



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105142638 B

(45)授权公告日 2020.08.28

(21)申请号 201480015150.8

(22)申请日 2014.03.17

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 105142638 A

(43)申请公布日 2015.12.09

(30)优先权数据  
61/799,177 2013.03.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2015.09.14

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/GB2014/050834 2014.03.17

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02014/140648 EN 2014.09.18

(73)专利权人 维罗纳制药公司

地址 英国加的夫

(72)发明人 M·J·A·沃克 M·卡佐拉  
L·卡尔泽塔

(74)专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127

代理人 庞东成 张培源

(51)Int.Cl.  
A61K 31/495(2006.01)  
A61K 31/519(2006.01)  
A61P 11/00(2006.01)

审查员 童瑶

权利要求书1页 说明书25页 附图11页

(54)发明名称

药物组合

(57)摘要

本发明提供一种组合物,所述组合物包含  
(a)PDE3/PDE4抑制剂,其是9,10-二甲氧基-2-(2,4,6-三甲基苯基亚氨基)-3-(N-氨甲酰基-2-氨基乙基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-4-酮或其药学上可接受的酸加成盐,和(b)毒蕈碱受体拮抗剂。

1. 一种适于吸入施用的组合物,所述组合物包含(a)治疗有效量的PDE3/PDE4抑制剂,其是9,10-二甲氧基-2-(2,4,6-三甲基苯基亚氨基)-3-(N-氨甲酰基-2-氨基乙基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-4-酮或其药学上可接受的酸加成盐,和(b)治疗有效量的毒蕈碱受体拮抗剂,

其中,所述毒蕈碱受体拮抗剂是阿托品、甲基阿托品、后马托品、莨菪碱、东莨菪碱、格隆铵、异丙托铵、氧托铵、克利铵或甲哌佐酯。

2. 如权利要求1所述的组合物,其中,所述PDE3/PDE4抑制剂(a)是9,10-二甲氧基-2-(2,4,6-三甲基苯基亚氨基)-3-(N-氨甲酰基-2-氨基乙基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-4-酮。

3. 如权利要求1或2所述的组合物,其中,所述毒蕈碱受体拮抗剂(b)是阿托品、东莨菪碱、格隆铵、异丙托铵或氧托铵。

4. 如权利要求1或2所述的组合物,其中,所述毒蕈碱受体拮抗剂(b)是阿托品或格隆铵。

5. 如权利要求1或2所述的组合物,其中,所述组合物是固定组剂。

6. 一种药物组合物,所述药物组合物包含权利要求1~5中任一项所定义的组合物以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

7. 如权利要求6所述的药物组合物,其通过干燥粉末吸入器或刻度剂量吸入器施用。

8. 如权利要求1、2、6或7中任一项所述的组合物,所述组合物用于治疗有需要的受试对象的呼吸道疾病。

9. 如权利要求8所述的组合物,其中,所述呼吸道疾病是哮喘、枯草热、过敏性鼻炎、支气管炎、肺气肿、支气管扩张症、慢性阻塞性肺病、成人呼吸窘迫综合征、囊性纤维化、肺纤维化或间质性肺病。

10. 如权利要求8所述的组合物,其中,所述呼吸道疾病是过敏性哮喘、类固醇抵抗性哮喘、重度哮喘或小儿哮喘。

11. 如权利要求8所述的组合物,其中,所述呼吸道疾病是肺部纤维化。

12. 如权利要求8所述的组合物,其中,所述呼吸道疾病是哮喘或慢性阻塞性肺病。

13. 如权利要求8所述的组合物,其中,所述受试对象是人类。

14. 一种产品,所述产品包含(a)权利要求1或2所定义的PDE3/PDE4抑制剂,和(b)权利要求1、3或4中任一项所定义的毒蕈碱受体拮抗剂,(a)和(b)同时、分开或依次用于治疗权利要求8~12中任一项所定义的疾病。

15. (a) 权利要求1或2所定义的PDE3/PDE4抑制剂和(b)权利要求1、3或4中任一项所定义的毒蕈碱受体拮抗剂在制备用于治疗权利要求8~12中任一项所定义的地方的药物中的应用。

## 药物组合

### 技术领域

[0001] 本申请要求2013年3月15日提交的美国临时专利申请第61/799,177号的优先权,通过参考将其并入。

[0002] 本发明涉及一种新型的药物组合,其在治疗呼吸道疾病和炎症疾病时具有令人惊奇的治疗功效。

### 背景技术

[0003] 对于治疗诸如哮喘和慢性阻塞性肺病(COPD)等呼吸道疾病存在许多不同的治疗途径。例如,已知皮质类固醇、 $\beta_2$ -肾上腺素受体激动剂、磷酸二酯酶(PDE)4抑制剂、PDE3抑制剂、白三烯受体拮抗剂、表皮细胞生长因子受体(egfr)激酶抑制剂、p38激酶抑制剂、NK 1激动剂和毒蕈碱受体拮抗剂都可用于治疗呼吸道疾病。

[0004] RPL554(9,10-二甲氧基-2-(2,4,6-三甲基苯基亚氨基)-3-(N-氨甲酰基-2-氨基乙基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-4-酮)是PDE3/PDE4双重抑制剂,并且描述于WO 00/58308。作为组合性PDE3/PDE4抑制剂,ARPL554兼具抗炎和支气管扩张活性,并用于治疗诸如哮喘和慢性阻塞性肺病(COPD)等呼吸道疾病。

[0005] 已知不同种类的呼吸道药物可以组合使用来治疗呼吸道疾病。但是,几乎观察不到此类组合的各成分之间的协同相互作用。

### 发明内容

[0006] 本发明令人惊奇的发现RPL554能够增强毒蕈碱受体拮抗剂的活性。因此RPL554和毒蕈碱受体拮抗剂的组合协同地相互作用来提供改善的治疗效果。

[0007] 药物之间的真正协同相互作用是罕见的。协同相互作用的存在可以通过例如Berenbaum法、Bliss独立(BI)标准和/或Loewe累加(LA)模型经由曲线等效图(参见Berenbaum,1977;Greco等,1995;Grabovsky和Tallarida,2004;Tallarida,2006;Goldoni和Johansson,2007;Tallarida和Raffa,2010)来确定。

[0008] 根据Berenbaum法,组合的协同通过下述步骤检测:首先确定每种组成药物作为单治疗剂的剂量-响应曲线以鉴定各药物的低剂量和高剂量。然后测定低剂量的各药物的组合的效果。如果低剂量的各药物的组合产生的响应大于作为单治疗剂的单独的各高剂量,则两种药物之间存在真正协同。

[0009] 本发明人已经令人惊奇地发现,当RPL554与毒蕈碱受体拮抗剂组合时产生Berenbaum法意义上的真正协同效果。在使用低剂量的各组成药物时获得的增强治疗效果是临床情况中高度期望的,并且例如减少患者经历的副作用。

[0010] 因此,本发明提供一种组合物,所述组合物包含(a)PDE3/PDE4抑制剂,其是9,10-二甲氧基-2-(2,4,6-三甲基苯基亚氨基)-3-(N-氨甲酰基-2-氨基乙基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-4-酮或其药学上可接受的酸加成盐,和(b)毒蕈碱受体拮抗剂。

[0011] 本发明还提供一种药物组合物,其包含本发明的组合物和一种或多种药学上可接

受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0012] 本发明还提供一种治疗有需要的受试对象中的疾病或状况的方法,所述疾病或状况基于(i)血管或支气管的急性或慢性阻塞,或(ii)急性或慢性炎症,所述方法包括对所述受试对象施用(a)本文所定义的PDE3/PDE4抑制剂和(b)毒蕈碱受体拮抗剂。

[0013] 本发明还提供一种产品,所述产品包含(a)本文所定义的PDE3/PDE4抑制剂,和(b)毒蕈碱受体拮抗剂,(a)和(b)同时、分开或依次用于治疗本文所定义的疾病或状况。

[0014] 本发明还提供(a)本文所定义的PDE3/PDE4抑制剂在制备药物中的应用,所述药物用于与(b)毒蕈碱受体拮抗剂同时、分开或依次使用以组合治疗本文所定义的疾病或状况。

[0015] 本发明还提供(b)毒蕈碱受体拮抗剂在制备药物中的应用,所述药物用于与(a)本文所定义的PDE3/PDE4抑制剂同时、分开或依次使用以组合治疗本文所定义的疾病或状况。

[0016] 本发明还提供(a)本文所定义的PDE3/PDE4抑制剂,和(b)毒蕈碱受体拮抗剂在制备用于治疗本文所定义的疾病或状况的药物中的应用。

[0017] 本发明还提供用于治疗本文所定义的疾病或状况的本发明的组合物。

[0018] 本发明还提供本文所定义的PDE3/PDE4抑制剂,其用于与毒蕈碱受体拮抗剂组合治疗本文所定义的疾病或状况。

[0019] 本发明还提供毒蕈碱受体拮抗剂,其用于与本文所定义的PDE3/PDE4抑制剂组合治疗本文所定义的疾病或状况。

## 附图说明

[0020] 图1:线状图表示用RPL554温育50分钟后对EFS引起的人分离支气管制样收缩的抑制。显示的点来自用n=5的不同受试对象的样品进行的试验,将其表示为平均值±SEM;\*\*\*P<0.001相对于对照。

[0021] 图2:RPL554和阿托品对由乙酰胆碱导致的次大收缩引起的人支气管舒张。显示的点来自用n=5的不同受试对象的样品进行的试验,将其表示为平均值±SEM;\*\*\*P<0.001相对于阿托品。

[0022] 图3:在被动致敏的人分离支气管中增加剂量的RPL554对组胺的收缩效果的影响。显示的点来自用n=5的不同受试对象的样品进行的试验,将其表示为平均值±SEM;\*\*\*P<0.001相对于被动致敏的对照。

[0023] 图4:阿托品和RPL554之间的低浓度相互作用(10nM和100nM)。数据来自用n=5的不同受试对象的样品进行的试验,将其表示为平均值±SEM。\*p<0.05和\*\*p<0.01。

[0024] 图5:对于RPL554与阿托品组合的BI药物相互作用模型进行响应表面分析获得的相互作用表面。水平轴表示化合物的浓度,垂直轴表示ΔE(舒张,%).0平面表示BI相互作用,而0平面上的体积表示协同(正ΔE)相互作用。相互作用的量级与ΔE直接相关,3D图的不同色调表示协同的不同百分比带(10%)。各个交叉点表示对来自不同受试对象的样品(n=5)进行的试验的平均值。

[0025] 图6:条形图表示对阿托品(空心柱;阿托品,nM)、RPL554(实心柱;nM)的舒张响应,对各剂量组合的累加响应(斑点柱;累加)和对各剂量组合的观察到的舒张响应(深色斑点柱;组合1:1)。各激动剂的浓度在X轴上示出。各条表示平均值,垂直线表示标准偏差(N=

5)。在累加响应的情况下,使用Tallarida和Raffa (2010)的方法估算平均值。 $*P<0.05$  (经调整),参照累加响应(使用单样品t检验)。

[0026] 图7:在静脉内施用RPL554单独(●)或与 $2\mu\text{g}/\text{kg}$ 阿托品的组合(▲)之后气道阻塞(由静脉内(iv.)施用蛙皮素( $2\mu\text{g}/\text{ml}$ ;  $5\text{ml}/\text{hr}$ )导致)的降低。

[0027] 图8:在静脉内施用RPL554单独(●)或与 $2\mu\text{g}/\text{kg}$ 阿托品的组合(▲)之后平均动脉血压的降低。

[0028] 图9:在静脉内施用阿托品之后气道阻塞(由静脉内(iv.)施用蛙皮素( $2\mu\text{g}/\text{ml}$ ;  $5\text{ml}/\text{hr}$ ))导致的降低。

[0029] 图10:静脉内施用阿托品后平均动脉血压的降低。

[0030] 图11:在不同电场刺激(EFS)频率下支气管张力(bronchial tone)对格隆铵的浓度响应曲线(CRC)。

[0031] 图12:在不同浓度的格隆铵下支气管张力对格隆铵的频率响应曲线以及曲线(AUC)图下面积。

[0032] 图13:在不同电场刺激(EFS)频率下支气管张力对于RPL554的浓度响应曲线(CRC)。

[0033] 图14:支气管张力对于不同浓度的RPL554的频率响应曲线。

[0034] 图15:在(A) 3Hz、(B) 10Hz和(C) 25Hz的EFS下人分离支气管对RPL554、格隆铵以及RPL554和格隆铵的收缩响应,以及各频率下的AUC比较。

[0035] 图16:对RPL554、格隆铵的舒张响应、对RPL554和格隆铵的组的预期响应,以及对RPL554和格隆铵的组的观察到的响应。

[0036] 图17:在诱导次大收缩的卡巴胆碱(CCh)下人分离支气管对RPL554和格隆铵的浓度响应曲线。

[0037] 图18:对人类小支气管( $<1\text{mm}$ 的直径)由RPL554和格隆铵的组合引起的预期的和观察到的舒张响应。

[0038] 图19:由RPL554和格隆铵的组合引起的观察到和预期的舒张响应之间的 $\Delta$ 效应。

## 具体实施方式

[0039] 本文使用以下缩略语:

[0040] RPL554:9,10-二甲氧基-2-(2,4,6-三甲基苯基亚氨基)-3-(N-氨甲酰基-2-氨基乙基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-4-酮;ANOVA:方差分析;BI:Bliss独立;COX:环氧合酶;EC30:引起30%最大效应所需的浓度;EC50:引起50%最大效应所需的浓度;EC70:引起70%最大效应所需的浓度;EFS:电场刺激;Emax:最大效应;KH:Krebs-Henseleit缓冲液;LA:Loewe累加;和PDE:磷酸二酯酶。

[0041] 术语“药学上可接受的”是指不是生物学上或在其他方面不合需要的材料。例如,术语“药学上可接受的载体”是指可以引入组合物并施用至受试对象/患者且不引起不合需要的生物效应或以与组合物的其它成分以无害方式相互作用的材料。此类药学上可接受的材料通常满足毒理学和制造测试的所需标准,并且包括由美国食品药品监督管理局鉴定为合适的无活性成分的那些材料。

[0042] 术语“药学上可接受的酸加成盐”是指不是生物学上或在其他方面不合需要的材

料药学的酸加成盐。此类药学上可接受的酸加成盐对本领域技术人员而言是已知的。

[0043] 术语“治疗有效量”是指当施用至需要治疗的受试对象时足以实现治疗的量。具体而言，“有效”量是指获得所需结果需要的量，“治疗有效”量是获得所需治疗结果需要的量。例如，为了拮抗毒蕈碱受体，“有效量”是毒蕈碱受体的拮抗量。类似地，对于治疗慢性阻塞性肺病 (COPD) 的治疗有效量是实现所需治疗结果的量，所需治疗结果可以是疾病预防、改善、抑制或减轻。

[0044] 本文使用的“治疗”是指治疗诸如哺乳动物 (特别是人) 等受试对象中的疾病或医学状况 (例如 COPD)，其包括：(a) 预防疾病或医学状况的发生，即对受试对象进行预防性治疗；(b) 改善疾病或医学状况，即，消除受试对象中的疾病或医学状况或引起受试对象中的疾病或医学状况消退；(c) 抑制受试对象中的疾病或医学状况，即减慢或阻滞受试对象中的疾病或医学状况的发展；或 (d) 减轻受试对象中的疾病或医学状况的症状。例如，术语“治疗 COPD”会包括预防 COPD 发作、改善 COPD、抑制 COPD 或减轻 COPD 的症状。术语“受试对象”旨在包括需要治疗或疾病预防的那些动物 (其目前正在接受治疗以用于疾病预防或治疗特定疾病或医学状况)，例如人类，以及在检验 (例如动物模型) 中正在进行本发明组合物评价或使用的测试受试对象。

[0045] PDE3/PDE4 抑制剂

[0046] 本发明中使用的 PDE3/PDE4 抑制剂是 9,10-二甲氧基-2-(2,4,6-三甲基苯基亚氨基)-3-(N-氨甲酰基-2-氨基乙基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[6,1-a] 异喹啉-4-酮 (也称为 RPL554) 或其药学上可接受的酸加成盐。

[0047] 通常而言，PDE3/PDE4 抑制剂是 9,10-二甲氧基-2-(2,4,6-三甲基苯基亚氨基)-3-(N-氨甲酰基-2-氨基乙基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[6,1-a] 异喹啉-4-酮。因此优选 9,10-二甲氧基-2-(2,4,6-三甲基苯基亚氨基)-3-(N-氨甲酰基-2-氨基乙基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[6,1-a] 异喹啉-4-酮的游离碱。

[0048] 毒蕈碱受体拮抗剂

[0049] 毒蕈碱受体拮抗剂 (MRA) 是阻断毒蕈碱乙酰胆碱受体的活性的化合物。本领域技术人员能够使用本领域技术人员公知的检验毫不费力地确定给定的化合物是否阻断毒蕈碱乙酰胆碱受体。

