

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 47/24

A61K 47/18

A61K 9/127

A61K 31/70

A61P 1/16

A61P 31/12



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 99804333.8

[45] 授权公告日 2005 年 5 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 1200736C

[22] 申请日 1999.3.23 [21] 申请号 99804333.8

[30] 优先权

[32] 1998.3.24 [33] JP [31] 76055/1998

[86] 国际申请 PCT/JP1999/001438 1999.3.23

[87] 国际公布 WO1999/048531 日 1999.9.30

[85] 进入国家阶段日期 2000.9.22

[71] 专利权人 日本新药株式会社

地址 日本京都府

[72] 发明人 平林加寿子 关纯造

审查员 刘桂英

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

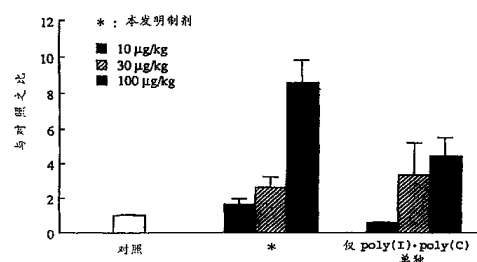
代理人 陈剑华

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 2 页

[54] 发明名称 肝炎治疗剂

[57] 摘要

本发明的目的是提供可有效治疗和预防肝炎的新的药剂。本发明的肝炎治疗剂或预防剂的特征在于，含有例如以 2-O-(2-二乙基氨基乙基)氨基甲酰基-1,3-O-二油酰基甘油和磷脂质为必需构成成分而形成的药物载体与 poly(I)·poly(C) 的复合体。



1. 肝炎治疗剂或预防剂，其特征在于，它含有以 2-O-(2-二乙基氨基乙基)氨基甲酰基-1,3-O-二油酰基甘油和药用磷脂质为必需构成成分而形成的药物载体与平均链长为 100-500bp 的 poly(I)·poly(C) 或平均链长为 100-500bp 的错配的 poly(I)·poly(C) 的双链 RNA 的复合体，所述错配的 poly(I)·poly(C) 保持着与 poly(I)·poly(C) 相同的干扰素诱导活性；

相对于药物载体 10 重量份，双链 RNA 为 0.05-10 重量份，

- 10 相对于 2-O-(2-二乙基氨基乙基)氨基甲酰基-1,3-O-二油酰基甘油 1 重量份，药用磷脂质为 0.1-10 重量份。

2. 如权利要求 1 所述的肝炎治疗剂或预防剂，其中，所述磷脂质是卵磷脂。

肝炎治疗剂

5

技术领域

本发明涉及肝炎治疗剂。

在本说明书中，“I”表示肌苷酸，“C”表示胞苷酸，“A”表示腺苷酸，“U”表示尿苷酸。

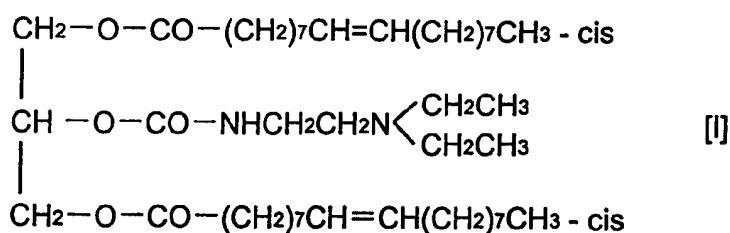
10 错配的 poly (I) · poly (C)、错配的 poly (A) · poly (U) 是本领域公知的术语，表示在构成双链的核酸碱基中含有部分非互补的碱基的 poly (I) · poly (C)、poly (A) · poly (U)。

背景技术

15 poly (I) · poly (C) 是由聚肌苷酸聚胞苷酸组成的双链 RNA，是一种周知的具有干扰素诱导活性和免疫增强作用的药物。

现有报道，干扰素自身对治疗丙型肝炎有效（例如，肝胆胰, 2(4), p611 (1984)、13(1), p123 (1986)、12(5), p809 (1986)、23(5), p1065 (1991)）。但将可诱导干扰素的上述 poly (I) · poly (C) 用通常的方法给予以期治疗肝炎，则从其诱导量的程度和毒性等考虑，被认为是困难的。

