



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I802984 B

(45) 公告日：中華民國 112 (2023) 年 05 月 21 日

(21) 申請案號：110132870

(22) 申請日：中華民國 110 (2021) 年 09 月 03 日

(51) Int. Cl. : C07D471/04 (2006.01)

A61K31/5377(2006.01)

A61P13/12 (2006.01)

(30) 優先權：2020/09/04 中國大陸

202010921155.4

(71) 申請人：大陸商上海醫藥集團股份有限公司 (中國大陸) SHANGHAI PHARMACEUTICALS HOLDING CO., LTD. (CN)

中國大陸

(72) 發明人：夏廣新 XIA, GUANGXIN (CN)；蘇威 SU, WEI (CN)；王雪松 WANG, XUESONG (CN)；柯櫻 KE, YING (CN)

(74) 代理人：洪武雄；陳昭誠

(56) 參考文獻：

TW 201242955A1

TW 201722950A

審查人員：羅尹秀

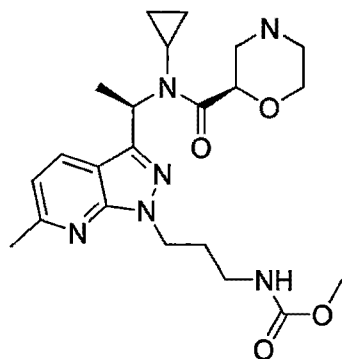
申請專利範圍項數：10 項 圖式數：2 共 62 頁

(54) 名稱

一種含氮的飽和雜環化合物的應用

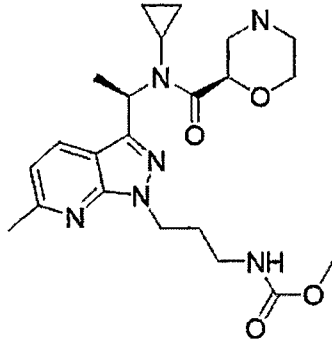
(57) 摘要

本發明提供了一種含氮的飽和雜環化合物的應用。具體地，本發明提供了由下式 I 所示的含氮的飽和雜環化合物或其藥學上可接受的鹽在製備治療和/或預防慢性腎病的藥物中的應用：



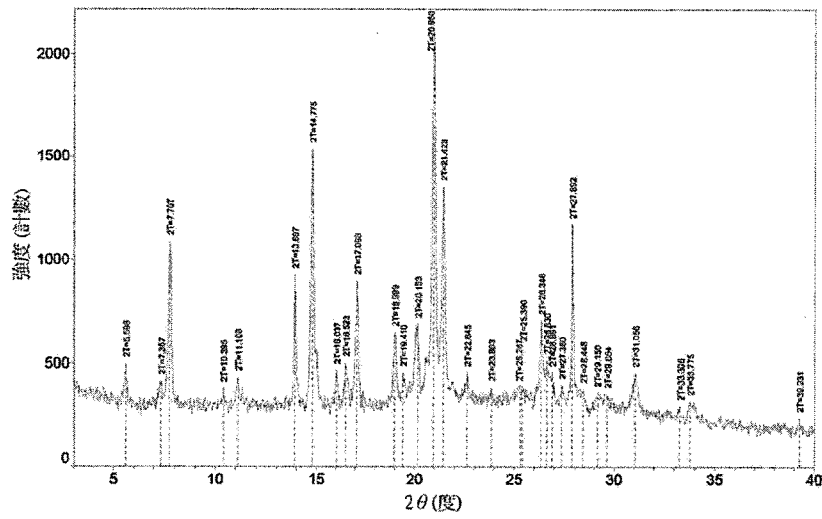
式I

The present invention provides a use of a nitrogen-containing saturated heterocyclic compound. In particular, the present invention provides a use of a nitrogen-containing saturated heterocyclic compound represented by the following formula I or a pharmaceutically acceptable salt thereof in the preparation of a medicine for the treatment and/or prevention of chronic kidney disease:



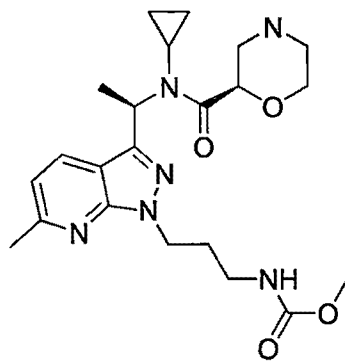
Formula I

指定代表圖：



【圖1】

特徵化學式：



式I

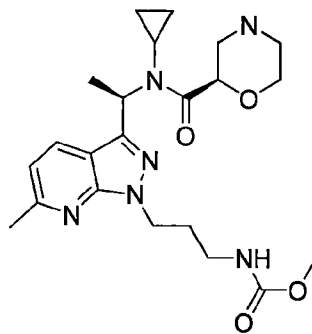
## 【發明摘要】

【中文發明名稱】 一種含氮的飽和雜環化合物的應用

【英文發明名稱】 USE OF NITROGEN-CONTAINING SATURATED  
HETEROCYCLIC COMPOUND

## 【中文】

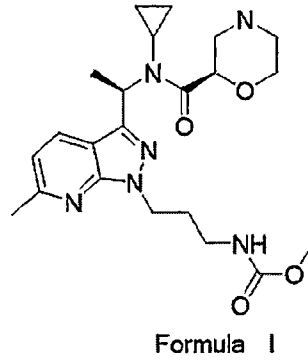
本發明提供了一種含氮的飽和雜環化合物的應用。具體地，本發明提供了由下式 I 所示的含氮的飽和雜環化合物或其藥學上可接受的鹽在製備治療和/或預防慢性腎病的藥物中的應用：



式I

## 【英文】

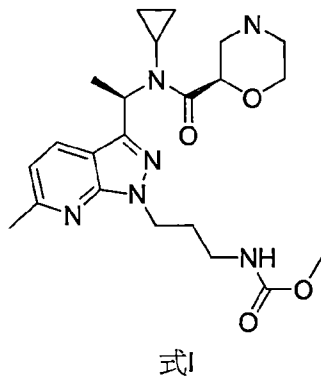
The present invention provides a use of a nitrogen-containing saturated heterocyclic compound. In particular, the present invention provides a use of a nitrogen-containing saturated heterocyclic compound represented by the following formula I or a pharmaceutically acceptable salt thereof in the preparation of a medicine for the treatment and/or prevention of chronic kidney disease:



【指定代表圖】 圖1

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】



## 【發明說明書】

【中文發明名稱】 一種含氮的飽和雜環化合物的應用

【英文發明名稱】 USE OF NITROGEN-CONTAINING SATURATED  
HETEROCYCLIC COMPOUND

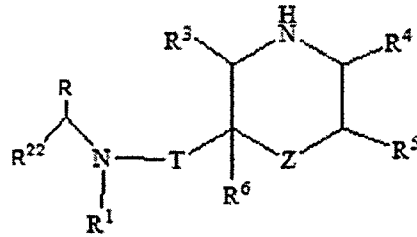
### 【技術領域】

【0001】 本發明關於一種含氮的飽和雜環化合物或其藥學上可接受的鹽在製備用於治療和/或預防慢性腎病的藥物中的應用。

### 【先前技術】

【0002】 慢性腎病(chronic kidney disease, CKD)具有患病率高、知曉率低、預後差和醫療費用高等特點，係繼心腦血管疾病、糖尿病和惡性腫瘤之後，又一嚴重危害人類健康的疾病。近年來 CKD 患病率逐年上升，全球一般人群患病率已高達 14.3%，我國橫斷面流行病學研究顯示，18 歲以上人群 CKD 患病率為 10.8%。慢性腎病(CKD)係一種進展性疾病，如未能及時有效救治，導致病情惡化進展，則隨病程進展，慢性腎病患者將發展為腎衰竭，如果不進行人工透析或腎臟移植，生存將變得困難。目前對於治療慢性腎病尚無特別有效的方法，因此，積極尋找治療慢性腎病有效並且毒副作用小的藥物，具有較大的臨床價值。

【0003】 CN103562191B 揭露了一種結構式如下所示的含氮的飽和雜環化合物或其藥學上可接受的鹽，顯示出了對腎素的抑制作用，可用於治療高血壓。



式中， $R^1$  表示環烷烴基等， $R^{22}$  表示可以被取代的芳基等， $R$  表示低級烷烴基等， $T$  表示羰基， $Z$  表示 $-O-$ 等， $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$  和  $R^6$  相同或不同，且表示氫原子等。

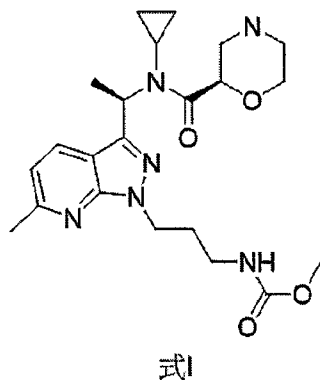
**【0004】** CN106928218A 揭露了新型的可藥用的嗎啉衍生物（含氮的飽和雜環）的鹽，包括其蘋果酸鹽、酒石酸鹽、鹽酸鹽、醋酸鹽和萘二磷酸鹽，其中酒石酸鹽有 A 晶型、B 晶型和二水合物 3 種晶態鹽型，蘋果酸鹽、鹽酸鹽、醋酸鹽各有 1 種晶態鹽型，萘二磷酸鹽為無定形。與已知的嗎啉衍生物的游離鹼相比，嗎啉衍生物的鹽具有一種或多種的改進性能，如具有較好的晶態，極大地提高了水溶解度、光穩定性及熱穩定性等。上述的嗎啉衍生物鹽或其晶型，可以用於治療和/或預防高血壓。

### 【發明內容】

**【0005】** 本發明所要解決的技術問題係針對先前技術中尚無特別有效的治療慢性腎病的藥物，而提供了一種含氮的飽和雜環化合物或其藥學上可接受的鹽在製備用於治療和/或預防慢性腎病的藥物中的應用。

**【0006】** 先前技術中該專利 CN103562191B 和專利申請 CN106928218A 的全部內容在此藉由引用併入本說明書中。

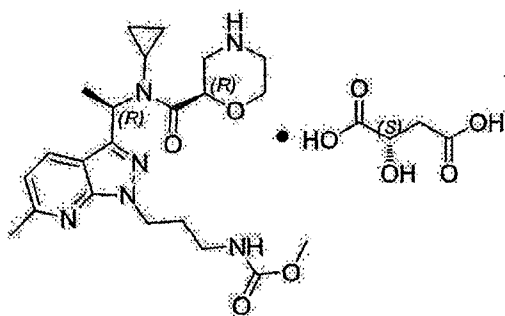
【0007】 在本發明的一個實施方式中，提供了一種由下式 I 所示的含氮的飽和雜環化合物或其藥學上可接受的鹽在製備治療和/或預防慢性腎病的藥物中的應用：



【0008】 在本發明的進一步的實施方式中，該藥學上可接受的鹽為鹽酸鹽、硫酸鹽、磷酸鹽、氫溴酸鹽、乙酸鹽、富馬酸鹽、草酸鹽、檸檬酸鹽、甲磺酸鹽、苯磺酸鹽、對甲苯磺酸鹽、馬來酸鹽、蘋果酸鹽、酒石酸鹽、醋酸鹽或萘二磺酸鹽。

【0009】 在本發明的又進一步的實施方式中，該藥學上可接受的鹽為蘋果酸鹽、酒石酸鹽、鹽酸鹽、醋酸鹽或萘二磺酸鹽。

【0010】 在本發明的一個實施方式中，該藥學上可接受的鹽為式 I 化合物的蘋果酸鹽，其係式 I 化合物和蘋果酸以 1 : 1 莫耳比形成的化合物，其結構式如下：



【0011】 在本發明的一個實施方式中，該蘋果酸鹽為結晶體，其 X 射線粉末衍射圖譜在  $2\theta$  為  $7.767^\circ \pm 0.2^\circ$ 、 $13.897^\circ \pm 0.2^\circ$ 、 $14.775^\circ \pm 0.2^\circ$ 、 $17.098^\circ \pm 0.2^\circ$ 、 $18.999^\circ \pm 0.2^\circ$ 、 $20.153^\circ \pm 0.2^\circ$ 、 $20.960^\circ \pm 0.2^\circ$ 、 $21.423^\circ \pm 0.2^\circ$ 、 $26.348^\circ \pm 0.2^\circ$ 、 $27.892^\circ \pm 0.2^\circ$  處具有特徵峰。特別地，該蘋果酸鹽結晶體的 X 射線粉末衍射圖譜復在  $2\theta$  為  $5.598^\circ \pm 0.2^\circ$ 、 $7.357^\circ \pm 0.2^\circ$ 、 $10.395^\circ \pm 0.2^\circ$ 、 $11.108^\circ \pm 0.2^\circ$ 、 $16.037^\circ \pm 0.2^\circ$ 、 $16.523^\circ \pm 0.2^\circ$ 、 $19.410^\circ \pm 0.2^\circ$ 、 $22.645^\circ \pm 0.2^\circ$ 、 $26.630^\circ \pm 0.2^\circ$ 、 $26.891^\circ \pm 0.2^\circ$ 、 $27.380^\circ \pm 0.2^\circ$ 、 $31.056^\circ \pm 0.2^\circ$ 、 $33.306^\circ \pm 0.2^\circ$ 、 $33.775^\circ \pm 0.2^\circ$ 、 $39.231^\circ \pm 0.2^\circ$  處具有特徵峰。更特別地，該式 I 化合物的蘋果酸鹽結晶體具有如圖 1 所示的 X 射線粉末衍射圖譜。

【0012】 在本發明的一個實施方式中，該慢性腎病包括高血壓合併腎病、高血壓合併腎病並伴隨糖代謝異常、慢性腎功能不全合併慢性心力衰竭或慢性腎病伴隨糖代謝異常。

【0013】 在本發明的一個實施方式中，該慢性腎病係指慢性腎病的 G1、G2、G3a、G3b、G4 期，較佳為 G2、G3a 或 G3b 期。

【0014】 在本發明的一個實施方式中，該高血壓合併腎病中的高血壓為 1 級高血壓、2 級高血壓或 3 級高血壓，較佳為 1 級高血壓或 2 級高血壓。

【0015】 在本發明的一個實施方式中，該藥物的劑型包括片劑、膠囊劑、靜脈注射劑、吸入劑、霧化劑、凍乾劑、貼劑、凝膠劑、噴霧劑、或栓劑，較佳為片劑。

【0016】 在本發明的一個實施方式中，該藥物為單元劑量。

【0017】 在本發明的一個實施方式中，該藥物的單元劑量中，含有 25 mg 至 200 mg 的如上式 I 所示的含氮的飽和雜環化合物或其藥學上可接受的鹽，例

如 25 mg、50 mg、100 mg、150 mg、200 mg 的如上式 I 所示的含氮的飽和雜環化合物或其藥學上可接受的鹽。

【0018】 美國腎臟基金會(NKF)所屬「腎病預後質量倡議」(KDOQI)工作組於 2002 年制定了 CKD 定義和分期標準。

【0019】 慢性腎病定義為腎臟結構或功能異常>3 個月。慢性腎病診斷標準出現下表 1 中任何一項指標，持續時間超過 3 個月。

【0020】 表 1：慢性腎病診斷標準

腎損傷標誌(1)白蛋白尿[AER $\geq$ 30 mg/24 h；ACR $\geq$ 30 mg/g(或 $\geq$ 3 mg/mmol)]；

- (2)尿沉渣異常；
- (3)腎小管相關病變；
- (4)組織學異常；
- (5)影像學所見結構異常；
- (6)腎移植病史

GFR下降 eGFR $<$ 60 mL/(min $\cdot$ 1.73m<sup>2</sup>)

