

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[ 51 ] Int. Cl<sup>7</sup>  
**A61K 31/661**  
A61P 35/00  
A61P 9/00



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 00809211.7

[45] 授权公告日 2005 年 5 月 25 日

[11] 授权公告号 CN 1202828C

[22] 申请日 2000.5.19 [21] 申请号 00809211.7  
[30] 优先权  
    [32] 1999. 5. 21 [33] GB [31] 9911926.5  
    [32] 1999. 10. 22 [33] GB [31] 9925131.6  
[86] 国际申请 PCT/EP2000/004562 2000.5.19  
[87] 国际公布 WO2000/071104 英 2000.11.30  
[85] 进入国家阶段日期 2001.12.20  
[71] 专利权人 诺瓦提斯公司  
    地址 瑞士巴塞尔  
[72] 发明人 T·奥库诺 J·格林  
    J·M·伍德  
    审查员 王灵茹

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利  
    商标事务所  
    代理人 程金山

权利要求书 1 页 说明书 22 页 附图 3 页

[54] 发明名称 二膦酸在制备抑制或逆转血管发生的  
    药物中的用途

[57] 摘要

本发明涉及一种用于根据治疗需要治疗患者体内血管发生、例如肿瘤患者或患有炎症疾病的患者的方法，该方法包括优选通过动脉内途径对所述患者给予有效量的二膦酸、例如帕米膦酸或 zoledronic acid 或其盐或其水合物的步骤。

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

1.下面所述的二膦酸或其药物上可接受的盐或其任意的水合物作为抑制或逆转血管发生的活性物质在制备治疗心肌缺血、骨关节炎、银屑病、成血管细胞瘤、血管瘤或疼痛的药物中的用途：3-氨基-1-羟基丙烷-1,1-二膦酸；1-羟基-2-(咪唑-1-基)乙烷-1,1-二膦酸。

2.一种根据权利要求1的用途，其中所述的二膦酸是氨羟二磷酸二钠或佐利膦酸或其药物上可接受的盐或其任意的水合物。

3.根据权利要求1的用途，其中所述的药物用于对血管发生进行栓塞性治疗。

4.根据权利要求1的用途，其中所述的药物用于预防或预防性治疗血管发生。

5.根据权利要求1的用途，其中所述的药物用于治疗患有心肌缺血或骨关节炎的患者。

6.根据权利要求1的用途，其中所述的药物用于对血管发生进行动脉内栓塞性治疗。

## 二膦酸在制备抑制或逆转血管发生的药物中的用途

本发明涉及药物组合物和用途，特别是涉及包括二膦酸（bisphosphonates）的药物组合物并涉及二膦酸的新型治疗用途。

二膦酸广泛用于抑制骨吸收得到增加的各种良性和恶性疾病中破骨细胞的活性。因此，近来已经将二膦酸用于长期治疗患有多发性骨髓瘤（MM）的患者。这些焦磷酸盐类似物不仅可以减少与骨骼相关的疾病的发生、而且它们还可以对患者产生临床有益效果并改善存活率。二膦酸能够预防体内的骨吸收；二膦酸的治疗功效已经在治疗骨的佩吉特病、肿瘤诱发的血钙过多且更进一步说是骨转移瘤和多发性骨髓瘤（MM）的过程中得到了证实（综述参见 Fleisch H 1997 的二膦酸临床研究（Bisphosphonates clinical.）-《骨疾病中的二膦酸》

（Bisphosphonates in Bone Disease）：从实验室到患者（From the Laboratory to the Patient），编辑：The Parthenon Publishing Group, New York/London, 68-163 页）。二膦酸抑制骨吸收的机理仍然难以理解且看起来可根据所研究的二膦酸的不同而改变。已经证实二膦酸与骨的羟磷灰石晶体强力结合，从而减少了骨的更新和吸收、降低了血液中羟脯氨酸或碱性磷酸酶的水平并且还抑制了破骨细胞的活化和活性。

MM 是一种浆细胞癌，其特征在于恶性浆细胞在骨髓内增殖和累积。主要临床结果是与病理性骨折和骨痛相关的裂解性骨损害。这些损害是由骨吸收过度所造成的，通常导致血钙过多。已经引入了二膦酸并结合常规的化疗来对 MM 进行长期治疗。近来已经证实诸如氯膦酸盐和氨羟二磷酸二钠这样的二膦酸可以减少诸如裂解性骨损害和病理性骨折这样的与骨骼相关的情况的发生并可以缓解骨痛和改善患者的生命质量。

目前已经令人意外地发现某些二膦酸对新近形成的毛细血管具有

栓塞作用，所述的毛细血管是在与肿瘤生长和侵害以及诸如炎症、类风湿关节炎和骨关节炎这样的病理性情况相关的血管发生过程中形成的。此外，已经发现某些二膦酸抑制了哺乳动物模型和组织培养实验中生长因子诱发的血管发生和内皮细胞增殖。