20 另一方面，已知有 Lipofectin® 等通常称作阳离子性脂质体的药物载体和以下述结构式 [I] 的 2-O- (2-二乙基氨基乙基) 氨基甲酰基-1, 3-O-二油酰基甘油等甘油衍生物和磷脂质为必需构成成分而形成的药物载体等（例如参见 WO91/17424 和 WO94/19314）。



25 上述阳离子性脂质体被认为是由脂质双分子膜组成的、在水溶液中带正电荷的小囊泡。由于阳离子性脂质体在水溶液中带正电荷，而 poly (I) · poly (C) 等双链 RNA 在水溶液中带负电荷，因此，可用通常的方法进行分散处理，使阳离子性脂质体和 poly (I) · poly (C) 等容易地形成复合体。

上述药物载体与 poly (I) · poly (C) 等双链 RNA 的复合体对治疗肝炎等有效是迄今未知的。

发明的公开

5 本发明的目的是提供新的可有效治疗或预防肝炎的药剂。

本发明者首先发现阳离子性脂质体之类的药物载体与 poly (I) · poly (C) 等双链 RNA 的复合体在肝脏和脾脏特异性地集聚，可长时间地诱导对治疗肝炎等有效的干扰素，并由此完成了本发明。

10 本发明的一个内容是提供以含有阳离子性脂质体与 poly (I) · poly (C) 等双链 RNA 的复合体（以下称“本复合体”）为特征的肝炎治疗剂或预防剂（以下称“本发明制剂”）。

下面对本发明作详细说明。

可用于本发明的“阳离子性脂质体”的例子有 Lipofectin[®]、Lipofectamine[®]、Lipofectace[®]、DMRIE-C[®]和 WO94/19314 中公开的药物载体（如以上述化学式
15 [I] 的 2-O-（2-二乙基氨基乙基）氨基甲酰基-1, 3-O-二油酰基甘油（以下称“化合物 A”）和磷脂质为必需构成成分而形成的药物载体等）。

在本发明中，较佳的阳离子性脂质体的例子有以化合物 A 和磷脂质为必需构成成分而形成的药物载体（以下称该药物载体为“本载体”）。

可用于本发明的双链 RNA 的例子有 poly(I) poly(C)、错配的 poly(I) poly
20 (C)、poly (A) · poly (U)、错配的 poly (A) · poly (U)。其中，以 poly (I) · poly (C) 为宜。

对上述双链 RNA 的链长无特别限定，但宜为 50-2,000bp (bp: 碱基对)，较好地为 100-500 碱基对，更好地为 200-400bp。若小于 50bp，则有效性可能不足，而若大于 2,000bp，则可能会有安全性问题。在本发明中，链长 100
25 -500bp 被认为能取得有效性和安全性的平衡。对于 poly (I) · poly (C)，也是较好地为 100-500bp，更好地为 200-400 bp。由于 poly (I) · poly (C) 等双链 RNA 通常是以由各种链长组成的一定的分布存在的，因此，上述各链长表示最大分布的碱基对数，在此是指“平均链长”。

对本载体中的磷脂质无特别限定，只要是药用磷脂质即可，其具体例子有
30 磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸、鞘磷脂和卵磷脂等。此外，还可使用氢化的磷脂质。较佳的磷脂质的例子有卵黄磷脂酰胆碱、卵黄卵磷脂、大豆卵磷脂和卵黄磷脂。可将二种以上的磷脂质合用。作为与化合物

A 合用的磷脂质，磷脂酰胆碱或卵磷脂优于通常用于阳离子性磷脂质的磷脂酰乙醇胺。

在本发明的较佳实例中，本发明提供包含磷脂质为卵磷脂的本载体与平均链长为 100 - 500bp（尤其是 200 - 400bp）的 poly (I) · poly (C) 的复合体的
5 本发明药剂。

阳离子性脂质体与双链 RNA 的构成比率根据阳离子性脂质体和双链 RNA 的种类和链长、肝炎的种类和程度等而异，但对于阳离子性脂质体 10 重量份，双链 RNA 宜为 0.05 - 10 重量份，较好地 0.1 - 4 重量份，更好地 0.5 - 2 重量份。本载体与 poly (I) · poly (C) 的构成比率也同样是，对于本载体 10
10 重量份，poly (I) · poly (C) 宜为 0.05 - 10 重量份，较好地 0.1 - 4 重量份，更好地 0.5 - 2 重量份。

