

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780007327.X

[51] Int. Cl.

A61K 31/21 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

C07C 327/00 (2006.01)

[43] 公开日 2009年3月25日

[11] 公开号 CN 101394844A

[22] 申请日 2007.2.14

[21] 申请号 200780007327.X

[30] 优先权

[32] 2006.2.14 [33] US [31] 60/772,874

[86] 国际申请 PCT/US2007/003682 2007.2.14

[87] 国际公布 WO2007/095178 英 2007.8.23

[85] 进入国家阶段日期 2008.9.1

[71] 申请人 东弗吉尼亚医学院

地址 美国弗吉尼亚州

[72] 发明人 K·A·谢伦伯格

F·A·拉坦齐奥 J·谢弗

[74] 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

代理人 陈文平

权利要求书3页 说明书31页 附图12页

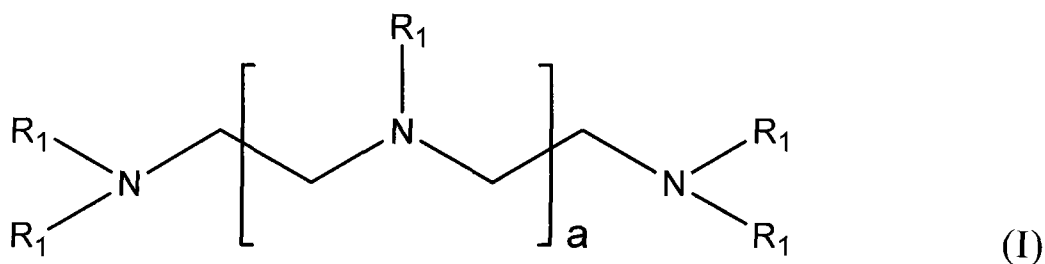
[54] 发明名称

甲氧基聚乙二醇硫酯螯合物及其用途

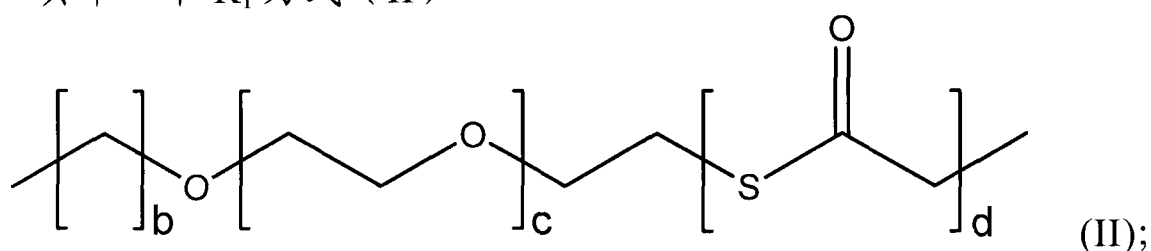
[57] 摘要

本发明一般地涉及保护细胞、组织和器官免受伴随辐射、化疗的或者与各种器官的退行性疾病或过程有关的——其引起自由基或氧化物如过氧化物、超氧阴离子、羟基自由基或氮氧化物或者重金属阳离子生成的离子化剂或其他损伤物质的破坏性影响。更具体地，本发明涉及甲氧基聚乙二醇硫酯螯合甲基酯，其通过渗入细胞膜而去除自由基氧化剂的电子和去除可与过氧化物反应生成活性羟基的重金属，或去除由细胞器释放的  $\text{Ca}^{++}$ ，从而可用作对抗组织损伤的保护剂。这些螯合酯也用于降低青光眼患者的眼内压。

1、式 (I) 的甲氧基聚乙二醇硫酸酯化合物:



其中一个  $R_1$  为式 (II)



其余的各个  $R_1$  选自式 (II) 或选自由  $-\text{CH}_2\text{COOH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+$ 、 $-\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Ca}^{++}/2$ 、 $-\text{CH}_2\text{COOCH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$  和  $-\text{CH}_2\text{COOC}_3\text{H}_7$  组成的组中;

a 为 0~6; 各个 b 独立地为 0~18; 各个 c 独立地为 3~10; 以及 d 独立地为 1~3。

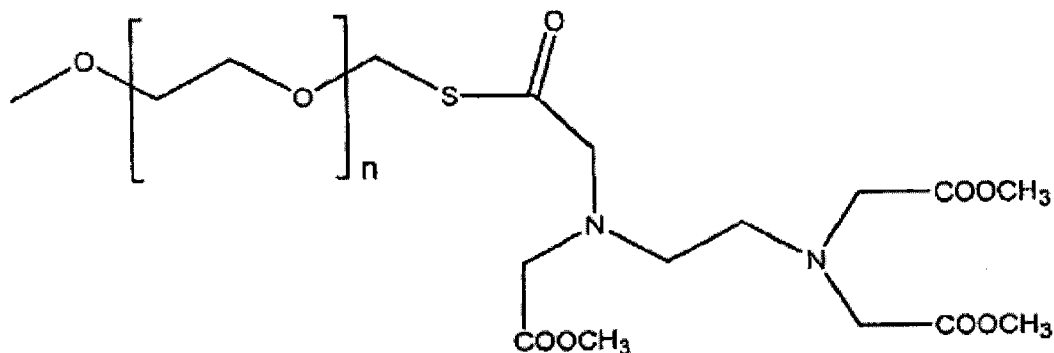
2、根据权利要求 1 所述的化合物, 其中, a 为 0, 各个 b 为 0, 各个 c 独立地为 3~10, d 为 1, 且 3 个  $R_1$  为  $-\text{CH}_2\text{COOCH}_3$ 。

3、根据权利要求 1 所述的化合物, 其中, a 为 1, 各个 b 为 0, 各个 c 独立地为 3~10, d 为 1, 且 4 个  $R_1$  为  $-\text{CH}_2\text{COOCH}_3$ 。

4、根据权利要求 2 所述的化合物, 其中, 各个 c 独立地为 7 或 8。

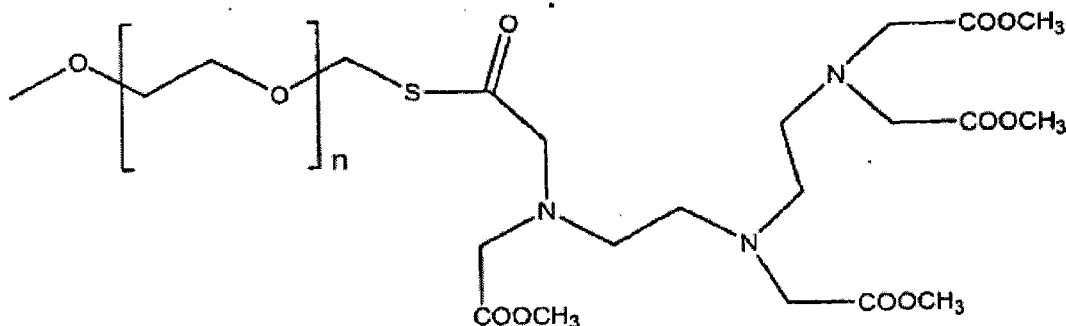
5、根据权利要求 3 所述的化合物, 其中, 各个 c 独立地为 7 或 8。

6、根据权利要求 1 所述的化合物, 其中, 所述化合物为:



其中  $n=3\sim 10$ 。

7、根据权利要求 1 所述的化合物，其中，所述化合物为：



其中  $n=3\sim 10$ 。

8、根据权利要求 1 所述的化合物，其中，所述化合物能够吸取电子。

9、根据权利要求 1 所述的化合物，其中，所述化合物能够与重金属或  $\text{Ca}^{++}$  形成螯合物。

10、一种组合物，其包括权利要求 1 的化合物和至少一种药学上可接受的载体或药学上可接受的辅剂。

11、一种组合物，其包括权利要求 2、3、6 或 7 的化合物和至少一种药学上可接受的载体或药学上可接受的辅剂。

12、一种组合物，其包括至少一种权利要求 1 的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂合物，以及任选的至少一种治疗药物。

13、根据权利要求 12 所述的组合物，进一步包括至少一种药学上可接受的载体或药学上可接受的辅剂。

14、一种在需要的患者中防止因暴露于辐射而导致的组织损伤的

方法，该方法包括给予患者治疗有效量的权利要求 1、2、3、6 或 7 所述的化合物。

15、一种在需要的患者中防止因自由基氧化剂而导致的退行性疾病的方法，该方法包括给予患者治疗有效量的权利要求 1、2、3、6 或 7 所述的化合物，其中自由基氧化剂包括过氧化物、超氧阴离子、羟基自由基和氮氧化物。

16、一种在需要的患者中治疗因青光眼而导致视网膜细胞死亡的方法，该方法包括给予患者治疗有效量的权利要求 10 所述的组合物。

17、一种试剂盒，其包括权利要求 1、2、3、6 或 7 的至少一种化合物，或其药学上可接受的盐或溶剂合物，及其使用说明。

18、一种在需要的细胞中从自由基氧化剂吸取电子的方法，该方法包括给予有效量的权利要求 1、2、3、6 或 7 所述的化合物，其中自由基氧化剂包括过氧化物、超氧阴离子、羟基自由基和氮氧化物。

19、一种在需要的细胞中防止通过重金属催化形成自由基氧化剂的方法，该方法包括给予有效量的权利要求 1、2、3、6 或 7 的化合物，其中自由基氧化剂包括过氧化物、超氧阴离子、羟基自由基和氮氧化物，其中所述化合物能够与重金属形成螯合物。

## 甲氧基聚乙二醇硫酯螯合物及其用途

### 技术领域

本发明一般地涉及保护细胞、组织、器官和包括人的机体免受伴随辐射、化疗、或导致细胞损伤的疾病或过程的离子化剂或自由基的破坏性影响，这些过程中涉及如过氧化物、超氧阴离子、羟基自由基或氮氧化物的自由基氧化物或重金属阳离子的生成。更具体而言，本发明涉及新的甲氧基聚乙二醇硫酯螯合酯，并且涉及它们在正常或患病的人、动物或植物中，在器官移植以及细胞和组织储藏或保存中单独用作生物保护剂和降低化学毒性，或作为辅剂与其他物质或疗法一起使用的方法。这些螯合酯也可用于降低青光眼患者的眼内压。

### 背景技术

对于人类，电离辐射的照射通过天然的放射源（例如紫外线或其他电磁辐射或者来自太阳、星球的宇宙辐射或者地球地壳中的地表放射源）或者各种人造放射源发生。主要的对于人造放射源的暴露来自诊断的 X-射线和放射性核素研究、牙科 X 射线机以及治疗技术（例如抗癌放射疗法），或在更小的程度上来自由于大气层原子武器试验的放射性尘埃、核电站以及职业相关的暴露。电离辐射主要通过细胞毒性效应对细胞和组织产生不良作用。其中大多数形式的电离辐射损伤生物分子和细胞的主要途径是通过一种涉及与水的相互作用产生毒性的活性氧（ $\text{OH}\cdot$ 、 $\cdot\text{O}^{2-}$  或  $\text{H}_2\text{O}_2$ ）的称作间接作用的过程。第二种机制称作直接作用，涉及对 DNA 的直接效应。

通过化学保护降低电离辐射的有害作用对于包括暴露于宇宙和地表辐射的一般人群的各种群体、对于给予诊断性的和牙科 X-射线的患者、对于暴露于辐射的工作人员、对于由于意外事故或恐怖事件而暴露于辐射的人群、对于暴露于“额外的”宇宙辐射的宇航员和航空

人员以及对于给予放射以治疗癌症的患者来说都是重要的。大约 60% 的癌症患者接受放射作为他们治疗的一部分，而对正常组织的损伤经常限制可能施予肿瘤的放射剂量。至于紫外辐射方面，黑色素瘤、翼状胬肉和白内障的患病率增加表明采取预防措施以减少这些问题的必要性。

越来越多的证据表明，困扰人类的许多退行性疾病的病因包括自由基反应。此类退行性疾病的实例包括动脉粥样硬化症、癌症、炎性关节病、关节炎、自身免疫性疾病、哮喘、糖尿病、老年性痴呆、阿尔茨海默症、帕金森病、多发性硬化症、肌肉萎缩症、局部缺血、中风、充血性心力衰竭和退行性眼病。生物老化过程也可能具有自由基因素的参与。大多数损伤细胞的自由基包括氧自由基，或更普遍地包括活性氧物质，其包括如单线态氧和过氧化氢的非自由基物质以及自由基。

眼是一个具有强活性氧物质活动的器官，因此它需要高水平的抗氧化剂以保护它的不饱和脂肪酸。青光眼是眼的退行性疾病的一个实例，它能导致视网膜细胞死亡。青光眼是一种未知病因的广泛分布的眼病，其可由于逐渐丧失视网膜神经节细胞 (RGC) 而导致最终失明。大多数青光眼患者具有升高的眼内压 (IOP)，因而临床上使用能够降低 IOP 的药物，包括  $\beta$  肾上腺素能阻断剂、前列腺素类、大麻素类和碳酸酐酶抑制剂，以降低疾病的影响。然而，有相当比例的青光眼患者不显示升高的眼内压，但是仍然显示出由于视网膜细胞死亡导致的视觉功能的逐渐减退。近来，注意力已集中在尝试使用神经保护剂以提高视网膜细胞的存活率，这应该是对所有青光眼患者有效的策略。