[0050] 本发明的发现是 RPL554 能够增强两种结构不同的毒蕈碱受体拮抗剂 (即阿托品和格隆铵) 的活性。基于使用两种结构不同的毒蕈碱受体拮抗剂的该发现，可得出下述结论：利用 RPL554 观察到的协同相互作用归因于这些化合物作为毒蕈碱受体拮抗剂的活性，而不是归因于这些化合物的特定结构。因此可得出下述结论：对于具有毒蕈碱受体拮抗剂活性的所有化合物，可以预期与 RPL554 具有协同作用。

[0051] 通常而言，毒蕈碱受体拮抗剂是阿托品、甲基阿托品、后马托品、莨菪碱、东莨菪碱、异丙托铵 (ipratropium)、氧托铵 (oxitropium)、噻托铵 (tiotropium)、甲胺太林 (methantheline)、丙胺太林 (propantheline)、辛托品、克利铵 (clidinium)、甘罗溴铵 (copyrrolate) (Robinul)、异丙酰胺 (isopropamide)、甲哌佐酯 (mepenzolate)、三乙己苯铵 (tridihexethyl)、己环铵、环喷托酯、托吡卡胺、三己芬迪、哌仑西平、替仑西平、AF-DX116 和美索曲明等。例如，毒蕈碱受体拮抗剂是阿托品、硫酸阿托品、阿托品氧化物、甲基阿托品硝酸酯、氢溴后马托品、氢溴莨菪碱 (d,1)、氢溴东莨菪碱、异丙托溴铵、氧托溴铵、噻

托溴铵、甲胺太林、溴丙胺太林、溴甲辛托品、克利溴铵、甘罗溴铵、碘化异丙酰胺、溴化甲哌佐酯、氯化三乙己苯铵 (Pathilone)、甲硫己环铵、环喷托酯盐酸盐、托吡卡胺、三己芬迪盐酸盐、哌仑西平、替仑西平、AF-DX116和美索曲明等。毒蕈碱受体拮抗剂的其它代表性实例包括阿地铵 (例如阿地溴铵) 和茈地铵 (例如茈地溴铵)。

[0052] 通常而言,毒蕈碱受体拮抗剂是阿托品、东莨菪碱、格隆铵 (glycopyrrolate, 或 glycopyrronium)、异丙托铵、噻托铵、氧托铵、哌仑西平、替仑西平、阿地铵 (aclidinium) 或茈地铵 (umeclidinium)。优选的是,毒蕈碱受体拮抗剂可以是阿托品、东莨菪碱、格隆铵、异丙托溴铵、噻托溴铵、氧托溴铵、哌仑西平、替仑西平、阿地铵或茈地铵。作为选择,毒蕈碱受体拮抗剂可以是阿托品、东莨菪碱、格隆溴铵、异丙托溴铵、噻托溴铵、氧托溴铵、哌仑西平或替仑西平。

[0053] 更优选的是,毒蕈碱受体拮抗剂是阿托品、异丙托溴铵或噻托铵。

[0054] 最优选的是,毒蕈碱受体激动剂是阿托品或格隆铵。

[0055] 毒蕈碱受体拮抗剂可选地是其消旋体、其对映异构体、其非对映异构体和其混合物的形式,并且可选地是其药学上可接受的酸加成盐的形式。用于形成毒蕈碱受体拮抗剂的加成盐的合适酸的典型实例是盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、甲磺酸、乙酸、富马酸、琥珀酸、马来酸和三氟乙酸。此外,可以使用上述盐的混合物。

[0056] 组合物、组剂 (combination)、药物组合物和制剂

[0057] 本发明的组合物包含 (a) PDE3/PDE4抑制剂,其是9,10-二甲氧基-2-(2,4,6-三甲基苯基亚氨基)-3-(N-氨甲酰基-2-氨基乙基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-4-酮或其药学上可接受的酸加成盐,和 (b) 毒蕈碱受体拮抗剂。

[0058] 通常,本发明的组合物是固定组剂 (fixed combination)。在固定组剂中,PDE3/PDE4抑制剂和毒蕈碱受体拮抗剂存在于同一组合物中。固定组剂可以用于同时施用PDE3/PDE4抑制剂和毒蕈碱受体拮抗剂。通常,固定组剂是干燥粉末组合物 (其优选适合于从干燥粉末吸入器递送)、适合于从喷雾器递送的溶液或者适合于从加压刻度剂量 (metered-dose) 吸入器递送的溶液或悬浮液。

[0059] 因此,例如固定组剂优选是包含PDE3/PDE4抑制剂和毒蕈碱受体拮抗剂的干燥粉末组合物。作为选择,固定组剂可以是包含PDE3/PDE4抑制剂和毒蕈碱受体拮抗剂的溶液 (通常是水性溶液),其适合于从喷雾器递送。作为选择,固定组剂可以是包含PDE3/PDE4抑制剂和毒蕈碱受体拮抗剂的溶液或悬浮液,其适合于从加压刻度剂量吸入器递送。

[0060] 固定组剂中的两种成分通常是相互混合的。

[0061] 作为选择,本发明的组合物可以是自由组合 (free combination)。在自由组合中,活性成分 (a) 和 (b) 通常彼此分离,并且包装入一个单元中以同时、基本上同时、分开或依次施用。

[0062] 通常,所述组合物是药物组合物,除了PDE3/PDE4抑制剂和毒蕈碱受体拮抗剂之外,其还包含一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。必要时,所述组合物可以含有其它治疗剂和/或配制剂。另一治疗剂的优选实例是 $\beta_2$ -肾上腺素受体激动剂。 $\beta_2$ -肾上腺素受体激动剂的实例是沙丁胺醇、舒喘灵 (albuterol)、比托特罗、非诺特罗、福莫特罗、茚达特罗、异他林、左沙丁胺醇、奥西那林、吡布特罗、沙甲胺醇、沙美特罗和特布他林。 $\beta_2$ -肾上腺素受体激动剂的优选实例是沙丁胺醇、沙美特罗、福莫特罗、舒喘灵和吡布特罗。

[0063] 本发明的组合物通常以药物组合物的形式对受试对象施用。此类药物组合物可以通过任何可接受的施用途径对受试对象施用,包括但不限于,吸入、口服、经鼻、局部(包括透皮)和胃肠外施用模式。优选的是通过吸入施用。此外,本发明的组合物可以例如通过以每天多剂量、每天单剂量或每周单剂量的形式口服施用。应该理解的是,在本文讨论的药物组合物中可以使用适合于特定施用模式的本发明组合物中使用的任何形式的活性试剂(即,游离碱、药学上可接受的盐、溶剂化物等)。

[0064] 本发明的药物组合物通常含有治疗有效量的活性剂。然而,本领域技术人员会意识到药物组合物可以含有多于治疗有效量的量(即,大容量组合物(bulk composition)),或者小于治疗有效量的量,即,个体单位剂量,其设计用于多次施用以实现治疗有效量。在一个实施方式中,所述组合物会含有约0.01重量%-95重量%的活性剂,包括,约0.01重量%-30重量%,例如约0.01重量%-10重量%,实际量取决于制剂本身、施用途径和给药频率等。在另一实施方式中,适于吸入的组合物例如包含约0.01重量%-30重量%的活性剂,又一实施方式包含约0.01重量%-10重量%的活性剂。

[0065] 在本发明的药物组合物中可以使用任何常规载体或赋形剂。特定载体或赋形剂或者载体或赋形剂的组合的选择取决于用于治疗特定受试对象或医学状况的类型或疾病状态的施用模式。在这点上,用于特定施用模式的合适组合物的制备在药学领域的技术人员的范围内。另外,此类组合物中使用的载体或赋形剂商购可得。具体而言,常规制剂技术描述于Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第20版,Lippincott Williams & White,Baltimore,Md.(2000);和H.C.Ansel等,Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,第7版,Lippincott Williams & White,Baltimore,Md.(1999)。

[0066] 可充当药学上可接受的载体的材料的代表性实例包括但不限于下述材料:糖类,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素,例如微晶纤维素及其衍生物,诸如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;黄蓍胶粉;麦芽;明胶;滑石;赋形剂,如可可脂和栓剂蜡;油,例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;二醇,如丙二醇;多元醇,如甘油、山梨糖醇、甘露醇和聚乙二醇;酯,如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,如氢氧化镁和氢氧化铝;藻酸;无热原水;等渗盐水;林格氏溶液;乙醇;磷酸盐缓冲液;压缩推进剂气体,例如氯氟烃和氢氟烃;和在药物组合物中使用的其它非毒性相容物质。

[0067] 药物组合物通常通过将活性剂/活性成分与药学上可接受的载体和一种或多种可选成分充分紧密混合或共混而制备。然后可以使用常规方法和设备将获得的均匀共混的混合物成型或填装成片剂、胶囊剂、丸剂、罐剂(canisters)、筒剂(cartridges)和分散剂等。

[0068] 通常而言,药物组合物适于吸入施用。药物组合物可以用于通过干燥粉末吸入器(DPI)或刻度剂量吸入器(MDI)施用。

[0069] 用于吸入施用的合适组合物通常为气溶胶或粉末的形式,例如为干燥粉末组合物。此类组合物通常使用公知的递送装置施用,例如喷雾吸入器、干燥粉末吸入器、刻度剂量吸入器,其实例于下文中描述。

[0070] 作为选择,包含活性剂/活性成分的组合物可以使用喷雾吸入器通过吸入施用。此类喷雾器装置通常产生高速气流,其使组合物喷射为薄雾,该薄雾被携带到受试对象的呼吸道中。因此,当配制用于在喷雾吸入器中使用时,通常将活性剂/活性成分溶解于合适的



载体中以形成溶液。作为选择,可以将将活性剂/活性成分微粒化并与合适的载体组合以形成可呼吸尺寸的微粒化颗粒的悬浮液,其中微粒化通常定义为使其中至少约90%的颗粒具有小于约10 $\mu$ m的质量中位直径。术语“质量中位直径”是指该直径使得一半质量的颗粒包含在更大直径的颗粒中,一半包含在更小直径的颗粒中。

[0071] 合适的喷雾器装置包括RespiMat<sup>RTM</sup> Soft Mist<sup>TM</sup> Inhaler (Boehringer Ingelheim)、AERx<sup>RTM</sup> Pulmonary Delivery System (Aradigm Corp.) 和PARI LC Plus Reusable Nebulizer (Pari GmbH)。用于在喷雾吸入器中使用的示例性组合物包含含有约0.05 $\mu$ g/mL~约10mg/mL的RPL554的等渗水溶液。在一个实施方式中,此类溶液具有约3.5~6的pH。

[0072] 作为选择,包含活性剂/活性成分的组合物可以使用干燥喷雾吸入器 (DPI) 通过吸入施用。此类DPI通常施用作为自由流动粉末的活性剂,在吸气过程中该粉末分散在受试对象的气流中。为了实现自由流动的粉末,活性剂/活性成分通常与合适的赋形剂一起配制,所述赋形剂例如乳糖、淀粉、甘露醇、右旋糖、聚乳酸、聚丙交酯-共-乙交酯和其组合。通常而言,将活性剂/活性成分微粒化并与赋形剂组合,以形成适于吸入的共混物。因此,在本发明的一个实施方式中,活性剂/活性成分为微粒化形式。例如,用于DPI的代表性组合物包含具有约1 $\mu$ m~约100 $\mu$ m粒径的干燥乳糖 (例如干燥磨碎乳糖) 和活性剂的微粒化颗粒。此类干燥粉末制剂可以例如通过将乳糖与活性剂组合,然后将成分干燥共混而制造。作为选择,必要时,活性剂可以不用赋形剂配制。然后通常将组合物填装至DPI中、或吸入筒或胶囊中,以用DPI进行使用。DPI对于本领域技术人员是公知的,并且许多此类装置可以商购获得,代表性装置包括Aerolizer<sup>RTM</sup> (Novartis)、Airmax<sup>TM</sup> (IVAX)、ClickHaler<sup>RTM</sup> (Innovata Biomed)、Diskhaler<sup>RTM</sup> (GlaxoSmithKline)、Diskus<sup>RTM</sup>或Accuhaler (GlaxoSmithKline)、Easyhaler<sup>RTM</sup> (Orion Pharma)、Eclipse<sup>TM</sup> (Aventis)、FlowCaps<sup>RTM</sup> (Hovione)、Handihaler<sup>RTM</sup> (Boehringer Ingelheim)、Pulvinal<sup>RTM</sup> (Chiesi)、Rotahaler<sup>RTM</sup> (GlaxoSmithKline)、SkyeHaler<sup>TM</sup>或Certihaler<sup>TM</sup> (SkyePharma)、Twisthaler (Schering-Plough)、Turbuhaler<sup>RTM</sup> (AstraZeneca) 和Ultrahaler<sup>RTM</sup> (Aventis) 等。

[0073] 作为选择,包含活性剂的组合物可以使用刻度剂量吸入器 (MDI) 通过吸入进行施用。此类MDI通常使用压缩推进气体排出测定量的活性剂。因此刻度剂量吸入器通常包含在液化推进剂中的活性剂的溶液或悬浮液,所述推进剂例如氯氟烃,如CCl<sub>3</sub>F或氢氟烷 (HFA),如1,1,1,2-四氟乙烷 (HFA 134a) 和1,1,1,2,3,3,3-六氟正丙烷 (HFA 227),不过考虑到氯氟烃影响臭氧层,通常优选HFA。HFA制剂的另外可选成分包括诸如乙醇或戊烷等共溶剂和诸如去水山梨糖醇三油酸酯等表面活性剂、油酸、卵磷脂和甘油。参见例如Purewal等的美国专利第5,225,183号、EP 0717987 A2 (Minnesota Mining and Manufacturing Company) 和WO 92/22286 (Minnesota Mining and Manufacturing Company)。用于在MDI中使用的代表性组合物包含约0.01重量%-5重量%的活性剂、约0-20重量%的乙醇;和约0-5重量%的表面活性剂,其余为HFA推进剂。此类组合物通常通过将冷却或加压的氢氟烷加入含有活性剂、乙醇 (如果存在) 和表面活性剂 (如果存在) 的合适容器中而制备。为了制备悬浮液,将活性剂微粒化,然后与推进剂组合。然后将制剂填装至气溶胶罐中,其形成MDI的一部分。MDI对于本领域技术人员而言是公知的,并且许多此类装置商购可得,代表性装置包括AeroBid Inhaler System (Forest Pharmaceuticals)、Atrovent Inhalation Aerosol (Boehringer

Ingelheim)、Flovent<sup>TM</sup> (GlaxoSmithKline)、Maxair Inhaler (3M)、Proventil<sup>TM</sup> Inhaler (Schering) 和 Serevent<sup>TM</sup> Inhalation Aerosol (GlaxoSmithKline)。作为选择,可以通过将表面活性剂的包涂液喷雾干燥在活性剂的微粒化颗粒上而制备。参见,例如WO 99/53901 (Glaxo Group Ltd.) 和WO 00/61108 (Glaxo Group Ltd.)。

[0074] 制备可呼吸性颗粒的方法和适于吸入给药的制剂和装置的另外实例描述于 Briggner 等的美国专利第5,874,063号; Trofast 的美国专利第5,983,956号; Jakupovic 等的美国专利第6,221,398号; Gao 等的美国专利第6,268,533号; Bisrat 等的美国专利第6,475,524号; 和 Cooper 的美国专利第6,613,307号。

[0075] 作为选择,药物组合物可以适于口服施用。用于口服施用的合适组合物为下述形式: 胶囊剂、片剂、丸剂、锭剂、扁囊剂、糖衣剂、粉末剂、颗粒剂; 在水性或非水性液体中的溶液或悬浮液; 水包油或油包水液体乳剂; 酏剂或糖浆剂等; 每种剂型含有预订量的活性剂。

[0076] 当意图以固体剂型 (例如胶囊剂、片剂和丸剂等) 口服施用时,所述组合物通常包含活性剂和一种或多种药学上可接受的载体,例如柠檬酸钠或磷酸氢二钙。固体剂型也可以包含: 填充剂或增量剂,如淀粉、微晶纤维素、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和/或硅酸; 粘合剂,如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯胶; 湿润剂,例如甘油; 崩解剂,如琼脂-琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、藻酸、某些硅酸盐和/或碳酸钠; 溶液阻滞剂,如石蜡; 吸收促进剂,如季铵化合物; 润湿剂,如鲸蜡醇和/或单硬脂酸甘油酯; 吸收剂,例如高岭土和/或膨润土; 润滑剂,如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠,和/或其混合物; 着色剂; 和缓冲剂。