因此，本发明提供了一种用于根据治疗需要治疗患者体内血管发生的方法，该方法包括对患者给予有效量的二膦酸的步骤。

本发明进一步提供了二膦酸在制备用于治疗血管发生的药物中的用途。

本发明进一步提供了二膦酸在治疗与哺乳动物体内疾病或病理情况相关的血管发生中的用途。

形成新血管的血管发生是在诸如修复、排卵和胚胎发生这样的许多生理过程中的主要情况。新血管形成也是诸如炎症、心肌缺血、类风湿关节炎、骨关节炎和例如肿瘤生长、侵害或转移这样的肿瘤形成这类许多病理情况的一个主要组成部分。许多固体肿瘤诱发从宿主血管床上形成新的毛细血管以便提供营养和氧。因此，本发明一般用于治疗疾病和医学情况，它们涉及包括如上所述在内的疾病或情况的建立和发展过程中的血管发生。涉及血管发生疾病和情况的其它和更为特殊的实例包括：视网膜病，例如糖尿病性视网膜病；银屑病；成血管细胞瘤（haemangioblastoma）；血管瘤（haemangioma）；疼痛；与年龄相关的黄斑变性；且特别是肿瘤疾病（固体肿瘤），尤其是诸如乳腺癌、结肠癌、肺癌（特别是小细胞肺癌）或前列腺癌。

本发明的用途和方法代表了对现存恶性疾病疗法的改进，其中将二膦酸用于预防或抑制骨转移瘤或骨吸收过度的发展并且还用于诸如类风湿关节炎和骨关节炎这样的炎症疾病疗法。已经发现二膦酸用于栓塞新近形成的血管的用途可使适当的治疗期后例如固体肿瘤这样的肿瘤和例如骨转移瘤这样的转移瘤得到抑制且甚至使例如固体肿瘤这样的肿瘤和例如骨转移瘤这样的转移瘤的大小减小。已经使用血管造影术观察到在二膦酸治疗后新近形成的血管消失而正常血管保持完整。此外，已经观察到栓塞的血管在停止用二膦酸治疗后没有恢复。

还观察到在用二膦酸治疗后骨转移瘤、类风湿关节炎和骨关节炎患者感到疼痛减轻。

尽管尚不了解二膦酸作为导致新近形成的血管栓塞的活性剂的作用方式，但是看起来新近形成的血管（毛细血管）被阻断、部分或完全被消除或另外血管发生被逆转，从而在例如使用血管造影术观察例如炎症部位这样的肿瘤或疾病部位时使新近形成的血管（毛细血管）部分或完全消失。就本说明书的目的而言，术语“血管发生的栓塞性治疗”或“栓塞作用”指的是这些观察到的现象。

因此，在本发明的另一个方面中，提供了：

- 一种用于根据治疗需要对患者体内的血管发生进行栓塞性治疗的方法，该方法包括对患者给予有效量的二膦酸的步骤；
- 二膦酸在制备用于对血管发生进行栓塞性治疗的药物中的用途；和
- 二膦酸作为血管发生抑制剂的用途。

此外，正如下文的实施例中所述，已经发现某些二膦酸可抑制哺乳动物模型中生长因子诱发的血管发生并且还可抑制组织培养模型中内皮细胞的增殖。看起来这种对血管发生的抑制作用并不依赖于激活的巨噬细胞的缺失，而相反，二膦酸看起来在内皮细胞活化和/或内皮细胞增殖的水平上起作用。因此，还可以将二膦酸有利地用于通过抑制血管发生出现或发展来预防或预防性治疗涉及血管发生的疾病和医学情况，包括如上述确定的疾病和医学情况。

因此，在本发明的另一个方面中，提供了：

- 一种用于根据治疗需要预防或预防性治疗患者体内血管发生的方法，该方法包括对患者给予有效量的二膦酸的步骤；
- 二膦酸在制备用于预防或预防性治疗血管发生的药物中的用途；和
- 二膦酸作为血管发生预防剂的用途。

特别地，本发明提供了一种如上述直接定义的并不依赖于或涉及活化的巨噬细胞缺失的方法和用途。

因此，在本说明书中术语“疗法”或“治疗”指的是预防或预防性治疗以及治愈或改善疾病的疗法，包括对处于感染疾病或怀疑已经感染疾病的危害中的患者以及患病或已经诊断为患有疾病或医学情况的患者进行治疗。

