

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
A61K 9/127
A61K 31/513



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01813943.4

[43] 公开日 2003 年 10 月 1 日

[11] 公开号 CN 1446080A

[22] 申请日 2001.6.6 [21] 申请号 01813943.4
[30] 优先权
[32] 2000. 6. 9 [33] US [31] 60/210,592
[86] 国际申请 PCT/US01/18224 2001.6.6
[87] 国际公布 WO01/95884 英 2001.12.20
[85] 进入国家阶段日期 2003.2.9
[71] 申请人 OSI 药物公司
地址 美国纽约
[72] 发明人 克劳丁·S·阿什瓦尔 章苏明
戴维·L·埃默森 胡 宁
杰勒德·M·詹森

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公
司
代理人 程金山

权利要求书 6 页 说明书 54 页 附图 5 页

[54] 发明名称 脂质体苯并喹唑啉胸苷酸合成酶抑制
剂制剂

[57] 摘要

提供了脂质体封装的苯并喹唑啉胸苷酸合成酶抑制
剂制剂。与游离药物相比，脂质体作为抗肿瘤
制剂具有改良的药物动力学和增强的功效。所述制
剂包括脂质体，其包含至少一种磷脂酰胆碱，胆甾
醇，和苯并喹唑啉胸苷酸合成酶抑制剂。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种脂质体，其包含至少一种磷脂酰胆碱、胆甾醇和苯并噻唑啉胸苷酸合成酶抑制剂。
5
2. 权利要求的脂质体，其中所述磷脂酰胆碱选自二硬脂酰磷脂酰胆碱，氢化大豆磷脂酰胆碱，大豆磷脂酰胆碱，卵磷脂酰胆碱，氢化卵磷脂酰胆碱，二棕榈酰磷脂酰胆碱，二油酰磷脂酰胆碱，二反油酰磷脂酰胆碱，和二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱。
- 10 3. 权利要求2的脂质体，其中所述磷脂酰胆碱是氢化大豆磷脂酰胆碱。
4. 权利要求2的脂质体，其中所述磷脂酰胆碱是大豆磷脂酰胆碱。
5. 权利要求2的脂质体，其中所述磷脂酰胆碱是二油酰磷脂酰胆碱。
6. 权利要求2的脂质体，其中所述磷脂酰胆碱是二反油酰磷脂酰胆碱。
7. 权利要求2的脂质体，其中所述脂质体进一步包含磷脂酰甘油。
- 15 8. 权利要求3的脂质体，其中所述苯并噻唑啉胸苷酸合成酶抑制剂是GW1843。
9. 权利要求4的脂质体，其中所述苯并噻唑啉胸苷酸合成酶抑制剂是GW1843。
10. 权利要求5的脂质体，其中所述苯并噻唑啉胸苷酸合成酶抑制剂是
20 GW1843。
11. 权利要求6的脂质体，其中所述苯并噻唑啉胸苷酸合成酶抑制剂是GW1843。
12. 权利要求7的脂质体，其中所述苯并噻唑啉胸苷酸合成酶抑制剂是GW1843。
- 25 13. 权利要求12的脂质体，其中所述氢化大豆磷脂酰胆碱、胆甾醇和磷脂酰甘油处于约2:1:0.1的摩尔比。
14. 权利要求8的脂质体，其中氢化大豆磷脂酰胆碱对胆甾醇的摩尔比约为5:1-2:1.5。

15. 权利要求14的脂质体，其中所述摩尔比是约2:1。
16. 权利要求14的脂质体，其中所述摩尔比是约4:1。
17. 权利要求15的脂质体，其中所述脂质体是单层并且小于100nm。
18. 权利要求17的脂质体，其中所述的氢化大豆磷脂酰胆碱对GW1843的摩尔比是约5:1-75:1。
19. 权利要求9的脂质体，其中所述摩尔比是约2:1。
20. 权利要求10的脂质体，其中所述摩尔比是约2:1。
21. 权利要求11的脂质体，其中所述摩尔比是约2:1。
22. 权利要求17的脂质体，其中所述氢化大豆磷脂酰胆碱对GW1843的摩尔比约为8:1-20:1。
23. 一种脂质体，其包含封装于脂质体中的苯并噻唑啉胸苷酸合成酶抑制剂（BTSI），其中所述脂质体由氢化大豆磷脂酰胆碱（HSPC）和胆甾醇组成，并且其中HSPC:胆甾醇的摩尔比是约2:1，其中HSPC:BTSI摩尔比为8:1-20:1，其中所述脂质体是具有小于100nm尺寸的单层。
24. 权利要求23的脂质体，其中所述BTSI是GW1843。
25. 一种用包括下述步骤的方法生产的权利要求1的组合物：
- a) 形成由磷脂酰胆碱和胆甾醇组成的类脂膜或粉末；
 - b) 用水溶液水合所述类脂膜或粉末，所述水溶液包含苯并噻唑啉胸苷酸合成酶抑制剂（BTSI）；
 - c) 提供能量从而获得脂质体，所述脂质体是单层并且小于100nm；
 - d) 对水溶液交叉-过滤以除去未封装的BTSI，从而获得包含BTSI的脂质体。
26. 权利要求25的组合物，其中所述磷脂酰胆碱选自二硬脂酰磷脂酰胆碱，氢化大豆磷脂酰胆碱，大豆磷脂酰胆碱，卵磷脂酰胆碱，氢化卵磷脂酰胆碱，二棕榈酰磷脂酰胆碱，二油酰磷脂酰胆碱，二反油酰磷脂酰胆碱，和二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱。
27. 权利要求26的组合物，其中所述磷脂酰胆碱是氢化大豆磷脂酰胆碱。
28. 权利要求26的组合物，其中所述磷脂酰胆碱是大豆磷脂酰胆碱。

29. 权利要求26的组合物, 其中所述磷脂酰胆碱是二油酰磷脂酰胆碱。
30. 权利要求26的组合物, 其中所述磷脂酰胆碱是二反油酰磷脂酰胆碱。
31. 权利要求26的组合物, 其中所述脂质体进一步包含磷脂酰甘油。
32. 权利要求25的组合物, 其中所述能量是通过均化器提供的。
- 5 33. 权利要求27的组合物, 其中所述BT SI是GW1843。
34. 权利要求28的组合物, 其中所述BT SI是GW1843。
35. 权利要求29的组合物, 其中所述BT SI是GW1843。
36. 权利要求30的组合物, 其中所述BT SI是GW1843。
37. 权利要求31的组合物, 其中所述BT SI是GW1843。
- 10 38. 权利要求27的组合物, 其中氢化大豆磷脂酰胆碱对胆甾醇的摩尔比是约5:1-2:1.5。
39. 权利要求38的组合物, 其中所述摩尔比是约2:1。
40. 权利要求38的组合物, 其中所述摩尔比是约4:1。
41. 权利要求39的组合物, 其中所述脂质体是单层并且小于100nm。
- 15 42. 权利要求41的组合物, 其中所述氢化大豆磷脂酰胆碱对GW1843的摩尔比是约5:1-75:1。
43. 权利要求42的组合物, 其中所述氢化大豆磷脂酰胆碱与GW1843的摩尔比是约8:1-20:1。
44. 权利要求25的组合物, 其中所述BT SI是GW1843, 其中所述磷脂酰胆碱是氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC), 其中所述HSPC:胆甾醇的摩尔比约为2:1, 其中HSPC:BT SI的摩尔比是8:1-20:1。
- 20 45. 一种制备包含苯并喹唑啉胸苷酸合成酶抑制剂(BT SI)的方法, 所述方法包括:
- a) 形成由磷脂酰胆碱和胆甾醇组成的类脂膜或粉末;
- 25 b) 用水溶液水合所述类脂膜或粉末, 所述水溶液包含BT SI;
- c) 提供能量从而获得脂质体, 所述脂质体是单层并且小于100nm;
- d) 对水溶液交叉-过滤以去除未封装的BT SI, 从而获得包含BT SI的脂质体。

46. 权利要求45的方法，其中所述磷脂酰胆碱选自二硬脂酰磷脂酰胆碱，氢化大豆磷脂酰胆碱，大豆磷脂酰胆碱，卵磷脂酰胆碱，氢化卵磷脂酰胆碱，二棕榈酰磷脂酰胆碱，二油酰磷脂酰胆碱，二反油酰磷脂酰胆碱，和二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱。
- 5 47. 权利要求46的方法，其中所述磷脂酰胆碱是氢化大豆磷脂酰胆碱。
48. 权利要求46的方法，其中所述磷脂酰胆碱是大豆磷脂酰胆碱。
49. 权利要求46的方法，其中所述磷脂酰胆碱是二油酰磷脂酰胆碱。
50. 权利要求46的方法，其中所述磷脂酰胆碱是二反油酰磷脂酰胆碱。
51. 权利要求46的方法，其中所述脂质体进一步包含磷脂酰甘油。
- 10 52. 权利要求45的方法，其中所述能量是通过均化器提供的。
53. 权利要求47的方法，其中所述BTSI是GW1843。
54. 权利要求48的方法，其中所述BTSI是GW1843。
55. 权利要求49的方法，其中所述BTSI是GW1843。
56. 权利要求50的方法，其中所述BTSI是GW1843。
- 15 57. 权利要求51的方法，其中所述BTSI是GW1843。
58. 权利要求47的方法，其中氢化大豆磷脂酰胆碱与胆甾醇的摩尔比是约5:1-2:1.5。
59. 权利要求58的方法，其中所述摩尔比是约2:1。
60. 权利要求58的方法，其中所述摩尔比是约4:1。
- 20 61. 权利要求59的方法，其中所述脂质体是单层并且小于100nm。
62. 权利要求61的方法，其中所述氢化大豆磷脂酰胆碱与GW1843的摩尔比是约5:1-75:1。
63. 权利要求62的方法，其中所述氢化大豆磷脂酰胆碱与GW1843的摩尔比是约8:1-20:1。
- 25 64. 权利要求45的方法，其中所述BTSI是GW1843，其中所述磷脂酰胆碱是氢化大豆磷脂酰胆碱（HSPC），其中所述HSPC:胆甾醇的摩尔比是约2:1，其中HSPC:BTSI摩尔比是8:1-20:1。
65. 一种抑制肿瘤生长的方法，其包括对肿瘤给药治疗或有效量的权利要

求1的组合物。

66. 权利要求65的方法，其中所述肿瘤是耐药的或药物敏感的。

67. 权利要求65的方法，其中所述肿瘤是癌症，所述癌症选自卵巢癌，肺癌，结肠直肠癌，乳腺癌，头和颈癌，前列腺癌，子宫癌，成胶质细胞瘤
5 和肉瘤。

68. 权利要求67的方法，其中所述磷脂酰胆碱选自二硬脂酰磷脂酰胆碱，氢化大豆磷脂酰胆碱，大豆磷脂酰胆碱，卵磷脂酰胆碱，氢化卵磷脂酰胆碱，二棕榈酰磷脂酰胆碱，二油酰磷脂酰胆碱，二反油酰磷脂酰胆碱，和二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱。

10 69. 权利要求68的方法，其中所述磷脂酰胆碱是氢化大豆磷脂酰胆碱。

70. 权利要求68的方法，其中所述磷脂酰胆碱是大豆磷脂酰胆碱。

71. 权利要求68的方法，其中所述磷脂酰胆碱是二油酰磷脂酰胆碱。

72. 权利要求68的方法，其中所述磷脂酰胆碱是二反油酰磷脂酰胆碱。

73. 权利要求68的方法，其中所述脂质体进一步包含磷脂酰甘油。

15 74. 权利要求69的方法，其中所述苯并噻唑啉胸苷酸合成酶抑制剂是GW1843。

75. 权利要求70的方法，其中所述苯并噻唑啉胸苷酸合成酶抑制剂是GW1843。

76. 权利要求71的方法，其中所述苯并噻唑啉胸苷酸合成酶抑制剂是
20 GW1843。

77. 权利要求72的方法，其中所述苯并噻唑啉胸苷酸合成酶抑制剂是GW1843。

78. 权利要求73的方法，其中所述苯并噻唑啉胸苷酸合成酶抑制剂是
GW1843。

25 79. 权利要求78的方法，其中所述氢化大豆磷脂酰胆碱、胆甾醇和磷脂酰甘油的摩尔比是约2:1:0.1。

80. 权利要求74的方法，其中氢化大豆磷脂酰胆碱与胆甾醇的摩尔比是约5:1-2:1.5。

-
81. 权利要求80的方法, 其中所述摩尔比是约2:1。
82. 权利要求80的方法, 其中所述摩尔比是约4:1。
83. 权利要求81的方法, 其中所述脂质体是单层并且小于100nm。
84. 权利要求83的方法, 其中所述氢化大豆磷脂酰胆碱与GW1843的摩尔比
- 5 是约5:1-75:1。
85. 权利要求75的方法, 其中所述摩尔比是约2:1。
86. 权利要求76的方法, 其中所述摩尔比是约2:1。
87. 权利要求77的方法, 其中所述摩尔比是约2:1。
88. 权利要求83的方法, 其中所述氢化大豆磷脂酰胆碱与GW1843的摩尔比
- 10 是约8:1-20:1。

脂质体苯并噻唑啉胸苷酸合成酶抑制剂制剂

5

发明领域

本发明涉及脂质体制剂，其包含苯并噻唑啉胸苷酸合成酶抑制剂。另外，本发明涉及制造和使用这类制剂的方法。

10 发明背景

脂质体是部分地制自磷脂的精微的泡囊，当用水分散时，其形成封闭的、充满流体的小球。已知作为苯并噻唑啉胸苷酸合成酶抑制剂的一类化合物是具有抗肿瘤活性的（U.S. 5,663,377）。此处描述的是包含苯并噻唑啉胸苷酸合成酶抑制剂的脂质体制剂。

15

发明概述

本发明提供了脂质体制剂，其包含至少一种磷脂酰胆碱，胆甾醇和苯并噻唑啉胸苷酸合成酶抑制剂。

20 附图简述

图1描述对雄性Sprague-Dawley大鼠静脉内给药脂质体封装的GW1843（NX1843）或游离的GW1843后，总血浆GW1843浓度的对数值对时间曲线（平均值±SD）。NX1843数据符合两相指数方程。

图2描述HCT-8处理的肿瘤的肿瘤生长曲线。

25 图3描述NX1843和GW1843对裸鼠体重的影响。

图4描述NX1843对肿瘤生长和体重的剂量反应作用。

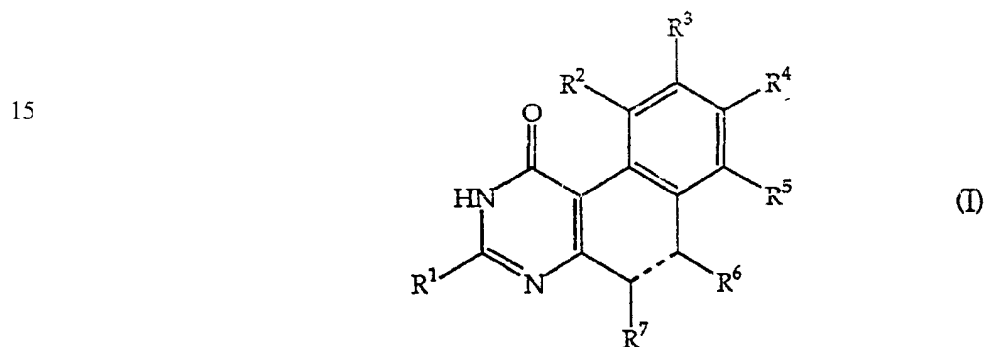
图5描述NX1843在molt4白血病模型中的功效。

发明详述

提供了封装于脂质体内的包含苯并喹唑啉胸苷酸合成酶抑制剂 (BTISI) 的制剂以及制备它们的方法。这些制剂具有药物用途, 包括作为抗肿瘤或
5 抗病毒制剂。另外, 与游离药物 (free drug) 相比, 作为抗肿瘤制剂, 脂质体具有改良的药物动力学和增强的功效。这些制剂包括脂质体, 其包含至少一种磷脂酰胆碱, 胆甾醇和BTISI。

美国专利号5,663,337 (1997年9月2日) 中描述了本发明的苯并喹唑啉胸苷酸合成酶抑制剂 (此处称为“本发明的化合物”), 其整体引入本文
10 作为参考, 尤其是第1栏第37行至第6栏第45行 (包括首尾行), 引入本文作为参考。

因此, 本发明提供了化学式 (I) 的化合物



20

或它们的盐, 其中虚线表示单键或双键, R^1 是 C_{1-4} 烷基或任选被 C_{1-4} 烷基、 C_{1-5} 烷酰基或苄基取代的氨基;

R^2 , R^3 , R^4 和 R^5 相同或不同, 并且每个选自氢, 苯基, 卤素, 硝基,

25 $S(O)_n R^8$ 基团, 其中 n 是整数 0, 1 或 2, R^8 是卤素或 C_{1-4} 烷基或 $NR^9 R^{10}$ 基团, 其中 R^9 和 R^{10} 均是氢,

$NR^{11} R^{12}$ 基团, 其中 R^{11} 和 R^{12} 相同或不同, 并且每个是氢或 C_{1-4} 烷基,

OR^{13} 基团, 其中 R^{13} 是氢或任选被卤素取代的 C_{1-4} 烷基;