註：至少滿足1項；AER：尿白蛋白排泄率；ACR：尿白蛋白肌酐比值；GFR：腎小球濾過率

【0021】 慢性腎病分期：慢性腎病根據腎小球濾過率(GFR)分為 5 期，見下表 2。

【0022】 表 2：慢性腎病根據 GFR 分期

分期	GFR [mL/(min•1.73m <sup>2</sup> )]	描述
G1	≥90	正常或增高
G2	60至89	輕度下降
G3a	45至59	輕至中度下降
G3b	30至44	中至重度下降
G4	15至29	重度下降
G5	<15	腎衰竭

【0023】 高血壓定義：未使用降壓藥物的情況下，非同日 3 次測量診室血壓，收縮壓（SBP）≥140 mmHg（1 mmHg=0.133 kPa）和/或舒張壓（DBP）≥90 mmHg。

【0024】 SBP≥140 mmHg 和 DBP<90 mmHg 為單純收縮期高血壓。患者既往有高血壓史，目前正在使用降壓藥物，血壓雖低於 140/90 mmHg，仍應診斷高血壓。

【0025】 根據血壓升高水平，進一步將高血壓分為 1、2 和 3 級。血壓水平分類和定義見下表 3。

【0026】表3：血壓水平分類和定義

分類	收縮壓 (mmHg)		舒張壓 (mmHg)
正常血壓	<120	和	<80
正常高值	120至139	和/或	80至90
高血壓	≥140	和/或	≥90
1級高血壓 (輕度)	140至159	和/或	90至99
2級高血壓 (中度)	160至179	和/或	100至109
3級高血壓 (重度)	≥180	和/或	≥110
單純收縮期高血壓	≥140	和	<90

【0027】心力衰竭（心衰）係一種臨床綜合症，定義為由於任何心臟結構或功能異常導致心室充盈或射血能力受損的一組複雜臨床綜合症。其主要臨床表現為呼吸困難和乏力（活動耐量受限），以及液體瀦留（肺淤血和外周性水腫）。

【0028】依據左心室射出分率（left ventricular ejection fraction, LVEF），將心衰分為射出分率降低的心衰（heart failure with reduced ejection fraction, HFrEF）、射出分率保留的心衰（heart failure with preserved ejection fraction, HFpEF）和射出分率中間值的心衰（heart failure with mid-range ejection fraction, HFmrEF），3種心衰類型的定義見下表4：

【0029】表 4：心力衰竭的分類與定義

分類	症狀和/ 或體徵	左心室射 出分率(%)	其他
HFrEF	有	<40	-
HFmrEF	有	40至49	1.利鈉肽升高 <sup>a</sup> ;2.符合以下至少1條： (1)左心室肥厚和/或左心房擴大； (2)心臟舒張功能異常 <sup>b</sup>
HFpEF	有	≥50	1.利鈉肽升高 <sup>a</sup> ；2.符合以下至少1條： (1)左心室肥厚和/或左心房擴大； (2)心臟舒張功能異常 <sup>b</sup>

註：HFrEF 射出分率降低的心力衰竭；HFmrEF 射出分率中間值的心力衰竭；HFpEF 射出分率保留的心力衰竭；<sup>a</sup>B 型利鈉肽 (BNP) >35 ng/L 和/或 N 末端 B 型利鈉肽原 (NT-proBNP) >125 ng/L；<sup>b</sup>E/e' ≥13、e' 平均值 (室間隔和游離壁) <9 cm/s；-無

【0030】糖代謝異常包括糖尿病前期與糖尿病。

【0031】糖尿病前期即係糖調節受損，係指血糖值已超過正常值範圍，但還未達到糖尿病的診斷標準，即正常人與糖尿病患者之間的中間狀態。

【0032】糖尿病係一組常見的代謝性疾病，其特徵係為高血糖、糖尿、葡萄糖耐量減低及胰島素釋放試驗異常。

【0033】本發明的積極進步效果在於：含氮的飽和雜環化合物鹽連續給藥 8 週對慢性腎功能不全合併慢性心力衰竭恆河猴 (中年/老年) 有效性和安全性研究表明，本發明提供的含氮的飽和雜環化合物或其藥學上可接受的鹽可有效預防或治療慢性腎病，該慢性腎病包括高血壓合併腎病、高血壓合併腎病並伴隨糖

脂代謝異常、慢性腎功能不全合併慢性心力衰竭或慢性腎病伴隨糖脂代謝異常。同時本發明提供的含氮的飽和雜環化合物或其藥學上可接受的鹽安全性很好，未見與給藥相關的不良事件。

#### 【圖式簡單說明】

【0034】 圖 1 係本發明實施例中所用的式 I 化合物蘋果酸鹽的 XRPD 圖譜。

【0035】 圖 2 係實施例 3 中靜脈內 (iv) 和口服 (po) 給藥後猴子體內式 I 化合物的濃度-時間圖。其中，猴子的靜脈內給藥劑量為 1 mg/kg，口服給藥劑量為 1、3 和 9 mg/kg。

#### 【實施方式】

【0036】 下面藉由實施例的方式進一步說明本發明，但並不因此將本發明限制在該實施例範圍之中。下列實施例中未註明具體條件的實驗方法，按照一般方法和條件，或按照商品說明書選擇。

【0037】 下述實施例中所用的式 I 化合物蘋果酸鹽係根據專利申請揭露 CN106928218A 中實施例 1 該製備方法製備所得並確認結構；巔沙坦 (Valsartan) 藉由商業途徑購買；所用的恆河猴購買自四川普萊美行之生物科技有限公司 (普萊美靈長類研究中心)。

## 【0038】 縮略詞

縮寫	英文全稱	中文全稱
CKD-EPI	Chronic Kidney Epidemiology	慢性腎臟流行病學
GFR	glomerular filtration rate	腎小球濾過率
eGFR <sub>creat-cys</sub>	Estimated glomerular filtration rate (creatinine-cystatin C)	估算的腎小球濾過率(血肌酐-血胱抑素 C)
UACR	urine albumin creatine ratio	尿白蛋白/肌酐比率
SBP	Systolic blood pressure	收縮壓
DBP		
DBP	Diastolic blood pressure	舒張壓
MALB	Micro albumin	微量白蛋白
CR-U	Urine creatinine	尿肌酐
E	Peak Velocity of Mitral Blood Flow at early diastole	舒張早期二尖瓣血流峰速
Ea	Peak Velocity of Mitral Annulus at early diastole	舒張早期二尖瓣環運動峰速
LVEF	Left Ventricular Ejection Fraction	左心室射出分率
CVD	cerebrovascular disease	腦血管疾病
DKD	diabetic kidney disease	糖尿病腎病

**【0039】 實施例 1：式 I 化合物蘋果酸鹽連續給藥 8 週對慢性腎功能不全合併慢性心力衰竭恆河猴（中年/老年）有效性和安全性研究**

**1. 研究目的**

評估式 I 化合物蘋果酸鹽連續給藥 8 週對腎功能的改善，以及能夠延緩或改善腎臟功能起效劑量、作用強度以及 CVD 事件的風險，為臨床試驗劑量設計、患者入選標準和安全性提供依據。主要療效終點（ENDPOINT）：1.對腎功能改善：腎小球濾過率  $eGFR_{creat-cys}$ 、胱抑素 C（CysC）、肌酐及 UACR；2.對心臟功能改善：超音波心動圖指標分析心臟結構和收縮、舒張功能給藥前後變化；3.安全性指標：血壓、血鉀、糖脂代謝相關指標等。

**【0040】 2. 試驗系統**

**2.1 自發性慢性腎功能不全恆河猴**

動物種屬：Macaca mulatta (Rhesus Macaque)

等級：普通級。試驗前檢疫合格，內容包括體檢、2 次結核桿菌試驗、寄生蟲、沙門氏菌、致賀氏菌和 B 病毒檢查。

動物標識：脖環上戴刻有阿拉伯數字的不銹鋼號牌，胸口紋身。

供應單位：雅安普萊美生物科技有限公司。

生產許可證號：SCXK（川）2019-027。

動物合格證號：0016710、0016944、0016966。

**【0041】 2.2 入選標準**

23 隻雄性/雌性動物，年齡 14 至 24 歲（等同於 40 至 70 歲成年人），體重雄性 8.45 至 14.93 kg，雌性 1 隻：6.43 kg；

糖脂代謝長期異常 3 年以上；糖代謝異常為空腹血糖 (FPG) > 4.8 mmol/l，  
vs 年齡匹配對照組 4.1±0.3 mmol/l；

CKD-EPI 評級 G3a-G3b，腎小球濾過率 eGFR：30 至 59 ml/min/1.73m<sup>2</sup>；或  
蛋白尿中重度增多 (A2-A3)：尿白蛋白/肌酐比值(UACR)≥15 mg/g-350 mg/g (4-  
6 小時尿液收集)，vs 年齡匹配對照組 3±2 mg/g。

**【0042】** 正常血壓、1 級或 2 級高血壓（與臨床患者標準一致）；

HFrEF：LVEF 30% - 49%（正常值：50% - 70%辛普森雙平面法）或 HFpEF  
（中度以上受損）：Ea<8 或 E/Ea>10（依據臨床診斷標準）。

**【0043】 2.3 排除標準**

- 1) 慢性肝病（包括已知活動性肝炎）和/或篩查丙胺酸轉胺酶 (ALT) 或天冬胺酸轉胺酶 (AST) >3x 正常上限 (ULN)。
- 2) 與血脂異常有關的排除標準：TC >7 mmol/l；TG >3.5 mmol/l。
- 3) 任何可能會影響藥效評價的其他疾病史。

**【0044】** 下表 5 顯示基線期-各劑量組受試慢性 DKD 腎功能不全恆河猴基礎病因和特徵。

【0045】表 5：基線期-各劑量組受試慢性 DKD 腎功能不全恆河猴基礎病

因和特徵

組別	動物號	年齡 yrs	體重 kg	腎功能 診斷 CKD -EPI 評級	UAC R mg/g	eGF R (ml/m in/1.7 3m <sup>2</sup> )	CR-P mg/d L	CYS C mg/L	糖脂 代謝 異常 年限	FPG mmol /L	血壓 (SBP/ DBP) mmHg	貧血 診斷	RBC 10 <sup>12</sup> /L	HGB g/L	K <sup>+</sup> m mo /L	EF %	E/ Ea /
安 慰 劑 組 (n=4)	6653	19	1092	G3a- A2	27.8	47	1.23	1.80	□β	4.90	103/5 3	正常	5.23	121	4.7 0	68. 36	11. 43
	231	18	10.19	G3a- A2	14.5	58	1.19	1.42	□β	5.79	134/6 3	正常	5.57	135	5.3 7	54. 05	10. 87
	1029	21	12.71	G3a	10.5	53	1.00	1.71	□β	5.35	162/7 2	正常	5.69	143	3.9 2	50. 79	10. 63
	4713	21	11.88	G3a	8.5	47	1.42	1.55	□β	4.86	143/6 5	正常	6.09	140	4.3 8	58. 81	26. 16
	Mean ±SD	20±2	11.43 ±1.10	/	15.3 ±8.7	51±5	1.21 ±0.17	1.62 ±0.17	/	5.23 ±0.44	135±2 463± 8	/	5.65 ±0.35	135 ±10	4.5 9	58. 00	14. 77
Val sa rtan 組 (n=3)	2091	18	9.35	G3a- A2	37.3	55	1.28	1.44	□β	7.77	131/6 7	正常	6.79	153	4.6 3	64. 02	8.4 0
	4861	17	11.23	G3a- A2	63.6	50	1.31	1.62	□β	5.75	125/6 0	正常	6.77	152	4.2 7	58. 75	13. 80
	6645	23	9.97	G3b- A2	15.0	40	1.50	1.76	□β	6.06	148/8 2	正常	6.09	137	5.0 7	59. 26	18. 35
	Mean ±SD	19±3	10.18 ±0.96	/	38.7 ±24.3	48±7	1.36 ±0.12	1.61 ±0.16	/	6.53 ±1.09	135±1 2/ 70±11	/	6.55 ±0.40	147 ±9	4.6 6	60. 68	13. 52
式 I 化 合 物 類 果 酸 鹽 5mg/ kg 組 (n=6)	144	18	6.43	G3b- A2	118.5	55	0.90	1.49	□β	5.46	132/6 3	正常	6.41	162	5.4 3	63. 71	7.0 9
	5073	14	9.75	G3a	10.5	48	1.53	1.63	□β	5.32	159/1 05	正常	5.92	143	4.7 4	42. 11	11. 46
	6651	24	8.45	G3a- A2	25.4	51	1.10	1.61	□β	4.23	127/7 4	正常	5.64	139	4.0 3	71. 95	9.2 1
	257	21	9.45	G3b- A2	279.3	41	0.99	2.52	□β	4.59	180/9 7	正常	5.50	121	5.2 0	/	/
	287	15	12.87	G3a	2.4	53	1.43	1.47	□β	6.08	154/7 0	正常	5.74	134	4.7 5	49. 98	5.9 1
	4721	17	10.38	G3b- A2	125.8	43	1.79	1.55	□β	5.31	149/7 1	正常	5.45	127	4.7 2	59. 46	14. 04
Mean ±SD	18±4	9.56 ±2.13	/	93.7 ±105. 9	49±5	1.29 ±0.35	1.71 ±0.40	/	5.17 ±0.66	150±1 980± 17	/	5.78 ±0.35	138 ±14	4.8 1	57. 44	9.5 4	

註：#257 動物胸廓畸形無法採集心臟超音波圖像。

【0046】表 5：基線期-各劑量組受試慢性 DKD 腎功能不全恆河猴基礎病

因和特徵 (續)

組別	動物號	年齡	體重	腎功能診斷	UAC R	eGFR	CRS	CYS C	糖脂代謝異常年限	FPG	血壓 (SBP/DBP)	貧血診斷	RBC	HGB	K <sup>+</sup>	EF	E/Ea
		yrs	kg	CKD-EPI 評級	mg/g	(ml/min/1.73m <sup>2</sup> )	mg/dL	mg/L	mmol/L	mmHg	10 <sup>12</sup> /L	g/L	mmo/L	%	/		
式 I 化合物蘋果酸鹽 2mg/kg 組 (n=5)	4829	20	12.13	G3a	3.5	54	1.15	1.57	□ <sub>3</sub>	4.09	126/58	正常	5.11	124	4.69	54.41	17.11
	6501	17	10.55	G3a	2.5	50	1.14	1.87	□ <sub>3</sub>	4.61	111/56	正常	5.30	129	5.80	70.41	7.73
	287	15	14.53	G3a-A2	15.3	48	1.36	1.72	□ <sub>3</sub>	6.87	184/78	正常	5.62	133	4.77	57.45	6.69
	4721	18	10.79	G3a-A2	122.1	46	1.42	1.69	□ <sub>3</sub>	5.53	143/83	正常	4.98	119	4.07	57.90	17.43
	2091	19	9.88	G3a-A2	29.3	58	1.06	1.56	□ <sub>3</sub>	7.7	137/74	正常	6.13	145	5.40	62.76	8.89
Mean ±SD	18±2	11.58±1.84	/	34.5±50.1	51±5	1.23±0.16	1.68±0.13	/	5.76±1.51	140±27/70±12	/	5.43±0.46	130±10	4.95±0.67	60.59±6.25	11.57±5.26	
式 I 化合物蘋果酸鹽 1mg/kg 組 (n=5)	1567	16	11.47	G3a-A2	32.8	51	1.25	1.67	□ <sub>3</sub>	5.03	101/54	正常	5.69	127	4.50	65.25	10.50
	4861	18	9.77	G3a-A2	30.0	54	1.03	1.80	□ <sub>3</sub>	6.09	105/56	正常	5.69	127	4.51	55.89	9.53
	5453	19	14.93	G3a	2.9	53	1.09	1.72	□ <sub>3</sub>	5.75	125/60	正常	5.85	140	4.40	54.86	9.22
	6653	20	10.46	G3a	1.6	50	1.05	1.84	□ <sub>3</sub>	6.29	121/59	正常	5.49	124	4.78	69.87	8.68
	5073	15	10.34	G3a	4.1	52	1.21	1.75	□ <sub>3</sub>	4.59	129/70	正常	5.64	136	4.79	47.92	10.36
Mean ±SD	18±2	11.39±2.07	/	14.3±15.7	52±1	1.13±0.10	1.76±0.07	/	5.55±0.72	116±13/60±6	/	5.67±0.13	131±7	4.60±0.18	58.76±8.75	9.66±0.77	