本发明中使用的二膦酸一般是那些可以产生如上所述的栓塞或血管发生抑制作用的二膦酸。

因此，用于本发明的合适的二膦酸例如可以包括下列化合物或其药物上可接受的盐或其任意的水合物：3-氨基-1-羟基丙烷-1,1-二膦酸（帕米膦酸（pamidronic acid）），例如氨羟二磷酸二钠（APD）；3-(N,N-二甲氨基)-1-羟基丙烷-1,1-二膦酸，例如二甲基-APD；4-氨基-1-羟基丁烷-1,1-二膦酸（阿仑膦酸（alendronic acid）），例如阿仑特罗；1-羟基-亚乙基-二膦酸，例如羟乙二膦酸；1-羟基-3-(甲基戊基氨基)-亚丙基-二膦酸，依伴膦酸（ibandronic acid），例如 ibandronate；6-氨基-1-羟基己烷-二膦酸，例如氨基-己基-BP；3-(N-甲基-N-正戊基氨基)-1-羟基丙烷-1,1-二膦酸，例如甲基-戊基-APD（=BM21.0955）；1-羟基-2-(咪唑-1-基)乙烷-1,1-二膦酸，如佐利膦酸（zoledronic acid）；1-羟基-2-(3-吡啶基)乙烷-1,1-二膦酸（利塞膦酸（risedronic acid）），例如利塞膦酸盐，包括其 N-甲基吡啶盐，例如诸如 NE-10244 或 NE-10446 这样的碘化 N-甲基吡啶鎓；1-(4-氯代苯硫基)甲烷-1,1-二膦酸（替鲁膦酸（tiludronic acid）），例如替鲁膦酸盐；3-[N-(2-苯硫基乙基)-N-甲氨基]-1-羟基丙烷-1,1-二膦酸；1-羟基-3-(吡咯烷-1-基)丙烷-1,1-二膦酸，例如 EB1053(Leo)；1-(N-苯基氨基硫代羰基)甲烷-1,1-二膦酸，例如 FR78844(Fujisawa)；5-苯甲酰基-3,4-二氢-2H-吡唑-3,3-二膦酸四乙酯，例如 U-81581(Upjohn)；1-羟基-2-(咪唑并[1,2-a]吡啶-3-基)乙烷-1,1-二膦酸，例如 YM529；和 1,1-二氯甲烷-1,1-二膦酸（氯膦酸（clodronic acid）），例如氯膦酸盐。

药物上可接受的盐优选与碱形成的盐，通常是来源于元素周期表中 Ia、Ib、IIa 和 IIb 族的金属盐，包括例如钾且特别是钠盐这样的

碱金属盐或碱土金属盐、优选钙盐和镁盐且还有与氨形成的铵盐或有机胺类。

特别优选的药物上可接受的盐是那些二磷酸酸性氢中的一个、两个、三个或四个、特别是一个或两个被药物上可接受的阳离子取代的盐，所述的药物上可接受的阳离子特别是钠、钾或铵，首选钠。

极为优选的一组药物上可接受的盐的特征在于每个磷酸基上带有一个酸性氢和一个药物上可接受的阳离子、特别是钠。

众所周知上述所有的二磷酸衍生物来源于文献。所述文献中包括其制备方法（例如参见 EP-A-513760 第 13-48 页）。例如，如美国专利 3,962,432 中所述制备了 3-氨基-1-羟基丙烷-1,1-二磷酸且如美国专利 4,639,338 和 4,711,880 所述制备了其二钠盐；且如美国专利 4,939,130 中所述制备了 1-羟基-2-(咪唑-1-基)乙烷-1,1-二磷酸。

本发明的一个特殊的实施方案由二磷酸衍生物的应用来代表，所述的二磷酸衍生物选自 3-氨基-1-羟基丙烷-1,1-二磷酸、3-(N,N-二甲氨基)-1-羟基丙烷-1,1-二磷酸、4-氨基-1-羟基丁烷-1,1-二磷酸、6-氨基-1-羟基己烷-1,1-二磷酸、3-(N-甲基-N-正戊基氨基)-1-羟基丙烷-1,1-二磷酸、1-羟基-2-(咪唑-1-基)乙烷-1,1-二磷酸、1-羟基-2-(3-吡啶基)乙烷-1,1-二磷酸及其 N-甲基吡啶鎓盐、1-(4-氯代苯硫基)甲烷-1,1-二磷酸、3-[N-(2-苯硫基乙基)-N-甲氨基]-1-羟基丙烷-1,1-二磷酸、1-羟基-3-(吡咯烷-1-基)丙烷-1,1-二磷酸、1-(N-苯基氨基硫代羰基)甲烷-1,1-二磷酸、5-苯甲酰基-3,4-二氢-2H-吡唑-3,3-二磷酸四乙酯、1-羟基-2-(咪唑并[1,2-a]吡啶-3-基)乙烷-1,1-二磷酸或其药物上可接受的盐及其任意的水合物。

本发明的一个优选的实施方案由二磷酸衍生物的应用来代表，所述的二磷酸衍生物选自 3-氨基-1-羟基丙烷-1,1-二磷酸、3-(N,N-二甲氨基)-1-羟基丙烷-1,1-二磷酸、4-氨基-1-羟基丁烷-1,1-二磷酸、6-氨基-1-羟基己烷-1,1-二磷酸、3-(N-甲基-N-正戊基氨基)-1-羟基丙烷-1,1-二磷酸、1-羟基-2-(咪唑-1-基)乙烷-1,1-二磷酸、1-羟基-2-(3-吡啶基)乙烷-1,1-二磷酸、3-[N-(2-苯硫基乙基)-N-甲氨基]

] -1-羟基丙烷-1,1-二膦酸、1-羟基-3-(吡咯烷-1-基)丙烷-1,1-二膦酸、1-羟基-2-(咪唑并[1,2-a]吡啶-3-基)乙烷-1,1-二膦酸或其药物上可接受的盐及其任意的水合物。

