

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 02829397.5

[51] Int. Cl.

A61K 31/27 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

A61P 11/08 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01)

A61P 15/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 12 月 26 日

[11] 授权公告号 CN 100356913C

[51] Int. Cl. (续)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 13/10 (2006.01)

A61P 9/08 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[22] 申请日 2002.8.8 [21] 申请号 02829397.5

[86] 国际申请 PCT/US2002/025225 2002.8.8

[87] 国际公布 WO2004/014290 英 2004.2.19

[85] 进入国家阶段日期 2005.1.28

[73] 专利权人 谭 文

地址 中国广东省东莞市松山湖科技园区
生产力促进中心 15 楼二层

[72] 发明人 陈俭龙 谭 文

[56] 参考文献

US5837727A 1998.11.17

US 4419364A 1983.12.6

审查员 雷耀龙

[74] 专利代理机构 北京万科园知识产权代理有限公司
责任公司

代理人 张亚军 曹诗健

权利要求书 2 页 说明书 14 页

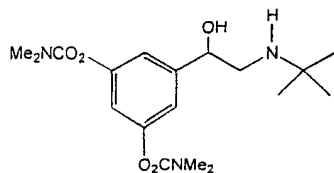
[54] 发明名称

左旋(R)班布特罗及其药物用途

[57] 摘要

本发明涉及班布特罗的左旋(R)单一对映体。本发明的化合物具有抗支气管痉挛作用和较低的心脏副作用,此外还有降血脂作用。本发明还涉及合成高光学纯的本发明化合物和其它儿茶酚胺类单一对映体的新的合成路线和方法。

1. 左旋 R 班布特罗, 它是具有以下结构式



的班布特罗的左旋 R 构型的单一对映体, 或其药学上可接受的盐。

2. 一种制备权利要求 1 化合物的盐酸盐的方法, 该方法步骤如下:

步骤 1: 3, 5-双 (N, N-二甲基氨基甲酰) 苯乙酮

24 克 3, 5-二羟基苯乙酮、50 克 二甲基甲酰氯, 41 克 1.5 H₂O 的水合碳酸钾, 9.4 克无水碳酸钾和 1 克吡啶混合溶于 150 毫升乙酸乙酯, 70° C 加热搅拌 2 小时; 再加入 120 毫升水, 70° C 加热搅拌 1.5 小时; 在室温下冷却, 分离反应混合物; 用 2%稀硫酸洗涤有机相, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 滤出液浓缩后得产物 40 克。

步骤 2: 2'-溴-3, 5-双 (N, N-二甲基氨基甲酰) 苯乙酮

将 38 克 3, 5-双 (N, N-二甲基氨基甲酰) 苯乙酮, 57.7 克溴化铜混合物加入 100 毫升乙酸乙酯和 100 毫升氯仿中, 搅拌回流 5 个小时; 将混合物过滤, 取出固体, 用水洗涤滤出物, 无水硫酸镁干燥, 过滤. 将滤出液浓缩、结晶得产物 44.1 克。

步骤 3: (R)-L-溴-2- [3, 5-双 (N, N-二甲基氨基甲酰) 苯]]-2-乙醇

在-25° C 氮气环境下, 将溶于 100 毫升无水四氢呋喃的 11 克 2'-溴-3, 5-双 (N, N-二甲基氨基甲酰) 苯乙酮加入溶于 60 毫升无水四氢呋喃的 10.6 克 (-)-DIP- Chloride 溶液中; 混合液在-25° C 下搅拌 60 小时; 升温至 0° C, 将 7 克二乙胺分滴加入; 将此混合物加温至室温, 搅拌 2 小时, 将其沉淀的硼烷复合物过滤后, 用戊烷洗涤; 蒸馏去除复合的溶剂, 剩留物经硅胶色谱柱纯化, 得油状产物 8.4 克。

步骤 4: (S)-2- [3, 5-双 (N, N-二甲基氨基甲酰) 苯] 环氧乙烷

将 15% 的 100 毫升氢氧化钠水溶液加入含有 7.0 克 (R)-L-溴-2- [3, 5-双 (N, N-二甲基氨基甲酰) 苯]]-2-乙醇的 100 毫升乙醇溶液中, 室温下搅拌 2 小时; 将反应混合物浓缩、水洗、并用乙酸乙酯提取; 用盐水和水洗去有机层, 无水硫酸镁干燥; 将滤出液旋转蒸发, 剩留物真空干燥, 得产物 5.5 克。

步骤 5: 左旋 R 班布特罗盐酸盐

将 5.5 克(S)-2- [3, 5-双(N, N-d 二甲基氨基甲酰) 苯]] 环氧乙烷和 80 毫升叔丁胺混合, 搅拌回流 3 天; 将混合物浓缩至干燥, 水洗, 再经乙酸乙酯提取; 用水洗去有机相, 无水硫酸镁干燥; 滤出液浓缩后, 在乙醚中用盐酸处理剩留物, 得白色固体的左旋 R 班布特罗盐酸盐 5.2 克。

3. 按照权利要求 1 化合物作为药物的活性成分在制备一种用于治疗哮喘症或可逆的阻塞性呼吸道或肺部疾病的药物上的用途。

4. 一种制备在治疗人类和动物的哮喘、过敏或其它呼吸道阻塞病症中具有支气管扩张作用的药物上的方法, 包括将治疗剂量的、按照权利要求 1 的化合物制备成经口服、静脉、皮下、或经皮肤或直肠吸收方式给药的药物。

5. 按照权利要求 1 的化合物作为一种活性成分在制备一种用于治疗高血脂症或高甘油三酯血症、肥胖症或其它血脂和脂肪酸代谢紊乱症的药物上的用途。

6. 按照权利要求 1 的化合物作为一种活性成分在制备一种舒张子宫、胆囊、膀胱的药物上的用途。

7. 按照权利要求 1 的化合物作为一种活性成分在制备一种激活含有 β_2 受体的器官或组织的药物上的用途。

8. 一种制备在治疗人类及动物的高血脂症中和在对普通人类及动物中具有降血脂作用的药物的方法, 包括将治疗剂量的、按照权利要求 1 的化合物制备成经口服、静脉、皮下、或经皮肤或直肠吸收方式给药的药物。

