



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101180028 B

(45) 授权公告日 2010.12.08

(21) 申请号 200680017517.5

(22) 申请日 2006.05.05

(30) 优先权数据

RM2005A000248 2005.05.20 IT

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007.11.20

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2006/062088 2006.05.05

(87) PCT申请的公布数据

W02006/122883 EN 2006.11.23

(73) 专利权人 希格马托制药工业公司

地址 意大利罗马

(72) 发明人 C·皮萨诺 L·韦希

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 陈轶兰

(51) Int. Cl.

A61K 31/192 (2006.01)

A61K 8/36 (2006.01)

A61P 17/10 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1537094 A, 2004.10.13, 实施例 20.

CASSANO N. STUDIO MULTICENTRICO IN

APERTO SULTRATTAMENTO DELL' ACNE LIEVE/

MODERATA CONADAPALENE IN MONOTERAPIA O

IN TERAPIACOMBINATA TREATMENT OF MILD

TO MODERATEACNE VULGARIS WITH ADAPALENE

ALONE ORCOMBINED WITH OTHER ANTI-ACNE

AGENTS. AMULTICENTER OPEN TRIAL. 《MINERVA

DERMATOLOGICA》Vol 137 no 5. 2002, Vol

137(no 5), 369-375.

审查员 王海鹏

权利要求书 1 页 说明书 12 页 附图 1 页

(54) 发明名称

金刚烷基甲氧基二苯基丙烯酸用于治疗痤疮
的用途

(57) 摘要

本发明描述了属于非典型类维生素 A 类别的
物质用于局部治疗痤疮的用途。尤其是展示了含
有经调配在凝胶中的金刚烷基甲氧基二苯基丙
烯酸的局部用药学或化妆品组合物对于此皮肤疾
病的动物模型的作用。

1. 金刚烷基甲氧基二苯基丙烯酸用于制备局部使用以治疗痤疮的药学或化妆品组合物的用途。

2. 根据权利要求 1 的用途,其中所述组合物呈凝胶形式。

3. 根据权利要求 1 或 2 的用途,其中所述组合物含有卵磷脂。

4. 根据权利要求 2 的用途,每 100 毫克凝胶含有 0.1 毫克金刚烷基甲氧基二苯基丙烯酸。

5. 局部使用以治疗痤疮的药学或化妆品组合物,其含有金刚烷基甲氧基二苯基丙烯酸作为活性成分,以及其它赋形剂和 / 或药学上可接受的载体,所述组合物呈凝胶形式。

6. 根据权利要求 5 的组合物,含有卵磷脂作为载体或赋形剂。

7. 根据权利要求 5 的组合物,每 100 毫克凝胶含有 0.1 毫克金刚烷基甲氧基二苯基丙烯酸。

金刚烷基甲氧基二苯基丙烯酸用于治疗痤疮的用途

发明领域

[0001] 在此描述的发明涉及属于非典型类维生素 A(atypicalretinoids) 类别的物质用于局部治疗痤疮的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 痤疮是一种常发生在青春期的多功能的疾病,其有时候会自然痊愈,但更常要花一段长时间且需要使用化学物质诸如过氧化苯甲酰、类维生素 A、抗生素和抗雄激素剂予以特异性地局部或全身治疗。令人遗憾的是,某些这类产品可能产生副作用诸如皮肤发红、干燥和过敏反应。再者,治疗痤疮和其他皮肤病的一项基本问题在于要穿透表皮层,表皮层代表着对药物进入的天然生理屏障。为了确实获得局部药理学作用,通过施用经调配在用作载体的软膏、乳膏或凝胶内的活性成分进行局部应用。

[0004] 卵磷脂 - 一种天然来源的磷脂 - 在某些化妆品或药制剂中用作为主要成分或作为乳化剂。除了结构上的功能外,其功能可为将活性成分载送到皮肤内。事实上,卵磷脂(磷脂酰胆碱)与细胞膜的脂质成分之间的化学类似性提示,基于卵磷脂的载体可为身体充分耐受且同时又可增强药理学作用(Scartazzini 和 Luisi,1988J. Physiol. Chem. 91, 823-833)。

[0005] 术语“痤疮”(来自希腊语 akni :皮疹)描述在青春期出现的毛囊病损,其与皮脂溢和粉刺形成相关联。它是极常见的疾病,于可变程度上,影响约 90% 青少年,但其中只有 10% 需要医学干预且后者中只有 1% 造成难以解决的临床问题。

[0006] 痤疮为毛囊皮脂腺器的慢性炎症,其呈现为多种方式,作为粉刺、脓疱、结节、囊肿和疤痕。在外观、过程,发病年龄和部位方面存在许多临床变化形式。最常见的形式为少年痤疮,其在青春期出现且自发地在约 25 岁消退,尽管其可能在以后出现,在 30 岁后复发和消退(Kraning 等人,1979J. Invest. Dermatol. 73,395-401)。

[0007] 发病通常在发育年龄期间,典型皮损为:粉刺、丘疹、结节和囊肿。粉刺为因皮脂肿胀的毛囊,常称为“白头”(毛囊孔被封闭时)和“黑头”(毛囊孔开放时);它们较常分布于鼻子上及其周围,前额,耳朵及其附近,以及下巴上。丘疹为粉刺的炎性并发症且显现为多种不同大小的发红凸起区域。它们会持续数天而后消失无痕迹。脓疱为黄色的病损,形状为半球形且充满脓,覆盖在丘疹顶部上。它们会持续 2 至 3 天,朝外排出并形成结痂。结节为大的固体形成结构,常有压痛、系由炎性浸润所产生。囊肿为充满脓的大凸起区域,碰触非常疼痛,其保持不变达数周,且不同于其他痤疮病损,它可容易地转变成疤痕,这些是痤疮所造成的不美观且有时候会毁损面容的永久性后果。