本发明的一个极为优选的实施方案由膦酸衍生物的应用来代表,所述的膦酸衍生物选自帕米膦酸、阿仑膦酸、3-(N-甲基-N-正戊基氨基)-1-羟基丙烷-1,1-二膦酸、1-羟基-2-(咪唑-1-基)乙烷-1,1-二膦酸、利塞膦酸和替鲁膦酸或其药物上可接受的盐及其任意的水合物。

本发明的一个特别优选的实施方案由二膦酸衍生物的应用来代表,所述的二膦酸衍生物选自 1-羟基-2-(咪唑-1-基)乙烷-1,1-二膦酸和 3-氨基-1-羟基丙烷-1,1-二膦酸或其药物上可接受的盐及其任意的水合物。

此外,本发明涉及 3-氨基-1-羟基丙烷-1,1-二膦酸或其药物上可接受的盐及其任意的水合物、例如氨羟二磷酸二钠或 pamidronate 的用途。

此外,本发明涉及 1-羟基-2-(咪唑-1-基)乙烷-1,1-二膦酸或其药物上可接受的盐及其任意的水合物、例如 zoledronic acid 的用途。

已经发现在本发明的动物模型中,zoledronic acid (1-羟基-2-(咪唑-1-基)乙烷-1,1-二膦酸)与其抑制血管内皮细胞生长因子(VEGF)诱发的血管发生相比优选抑制碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)诱发的血管发生,正如下文实施例中所述。

因此,在本发明特别优选的实施方案中,提供了一种如上所述的方法或用途:

- 其中二膦酸是 zoledronic acid 或其药物上可接受的盐及其任意的水合物且其中所述的血管发生包括 bFGF 诱发的血管发生;或

- 其中二膦酸是 zoledronic acid 或其药物上可接受的盐及其任意的水合物并将所述的二膦酸与 VEGF 抑制剂联用。

可以使用异构体或异构体混合物形式的二膦酸(下文称作本发明的活性剂),如果合适,一般作为旋光异构体使用它们,诸如对映体或非对映异构体或几何异构体,一般为顺式-反式异构体。可以获得纯

对映体和/或外消旋物形式的旋光异构体。

还可以使用水合物形式的本发明活性剂或包括用于其结晶的其它溶剂。

优选使用药物组合物形式的本发明活性剂（二膦酸），所述的药物组合物可以含有治疗有效量的活性组分和适合于给药的无机或有机的固体或液体的药物上可接受的载体或混有它们。

例如，该药物组合物可以是：诸如口服、直肠、气溶胶吸入或鼻部给药的肠内用组合物；诸如静脉内或皮下给药的非肠道用组合物；或经皮给药用组合物（例如被动或离子渗透用组合物）。

优选所述的药物组合物适合于口服或非肠道（尤其是静脉内、动脉内或经皮）给药。将动脉内和口服给药、首要和最重要的动脉内给药看作是特别重要的。优选二膦酸活性组分是非肠道剂型、最优选动脉内剂型。

如果合适，特定的给药方式和剂量可以由主管医师根据患者的特殊情况、尤其是年龄、体重、生活方式、运动程度、激素状态（例如绝经后）和骨无机密度来选择。然而，最优选将二膦酸经动脉内给药入产生新近形成的血管的动脉。

因此，在本发明特别优选的实施方案中，提供了：

一种用于根据治疗需要对患者体内血管发生进行栓塞性治疗的方法，该方法包括对患者给予有效量的二膦酸的步骤；

二膦酸在制备用于对血管发生进行动脉内栓塞治疗的药剂中的用途；

二膦酸在治疗与哺乳动物体内疾病或病理情况相关的血管发生或使其逆转的动脉内用途；和

二膦酸作为血管发生逆转剂的动脉内用途。

本发明活性剂的剂量可以取决于各种因素，诸如活性组分作用的功效和期限、给药方式、温血物种和/或温血动物性别、年龄、体重和个体的情况。

剂量通常要求对体重约为 75kg 的温血动物给予

0.002-3.40mg/kg、尤其是0.01-2.40mg/kg的单剂量二磷酸活性组分。如果需要，还可以分几次给予该剂量，可以按照相等的部分剂量给药。

“mg/kg”指的是所治疗的每kg体重哺乳动物、包括人所用的mg药物。

可以重复给予作为单剂量（优选）或分几次部分剂量给药的上述剂量，例如每天一次、每周一次、每月一次、每3个月一次、每6个月一次或一年一次。换句话说，可以按照从连续每日疗法到间歇周期疗法范围内的方案给予所述的药物组合物。

优选按照与传统上使用二磷酸衍生物治疗疾病中所用相同等级的剂量给予二磷酸，所述的疾病诸如佩吉特病、肿瘤诱发的血钙过多或骨质疏松。换句话说，优选按照可同样有效治疗佩吉特病、肿瘤诱发的血钙过多或骨质疏松的剂量给予二磷酸衍生物，即按照同样有效抑制骨吸收的剂量给予它们。