任选被 OR^{14} 或 $NR^{14} R^{15}$ 基团取代的 C_{1-4} 脂族基团, 其中 R^{14} 和 R^{15} 相同或不同,

并且每个是氢或C₁₋₄烷基;

或R²-R⁵中的两个连接在一起形成苯并基团,

或R²-R⁵中的一个-X-Y-R¹⁶, 其中X是CH₂, NR¹⁷, CO或S(O)_m, m是0, 1或2, R¹⁷是氢或C₁₋₄脂族基团, Y是CH₂, NR^{17'}, O, 或S(O)_{m'}, 其中m'是0,

- 5 1, 或2, R^{17'}是氢或C₁₋₄脂族基团, 条件是, 当X和Y每个是CH₂时, X和Y相同, 或-X-Y-是-O-, -NR¹⁷-, -CH=CH-或-N=N-, 其中R¹⁷如上述定义, R¹⁶是C₁₋₄脂族基团或5-或6-元芳香环, 所述芳香环任选被R¹⁸在至少一个碳原子被从连接Y的位置去除的位置上取代, 所述5-或6-元环任选被卤素原子进一步取代; R¹⁸是卤素, C₁₋₄烷氧基, 硝基, 腈, 任选被卤素取代的C₁₋₄烷基, 卤素或COR¹⁹基团, 其中R¹⁹是羟基, C₁₋₄烷氧基或任选被一个或两个羧基或它的C₁₋₁₂酯取代的C₁₋₆烷基, 或R¹⁹是NR²⁰R²¹, 其中R²⁰和R²¹相同或不同并且每个是氢或任选被羟基取代的C₁₋₄烷基, 或R¹⁹是氨基酸基团或它的酯, 其中氨基酸基团的第一氮原子可连接5-或6-元芳香环以形成一个另外的5-或6-元杂环, 或R¹⁹是C₂₋₃亚烷基, 其连接到5-或6-元芳香环上以形成一个另外的5-或6-元环;

R⁶和R⁷相同或不同, 并且每个是任选被羟基取代的C₁₋₄烷基、或C₁₋₄烷氧基或两者一起形成苯并基团;

条件是至少R²-R⁷之一不是氢, 并且当R¹是羟基或甲基时, R⁴不是甲氧基。

术语卤素表示氟, 溴, 氯和碘。

- 20 术语C₁₋₄脂族基团表示C₁₋₄烷基, 烯基或炔基。

术语氨基酸基团表示天然存在的氨基酸。

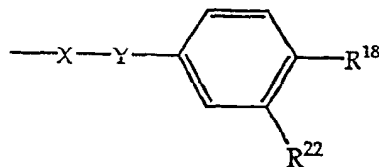
优选的氨基酸基团包括甘氨酸, 谷氨酸和聚谷氨酸 (polyglutamic and) 基团。当氨基酸基团连接5-或6-元芳香环时, 这是通过靠近连接COR¹⁹的碳原子的芳香环的碳原子实现的。

- 25 优选虚线是双键。

合适的芳香环R¹⁶的取代基包括卤素, C₁₋₄烷基和C₁₋₄烷氧基, 每个任选被1-5个卤素原子取代。最合适存在一个或两个选自氟, 氯, 甲基, 三氟甲基和甲氧基的取代基, 优选氟, 或在芳香环上不存在取代基。在一个优选

的实施方案中, $-X-Y-R^{16}$ 是基团

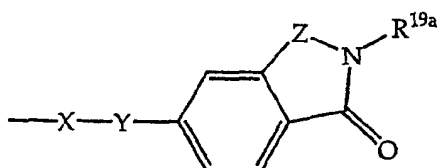
5



其中 R^{18} 如前所定义, 并且优选如前定义的 COR^{19} , R^{22} 是氢或氟。

在另一个优选的实施方案中, $X-Y-R^{16}$ 是基团

10



其中 H_2NR^{19a} 是谷氨酸或聚谷氨酸基团, Z 是 CH_2 , S 或 O 。

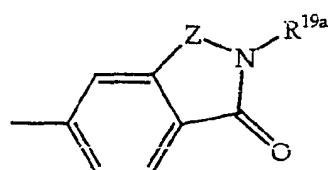
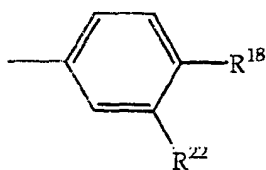
合适地, R^1 是任选被一个或两个甲基或乙基取代的氨基, 或 R^1 是甲基或乙基。

优选 R^1 是氨基或甲基。

15

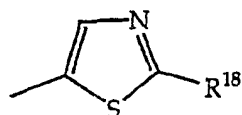
合适地, R^2-R^5 的至多仅三个, 优选至多仅两个不是氢, 并且每个独立选自氢, 卤素, 羟基, 硝基, 任选被羟基或 C_{1-2} 烷氧基取代的 C_{1-3} 烷基, C_{1-3} 烷氧基, 任选被一个或两个甲基或乙基取代的氨基, 或 $S(O)_nR^{23}$ 基团, 其中 n 是0, 1, 或2, R^{23} 是 C_{1-4} 烷基或任选被一个或两个甲基或乙基取代的氨基, 或 R^2-R^5 之一是基团 $-X-Y-R^{24}$, 其中 R^{24} 是基团

20

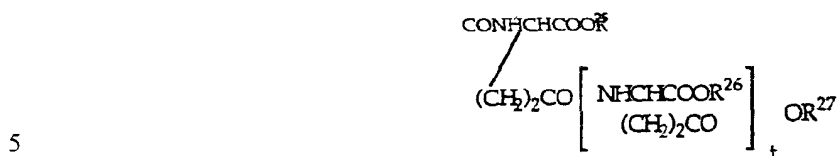


或

25



其中 R^{18} , R^{19a} , R^{22} 和 Z 如前所定义。在一个优选的实施方案中, R^{18} 是硝基或基团



其中 R^{25} , R^{26} 和 R^{27} 相同或不同, 并且每个是氢或 C_{1-4} 烷基, 并且 t 是0-6的整数。优选 R^{25} , R^{26} 和 R^{27} 是氢并且 t 是0。优选 Z 是 CH_2 或 S 。

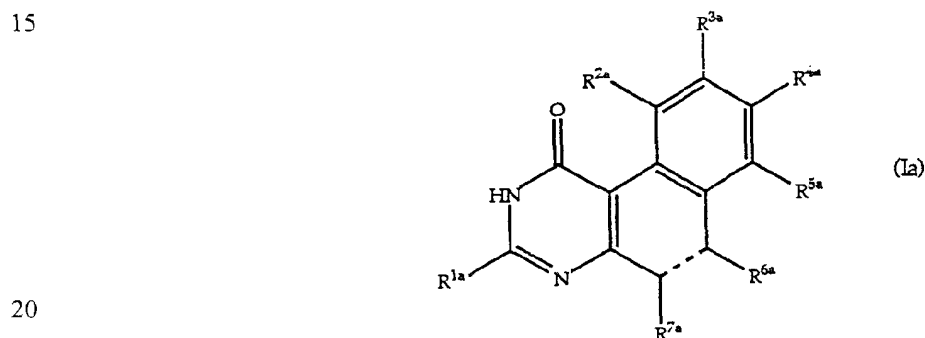
优选 R^2 - R^5 之一是如前定义的 $-X-Y-R^{24}$ 。优选 R^3 是 $-X-Y-R^{24}$ 。

10 合适地, R^6 和 R^7 相同或不同, 并且每个是氢, 甲基, 乙基或被溴、羟基或甲氧基取代的甲基。优选 R^7 是氢, R^6 是甲基。

优选 $-X-Y-$ 是 $-\text{SO}_2\text{NR}^{17}-$ 或 $\text{CH}_2\text{NR}^{17}$, 其中 R^{17} 如前所定义。

合适地, R^{17} 是氢或 C_{1-4} 烷基或烯基, 优选 R^{17} 是氢或甲基。

本发明的一类化合物是化学式(Ia)的化合物

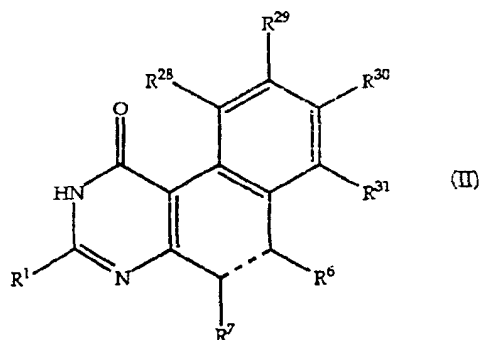


或它们的盐, 其中虚线表示单键或双键, R^{1a} 是 C_{1-4} 烷基或任选被 C_{1-4} 烷基取代的氨基, C_{1-5} 烷酰基或苄基; R^{2a} , R^{3a} , R^{4a} 和 R^{5a} 相同或不同, 并且每个选自氢, 卤素, 硝基, 基团 $\text{S}(\text{O})_n\text{R}^{8a}$, 其中 n 是整数0, 1或2, R^{8a} 是卤素或是 C_{1-4} 烷基或氨基; 基团 $\text{NR}^{11a}\text{R}^{12a}$, 其中 R^{11a} 和 R^{12a} 相同或不同, 并且每个是氢或 C_{1-4} 烷基, 基团 OR^{13a} , 其中 R^{13a} 是氢或任选被卤素取代的 C_{1-4} 烷基, 任选被基团 OR^{14a} 或 $\text{NR}^{14a}\text{R}^{15a}$ 取代的 C_{1-4} 脂族基团, 其中 R^{14a} 和 R^{15a} 相同或不同, 并且每个是氢或 C_{1-4} 烷基, 或 R^{2a} - R^{5a} 之一是基团 $-X-Y-R^{16a}$, 其中 X 是 CH_2 , NR^{17a} , CO

25

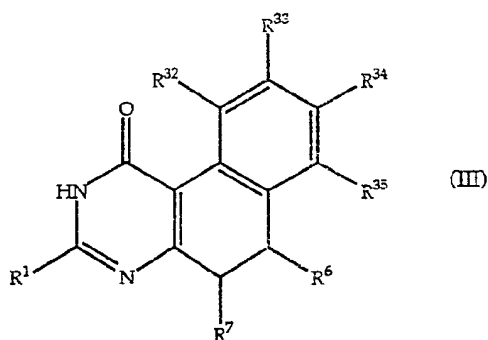
或 $S(O)_m$, m 是0, 1, 或2, R^{17a} 是氢或 C_{1-4} 脂族基团, Y 是 CH_2 , NR_{17a} , O , 或 $S(O)_{m'}$, 其中 m' 是0, 1或2, R^{17a} 是氢或 C_{1-4} 脂族基团, 条件是, 当 X 和 Y 每个是 CH_2 时, X 和 Y 仅相同, 或 $-X-Y-$ 是 $-NR^{17a}$, $-CH=CN-$ 或 $-N=N-$, 其中 R^{17a} 如前定义, R^{16a} 是 C_{1-4} 脂族基团或任选取代的5-或6-元芳香环, 所述5-或6-元芳香环被基团 R^{18a} 在至少一个碳原子被从连接 Y 的位置去除的位置上取代, R^{18a} 是硝基, 腈, 任选被卤素取代的 C_{1-4} 烷基, 卤素, 或基团 COR^{19a} , 其中 R^{19a} 是任选被一个或两个羧基或 C_{1-4} 烷氧基取代的 C_{1-6} 烷基, 基团 $CONR^{20a}R^{21a}$, 其中 R^{20a} 和 R^{21a} 相同或不同并且每个是氢或 C_{1-4} 烷基或 R^{19a} 是谷氨酸或聚谷氨酸基团或其酯, 其中谷氨酸或聚谷氨酸基团的第一个氮原子可连接5-或6-元芳香环以形成另一个5-或6-元杂环; R^{6a} 和 R^{7a} 相同或不同并且每个是任选被羟基取代的 C_{1-4} 烷基或 C_{1-4} 烷氧基或两个一起形成苯并基团, 条件是, R^{2a} - R^{7a} 中的至少一个不是氢, 并且当 R^{1a} 是羟基或甲基时, R^{4a} 不是甲氧基。

本发明的另一类化合物是化学式 (II) 的化合物



或它们的盐, 其中 R^1 , R^6 , R^7 和虚线如前定义, R^{28} - R^{31} 相同或不同并且每个选自氢, 卤素, 硝基, 基团 $S(O)_nR^8$, 基团 $NR^{11}R^{12}$, 基团 OR^{13} , 或任选被基团 OR^{14} 或 $NR^{14}R^{15}$ 取代的 C_{1-4} 脂族基团, 其中 R^8 , R^{11} , R^{12} , R^{13} , R^{14} 和 R^{15} 如前定义, 条件是, R^{28} - R^{31} 不全是氢, 并且当 R^1 是羟基或甲基时, R^{30} 不是甲氧基。

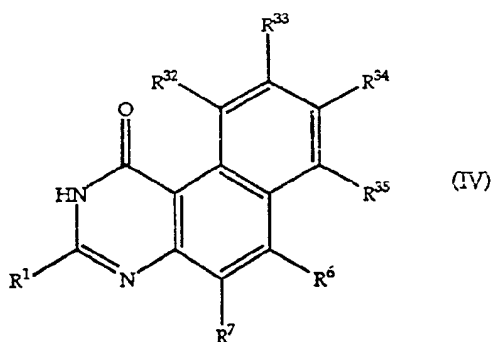
本发明优选的一类化合物是化学式 (III) 的化合物:



5

或它们的盐，其中R¹，R⁶和R⁷如前定义，R³²-R³⁵相同或不同并且一个是基团X-Y-R¹⁶，其它相同或不同并且每个选自氢，卤素，硝基，S(O)_nR⁸，NR¹¹R¹²，OR¹³或任选被OR¹⁴或NR¹⁴R¹⁵取代的C₁₋₄脂族基团，其中X，Y，R⁸，R¹¹，R¹²，R¹³，R¹⁴，R¹⁵和R¹⁶如前定义。

10 本发明另一类优选的化合物是化学式 (IV) 的化合物：



15

其中R¹，R⁶，R⁷和R³²-R³⁵如前定义。

20 优选R³³是如前定义的X-Y-R¹⁶。

优选的化学式 (I) 的化合物包括：

3-氨基-9-溴苯并[f]喹唑啉-1(2H)-酮

3-氨基-9-乙炔基苯并[f]喹唑啉-1(2H)-酮

25 N-(4-((3-氨基-1,2,5,6-四氢-1-氧苯并[f]喹唑啉-9-基)亚磺酰氨基)苯甲酰基)-L-谷氨酸

N-(4-((1,2,5,6-四氢-3-甲基-1-氧苯并[f]喹唑啉-9-基)亚磺酰氨基)苯甲酰基)-L-谷氨酸

N-(4-((1,2-二氢-3-甲基-1-氧苯并[f]喹唑啉-9-基)亚磺酰氨基)苯甲酰基)-L-谷

氨酸

N-(4-(((1,2-二氢-3-甲基-1-氧苯并[f]喹唑啉-9-基)甲基)氨基)-2-氟代苯甲酰基)-L-谷氨酸

5 酸
N-(4-(((1,2-二氢-3-甲基-1-氧苯并[f]喹唑啉-9-基)甲基)氨基)苯甲酰基)-L-谷氨酸

(S)-2-(5-(((1,2-二氢-3-甲基-1-氧苯并[f]喹唑啉-9-基)甲基)氨基)-1-氧代-2-异二氢吡啶基)谷氨酸

9-((4-乙酰基苯胺基)甲基-3-甲基苯并[f]喹唑啉-1(2H)-酮

3-甲基-9-((4-硝基苯胺基)甲基)苯并[f]喹唑啉-1(2H)-酮

10 N-(4-(((3-氨基-1,2-二氢-1-氧苯并[f]喹唑啉-9-基)甲基)氨基)苯甲酰基)-L-谷氨酸

3-氨基-9-((4-硝基苯胺基)甲基)苯并[f]喹唑啉-1(2H)-酮

9-((4-乙酰基苯胺基)甲基-3-氨基苯并[f]喹唑啉-1(2H)-酮

15 (RS)-2-(2-(4-(((1,2-二氢-3-甲基-1-氧苯并[f]喹唑啉-9-基)甲基)氨基)苯基)-2-氧乙基)谷氨酸

4-(4-(((1,2-二氢-3-甲基-1-氧苯并[f]喹唑啉-9-基)甲基)氨基)苯基)-4-氧代丁酸乙酯

4-(4-(((1,2-二氢-3-甲基-1-氧苯并[f]喹唑啉-9-基)甲基)氨基)苯基)-4-氧代丁酸

20 N-(4-(((1,2-二氢-3-甲基-1-氧苯并[f]喹唑啉-9-基)甲基)氨基)-2-氟代苯甲酰基)甘氨酸

N-(4-(((1,2-二氢-3-甲基-1-氧苯并[f]喹唑啉-9-基)甲基)氨基)-2-氟代苯甲酰基)甘氨酸乙酯

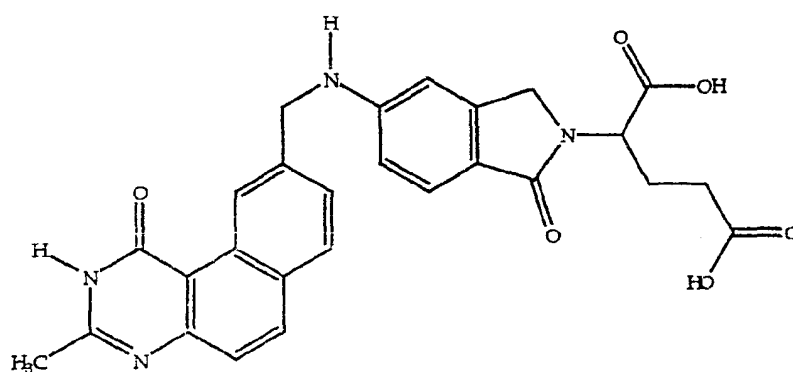
化学式(I)的某些化合物包含不对称碳原子,因此能作为光学异构体存在。单个的光学异构体和它们的混合物也包括在本发明的范围内。