[0077] 在药物组合物中也可以存在缓释剂、润湿剂、包涂剂、甜味剂、调味剂和芳香剂、防腐剂和抗氧化剂。用于片剂、胶囊和丸剂等的示例性包涂剂包括用于肠溶衣的那些,例如乙酸钠纤维素邻苯二甲酸酯、聚乙烯基乙酸邻苯二甲酸酯、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、甲基丙烯酸-甲基丙烯酸酯共聚物、乙酸钠纤维素偏苯三酸酯、羧甲基乙基纤维素和羟丙基甲基纤维素乙酸琥珀酸酯。药学上可接受的抗氧化剂的实例包括: 水溶性抗氧化剂,如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、偏亚硫酸钠 (sodium metabisulfate) 和亚硫酸钠等; 油溶性抗氧化剂,如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基化羟基苯甲醚、丁基羟基甲苯、卵磷脂、棕榈酸丙酯和 $\alpha$ -生育酚等; 金属螯合剂,如柠檬酸、乙二胺四乙酸、山梨糖醇、酒石酸和磷酸等。

[0078] 还可以通过使用不同比例的例如羟丙基甲基纤维素或其它聚合物基质、脂质体和/或微球体将组合物配制成使活性剂缓释或控释。此外,本发明的药物组合物可以包含遮光剂并可以配制成使得它们仅释放 (或优选的是,仅在胃肠道的特定部分释放) 活性剂,可选地是,以延迟方式释放。可以使用的包埋组合物的实例包括聚合性物质和蜡。活性剂也可以为微囊封装形式,适合时与一种或多种上述赋形剂一起进行微囊封装。

[0079] 举例而言,用于口服施用的合适的液体剂型包括药学上可接受的乳剂、微乳剂、溶液、悬浮液、糖浆剂和酏剂。液体剂型通常包含活性剂和惰性稀释剂,例如,如水或其它溶剂、增溶剂和乳化剂,如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苄醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油 (例如、棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢呋喃基醇、聚乙二醇和脱水山梨糖醇的脂肪酸酯,和它们的混合物。悬浮液可以含有助悬剂,例如,如乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨糖醇和脱水山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂-琼脂和黄蓍胶,以及其混合物。

[0080] 当意图口服施用时,本发明的药物组合物可以包装在单位剂型中。术语“单位剂型”是指适合于对受试对象给药的物理上离散的单位,即,各单位含有计算成单独或与一种或多种另外的单元组合产生所需治疗效果预定量的活性剂。例如,此类单位剂型可以是胶囊剂、片剂和丸剂等。

[0081] 本发明的组合物还可胃肠外(例如通过皮下、静脉内、肌肉内或腹膜内注射)施用。对于此类施用,活性剂可以以无菌溶液、悬浮液或乳液提供。用于制备此类制剂的示例性溶剂包括水、盐水、诸如丙二醇等低分子量醇、聚乙二醇、油、明胶、诸如油酸乙酯等脂肪酸酯,等等。通常的胃肠外制剂是活性剂的pH4-7的无菌水溶液。胃肠外制剂还可以含有一种或多种增溶剂、稳定化剂、防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。这些制剂可以通过利用无菌可注射介质、无菌试剂、过滤、照射或加热而灭菌。

[0082] 本发明的组合物还可以使用已知的透皮递送体系和赋形剂透皮施用。例如,可以将活性剂与诸如聚丙二醇、聚乙二醇单月桂酸酯和氮杂环烷-2-酮等等渗透增强剂混合,并引入贴剂或类似的递送体系。必要时可以在此类透皮组合物中使用包括凝胶剂、乳化剂和缓冲剂等另外的赋形剂。

[0083] 通过将RPL554与第二试剂组合,可以实现双重治疗,即PDE3/PDE4抑制活性和与第二试剂(毒蕈碱受体拮抗剂)有关的活性,在一些情况下通过施用两种组合物来实现,在一些情况下通过施用含有活性剂和第二试剂的单一组合物来实现。在组合治疗中,RPL554的施用量以及第二试剂的量,可小于在单一疗法中通常施用的量。

[0084] RPL554可以与第二活性剂(毒蕈碱受体拮抗剂)物理混合来形成含有两种试剂的组合物,或者每种试剂可以存在于分开的不同组合物中,将所述不同的组合物同时或依次对受试对象施用。例如,可以使用常规步骤和设备将RPL554与第二活性剂组合,以形成包含RPL554的活性剂和第二活性剂的组合。另外,活性剂可以与药学上可接受的载体组合,以形成包含RPL554、第二活性剂和药学上可接受的载体的药物组合物。在该实施方式中,通常将组合物的成分混合或共混以形成物理混合物。然后使用本文所述的任何途径将物理混合物以治疗有效量施用。

[0085] 作为选择,在施用至受试对象之前活性剂可以保持分离和独立(distinct)。在该实施方式中,在施用之前所述试剂不物理混合在一起,但是作为单独的组合物同时施用或分开数次施用。此类组合物可以单独包装或可以一起包装在试剂盒中。当分开数次施用时,第二试剂通常会在施用RPL554之后小于24小时施用。在其它实施方式中,该时间关系为施用RPL554后小于12小时、小于8小时、小于6小时、小于4小时、小于3小时、小于1小时、小于30分钟、小于10分钟、小于1分钟、或立即。这也称为依次施用。因此,RPL554可以使用利用对于各活性剂的单独的室(例如泡罩包装)的吸入递送装置通过同时吸入或与另一活性剂依次吸入而施用,其中依次是指在施用RPL554后立即施用或施用RPL554的某一预定时间后(例如1小时后或3小时后)施用。作为选择,所述组合物可以使用单独的递送装置,即每种试剂一种递送装置进行施用。另外,所述试剂可以通过不同的施用途径,即吸入一种并且口服施用另一种来递送。

[0086] 通常而言,所述试剂盒包含含有RPL554的第一剂型和含有本文提供的一种或多种第二试剂的至少一种另外的剂型,其量足以执行本发明的方法。第一剂型和第二(或第三等)剂型一起包含治疗有效量的活性剂,以治疗或预防受试对象中的疾病或医学状况。

[0087] 当包括第二试剂时,第二试剂以治疗有效量存在,即,通常以当与RPL554共施用时产生治疗有益效果的量进行施用。第二试剂可以为药学上可接受的酸加成盐、溶剂化物、光学上纯的立体异构体的形式。因此,下述第二试剂意图包括所有此类形式,并且商购可得,或者可以使用常规方法和试剂制备。第二试剂的合适剂量通常为约0.05 $\mu$ g/天~约500mg/天。

[0088] 疾病和状况

[0089] 本文定义的(a)PDE3/PDE4抑制剂和本文定义的(b)毒蕈碱受体拮抗剂的组合用于治疗有需要的受试对象中的疾病或状况,所述疾病或状况基于(i)血管或支气管的急性或慢性阻塞,或(ii)急性或慢性炎症。

[0090] 通常而言,所述疾病或状况选自:

[0091] 1.呼吸道疾病或状况:气管的阻塞性疾病,包括:哮喘,包括支气管、过敏性、内源性、外源性、运动诱发性、药物诱发性(包括阿司匹林和NSAID诱发性)和粉尘诱发性哮喘,无论是间歇性还是持续性,所有都是严重度的,以及气道高反应性的其它原因;慢性阻塞性肺病(COPD);支气管炎,包括传染病和嗜酸性粒细胞性支气管炎;肺气肿;支气管扩张症;囊性纤维化;结节病;农民肺及相关疾病;超敏性肺炎;肺纤维化,包括隐源性纤维化肺炎,特发性间质性肺炎,纤维化并发性抗肿瘤治疗和慢性感染,包括结核病和曲霉病以及其它真菌感染;肺移植的并发症;肺血管的血管性和血栓性疾病,以及肺动脉高压;镇咳活性,包括治疗与气道炎症和分泌性状况相关的慢性咳嗽,和医源性咳嗽;急性和慢性鼻炎,包括药物性鼻炎和血管运动性鼻炎;常年性和季节性过敏性鼻炎,包括神经性鼻炎(枯草热);鼻息肉;急性病毒感染,包括普通感冒,和因呼吸道合胞病毒引起的感染,流行性感冒,冠状病毒(包括SARS)和腺病毒。

[0092] 2.骨和关节疾病或状况:与骨关节炎/骨关节病相关或包括其的关节炎性皮炎,无论是原发性还是继发性的,例如先天性髋关节发育不良;颈腰椎炎,以及腰背和颈部疼痛;类风湿关节炎和斯提耳病;血清阴性脊柱关节病,包括强直性脊柱炎,银屑病性关节炎,反应性关节炎和未分化的脊柱关节病;脓毒性关节炎和其它感染相关的关节病(arthropathies)和骨疾病,诸如结核病,包括波特病和蓬塞综合征;急性和慢性晶体诱发的滑膜炎,包括尿酸盐贮积病、焦磷酸钙沉积病与磷灰石钙相关的腱、粘液囊和滑液炎症;贝切特病(Behcet's disease);原发性和继发性斯耶格伦综合征;全身性硬化和局限性硬皮病;系统性红斑狼疮、混合型结缔组织病和未分化结缔组织病;炎性肌病,包括皮肌炎和多肌炎;风湿性多肌病;幼年型关节炎(juvenile arthritis),包括无论何种关节分布的原发性炎性关节炎和相关综合征以及风湿热及其全身并发症;血管炎(vasculitide),包括巨细胞性动脉炎,高安动脉炎(Takayasu,arteritis)、丘-施综合征(Churg-Strauss syndrome)、结节性多动脉炎、微观多动脉炎,和与病毒感染、超敏反应、冷球蛋白和异蛋白相关的血管炎;腰背痛;家族性地中海热、穆-韦综合征(Muckle-Wells syndrome)和家族性爱尔兰热(Familial Hibernian Fever)、菊池病(kikuchi);药物诱发性关节痛、腱炎(tendonitides)和肌病;

[0093] 3.由于损伤[例如运动损伤]或疾病引起的疼痛和结缔组织再造的肌骨骼病症:关节炎(例如类风湿性关节炎、骨性关节炎、痛风或晶体关节病),其它关节病(例如椎间盘退化或颞下颌的关节退化),骨再造疾病(例如骨质疏松症,变形性骨炎或骨坏死),多软骨炎,

硬皮病,混合结缔组织病症,脊椎关节病或牙周病(例如牙周炎);

[0094] 4. 皮肤疾病或状况:银屑病、特应性皮炎、接触性皮炎或其它湿渗性皮肤病和迟发型超敏反应;植物性皮炎和光照性皮炎;脂溢性皮炎、疱疹样皮炎、扁平苔癣、萎缩性硬化性苔癣、坏疽性脓皮症、皮肤结节病、盘状红斑狼疮、天疱疮、类天疱疮、大疱性表皮松解、荨麻疹、血管性水肿、血管炎、中毒性红斑、表皮嗜嗜红细胞增多、斑秃、男性型秃发症、斯威特综合征(Sweet's syndrome)、韦-克综合征(Weber-Christian syndrome)、多形性红斑;蜂窝组织,包括传染性的和非传染性的;脂膜炎;皮肤淋巴瘤;非黑素瘤皮肤癌和其它发育不良性损害;药物诱发性疾病,包括固定性药疹;

[0095] 5. 眼睛疾病或状况:睑炎;结膜炎,包括多年性和春季变应性结膜炎;虹膜炎;前色素层炎和后色素层炎;脉络膜炎;自身免疫性疾病;影响视网膜的变性或炎性疾病;眼炎,包括交感性眼炎;结节病;感染,包括病毒、真菌和细菌感染;

[0096] 6. 胃肠道疾病或状况:舌炎、龈炎、牙周炎;食管炎,包括返流;嗜酸性粒细胞性胃肠炎、肥大细胞增多症、克罗恩病、结肠炎,包括溃疡性结肠炎、直肠炎、肛门瘙痒;腹部疾病、肠易激综合征和可以具有远离肠作用的食物相关变态反应(例如偏头痛、鼻炎或湿疹);

[0097] 7. 腹部疾病或状况:肝炎,包括自身免疫性、酒精性和病毒性肝炎;肝纤维化和肝硬化;胆囊炎;胰腺炎,包括急性胰腺炎和慢性胰腺炎;

[0098] 8. 生殖泌尿系统疾病或状况:肾炎,包括间质性肾炎和肾小球肾炎;肾病综合征;膀胱炎,包括急性和慢性(间质性)膀胱炎和杭纳溃疡(Hunner's ulcer);急性和慢性尿道炎、前列腺炎、附睾炎、卵巢炎和输卵管炎;女性阴道炎;佩罗尼病(Peyronie's disease);勃起功能障碍(男性和女性);

[0099] 9. 同种异体移植排斥:急性和慢性同种异体移植排斥,例如在肾、心脏、肝、肺、骨髓、皮肤或角膜移植后或输血后的急性和慢性同种异体移植排斥;或慢性移植抗宿主病;

[0100] 10. CNS疾病或状况:阿尔茨海默病和其它痴呆疾病,包括CJD和nvCJD;淀粉样变性;多发性硬化和其它脱髓鞘综合征;脑动脉粥样硬化和血管炎(vasculitis);颞动脉炎;重症肌无力;急性和慢性疼痛(急性、间歇性或持续性,无论是来源于中枢的还是外周的),包括内脏痛、头痛、偏头痛、三叉神经痛、不典型面痛、关节和骨痛、因癌症和肿瘤侵入引起的疼痛、神经性疼痛综合征,包括糖尿病、疱疹后和与HIV-相关的神经病变;神经类肉瘤病;恶性、感染性和自身免疫过程的中枢和外周神经系统并发症;

[0101] 11. 其它自身免疫性疾病和过敏性疾病,包括桥本甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、格雷夫氏病(Graves' disease)、阿狄森病(Addison's disease)、糖尿病、特发性血小板减少性紫癜、嗜酸细胞性筋膜炎、高-IgE综合征、抗磷脂综合征;

[0102] 12. 其它具有炎性或免疫性成分的疾病,包括获得性免疫缺陷综合征(AIDS)、麻风病、恶性皮肤网状细胞增多综合征(Sezary syndrome)和附肿瘤综合征;

[0103] 13. 心血管疾病或状况;动脉粥样硬化,影响冠状动脉和外周循环;心包炎;心肌炎、炎性和自身免疫性心肌病,包括心肌结节病;局部缺血性再灌注损伤;心内膜炎、心瓣炎和主动脉炎,包括传染性的(例如梅毒性的);血管炎;近静脉和外周静脉疾病,包括静脉炎和血栓形成,包括深部静脉血栓形成和静脉曲张并发症;

[0104] 14. 肿瘤:治疗常见癌症,包括前列腺、乳腺、肺、卵巢、胰腺、肠和结肠、胃、皮肤和

脑肿瘤和侵害骨髓(包括白血病)和淋巴组织增生系统的恶性淋巴瘤,诸如霍杰金淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)和非霍杰金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma);包括预防和治疗转移性疾病和肿瘤复发以及副肿瘤综合征;和

[0105] 15. 胃肠道疾病或状况:乳糜泄、直肠炎、嗜酸性肠胃炎、肥大细胞病、克罗恩病、溃疡性结肠炎、镜下结肠炎、未确定型结肠炎、肠易激疾病(irritable bowel disorder)、肠易激综合征(irritable bowel syndrome)、非炎性腹泻或具有远离肠的效应的食物相关的过敏症,例如,偏头痛、鼻炎以及湿疹。

[0106] 优选的是,所述疾病或状况是哮喘、过敏性哮喘、枯草热、过敏性鼻炎、支气管炎、肺气肿、支气管扩张症、慢性阻塞性肺病(COPD)、成人呼吸窘迫综合征(ARDS)、类固醇抵抗性哮喘、重度哮喘、小儿哮喘、囊性纤维化、肺纤维化、肺部纤维化、间质性肺病、皮肤病、特应性皮炎、银屑病、眼部炎症、脑缺血或自体免疫疾病。

[0107] 更优选的是,所述疾病或状况是哮喘或慢性阻塞性肺病(COPD)。

[0108] 治疗的受试对象通常是人类。

[0109] 通常而言,活性成分(a)和(b)是共施用的。优选的是,活性成分(a)和(b)包含在单一剂型中。

[0110] 作为选择,活性成分(a)和(b)可以分开施用。在活性成分(a)和(b)的施用之间可以存在时间延迟。

[0111] 活性成分(a)和(b)可以通过吸入施用。活性成分(a)和(b)可以通过气溶胶施用。

[0112] 每剂量施用的活性剂的量或者每天施用的总量可以预先确定,或者其可以在单独患者基础上通过考虑多种因素来确定,所述因素包括患者状况的性质和严重性,正在治疗的状况、患者的年龄、体重和综合健康、患者对活性剂的耐受性、施用途径、药理学考虑,例如活性剂的活性、功效、药代动力学和毒理学特性,和正在施用的任何第二试剂,等等。罹患疾病或医学状况(例如COPD)的患者的治疗可以以确定剂量或治疗医师确定的剂量开始,并且会持续预防、改善、抑制或减轻症状。进行此类治疗的患者通常会被常规监测,以确定疗法的功效。例如,在治疗COPD时,可以使用用力呼吸量(在1秒内测定)的显著改善来确定治疗的功效。用于本文描述的其它疾病和状况的类似指标对本领域技术人员而言是已知的,并且对于治疗医师而言容易获得。医师的连续监测会确保活性剂的最佳量会以任何给定时间施用,以及促进治疗持续时间的确定。当也施用第二试剂时这特别有价值,因为他们的选择、剂量和疗法的持续时间也需要调整。以此方式,治疗方案和给药计划可以随着治疗的过程进行调整,以使施用显示所需功效的最低量的活性剂,并使治疗仅持续成功治疗疾病或医学状况所需的时间。

