



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103442700 B

(45) 授权公告日 2016.04.06

(21) 申请号 201280014897.2

A61P 17/00(2006.01)

(22) 申请日 2012.03.23

A61P 3/02(2006.01)

A61K 9/00(2006.01)

(30) 优先权数据

61/467,192 2011.03.24 US

(56) 对比文件

CN 101541304 A, 2009.09.23,

R.Sivaramakrishnan et

al.Glucocorticoid entrapment into

lipid carriers — characterization by

parelectric spectroscopy and influence

on dermal uptake. 《Journal of Controlled Release》.2004, 第 97 卷 (第 3 期), 493-502.

R.Sivaramakrishnan et

al.Glucocorticoid entrapment into

lipid carriers — characterization by

parelectric spectroscopy and influence

on dermal uptake. 《Journal of Controlled Release》.2004, 第 97 卷 (第 3 期), 493-502.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013.09.24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2012/055222 2012.03.23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/127037 EN 2012.09.27

(73) 专利权人 利奥制药有限公司

地址 丹麦巴勒鲁普

(72) 发明人 L·B·詹森 K·彼得松

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 杨春刚 黄革生

审查员 崔义文

(51) Int. Cl.

A61K 9/51(2006.01)

A61K 9/06(2006.01)

A61K 31/573(2006.01)

A61K 31/593(2006.01)

权利要求书2页 说明书27页 附图8页

(54) 发明名称

含有脂质纳米颗粒和皮质类固醇或维生素 D 衍生物的组合物

(57) 摘要

药物组合物包含以固体溶液或分散体掺入到脂质纳米颗粒中的作为治疗活性成分的皮质类固醇和 / 或维生素 D 衍生物,所述脂质纳米颗粒在环境温度下是固体,并包含熔点高于体温的第一种脂质,所述第一种脂质是蜡,其选自 C₁₂₋₂₄醇和 C₁₂₋₂₄脂肪酸的酯、C₁₂₋₂₄脂肪酸的甘油单、二或三酯、C₁₂₋₂₄脂肪醇和胆固醇,任选地包含在环境温度下是油并与第一种脂质可溶混的第二种脂质,以及药学上可接受的表面活性剂。

1. 局部用药物组合物,其包含以固体溶液或分散体掺入到脂质纳米颗粒中的作为治疗活性成分的卡泊三醇或卡泊三醇一水合物,所述脂质纳米颗粒在环境温度下是固体,并包含熔点高于体温的 60-92 重量%的第一种脂质,所述第一种脂质是蜡,其选自棕榈酸鲸蜡基酯、C₁₄₋₂₈脂肪醇、氢化棕榈油和具有 0.1 或更小酸值的甘油三酯,且还包含脂质纳米颗粒的 1-40 重量%的第二种脂质,所述第二种脂质在环境温度下是油并与第一种脂质可溶混,所述第二种脂质选自辛酸甘油三酯 / 癸酸甘油三酯和蓖麻油,所述脂质纳米颗粒还包含 2-22 重量%的药学上可接受的选自泊洛沙姆的表面活性剂。

2. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中第一种脂质占脂质纳米颗粒的 65-90 重量%。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的组合物,其中第二种脂质占脂质纳米颗粒的 10-35 重量%。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的组合物,其中脂质纳米颗粒包含 80-85 重量%的所述第一种脂质、15-20 重量%的所述第二种脂质和所述脂质纳米颗粒重量的 2-5%的表面活性剂。

5. 根据权利要求 4 所述的组合物,其中所述第一种脂质是棕榈酸鲸蜡基酯,并且所述第二种脂质是辛酸甘油三酯 / 癸酸甘油三酯。

6. 根据权利要求 1、2 和 5 中任何一项所述的组合物,其中脂质纳米颗粒具有 100-500nm 的平均粒度。

7. 根据权利要求 1、2 和 5 中任何一项所述的组合物,其中脂质纳米颗粒以组合物的 5-30 重量%的量存在。

8. 根据权利要求 1、2 和 5 中任何一项所述的组合物,其还包含碱性缓冲剂,从而组合物的 pH 是 7.5 或更大。

9. 根据权利要求 8 所述的组合物,其中碱性缓冲剂是选自三乙醇胺、氨基丁三醇、单乙醇胺和二乙醇胺的胺。

10. 根据权利要求 1、2、5 和 9 中任何一项所述的组合物,其还包含水相。

11. 根据权利要求 1、2、5 和 9 中任何一项所述的组合物,其还包含增稠剂。

12. 根据权利要求 11 所述的组合物,其中增稠剂是卡波姆或纤维素衍生物。

13. 根据权利要求 11 所述的组合物,其中增稠剂以组合物的 0.1-5 重量%的量存在。

14. 根据权利要求 1、2、5、9 和 12 中任何一项所述的组合物,其用于预防或治疗银屑病。

15. 制备根据权利要求 1-14 任何一项所述的组合物的方法,所述方法包括:

(a) 将卡泊三醇或卡泊三醇一水合物溶解或分散于包含 60-92 重量%的熔点高于体温的第一种脂质的脂质相中,所述第一种脂质是蜡,其选自棕榈酸鲸蜡基酯、C₁₄₋₂₈脂肪醇、氢化棕榈油和具有 0.1 或更小酸值的甘油三酯,所述第一种脂质是熔化状态的,并包含 1-40 重量%的选自辛酸甘油三酯 / 癸酸甘油三酯和蓖麻油的第二种脂质,第二种脂质在室温下是油并与第一种脂质可溶混;

(b) 将步骤 (a) 中得到的脂质相分散于水相中,所述水相包含 0.2-10 重量%的药学上可接受的表面活性剂,所述表面活性剂选自泊洛沙姆;

(c) 利用高压匀化器将步骤 (b) 中得到的乳剂匀化,以形成包含卡泊三醇或卡泊三醇一水合物的脂质相的纳米颗粒;和

(d) 将步骤 (c) 中得到的匀化乳剂冷却,以固化纳米颗粒。

16. 根据权利要求 1、2、5、9 和 12 中任何一项所述的组合物,其还包含含有作为治疗活性成分的倍他米松酯并与根据权利要求 1-14 中任何一项所述的脂质纳米颗粒在药学上可接受的水性溶媒中混合的脂质纳米颗粒。

17. 根据权利要求 16 所述的组合物,其中倍他米松酯是倍他米松戊酸酯或倍他米松二丙酸酯。

18. 权利要求 16 所述的组合物,其中还包含抗氧化剂,所述抗氧化剂选自 BHA 或 BHT 或 BHA 和 BHT 的混合物。

含有脂质纳米颗粒和皮质类固醇或维生素 D 衍生物的组合 物

发明领域

[0001] 本发明涉及含有脂质纳米颗粒和作为活性成分的皮质类固醇和 / 或维生素 D 类似物的组合物, 制备所述脂质纳米颗粒的方法和所述组合物在治疗皮肤疾病和病症中的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 异位性皮炎 (AD) 是慢性复发的炎症性皮肤疾病, 因为该疾病影响全部儿童的 10-20%, 所以在婴儿期早期中高度流行 (Katoh, J. Dermatol. 36, 2009, 367-376 页)。该疾病特征为瘙痒、红斑、苔藓样硬化、丘疹和干燥皮肤, 具有受损的表皮屏障和皮肤感染的倾向 (Reitamo 等人, 异位性皮炎教科书 (Textbook of Atopic Dermatitis), 第一版, Informa Healthcare, 伦敦, 2008)。AD 的发病机制一直主要归因于免疫异常。然而, 几个最新研究结果显示缺陷皮肤屏障在 AD 中的重要性, 其为炎症过程的驱动器和接触皮肤免疫细胞的抗原。AD 和遗传性角质纤维聚集蛋白缺陷之间非常显著的关系已显示皮肤屏障破坏在 AD 发病机制中是极重要的 (Palmer 等人, Nat. Genet. 38, 2006, 441-446 页; Weidinger 等人, J. Allergy Clin. Immunol. 118, 2006, 214-219 页)。

[0004] 目前, AD 的一线治疗是局部用皮质类固醇, 它们与湿润剂 (moisturizers) 联合显示广泛的抗炎和免疫抑制作用, 其能够帮助缓解干燥皮肤, 并修复屏障 (Reitamo 等人, 见上)。具有高含油量的软膏剂或乳剂通常是皮肤科医生优选的, 因为它们在保持皮肤水合方面更有效, 并可提高所用药物的穿透性 (Wiedersberg 等人, Eur. J. Pharm. Biopharm. 68, 2008, 453-466 页; Reitamo 等人, 见上)。然而, 这些类型制剂的护肤品可接受性可能是差的, 这反映在 AD 患者较低的顺应性方面 (Yentzer 等人, J. Drugs Dermatol. 9, 2010, 324-329 页)。并且, 药物从常规溶媒例如软膏剂和乳剂中的释放和随后的皮肤渗透可能是非常有限的, 且涉及不确定的递送, 例如药物水平可能太低, 以至于在一些患者中不产生疗效, 并在其他患者中引起副作用或全身性渗透 (Korting 和 Schaefer-Korting, Handbook Exp. Pharmacol., 2010, 435-468)。AD 中皮肤屏障受损的事实进一步使药物向皮肤的靶向递送复杂化, 因为屏障状况对穿透进和渗透过皮肤的药物量是至关重要的 (Bronaugh 和 Stewart, J. Pharm. Sci. 74, 1985, 1062-1066 页; Moon 和 Maibach, 外源性皮肤病. 环境性皮炎 (Exogenous Dermatoses. Environmental Dermatitis) (Menne 和 Maibach, 编), CRC, Boca Raton, 1991, 217-226 页; Simonsen 和 Fullerton, Skin Pharmacol. Physiol. 20, 2007, 230-236 页; Wilhelm 等人, J. Invest. Dermatol. 97, 1991, 927-932 页)。

[0005] 优化皮肤药物递送的一种方法是利用纳米颗粒载体。尤其是由脂质制成的颗粒载体 (脂质纳米颗粒、脂质体、微米 - 和纳米乳剂) 是有前途的, 因为它们可能具有封闭 (occlusive) 性质、增加皮肤穿透和靶向性质 (Korting 和 Schaefer-Korting, 见上)。固体脂质纳米颗粒 (SLN) 在 40-1000nm, 并且基本上与 o/w 乳剂是可比的, 但是用熔点高于体温的脂质代替液体油 (Muller 等人, Adv. Drug Del. Review 54, 增刊 1, 2002, S131-S155)。由于其固体状态和小尺寸, SLN 具有强的粘附性, 一旦施用至皮肤, 其可诱导封闭, 并且就美容

方面,SLN比软膏剂更易被接受(Jenning等人,Int. J. Pharm. 199,2000,167-177页;Santos等人,J. Drug Target.,2002,489-495页;Wissing和Muller,Eur. J. Pharm. Biophar. 56,2003,67-72页)。所述封闭性质降低经表皮的水分丢失(TEWL),并可帮助皮肤疾病如AD在物理上恢复皮肤障碍(Keck和Schwabe,J. Biomed. Nanotechnol. 5,2009,428-436页)。

[0006] 银屑病是慢性炎症性皮肤病,其表现为红斑、干燥、角化过度引起的鱼鳞斑。所述斑最经常发现于肘、膝和头皮,尽管更广泛的损害可见于身体的其他部位,特别是腰骶部。轻度至中度银屑病的最常见治疗涉及含有皮质类固醇作为活性成分的组合物的局部施用。虽然有效,但是皮质类固醇的施用具有许多副作用的缺点例如皮肤萎缩、条纹(striae)、痤疮样疹、口周皮炎、皮肤真菌和细菌过度生长、色素沉着皮肤的着色不足和红斑痤疮。

[0007] 然而,多年来,银屑病的有利的非甾体治疗一直在于维生素D类似化合物卡泊三醇的局部治疗,其配制于软膏剂组合物中(由LEO Pharma上市的**Daivonex**[®]或**Dovonex**[®]软膏剂)(其中卡泊三醇存在于溶液中)或乳剂组合物中(由LEO Pharma上市的**Daivonex**[®]或**Dovonex**[®]乳剂)。软膏剂组合物中的溶剂是丙二醇,其具有促进活性成分穿透进皮肤的优点,引起增高的效力,但是其还已知为皮肤刺激剂。因此,已报道:局部组合物中含有的丙二醇经常使患者形成接触性皮炎(一项研究报道许多对丙二醇的刺激性反应(12.5%),参见M. Hannuksela等人,接触性皮炎(Contact Dermatitis)1,1975,112-116页),并且当丙二醇以高浓度使用时,刺激反应的数量增加(根据J. Catanzaro和J. Graham Smith的综述,J. Am. Acad. Dermatol. 24,1991,90-95页)。由于尤其由丙二醇的存在导致的卡泊三醇向皮肤的渗透增加,已发现在银屑病损害的治疗中,**Daivonex**[®]软膏剂比**Daivonex**[®]乳剂更有效,但是**Daivonex**[®]软膏剂还在显著比率的银屑病患者中引起皮肤刺激。

[0008] 人皮肤特别是外层角质层提供抵抗微生物病原体和有毒化学物质穿透的有效屏障。虽然皮肤的所述性质通常是有益的,但是这使药物的皮肤施用复杂化,因为施用至患有皮肤疾病的患者皮肤上的大量(如果不是大多数)活性成分不能穿透到其发挥活性的皮肤的有活力(viable)层。为了保证足够的活性成分穿透至真皮和表皮,通常优选包括溶解状态的活性成分,典型地,在醇例如乙醇或二醇例如丙二醇形式的溶剂存在下。如上述,丙二醇是众所周知的渗透促进剂,即能穿透角质层并将溶媒中的低分子成分例如治疗活性成分“拉”进表皮的物质。丙二醇本身可引起严重的皮肤刺激,并且其还能将溶媒中的低分子且有潜在刺激性的成分“拉”进表皮,引起常用溶媒包括丙二醇的全部刺激作用。由此,在预期用于炎性皮肤病治疗的组合物中作为溶剂的丙二醇的存在可加重炎症反应。

[0009] 本发明的一个目的是提供一种组合物,与市售软膏剂相比,其在无常规渗透促进剂例如丙二醇或其他具有潜在刺激性的赋形剂存在的条件下,具有作为活性成分包含于局部用组合物中的皮质类固醇或维生素D类似物的改善的皮肤穿透和改善的生物活性。另一目的是提供组合物,该组合物拥有封闭性质但是其具有改善的美容性质,即其比软膏剂更不油腻,且具有更宜人的皮肤感觉。

[0010] 痤疮是影响毛皮脂腺囊的多因子病的皮肤病症,其特征在于增加的皮脂产生和从

皮脂腺的皮脂释放,毛皮脂腺囊输送管中过量皮脂的存在致使粉刺形成(腺囊输送管中固化的皮脂塞子)。此外,输送管的关闭致使脓疱、丘疹或囊肿形成,其经常遭受细菌尤其是痤疮丙酸杆菌(*Propionibacterium acnes*)定居和局限性炎症。寻常痤疮是青少年中最常见的皮肤病患,但是大量年龄 20-40 的成年人也受痤疮影响。目前,可用的治疗痤疮的药物包括过氧苯甲酰、壬二酸、局部用和全身性抗生素例如立思丁(Fucidin®)、克林霉素、红霉素和四环素、维 A 酸、例如阿达帕林、维甲酸、异维 A 酸和激素类例如雌激素。然而,所述药物具有严重的缺点包括致畸性、皮肤刺激、光敏作用等。

[0011] 因为对患病个体的负面社会心理后果和可用于痤疮局部治疗的相对有限数量的药物,以及这些药物已知的副作用的严重性,所以提供用于痤疮适当治疗的新药物是非常重要的。

[0012] 因此,本发明的另一个目的是提供能将其中包含的活性成分靶向至皮肤毛囊的组合物。对于预期用于痤疮和相关病患例如红斑痤疮治疗的组合物,毛囊靶向是特别使人感兴趣的。使活性成分直接靶向作用位点可具有减轻副作用例如皮肤刺激的附加优点,从而提供比目前市场上的治疗选择更好耐受的痤疮疗法。