单剂量单位剂型的制剂优选含有约1% - 约90%的活性组分，而非单剂量剂型的制剂优选含有约0.1% - 约20%的活性组分。诸如胶囊剂、片剂或锭剂这样的单剂量单位剂型例如含有约1mg - 约500mg的活性组分。

用于肠内和非肠道给药的药物制剂例如是那些诸如锭剂、片剂或胶囊剂以及安瓿这样的剂型。按照本身公知的方式制备它们，例如通过常规的混合、成粒、成型、溶解或冻干步骤制备它们。例如，可以通过将活性组分与固体载体混合、如果合适使所得混合物成粒且如果需要或必要在添加合适的佐剂后将该混合物或颗粒加工成片剂或锭剂芯来获得用于口服给药的药物组合物。

合适的载体尤其是：填充剂，诸如糖类，例如乳糖、蔗糖、甘露糖醇或山梨醇；纤维素制剂和/或磷酸钙，例如磷酸三钙或磷酸氢钙；以及粘合剂，诸如例如使用玉米、小麦、稻米或马铃薯淀粉制成的淀粉糊、明胶、黄蓍胶、甲基纤维素和/或聚乙烯吡咯烷酮；和如果需要，崩解剂，诸如上述淀粉、以及羧甲基淀粉、交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或藻酸或其盐，诸如藻酸钠。佐剂尤其是流动调节剂和润滑剂，例

如硅酸、滑石、硬脂酸或其盐，诸如硬脂酸镁或硬脂酸钙；和/或聚乙二醇。将锭剂芯制成可以耐胃液的合适的包衣层，特别是使用可以含有阿拉伯树胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇和/或二氧化钛的浓糖溶液或溶于合适的有机溶剂或溶剂混合物的涂层溶液或诸如邻苯二甲酸乙酰基纤维素或邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素这样的合适纤维素制剂，从而产生耐胃液的包衣层。例如，为了确定或表明不同剂量活性组分的目的，可以将着色剂或色素添加到片剂或锭剂的包衣层中。

其它可口服给药的药物制剂是由明胶制成的干填充胶囊和由明胶和诸如甘油或山梨醇这样的增塑剂制成的密封软胶囊。干填充胶囊可以含有颗粒形式的活性组分，所述的颗粒例如混有诸如乳糖这样的填充剂、诸如淀粉这样的粘合剂和/或诸如滑石或硬脂酸镁这样的助流剂且如果合适可以混有稳定剂。在软胶囊中，优选将活性组分溶于或悬浮于诸如脂肪油、石蜡油或液体聚乙二醇这样合适的液体中，还能够向其中添加稳定剂。

非肠道制剂尤其是以诸如通过静脉内、肌内、腹膜内、鼻内、经皮、皮下或优选动脉内这样的各种方式有效的可注射液体。这类液体优选是可以在使用前由冻干制剂制备的等渗水溶液或混悬液，所述的冻干制剂含有单独的活性组分或与药物上可接受的载体混合的活性组分。可以将该药物组合物灭菌和/或该药物组合物例如含有防腐剂、稳定剂、湿润剂和/或乳化剂、增溶剂、用于调节渗透压的盐和/或缓冲剂。

经皮施用的合适制剂包括有效量的活性组分与载体。有利的载体包括可吸收的药理上可接受的溶剂以便有助于通过宿主皮肤。经皮装置以绷带形式为特征，绷带包括表衬层、含有化合物且可以含有载体的储存层、可以包括在延长时间期限内以受控和预定速率输送宿主皮肤中的活性组分的速率控制屏障和使所述装置与皮肤固定的部件。

下列实施例解释了上文所述的本发明且相关的实施例5涉及附图：

附图1是用氨羟二磷酸二钠治疗前(a)和治疗后(b)乳腺癌患者左侧支气管动脉的血管造影片。

附图2是用氨羟二磷酸二钠治疗前(a)和治疗后(b)相同乳腺

癌患者右侧支气管动脉的血管造影片。

附图 3 是用氨羟二磷酸二钠治疗前 (a) 和治疗后 (b) 骨关节炎患者右膝关节的血管造影片。

在下列实施例中, 将术语“活性组分”理解为本发明使用的上述二磷酸衍生物中的任意一种。

### 实施例

实施例 1: 含有包衣颗粒形式的例如氨羟二磷酸二钠五水合物这样的活性组分作为活性组分的胶囊剂:

芯颗粒:

|                |         |
|----------------|---------|
| 活性组分 (粉碎)      | 197.3mg |
| 微晶纤维素          | 52.7mg  |
| (Avicel®PH105) |         |
|                | 250.0mg |

+内包衣层:

|             |              |
|-------------|--------------|
| 纤维素 HP-M603 | 10.0mg       |
| 聚乙二醇        | 2.0mg        |
| 滑石          | <u>8.0mg</u> |
|             | 270.0mg      |