[0113] 因此,在一个实施方式中,本发明的组合物用于治疗哺乳动物(包括人类和它们的伙伴动物(例如犬、猫等))中的平滑肌疾病。举例而言,此类平滑肌疾病包括膀胱过动症、慢性阻塞性肺病(COPD)和肠易激综合征。通常而言,用于治疗平滑肌疾病或由毒蕈碱受体接到的其它疾病的合适剂量为约0.14 $\mu$ g/kg/天~约7mg/kg/天的活性剂;包括约0.15 $\mu$ g/kg/天~约5mg/kg/天。对于平均70kg的人,这总计为约10 $\mu$ g/每天~约500mg/每天的活性剂。

[0114] 通常而言,本发明的组合物用于通过对患者施用治疗有效量的所述组合物而治疗哺乳动物(包括人类)中的肺部或呼吸道疾病,例如COPD和哮喘。通常而言,用于治疗肺部疾病的剂量为约10 $\mu$ g/天-1500 $\mu$ g/天。本领域技术人员将术语“COPD”理解为包括各种呼吸道

疾病,包括Barnes (2000) N.Engl.J.Med.343:269-78和其中引用的参考文献中例举的慢性阻塞性支气管炎和气肿。

[0115] 当通过吸入施用时,本发明的组合通常具有产生支气管舒张的效果。因此,在该方法的另一方面,本发明涉及在患者中产生支气管舒张的方法,所述方法包括对患者施用产生支气管舒张量的本发明组合物。通常而言,用于产生支气管舒张的治疗有效剂量为约10 $\mu$ g/天-1500 $\mu$ g/天。

[0116] 作为选择,本发明的组合物可用于治疗膀胱过动症。当用于治疗膀胱过动症时,典型剂量为约1.0mg/天-500mg/天。

[0117] 作为选择,本发明的组合物可用于治疗肠易激综合征。当用于治疗肠易激综合征时,本发明的组合物可以口服或直肠施用,并且典型剂量为约1.0mg/天-500mg/天。

[0118] 在安全性研究后,本发明发现在血压或心率方面RPL554不与毒蕈碱受体拮抗剂(例如阿托品)不利地相互作用。类似地,毒蕈碱受体拮抗剂(例如阿托品)的心血管效果不受RPL554影响。

[0119] 以下实施例说明本发明。

[0120] 实施例

[0121] 实施例1

[0122] 材料和方法

[0123] 组织的制备

[0124] 从因肺癌(但没有慢性气道疾病的病史)进行肺叶切除外科手术的24名受试对象(11名男性和13名女性,60.1 $\pm$ 1.6年龄)的切除的未患病区域取得肉眼上正常的肺的区域。

[0125] 立即将气道放在含有环氧合酶(COX)抑制剂吲哚美辛(5.0 $\mu$ M)的加氧Krebs-Henseleit缓冲液(KH)(mM:NaCl 119.0,KCl 5.4,CaCl<sub>2</sub>2.5,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>1.2,MgSO<sub>4</sub>1.2,NaHCO<sub>3</sub>25.0,葡萄糖11.7;pH 7.4)中,并在4 $^{\circ}$ C从“Regina Elena National Cancer Institute”或“Sant’ Andrea Hospital”转移至意大利罗马的“Tor Vergata University”大学的Surgery and Medicine Faculty中呼吸道研究实验室。受试对象都没有用茶碱、 $\beta_2$ -激动剂或糖皮质激素长期治疗。在外科手术日确定的血清IgE水平在正常范围。术前肺功能参数通常是正常的,并且没有呼吸道感染的征兆。

[0126] 在实验室中,从结缔组织和蜂窝组织切下气道。然后,将肺段支气管分离并在KH缓冲液中于冰箱温度贮存过夜。第二天早晨,将支气管切成环(n=120;厚度1mm-2mm;直径5mm-7mm),并转移至含有KH缓冲液(37 $^{\circ}$ C)的4400型四室10ml分离器官浴(Ugo Basile,VA-Italy),连续用95:5%的O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>混合物通气。

[0127] 药物的制备

[0128] 使用以下药物:乙酰胆碱、组胺、阿托品、罂粟碱和吲哚美辛。所有物质获自Sigma-Aldrich(St.Louis,美国)。除了吲哚美辛和奎宁之外,将药物溶解于蒸馏水中,吲哚美辛和奎宁溶解于乙醇中,然后在KH缓冲液中稀释。最大量的乙醇(0.02%)不影响分离组织的响应(Freas等,1989;Hatake和Wakabayashi,2000)。RPL554由英国伦敦的Verona Pharma PLC友情提供。将化合物以小的等分试样形式贮存于-80 $^{\circ}$ C直到其使用。

[0129] 张力测定

[0130] 将人支气管置于含有KH缓冲液(37 $^{\circ}$ C)的器官浴中,用吲哚美辛给药(5.0 $\mu$ M),用

95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>鼓泡,并在被动张力(0.5g-1.0g)下悬浮。将支气管环固定在器官浴中的钩上,其中一个钩用线与固定棒连接,另一个钩用线与等距力位移转换器(isometric force displacement transducer)系上。每10分钟用重复变化的药用KH缓冲液将气道平衡90分钟。用转换器(Fort 10 WPI,Basile,Instruments,意大利)测定等长张力的变化,并且通过乙酰胆碱(100μM)评估组织响应性;当响应到达稳定阶段时,将环洗涤3次,并使其平衡45分钟。

#### [0131] 研究设计

##### [0132] RPL554对电场刺激的影响

[0133] 将各器官浴装备有在组织旁边(离10mm)的两个铂金板电极(1cm<sup>2</sup>),以用于电场刺激。使用10Hz EFS(利用10V的恒定电流的双相脉冲,0.5ms,10s)的训练进行试验,利用3165多路脉冲放大器(Ugo Basile,VA-意大利)(Binks等,2001)第1小时每5分钟一个脉冲,然后在接下来的5小时每30分钟1个脉冲。在开始EFS训练后,将组织与RPL554(10μM或100μM)一起温育,直到达到对由电场刺激(EFS)引起的收缩响应的最大抑制。然后终止与药物一起温育,重复洗涤组织30分钟,然后每隔30分钟洗涤一次,直到药物施用后5小时。

##### [0134] RPL554对被动致敏支气管的舒张效果

[0135] 如此前描述的那样(Watson等,1997;Rabe,1998),使分离的人支气管环在含有KH缓冲液的管中在10%vol<sup>-1</sup>致敏血清不存在(非致敏对照环)或存在(致敏环)的情况下旋转过夜。恶化过程中的罹患特应性哮喘的患者(对常见气源性致敏原具有特异性的总IgE>250U ml<sup>-1</sup>)的受试对象提供血清供体的知情同意。通过将全血离心制备血清,并将血清样品在-80℃以200ml等分试验冷冻直到需要使用。

[0136] 第二天早上,在除去附着的肺泡和结缔组织之后,将支气管环转移至含有KH缓冲液(37℃)的器官浴中,并用95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>连续通气。将组织与RPL554(1μM、10μM和100μM)预温育30分钟,然后(在不经洗涤的情况下)在RPL554的存在下构建对组胺(10nM-1mM)的浓度响应曲线。

##### [0137] RPL554与毒蕈碱受体拮抗剂的协同效应

[0138] 为了测试RPL554与毒蕈碱受体拮抗剂组合诱导的可能协同舒张,将支气管环用引起70%最大效应(EC70)所需浓度的乙酰胆碱收缩,并使其稳定15分钟的时间。然后,构建浓度响应曲线以测试单独的各化合物RPL554和毒蕈碱受体拮抗剂;以及与毒蕈碱受体拮抗剂组合施用的RPL554,从而产生此前所述的等效剂量图(Greco等,1995;Tallarida,2001;Goldoni和Johansson,2007;Boik等,2008;Lee,2010)。

[0139] 在施用下一浓度之前,在各连续浓度之间采用20分钟间隔来达到稳定的舒张水平。完成试验时,添加罂粟碱(500μM)以使组织完全松弛,提供各组织的舒张可以与其相比的标准。

#### [0140] 结果分析

##### [0141] EFS研究的分析

[0142] 将EFS引起的支气管收缩张力测定为对照支气管的百分比,并且通过施用别处所述(Motulsky和Christopoulos,2004)的非线性回归拟合生物数据的模型而构建多项式曲线。将最大效应(E<sub>max</sub>)鉴定为由EFS刺激引起的最低收缩力,并且偏移(t<sub>1/2</sub>,分钟)表示引起最大舒张的一半的时间。如此前所述(Mercier等,2002),对于固定在分离器官浴系统中的



每3个支气管环,使用一个作为时间对照。

[0143] 浓度响应研究的分析

[0144] 使用对sigmoidal模型的适当曲线拟合来计算效应(E)、Emax和引起50%最大效应所需的浓度(EC50)。使用的等式是 $\log[\text{激动剂}] \text{ v.s. 响应、可变斜率}$ ,表示为 $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / \{1 + 10^{[(\text{LogEC50} - X) * \text{HillSlope}]}\}$  (Motulsky和Christopoulos,2004; Goodman等,2008)。将E/Emax表示为通过收缩剂引起的Emax的百分比;将EC50值转化为pD<sub>2</sub>以进行统计分析(Goodman等,2008),舒张响应表示为罂粟碱(500μM)引起的舒张的百分比。

[0145] 协同作用研究的分析

[0146] 通过应用Berenbaum法、Bliss独立(BI)标准和Loewe累加(LA)模型经由曲线等效图(Berenbaum,1977;Greco等,1995;Grabovsky和Tallarida,2004;Tallarida,2006;Goldoni和Johansson,2007;Tallarida和Raffa,2010)测定RPL554和毒蕈碱受体拮抗剂之间的可能协同作用的分析。

[0147] 为了应用Berenbaum法,对于EC50值评价相互作用指数,因此,如果相互作用指数<1,则认为该效应是协同的;如果相互作用指数>1,该效应是拮抗的,并且如果相互作用指数=0,认为该效应是累加的(Goldoni和Johansson,2007;Lee,2010)。

[0148] 通过以下等式表示两种试剂的BI理论: $E(x,y) = E_x + E_y - (E_x * E_y)$ ,其中E是分数效应,x和y是在组合试验中的两种化合物的浓度。如果组合效应高于上述等式的预期值,则认为相互作用是协同的,而当该效应较低,则相互作用是拮抗的。否则,该效应是累加的,不存在相互作用(Greco等,1995;Meletiadis等,2003;Boucher和Tam,2006;Goldoni和Johansson,2007;Boik等,2008;Lee,2010)。在该研究中,BI等式特征为X=RPL554和Y=毒蕈碱受体拮抗剂。

[0149] 来自各肺的支气管的阿托品和RPL554的对照浓度响应曲线拟合成4参数的逻辑等式,以计算Emax、斜率(nH)和效力(EC50)的参数评估值。以下参数评估Emax和nH(平均值±SD),然后使用阿托品(分别为 $66 \pm 14$ 、 $0.912 \pm 0.488$ 、 $1.181 (0.134 - 10.4) \mu\text{M}$ ,n=5)和RPL554(分别为 $100 \pm 0$ 、 $2.271 \pm 0.713$ 、 $21.2 (11.5 - 39.1) \mu\text{M}$ ,n=5)的EC50(几何平均数,95%CI)来计算对每对药物组合的累加响应,以计算协同作用(Tallarida and Raffa 2010)(Grabovsky和Tallarida 2004)。采用剂量等效的概念,将关系式 $a/A + b/B = 1$ 变形为 $b + \text{beq}(a) = B$ ,其中beq(a)是a的等效剂量,并且通过使两个单独的浓度响应曲线 $E_A = f(A)$ 和 $E_B = f(B)$ 相等而求解beq(a)。然后通过将B插入 $E_B = f(B)$ 中而计算相对于B的各剂量组合的累加响应( $E_{ab}$ )。计算对组合剂量观察到的舒张响应与累加响应之间的差,并使用单样品t检验进行分析以用于多重比较,使用Bonferroni校正对多重比较调整概率。出于说明性目的,分析1:1剂量组合的协同作用。

[0150] 统计分析

[0151] 对于各治疗组,所有值表示为平均值±SEM。通过学生t检验或必要时的方差分析(ANOVA)评估统计显著性,并且将统计显著性水平定义为 $P < 0.05$  (Motulsky,1995)。使用计算机软件进行所有数据分析(GraphPad Prism, San Diego California USA; Microsoft Excel, Redmond Washington USA)。

[0152] 与阿托品(毒蕈碱受体拮抗剂)组合施用的RPL554的协同效应

[0153] 为了测试RPL554与阿托品组合施用而诱导的协同舒张,将支气管环用引起70%最

大效应所需浓度 (EC70) 的乙酰胆碱收缩, 并使其稳定15分钟的时间。接下来, 构建浓度响应曲线以测试各化合物RPL554或阿托品单独; 或者与阿托品组合施用的RPL554, 从而产生等效图 (阿托品: RPL554, 为10:1~1:100), 这如别处 (Greco等, 1995; Tallarida, 2001; Goldoni和Johansson, 2007; Boik等, 2008; Lee, 2010) 所述。

[0154] 在施用下一浓度之前, 在各连续浓度之间采用20分钟间隔来达到稳定的舒张水平。完成试验时, 添加罂粟碱 (500 $\mu$ M) 以使组织完全松弛, 提供各组织的舒张可以与其相比的标准。

#### [0155] 结果

##### [0156] 支气管环的基线特性

[0157] 在用药物 (445 $\pm$ 98mg) 治疗之前, 由乙酰胆碱 (100 $\mu$ M) (440 $\pm$ 95mg) 诱导的收缩和由EFS (10Hz) 诱导的收缩在涉及湿重 (220.5 $\pm$ 16.5mg) 的研究中使用的分离人支气管环的基线特性之间没有显著差异 ( $P>0.05$ )。

[0158] 在初步试验中, 构建对乙酰胆碱 (1nM~1mM) 的浓度响应曲线, 以评估随后研究的次大响应 (约70%的最大响应; 1250 $\pm$ 190mg;  $n=5$ )。

##### [0159] RPL554对分离人类气道的支气管张力的影响

[0160] RPL554抑制在暴露于该药物之后保持至少5小时的人支气管组织的由EFS诱导的收缩响应 (图1)。RPL554以100 $\mu$ M ( $E_{max}$  91.33 $\pm$ 3.37%;  $T_{1/2}$  23.7 $\pm$ 12.3分钟) 的最大浓度消除这些对照响应。

[0161] RPL554引起用乙酰胆碱预收缩的人分离支气管组织的浓度依赖性舒张。在支气管舒张方面RPL554效力比阿托品低, 但是与阿托品相比, RPL554使组织完全舒张 ( $P<0.001$ )。来自各肺的支气管的阿托品和RPL554的对照浓度响应曲线拟合成4参数的逻辑等式, 以计算 $E_{max}$ 、斜率 (nH) 和效力 (EC50) 的参数评估值。以下参数评估阿托品 (分别为66 $\pm$ 14、0.912 $\pm$ 0.488、1.181 (0.134-10.4)  $\mu$ M,  $n=5$ ) 和RPL554 (分别为100 $\pm$ 0、2.271 $\pm$ 0.713、21.2 (11.5-39.1)  $\mu$ M,  $n=5$ ) 的 $E_{max}$ 和nH (平均值 $\pm$ SD) 以及EC50 (几何平均值, 95%CI) (图2)。

[0162] 与非致敏组织相比, 支气管的被动致敏增强了组胺的收缩效果。在被动致敏支气管中, 与未处理组织相比, 1和10 $\mu$ M的RPL554将对于组胺的浓度响应曲线显著地 ( $P<0.001$ ) 向左平移, 100 $\mu$ M的RPL554完全消除了组胺诱导的收缩 (图3, 表1)。

[0163] 表1: 在被动致敏支气管中RPL554对组胺诱导的收缩的影响。显示的数据来自用 $n=5$ 个不同受试对象的样品进行的试验, 将其表示为平均值 $\pm$ SEM; \*\*\* $P<0.001$  v.s. 被动致敏的对照。