[0013] 发明简述

[0014] 预期局部用于皮肤的药物物质的皮肤穿透是一复杂过程,其涉及三个主要步骤: 1) 所述物质从溶媒的释放, 2) 向角质层的穿透和 3) 从角质层分配至有活力的表皮和真皮中的靶位点。第一个步骤取决于药物和溶媒的理化性质,其通过处理可以被优化。第二或第三个步骤是更复杂的。再次,药物物质的理化性质和在溶媒中的药物饱和度对于药物物质在溶媒和皮肤之间的分配是重要的,并可受溶媒优化的影响。但是此外,对于穿透进皮肤的主要生物屏障——角质层的状况是受皮肤疾病影响的。在通往本发明的研究中,评价了脂质纳米颗粒作为局部药物递送系统对于屏障损害皮肤的性质。将脂质纳米颗粒与常规软膏剂制剂相比,所述常规软膏剂制剂适合于向皮肤递送亲脂化合物,并拥有封闭性质。

[0015] 最近,屏障受损皮肤的体外研究显示与软膏剂相比,SLN 能在皮肤中维持显著更高水平的皮质类固醇。该储库(reservoir)作用可见于体外的完整皮肤和屏障受损皮肤,并且药物特殊地定位于角质层中。施用含有药物的 SLN 后,较上皮肤层中药物物质的特异定位、皮肤的储库作用以及施用至皮肤的药物的治疗作用之间的关系极少被描述。本发明的一个目的是提供组合物,所述组合物由于脂质纳米颗粒的封闭皮肤或者增加与屏障受损皮肤的相互作用的能力,具有增高的药效。

[0016] 因此,本发明涉及局部用药物组合物,其含有以固体溶液或分散体掺入在脂质纳米颗粒中的皮质类固醇(作为治疗活性成分),所述脂质纳米颗粒在环境温度下是固体,并含有大约 60-92 重量%的熔点高于体温的第一种脂质,所述第一种脂质是蜡,其选自 C_{12-24} 醇和 C_{12-24} 脂肪酸的酯、 C_{12-24} 脂肪酸的甘油单、二或三酯、 C_{12-24} 脂肪醇和胆固醇,所述脂质纳米颗粒还含有大约 2-25 重量%的药学上可接受的表面活性剂。

[0017] 另一方面,本发明涉及局部用药物组合物,其含有以固体溶液或分散体掺入在脂质纳米颗粒中的作为治疗活性成分的维生素 D 衍生物,所述脂质纳米颗粒在环境温度下是固体,并含有大约 60-92 重量%的熔点高于体温的第一种脂质,所述第一种脂质是蜡,其选自 C_{12-24} 醇和 C_{12-24} 脂肪酸的酯、具有 0.1 或更小酸值的 C_{12-24} 脂肪酸的甘油单、二或三酯、 C_{12-24} 脂肪醇和胆固醇,所述脂质纳米颗粒还含有大约 2-25 重量%的药学上可接受的表面活

性剂,其选自泊洛沙姆或乙氧基化脂肪醇。

附图说明

[0018] 本发明还描述在附图中。

[0019] 图 1 显示分别以软膏剂和三种不同的 SLN 将 BMV 施用在完整 (a) 和屏障受损 (b) 皮肤上 24 小时后,穿透到不同皮肤层的 ^3H BMV 的相对量。结果是相对于回收的 ^3H BMV 的总量。平均值 $\pm$ SD (n=8)。

[0020] 图 2 显示分别以软膏剂和二硬脂酸酯 SLN 将 BMV 施用在完整 (a) 和屏障受损 (b) 皮肤上 6、16 或 24 小时后,分别穿透进皮肤和接收介质 (receptor medium) 中的 ^3H BMV 的相对量。结果是相对于回收的 ^3H BMV 的总量。平均值 $\pm$ SD (n=6)。

[0021] 图 3 显示分别施用二硬脂酸酯 SLN 和软膏剂 24 小时后,皮肤 (a) 和接收介质 (b) 中的 ^3H BMV 的相对量。在一些情况中施用 SLN 后,暴露于 SLN 的皮肤被封闭。结果是相对于回收的 ^3H BMV 的总量。平均值 $\pm$ SD (n=8)。

[0022] 图 4 显示与软膏剂中的 BDP 相比,用包含二硬脂酸甘油酯的 SLN 中的 BDP 处理的无毛大鼠皮肤中的 BDP 的皮肤浓度。SLN 组合物是实施例 1 中所示的。

[0023] 图 5a 显示在比较以 SLN 施用的 BMV 和以软膏剂施用的 BMV 的效果的研究中,耳朵厚度的 AUC。平均值 $\pm$ SEM (n=10)。

[0024] 图 5b 显示在剂量探索研究中,耳朵厚度的 AUC。平均值 $\pm$ SEM (n=8)。根据实施例 3 中描述的处理方案,将所有动物用咪唑酮处理,以便诱导 AD 显型。

[0025] 图 6a 和 6b 显示致敏小鼠中 IL-4 和 IL-1 β 的细胞因子水平。根据实施例 3 中描述的处理方案,将所有动物用咪唑酮处理,以便诱导 AD 显型。平均值 $\pm$ SEM (n=4-10)。

[0026] 图 7a 和 7b 是与施用含有 BMV 的软膏剂相比,通过在咪唑酮处理的小鼠的耳朵上施用含有 BMV 的脂质纳米颗粒,显示经表皮水分丢失减少 (TEWL) 的曲线图。图 7a 显示 SLN 与软膏剂的比较。图 7b 显示剂量探索研究中的 TEWL 值。

[0027] 本发明的详细内容

[0028] 定义

[0029] 术语“脂质纳米颗粒”旨在表示固体脂质纳米颗粒 (SLN) 或者纳米结构的脂质载体 (NLC)。SLN 是由环境温度下为固体的脂质 (例如长链甘油三酯、脂肪酸和蜡) 和表面活性剂制备的纳米尺寸的颗粒,其中活性成分可以是溶解的或分散的。NLC 是由环境温度下为固体的脂质和环境温度下为液体的脂质 (油) 和表面活性剂制备的纳米尺寸的颗粒,其中活性成分可以是溶解的或分散的。脂质纳米颗粒的粒度可以是大约 10-800nm,例如 50-600nm 或 100-500nm。

[0030] 术语“活性成分”旨在表示治疗活性的药物物质,其选自维生素 D 衍生物或类似物和皮质类固醇。

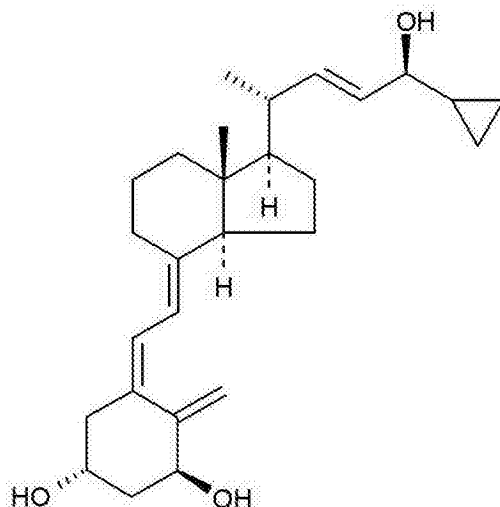
[0031] 术语“维生素 D 衍生物”旨在表示维生素 D₃ 的生物学活性代谢物例如骨化三醇或者此类代谢物的前体例如阿法骨化醇。

[0032] 术语“维生素 D 类似物”旨在表示含有维生素 D 骨架而进行侧链修饰和 / 或骨架本身修饰的合成化合物。该类似物对维生素 D 受体显示与天然存在的维生素 D 化合物可比

的生物活性。

[0033] “卡泊三醇”是下式的维生素 D 类似物：

[0034]



[0035] 已发现卡泊三醇以两种晶体形式存在,脱水物和一水合物。W094/15912 中描述了卡泊三醇一水合物及其制备。

[0036] 术语“皮质类固醇”旨在表示在肾上腺皮质中由胆固醇或其衍生物合成的甾体化合物,特别是显示抗炎作用的此类衍生物。皮质类固醇的示例包括但不限于安西奈德、倍他米松、布地奈德 (budesonide)、氯倍他索、氯倍他松、可的松、地奈德、脱氧可的松、Desoximethasone、地塞米松、二氟可龙 (diflucortolon)、二氟拉松、Flucortisone、氟米松、氟尼缩松、醋酸氟轻松、氟轻松 (fluocinolon)、氟米龙、氟泼尼龙、氟氢缩松、氟替卡松、氯氟舒松、卤倍他索 (halobetasol)、氢化可的松、甲泼尼龙、甲基强的松 (methylprednisone)、莫米松、帕拉米松、泼尼卡酯、泼尼松、泼尼松龙和曲安西龙或其药学上可接受的酯或丙酮化合物。目前优选的皮质类固醇的示例是倍他米松及其酯例如 17- 戊酸酯或 17, 21- 二丙酸酯或者氯倍他索 17- 丙酸酯。

[0037] 术语“贮存稳定性”或“贮存稳定的”旨在表示组合物显示化学和物理稳定性特征,其允许组合物在冷藏或者优选在室温下贮存足够长的一段时间,以使组合物是商业可用的,例如至少 12 个月,特别是至少 18 个月,并优选至少 2 年。

[0038] 术语“化学稳定性”或“化学上稳定的”旨在表示在产品的贮存期限内通常是 2 年,在室温下,不超过 10%,优选不超过 6% 的活性成分降解。通过将组合物进行 40°C 下的加速稳定性研究,可得到室温下的化学稳定性近似值,在加速稳定性研究中,将组合物置于 40°C 的加热药柜中,并在 1 个月和 3 个月取样,通过 HPLC 测试出现的降解产物。如果在 40°C 下、3 个月,低于大约 10% 的物质降解,那么这通常相应于室温下 2 年的贮存期限。当组合物中包含的活性成分是卡泊三醇时,“化学稳定性”通常表明在最终的药品中卡泊三醇随时间推移不显著降解成 24- 表卡泊三醇或卡泊三醇的其他降解产物。

[0039] 术语“物理稳定性”或“物理学上稳定的”旨在表明历经组合物的贮存期限,活性成分不从抛射剂或溶媒相中沉淀出来。

[0040] 术语“基本无水的”旨在表明软膏剂组合物中的游离水含量不超过组合物重量的大约 2%,优选不超过大约 1%。

[0041] 术语“中链甘油三酯”用于表示具有 6-12 个碳原子链长的脂肪酸的甘油三酯。所述中链甘油三酯目前的优选示例是辛酸 (C₈) 和癸酸 (C₁₀) 甘油三酯的混合物,例如可以商品名 Miglyol1812 获得的。

[0042] 术语“半固体”用于表示室温下,显示粘弹性行为且特征上是非-牛顿的,即在低剪应力下不流动,但是在高剪切率下显示塑性、假塑性或触变型流动行为的组合物或赋形剂。半固体组合物的典型示例是软膏剂和乳剂。

[0043] 术语“封闭”旨在表示在皮肤表面提供脂质层,其形成足够致使经表皮水分丢失降低的水化层屏障,引起皮肤水合。

[0044] 术语“皮肤穿透”旨在表示活性成分扩散进皮肤不同层即角质层、表皮和真皮。

[0045] 术语“皮肤渗透”旨在表示活性成分穿过皮肤进入体循环的流动,或者在体外研究例如下文实施例 2 中报道的那些情况下,进入实验中所用的 Franz 池装置的接收流体的流动。

[0046] 实施方案

[0047] 在本发明组合物中,第一种脂质可包含脂质纳米颗粒的大约 65-92 重量%或者大约 70-90 重量%或者大约 75-85 重量%或者大约 80 重量%,并且表面活性剂含有脂质纳米颗粒的大约 8-22 重量%例如大约 10-20 重量%。第一种脂质可优选选自棕榈酸鲸蜡基酯、蜂蜡、棕榈酸十八烷基酯、山嵛酸十八烷基酯、单硬脂酸甘油酯、二硬脂酸甘油酯、二山嵛酸甘油酯、三肉豆蔻酸甘油酯、三棕榈酸甘油酯、三硬脂酸甘油酯、山嵛醇 (behenol)、硬脂酸、氢化棕榈油、氢化椰油甘油酯、氢化蓖麻油或十八醇十六醇混合物 (cetostearylalcohol)。

[0048] 在本发明组合物中,表面活性剂可以是亲水表面活性剂,并可优选选自泊洛沙姆例如泊洛沙姆 188 或泊洛沙姆 407,聚山梨酯类例如聚山梨酯 80,糖酯(例如蔗糖硬脂酸酯或蔗糖棕榈酸酯),乙氧基化脂肪醇例如聚氧乙烯蓖麻油衍生物或者其可以是亲脂表面活性剂例如磷脂诸如大豆磷脂酰胆碱或卵磷脂。

[0049] 此外,脂质纳米颗粒可含有脂质纳米颗粒的大约 1-40 重量%,例如大约 10-30 重量%或者大约 15-15 重量%或者大约 20 重量%的第二种脂质,所述第二种脂质在环境温度下是油且与第一种脂质或者亲脂性乳化剂(例如聚丙烯脂肪酰基醚)、或者软化剂是可溶混的。第二种脂质可选自 C₆₋₁₀ 甘油单酯、C₆₋₁₀ 甘油二酯、肉豆蔻酸异丙酯或棕榈酸异丙酯、中链甘油三酯或长链甘油三酯,包括植物油例如蓖麻油、葵花籽油、红花油、月见草油、琉璃苣籽油、芝麻油、玉米油、棕榈仁油、橄榄油、鳄梨油、杏仁油、菜籽油、椰子油、棉籽油、花生油、大豆油、小麦胚芽油、葡萄核油或霍霍巴油。

[0050] 本发明组合物可以是乳剂(水包油型乳剂)、洗剂、喷雾剂或水性凝胶剂,其中脂质纳米颗粒通常以组合物重量的大约 1-40 重量%例如大约 5-30 重量%或者大约 10-20 重量%的量存在。所述组合物还含有水相,其中,在某些情况下,脂质可形成网状构造,以便引发组合物的胶凝化或者其可含有增稠剂。增稠剂可选自卡波姆,纤维素衍生物例如羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟乙基纤维素,透明质酸,藻酸盐,葡聚糖或其衍生物。增稠剂通常以组合物的大约 0.1-5 重量%例如大约 0.5 重量%的量存在。组合物还可含有软化剂,其可选自硅油、液体石蜡和胆固醇或甘油、尿囊素、泛醇、聚甘油或聚甘油酯。软化剂可以以组合物的大约 10-50 重量%或者大约 20-40 重量%或者大约 30 重量%的量存在。

[0051] 活性成分可以以不同形式存在于组合物中,即溶解或分散于水相中、溶解或分散

于表层脂质 / 水相中或者溶解或分散于脂质纳米颗粒中,在表面上或在核心中。先前已发现活性成分最可能与脂质表面相关,且不能有效地掺入到核心中,引起零级释放模式和 6h 后缺乏特异性皮肤靶向 [L. B. Jensen 等人, *Int. J. Pharm.* 390(1), 2010, 53-60 页]。这与本发明的发现相一致,据此,一些活性成分溶解或分散于水相中,至少在棕榈酸鲸蜡基酯和三棕榈酸酯脂质纳米颗粒中,而主要比率的活性成分被掺入进脂质表面内或与脂质表面相关联。通常认为,与更小极性脂质相比,用更大极性的脂质可实现活性成分在脂质组分中更高的溶解度和更有效的包囊 [J. Zhang 和 E. Smith, *J. Pharm. Sci.* DOI10. 1002/ jps. 22329, 2010]。因此,倍他米松戊酸酯 (BMV, 模型活性成分) 在熔化脂质中的溶解度研究显示脂质极性和溶媒中溶解度的相互关系,相应于采用含有不同量甘油单酯的脂质的先前发现 [L. B. Jensen 等人, 同上; V. V. Kumar 等人, *Int. J. Pharm.* 335(1-2), 2007, 167-175 页]。已表明脂质极性控制 BMV 在体外释放研究中的释放,所述体外研究是用不同极性的不同脂质进行的 [L. B. Jensen 等人, 同上]。

