在红斑痤疮中增加的其它炎症细胞因子包括 IL-1 α 和转化生长因子 β -2^{17,18}。

[0014] 3.3. 血管调节剂

[0015] 炎症调节剂可能引起在红斑痤疮病人中观察到的血管扩张。例如,已提到 P 物质、组胺、5-羟色胺、细胞内缓激肽或前列腺素¹⁹。Smith 等报导了红斑痤疮中血管内皮生长因子及其受体的表达增加²⁰。

[0016] 4. 当前红斑痤疮管理

[0017] 在治疗红斑痤疮中已使用了许多抗生素,例如四环素和多西环素。已提出这些抗生素赋予消炎作用而不是抗微生物作用。然而其它消炎药在治疗红斑痤疮中无效。免疫抑制剂,例如皮质类固醇通常使红斑痤疮的炎症状况恶化¹。

[0018] 外用甲硝唑和一些系统性抗生素常用作红斑痤疮的一线治疗。口服四环素、多西环素和米诺环素常用于治疗红斑痤疮。口服抗生素的效力更可能是由于消炎作用,而不是抗生素作用²¹。美国 FDA 于 2002 年批准了壬二酸的 15% 凝胶用于轻度到中度红斑痤疮的外用治疗²²。其它以“标示外”方式使用的传统外用药包括克林霉素、磺胺醋酰胺和硫磺,但其机制尚不很清楚。

[0019] 5. 黄连素在非皮肤病中的应用

[0020] 黄连素 (天然黄 18,6-二氢 -9,10-二甲氧基苯并 (g)-1,3-苯并二恶茂 (5,6-a) 喹啉) 是一种存在于草本植物,例如黄连属 (黄连 (*Coptidis rhizome*))、黄檗、黄芩 (*Scutellaria baicalensis*)、亮叶十大功劳 (*Mahonia aquifolium*) 和小檗中的异喹啉生物碱²³。发现黄连素及其衍生物具有抗微生物和抗疟活性。其可对许多种病原体,例如真菌、酵母菌、寄生虫、细菌和病毒见效²⁴。发现黄连素还具有其它可能的益处。例如,其有治疗高血胆固醇、心血管疾病、糖尿病和肿瘤的潜力²⁵。

[0021] 黄连素还具有消炎功能,但其确切机制尚未知。近来,一些研究人员报导黄连素的消炎机制是由环加氧酶 -2 (COX-2) 通路介导的,因为 COX-2 在炎症中增加的前列腺素合成中起到了关键作用²⁶。在一些用于治疗沙眼的滴眼液或眼膏中用黄连素作为一种成分²⁷。

[0022] 6. 黄连素在皮肤病中的应用

[0023] 美国专利 #6440465 涉及葡糖胺的外用皮肤制剂,其具有含黄连素的软化剂基底,用于治疗银屑病²⁸。专利申请 #20050158404 涉及一种口服给药的营养品、饮食补剂或药物组合物,其含有维生素 A、维生素 E、硒、维生素 B6、锌、铬、和黄连素的草本来源,用于治疗痤疮²⁹。美国专利 #6974799 涉及外用组合物,含有三肽 (N-棕榈酰基 -Gly-His-Lys) 和四肽 (N-棕榈酰基 -Gly-Gln-Pro-Arg),用于治疗衰老的可见迹象,包括皱纹、伸展纹、黑眼圈³⁰。制剂可含有额外组分,包括黄连素。在这些发明中,黄连素作为许多成分之一纳入,且其浓度未明确。

[0024] 专利申请 #20040146539 涉及有瘦身和调理紧致抗衰老益处的外用营养组合物,其可用于治疗皮肤老化、皱纹、皮肤脱屑、痤疮、红斑痤疮和其它皮肤问题³¹。该发明的组合

物包含选自数种药物的抗菌剂,包括黄连素。在这些营养组合物中,黄连素作为许多成分之一纳入,且其浓度未明确。有一种 10%亮叶十大功劳霜 (Relieva™,加拿大阿波罗制药公司 (Apollo Pharmaceutical Canada Inc)),其含有 0.1%黄连素,用于治疗银屑病³²。

[0025] 黄连素在治疗红斑痤疮和其它红脸相关皮肤病中的疗效是未知的。迄今,没有直接证据提示黄连素可改善红斑痤疮症状。

[0026] 发明描述

[0027] 需要一种治疗红斑痤疮和其它相关皮肤病的副作用最小的有效疗法。本发明涉及安全有效地治疗红斑痤疮和其它红脸相关皮肤病,例如痤疮、脂溢性皮炎、接触性皮炎和光照性皮炎的外用药物制剂。本发明认识到目前可得的含黄连素作为组分的外用药物制剂或经实验配方中的缺陷,从而改善了该缺陷。