25 本发明化合物的盐可包含衍生自化学式(I)的化合物的氨基或由化学式(I)的化合物得到的阴离子(例如当被羧基取代时)和阳离子的酸式加成盐。在这两种类型的盐中,治疗活性存在于衍生自本发明的这里定义的化合物的部分,尽管为了治疗和预防的目的,其它组分的同一性是不重要

的，但是优选对患者是药学可接受的。药用酸式加成盐的实例包括那些衍生自无机酸如盐酸，氢溴酸，磷酸，偏磷酸，硝酸和硫酸，和有机酸如酒石酸，乙酸，三氟乙酸，柠檬酸，苹果酸，乳酸，富马酸，苯甲酸，乙醇酸，葡萄糖酸，琥珀酸和甲磺酸和芳基磺酸，例如对-甲苯磺酸的盐。包含衍生自化学式 (I) 的化合物的阴离子和阳离子的盐的实例包括铵盐，碱金属盐，如钠和钾盐，碱土金属盐如镁和钙盐，和与有机碱形成的盐例如衍生自一元-，二元-或三元-（低级烷基）或（低级链烷醇）胺，例如三乙醇胺和二乙氨基乙胺的盐，和与杂环胺如哌啶，吡啶，哌嗪和吗啉形成的盐。药用盐以及因而不能药用的盐用于分离和/或纯化本发明的化合物，非药用盐还能用本领域中众所周知的技术转变成药用盐。

从包含羧基的化学式 (I) 的化合物形成的化学式 (I) 的化合物的酯通常是制备母酸的有用的中间体。

本发明一个特别优选的化合物是一种化合物，GW1843（此处也称为GW1843U89或1843U89），化学式如下：



GW1843

此处使用的GW1843的脂质体制剂称为NX1843。

此处使用的术语“脂质体”指的是单层泡囊或多层泡囊，例如在美国专利号4,753,788中所描述的（其内容引入本文供参考）。

“单层脂质体”也称为“单层泡囊”，是由一种类脂双层膜组成的球

形泡囊，所述类脂双层膜确定一个封闭的含水区室。所述双层膜由两层类脂组成；内层和外层（小叶）。类脂分子的外层进行取向，使得它们的亲水头部朝向外部的含水环境，它们的疏水尾部向下指向脂质体的内部。类脂层的内层直接在外层的下面，类脂的取向使得头部朝向脂质体的含水内部并且尾部朝向类脂外层的尾部。

“多层脂质体”也称为“多层泡囊（multilamellar或multiple lamellar）”，由多于一个类脂双层膜组成，这些膜确定了多于一个封闭的含水区室。这些膜被集中排列，使得不同的膜被含水区室所分隔，非常象洋葱。

此处使用的术语“封装”和“包埋”指的是将BTSI结合或缔合到脂质体中或与脂质体相结合或缔合。BTSI可存在于脂质体的内部含水空间，膜双层的内或外小叶中，部分包埋于双层的外小叶并且部分在脂质体的外部，或与脂质体的表面相连（如通过静电相互作用），或这些的组合。

此处使用的“赋形剂”指的是有助于药物产品的稳定性的物质，包括但不局限于pH的稳定性，脂质体的胶体性质的稳定性，和药物及磷脂的化学稳定性。赋形剂的实例包括但不局限于酸，一价阴离子的钠或铵形式如氯化物，乙酸盐，乳糖酸盐和甲酸盐；二价阴离子如天冬氨酸盐，琥珀酸盐和硫酸盐；和三价离子如柠檬酸盐和磷酸盐。

“磷脂”指的是能形成脂质体的任何一种磷脂或磷脂的组合。磷脂酰胆碱（PC），包括那些获自卵，大豆或其它植物源的磷脂酰胆碱，或那些部分或全部合成的磷脂酰胆碱，或具有可变的类脂链长和不饱和度的磷脂酰胆碱，是适于在本发明中使用的。合成的、半合成的和天然产品的磷脂酰胆碱是适于在本发明中使用的，包括但不局限于二硬脂酰磷脂酰胆碱（DSPC），氢化大豆磷脂酰胆碱（HSPC），大豆磷脂酰胆碱（大豆PC），卵磷脂酰胆碱（卵PC），二油酰磷脂酰胆碱（DOPC），氢化卵磷脂酰胆碱（HEPC），二反油酰磷脂酰胆碱（dielaidoylphosphatidylcholine）（DEPC），二棕榈酰磷脂酰胆碱（DPPC），和二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱（DMPC）。所有这些磷脂是市场上可购买的。优选的PC是HSPC和DSPC；最优选HSPC。

另外，磷脂酰甘油（PG）和磷脂酸（PA）也是适于在本发明中使用的

磷脂，包括但不限于二肉豆蔻酰磷脂酰甘油（DMPG），二月桂基磷脂酰甘油（DLPG），二棕榈酰磷脂酰甘油（DPPG），二硬脂酰磷脂酰甘油（DSPG），二肉豆蔻酰磷脂酸（DMPA），二硬脂酰磷脂酸（DSPA），二月桂基磷脂酸（DLPA），和二棕榈酰磷脂酸（DPPA）。当在制剂中使用时，二硬脂酰磷脂酰甘油（DSPG）是优选的带负电的类脂。当带负电的类脂如DSPG包含于制剂中时，优选以少于总类脂的20%，更优选少于5%的摩尔量存在。其它合适的磷脂包括磷脂酰乙醇胺，磷脂酰肌醇和包含月桂酸，肉豆蔻酸，硬脂酸和棕榈酸链的磷脂酸。另外，本发明也考虑包括含磷脂的聚乙二醇（PEG）。

此处使用的术语“肠道外”指的是静脉内（IV），肌肉内（IM），皮下（SubQ）或腹膜内（IP）给药。

本发明考虑了任何有效的磷脂:BTSI比率。优选的磷脂:BTSI摩尔比是5:1-75:1，更优选是8:1-20:1。优选的脂质体制剂包括磷脂:胆甾醇摩尔比超过5:1-2:1.5的范围。最优选的脂质体制剂是PC:胆甾醇为2:1。在优选的实施方案中，脂质体是具有小于100nm中值粒径的单层泡囊，其中磷脂是氢化大豆磷脂酰胆碱（HSPC），并且以2:1的摩尔比包含胆甾醇，并且BTSI是GW1843。

通常，制备本发明的制剂的方法是最初制备形成脂质体的溶液。例如通过称出一定量磷脂酰胆碱和胆甾醇，并将它们溶解在有机溶剂优选氯仿或溶剂的混合物优选氯仿和甲醇的混合物中来实施。例如用旋转式汽化器、喷雾干燥器或其它工具蒸发该溶液以形成固态类脂相如薄膜或粉末。优选的干燥方法是使用喷雾干燥器。然后用含活性药物、含有或不含赋形剂的水溶液水合薄膜或粉末，以形成脂质体分散体。优选除了酸或碱以外，不使用赋形剂来调整药物溶液的pH。根据所使用的磷脂，将分散于药物溶液中的类脂薄膜或粉末加热至约25°C-70°C的温度。

通过搅拌、优选通过摇动或混合分散体，形成多层脂质体。例如通过超声处理或使用微流化装置、或挤出装置、或均化器或French press对类脂固相的含水分散体施以能量如剪切力或空穴以形成多层泡囊。也可使用注

射，冷冻并融化，从类脂中渗析掉洗涤剂溶液，或用于制备脂质体的其它已知方法制备脂质体。使用各种已知技术（包括持续施用能量）可控制脂质体的尺寸。优选地，在3,000-20,000磅/平方英寸，优选10,000-14,000磅/平方英寸的压力下，在类脂的约聚集转变温度，优选HSPC:胆甾醇制剂的55℃
5 以上的温度下，使用均化装置以形成直径小于100纳米的单层泡囊。

使用渗析、尺寸排阻色谱法（Sephadex G-50树脂）或超滤（也称为交叉过滤）（切断（cut off）50,000-300,000分子量），通过缓冲液与水溶液的交流，从脂质体分散体中去除未包埋的赋形剂和/或药物。

脂质体的治疗用途可包括传递游离形态通常有毒的药物。在脂质体中，
10 可使有毒药物远离可导致毒性的敏感组织，并导向可发挥它们的治疗作用的选定区域。脂质体也可以治疗方式使用以经过一段延长期缓慢释放药物，从而通过增强的药物动力学分布降低给药频率。另外，脂质体可提供一种形成适于静脉内输送的疏水药物含水分散体的方法。

脂质体的输送路线也可影响它们在体内的分布。脂质体的被动输送涉
15 及给药的各种路径如肠道外的应用，尽管其它有效给药形式如内关节注射，吸入雾剂（inhalant mist），口服活性制剂，透皮iontophoresis或栓剂也是被考虑的。每种路径在脂质体定位上都有差异。

本发明还提供了一种抑制肿瘤（耐药和对药物敏感的）生长的方法，所述抑制是通过传递给肿瘤（优选在哺乳动物中）治疗或有效量的脂质体
20 BTSI实现的。此处制剂的单一剂量给药的理想数量和间隔时间可通过被治疗的疾病的性质和程度，给药的形式、路径和部位，和被治疗的具体患者来确定，并且这些最佳参数可通过常规技术来确定。本领域的技术人员将会理解，治疗的最佳路线，即对于确定的天数每天给药的剂量数可由本领域的技术人员使用治疗确定测试的常规方法确定。

25 本发明考虑了与所有癌症包括多重耐药癌症相关的肿瘤生长的抑制。所述的脂质体制剂可具体用于抑制的癌症包括结肠直肠癌，卵巢癌，肺癌，乳腺癌，头和颈癌，前列腺癌，子宫癌（uteran），成胶质细胞瘤，和肉瘤。另外，考虑此处描述的并在权利要求中要求的制剂可与其它抗癌疗法结合

使用，所述其它抗癌疗法包括但不限于1) 治疗卵巢癌的紫杉醇和铂复合体；2) 治疗结肠直肠癌的5FU和甲酰四氢叶酸或左旋咪唑；3) 治疗肺癌的顺氯氨铂和足叶乙甙，4) topo I抑制剂如托泊替堪 (topotecan)，药薯 (irinotecan)，和NX211，和5) 蒽环霉素如阿霉素或盐酸强力霉素 (doxil)。

5 通过参考下述实施例将更完全地理解本发明，所述实施例意图说明本发明而不是限制本发明。实施例1描述GW1843的脂质体制剂。实施例2描述四种脂质体制剂的单一剂量药物动力学。实施例3描述游离的GW1843和GW1843的脂质体制剂之间的血浆药物动力学参数比较。实施例4描述单一NX1843制剂的两个独立的批次的比较。实施例5描述不同脂质体制剂的比较
10 和动物重量对血浆药物动力学的影响的确定。实施例6描述单一静脉内药丸给药后的血浆药物动力学。实施例7描述对TS抑制剂GW1843和脂质体制剂NX1843的临床前研究。

实施例1

15 GW1843的脂质体制剂

此处使用的磷脂和胆甾醇以干粉形式获自Avanti Polar lipids, Nippon Fine Chemical, Lipoid或Sygena，并且不经进一步纯化使用。所有其它的化学品是试剂级，并且不经进一步纯化即使用。

GW1843的脂质体的制备包括将药物封装于脂质体的内部空间。首先，
20 制备包含氢化大豆磷脂酰胆碱和胆甾醇的类脂薄膜或喷雾干燥的粉末。使用喷雾干燥法制备HSPC:胆甾醇为2:1摩尔比的混合物。将类脂溶解在氯仿中直至20%重量/重量。然后使用72-78℃的氮气将有机溶剂溶液中的类脂组分干燥至粉末。使用薄膜方法制备HSPC:胆甾醇为4:1摩尔比的混合物。为制备类脂薄膜，使用氯仿和甲醇(1:1体积比)的溶剂混合物(273mg/ml)
25 溶解类脂组分。然后将氮气穿过溶液，同时将溶液在65℃的温浴中加热，去除溶剂。在成品中类脂浓度最多为100-200mg/ml下，在水溶液中水合每种类脂粉末或薄膜，所述水溶液包含20-225mg/ml浓度的活性药物，含有或不含磷酸盐缓冲液(用于缓冲溶液pH)，pH在7-9的范围内。使用150mM

磷酸盐缓冲液制备样品NA-1022-63A, NA-1022-59A, GC-1007-27和GC-1020-36。不用磷酸盐缓冲液制备其它样品。在上述磷脂的相变温度以上的温度下,用乙酸培养(AT-1084-95B),这可能造成所观察到的成品的低pH(表1A)。HSPC:胆甾醇的摩尔比为4:1-2:1。然后在所述类脂相变温度以上的温度(~55℃)下,使用探针超声处理(probe sonication),从这些混合物形成小单层脂质体(<100nm,中值粒径,使用微量超细颗粒分析仪(Micro Trac Ultrafine Particle Analyzer))。通常使用尺寸排阻色谱法(Sephadex G-50树脂)通过缓冲液与水或9%蔗糖的交换,从脂质体分散体中去除未包埋于脂质体含水核中的药物和/或赋形剂。对于使用水作为洗脱液的制剂,在从脂质体分离未包埋的药物和/或赋形剂后,加入蔗糖。

通过0.22微米滤器在环境温度下过滤样品,所述滤器由乙酸纤维素或聚醚砜组成。表征结果示于下表1A中。

使用HSPC以外的磷脂制备其它制剂(表1B)。带负电的磷脂酰胆碱,DSPG,也在一种制剂中使用(表1B)。用100mg/ml氯仿和甲醇如上描述制备AL-1230-058, AL-1230-052, AL-1230-048和AL-1230-055类脂薄膜。如上描述制备AL-1230-041喷雾干燥粉末。在100mg/ml, pH7.5的药物溶液中水化每种类脂薄膜或粉末。混合后,在~65℃和~13,000磅/平方英寸压力下,使用均化器(Niro制造的Panda)均化水化的类脂,以形成小单层泡囊。均化后,为了注射,用水交叉过滤脂质体以去除未包埋的药物。在交叉过滤末尾,向主体中加入蔗糖至接近9%的浓度。通过0.2μm聚醚砜(PES)滤器过滤脂质体溶液。这些制剂的检测结果显示于表1B中。

对于HSPC:胆甾醇(摩尔比2:1)制剂,使用不同的赋形剂如蔗糖,磷酸盐,柠檬酸盐和琥珀酸盐制备另外的制剂。在100mg/ml, pH7.5的药物溶液中水化HSPC:胆甾醇(2:1)(摩尔比)的喷雾干燥粉末。混合后,65℃和13,000磅/平方英寸压力下,使用均化器(Niro制造的Panda)均化水化的类脂,以形成小单层泡囊。均化后,为了注射,用水交叉过滤脂质体以去除未包埋的药物。在交叉过滤末尾,向主体中加入蔗糖至接近9%的浓度。加入另外的缓冲液赋形剂(表1C)至理想的浓度,并调整溶液的pH。通过

0.2 μ m聚醚砜（PES）滤器过滤脂质体溶液。这些制剂的一些检测结果示于表1C中。制剂的稳定性数据示于表1D中。在2-8℃，制剂经至少1个月是稳定的。

5 实施例2

四种脂质体制剂的单一剂量药物动力学

在大鼠中，在单一静脉内药丸给药后，比较游离的GW1843和GW1843的4种不同脂质体制剂（参见表1A；GC-1007-27，GC-1020-36，NA-1022-63A，和NA-1022-59A）的血浆药物动力学。这些脂质体制剂的区别在于用来装填脂质体的pH不同。NX1843批次nos.GC-1007-27，GC-1020-36，NA-1022-63A，和NA-1022-59 A分别在pH7.0，7.4，7.3和7.5的条件下装填。

材料和方法

总共15只Sprague Dawley大鼠用于此研究。每只大鼠重约250克。每组分3只动物（总共5组）。称重每只动物，异氟醚(isoflurene)麻醉下，以1mg/kg体重的剂量通过静脉内药丸给药到尾静脉。异氟醚麻醉下，在示于表2的时间点采集EDTA血样，并立即加工成血浆。将血浆保存在-20℃直至分析用。

制备血浆样品，并通过使用non-validated HPLC分析来分析GW1843。甲醇沉淀血浆蛋白后，C-18反相柱色谱分离可溶性GW1843。用等度法（isocratic method）实现分离。流动缓冲液由80%的乙腈和20%的100mM的乙酸铵组成（pH=5.3）。使用峰下的面积与GW1843的浓度绘制标准曲线。