在本载体中，化合物 A 与磷脂质的构成比率根据双链 RNA 的种类和链长、用量及磷脂质而异，但对于化合物 A 1 重量份，磷脂质宜为 0.1 - 10 重量份，较好地 0.5 - 5 重量份，更好地 1 - 2 重量份。

15 本发明制剂例如可以是本复合体分散在水溶液中的液剂（注射剂、滴注剂等）或冻干制剂的形式。当为液剂时，本复合体的浓度宜为 0.001 - 25 % (w/v)，较好地 0.01 - 5 % (w/v)，更好地 0.1 - 1 % (w/v)。

本发明制剂可适量地含有任意的药用添加剂，如乳化助剂、稳定剂、等渗剂、pH 调节剂。具体地说，可含有 6 - 22 个碳原子的脂肪酸（如辛酸、癸酸、
20 月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、花生四烯酸、二十二碳六烯酸）或其药用盐（如钠盐、钾盐、钙盐）、白蛋白、葡聚糖等乳化助剂；胆甾醇、磷脂酸等稳定剂；氯化钠、甘油、麦芽糖、乳糖、蔗糖、海藻糖等等渗剂；盐酸、硫酸、磷酸、乙酸、氢氧化钠、氢氧化钾、三乙醇胺等 pH 调节剂等。

25 本发明制剂例如可用与脂质体的通常制法相同的方法制造。例如，可通过将阳离子性脂质体或其原料（例如，化合物 A 和磷脂质）和 poly (I) · poly (C) 等双链 RNA 在水溶液中分散处理而加以制造。水溶液可以是例如注射用水、注射用蒸馏水、生理盐水等电解质液、葡萄糖液等。分散处理使用适当的分散器（如均相混合器、匀浆器、超声波分散器、超声波匀浆器、高压乳化分
30 散器、Microfluidizer®、Nanomizer®、Ultimizer® 或 Manton-Gaulin 型高压匀浆器）进行。此外，该分散处理也可分成包括例如粗分散在内的数阶段进行。

在本发明中可直接使用市售的阳离子性脂质体或者适当加工后使用。

用阳离子性脂质体的原料制造本发明的制剂时，除可在该原料中加入 poly (I) · poly (C) 等双链 RNA、一起分散处理之外，也可先将该原料分散处理，形成阳离子性脂质体，然后加入 poly (I) · poly (C) 等双链 RNA，再分散处理，制造本发明的制剂。

5 任意的药用添加剂可以在分散前、也可以在分散后以适当的步骤添加。

然后，将经过上述分散处理而得到的本发明制剂冻干处理，即可得到本发明的冻干制剂。冻干处理可用常法进行。例如，将经过上述分散处理而得到的本发明制剂灭菌后以规定量分注至管瓶中。在约 -40℃ 至 -20℃ 的条件下预冷冻约 2 小时，减压下在约 0-10℃ 一次干燥，然后减压下在约 15-25℃ 二次干燥，进行冻干。并且，一般地用氮气置换管瓶内部，加塞，由此得到本发明的冻干制剂。

本发明的冻干制剂一般可通过加入任意的适当溶液（再溶解液）进行再溶解后使用。所述再溶解液可以是注射用水、生理盐水等电解质液、葡萄糖液和其他一般输液。对再溶解液的量无特别限定，根据用途等而异，但宜为冻干前的液量的 0.5-2 倍，或者在 500mL 以下。

由于与单独给予 poly (I) · poly (C) 等双链 RNA 的情况相比，本发明制剂可在肝脏和脾脏中特异性地集聚，并长时间地大量诱导 β -干扰素，因此，可有效地用于包括人在内的动物的肝炎的治疗或预防。此外，包含磷脂质为卵磷脂的本载体与平均链长为 100-500bp（尤其是 200-400bp）的 poly (I) · poly (C) 的复合体的本发明制剂由于在保持有效性的同时毒性极低，因此，特别优异。