[0028] 有一系列证据表明在使用纯化黄连素或含黄连素草本提取物的动物研究和人类临床实验中,黄连素是一种药物活性组分。在许多疾病指征,例如细菌和真菌感染和心血管疾病的治疗中,有时获得黄连素统计学显著的结果。在用富含黄连素的提取物制剂治疗银屑病的试验中,也获得了有效结果,虽然黄连素对银屑病的效力还未被接受。这些结果提示,黄连素可作用于分子靶标,导致一些分子通路和细胞功能的改变,如本专利申请背景技术部分所述。

[0029] 在许多药物化合物的药理研究中已清楚显示,一种药物活性化合物必需在体内或受影响组织内存在超过一定的药物阈值浓度,以实现有意义的生物学和药理学效果,从而在受治个体中起到疗效。在含有一种或多种植物提取物的草药制品中,存在多种活性药物成分。在大多数使用草药制品的口腔或外用途径的治疗中,各种药物成分以低于阈值的浓度存在于治疗个体的身体或受影响组织内。然而,来自相同或不同植物的几种化合物可能作用于相同分子靶标,或者来自相同或不同植物的几种化合物可能作用于同一生物途径中的不同分子靶标。结果,各种化合物一致作用,产生有意义的生物学和药理学效应,从而产生疗效。

[0030] 当草药制剂不能在受治疗个体中产生疗效时,可能是由于其中所含的一种本应药物活性的化合物在受治疗个体中浓度太低,而该化合物本身或与制剂中的化合物组合不能产生有意义的生物学和药理学效果。实际上,鉴定和分离出了许多用于草药制剂的重要药物化合物(单化学实体)。用这些纯化合物的疗效通常超过含这些化合物的草药制剂可实现的疗效。

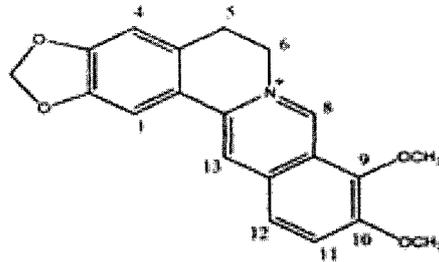
[0031] 几世纪来,已用富含黄连素植物提取物的外用草药制剂治疗各种疾病,包括各种皮肤病,例如银屑病、痤疮、湿疹等。这些外用植物制剂获得了各式各样的结果。在一些制剂中,含黄连素的提取物由构成制剂的约 10%各种成分组成。估计外用总制品中的黄连素化合物占最终制剂的约 0.1% (w/w)³²。

[0032] 基于上述论述,我们研究了不同浓度的黄连素在体外对可能参与红斑痤疮发病的生物学途径的效果。基于上述的结果和论述,我们开发了含确定百分数黄连素的化学上明确的外用药物制剂,其浓度高于含草药黄连素的传统药物制剂中黄连素浓度。接着,我们在红斑痤疮病人受影响皮肤区域上测试了这些制剂。我们的发现表明,含 0.1% (w/w) 以上的黄连素的外用药物制剂可在治疗红斑痤疮和相关的敏感性红脸疾病中产生有效和可容许的效果。

[0033] 黄连素类似物

[0034] 黄连素 (5,6-二氢-9,10-二甲氧基苯并(g)-1,3-苯并二恶茂(5,6-a)喹啉) 的结构如下所示:

[0035]



[0036] 黄连素

[0037] 可制备多种具有与黄连素类似的不同生物活性的原小檗碱类生物碱,例如:药根碱、黄藤素、黄连碱、9-去甲基黄连素、9-去甲基黄藤素、13-氢化黄连素、小檗红碱、巴马除宾、9-0-乙基小檗红碱、9-0-乙基-13-乙基小檗红碱、13-甲基二氢黄连素N-甲基盐、四氢原小檗碱及其N-甲基盐、13-己基黄连素、13-己基黄藤素、和9-月桂酰基氯化小檗红碱^{33,34}。

[0038] 黄藤素存在于不同科的植物中,最著名的是在黄藤 (*Fibrarurea Tinctoria* Lour) 的根茎中。黄藤素是一种异喹啉生物碱,含有黄藤素的制剂在中国广泛用于治疗妇科炎症、菌痢、肠炎、呼吸道感染、尿路感染。另外,黄藤素还有抗心律不齐、消毒、抑菌、和抗病毒活性。黄藤素还可用作抗肿瘤药筛选中的化合物³⁵。已有含黄藤素的药物作为外用毛发生长抑制剂 (Keramene, Divine Skin Solutions D S Laboratories Keramene Body Hair Minimizer)。

[0039] 黄连碱是在中国金线 (*Coptis chinensis*) 中发现的一种生物碱。在中草药中,它与相关的化合物黄连素一起用于治疗细菌感染导致的消化障碍。黄连碱还表现出对肿瘤生长的某些显著抑制。已显示黄连碱在体外对人肿瘤结肠细胞系³⁶ 和人肝细胞癌和白血病细胞系³⁷ 有细胞毒性。