通过非-间隔分析确定药物动力学参数（WinNonlin版1.5）。使用对于每组而言相对时间值的平均浓度确定每个实验组的药物动力学参数。计算下述参数：最大血浆浓度(C_{max})；相对于外延至无限时间（AUC_{inf}）或至最后的时间点（AUC_{last}）的时间曲线的血浆浓度下面的面积；消去半衰期（Elim.T_{1/2}）；平均停留时间（MRT）血浆清除率（Cl）和在稳态下的分布体积（V_{ss}）。

结果

每个给药组的血浆浓度归纳于表2中。计算的药物动力学参数示于表3

中。

非间隔分析

非间隔分析对基础的药物动力学模型未做任何设想。评估在血浆中的最大获得浓度 (C_{max})，对于脂质体制剂范围为15.5-24.8 $\mu\text{g/mL}$ ，对于游离药物是1.3 $\mu\text{g/mL}$ 。所有四种脂质体制剂的评估的消去半衰期 ($\text{Elim.}t_{1/2}$) 明显大于游离药物。脂质体制剂的消去半衰期均接近18.5小时，而游离药物显示接近0.5小时的消去半衰期。脂质体制剂的血浆浓度对时间曲线 (AUC_{inf}) 下的面积为266,740-462,920 ($\text{h} \times \text{ng/mL}$)，而游离药物则仅仅为263 ($\text{h} \times \text{ng/mL}$)。后一结果反映于血浆清除率中，所述血浆清除率对脂质体制剂为2.16-3.75 mL/h ，对游离药物为3,805 mL/h 。

最后，稳定状态下脂质体制剂的分布体积 (V_{ss}) 为预期的大鼠的血浆体积 (31.2 mL/kg) (3)的2-3倍，而游离药物具有比脂质体制剂大18-30倍的分布体积。

15 实施例3

游离GW1843和GW1843脂质体制剂的血浆药物动力学参数的比较
材料和方法

GW1843 (M.W. 500.51 g/mol) 获自Glaxo Wellcome有限公司并作为含水物悬浮。简单地，将616.74毫克GW1843悬浮于1.4 mL 2N NaOH中。混合溶液直至溶解。向溶解的溶液中加入30 mL 盐水。用2N HCl将pH调至7.15。最后，用盐水将溶液补至46.545 mL 。标称浓度为13.25 mg/mL 。基于 $4.34 \times 10^4 \text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ 的消光系数，在266 nm 下于0.1N氢氧化钠中的UV吸收来确定浓度。通过UV光谱学确定的浓度为13.97 mg/mL (与预期相差5.4%)。将用光谱学确定的值在HPLC分析中用作标准物。NX1843 批次 SMC-991-96 (参见表1A) 用来制备质量控制溶液。

重343.91-420.19克的雄性Sprague-Dawley大鼠用于此研究。按照动物福利和养护准则 (NRC出版物，实验动物养护和使用指南，1996) 在Boulder Colorado进行生存阶段的研究。IACUC草约号N98010。在处理前和处理期

间允许动物自由进食和饮水。

称重用NX1843处理的单个动物，异氟醚麻醉下，以1mg/kg体重的剂量通过静脉内药丸给药到尾静脉。

异氟醚麻醉动物的同时，对GW1843组给药后的5，15，30和45分钟，以及1，1.5和2小时获得系列EDTA-血样（0.5mL）。对于NX1843组，给药后的10，30和90分钟，以及4，8，24，32，48，72和96小时获得系列EDTA-血样（0.5mL）。立即将EDTA-血样加工成血浆，并将血浆样品保存在-20℃直至分析用。

使用等度(isocratic)反相高效液相色谱(HPLC)程序快速确定大鼠EDTA-血浆中GW1843总浓度。甲醇沉淀血浆蛋白（2份甲醇对1份血浆）后，通过14,000×g离心10分钟去除蛋白。用安装以防护柱的ZORBAX Eclipse™XBD-C18柱（3mm×15cm）分离可溶性GW1843（注射体积20μL）。HPLC缓冲液由80% 100mM pH=5.3的乙酸铵和20%乙腈组成，并且流速为0.4mL/min。总运行时间为7分钟，并通过在264nm紫外吸收检测和定量GW1843。标准曲线由游离GW1843穿刺的大鼠EDTA-血浆组成，而质量控制样品由NX1843穿刺的大鼠EDTA-血浆组成。标准曲线的范围为0.1-30.0μg/mL。

使用WinNonlin（1.5版），用非-间隔法分析静脉内给药GW1843或脂质体封装的GW1843后的总GW1843的药物动力学参数。使用log/线性trapazoidal规则。对于非-间隔分析，利用所有的3时间点（time points）评估游离GW1843的消去相，而利用最后的5时间点评估NX1843的消去半衰期。通过外推至0时间评估Cmax值。确定此研究中每只动物的药物动力学参数。从在每组中获得的值确定每个参数的平均值和SD。评估的参数包括：

Cmax	最大血浆浓度
AUC（0-last）	血浆浓度对直至测量的最后时间血浆时间点的时间曲线下的面积
ke	用线性回归评估的末端消去相的斜度
t1/2	末端消去相的半衰期（0.693/ke）

MRT (0-inf)	外延至无穷大的平均停留时间
AUC (0-inf)	浓度对外延至无穷大的时间曲线下的面积

如下计算给药后GW1843的观察到的清除率 (CL)：

$$CL = \frac{\text{剂量}_{\text{静脉内}}}{AUC}$$

通过在相同实验中获得的数据不成对t-检验 (unpaired t-test) 进行处理
5 组的比较。认为小于0.05的p值是显著的。使用GraphPad Instat 1.0版本
(GraphPad软件) 进行检验。

结果

GW1843和脂质体封装的GW1843 (NX1843) 的非-间隔分析

GW1843给药组的总血浆浓度归纳于表4中，而相应的脂质体封装的
10 GW1843 (NX1843; SMC-991-96) 给药组的总血浆浓度归纳于表5中。GW1843
和NX1843的几个计算的药物动力学参数的评估值分别示于表6和表7中。
GW1843给药组的药物动力学值是基于用所有3个测量的GW1843血浆浓度评
估的最后半衰期 (terminal half-life)。这可能导致低估半衰期并且因此略微
低估AUC。然而，在这个剂量水平的有限的数据需要这种方法。

15 图1表示两个给药组log浓度对时间曲线。

评估接受22.1-28.7 $\mu\text{g/mL}$ 的总GW1843范围的NX1843的动物血浆中最大
获得浓度 (C_{max})。这些值明显大于观察到的游离GW1843 (范围为1.62-
1.99 $\mu\text{g/mL}$)。评估的 (平均值 $\pm$ SD) 脂质体制剂的最后半衰期 ($\text{Elim.t}_{1/2}$)
为 16.6 ± 0.86 小时，而游离的药物显示 0.142 ± 0.007 小时的消去半衰期。与
20 游离药物的仅仅 $0.27 \pm 0.028 \text{ hr} \cdot \mu\text{g/mL}$ 相比，脂质体制剂的GW1843血浆浓度
对时间曲线下的面积 [$AUC(0-\text{inf})$] 为 $524 \pm 55.9 \text{ hr} \cdot \mu\text{g/mL}$ 。后一结果反应在血
浆清除率中，所述血浆清除率对脂质体制剂为 $1.93 \pm 0.206 \text{ mL/hr}$ ，对游离的
药物为 $3,740 \pm 456 \text{ mL/hr}$ 。最后，脂质体制剂在稳态下的分布体积 (V_{ss}) 少
于大鼠的预期的血浆体积 (31.2 mL/kg) (3) 的2倍，而游离药物具有大于脂
25 质体制剂的约14.6倍的分布体积。

与游离药物相比，GW1843的脂质体封装在总血浆暴露 (exposure) 方

面增加了约1,940倍。这个数值与在实施例2中获得的数值相似，在实施例2中观察到1,000-1,760倍的增加。

通常，在这个实施例中获得的NX1843的药物动力学参数与那些在实施例2中观察到的相似。

- 5 在这个实施例中，对于NX1843制剂确定的18.0小时的平均最后半衰期与在实施例2中测试的四种NX1843制剂的所有最后半衰期（范围 17.7-20.2小时）没有明显差异。

实施例4

- 10 单一NX1843制剂的两个独立批次的比较

使用NX1843 批次号SMC-991-96和SMC-1092-09（参见表1A）。

- 重207.16-219.27克的雄性Sprague-Dawley大鼠用于此研究。根据动物福利和养护准则（NRC出版物，实验动物的养护和使用指南，1996），在Boulder Colorado进行存活阶段的研究。IACUC草约号N98010。在处理前及期间允许动物自由进食及饮水。

称重单个动物，并在异氟醚（isoflurane）麻醉下，以1mg/kg体重的剂量通过静脉内药丸给药到尾静脉。

- 在isoflurane麻醉下，系列EDTA-血样（0.5mL）在给药后10，30和90分钟和4，8，24，32，48，72和96小时（标称时间）获得。将EDTA-血样立即加工成血浆，并保存于-20℃直至分析用。

如实施例3确定GW1843在血浆中的总浓度。

如实施例3评估静脉内给药脂质体封装的GW1843后的总GW1843的药物动力学参数。

- 通过数据的不成对t-检验进行处理组的比较。除了进行多重比较的情况下利用Bonferroni 修正外，认为小于0.05的p-值是显著的。使用GraphPad Instat 1.0版本（GraphPad软件）进行检验。

结果

脂质体封装的GW1843 (NX1843) 批次 SMC-1092-09给药组的血浆浓度归纳于表8中, 而相应的NX1843 批次 SMC-991-96给药组的血浆浓度归纳于表9中。对于NX1843 批次 SMC-1092-09和NX1843 批次 SMC-991-96的几个计算的药物动力学参数的评估值分别示于表10和表11中。

5 评估接受16.9-23.1 $\mu\text{g/mL}$ 的总GW1843 (平均值=19.1 $\mu\text{g/mL}$) 范围的NX1843 批次 SMC-1092-09的动物血浆中最大获得浓度(C_{max})。评估接受15.0-18.4 $\mu\text{g/mL}$ 的总GW1843 (平均值=16.8 $\mu\text{g/mL}$) 范围的NX1843 批次 SMC-991-96的动物血浆中的 C_{max} 。对于每组观察到的平均 C_{max} 值的差异不明显($p=0.2161$)。对于批次 SMC-1092-09和批次 SMC-991-96获得的评估(平均值 $\pm$ SD)最后半衰期($\text{Elim.t}_{1/2}$)分别为 12.2 ± 0.06 小时和 11.7 ± 0.96 小时。观察到的两个批次的半衰期差异不明显($p=0.3386$)。另外, 观察到的批次 SMC-1092-09 (70.8 mL/kg) 和批次 SMC-1092-991-96 (65.8 mL/kg) 的 V_{ss} 的平均值的差异不明显($p=0.2784$)。最后, 观察到的两个批次 [SMC-1092-09 $276 \pm 21.9\mu\text{g.hr/mL}$ 和 SMC-991-96 $293 \pm 53.8\mu\text{g.hr/mL}$] 的
10 AUC(0-inf)之间的差异或两个批次 [SMC-1092-09 $3.65 \pm 0.28\text{mL/hr.kg}$ 和 SMC-991-96 $3.50 \pm 0.59\text{mL/hr.kg}$ ($p=0.6623$)] 的清除率之间的差异不明显。

在本实施例中获得的批次 SMC-991-96的几个药物动力学参数明显不同于那些在实施例3中获得的相同批次的药物动力学参数。两个实施例使用相同的剂量, 给药路线和大鼠品种(参看实施例3)。使用二-tailed不成对t检验检测5个不同药物动力学参数的统计学意义。由于进行5个比较, 进行
20 Bonferroni校正使得 $p < 0.01$ 的值对于显著性是必须的。

对于所有5个被检测的参数, 观察的平均值的差异在统计学上是显著的。对于血浆清除率($p=0.0024$), 在稳态下的分布体积($p=0.0027$), 血浆最后半衰期($p=0.0003$), C_{max} ($p=0.0022$)和AUC(0-inf)($p=0.0010$)观察到统计学上
25 显著的差异。

本实施例的AUC(0-inf)为在实施例3中获得的AUC(0-inf)的55%。经过最初24小时的AUC检验[AUC(0-24)]表明在本实施例中批次 SMC-991-96($206 \pm 29.4\mu\text{g.hr/mL}$) 仅为在实施例3中相同批次($320 \pm 27.5\mu\text{g.hr/mL}$) 获得的

AUC(0-24)的64%。这一数据揭示在最初24小时观察到血浆暴露的主要差异。然而，AUC(0-24)为实施例3中AUC(0-inf)的61%，而在本研究中为70%，推测在本研究中发现的更快末端阶段(terminal phase)在减少全部血浆暴露中也起一定作用。

- 5 在批次 SMC-1092-09和SMC-991-96之间未观察到统计学上显著的药物动力学差异。

对于批次 SMC-991-96，在本实施例和实施例3的结果之间观察到统计学上显著的药物动力学差异。

- 10 本实施例和实施例3的动物重量的差异可能导致研究批次 SMC-991-96观察到的药物动力学差异。

实施例5

不同脂质体制剂的比较和动物体重对血浆药物动力学影响的确定

材料和方法

- 15 使用NX1843 批次号 SMC-1092-09,AT-1084-97B,AT-1084-91B 和 AT-1084-88B。

- 20 使用重207.78-228.76克的雄性Sprague-Dawley大鼠评估所有的1批次。另外，使用重403.12-418.28克的大雄性Sprague-Dawley大鼠评估巨大大鼠的批次 AT-1084-91B。根据动物福利和养护准则（NRC出版物，实验动物的养护和使用指南，1996），在Boulder Colorado进行存活阶段的研究。IACUC草约号N98010。在处理前及期间允许动物自由进食及饮水。

称重单个动物，并以1mg/kg体重的剂量通过静脉内药丸给药到尾静脉。

- 25 在给药后10, 30和90分钟和4, 8, 24, 32, 48, 72和96小时获得系列EDTA-血样（0.5mL）。将EDTA-血样立即加工成血浆，并保存于-20℃直至分析用。血浆样品是在异氟醚（isofluorane）麻醉条件下获得的。

如实施例3确定GW1843在血浆中的总浓度。

如实施例3所述评估静脉内给药GW1843或脂质体封装的GW1843后的总GW1843的药物动力学参数。

对于不成对数据，通过单向ANOVA进行统计检验。认为小于0.05的p值是显著的。使用GraphPad Instat 1.0版本（GraphPad软件）进行检验。

结果

将动物分派给5组之一（每组n=4）。组A-D由平均重223克的动物组成，而组E由平均重409克的动物组成。每组中的动物接受1mg/kg静脉内药丸剂量的脂质体封装的GW1843制剂。组A给药批次 AT-1084-97B，一种包含碱性固有的pH的制剂。组B，C和E每个给药标准的NX1843制剂。组B给药来自批次 SMC-1092-09的检验物，而组C和E给药来自批次 AT-1084-91B的检验物。组D动物给药批次 AT-1084-88B，一种由高类脂/药物比构成的批次。在每个给药组中，每只动物的总血浆GW1843浓度示于表12-16。在每个给药组中，对于每只动物的几个计算的药物动力学参数的评估值示于表17-21中，所述药物动力学参数通过非-间隔分析确定。对所有5组的清除率[剂量($\mu\text{g/kg}$)/AUC(0-inf)($\mu\text{g}\cdot\text{hr/mL}$)]进行单向ANOVA。该检验揭示在组间存在明显差异($p<0.0001$)。进行7个后检验（在组A和B，A和C，B和C，B和D，B和E，C和D，以及C和E之间），结果讨论如下。

相同NX1843制剂的两个独立批次的药物动力学参数的内-研究分析（intra-study analysis）

在等大小（~220克）大鼠中比较NX1843相同标准脂质体制剂的两个独立批次。组B动物给药批次 SMC-1092-09，而组C动物给药批次 AT-1084-91B。组B获得的血浆最后半衰期（ 10.6 ± 1.10 小时）与组C获得的最后半衰期（ 11.7 ± 0.535 小时）没有明显差异。尽管组B获得的AUC(0-inf)（ $253\pm 28.4\mu\text{g}\cdot\text{hr/mL}$ ）似乎少于组C获得的AUC(0-inf)（ $347\pm 51.2\mu\text{g}\cdot\text{hr/mL}$ ），但是在清除率的单向ANOVA分析后进行的后检验表明，组B和组C之间在清除率上无统计学上显著的差异（ $p=0.0606$ ）。

尽管该血浆清除率结果也可被认为“或多或少显著”，但GW1843的相同脂质体封装制剂（NX1843）的独立批次的相似内-研究比较却提供了不一致的结果（实施例4）。在本研究中，雄性Sprague-Dawley大鼠的一组给药

1mg/kg的批次 SMC-1092-09，而雄性Sprague-Dawley大鼠的另一组给药1mg/kg的批次 SMC-991-96。在两组中所分析的包括血浆清除率的任何一种血浆药物动力学参数上，本研究未显示统计学上的显著差异（ $p=0.6623$ ）。