[0008] 痤疮的发病机理中涉及的主要致病因素为:(1) 皮脂过度分泌;2) 毛囊角化过度;3) 毛囊中的细菌定植;4) 炎性过程的起始。痤疮患者比对照者分泌更多的皮脂且此因素似乎与痤疮的严重性相关联。皮脂腺的发育和分泌活性受到睾丸、卵巢和肾上腺产生的雄激素性激素的控制。

[0009] 睾酮会影响皮脂腺的增殖活性,皮脂腺具有对这些激素有高亲和性的受体且还具有酶 5- α -还原酶,该酶能够将睾酮转化为其生物活性部分 - 二氢睾酮。所述激素因子参

与女性经前期的周期性痤疮突发。

[0010] 毛囊过度角化是发生痤疮病损的基础事件且部分系由增加的表皮增殖及部分系由角质细胞延迟脱落所致。其结果为毛囊壁增厚,堵塞皮脂排出,随即皮脂淤积而形成粉刺。在这些条件下,一种厌氧性细菌-痤疮丙酸杆菌 (*Propionibacterium Acnes*) 易于发展和增殖 (Strauss 等人,1974J. Invest. Dermatol. 62,321-325 ;Harris 等人,1983J. Am. Acad. Dermatol, 8,200-203),产生具有刺激性和粉刺产生能力的游离脂肪酸,刺激免疫应答。最后,由于生物活性物质从毛囊皮脂腺导管通到真皮而导致炎症。可用的治疗可分成角质溶解性治疗和抑菌性治疗,其分别涉及细胞重建和抗菌作用。

[0011] 治疗策略取决于病症的严重性。对于中等或中度形式的痤疮,优选局部用的药物。最常见的乳膏为基于过氧化苯甲酰的那些,其可使着药点干燥并阻断感染。

[0012] 现今有三种局部治疗可用于痤疮。它们基于不同的作用机制 ;类维生素 A ;粉刺分解剂,其可减缓脱皮过程以减少粉刺和微小粉刺的数目 ;抗生素,其具有杀菌活性,经由直接杀死粉刺丙酸杆菌形式而产生作用,也对粉刺产生具有轻微的间接作用 ;联合疗法,使用类维生素 A 和局部抗生素两者,用于同时有粉刺性病损和炎性病损的患有严重形式痤疮的患者。

[0013] 对于不是特别严重的痤疮现象,蕾婷 A(Retin-A),也称为维甲酸 (tretinoin),是一种直接应用于皮肤的抗粉刺剂。其呈洗液或乳膏形式,作用为角质溶解,亦即其可恢复正常的角蛋白形成过程及防止粉刺 (黑头) 的形成。

[0014] 皮肤病学领域对于新疗法的研究一直在进展。现今可用到的最新一代疗法如下 :

[0015] 1. 他札罗汀,一种合成产物,其可与维生素 A 受体特异性地相互作用。除了对痤疮,其也可有效地治疗牛皮癣。

[0016] 2. 壬二酸在欧洲研究中产生了替代性结果且其特征在于广谱的双重作用 (抗微生物作用和角质化作用) ;其事实上也用于皮肤色素沉着过度的病例中 (Graupe 等人,1996, Cutis 57,20-35) ;和

[0017] 3. 阿达帕林,一种具有类维生素 A 活性的萘甲酸衍生物。这是一种具有角质化作用的细胞分化调节剂,有效且刺激性小于视黄酸。其以商品名达芙文 (Differin_) 上市,用于对其中粉刺、丘疹和脓疱为主的寻常痤疮的局部治疗。

[0018] 国际专利申请 W003/011808 描述了新一类定义为非典型视黄酸的化合物,其据称具有抗肿瘤用途。该申请中描述的化合物包括金刚烷基甲氧基二苯基丙烯酸 (ST1898)。

[0019] 发明描述

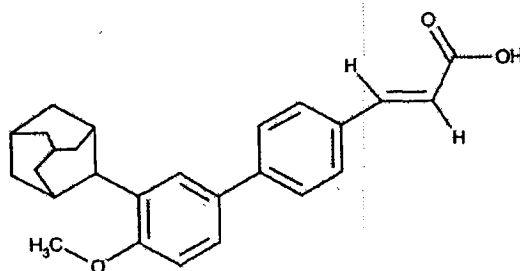
[0020] 本发明的主要目的涉及以下发现,即金刚烷基甲氧基二苯基丙烯酸在用为痤疮的参照的动物模型中具有抗痤疮活性。

[0021] 这种粉刺化解活性不能预见,因为在属于相同化学类别的物质 (丙烯酸的金刚烷基二苯基系衍生物) 上缺乏明确的结构参照。

[0022] 本发明的主要目的因而为金刚烷基甲氧基二苯基丙烯酸在制备局部使用以治疗痤疮的药学或化妆品组合物中的用途。

[0023] 此化合物的结构式如下 :

[0024]



[0025] 此化合物的化学合成记载于国际专利申请 WO 03/011808 中（特别参见实施例 20）。

[0026] 本发明的另一目的为用于痤疮局部治疗的药学或化妆品组合物，其含有金刚烷基甲氧基二苯基丙烯酸作为活性成分，连同其他赋形剂和 / 或药学上可接受的载体。

[0027] 术语“药学上可接受”意指为药典（欧洲、英国或美国）所认可用于动物应用，尤其是人类应用。

[0028] 这些赋形剂的实例为：葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、酰胺、硬脂酸盐类、单硬脂酸酯类、棕榈酸酯类、甘油、水、乙醇、脂质、磷脂、缓冲剂诸如磷酸二氢钠或铵盐、它们的混合物等等。