+耐胃液的外包衣层:

|                    |         |
|--------------------|---------|
| Eudragit®L30D (固体) | 90.0mg  |
| 柠檬酸三乙酯             | 21.0mg  |
| Antifoam®AF        | 2.0mg   |
| 水                  |         |
| 滑石                 | 7.0mg   |
|                    | 390.0mg |

将氨羟二磷酸二钠与 Avicel®PH105 的混合物用水润湿并捏合、挤压且制成球状。然后在流化床中依次用由纤维素 HP-M603、聚乙二醇 (PEG) 8000 和滑石组成的内包衣层和由 Eudragit®L30D、柠檬酸三乙酯和 Antifoam®AF 组成的耐胃液的水包衣层给干燥的颗粒包衣。用滑石将包衣的颗粒制成粉末并通过例如 Höfliger 和 Karg 的商品胶囊填充机将其填入胶囊 (胶囊大小为 0 号)。

实施例 2: 例如含有 1-羟基-2-(咪唑-1-基) 乙烷-1, 1-二膦酸作为活性组分的整体粘合经皮系统:

组成:

|                                                     |              |
|-----------------------------------------------------|--------------|
| 聚异丁烯 (PIB) 300<br>(OppanolB1, BASF)                 | 5.0g         |
| PIB35000<br>(OppanolB10, BASF)                      | 3.0g         |
| PIB1200000<br>(OppanolB100, BASF)                   | 9.0g         |
| 氢化烃树脂<br>(Escorez5320, Exxon)                       | 43.0g        |
| 1-十二烷基氮杂环庚-2 酮<br>(Azone, NelsonRes., Irvine<br>CA) | 20.0g        |
| 活性组分                                                | <u>20.0g</u> |
| 总计                                                  | 100.0g       |

制备:

通过在辊式齿轮床上滚动将上述成分彼此溶于 150g 特殊沸点的石油级分 100 - 125 中。通过使用 300mm 医用刀片的涂铺器将该溶液施用在聚酯薄膜 (Hostaphan, Kalle) 上, 得到约 75g/m<sup>2</sup> 的包裹层。在干

燥（60℃下15分钟）后，将硅氧烷处理的聚酯薄膜（75mm厚，Laufenberg）用作剥离薄膜。使用穿孔工具给成品系统穿出所需形式的5-30cm<sup>2</sup>大小的孔。将完整的系统独立地密封在铝纸囊剂中。

实施例 3: 装有 1.0mg 干燥的冻干 1-羟基-2-(咪唑-1-基)乙烷-1,1-二磷酸（混合的其钠盐）的小瓶。在用 1ml 水稀释后，获得了静脉输注用的溶液（浓度为 1mg/ml）。

组成:

|                           |         |
|---------------------------|---------|
| 活性组分（游离的二磷酸）              | 1.0mg   |
| 甘露糖醇                      | 46.0mg  |
| 柠檬酸三乙酯 ×2H <sub>2</sub> O | 约 3.0mg |
| 水                         | 1ml     |
| 注射用水                      | 1ml     |

在 1ml 水中用柠檬酸三乙酯将所述的活性组分滴定至 pH 为 6.0。然后加入甘露糖醇并将该溶液冻干和将冻干物装入小瓶。

实施例 4: 装有例如溶于水的氨羟二磷酸二钠五水合物这样的活性组分的安瓿。该溶液（浓度为 3mg/ml）是稀释后静脉输注用的溶液。

组成:

|                     |         |
|---------------------|---------|
| 活性组分（△5.0mg 无水活性组分） | 19.73mg |
| 甘露糖醇                | 250mg   |
| 注射用水                | 5ml     |

#### 实施例 5 患者的治疗

通过动脉内方式用二磷酸输注液经产生癌、转移瘤或骨关节炎部位的动脉治疗患有癌症和相关转移瘤的许多患者和 1 位患有骨关节炎

的患者。在输注二膦酸前后使用标准血管造影技术检查癌、转移瘤或骨关节炎部位。在所有情况中，观察到了对疾病区域中新近形成的毛细血管和其它血管的明显的栓塞作用。治疗方案在下面具体描述。

i) 患者 ID: 1676  
性别: 女性  
年龄: 68 岁零 6 个月  
诊断: 乳腺癌、多发性肺转移瘤  
治疗蒂: 双侧支气管动脉

将总计 75mg 的氨羟二磷酸二钠 (Aredia®) 输注入双侧支气管动脉以便消除其肿瘤血管扩张 (tumour blushes)。附图 1 和 2 表示治疗前 (a) 和治疗后 (b) 的左侧 (附图 1) 和右侧 (附图 2) 肺区域的血管造影片。

ii) 患者 ID: 2022  
性别: 女性  
年龄: 57 岁零 1 个月  
诊断: 乳腺癌、骨转移瘤、多发性肺转移瘤  
治疗蒂: 1. 双侧最上部的肋间动脉到第 12 肋间动脉  
2. 双侧支气管动脉  
3. 胸廓内的外侧动脉  
4. 胸廓外侧动脉前根