本发明制剂例如可静脉内注射、经粘膜给予或肝动脉内注射。

本发明制剂的肝炎治疗量根据双链 RNA 和磷脂质的种类、肝炎的种类和阶段、患者年龄、动物种差、给药途径、给药方法等而异，但双链 RNA 的给予量通常一次宜为 1 μ g-50mg/人，较好地 10 μ g-10mg/人。poly (I) · poly (C) 的给予量通常也一次宜为 1 μ g-50mg/人，较好地 10 μ g-10mg/人。本发明制剂可每日 1-3 次，每日、隔日、每周、隔周进行注射或滴注。

本发明的最佳实施方式

30 下面结合实施例和试验例对本发明作更详细的说明。在各实施例和试验例中，本发明制剂的浓度均以制剂中的 poly (I) · poly (C) 的浓度表示。

实施例 1

将化合物 A 2g 和精制卵黄卵磷脂 2g 加入到溶解在 100mL 注射用水中的麦芽糖 40g 中，搅拌、混合，用匀浆器分散处理 5 分钟，得到本载体的粗分散液。将该分散液再用实验用小型乳化分散器分散处理 1 小时，加入注射用水，使其达到 250mL，回收本载体分散液。搅拌下往本载体分散液 250mL 中加入含有 500mg poly (I) · poly (C) (平均链长约 200bp) 的 150mL 水溶液，再用实验用小型乳化分散器分散处理 1 小时，得到本发明制剂。然后，将本发明制剂分注至管瓶中 (每瓶 1mL)，按常法制成冻干制剂。

10 实施例 2

将化合物 A 50g 和卵黄磷脂 30g 加入到溶解在 10L 注射用水中的蔗糖 4kg 中，用 Manton-Gaulin 型高压匀浆器分散处理 10 分钟，加入注射用水，使其达到 25L，回收本载体分散液。搅拌下往本载体分散液 20L 中加入含有 10g poly (I) · poly (C) (平均链长约 200bp) 的 12L 水溶液，用盐酸将 pH 调整至 5.5，再用 Manton-Gaulin 型高压匀浆器分散处理 30 分钟，得到本发明制剂。然后，将本发明制剂分注至管瓶中 (每瓶 20mL)，按常法制成冻干制剂。将市售的 5% 葡萄糖输液 (500ml) 加入到该冻干制剂中，使其溶解。

实施例 3

20 将化合物 A 2g 和大豆卵磷脂 2g 加入到溶解在 100mL 注射用水中的葡萄糖 20g 中，搅拌、混合，用匀浆器分散处理 5 分钟，得到本载体的粗分散液。将该分散液再用实验用小型高压乳化分散器分散处理 1 小时，加入注射用水，使其达到 250mL，回收本载体分散液。搅拌下往本载体分散液 250mL 中加入含有 50mg poly (I) · poly (C) (平均链长约 200bp) 的 150mL 水溶液，再用实验用小型高压乳化分散器分散处理 1 小时，得到本发明制剂。

实施例 4

30 将化合物 A 1.2g 和精制卵黄卵磷脂 2.0g 加入到溶解在 100mL 注射用水中的麦芽糖 40g 中，搅拌、混合，用实验用小型乳化分散器分散处理 30 分钟，加入注射用水，使其达到 250mL，回收本载体分散液。搅拌下往本载体分散液 250mL 中加入含有 200mg poly (I) · poly (C) (平均链长约 200bp) 的 150mL 水溶液，再用实验用小型乳化分散器分散处理 2 小时，得到本发明制剂。

实施例 5

将化合物 A 1.2g 和精制卵黄卵磷脂 2.0g 加入到溶解在 100mL 注射用水中的麦芽糖 40g 中，搅拌、混合，用实验用小型乳化分散器分散处理 30 分钟，加入注射用水，使其达到 250mL，回收本载体分散液。搅拌下往本载体分散液 5 250mL 中加入含有平均链长 360 碱基的 poly (I) 100mg 和平均链长 318 碱基的 poly (C) 100mg 的 150mL 水溶液，再用实验用小型乳化分散器分散处理 2 小时，得到本发明制剂。

实施例 6

10 将化合物 A 2g 和精制卵黄卵磷脂 2g 加入到溶解在 100mL 注射用水中的麦芽糖 40g 中，搅拌、混合，用匀浆器分散处理 5 分钟，得到本载体的粗分散液。将该粗分散液再用实验用小型乳化分散器分散处理 1 小时，加入注射用水，使其达到 250mL，回收本载体分散液。搅拌下往本载体分散液 250mL 中加入含有平均链长 1419 碱基的 poly(I)250mg 和平均链长 1491 碱基的 poly(C)250mg 15 的 150mL 水溶液，再用实验用小型乳化分散器分散处理 1 小时，得到本发明制剂。然后，将本发明制剂分注至管瓶中（每瓶 1mL），按常法制成冻干制剂。