[0029] 赋形剂或载体的其他实例记载于 E. Martin 的“Remington's Pharmaceutical Sciences”。

[0030] 本发明的组合物可调配成为乳膏、软膏、凝胶、泡沫、喷雾溶液或持续释放性贴片的形式。本发明的组合物优选呈凝胶形式。

[0031] 更优选，本发明的组合物为卵磷脂凝胶，诸如 Epikuron 200™，其为经纯化的大豆卵磷脂，亦即通过柱色谱法从大豆种子纯化的供制药工业所用的蜡状磷脂酰胆碱（纯度大于 92%）。

[0032] 在本发明组合物中的活性成分含量可以根据本专利申请中所报道的实施例及后续临床试验而容易地计算出。本发明的组合物优选含有 0.1 毫克活性成分 / 100 毫克卵磷脂凝胶。

[0033] 本发明将以下面的实施例予以示范说明，但这些实施例对本发明范围不具限制性。

附图说明

[0034] 图 1 显示用 ST1898（制剂 1）局部治疗对犀鼠（rhino mice）皮肤的作用。该治疗对于小囊 / 假粉刺的数目、尺寸和角质含量的减少以及对皮脂腺的形态（变得更萎缩，图中箭头所示）都有显著的作用。与未经处理的小鼠（A）相比，表皮的增生（B）也特别清楚。再者，经处理的犀鼠的皮肤表现出在毛囊的退化期中的缺陷，包括到生命第 6 周毛发的完全丧失和发生所谓的小囊 / 假粉刺（图 1 中的 C），其代表在组织学上类似于“滞留型”痤疮病损的开放粉刺的模型。犀鼠的皮肤还具有皮脂腺萎缩（图 1 中的箭头）和在真皮深部中存在囊肿（图 1 中的星号，仅部分可见，因图像只显示出皮肤的最浅表部分）的特征。

[0035] 实施例

[0036] 实施例 1. 有机凝胶的制备和表征

[0037] 使用下列物质于随后的制备中：卵磷脂、大豆种子提取物（Epikuron 200™），棕榈

酸异丙酯、抗坏血酸、钼酸铵、碘晶体、磷酸四甲铵、脱色碳和磷酸二氢钠。此外,还用到氯仿、二氯甲烷、甲醇、乙醇、二甲亚砜 (DMSO) 及氨水溶液 (30%)。

[0038] 参比用脂质 POPC(1- 棕榈酰 -2- 油酰 -sn- 甘油 -3- 磷脂酰胆碱) 获自 Avanti Polar Lipids(Canada) 且不经进一步纯化即使用。

[0039] 活性成分金刚烷基甲氧基二苯基丙烯酸 (ST1898) 由 Sigma-Tau (Pomezia, Rome) 合成及纯化。

[0040] 凝胶制备法

[0041] 卵磷脂溶液如下制备:将卵磷脂经由在 40-50℃磁搅拌数分钟或数小时而溶解在棕榈酸异丙酯 (IPP) 中,时间取决于卵磷脂的重量百分比。每一溶剂-卵磷脂体系在添加少量水后产生凝胶,水量通常表示为 w_0 ,根据方程式 1 指示水与卵磷脂之间的摩尔比:

$$[0042] \quad w_0 = \frac{[H_2O]}{[\text{卵磷脂}]} \text{ 方程式 1}$$

[0043] 当水完全分散在有机相中时即形成凝胶,该现象通常取决于卵磷脂浓度、磁搅拌及所用溶剂的性质。在本研究所用条件下,卵磷脂/IPP 溶液的凝胶化以从数秒钟至数分钟的时间间隔发生。

[0044] 实施例 2. ST1898 组合物-制剂 1 的制备

[0045] 调配在凝胶相中的 ST1898 的制备

[0046] 将所需量的 ST1898 和 Epikuron 200 卵磷脂溶解在 IPP 中 (ST1898 :0.1%, 卵磷脂 :47%, IPP :52.9%),将该溶液置于 60-70℃温度下磁搅拌持续完全溶解所需时间 (2-12 小时,取决于卵磷脂浓度)。

[0047] 所有成分,包括溶剂 IPP,都是以称重方式计量。出于实用理由(药物的完全溶解),可先制备卵磷脂/IPP 溶液,再用此有机相溶解药物。只有在此步骤后,才加入胶凝所需量的水。鉴于类维生素 A 的光敏感性,用铝箔覆盖使容器避光。在溶液不立即变均匀的情况中,可予温和照射。使用 Hamilton 微型注射器添加的水的体积根据方程式 2 计算出:

$$[0048] \quad V_{H_2O}(\text{毫升}) = \frac{m_{EP200}(\text{克})}{760} \times 18 \times w_0 \text{ 方程式 2}$$

[0049] 其中 V_{H_2O} 表示要加入的水的体积(毫升), m_{EP200} 为 Epikuron200 卵磷脂的量(克)且 w_0 为期望的水对卵磷脂的摩尔比(参见方程式 1)。