[0052] 脂质极性的作用还可以与配制于脂质纳米颗粒中的活性成分的皮肤穿透相关,或许是脂质纳米颗粒与皮肤脂质改变的相互作用的结果。具有与皮肤溶解度参数接近的溶解度参数的成分可与皮肤具有好的可溶混性 (miscibility), 并且改变脂质溶解度参数可能是控制活性成分从脂质纳米颗粒释放并分配进皮肤的一种方法 [K. B. Sloan 等人, *J. Invest. Dermatol.* 87(2), 1986, 244-252 页]。例如,据估计 BMV 的溶解度参数是 12 [L. B. Jensen 等人, 同上], 并且猪皮肤是大约 10 [Z. Liron 和 S. Cohen, *J. Pharm. Sci.* 73(4), 1984, 538-542 页]。所用的脂质具有 8.7-9.5 的溶解度参数。包含二硬脂酸酯的脂质纳米颗粒具有 9.5 的溶解度参数,最接近于皮肤的,因此,与三棕榈酸酯和棕榈酸鲸蜡基酯脂质纳米颗粒相比,可预期其与皮肤脂质更易溶混。BMV 可溶解于所述脂质中,且二硬脂酸酯脂质纳米颗粒比其他所用的脂质纳米颗粒的尺寸更小;直径是 $150.9 \pm 0.12 \text{ nm}$ 。这可解释与三棕榈酸酯和棕榈酸鲸蜡基酯脂质纳米颗粒相比,施用二硬脂酸酯脂质纳米颗粒中的 BMV 之后, BMV 在皮肤中并特别是在角质层中更高的量 (参见实施例 2)。

[0053] 为了使尺寸不同引起的穿透模式 (profiles) 的任何差异最小化,脂质颗粒应当在其平均直径方面没有显著不同。平均直径与颗粒表面积相关,据认为颗粒表面积是脂质纳米颗粒与皮肤相互作用并穿透进皮肤以及任何封闭性质的重要参数 [S. Wissing 等人, *J. Cosmet. Sci.* 52(5), 2001, 313-324 页; R. H. Muller 等人, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, Suppl. 1, 2002, S131-S155]。因此,在本发明组合中,脂质纳米颗粒可具有大约 10-800nm 特别是大约 50-600nm 例如 100-500nm 的平均直径。示例性 BMV 脂质纳米颗粒的平均直径 (参见实施例 1) 是 150-212nm, 具有低于 0.24 的 PdI。通常认为高于 10nm 的颗粒不穿透完整皮肤,但是较大尺寸的颗粒 (具有 500-700nm 的直径) 可穿透进患病皮肤,因为屏障是受损的。测量的粒度表明颗粒不能穿透完整的皮肤,而屏障层受损的皮肤可能是易于颗粒穿透的。由棕榈酸鲸蜡基酯制备的脂质纳米颗粒是比其他类型脂质更单分散的,这可能是由于棕榈酸鲸蜡基酯是具有不同晶体结构的蜡型脂质。先前已表明这种类型的脂质产生具有良好物理稳定性的均质且小尺寸的颗粒 [V. Jennings 和 S. Gohla, *Int. J. Pharm.* 196(2), 2000, 219-222 页]。

[0054] 尺寸测量表明 SLN 不能穿透完整的皮肤,但是对于屏障受损的皮肤,颗粒穿透是可能的。下文使用 ^{14}C - 标记的脂质颗粒和 ^3H - 标记的 BMV 的实施例 2 中讨论的研究表明

BMV/ 脂质比率沿皮肤层向下增加,在接收介质中达到最大值,并因此,推断 BMV 没有被脂质纳米颗粒递送至较深皮肤层的靶细胞,更正确地讲脂质纳米颗粒作为药物物质在皮肤上层中的药物储库。从脂质的 ^{14}C - 标记,还已表明脂质颗粒主要停留在完整和屏障受损皮肤的皮肤表面和角质层中。因此,活性成分必须从颗粒中释放,以进一步扩散到皮肤中,并到达有活力的表皮和真皮中的靶细胞。

[0055] 如文中通过带剥脱的 (tape-stripped) 皮肤所示,即使屏障被强烈损伤,脂质纳米颗粒也不穿过皮肤,这被认为是有益的。脂质颗粒停留在皮肤表面的事实也使得脂质纳米颗粒可增加皮肤水合并物理上增强屏障成为可能。在皮肤病例如 AD 治疗中,这是高度相关的性质,在皮肤病中身体皮肤屏障情况是与 AD 发病机制强烈相关的,因为其与免疫皮肤屏障相互作用。

[0056] 在实现皮肤中药物物质的高量方面,脂质纳米颗粒是优于软膏剂的。从图 3 中的结果看,这可能是清楚的。完整和屏障受损的皮肤上层中发现大比率的活性成分,这最可能与脂质纳米颗粒的大表面积和粘附性质相关。此外,脂质纳米颗粒和活性成分可穿透毛囊和皮沟中,从那里,它们可作为药物储库。与三棕榈酸酯和棕榈酸鲸蜡基酯相比,向完整和屏障受损皮肤施用二硬脂酸酯脂质纳米颗粒后,较高量的活性成分存在于角质层和表皮中,认为这是与脂质极性和颗粒大小的不同相关 (图 1)。因此,除了前面所见的封闭作用,与皮肤的紧密相互作用、与皮肤脂质的融合和药物物质以受控方式的释放可能是脂质纳米颗粒穿透增强性质的机制 [R. H. Muller 等人,同上]。

[0057] 当施用棕榈酸鲸蜡基酯 SLN 时,对于完整和屏障受损皮肤,完整皮肤表皮和接收介质中较高的 BMV 量可归因于不同的脂质结构、较低的极性和较低的 BMV 溶解度 [J. Zhang 和 E. Smith,同上;V. Jennings 和 S. Gohla,同上]。这可使 BMV 更容易地离开 SLN 溶媒并分配进皮肤中。

[0058] 当屏障完整时,BMV 非常有效地保留在皮肤中 (图 1a),但是当屏障层受损时,其与软膏剂类似那样透过皮肤 (图 1b)。然而,与软膏剂相比,较高量的活性成分发现于屏障受损皮肤中。测试的脂质纳米颗粒的最有利的穿透模式 (参见实施例 2) 获自二硬脂酸酯脂质纳米颗粒,其产生活性成分的最高的溶解度,并在保持大量活性成分于皮肤中而较少量的活性成分在接收介质方面是优越的。对于完整和屏障受损皮肤,皮肤中活性成分的水平是类似的,其表明脂质纳米颗粒有效地粘附至完整皮肤和屏障受损皮肤的表面。

[0059] 已发现与软膏剂相比,施用二硬脂酸酯 SLN 6h、16h 和 24h 期间,更高量的活性成分保持于完整和受损皮肤中 (图 2)。24h 期间接收介质中的最小增加可通过制剂的表面耗竭 (即可用于穿透进皮肤的活性成分的量) 而解释。认为活性成分是部分地掺入在颗粒中,部分掺入在颗粒表面层。先前已表面这一结构反映于跟随有控释的突释 (burst release) [E. B. Souto 等人, Int. J. Pharm 278 (1), 2004, 71-77 页;V. Jennings 等人, J. Control. Release 66 (2-3), 2000, 115-126 页]。当突释后,表面层被耗竭时,然后较少的活性成分可以从颗粒中扩散到皮肤并且具有较慢的释放速率。对于该所见模式,另一个原因是皮肤或者特别是毛囊被掺入在 SLN 中的 BMV 或者被任何 BMV 晶体饱和,所述 BMV 晶体可分别存在于棕榈酸鲸蜡基酯和三棕榈酸酯制备的 SLN 中。起初通过毛囊和汗腺管的短暂分流扩散,随后稳态扩散通过 SC,是可能的 (R. J. Scheuplein, 经皮吸收机制. II. 短暂扩散和皮肤穿透的各种途径的相对重要性 (Mechanism of percutaneous absorption. II. Transient

diffusion and the relative importance of various routes of skin penetration), J Invest Dermatol 48(1) (1967) 79-88)。这一作用可相应于这些研究中可见的 BMV 的恒定水平。因此,脂质纳米颗粒可用于创建皮肤和毛囊中的储库,并保持可用于吸收的恒量活性成分。然而,由于药物的掺入,颗粒和皮肤的交换速率可随施用时间而变化。时间曲线(profiles)和接收介质中药物物质的量表明药物物质发现于颗粒的表层中。当施用至皮肤时,脂质纳米颗粒因此具有以双相方式递送活性成分的能力:最初从颗粒表面和水相突释,随后是与脂质颗粒更紧密联系的药物物质在角质层中的储库效应。

[0060] 一旦屏障受损皮肤封闭,BMV 穿透的显著增加可能具有不同的原因。首先,因为由于角质层中增加的含水量和脂质屏障障碍引起的扩散系数增加,封闭几乎总是增加吸收至皮肤中的药物物质的量 [J. A. Bouwstra 等人, J. Recept. Signal Transduct. Res. 21 (2-3), 2001, 259-286 页]。此外,封闭可促进脂质纳米颗粒中存在的表面活性剂对皮肤屏障的穿透促进作用。封闭还可影响组合物和皮肤之间的药物交换,因为施用后水不能蒸发。因为一旦屏障受损皮肤封闭,非常大量的药物穿透进接收介质中,这些结果还支持活性成分是与颗粒表面相关,而不是包裹于固体颗粒核心中的。

[0061] 在另一项研究中,将掺入在 SLN 中的倍他米松二丙酸酯 (BDP) 施用至无毛大鼠的皮肤上,并显示了 SLN 维持皮质类固醇至皮肤的能力。当与软膏剂相比时,分别在 1 天和 3 天后,显著更高量的 BDP 存在于皮肤中,并且制剂施用后 7 天,当以 SLN 施用,仍可在皮肤中检测到药物物质,而当以软膏剂施用,不能检测到药物物质。

[0062] 上文公开类型的脂质纳米颗粒可通过下述方法制备,其包括:

[0063] (a) 将皮质类固醇溶解或分散于含有约 60-92 重量 % 的熔点高于体温的第一种脂质的脂质相中,所述第一种脂质是蜡,其选自 C_{12-24} 醇和 C_{12-24} 脂肪酸的酯、 C_{12-24} 脂肪酸的甘油二酯或三酯、 C_{12-24} 脂肪醇和胆固醇,所述第一种脂质是熔化状态的,所述脂质相任选地包含大约 1-40 重量 % 的在环境温度下是油并与第一种脂质、或者亲脂性乳化剂、或者软化剂可溶混的第二种脂质;

[0064] (b) 将步骤 (a) 中得到的脂质相分散于含有 0.2-10 重量 % 的药学上可接受的表面活性剂的水相中,以形成乳剂,所述表面活性剂选自泊洛沙姆、聚山梨酯和乙氧基化脂肪醇;

[0065] (c) 利用高压匀化器将步骤 (b) 中得到的乳剂匀化,以形成含有皮质类固醇的脂质相的纳米颗粒;和

[0066] (d) 将步骤 (c) 中得到的匀化的乳剂冷却,以固化纳米颗粒。

[0067] 测定通过所述方法制备的脂质纳米颗粒的粒度,其为大约 100-500nm。

[0068] 或者,可通过下述方法制备脂质纳米颗粒,所述方法包括:

[0069] (a) 将皮质类固醇溶解或分散于含有约 60-92 重量 % 的熔点高于体温的第一种脂质的脂质相中,所述第一种脂质是蜡,其选自 C_{12-24} 醇和 C_{12-24} 脂肪酸的酯、 C_{12-24} 脂肪酸的甘油二酯或三酯、 C_{12-24} 脂肪醇和胆固醇,所述第一种脂质是熔化状态的,所述脂质相任选地含有大约 1-40 重量 % 的在环境温度下是油并与第一种脂质、或者亲脂性乳化剂、或者软化剂可溶混的第二种脂质;

[0070] (b) 将步骤 (a) 中得到的脂质相在液氮中或干冰上固化;

[0071] (c) 将固化的脂质相研磨成大约 50-100 μm 的粒度;

[0072] (d) 将步骤 (c) 中得到的粉末分散于含有大约 0.2-10 重量 % 的表面活性剂的冷水相中 ; 和

[0073] (e) 在室温或低于室温下, 利用高压匀化器将步骤 (d) 中得到的分散体匀化, 以得到脂质纳米颗粒。

[0074] 含有皮质类固醇的脂质纳米颗粒组合物可有利地用于治疗炎性皮肤病或病症例如湿疹、异位性皮炎、接触性皮炎、银屑病、皮肤老化、光老化、痤疮、荨麻疹或瘙痒症。

[0075] 在另一实施方案中, 脂质纳米颗粒还含有在环境温度下是油并与第一种脂质、或者亲脂性乳化剂或者软化剂是可溶混的第二种脂质。第二种脂质的量是脂质纳米颗粒的大约 1-40 重量 % 例如大约 10-35 重量 % 或者大约 15-30 重量 % 或者大约 20-25 重量 %。更具体地讲, 脂质纳米颗粒可含有大约 80-85 重量 % 的第一种脂质和大约 15-20 重量 % 的第二种脂质。

[0076] 在该实施方案中, 第二种脂质可有利地选自 C_{6-10} 甘油单酯、 C_{6-10} 甘油二酯、中链甘油三酯, 例如辛酸 / 癸酸甘油三酯 ; 长链甘油三酯例如蓖麻油、肉豆蔻酸异丙酯或棕榈酸异丙酯。

[0077] 在包含维生素 D 衍生物或类似物作为活性成分的实施方案中, 所述第一种脂质可有利地选自棕榈酸鲸蜡基酯、 C_{14-28} 脂肪醇、氢化棕榈油和具有 0.1 或更小酸值 (表明由于众所周知的维生素 D 衍生物的酸敏感性, 对维生素 D 衍生物的化学稳定性是有害的游离脂肪酸的低含量) 的甘油三酯。在该实施方案中, 已发现包含第一种和第二种脂质的脂质纳米颗粒对维生素 D 衍生物制剂是特别有利的, 因为其允许药物化合物被掺入到脂质纳米颗粒中, 在此其更少地暴露于组合物的水相中有害成分的降解。利用第一种和第二种脂质可提高脂质纳米颗粒中的药物载量, 并使活性成分免于存在于水相中。此外, 当脂质纳米颗粒拥有贮存期间不易于多晶型转化 (致使药物逸出并分配到水相中) 的结构时, 稳定性可进一步增加。第二种脂质可有利地选自肉豆蔻酸异丙酯、棕榈酸异丙酯、中链甘油三酯例如辛酸酯 / 癸酸甘油三酯或长链甘油三酯例如蓖麻油。在目前优选的实施方案中, 所述第一种脂质是棕榈酸鲸蜡基酯, 且第二种脂质是辛酸 / 癸酸甘油三酯。维生素 D 衍生物可选自卡泊三醇、骨化三醇、马沙骨化醇、他卡西醇, 对于局部施用在皮肤上, 所有这些是众所周知的。