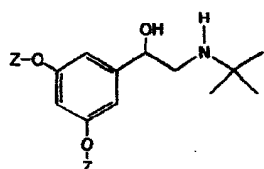
左旋(R)班布特罗及其药物用途

技术领域

本发明涉及一种具有药物治疗作用的新化合物,该化合物的制备方法,制备该化合物的化学中间体,制备含有该化合物的药物制剂的方法,以及使用该化合物的制造药物的用途。本发明的化合物有强效和持久的支气管舒张作用,使用本发明的化合物制成的药物可以有效地治疗哮喘病中的支气管痉挛和相关病症。使用本发明的化合物制成的药物还具有强效的降血脂作用,可用于治疗高血脂症,特别是高甘油三酯血症。

背景技术

目前上市的支气管扩张药物均具有相应副作用,因此,发明新的支气管扩张药物,使其有强效的支气管扩张作用而同时又有较低的副作用是临床应用的需要。具有下面结构通式的化合物代表了目前上市的一类优选的长效支气管扩张药物。



支气管扩张药特布它林(通式中 $Z=H$) 就是这类药物中的一种。班布特罗(通式中 $Z=C(O)NMe_2$), 是特布它林的双(二甲氨基甲酸酯)(bis-2-dimethylcarbamate)前体药。与特布它林相比,口服班布特罗具有更为有效的支气管扩张作用,同时作用时限可达12小时以上;与特布它林相比,班布特罗还具有较低的有害的心血管副作用。此外在某些病人班布特罗有降血脂效应。(Bauer CA and Svensson LA, EP 0521967, 1990)

现已知道,当用于临床治疗时,在许多具有旋光对映体的手性药物中,在一对对映体中,某一单一对映体往往比其中的另一单一对映体具有更强的药物活性。例如,左旋(R)的沙丁胺醇对映体(R型)作为 $\beta-2$ 受体的激动剂,其药效大约是右旋的沙丁胺醇对映体(S型)的80倍。(Hartley and Middlemis, J. Med. Chem., 14, 895-896, 1971),与消旋沙丁胺醇相比,使用单一纯化的左旋(R)的沙丁胺醇可增加药效和减少副作用。美国食品药品监督管理局已经批准新药左旋(R)盐酸沙丁胺醇上市,用于治疗哮喘病。与左旋(R)的沙丁胺醇相似,在体动物试验证明,单一特布它林旋光对映体也有比消旋的特布它林更强的药效活性和较低

的副作用。(Kallstrom et al., Chirality 1996, 8, 567)

特布它林的前体药班布特罗具有一个手性中心, 因此, 它可以消旋形式存在, 也可以纯的单一旋光对映体的形式存在 (Torsten et al., U.S. Patent 4, 419, 364, 1983)。然而, 据我们所知, 还没有关于将消旋班布特罗分离为单一对映体的拆分方法或其它方法的报道, 也没有任何关于已生成具有单一对映体班布特罗的报道。因此, 单一的左旋(R) 或右旋(S) 班布特罗对映体的生物学活性和治疗作用至今尚未被研究和揭示。

消旋体班布特罗已上市, 并且有许多年的广泛的临床使用历史。

现已知道包括特布它林在内的一类 β -2 激动剂, 其右旋(S) 体较之于左旋(R) 体往往有较强的毒性和较低的药效活性; 右旋(S) 体的这一特点可能与临床上服用班布特罗所出现的副作用有关。本发明阐述了制备高纯度的单一旋光性的班布特罗的方法, 证明作为治疗药物, 单一左旋(R) 体班布特罗较之于消旋体班布特罗有明显的优势。此外, 本发明还包括左旋(R) 体班布特罗的新的药物用途。

至少有两种方法被用于沙丁胺醇和相关的 2-苯基乙醇胺的手性合成中手性中心的立体化学调控。在制备纯化的单一左旋(R) 或右旋(S) 沙丁胺醇时采用的方法之一就是沙丁胺醇的中间体或最终产物即沙丁胺醇本身进行拆分 (Bakale et al., Clinical Reviews in Allergy and Immunology, Vol. 14, pp7-35, 1996).; 而另一方法则涉及不对称合成, 它是从手性前体合成手性物质的全新方法。

发明内容

发明内容总结

本发明提出一种新的光学纯的化合物, 即左旋(R) 体班布特罗以及其盐, 后者是支气管痉挛的扩张剂。本发明的化合物对哮喘的治疗药效约是消旋体班布特罗的两倍, 而其对心脏的变力性和变时性的副作用则较消旋体班布特罗低。本发明的化合物还具有降血脂的活性, 它可降低高血脂症时的血浆中脂, 特别是甘油三脂的含量。本发明还涉及制备光学纯的单一对映体班布特罗和相关的 2-苯基乙醇胺的方法。本发明的权利要求包括具有如下结构的单一对映体的左旋(R) 班布特罗以及其制药学上可接受的盐。本发明的化合物可用于制备治疗哮喘病的支气管扩张药物和治疗高血脂病的降血脂药物。

本发明的权利要求还包括一种高效廉价的制备光学纯的左旋(R) 班布特罗和 2-苯基乙醇胺以及它们的中间体的方法, 该方法是将班布特罗和 2-苯基乙醇胺与一种手性酸形成非对映异构体的盐, 或通过采用一种具有对映选择性的化学发应。对映选择性合成方法包括以下步骤:

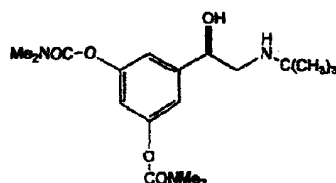
(a) 将含有合适的取代基和合适的保护基取代的 α -溴代苯乙酰进行不对称还原; 得到一种手性的 2-溴-1-苯基乙醇。

(b) 用一个适当的取代基和任意保护的伯胺置换溴原子, 从而生成一种手性的 2-苯基乙醇胺。

本发明的全部内容、特征、优点详细描述如下。

发明内容的详细描述

本发明涉及的化合物是(R)构型的左旋班布特罗对映体和其制药学可接受的盐。该化合物的结构如下：



“光学纯的单一对映体”的含义是指，在本发明的具有两种对映体结构的化合物组成上，其中一种构型对映体化合物按重量计至少占 80%；另一种构型对映体化合物含量按重量计不超过 20%；或者在优选情况下，一种构型的对映体化合物按重量计至少占 98%；另一种构型的对映体化合物含量按重量计不超过 2%；或者在更为优选的情况下，一种构型的对映体化合物按重量计至少占 99%；另一种构型的对映体化合物含量按重量计不超过 1%。