5 表22归纳了从NX1843的标准制剂的三个独立的批次的两项研究中获得
的总GW1843血浆药物动力学参数（实施例4和5）。在给药1mg/kg静脉内药
丸剂量的检验物后，所有这些数据已从等重的雄性Sprague-Dawley大鼠进行
测定。总的说来，根据这些数据，在相同脂质体制剂的不同批次之间未观
察到总GW1843血浆药物动力学参数上的批次之间的差异。

10 获自在等重大鼠中以GW1843标准脂质体制剂（NX1843）的相同批次进行
的两项研究的药物动力学参数的内-研究分析

在本研究中，大鼠（组B）给药1mg/kg静脉内药丸剂量的批次 SMC-
1092-09。在实施例4中，相似重量的一组大鼠也给药1mg/kg静脉内药丸剂
量的批次 SMC-1092-09。对于在本实施例和实施例4（研究R990198-138E）中
15 给药该批次的检验物的大鼠所获得的总GW1843血浆药物动力学参数示于表
22中。未检测到研究之间存在明显差异。对于在本实施例（研究R2000007-
138E）中组B所获得血浆最后半衰期（ 10.6 ± 1.10 小时）与在实施例4（研究
R990198-138E）中对于SMC-1092-09组获得的最后半衰期（ 12.2 ± 0.06 小时）
无明显差异。另外，对于在本实施例中组B获得的血浆清除率（ $3.99 \pm$
20 0.417 mL/hr.kg ）与在实施例4（研究R990198-138E）中对于SMC-1092-09组
获得的血浆清除率（ $3.65 \pm 0.283 \text{ mL/hr.kg}$ ）无明显差异。

高的固有pH和高类的脂/药物比率制剂

在约220克动物中检测两种备选的脂质体GW1843制剂的药物动力学分
布。组A给药含高固有pH的制剂，而组D给药含增加的类脂/药物比率的制剂。
25 为了比较，同样由~220克动物组成的组B和C给药两个独立批次的GW1843
的标准脂质体制剂（NX1843）。

对于高固有pH组和给药标准制剂的两组观察的血浆药物动力学参数之
间无明显差异。值得注意的是，组A的最后半衰期（ 9.83 ± 0.215 小时）与组

B (10.6 ± 1.10 小时) 或组C (11.7 ± 0.535 小时) 观察的最后半衰期无明显差异。另外, 组A的AUC(0-inf)($283 \pm 23.7 \mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$) 在组B($253 \pm 28.4 \mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$) 和组C($347 \pm 51.2 \mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$) 获得的AUC(0-inf)之间。接着对于清除率的单向ANOVA分析的后检验表明在组A ($3.56 \pm 0.295 \text{mL}/\text{hr}\cdot\text{kg}$) 和组B ($3.50 \pm 0.589 \text{mL}/\text{hr}\cdot\text{kg}$) 之间或在组A和组C ($2.94 \pm 0.489 \text{mL}/\text{hr}\cdot\text{kg}$) 之间, 在清除率方面无统计学上的明显差异。

观察高类脂/药物比率组(组D)和给药标准制剂的两组(组B和C)的血浆药物动力学参数之间存在明显差异。值得注意的是, 组D的最后半衰期(11.7 ± 1.88 小时)与组B(10.6 ± 1.10 小时)或组C(11.7 ± 0.535 小时)观察的最后半衰期无明显差异。然而, 组D获得的AUC(0-inf)($169 \pm 28.8 \mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$)似乎小于组B($253 \pm 28.4 \mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$)或组C($347 \pm 51.2 \mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$)获得的AUC(0-inf)。接着清除率的单向ANOVA分析进行的后检验表明在组D和组B之间($p=0.0038$)和组D和组C之间($p=0.0005$)存在统计学上的明显差异。

在大/小鼠中NX1843药物动力学

在雄性Sprague-Dawley大鼠中进行的先前药物动力学研究的检验(实施例2, 3和实施例4)揭示, 给药 $1 \text{mg}/\text{kg}$ 静脉内药丸剂量的脂质体封装的GW1843(NX1843)后, 总GW1843血浆清除率($\text{mL}/\text{hr}\cdot\text{kg}$)可能随着动物重量而改变。为了检验该假设, 在本研究中给药两组雄性Sprague-Dawley大鼠 $1 \text{mg}/\text{kg}$ 静脉内药丸剂量的相同批次的NX1843(组C和E)。动物重量在组之间不同, 使得组C中动物平均重226克, 而在组E中平均重409克。获得药物动力学参数的检验揭示可能存在差异。例如, 组E动物的血浆最后半衰期(14.0 ± 2.03 小时)比组C动物(11.7 ± 0.535 小时)长。另外, 组E动物的 C_{max} ($25.2 \pm 1.33 \mu\text{g}/\text{mL}$)比组C动物($20.4 \pm 1.23 \mu\text{g}/\text{mL}$)大。这些差异也反映在组C和E之间在AUC(0-inf)方面的差异。组E动物具有 $549 \pm 58.0 \mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$ 的AUC(0-inf), 而组C动物具有 $347 \pm 51.2 \mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$ 的AUC(0-inf)。然而, 组C和组E之间的清除率的单向ANOVA分析表明仅“或多或少明显”的结果($p=0.0522$)。可是当结合以来自先前实施例(研究号R990164-138E和R990198-138E)的结果时, 大和小动物之间的差异变得明显。表23表示获自两个独立的批次

的NX1843的相同制剂的血浆药物动力学参数的结合结果，所述NX1843的相同制剂在大和小动物中均进行了研究。在大动物的两个实验具有相似的清除率值， $1.93 \pm 0.207 \text{ mL/hr.kg}$ 和 $1.84 \pm 0.191 \text{ mL/hr.kg}$ 。然而，在较小动物中，在两个独立的实验中获得了更高的清除率（ $3.50 \pm 0.589 \text{ mL/hr.kg}$ 和 $2.94 \pm 0.489 \text{ mL/hr.kg}$ ）。因此，从结合的数据可以清楚看出当由 $\mu\text{g/kg}$ 要素决定时，清除率的值不同。然而，如果使用总剂量（ mL/hr ）确定清除率，则对于大和小动物而言，获得的清除率值是相似的。用总剂量方法再计算示于表23中的清除率值，对于由约220克动物组成的两个研究给出了 0.73 mL/hr 和 0.65 mL/hr 的清除率，对于由约400克动物组成的两个研究提供 0.75 mL/hr 和 0.74 mL/hr 的清除率。

在等大小动物中，在脂质体封装的GW1843制剂（批次 SMC-1092-09）的血浆清除率（ mL/hr.kg ）之间未观察到统计学上明显的差异，所述脂质体制剂在本实施例和在实施例4中获得。

在等大小动物中，在相同脂质体封装GW1843制剂（NX1843）的两个独立的批次（SMC-1092-09和AT-1084-91B）之间未观察到在血浆清除率（ mL/hr.kg ）方面存在统计学上的明显差异。

基于动物重量观察标准制剂的血浆清除率（ mL/hr.kg ）的差异。这个结论是基于在本实施例中大和小动物批次AT-1084-91B的比较和基于在本实施例和实施例4中小动物批次SMC-1092-09的比较，以及基于在实施例4中小动物和实施例3中的大动物批次SMC-996-91的比较。因此，在实施例4中为解释PK差异提供的假设已得到验证。

当以 $[\text{总剂量}(\mu\text{g})/\text{AUC}(0\text{-}\infty)(\mu\text{g.hr/ML})]=\text{mL/hr}$ 计算时，血浆清除率在大和小大鼠间似乎是不变的。

在等大小的动物中，高类脂/药物比率制剂（批次AT-1084-88B）比标准制剂（批次SMC-1092-09和AT-1084-91B）或高固有pH制剂（批次AT-1084-97B）清除得更快，但从血浆清除仍比游离GW1843（实施例2和3）明显慢得多。

在等大小动物中，高固有pH制剂（批次AT-1084-97B）具有与标准制剂

（批次SMC-1092-09和AT-1084-91B）相似的血浆清除率。因此，该制剂从血浆清除同样比游离GW1843（实施例2和3）明显慢得多。

实施例6

5 单一静脉内药丸给药后血浆药物动力学

本实施例的目的是扩展备选的脂质体封装的GW1843制剂的分析。在此处检验了由4:1HSPC/胆甾醇摩尔比组成的制剂。其它制剂由2:1摩尔比组成。已知胆甾醇稳定脂质体结构，因此期望增加的HSPC/胆甾醇比率可增加血浆清除率。

10 结果

使用NX1843 批次号AT-1105-32（表1A）。

重244.57-257.19克的雄性Sprague-Dawley大鼠用于此研究。根据动物福利和养护准则（NRC Publication Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 1996），在Boulder, Colorado进行存活阶段的研究。在处理前及期间允许动物自由进食及饮水。

称重各个动物，并以1mg/kg体重的剂量通过静脉内药丸(bonus)给药到尾静脉。

在给药后10，30和90分钟和4，8，24，32，48，和72小时获得EDTA-血样（0.5mL）。当动物在麻醉（isoflurane）状态下取样，并将EDTA-血样立即加工成血浆，并将血浆样品保存于-20℃直至分析用。

如实施例3确定GW1843在血浆中的总浓度。

如实施例3所述评估静脉内给药脂质体封装的GW1843后总GW1843的药物动力学参数。

通过在相同实验中获得的的数据的不成对t-检验进行处理组的比较。认为小于0.05的p值是有意义的。使用GraphPad Instat 1.0版本（GraphPad软件）进行检验。

结果

每个动物的总GW1843血浆浓度归纳于表24中。脂质体封装的GW1843

(NX1843) 4:1HSPC/胆甾醇摩尔比制剂的几个计算的药物动力学参数的评估值于表25中提供。

评估总GW1843在血浆中的最大获得浓度(C_{max}), 范围为14.4 $\mu\text{g/mL}$ (大鼠#2)-17.2 $\mu\text{g/mL}$ (大鼠#3)。所有四只动物的平均 C_{max} 为15.8 $\mu\text{g/mL}$ 。评估的
5 (平均值 $\pm$ SD) 最后半衰期($\text{Elim.t}_{1/2}$)为 9.92 ± 1.98 小时, 其完全在标准的脂质体封装的GW1843制剂观察的范围内。总GW1843血浆浓度对时间曲线[AUC(0-inf)]下的面积为 $213 \pm 22.8 \text{ hr} \cdot \mu\text{g/mL}$ 。曲线下的面积稍微小于对于标准的脂质体制剂观察到的面积, 范围为251-342 $\text{hr} \cdot \mu\text{g/mL}$ 。这反映在4:1 HSPC/胆甾醇制剂获得血浆清除率值($4.47 \pm 0.472 \text{ mL}/(\text{hr} \cdot \text{kg})$)。在用几乎
10 相等大小的动物进行的4个实验中, 对于三个不同批次的标准制剂获得的平均清除率值的范围为3.50-3.99 $\text{mL}/(\text{hr} \cdot \text{kg})$ 。

先前的研究已表明在 $\text{mL}/(\text{hr} \cdot \text{kg})$ 基础上的血浆清除率随着动物重量的增加而降低(实施例5)。在本研究中动物的平均重量为250克, 而标准脂质体封装的GW1843制剂的比较研究是用平均重220克(对于四项研究, 动物的
15 平均重量范围为215-224克)的大鼠进行的。因此, 在本研究中使用具有约220克重量的动物有可能增加观察到的差异。

由4:1类脂/胆甾醇比率组成的NX1843制剂(批次AT-1105-32)从血浆中清除比标准脂质体制剂稍快些。AT-1105-32的清除率为 $4.74 \pm 0.472 \text{ mL}/(\text{hr} \cdot \text{kg})$ 。在4个实验中(实施例4和5), 对于三个不同批次的标准
20 制剂, 在几乎等大小的动物中获得的平均清除率值的范围为3.50-3.99 $\text{mL}/(\text{hr} \cdot \text{kg})$ 。该制剂(批次AT-1105-32)从血浆中清除仍然明显比游离GW1843更慢些(参见实施例2和3)。

实施例7

对TS抑制剂GW1843U89和脂质体制剂NX1843的临床前研究

25 方法

雌性Nu/Nu小鼠(18-24克, 10-14周龄)获自Harlan Sprague Dawley, 并饲养于微型分离器过滤架(microisolator filtration racks), 用过滤的酸化和无菌实验室固型事物随意饲养。人结肠肿瘤异种移植模型(HCT-8, 胸

5 昔激酶 (TK) $-/-$ 获自 Dr. Youcef M. Rustum (Roswell Park, Buffalo, 纽约), 并且本身作为评估胸昔激酶抑制剂的有用模型而建立。允许动物在移植肿瘤细胞前1周适应它们的新环境。通过将收获的肿瘤细胞注射入腋窝区小鼠肋腹上个别皮下部位建立肿瘤。肿瘤生长至约 $200 \pm 50 \text{ mm}^3$ 大小。然后根据

5 体重将动物分类, 分四只动物/笼, 并为了持久鉴定在尾部刺字。通过尾静脉内药丸注射对每个由8只产生肿瘤的小鼠组成的动物组给药一周剂量的实验制剂。用游标卡尺以正确的角度测量, 使用公式 $(L \times W^2/2)$ 确定肿瘤体积, 并每周两次认定体重。将数据标绘为体重对以天数计的时间的变化%, 和肿瘤体积增加对天数的%。

10 从实验结果计算抗-肿瘤活性的方法如下:

抑制和消退计算通常用于评估实验数据: $\%T/C = 100 \times 1 - (T/C)$

T=对于处理组的 (平均) 时间, 以天计, 以达到切去大小 (cutoff size) (2克)

C=对于对照组的 (平均) 时间, 以天计, 以达到切去大小 (2克)

15 $\%T/C$ 值少于10%是有明显活性的表现; 和
 $\%T/C$ 值小于或等于20%是有中等活性的表现。

$\%$ 肿瘤生长抑制

$\%TGI = 100(W_c - W_t)/W_c = 100(1 - W_t/W_c)$

W_c 是在时间x对照组的平均肿瘤重量

20 W_t 是在时间x处理组的平均肿瘤重量

如果各组间起始肿瘤尺寸很大, 对照和处理组在肿瘤生长的相对差异 (RW) 被用作校正最初的差异。

$RW = W_i/W_o$, 其中 W_i 是在时间x的平均肿瘤重量, W_o 是最初平均肿瘤重量。

25 $\%$ 消退 $= 100 (W_o - W_i) / W_o$; 其中 W_o 是处理开始处理组的平均肿瘤重量, W_i 是处理后某组在某一时间x的平均肿瘤重量。常常, 时间x=给药最终治疗剂量后24-48小时。

生长延迟测量用于评估实验结果:

对于sc正在生长肿瘤的肿瘤细胞死亡计算：

$$\log_{10}\text{细胞死亡（总量）}=[\text{T-C值（以天计）}]/(3.32)(T_d)$$

其中T-C=处理和对照肿瘤达到确定的终点的时间差，以天计；T_d是来自最佳拟合（best-fit）直线的肿瘤体积倍增时间，以天计，所述最佳拟合直线来自对照肿瘤指数生长（100-800mh范围）的log-线性生长曲线图。通过从T-C值中减去处理期间的持续时间，然后被3.32×T_d除来提供T-C值到净log₁₀肿瘤细胞死亡的转换。

HCT-8, TK-/-异种移植模型

最初的实验，称为NMX-427检验GW1843U89在两个不同的剂量水平50和100mg/kg/天×17天的影响。对照组仅给药载体。实验证实在两个给药组之间几乎无差异，两个药物组与对照组均存在显著差异，两个药物组对于50和100mg/kg组分别具有3.0和3.3的log细胞杀灭值。存在两种持久治愈，其中一种在每个给药组中保持至第57天实验的终止。通过总体重降低测量的副作用毒性在两个药物处理组中均最小，在对照组中最大。这可反映肿瘤诱导的恶病质，一种被某些积极生长的肿瘤所诱导的结果。

第二个异种移植比较了脂质体制剂的GW1843U89（表1A；NA-1022-59A）与游离药物的抗-肿瘤功效，所述GW1843U89每隔一天给药7.5mg/kg，游离药物每天给药25和50mg/kg。脂质体药物的量仅允许14天的定量（7剂）。提供的游离药物的总量为350mg/kg和700mg/kg，而在NX1843组，提供的总药量为52.5mg/kg。表26归纳了清楚地证实脂质体药物比游离药物更有效的结果，所述脂质体药物需要的总药量更少，可以更低频率的时间表给药。与25和50mg/kg游离药物组相比，脂质体药物的作用证实游离药物有更强的功效，其具有83%消退和4.6的log细胞杀灭值，而25和50mg/kg游离药物组不发生肿瘤消退，并且分别为1.5和3.5的log细胞杀灭值。图2表示肿瘤生长曲线，并证实游离药物的用药反应效果，和用NX1843组更延迟的肿瘤派生(outgrowth)。药物对体重的相对作用示于图3。在所有药物组中体重的降低是短暂并且可逆的，不超过10%。