[0078] 旨在靶向毛囊的包含含有药物的脂质纳米颗粒的组合物可有利地包含具有与毛囊的毛囊皮脂腺中存在的皮脂的溶解度参数接近的溶解度参数的脂质。因此, 显然, 脂质纳米颗粒中存在的第一种和 / 或第二种脂质对活性化合物递送进富含皮脂区域例如毛囊的作用可通过所述赋形剂的溶解性而解释, 正如希尔德布兰德 (Hildebrand) 可溶性系数所测定的 (JH Hildebrand 和 RL Scott, *The Solubility of Non-Electrolytes*, Reinhold, 纽约, 1949)。模型皮脂组合物的希尔德布兰德系数 (溶解度参数 δ) 显示皮脂是完全非极性的油状物质, 具有大约 $7.5-8(\text{cal}/\text{cm}^3)^{1/2}$ 的希尔德布兰德系数 (参见 DW Osborne 等人, 皮肤表面脂质对局部制剂的影响 ("The Influence of Skin Surface Lipids on Topical Formulations"), *Topical Drug Delivery Formulations*, 第 42 卷, 1990 (Drugs and the Pharmaceutical Science))。已发现具有皮脂希尔德布兰德系数 ± 2 单位之内的希尔德布兰德系数的脂质是与皮脂可溶混的, 并由此适合于溶解活性化合物以将其递送至毛囊皮脂腺单位的目的。另一影响因素是脂质熔点, 因为药物物质释放可以通过熔化和与皮脂和皮肤脂质的融合而启动。具有与皮脂溶解度参数接近的溶解度参数的脂质可包括棕榈酸鲸蜡

基酯、棕榈酸十八烷基酯和山嵛酸十八烷基酯。

[0079] 已知卡泊三醇是对酸性条件（在 pH 低于大约 7.0 的水性组合物中或在酸性反应物质存在下在非水组合物中）非常敏感的物质，这促成卡泊三醇的快速降解。为了保证所述物质在组合物的整个贮存期限内足够的化学稳定性，包含能中和酸性杂质的化合物可能是合理的，所述酸性杂质可能存在于组合物的一种或多种赋形剂中，并且其对卡泊三醇的化学稳定性是有害的。酸中和化合物可有利地选自缓冲剂例如磷酸盐缓冲剂，其可以以组合物重量的大约 0.025-0.1% 的量被包含，以便组合物的 pH 是 7.5 或更大。酸中和化合物还可以是锚定脂质（即锚定于水相和脂质纳米颗粒之间界面的长脂质链）的胺。所述胺的示例是叔胺例如三乙醇胺、氨基丁三醇、单乙醇胺或二乙醇胺，其可以以大约 0.1-2 重量 % 的量包含于组合物中。

[0080] 在本发明组合物的该实施方案中，脂质纳米颗粒可以以组合物的 1-40 重量 % 例如大约 5-30 重量 % 或者大约 10-20 重量 % 的量存在。组合物可以是乳剂（水包油型）、洗剂、喷雾剂或水性凝胶剂，组合物还包含水相。水相可进一步包含脂质例如硅油、液体石蜡或胆固醇和 / 或增稠剂。增稠剂可选自卡波姆或纤维素衍生物，例如羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟乙基纤维素。增稠剂通常以组合物的大约 0.1-5 重量 % 特别是大约 0.5 重量 % 的量存在。组合物还可包含软化剂，其可选自硅油、液体石蜡和胆固醇。软化剂可以以组合物的大约 10-50 重量 % 或者大约 20-40 重量 % 或者大约 30 重量 % 的量被包含。

[0081] 根据该实施方案的组合物可通过下述方法制备，所述方法包括：

[0082] (a) 将维生素 D 衍生物溶解或分散于包含约 60-92 重量 % 的熔点高于体温的第一种脂质的脂质相中，所述第一种脂质是蜡，其选自 C_{12-24} 醇和 C_{12-24} 脂肪酸的酯、具有 0.1 或更小酸值的 C_{12-24} 脂肪酸的甘油三酯、 C_{12-24} 脂肪醇和胆固醇，并任选地包含大约 1-40 重量 % 的在室温下为油并与第一种脂质可溶混的第二种脂质，所述第一种脂质是熔化状态的；

[0083] (b) 将步骤 (a) 中得到的脂质相分散于包含约 0.2-10 重量 % 的药学上可接受的表面活性剂的水相中，所述表面活性剂选自泊洛沙姆或乙氧基化脂肪醇；

[0084] (c) 利用高压匀化器将步骤 (b) 中得到的乳剂匀化，以形成包含维生素 D 衍生物的脂质相的纳米颗粒；和

[0085] (d) 将步骤 (c) 中得到的匀化的乳剂冷却，以固化纳米颗粒。

[0086] 通过所述方法制备的脂质纳米颗粒的粒度测定为大约 100-500nm。

[0087] 或者，可通过下述方法制备组合物，所述方法包括：

[0088] (a) 将维生素 D 衍生物溶解或分散于包含约 60-92 重量 % 的熔点高于体温的第一种脂质的脂质相中，所述第一种脂质是蜡，其选自 C_{12-24} 醇和 C_{12-24} 脂肪酸的酯、具有 0.1 或更小酸值的 C_{12-24} 脂肪酸的甘油三酯、 C_{12-24} 脂肪醇和胆固醇，并任选地包含大约 1-40 重量 % 的第二种脂质，第二种脂质在室温下是油并与第一种脂质是可溶混的，所述第一种脂质是熔化状态的；

[0089] (b) 将步骤 (a) 中得到的脂质相在液氮中或干冰上固化；

[0090] (c) 将固化的脂质相研磨成大约 50-100 μm 的粒度；

[0091] (d) 将步骤 (c) 中得到的粉末分散于包含大约 0.2-10 重量 % 的表面活性剂的冷水相中；和

[0092] (e) 在室温或低于室温下，利用高压匀化器将步骤 (d) 中得到的分散体匀化，以得

到脂质纳米颗粒。

[0093] 可将包含维生素 D 衍生物或类似物的脂质纳米颗粒组合物用于预防或治疗炎性或过增生性皮肤病症例如银屑病、脂溢性银屑病 (sebopsoriasis)、掌跖脓疱病 (pustulosis palmoplantaris)、皮炎、鳞癣、红斑痤疮、痤疮或光化性角化病。

[0094] 在文献中,已描述皮脂腺细胞表达维生素 D 受体 (VDR) 并且 VDR 的表达是用生物活性维生素 D 代谢物 $1\alpha, 25\text{-二羟基维生素 D}_3$ (骨化三醇) 治疗而诱导的,参见 **C. Krämer** 等人, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 113, 2009, 9-16 页。用骨化三醇温育培养的皮脂腺细胞致使促炎细胞因子 IL-6 和 IL-8 分泌降低。因此,可假定如果靶向毛囊,维生素 D 衍生物可对皮脂腺病症例如痤疮产生治疗作用。此外,已知维生素 D 衍生物降低角蛋白细胞的增生过度,并可预期也对囊输送管的角蛋白细胞产生作用。

[0095] 尽管先前已提议维生素 D 类似物例如卡泊三醇可用于痤疮的治疗 (参见 W091/12807),但是随后显示之前参考文献公开的组合物对所述治疗是无效的。据认为用先前的组合物观察到的缺乏疗效是由活性成分不靶向作用位点引起的,并且现在认为当维生素 D 类似物靶向毛囊时,可以获得痤疮治疗中的提高的疗效。

[0096] 因此,本发明还涉及将维生素 D 衍生物例如卡泊三醇靶向毛囊皮脂腺的方法,该方法包括向需要所述治疗的患者的皮肤区域施用治疗有效量的如上所述的脂质纳米颗粒组合物。更具体地讲,需要治疗的皮肤区域包含粉刺、脓疱、丘疹或与痤疮相关的囊肿或者相关疾病例如红斑痤疮。维生素 D 衍生物优选是卡泊三醇或卡泊三醇一水合物。

[0097] 此外,考虑在药学上可接受的含水溶媒中制备包含作为活性成分的皮质类固醇和维生素 D 衍生物或类似物的脂质纳米颗粒组合物。在该实施方案中,可通过加入抗氧化剂稳定组合物,所述抗氧化剂可选自 BHA 和 BHT 或者 BHA 和 BHT 的混合物。

实施例

[0098] 实施例 1

[0099] 本发明组合物

[0100] 包含倍他米松-17-戊酸酯 (BMV) 的固体脂质纳米颗粒

[0101]

成分	组合物 A (mg/g)	组合物 B (mg/g)	组合物 C (mg/g)	组合物 D (mg/g)	组合物 E (mg/g)	组合物 F (mg/g)
BMV	1	1	1	0.12	0.12	1.2
二硬脂酸甘油酯	100	-	-	100	25	100
棕榈酸鲸蜡基酯	-	100	-	-	-	-
三棕榈酸甘油酯	-	-	100	-	-	-
聚山梨酯 80	25	25	25	25	4	25
水	Ad 1g	Ad 1g	Ad 1g	Ad 1g	Ad 1g	Ad 1g

[0102] 包含倍他米松 - 二丙酸酯 (BDP) 的固体脂质纳米颗粒

[0103] 组合物 G

[0104]

赋形剂(mg/g)

单位

mg

倍他米松二丙酸酯

0.643

二硬脂酸甘油酯

100

[0105]

聚山梨酯 80

20

磷酸二钠二水合物

10

氢氧化钠(氯化氢)

适量, pH 6.0

水, 纯化的

ad 1 g

[0106] 包含卡泊三醇一水合物的脂质纳米颗粒

[0107]

	组合物H	mg/g
1	卡泊三醇一水合物	0.0522
2	棕榈酸鲸蜡基酯	160
3	MCT	40
4	泊洛沙姆 407	48
6	二偶氮利定脲(Diazolidinyl urea)	5
7	磷酸氢二钠二水合物	20
8	BHA-BHT(50:50)	3
9	氢氧化钠(氯化氢)	适 量 , pH /8.0/8.5
10	水, 纯化的	ad 1 g

[0108]

	组合物 I	Mg/g
1	卡泊三醇一水合物	0.0522
2	棕榈酸鲸蜡基酯	200
3	泊洛沙姆 407	48
4	二偶氮利定脲	10
5	磷酸氢二钠二水合物	20
6	BHA-BHT(50:50)	3
7	氢氧化钠(氯化氢)	适量, pH8.5
8	水, 纯化的	ad1g

[0109]

	组合物J	mg/g
1	卡泊三醇一水合物	0.0522
2	棕榈酸鲸蜡基酯	160
3	MCT	40
4	卡波姆974 P	10
5	泊洛沙姆407	48
6	二偶氮利定脲	5
7	磷酸氢二钠二水合物	20
8	BHA-BHT(50:50)	3
9	氢氧化钠(氯化氢)	适 量 , pH /8.0/8.5
10	水, 纯化的	ad 1 g

[0110]

	组合物 K	mg/g
1	卡泊三醇一水合物	0.0522
2	棕榈酸鲸蜡基酯	200
3	泊洛沙姆407	48
5	卡波姆974P	10
5	二偶氮利定脲	10
6	磷酸氢二钠二水合物	20
7	BHA-BHT(50:50)	3
8	氢氧化钠(氯化氢)	适 量 ,pH 8.0/8.5
9	水, 纯化的	ad 1 g

[0111]

	组合物 L	mg/g
1	卡泊三醇一水合物	0.0522
2	甘油三硬脂酸酯	80
3	蓖麻油	20
4	泊洛沙姆 407	24

5	卡波姆 974P	10
---	----------	----

[0112]

6	二偶氮利定脲	5
7	磷酸氢二钠二水合物	20
8	BHA-BHT (50:50)	3
9	氢氧化钠 (氯化氢)	适量, pH8.5
10	水, 纯化的	ad1g

	组合物 M	mg/g
1	卡泊三醇	0,0522
2	Dynasan P60	80
3	Miglyol 812 或分级的椰子油	20
4	泊洛沙姆 407	24
5	卡波姆 974P	10
6	二偶氮利定脲	5
7	磷酸氢二钠二水合物	20
8	BHA-BHT(50:50)	3
9	氢氧化钠(氯化氢)	适量, pH 8.5
10	水, 纯化的	ad 1 g

[0113]

[0114]

	组合物 N	mg/g
1	卡泊三醇一水合物	0,0522
2	山嵛醇	80
4	泊洛沙姆 407	24
5	卡波姆 974P	10
6	二偶氮利定脲	5
7	磷酸氢二钠二水合物	20
8	BHA-BHT (50:50)	3

9	氢氧化钠 (氯化氢)	适量, pH8.5
10	水, 纯化的	ad1g

[0115] 包含卡泊三醇一水合物和倍他米松二丙酸酯的脂质纳米颗粒

[0116]

	组合物 O	mg/g
1.	卡泊三醇	0,0522
2.	倍他米松二丙酸酯	0,643

[0117]

3.	Dynasan118	80
4.	Miglyol812	20
5.	泊洛沙姆 188	20
6.	卡波姆 974P	5
7.	二偶氮利定脲	5
8.	磷酸氢二钠二水合物	14
9.	BHA-BHT (50:50)	3
10.	. 氢氧化钠	适量, pH6.6
11.	. 水, 纯化的	ad1g

[0118]

	组合物 P	mg/g
	卡泊三醇	0,0522
	倍他米松二丙酸酯	0,643
	三硬脂酸酯	100
	泊洛沙姆 188	10
	卡波姆 974P	5
	二偶氮利定脲	5

	磷酸氢二钠二水合物	14
	BHA-BHT (50:50)	3
	氢氧化钠	适量, pH6.6
	水, 纯化的	ad1g

[0119]

	组合物 Q	mg/g
	卡泊三醇	0,0522
	倍他米松二丙酸酯	0,643
	Dynasan118	80
	蓖麻油	20
	泊洛沙姆 188	20
	卡波姆 974P	5
	二偶氮利定脲	5
	磷酸氢二钠二水合物	14
	BHA-BHT (50:50)	3
	氢氧化钠	适量, pH6.6
	水, 纯化的	ad1g

[0120] 在 40℃ 下贮存 3 个月后, 测定掺入到脂质纳米颗粒 (组合物 H-L) 中的卡泊三醇是化学稳定的 (>90%)。

[0121] 在 25℃ 下贮存 18 个月后, 测定掺入到脂质纳米颗粒 (组合物 H-M) 中的卡泊三醇是化学稳定的 (>90%)。

[0122] 在 25℃ 下贮存 6 个月后, 测定倍他米松二丙酸酯在组合物 G 中是化学稳定的 (>90%)。

[0123] 组合物 N 在 25℃ 下的稳定性评价正在进行。

[0124] 在 25℃ 下贮存 6 个月后, 测定掺入到脂质纳米颗粒 (组合物 O-Q) 中的卡泊三醇和倍他米松二丙酸酯在 SLN 中是化学稳定的 (>90%)

[0125] 制剂的制备

[0126] 通过 EP605497 中描述的热高压匀化进行 SLN 的制备。

[0127] 简言之, 对于有 BMV 和 BDP 的 SLN, 将脂质在 80℃ 下熔化, 并将 BMV 或 BDP 在搅拌

下溶解于熔化的脂质中。向脂质混合物中,加入相同温度的聚山梨酯 80 水溶液,并利用 Silverson Machines Ltd. (Chesham, United Kingdom) 的 Silverson High Speed Mixer L4RT 将混合物在 6000rpm 温和地匀化 2min,以形成粗乳液。利用 Avestin Inc. (渥太华, ON, 加拿大) 的 EmulsiFlex C5,并将均化器置于 Julabo TW20 水浴 (Seelbach, 德国) 中以保持温度在 80℃,将乳液在高压下匀化。应用 4 个匀化循环,在 600bar 下,处理所述粗乳液。这些处理参数选自初步研究,因为它们产生具有小的平均粒度 ($\leq 200\text{nm}$) 和低多分散性的 SLN。将 SLN 分散体在室温下冷却,同时避光保护,并随后调至 pH5.0。

[0128] 含有 BMV 的软膏剂由 99%(w/w) 的白软石蜡和 1%(w/w) 的液体石蜡组成,并通过使用乳钵将 BMV 晶体混悬于软膏剂而制备。将所有包含 BMV 的制剂在 5℃ 下避光贮存直至使用。