[0050] 实施例 3. 分析程序

[0051] 紫外-可见光分析

[0052] 使用紫外-可见光分光光度法定量表征溶于溶剂 DMSO 中的和掺入卵磷脂/IPP 凝胶相中的类维生素 A ST1898,其中使用二极管阵列分光光度计 (Agilent HP8452A),分辨率 2nm,采用 1cm 石英吸光皿。鉴于材料的高粘度,将含有类维生素 A ST1898 的有机凝胶转移到吸光皿需要升高温度(约 60℃),接着予以冷却以进行分析。

[0053] HPLC 分析

[0054] 对于溶解在 DMSO 中及掺入到凝胶相中的类维生素 A ST1898 所作的 HPLC 分析采用 HPLC HP1050 仪器 (Agilent) 进行,其装设紫外-可见光二极管阵列检测器及 HP ChemStation 软件。药物定量分析程序包括在反相 Nucleosyl C18 柱 (3 微米粒子尺寸, 125×4 毫米) 上进行等度洗脱(甲醇/水,体积比 80/20,含 0.2% TFA),流速为 1.5 毫升

/ 分钟,注射体积等于 5 微升(在这些条件下,记录到约 140 巴的稳定压力)。通过分光光度测定法使用吸光度(330nm)进行检测。典型条件为注射 5 微升 ST1898 的 DMSO 溶液。所观察到的保留时间等于约 8 分钟。

[0055] 对掺入到卵磷脂/IPP 凝胶相中的药物 ST1898 的分析需要用氯仿预先稀释以减低基质的粘度,使其可被注射到色谱柱中。在最大溶解度测定阶段中,在采取要分析的样品之前,使用离心处理。洗脱条件类似于上面所报道的条件,不过洗脱剂流速根据卵磷脂浓度予以优化(如:1.5 毫升/分钟)。

[0056] 典型条件用以注射在氯仿中适当稀释的在 Epikuron 200 卵磷脂 42% w/w(约 800mM) 在 IPP 中的有机凝胶($w_0 = 3$) 中的 ST1898 0.2% w/w。经由 HPLC 以荧光分光光度法检测而进行定量测定

[0057] 该分析采用 HPLC 设备(System Gold,Beckham) 进行,其装设有荧光检测器($\lambda_{ex} = 330nm$, $\lambda_{em} = 475nm$),在反相 Lichrospher 100 C18 柱(5 微米粒子尺寸,125×4 毫米)上进行等度洗脱(甲醇/水,体积比 80/20,含 0.2% TFA);流速为 1.0 毫升/分钟;注射体积等于 10 微升。典型条件包括注射 10 微升 ST1898 的 THF 溶液。所观测到的保留时间等于约 16.5 分钟。

[0058] 实施例 4. ST1898(制剂 1) 对于小鼠表皮假粉刺的粉刺消解作用研究中所用的动物模型

[0059] 小鼠($hr^{rh}hr^{rh}$) 是一种无毛等位基因小鼠且为非炎性痤疮的实验动物模型。在该动物中,在首次覆毛后,退化期中的错误导致在 4 周龄时过早的且不可逆的脱毛。毛囊不能自我重建。取而代之的是,原毛囊单位的下部发展成为角质产生性囊肿,其随著动物年龄增长变成永久地位于深层真皮内并扩大。同时,原始的毛管(原毛囊单元的上部)会转变成成为安瓿形腔或囊。这些囊都填充着角质细胞和皮脂且因角质物质的产生和蓄积而进行性变大。在组织学上,它们类似典型的滞留型痤疮性病损或粉刺。不过,它们是肉眼看不到的且不能在手指之间挤出。如同在人类痤疮中,随着囊的形成与扩大,皮脂腺渐进性缩小。最后,小鼠的皮肤会因为弹性纤维的缺乏而出现松垂和赘余。所以,成年小鼠的皮肤的特征在于源自原始毛囊单位的漏斗状区的囊。这些在组织学上类似于滞留型痤疮病损,即微型粉刺。所以,在过去 30 年内,在体内方案中使用小鼠,旨在测试新药物(经由局部施用,较小程度地全身性施用)治疗痤疮的粉刺消解活性。

[0060] 多种抗痤疮药,特别是局部施用的类维生素 A,对于小鼠皮肤的粉刺消解效用系最初在 70 年代报道,使用定性式组织学方法显示出:1) 在带有完全发育的皮脂腺的短、窄、非过度增生的毛囊管中,部分小囊/粉刺的转变现象;2) 部分小囊的完全退化,留下长段的正常外观的表皮;3) 表皮厚度的增加;4) 对深部真皮囊肿没有影响。这些改变在以类维生素 A(如,全反式视黄酸或阿达帕林)局部处理一周后开始出现且在 3 周后达到最大。

[0061] 目前,在局部粉刺消解剂的筛选中用于评估和衡量其粉刺消解活性的最广泛使用的技术为对从在三周治疗期结束时获得的皮肤活检取得的皮肤切片进行定量组织学图像分析。有数种显微测量指标可用来计算下列参数:每厘米角质层长度的表皮小囊(粉刺)总数,粉刺轮廓(此可得到粉刺形态学方面的衡量,亦即安瓿形相对于窄形),以及表皮厚度。

[0062] 根据导致本发明的研究,将由 Charles River Italy S.p.A. 供给的 5-6 周龄、体

重 18-22 克（在实验开始时）的雄性小鼠（RHJ/LeJ）（批号 No. 2004256, 在 28/07/2004 出生）及雌性小鼠（批号 No. 2004257, 8 只在 11/08/2004 出生而 7 只在 21/07/2004 出生）圈养在 makrolon 笼子（26.7×20.7×14 厘米大小）内；每一笼子一只鼠；笼子上具有带过滤器的塑胶盖及在一层无菌锯屑上的栅格。