现在已明确：神经节细胞依赖于各种神经营养因子，但主要依赖于脑源性神经营养因子 (BDNF)。成熟的神经节细胞从其相应的目标神经元摄取分泌的 BDNF，并沿着它的轴突将 BDNF 运送到视网膜内的细胞体。目前青光眼被认为是通过在筛板位置阻断轴浆运输而阻断这种逆向的 BDNF 流 (Nickells RW., J. Glaucoma 1996; 5:345-356)。

尚未明确知道神经节细胞在没有 BDNF 供应的情况下能存活多久，但在培养物上进行的试验表明：只有数天左右。一种被考虑用于青光眼治疗的明显的神经保护策略是向神经节细胞提供不同来源的 BDNF。与青光眼有关的另一种损伤性刺激是兴奋性毒素的释放。这些分子实际上是如谷氨酸的兴奋性氨基酸，其通常被神经元用作神经递质。然而在高的局部浓度下，这些通常为良性的分子在附近细胞中激活高毒性反应（因此产生“兴奋性毒素”一词）。和神经营养因子相似，兴奋性毒素与细胞表面的受体相互作用。神经元上发现有 3 种已知的谷氨酸受体亚型，但在兴奋性毒性效应中显示出起最大作用的一个是 N-甲基-D-天冬氨酸（NMDA）受体。在人类青光眼患者和患有实验性青光眼的猴的玻璃体中已检测到谷氨酸水平升高 (Dreyer EB, Zurakowski D, Schumer RA, Podos SM, Lipton SA., Arch. Ophthalmol. 1996; 114:299-305)。

如铁和铜的过渡金属已知可以产生细胞毒性的自由基，而如转铁蛋白、血浆铜蓝蛋白和铁蛋白的铁调节蛋白已经显示出起到抗氧剂的作用，从而抵消这些金属的毒性作用。铁和铜阳离子在局部缺血过程中和涉及多种疾病过程时从组织中释放。失去血和氧的组织发生缺血性坏死或梗死，可能伴有不可逆的器官损伤。即使血流和氧流恢复到该器官或组织（再灌注），所述器官也不能立即恢复到正常的缺血前的状态。缺血后的功能障碍可能是由于受影响的器官中产生了氧自由基。由于白细胞的高反应性，再灌注过程中中性粒细胞的再进入会产生自由基损伤。已知铁和铜的阳离子催化羟自由基形成。螯合剂乙二胺四乙酸（EDTA）已知可以降低电离辐射的脂质过氧化反应 (Ayene-SI; Srivastava-PN Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med. 1985 Aug; 48(2): 197-205)。对缺血性应激组织给予抗氧剂和还原性等物可使线粒体复原，这在恢复体内正常钙平衡和组织功能方面是决定性的。

人们进一步知道：本身不是第一过渡系列元素的金属阳离子例如  $\text{Ca}^{++}$  在体内完成重要的功能，但也可能涉及许多致病性过程，如发生

在缺血和再灌注过程中的心脏钙超载。这些金属阳离子可能与第一过渡系列元素的阳离子竞争以与对  $\text{Ca}^{++}$  具有高亲和力的螯合剂螯合，因此干扰第一过渡系列阳离子与螯合剂的螯合。此外，例如  $\text{Ca}^{++}$  的阳离子的螯合可能影响这些阳离子在体内的正常的功能。因此，螯合剂的使用必须根据对各种阳离子在所治疗的疾病过程中的作用的认识和通过特异的螯合剂亲和力的选择进行调节以去除不利的阳离子而又不产生另外的离子失衡。

人们已经做了大量的减少正常组织损伤、同时仍能递送有效治疗量的电离辐射到癌症组织的尝试。这些技术包括近距离放射疗法、分割和超分割的剂量方法、复杂的剂量安排和递送系统以及采用线性加速器的高压放射治疗。然而，此类技术在最好的情况下仅能试图在杀死癌细胞的有益作用和射线对正常组织的不利的作用之间进行权衡。在治疗比方面还有很大的提高空间，治疗比是对肿瘤的损伤的量度除以对正常组织的损伤的比值。

通过给予例如去铁胺的铁螯合铁载体而与铁和铜阳离子形成络合物，从而降低这些阳离子的催化效率的尝试在抑制体内羟自由基导致的组织损伤方面没有获得明确的成功。如去铁胺的铁载体对铜阳离子来说是弱螯合剂。尽管铜在体内以比铁低得多的浓度存在，但铜在催化羟自由基形成上具有比铁高得多的活性。

聚乙二醇 (PEG) 和聚乙二醇甲基醚 (MP) 也已经被发现能降低组织损伤，但机理不明。PEG 是由具有相似分子量的同系物的混合物组成的两亲性的聚合物  $\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$ 。因此，例如 MP350 具有 350 的平均分子量，且由  $n=4 \sim 9$  和中位值  $n=7$  的同系物的混合物组成。较低分子量的聚合体 PEG 200-600 经口摄入后通过胃肠道被吸收，并原样从尿中排出。PEG 与水一起直接通过肠粘膜细胞膜被吸收。

PEG 200-600 无毒且是生物学惰性的，常用作施用水不溶性药物的载体。在多项研究中，凭经验发现 PEG 载体独自显示了显著的生物活性，导致对低分子量的 PEG 的进一步研究。例如，当对小鼠 X 射线照射前或照射后即刻腹膜内 (IP) 给予 PEG 400 时，PEG 400 在

致死率和发病率上显示出显著的保护作用 (Shaeffer 和 Schellenberg, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 10:2329, 1984; Shaeffer 等, *Radiat. Res.*, 107:125, 1986)。PEG 300 IP 给药后显示出减轻实验性脑震荡损伤的中枢神经系统后遗症的作用 (Clifton 等, *J. Neurotrauma*, 6:71, 1989)。

因此分子量 400 左右的 PEG 是显示出对抗组织损害的保护作用的独特的无毒物质。但是, 分子量大于 700 的 PEG 通过胃肠道的吸收很弱。低分子量 PEG 的保护作用的机制尚未确定, 但可能涉及 PEG 与脂质膜表面或蛋白质成分的相互作用。PEG 聚集在细胞膜附近, 降低水在膜表面的极性, 并且增加疏水相互作用 (Hoekstra 等, *J. Biol. Chem.*, 264:6786, 1989)。

已知某些 MP 螯合物可能是有效的铁螯合剂。例如, 已知 MP 可与亚氨基二乙酸末端 (MIDA) 连接。其他的用 MP 修饰的螯合物包括 MP 550-去铁胺 (高铁氧胺), 其通过分子量 550 的 MP 与羰二咪唑反应, 接着用得到的咪唑羰酰酯与去铁胺碱反应形成氨基甲酸酯键而制备。该物质作为钆的螯合物被生产, 用作肾脏磁共振造影剂 (Düewell 等, *Invest. Radiol.*, 26:50, 1991)。去铁胺已知为有效的铁离子螯合剂。

MIDA 可以通过 MP 350 与亚硫酰氯反应将其转化为氯化物 (Bueckmann 等, *Biotechnology & Applied Biochem.*, 9:258-268, 1987), 接着通过氯化物与亚氨基二乙酸钠反应生成亚氨基二乙酸盐而制备的 (Wuenschell 等, *J. Chromatog.* 543: 345-354, 1991)。甲酯可用甲醇 HCl 制备。然而, 人们一直在寻找作为更有效的螯合剂且无毒的其它 MP 螯合物。

美国专利 6,020,373 披露了连接到螯合甲基酯的聚乙二醇在动物模型中是非常有效的对抗辐射损伤和阿霉素毒性的保护剂。含有潜在的巯基的公知的辐射保护剂氨磷汀, S-2-[3-氨基丙基氨基]乙基硫代磷酸 (WR-2721, Etfiyol), 临床上已经广泛用于在放疗和化疗中保护正常组织 (Wasserman, T. H., *Seminars in Oncology* 21(5 增刊 11): 21-25,

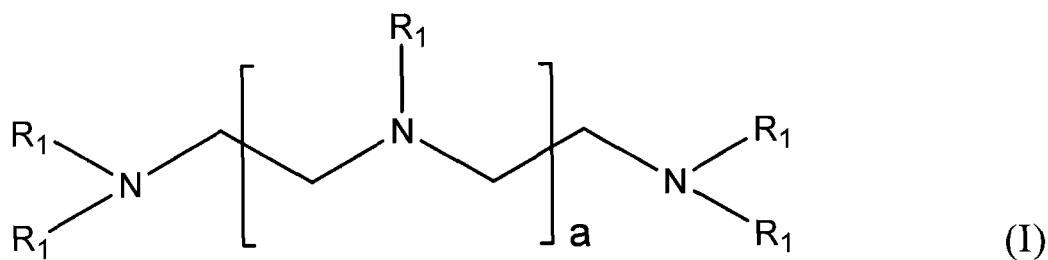
1994)，但是它的效果有限。例如半胱氨酸和巯基乙胺的巯基化合物已知在动物中具有辐射保护作用。巯基通过给破坏性分子提供氢原子来清除辐射产生的自由基。尽管做了大量努力以开发更有效的保护剂，但是没有发现显著优于巯基乙胺的基于巯基的辐射防护剂。此外，由于这些化合物的毒性，使用巯基药物以对抗辐射也受到限制。另外，有报道说极性药物的酯的使用有助于药物渗入到细胞中(Vos等, *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud.* 53:273-81, 1988)。

因此，很清楚需要具有更高性能的能够保护细胞、组织和器官免受辐射或化疗伴随的或者与疾病或其它状态相关的--其中涉及到如过氧化物、超氧阴离子、羟基自由基或氮氧化物的自由基氧化物或者重金属阳离子的生成--离子化试剂的破坏性影响的组合物和方法。

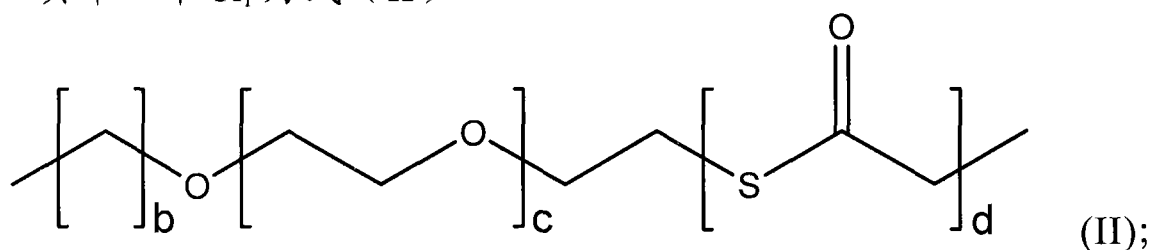
### 发明内容

本发明提供能够保护细胞、组织和器官免受伴随辐射或化疗的，或多种器官的退行性疾病相关的--特征在于它们引起如过氧化物、超氧阴离子、羟基自由基或氮氧化物的自由基或氧化剂或重金属阳离子的生成--离子化剂或其他损伤性物质的破坏性影响的组合物和方法。更具体地，本发明涉及甲氧基聚乙二醇硫酸酯螯合甲基酯，其通过渗入细胞膜去除自由基氧化剂的电子和去除可与过氧化物反应生成活性羟基的重金属，或去除由细胞器释放的  $\text{Ca}^{++}$ ，而用作对抗组织损伤的保护剂。本发明也用于降低各种类型的青光眼中出现的升高的眼内压。

相应地，本发明涉及式(I)的甲氧基聚乙二醇硫酸酯化合物：



其中一个  $R_1$  为式 (II)

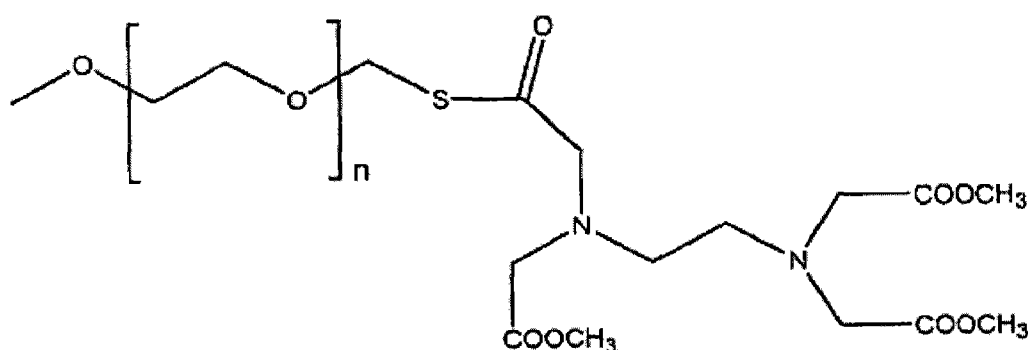


其余的各个  $R_1$  选自式 (II) 或选自由  $-\text{CH}_2\text{COOH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+$ 、 $-\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Ca}^{++}/2$ 、 $-\text{CH}_2\text{COOCH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$  和  $-\text{CH}_2\text{COOC}_3\text{H}_7$  组成的组中； $a$  为 0~6；各个  $b$  独立地为 0~18；各个  $c$  独立地为 3~10；以及  $d$  独立地为 1~3。