## 【0047】3. 試驗設計

## 3.1 分組及劑量設計

本次試驗分三個階段納入動物，第一階段共兩個組：式 I 化合物蘋果酸鹽 5mg/kg 組 3 隻動物 (#257, #4721, #287)，安慰劑組 2 隻動物 (#1029, #4713)，第二階段式 I 化合物蘋果酸鹽 5mg/kg 組 3 隻動物 (#144, #5073, #6651)，Valsartan 組 3 隻動物 (#2091, #4861, #6645)，安慰劑組 2 隻動物 (#6653, #231)，第三階段式 I 化合物蘋果酸鹽 2mg/kg 組 5 隻動物 (#4829, #6501, #287,

#4721，#2091)，式 I 化合物蘋果酸鹽 1mg/kg 組 5 隻動物（#1567，#4861，#5453，#6653，#5073），

【0048】其中第一階段 2 例動物（#287 和#4721）停藥沖提約 9 個月，第二階段 4 例動物（#5073，#2091，#4861 和#6653）停藥沖提約 5 個月後進入第三階段基線期（基線期為 1 個月）。

【0049】詳見下表 6。

【0050】表 6：組別設計信息

組別名稱	動物數(隻)	劑量(mg/kg/次)	給藥頻率
安慰劑組	4	/	/
Valsartan 組	3	2.67	每天 1 次或 2 次
式 I 化合物蘋果酸鹽 5mg/kg 組	6	5	每天 1 次
式 I 化合物蘋果酸鹽 2mg/kg 組	5	2	每天 1 次
式 I 化合物蘋果酸鹽 1mg/kg 組	5	1	每天 1 次

備註：Valsartan 組給藥期第 1 至 2 週每天 1 次，第 3 至 8 週每天 2 次。

### 【0051】 3.2 給藥信息

給藥途徑：口服給藥。

給藥頻率：式 I 化合物蘋果酸鹽每天 1 次，Valsartan 組給藥期第 1 至 2 週每天 1 次，第 3 至 8 週每天 2 次。

給藥量計算：以每次稱量的體重計算接下來一週的給藥量。

給藥時間：08:00 至 09:00 給藥。

### 【0052】 3.3 主要藥效指標

腎小球濾過率  $eGFR_{\text{creat-cys}}$ ：檢測肌酐 (Cr-P)、尿素氮 (BUN)、胱抑素 (CysC)，計算獲  $eGFR$  值。給藥前 1 次，給藥後每兩週檢測 1 次。

$$eGFR_{\text{male}} = 135 \times \min(\text{Cr}/0.9, 1)^{-0.207} \times \max(\text{Cr}/0.9, 1)^{-0.601} \times \min(\text{CysC}/0.8, 1)^{0.375} \times \max(\text{CysC}/0.8, 1)^{-0.711} \times 0.995^{\text{Age} \times 3}$$

$$eGFR_{\text{female}} = 135 \times \min(\text{Cr}/0.7, 1)^{-0.284} \times \max(\text{Cr}/0.7, 1)^{-0.601} \times \min(\text{CysC}/0.8, 1)^{0.375} \times \max(\text{CysC}/0.8, 1)^{-0.711} \times 0.995^{\text{Age} \times 3} \times 0.969$$

UACR：4h/6h 尿液收集，檢測尿微量白蛋白 (malb) 和尿肌酐 (Cr-U)，計算獲得 UACR 值。給藥前 1 次，給藥結束 1 次。UACR=MALB / Cr-U。

血壓：麻醉後檢測血壓，包括收縮壓 (SBP)，舒張壓 (DBP)，平均血壓 (MBP) 和心率 (HR)。給藥前 1 次，給藥後 4 週和 8 週各 1 次。

心臟 GE 多普勒超音波：1 年內歷史心超一次 (入選動物)、給藥前一次 (基線期 D-30 天內)，給藥後 8 週一次。

### 【0053】 3.4 次要藥效指標

血鉀，給藥前 2 次，給藥期每 2 週一次；

糖脂代謝及肝功：FPG、FRA、LDL-c、HDL-c、TG、TC、NT-proBNP、ALT、AST、TBIL 等，給藥前 2 次，給藥期 4 週和 8 週各 1 次；

其他生化指標和血液學，給藥前後各 1 次；

體重：給藥前一次，給藥期每週一次；

給藥後每天觀察 24 小時攝食、行為等變化。

**【0054】 3.5 檢測方法和設備**

檢測方法：見下表 7 和下表 8。

血液學檢測儀器：Siemens ADVIA 2120i Hematology Systems。

血生化和尿液指標檢測儀器：Roche cobas6000 analyzer series C501 模塊檢測，NT-proBNP 採用 ELISA 試劑盒檢測。

【0055】表 7：生化檢測項目

測定項目	單位	測定方法
血清鉀離子 (K <sup>+</sup> )	mmol/L	離子選擇電極法、間接法
腦啡肽前體 (NT-proBNP)	pg/mL	酶聯免疫吸附法
尿液-微量白蛋白 (Malb)	g/L	免疫比濁法、2 點終點
尿液-肌酐 (Cr-U)	mg/dL	酶比色法
血尿素氮 (BUN)	mg/dL	比色法、速率法
血漿肌酐 (Cr-P)	mg/dL	酶比色法
胱抑素 C (CysC)	mg/L	免疫比濁法
總膽固醇 (TC)	mmol/L	酶比色法
甘油三脂 (TG)	mmol/L	酶比色法
高密度脂蛋白 (HDL-c)	mmol/L	均相酶比色法
低密度脂蛋白 (LDL-c)	mmol/L	均相酶比色法
血糖 (FPG)	mmol/L	己糖激酶法
果糖胺 (FRA)	μmol/L	速率法
穀丙轉胺酶 (ALT)	IU/L	IFCC 速率法
穀草轉胺酶 (AST)	IU/L	比色法
總膽紅素 (TBIL)	μmol/L	重氮法
鹼性磷酸酶 (ALP)	IU/L	比色法、速率法
總蛋白質 (TP)	g/L	比色法、2 點終點
白蛋白 (ALB)	g/L	比色法
直接膽紅素 (DBIL)	μmol/L	重氮法、2 點終點
γ-穀胺醯轉胺酶 (GGT)	IU/L	酶比色法

【0056】表 8：血液學檢測項目

指標	單位	測定方法
白細胞數 (WBC)	$10^9/L$	2 維激光
紅細胞數 (RBC)	$10^{12}/L$	2 維激光
血紅蛋白 (HGB)	g/L	氰化高鐵血紅蛋白
紅細胞壓積 (HCT)	%	2 維激光
紅細胞平均體積 (MCV)	fL	2 維激光
紅細胞平均血紅蛋白量 (MCH)	pg	2 維激光
紅細胞平均血紅蛋白濃度 (MCHC)	g/L	2 維激光
紅細胞體積分佈寬度 (RDW)	%	2 維激光
血紅蛋白分佈寬度 (HDW)	g/L	2 維激光
直接測定的平均血紅蛋白濃度 (CHCM)	g/L	2 維激光
平均血紅蛋白含量(CH)	pg	2 維激光
平均紅細胞 CH 分佈寬度 (CHDW)	pg	2 維激光
血小板總數(PLT)	$10^9/L$	2 維激光
血小板比積(PCT)	%	2 維激光
血小板體積分佈寬度(PDW)	%	2 維激光
血小板平均體積(MPV)	fL	2 維激光

## 【0057】 3.6 心臟多普勒超音波

麻醉方法：採用 15mg/kg 鹽酸氯胺酮肌肉注射麻醉，根據動物麻醉狀態，獸醫判定後進行補充麻醉，每次補充麻醉的劑量為初始劑量的 1/2。

檢測方法：動物取左側臥位，採用 6S-RS 探頭（頻率 2.7-8.0 MHz）進行圖像採集。

分析方法：圖像採集保存後使用配套分析工作站 EchoPAC Software 在連續的 3 個心動週期內重複檢測心臟收縮及舒張功能各項指標。

檢測指標及超音波技術：見下表 9。

檢測儀器：GE Vivid S5 彩色多普勒超音波診斷儀。

### 【0058】 3.7 血壓檢測

檢測方法：肌肉注射 15 mg/kg 鹽酸氯胺酮對動物進行麻醉，麻醉後呈仰臥位，將左上臂毛髮剃除乾淨，並按標準綁上合適大小的袖帶，將血氧探頭夾在動物手指或腳趾（左手除外）上，紅色感光面在指肚一側，使用自動模式連續檢測 3 次動物血壓，每次間隔 1min。若三次以上血壓的 DBP、SBP 和 MBP 差異不大（最高值與最低值差異小於 15mmHg），測定結束。

檢測指標：檢測指標包括收縮壓（SBP）、舒張壓（DBP）、平均血壓（MBP）和心率（HR）。

檢測儀器：GE B40i 電生理監護儀。

【0059】表 9：心臟超音波檢測指標

檢測指標	單位	檢測技術
左房前後徑 LAAD (mm)	mm	
左房橫徑 LATD (mm)	mm	二維超音波
左房縱徑 LAVD (mm)	mm	
左房容積 LA Volume-Ellipsoid (ml)	ml	
舒張早期二尖瓣血流峰速 E	cm/s	
E 峰減速時間 EDT	ms	
舒張晚期二尖瓣血流峰速 A	cm/s	脈衝多普勒
E/A	/	
A 等持續時間 A Dur	ms	
舒張早期二尖瓣環運動峰速 Ea	cm/s	
舒張晚期二尖瓣環運動峰速 Aa	cm/s	
Ea/Aa	/	組織多普勒
E/Ea	/	
等容舒張期時間 IVRT	ms	
等容收縮期時間 IVCT	ms	
肺靜脈 S 波峰速 PV S	cm/s	
肺靜脈 D 波峰速 PV D	cm/s	
肺靜脈反流 Ar 波峰速 PV Ar	cm/s	脈衝多普勒
肺靜脈反流 Ar 波持續時間 Ar Dur	ms	
Ar-A Dur	ms	
舒張早期左室內血流傳播速度 Vp	cm/s	彩色 M 型超音波

四腔心舒張末容積 LVEDV MOD A4C	ml	
四腔心舒張末期左室長徑 LVLd A4C	mm	
四腔心收縮末容積 LVESV MOD A4C	ml	
四腔心收縮末期左室長徑 LVLs A4C	mm	
四腔心每搏量 SV MOD A4C	ml	
四腔心射出分率 LVEF MOD A4C	%	
兩腔心舒張末容積 LVEDV MOD A2C	ml	
兩腔心舒張末期左室長徑 LVLd A2C	mm	
兩腔心收縮末容積 LVESV MOD A2C	ml	二維雙平面辛普森法
兩腔心收縮末期左室長徑 LVLs A2C	mm	
兩腔心每搏量 SV MOD A2C	ml	
兩腔心射出分率 LVEF MOD A2C	%	
雙平面收縮末容積 LVESV MOD BP	ml	
雙平面舒張末容積 LVEDV MOD BP	ml	
雙平面射出分率 EF Biplane	%	
雙平面每分輸出量 CO Biplane	L/min	
心率 HR	BPM	
RR 間期 R-R	ms	

### 【0060】 3.8 臨床觀察

觀察次數：每天觀察 1 次。

觀察方法：隔籠觀察。

觀察內容：注射部位、皮膚、被毛、眼、耳、鼻、口腔、胸部、腹部、泌尿生殖部、四肢等部位，以及呼吸、運動、泌尿、排便和行為改變等。

### 【0061】 3.9 攝食量測定

給料方法：上午 8:00 至 9:00、10:00、下午 2:00 和下午 4:00 各給食一次，保證食盒中有食物，自由採食，第二天上午 07:40 至 08:00 撤去剩餘飼料。

給料量：約 250 至 500 g/隻/天，試驗中保證食盒中 24 h 有飼料，動物自由攝食。

攝食量測定方法：飼料採用半定量方法估算，每天記錄給食量、丟棄量和食盒剩餘量。攝食量=給食量-丟棄量-食盒剩餘量。

### 【0062】 3.10 體重測定

稱重時間：當天餵食前。

測定方法：稱重前動物禁食 14 至 16h，動物在清醒狀態下，進入轉移籠後，用大動物稱稱重。

測定儀器：METTLER TOLEDO 電子臺秤。

### 【0063】 4.0 終止試驗標準

- a. 發生嚴重不良事件。
- b. 發生嚴重感染。

### 【0064】 5. 結果與分析

#### 5.1 對 UACR 的影響

各組給藥對蛋白尿（UACR）的影響見下表 10。各組選擇蛋白尿中重度增多，表現為基線尿白蛋白/肌酐比值(UACR)≥15mg/g 至 350mg/g（4 至 6 小時尿液收集）的 CKD 恆河猴分析基線和給藥 8 週（W8）的白蛋白/肌酐比值變化。

**安慰劑組**(n=4)：與基線比，試驗期結束 W8 的 UACR 平均升高  $30.64 \pm 34.50\%$ ；4 例動物蛋白尿 UACR 在一定範圍內穩定波動，未表現快速進展。

**Valsartan 組**(n=3，中重度蛋白尿增多納入統計)：與基線比，給藥 W8 的 2 例動物 (#2091, #4861) UACR 下降 40%至 70%，均呈現獲益；1 例動物基線的 UACR 為 15mg/g，給藥後 W8 的 UACR 為 20.4%，獲益不明顯。由於入組動物數少，與安慰劑組比無統計學差異。

**【0065】式 I 化合物蘋果酸鹽 (5 mg/kg 每天一次 (qd)) 組** (n=6，4/6 隻中重度蛋白尿增多納入統計)：與基線比，給藥後 W8 的 UACR 平均下降  $46.87 \pm 36.93\%$ ，與安慰劑組比呈顯著降低 ( $p < 0.05$ )。其中 3 例動物給藥 W8 與基線比 UACR 下降 60%至 70%，均呈現獲益；1 例動物未見獲益。

**【0066】式 I 化合物蘋果酸鹽 (2mg/kg qd) 組** (n=5，3/5 隻中重度蛋白尿增多納入統計)：與基線比，給藥後 W8 的 UACR 平均下降  $66.00 \pm 17.42\%$ ，與安慰劑組比呈顯著降低 ( $p < 0.01$ )。其中 3 例動物給藥 W8 與基線比 UACR 下降約 50%至 80%，均呈現獲益。