		非致敏	被动致敏			
			对照	RPL554 1 $\mu$ M	RPL554 10 $\mu$ M	RPL554 100 $\mu$ M
[0164]	<b>E<sub>max</sub></b>	100.7 $\pm$ 1.7	101.8 $\pm$ 1.4	70.3 $\pm$ 2.7 ***	58.1 $\pm$ 2.2 ***	nd
	<b>pD<sub>2</sub></b>	4.82 $\pm$ 0.03 ***	5.29 $\pm$ 0.03	4.97 $\pm$ 0.07 ***	4.98 $\pm$ 0.07 ***	nd

##### [0165] RPL554和阿托品对人支气管张力的协同舒张效应

[0166] RPL554与阿托品的相互作用产生1nM~10 $\mu$ M (1nM:  $P<0.05$ ; 10nM和1 $\mu$ M:  $P<0.01$ ; 100nM和10 $\mu$ M:  $P<0.001$ ) 浓度范围的RPL554的显著协同效应, 并且对于RPL554 1 $\mu$ M和阿托品10nM的交叉浓度检测到最大协同作用 (BI  $\Delta$  效应: 0.54 $\pm$ 0.09)。与单独给予各药物诱导的

效应之和相比,通过将支气管环的舒张增加 $\approx 4.85$ 倍,低浓度的RPL554和阿托品协同地相互作用( $10\text{nM}$ ,  $P<0.05$ ,  $100\text{nM}$ ,  $P<0.01$ )。

[0167] 基于舒张效力的增强,等摩尔关系(1:1)的RPL554和阿托品对用乙酰胆碱预收缩的人支气管张力的结果表明了统计学上显著的BI相互作用( $P<0.01$ ) (表2)。

		RPL554 + 阿托品	
		观察的	预期的
[0168]	<b>E<sub>max</sub></b>	97.87 $\pm$ 1.50	98.68 $\pm$ 7.91
	<b>pD<sub>2</sub></b>	7.54 $\pm$ 0.31	5.55 $\pm$ 0.33
	<b><math>\Delta</math> 效应(观察的-预期的)</b>	1.99 $\pm$ 0.10**	

[0169] 表2:RPL554和阿托品(等摩尔,1:1)对乙酰胆碱诱导的次大收缩的舒张协同效应。显示的数据来自用 $n=5$ 的不同受试对象的样品进行的试验,将其表示为平均值 $\pm$ SEM。对于0相互作用假说的 $\Delta$ 效应(观察的v.s.预期的值)\*\* $P<0.01$ 。

[0170] 此外,Berenbaum分析证明,对于浓度在 $1\text{nM}\sim 10\mu\text{M}$ 的RPL554,RPL554和阿托品引起协同相互作用(相互作用指数: $0.09\pm 0.07$ ),并且RPL554显著地引起针对 $2.91\pm 0.44$ 对数的阿托品的舒张浓度响应曲线的向左平移( $P<0.05$ )。对于1:1剂量组合的阿托品和RPL554的观察到的响应和累加舒张响应之间存在统计学上显著的差异,表明协同作用(图6)。

[0171] 最后,使用BI法的3D表面分析证明,当与RPL554一起施用,阿托品在所有浓度均诱导了非常高且广的协同作用(图5)。

[0172] 已经证明,PDE3/PDE4被RPL554的选择性抑制引起分离的人气道的支气管张力的舒张,这拓展并支持了之前在分离的豚鼠气管中报道的观察(Boswell-Smith等,2006b)。在终止药物暴露后该抑制效应保持长达5小时,确认了该化合物在人气道中的长期持续的作用。此外,RPL554的作用是将由组胺或乙酰胆碱收缩的气道舒张。此外,在被动致敏的支气管中,在将组织与RPL554预先温育,对组织产生显著保护,使其免于外源性施用组胺所引起的收缩作用。此外,与毒蕈碱受体拮抗剂(阿托品)相关的PDE3/4的抑制证明了对ASM的舒张的协同效应。这些结果表明,在人支气管组织中RPL554是针对收缩剂的良好功能拮抗剂,并且当与毒蕈碱受体拮抗剂组合时,能够具有提供进一步的协同支气管舒张的能力。

[0173] 对由EFS引起的收缩响应,RPL554引起了浓度和时间依赖性抑制;针对EFS诱发的收缩响应,RPL554比其它PDE4抑制剂具有显著更长的作用持续时间(Spina等,1998; Boswell-Smith等,2006b)。

[0174] RPL554在抑制在用组胺收缩的被动致敏人支气管中的收缩响应方面特别有效,并且据报道在致敏豚鼠中各种选择性PDE3和PDE4抑制剂显著地削弱了由抗原诱导的急性支气管痉挛(Boswell-Smith等,2006a)。

[0175] 在被动致敏支气管中RPL554还明显减少了针对组胺的最大响应。

[0176] 本发明组合的安全性研究

[0177] 进行该研究来确定RPL554是否与毒蕈碱拮抗剂(阿托品)具有心血管相互作用。包括 $\beta_2$ 激动剂(沙丁胺醇)来完成。RPL554是双重PDE3/PDE4抑制剂,开发该抑制剂以作为具有可能的抗炎作用的吸入支气管舒张剂来治疗慢性阻塞性肺病(COPD)和哮喘。以心血管变化的形式,评估对以静脉推注给予的RPL554、沙丁胺醇和阿托品的心血管响应,并测定为血压

和心率方面的注射后峰值变化。该研究采用随机盲法,药物成对给出,以交替方式间隔5分钟,例如RPL554之后为沙丁胺醇,反之亦然。研究所选用的剂量产生心血管效应,和推测的血浆浓度,远大于用于吸入的情况。选择它们以测试在上述治疗条件下的可能相互作用。

[0178] 总结

[0179] 在该研究中,根据随机化设计检测(单独和组合)静脉施用的RPL554、沙丁胺醇和阿托品对麻醉大鼠中血压和心率的效应。从RPL554和沙丁胺醇的起始剂量-响应研究选择在平均血压(MBP)方面产生15mmHg-30mmHg增量和在心率(HR)方面产生每分钟30下-60下搏动增量的剂量。对于在血压或心率方面产生较少效果的阿托品,选择最大施用剂量以用于进一步研究。其后,以成对5分钟间隔施用的方式检测所选剂量。来自该研究的数据表明,在麻醉大鼠中,在心血管方面RPL554和沙丁胺醇之间没有相互作用,或者在对MBP或HR的效应方面RPL554和阿托品之间没有相互作用。为了严谨地测试可能的相互作用,研究所选的施用剂量和途径产生了用常规治疗剂量未看到的心血管效应。此外,据推测推注途径产生的血浆浓度比通过吸入给与的较低治疗剂量看到的血浆浓度高得多。该研究的目的在于使用上述正常条件以挑战上述治疗条件下的可能相互作用。

[0180] 程序

[0181] 对重量为200grms-250grms的来自Charles River的斯普拉-道来(Sprague-Dawley)雄性大鼠进行该研究。一旦大鼠送到实验室,就对其禁食和禁水1-3小时。出于试验目的通过腹膜内注射途径以100mg/kg的剂量使用仲丁硫巴比妥钠进行麻醉。无需补充麻醉剂,并且在试验阶段的最后将每只小鼠处死。该研究具有两部分:(I)起始剂量范围研究和(II)相互作用研究。研究的药物为:溶解于盐水中的RPL554(R)、沙丁胺醇(S)、阿托品(A)。

[0182] (I) 起始剂量范围研究

[0183] 起始剂量-范围研究如下进行:进行静脉推注剂量的三种药物的累积剂量-响应曲线以确定全部研究的三种药物中的每一种的合适剂量。从该起始剂量范围研究中选择RPL554和沙丁胺醇的剂量,从而在平均血压(MBP)方面产生15-30mmHg增量和在心率(HR)方面产生每分钟30-60下搏动增量。阿托品产生有限的心血管效应,因此选择高剂量作为施用剂量,有文献证明该剂量由明显的毒蕈碱受体阻断。该剂量范围研究包括4只大鼠,其中基于剂量加倍给予3种药物中每种的累积剂量。每5分钟提供每种药物的剂量进行静脉推注,不同药物之间间隔1小时。注射顺序为:对于动物1-S,R,A;动物2-R,A,S;动物3-A,S,R,和动物4-R,A,S如上指出,选择的注射剂量和途径为超常的,并且当通过吸入给予时以上剂量产生效果。

[0184] 从该研究中选择以下剂量用于随后的相互作用研究:

[0185] R=8 $\mu$ g/kg -8 $\mu$ g/mL,在0.9%盐水中

[0186] S=2 $\mu$ g/kg -2 $\mu$ g/mL,在0.9%盐水中

[0187] A=32 $\mu$ g/kg -32 $\mu$ g/mL,在0.9%盐水中

[0188] (II) 相互作用研究

[0189] 在该研究中,所有药物为单剂量,通过静脉内推注经由颈静脉插管并且以1mL/kg的体积给出。该研究设计采用随机盲法,使用3个系,每个系包含四只动物,总共12只动物。

[0190] 使用逐个系设计基于随机盲法对各动物提供药物对,其中每个系包含四只大鼠,如下进行注射:R1S2、S1R2、R1A2和A1R2(以随机顺序,其中1表示第一次提供的药物,2表示

第一药物后5分钟第2次提供的药物)。总共研究了3个系,因此使用总共12只大鼠,并且没有动物必须被替换。对12只动物出于临时分析的目的确定是否可以进一步研究,并且确定如果可以进一步研究的话是否需要更多的系和/或剂量调整(适应性设计),之后终止研究。

[0191] 使用其输出由AD Instruments PowerLab 26T处理的转换器从颈动脉测定血压。从ECG和血压追踪基于搏动间隔(beat to beat)计算心率。通过LabChart 6进行分析。使用LabChart 6中的功能完成测定。

[0192] 在对每次药物注射峰值响应时测定所有药物效应。施用沙丁胺醇的峰值响应时间对于血压为20秒,对于心率为60秒。对于RPL554,相应的时间对于血压为60-80秒,对于心率为2-4.5分钟。对于阿托品,对于血压和心率都是4分钟。

[0193] 将数据记录为以mmHg为单位的收缩压、舒张压和经计算的平均血压,而将心率记录为搏动/每分钟。对记录的值进行处理以从两个对照值提供血压和心率的药物-诱导变化。这些中的一个是在第一次注射之前的,第二个是第二次注射之前的。将计算的变化相对于这两个对照值标准化,并且表达为与对照值相比减少的阴性值或与对照值相比增加的阳性值。

[0194] 结果

[0195] 主要药代动力学

[0196] 表3. 在麻醉大鼠(n=3,对于每个平均值)中RPL554、沙丁胺醇和阿托品单独或在另一药物后对与对照( $\Delta$ )相比平均动脉血压和平均心率变化的效应

当与沙丁胺醇或阿托品配对时 RPL554 的效应				
	$\Delta$ MBP (mmHg 和%)		$\Delta$ HR (bpm 和%)	
RPL554, 在沙丁胺醇前*	-15	-15%	36	10%
RPL554, 在沙丁胺醇后**	-17	-16%	29	7%
RPL554, 在阿托品前*	-17	-16%	30	8%
RPL554, 在阿托品后**	-19	-20%	33	10%
当与 RLP554 配对时沙丁胺醇的效应				
	$\Delta$ MBP (mmHg and %)		$\Delta$ HR (bpm and %)	
沙丁胺醇, 在 RPL554 前*	-32	-30%	58	18%
沙丁胺醇, 在 RPL554 后***	-23	-24%	43	11%
当与 RLP554 配对时阿托品的效应				
	$\Delta$ MBP (mmHg 和 %)		$\Delta$ HR (bpm 和 %)	
阿托品, 在 RPL554 前*	-5.0	-5%	6.3	1%
阿托品, 在 RPL554 后****	-2.7	-3%	21	5%

[0197] [0198] 将药物成对地以5分钟间隔作为静脉推注给予。 $\Delta$ 值是峰值效应相对于给药前值的差,表示为相对于给药前值的变化或百分比变化。

[0199] \*=相对于没有预先药物处理的药物的对照响应

[0200] 测定的主要药代动力学变量是采用计算的平均血压的收缩血压和舒张血压,和心率。观察到的变化总结于上表3中。

[0201] 如在所有情况下观察出的,在研究剂量下,RPL554引起血压下降,无论是收缩压、

舒张压还是平均血压均表示为实际变化或相对于给药前的值进行标准化。当在先施用沙丁醇胺或阿托品之前或之后测定时,如表3中可以看出,对RPL554注射的血压变化没有不同,无论是变化表示为相对于给药前的变化,还是标准化为百分比均是如此。

[0202] 心率响应同样不受先施用其它药物的影响,不过在第一次施用后5分钟施用第二药物确实以依赖于所涉及的药物方式改变给药前的值。

[0203] 次要药代动力学和安全性药理学

[0204] 次要药代动力学变量是:ECG、呼吸速率和心率失常。在ECG或呼吸速率方面未看到显著变化,并且未看到心率失常。

[0205] 药代动力学药物相互作用

[0206] 三种药物之间的可能心血管相互作用是该研究的主要目的。如表3所呈现或者通过实际试验记录的检查所看到的,未发现药物之间的主要相互作用。

[0207] 实施例2

[0208] 与阿托品(毒蕈碱受体拮抗剂)组合施用的RPL554的体内协同效应

[0209] 该实施例研究RPL554逆转由蛙皮素诱导的支气管收缩的能力,以及当将RPL554与阿托品组合施用时的可能的协同效应。

[0210] 将豚鼠麻醉并通气。通过静脉内施用蛙皮素(2μg/ml;5ml/hr)诱导气道阻塞。通过静脉内单独施用不同剂量的RPL554或将其与次大剂量的阿托品(2μg/kg)组合施用,诱导支气管舒张。在产生阿托品的剂量响应曲线的研究后,选择剂量,以选择导致气道阻塞减少约20%的剂量。测定总肺阻力(R<sub>L</sub>)和平均动脉血压。在气道阻力和血压方面将数据表示为%减少。

[0211] 在10μg/kg-80μg/kg,RPL554引起豚鼠气道的剂量依赖性舒张。与2μg/kg阿托品(引起气道阻塞减少22.3±4.9%的剂量)组合时,次大剂量的RPL554(20μg/kg)比该剂量单独施用的RPL554引起气道的更大舒张(表4)。20μg/kg RPL554的静脉内施用(当与任一种共施用时其是不可行的)引起平均动脉血压的减少(对照:37.3±6.7%,+2μg/kg阿托品:35.3±4.3%)。结果示于图7~10中。

[0212]	表 4	气道阻塞的%减少	
		RPL554 对照	RPL554 + 阿托品 (2μg/kg)
	10 μg/kg	7.4 +1.9	41.7 + 1.2
	20 μg/kg	24.6 + 4.3	76.5 + 8.8
	40 μg/kg	55.2 + 6.2	84,3 +9.1
	80 μg/kg	65.1 + 5.3	81.9 + 4.7

[0213] 该结果提供进一步证据证明,RPL554是有效的支气管舒张剂,其当与毒蕈碱受体拮抗剂阿托品组合时作为支气管舒张剂具有协同活性,但是在血压方面不与该类物质相互作用。

[0214] 实施例3

[0215] 与格隆溴铵(毒蕈碱受体拮抗剂)组合施用的RPL554对分离的人支气管的协同效应

[0216] 研究了在分离的人支气管中RPL554与格隆溴铵之间的长期相互作用。

[0217] 方法

[0218] 将来自6名患者的支气管环在用O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>(95/5%)通气的Krebs-Henseleit液(37℃)

中在0.5g-1.0g张力下温育。在用3Hz、10Hz或25Hz电场刺激(EFS)收缩的组织中,研究RPL554和格隆铵(单独或组合)的作用(30%最大舒张, $EC_{30}$ )持续时间。将支气管张力表示为对罂粟碱( $E_{max}$ )的最大响应的%,并且评估收缩响应的曲线下面积(AUC)。通过Bliss独立理论分析药物混合效应。值( $n=3$ )是平均值 $\pm$ SEM。

#### [0219] 结果

[0220] 单独施用的RPL554和格隆铵分别在 $160\pm 20$ 分钟和 $50\pm 10$ 分钟诱导最大舒张,并且该效应中4小时中可检测。在洗脱过程中,最大协同舒张相互作用在 $\approx 2$  hrs ( $71.4\pm 5.1\%$ ),并且药物的组合将舒张效应延长6小时,此时EFS介导的收缩响应的减少仍为 $41.2\pm 8.5\%$ 。观察到的AUC( $44.9\pm 3.1\%$ )显著低于6小时研究过程中的预期( $65.8\pm 3.3\%$ ) ( $P<0.001$ ),其中对于3Hz的EFS具有主要效果。结果示于图11~16中。