本发明的一种实施方式是其中  $a$  为 0，各个  $b$  为 0，各个  $c$  独立地为 3~10， $d$  为 1，且 3 个  $R_1$  为  $-\text{CH}_2\text{COOCH}_3$  的式 (I) 化合物。在一个实施例中，本发明是其中  $a$  为 0，各个  $b$  为 0，各个  $c$  独立地为 7 或 8， $d$  为 1，且 3 个  $R_1$  为  $-\text{CH}_2\text{COOCH}_3$  的式 (I) 化合物。

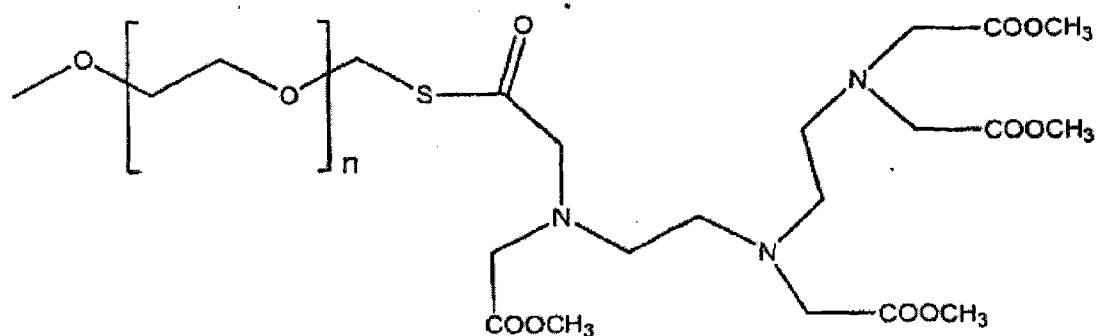
本发明的另一实施方式是其中  $a$  为 1，各个  $b$  为 0，各个  $c$  独立地为 3~10， $d$  为 1，且 4 个  $R_1$  为  $-\text{CH}_2\text{COOCH}_3$  的式 (I) 化合物。在一个实施例中，本发明是其中  $a$  为 1，各个  $b$  为 0，各个  $c$  独立地为 7 或 8， $d$  为 1，且 4 个  $R_1$  为  $-\text{CH}_2\text{COOCH}_3$  的式 (I) 化合物。

更具体地，本发明涉及具有下式结构的化合物：



其中  $n=3\sim 10$ 。

在另一实施方式中，本发明涉及具有下式结构的化合物：



其中  $n=3\sim 10$ 。

在本发明的一种实施方式中，所述式 (I) 化合物能够吸取电子。  
在本发明的一种实施方式中，所述式 (I) 化合物能够与重金属或  $\text{Ca}^{++}$  形成螯合物。

本发明也涉及一种药物组合物，其包括式 (I) 化合物和至少一种药学上可接受的载体或药学上可接受的辅剂。在一种实施方式中，本发明涉及一种药物组合物，其包括式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐或溶剂合物，以及任选的至少一种治疗药物。

本发明进一步涉及一种在需要的患者中防止因暴露于辐射而导致的组织损伤的方法，该方法包括给予患者治疗有效量的式 (I) 化合物。

在一种实施方式中，本发明涉及一种在需要的患者中防止自由基氧化剂导致的退行性疾病的方法，该方法包括给予患者治疗有效量的式 (I) 化合物，其中自由基氧化剂包括过氧化物、超氧阴离子、羟基自由基和氮氧化物。

在另一实施方式中，本发明涉及一种在需要的患者中治疗因青光眼而导致的视网膜细胞死亡的方法，该方法包括给予患者治疗有效量的包含式 (I) 化合物和至少一种药学上可接受的载体或药学上可接受的辅剂的组合物。

在另一实施方式中，本发明涉及一种在需要的细胞中从自由基氧化剂吸取电子的方法，该方法包括施用有效量的式 (I) 化合物，其中自由基氧化剂包括过氧化物、超氧阴离子、羟基自由基和氮氧化物。

在一个实施例中，本发明涉及一种在需要的细胞中防止由重金属

催化形成自由基氧化剂的方法，该方法包括施用有效量的式 (I) 化合物，其中自由基氧化剂包括过氧化物、超氧阴离子、羟基自由基和氮氧化物，其中所述化合物能够与重金属形成螯合物。

本发明也涉及一种试剂盒，其包括至少一种式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐或溶剂合物，及使用说明。

### 附图简要说明

图 1 表示药物被水解成从自由基氧化物去除电子的 MP 硫醇，同时螯合物去除细胞损伤生成的重金属的示例性过程。

图 2 表示与 EDTA 甲基三酯偶联的甲氧基聚乙二醇硫醇 (MPSEDE) 的典型质谱。

图 3 表示作为辐射防护剂的 MP 硫醇化合物的效率。

图 4 证明眼睛局部给药时 MPDTE 渗透到大鼠的眼球。

图 5 表示眼睛局部给予 MPDTE 的剂量反应。

图 6 表示眼睛局部给予 MPSEDE 的剂量反应。

图 7 表示眼睛局部给予 30mM MP 化合物的平均剂量反应。

图 8 表示 MPAEDE 和 MPDTE 浓度增加对眼内压的影响。

图 9 表示 MPDTE 引起的 IOP 降低与已知的辐射防护剂的比较。

图 10 表示 MPDTE、MP 和 DTE 引起的 IOP 降低的比较。

图 11 表示同时给予 MP 化合物和 NMDA 之后的视网膜电流图测定结果的代表性的 A-波成分。

图 12 表示同时给予 MPG 化合物和 NMDA 之后的视网膜电流图测定结果的代表性的 B-波成分。

### 具体实施方式

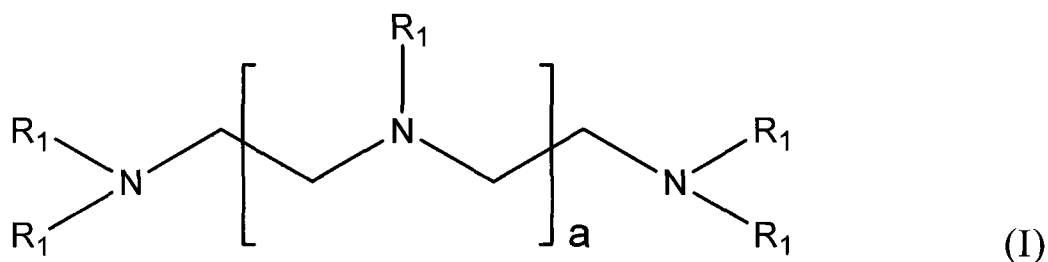
本发明提供新的用于保护细胞、组织、器官和机体免受伴随辐射或化学治疗的或与各种器官的退行性疾病相关的——它们引起自由基、超氧阴离子或重金属阳离子生成--的离子化试剂的破坏性影响的化合物。在一个方面，本发明涉及潜在的硫醇与潜在的螯合物以及有助于

输送到细胞内的两亲性聚乙二醇尾的组合，从而能够实现对抗自由基对细胞的损伤的双重保护机制。

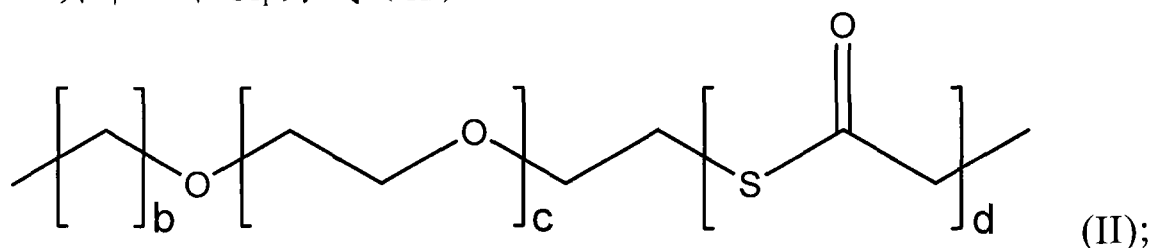
在一个方面，本发明涉及新的平均分子量为 200 ~ 600，更优选 300 ~ 450，且最优选 350 (MP350) 的两亲性细胞渗透性甲氧基聚乙二醇 (MP)，其通过硫酯键将螯合基团化学连接到聚合物的非甲基末端而进行修饰。

可用于修饰本发明的甲氧基聚乙二醇的示例性螯合基团包括乙二胺四乙酸 (EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸 (DTPA) 和例如通过溴乙酸或衍生物与三亚乙基四胺和其他包含乙撑胺键的高级同系物反应形成的类似螯合基团，或者如环己烷二胺四乙酸和乙二醇氨基乙醚四乙酸 (EGTA) 的其他螯合基团。

本发明化合物一般具有下式结构：



其中一个  $\text{R}_1$  为式 (II)



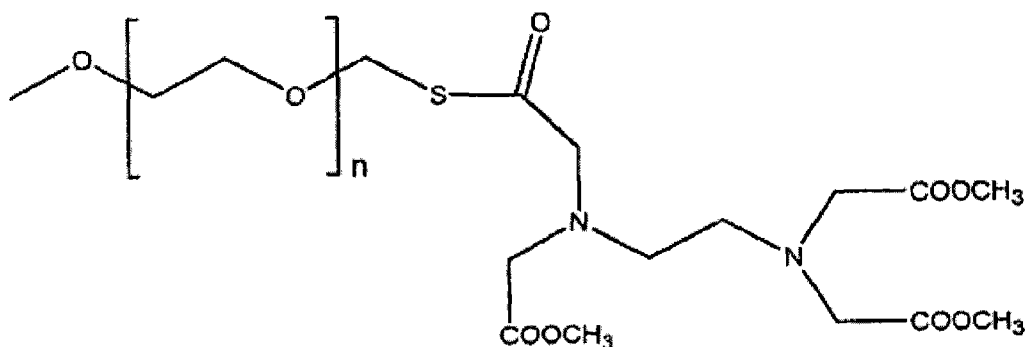
其余的各个  $\text{R}_1$  选自式 (II) 或选自自由  $-\text{CH}_2\text{COOH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+$  或其它单价离子、 $-\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Ca}^{++}/2$  或其它二价或多价离子、 $-\text{CH}_2\text{COOCH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$  和  $-\text{CH}_2\text{COOC}_3\text{H}_7$  组成的组中；

a 为 0 ~ 6；各个 b 独立地为 0 ~ 18；各个 c 独立地为 3 ~ 10；以及 d 独立地为 1 ~ 3。

本发明的一种实施方式是其中  $a$  为 0, 各个  $b$  为 0, 各个  $c$  独立地为 3 ~ 10、优选为 7,  $d$  为 1, 一个  $R_1$  为式 (II), 且三个  $R_1$  为  $-\text{CH}_2\text{COOCH}_3$  的式 (I) 化合物。

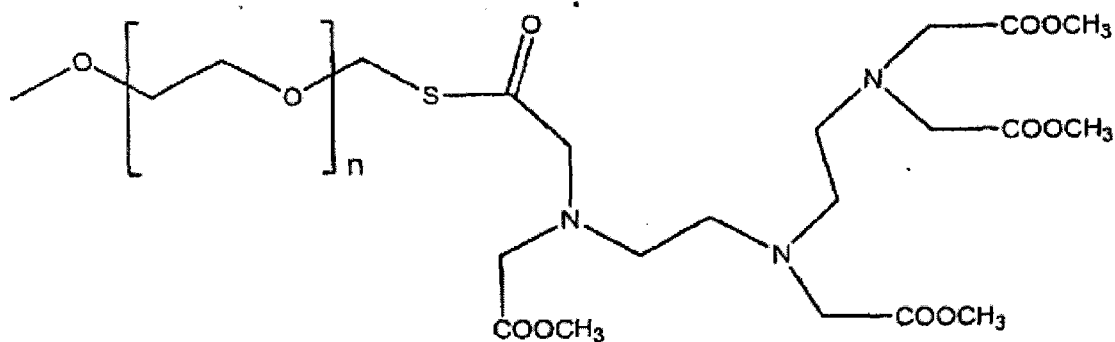
本发明的另一实施方式是其中  $a$  为 1, 各个  $b$  为 0, 各个  $c$  独立地为 3 ~ 10、优选为 7,  $d$  为 1, 一个  $R_1$  为式 (II), 且其余的  $R_1$  为  $-\text{CH}_2\text{COOCH}_3$  的式 (I) 化合物。

在一个实施例中, 本发明的化合物为具有下式结构的乙二胺四乙酸甲基三酯的甲氧基聚乙二醇硫酸酯 (MPSEDE):



其中  $n=3 \sim 10$ , 优选 7。

在另一实施例中, 本发明的化合物为具有下式结构的二亚乙基三胺五乙酸甲基四酯的甲氧基聚乙二醇硫酸酯:



其中  $n=3 \sim 10$ , 优选 7。

本发明进一步提供制备如上定义的式 (I) 化合物的方法, 其包括首先通过与亚硫酸氯反应将 MP 转化为氯化物 (Bueckmann 等, *Biotechnology & Applied Biochem.*, 9:258-268, 1987), 然后通过该氯化