将总计 75mg 的氨羟二磷酸二钠 (Aredia®)、100mg 依托泊苷、10mgBLM 和 500mgimpras-liprodol 用于消除沿这些蒂排列的肿瘤血管扩张 (tumourblushes)。(对骨转移瘤而言仅使用氨羟二磷酸二钠)。

iii) 患者 ID: 1441  
性别: 女性  
年龄: 63 岁零 11 个月  
诊断: 乳腺癌、多发性骨转移瘤、多

## 发性肝转移瘤

治疗蒂:

1. 双侧闭孔肌动脉
2. 双侧 L4/5 至 L1 腰动脉
3. 右侧肝的 6、7、8 胚下  
(subergemenal) 肝动脉

将总计 45mg 的氨羟二磷酸二钠 (Aredia®)、10mgADM (对肝)、10mgBLM 和 500mgimpras-liprodol 乳剂用于消除沿这些蒂排列的肿瘤血管扩张 (tumour blushes)。(对骨转移瘤而言将 45mg 氨羟二磷酸二钠用于其上而就肝转移瘤而言还使用 10mgADM 和 500mgimpras-liprodol)。

iv) 患者 ID:

1840

性别:

男性

年龄:

43 岁零 11 个月

诊断:

舌癌、colateralvibo、隔膜转  
移瘤

治疗蒂:

1. 第 7、8、9、10 肋间动脉
2. 左侧腹股沟隔
3. 左侧较上部肋间动脉
4. 左侧肩胛下动脉

将总计 60mg 的氨羟二磷酸二钠 (Aredia®) 输注入上述动脉以便消除其沿这些蒂排列的肿瘤血管扩张 (tumour blushes)。

v) 患者 ID:

1835

性别:

女性

年龄:

34 岁零 8 个月

诊断:

乳腺癌、多发性肺转移瘤、多  
发性骨转移瘤、多发性肝转移  
瘤

治疗蒂:

左侧回肠腰、回肠骶、骶骨外  
侧动脉

右侧回肠腰、深部回肠

orungles 动脉

双侧 L4、左侧 L3、双侧 L2 胸

廓动脉；右侧胸廓肋间动脉；

支气管、右侧肝动脉

将总计 90mg 的氨羟二磷酸二钠 (Aredia®)、100mg 依托泊苷、10mgADM、6.0CE 的 OK-432 和 500mgimpras-liprodol 乳剂用于消除沿这些蒂排列的肿瘤血管扩张 (tumourblushes)。

vi) 患者 ID: 2013

性别: 女性

年龄: 73 岁零 7 个月

诊断: 右侧膝关节骨关节炎 (解释为  
局部缺血性生血管骨疾病)

治疗蒂: 1. 右侧膝降动脉

2. 右侧 sular 动脉

将总计 30mg 的氨羟二磷酸二钠 (Aredia®) 用于消除其沿这些蒂排列的生血管扩张 (blushes)。治疗前 (a) 和治疗后 (b) 的右侧膝关节区域的血管造影片如附图 3 中所示。

vii) 患者 ID: 2026

性别: 女性

年龄: 49 岁

诊断: 乳腺癌、胸柱、骨转移瘤

治疗蒂: 1. 双侧最上部肋间动脉

2. 双侧 1-4 腰动脉

3. 骶骨中动脉

将总计 30mg 的氨羟二磷酸二钠 (Aredia®) 输注入肿瘤血管扩张 (tumour blushes) 以便消除它们。

viii) 患者 ID: 1985

性别: 女性

年龄: 49 岁零 8 个月  
诊断: BCT 后乳腺癌、多发性骨转移  
瘤

治疗蒂: 1. 双侧最上部肋间至第 12 肋  
间动脉  
2. 双侧腰动脉 (L1-L4)  
3. 骶骨中动脉

将总计 90mg 的氨羟二磷酸二钠 (Aredia®) 用于消除沿这些蒂排列的肿瘤血管扩张 (tumour blushes)。

ix) 患者 ID: 1063  
性别: 男性  
年龄: 80 岁零 10 个月  
诊断: 肺癌、扁平细胞癌  
治疗蒂: 1. 右侧最上部肋间动脉  
2. 双侧支气管动脉的普通动脉

仅将总计 45mg 的氨羟二磷酸二钠 (Aredia®) 输注入肿瘤以便消除饲养蒂的肿瘤血管扩张 (tumour blushes)。

#### 实施例 6 zoledronic acid 对由小鼠体内皮下植入物输注的生长因子诱发的血管发生的作用

##### 方法

##### 动物

使用称重为 17-20g 的雌性小鼠 (Tiflbm:MAG)。通过耳部标记区分它们并在正常条件下分组 (6 只动物/笼) 且每日进行观察。在每次实验中每个治疗组使用 6 只小鼠。将全部实验至少进行两次。

##### 室的制备

使用由全氟-烷氧基-特氟隆 (Teflon®-PFA, 21mm × 8mm 直径, 550μl 体积) 制成并穿有 80 个固定间隔的 0.8mm 孔的多孔组织。将两端用相同物质制成的可除去的帽密封。将 4-6 个室插入硅管 (12mm 直径)。