实施例 7

20 将化合物 A 1.2g 和精制卵黄卵磷脂 2.0g 加入到溶解在 100mL 注射用水中的麦芽糖 40g 中，搅拌、混合，用实验用小型乳化分散器分散处理 30 分钟，加入注射用水，使其达到 250mL，回收本载体分散液。搅拌下往本载体分散液 250mL 中加入含有平均链长 84 碱基的 poly (I) 100mg 和平均链长 76 碱基的 poly (C) 100mg 的 150mL 水溶液，再用实验用小型乳化分散器分散处理 2 小时，得到本发明制剂。

25

实施例 8

按与实施例 4 相同的方法，得到含有平均链长约 350bp 的 poly (I) · poly (C) 的本发明制剂。

30 实施例 9

按与实施例 4 相同的方法，得到含有平均链长约 1450bp 的 poly (I) · poly (C) 的本发明制剂。

实施例 10

按与实施例 4 相同的方法, 得到含有平均链长约 80bp 的 poly (I) · poly (C) 的本发明制剂。

5 试验例 1 小鼠肝脏中的 β -干扰素的诱导效果 (in vivo)

以雄性 Balb/c 小鼠 (5 周龄) 为试验动物, 一组 3 只, 在小鼠的静脉内注射本发明实施例 4 的制剂或注射仅 poly (I) · poly (C) 的制剂作为对照。3 小时后摘取肝脏。用 AGPC 法 (The acid-guanidine-phenol-chloroform 法) 提取全 RNA, 用 RT-PCR 法测定 β -干扰素的 mRNA 表达量。结果见图 1。

10 图 1 表明, 各试样均浓度依存性地表达 β -干扰素 mRNA 并诱导 β -干扰素, 但与仅 poly (I) · poly (C) 的制剂相比, 本发明制剂的诱导效果更强。

试验例 2 肝脏以外的脏器中的 β -干扰素的诱导效果 (in vivo)

按与试验例 1 相同的方法测定肝脏以外的脏器中的 β -干扰素的 mRNA 表
15 达量。结果见图 2。

图 2 表明, 本发明制剂在肾脏、肺和脑中不表达 β -干扰素 mRNA, 对 β -干扰素无明显的诱导效果。

上述试验例 1 和 2 的结果显示, 单独给予 poly (I) · poly (C), 没有脏器
20 特异性, 而本发明制剂在肝脏和脾脏中对 β -干扰素有明显的诱导效果。

20 试验例 3 小鼠血清中的干扰素量 (in vivo)

以雄性 Balb/c 小鼠 (5 周龄) 为试验动物, 一组 3 只, 在小鼠的静脉内注射本发明实施例 4 的制剂或注射仅 poly (I) · poly (C) 的制剂作为对照。3 小时后采血得血清。根据病毒 (VSV) 感染所致 L929 细胞变性的抑制效果测
25 定血清中的干扰素量。结果见表 1。

表1 小鼠血清中的干扰素量

	给予量 ($\mu\text{g/kg}$)	干扰素量 (IU/ml)
对照	-	< 3
实施例 4	10	13 $\pm$ 2
	30	41 $\pm$ 1
	100	63 $\pm$ 18
仅 poly (I) · poly (C)	10	< 3
	30	5 $\pm$ 2
	100	18 $\pm$ 6

表1表明,在各试验组中,均剂量依存性地检测出血清中的干扰素,但在本发明制剂组中,检测出更多干扰素。

- 5 本发明制剂的 100 $\mu\text{g/kg}$ 组在注射 3 小时后的干扰素量为 63IU/ml,即使在注射 24 小时后,也达到 30IU/ml。而根据报道,临床上给人注射 3×10^6 IU 的 β -干扰素时,刚注射后的血中浓度为 67IU/ml,45 分钟后就检测不出了。因此,本试验的结果提示,本发明制剂在临床上也能持续诱导足够量的干扰素。