物与硫脲反应转化为硫醇 (MP 硫醇) (Urquhart 等, Organic Syntheses Coll. Vol 3; Horning, E. C; Ed.; Wiley, N. Y., 1955; 363-365 页) 的步骤。在二甲基甲酰胺溶剂中使用羰二咪唑作为偶合剂使 MP 硫醇与螯合剂偶合成为硫酯 (Gais, Angew. Chem. Int. Ed. 16:244-246, 1977), 接着用甲醇和羰二咪唑进行其它羧基的甲基酯化反应。乙二胺四乙酸的甲氧基聚乙二醇硫酯 (MPSEDE) 和二亚乙基三胺五乙酸的甲氧基聚乙二醇硫酯 (MPSDTE) 可以通过 MP 硫醇分别与 EDTA 和 DTPA 偶合以同样的方式制备。

上述式 (I) 化合物可转化成其药学上可接受的盐或溶剂合物, 优选例如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、醋酸盐、延胡索酸盐、马来酸盐、酒石酸盐、柠檬酸盐、草酸盐、甲磺酸盐或对甲苯磺酸盐的酸加成盐。

式 (I) 化合物可以以立体异构形式存在。可以理解: 本发明包括式 (I) 化合物的所有几何和光学异构体及其包含外消旋体的混合物的使用。互变异构体及其混合物的使用也构成本发明的一个可预期的方面。

式 (I) 化合物可包括其它的螯合剂或还原基团, 例如作为螯合剂的 BAPTA、TPEN(四-(2-吡啶基甲基)乙二胺)、钙黄绿素和作为还原基团的 NADH 和 NAD(P)H。

本发明化合物的一个特别重要的特征是: 它们渗透细胞膜的能力。在一种实施方式中, 本发明涉及平均分子量为 200 ~ 600, 更优选 300 ~ 450, 且最优选 350 (MP350) 的新的两亲性细胞渗透性甲氧基聚乙二醇 (MP), 其通过键连接将螯合基化学连接到聚合物的非甲基末端而进行修饰, 所述键连接包括例如硒、亚砷、含烯二醇基的还原酮类(例如抗坏血酸和二羟马来酸)、氢化奎宁(hydroquinine)、二氢吡啶、包括生育酚环系统的四取代的氢醌醚、包括二氢硫辛酸的二巯基化物、吲哚以及包括类胡萝卜素的共轭聚烯的官能团, 从而成为自由基还原剂。其他的螯合物可包括用氨基甲酸酯基代替羧基的螯合物(包括去铁胺), 和杂环胺(包括邻二氮菲、1,1-联吡啶和 8-羟基喹啉)。

在一个实施例中，本发明的化合物包括环己烷二胺四乙酸和乙二醇氨基乙醚四乙酸(EGTA)的MP硫酯，其是通过在将MP硫醇用羰二咪唑偶联到螯合物上的步骤中用环己烷二胺四乙酸或EGTA代替EDTA而合成的。

尽管不局限于任何具体的作用理论，这种渗透细胞膜的能力被认为是两亲性的MP和非极性酯基赋予的非极性的结果，因而化合物可以通过非极性代谢产物使用的膜通道，随后通过细胞内的酯酶迅速激活为硫醇和活性螯合物。硫醇被认为通过形成二硫化物有效地去除例如过氧化物、超氧化物、羟基自由基或氮氧化物的自由基的电子；而螯合物被认为可除去细胞损伤产生的、且可与过氧化物反应生成活性羟基的重金属例如 $\text{Fe}^{++}$ 、 $\text{Fe}^{+++}$ 或 $\text{Cu}^{++}$ ，或者除去可能由细胞器释放的 $\text{Ca}^{++}$ 。因此本发明的化合物具有通过两种不同的机制保护细胞的能力。这个过程图示说明于图1中。

在另一方面，本发明提供式(I)化合物或其药学上可接受的盐或溶剂合物在制备治疗药物中的用途。可以理解：所述药物可以包括具有不同或相似的作用机理的其他组分或药学上可接受的辅剂，以达到比MP酯或盐单独使用更宽范围的预防或治疗效果。术语“辅剂”应解释为调节主要成分的作用的成分，或提高医疗效果的成分或提高对抗原的免疫反应的成分。

在本说明书的上下文中，术语“治疗”，除非有相反的具体表示，也包括“预防”。术语“治疗的”和“治疗地”应做相应的解释。

本发明提供在患有阿尔茨海默症或存在患病风险的患者中治疗这一使人虚弱的神经变性疾病的安全且有效的方法，该方法包括给予需要的患者治疗有效量的式(I)化合物或其药学上可接受的盐或溶剂合物。

本发明也提供在患有帕金森病或存在患所述疾病风险的患者中治疗所述疾病的安全且有效的方法，该方法包括给予患者治疗有效量的式(I)化合物或其药学上可接受的盐或溶剂合物。

本发明也提供在患有多发性硬化症(MS)或存在患所述疾病风

险的患者中治疗所述疾病的安全且有效的方法，该方法包括给予患者治疗有效量的式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐或溶剂合物。

本发明仍进一步提供在患有肌肉萎缩症 (MD) 或存在患所述疾病风险的患者中治疗肌肉萎缩症的安全且有效的方法，该方法包括给予患者治疗有效量的式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐或溶剂合物。

本发明提供通过给予患者治疗有效量的式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐或溶剂合物或其药学上可接受的辅剂，在需要的患者中治疗辐射损伤和预防与辐射有关的癌症的安全且有效的方法。辐射源可以是电磁辐射 (包括可见光或紫外线)，或核辐射 (包括  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ )，或宇宙辐射。损伤的类型可以包括，但不限于例如晒斑、老年斑和黑色素瘤的各种形式的皮肤损伤，以及体内细胞消亡、囊肿生成、神经病变和各种类型的良性和恶性肿瘤。

本发明提供通过给予患者治疗有效量的式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐或溶剂合物或其药学上可接受的辅剂以及一种或多种具有自由基和/或重金属毒性成分的化学药物在需要化疗的患者中或者无意地或故意地给予具有自由基和/或重金属毒性成分的化学药物的患者中治疗由化疗产生的对正常组织的毒性的安全且有效的方法。所述式 (I) 化合物可以在给予具有自由基和/或重金属毒性成分的化学药物之前、之中或之后给予。本发明可用于降低包括氟嘧啶、嘧啶核苷、嘌呤、铂类似物、蒽环类 (antrocycline)、鬼臼毒素、喜树碱、激素和激素类似物、酶、蛋白质和抗体、长春花生物碱、紫杉烷等的具有自由基和/或重金属毒性成分的化学药物的毒性。尽管本发明的降低毒性的方法可适用于任何化学治疗药物，所述化学治疗药物的一些实例为依立替康、5-氟尿嘧啶、红豆杉醇、顺铂、阿霉素、奥沙利铂、环磷酰胺、EGF 和 VGF 抑制剂、乙酰吗喃、对乙酰氨基酚、阿柔比星、阿地白介素、阿仑单抗、阿利维 A 酸、六甲蜜胺、氨磷汀、氨基乙酰丙酸、氨柔比星、安吡啶、阿那格雷、阿那曲唑、ANCER、安西司亭、ARGLABIN、三氧化二砷、BAM 002 (Novelos)、贝沙罗汀、

比卡鲁胺、5-溴去氧尿苷、卡培他滨、西莫白介素、西曲瑞克、克拉屈滨、克霉唑、阿糖胞苷十八烷基磷酸钠、DA 3030 (Dong-A)、达克珠单抗、地尼白介素-毒素连接物、地洛瑞林、右雷佐生、地拉卓、多西他赛、二十二烷醇、度骨化醇、去氧氟尿苷、多柔比星、溴隐亭、卡氮芥、阿糖胞苷、氟尿嘧啶、HIT 双氯芬酸、 $\alpha$ -干扰素、柔红霉素、维甲酸、依地福新、依决洛单抗、依氟鸟氨酸、乙嘧替氟、表柔比星、倍他依泊汀、依托泊苷磷酸盐、依西美坦、依昔舒林、法倔唑、非格司亭、非那雄胺、氟达拉滨磷酸盐、福美坦、福莫司汀、硝酸镓、吉西他滨、吉妥珠单抗奥唑米星、吉美嘧啶/奥替拉西/替加氟联用、glycopine、戈舍瑞林、依铂、人绒毛膜促性腺激素、人类胎儿甲胎蛋白、伊班膦酸、伊达比星、咪喹莫特、干扰素  $\alpha$ 、天然的干扰素  $\alpha$ 、干扰素  $\alpha$ -2、干扰素  $\alpha$ -2a、干扰素  $\alpha$ -2b、干扰素  $\alpha$ -N1、干扰素  $\alpha$ -n3、复合  $\alpha$  干扰素-1、天然的干扰素  $\alpha$ 、干扰素  $\beta$ 、干扰素  $\beta$ -1a、干扰素  $\beta$ -1b、干扰素  $\gamma$ 、天然干扰素  $\gamma$ -1a、干扰素  $\gamma$ -1b、白细胞介素-1 $\beta$ 、碘苜蓿、伊立替康、伊索拉定、兰瑞肽、LC 9018 (Yakult)、来氟米特、来格司亭、香菇多糖硫酸盐、来曲唑、白细胞  $\alpha$  干扰素、亮丙瑞林、左旋咪唑+氟尿嘧啶、利阿唑、洛铂、氟尼达明、洛伐他汀、马索罗酚、美拉肿醇、甲氧氯普胺、米非司酮、米替福新、米立司亭、错配双链 RNA、米托胍脞、二溴卫矛醇、米托蒽醌、莫拉司亭、那法瑞林、纳洛酮+喷他佐辛、那托司亭、奈达铂、尼鲁米特、那可丁、新红细胞生成刺激蛋白、NSC 631570 奥曲肽、奥普瑞白介素、奥沙特隆、奥沙利铂、紫杉醇、帕米膦酸、培门冬酶、聚乙二醇化干扰素  $\alpha$ -2b、木聚硫钠、喷司他丁、溶链菌、吡柔比星、兔抗胸腺细胞多克隆抗体、聚乙二醇干扰素  $\alpha$ -2a、吡吩姆钠、雷洛昔芬、雷替曲塞、拉布立酶、铼 Re 186 1-羟基-亚乙基-1,1-二膦酸、R11 维胺酸、利妥昔单抗、罗莫肽、来昔决南钆(153 Sm)、沙格司亭、西佐喃、索布佐生、索纳明、氯化铟-89、苏拉明、他索纳明、他扎罗汀、替加氟、替莫泊芬、替莫唑胺、替尼泊苷、四氯十氧化物(tetrachlorodecaoxide)、沙利度胺、胸腺法新、促甲状腺素  $\alpha$ 、拓扑替康、托瑞米芬、托西莫单抗-碘 131、

群司珠单抗、曲奥舒凡、维甲酸、曲洛司坦、三甲曲沙、曲普瑞林、天然肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、乌苯美司、膀胱癌疫苗、丸山疫苗、黑色素瘤溶解疫苗、戊柔比星、维替泊芬、长春瑞滨、维鲁利秦(VIRULIZIN)、净司他丁斯酯或唑来膦酸；阿巴瑞克；AE 941 (Aetema)、氨莫司汀、反义寡核苷酸、bcl-2 (Genta)、APC 8015 (Dendreon)、西妥昔单抗、地西他滨、右旋氨鲁米特、地吡醌、EL 532 (Elan)、EM 800 (Endorecherche)、恩尿嘧啶(eniluracil)、依他硝唑、芬维 A 胺、非格司亭 SD01 (Amgen)、氟维司群、加洛他滨、胃泌素 17 免疫原、HLA-B7 基因治疗(Vical)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、二盐酸组胺、替伊莫单抗 tiuxetan (ibritumomab tiuxetan)、伊洛马司他、IM 862 (Cytran)、白介素-2、艾泼昔芬(iproxifene)、LDI 200 (Milkhaus)、来立司亭、林妥珠单抗、CA 125 Mab (Biomira)、癌症 Mab (Japan Pharmaceutical Development)、HER-2 和 Fc MAb(Medarex)、个体遗传型 105AD7 MAb (CRC Technology)、个体遗传型 CEA MAb (Trilex)、LYM-1-碘 131 MAb (Techniclone)、多态上皮细胞粘蛋白-钇 90 MAb (Antisoma)、马立马司他、美诺立尔、米妥莫单抗、莫特沙芬钆、MX 6 (Galderma)、奈拉滨、诺拉曲塞、P30 蛋白质、培维索孟、培美曲塞、泊非霉素、普琳司他、RL 0903 (Shire)、卢比替康、沙铂、苯乙酸钠、磷门冬酸、SRL 172 (SR Pharma)、SU 5416 (SUGEN)、SU 6668 (SUGEN)、TA 077 (Tanabe)、四硫钼酸盐、唐松草碱(thaliblastine)、血小板生成素、乙基锡初紫红素、替拉扎明、癌症疫苗(Biomira)、黑色素瘤疫苗(New York University)、黑色素瘤疫苗(Sloan Kettering Institute)、黑色素瘤肿瘤溶解疫苗(New York Medical College)、病毒性黑色素瘤细胞溶解疫苗(Royal Newcastle Hospital)或伐司朴达。

本发明提供在患有局部缺血或存在患所述疾病风险的患者中治疗所述疾病的安全且有效的方法，该方法包括给予患者治疗有效量的式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐或溶剂合物。