本发明合成一种 2-苯-2-乙醇氨对映体的特定构型，它可通过两种方法得到：

方法一：合成一种消旋的 2-苯基-2-乙醇胺，再用一种手性的酸对前者进行拆分；可选用的手性酸包括：(L) 和 (D) 型酒石酸，二苯甲酰-(L) 和 (D) 型酒石酸；以及二对甲基苯甲酰-(L) 和 (D) 型酒石酸。

方法二：制成一种适当的 2-苯-2-乙醇溴的取代物，使其含有高比例的单一旋光对映体，作为 2-苯-2-二乙醇胺的前体物。本方法的一般步骤是：

(1) 将一种被适当取代和保护的 α -溴代苯乙酮，不对称的还原为一种由伯溴基团和一种仲羟基构成的手性的 2-溴乙醇。

(2) 用一种适当取代的和任意保护的伯胺置换溴，从而制成一种手性的 2-苯-2-乙醇胺。

在本发明中，“适当的取代物”和与之相当的名词的含义是指当存在该类取代物时，将会产生有用的最终产物和中间体。在手性 2-苯-2-乙醇胺的实例中，其中之一的优选的有用的终产物是 2-苯-2-乙醇胺类的 β 肾上腺能受体 β 激动剂，包括：沙丁胺醇 formoterol, 沙美特罗, 特布它林, 和班布特罗。这类化合物的优选的有用中间体包括：相应保护的手性 2-苯-2-乙醇溴代物。

“适当保护的基团”是指可保护特定的化合物中的化学结构的一种基团，而在某个或某些反应中，这一化学结构如不被保护则易于发生改变；同时这一种基团在一定条件下可被脱去而不改变上述化合物的其它固有的功能。

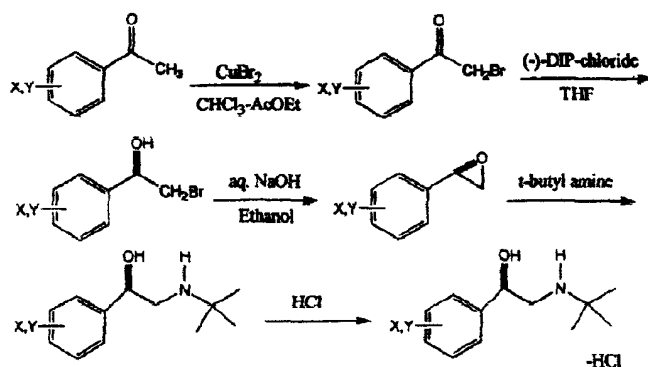
用于保护胺的机能的优选的保护基团包括：氨基化合物，氨基甲酸盐，和相关基团。大量的适当的保护基团和相应的化学分裂反应在《有机化学中的保护基团》一书中有详尽描述，书中还包括了参考资料。特别是该书第一章：保护基团

综述, 第二章, 羟基保护基团; 第三章, 碘保护基团; 第四章, 羧基保护基团; 第五章, 羰基保护基团。(见“Protective Groups in Organic Chemistry”, Theodore W. Greene (John Wiley & Sons, Inc., New York, 1991, ISBN 0-471-62301-6) (“Greene”). See also Kocienski, Philip J.; “Protecting Groups” (Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1994)).

“适当的离去基团”是指一种基团, 它可容易的从一个反应中间体中被置换出来, 从而产生出所需的产物; 与此同时, 这一基团的脱除并不影响原有化合物的固有功能。保护羟基功能的优选离去基团包括: 对甲磺酸酯, 甲磺酸酯, 三氟醋酸酯和其它相关基团。溴、氯、碘是有机合成中常用的离去基团。

在一种优选的具体反应中, 被适当的取代的 2-苯基-2-乙醇溴代物是首先通过其相应的 α -溴代苯乙酮, 采用目前已为人熟知的方法而获得的; 然后再进行其余的合成步骤。下面的图示是这一优选具体反应的实例 (图示 1)。

图示 1



在图示 2 中, 关键的不对称还原剂是 β -氯代二异松藻基硼 (B-chlorodiisopinocampheyl-boranes), 即 (DIP-ChlorideTM): 其中 (-)-DIP-chlorideTM 用于制备左旋 (R) 构型的醇, (+)-DIP-chlorideTM 用于制备右旋 (S) 构型的醇。这些试剂已被开发用于手性醇的常规制备, 这些试剂可通过商业途径获得也可在有经验的实验室制成。(有关 DIP-chlorideTM 化学特性综述见: Brown et al. Acc. Chem. Res. 1992, 25, 16; Brown and Ramachandran in Advances in Asymmetric Synthesis, Vol 1, Hassner, A., Ed., JAI Press: Greenwich, CT, 1994, pp-144-20; Ramachandran and Brown, in Reductions in Organic Synthesis, Chap. 5, Abdel-Magid, A., Ed., American Chemical Society: Washington, DC, 1996),

用伯胺取代离去基团溴原子得到具有保护基的产物。根据需要, 保护基可从取代物中的 X, Y 和/或 Z 中脱除, 从而生成高光学纯度的 2-苯基-2-乙醇胺, 其对映体重量百分比大于或等于 98%。

取代基 X, Y 和 Z 为 2 苯-2-乙醇胺提供了有价值的功能, 如使之具有 β 肾上腺能受体激动剂的作用或家畜促生长剂的作用。取代物 X 和 Y 的优选的实例有: 羟基, 羟甲基, 胺基, 甲酰氨基 N, N-二甲基甲酰基和相关基团。取代物 Z 的优选的实例有: 叔丁胺, $(\text{CH}_2)_6\text{O}(\text{CH}_2)_4-\text{C}_6\text{H}_5$, $\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}_6\text{H}_4-4-\text{OCH}_3$ 相关基团。