#### [0221] 结论

[0222] 低浓度的RPL554和格隆铵协同地抑制在分离人支气管中由EFS诱导的收缩张力,并且将舒张效应延长6小时。

#### [0223] 实施例4

[0224] 与格隆溴铵(毒蕈碱受体拮抗剂)组合施用的RPL554对人小气道的协同效应

[0225] 研究了在分离的人细支气管中RPL554与格隆铵之间的相互作用。

#### [0226] 方法

[0227] 将来自6名患者的精确切割的肺切片(PCLS)在用 $O_2/CO_2$  (95:5%)通气的Krebs-Henseleit液(37℃)中温育。在由卡巴胆碱(CCh)诱导的次大收缩下(70%最大, $EC_{70}$ ),评估对以等效浓度单独和组合施用的RPL554和格隆铵的浓度响应。将小支气管( $<1$ mm直径)舒张表示为由罂粟碱诱导的最大响应(管腔面积增大)( $E_{max}$ )的%,和作为 $IC_{50}$ 的负对数的效力( $pD_2$ )。通过Bliss独立理论分析药物混合效应。值( $n=3$ )是平均值 $\pm$ SEM。

#### [0228] 结果

[0229] 与RPL554相比,格隆铵诱导细支气管的更有效的浓度依赖性舒张( $pD_2$ :格隆铵 $9.2\pm 0.4$ ,RPL554 $6.0\pm 0.1$ , $P<0.001$ ),它们都消除CCh-诱导的收缩。与预期响应相比,低-中浓度的格隆铵和RPL554(格隆铵 $0.05nM-0.14nM$ ,RPL554 $0.32\mu M-0.54\mu M$ )对小气道增强舒张具有 $+21.1\pm 4.0\%$ 的协同舒张响应( $P<0.05$ )。与预期响应( $51.0\pm 5.4\%$ )相比,低浓度( $EC_{30}$ )的格隆铵和RPL554诱导 $69.1\pm 2.4\%$ 的显著( $P<0.05$ )管腔面积增大。结果示于图17~19中。

#### [0230] 结论

[0231] RPL554和格隆铵主要在低-中浓度时对细支气管的管腔面积增大具有协同相互作用。

#### [0232] 实施例5

[0233] 与噻托溴铵(毒蕈碱受体拮抗剂)组合施用的RPL554的协同效应

[0234] 对于毒蕈碱受体拮抗剂噻托溴铵,重复用于评价RPL554与阿托品的组合的协同效应的实施例1的方法。构建浓度响应曲线来测试单独的RPL554、单独的噻托溴铵以及噻托溴铵组合施用的RPL554。采用Berenbaum法和Bliss独立标准来评价噻托溴铵和RPL554的协同作用。对于RPL554和噻托溴铵的组合观察协同效应。

#### [0235] 实施例6

[0236] 与氧托溴铵(毒蕈碱受体拮抗剂)组合施用的RPL554的协同效应

[0237] 对于毒蕈碱受体拮抗剂氧托溴铵,重复用于评价RPL554与阿托品的组合的协同效应的实施例1的方法。构建浓度响应曲线来测试单独的RPL554、单独的氧托溴铵以及与氧托溴铵组合施用的RPL554。采用Berenbaum法和Bliss独立标准来评价氧托溴铵和RPL554的协同作用。对于RPL554和氧托溴铵的组合观察协同效应。

#### [0238] 实施例7

[0239] 与阿地铵(毒蕈碱受体拮抗剂)组合施用的RPL554的协同效应

[0240] 对于毒蕈碱受体拮抗剂阿地铵,重复用于评价RPL554与阿地铵的组合的协同效应的实施例1的方法。构建浓度响应曲线来测试单独的RPL554、单独的阿地铵以及与阿地铵组合施用的RPL554。施用Berenbaum法和Bliss独立标准来评价阿地铵和RPL554的协同作用。对于RPL554和阿地铵的组合观察协同效应。

#### [0241] 制剂实施例1-通过DPI施用

[0242] 将RPL554组合(0.2mg)微粒化然后与乳糖共混(25mg)。然后将该共混混合物填装至明胶吸入筒中。使用例如DPI施用该筒的内容物。

[0243] 将微粒化的RPL554组合(100mg)与粉碎的乳糖(25g)(例如不大于约85%的颗粒具有约60 $\mu$ m~约90 $\mu$ m的MMD,并且不小于15%的颗粒具有小于15 $\mu$ m的MMD的乳糖)共混。然后将共混混合物以足能提供约0~500 $\mu$ g的RPL554/剂量的量填装至可剥离泡罩包装的各泡罩中。使用DPI施用该泡罩的内容物。

[0244] 作为选择,将微粒化的RPL554组合(1g)与粉碎的乳糖(200g)共混以形成化合物与粉碎乳糖的重量比为1:200的块状组合物(bulk composition)。将共混组合物包装到能够递送约10 $\mu$ g~500 $\mu$ g RPL554/剂量的DPI中。

[0245] 作为选择,将微粒化的RPL554(100mg)和微粒化的毒蕈碱受体拮抗剂(500mg)与磨碎的乳糖(30g)共混。然后将共混混合物以足能提供约10 $\mu$ g~约500 $\mu$ g的RPL554/剂量的量填装至可剥离泡罩包装的各泡罩中。使用DPI施用该泡罩的内容物。

#### [0246] 制剂实施例2-用于MDI的组合物

[0247] 将微粒化的RPL554组合(10g)分散在通过将卵磷脂(0.2g)溶解在去矿物质水(200mL)中制备的溶液中。将所得的悬浮液喷雾干燥,然后微粒化以形成包含具有小于约1.5 $\mu$ m的平均直径的颗粒的微粒化组合物。然后将微粒化组合物以足能提供约10 $\mu$ g~约500 $\mu$ g的RPL554/剂量的量填装至MDI筒中(当通过MDI施用时),该筒含有加压的1,1,1,2-四氟乙烷。

[0248] 作为选择,通过将作为平均尺寸小于10 $\mu$ m的微粒化颗粒的5g RPL554组合分散在胶体溶液中制备含有5重量%RPL554组合、0.5重量%卵磷脂和0.5重量%海藻糖的悬浮液,所述胶体溶液由溶解于100mL去矿物质水中的0.5g的海藻糖和0.5g的卵磷脂而形成。将悬浮液喷雾干燥,将所得材料微粒化成具有小于1.5 $\mu$ m的平均直径的颗粒。将颗粒填装至具有加压1,1,1,2-四氟乙烷的罐。

#### [0249] 制剂实施例3-用于喷雾吸入器的组合物

[0250] 将RPL554组合(25mg)溶解在柠檬酸盐缓冲(pH 5)的等渗盐水(125mL)中。将混合物搅拌并超声直到所述化合物溶解。检测溶液的pH,并且必要时通过缓慢添加水性1N氢氧化钠将其调整至pH 5。使用喷雾装置施用溶液,该装置提供约10 $\mu$ g~约500 $\mu$ g的RPL554组合/剂量。



[0251] 制剂实施例4-用于口服施用的硬明胶胶囊

[0252] 将RPL554组合 (50g)、喷雾干燥乳糖 (440g) 和硬脂酸镁 (10g) 彻底共混。然后所得的组合物填装至硬明胶胶囊 (500mg组合物/胶囊) 中。

[0253] 制剂实施例5-用于口服施用的悬浮液

[0254] 将以下成分混合以形成含有100mg化合物/10mL悬浮液的悬浮液:

成分	量
RPL554 组合	1.0 g
富马酸	0.5 g
氯化钠	2.0 g
尼泊金甲酯	0.15 g
尼泊金丙酯	0.05 g
[0255] 砂糖	25.5 g
山梨糖醇(70%溶液)	12.85 g
Veegum <sup>RTM</sup> K (硅酸镁铝)	1.0 g
调味剂	0.035 mL
着色剂	0.5 mg
蒸馏水适量	至 100 mL

[0256] 制剂实施例5-用于通过注射施用的可注射制剂

[0257] 将RPL554组合 (0.2g) 与0.4M乙酸钠缓冲液 (2.0mL) 共混。必要时使用0.5N水性盐酸和0.5N水性氢氧化钠将所得溶液的pH调整为pH 4, 然后添加足够的注射用水以达到20mL的总体积。然后将混合物过滤通过无菌过滤器 (0.22微米) 以提供适于注射施用的无菌溶液。

[0258] 参考文献

[0259] Berenbaum MC (1977) Synergy, additivism and antagonism in immunosuppression. A critical review. Clin Exp Immunol 28:1-18.

[0260] Binks AP, Paydarfar D, Schachter SC, Guz A and Banzett RB (2001) High strength stimulation of the vagus nerve in awake humans: a lack of cardiorespiratory effects. Respir Physiol 127:125-133.

[0261] Boik JC, Newman RA and Boik RJ (2008) Quantifying synergism/antagonism using nonlinear mixed-effects modeling: a simulation study. Stat Med 27:1040-1061.

[0262] Boswell-Smith V, Cazzola M and Page CP (2006a) Are phosphodiesterase 4 inhibitors just more theophylline? J Allergy Clin Immunol 117:1237-1243.

[0263] Boswell-Smith V, Spina D, Oxford AW, Comer MB, Seeds EA and Page CP (2006b) The pharmacology of two novel long-acting phosphodiesterase 3/4 inhibitors, RPL554 [9,10-dimethoxy-2-(2,4,6-trimethylphenylimino)-3-(n-carbamoyl-2-aminoethyl)-3,4,6,7-tetrahydro-2H-pyrimido[6,1-a]isoquinolin-4-one] and RPL565 [6,7-dihydro-2-(2,6-diisopropylphenoxy)-9,10-dimethoxy-4H-pyrimido[6,1-a]isoquinolin-4-one]. J Pharmacol Exp Ther 318:840-848.

[0264] Boucher AN and Tam VH (2006) Mathematical formulation of additivity for

antimicrobial agents. *Diagn Microbiol Infect Dis* 55:319-325.

[0265] Freas W, Hart JL, Golightly D, McClure H and Muldoon SM (1989) Contractile properties of isolated vascular smooth muscle after photoradiation. *Am J Physiol* 256:H655-664.

[0266] Goldoni M and Johansson C (2007) A mathematical approach to study combined effects of toxicants in vitro: evaluation of the Bliss independence criterion and the Loewe additivity model. *Toxicol In Vitro* 21:759-769.

[0267] Goodman LS, Gilman A and Brunton LL (2008) Goodman & Gilman's manual of pharmacology and therapeutics. McGraw-Hill Medical, New York.

[0268] Grabovsky Y and Tallarida RJ (2004) Isobolographic analysis for combinations of a full and partial agonist: curved isoboles. *J Pharmacol Exp Ther* 310:981-986.

[0269] Greco WR, Bravo G and Parsons JC (1995) The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacol Rev* 47:331-385.

[0270] Hatake K and Wakabayashi I (2000) Ethanol suppresses L-arginine-induced relaxation response of rat aorta stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi* 35:61-68.

[0271] Meletiadis J, Mouton JW, Meis JF and Verweij PE (2003) In vitro drug interaction modeling of combinations of azoles with terbinafine against clinical *Scedosporium prolificans* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 47:106-117.

[0272] Mercier FJ, Naline E, Bardou M, Georges O, Denjean A, Benhamou D and Advenier C (2002) Relaxation of proximal and distal isolated human bronchi by halothane, isoflurane and desflurane. *Eur Respir J* 20:286-292.

[0273] Motulsky H (1995) Intuitive biostatistics. Oxford University Press, New York; Oxford.

[0274] Motulsky H and Christopoulos A (2004) Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression: a practical guide to curve fitting. Oxford University Press, Oxford.

[0275] Rabe KF (1998) Mechanisms of immune sensitization of human bronchus. *Am J Respir Crit Care Med* 158:S161-170.

[0276] Spina D, Ferlenga P, Biasini I, Moriggi E, Marchini F, Semeraro C and Page CP (1998) The effect duration of selective phosphodiesterase inhibitors in the guinea pig. *Life Sci* 62:953-965.

[0277] Tallarida RJ (2001) Drug synergism: its detection and applications. *J Pharmacol Exp Ther* 298:865-872.

[0278] Tallarida RJ (2006) An overview of drug combination analysis with isobolograms. *J Pharmacol Exp Ther* 319:1-7.

[0279] Tallarida RJ and Raffa RB (2010) The application of drug dose

equivalence in the quantitative analysis of receptor occupation and drug combinations. *Pharmacol Ther* 127:165-174.

[0280] Watson N, Bodtke K, Coleman RA, Dent G, Morton BE, Ruhlmann E, Magnussen H and Rabe KF (1997) Role of IgE in hyperresponsiveness induced by passive sensitization of human airways. *Am J Respir Crit Care Med* 155:839-844.