本发明也提供在患有或存在患中风风险的患者中治疗所述疾病的安全且有效的方法，该方法包括给予患者治疗有效量的式 (I) 化

合物或其药学上可接受的盐或溶剂合物。

本发明也提供在患有或存在患充血性心力衰竭风险的患者中治疗所述疾病的安全且有效的方法，该方法包括给予患者治疗有效量的式(I)化合物或其药学上可接受的盐或溶剂合物。

本发明仍进一步提供在患有或存在患眼睛疾病风险的患者中治疗所述疾病的安全且有效的方法，该方法包括给予患者治疗有效量的式(I)化合物或其药学上可接受的盐或溶剂合物。其他疾病可能包括医学目前已知的任何疾病，包括但不限于青光眼、黄斑变性、白内障、黑色素瘤、翼状胬肉等。

本发明仍进一步提供在患有或存在患神经变性、风湿病、关节炎或自身免疫疾病风险的患者中治疗所述疾病的安全且有效的方法，该方法包括给予患者治疗有效量的式(I)化合物或其药学上可接受的盐或溶剂合物。其他疾病可能包括医学目前已知的任何疾病，包括但不限于各种类型的关节炎、节段性回肠炎、纤维肌性发育不良等。

本发明提供通过给予患者治疗有效量的式(I)化合物或其药学上可接受的盐或溶剂合物，在需要的患者中保护细胞、组织或器官的安全且有效的方法。

本发明提供通过给予患者治疗有效量的式(I)化合物或其药学上可接受的盐或溶剂合物，在需要的患者中治疗或预防铁或其它重金属或过渡元素毒性的安全且有效的方法。

本发明提供通过在介质中包含治疗有效量的式(I)化合物或其药学上可接受的盐或溶剂合物，保护离体器官、组织、细胞(包括红细胞、精子、植物细胞、提取物、膜、脂质体、蛋白质、碳水化合物、类脂、DNA 或其它的天然或合成的生物材料)的安全且有效的方法。

式(I)化合物和其药学上可接受的盐和溶剂合物可独立使用，但一般以其中式(I)化合物/盐/溶剂合物(活性成分)与药学上可接受的辅剂、稀释剂或载体结合的药物组合物的形式施用。根据给药的方式不同，所述药物组合物优选包含0.05~99w%(重量百分比)，更优选0.05~80w%，仍更优选0.10~70w%，且进一步优选0.10~50w%

的活性成分，所有重量百分比均基于总的组合物。

本发明也提供一种药物组合物，其包含此处定义的式(I)化合物或其药学上可接受的盐、酯或溶剂合物，与药学上可接受的辅剂、稀释剂或载体结合。

本发明进一步提供制备本发明的药物组合物的方法，该方法包括：将此处描述的式(I)化合物或其药学上可接受的盐、酯或溶剂合物与药学上可接受的辅剂、稀释剂或载体混合。所述载体在与制剂的其它组分相容且对其接受者无害的意义上必须是“可接受的”。

所述药物组合物可以以溶液、混悬液、本身的或七氟代烷的气溶胶和干粉制剂的形式局部给药(例如，对肺和/或气道或对皮肤或其它上皮表面)；或者全身给药，例如，通过以片剂、胶囊、糖浆剂、散剂或颗粒剂的形式口服给药，或通过以溶液或混悬液的形式非消化道给药，或通过皮下给药或以栓剂的形式通过阴道或直肠给药，或经皮给药。

本发明的化合物和组合物可以任意地以包含常规无毒的药学上可接受的载体、辅剂和赋形剂的剂量单位制剂形式通过任何可用的和有效的给药系统给予，包括但不限于口服、口腔内(bucally)、耳道或鼻道内、非消化道、通过吸入喷雾、通过局部涂敷、通过注射、经皮、经阴道或经直肠(如使用栓剂)施用。非消化道途径包括皮下注射、静脉注射、肌肉注射、胸骨内注射或输注技术。

本领域技术人员已知的化合物经皮给药方式涉及药物化合物通过所述化合物的经皮通道输送进入患者的系统循环。局部给药也可能包括如透皮贴剂或离子电渗装置的经皮给药的使用。其他组分也可引入到透皮贴剂中。例如，组合物和/或透皮贴剂能与一种或多种包括，但不限于羟苯甲酯、羟苯丙酯、氯甲酚、苯扎氯铵等的防腐剂或抑菌剂一起配制。化合物和组合物局部给药的剂型可以包括乳剂、糊剂、喷雾剂、洗剂、凝胶剂、软膏剂、滴眼剂、滴鼻剂、滴耳剂等。在这些剂型中，本发明的组合物能与如作为防腐剂的1%或2%(wt/wt)苯甲醇、乳化蜡、甘油、棕榈酸异丙酯、乳酸、纯水和山梨醇溶液混

合形成白色、平滑的、均匀的、不透明的乳剂或洗剂。此外，这些组合物可包含聚乙二醇 400，其可作为溶剂或吸收调节剂。组合物能与如作为防腐剂的 2% (wt/wt) 苯甲醇、白凡士林、乳化蜡和 Tenox II (丁羟茴醚，没食子酸丙酯，柠檬酸，丙二醇) 混合形成软膏剂。包扎材料(例如纱布)的织物片或卷可以在溶液、洗剂、乳剂、软膏剂或其他剂型中浸渍所述组合物，这种形式也可用于局部给药。所述组合物也可使用经皮系统局部涂敷，例如一种基于丙烯酸的聚合物粘合剂与浸渍有所述组合物且被层压到不渗透的背衬物上的树脂交联剂形成的经皮系统。

用于口服给药的固体剂型可以包括胶囊、片剂、泡腾片、咀嚼片、丸剂、散剂、囊剂、颗粒剂和凝胶剂。在此类固体剂型中，活性化合物可混合至少一种例如蔗糖、乳糖或淀粉的惰性稀释剂。在正常情况下，这些剂型也可以包括除惰性稀释剂之外的其它物质，例如，如硬脂酸镁的润滑剂。在胶囊剂、片剂、泡腾片剂和丸剂的情况下，所述剂型也可包括缓冲剂。可制备包含本发明的活性化合物或组合物与植物油的混合物的软明胶胶囊。硬明胶胶囊可包含活性化合物与固体的、粉状的载体例如乳糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露醇、马铃薯淀粉、玉米淀粉、支链淀粉、明胶的纤维素衍生物的组合的颗粒。片剂和丸剂可制备成有肠衣的。

用于口服给药的液体剂型可以包括药学上可接受的包含本领域通常使用的惰性稀释剂(例如水)的乳液、溶液、混悬液、糖浆剂和酏剂。这些组合物还可包括例如湿润剂、乳化和悬浮剂，以及甜味、矫味和芳香剂的辅剂。

用于本发明的化合物和组合物的阴道或直肠给药的栓剂可通过将所述化合物或组合物与适合的、无刺激的例如可可豆脂和聚乙二醇的赋形剂混合制备而成，它们在室温下为固体但在体温下为液体，因而发生熔融并释放药物。

例如无菌的可注射水溶液或油状混悬液的可注射制剂可以按照现有技术使用适合的分散剂、湿润剂和/或悬浮剂制备。所述无菌的可

注射制剂也可以是无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂的无菌可注射的溶液或混悬液，例如 1,3-丁二醇溶液。可使用的所述可接受的载体和溶剂包括水、林格液和等渗氯化钠溶液。无菌的非挥发性油也常规地用作溶剂或混悬介质。

本发明的组合物可进一步包括常规的赋形剂，即，适合肠胃外使用的药学上可接受的有机或无机载体物质，其不与活性成分发生有害的反应。适合的药学上可接受的载体包括，例如，水、盐溶液、乙醇、植物油、聚乙二醇、明胶、乳糖、淀粉酶、硬脂酸镁、滑石粉、表面活性剂、硅酸、粘性石蜡、芳香油、脂肪酸单甘油酯和甘油二酯、Petroethral 脂肪酸酯、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等。药物制剂可以为灭菌的，且如果需要可与例如润滑剂、防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、影响渗透压的盐、缓冲剂、着色剂、调味剂和/或芳香物质等的辅剂混合，这些辅剂不与活性成分发生有害反应。对于肠胃外使用，特别适合的赋形剂由溶液（优选油性或水性溶液），以及混悬液、乳剂或注入物组成。水性混悬液可包含能增加混悬液的粘性的物质，并且包括，例如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇和/或右旋糖苷。任选地，所述混悬液也可以包含稳定剂。

在本发明实施中有用的溶剂包括药学上可接受的、可与水混溶的、非水性的溶剂。在本发明的上下文中，这些溶剂应该包括普遍接受于药学使用的、基本上可与水混溶的且基本上非水性的溶剂。优选地，这些溶液也不是邻苯二甲酸酯增塑剂溶解溶剂，因此，当在医疗设备中使用时，它们基本上不溶解可能存在于医疗设备中的邻苯二甲酸酯增塑剂。更优选地，在本发明实施中可用的药学上可接受的、可与水混溶的、非水性的溶剂包括，但不限于 N-甲基吡咯烷酮(NMP)，丙二醇，乙酸乙酯，二甲亚砷，二甲基乙酰胺，苯甲醇，2-吡咯烷酮，苯甲酸苄酯，C<sub>2-6</sub> 链烷醇，2-乙氧基乙醇，如醋酸 2-乙氧基乙酯、乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙二醇二乙醚或乙二醇二甲醚的烷基酯，(S)-(-)-乳酸乙酯，丙酮，甘油，例如甲乙酮或二甲基砷的烷基酮，四氢呋喃，如己内酰胺的环烷酰胺，癸甲基亚砷，油酸，如 N,N-二乙基-间甲苯

甲酰胺的芳族胺或者 1-十二烷基氮杂环庚烷-2-酮。

本发明的组合物可进一步包括增溶剂。增溶作用是使得能够形成溶液的现象。它与两亲分子(即在溶液中同时具有极性和非极性双重性质,因而有能力增加正常情况下不溶或仅微溶的物质在分散介质中的溶解度的那些分子)的存在有关。增溶剂经常具有表面活性剂的性质。它们的功能可能是增加溶质在溶液中的溶解度,而不是充当溶剂,虽然在例外的情况下,单一化合物可同时具有增溶和溶剂的特性。在本发明实施中有用的增溶剂包括,但不限于三乙酸甘油酯、聚乙二醇类(例如,如 PEG 300、PEG 400 或它们与 3350 的混合物等)、聚山梨酯类(例如,如聚山梨酯 20、聚山梨酯 40、聚山梨酯 60、聚山梨酯 65、聚山梨酯 80 等)、泊洛沙姆类(例如,如泊洛沙姆 124、泊洛沙姆 188、泊洛沙姆 237、泊洛沙姆 338、泊洛沙姆 407 等)、聚氧乙烯醚类(例如,如聚乙二醇 2 鲸蜡基醚、聚乙二醇 10 鲸蜡基醚和聚乙二醇 20 鲸蜡基醚、聚乙二醇 4 月桂基醚、聚乙二醇 23 月桂基醚、聚乙二醇 2 油醚、聚乙二醇 10 油醚、聚乙二醇 20 油醚、聚乙二醇 2 硬脂酰醚、聚乙二醇 10 硬脂酰醚、聚乙二醇 20 硬脂酰醚、聚乙二醇 100 硬脂酰醚等)、聚乙二醇硬脂酸酯类(例如,如聚乙二醇 30 硬脂酸酯、聚乙二醇 40 硬脂酸酯、聚乙二醇 50 硬脂酸酯、聚乙二醇 100 硬脂酸酯等)、聚乙氧基化硬脂酸酯类(例如,如聚乙氧基 12-羟基硬脂酸酯等),以及三丁酸甘油酯。

可加入到本发明的组合物中的其它物质包括环糊精,以及环糊精类似物和衍生物,以及能提高本发明组合物稳定性、保持产品在溶液中或防止与施用本发明组合物有关的副作用的其他的可溶性赋形剂。环糊精可从杨森药厂获得,商品名为 ENCAPSIN<sup>®</sup>。

如果需要,所述组合物也可包含少量的湿润剂、乳化剂和/或 pH 缓冲剂。所述组合物可以是液体溶液、混悬剂、乳剂,片剂,丸剂,胶囊、缓释制剂或散剂。所述组合物可与传统的粘合剂和例如甘油三酯的载体制备成栓剂。口服制剂包括例如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等的标准载体。