本发明也可用于制备手性 2 苯-2-乙醇胺产物的酸盐。适当的盐包括来自无机酸的盐如硫酸盐, 盐酸, 以及来自有机酸的盐, 如甲磺酸, 延胡索酸, 酒石酸, 柠檬酸, 马来酸, 琥珀酸和安息香酸。

左旋 (R) 班布特罗的使用: 使用本发明化合物即左旋 (R) 班布特罗进行临床治疗时, 以本发明化合物作为活性成分制备成不同的药物剂型, 可以口服给药、也可以注射或吸入给药, 也可经皮肤或直肠吸收。

左旋 (R) 班布特罗可用于以下用途:

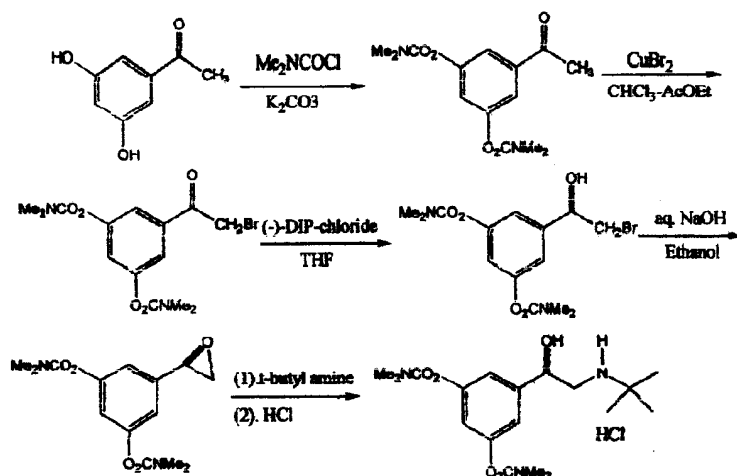
- (1) 作为支气管痉挛扩张剂用于各种哮喘症。
- (2) 作为降血脂药用于高血脂症或其它相关病症。
- (3) 由于其具有降低血浆甘油三酯的作用, 可用于去除人类和动物的过剩脂肪组织。
- (4) 可用于舒张人体的子宫、胆囊、膀胱、血管、以及含有 β_2 的其它器官和组织。
- (5) 用于制备一种激活含有 β_2 受体的器官或组织的药物。
- (6) 用于治疗哮喘症或可逆的阻塞性呼吸道或肺部疾病的药物。
- (7) 用于治疗高血脂症或高甘油三酯血症、肥胖症或其它血脂和脂肪酸代谢紊乱症的药物。

实施例

左旋 (R) 盐酸班布特罗的制备

图示 2 说明了本发明制备左旋 (R) 班布特罗、左旋 (R) 班布特罗盐酸盐的制备方法。方法中所用全部试剂均有市售。由 Bruker Avance 核磁仪记录核磁共振谱, 300MHZ ^1H 。用 Waters 液相色谱仪进行手性分析, 色谱柱: Chiralcel OJ; 检测波长: 220 NM; 流动相: 91 (正己烷): 10 (乙醇): 0.1 (二乙胺)。

图示 2



步骤 1: 3, 5-双 (N, N-二甲基氨基甲酰) 苯乙酮

3, 5-二羟基苯乙酮、(24 g, 0.16 摩尔), 二甲基甲酰氯 (50 克, 0.46 摩尔), 水合碳酸钾 (1.5 H₂O)、(41 克, 0.25 摩尔), 无水碳酸钾 (9.4 克, 0.07 摩尔) 和吡啶 (1 g) 混合溶于乙酸乙酯 (150 毫升), 70° C 加热搅拌 2 小时。再加入水 (120 毫升), 70° C 加热搅拌 1.5 小时。在室温下冷却, 分离反应混合物。用稀硫酸 (2%) 洗涤有机相, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 滤出液浓缩后得产物 (40 克), 收率 86%。¹HNMR (CDCl₃) 62.58 (s, 3H, COCH₃), 2.90, 3.10 (s, 12H, 2xN (CH₃)₂), 7.20 (s, 1H, H₄), 7.55 (s, 2H, H₂, 6)。

步骤 2: 2'-溴-3, 5-双 (N, N-二甲基氨基甲酰) 苯乙酮

将 3, 5-双 (N, N-二甲基氨基甲酰) 苯乙酮 (38 克, 0.13 摩尔), 溴化铜 (II) (57.7 克, 0.26 摩尔) 混合物加入乙酸乙酯 (100 毫升) 和氯仿 (100 毫升) 中, 搅拌回流 5 个小时。将混合物过滤, 取出固体, 用水洗涤滤出物, 无水硫酸镁干燥, 过滤。将滤出液浓缩、结晶得产物 (44.1 克), 产率 91%。¹HNMR (CDCl₃) 3.04, 3.12 (s, 12H, 2xN (CH₃)₂), 4.40 (s, 2H, CH₂), 7.25 (s, 1H, H₄), 7.58 (s, 2H, H₂, 6) ppm。

步骤 3. (R)-L-溴-2- [3, 5-双 (N, N-二甲基氨基甲酰) 苯]-2-乙醇

在 -25° C 氮气环境下, 将溶于无水四氢呋喃 (100 毫升) 的 2'-溴-3, 5-双 (N, N-二甲基氨基甲酰) 苯乙酮 (11 克, 30 摩尔) 加入溶于无水四氢呋喃 (60 毫升) 的 (-)-DIP-Chloride (10.6 g, 33 摩尔) 溶液中。混合液在 -25° C 下搅拌 60 小时。升温至 0° C, 将二乙胺 (7 克, 66 摩尔) 分滴加入。将此混合物加温至室温, 搅拌 2 小时, 将其沉淀的硼烷复合物过滤后, 用戊烷洗涤。蒸馏去除复合的溶剂, 剩留物经硅胶色谱柱用纯化, 得油状产物 (8.4 克), 产率 75%。∴ ¹HNMR (CDCl₃), 结果与结构相符。

步骤4. (S)-2- [3, 5-双(N, N-d 二甲基氨基甲酰) 苯] 环氧乙烷.