**【0067】式 I 化合物蘋果酸鹽 (1mg/kg qd) 組** (n=5，2/5 隻中重度蛋白尿增多納入統計)：與基線比，1 例動物給藥後 W8 的 UACR 降低 39%，1 例獲益不明顯。

**【0068】總之，式 I 化合物蘋果酸鹽的 2 至 5mg/kg qd，給藥 8 週能顯著改善蛋白尿 (UACR)。**

【0069】表 10：式 I 化合物蘋果酸鹽給藥 8 週對自發性慢性腎病（CKD）

恆河猴 UACR 的影響

組別	動物號	MALB(mg/L)		Cr-U(mg/dL)		Urine-Vol(ml)		UACR(mg/g)		UACR 變化率 (%)	UACR 獲益評估
		Baseline	8 週	Baseline	8 週	Baseline	8 週	Baseline	8 週		
安慰劑組 (n=4)	6653	38.3	4.7	137.74	15.66	60	35	27.8	30.0	7.94	沒獲益
	231	10.6	16.6	73.27	68.31	115	210	14.5	24.3	67.97	沒獲益
	1029	4.4	2.2	42.00	81.64	265	55	10.5	10.0	-4.55	沒獲益
	4713	4.2	13.6	49.45	105.90	315	50	8.5	12.8	51.20	沒獲益
	Mean±SD	14.4±16.2	9.3±6.9	75.62±43.51	67.88±38.13	189±121	88±82	15.3±8.7	19.3±9.5	30.6±34.50	/
Valsartan 組 (n=3)	2091	7.1	6.2	19.02	28.20	185	240	37.3	22.0	-41.10	獲益
	4861	60.0	39.9	94.34	206.27	20	80	63.6	19.3	-69.59	獲益
	6645	25.8	19.5	171.64	95.47	20	37	15.0	20.4	35.88	/
	Mean±SD	31.0±26.8	21.9±17.0	95.00±76.31	109.98±89.92	75±95	119±107	38.7±24.3	20.6±13	24.93±54.56	/
	式 I 化合物蘋果酸鹽 5mg/kg 組 (n=6)	144	93.2	72.4	78.63	52.32	30	60	118.5	138.4	16.75
5073		4.3	1.2	40.84	21.19	235	400	10.5	5.7	NA	/
6651		46.5	3.4	182.87	37.25	30	90	25.4	9.1	-64.10	獲益
257		59.3	112.3	21.23	128.11	208	25	279.3	87.7	-68.62	獲益
287		2.1	0.3	89.17	16.98	165	380	2.4	1.8	NA	/
4721		26.0	21.6	20.66	61.60	405	115	125.8	35.1	-72.14	獲益
Mean±SD	38.6±35.0	35.2±46.7	72.23±61.34	52.91±40.68	179±141	178±167	93.7±105.9	46.3±55.4	-46.87±36.93 <sup>#</sup>	/	

註：1. UACR=MALB / Cr-U

2. 變化率=（給藥後時間點-基線值）/基線值\*100%，負值為降低；「#」與安慰劑組比 p&lt;0.05。

3. NA，UACR 正常動物未納入統計。

表 10：式 I 化合物蘋果酸鹽給藥 8 週對自發性慢性腎病（CKD）恆河猴 UACR 的影響（續）

組別	動物號	MALB(mg/L)			Cr-U(mg/dL)			Urine-Vol(ml)			UACR(mg/g)			UACR 變化率 (%)	UACR 獲益評估
		Baseline	4週	8週	Baseline	4週	8週	Baseline	4週	8週	Baseline	4週	8週		
式 I 化合物蘋果酸鹽 2mg/kg 組 (n=5)	4829	1.2	1.0	3.0	33.98	32.18	53.10	290	330	77	3.5	3.1	5.6	NA	/
	6501	0.6	12.5	0.4	24.39	157.85	33.60	315	20	260	2.5	7.9	1.2	NA	/
	287	5.3	5.3	0.6	34.58	41.80	26.33	53	320	420	15.3	12.7	2.3	-85.13	獲益
	4721	145.4	103.7	69.5	119.07	111.58	116.29	55	60	60	122.1	92.9	59.8	-51.06	獲益
	2091	6.8	2.4	3.6	23.24	66.89	32.22	370	85	265	29.3	3.6	11.2	-61.81	獲益
	Mean±SD	31.9±63.5	25.0±44.2	15.4±30.3	47.05±40.60	82.06±52.33	52.31±37.16	217±151	163±150	216±150	34.5±50.1	24.0±38.7	16.0±24.8	-66.00±17.42 <sup>##</sup>	/
式 I 化合物蘋果酸鹽 1mg/kg 組 (n=5)	1567	9.5	4.6	5.2	28.93	30.74	26.02	393	170	375	32.8	15.0	20.0	-39.14	獲益
	4861	26.8	34.1	38.4	89.48	121.39	118.23	55	35	25	30.0	28.1	32.5	8.44	沒獲益
	5453	0.6	1.4	0.8	20.69	19.36	25.52	440	380	470	2.9	7.2	3.1	NA	/
	6653	0.9	5.1	7.6	56.97	108.29	290.17	120	310	25	1.6	4.7	2.6	NA	/
	5073	0.9	1.3	1.1	21.90	16.09	17.93	443	470	520	4.1	8.1	6.1	NA	/
	Mean±SD	7.7±11.3	9.3±14.0	10.6±15.8	43.59±29.56	59.17±51.32	95.57±116.36	290±187	273±172	283±241	14.3±15.7	12.6±9.4	12.9±13.0	-15.35±33.65	/

註：1. UACR=MALB / Cr-U

2. 變化率=（給藥後時間點-基線值）/基線值\*100%，負值為降低；「#」與安慰劑組比 p<0.05，「##」與安慰劑組比 p<0.01。

3. NA，UACR 正常動物未納入統計。

### 【0070】 5.2 對腎小球濾過率 eGFR<sub>creat-cys</sub> 影響

各組對 eGFR 的影響見下表 11 和下表 12。各組入選 eGFR<sub>creat-cys</sub>：30 至 59 ml/min/1.73m<sup>2</sup>，分析對基線和給藥後 W8 的腎小球濾過率變化。

**安慰劑組 (n=4)：**與基線比，4 例動物腎小球濾過率 eGFR<sub>creat-cys</sub> 在一定範圍內穩定波動未表現快速進展。

**缬沙坦 (Valsartan) 組 (n=3)：**與基線比，給藥後 W8 Valsartan 組腎小球濾過率 eGFR<sub>creat-cys</sub> 平均增加 6±2 ml/min/1.73m<sup>2</sup>，與安慰劑變化值比呈極顯著增加 (p<0.01)，顯著改善了腎小球惡化，且療效呈現時效性。

【0071】 式 I 化合物蘋果酸鹽 (5 mg/kg qd) 組 (n=6) : 與基線比, 給藥後 W8 腎小球濾過率  $eGFR_{\text{creat-cys}}$  平均增加  $6 \pm 6$  ml/min/1.73m<sup>2</sup>, 與安慰組變化值比呈顯著增加 ( $p < 0.05$ ), 療效呈現時效性。

【0072】 式 I 化合物蘋果酸鹽 (2mg/kg qd) 組 (n=5) : 與基線比, 給藥後 W8 腎小球濾過率  $eGFR_{\text{creat-cys}}$  平均增加  $3 \pm 3$  ml/min/1.73m<sup>2</sup>, 與安慰組變化值比呈顯著增加 ( $p < 0.05$ )。

【0073】 式 I 化合物蘋果酸鹽 (1mg/kg qd) 組 (n=5) : 與基線比, 給藥後 W8 腎小球濾過率  $eGFR_{\text{creat-cys}}$  平均增加  $3 \pm 4$  ml/min/1.73m<sup>2</sup>, 與安慰組變化值比無統計學意義上改變。

【0074】 總之, 式 I 化合物蘋果酸鹽的 2-5mg/kg qd, 給藥 8 週能顯著改善腎小球濾過率  $eGFR_{\text{creat-cys}}$ 。

【0075】表 11：式 I 化合物蘋果酸鹽給藥 8 週對自發性慢性腎病恆河猴

eGFR<sub>creat-cys</sub> 的影響

組別	動物號	eGFR <sub>creat-cys</sub> (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )					eGFR <sub>creat-cys</sub> 變化值 (8週)
		Baseline	2週	4週	6週	8週	
安慰劑組 (n=4)	6653	47	49	43	47	44	-3
	231	58	62	57	56	58	1
	1029	53	57	55	50	56	2
	4713	47	49	43	46	45	-2
	Mean±SD	51±5	54±6	49±8	50±4	51±8	-1±3
Valsartan 組 (n=3)	2091	55	58	55	55	60	5
	4861	50	54	57	55	59	8
	6645	40	46	46	47	46	5
	Mean±SD	48±7	53±6	53±6	53±5	55±8	6±2 <sup>##</sup>
	式 I 化合物 蘋果酸鹽 5mg/kg 組 (n=6)	144	55	51	52	53	57
5073		48	57	51	54	53	6
6651		51	62	57	49	55	4
257		41	37	39	40	43	2
287		53	54	65	64	61	8
4721		43	61	55	54	60	17
Mean±SD	49±5	54±9	53±8	53±8	55±7	6±6 <sup>#</sup>	
式 I 化合物 蘋果酸鹽 2mg/kg 組 (n=5)	4829	54	58	61	58	59	5
	6501	50	47	45	48	50	0
	287	48	46	50	48	51	2
	4721	46	43	56	51	52	6
	2091	58	57	59	62	59	1
Mean±SD	51±5	50±7	54±7	54±6	54±4	3±3 <sup>#</sup>	
式 I 化合物 蘋果酸鹽 1mg/kg 組 (n=5)	1567	51	53	60	58	58	7
	4861	54	56	64	57	59	6
	5453	53	50	55	56	53	0
	6653	50	48	52	53	48	-2
	5073	52	56	56	57	57	5
Mean±SD	52±1	52±3	57±5	56±2	55±5	3±4	

註：變化值=8週-Baseline，負值為降低。「#」變化值安慰劑組比 p<0.05，「##」變化值與安慰劑組比 p<0.01

【0076】表 12：式 I 化合物蘋果酸鹽給藥 8 週自發性慢性腎病恆河猴

eGFR<sub>creat-cys</sub> 變化值

組別	動物號	eGFR <sub>creat-cys</sub> 變化值 (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )				
		Baseline	2 週	4 週	6 週	8 週
安慰劑組 (n=4)	6653	0	2	-4	0	-3
	231	0	4	-1	-2	1
	1029	0	4	2	-4	2
	4713	0	2	-4	-1	-2
	Mean±SD	0±0	3±1	-2±3	-2±2	-1±3
Valsartan 組 (n=3)	2091	0	4	1	1	5
	4861	0	4	7	5	8
	6645	0	6	6	7	5
	Mean±SD	0±0	5±1	5±3	4±3	6±2
式 I 化合物蘋果酸 鹽 5mg/kg 組 (n=6)	144	0	-4	-3	-1	3
	5073	0	9	4	6	6
	6651	0	11	6	-2	4
	257	0	-4	-2	-1	2
	287	0	1	12	11	8
	4721	0	17	11	11	17
Mean±SD	0±0	5±9	5±6	4±6	6±6	
式 I 化合物蘋果酸 鹽 2mg/kg 組 (n=5)	4829	0	5	7	4	5
	6501	0	-3	-5	-1	0
	287	0	-3	1	0	2

	4721	0	-3	10	5	6
	2091	0	0	1	5	1
	Mean±SD	0±0	-1±3	3±6	3±3	3±3
式 I 化合物蘋果酸 鹽 1mg/kg 組 (n=5)	1567	0	1	8	7	7
	4861	0	2	10	3	6
	5453	0	-3	3	3	0
	6653	0	-2	1	3	-2
	5073	0	4	5	6	5
	Mean±SD	0±0	0±3	5±4	4±2	3±4

註：變化值=當前值-Baseline，負值為降低。

### 【0077】 5.3 對 CysC、Cr-P 和 BUN 影響

各組給藥後對 CysC、Cr-P 和 BUN 的影響見下表 13 至表 15。

【0078】表 13: 式 I 化合物蘋果酸鹽給藥 8 週對自發性慢性腎病恆河猴 Cr-

P 的影響

組別	動物號	Cr-P (mg/dL)				
		Baseline	2 週	4 週	6 週	8 週
安慰劑組 (n=4)	6653	1.33	1.23	1.19	1.28	1.16
	231	1.20	1.19	1.11	1.18	1.20
	1029	0.98	1.00	0.92	1.00	1.04
	4713	1.33	1.42	1.25	1.47	1.33
	Mean±SD	1.21±0.17	1.21±0.17	1.12±0.14	1.23±0.20	1.18±0.12
Valsartan 組 (n=3)	2091	1.28	1.12	1.12	1.11	1.09
	4861	1.31	1.12	1.08	1.11	1.03
	6645	1.50	1.22	1.26	1.26	1.26
	Mean±SD	1.36±0.12	1.15±0.06*	1.15±0.09**	1.16±0.09**	1.13±0.12**
式 I 化合物蘋果 酸鹽 5mg/kg 組 (n=6)	144	0.90	0.92	0.85	0.87	0.85
	5073	1.53	1.14	1.26	1.42	1.22
	6651	1.10	0.88	0.89	1.02	0.95
	257	0.99	1.12	1.15	1.06	1.04
	287	1.43	1.40	1.13	1.12	1.11
	4721	1.79	0.96	1.33	1.32	1.18
Mean±SD	1.29±0.35	1.07±0.19	1.10±0.19*	1.14±0.20	1.06±0.14*	
式 I 化合物蘋果 酸鹽 2mg/kg 組 (n=5)	4829	1.15	1.1	1.15	1.17	1.17
	6501	1.14	1.19	1.44	1.27	1.29
	287	1.36	1.52	1.47	1.43	1.4
	4721	1.42	1.54	1.26	1.34	1.3
	2091	1.06	1.11	1.09	1.04	1.11
Mean±SD	1.23±0.16	1.29±0.22	1.28±0.17	1.25±0.15	1.25±0.11	
式 I 化合物蘋果 酸鹽 1mg/kg 組 (n=5)	1567	1.25	1.21	1.11	1.16	1.14
	4861	1.03	1.07	1.01	1.07	1.01
	5453	1.09	1.12	1.12	1.07	1.17
	6653	1.05	1.13	1.06	1.07	1.18
	5073	1.21	1.24	1.26	1.22	1.22
Mean±SD	1.13±0.10	1.15±0.07	1.11±0.09	1.12±0.07	1.14±0.08	