用NX1843进行用药时间表研究（表1A；SMC-991-96），其中HCT-8产生肿瘤的裸鼠按下述剂量和时间表静脉内给药：25mg/kg；数量传送1，8；15mg/kg；QD(1,3,5)×2；7.5mg/kg；QD(1-5)×2。除了这些给药组，在第1-5天以100mg/kg给药游离药物，并且在第二周重复。在本实验中还包括如下：在第1和8天以100mg/kg给药5-fluorouracil(SFU)；在第1天和8天以6mg/kg给药喜树碱类似物的脂质体制剂（NX211）；在第1天和8天分别给药6mg/kg和100mg/kg的NX211+5FU；第1，8天给药6mg/kg的NX211+第1-5 x 2天给药100mg/kg的游离GW1843；和第1，8天给药6mg/kg和25mg/kg的NX211+NX1843。结果示于表27中。所有3个NX1843给药组证实每组具有3.9-4.2范围的log细胞杀灭（LCK）值，1/8持久治愈的相等功效。当NX211结合以NX1843或GW1843时，总的肿瘤作用相似，具有3.4的LCK值。然而，存在由NX211+NX1843结合产生的2/8持久治愈。单独5-FU、单独NX211和单独GW1843给药组抑制肿瘤生长的功效均较小，LCK值分别为1.5，1.9和2.4。功效最小的给药组为单独5-FU，单独NX211，和5-FU+NX211结合。游离GW1843给药组在限制肿瘤生长方面稍微好些，但对肿瘤消退和肿瘤生长的总抑制最有效的是NX1843给药组，产生5/32的持久治愈。体重降低是短暂并且可逆的，并且不超过20%。然而，包含药物的NX211和5-FU组表现最大的体重降低值。

另一个补充以NX1843的实验是用药反应研究，即对HCT-8产生肿瘤的小鼠在第1和8天静脉内以下述剂量给药NX1843：25，20，15，10，5mg/kg。除了最低组，所有给药组中最初的肿瘤皱缩是相似的，所述最低组是与抑制92-99%肿瘤生长的其余4组相比，其抑制约80%的肿瘤生长。在任何一个给药组中均对体重无明显影响，并产生7/32的治愈。在图4和表28中可见，用药依赖的肿瘤反应是明显的。

在NX1843脂质体制剂中产生几种改变，然后在HCT-8异种移植模型中检验以确定是否可确定功效方面的明显差异。所述改变包括HSPC:胆甾醇从4:1-2:1，相对固有酸度从pH5-9的范围。结果示于表29中。

本研究证实当在HCT-8异种移植模型中比较NX1843的不同制剂时，在

抗肿瘤功效方面未看到明显差异。在不同制剂检测之间的药物动力学差异也最小，并且无明显差异。

5 在SCID小鼠Molt4白血病模型中进一步检验NX1843。在该模型中，发病率和死亡率是测量的终点。通过静脉内注射移植 1×10^7 肿瘤细胞产生肿瘤，等待4天，然后启动处理。处理组由25mg/kgNX1843+/-胸苷磷酸化酶（Tpase）组成。Tpase处理将小鼠循环的胸苷水平降低至人的水平（50-100nM）。对照组仅给药D5W。结果示于图5，并证实不考虑Tpase处理，NX1843增加了成活率。

10 根据具体举例说明的实施方案，以描述了此处所要求的本发明。然而，上述说明书不是意图将本发明限制在举例说明的实施方案上，并且熟练的技术人员可在本发明的范围和精神内进行更改，所述本发明如在上述说明书中所描述。本发明包括替换，更改和相等物，这些可包括在如后附的权利要求所定义的本发明的正确的精神和范围内。

表1A. 在不同的HSPC:胆甾醇摩尔比，和不同的pH和水化时药物溶液的浓度下制备的GW1843脂质体制剂：

制剂 I.D.#	HSPC： 胆甾醇 摩尔比	水化时药 物溶液的 pH	水化时药 物浓度 mg/l	在终产物 中总类脂 浓度mg/ml	GW1843 在 总产物中的 浓度mg/ml	在终产物 中HSPC/药 物摩尔比	在终产物中 总类脂/药 物摩尔比	中值粒 径 nm	终产 物的 pH
AT-1084-88B	2:1	7	20	41	0.33	63	92	44	7.1
AT-1084-86B	4:1	7	100	15	0.51	17	21	57	5.5
AT-1084-91B	2:1	7	100	50	2.4	11	16	55	6.2
AT-1084-95B	2:1	7	100	44	1.7	14	20	54	3.2
AT-1084-97B	2:1	9	100	36	1.7	11	16	78	6.1
AT-1105-32	4:1	7	100	23	0.74	13	17	54	6.5
SMC-1092-09	2:1	7	100	59	3.5	8.9	13	43	7.0
SMC-991-96	2:1	7	100	67	3.2	11	16	42	6.9
NA-1022-63A	2:1	8	225	34	2.0	8.7	13	42	6.1
NA-1022-59A	2:1	8	200	32	1.3	13	19	60	5.9
GC-1020-36	2:1	7	116	34	2.2	8.0	12	39	6.0
GC-1007-27	2:1	7	100	35	2.5	7.2	11	31	7.0

表1B. 附加的GW1843脂质体制剂

制剂I.D.	类脂	类脂的摩尔比	在终产物中GW1843浓度 mg/ml	中值粒径 nm	pH
AL1230-058	HSPC: 胆甾醇	4:1	2.7	29	6.5
AL1230-052	DOPC: 胆甾醇	2:1	1.4	30	6.3
AL1230-048	DEPC: 胆甾醇	2:1	1.9	26	6.9
AL1230-055	Soy-PC: 胆甾醇	2:1	1.5	43	6.6
AL1230-041	HSPC: 胆甾醇:DSPG	2:1:0.1	3.6	43	6.3

表1C. 含不同赋形剂的脂质体制剂

制剂I.D.	赋形剂和浓度	终产物的pH
NHC1202-027-4	9%蔗糖	6.5
NHC1202-027-1	1mM磷酸盐和9%蔗糖	7.5
NHC1202-027-2	5mM磷酸盐和9%蔗糖	7.7
NHC1202-027-3	1mM柠檬酸盐和9%蔗糖	7.1
NHC1202-089-2	1mM琥珀酸盐和9%蔗糖	6.6

表1D. 含不同赋形剂的脂质体制剂的中值粒径稳定性 (2-8℃)

制剂I.D.	T=0	T=3月
NHC1202-027-4	35	36
NHC1202-027-1	37	40
NHC1202-027-2	37	41
NHC1202-027-3	38	39
NHC1202-089-2	37	46 (1个月)

表2. 对大鼠单一静脉内药丸给药1mg/kg后，大鼠中GW1843血浆浓度

组	游离的GW1843			脂质体pH 7.0			脂质体pH 7.3			脂质体pH 7.4			脂质体pH 7.5		
动物#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
时间(h)	GW1843血浆浓度 (µg/mL)														
0.083	0.52	0.76	0.76	13.2	14.0	16.1	22.2	22.2	21.8	18.3	17.2	19.9	24.1	22.2	22.3
0.250	0.18	0.20	0.19												
0.500	0.10	0.11	0.10												
1.000	BLQ	0.06	0.06												
0.166															
0.750				10.7	10.8	11.7	16.0	16.1	16.2	18.6	17.1	18.8	15.5	17.0	19.1
2.000				7.98	8.22	9.14	14.7	12.5	12.1	15.3	12.5	14.5	14.7	16.9	17.8
4.000				7.38	8.15	9.07	11.9	12.9	11.3	12.1	10.8	13.7	13.6	15.2	14.8
8.000				6.35	7.49	7.53	11.1	12.6	11.3	12.2	10.6	12.1	14.0	13.4	13.5
24.00				3.75	3.74	4.27	6.10	6.52	5.96	6.87	5.13	6.74	6.75	7.06	6.84
32.00				3.23	3.02	3.25	4.07	4.32	4.27	4.36	4.19	4.96	4.69	4.86	4.37
48.00				1.61	1.54	1.84	2.71	2.77	2.63	2.27	2.44	3.02	3.14	3.00	2.69

表3. 对大鼠单一静脉内药丸给药1mg/kg后，通过GW1843非间隔分析确定的药物动力学参数

	AUCinf (h×ng/mL)	AUClast (h×ng/mL)	Cl (mL/h×kg)	Cmax (ng/mL)	MRTinf (h)	t1/2 (h)	Vss (mL/kg)
游离的药物	263	219	3805	1281	0.5	0.5	1886.8
脂pH7.0	266740	220640	3.75	15548	27.4	19.2	102.6
脂pH7.3	412307	339339	2.43	24124	27.3	18.7	66.2
脂pH7.4	412188	344089	2.43	18541	26.5	18.3	64.3
脂pH7.5	462920	387013	2.16	24790	26.1	17.9	56.3

表4. 对雄性Sprague-Dawley大鼠单一静脉内药丸给药1mg/kg的游离GW1843后, GW1843血浆浓度

时间(hr)	GW1843在血浆中的浓度 (µg/mL)					
	大鼠1	大鼠2	大鼠3	大鼠4	平均值	SD
0.083	0.991	0.823	1.02	0.974	0.952	0.088
0.250	0.214*	0.212	0.270	0.325	0.255	0.054
0.500	0.117	0.091**	0.127	0.138	0.118	0.020

*实际在0.267小时取样。

**在确定的LLQ (0.1µg/mL) 下的数据。通过外推法获得的值。

表5. 对雄性Sprague-Dawley大鼠单一静脉内药丸给药1mg/kg的脂质体封装GW1843 (NX1843; SMC-991-96) 后, 总GW1843血浆浓度

时间(hr)	血浆中总GW1843的浓度 (µg/mL)					
	大鼠5	大鼠6	大鼠7	大鼠8	平均值	SD
0.167	21.0	23.9	26.6	23.7	23.8	2.29
0.500	22.1	23.3	22.9	20.8	22.3	1.10
1.500	15.7	21.1	21.6	18.0	19.1	2.77
4.000	17.9	17.8	17.9	16.3	17.5	0.78
7.966	14.0	15.6	17.2	13.9	15.2	1.56
24.18	7.22	8.17	8.64	7.09	7.78	0.75
31.98	5.21	7.64	6.71	5.96	6.38	1.04
48.50	2.36	3.25	3.19	2.77	2.89	0.41
72.55	1.01	1.40	1.42	1.13	1.24	0.20
96.33	0.329	0.460	0.487	0.277	0.388	0.101

表6.对雄性Sprague-Dawley大鼠单一静脉内药丸给药1mg/kg的游离GW1843后, GW1843血浆药物动力学参数(非-间隔分析)

动物编号	大鼠1	大鼠2	大鼠3	大鼠4	平均值	SD
参数						
重量(kg)	0.38112	0.39114	0.38346	0.34391	0.37498	0.021
AUC(0-inf)($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$)	0.27	0.23	0.29	0.29	0.27	0.028
AUC(0-last)($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$)	0.25	0.21	0.26	0.26	0.25	0.024
CL($\text{mL}/\text{hr}\cdot\text{kg}$)	3,660	4,410	3,470	3,430	3,740	456
Cmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1.99	1.62	1.98	1.69	1.82	0.193
MRT(0-inf)(hr)	0.18	0.17	0.19	0.21	0.19	0.017
T1/2(hr)	0.14	0.14	0.14	0.15	0.14	0.005
Vss(mL/kg)	654	762	650	709	694	52.9

表7. 对雄性Sprague-Dawley大鼠单一静脉内药丸给药1mg/kg的脂质体封装的GW1843 (NX1843;SMC-991-96) 后, GW1843血浆药物动力学参数(非-间隔分析)

动物编号	大鼠5	大鼠6	大鼠7	大鼠8	平均值	SD
参数						
重量(kg)	0.39031	0.38086	0.37256	0.42019	0.39098	0.021
AUC(0-inf)($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$)	469	565	578	482	524	55.9
AUC(0-last)($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$)	461	554	566	478	515	52.9
CL($\text{mL}/\text{hr}\cdot\text{kg}$)	2.13	1.77	1.73	2.08	1.93	0.21
Cmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	22.1	24.3	28.7	25.3	25.1	2.75
MRT(0-inf)(hr)	23.6	25.7	25.3	24.1	24.7	0.99
T1/2(hr)	16.4	17.0	17.5	15.5	16.6	0.86
Vss(mL/kg)	50.4	45.5	43.8	50.0	47.4	3.28

表8. 对雄性Sprague-Dawley大鼠静脉内药丸给药1mg/kg的脂质体封装的GW1843（NX1843）批次 SMC-1092-09后，总GW1843血浆浓度

时间(hr)	NX1843在血浆中的浓度(µg/mL)					
	大鼠5	大鼠6	大鼠7	大鼠8	平均值	SD
0.183	16.9	15.8	15.5	20.3	17.1	2.20
0.517	13.2	13.5	13.2	16.0	14.0	1.36
1.650	11.7	12.1	11.6	11.5	11.7	0.263
4.100	10.3	9.7	10.3	11.0	10.3	0.532
8.000	8.51	8.34	8.72	9.96	8.88	0.735
24.000	4.79	4.27	4.32	5.71	4.77	0.667
32.000	3.32	2.86	2.57	2.72	2.87	0.324
48.167	1.48	1.08	1.06	1.32	1.24	0.202
72.200	0.379	0.250	BLOQ	BLOQ	-	-
96. 000	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	-	-

5 BLOQ-量化的下限

表9. 对雄性Sprague-Dawley大鼠静脉内药丸给药1mg/kg的脂质体封装的GW1843 (NX1843) 批次 SMC-991-96后, 总GW1843血浆浓度

时间(hr)	NX1843在血浆中的浓度($\mu\text{g/mL}$)					
	大鼠5	大鼠6	大鼠7	大鼠8	平均值	SD
0.183	18.0	15.9	15.1	14.6	15.9	1.50
0.500	17.0*	13.0	14.2	13.8	14.5	1.74
1.650	15.5	13.3	10.6	12.2	12.9	2.06
4.100	13.2	10.5	10.2	10.7	11.2	1.38
8.000	11.8	7.8	9.5	9.5	9.7	1.64
24.000	6.00	4.20	5.17	4.45	4.96	0.809
32.000	4.31	2.21	2.97	3.24	3.18	0.869
48.167	1.80	0.864	1.32	1.11	1.27	0.397
72.200	0.470	BLOQ	0.247	BLOQ	-	-
96.000	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	-	-

5 *在0.517分钟取的样品

BLOQ-量化的下限

表10. 对雄性Sprague-Dawley大鼠单一静脉内药丸给药1mg/kg的脂质体封装的GW1843（NX1843）批次SMC-1092-09后，GW1843血浆药物动力学参数（非-间隔分析）

动物编号	大鼠1	大鼠2	大鼠3	大鼠4	平均值	SD
参数						
重量(kg)	0.22475	0.20796	0.21927	0.20716	0.21479	0.00864
AUC(0-inf)($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$)	285	257	259	302	276	21.7
AUC(0-last) ($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$)	278	253	240	280	263	19.5
CL($\text{mL}/\text{hr}\cdot\text{kg}$)	3.51	3.89	3.87	3.31	3.65	0.283
Cmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	19.4	17.2	16.9	23.1	19.2	2.86
MRT(0-inf)(hr)	21.0	18.9	18.7	19.2	19.5	1.05
T1/2(hr)	13.1	11.7	12.0	11.9	12.2	0.63
Vss(mL/kg)	73.8	73.5	72.5	63.4	70.8	4.96

5 表11. 对雄性Sprague-Dawley大鼠单一静脉内药丸给药1mg/kg的脂质体封装的GW1843（NX1843）批次SMC-991-96后，GW1843血浆药物动力学参数（非-间隔分析）

动物编号	大鼠5	大鼠6	大鼠7	大鼠8	平均值	SD
参数						
重量(kg)	0.21681	0.21542	0.21783	0.21085	0.21523	0.00308
AUC(0-inf)($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$)	368	241	284	278	293	53.6
AUC(0-last) ($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$)	360	228	280	259	282	56.4
CL($\text{mL}/\text{hr}\cdot\text{kg}$)	2.72	4.15	3.53	3.60	3.50	0.589
Cmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	18.4	17.9	15.6	15.0	16.7	1.68
MRT(0-inf)(hr)	20.6	17.2	19.2	18.9	19.0	1.40
T1/2(hr)	13.0	10.8	11.2	11.8	11.7	0.96
Vss(mL/kg)	56.0	71.4	67.7	68.1	65.8	6.74

表12.对雄性Sprague-Dawley大鼠（组A）单一静脉内药丸给药1mg/kg脂质体封装的GW1843（NX1843）制剂后，所述制剂具有高的固有pH（批次 AT-1084-97B），总GW1843血浆浓度

时间(hr)	GW1843在血浆中的浓度($\mu\text{g/mL}$)					
	大鼠1	大鼠2	大鼠3	大鼠4	平均值	SD
0.167	16.6	18.5	19.4	15.1	17.4	1.93
0.500	15.6	14.9	15.5	14.2	15.1	0.645
1.567	12.6*	13.7	15.3	12.0**	13.4	1.45
4.000	11.9	10.5	12.9	11.1	11.6	1.04
7.550	10.5	10.7	10.8	9.06	10.3	0.813
24.067	4.78	5.07	5.31	4.41	4.89	0.388
31.917	2.03	2.81	3.38	2.94	2.79	0.562
48.283	0.764	1.10	1.14	0.799	0.951	0.197
72.250	0.135	0.180	0.185	BLOQ	0.167 ⁺	0.028 ⁺
96.000	NS	NS	NS	NS	-	-