将15% 氢氧化钠水溶液(100 毫升)加入含有(R)-L-溴-2- [3, 5-双(N, N-二甲基氨基甲酰) 苯]]-2-乙醇(7.0 克, 18.7 摩尔)的乙醇溶液(100 毫升)中, 室温下搅拌2 小时。将反应混合物浓缩、水洗、并用乙酸乙酯提取。用盐水和水洗去有机层, 无水硫酸镁干燥。将滤出液旋转蒸发, 剩留物真空干燥, 得产物(5.5 克), 收率100%。产物直接用于下一步不再进一步纯化。¹H NMR (CDCl₃) 8 2.56, 3.15 (dd, 2H, CH₂), 4.20 (dd, 1H, CH), 3.0, 3.10 (s, 12H, 2xN (CH₃)₂), 7.22 (s, 2H, H₂, 6), 7.56 (s, 1H, H₄) ppm.; 手性 HPLC, ee 98.7% (R, 99.35%, S, 0.65%).

步骤5. 左旋(R) 班布特罗盐酸盐.

将(S)-2- [3, 5-双(N, N-d 二甲基氨基甲酰) 苯]] 环氧乙烷(5.5 克, 18.7 摩尔)和叔丁胺(80 毫升)混合, 搅拌回流3 天。将混合物浓缩至干燥, 水洗, 再经乙酸乙酯提取。用水洗去有机相, 无水硫酸镁干燥。滤出液浓缩后, 在乙醚中用盐酸处理剩留物, 得白色固体的左旋(R) 班布特罗盐酸盐(5.2 克), 收率, 69%。¹H 和 ¹³C NMR (D₂O): 1.30 (s, 9H, (CH₃)₃), 2.90, 3.06 (s, 12H, 2xN (CH₃)₂), 3.10, 3.25 (dd, 2H, H₂', 2''), 4.95 (dd, 1H, H₁'), 6.88 (s, 1H, H₄), 7.06 (s, 2H, H₂, 6) ppm. 手性 HPLC, ee 99.4% (R, 99.7%, S, 0.3%).

盐酸左旋(R) 班布特罗的药理学试验:

抗支气管痉挛作用

A1. 对组织胺诱发的清醒荷兰猪哮喘症的保护作用

试验方法: 动物: 荷兰猪(Dunkin-Hartley 种)重量190±30 克, 隔夜禁食, 自由饮水。将动物置于密封玻璃罩内, 将雾化的2%组织胺溶液以0.5 毫升/分速度恒压喷入玻璃罩内以, 使动物吸入, 为期15 秒钟。然后, 将动物取出, 观察其活动。记录动物因哮喘窒息摔倒和从开始吸入组织胺到摔倒的时间(摔倒潜伏期)。选择其中潜伏期小于120 秒的动物, 作为对组织胺敏感动物, 待动物休息24 小时完全恢复后, 用于下一步试验。待试化合物盐酸盐和盐酸消旋班布特罗用生理盐水稀释。

待试化合物(本发明化合物)的时一效反应过程: 按2、4 和8 毫克/公斤体重, 经胃管分别给荷兰猪服用左旋(R) 班布特罗和消旋班布特罗, 以及等量的盐水。在给药后1、4、和24 小时, 分别将动物放入充满组织胺气雾的密封玻璃罩内。每组8 只动物, 雌雄各半。已吸入组织胺动物不再重复使用。

待试化合物的剂量-药效反应研究: 动物随机分为不同剂量组和空白对照组, 每组8 只, 雌雄各半。按0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 和8.0 毫克/公斤, 经胃管分别给予左旋(R) 盐酸班布特罗和消旋盐酸班布特罗, 以及对照生理盐水。按上述方法使动物吸入组织胺, 并记录摔倒动物数量和摔倒潜伏期。根据对摔倒动物数目和潜伏期长短, 可定量动物服用药物对吸入组织胺所诱发的支气管痉挛的保护

作用。对于吸入组织胺后 360 秒后，还没有表现因严重哮喘所导致摔倒的动物，计为无摔倒，其潜伏期计数为 360 秒。

试验结果：上述试验的结果总结于表 1 至表 3。如表 1 所示，给荷兰猪口服 2 到 8 毫克/公斤体重的左旋（R）班布特罗和消旋班布特罗后，对吸入组织胺所致的哮喘有显著的拮抗作用。药物的抗哮喘作用在服用后 1 小时内起效，可持续 24 小时。最大药效出现时间为服用药物后 4 小时。在服用药物 1 到 4 小时后，服用左旋（R）班布特罗 2 毫克/公斤体重和 4 毫克/公斤体重组动物的抗哮喘作用明显强于服用相同剂量消旋班布特罗组的动物（ $P<0.01$ ）。表 1 中数据结果显示左旋（R）班布特罗药效作用约为消旋班布特罗的两倍。

表 1. 服用左旋（R）班布特罗和消旋班布特罗后对清醒荷兰猪吸入雾化组织胺反应的影响作用。

	N=	第一小时		N=	第四小时		N=	第二十四小时	
		摔倒率 %	潜伏期 秒		摔倒率 %	潜伏期 秒		摔倒率 %	潜伏期 秒
对照 #	8.0	100	47 ± 16	8.0	100	43 ± 13	8.0	100	
R-bambuterol									
		50.0			25.0				
2mg/kg	4.0	*	231 ± 70	2.0	*	295 ± 65	5.0	62.5	202 ± 67
		37.5							
4mg/kg	3.0	*	258 ± 71	0.0	0.0*	>360	4.0	50.0	242 ± 64
8mg/kg	2.0	25.0	299 ± 57	0.0	0.0	>360	3.0	37.5	256 ± 72
RS-bambuterol									
2mg/kg	6.0	75.0	168 ± 61	4.0	50.0	227 ± 56	5.0	50.0	208 ± 65
4mg/kg	5.0	62.5	199 ± 63	2.0	25.0	299 ± 51	3.0	37.5	287 ± 57
8mg/kg	3.0	37.5	260 ± 66	0.0	0.0	>360	2.0	25.0	303 ± 54