[0129] 以相同的方式,进行包含卡泊三醇的固体脂质纳米颗粒和纳米结构的脂质载体的制备。将卡泊三醇溶解于热油中 (在 NLC 情况中),并将混合物加入到熔融的脂质中。对于 SLN,将卡泊三醇溶解于熔融的脂质中,并将温度保持在 80℃,同时搅拌。将泊洛沙姆 / 水溶液调至 pH8.0,加热至 80℃ 的温度,并加入到熔融的脂质 - 药物混合物中。利用 Silverson Machines Ltd. (Chesham, United Kingdom) 的 Silverson High Speed Mixer L4RT 制备预乳剂。然后,利用 Avestin Inc. (渥太华, ON, 加拿大) 的 EmulsiFlex C5,,将均化器置于 Julabo TW20 水浴 (Seelbach, 德国) 中以保持温度在 80℃,应用 500-800bar 和 3 循环,通过高压匀化而制备 SLN 分散体。一旦冷却,将 SLN 和缓冲剂、防腐剂和稳定剂混合,并将 pH 调至 8.0 或 8.5。当将制剂用卡波姆增稠时,一旦冷却,通过分步加入卡波姆利用 Silverson Machines Ltd. (Chesham, United Kingdom) 的 Silverson High Speed Mixer L4RT 将其完成,然后最后的步骤为调整 pH。

[0130] 制剂的表征

[0131] 在制备之日后 0-3 天进行表征,并在制备后一周内开始体内研究。

[0132] 动态光散射 (DLS)

[0133] 通过 DLS 在装配 633nm 激光和 173° 检测光学的 Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) 上,完成 SLN 的粒度分析。在 25℃ 下,进行样品 ($n=3$) 的测量,测量前将样品用纯净水充分稀释,即将水的粘性用于测量。将 Malvern DTS v5.10 软件用于数据采集和分析。通过多分散性指数 (PdI) 和平均水动力学直径 (Z -平均值) 描述粒度分布。

[0134] 显微镜检查

[0135] 利用来自 DFA Instruments (Glostrup, Denmark) 的装配有 Linkam PE94 加热器的 Nikon Eclipse80i 显微镜,用显微镜检查评价 BMV 在脂质中的溶解度和最终制剂 SLN 和软膏剂的外观。用于采集的软件是 Image Pro Plus 。

[0136] 高压液相色谱 (HPLC)

[0137] 分别通过 HPLC,定量分析 SLN 和软膏剂中 BMV、BDP 和卡泊三醇的含量。

[0138] SLN 和软膏剂的表征

[0139] DLS 分析表明剂量探索研究中测试的四种不同 SLN (仅改变 BMV 的含量) 的平均直径是 179.9 - 193.6nm,具有 0.179-0.216 的 PdI。表面活性剂和脂质浓度的优化以减轻皮肤刺激同时保持小的平均粒度和低的 PdI 表明,采用 2.5%(w/w) 二硬脂酸酯和 0.4%(w/

w) 聚山梨酯 80 其是可行的。具有所述组合物的 SLN 的 Z- 平均值是 205.4nm, 并且 PdI 是 0.228。Z- 平均值和 PdI 值取决于表面活性剂和脂质的浓度。对于脂质的两种浓度, 增加表面活性剂的浓度降低 Z- 平均值和 PdI, 直到某一水平的表面活性剂, 此后粒度不再降低。

[0140] 将 BMV 溶解于 SLN 中的脂质中, 并且利用显微镜在最终制剂中未检测到药物晶体。在软膏剂中, BMV 晶体 ($<25\ \mu\text{m}$) 均匀分布于整个溶媒中。HPLC 分析表明 SLN 和软膏剂中的 BMV 浓度在预期的值, 具有低于 1.4% 的相对标准差 (除了 0.003mg/g SLN, 其中相对偏差是 10.3%)。这说明在两种制剂类型中 BMV 都是均匀分布的和化学上稳定的。

[0141] 实施例 2

[0142] 皮肤穿透研究

[0143] 皮肤样品制备

[0144] 自 Danish Meat Trade College (Roskilde, 丹麦) 从新屠宰的猪中得到猪耳朵。将耳朵贮存在 -20°C 下, 并在 4°C 缓慢解冻后, 利用解剖刀从耳朵背部刮和移出全厚皮肤。用解剖刀仔细除去皮下组织, 并将皮肤切成适当的块后, 在 -20°C 冷却, 直到使用 (不超过 14 天之后)。从每个耳朵得到两块皮肤, 并且对于完整和屏障受损的皮肤而言, 它们是均衡的。

[0145] 通过应用 D-Squame[®] 带盘 (Cuderm Corp., 达拉斯, USA) 进行 25 次连续带剥脱而诱导皮肤屏障损害。用 D-Squame[®] 带施用器 (Cuderm Corp., 达拉斯, USA) 在带上施加 $225\text{g}/\text{cm}^2$ 的压力, 持续 5 秒。用小的大头针将皮肤固定在软木盘上, 拉伸它, 以克服带剥脱时皮沟的问题。该方法改编自 Simonsen 等人, 其创建了模拟 AD 皮肤屏障性质的皮肤模型 [L. Simonsen 和 A Fullerton, Skin Pharmacol. Physiol. 20(5), 2007, 230-236 页]。通过比较新鲜皮肤和解冻皮肤 ($n=6$) 并带剥脱 0、5、15、25 和 40 次的初始研究, 来验证带剥脱新鲜皮肤与冷冻和解冻皮肤的影响。进行钻取活组织检查并固定于 10%(w/w) 的福尔马林中, 接着在显微镜检查前进行苏木精-曙红染色。

[0146] 皮肤穿透和渗透研究

[0147] 评价 BMV 和脂质的穿透模式。将 ^3H - 标记的 BMV 和 ^{14}C - 标记的脂质用于研究 BMV 和脂质颗粒 (二硬脂酸酯和三棕榈酸酯) 向完整皮肤和屏障受损皮肤的穿透。

[0148] 将皮肤安装在 Franz 型扩散池上, 真皮侧朝向接收介质 (扩散面积 3.14cm^2 , 容器体积 10ml, 恒定搅拌, 温度保持在 32°C)。将 1%(w/w) 甲基- β -环糊精在 pH5.5 的等渗醋酸缓冲液 (15mM 乙酸钠, 100mM 氯化钠) 中的溶液用作接收介质。用等渗氯化钠溶液平衡皮肤 30 分钟, 并用接收介质平衡 60 分钟后, 更新接收介质, 并利用药铲在皮肤表面上均匀地施用 20mg 制剂 (6.4mg 制剂 $/\text{cm}^2$)。通过施用之前和之后称量药铲的重量来测定施用制剂的精确量。完成温育后, 分离并分析皮肤。所有研究在完整或屏障受损皮肤上进行, 并且制剂施用时间在 6h、16h 和 24h 间变化。通过在皮肤顶部安装玻璃塞创建封闭, 以确保完全封闭条件。

[0149] 完成施用时间后, 通过用棉垫擦拭皮肤而除去剩余的制剂。用 10ml 乙酸乙酯从棉垫和供体室的盖子萃取 BMV 和脂质。用庚烷:乙醇 (30:70) 从软膏剂萃取 BMV。施用与诱导皮肤损伤时相同的技术, 利用 D-Squame[®] 带盘 (Cuderm Corp., 达拉斯, USA), 通过向完整皮肤施用最多 15 次带剥脱而除去角质层。对于屏障受损皮肤, 仅用最多进行 3 次带剥脱。在两种情况下, 第一个带剥脱条被包括作为剩余制剂。通过采用不同制剂的初步研究和暴露于制剂 24h 小时后, 使用不同数量的带剥脱条的实验结果, 建立除去角质层的方法。

然而,如果分别使用低于 15 或 3 个带剥脱条,表皮开始松弛,则终止带剥脱,并将最后一个剥脱条包括于表皮计数中。通过加热(在 60℃和高湿度下温育 5min)分离表皮和真皮。将环绕施用区域的皮肤(称为未施用皮肤)切成小块并分析,以包括任何侧面穿透和实现完全回收。将 Soluene[®] 350 加入到所述带剥脱条和皮肤样品上,以溶解组织和提取药物和脂质。在 50℃下,温育 24h 后,将 10ml Hionic-Fluor 加入到 Soluene[®] 350 样品中,并在 Packard Instrument Company(Meriden, USA) 的 Tri-Carb2100TR Liquid Scintillation Analyzer 中通过液体闪烁进行分析。在闪烁计数前,通过将 1ml 与 10ml Hionic-Fluor 混合而对来自盖子和棉垫的萃取物,以及接收介质的含量进行分析。将适当的液体(即乙酸乙酯,接收介质,庚烷:乙醇(30:70)和与 Hionic-Fluor 混合的 Soluene[®] 350)用作背景测量。

[0150] 当比较 6h、16h 和 24h 时,将不同皮肤层的 BMV 的量汇集,以考虑以下事实:24h 期间皮肤结构变化,从而分离步骤的效率也可能改变。

[0151] 在 Franz 扩散池中,对完整和屏障受损的猪皮肤进行体外穿透研究,改变 SLN 脂质组分、施用的持续时间和封闭条件的存在,以便评价 SLN 如何影响药物物质进入或穿过皮肤的穿透模式。

[0152] 发现 BMV 与二硬脂酸酯的比率随皮肤深度而增加,即穿透皮肤的 BMV 比穿透皮肤的脂质更多。剩余制剂中的比率是大约 1。在角质层中,其降低到低于 1,并且随后穿过表皮和真皮增加,在接收介质中达到 3.6 的比率。与二硬脂酸酯相比,三棕榈酸酯模式是略微不同的,因为在真皮中可看到 BMV 与脂质比率的降低,并且接收介质中的比率是 2.7,其比二硬脂酸酯的更低。BMV/脂质比率随皮肤深度增加的事实表明脂质颗粒主要保留于皮肤表面或上层中,并且 BMV 从颗粒释放,穿透进皮肤。表 3 显示脂质进入不同皮肤层和接收介质中的穿透数据。存在这样一个趋势,即对于完整和屏障受损皮肤,相比三棕榈酸酯更多的二硬脂酸酯到达表皮。当皮肤由带剥脱造成受损屏障时,可看到到达表皮、真皮和接收介质中的脂质的量增加。在屏障受损皮肤中,与 BMV 穿透增加(~3-60 倍)相比,脂质穿透增加(~3-7 倍)是非常低的,强调 BMV 从纳米颗粒释放,并单独地扩散通过皮肤。

[0153] 在皮肤施用 24h 后,观察到的 SLN 和软膏剂之间的主要不同是 SLN 使显著更高总量的 BMV 保留在完整和屏障受损皮肤的皮肤中(图 1)。当屏障是完整的时,在 SLN 中施用的大量 BMV 被发现于角质层中,并且更少在接收介质中(图 1a)。SLN 使 BMV 更高程度地局限到皮肤的上层,从这里其可扩散到更深的皮肤层,并且很明显,当与软膏剂相比时,SLN 使显著更多的 BMV 更深入地穿透进完整皮肤更深的角质层($p<0.05$)。用棕榈酸鲸蜡基酯 SLN,更多的 BMV 到达表皮。当将 SLN 施用到完整皮肤时,仅可忽略量的 BMV($<0.9\%$)穿透到接收介质中,而施用软膏剂后,显著更多的($8.4\pm 4.0\%$)穿透完整皮肤(图 1a)。施用 SLN 或软膏剂之前,经带剥脱皮肤,BMV 从所有制剂进入接收介质的穿透大大增加($13.8-21.8\%$)(图 3b)。与软膏剂相比,当施用 SLN 时,显著更多的 BMV 保留在屏障受损皮肤中($p<0.05$),但是相似量的 BMV 穿透到接收介质中(图 1b)。与三棕榈酸酯和棕榈酸鲸蜡基酯 SLN 相比,施用二硬脂酸酯 SLN 中的 BMV 后,趋势是更多的 BMV 保留在完整和屏障受损皮肤的角质层中(图 1)。

[0154] 为了更好地理解施用 24h 后得到的结果,将两个其他时间点包括于研究中,即 6h

和 16h。由于 BMV 在该脂质中的更大溶解度,选择二硬脂酸酯进行这些研究。分别施用 6h、16h 和 24h 后,显示当使用软膏剂时(图 2),在所有时间点,显著更少量的 BMV 存在于皮肤中,并且二硬脂酸酯 SLN 的施用导致皮肤中的恒定和显著更高量的 BMV。当以 SLN(图 2b)施用时,对于屏障受损皮肤,渗透到接收介质的 BMV 的量在 24 小时中仅小幅度增加。

[0155] 当施用 SLN 后 24h 立即将皮肤封闭时,与未封闭条件相比,渗透到接收介质的 BMV 的量显著增加,并且皮肤中的量降低(图 3)。经封闭且与完整皮肤相比,对于屏障受损皮肤而言,渗透到接收介质的 BMV 的增加是极高的;当施用二硬脂酸酯 SLN 时,是 $65.6 \pm 15.2\%$ (图 3b)。

[0156] 无毛大鼠中倍他米松二丙酸酯的体内皮肤递送

[0157] 在异氟烷麻醉条件下,将 $100 \mu\text{l}$ 制剂施用到大鼠背上的 $4 \times 3 \text{cm}$ 区域。将大鼠静置 2 分钟(用于使制剂干燥),并将“生物被膜”Optiskin 膜 ($5.3 \times 7.2 \text{cm}$, URG0 laboratories, 法国)施用到所述区域和所述区域的顶部,Fixomull stretch(BSN medical, 德国)。

[0158] 在给药后的不同时间间隔终结大鼠,在该时间点采集皮肤活组织检查和血液样品。终止前,从每个动物收集舌下血液样品。将大鼠用 CO_2 安乐死。从施用的皮肤区域采集皮肤活组织检验样品。将皮肤用浸泡在 99.9% 乙醇中的织物轻轻清洗。将活组织检验样品称重并保持在 -80°C 度,直到定量分析。用 LC-MS/MS 进行定量分析。

[0159] 图 4 说明当与软膏剂相比时,通过以 SLN 向无毛大鼠的皮肤施用,可在皮肤中获得更高水平的倍他米松二丙酸酯(BDP)及其代谢产物倍他米松(BOP)和倍他米松单丙酸酯(BMP),维持更长的一段时间。在第 3 天,实现皮肤中稳定高水平的药物物质,并且第 7 天,药物物质还一定程度地保留在皮肤中,而当以软膏剂施用时,不能检测到药物物质。这些数据证实:当将 SLN 中的皮质类固醇 BMV 施用到完整和屏障受损的猪皮肤时,体外可见的储库作用。

[0160] 实施例 3

[0161] 在鼠异位性皮炎模型中评价作为皮肤递送系统的包含 BMV 的脂质纳米颗粒

[0162] AD 诱导

[0163] 通过反复用 **咪**唑酮激惹而诱导 AD 显型(Man 等人, J. Invest. Dermatol. 128, 2008, 79-86 页)。通过向右耳的各侧施用 $10 \mu\text{l}$ 10.8%(w/v) 的咪唑酮的丙酮溶液(指定为 -7 天)而将小鼠致敏。将对照组在右耳和左耳的两侧用 $10 \mu\text{l}$ 丙酮处理。致敏后 7 天(称为第 0 天),将小鼠用 0.4%(w/v) 的咪唑酮的丙酮溶液进行第一次激惹。更具体地讲,从第 0 天至第 21 天,每隔一天,向小鼠右耳的各侧给药 $10 \mu\text{l}$ 10.4%(w/v) 的 **咪**唑酮。在施用 **咪**唑酮的相同天中,将对照组小鼠仅在左耳和右耳的各侧分别施用 $10 \mu\text{l}$ 丙酮。在第 10 天开始治疗,包括每天一次的治疗方案,直到第 21 天研究结束。测量下面的读数;耳朵厚度、TEWL、细胞因子分析、耳朵皮肤的组织学评价、以及耳朵组织和血清中的 BMV 定量分析。

[0164] 以 SLN 施用 BMV 的剂量探索

[0165] 进行初始研究,以发现 SLN 中 BMV 的剂量反应关系,并确立当将 SLN 的效果与软膏剂比较时要施用的剂量。在该研究中施用 SLN 中的三种不同浓度的 BMV。将小鼠分成包含 4-8 只动物的 8 组(总计 52 只小鼠),包括未诱导 AD 的两组丙酮对照组小鼠($n=4$),并将对照组每天一次用 $10 \mu\text{l}$ 丙酮在右耳和左耳的各侧处理或者每天一次用 $5 \mu\text{l}$ 安慰剂 SLN 在右耳的各侧处理。其它组由患有咪唑酮诱导的 AD 的小鼠构成,并将小鼠在右耳各侧每天一次