10 试验例 4 毒性试验

(1) 单次给予后大鼠肝毒性的出现 (急性毒性试验)

- 在 8 只 6 周龄的 SD 雄性大鼠的静脉内单次注射实施例 4 的本发明制剂,20 小时后测定血清氨酰转移酶浓度。结果,即使剂量达到 5mg/kg,也未观察到死亡例。剂量为 5mg/kg 时仅观察到血清氨酰转移酶浓度的略有上升。剂量为 15 1mg/kg 时,血清氨酰转移酶浓度基本上未上升。

(2) 限于 2 周的大鼠亚急性毒性试验

在 6 只 SD 雄性大鼠 (6 周龄) 的静脉内连续 14 日注射本发明实施例 4 的制剂。结果,在 1mg/kg 以下剂量,未发现明显的毒性症状。

20

(3) 抗原性试验

用雄性豚鼠 (hartley, 5 周龄) 进行本发明实施例 4 的制剂的抗原性试验。结果,在 50 μg /豚鼠的剂量,未发现抗原性。

(4) 简易诱变性试验

对本发明实施例 4 的制剂进行了简易回复突变试验和简易染色体畸变试验。结果, 在 10 μ g/ml, 未发现诱变性。

5

图面的简单说明

图 1 表示小鼠肝脏中的 β -干扰素 mRNA 的表达量。左端的 1 栏表示对照组。中央的 3 栏表示本发明实施例 4 的制剂的给予结果, 从左依次是 10 μ g/kg、30 μ g/kg 和 100 μ g/kg 给予组。右端的 3 栏表示仅给予 poly (I) ·poly (C) 的结果; 从左依次是 10 μ g/kg、30 μ g/kg 和 100 μ g/kg 给予组。纵轴表示药物给予组与对照组的 β -干扰素 mRNA 表达量之比。

10

图 2 表示小鼠各脏器 (从上依次是脾脏、肾脏、肺、脑) 中的 β -干扰素 mRNA 的表达量。各左端的 1 栏表示对照组。各中央的 3 栏表示本发明实施例 4 的制剂的给予结果, 从左依次是 10 μ g/kg、30 μ g/kg 和 100 μ g/kg 给予组。各右端的 3 栏表示仅给予 poly (I) ·poly (C) 的结果, 从左依次是 10 μ g/kg、30 μ g/kg 和 100 μ g/kg 给予组。纵轴表示药物给予组与对照组的 β -干扰素 mRNA 表达量之比。