註：「\*」與基線值 Baseline 比  $p < 0.05$ ，「\*\*」與基線值 Baseline 比  $p < 0.01$ 。

【0079】表 14：式 I 化合物蘋果酸鹽給藥 8 週對自發性慢性腎病恆河猴

CysC 的影響

組別	動物號	CysC (mg/L)				
		Baseline	2 週	4 週	6 週	8 週
安慰劑組 (n=4)	6653	2.03	1.80	1.74	1.99	1.88
	231	1.42	1.42	1.37	1.47	1.49
	1029	1.59	1.71	1.66	1.63	1.83
	4713	1.44	1.55	1.61	1.69	1.67
	Mean±SD	1.62±0.28	1.62±0.17	1.60±0.16	1.70±0.22	1.72±0.18
Valsartan 組 (n=3)	2091	1.66	1.44	1.47	1.58	1.59
	4861	1.68	1.62	1.65	1.58	1.64
	6645	1.73	1.76	1.74	1.69	1.63
	Mean±SD	1.69±0.04	1.61±0.16	1.62±0.14	1.62±0.06	1.62±0.03
式 I 化合物蘋果 酸鹽 5mg/kg 組 (n=6)	144	1.49	1.63	1.68	1.59	1.46
	5073	1.63	1.63	1.73	1.47	1.69
	6651	1.61	1.45	1.64	1.80	1.66
	257	2.52	2.63	2.41	2.45	2.29
	287	1.47	1.46	1.36	1.40	1.50
	4721	1.55	1.64	1.44	1.46	1.39
Mean±SD	1.71±0.40	1.74±0.44	1.71±0.37	1.70±0.40	1.67±0.33	
式 I 化合物蘋果 酸鹽 2mg/kg 組 (n=5)	4829	1.57	1.44	1.31	1.39	1.36
	6501	1.87	1.97	1.77	1.76	1.68
	287	1.72	1.71	1.56	1.65	1.58
	4721	1.69	1.73	1.43	1.54	1.55
	2091	1.56	1.51	1.47	1.42	1.47
Mean±SD	1.68±0.13	1.67±0.21	1.51±0.17**	1.55±0.16**	1.53±0.12**	
式 I 化合物蘋果 酸鹽 1mg/kg 組 (n=5)	1567	1.67	1.66	1.49	1.48	1.51
	4861	1.80	1.64	1.43	1.61	1.59
	5453	1.72	1.83	1.57	1.62	1.62
	6653	1.84	1.83	1.76	1.68	1.77
	5073	1.75	1.55	1.50	1.50	1.51
Mean±SD	1.76±0.07	1.70±0.12	1.55±0.13**	1.58±0.08**	1.60±0.11**	

註：「\*\*」與 Baseline 比 p&lt;0.01。

【0080】表 15：式 I 化合物蘋果酸鹽給藥 8 週對自發性慢性腎病恆河猴

BUN 的影響

組別	動物號	BUN (mg/dL)		
		Baseline2	4 週	8 週
安慰劑組 (n=4)	6653	34.8	30.0	26.6
	231	34.0	29.3	34.5
	1029	27.5	33.3	27.9
	4713	36.7	37.4	38.6
	Mean±SD	33.3±4.0	32.5±3.7	31.9±5.6
Valsartan 組 (n=3)	2091	19.0	22.2	19.5
	4861	25.4	29.1	33.4
	6645	31.2	33.4	26.0
	Mean±SD	25.2±6.1	28.2±5.7	26.3±7.0
式 I 化合物蘋果酸鹽 5mg/kg 組 (n=6)	144	18.6	23.6	18.6
	5073	37.3	32.5	30.4
	6651	41.3	32.6	30.1
	257	77.3	62.5	62.5
	287	18.1	27.2	27.9
	4721	81.2	53.8	41.9
Mean±SD	45.6±27.7	38.7±15.7	35.2±15.3	
式 I 化合物蘋果酸鹽 2mg/kg 組 (n=5)	4829	37.5	42.7	36.4
	6501	24.2	37.1	29.4
	287	18.7	22.9	23.6
	4721	42.1	41.6	49.5
	2091	25.4	30.4	22.6
Mean±SD	29.6±9.8	34.9±8.3	32.3±11.1	

	1567	35.1	38.0	29.5
式 I 化合物蘋果酸鹽	4861	32.4	24.9	30.5
1mg/kg 組	5453	19.3	15.4	16.2
(n=5)	6653	39.8	36.3	38.5
	5073	40.8	32.7	28.1
	Mean±SD	33.5±8.6	29.5±9.3	28.6±8.0

#### 【0081】 5.4 對血壓的影響

各給藥組給藥對血壓的影響見表 16。靈長類的血壓測試由於需要麻醉，因此需要控制心率在各個時間點的變異性才能統計。

**安慰劑組** (n=4, 2/4 高血壓)：與基線比，4 例動物血壓在一定範圍內穩定波動。

**Valsartan 組**(n=3, 1/3 隻高血壓)：與基線比，給藥後 W8，SBP 和 DBP 分別平均降低 14±4 mmHg 和 7±0 mmHg，與安慰組變化值比呈極顯著降低(p<0.01)。

**【0082】 式 I 化合物蘋果酸鹽 (5 mg/kg qd) 組** (n=6, 4/6 例高血壓)：與基線比，給藥後 W8，SBP 和 DBP 分別平均降低 21±8 mmHg 和 10±7 mmHg，與安慰組變化值比呈極顯著降低 (p<0.01)，療效呈現時效性。

**【0083】 式 I 化合物蘋果酸鹽 (2 mg/kg qd) 組** (n=5, 2/5 例高血壓)：與基線比，給藥後 W8，SBP 和 DBP 分別平均降低 19±9 mmHg 和 9±8 mmHg，與安慰組變化值比呈極顯著降低 (p<0.01)，療效呈現時效性。

【0084】式 I 化合物蘋果酸鹽 (1 mg/kg qd) 組 (n=5)：與基線比，給藥後 W8，SBP 和 DBP 分別平均降低 11±4 mmHg 和 5±4 mmHg，與安慰組變化值比呈顯著降低 (p<0.05)。

【0085】總之，式 I 化合物蘋果酸鹽的 1 至 5mg/kg qd，給藥 8 週均呈現降低血壓的活性。

表 16：式 I 化合物蘋果酸鹽給藥 8 週對自發性慢性腎病恆河猴血壓的影響

組別	動物號	SBP (mmHg)			SBP 變化值 (mmHg)		DBP (mmHg)			DBP 變化值 (mmHg)	
		Baseline	4 週	8 週	4 週	8 週	Baseline	4 週	8 週	4 週	8 週
安慰劑組 (n=4)	6653	103	110	121	6	18	53	58	65	5	13
	231	134	122	139	-11	6	63	61	66	-1	3
	1029	162	169	156	7	-6	72	73	87	4	13
	4713	143	164	154	21	11	65	72	68	7	2
	Mean±SD	135±24	141±30	143±16	6±13	7±10	63±8	67±9	72±11	4±4	8±7
Valsartan 組 (n=3)	2091	131	130	121	-1	-10	67	62	61	-5	-6
	4861	125	106	107	-19	-18	60	53	53	-7	-7
	6645	148	138	133	-10	-15	82	62	75	-20	-7
	Mean±SD	135±12	125±17	120±13*	-10±9	-14±4 <sup>##</sup>	70±11	59±5	63±11**	-10±8 <sup>#</sup>	-7±0 <sup>##</sup>
式 I 化合物 蘋果酸 鹽 5mg/kg 組 (n=6)	144	132	136	NA	3	NA	63	61	NA	-2	NA
	5073	159	124	NA	-35	NA	105	70	NA	-35	NA
	6651	127	NA	114	NA	-12	74	NA	57	NA	-18
	257	180	159	161	-21	-19	97	81	97	-16	0
	287	154	144	121	-9	-32	70	68	60	-3	-11
	4721	149	139	128	-10	-21	71	68	59	-3	-13
Mean±SD	150±19	138±12	129±16**	-14±14 <sup>#</sup>	-21±8 <sup>##</sup>	80±17	71±7	66±15*	-12±14 <sup>#</sup>	-10±7 <sup>##</sup>	
式 I 化合物 蘋果酸 鹽 2mg/kg 組 (n=5)	4829	126	110	102	-16	-24	58	55	52	-2	-6
	6501	111	NA	NA	NA	NA	56	NA	NA	NA	NA
	287	184	163	160	-21	-24	78	83	70	-5	-8
	4721	143	NA	121	NA	-22	83	NA	62	NA	-21
	2091	137	138	133	1	-5	74	66	73	-8	-1
Mean±SD	140±27	140±20	128±21	-12±11	-19±9 <sup>##</sup>	70±12	71±11	64±8	-2±7	-9±8 <sup>##</sup>	
式 I 化合物 蘋果酸 鹽 1mg/kg 組 (n=5)	1567	101	104	94	4	-7	54	51	53	-3	0
	4861	105	109	89	4	-15	56	54	49	-2	-8
	5453	125	124	114	-1	-12	60	65	53	5	-7
	6653	121	NA	NA	NA	NA	59	NA	NA	NA	NA
	5073	129	NA	NA	NA	NA	70	NA	NA	NA	NA
Mean±SD	116±13	118±17	111±20	2±3	-11±4 <sup>#</sup>	60±6	61±12	60±12	0±5	-5±4 <sup>#</sup>	

註：「\*」與基線值 Baseline 比 p<0.05，「\*\*」與基線值 Baseline 比 p<0.01。「#」變化值與安慰劑組比 p<0.05，「##」變化值與安慰劑組比 p<0.01。NA，心率不穩定不納入統計分析。

**【0086】 5.5 對心功能的影響**

各組對超音波心動圖指標的影響見表 17。

**【0087】** 式 I 化合物蘋果酸鹽各給藥劑量組，Valsartan 組和安慰劑組給藥後心臟收縮和舒張功能未見明顯不良反應。

**【0088】** 另外，式 I 化合物蘋果酸鹽 5mg/kg 組 2 例表現為射出分率低下心功能不全 (SD) 恆河猴動物 (#5073 和#287) 與基線比給藥後 8 週 LVEF% 升高。但本品是否能有治療慢性心衰作用需要後續更多的研究隊列數據支持。

【0089】表 17：式 I 化合物蘋果酸鹽給藥 8 週對自發性慢性腎病恆河猴心

臟功能主要指標的影響及療效評價

組別	動物號	LVEF (%)		Ea (cm/s)		E/Ea	
		Baseline	8 週	Baseline	8 週	Baseline	8 週
安慰劑組 (n=4)	6653	68.36	64.37	6.03	4.65	11.43	13.30
	231	54.05	59.26	5.10	4.94	10.87	11.59
	1029	50.79	50.71	4.02	5.16	10.63	10.13
	4713	58.81	55.63	4.26	4.60	26.16	22.38
	Mean±SD	58.00±7.65	57.49±5.77	4.85±0.91	4.84±0.26	14.77±7.60	14.35±5.51
Valsartan 組 (n=3)	2091	64.02	64.09	4.16	7.01	8.40	6.90
	4861	58.75	57.98	5.14	7.17	13.80	10.43
	6645	59.26	61.97	3.44	4.61	18.35	16.40
	Mean±SD	60.68±2.91	61.35±3.10	4.25±0.85	6.26±1.43	13.52±4.98	11.24±4.80
式 I 化合物蘋果 酸鹽 5mg/kg 組 (n=6)	144	63.71	62.99	6.57	8.53	7.09	7.38
	5073	42.11	45.89	4.92	8.26	11.46	9.25
	6651	71.95	73.88	3.29	6.47	9.21	8.22
	257 <sup>a</sup>	/	/	/	/	/	/
	287	49.98	54.16	8.75	8.40	5.91	6.12
	4721	59.46	55.90	5.22	6.62	14.04	11.07
Mean±SD	57.44±11.67	58.56±10.50	5.75±2.04	7.66±1.02	9.54±3.29	8.41±1.88	
式 I 化合物蘋果 酸鹽 2mg/kg 組 (n=5)	4829	54.41	58.54	4.36	5.00	17.11	10.63
	6501	70.41	67.80	6.37	6.66	7.73	6.35
	287	57.45	57.13	8.94	8.01	6.69	7.84
	4721	57.90	58.03	4.46	5.91	17.43	9.88
	2091	62.76	62.85	5.82	6.82	8.89	6.22
Mean±SD	60.59±6.25	60.87±4.46	5.99±1.86	6.48±1.12	11.57±5.26	8.18±2.01	
式 I 化合物蘋果 酸鹽 1mg/kg 組 (n=5)	1567	65.25	63.95	5.90	5.35	10.50	10.68
	4861	55.89	55.81	6.31	5.65	9.53	11.36
	5453	54.86	54.03	4.81	6.99	9.22	8.16
	6653	69.87	61.01	5.18	5.37	8.68	8.95
	5073	47.92	49.37	6.37	5.06	10.36	10.64
Mean±SD	58.76±8.75	56.83±5.76	5.71±0.69	5.68±0.76	9.66±0.77	9.96±1.34	

備註：舒張功能異常的級別係在綜合考慮了 Ea、E/Ea、Ea/Aa 以及其它功能指標後而定；當受試動物的舒張功能異常級別較基線有改善時視為「獲益」，否則視為「無效」；#257 動物胸廓畸形無法採集心臟超音波圖像。

## 【0090】5.6 對心功能損傷血液 Biomarker 的影響

### 5.6.1 對 NT-proBNP 的影響

式 I 化合物蘋果酸鹽對 NT-proBNP 的影響見表 18。

【0091】與基線期比，給藥 8 週後各給藥組動物 NT-proBNP 水平未見明顯改變。

【0092】表 18：式 I 化合物蘋果酸鹽給藥 8 週對自發性慢性腎病恆河猴 NT-proBNP 的影響

組別	動物號	NT-proBNP (pg/ml)		
		Baseline	4 週	8 週
安慰劑組 (n=4)	6653	342	143	172
	231	146	187	130
	1029	155	170	201
	4713	169	177	230
	Mean±SD	203±93	169±19	183±42
Valsartan 組 (n=3)	2091	211	179	217
	4861	500	260	288
	6645	394	285	291
	Mean±SD	368±146	241±56	266±42
式 I 化合物蘋果 酸鹽 5mg/kg 組 (n=6)	144	312	254	261
	5073	88	108	146
	6651	211	245	250
	257	432	418	351
	287	177	210	197
	4721	162	178	180
Mean±SD	230±123	236±104	231±73	

式 I 化合物蘋果 酸鹽 2mg/kg 組 (n=5)	4829	43	46	54
	6501	155	59	178
	287	335	304	253
	4721	46	46	54
	2091	250	107	174
	Mean±SD	166±127	113±110	143±87
式 I 化合物蘋果 酸鹽 1mg/kg 組 (n=5)	1567	88	44	70
	4861	299	239	157
	5453	127	37	136
	6653	203	304	141
	5073	44	40	39
	Mean±SD	152±101	133±129	109±51

### 【0093】 5.6.2 對 K<sup>+</sup>的影響

式 I 化合物蘋果酸鹽對 K<sup>+</sup>的影響見表 19。

與基線期比，給藥 8 週後各給藥組動物血清 K<sup>+</sup>水平未見明顯改變。

【0094】表 19: 式 I 化合物蘋果酸鹽給藥 8 週對自發性慢性腎病恆河猴 K<sup>+</sup> 的影響

組別	動物號	K <sup>+</sup> (mmol/L)					
		Baseline1	Baseline2	2週	4週	6週	8週
安慰劑組 (n=4)	6653	4.47	4.70	3.98	4.85	4.45	4.15
	231	4.79	5.37	5.78	4.76	5.02	5.32
	1029	4.43	3.92	3.68	3.50	4.12	3.68
	4713	4.95	4.38	3.64	4.01	3.98	3.96
	Mean±SD	4.66±0.25	4.59±0.61	4.27±1.02	4.28±0.64	4.39±0.46	4.28±0.72
Valsartan 組 (n=3)	2091	4.94	4.63	5.38	5.68	5.28	5.94
	4861	3.86	4.27	4.47	4.55	4.81	4.50
	6645	4.31	5.07	5.43	4.88	5.09	4.95
	Mean±SD	4.37±0.54	4.66±0.40	5.09±0.54	5.04±0.58	5.06±0.24	5.13±0.74
式 I 化合物 蘋果酸鹽 5mg/kg 組 (n=6)	144	4.78	5.43	4.91	4.33	4.53	4.26
	5073	4.54	4.74	4.55	4.55	4.16	4.64
	6651	4.93	4.03	6.07	5.46	4.77	4.49
	257	5.41	5.20	5.37	4.50	4.76	5.28
	287	5.16	4.75	5.05	4.61	5.58	5.00
	4721	4.52	4.72	3.93	3.51	3.60	3.26
Mean±SD	4.89±0.35	4.81±0.48	4.98±0.73	4.49±0.62	4.57±0.66	4.49±0.70	
式 I 化合物 蘋果酸鹽 2mg/kg 組 (n=5)	4829	4.53	4.69	4.02	4.74	5.48	4.50
	6501	4.42	5.80	4.83	4.76	5.72	4.36
	287	4.92	4.77	4.73	4.55	4.90	4.47
	4721	3.43	4.07	4.43	4.31	4.26	3.93
	2091	6.19	5.40	5.08	4.76	4.99	4.77
Mean±SD	4.70±1.00	4.95±0.67	4.62±0.41	4.62±0.20	5.07±0.57	4.41±0.31	
式 I 化合物 蘋果酸鹽 1mg/kg 組 (n=5)	1567	3.93	4.50	4.17	4.30	4.67	4.29
	4861	4.30	4.51	4.14	3.94	4.99	4.17
	5453	4.15	4.40	4.15	4.26	4.08	4.15
	6653	4.74	4.78	4.95	5.23	5.57	4.49
	5073	4.98	4.79	5.04	4.79	5.30	4.65
Mean±SD	4.42±0.43	4.60±0.18	4.49±0.46	4.50±0.51	4.92±0.58	4.35±0.22	