用 $10 \mu\text{l}$ 丙酮 ($n=7$)、 $10 \mu\text{l}$ $3.0 \mu\text{g}/\text{耳}/\text{天}$ BMV 的丙酮溶液 ($n=6$)、 $5 \mu\text{l}$ 安慰剂 SLN ($n=7$)、 $5 \mu\text{l}$ $10.030 \mu\text{g}/\text{耳}/\text{天}$ BMV 的 SLN ($n=8$)、 $5 \mu\text{l}$ $11.20 \mu\text{g}/\text{耳}/\text{天}$ ($n=8$) 和 $5 \mu\text{l}$ $12.0 \mu\text{g}/\text{耳}/\text{天}$ BMV 的 SLN ($n=8$) 处理。不处理左耳。

[0166] SLN 和软膏剂的刺激和作用

[0167] 在研究中优化 SLN 组合物,所述研究中评价 SLN 溶媒对鼠耳朵皮肤的刺激作用。具体地讲,评价表面活性剂聚山梨酯 80 的浓度。产生一系列安慰剂制剂,以发现表面活性剂和脂质的最佳水平,其导致大约 200nm 的平均粒度和低的颗粒多分散性 (<0.25)。并且,所述组合物的颗粒应当不对健康鼠耳朵皮肤引起任何刺激作用,并应在脂质混合物中提供足够的 BMV 溶解度 ($>0.012\%(\text{w/w})$)。发现满足这些标准的 SLN 溶媒的组合物是 $2.5\%(\text{w/w})$ 脂质和 $0.4\%(\text{w/w})$ 聚山梨酯 80 (表 1)。该 SLN 制剂的作用与常规石蜡软膏剂是可比的,其还显示对健康鼠耳朵皮肤无刺激。

[0168] 为了比较 SLN 与软膏剂对 BMV 的递送,将 69 只小鼠分成 8 组,每组 4-10 只动物的,其中一组是无 AD 诱导的丙酮对照组 ($n=4$)。其他组中的小鼠都有咪唑酮诱导的 AD,并将它们每天一次在右耳各侧用 $10 \mu\text{l}$ 丙酮 ($n=8$)、 $10 \mu\text{l}$ $3.0 \mu\text{g}/\text{耳}/\text{天}$ 的 BMV 的丙酮溶液 ($n=8$)、 $10 \mu\text{l}$ $11.20 \mu\text{g}/\text{耳}/\text{天}$ BMV 的丙酮溶液 ($n=10$)、 $5 \mu\text{l}$ $11.20 \mu\text{g}/\text{耳}/\text{天}$ 的 BMV 的 SLN ($n=10$)、 $6 \mu\text{g}$ $1.20 \mu\text{g}/\text{耳}/\text{天}$ BMV 的软膏剂 ($n=10$)、 $5 \mu\text{l}$ 安慰剂 SLN ($n=10$) 和 $6 \mu\text{g}$ 安慰剂软膏剂 ($n=9$) 处理。治疗方案在其它方面与剂量探索研究相似。用移液管施用 SLN,并且由于较高的粘度,对于软膏剂使用药铲。表 1 中显示了测试的制剂的组成。

[0169] 耳朵厚度

[0170] 作为皮肤炎症程度的量度,利用 Mitutoyo Americ Co. (Aurora, IL, USA) 的数字测微尺测量右耳和左耳的耳朵厚度,将未处理耳朵的耳朵厚度值作为内部对照。由同一个人完成整个研究中进行的所有测量,以将个体间的测量差异性最小化。在第 10、12、14、17、19 和 21 天施用治疗前,进行测量。

[0171] 经表皮的水丢失 (TEWL)

[0172] 应用 Delfin Technologies Ltd. (Kuopio, 芬兰) 的 Vapometer,将 TEWL 用作皮肤屏障情况的指示。利用直径 4.5mm 的钉接头 (nail adaptor),20s 内在小鼠的右耳上测量 TEWL (每鼠一次)。在剂量探索研究的第 -7、10、14 和 20 天施用治疗前,以及将 SLN 与软膏剂进行比较的研究的第 -7、10、13、17 和 20 天施用治疗前,进行测量。每次 TEWL 测量时,测量实验室的环境相对湿度和温度。

[0173] 终点采样

[0174] 在第 21 天,最后施用制剂后两小时,从所有动物采集血液和右耳。在丙酮对照组,采集两只耳朵。将动物用异氟烷麻醉,并利用毛细管从眼睛采集血液。将血液填充到 2.5ml 的 Vacutainer®管中,并在室温静置 30 分钟,随后在 1000G 和 4°C 下离心 10 分钟。将上清液转移到 1.4ml 无编码的 u-底容积 (bulk) 微电子管中,并在 -80°C 贮存,直至定量药物分析。采集血样后,将动物处死,并用解剖刀割下右耳。利用 Stiefel®活检穿孔器 (Offenbach am Main, 德国),从耳朵中间分离出 8mm 的活组织检品用于组织分析,并且从中采取 3mm 的活组织检品,并在 $10\%(\text{v/v})$ 中性缓冲甲醛中保存。将来自 8mm 组织检品的剩下的耳朵组织切成两等份,将其中一份在分析药物浓度前进行带剥脱,将另一份用于细胞因子分析。两份

都在液氮中立即冷冻,并贮存于 -80°C ,直到进行分析。

[0175] 耳朵组织中的细胞因子水平

[0176] 利用 Bertin Technologies(Montigny-le-Bretonneux,法国)的装配 Cryolys 冷却装置的 Precellys[®] 24 组织匀化器,将耳朵组织在 $200\ \mu\text{l}$ 溶胞缓冲液中匀化。溶胞缓冲液由溶解于 PBS 中的 $1\text{mM}\ \text{Na}_3\text{VO}_4$ 、 $0.4\%(\text{v/v})$ 壬基苯氧基聚乙氧基乙醇 (NP40) 和 Roche Diagnostics(Mannheim,德国)的蛋白酶抑制剂 Complete[™]组成。匀化后,将样品在冰上静置 15-30 分钟的一段时间,然后利用 Ole Dich Instrument makers(Hvidovre,丹麦)的 Microcentrifuge157MP,在 4°C 和 15000G 下,离心 15 分钟。上清液保持于 -80°C ,直到进行 MSD[®] 细胞因子测试。在细胞因子测定前,进行总蛋白浓度的测量,以使样品浓度标准化。其利用 Pierce Biotechnology(Rockford, IL, USA) 的 Pierce[®] BCA Protein Assay 试剂盒完成。将板子在珀金埃尔默 (Skovlunde, 丹麦) 的 VICTOR[™]X3Multilabel Plate Reader 上进行读数。利用 MSD[®] Sector Imager6000(Meso Scale Discovery, 盖瑟斯堡, MD, USA), 用 MSD[®] 小鼠 TH1/TH29-plex multi-spot[®] 96-孔 10 点滴板测量耳朵组织中的细胞因子 IFN- γ 、IL-1- β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-8、IL-10、IL-12 总计和 TNF- α 的具体水平。对于组织应用,优化 MSD[®] 测试。因此,用 $150\ \mu\text{l}$ MSD 校准混合物(calibrator blend)将板子封闭 1 小时,随后,用 $150\ \mu\text{l}\ 10.05\%(\text{v/v})$ 聚山梨酯 20 冲洗 3 次。将 $25\ \mu\text{l}$ 稀释的组织上清液样品加入到板子上,随后在室温下摇动 2 小时。然后,加入 $25\ \mu\text{l}$ SULFO-TAG[™]检测抗体溶液(Meso Scale Discovery, 盖瑟斯堡, MD, USA),并在室温下温育 2 小时。用 $0.05\%(\text{v/v})$ 聚山梨酯 20 重复冲洗 3 次后,最后加入在 MilliQ 水中 1:2 稀释的 $150\ \mu\text{l}$ 读数缓冲液,并在 MSD[®] Sector Imager6000 上读板。

[0177] 耳朵组织和血清中的 BMV 定量分析

[0178] 利用质谱 (MS) 进行血清和组织中 BMV 的定量分析。将 $300\ \mu\text{l}\ 15\text{mg/ml}$ 蛋白酶 K 溶液和 pH8.5 的 $1700\ \mu\text{l}$ 消化缓冲液 (1.58% 氨基丁三醇盐酸盐、 0.029% EDTA、 0.20% 十二烷基硫酸钠、 0.117% 氯化钠) 加入到耳朵组织样品中,随后超声 20 分钟,以匀化样品。将 $50\ \mu\text{L}$ 样品转移到深孔板中,通过加入 $150\ \mu\text{L}$ 包含内标 E01271 (20nM) 的甲醇而诱导沉淀。在 4000rpm 、 10°C , 离心 30 分钟后,分析样品。为了沉淀血清样品中的蛋白质,加入 $100\ \mu\text{l}$ 内标的乙腈溶液。分别将 $20\ \mu\text{l}$ 样品和标准品转移到深孔板中。轻轻摇动后,将板子在 4000rpm 、 10°C , 离心 30 分钟。用 Waters(Milford MA, USA) 的装配 UPLC 的 LC-MS/MS 系统和 Applied Biosystems(卡尔斯巴德, CA, USA) 的 API5000 质谱仪分析样品。将 Analyst(API5000) 和 Waters Acquity 软件用于数据采集和分析。温度是 60°C ,且流速是 0.5ml/min 。使用流动梯度法,变化流动相:在 2.3 分钟期间,0-100%的甲醇:1M 醋酸铵:甲酸:水 ($900:2:0.755:100$) 和甲醇:1M 醋酸铵:甲酸:水 ($50:2:0.755:950$)。对于皮肤样品,将检测限设定为 11.11ng/mg ,对于血清样品,将检测限设定为 0.001ng/ml 。

[0179] 数据分析

[0180] 将所有数据在 Microsoft Excel 或 Graph Pad Prism5.0 中绘图。在 Graph Pad Prism5.0 中完成统计分析。进行单向 ANOVA ($p < 0.05$) 随后是比较平均值的 Newman Keuls 或 Dunnett's 多重比较检验。

[0181] AD 模型验证

[0182] 慢性咪唑酮模型是良好验证和公认的 AD 模型 (Man 等人, 同上)。的确, 我们的动物模型也显示具有良好诱导的 AD 显型。用咪唑酮处理的耳朵的耳朵厚度增加, 而对于仅用丙酮处理的耳朵, 未见耳朵厚度的变化。如预期的, 在咪唑酮致敏小鼠中, 用 BMV 的丙酮溶液处理引起耳朵厚度的显著降低。并且, TEWL 值与证实皮肤炎症和屏障受损的耳朵厚度数据相关。因此, 用咪唑酮处理 10 天, TEWL 值从 $10\text{g}/\text{m}^2\cdot\text{h}$ 增加到 $30\text{--}35\text{g}/\text{m}^2\cdot\text{h}$ 。在咪唑酮致敏组中, 细胞因子表达上调, 而在仅用丙酮处理的小鼠中, 其未受影响。用 BMV 的丙酮溶液治疗后, 在咪唑酮致敏小鼠中, 细胞因子水平下调, 证实局部皮质类固醇治疗的效力。组织学评价还清楚显示咪唑酮致敏小鼠耳朵组织中的显著炎症反应, 相反, 仅用丙酮处理的小鼠的皮肤样品未显示炎症征兆, 而用 BMV 治疗的小鼠的皮肤样品仅显示轻度炎症征兆, 其与药物治疗的效力相关 (数据未显示)。

[0183] SLN 和软膏剂中的 BMV 的相似耳朵厚度减小

[0184] 将耳朵厚度选择为终点之一, 因为它能用作皮肤炎症程度的量度 (Patrick 等人, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 81, 1985, 476-490 页; Young 等人, *J. Invest. Dermatol.* 82, 1984, 367-371 页)。

[0185] 耳朵厚度测量结果表明包含 BMV 的 SLN 和软膏剂引起耳朵厚度的相似且显著 ($P<0.05$) 的降低, 并且, 作用是与 $1.20\text{ }\mu\text{g}/\text{耳朵}/\text{天}$ 的 BMV 的丙酮溶液对照在相同范围内 (图 5a)。这强烈表明 BMV 从 SLN 溶媒释放并穿透皮肤, 以足够产生与软膏剂和丙酮中施用的 BMV 可比较效果的高剂量到达靶细胞。之前, 体外已显示当将 SLN 中的 BMV 施用至猪皮肤时, 在皮肤中且特别是在角质层中保留的药物物质总量比当将 BMV 在软膏剂中施用显著更高, 参见实施例 2。然而, 药物物质从 SLN 释放并穿透角质层而发挥作用是必要的, 这在体内得到证实。

[0186] 在剂量探索研究中, 对耳朵厚度存在清楚的剂量反应作用, 反映为当与未治疗的动物和 SLN 安慰剂组相比时, 施用包含 $1.20\text{ }\mu\text{g}/\text{耳朵}/\text{天}$ 和 $12.0\text{ }\mu\text{g}/\text{耳朵}/\text{天}$ 浓度的 BMV 的 SLN 后, 耳朵厚度显著 ($P<0.05$) 降低 (图 5b)。从用 $0.03\text{ }\mu\text{g}/\text{耳朵}/\text{天}$ SLN 中的 BMV 治疗中未发现疗效。

[0187] 细胞因子水平显示 SLN 和软膏剂中的 BMV 的相似效果

[0188] 已显示用咪唑酮的多重激惹引起皮肤炎症从主要 Th1 主导的反应转变为 Th2 主导反应的移动, 这反映在细胞因子的表达, 其普遍存在于人 AD 中 (Kitagaki 等人, *J. Invest. Dermatol.* 105, 1995, 749-755 页; Kitagaki 等人, *J. Immunol.* 159, 1997, 2484-2491; Matsumoto 等人, *Skin Res. Technol.* 10, 2004, 122-129 页)。

[0189] 在本研究中评价 Th1 和 Th2 产生的细胞因子。在剂量探索研究中, 存在 SLN 中的 BMV 的清楚的剂量反应作用, 即 IL-1 β 、IL-4、IL-8、IL-10 和 IL-12 水平与在 SLN 中施用的 BMV 的剂量成比例的降低 (数据未显示)。不幸地, 用 BMV 治疗后, IL-5 和 TNF- α 的浓度低于检测限, 这是为什么它们不能包括于数据分析中的原因。与丙酮对照相比, 向未被咪唑酮致敏的小鼠施用安慰剂 SLN 后, IL-8 和 IL-12 水平是显著升高, 表明来自 SLN 溶媒的刺激。

[0190] SLN 中的 BMV 与软膏剂中 BMV 的比较显示在两种制剂中, BMV 下调 IL-1 β 、IL-4、IL-8、IL-10 和 IL-12 的水平,这也可见于剂量探索研究中。这例示在图 6a 和 6b 中,其表明细胞因子 IL-4 和 IL-1 β 的下调。对于细胞因子的调节,所述制剂之间无显著差异,表明两种制剂在这方面是同等有效的。应该注意的是,使用安慰剂软膏剂后的细胞因子水平通常比施用安慰剂 SLN 后的细胞因子水平更高,表明相比 SLN,软膏剂溶媒更有刺激性。