[0063] 食物和水都是自由取用。在整个研究持续期间每一只鼠的每日饮食包括饲料（GLP-4RF21, 由 Mucedola 公司所供应）。动物的食物和饮水的分析鉴定证明保存在 Sigma-Tau 处。

[0064] 动物在 12 小时光照 / 黑暗周期（7.00-19.00 照光）中饲养。

[0065] 动物房参数设定如下：温度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ，相对湿度等于 $55 \pm 15\%$ ，空气过滤器每 15-20 小时更换。

[0066] 监测环境条件且将数据保存在动物饲养档案中。

[0067] 形成两组，每组 6 只动物。

[0068] 在 Sigma-Tau 实验室中使用动物的授权得自卫生部。动物的管理和使用都是按照 European Directives No. 86/609 及 Italian Regulatory system (Legislative Decree No. 116, Art. 6, 1992 年 1 月 27 日)。有关动物处理的研究的每一部分都经 Sigma-Tau 的兽医学部所批准。

[0069] 随机化

[0070] 动物饲养员将小鼠从盒子随机地转移到笼子内。然后将每一笼子用一卡片标记以识别处理类型（所用物质、剂量、施用途径及动物识别号码）。

[0071] 处理

[0072] 对动物经由在 3 周期间（于 Sigma-Tau 实验室）每周连续 5 天每天一次使用 50 微升体积的微型吸管将试验化合物局部施用到背部 45 秒而予以处理。所应用的产物为：在载体中的 ST1898 0.1%（制剂 1:Epikuron200 卵磷脂, 46.9% w/w（约 800mM）在棕榈酸异丙酯中的有机凝胶, $w_0 = 3$ ），和未处理的动物。

[0073] 记录类型与频率

[0074] 每天在处理之前和之后，精确地观察动物，特别注意其行为及局部和总体征象，核验及记录任何死亡事件。此外，在每次使用试验化合物和用载体处理之前对所有动物称重。

[0075] 组织活检

[0076] 自处理结束三天后，经由颈脱位法杀死每一小鼠，且从动物背部去除毛发。对处理区域用 6 毫米打孔器取活检，固定在 10% 缓冲福尔马林中且包埋于石蜡中（在 Sigma-Tau 实验室固定并通过 70% 乙醇，在 BMC Laboratory, IDI 埋置于石蜡中）。从每一活检取得 3 个切片，各 3 微米厚且相隔 150 微米，并用苏木素 - 伊红染料予以染色。

[0077] 组织学检查与图像分析

[0078] 使用 KS300.3 显微镜 (Zeiss, Jena, Germany)，以 20x 放大倍数，进行形态学分析及下列参数的定量显微镜评估：

[0079] 每单位长度（厘米）角质层的小囊 / 假粉刺的数目；

[0080] 小囊 / 假粉刺的最大直径 (D)；

[0081] 小囊 / 假粉刺的孔径 (d)；

[0082] 毛囊间表皮面积 (S) 及相同区域中表皮基底层长度 (L)。

[0083] 将粉刺的轮廓表示为 $r = d/D$ 且将表皮的厚度表示为 S/L (微米)。数据评估

[0084] 所得数据的统计学分析,更精确地说,得自每一不同动物组的数据之间的比较,使用对非配对数据的非参数性 Mann-Whitney 检验而进行。

[0085] 使用此调配凝胶(制剂 1-ST18980.1%于卵磷脂/IPP 47/53(重量/重量)中; $w_0 = 3$)进行体内试验,可证明该物质对豚鼠局部处理之后的强效粉刺消解活性。

[0086] 结果:ST1898(制剂 1)和阿达帕林对豚鼠表皮小囊/假粉刺的抗粉刺作用

[0087] 从文献已知类维生素 A 诱导粉刺消解和表皮增厚的能力,所述作用是由于豚鼠皮肤中表皮细胞的过度增殖(或增生)(Kligman L.H. 和 Kligman A.M.,1979J. Invest. Dermatol. 73,354-8;Mezick 等人,1984J. Am. Acad. Dermatol. 11,902-4;Ashton 等人,1984 J. Invest. Dermatol. 82,632-5)。

[0088] 此研究计划中使用的体内模型为豚鼠($hr^{rh}hr^{rh}$),其为无毛小鼠等位基因型($hr^{hr}hr^{hr}$)且代表非炎性痤疮的实验动物模型。此模型用于评估经局部施用及全身性施用的抗痤疮化合物的治疗效力(特别是粉刺消解效力)已有 20 年以上。豚鼠表现出多种皮肤变化,包括毛囊退化期中的缺陷,包括到生命第六周毛发完全丧失及发生所谓的小囊/假粉刺(图 1 中的 C),其代表在组织学上类似于“滞留型”痤疮病损的开放粉刺的模型。豚鼠的皮肤还具有皮脂腺萎缩(图 1 中箭头)及在真皮深部存在囊肿(图 1 中星号,只有部分可看到,因该图像只显示出皮肤最浅表的部分)的特征。

[0089] 经局部应用的 ST1898(制剂 1)对治疗痤疮具有药理学上有用的特征,其具有粉刺消解作用及抗炎作用且可导致粉刺数目的减少。ST1898 因而可充当在痤疮病理学中大大改变的角质化和炎症的细胞分化过程的调节剂(图 1)。

[0090] 如从图 1 可见,使用 ST1898(制剂))局部处理豚鼠的皮肤对于小囊/假粉刺的数目、尺寸和角质含量的减少(表 1),及对皮脂腺的形态(变得更萎缩)(图中箭头)都有非常显著的影向。与未处理小鼠(A)相比表皮的增生也特别清楚(B)。