各种药物递送系统是已知的且可用于施用本发明的化合物或组合物，包括，例如脂质体包囊、微泡、乳液、微粒、微囊、纳米粒等。所需剂量可以作为单一单元或缓释形式给予。

在例如磷脂或表面活性剂的适合的赋形剂或试剂存在下，可通过使用常规的例如磨、碾、喷雾干燥等技术微粉化所述制剂以提高所述组合物的生物利用度。

本发明的缓释剂型可以包括具有治疗药物分散其中的微粒和/或纳米粒，或者可以包括纯的，优选结晶的，固体形式的治疗药物。为了缓释给药，包含纯的（优选结晶的）治疗药物的微粒剂型是优选的。本发明的这个方面的药物剂型可以是适合缓释给药的任何型式。优选的缓释药物剂型表现出一种或多种下述特性：微粒（例如，直径约 0.5 微米~约 100 微米、优选约 0.5 微米~约 2 微米，或者直径约 0.01 微米~约 200 微米、优选约 0.5 微米~约 50 微米、且更优选约 2 微米~约 15 微米）或纳米粒（例如，直径约 1.0 纳米~约 1000 纳米、优选约 50 纳米~约 250 纳米，或者直径约 0.01 纳米~约 1000 纳米、优选约 50 纳米~约 200 纳米），自由流动的粉末结构；设计为在约 0.5 天~约 180 天、优选约 1 到 3 天~约 150 天、更优选约 3 天~约 180 天、且最优选约 10 天~约 21 天的时间段内生物降解的可生物降解的结构；或者使得治疗药物在约 0.5 天~约 180 天、更优选约 30 天~约 120 天，或约 3 天~约 180 天、更优选约 10 天~约 21 天的时间段内发生扩散的非生物降解的结构；与剂型施用的靶组织和局部生理环境生物相容，包括产生生物相容的生物降解产物；利于形成稳定且可重现的治疗药物的分散体，以优选地形成治疗药物-聚合物基质，通过以下的一种或两种途径产生活性治疗药物的释放：（1）通过剂型扩散治疗药物（当治疗药物可溶于限定剂型的外形的成形聚合物或聚合物混合物时）；或（2）随着剂型生物降解释放所述治疗药物；和/或对靶向剂型，具有优选约 1~约 10,000 的结合蛋白/肽与剂型的结合的能力，且更优选每 150 平方埃的颗粒表面积具有至多约 1 个结合肽与剂型的结合。结合蛋白/肽与剂型的结合的总数取决于所用的颗粒尺寸。结合蛋白或肽

能够通过共价配体插入或此处描述的非共价形式偶联到所述药物剂型的颗粒上。

纳米粒缓释药物剂型优选为可生物降解的，且任选地结合到血管平滑肌细胞并主要通过胞吞作用进入这些细胞。纳米粒生物降解在前溶酶体小囊泡和溶酶体内经过一段时间（例如 30 ~ 120 天；或 10 ~ 21 天）发生。因为后来的靶细胞仅通过吞噬作用摄取少许的较小的微粒进入到细胞中，本发明优选采用较大微粒的药物剂型释放治疗药物。本领域的专业人员可以理解：靶细胞吸收并代谢本发明的剂型的明确机理取决于这些细胞的形态学、生理学性质和代谢过程。颗粒缓释药物剂型的尺寸对于细胞同化作用的方式也很重要。例如，更小的纳米粒可与细胞间的组织液一起流动并渗入被注入的组织。较大的微粒倾向于更易在被注入的初始组织中被细胞间隙捕获，而因此可用于递送抗增殖的治疗药物。

本发明优选的缓释剂型包括可生物降解的微粒或纳米粒。更优选地，可生物降解的微粒或纳米粒由包含基质的聚合物形成，该基质通过随机的、非酶解的、水解分裂进行生物降解以释放治疗药物，由此在微粒结构中形成孔隙。

本发明的化合物和组合物可被制成药学上可接受的酯和盐。药学上可接受的盐包括，例如碱金属盐和游离酸或游离碱的加成盐。盐的性质不是关键的，只要它是药学上可接受的。适合的药学上可接受的酸加成盐可由无机酸或由有机酸形成。这些无机酸的实例包括，但不限于盐酸、氢溴酸、氢碘酸、亚硝酸（亚硝酸盐）、硝酸（硝酸盐）、碳酸、硫酸、磷酸等。合适的有机酸包括，但不限于有机酸的脂族酸、环脂肪族酸、芳香酸、杂环酸、羧酸和磺酸类，例如甲酸、乙酸、丙酸、琥珀酸、羟基乙酸、葡糖酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、葡糖醛酸、马来酸、富马酸、丙酮酸、天冬氨酸、谷氨酸、苯甲酸、邻氨基苯甲酸、甲磺酸(mesylic acid)、水杨酸、对羟基苯甲酸、苯乙酸、扁桃酸、双羟奈酸（扑酸）、甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、泛酸、甲苯磺酸、2-羟乙基磺酸、对氨基苯磺酸、硬脂酸、海藻酸(algenic

acid)、 $\beta$ -羟基丁酸、环己基氨基磺酸、半乳糖二酸和半乳糖醛酸等。适合的药学上可接受的碱加成盐包括，但不限于由铝、钙、锂、镁、钾、钠和锌制成的金属盐或由伯、仲和叔胺、环胺、N,N'-二苄基乙二胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、葡甲胺（N-甲基葡糖胺）和普鲁卡因等制成的有机盐。所有这些盐可由相应的化合物通过常规方法制备，例如通过使合适的酸或碱与所述化合物反应。

虽然个体需要可发生变化，但是确定所述化合物和/或组合物的最佳有效量范围是属于本领域技术人员的技能。一般地，提供有效量的化合物和组合物所需要的剂量根据接受者的年龄、健康状态、身体状况、性别、饮食、体重、功能障碍的程度、治疗的频率和功能障碍或疾病的性质和范围、患者的医疗条件、给药途径，所用的具体化合物的如活性、效力、药动学和毒性特征的药理学因素、是否使用药物递送系统以及该化合物是否作为联合用药的一部分而发生变化，本领域普通技术人员可对该剂量进行调整。

本发明化合物可以下述剂量施用：体内 1 pg/kg ~ 10 g/kg；局部 0.00001% ~ 100%，可以制成速释或缓释的制剂。本发明给药方案包括每天 1 ~ 8 次给予不连续的剂量，急性的单次剂量和慢性的多剂量，如滴注（持续 IV 或其他输注）或推注。本发明可与溶剂和其他的试剂或化合物一起配制。

本发明也提供药物试剂盒，其包括填充有本发明的药物化合物和/或组合物的一种或多种成分（包括此处描述的一种或多种治疗药物）的一个或多个容器。例如，此试剂盒也可包括其他的化合物和/或组合物（如治疗药物、渗透促进剂、润滑剂等），用于施用所述化合物和/或组合物的装置，以及政府机构规定形式的涉及药品或生物制品的生产、使用或销售的书面说明，此说明也反映所述机构批准该产品的生产、使用或销售以用于人体。

## 实施例

对于本发明的更完整的理解可通过参考本发明下述的说明性实

施例达到，但是这些实施例不用于限制本发明。在下述的说明性实施例中，快原子轰击质谱（FAB MS）在圣路易斯的华盛顿大学通过MS50-TA质谱仪获得，使用硝基苄醇和锂离子基质以及氙气FAB束将样品离子化。所述仪器为三段的、具有50,000最大分辨能力的EBE设计。全加速电压（8kV）下的质量扫描范围是约800道尔顿。低分辨率的FAB谱在1000的标称分辨率下运行而高分辨率谱在10,000的分辨率下运行。精确质量测量是使用碱金属盐离子作为参考质量通过峰匹配技术完成的。

所有溶剂和商用试剂是实验室级的且按原样使用。MP硫醇连接的螯合酯用生物学方法测定其最大耐受剂量（MTD）或LD50、辐射保护作用以及作为青光眼治疗的清除化合物的作用。MP硫醇作为辐射保护剂进行测试。MP硫醇与EDTA或DTPA连接产生具有与母体化合物相当的毒性的衍生物。所述化合物以甲氧基聚乙二醇（MP）和螯合剂EDTA或二亚乙基三胺五乙酸（DTPA）通过多个步骤制备。

#### 实施例 1. EDTA 与甲氧基聚乙二醇硫醇的甲基酯（MPSEDE）

MP通过与亚硫酰氯反应转化成氯化物（Bueckmann等, *Biotech. Appl. Biochem.*, 9: 258-268, 1987），然后通过硫脲反应转化成硫醇（Urquhart等 *Organic Syntheses Coll. Vol 3; Horning, E. C; Ed.; Wiley, N. Y., 1955; 363-365 页*），接着用碱、酸进行处理，并用硅胶色谱纯化。在二甲基甲酰胺溶剂中使用羰二咪唑作为偶合剂使所述硫醇与EDTA偶联形成硫酯（Gais, *Angew. Chem. Int. Ed.* 16:244-246, 1977），接着用甲醇和羰二咪唑进行其它羧基的甲基酯化反应。所述产物通过用乙酸乙酯和庚烷的梯度洗脱进行硅胶色谱纯化，通过皂化反应并通过采用吡啶偶氮萘酚指示剂的氯化铜滴定法测定螯合物（Blijenberg等, *Clin. Chim Acta* 26:577-579, 1969）和用埃尔曼试剂通过分光光度法测定硫醇（Riddles等 *Meth. Enzymol.* 1983, 91, 49-60）进行鉴定，以及通过FAB质谱确认分子结构。所有分析与所示结构一致。MPSEDE的代表性的质谱见图2。所述产物由与乙氧基单元数为4~9

的 MP 硫醇偶合的螯合物组成，具有如图所示的 M+H 和 M+ Li 峰。

实施例 2. DTPA 与甲氧基聚乙二醇硫醇的甲基酯 (MPSDTE)

使用与实施例 1 中描述的方法相同的方法将 MP 转化为 MP 硫醇。在二甲基甲酰胺溶剂中使用羰二咪唑作为偶合剂使所述硫醇与 DTPA 偶联形成硫酯(Gais, *Angew. Chem. Int. Ed.* 16:244-246, 1977), 接着用甲醇和羰二咪唑进行其它羧基的甲基酯化反应。所述产物通过用乙酸乙酯和庚烷梯度洗脱进行硅胶色谱纯化, 通过皂化反应并通过以吡啶偶氮萘酚为指示剂的氯化铜滴定法测定螯合物 (Blijenberg 等, *Clin. Chim Acta* 26:577-579, 1969) 和用埃尔曼试剂通过分光光度法测定硫醇 (Riddles 等 *Meth. Enzymol.* 1983, 91, 49-60) 进行鉴定, 以及通过 FAB 质谱确认分子结构。所有分析与所示结构一致。

### 毒性研究

对于所有生物学研究, 所述物质用水溶解并调至 pH7。所述物质大致的毒性水平的初步测定是通过给各个 Swiss-Webster 雌鼠腹膜内 (IP) 注射逐步增大的剂量进行的, 直到有明显毒性。最大耐受剂量 (MTD) 是 2 mmole/kg, 没有出现如昏迷、抽搐或死亡的明显的中毒症状。

### 辐射保护研究

测试 MP 硫醇衍生物对辐射致死率的影响。由 12 只或更多雌性 Swiss-Webster 小鼠组成的组 IP 给予约最大耐受剂量一半的衍生物溶液。10 分钟后, IP 给予 0.262mmole/kg 戊巴比妥 (PB), 第一次注射后 20 分钟, 头和颈部在 20 到 50 分钟的时间内以不同的标示剂量接受照射。在以下条件下使用 Philips RT-250 设备进行照射: 200 kVp, 20 mA, 0.2mm Cu 附加滤过, HVL 0.57 mm Cu, 1.834Gy/min 的剂量率。小鼠以每组 6 只或 12 只接受照射, 且它们的头以 50cm 的目标-皮肤的距离被安排在 20×24cm 的孔锥内, 这样它们的头部都在 95%

的等剂量范围内。X射线装置的输出量用 Capintec PT-06c Farmer 箱校准。对照组仅接受 PB 和 0.4ml 生理盐水以代替药物。

每组小鼠检测其一般状态和存活率，记下死亡率。在这些条件下，小鼠在照射后 10 至 13 天之间死于辐射。图 3 显示给予 MP 硫醇或盐水后以不同剂量辐射头和颈部的这些小鼠的存活百分率。MP 硫醇被发现是一种有效的辐射保护剂，具有与已知的如氨磷汀 (Ethyol) 的辐射防护剂相当的剂量变更因子。

### 对手术诱发的青光眼的影晌

在大鼠中测试 MPSEDE 对抗青光眼和视神经节细胞消亡的保护作用。

大鼠高眼压模型：在体重 400~500 克的 9 只雄性 SpragueDawley 大鼠中诱导高眼压。在使用 (IP) 马来酸乙酰丙嗪 (12 mg/Kg) 和氯胺酮 (80 mg/Kg) 进行全身麻醉和丙美卡因 (0.5%) 进行局部麻醉的情况下，精细地切开结膜。为降低对血管再生和新血管形成的刺激，右眼的切开限制在紧紧围绕涡静脉周围的区域。4 个涡静脉中的 3 个暴露出来并用 9.0 号尼龙缝线结扎。研究的入组标准是：与冷冻手术的基线眼内压相比，眼内压 (IOP) 增加 5mm Hg 或更多。在 6 周内，所有经手术的眼的 IOP 与基线相比增加了至少 5mm Hg。本研究遵循国家卫生研究院指导方针和视觉与眼科学研究协会对动物的使用 and 治疗的声明。

眼内压 (IOP) 的测量：在治疗开始前，从青光眼大鼠模型获得基线 IOP。IOP 在镇静状态下通过特别改良的 Goldmann 压平眼压计 (HAAG-STREIT, Bern, 瑞士) 测定。测量结果是由相同的观测者在同一天的同一个时间读取的两次连续读数的平均值。

眼损伤的测定：使用裂隙灯 (HAAG-STREIT, Bern, 瑞士) 检测以确定任何可能的眼损伤和前房中的变化。测定通过经改进以记录炎症、结膜水肿/肿胀，结膜流脓、房水发光、纤维蛋白、光反射、虹膜、角膜混浊、血管化作用和染色的症状的半定量量表进行记录 (Samudre,