[0191] 通过在 SLN 或软膏剂中施用的 BMV 引起的 TEWL

[0192] TEWL 可用作皮肤屏障性质的指示符 (Levin 和 Maibach, J. Contr. Rel. 103, 2005, 291-299 页; Proksch 等人, J. Dermatol. Sci. 43, 2006, 159-169 页; Werner 和 Lindberg, Acta Derm. Venereol. 65, 1985, 102-105 页), 并用于评价施用到皮肤的溶媒的封闭性质 (Loden, Acta Derm. Venereol. 72, 1992, 327-330 页)。将施用 1.20 μ g BMV/耳朵/天的 SLN 与软膏剂比较表明用两种制剂之一治疗将 TEWL 值显著降低到了与对照可比较的水平 (图 7a)。在剂量探索研究中, 仅用 SLN 中的 BMV 1.2 μ g/耳朵/天治疗引起 TEWL 值的显著 ($P < 0.05$) 降低 (图 7b)。与先前用施用至皮肤的 SLN 完成的研究相反 (Jenning 等人, Int. J. Pharm. 199, 2000, 167-177 页; Santos 等人, J. Drug Target. 10, 2002, 489-495 页; Wissing 和 Muller, Eur. J. Pharm. Biopharm. 56, 2003, 67-72 页), TEWL 未显示来自安慰剂 SLN 和安慰剂软膏剂的任何封闭作用。TEWL 仅被包含 BMV 的制剂降低。封闭作用不明显的原因可能是测量在制剂施用后的日子进行。此时, 制剂可能不再以足够引起封闭的高剂量存在于皮肤上, 尤其是由于小鼠连续抓挠和清洁它们的耳朵。因此, 认为施用含 BMV 的制剂后, TEWL 的降低是与 BMV 的疗效相关的, 尤其是血管收缩作用, 其可降低水从皮肤表面的蒸发 (Kolbe 等人, Skin Re. Technol. 7, 2001, 73-77 页)。

[0193] SLN 增加皮肤中 BMV 的量

[0194] 第 21 天最后一次施用两小时后, 分析皮肤和血清中的 BMV 浓度。SLN 与软膏剂的比较表明: 施用 SLN 后 BMV 的皮肤浓度比施用软膏剂中的 BMV 后的显著更高 (5 倍)。对于 SLN、软膏剂和丙酮对照 1.20 μ g/耳朵/天, 血清中 BMV 的浓度是类似的 (图 8)。剂量探索研究表明施用含 BMV 的 SLN 12.0 μ g/耳朵/天和 BMV 的丙酮溶液 3.0 μ g/耳朵/天后, 血清中 BMV 的水平是可比的 (图 8)。然而, 与 BMV 的丙酮溶液 3.0 μ g/耳朵/天相比, 对于含 BMV 的 SLN 12 μ g/耳朵/天而言, 皮肤中的水平是更高的。SLN 0.03 μ g/耳朵/天在血清中不能测量到, 并且非常低水平的 BMV 存在于皮肤中, 说明采用该制剂未发现疗效。

[0195] 耳朵厚度中见到的剂量反应、TEWL 和耳朵组织的细胞因子水平以及施用不同制剂包括对照得到的皮肤浓度表明 BMV 经皮穿透并发挥局部作用。然而, 当小鼠抓挠和清洁其耳朵时口服摄入 BMV 的可能性不能在血清浓度的解释中排除。

[0196] 施用 SLN 后, 皮肤中发现更多的 BMV 的事实可表明与软膏剂相比, SLN 能更牢固地粘附到皮肤并建立皮肤储库。这种作用还可见于当含 BMV 的 SLN 与软膏剂相比时的体外研究, 参见实施例 2。在本研究中, 已表明除使增加量的药物物质保留于任何剩余的角质层和/或有活力表皮中外, 来自 SLN 的药物物质可以产生与常规制剂和丙酮对照相当的效果的程度到达靶位点。相似的结果可见于在鼠 AD 模型中比较 SLN 或油中施用的环孢菌素 A 的作用的另一体内研究。表明 SLN 中的环孢菌素 A 比油中的更有效, 并且采用 SLN, 皮肤角质层中药物物质的量显著增加 (Kim 等人, Pharmazie 64, 2009, 510-514 页)。在湿疹患者中完成的另一项研究表明用掺入到 SLN 中的氯倍他索丙酸酯治疗诱导皮肤储库作用, 并且

与市售乳剂相比,在疗效上是更好的 (Kalariya 等人, Indian J. Exp. Biol., 2005, 233-240 页)。

[0197] 实施例 4

[0198] 除了仅使用完整的猪耳朵皮肤,并且将接收介质换为 4%BSA 外,用实施例 2 中所述的组合物 H、L、J、M、N 进行皮肤穿透和渗透研究。来自这些研究中的数据表明当与乳剂相比时,脂质纳米颗粒能将卡泊三醇保留于角质层中,并且尤其是有活力的皮肤中。此外,当施用脂质纳米颗粒时,非常少量的药物物质渗透皮肤,到达接收介质。