15

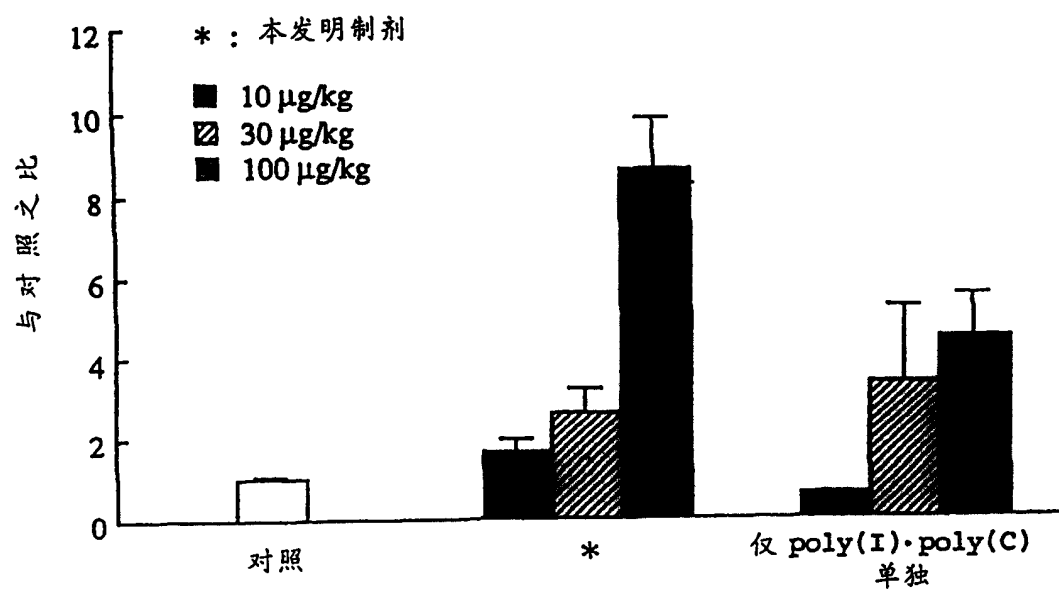


图 1

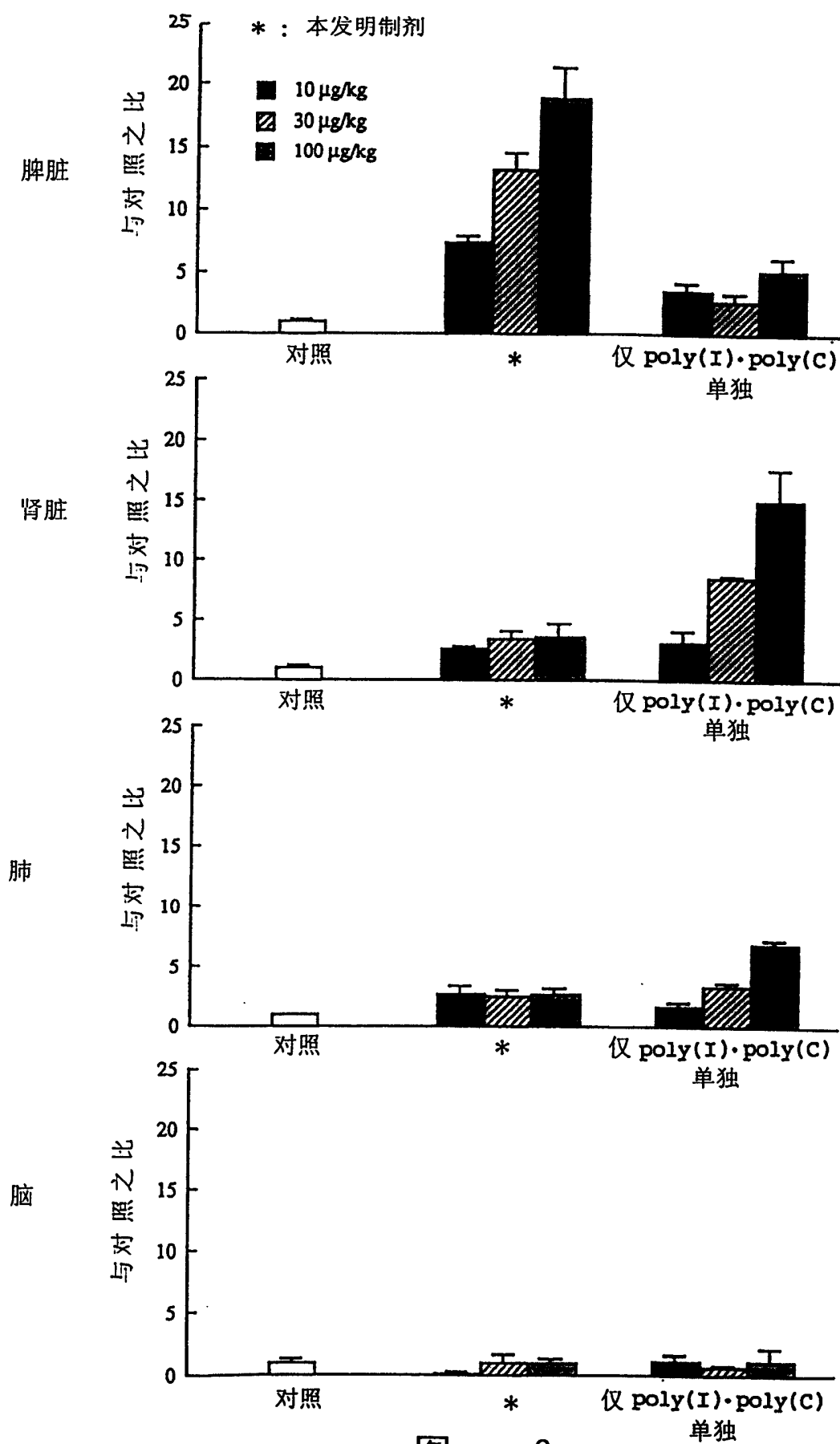


图 2