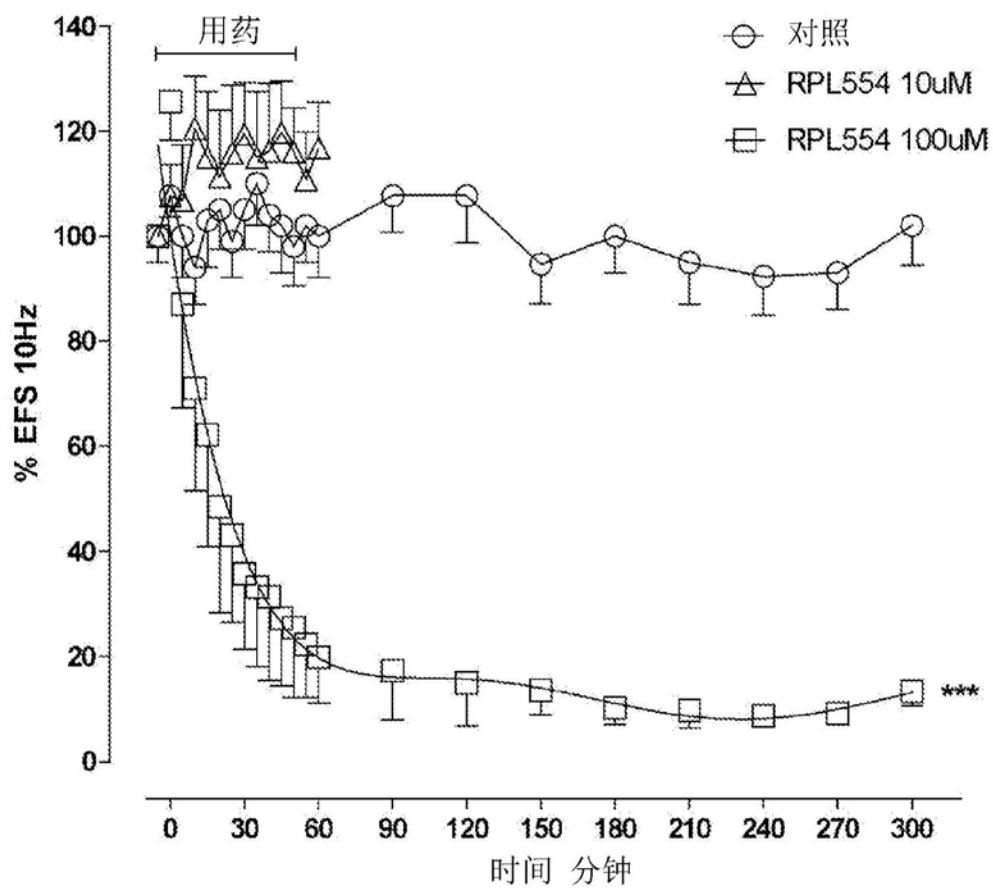


图1

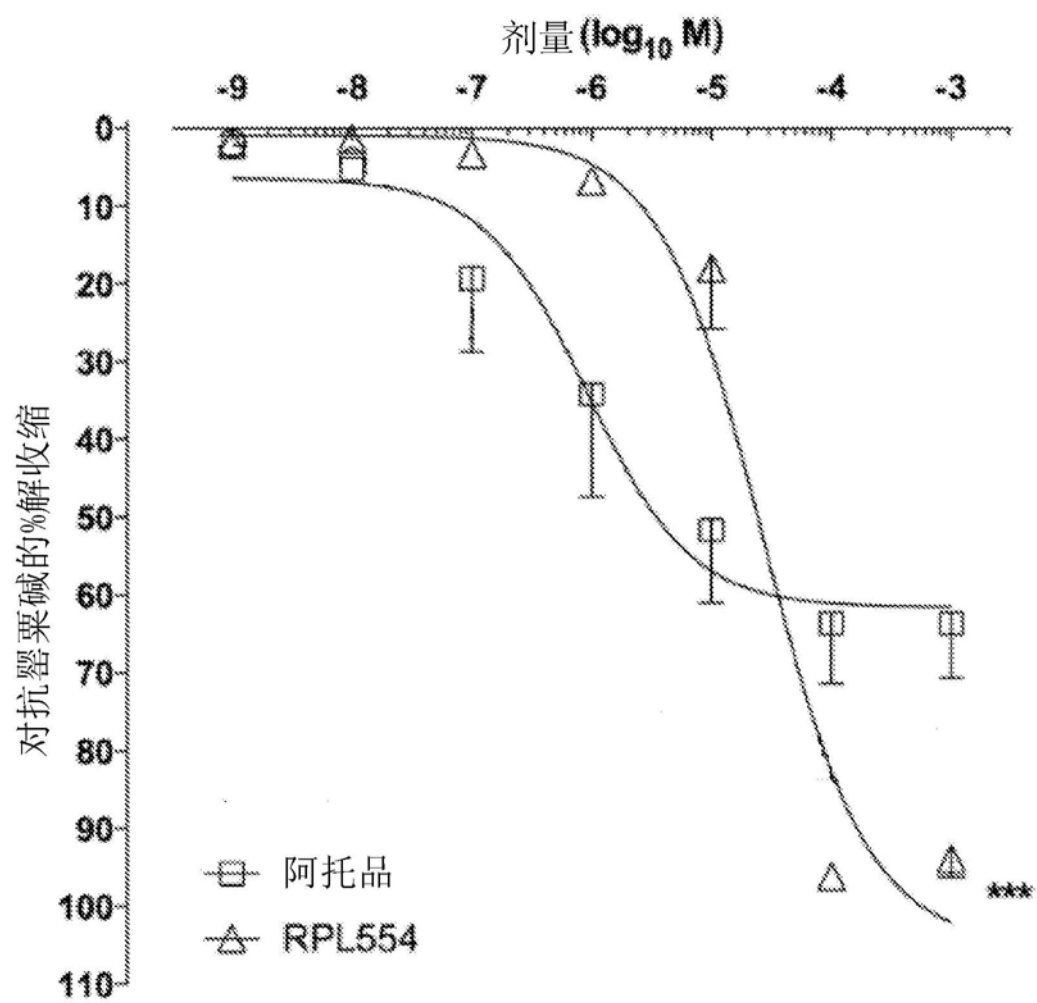


图2

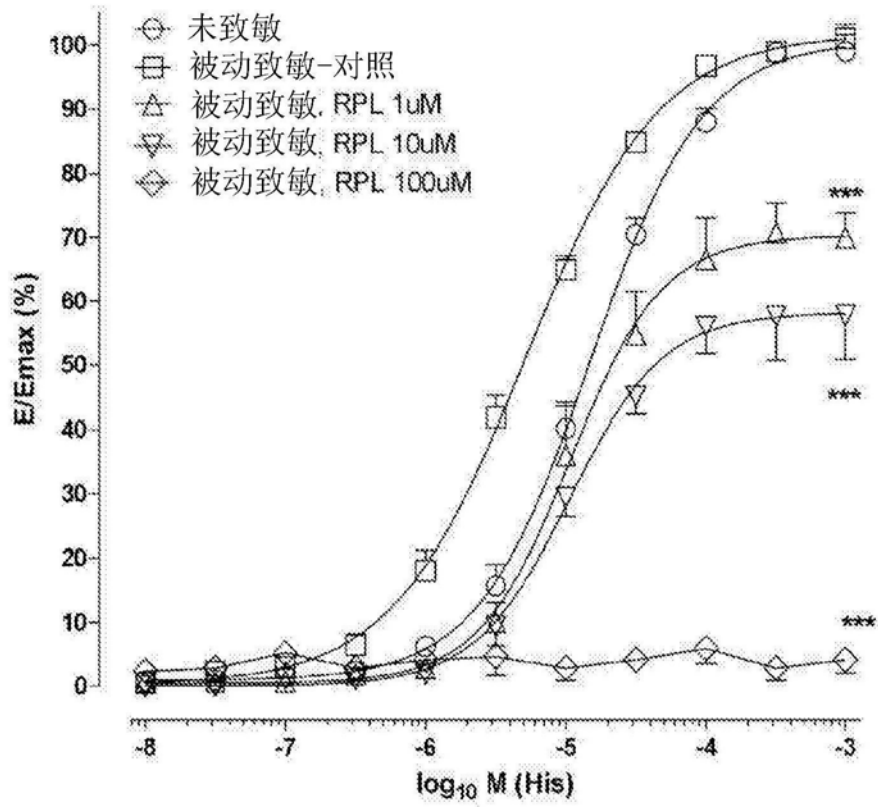


图3

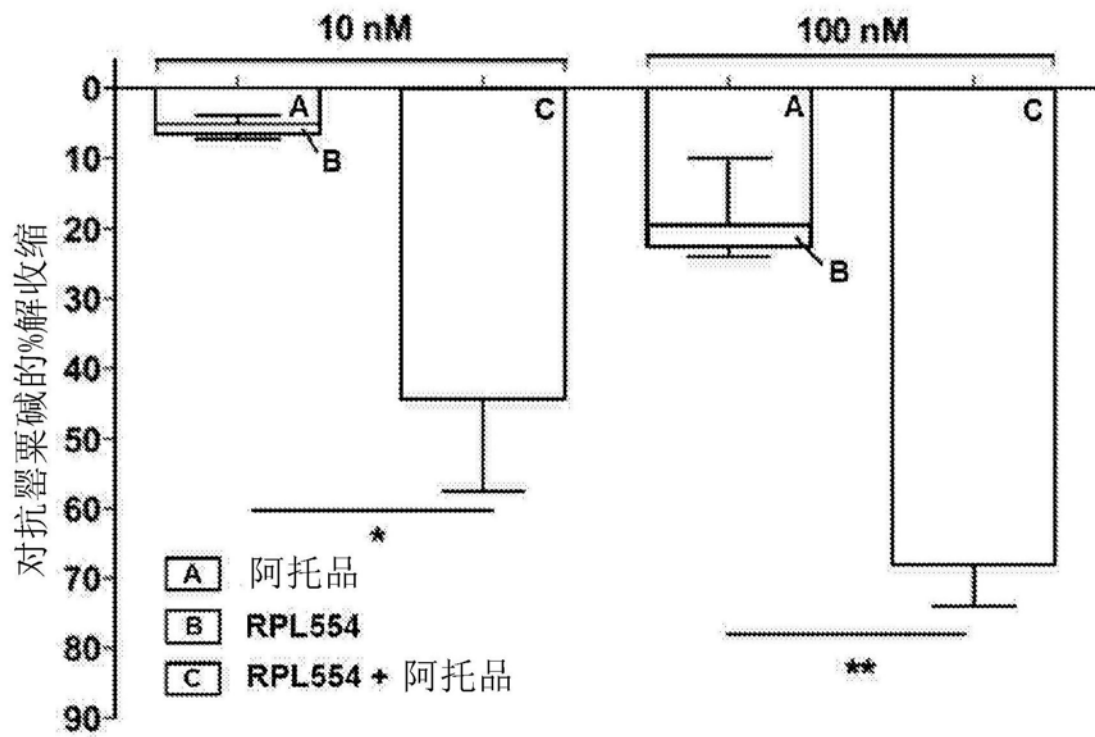


图4

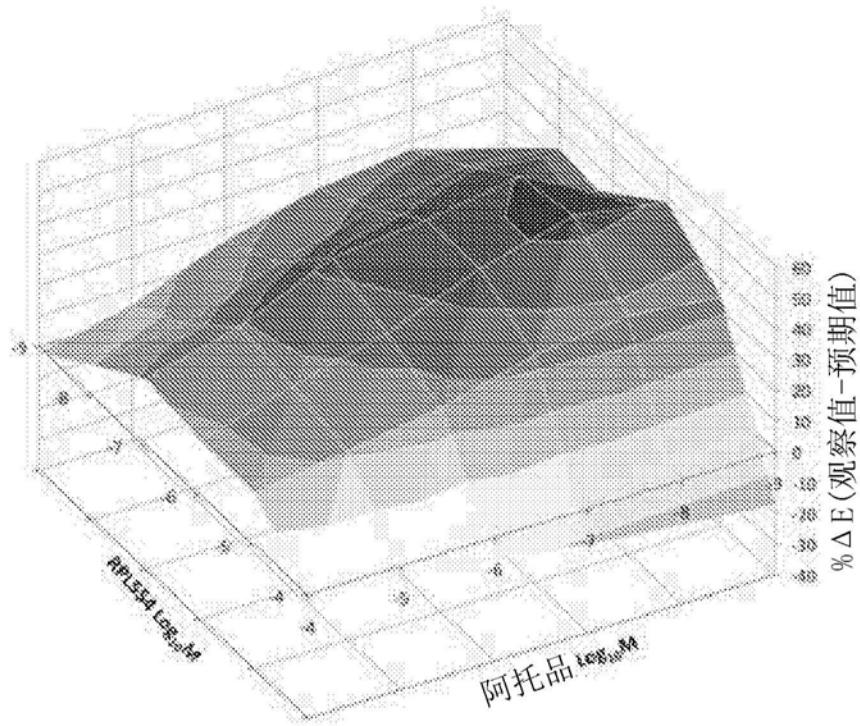


图5

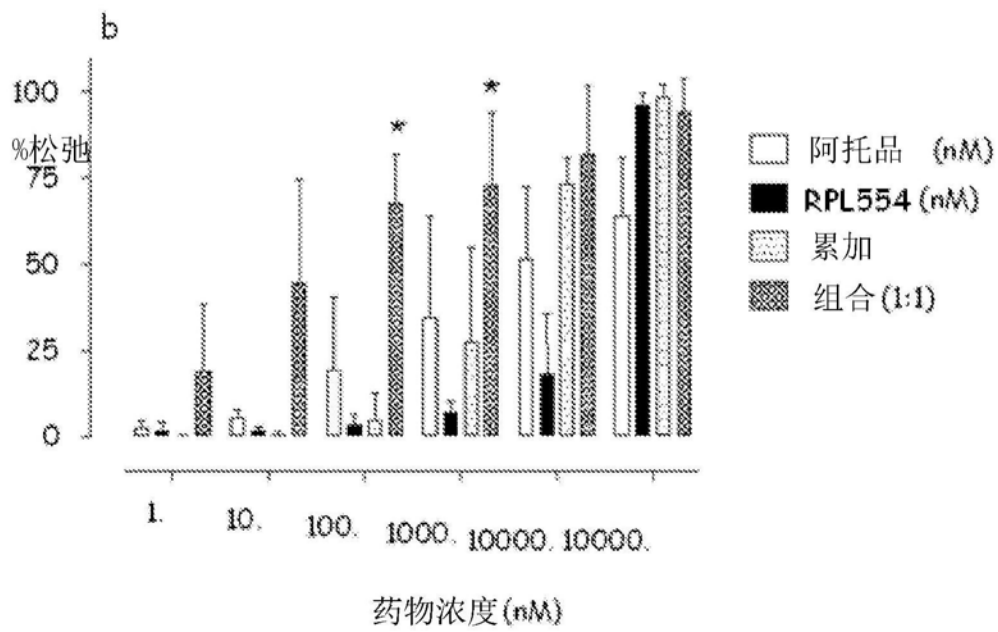


图6

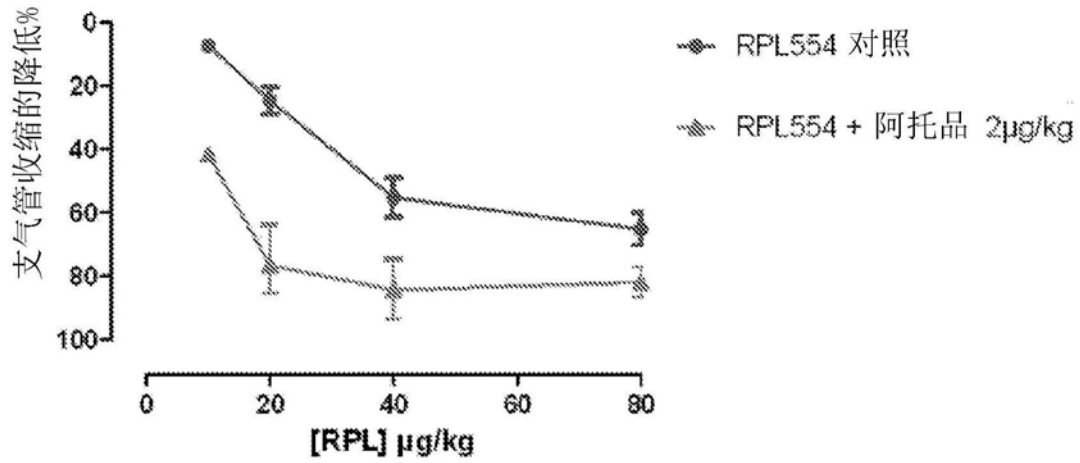


图7

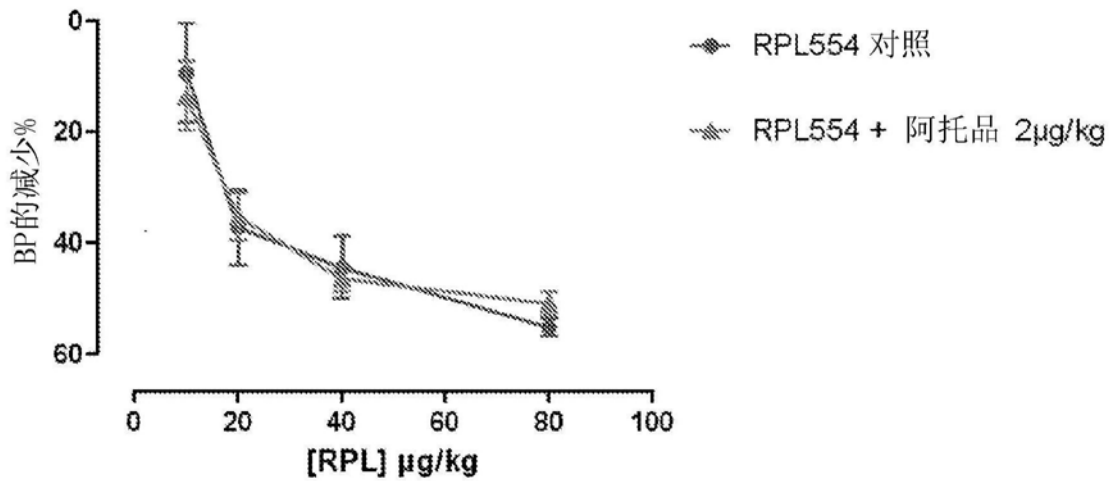


图8

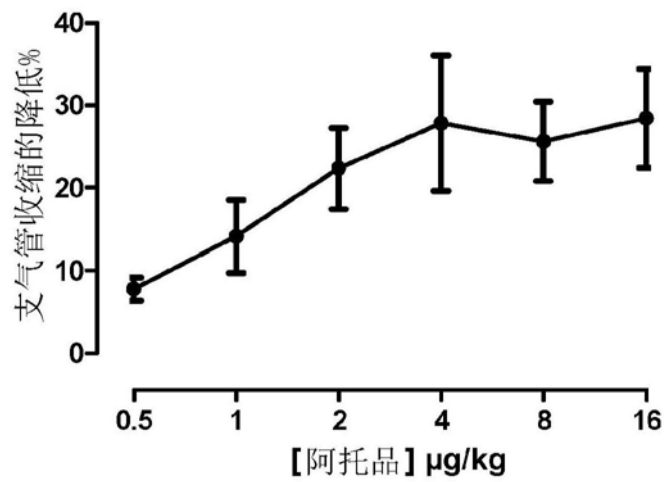


图9



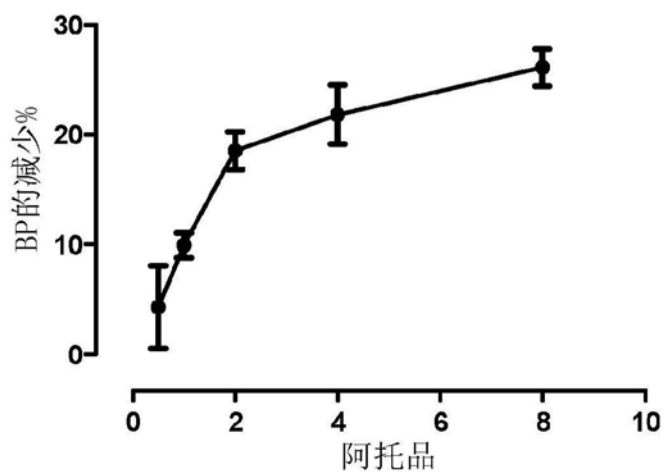