[0040] 在我们的研究中,我们也调查了黄藤素和黄连碱在不同浓度下对红斑痤疮发病机理中可能涉及的生物学途径的体外和体内效果。基于上述结果和论述,我们也开发了化学上明确的外用药物制剂,其含有确定浓度的黄藤素或黄连碱。这些制剂可在治疗红斑痤疮和相关敏感性红脸疾病中实现有效和可容许的结果。

[0041] 实施例 1:黄连素抑制人角质形成细胞中导管素诱导的细胞因子分泌的效果 (体外实验)

[0042] 对于我们的体外研究,将黄连素 (西格玛公司 (Sigma),美国密苏里州圣路易斯) 溶于水、甲醇、乙醇或二甲亚砜 (DMSO)。正常人角质形成细胞 (英杰公司 (Invitrogen),美国加利福尼亚州) 在 EpiLife 培养基 (英杰公司,美国加利福尼亚州) 上生长,该培养基补充有 0.06mM Ca^{+2} 、1% EpiLife 限定生长添加剂、和 1% 青霉素 / 链霉素 (英杰公司,美国加利福尼亚州)。细胞在 37°C 的含 5% CO_2 和 95% 空气的湿润大气中生长。人角质形成细胞培养至汇合,用合成的导管素 (LL-37) (6.4 μ M) 处理 16 小时,诱导类似于在红斑痤疮中观察到的炎症反应。一些导管素处理的角质形成细胞培养物与 1.25 μ g/ml-12.5 μ g/ml

浓度的黄连素共孵育。用导管素或含 1% 乙醇的导管素处理,但不使用黄连素的角质形成细胞培养物作为负对照。收集上清,置于无菌 96 孔板中,根据厂商说明书(安迪生物(R&D Systems),美国明尼苏达州)ELISA 分析白细胞介素-8(IL-8)、白细胞介素-1 α (IL-1 α)、和静脉表皮细胞生长因子(VEGF)。

[0043] 结果显示导管素能诱导培养的人角质形成细胞释放 IL-8、IL-1 α 和 VEGF。通过在培养基中添加不同浓度(0-12.5 μ g/ml)的黄连素检测黄连素对 IL-8(图 1A)、IL-1 α (图 1B) 和 VEGF(图 1C) 释放的抑制作用。当用 1.25 μ g/ml 黄连素处理导管素刺激的角质形成细胞时,与用含 1% 的乙醇对照处理的导管素相比,IL-8、IL-1 α 和 VEGF 释放分别下降 31.4%、24.9% 和 29.1% ($P < 0.05$)。这些结果显示黄连素能以剂量依赖性方式显著抑制导管素诱导的炎症反应,尤其是在黄连素浓度高于 6.25 μ g/ml 时,表明黄连素对导管素诱导的皮损疮相关细胞因子释放有消炎作用。

[0044] 实施例 2:含有确定百分比的纯化黄连素和黄藤素的外用药物制剂的制备

[0045] 根据上述论述,本发明的含黄连素的外用药物制剂具有一个关键特征:其含有确定百分数的纯化黄连素,该百分数高于先前使用富含黄连素的植物提取物的制剂所得百分数。一定范围的浓度被用于动物模型研究和人临床研究中的测试。

[0046] 对于我们的动物模型和人类研究,将纯化的黄连素溶于 100% 乙醇,然后加入水,在终溶液中达到黄连素的所需浓度。例如在凝胶制剂中,制备了溶于 10% 乙醇的 0.1% 或 0.2% 黄连素。密封溶液或凝胶制剂,储于 4 $^{\circ}$ C 待用。我们在动物模型和皮损疮病人中的研究结果表明,制剂中的黄连素浓度应为 0.1% 或更高,以获得持续满意的结果。这些浓度高于先前用富含黄连素植物提取物的含黄连素的外用制剂。

[0047] 正在进行制备软膏、凝胶、霜、洗液或喷雾形式制剂的实验,它们更适合临床医师和病人使用。在本发明的外用药物制剂中,黄连素或黄连素的生物等价类似物(例如黄藤素和黄连碱)是唯一或主要的活性药物化合物。用于我们研究的纯化黄藤素溶于 100% 水,然后稀释,在终溶液或凝胶制剂中实现确定的黄藤素浓度,例如 0.02%、0.1%、或 0.2% 黄藤素。

[0048] 然而,改良或改变的制剂可包含其它成分,用于提高黄连素或其类似物的溶解度、乳化、润滑、抗生素活性或水合。

[0049] 本发明的一个提高黄连素或其生物等价类似物溶解度的优选方式是在制剂中添加甘油。本发明的一个提高制剂抗生素活性的实施方式是加入显示具有抗生素活性的植物提取物。一种增强本发明外用制剂水合性的实施方式是添加透明质酸。