R-bambuterol: 左旋（R）盐酸班布特罗；RS-bambuterol: 消旋盐酸班布特罗
与其它各组相比有显著差异（ $P<0.01$ ）

*与消旋消旋盐酸班布特罗组相比有显著差异（ $P<0.05$ ）

表 2 显示在清醒荷兰猪，比较不同剂量的左旋（R）班布特罗与消旋班布特罗对吸入雾化组织胺发应的保护作用。

两种药的保护作用药效均与剂量相关。左旋（R）班布特罗在 4mg/kg 剂量时有最大保护作用，而消旋班布特罗则在 8 mg/kg 剂量时有最大保护作用。左旋（R）班布特罗和消旋班布特罗的半数有效剂量（ ED_{50} ）分别为为 0.91mg/kg 和 1.68 mg/kg。

表 2 左旋 (R)班布特罗和消旋班布特罗对荷兰猪吸入雾化组织胺所致摔倒的影响比较

剂量 (mg/kg)	0	0.25	0.5	1	2	4	8
动物数目 (n)	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8
% 摔 倒 率 , (R-bambuterol)	100	87.5	75	50	25	0	0
% 摔 倒 率 , (RS-bambuterol)	100	100	87.5	75	50	25	0

R-bambuterol: 左旋盐酸班布特罗; RS-bambuterol: 消旋盐酸班布特罗

表 3 比较了口服不同剂量的左旋 (R) 班布特罗和消旋班布特罗对荷兰猪吸入雾化组织胺所致摔倒的潜伏期的不同影响作用。摔倒的潜伏期增加表明药物对吸入雾化组织胺所致哮喘发应的保护作用。两药的作用均呈剂量依赖性。左旋 (R) 班布特罗 4 mg/kg 的药效相当于消旋班布特罗 8 mg/kg 的药效。左旋 (R) 班布特罗的最大药效剂量为 4 mg/kg, 而消旋班布特罗最大药效剂量为 8 mg/kg。

表 3.左旋 (R) 班布特罗和消旋班布特罗对荷兰猪吸入雾化组织胺所致摔倒的潜伏期影响的比较

剂量 (mg/kg)	0	0.25	0.5	1	2	4	8
动物数目 (n)	n=8	n=8	N=8	n=8	n=8	n=8	n=8
潜 伏 期 (秒), R-bambuterol	43	110	160	209	29	>36	>36
潜 伏 期 (秒), RS-bambuterol	44	61	114	151	22	299	>36

注: R-bambuterol: 左旋盐酸班布特罗; RS-bambuterol: 消旋盐酸班布特罗。

A2. 对致敏清醒荷兰猪过敏性支气管痉挛的保护作用

试验方法: 荷兰猪 (Dunkin-Hartley 种, 体重 200 ± 10 克, 雌雄各半, 皮下或腹腔内注入 5% 卵白蛋白溶液对荷兰猪进行致敏。雌雄分养, 自由进食饮水; 致敏 14 天后, 将动物随机分组, 每组 8 只。每组动物分别注入不同浓度左选班布特罗和效旋班布特罗生理盐水溶液和空白生理盐水对照。给药 4 小时后将动物移至密封玻璃罩内, 待动物稳定后, 以 0.5 ml/min 速率通过气雾器向玻璃罩内喷入雾化的 5% 的卵白蛋白溶液, 使动物吸入, 持续 15 秒钟。之后, 将动物移出玻璃罩进行观测, 分别测定动物因哮喘窒息所致摔倒的数目和摔倒潜伏期。对于观察 360 秒后, 还没有因哮喘所导致摔倒的动物, 计为无摔倒, 其潜伏期计数为 360 秒。

试验结果：试验结果总结于表4。在对照组8只动物，卵白蛋白致敏的清醒荷兰猪吸入雾化抗原后诱发严重的哮喘反应，全部动物均出现因严重哮喘所致摔倒，摔倒潜伏期为 58 ± 9 秒。然而，服用8 mg/kg 左旋(R)班布特罗在用药组，在360分钟的观察期中，全部动物均未出现摔倒。服用相同剂量，即8 mg/kg，消旋班布特罗用药组，8只动物中有2只出现因严重哮喘所致摔倒，摔倒潜伏期为 316 ± 36 秒。服用4 mg/kg 左旋(R)班布特罗用药组，结果与服用8 mg/kg 消旋班布特罗用药组相似。在服用4 mg/kg or 8 mg/kg 左旋(R)班布特罗组，动物的摔倒率小于服用相应的等剂量的消旋左旋(R)班布特罗组的动物摔倒率，而摔倒潜伏期长于服用相应的等剂量的消旋左旋(R)班布特罗组的摔倒潜伏期。这些结果提示，在对荷兰猪过敏性支气管痉挛的保护作用方面，左旋(R)班布特罗的药效明显强于消旋班布特罗。

表4 左旋(R)班布特罗和消旋班布特罗对致敏荷兰猪过敏性支气管痉挛的保护作用的比较

用药	摔倒动物数目	% 摔倒率	潜伏期 (秒)
对照 (n=8)	8	100	58 ± 9
左旋班布特罗:			
1 mg/kg (n=8)	5	63	$193 \pm 30^*$
4 mg/kg (n=8)	2	25	$293 \pm 27^{*#}$
8 mg/kg (n=8)	0	0	$>360^{*#}$
消旋班布特罗:			
1 mg/kg (n=8)	6	75	$156 \pm 38^*$
4 mg/kg (n=8)	3	38	$174 \pm 21^*$
8 mg/kg (n=8)	2	25	$316 \pm 36^*$

* 与对照组相比有显著性差异 ($P < 0.01$)

与消旋班布特罗组相比有显著性差异 ($P < 0.01$)

A3. 左旋(R)班布特罗对荷兰猪游离肺条的支气管舒张作用

试验方法：荷兰猪(Dunkin-Hartley种，体重400 g)。麻醉后开胸，取肺下叶，

将肺组织切成宽度约3 mm的肺条，切时使肺条的长轴与支气管走向平行。将此肺条进一步分割成两薄条，使其大小约为 $20 \times 3 \times 3$ mm。将肺条两端用丝线固定于充满 37°C 的Krebs氧合溶液的器官浴槽中。以约0.5-1.0 g重力量轻轻牵拉肺条，然后，使肺条在浴槽内平衡约60分钟，浴槽每20分钟更换一次溶液。加入 10^{-5} M组织胺使肺条预收缩，然后，分别向浴槽内累进加入含不同浓度的等容量的左旋(R)班布特罗和消旋班布特罗的溶液。通过张力换能器对肺条的收缩进行等长测定。