图10

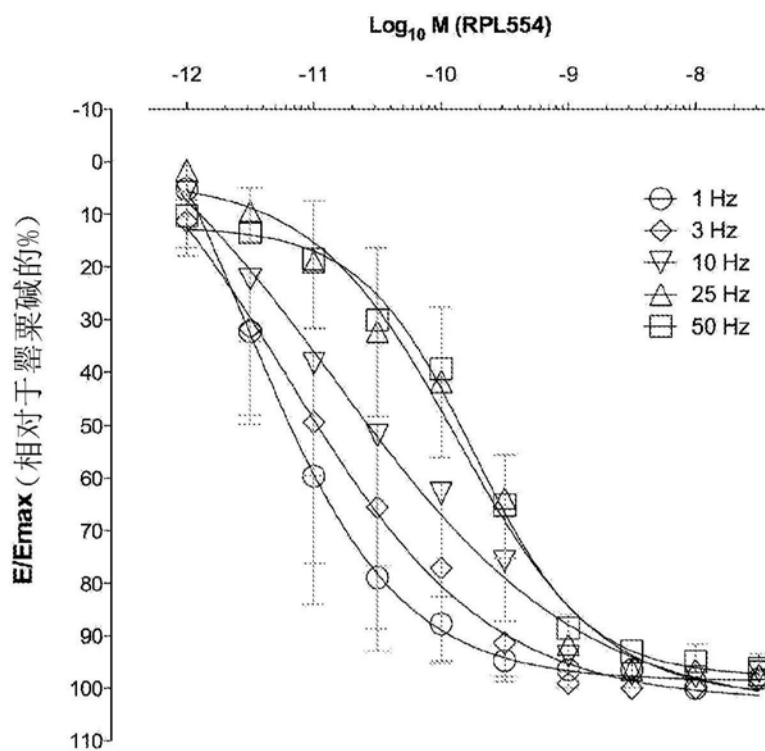


图11

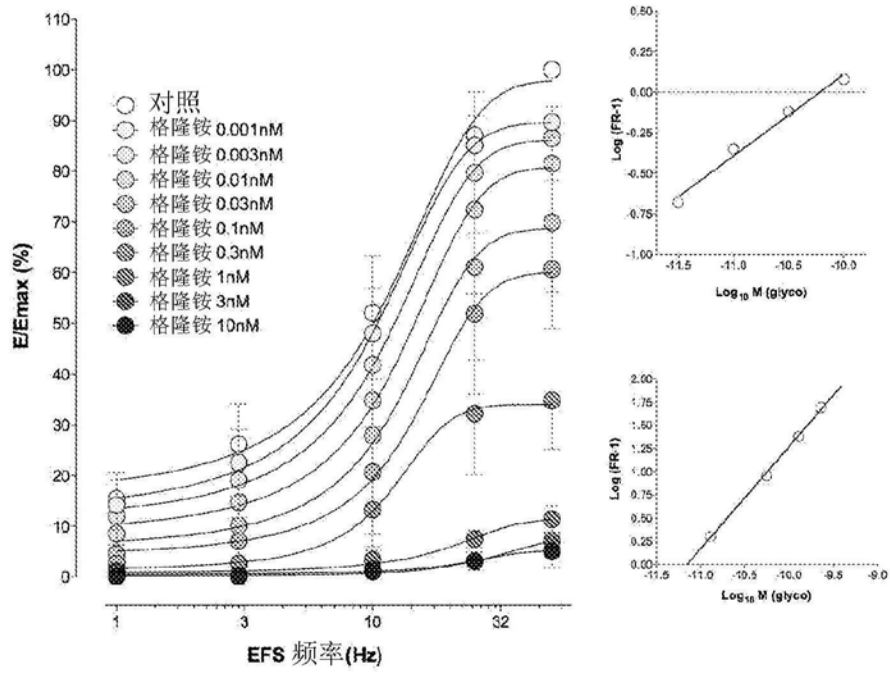


图12

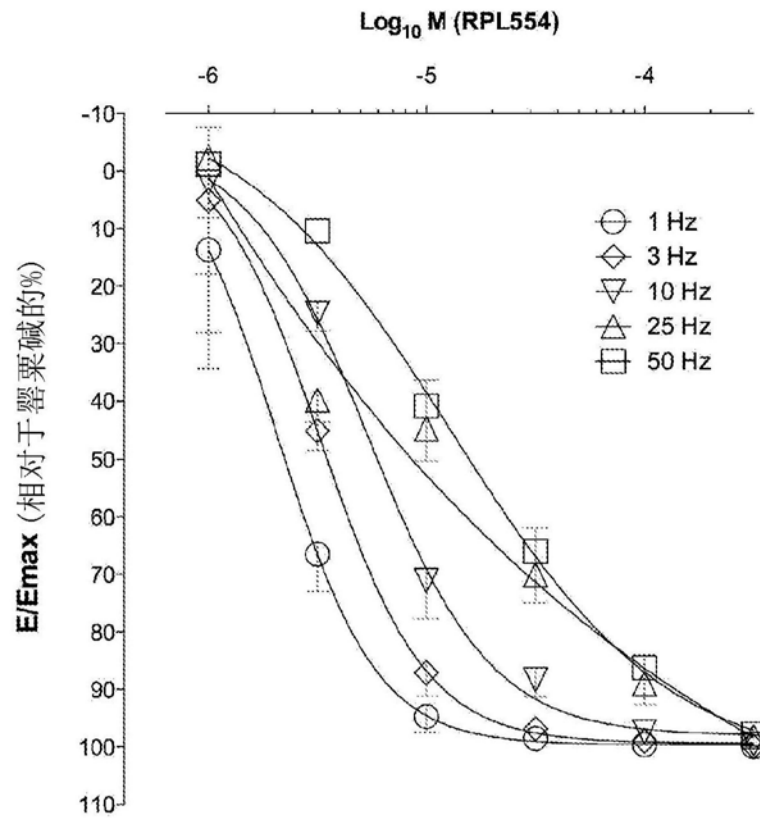


图13

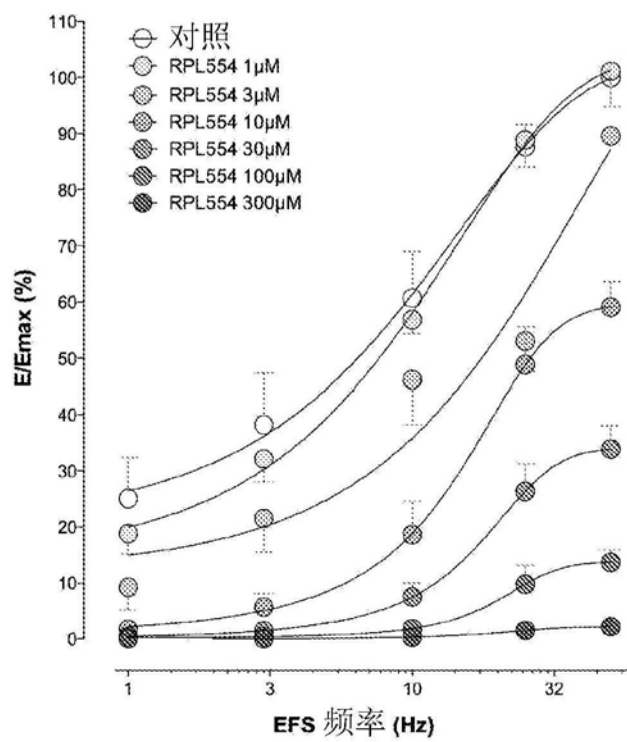


图14

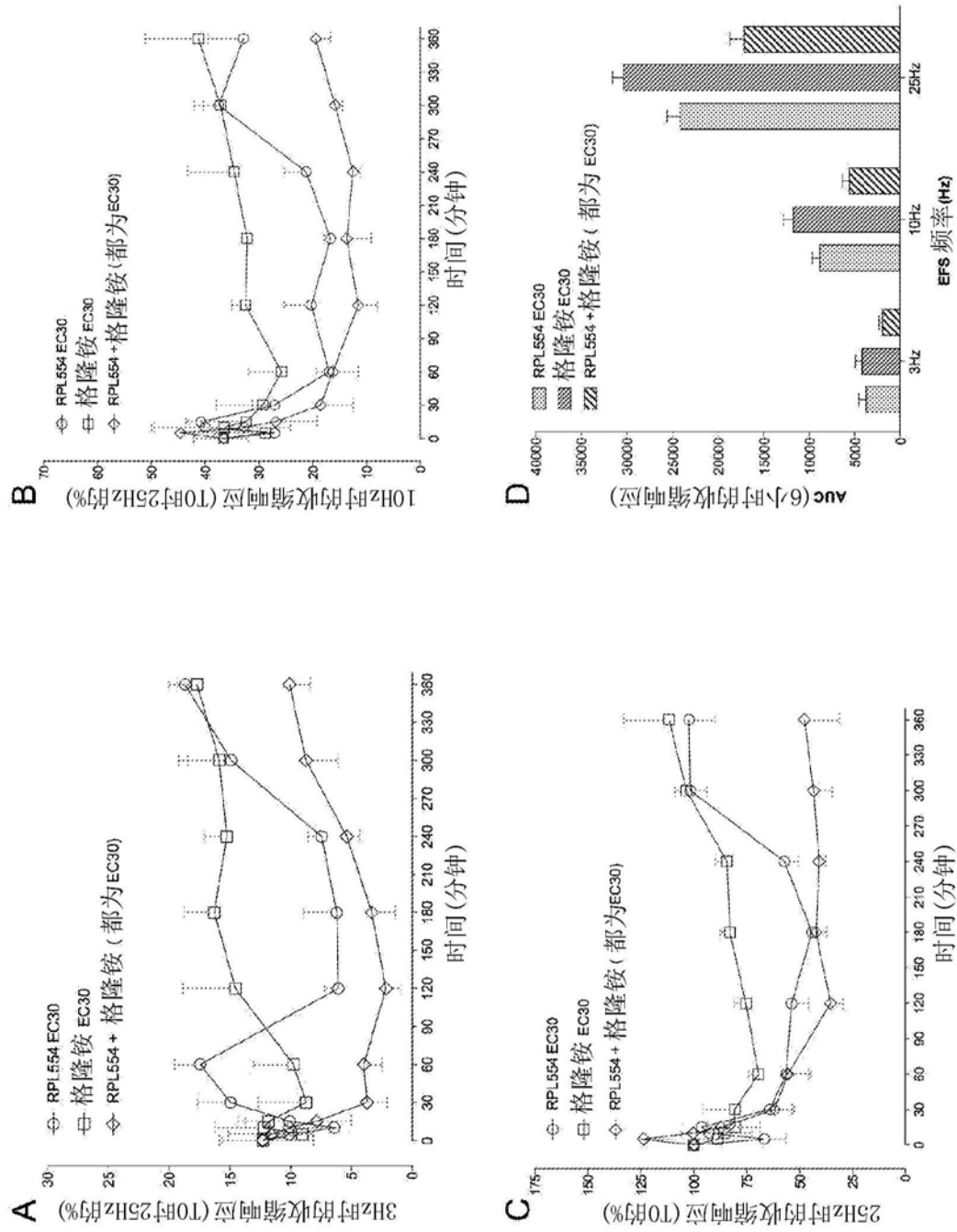


图15

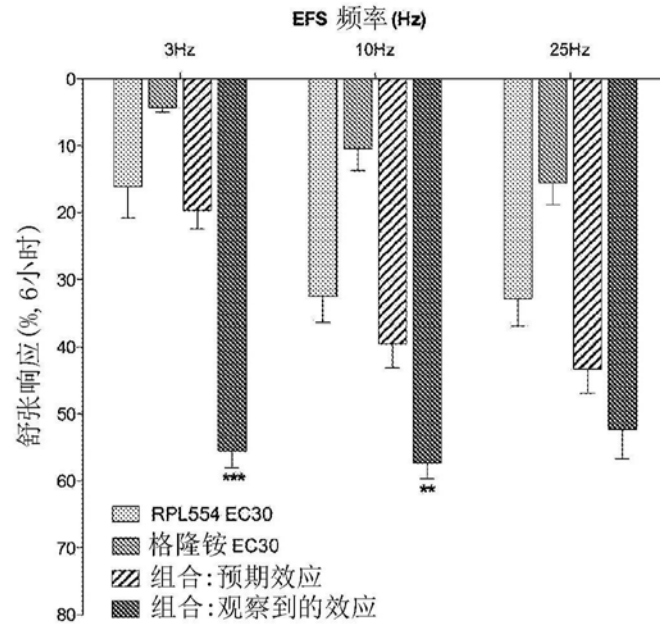


图16

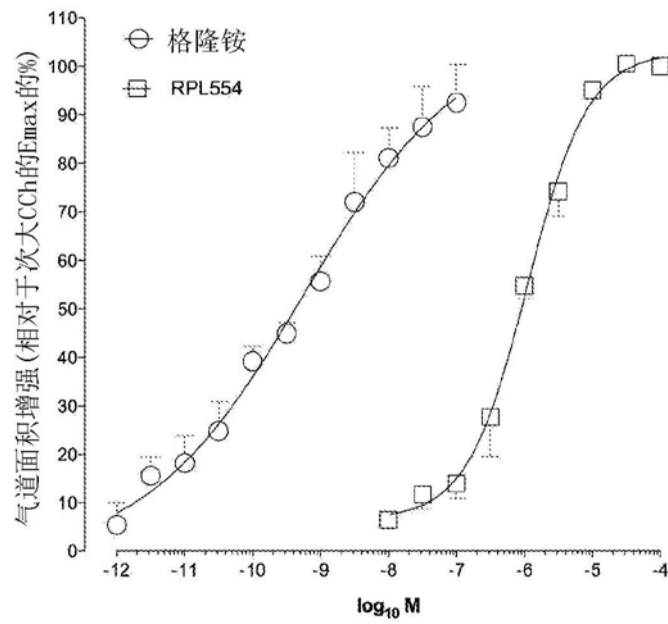


图17

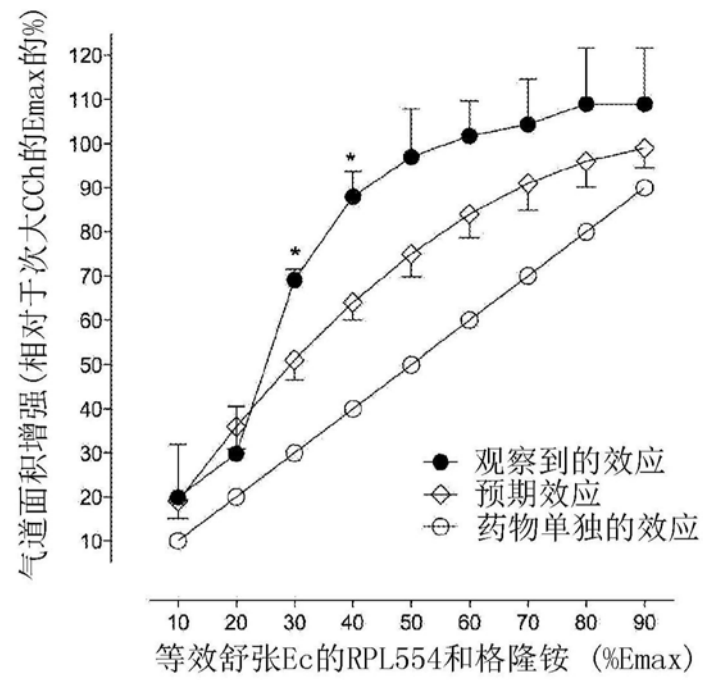


图18

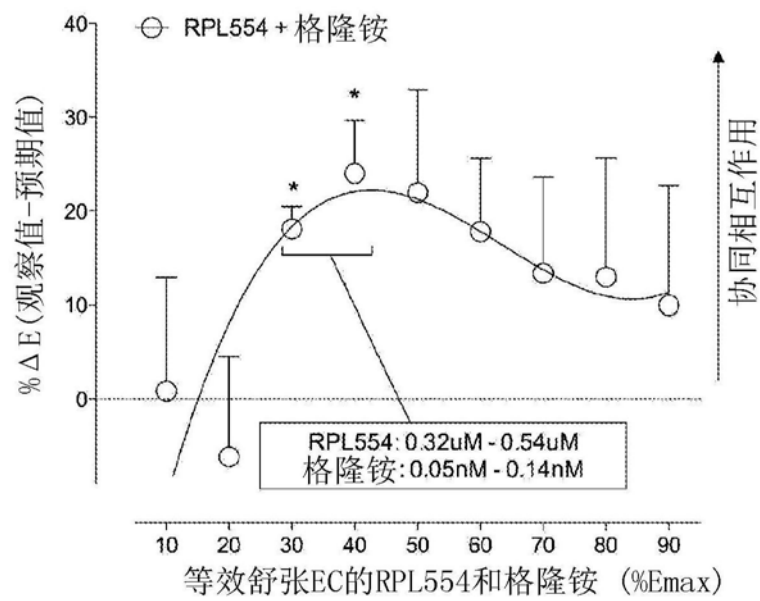


图19