[0050] 实施例 3:本发明的外用药物制剂对小鼠皮损疮模型的效果

[0051] 皮损疮的动物模型:从先前报导¹⁸采用皮损疮动物模型。简单说,BALB/c 和 C57BL/6 小鼠在处理前 24 小时剃毛,每日在背上皮下注射 40 μ l 导管素(320 μ M) 两次。初次注射 48 小时后(总共注射 4 次),在注射位点观察到皮损和水肿,模拟皮损疮的临床特征。

[0052] 我们的试验中,用或不用外用黄连素一天两次处理注射了导管素的小鼠,观察黄连素对减轻炎症的效果。结果显示,皮下注射导管素的小鼠在 48 小时后引起像皮损疮临床特征的红肿和血管扩张。然后将注射了导管素的小鼠分成 2 组,用黄连素($n = 3$) 或不用黄连素($n = 3$,作为对照) 分别再处理 2 天。将含 0.1% 黄连素的外用制剂一天两次涂

在导管素诱导的损伤上。红肿或炎性损伤在对照组中持续 7 天以上。在第 4 日, 相较对照相, 黄连素处理组中的红肿和血管扩张显著减轻。这些结果表明, 外用黄连素能在体内减轻导管素诱导的炎症反应。

[0053] 实施例 4 : 研究本发明的外用药物制剂对红斑痤疮病人效力的人临床研究

[0054] 方法 : 进行了开放标签的临床研究, 以确定本发明外用黄连素制剂治疗红斑痤疮和相关皮肤病的效力。皮肤科医师诊断该研究中包括的病人患有临床定义上的红斑痤疮。所有病人给予 0.1% 黄连素凝胶, 一日两次, 共 6 周。在治疗开始的时间点、治疗后 2 周和 6 周, 评估病人的红斑痤疮症状。不允许病人对其皮肤病症使用其它药物, 包括抗生素。仅允许口服抗组胺以缓解瘙痒症状。

[0055] 为了评估疗效, 使用国家红斑痤疮学会专家委员会对红斑痤疮分类和分级的红斑痤疮标准分级系统³。另外, 在黄连素治疗的第 0 周、第 2 周和第 6 周对病人的研究者总体评估 (IGA) 和总体红肿严重程度进行评分。IGA 根据 7 分评分体系从 0 (清除) 到 6 (严重) 表示。总的面部红肿和毛细血管扩张的严重程度分别用 0-3 的分数分成“无”、“轻度”、“中度”或“重度”级别。用于评估总体面部红肿严重程度的分级系统如前所述³⁸。

[0056] 结果 : 该研究中招募了总共 20 名红斑痤疮病人 (18 名女性和 2 名男性)。研究人群的平均年龄为 43.3 (19-85) 岁。在黄连素治疗前红斑痤疮的平均持续时间是 4 (1-24) 年。在 20 名红斑痤疮病人中, 13 例是红斑毛细血管扩张型 (65%), 7 例是丘疹脓疱型 (35%), 5 例 (25%) 是增生肉芽肿型。

[0057] 根据 7 分评分系统, 基线 (治疗开始时) 红斑痤疮 IGA 评分为 4.1 ± 1.3 。该评分在第 2 周时降至 2.6 ± 0.9 , 在第 6 周时降至 1.6 ± 0.8 。第 0 周、第 2 周和第 6 周之间 IGA 评分的差异在统计上显著 (W2 对 W0 : 配对 t 检验 $P < 0.0001$; W6 对 W0 : 配对 t 检验 $P < 0.0001$)。在治疗开始时, 大部分病人 (95%) 分级为轻度到中度 (3) 到重度 (6)。在治疗结束时, 20 名病人中的 19 名 (95%) 具有轻度 (2) 到清除 (0) 的评级。

[0058] 研究者评估的总体红肿严重程度在治疗开始时是 2.35 ± 0.6 , 在第 2 周时是 1.5 ± 0.5 , 第 6 周时是 0.95 ± 0.4 。第 2 周或第 6 周时的改善在统计上显著 (W2 对 W0 : 配对 t 检验 $P < 0.0001$; W6 对 W0 : 配对 t 检验 $P < 0.0001$)。在治疗开始时, 大部分病人 (95%) 的红肿分级为中度 (2) 到重度 (3)。在治疗结束时, 20 名病人中的 19 名 (95%) 具有轻度 (1) 到无 (0) 的红肿评级。

[0059] 安全性和耐受性 : 在该研究中没有严重不良事件。仅 2 例 (10%) 在外用给药的区域具有瞬时瘙痒和刺痛感, 但可忍受而没有中断研究。

[0060] 实施例 5 : 外用黄连素有效治疗类固醇诱导的红斑痤疮样皮炎, 以及 EGFR 抑制物诱导的痤疮样皮炎

[0061] 我们还对 10 名患有类固醇诱导的红斑痤疮样皮炎的病人、5 名患有 EGFR 抑制物诱导的痤疮样皮炎的病人进行 0.1% 黄连素凝胶研究, 一日使用两次, 共 6 周。全部 15 名病人显示与对红斑痤疮观察到的类似有效和耐受反应。