[0091] 表 1. 对雄性和雌性豚鼠皮肤图像的表皮参数的分析

[0092]

处理	数目	粉刺 ^a (厘米)	粉刺轮廓($r =$	厚度(微米)
未处理	6	2 7.8±	0.6 5±	23.5±
ST18980.1%	6	**7.5±	**1.01±	**82.7±

[0093] 数据皆为平均值 ±SD

[0094] * $p < 0.05$ 及 ** $p < 0.01$ 相对于未处理组(Mann-Whitney)

[0095] ^a 每单位长度(表示为厘米)角质层的粉刺数目

[0096] 与药物在局部治疗痤疮后的粉刺消解作用直接相关联的参数为 r (表 1)(Mezick 等人,1984 J. Am. Acad. Dermatol. 11,902-4;Bouclier 等人,1991 Skin Pharmacol. 4, 65-73):若 r 等于或大于 1,则试验化合物具有由典型痤疮病损数目减少所证实的粉刺消解效用。

[0097] 与由未处理小鼠组所代表的对照相比,可以看出此参数值被 ST1898(制剂 1)所改变,其产生从封闭性粉刺到开放粉刺的变化, r 值等于 1,展示出强力的粉刺消解效用。此

外,于该组织图中可以看到描述表皮厚度的参数在用 ST1898 处理后增加。

[0098] 实施例 5. ST1898 组合物 - 制剂 2 的制备 - 在凝胶相中的 ST1898 制剂的制备

[0099] 制剂:ST1898 0.1 和 0.05%在载体中。

[0100] 载体:卡波姆 980、丙二醇、泊洛沙姆、依地酸二钠、羟基苯甲酸甲酯、苯氧基乙醇、氢氧化钠及纯净水。

[0101] 阴性对照:无处理

[0102] 使用阿达帕林(达芙文凝胶_)作为参比化合物(0.1%)。实施例 6. ST1898(制剂 2)对小鼠表皮假粉刺的粉刺消解作用

[0103] 在 Sigma-Tau 实验室中使用动物的授权系由 Italian Health Authority 取得。动物的护理和饲养按照 European Directives no. 86/609 及 Italian DL 116, 1992 年 1 月 27 日。此研究中有关动物护理的所有部分都已经 Sigma-Tau 兽医人员批准。

[0104] 动物供应及饲养

[0105] 将小鼠(Charles River Italy S.p.A., 供给 Jackson Laboratory)圈养在 makrolon 笼子(26.7×20.7×14 厘米)内(1 只小鼠/笼),该笼子具有钢制栅格盖及经粉碎和灭菌的无尘床垫穗轴锯屑床架。动物圈养在光照-黑暗周期下,保持温度和湿度恒定。动物房的参数估计如下:22±2℃温度,55±15%相对湿度,约 15-20 次过滤空气更换/小时及 12 小时人工光照的昼夜节律周期(7a.m., 7p.m.)。监测环境条件;数据保存在动物饲养档案中。

[0106] 饮食和水供给

[0107] 饮用水自由取用。于整个研究过程中对每只小鼠每日供应完全小丸食物(GLP 4RF21, Mucedola)。动物食物和饮水的分析鉴定证明保存在 Sigma-Tau 处。

[0108] 研究设计-小鼠处理

[0109] 将 30 只(RHJ/LeJ)小鼠(Jackson Laboratory)(15 只雄性,15 只雌性)(6-8 周龄)分成 6 只小鼠/组。两组用 ST1898(制剂 2)(0.1%和 0.05%,在载体中)处理,一组用作为参比化合物的阿达帕林(达芙文_凝胶)(0.1%)处理,一组用载体(与达芙文_凝胶配方相同:卡波姆 980、丙二醇、泊洛沙姆、依地酸二钠、羟基苯甲酸甲酯、苯氧基乙醇、氢氧化钠和纯净水)处理。

[0110] 一组未经处理(对照组)。将药物(50 微升)以带无菌手套的手指局部地涂在背部皮肤上(按摩 30-45 秒),每天一次,连续 5 天/周(星期六和星期日除外),连续 3 周。最后施用后三天,经由颈脱位法将小鼠处死。在死亡后立即从所有处死动物采取两份皮肤打孔活检(6 毫米)。将该活检用福尔马林固定(10%缓冲福尔马林溶液)且用石蜡包埋。

[0111] 死后检验

[0112] 使用定量式组织学图像分析评定每厘米角质层长度的表皮小囊(粉刺)总数、粉刺轮廓及表皮厚度。从一份活检,以 150 微米间隔取得 3 个 3 微米厚的皮肤切片且用苏木素-伊红予以染色。将第二份活检保存起来供记录用。

[0113] 对经染色的皮肤切片的电脑辅助形态学分析使用 Zeiss KS300.3 系统(参数 n. 1, 3 和 4)实施。对于角质层总长度测量,使用测微设备。测量下列显微参数:

[0114] 1) 每一开放表皮小囊/粉刺上的最大直径或半深度直径(D)及表面孔的直径(d),

[0115] 2) 三个切片的长度,取为角质层的总长度,

[0116] 3) 三个切片中表皮小囊 / 粉刺的总数,

[0117] 4) 在毛囊间区域中,表皮的表面积 (S) 及相应基底层长度 (L)。

[0118] 从这些数据,计算每一组动物的下列平均值 (+/-SD) :

[0119] 1) 小囊 / (粉刺) 的数目 / 角质层长度 (厘米);