### 【0095】 5.7 安全性耐受研究

給藥期間式 I 化合物蘋果酸鹽組未見與給藥相關的不良事件，肝功、腎功、攝食量、體重、血液學指標等未見明顯改變。

### 【0096】 6. 結論

式 I 化合物蘋果酸鹽 2-5mg/kg qd，給藥 8 週能顯著改善蛋白尿（UACR），顯著改善腎小球濾過率  $eGFR_{\text{creat-cys}}$ ，療效與 Valsartan 組相當。

**【0097】** 式 I 化合物蘋果酸鹽 1-5mg/kg qd，給藥 8 週均呈現降低血壓的活性。同時在本試驗條件下未見高血鉀症的風險。

### **【0098】 實施例 2：式 I 化合物的臨床前安全性評估**

#### **【0099】 1. 材料和方法**

##### 1.1. 測試物質

式 I 化合物按照 CN103562191B 中的方法製備並確認結構。溶媒係 0.5% 的羧甲基纖維素鈉（Sodium carboxymethyl cellulose，CMC-Na）。式 I 化合物在室溫下保存，避免光照和潮濕。食蟹猴的安全性研究中，將測試物質以相關濃度懸浮於 0.5% CMC-Na 中。分析製備的懸浮液的均質性、濃度和一週穩定性，以確保正確施用報告的劑量。對活性藥物成分（API）的六個月加速穩定性進行了測試。

##### **【0100】 1.2. 動物飼養**

3-4 歲的健康雄性和雌性食蟹猴由海南新源生物技術有限公司（中國海南）提供。在治療開始時，雄性體重範圍為 3.2 至 5.8 kg，雌性體重範圍為 2.5 至 3.7 kg。在研究之前，他們被安置了 36 天馴化期。每天早上一次，動物自由飲食和取水。

**【0101】** 這項非臨床實驗研究按照中國食品藥品監督管理局（CFDA）的指南進行。該實驗係在國際實驗室動物護理評估與鑑定協會（AAA LAC）批准的設施中進行的，並且根據《實驗室動物護理和使用指南》（Nussberger 等，2008）對動物進行飼養。

**【0102】 1.3. 劑量和治療時間表**

使用基於體重的計算機隨機程序選擇食蟹猴（5/性別/組），並藉由鼻飼餵養式 I 化合物（劑量水平為 0（對照組）、20、100、450 mg/kg/天，體積為 5 ml/kg）。每週根據動物的體重調整受試者劑量。對於所有組，在第 28 天隨機選擇 2/3 的動物並實施安樂死。在停藥 28 天後對其餘動物實施安樂死。

**【0103】 1.4. 臨床觀察**

從隔離期開始每天評估死亡率和臨床體徵。每天至少兩次檢查每隻動物的行為、給藥後的反應或疾病的發生。

**【0104】** 觀察包括但不限於以下內容：皮膚和毛皮的變化；眼睛和黏膜；呼吸、循環、自主、中樞神經系統和行為模式。分別在給藥前（兩次），第一次給藥後 1 和 24 小時，以及在第 26 天給藥前和給藥後 1 和 24 小時，測量直腸溫度。每週測量體重。每天估算猴子的食物消耗量。使用便攜式裂隙燈（YZ2）和直接檢眼鏡（GFJY-01B）對猴子進行檢眼鏡檢查。

**【0105】 1.5. 實驗室測試**

對於猴子研究，在隔離期（兩次，第 01 天和第 02 天），第 14 天，第 28 天和第 56 天，測量了以下參數，如下表 20 所示。（1）使用 Bayer ADVIA2120（德國）和 Sysmex CA-1500（日本）進行血液和凝血指數檢查。（2）使用 HITACHI 7080 自動分析儀（日本）和 Easylyte PLUS 電解質分析儀（美國 MEDICA）評估血清生化檢查。（3）藉由每個籠子下面的託盤收集每隻動物的 24 小時合併尿液。使用 Uritest-300（中國）進行尿液分析。（4）藉由每個籠子下面的託盤收集每隻猴子的 24 小時彙集的糞便。檢測糞便潛血。（5）ACCESS 2 化學發光免疫分析法用於心肌肌鈣蛋白（TropI，非 GLP）測試。

【0106】表 20：在血液學，血清化學和尿液分析中評估的參數

血液學	血清化學	尿分析法	糞便
紅細胞計數(RBC)	丙胺酸胺基轉移酶 (ALT)	葡萄糖	潛血
血紅蛋白濃度 (HB)	天冬胺酸胺基轉移酶 (AST)	pH	
血細胞比容 (HCT)	鹼性磷酸酶 (ALP)	比重	
平均細胞容積 (MCV)	葡萄糖 (GLU)	蛋白質	
紅細胞平均血紅蛋白含量 (MCH)	總蛋白質 (TP)	膽紅素	
紅細胞平均血紅蛋白濃度(MCHC)	白蛋白 (ALB)	酮	
血小板 (PLT)	尿素氮 (BUN)	潛血	
白細胞總計數 (WBC)	肌酸酐 (CREA)	亞硝酸鹽	
淋巴細胞 (LYMPH)	甘油三酯 (TG)	中膽紅原	
單核細胞 (MONO)	總膽固醇 (CHOL)		
嗜酸細胞(EOS)	總膽紅素 (TBIL)		
嗜鹼粒細胞(BASO)	$\gamma$ -穀胺醯轉胺酶(GGT)		
中性白細胞 (NEUT)	鈣 (Ca)		
網狀細胞計數 (RETIC)	磷 (P)		
凝血酶原時間 (PT)	肌酸磷酸激酶(CPK)		
活化部分	$K^+$ 、 $Na^+$ 、 $Cl^-$		
促凝血酶原激酶時間 (APTT)			
	TropI		

## 【0107】 1.6.一般心電圖分析

在每個計劃的時間（給藥後第 1 天，給藥後第 01 天，第 02 天，給藥後第 1 天的第 1 和 24 小時，給藥前，以及給藥後第 26 天、第 56 天的第 1 小時，第 24 小時）進行一般 ECG 分析。ECG 系統使用派生 DII（ECG-6951E，中國上海）記錄 P 波、R 波、T 波、PR 間隔、Q-T 間隔、QRS 持續時間和心率。

## 【0108】 1.7. 屍檢和組織病理學

在暴露階段（第 28 天）和恢復階段（第 56 天）結束時，藉由目視檢查對所有動物進行完整的屍檢。修剪，稱重並評估以下選定器官的絕對重量以及最終體重或腦重的百分比：大腦、心臟、腎臟、腎臟、肝臟、脾臟、胸腺、睪丸、附睪、子宮、卵巢、腎上腺和甲狀腺（包括甲狀旁腺）。將以下組織保存在 10% 的中性福爾馬林中：腦、垂體、甲狀腺（包括甲狀旁腺）、氣管、心臟、胰腺、脾、腎上腺、前列腺、卵巢、子宮（包括子宮頸和輸卵管）、陰道、睪丸、附睪、精囊、食道、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、腸系膜淋巴結、淋巴集結、上頷下淋巴結、主動脈、眼睛、骨骼肌、坐骨神經、股骨（包括幹骺端）、乳腺、胸骨、唾液腺、脊髓、膀胱、肺（包括支氣管）、肝、腎、胃、骨髓（胸骨）、胸腺、胸骨、膽囊、任何明顯的病變或腫塊。屍檢時肺組織被固定劑感染。所有保存的組織均進行包埋、切片、蘇木精和曙紅（HE）染色，並進行顯微鏡檢查。塗片（猴胸骨）和成對包埋的胸骨切片均進行了骨髓細胞形態學檢查。

#### 【0109】 1.8. 毒物代謝動力學

在給藥後第 1 天和第 26 天的 0 小時、0.5 小時、1.5 小時、3 小時、5 小時、7 小時和 24 小時採集血樣。每次從靜脈中抽取約 1.0 mL 血液，並將其收集到 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝管中。將血樣放在冰上，然後在 4°C 下離心（3500 rpm，5 分鐘）獲得血漿樣品，將其冷凍在約 -80°C 下直至分析。式 I 化合物的毒物代謝動力學測定係在中國科學院上海藥物研究所進行的。

#### 【0110】 1.9. 統計分析

對於每種性別，使用統計軟件 SAS 9.3 對體重、直腸溫度、ECG、器官重量、血液學參數和血清生化數據進行分析。首先，使用 Levene 檢驗分析方差的均勻性。如果  $P > 0.05$ ，則採用單向方差分析。如果  $P < 0.05$ ，則使用 Kruskal -

Wallis 檢驗。如果所得的 ANOVA p 值 $<0.05$ ，則使用 Dunnett T 檢驗對每組進行比較。如果所得的 Kruskal-Wallis 檢驗 p 值 $<0.05$ ，則在數據秩轉換後執行 Dunnett T 檢驗。

## 【0111】 2. 結果

### 2.1. 臨床觀察

與對照組相比，高劑量組的體重增加量略有下降（雌性為  $2.7\pm 0.4$  對  $3.2\pm 0.2$ ；雄性為  $4.1\pm 0.5$  對  $4.6\pm 0.5$ ），無統計學意義。

【0112】 與給藥有關的早期死亡發生在第 23 天，一隻高劑量雌性發生，臨床體徵包括活動不足、駝背、體溫低下、腹瀉、輕度腸鼓膜和胸腺萎縮。在其他動物中沒有觀察到與治療相關的明顯臨床毒性跡象。

### 【0113】 2.2. 血液學與凝血

在所有接受治療的雌性和大劑量雄性中均觀察到 NEUT% 升高和 LYMPH% 降低。復觀察到中高劑量動物的 Fbg 升高，高劑量雌性動物的 APTT 升高（表 21）。

【0114】表 21：式 I 化合物處理 4 週的猴子的血液學數據。

組別	時間	WBC ( $\times 10^9 \cdot L^{-1}$ )	NEUT(%)	LYMPH(%)	APTT(sec)	Fbg( $g \cdot L^{-1}$ )
<b>雌性</b>						
0 mg/kg	d0	12.1 ± 1.9	34.6 ± 9.4	60.9 ± 8.8	16.2 ± 1.9	1.9 ± 0.4
	d14	14.3 ± 4.6	38.8 ± 12.0	55.6 ± 11.3	16.4 ± 1.7	2.2 ± 1.0
	d26	12.8 ± 2.7	36.7 ± 12.9	55.5 ± 11.8	19.1 ± 1.6	2.1 ± 1.1
	d56	13.6 ± 0.3	36.7 ± 10.0	55.2 ± 13.4	18.0 ± 0.6	2.7 ± 1.6
20mg/kg	d0	15.3 ± 3.6	42.5 ± 18.8	51.3 ± 18.0	16.7 ± 0.8	2.0 ± 0.3
	d14	16.0 ± 3.9	52.5 ± 10.4	40.8 ± 11.3	15.9 ± 1.0	2.9 ± 0.9
	d26	19.1 ± 4.0	61.4 ± 13.2**	33.1 ± 12.8*	18.3 ± 1.4	2.8 ± 0.9
	d56	12.4 ± 1.6	38.1 ± 7.1	53.1 ± 7.4	16.4 ± 1.1	1.7 ± 0.5
100 mg/kg	d0	10.9 ± 2.9	50.5 ± 17.3	44.0 ± 16.5	15.0 ± 1.6	1.9 ± 0.4
	d14	14.0 ± 4.0	59.5 ± 5.3*	33.2 ± 4.4*	14.5 ± 0.9*	2.5 ± 0.4
	d26	15.9 ± 6.2	63.2 ± 6.4**	30.0 ± 6.8**	19.7 ± 2.2	3.5 ± 0.8
	d56	9.9 ± 1.0	45.2 ± 2.3	48.7 ± 0.6	15.8 ± 1.5	2.1 ± 0.3
450 mg/kg	d0	14.4 ± 1.7	43.3 ± 12.3	51.8 ± 12.2	16.9 ± 1.4	1.8 ± 0.3
	d14	16.9 ± 7.8	63.5 ± 15.2**	30.1 ± 14.3**	18.6 ± 0.8*	3.9 ± 0.8*
	d26	18.1 ± 3.7	67.5 ± 9.2**	26.9 ± 8.9**	20.1 ± 3.1	4.2 ± 0.7**
	d56	14.0 ± 4.9	42.3 ± 0.6	53.3 ± 0.3	18.0 ± 3.5	1.4 ± 0.0
<b>雄性</b>						
0 mg/kg	d0	13.8 ± 4.2	48.3 ± 19.7	44.7 ± 19.6	17.2 ± 1.9	3.1 ± 1.7
	d14	15.3 ± 5.6	49.7 ± 9.0	43.2 ± 9.8	17.7 ± 1.6	3.0 ± 1.0
	d26	15.3 ± 5.3	48.5 ± 8.4	45.8 ± 7.5	19.5 ± 2.2	2.0 ± 0.3
	d56	12.1 ± 2.3	30.3 ± 12.3	62.1 ± 9.2	17.3 ± 1.2	1.8 ± 0.2
20 mg/kg	d0	13.4 ± 2.5	39.9 ± 14.6	55.3 ± 14.6	16.4 ± 1.1	2.1 ± 0.6
	d14	17.7 ± 9.3	43.1 ± 20.4	51.1 ± 19.6	17.8 ± 2.7	3.2 ± 0.8
	d26	13.8 ± 6.5	35.1 ± 12.4	59.5 ± 11.9	19.5 ± 2.4	2.2 ± 0.4
	d56	20.1 ± 4.2	38.5 ± 12.6	53.3 ± 14.3	21.3 ± 4.0	3.1 ± 1.4

100 mg/kg	d0	12.6±2.3	32.6±18.2	61.5±16.2	16.6±1.8	2.2±0.3
	d14	15.6±6.6	45.2±12.2	48.0±12.2	15.5±0.5	2.8±0.7
	d26	20.3±2.9	60.8±10.5	32.1±9.4	22.5±2.5	4.1±1.2**
	d56	14.1±0.2	42.5±11.2	52.7±9.0	17.7±1.0	1.7±0.3
450 mg/kg	d0	12.0±3.8	46.9±17.3	48.6±16.8	17.0±2.1	2.2±0.7
	d14	16.7±6.4	59.2±16.0	35.6±15.5	16.1±0.8	3.1±1.0
	d26	18.6±5.9	68.6±12.3*	26.5±12.0*	20.0±3.3	4.1±0.6**
	d56	14.6±0.8	36.7±23.2	59.8±22.8	19.9±0.3	1.8±0.0