[0062] 实施例 6 : 黄藤素显示治疗红斑痤疮或红脸病的效力

[0063] 我们还对 10 名患红斑痤疮和相关红脸病的病人用含 0.02% (w/w) 黄藤素的外用制剂进行了研究。全部 10 名病人显示与用黄连素观察到的类似有效和耐受反应。

[0064] 从实施例得到的结论 :

[0065] 体外培养研究证明黄连素通过抑制人角质形成细胞中导管素诱导的 IL-8、IL-1 α 和 VEGF 生成显示消炎效果。由于炎症涉及红斑痤疮发病机理与相关皮肤病,黄连素的消炎作用可能是归因于其对红斑痤疮和相关炎症性皮肤病的临床有益效果。

[0066] 我们的临床研究结果显示,本发明含浓度高于 0.1% 纯化黄连素或浓度高于 0.02% 的黄藤素的外用药物制剂可有效、安全和良好耐受地用于治疗红斑痤疮和红皮肤相关疾病,例如痤疮、接触性皮炎、脂溢性皮炎和光照性皮炎、类固醇诱导的红斑痤疮样皮炎和 EGFR 抑制物诱导的痤疮样皮炎。

[0067] 附图简要说明

[0068] 图 1. 黄连素抑制导管素 (LL-37)- 诱导的人角质形成细胞中 IL-8、IL-1 α 和 VEGF 释放。用导管素 (LL-37) 刺激角质形成细胞,并用 ELISA 实验评估了角质形成细胞的 IL-8(图 1A)、IL-1 α (图 1B) 和 VEGF(图 1C) 的释放。

[0069] 图 2. A. 黄连素治疗开始和治疗 2 周及 6 周时的研究者总体评估分数。B. 外用黄连素治疗开始时和治疗 2 周及 6 周时的总体红肿严重程度分数。

[0070] 引用文献

[0071] 1. Plewig G, Jansen T. Rosacea. 于: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, 等编, Dermatology in General Medicine(《普通药物皮肤学》),第六版,纽约州纽约: 麦克劳希尔集团卫生专业分公司 (McGraw-Hill Health Professions Division, 2003) 688-696 页.

[0072] 2. Lonne-Rahm SB, Fischer T, Berg M. Stinging and rosacea(《刺痛和红斑痤疮》). Acta Derm Venereol 1999 ;79 :460-461.

[0073] 3. Wilkin J, Dahl M, Detmar M, 等, Standard grading system for rosacea : report of the National Rosacea Society Expert Committee on the Classification and Staging of Rosacea(《红斑痤疮的标准分级系统 : 国家红斑痤疮学会专家委员会对红斑痤疮分类和分级的报告》) J Am Acad Dermatol 2004 ;50 :907-912.

[0074] 4. Griffiths WA. The red face—an overview and delineation of the MARSH syndrome(《红脸 -MARSH 综合症的概览和定义》). Clin Exp Dermatol. 1999 ;24 :42-47.

[0075] 5. Draelos ZD. Assessment of skin barrier function in rosacea patients with a novel 1% metronidazole gel(《红斑痤疮病人中新型 1% 甲硝唑凝胶的皮肤屏障功能评估》). J Drugs Dermatol. 2005 ;4 :557-562.

[0076] 6. Chen AY, Zirwas MJ. Steroid-induced rosacealike dermatitis : case report and review of the literature(《类固醇诱导的红斑痤疮样皮炎 : 病例报告和文献综述》). Cutis. 2009 83(4) :198-204.

[0077] 7. Lee DH, Li K, Suh DH. Pimecrolimus 1 % cream for the treatment of steroid-induced rosacea : an 8-week split-face clinical trial(《用于治疗类固醇诱导的红斑痤疮的吡美莫司 1% 霜 : 8 周半脸临床实验》). Br J Dermatol. 2008 ;158(5) : 1069-76.

[0078] 8. Wollenberg A, Kroth J, Hauschild A, Dirschka T. Cutaneous side effects of EGFR inhibitors—appearance and management(《EGFR 抑制物的角质层副作用 - 表现和管理》). Dtsch Med Wochenschr. 2010 ;135(4) :149-54.

[0079] 9. Lacouture ME, Maitland ML, Segaert S, 等, ? A proposed EGFR inhibitor

dermatologic adverse event-specific grading scale from the MASCC skin toxicity study group(《来自 MASCC 皮肤毒性研究组的建议 EGFR 抑制物皮肤学不良事件专门分级标准》). Support Care Cancer. 2010 ;18(4) :509-22.

[0080] 10. Palleschi GM, Torchia D. Rosacea in a monozygotic twin(《同卵双生子中的红斑痤疮》). Australas J Dermatol. 2007 ;48 :132-133.