[0120] 2) 粉刺轮廓,计算成 $r = d/D$

[0121] 3) 表皮厚度,计算成 S/L ,单位微米

[0122] 试验物的施用

[0123] 在背部皮肤上的局部施用 (按摩 30-45 秒) 系使用带手套手指涂抹 50 微升而实施。连续 3 周中连续 5 天 / 周 (星期六和星期天除外) 每日进行所述处理一次。

[0124] 数据分析

[0125] 统计学分析使用双尾 Student' s “t” 检验实施,以比较得自不同动物组的数据。

[0126] 当达到 p 值 (P) ≤ 0.05 时即视为有显著差异。

[0127] 于需要时使用其它统计学方法。

[0128] 结果

[0129] 在处理期间,记录小鼠体重以控制小鼠的健康状态。没有发现体重有明显变异 (表 2)。

[0130] 对用 ST1898 (制剂 2) 处理的犀鼠及对照犀鼠的分析结果示于表 2 和图 1-8 中。最相关的发现总结于下文。

[0131] 组织学分析

[0132] 得自 5 组犀鼠的组织学标本的分析显示

[0133] a) 与未处理皮肤相比,载体处理对于小囊 (粉刺) 数目和形态以及表皮形态和厚度都没有影响。在所有标本中都观察到许多填充着角质化细胞的扩大粉刺。皮脂腺表现出明显地萎缩。未处理小鼠及经载体处理小鼠的稀疏毛囊间表皮包含单一层的基底细胞,二至三层的棘细胞及一层包含角质透明蛋白颗粒的粒细胞。角质层呈现为厚且构造疏松,具有特征性的“篮波 (basketwave)”外观。

[0134] b) 用 ST1898 处理过的小鼠皮肤中的粉刺数目有大幅减少。在用 ST1898 处理过的小鼠与用阿达帕林处理过的小鼠之间,此效应似乎相差无几。在所有经活性化合物处理过的动物中,大部分的毛囊都变成细窄毛发管道,没有显示出有角质物质的蓄积。此外,有特别扩大的皮脂腺连接到毛囊管。

[0135] c) 在 ST1898 处理小鼠和阿达帕林处理小鼠中有毛囊间表皮增生现象。具体而言,毛囊间表皮包含单一层的基底细胞,3-6 层的棘细胞及 3-5 层的含有许多大角质透明蛋白颗粒的粒细胞。角质层更为紧密,特别是在其下部中。值得注意的是,与 ST1898 处理小鼠相比,在阿达帕林处理小鼠的皮肤中表皮增生现象更显著。此外,在所有经活性化合物处理的动物中都观察到轻微的真皮淋巴细胞浸润现象。形态学分析

[0136] 粉刺数目。在未处理小鼠与载体处理小鼠中,每厘米角质层的粉刺数目相差无几。

[0137] 与未处理及载体处理对照相比,该值在经 ST1898 0.1% 和 0.05% 处理的小鼠中呈现出高度的减低 (p 值 < 0.005)。在 0.1% ST1898 处理小鼠中,相对于 0.05% ST1898 处理的小鼠,粉刺数目明显地更低 (p 值 < 0.005)。ST1898 0.1% 与阿达帕林 0.1% 显示出相当

的效用 (p 值 = 0.288626)。

[0138] 粉刺轮廓。粉刺轮廓分析显示出,相对于未处理及载体处理对照小鼠,在经 0.1% ST1898-、0.05% ST1898- 和阿达帕林- 处理的小鼠中 r 值高度显著且彼此相当的增加 (p 值 < 0.0005)。未处理及载体处理这两组显示出相近的值。

[0139] 表皮厚度。相对于两个组的对照小鼠,在经 ST1898 0.1% -, ST1898 0.05% - 及阿达帕林- 处理的小鼠中,表皮厚度显著增加 (p 值 < 0.0005)。未处理和载体处理小鼠显示出相近的值。ST1898 0.05% 处理小鼠中的表皮厚度高于用 0.1% ST1898 处理的小鼠 (p 值 < 0.05) 或用阿达帕林处理的小鼠 (p 值 < 0.005)。阿达帕林处理的小鼠在与用 0.1% ST1898 处理的小鼠相比时,显示出显著更厚的表皮 (p 值 < 0.05)。

[0140] 结论

[0141] 对用类维生素 A ST1898 连续 3 周 (每天一次, 5 天 / 周) 局部处理的犀鼠的分析显示出,在所用两种浓度 (0.1% 和 0.05%) 下 ST1898 都显示出粉刺消解活性和抗粉刺产生活性,如经由 (i) 与未处理或载体处理的小鼠相比高度减少的粉刺数目,和 (ii) 细窄粉刺的大幅增加 (增加的 r 值) 所评定的。

[0142] 以相同浓度 (0.1%) 施用,ST1898 发挥出类似于参比化合物阿达帕林所引发的对粉刺数目和轮廓的作用。

[0143] ST1898 的作用是剂量-相关的,在减少粉刺数目及诱导表皮增生方面,0.05% ST1898 不如 0.1% ST1898 有效。

[0144] 此外,与参比化合物处理相比,在 ST1898 0.1% 局部处理后,表皮增生显著减低,显示出使用 ST1898 超越现有局部用类维生素 A 的可能优势。

[0145] 表 2 使用 ST1898 (制剂 2) 或阿达帕林根据方案 $qd \times 5/w \times 3w$ 处理的犀鼠的体重和致死率

[0146]