SS, Lattanzio, FA Jr., Williams, PB 和 Sheppard, JD, Jr., Comparison of topical steroids for acute anterior uveitis, *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* (2004) 20:533-47)。在检查之前,大鼠服用马来酸乙酰丙嗪(6 mg/Kg)和氯胺酮(40 mg/Kg)镇静剂,加上局部施用 0.5%丙美卡因。在整个研究过程中,该检查由同一组不清楚分组情况的、具有相关知识的观测者完成。

共聚焦显微镜体内分析: 该技术允许重复地进行体内角膜和前段观察以监测炎症细胞的存在情况、位置和数目,以及纤维蛋白、高折射体和上皮细胞、间质细胞和内皮细胞形态学上的改变。大鼠的检测在用乙酰丙嗪(12 mg/Kg)和氯胺酮(80 mg/Kg)麻醉,加上 0.5%丙美卡因的局部给药的情况下,使用 Advanced Scanning Limited 的共聚焦显微镜(ASL 1000, Advanced Scanning Limited, New Orleans, LA)进行,使用 CCD 照相机(Kappa Optoelectronics Inc., Monrovia, CA)拍照并用 SVO-9500MD VCR (Sony Corporation, Tokyo, Japan)记录。采用 Metamorph™ 成像系统(Universal Imaging, Downingtown, PA)分析数据。

NMDA 视网膜损伤模型: 视网膜电流图(ERG) A 和 B 波中的变化用于指示 RGC 的损伤。为检测 RGC 神经保护作用,玻璃体内注射 2  $\mu$ l 的 10mM NMDA(其足以在两周内改变 ERG A 波和 B 波),在正常大鼠中单侧共同施用 2mM(玻璃体内)或 100mM(局部的)MPDTE、MPSEDE 和氨磷汀进行测试。对于局部给药,大鼠用 20  $\mu$ l 试剂以每天 3 次的频率在应用 NMDA 之前 5 天和之后 3 天进行预处理。暗视 ERG 的改变在正常大鼠上测得。大鼠进行暗适应至少 4 小时。眼睛用阿托品扩瞳后局部涂敷丙美卡因和甲基纤维素凝胶。定制的 AgCl 电极(64-1317, Warner Instruments, Hamden, CT)放置在角膜的顶点。刺激由 Ganzfield 碗形光刺激器(Grass Instruments, PS22, Quincy, MA)产生的不衰减白光的 10 微秒闪光组成。各只眼的数据用激励器放大器(Grass Instruments, Model 7DAF Polygraph, Quincy, MA)分别记录。通过 DASyLab (Bedford, NH)获得数字化的数据。对

侧的正常眼作为年龄匹配的阴性对照，例如正常的未损伤眼的反应。计算出被处理的眼和对侧眼之间及处理组之间的 A 波和 B 波的幅度的差异。

局部应用 MP 化合物以测量大鼠手术青光眼模型的 IOP: 对大鼠手术的眼局部应用 20  $\mu$ l 的 MP 化合物 (0.3 - 100 mM; n=3 ~ 6) 进行处理。MP 化合物与局部应用 10 或 87 mM 氨磷汀 (自由基清除剂) 的情况进行比较。MP 酯化螯合剂为二亚乙基三胺五乙酸(MPDTE) 和 MPSEDE。

MPDTE 眼毒性的长期试验: 两组正常大鼠用于测试，在一只眼中局部应用 20  $\mu$ l 10mM MPDTE (n=3) 或 87mM MPDTE (n=3)，每日 3 个剂量，持续 1 个月。在给药前进行 IOP、裂隙灯和共聚焦检查，15 天时进行裂隙灯检查，且 30 天后进行 IOP、裂隙灯和共聚焦检查。

药代动力学实验: 为测定 MP 化合物的局部吸收和全身分布，以  $^{14}\text{C}$  标记的 MPDTE 向正常大鼠滴注 20  $\mu$ l 30mM 的 MPDTE。 $^{14}\text{C}$  标记连接到 MP 的主链上以减小假交换的机率。15 ~ 120 分钟后，每个时间点 2 ~ 6 只动物被无痛处死，取得血、尿和组织样本。将眼摘取，用 0.9%生理盐水冲洗 5 次去除未吸收的药物。样品溶解后在液体闪烁计数器中计数以确定放射标记的 MP 的存在。

数据分析: 单方差分析用于分析 IOP、血压和心率数据。配对 t 检验用于配对比较。非参数的数据用符号秩检验进行分析。 $P < 0.05$  的差异被认为有统计学意义。除了特别注明以外，所有的值表示为均值  $\pm$  SEM。

### 多柔比星对 H9C2 细胞的化学毒性研究

用作大鼠横纹肌模型的 H9C2 细胞用以前所描述的技术 (Lattanzio, FA Jr., Tiangco, D., Osgood, C, Beebe, S., Kerry, J.和 Hargrave BY. Cocaine increases intracellular calcium and reactive oxygen species, depolarizes mitochondria, and activates genes associated

with heart failure and remodeling. *Cardiovascular Toxicology* (2005) 5: 377-389) 进行培养。用荧光钙指示剂和 ROS 指示剂确定是否有报道的细胞内钙增加和 ROS 活性增加的发生,及是否在 2mM MPSEDE 或 MPDTE 存在下这些变化被减小。细胞按照 Lattanzio 等, 2005 所述的方法用 Zeiss 510 荧光共聚焦显微镜检测。

图 4 证明 MP 化合物通过眼局部给药渗入到大鼠的眼球里,但是很少交叉进入未处理的对侧眼或大脑(大脑数据未显示)。MPDTE 的消除主要通过尿。正常大鼠的长期局部给药在一个月后裂隙灯或共聚焦检测未在任何一只眼显示眼毒性,且 IOP 中无残留的改变。

MPDTE 和 MPSEDE 的初始测试证明: 10~100mM 的单剂量显著降低 IOP(图 5, 图 6, 图 7)。图 8 显示: 在 60 分钟时 MPDTE 和 MPSEDE 的剂量-反应曲线接近局部 MP IOP 响应的最大峰。图 9 中, 使用单剂量, MPDTE 引起的 IOP 降低可保持约 2 小时, 并与试验用大麻素(1% WIN 55,212-2)或氨磷汀相当。使用 10mM 或 87mM 氨磷汀未见 IOP 降低。

IOP 降低的机制通过对比 MP 主链和螯合剂基团 DTE 的单独效应和组合效应进行研究。如图 10 所示, MP 或 DTE 单独或联合施用都有 IOP 的降低, 但 IOP 降低没有使用 MPDTE 时的大。

与单独给予 NMDA 所见的降低相比, MPDTE 和 NMDA 共同使用可分别显著保持 A 波(图 11)和 B 波(图 12)的幅度。MPSEDE 显示了降低 NMDA 损伤的趋势, 但在所测试的剂量上是不显著的。玻璃体内和局部使用 MPSEDE 或 MPDTE 显著降低 NMDA 的损伤(表 1)。

表 1

	玻璃体内	局部
%基线	A/B 波	A/B 波
NMDA	51.2/68.4	51.2/68.4
NMDA+MPDTE	90.0/90.0	82.5/88.1
NMDA+MPSEDE	76.2/69.6	95.9/93.7
NMDA+氮磷汀	94.2/83.3	69.4/99.3

### 化学保护

采用 Lattanzio 等 2005 年所描述的技术，将作为大鼠肌细胞模型的 H9C2 细胞在 MEM 中培养至汇合。经过或不经过 30 分钟的 2mM MPDTE 预处理，所述细胞用荧光钙指示剂 5 $\mu$ M fluo-3 AM 于 37 $^{\circ}$ C 处理 30 分钟，冲洗后暴露于 50 $\mu$ M 多柔比星（超高中毒剂量）中。多柔比星通过产生自由基损伤和随后的膜损伤干扰钙的动态平衡，从而增加心脏细胞的细胞内钙。10 分钟暴露后，未处理的细胞中细胞内钙增加了 59.4%，但在 MPDTE 处理的细胞中仅增加 40.2%（ $P < 0.001$ ， $n = 20$  细胞，3 次独立的试验）。保护作用可能由于自由基清除和钙整合的联合而发生。