[0081] 11. Yazici AC, Tamer L, Ikizoglu G, Kaya TI, Api H, Yildirim H, Adiguzel A. GSTM1 and GSTT1 null genotypes as possible heritable factors of rosacea(《作为可能的红斑痤疮遗传因子的 GSTM1 和 GSTT1 空白基因型》). Photodermatol Photoimmunol Photomed. 2006 ;22 :208-210.

[0082] 12. Jansen T, Plewig G. Rosacea :classification and treatment(《红斑痤疮 :分类和治疗》). J R Soc Med. 1997 ;90 :144-150.

[0083] 13. Wilkin JK. Rosacea. Pathophysiology and treatment(《红斑痤疮 :病理学和治疗》). Arch Dermatol. 1994 ;130 :359-362.

[0084] 14. Forton F, Seys B :density of Demodex folliculorum in rosacea :A case-control study using standardized skin-surface biopsy(《毛囊蠕形螨在红斑痤疮中的密度 :用标准化皮肤表面活检的病例 - 对照研究》). Br J Dermatol. 1993 ;128 :650.

[0085] 15. Yamasaki K, Di Nardo A, Bardan A, Murakami M, Ohtake T, Coda A, Dorschner RA, Bonnart C, Descargues P, Hovnanian A, Morhenn VB, Gallo RL. Increased serine protease activity and cathelicidin promotes skin inflammation in rosacea(《提高的丝氨酸蛋白酶活性和导管素促使红斑痤疮中的皮肤发炎》). Nat Med. 2007 ;13 :975-980.

[0086] 16. Zuyderduyn S, Ninaber DK, Hiemstra PS, Rabe KF. The antimicrobial peptide LL-37 enhances IL-8 release by human airway smooth muscle cells(《抗微生物肽 LL-37 提高人气道平滑肌细胞的 IL-8 释放》). Allergy Clin Immunol. 2006 ;117 :1328-1335.

[0087] 17. Afonso AA, Sobrin L, Monroy DC, Selzer M, Lokeshwar B, Pflugfelder SC. Tear fluid gelatinase B activity correlates with IL-1alpha concentration and fluorescein clearance in ocular rosacea(《泪液明胶酶 B 活性与眼部红斑痤疮中的 IL-1 α 浓度和荧光清除有关》). Invest Ophthalmol Vis Sci. 1999 ;40 :2506-2512.

[0088] 18. Pu LL, Smith PD, Payne WG, Kuhn MA, Wang X, Ko F, Robson MC. Overexpression of transforming growth factor beta-2 and its receptor in rhinophyma :an alternative mechanism of pathobiology(《转化生长因子 β -2 及其受体在肥大性酒糟鼻中的过度表达 :病理生物学的另一种机制》). Ann Plast Surg. 2000 ;45 :515-519.

[0089] 19. Guarrera M, Parodi A, Cipriani C, 等. Flushing in rosacea :a possible mechanism(《红斑痤疮中的发红 :一种可能机制》). Arch Dermatol Res. 1982 ;272 :311-316.

[0090] 20. Smith JR, Lanier VB, Braziel RM, Falkenhagen KM, White C, Rosenbaum JT. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in rosacea(《血管内皮生长因子及其受体在红斑痤疮中的表达》). Br J Ophthalmol. 2007 ;91 :226-229.