\*p <0.05，與對照組相比，\*\* p <0.01，與對照組相比，值為平均值±S.D。

### 【0115】 2.3. 血清生化

雄性雌性高劑量食蟹猴的血清化學參數 CPK，BUN 和 CREA 均顯著增加，尤其係在第 23 天早期死亡的猴子中（第 14 天數據，BUN：34.99；CREA：526）。高劑量雄性的 CHOL 明顯降低。高劑量雄性的血清 Na 水平略有下降，但在第 26 天時有統計學意義。其他統計學上有意義的發現係單獨發生的事件，被認為沒有毒理學意義（表 22）。

【0116】表 22：式 I 化合物處理 4 週的猴子的血清化學成分

組別	天數	CPK (U·L <sup>-1</sup> )	BUN (mmol·L <sup>-1</sup> )	CREA (μmol·s <sup>-1</sup> ·L <sup>-1</sup> )	CHOL (mmol·L <sup>-1</sup> )	Na (mmol·L <sup>-1</sup> )	K (mmol·L <sup>-1</sup> )
<b>雌性</b>							
0 mg/kg	d0	188.4±83.4	6.2±1.3	57.4±4.9	3.3±1.1	150.4±2.3	4.7±0.3
	d14	180.0±91.3	5.5±1.0	57.8±4.8	3.2±1.2	149.3±3.3	5.4±0.4
	d26	147.4±42.2	5.6±0.6	51.0±5.5	3.1±0.8	148.3±1.8	5.0±0.5
	d56	135.5±34.6	6.3±0.6	49.0±4.2	2.4±0.4	147.5±1.6	4.3±0.1
20 mg/kg	d0	158.4±63.5	6.1±1.1	59.0±4.0	3.0±0.5	149.4±3.5	5.0±0.3
	d14	151.6±45.2	5.4±0.9	52.4±3.8	2.8±0.2	149.6±1.7	5.2±0.2
	d26	149.4±58.7	6.3±1.1	51.2±3.6	2.7±0.3	149.2±4.3	4.9±0.5
100 mg/kg	d56	129.0±5.7	6.0±0.6	51.5±4.9	3.0±0.1	147.2±4.2	5.0±0.5
	d0	187.6±75.0	5.9±1.1	55.2±4.7	3.8±1.3	149.4±1.9	4.5±0.4
	d14	247.2±89.5	6.4±0.8	55.2±3.8	2.9±0.6	149.8±3.7	4.7±0.5*
450 mg/kg	d26	195.0±96.8	6.4±1.6	51.2±3.6	3.1±0.5	149.6±3.8	4.8±0.6
	d56	112.0±12.7	5.2±0.2	54.5±4.9	3.6±0.2	147.9±1.3	4.2±0.2
	d0	163.2±56.2	6.1±0.7	54.4±7.1	3.3±0.4	150.1±2.2	5.1±0.5
450 mg/kg	d14	815.2±1316.0	14.3±11.8	162.0±204.0	2.4±0.9	144.6±3.5	5.5±0.2
	d26	328.5±259.1	9.7±1.0**	64.3±7.1*	2.0±0.7	145.0±2.6	5.3±0.4
	d56	290.0±176.8	5.6±0.6	57.0±2.8	3.1±0.3	145.7±0.9	4.8±0.2
<b>雄性</b>							
0 mg/kg	d0	137.2±56.1	5.6±0.9	63.6±4.3	3.1±0.4	150.3±3.2	4.9±0.5
	d14	152.0±54.9	5.2±1.0	59.4±5.4	3.2±0.3	150.5±3.2	5.1±0.3
	d26	176.4±91.1	5.7±0.7	59.4±3.0	2.9±0.4	149.0±2.0	4.7±0.2
	d56	343.5±352.8	5.8±0.1	60.0±1.4	2.9±0.2	147.3±3.2	4.6±0.0
20mg/kg	d0	156.6±76.3	5.1±0.9	64.2±7.2	2.9±0.5	148.7±2.0	5.1±0.3
	d14	128.2±50.8	4.8±0.5	65.0±4.3	2.6±0.4	148.7±1.6	4.6±0.3
	d26	154.4±21.5	5.6±0.3	64.0±5.5	2.7±0.5	147.9±1.9	5.4±0.9
100 mg/kg	d56	161.0±87.7	5.2±0.4	64.0±5.7	2.6±0.1	144.6±1.6	5.3±1.1
	d0	161.4±12.3	5.7±0.5	66.6±8.6	3.6±0.4	149.1±2.9	4.8±0.4
	d14	213.4±67.1	6.1±1.5	63.0±4.1	3.0±0.6	148.3±2.5	4.8±0.4
450 mg/kg	d26	179.8±42.1	5.9±1.0	63.0±8.5	2.8±0.3	147.1±2.4	5.2±0.2
	d56	109.0±9.9	5.7±1.5	58.5±3.5	2.8±0.6	146.5±0.7	4.2±0.0
	d0	140.4±44.6	5.3±0.6	68.6±5.1	3.4±0.5	148.4±2.5	5.2±0.8
450 mg/kg	d14	290.2±120.0*	11.3±6.7*	115.8±74.4	1.8±0.3**	146.4±3.3	5.0±0.2
	d26	133.6±44.6	10.4±3.1**	79.0±2.8**	1.7±0.3**	144.3±2.2**	5.2±0.2
	d56	99.5±7.8	5.1±0.0	66.5±3.5	2.8±0.3	145.3±1.1	4.8±0.8

\*p < 0.05，與對照組相比，\*\* p < 0.01，與對照組相比，值為平均值±S.D。

**【0117】 2.4.尿液分析**

在雄性或雌性猴子中檢查的任何尿液分析參數均未報告有明顯變化。

**【0118】 2.5. ECG 參數**

一隻中劑量雌性在給藥後第 26 天的 1 小時觀察到 QTc 間隔延長（動物 # 303 為 296 ms）。一隻高劑量雄性在給藥後第 26 天的 1 小時觀察到竇性心律不齊，QRS 間隔延長（動物 # 411 為 60 ms）高劑量雌性在服藥後第 1 天和第 26 天的 1 小時和也觀察到 QRS 間隔延長（表 23）。

【0119】表 23：式 I 化合物處理 4 週的猴子的心電圖數據

組別	天數	HR (bpm)	QRS (ms)	QT (ms)	QTc (ms)	
<b>雌性</b>						
0 mg/kg	d0	187.2 ± 39.6	32.0 ± 4.5	168.0 ± 19.2	243.1 ± 15.5	
	1h(d1)	244.4 ± 55.0	32.0 ± 4.5	154.0 ± 11.4	243.6 ± 12.1	
	24h(d1)	216.7 ± 18.3	32.0 ± 4.5	166.0 ± 15.2	254.4 ± 22.8	
	1h(d26)	259.2 ± 13.4	30.0 ± 0.0	142.0 ± 17.9	230.8 ± 25.7	
	24h(d26)	256.3 ± 10.7	30.0 ± 0.0	148.0 ± 8.4	240.0 ± 11.0	
	d56	222.8 ± 16.3	25.0 ± 7.1	170.0 ± 14.1	262.9 ± 15.5	
	20 mg/kg	d0	185.7 ± 48.0	34.0 ± 5.5	170.0 ± 20.0	244.6 ± 14.3
		1h(d1)	230.1 ± 20.5	38.0 ± 4.5	160.0 ± 7.1	250.2 ± 10.4
		24h(d1)	209.8 ± 9.3	34.0 ± 8.9	158.0 ± 4.5	239.7 ± 5.4
		1h(d26)	262.8 ± 13.5	36.0 ± 5.5	140.0 ± 7.1	228.9 ± 8.0
		24h(d26)	245.4 ± 43.9	36.0 ± 5.5	150.0 ± 10.0	238.6 ± 14.1
		d56	238.0 ± 29.2	40.0 ± 0.0	160.0 ± 0.0	253.1 ± 10.4
	100 mg/kg	d0	182.3 ± 28.9	32.0 ± 4.5	170.0 ± 12.2	245.0 ± 9.2
		1h(d1)	228.5 ± 12.8	36.0 ± 5.5	160.0 ± 7.1	249.6 ± 6.7
		24h(d1)	217.6 ± 22.7	34.0 ± 5.5	162.0 ± 11.0	248.2 ± 7.7
		1h(d26)	246.4 ± 40.7	38.0 ± 4.5	170.0 ± 10.0*	271.1 ± 17.2**
		24h(d26)	256.1 ± 17.1	38.0 ± 4.5	148.0 ± 8.4	239.8 ± 10.5
		d56	230.8 ± 5.0	30.0 ± 0.0	160.0 ± 0.0	250.7 ± 1.8
450 mg/kg	d0	174.1 ± 28.8	32.0 ± 4.5	168.0 ± 16.4	238.1 ± 12.7	
	1h(d1)	211.3 ± 20.5	50.0 ± 14.1**	175.0 ± 17.3	265.5 ± 19.9	
	24h(d1)	211.3 ± 2.4	35.0 ± 5.8	162.5 ± 9.6	247.2 ± 13.8	
	1h(d26)	262.7 ± 15.4	40.0 ± 0.2**	140.0 ± 8.2	229.0 ± 14.6	
	24h(d26)	257.8 ± 9.0	32.5 ± 5.0	152.5 ± 9.6	247.8 ± 14.4	
	d56	207.4 ± 28.1	25.0 ± 7.1	170.0 ± 14.1	256.3 ± 9.7	
<b>雄性</b>						
0 mg/kg	d0	214.3 ± 12.6	36.0 ± 8.9	166.0 ± 8.9	253.7 ± 15.6	
	1h(d1)	248.4 ± 16.7	36.0 ± 5.5	152.0 ± 4.5	243.9 ± 6.6	
	24h(d1)	208.5 ± 18.5	34.0 ± 5.5	170.0 ± 14.1	256.9 ± 15.8	

	1h(d26)	253.9 ± 12.1	32.0 ± 4.5	148.0 ± 8.4	239.2 ± 10.5
	24h(d26)	232.1 ± 43.2	38.0 ± 8.4	156.0 ± 8.9	243.3 ± 8.7
	d56	194.5 ± 19.5	40.0 ± 0.0	180.0 ± 0.0	266.3 ± 8.9
20 mg/kg	d0	198.4 ± 16.5	34.0 ± 8.9	164.0 ± 11.4	243.9 ± 11.7
	1h(d1)	216.0 ± 27.0	32.0 ± 4.5	158.0 ± 11.0	241.4 ± 12.3
	24h(d1)	206.1 ± 20.7	28.0 ± 4.5	166.0 ± 8.9	250.0 ± 10.4
	1h(d26)	260.0 ± 12.4	36.0 ± 5.5	146.0 ± 11.4	237.8 ± 16.3
	24h(d26)	264.9 ± 16.1	34.0 ± 5.5	146.0 ± 11.4	239.2 ± 14.8
	d56	225.6 ± 2.4	30.0 ± 0.0	145.0 ± 7.1	225.4 ± 10.2
100 mg/kg	d0	215.4 ± 11.2	32.0 ± 8.4	154.0 ± 16.7	235.6 ± 24.5
	1h(d1)	230.0 ± 19.9	38.0 ± 4.5	156.0 ± 11.4	243.8 ± 16.5
	24h(d1)	208.2 ± 10.4	36.0 ± 8.9	162.0 ± 11.0	245.3 ± 18.6
	1h(d26)	256.9 ± 16.7	36.0 ± 5.5	144.0 ± 5.5	233.8 ± 12.2
	24h(d26)	260.7 ± 9.1	36.0 ± 5.5	144.0 ± 8.9	234.9 ± 13.9
	d56	225.6 ± 2.4	35.0 ± 7.1	165.0 ± 7.1	256.6 ± 11.9
450 mg/kg	d0	214.3 ± 17.7	34.0 ± 5.5	156.0 ± 5.5	238.2 ± 7.2
	1h(d1)	217.4 ± 3.2	36.7 ± 5.8	170.0 ± 10.0	261.1 ± 16.0
	24h(d1)	211.0 ± 15.9	32.0 ± 4.5	166.0 ± 8.9	252.1 ± 9.4
	1h(d26)	247.6 ± 22.6	36.0 ± 13.4	150.0 ± 17.3	240.0 ± 23.7
	24h(d26)	210.4 ± 49.9	38.0 ± 4.5	158.0 ± 13.0	237.7 ± 12.2
	d56	203.3 ± 15.5	35.0 ± 7.1	160.0 ± 0.0	240.2 ± 6.1

\*p < 0.05，與對照組相比，\*\* p < 0.01，與對照組相比，值為平均值±S.D。

## 【0120】 2.6. 屍檢

### 2.6.1. 總體病理和器官重量

沒有猴子的宏觀發現被認為與服用測試物質有關，但對於較早死亡的猴子而言，輕度的腸鼓膜和胸腺萎縮除外。高劑量猴子的肝臟和腎臟相對重量較高，胸腺相對重量較低，子宮的絕對或相對重量較低（表 24）。

【0121】 表 24：式 I 化合物處理 4 週的食蟹猴的器官重量。

組別	時間	絕對重量(g)			
		肝	腎	胸腺	子宮
<b>雌性</b>					
0 mg/kg	d28	58.43±5.40	12.17±1.46	1.60±0.46	8.33±0.51
	d56	69.80±6.51	14.55±0.64	1.95±2.05	6.05±2.76
20 mg/kg	d28	58.37±7.38	12.20±2.23	1.23±0.40	5.97±1.20
	d56	68.35±3.32	13.75±0.78	2.00±0.71	11.30±3.25
100 mg/kg	d28	57.60±4.25	11.67±0.71	0.73±0.50	7.03±0.94
	d56	68.45±20.01	14.15±2.33	2.35±0.49	8.30±3.39
450 mg/kg	d28	69.40±3.68	12.95±0.07	0.50±0.14	3.50±0.14**
	d56	72.40±11.74	14.75±1.91	1.40±0.14	9.60±2.40
<b>雄性</b>					
0 mg/kg	d28	74.10±3.60	15.80±2.55	1.47±0.83	
	d56	82.90±16.40	19.15±0.49	1.75±0.92	
20 mg/kg	d28	69.03±2.87	14.30±1.42	1.10±0.20	
	d56	71.25±1.77	16.40±3.11	2.95±0.07	
100 mg/kg	d28	72.93±14.69	15.13±3.62	1.57±0.90	
	d56	84.75±5.59	17.85±1.91	2.45±0.35	
450 mg/kg	d28	94.37±12.72	16.77±2.31	0.90±0.10	
	d56	80.90±4.95	18.75±0.21	2.20±0.42	
<b>雌性</b>					
<b>相對重量 (體重)</b>					
0 mg/kg	d28	1.83±0.22	0.38±0.023	0.05±0.01	0.26±0.03

	d56	2.12±0.08	0.45±0.08	0.06±0.05	0.18±0.06
20 mg/kg	d28	2.06±0.22	0.43±0.07	0.04±0.01	0.21±0.04
	d56	2.01±0.07	0.41±0.06	0.06±0.02	0.33±0.07
100 mg/kg	d28	1.96±0.13	0.40±0.02	0.02±0.02	0.24±0.03
	d56	1.86±0.37	0.39±0.03	0.07±0.02	0.23±0.12
450 mg/kg	d28	2.78±0.31**	0.52±0.03*	0.02±0.01	0.14±0.01*
	d56	2.04±0.05	0.42±0.00	0.04±0.01	0.27±0.03