5 BLOQ-量化的下限

NS-无样品

*在1.583小时取的样品

**在1.550小时取的样品

⁺三个确定的值的平均值和SD

表13. 对雄性Sprague-Dawley大鼠（组B）单一静脉内药丸给药1mg/kg脂质体封装的GW1843（NX1843）的标准制剂（批次SMC-1092-09）后，总GW1843血浆浓度

时间(hr)	GW1843在血浆中的浓度($\mu\text{g/mL}$)					
	大鼠5	大鼠6	大鼠7	大鼠8	平均值	SD
0.167	16.9	12.1	14.1	18.5	15.4	2.85
0.500	15.1	11.9	12.3	16.7	14.0	2.29
1.500	13.8	10.4	10.6	14.5	12.3	2.13
3.967	12.3	10.3	11.1	11.3	11.3	0.823
8.000	8.07	7.79	9.08	11.0	8.99	1.45
24.067	3.77	3.61	4.17	3.85	3.85	0.236
32.067	2.49	2.36	2.25	3.40	2.63	0.526
48.167	0.766	0.922	0.932	1.17	0.948	0.973
72.917	0.109	0.133	0.177	0.259	0.170	0.066
96.250	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	-	-

5 BLOQ-量化的下限

表14. 对雄性Sprague-Dawley大鼠（组C）单一静脉内药丸给药1mg/kg脂质体封装的GW1843（NX1843）的标准制剂（批次AT-1084-91B）后，总GW1843血浆浓度

时间(hr)	GW1843在血浆中的浓度($\mu\text{g/mL}$)					
	大鼠9	大鼠10	大鼠11	大鼠12	平均值	SD
0.167	20.5	17.6	18.4	21.3	19.5	1.74
0.517	19.4*	13.1**	17.4	20.8	17.7	3.35
1.500	15.7	12.4	14.7	14.9	14.4	1.42
3.967	16.2	11.5	13.4	15.7	14.2	2.17
8.000	11.9	9.51	11.5	13.7	11.7	1.72
24.017	6.33	4.59	5.68	6.45	5.76	0.852
32.067	3.92	2.70	3.85	4.06	3.63	0.628
48.167	1.83	0.974	1.53	1.73	1.52	0.382
72.917	0.299	0.273	0.291	0.403	0.317	0.059
96.250	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	-	-

BLOQ-量化的下限

5 *在0.500小时取的样品

**在0.583小时取的样品

表15. 对雄性Sprague-Dawley大鼠（组D）单一静脉内药丸给药1mg/kg脂质体封装的GW1843（NX1843）制剂后，所述制剂具有高类脂：药物比率（批次 AT-1084-88B），总GW1843血浆浓度

时间(hr)	GW1843在血浆中的浓度($\mu\text{g/mL}$)					
	大鼠13	大鼠14	大鼠15	大鼠16	平均值	SD
0.167	14.3	14.5	16.8	15.5	15.3	1.14
0.500	12.1	12.5	12.0	12.7	12.3	0.330
1.550	10.7	10.2	10.9	7.34*	9.79	1.66
4.000	7.95	7.75	9.10	6.55	7.84	1.04
7.550	6.61	6.30	6.53	3.51	5.74	1.49
24.067	2.58	2.53	2.11	1.68	2.23	0.420
31.917	1.62	1.69	1.66	1.24	1.55	0.210
48.283	0.674	0.636	0.561	0.432	0.576	0.107
72.250	0.250	0.239	0.187	0.138	0.204	0.052
96.000	NS	NS	NS	NS	-	-

NS-无样品

5 *在1.533小时取的样品

表16. 对雄性Sprague-Dawley大鼠（组E）单一静脉内药丸给药1mg/kg脂质体封装的GW1843（NX1843）的制剂（批次 AT-1084-91B）后，总GW1843血浆浓度

时间(hr)	GW1843在血浆中的浓度($\mu\text{g/mL}$)					
	大鼠17	大鼠18	大鼠19	大鼠20	平均值	SD
0.167	24.9	23.3	22.8	24.7	23.9	1.03
0.517	22.1	22.4	19.7	21.8	21.5	1.22
1.500	12.1	19.0	14.4*	18.0*	15.9	3.20
3.967	15.4	ND	17.5	ND	16.5 ⁺	1.48 ⁺
8.000	19.3	10.6	15.4	14.0	14.8	3.60
24.017	9.27	10.0	7.89	11.7	9.72	1.59
32.067	7.19	7.07	6.45	8.43	7.29	0.829
48.167	3.94	3.06	2.56	4.58	3.54	0.900
72.917	1.30	1.11	0.660	1.73	1.20	0.444
96.250	0.317	0.347	0.390	0.127	0.295	0.116

ND-无数据

5 *在1.533小时取的样品

+二个确定的数据点的平均值和SD

表17. 对雄性Sprague-Dawley大鼠（组A）单一静脉内药丸给药1mg/kg脂质体封装的GW1843（NX1843）制剂后，所述制剂具有高的固有pH（批次AT-1084-97B），总GW1843血浆药物动力学参数（非-间隔分析）

动物编号	大鼠1	大鼠2	大鼠3	大鼠4	平均值	SD
参数						
重量(kg)	0.22201	0.20778	0.22268	0.22589	0.21959	0.00805
AUC(0-inf)($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$)	270	290	312	258	283	23.7
AUC(0-last)($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$)	268	288	309	247	278	26.6
CL($\text{mL}/\text{hr}\cdot\text{kg}$)	3.71	3.45	3.20	3.87	3.56	0.295
Cmax($\mu\text{g}/\text{mL}$)	17.1	20.6	21.7	15.6	18.8	2.87
MRT(0-inf)(hr)	15.8	17.5	17.4	17.0	16.9	0.780
T1/2(hr)	9.67	10.1	9.89	9.64	9.83	0.215
Vss(mL/kg)	58.7	60.2	55.7	65.8	60.1	4.24

5 表18. 对雄性Sprague-Dawley大鼠（组B）单一静脉内药丸给药1mg/kg标准脂质体封装的GW1843（NX1843）制剂（批次 SMC-1092-09）后，总GW1843血浆药物动力学参数（非-间隔分析）

动物编号	大鼠5	大鼠6	大鼠7	大鼠8	平均值	SD
参数						
重量(kg)	0.23104	0.22129	0.22358	0.22141	0.22433	0.00460
AUC(0-inf)($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$)	244	226	250	293	253	284
AUC(0-last)($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$)	243	224	247	288	251	26.9
CL($\text{mL}/\text{hr}\cdot\text{kg}$)	4.10	4.42	4.00	3.42	3.99	0.417
Cmax($\mu\text{g}/\text{mL}$)	17.9	12.2	15.1	19.5	16.2	3.21
MRT(0-inf)(hr)	16.0	17.5	17.5	18.3	17.3	0.960
T1/2(hr)	9.42	10.2	10.9	12.0	10.6	1.10
Vss(mL/kg)	65.4	77.3	69.9	62.5	68.8	6.45

表19. 对雄性Sprague-Dawley大鼠（组C）单一静脉内药丸给药1mg/kg标准脂质体封装的GW1843（NX1843）制剂（批次AT-1084-91B）后，总GW1843血浆药物动力学参数（非-间隔分析）

动物编号	大鼠9	大鼠10	大鼠11	大鼠12	平均值	SD
参数						
重量(kg)	0.22583	0.22876	0.22839	0.22250	0.22637	0.00289
AUC(0-inf)($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$)	375	275	344	395	347	52.5
AUC(0-last)($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$)	370	271	339	387	342	51.2
CL($\text{mL}/\text{hr}\cdot\text{kg}$)	2.67	3.63	2.91	2.53	2.94	0.489
Cmax($\mu\text{g}/\text{mL}$)	21.1	19.8	18.9	21.6	20.4	1.23
MRT(0-inf)(hr)	18.9	18.3	18.9	19.3	18.9	0.412
T1/2(hr)	11.2	12.0	11.3	12.3	11.7	0.535
Vss(mL/kg)	50.3	66.5	55.1	48.8	55.2	8.01

5 表20. 对雄性Sprague-Dawley大鼠（组D）单一静脉内药丸给药1mg/kg脂质体封装的GW1843（NX1843）制剂后，所述制剂具有高类脂：药物比率（批次AT-1084-88B）后，总GW1843血浆药物动力学参数（非-间隔分析）

动物编号	大鼠13	大鼠14	大鼠15	大鼠16	平均值	SD
参数						
重量(kg)	0.22711	0.22021	0.21770	0.21706	0.22052	0.00460
AUC(0-inf)($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$)	187	183	180	126	169	28.8
AUC(0-last)($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$)	182	179	178	124	166	27.9
CL($\text{mL}/\text{hr}\cdot\text{kg}$)	5.34	5.47	5.54	7.92	6.07	1.24
Cmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	15.5	15.6	19.9	17.1	17.0	2.05
MRT(0-inf)(hr)	18.5	18.0	16.4	16.9	17.5	0.968
T1/2(hr)	14.4	11.4	10.3	10.6	11.7	1.88
Vss(mL/kg)	98.8	98.5	90.9	133	105	18.8

表21. 对0.4kg雄性Sprague-Dawley大鼠（组E）单一静脉内药丸给药1mg/kg标准脂质体封装的GW1843(NX1843)制剂(批次AT-1084-91B)后,总GW1843
5 血浆药物动力学参数（非-间隔分析）

动物编号	大鼠17	大鼠18	大鼠19	大鼠20	平均值	SD
参数						
重量(kg)	0.41828	0.40312	0.41142	0.40424	0.40927	0.00705
AUC(0-inf)($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$)	586	506	494	611	549	58.0
AUC(0-last) ($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$)	579	499	485	609	543	60.4
CL($\text{mL}/\text{hr}\cdot\text{kg}$)	1.71	1.98	2.02	1.64	1.84	0.191
Cmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	26.4	23.7	24.4	26.2	25.2	1.33
MRT(0-inf)(hr)	24.9	25.5	23.3	25.5	24.8	1.04
T1/2(hr)	14.3	15.0	15.5	11.0	14.0	2.03
Vss(mL/kg)	42.6	50.3	47.2	41.7	45.5	4.03

表22. 对220克雄性Sprague-Dawley大鼠单一静脉内药丸给药1mg/kg标准脂质体封装的GW1843（NX1843）制剂后获得的总GW1843血浆药物动力学参数的归纳表（非-间隔分析）

参数	NX1843 研究# R990198-138E 批次: SMC-1092-09	NX1843 研究# R990198-138E 批次: SMC-991-96	NX1843 研究# R2000007-138E 批次: SMC-1092-09	NX1843 研究# R2000007-138E 批次: AT-1084-91B
n	4	4	4	4
重量(kg)	0.215±0.00864	0.215±0.00308	0.224±0.0046	0.226±0.0029
剂量(mg/kg)	1.00	1.00	1.00	1.00
C _{max} (µg/mL)	19.1±2.86	16.8±1.70	16.2±3.21	20.4±1.23
AUC(0- inf)(µg.hr/mL)	276±21.9	293±53.8	253±28.4	347±51.2
AUC(0-last) (µg.hr/mL)	263±19.3	281±56.2	251±26.9	342±56.2
CL(mL/hr.kg)	3.65±0.283	3.50±0.589	3.99±0.417	2.94±0.489
T _{1/2} (hr)	12.2±0.06	11.7±0.96	10.6±1.10	11.7±0.535
V _{ss} (mL/kg)	70.8±5.00	65.8±6.74	68.8±6.45	55.2±8.01

表23. 对小（220克）对大（400克）雄性Sprague-Dawley大鼠单一静脉内药丸给药1mg/kg标准脂质体封装的GW1843（NX1843）制剂后获得的总GW1843血浆药物动力学参数的归纳表（非-间隔分析）

参数	NX1843 研究# R990198-138E 批次: SMC-991-96	NX1843 研究# R990164-138E 批次: SMC-991-96	NX1843 研究# R2000007-138E 批次: AT-1084-91B	NX1843 研究# R2000007-138E 批次: AT-1084-91B
n	4	4	4	4
重量(kg)	0.215±0.00308	0.391±0.021	0.226±0.0029	0.4093±0.0071
剂量(mg/kg)	1.00	1.00	1.00	1.00
C _{max} (µg/mL)	16.8±1.70	25.1±2.75	20.4±1.23	25.2±1.33
AUC(0-inf)(µg.hr/mL)	293±53.8	524±55.9	347±51.2	549±58.0
AUC(0-last) (µg.hr/mL)	281±56.2	515±52.9	342±56.2	543±60.4
CL(mL/hr.kg)	3.50±0.589	1.93±0.207	2.94±0.489	1.84±0.191
T _{1/2} (hr)	11.7±0.96	16.6±0.86	11.7±0.535	14.0±2.03
V _{ss} (mL/kg)	65.8±6.74	47.4±3.28	55.2±8.01	55.2±8.01

表24. 对雄性Sprague-Dawley大鼠单一静脉内药丸给药1mg/kg脂质体封装的GW1843（HSPC/胆甾醇摩尔比为4:1）后，总GW1843血浆浓度

时间(hr)	GW1843在血浆中的浓度(μg/mL)					
	大鼠1	大鼠2	大鼠3	大鼠4	平均值	SD
0.167	16.1	9.40	16.6	13.6	13.9	3.29
0.500	15.1	14.4	15.5*	15.0*	15.0	0.455
1.500	13.4	9.93	11.1	10.7	11.3	1.49
4.000	7.99	7.93	7.81	7.28	7.75	0.324
7.867	7.93	7.74	7.03	6.06	7.19	0.847
24.17	4.19	3.39 ⁺	3.23	3.21	3.51	0.464
32.43	2.83	2.53	1.66	2.53	2.39	0.505
47.83	1.10	0.616	0.425	0.921	0.766	0.302
72.37	0.137	BLOQ	BLOQ	BLOQ	-	-

BLOQ-量化的下限

*在0.517小时取的样品

5 ⁺在24.23小时取的样品

表25.对雄性Sprague-Dawley大鼠单一静脉内药丸给药1mg/kg脂质体封装的GW1843（HSPC/胆甾醇摩尔比为4:1）后，通过非-间隔分析获得的总GW1843

5 血浆药物动力学参数

动物编号	大鼠1	大鼠2	大鼠3	大鼠4	平均值	SD
参数						
重量(kg)	0.25719	0.25305	0.24655	0.24457	0.25034	0.005829
AUC(0-inf)(μg.hr/mL)	245	210	191	206	213	22.8
AUC(0-last) (μg.hr/mL)	243	201	187	189	205	26.1
CL(mL/hr.kg)	4.09	4.77	5.22	4.86	4.74	0.472
Cmax (μg/mL)	16.6	14.4	17.2	15.0	15.8	1.32
MRT(0-inf)(hr)	18.1	16.8	14.7	19.8	17.4	2.15
T1/2(hr)	9.66	9.27	8.05	12.7	9.92	1.98
Vss(mL/kg)	73.8	80.3	76.7	96.0	81.7	9.90

表26. NX1843和游离药物的比较结果归纳

药物/剂量	%肿瘤生长抑制 (23天)	%消退 (23天)	Log细胞杀伤
赋形剂控制	0	0	0
1843;50mg/kg;QD1-15	88.4	0	3.5
1843;25mg/kg;QD1-15	78	0	1.5
NX1843;7.5mg/kg;QD2×7	97.5	83	4.6

表27. 比较对结合以5-FU, NX211和GW1843的肿瘤反应的NX1843剂量-一览表归纳

处理	%TGI	%消退 22天	LCK	治愈
对照	0	0	0	0
NX1843,25mg/kg;QD1,8	97	88	4.2	1
NX1843,15mg/kg;QD1,3,5×2	95	86	3.2	1
NX1843,7.5mg/kg;QD1-5×2	96	88	3.9	1
GW1843,100mg/kg;QD1-5×2	80	0	2.4	0
5-FU, 100mg/kg; QD1,8	72	0	1.5	0
NX211,6mg/kg;QD1,8	78	0	1.9	0
NX211,6mg/kg+5-FU, 100mg/kg;QD1,8	78		1.9	0
NX211,6mg/kg+NX1843,25mg/kg; QD1,8	97	89	3.4	2
NX211,6mg/kg;QD1,8+GW1843, 100mg/kg;QD1-5×2	91	50	3.4	0

表28.用NX1843进行的剂量反应实验的归纳

药物和剂量	%TGI	%消退	治愈
D5W对照	0	0	0
NX1843; 25mg/kg	99	100	4
NX1843;20mg/kg	97	100	2
NX1843;15mg/kg	95	65	1
NX1843;10mg/kg	92	58	0
NX1843;5mg/kg	80	0	0

5 %TGI和%消退是在第26天测定的, 治愈是在第60天确定的。

表29.在HCT-8异种移植模型中，比较10mg/kg剂量的NX1843制剂QD1，8的抗肿瘤功效结果

5

NX1843 批次	%TGI	%消退	中线LCK	治愈
AT-1084-86	91%	18%	2.44	0
AT-1084-91B	94%	54%	2.41	0
AT-1084-95B	93%	56%	3.32	0
AT-1084-97B	94%	44%	3.71	1
SMC-1092-09	93%	37%	2.54	0