- [0091] 21. McDonnell JK, Tomecki KJ. Rosacea :an update. (《红斑痤疮 :最新进展》) Clev Clinic J Med. 2000 ;67 :587-590.
- [0092] 22. Gupta AK, Gover MD. Azelaic acid(15% gel) in the treatment of acne rosacea(《壬二酸 (15%凝胶) 治疗红斑痤疮粉刺》). Int J Dermatol. 2007 ;46 :533-538.
- [0093] 23. Berberine(2000). Altern Med Rev. (《替代医学评论》)5 :175-177
- [0094] 24. Yu HH, Kim KJ, Cha JD, 等 Antimicrobial activity of berberine alone and in combination with ampicillin or oxacillin against methicillin-resistant Staphylococcus aureus(《黄连素单独和与青霉素或苯唑西林联用针对甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌的抗微生物活性》). J Med Food. 2005 ;8 :454-461.
- [0095] 25. Mantena SK, Sharma SD, Katiyar SK. Berberine, a natural product, induces G1-phase cell cycle arrest and caspase-3-dependent apoptosis in human prostate carcinoma cells(《黄连素,一种天然产物,诱导人前列腺癌细胞中的G1期细胞周期抑制和胱冬酶-3依赖性凋亡》). Mol. Cancer Ther. 2006 ;5 :296-308.
- [0096] 26. Kuo CL, Chi CW, Liu TY. The anti-inflammatory potential of berberine in vitro and in vivo(《黄连素的体外和体内消炎潜能》). Cancer Lett. 2004 ;203 :127-137.
- [0097] 27. Khosla PK, Neeraj VI, Gupta SK, Satpathy G. Berberine, a potential drug for trachoma(《黄连素,一种沙眼的可能药物》). Rev Int Trach Pathol Ocul Trop Subtrop Sante Publique. 1992 ;69 :147-65.
- [0098] 28. Meisner ;Lorraine Faxon. Topical composition for the treatment of psoriasis and related skin disorders(《银屑病和相关皮肤病的外用治疗组合物》). 美国专利 6440465(2002).
- [0099] 29. Goodless, Dean R. Composition and method for treatment of acne(《粉刺治疗的组合物和方法》). 美国专利申请 20050158404(2005).
- [0100] 30. Lintner ;Karl. Compositions containing mixtures of tetrapeptides and tripeptides(《含四肽和三肽混合物的组合物》). 美国专利 6974799(2005). ?
- [0101] 31. Gupta, Shyam K. Topical nutraceutical compositions with selective body slimming and tone firming antiaging benefits(《具有选择性瘦身和紧致抗衰老益处的外用营养组合物》). 美国专利申请 20040146539(2004).
- [0102] 32. Gulliver WP, Donsky HJ. A report on three recent clinical trials using Mahonia aquifolium 10% topical cream and a review of the worldwide clinical experience with Mahonia aquifolium for the treatment of plaque psoriasis(三个最近使用亮叶十大功劳 10%外用霜的临床实验报告和全球用亮叶十大功劳治疗斑块状银屑病的临床经验综述). Am J Ther. 2005 ;12 :398-406.
- [0103] 33. Iwasa K, 等, Fungicidal and herbicidal activities of berberine related alkaloids(《黄连素相关生物碱的杀真菌和除草活性》). Biosci. Biotechnol. Biochem. 2000 ;64 :1998-2000.
- [0104] 34. Iwasa K, Nanba H, Lee DU, Kang SI. Structure-activity relationships of protoberberines having antimicrobial activity(《具有抗微生物活性的小檗原碱的结构-活性关系》). Planta Med. 1998 ;64 :748-751.

[0105] 35. Prabal Giri, Maidul Hossain 和 Gopinatha Suresh Kumar. RNA specific molecules :Cytotoxic plant alkaloid palmatine binds strongly to poly(A) (《RNA 特异性分子 :细胞毒性植物生物碱黄藤素与 poly(A) 强结合》). Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2006 ;16 :2364-2368.

[0106] 36. Colombo M.L. 等, Cytotoxicity evaluation of natural coptisine and synthesis of coptisine from Berberine (《天然黄连碱的细胞毒性评估以及从黄连素合成黄连碱》). Farmaco 2001 ;56 :403-409.

[0107] 37. Chun-Ching Lin 等, Cytotoxic effects of Coptis chinensis and Epimedium sagittatum extracts and their major constituents (berberine, coptisine and icariin) on hepatoma and leukaemia cell growth (《中国金线和三枝头九叶草提取物及其主要组分 (黄连素、黄连碱和淫羊藿苷) 对肝细胞癌和白血病细胞生长的细胞毒性效果》). Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 2004 ;31 :65-69.

[0108] 38. Thiboutot D, Thieroff-Ekerdt R, Graupe K. Efficacy and safety of azelaic acid (15%) gel as a new treatment for papulopustular rosacea : results from two vehicle-controlled, randomized phase III studies (壬二酸 (15%) 凝胶作为丘疹脓疱性红斑痤疮新疗法的效力和安全性 : 双载体对照, 随机 III 期研究的结果). J Am Acad Dermatol 2003 ;48 :836-845.