**雄性**

0 mg/kg	d28	1.77±0.15	0.38±0.04	0.03±0.02	
	d56	1.60±0.25	0.37±0.01	0.03±0.02	
20 mg/kg	d28	1.82±0.21	0.37±0.02	0.03±0.01	
	d56	1.44±0.02	0.33±0.06	0.06±0.00	
100 mg/kg	d28	1.83±0.25	0.37±0.06	0.04±0.03	
	d56	1.76±0.06	0.37±0.03	0.05±0.01	
450 mg/kg	d28	2.42±0.20*	0.43±0.03	0.02±0.01	
	d56	1.64±0.22	0.38±0.02	0.04±0.01	

**雌性****相對重量 (/腦重量)**

0 mg/kg	d28	97.71±14.77	20.21±1.89	2.66±0.74	13.93±1.90
	d56	108.79±9.78	22.68±1.07	3.03±3.19	9.42±4.27
20 mg/kg	d28	90.10±7.72	18.73±1.74	1.87±0.46	9.19±1.57
	d56	104.00±10.62	20.86±0.06	3.07±1.24	17.30±5.86
100 mg/kg	d28	96.55±7.51	19.61±1.86	1.18±0.73	11.84±2.02
	d56	104.90±37.06	21.60±4.92	3.54±0.52	12.44±4.34
450 mg/kg	d28	112.03±12.42	20.87±1.10	0.81±0.27*	5.63±0.10**

	d56	109.03±13.64	22.23±2.05	2.12±0.29	14.43±3.09
<b>雄性</b>					
0 mg/kg	d28	101.35±5.42	21.65±3.87	2.02±1.18	
	d56	111.94±22.78	25.85±0.82	2.36±1.23	
20 mg/kg	d28	103.68±11.79	21.46±2.99	1.67±0.43	
	d56	100.96±1.74	23.16±3.43	4.18±0.08	
100 mg/kg	d28	100.31±9.48	20.85±3.95	2.27±1.44	
	d56	115.98±8.59	24.36±0.80	3.33±0.02	
450 mg/kg	d28	135.54±14.14*	24.07±2.45	1.30±0.20	
	d56	119.80±2.56	27.81±1.42	3.25±0.50	

\*p < 0.05，與對照組相比，\*\* p < 0.01，與對照組相比，值為平均值±S.D。

### 【0122】 2.7. 毒物代謝動力學

在 20-450mg/kg 劑量範圍內全身暴露量(由化合物原型和主要代謝物的血漿 AUC<sub>0-24h</sub> 和 C<sub>max</sub> 表示) 的增加比例比劑量的增加比例大得多。連續 28 天給藥後，未見積累。

### 【0123】 實施例 3：非臨床藥物代謝動力學

#### 【0124】 1. 材料和方法

##### 1.1. 材料

式 I 化合物按照 CN103562191B 中的方法製備並確認結構。

#### 【0125】 1.2. 動物

食蟹猴 (3/性別/組：體重 3-5 公斤，年齡 5-6 歲) 來自蘇州西山中科實驗動物 (中國上海)。研究前將動物馴化 7 天。將猴子單獨關進籠子，放在可控溫度 (18–26°C) 和濕度 (50±20%) 的動物房中，空氣流量為 10，每小時換新鮮空氣。光照週期為 12 小時開和 12 小時關，每天早晨給猴子喂一次飼料和水。所有動物實驗均按照 AMMS 動物護理和使用委員會制定的《動物護理和使用指南》進行。

### 【0126】 2. 式 I 化合物的靜脈和口服給藥

將式 I 化合物靜脈或口服給予禁食過夜的食蟹猴。劑量分別為 1 mg/kg (靜脈)，1 mg/kg，3 mg/kg，9 mg/kg (口服)。在給藥後 0，5 和 15 分鐘時，分別在 0.25、0.5、1、2、4、6、8、12 和 24 小時從靜脈採集血液樣本 (每個時間點 0.2 mL)。採集後，將所有血樣立即以 10,000×g 離心 5 分鐘，並將血漿保存在 -75±10°C 直至分析。藉由蛋白質沉澱製備血漿樣品。血漿中將式 I 化合物的濃度藉由驗證的液相層析-串聯質譜法測定。

【0127】 藥物代謝動力學參數，例如血漿濃度-時間曲線下面積 (AUC)、最大血漿濃度 ( $C_{max}$ )、達到  $C_{max}$  的時間 ( $T_{max}$ )、半衰期 ( $T_{1/2}$ )、全身血漿清除率 (CL)、平均停留時間 (MRT) 和穩態時的分佈體積 ( $V_{ss}$ ) 係藉由 WinNonlin v1.3 (美國加利福尼亞州山景市的 Pharsight) 藉由非房室分析計算得出的。對於異速生長模型，動物的藥物代謝動力學數據係藉由兩室模型和 Kinetica 5.1 軟件包 (v.3.0；InnaPhase，費城，賓夕法尼亞州，美國) 來模擬的。

### 【0128】 3. 結果

#### 血漿藥物代謝動力學和生物利用度

【0129】 表 25 和圖 2 顯示了在食蟹猴靜脈和口服給藥後的藥物代謝動力學數據。靜脈注射後，藥物濃度雙指數下降，清除率為 1.96 L/h/kg，猴子的分佈

體積為 1.86 L/kg。口服後，式 I 化合物在 1.0 至 1.30 h 達到  $C_{max}$ ，在血漿中的  $T_{1/2}$  消失為 2.73 至 5.99 h。從靜脈內和口服給藥後的  $AUC_{0-24h}$  計算得出，式 I 化合物在猴子中的口服生物利用度為 3.3 至 11.3%，這表明關於外排轉運蛋白。

表 25：

物種	劑量 mg/kg	途 徑	CL L/h/kg	V <sub>ss</sub> L/kg	MRT h	t <sub>1/2</sub> h	C <sub>max</sub> ng/ml	T <sub>max</sub> h	AUC <sub>tot</sub> , ng*h/ml	CL/F L/h/kg	V <sub>ss</sub> /F L/kg	F (%)
猴子	1	<i>iv</i>	1.96	1.86	0.97	2.73	466	-	421	-	-	-
	1	<i>po</i>	-	-	4.32	2.90	3.99	1.0	11.8	84.8	366	3.3
	3	<i>po</i>	-	-	3.46	3.68	42.2	1.3	99.4	30.2	104	8.0
	9	<i>po</i>	-	-	2.62	5.99	263	1.0	426	21.2	55.5	11.3

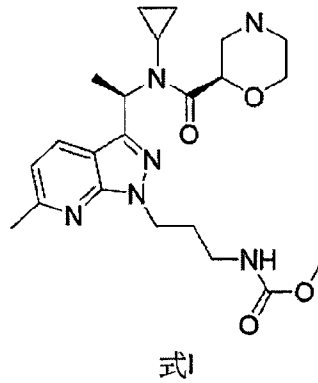
*iv* 後的 CL 清除率，*iv* 後穩態下的 V<sub>ss</sub> 分佈體積，MRT 平均停留時間，T<sub>1/2</sub> 半衰期，C<sub>max</sub> 最大血漿濃度，達到 C<sub>max</sub> 的 T<sub>max</sub> 時間，AUC<sub>tot</sub> 血漿濃度-時間曲線下的總面積，CL/F 口服後清除率，V<sub>ss</sub>/F 口服後在穩態下的分佈體積，F 口服絕對生物利用度，*iv* 靜脈內靜脈注射，*po* 口服。

## 【符號說明】

無。

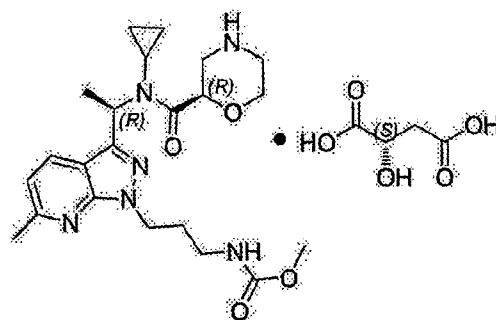
## 【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種由下式 I 所示的含氮的飽和雜環化合物或其藥學上可接受的鹽在製備治療和/或預防慢性腎功能不全合併慢性心力衰竭之藥物的應用：



【請求項2】 如請求項 1 所述的應用，其中，該藥學上可接受的鹽為鹽酸鹽、硫酸鹽、磷酸鹽、氫溴酸鹽、富馬酸鹽、草酸鹽、檸檬酸鹽、甲磺酸鹽、苯磺酸鹽、對甲苯磺酸鹽、馬來酸鹽、蘋果酸鹽、酒石酸鹽、醋酸鹽或萘二磺酸鹽。

【請求項3】 如請求項 1 或 2 所述的應用，其中，該藥學上可接受的鹽為式 I 化合物的蘋果酸鹽，其係式 I 化合物和蘋果酸以 1：1 莫耳比形成的化合物，其結構式如下：



【請求項4】 如請求項 3 所述的應用，其中，該蘋果酸鹽為結晶體，其 X 射線粉末衍射圖譜在  $2\theta$  為  $7.767^\circ \pm 0.2^\circ$ 、 $13.897^\circ \pm 0.2^\circ$ 、 $14.775^\circ \pm 0.2^\circ$ 、 $17.098^\circ \pm 0.2^\circ$ 、

18.999°±0.2°、20.153±0.2°、20.960°±0.2°、21.423°±0.2°、26.348°±0.2°、27.892°±0.2°

處具有特徵峰。

【請求項5】如請求項4所述的應用，其中，該蘋果酸鹽結晶體的X射線粉末衍射圖譜復在 $2\theta$ 為5.598°±0.2°、7.357°±0.2°、10.395°±0.2°、11.108°±0.2°、16.037°±0.2°、16.523°±0.2°、19.410°±0.2°、22.645°±0.2°、26.630°±0.2°、26.891°±0.2°、27.380°±0.2°、31.056°±0.2°、33.306°±0.2°、33.775°±0.2°、39.231°±0.2°處具有特徵峰。

【請求項6】如請求項5所述的應用，其中，該式I化合物的蘋果酸鹽結晶體具有如圖1所示的X射線粉末衍射圖譜。

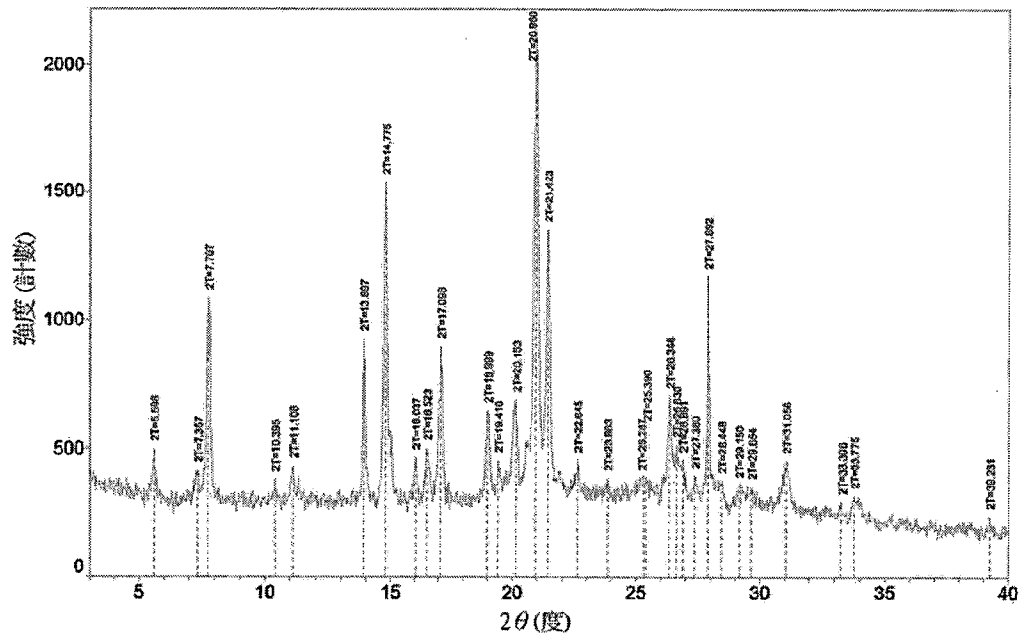
【請求項7】如請求項1或2所述的應用，其中，該藥物的劑型包括片劑、膠囊劑、靜脈注射劑、吸入劑、霧化劑、凍乾劑、貼劑、凝膠劑、噴霧劑或栓劑。

【請求項8】如請求項1或2所述的應用，其中，該藥物為單元劑量。

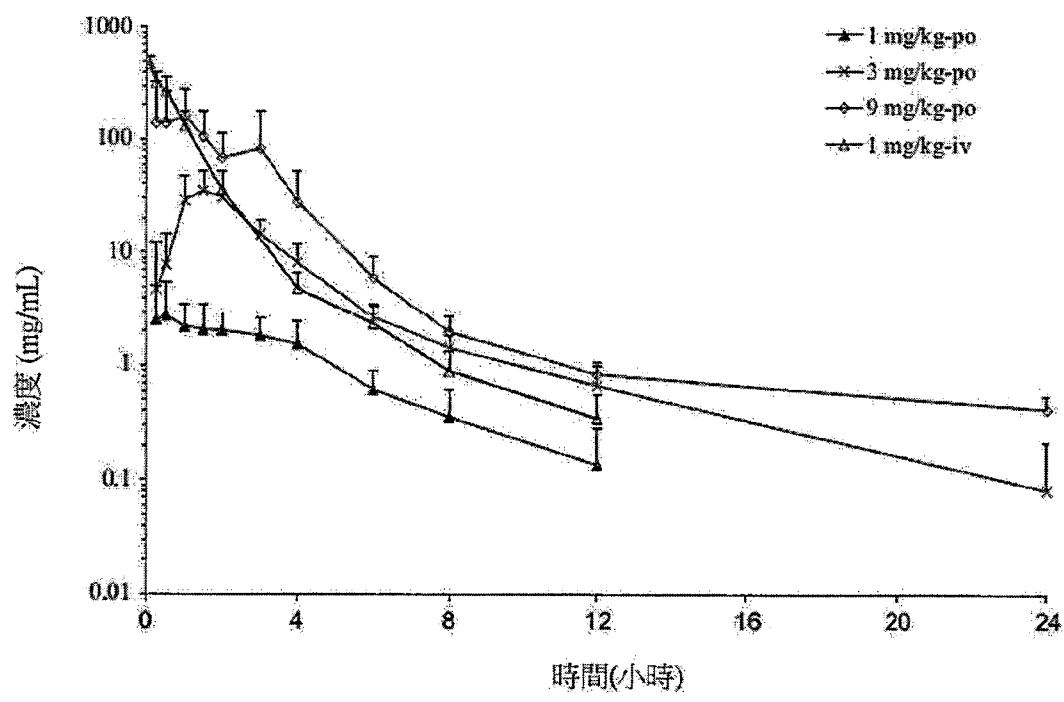
【請求項9】如請求項8所述的應用，其中，該單元劑量中，含有25 mg至200 mg的由式I所示的含氮的飽和雜環化合物或其藥學上可接受的鹽。

【請求項10】如請求項8所述的應用，其中，該單元劑量中，含有25 mg、50 mg、100 mg、150 mg或200 mg的由式I所示的含氮的飽和雜環化合物或其藥學上可接受的鹽。

【發明圖式】



【圖1】



【圖2】