纵列变更分析证实批次之间无明显差异， $p=0.2985$ 。

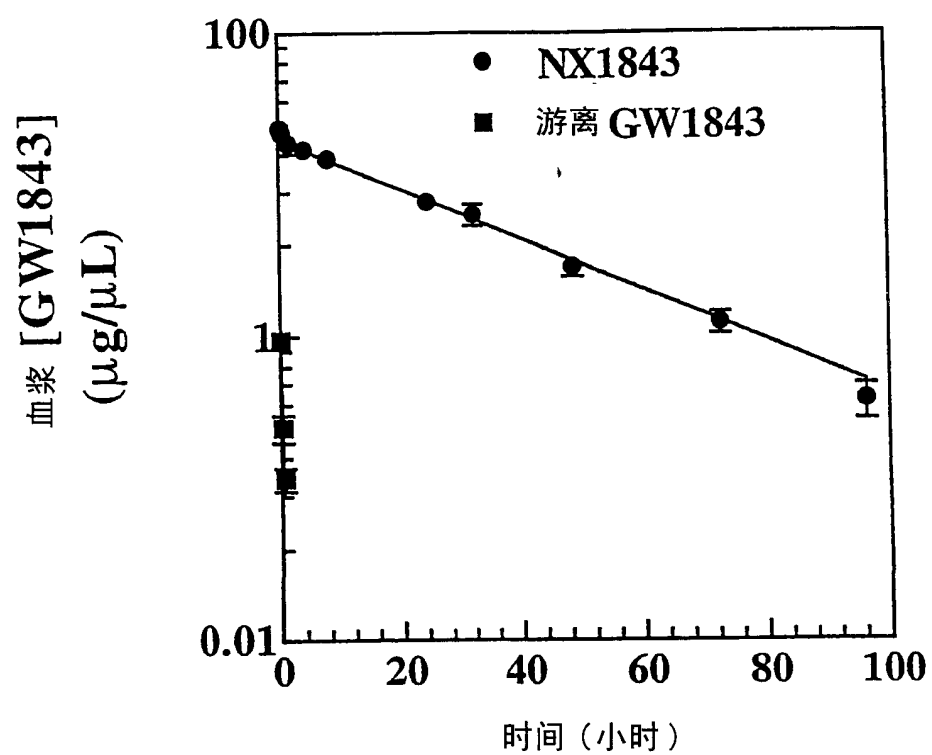


图 1

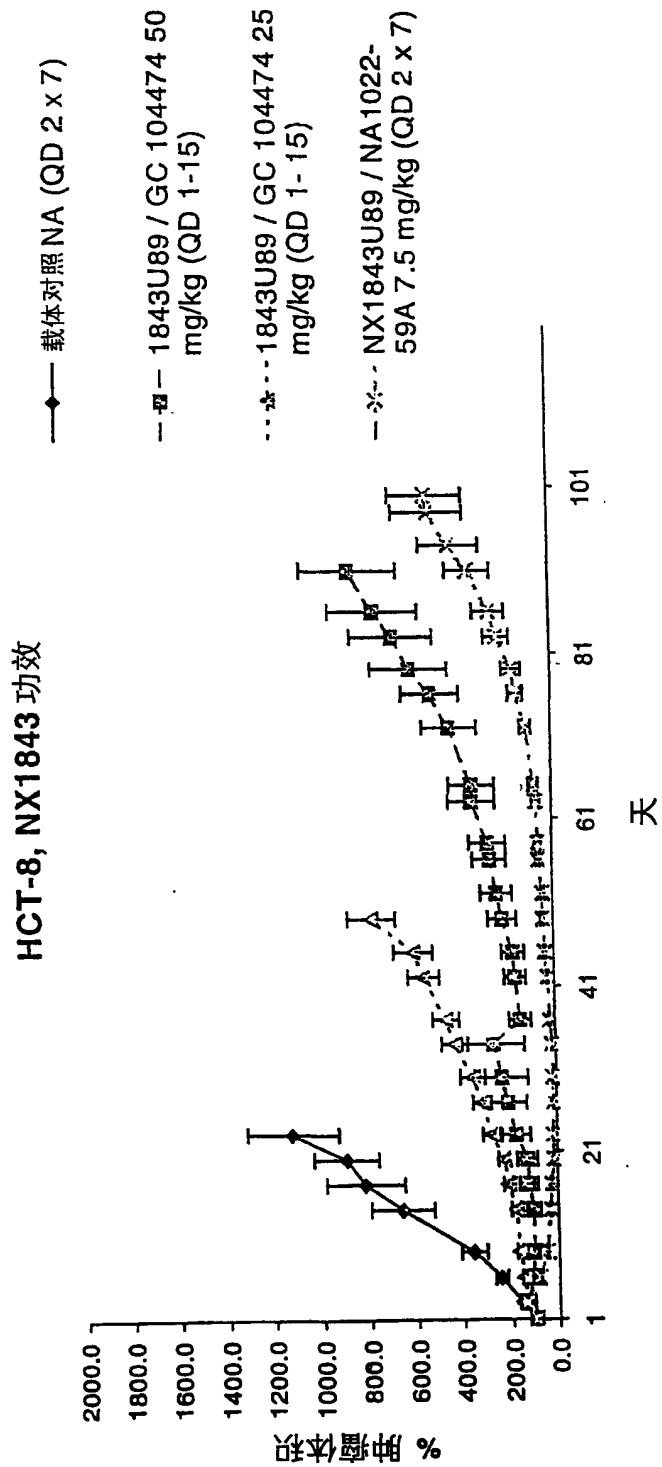


图 2

NMX-549, HCT-8, NX1843 功效

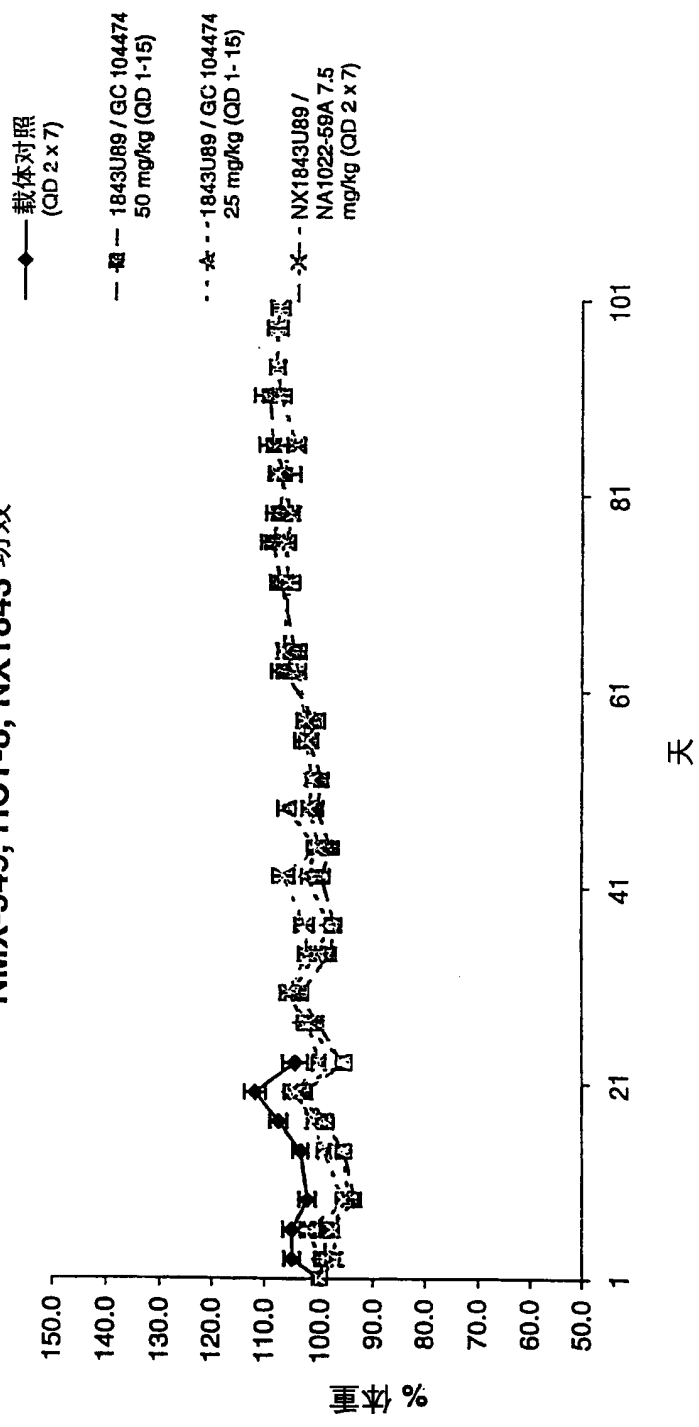
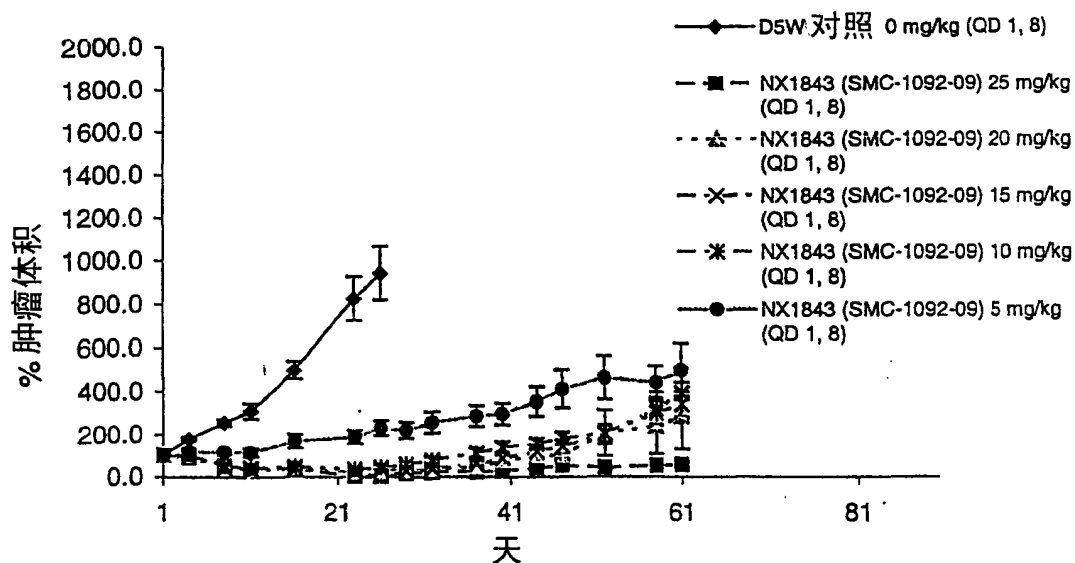


图 3

HCT-8 肿瘤产生小鼠, NX1843 剂量范围



HCT-8 肿瘤产生小鼠, NX1843 剂量范围

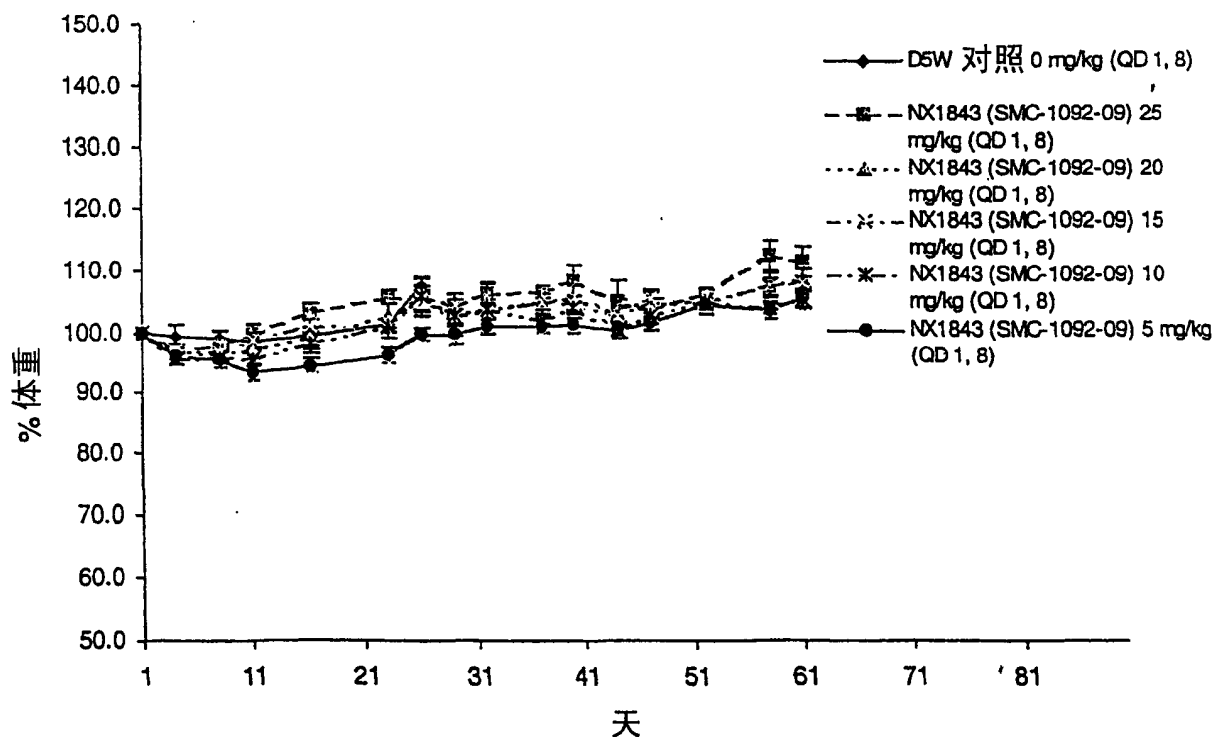


图 4

SMX-712 % 存活率

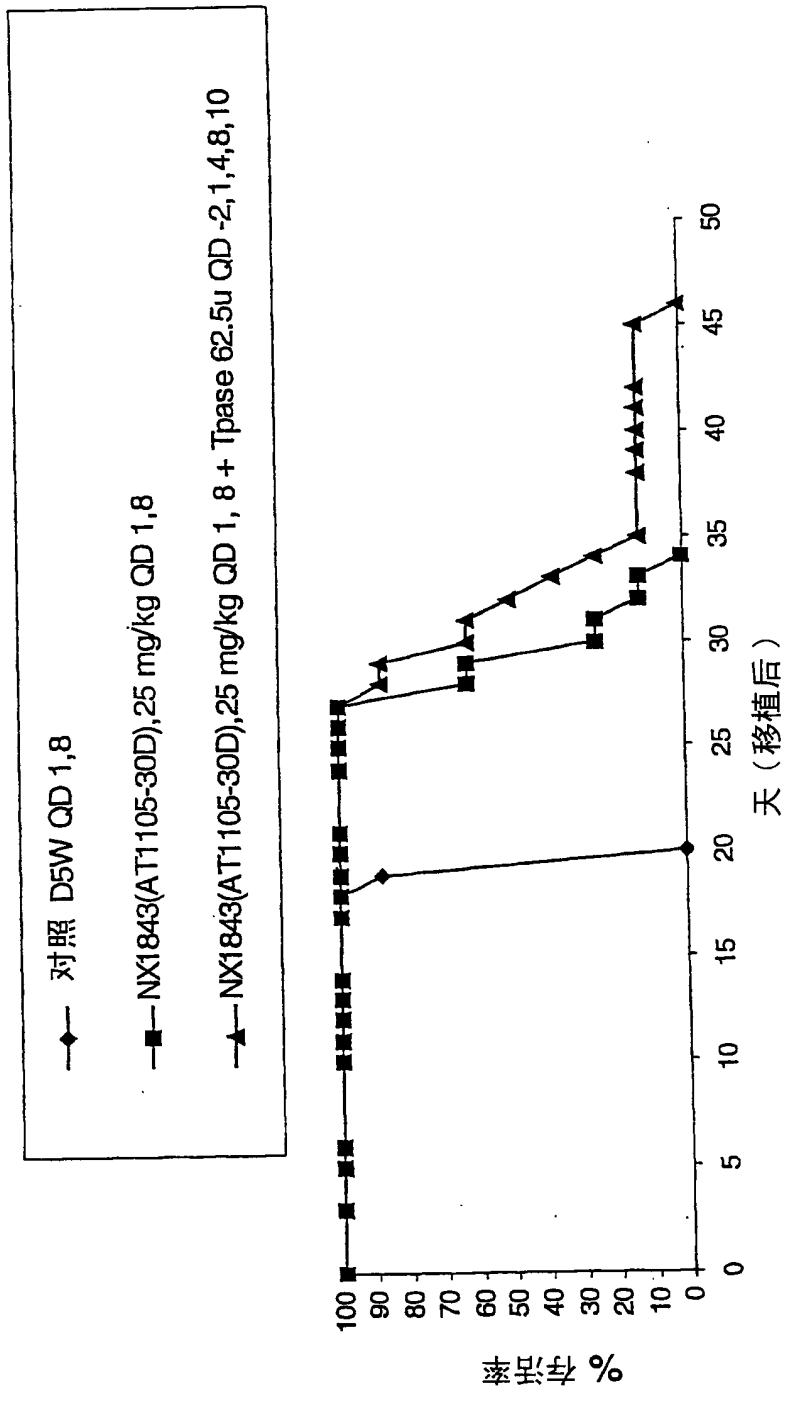


图 5