待试药品溶液的制备：左旋(R)班布特罗或消旋班布特罗均为无活性的前体药，后者在体内主要由血浆胆碱酯酶水解为原型药，即左旋(R)特布它林或消旋

特布它林。根据对消旋班布特罗的药代动力学研究，经肠胃吸收的消旋班布特罗约有 50% 在血浆中被水解为有活性的原型药，即特布它林。由于在制备的肺条里几乎没有上述胆碱酯酶，因此，无论是待试化合物左旋（R）班布特罗还是消旋班布特罗均没有显著的作用。

为了测试本发明化合物左旋（R）班布特罗对离体荷兰猪肺组织条的作用，分别给荷兰猪经口服用左旋（R）班布特罗和消旋班布特罗各 8 mg/kg；四小时后，分别采集动物血液，制备含左旋（R）班布特罗或消旋班布特罗的活性原型药血清。经高效液相色谱仪测定，服用左旋（R）班布特罗动物血液中活性原型药的浓度为 64-70 ng/ml，服用消旋班布特罗动物血液中活性原型药的浓度为 62-69 ng/ml。根据上述器官浴槽溶液容量，选取一适当容量的含有上述活性原型药血清，使一次将该量之血清加入浴槽溶液中稀释后，浴槽溶液中活性原型药的最终浓度增加为 0.25 ng/ml。分时段、依次、累进向浴槽溶液中加入上述同容量的血清，使浴槽溶液中活性原型药的浓度等量递增；同时依次测定浴槽内肺条的舒张情况，从而确定药物和肺条的浓度—反应量效关系。有关含有来自左旋（R）班布特罗的活性原型药血清的试验与含有来自消旋班布特罗的活性原型药血清的试验，采用同样方法平行进行，以减少误差。

试验结果：从表 5 可见含左旋（R）班布特罗活性成分的血清对收缩肺条的扩张作用明显大于含消旋班布特罗活性成分的血清。

表 5. 含左旋（R）班布特罗活性成分的血清和含消旋班布特罗活性成分的血清对预收缩的荷兰猪游离肺条的扩张作用。

浓度 (ng/ml)	舒张百分比	
	左旋班布特罗*	消旋班布特罗
	活性成分	活性成分
	n=4	n=4
0.25	12.4±1.3	7.6±0.8
0.50	19.5±2.2	10.8±2.1
0.75	43.7±1.8	26.5±3.4
1.00	60.1±5.7	39.6±4.0
1.25	75.6±8.4	45.7±6.7

* 含左旋班布特罗活性成分的血清组的在各浓度的反应数值均显著地大于含消旋班布特罗活性成分的血清组的相应数值。(P<0.01)

B 左旋（R）班布特罗的降血脂作用

试验方法：昆明种小鼠，雌雄各 35 只，体重 18—22 克。自由进食饮水。动物随机分为下列 7 组，每组 10 只。对照组（2 组）：蒸馏水；左旋（R）班布特罗 10 mg/kg 组和 5 mg/kg 组；消旋班布特罗 10 mg/kg 组和 5 mg/kg 组；优降脂

(simvastatin) 10 mg/kg; 经胃管向动物给药或等量蒸馏水, 每天一次, 连续四天。所有动物在第四天前晚禁食, 并在第四天给药或蒸馏水后即刻, 除上述一组对照组外, 经腹腔再向各组动物注入 Tyloxapol (400 mg/kg, Sigma Chemical Co.) 以诱发动动物高脂血症。注入 Tyloxapol 24 小时后, 经动物胸腔穿刺取血样制备血清。经血液自动分析仪 (Olympic, Japan), 分别测定下列物质, 确定其血液浓度: 甘油三酯 (TG), 胆固醇 (CHO), 高密度脂蛋白 (HDL), 低密度脂蛋白 (LDL) 和极低密度脂蛋白 (VLDL)。

试验结果: 在蒸馏水对照组, 腹腔注入 Tyloxapol 导致 TG, CHO, LDL and VLDL 明显增加, 增加值与未注入 Tyloxapol 的另一蒸馏水对照组的相应值相比有显著性差异 (表 6), 但前组动物的 HDL 无明显改变。另一方面, 在左旋 (R) 班布特罗组、消旋班布特罗组和优降脂 (simvastatin) 组动物, 腹腔注入 Tyloxapol 后其血液中 TG, CHO, LDL and VLDL 浓度的增加明显减少或没有增加。这些结果总结于表 6。

表 6. 本发明化合物左旋 (R) 班布特罗在高脂血症小鼠的降脂作用

	血脂浓度 (mg/dl)				
	甘油三酯	胆固醇	VLDL	LDL	HDL
对照*	154 ± 25	104 ± 18	35 ± 6	20 ± 5	49 ± 8
Tyloxapol#	816 ± 115	240 ± 83	111 ± 54	54 ± 23	63 ± 20
Tyl+左旋班布特罗 5mg*	323 ± 176	189 ± 83	50 ± 26	34 ± 15	42 ± 27
Tyl+左旋班布特罗 10mg*	105 ± 18#	119 ± 16	35 ± 7	29 ± 5	53.3 ± 6.7
Tyl+消旋班布特罗 10mg*	148 ± 45	125.2 ± 19.8	44.2 ± 14.4	30 ± 6	50 ± 17
Tyl+优降脂 10mg@	311 ± 187*	176 ± 64	85 ± 50	42 ± 11	49 ± 16

注: Tyl. Tyloxapol; VLDL 极低密度脂蛋白; LDL 低密度脂蛋白; HDL 高密度脂蛋白

* 与 Tyloxapol 组相比, TG, CHO, VLDL and LDL 血液浓度值有明显差异 (HDL 除外),

但 Tyl+优降脂组仅 TG 值与 Tyloxapo 组相应值比有显著性减低。

Tyl+左旋班布特罗 10mg 组的 TG 值与对照组和 Tyloxapol 组以及 Tyl+优降脂组相比有显著性减低。

@ Tyl+优降脂组与 Tyl+左旋班布特罗 10mg 组相比, TG, CHO, VLDL and LDL 各值均有显著性差异。

各组间 HDL 值均无显著性差异。

表 6 的结果表明, 左旋 (R) 班布特罗 5 mg/kg and 10 mg/kg 均可显著地降低高脂小鼠血液中甘油三酯, 胆固醇, VLDL 和 LDL 的浓度。左旋 (R) 班布特罗 10 mg/kg 对上述物质的降低数量大于左旋 (R) 班布特罗 5 mg/kg 的作用, 但仅 TG 值的