处理	n	起始体重 克 $\pm$ SE	最终体重 克 $\pm$ SE	体重减轻 最大值 (%)
对照 (无处理)	*5	20.7 $\pm$ 1.3	22.8 $\pm$ 1.2	0
载体	*5	21.5 $\pm$ 0.9	22.9 $\pm$ 1.3	1
ST1898 0.1%	6	20.9 $\pm$ 0.4	21.9 $\pm$ 0.5	1
ST1898 0.05%	6	20.9 $\pm$ 1.0	22.2 $\pm$ 1.1	0
阿达帕林 0.1% (达芙文凝胶)	*5	21.3 $\pm$ 1.1	21.2 $\pm$ 1.3	4

[0147] 在最后一次处理后三天将小鼠处死。用于 ST1898 (制剂 2) 的载体与达芙文凝胶

的相同（卡波姆 980、丙二醇、泊洛沙姆，依地酸二钠、羟基苯甲酸甲酯、苯氧基乙醇、氢氧化钠和纯净水）。

[0148] * 一只小鼠因低体重而在开始处理之前就排除出研究。

[0149] 经 ST1898（制剂 2）处理的小鼠和对照小鼠的皮肤的形态测定分析（结果表示为平均值 $\pm$ SD）

[0150] 表 3.1

[0151]

处理	粉刺 (n/ 厘米)	P 值 相对于未处理组	P 值 相对于载体组
未处理	57.35 $\pm$ 4.96		0.982154
载体	57.27 $\pm$ 5.74	0.982154	
ST1898 0.1%	31.35 $\pm$ 5.37	1.68×10^{-5} ***	2.89×10^{-5} ***
ST1898 0.05%	42.42 $\pm$ 4.5	0.00056**	0.00098**
阿达帕林 0.1%	28.31 $\pm$ 2.92	3.41×10^{-6} ***	8.12×10^{-5} ***

[0152] P 值 0.1% ST1898 相对于 0.05% ST1898 = 0.003182**

[0153] P 值 0.1% ST1898 相对于阿达帕林 = 0.288626

[0154] P 值 0.05% ST1898 相对于阿达帕林 = 0.000213***

[0155] 表 3.2

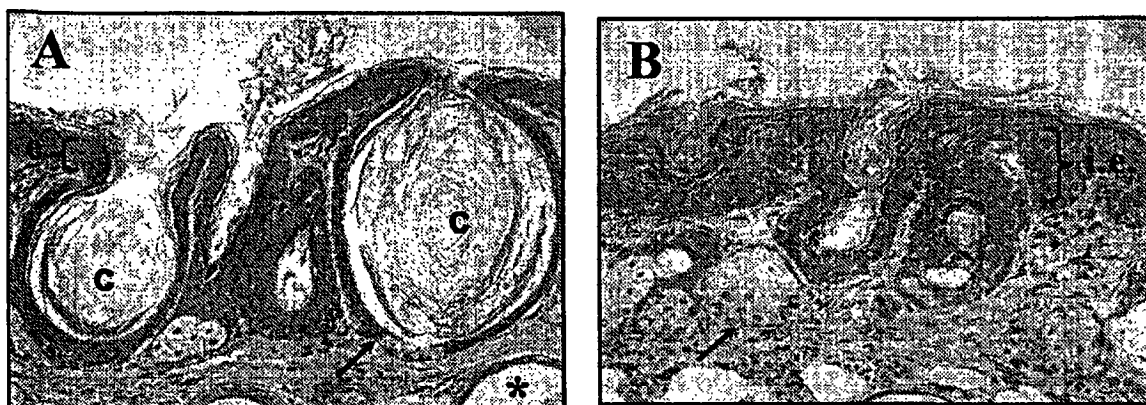
[0156]

处理	粉刺轮廓 ($r = d/D$)	P 值 相对于未处理组	P 值 相对于载体组
未处理	0.62 $\pm$ 0.05		0.918704
载体	0.61 $\pm$ 0.05	0.918704	
ST1898 0.1%	1.27 $\pm$ 0.07	2.85×10^{-8} ***	2.99×10^{-8}
ST1898 0.05%	1.26 $\pm$ 0.13	3.24×10^{-6} ***	3.29×10^{-6} ***
阿达帕林 0.1%	1.24 $\pm$ 0.11	3.22×10^{-6} ***	3.23×10^{-6} ***

- [0157] P 值 0.1% ST1898 相对于 0.05% ST1898 = 0.794536
- [0158] P 值 0.1% ST1898 相对于阿达帕林 = 0.517798
- [0159] P 值 0.05% ST1898 相对于阿达帕林 = 0.792654
- [0160] 表 3.3
- [0161]

处理	表皮厚度 (微米)	P 值 相对于未处理组	P 值 相对于载体组
未处理	20.90 ± 2.91		0.857119
载体	20.56 ± 2.86	0.857119	
ST1898 0.1%	42.52 ± 2.17	$1.89 \times 10^{-7}***$	$1.50 \times 10^{-7}***$
ST1898 0.05%	37.45 ± 3.97	$2.94 \times 10^{-5}***$	$2.0 \times 10^{-5}***$
阿达帕林 0.1%	57.33 ± 9.99	$5.09 \times 10^{-5}***$	$4.72 \times 10^{-5}***$

- [0162] P 值 0.1% ST1898 相对于 0.05% ST1898 = 0.020697*
- [0163] P 值 0.1% ST1898 相对于阿达帕林 = 0.006037*
- [0164] P 值 0.05% ST1898 相对于阿达帕林 = 0.001479**
- [0165] * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.005$; *** = $p < 0.0005$



显微镜图像 (20x)： 犀鼠的皮肤

A) 未经处理

B) 经ST1898处理

图1