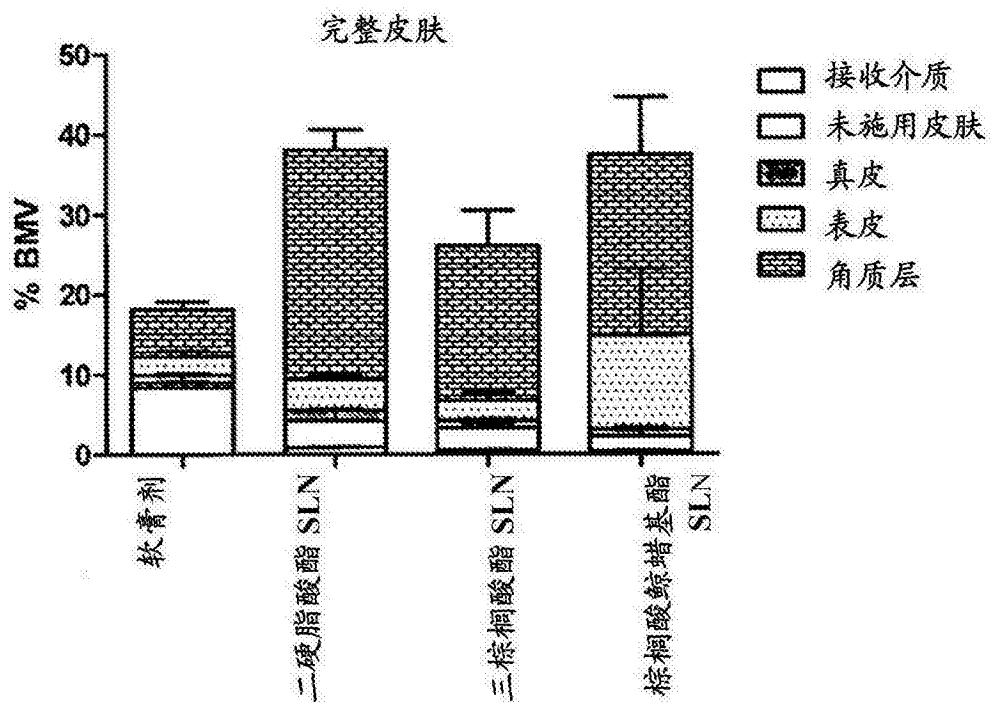


图 1a

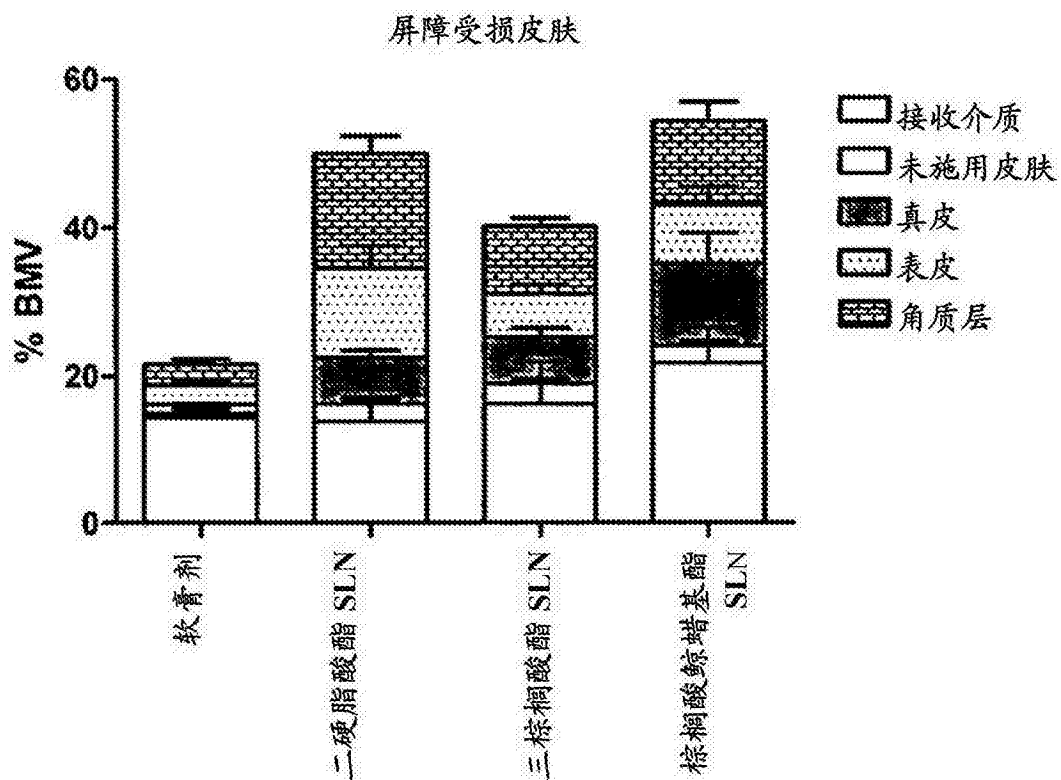


图 1b

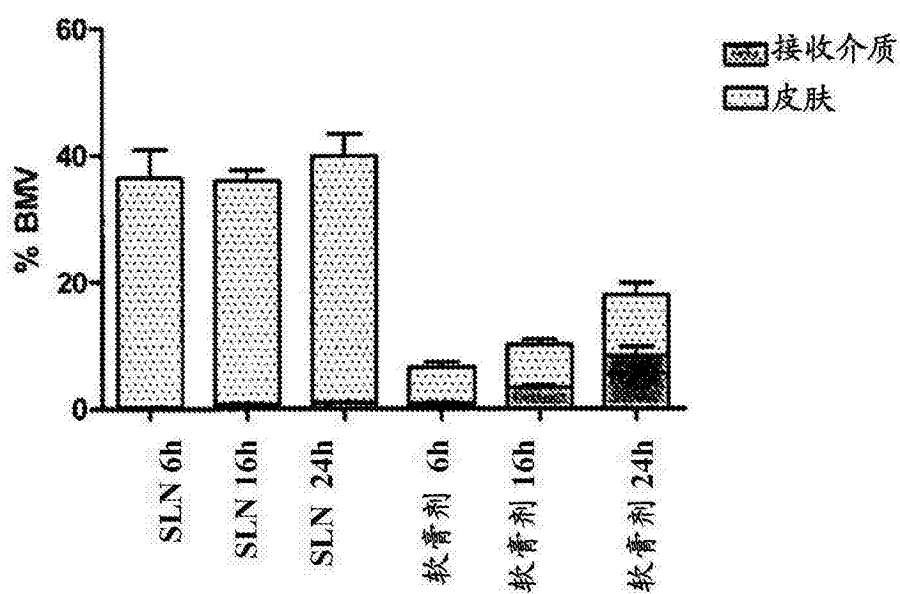


图 2a

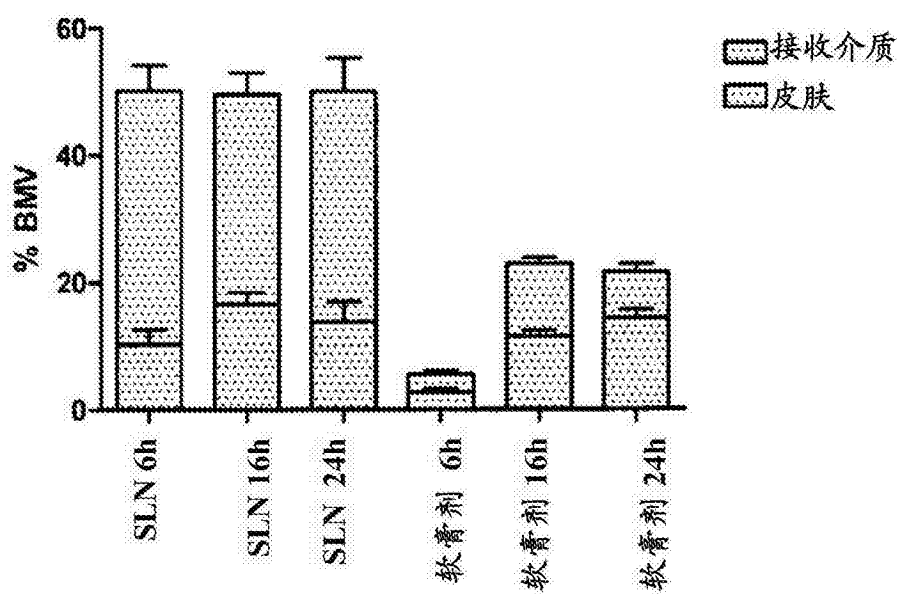


图 2b

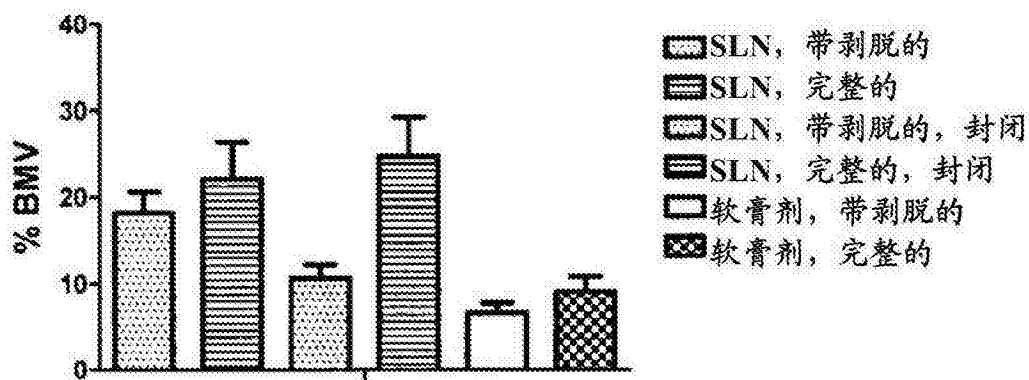


图 3a

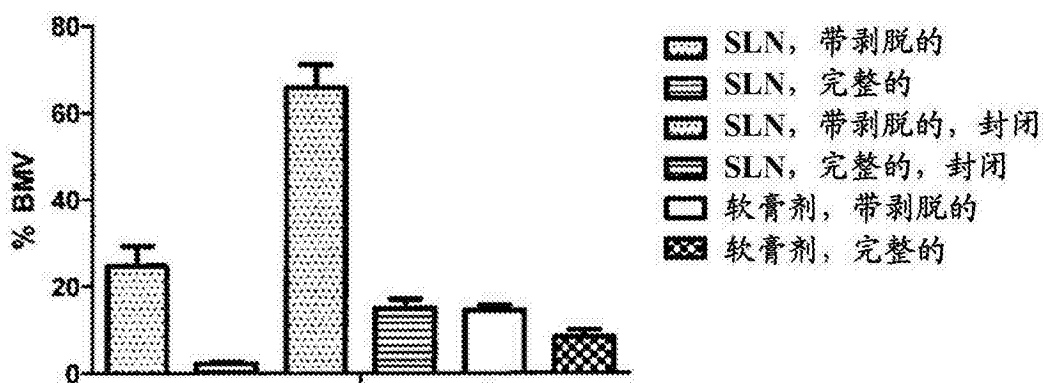


图 3b

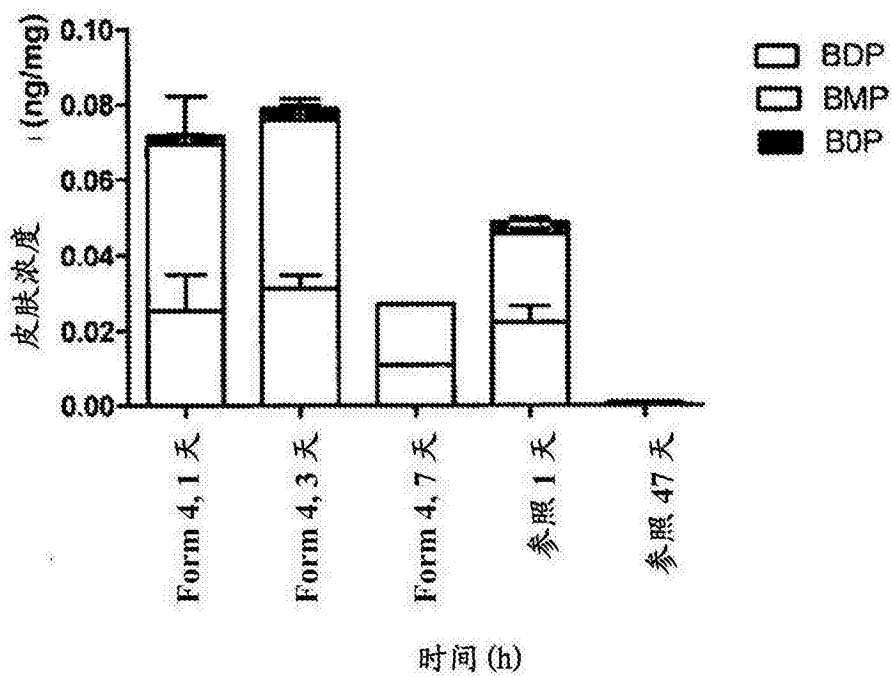


图 4

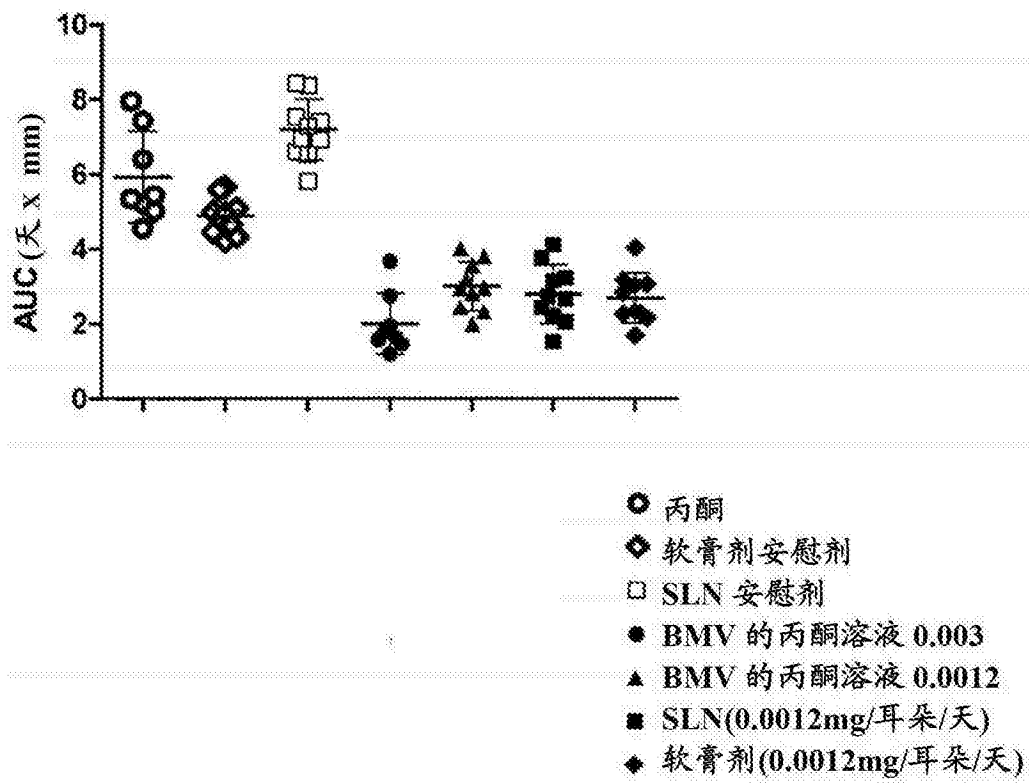


图 5a

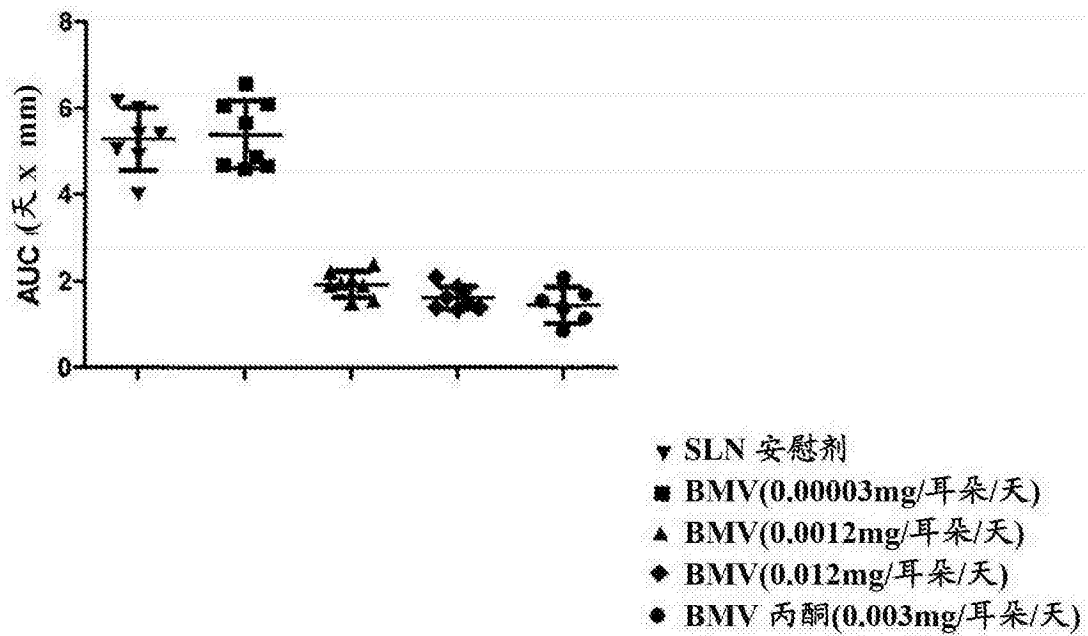


图 5b

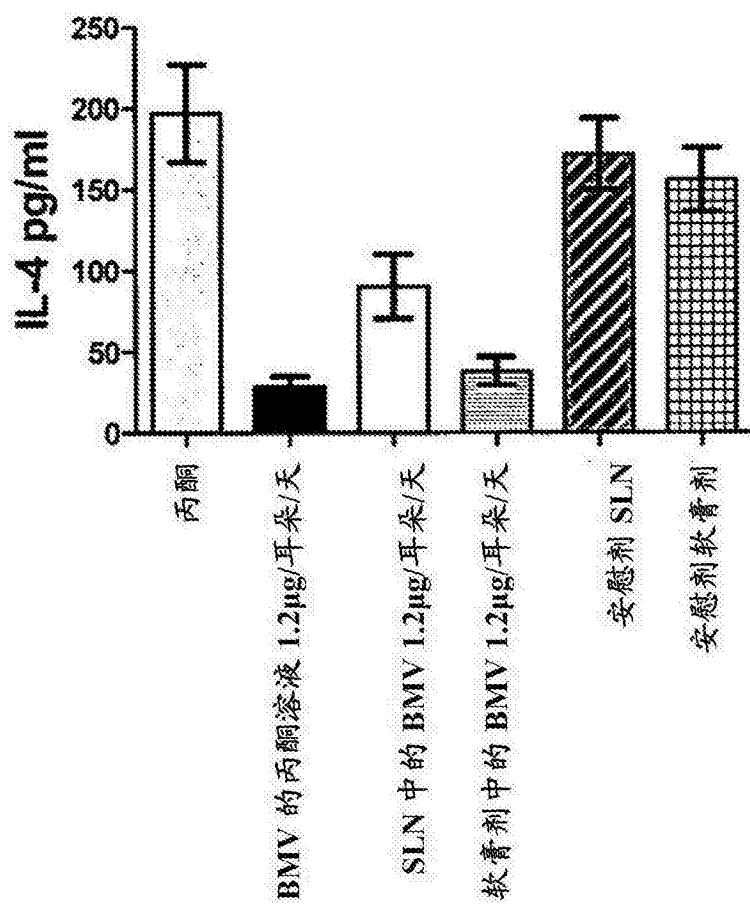


图 6a

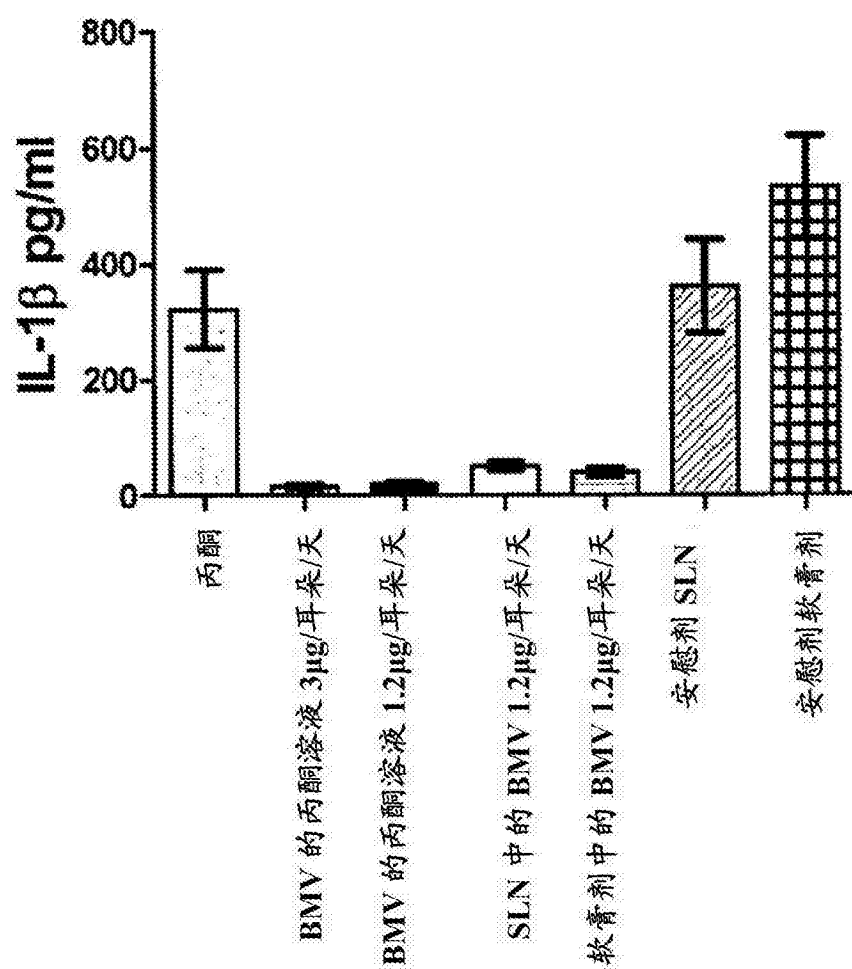
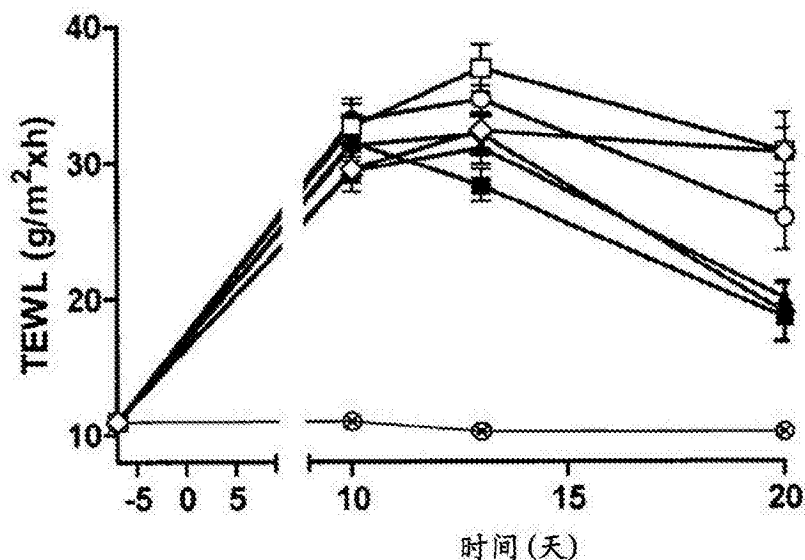
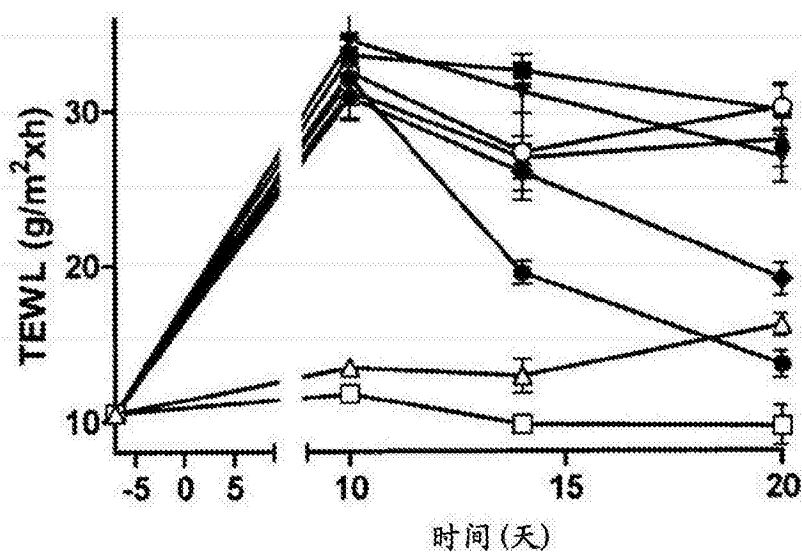


图 6b



将 SLN 与软膏剂比较的研究中的 TEWL 值。⊗ 丙酮(无诱导的 AD), ○ 丙酮(诱导的 AD), ▲ BMV 的丙酮溶液 1.2μg/耳朵/天, ■ SLN 中的 BMV 1.2μg/耳朵/天, ◆ 软膏剂中的 BMV 1.2μg/耳朵/天, □ SLN 安慰剂, ◇ 软膏剂安慰剂。平均值±SEM (n = 4-10)

图 7a



来自剂量探索研究的 TEWL 值。▼ SLN 安慰剂, ○ 丙酮, ■ SLN 中的 BMV 0.03μg/耳朵/天, ▲ SLN 中的 BMV 1.2μg/耳朵/天, ◆ SLN 中的 BMV 12μg/耳朵/天, ● BMV 的丙酮溶液 3μg/耳朵/天, △ SLN (无诱导的 AD), □ 丙酮(无诱导的 AD)。平均值±SEM (n = 4-8)

图 7b

在第 21 天施用治疗后两小时皮肤和血清中 BMV 的浓度。浓度以平均值 $\pm$ SEM 给出。

研究	溶媒	动物数	施用的 BMV $\mu\text{g}/\text{耳朵}/\text{天}$	皮肤 浓度 μM	血清 浓度 μM
剂量探索	丙酮	6	3.0	11.02 ± 2.06	0.015 ± 0.002
剂量探索	SLN	8	0.03	0.11 ± 0.01	-
剂量探索	SLN	8	1.2	1.84 ± 0.31	0.003 ± 0.001
剂量探索	SLN	8	12.0	45.16 ± 3.78	0.017 ± 0.005
作用	丙酮	8	3.0	34.84 ± 2.91	0.035 ± 0.029
作用	丙酮	10	1.2	11.17 ± 0.98	0.016 ± 0.001
作用	SLN	10	1.2	16.47 ± 0.88	0.022 ± 0.007
作用	软膏剂	10	1.2	3.00 ± 0.37	0.011 ± 0.001

图 8