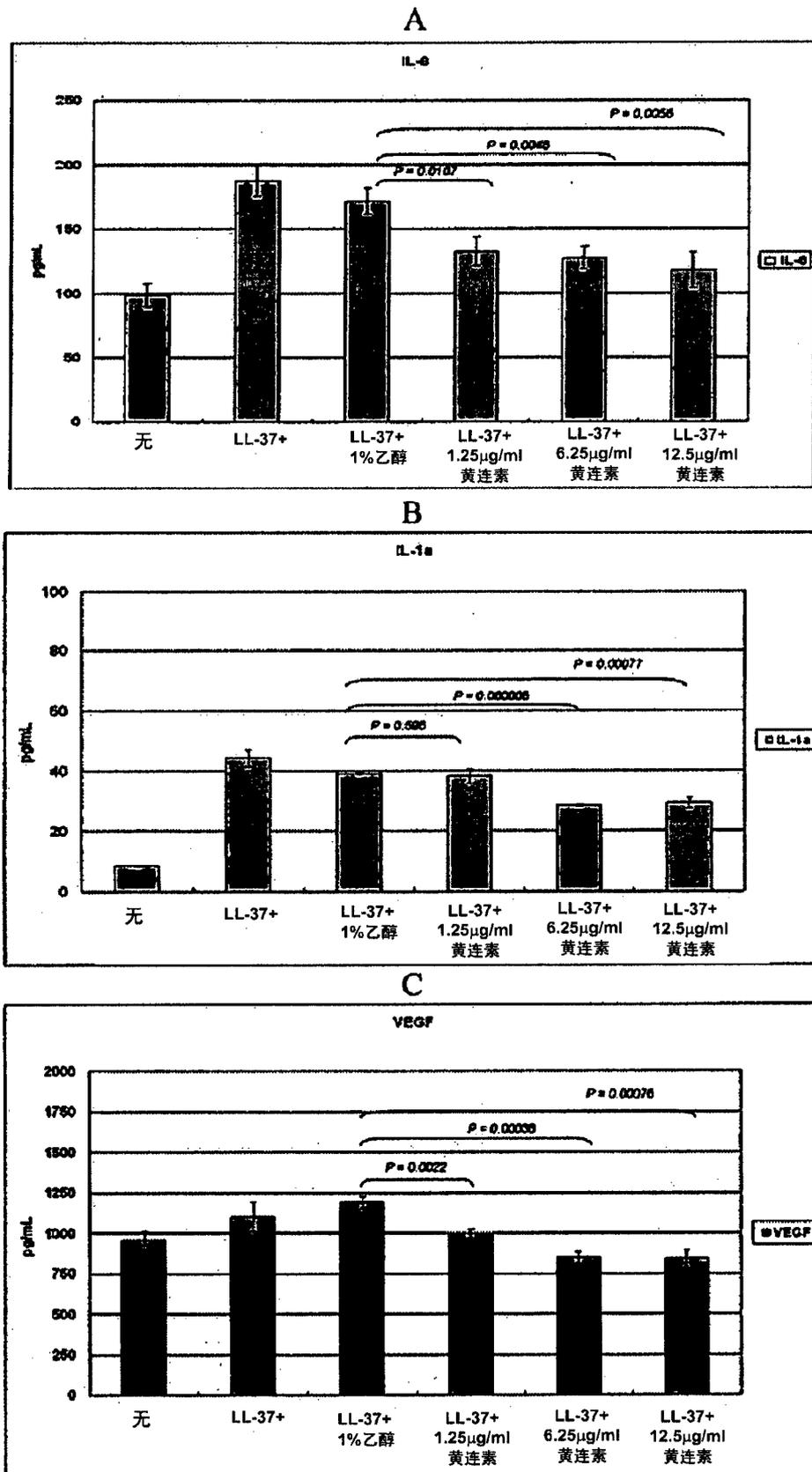


图 1

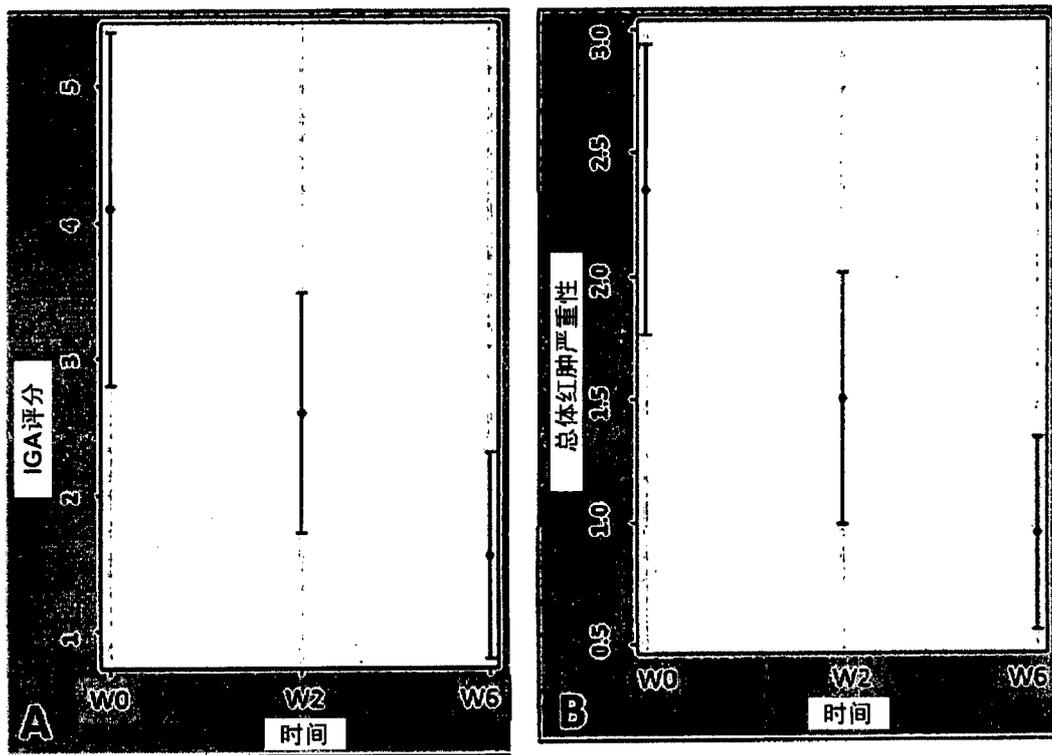


图 2