从上述的说明，本领域的技术人员能容易确定本发明的必要特征，并且在不偏离本发明的本质和范围的情况下，能对本发明做出各种改变和修饰以适应不同的用途和条件。

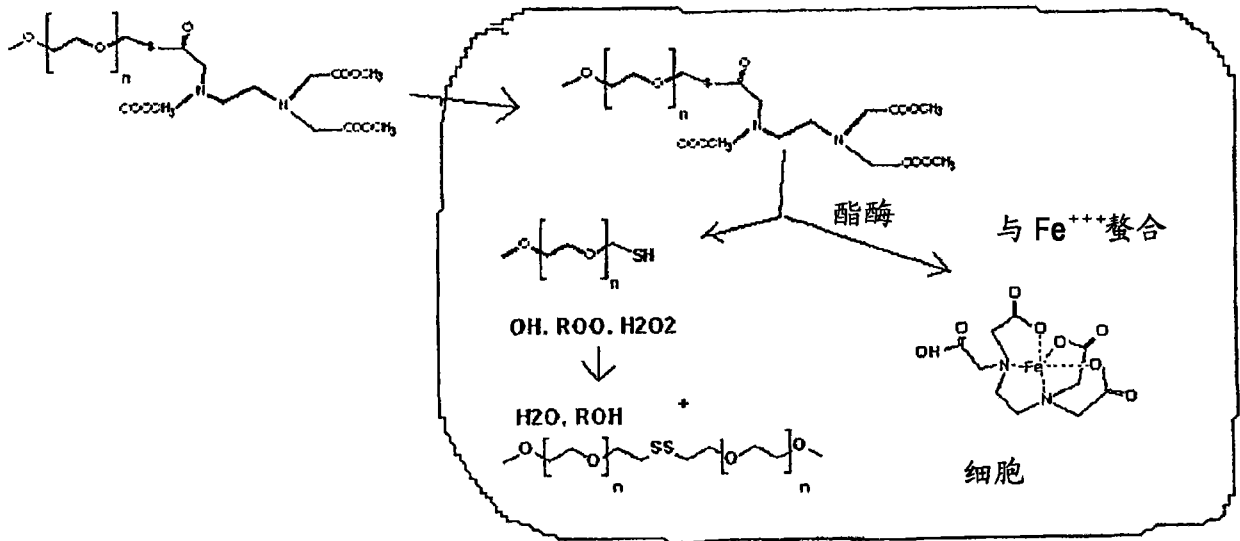


图 1

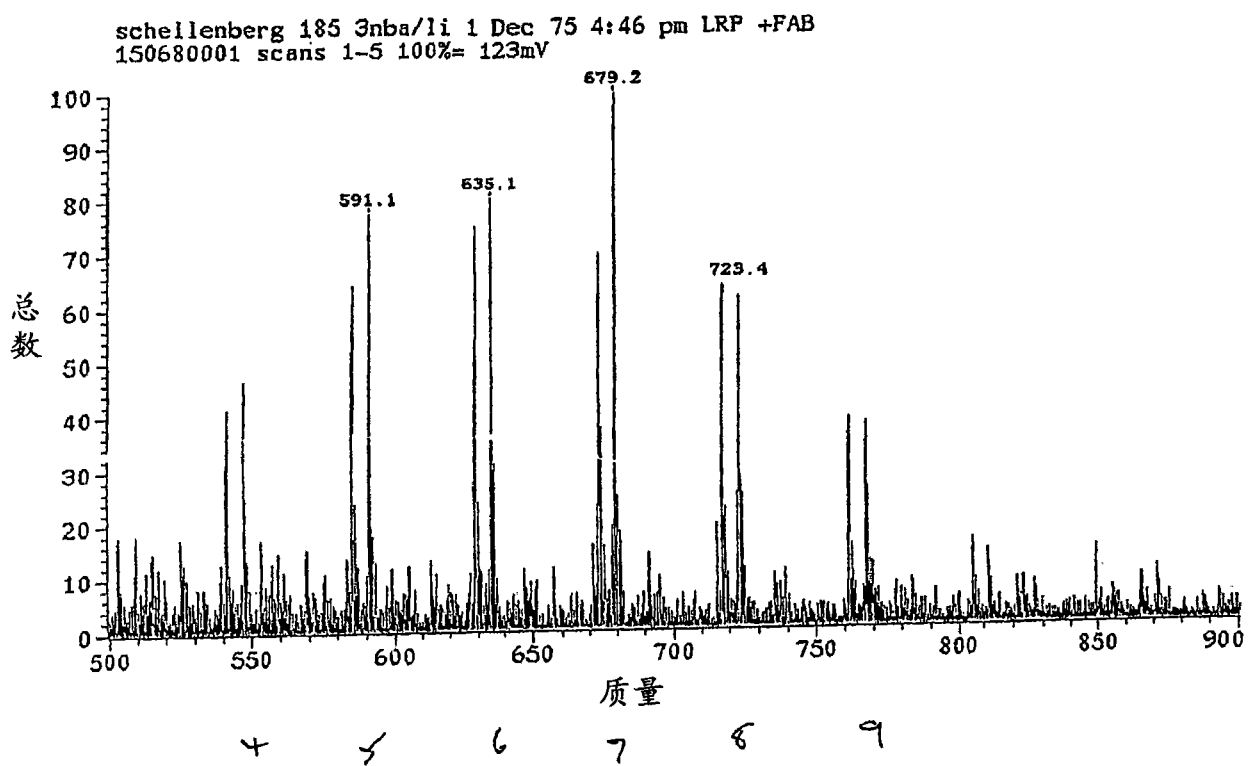


图 2

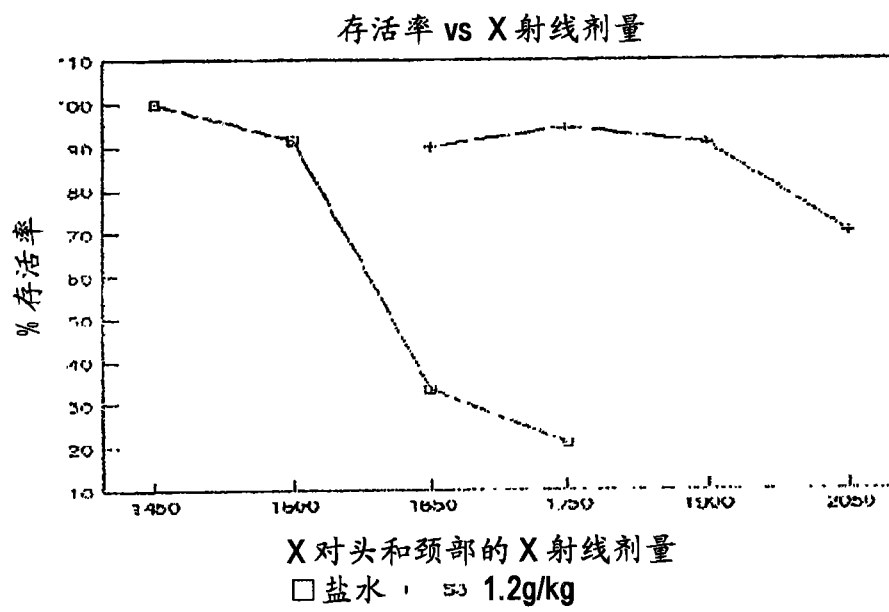


图 3

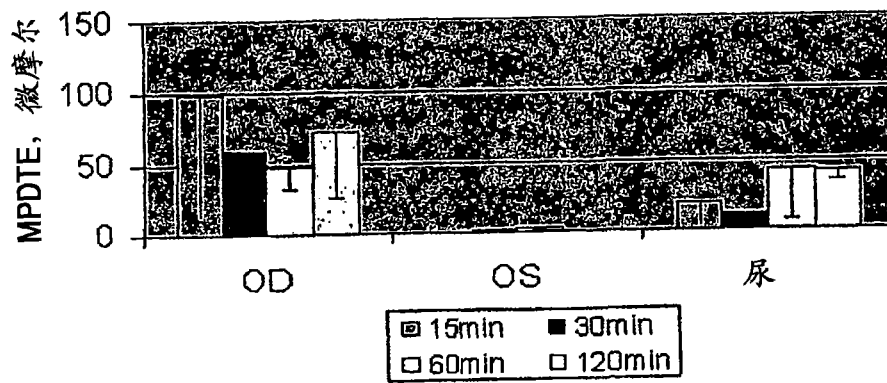


图 4

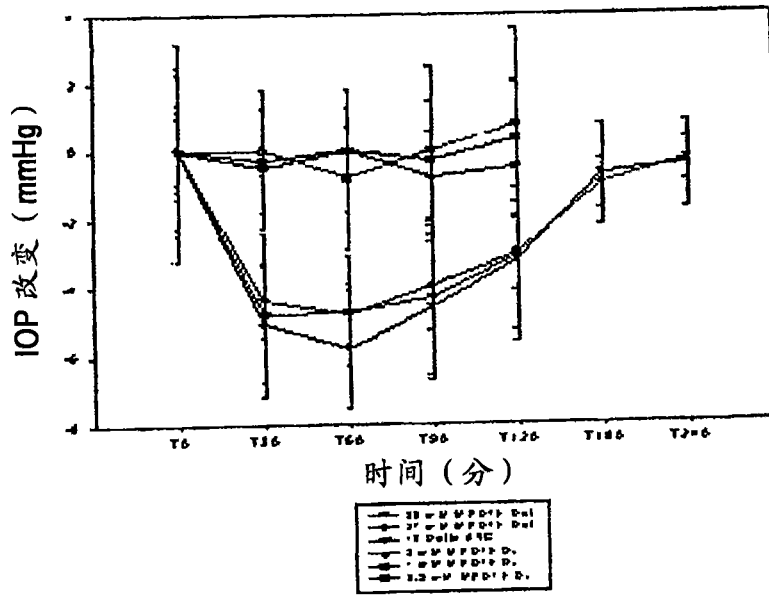


图 5

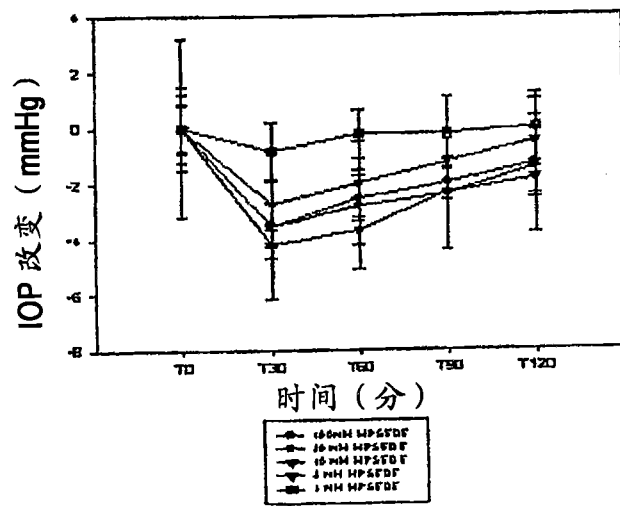


图 6

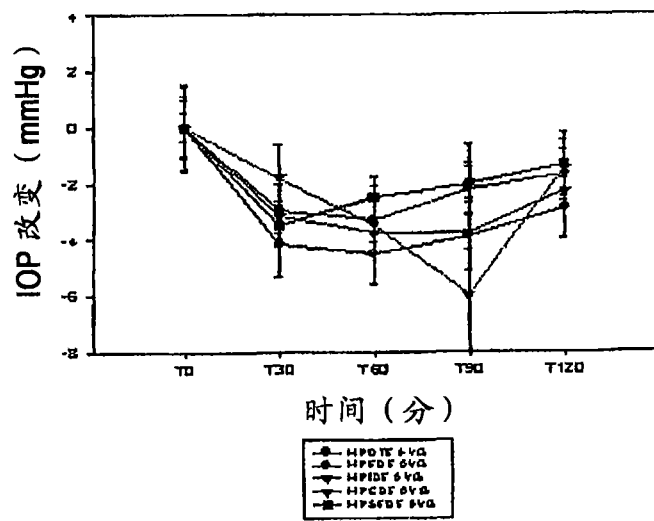


图 7

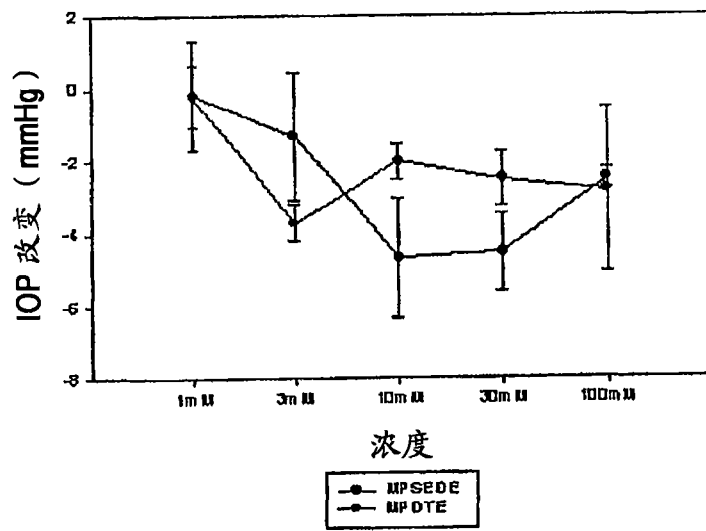


图 8

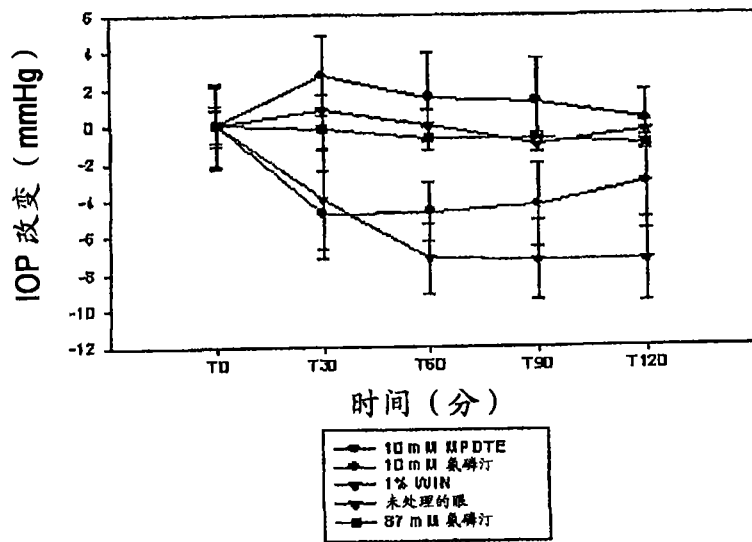


图 9

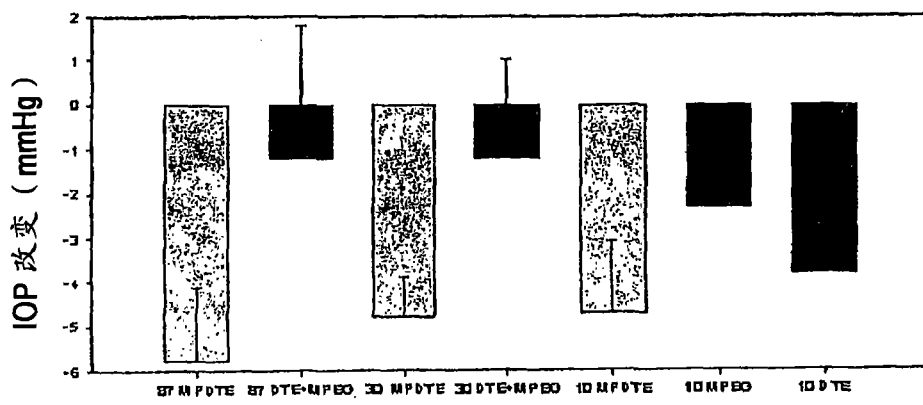


图 10

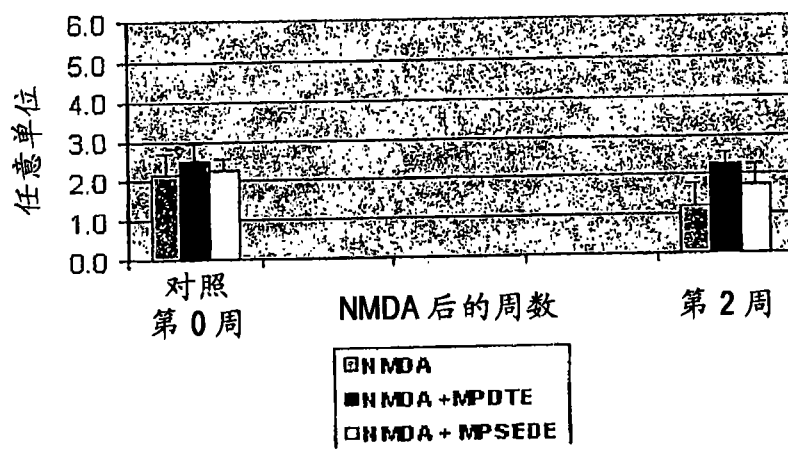


图 11

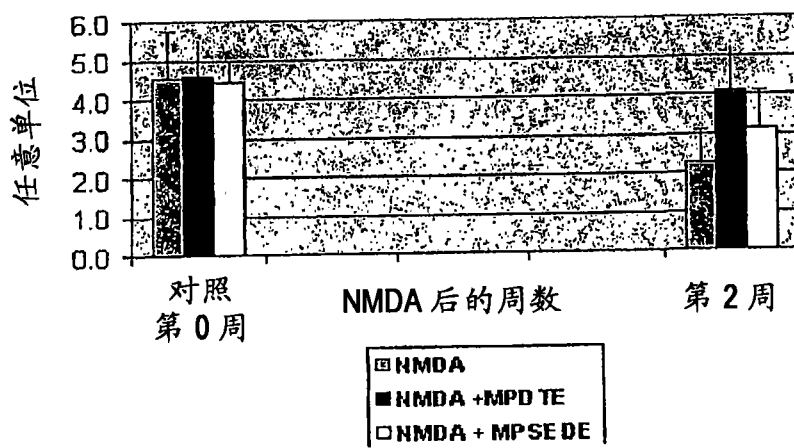


图 12