两组间差异达到统计学显著性($p<0.01$)。左旋(R)班布特罗10 mg/kg组, 注入Tyloxapol后TG, CHO, VLDL and LDL的值相当于无高血脂症的对照组相应值。左旋(R)班布特罗10 mg/kg对TG, CHO, VLDL and LDL值的降低作用明显地大于同样剂量的优降脂的作用。在高血脂的小鼠, 左旋(R)班布特罗10 mg/kg或消旋班布特罗10 mg/kg作用可使TG, CHO, VLDL and LDL各值接近无高血脂症小鼠的对照组的相应值; 其中左旋(R)班布特罗10 mg/kg可使甘油三酯(TG)从对照组水平上进一步明显减低。消旋班布特罗10 mg/kg, 优降脂(simvastatin) 10 mg/kg 则没有与左旋(R)班布特罗10 mg/kg相似的作用。

C. 左旋(R)班布特罗对大鼠心血管的影响。

试验方法: SD 大鼠, 体重250—300克。随机分为两组, 每组6只, 雌雄各半。动物麻醉后, 切开一侧颈总动脉, 插入一塑料导管。导管连接压力换能器, 记录平均动脉血压(MBP)和心率(HR)。经另一侧颈总动脉插入一导管, 使之进入左心室; 导管一端与连接压力换能器, 分别记录左室收缩压(LVSP)和其一阶微分, LVSP(dp/dt)作为心脏变力性效应的指标。左旋(R)班布特罗和消旋班布特罗分别溶解于生理盐水, 经静脉注入动物, 剂量30 mg/kg。在注入药物前(对照)、和注入后出现最大发应时(试验组)、以及注入药后20分钟时(恢复期)分别记录动物的HR, MBP 和最大dp/dt(Max dp/dt)。试验用左旋(R)班布特罗和消旋班布特罗均为盐酸盐。

试验结果: 试验结果总结于表7。左旋(R)班布特罗组动物在给药(30mg/kg)后出现心率增加和Max dp/dt增大, 这表明, 该剂量左旋(R)班布特罗有一定的变时性和轻微的变力性作用。不过与注入等剂量的消旋班布特罗组动物相比, 左旋(R)班布特罗的上述作用并不明显。与消旋班布特罗组动物的Max dp/dt的增加量相比, 左旋(R)班布特罗组的Max dp/dt 增加量显著较少。增加量分别为用药前的24.4%(消旋班布特罗)和用药前的12.9%(左旋(R)班布特罗)($p<0.01$)。这表明, 在同一剂量, 左旋(R)班布特罗对心脏的变力性作用小于消旋班布特罗。在恢复期(给药后20分钟), 左旋(R)班布特罗组动物心率基本恢复至用药前水平(用药前的3.7%, $\Delta 15\pm 9$), 而消旋班布特罗组动物的相应值明显较高(9.5%, $\Delta 40\pm 9$), 相比差异显著($p<0.01$)。这表明, 左旋(R)班布特罗对心脏的变时性作用的持续时间要明显少于消旋班布特罗。

表 7. 左旋 (R) 班布特罗和消旋班布特罗 (30 mg/kg, i.v) 对大鼠心血管的影响

	心率 (次/分)	用药前 的 (%)	平均动脉压 (Kpa)	用药前 的 (%)	最大 dp/dt (Kpa/秒)	用药前 的 (%)
左旋班布特罗组:						
用药前	402±38		14.1±1.7		297±84	
用药后	△ 95±12	23.6%	4.9±0.8	34.8%	38.4±3.5*	12.9%
20 分钟后	△ 15±9*	3.7%	1.3±0.6	9.8%	14.8±3	5.0%
消旋班布特罗组:						
用药前	412±67		13.3±1		268±71	
用药后	△ 85.8±5	20.6%	4.2±0.5	31.6%	65.4±9*	24.4%
20 分钟后	△ 40±9*	9.5%	1.1±0.4	8.3%	13±3.8	4.8%

* 左旋班布特罗组的数值与消旋班布特罗组的相应值比有显著性差异 ($p<0.01$)

本发明化合物左旋 (R) 班布特罗的药理学试验结果的讨论

本发明化合物左旋 (R-) 班布特罗:

1. 是一种有效的支气管扩张剂, 口服后对致痉挛物质和抗原所引起的哮喘发应有长效的保护和对抗作用。在这方面, 左旋 (R) 班布特罗的药效约为消旋班布特罗药效的两倍。

2. 对吸入气雾组织胺的清醒荷兰猪, 口服后即可预防严重哮喘所致摔倒, 还可增加摔倒潜伏期时间。在这方面, 左旋 (R) 班布特罗的药效约为消旋班布特罗药效的两倍。

3. 口服剂量 4 mg/kg 时, 即可预防动物吸入气雾组织胺所致哮喘摔倒, 而达到相似的预防作用须口服 8 mg/kg 剂量的消旋班布特罗, 口服左旋 (R) 班布特罗的这些保护作用可持续 24 小时。

4. 对高血脂症动物具有有效的降血脂作用, 并可使其血浆甘油三酯、胆固醇、VLDL 和 LDL 的浓度达到正常对照动物的水平。在降低高血脂症动物动物血中的甘油三酯方面, 左旋 (R) 班布特罗的药效作用明显大于消旋班布特罗和优降脂 (simvastatin)。

5. 与等量的消旋班布特罗相比, 对在大鼠心脏的变时性和变力性等副作用较小。

总之, 本发明化合物左旋 (R) 班布特罗为治疗哮喘症提供一个好的选择, 它比已上市的消旋班布特罗具有显著更好的疗效/副作用比。与消旋班布特罗相比, 本发明化合物是一种更有效的支气管痉挛的舒张剂, 而且还具有更少的心脏副作用。本发明化合物还是一种有效的降血脂剂, 特别是可有效的治疗高甘油三酯血症。