然后用硅橡胶密封所述管的两端并在 24 小时后通过高压灭菌给含有所述室的管灭菌（121℃，15 分钟）。

### 生长因子

在无菌条件下填充该室（总体积 0.5ml），而在硅管内仍然含有包含 20U/ml 的肝素（NovoNordiskA/S, 2880Bagsvaerd, Denmark）的 0.8 % w/v 琼脂（BBL®Nr. 11849, BectonDickinson, Meylan, France）并含有或不含生长因子（人 VEGF2μg/ml 或人 bFGF0.3μg/ml）。在填充步骤前将该琼脂溶液维持在 42℃ 下。

### 室的移植

通过吸入 3 % 的含氧异氟醚（Forene®, AbbottAG, Cham, Switzerland）诱发小鼠麻醉。在无菌条件下通过动物背部上的小切口植入所述室。用止血钳（Autoclip9mm, ClayAdams）封闭皮肤切口。

### 室的去除

植入 5 天后，麻醉（3 % 异氟醚）动物并使用超剂量的戊巴比妥处死动物（210mg/kg 腹膜内给药，Vetanarcol, Veterinaria AG, Zürich, Switzerland）。然后将室从动物体内取出，谨慎取出已经在各植入物周围形成的血管化多孔组织、称重并通过血红蛋白浓度的比色测定来对总血量进行定量。

### 生血管反应的定量

在添加 2ml 蒸馏水后，以 24000rpm 将组织样品匀化 1 分钟（UltraTurraxT25）。然后以 7000rpm 将该样品离心 1 小时。通过 0.45μmGHP 注射滤器（Acrodisc® GF, Gelman Sciences, AnnArbor, Michigan, USA）过滤上清液以避免脂肪的污染。通过使用 Drabkin 试剂盒（Sigma 血红蛋白 #525, SigmachemicalCo.Ltd., Poole, Dorset, England）在 540nm 处的分光光度分析来测定滤液中存在的血红蛋白的量。将滤液的等分部分（100μl）加入到 1ml 的 Drabkin's 溶液中并在室温下将该混合物培养 15 分钟。540nm 处的吸收度（Uvikon810P）与血红蛋白的浓度成正比。然后应用预先使用从供体

小鼠体内不同体积的全血样品中获得的校正曲线将血红蛋白测定值转换成血液体积测定值 ( $\mu\text{l}$ )。

### 药物治疗

在植入所述室前 1 天开始给予 Zoledronic acid 并在植入后 5 天最后一次剂量后 24 小时取出所述室。将动物分组以便于实验期限。通过在旋转位置上给予注射而经皮下给予 1、10 和  $100\mu\text{g/kg/天}$  (剂量体积  $25\text{ml/kg}$ ) 剂量的 Zoledronic acid。首先将该化合物溶于蒸馏水且然后用含有甘露糖醇的蒸馏水稀释 (终浓度: 5% 甘露糖醇)。对照组动物仅接受载体。将各实验至少进行两次且然后收集数据以便于最终的评价。

### 计算和统计学

如下计算各动物体内生血管反应的抑制百分比 (组织重量或总血液量的增加):

$$(A - B) / (C - D) \times 100$$

A = 来自药物治疗的带有含生长因子的室的小鼠组织的重量 (或血液体积)。

B = 来自药物治疗的带有不含生长因子的室的小鼠组织的平均重量 (或血液体积)。

C = 来自载体治疗的带有含生长因子的室的小鼠组织的平均重量 (或血液体积)。

D = 来自药载体治疗的带有不含生长因子的室的小鼠组织的平均背景重量 (或血液体积)。

使用 Mann-Whitney 秩和检验 (SigmaStar2.0 软件, JandelScientific, Germany) 在各组之间 (化合物治疗的与未治疗的动物) 对组织重量和血液体积的绝对值进行统计学比较。将显著性水平设定在  $p < 0.05$ 。

### 结果

正如通过重量和血液含量测定的, Zoledronic acid 以剂量依赖性方式抑制了由 bFGF 诱发的生血管反应,  $\text{IC}_{50}$  近似值分别为 2.5 和

3. 1 $\mu$ g/kg。在最高测试剂量下（100 $\mu$ g/kg/天），对 VEGF-诱发的血液含量而非重量增加方面存在显著抑制作用。

这些研究证实 Zoledronic acid 在显示出对几种疾病动物模型中骨更新的治疗作用的剂量范围内抑制了 bFGF 而非 VEGF 诱发的血管发生。在较高剂量下还观察到了对 VEGF 反应的部分抑制作用。因此，看起来 Zoledronic acid 对 bFGF 介导的反应的抑制作用具有一定的选择性。

### 实施例 7 Zoledronate 对体外细胞增殖和迁移的作用

#### 方法

#### 测试化合物和溶液

使用 zoledronate 的水合二钠盐进行本报告中所述的研究。用 PBS 制备 zoledronate（10mM）和 EDTA（5mM）的储备溶液。然后将储备溶液稀释入针对各细胞系的最佳培养基中。

#### 细胞和细胞培养条件

人脐静脉内皮细胞（HUVEC）获自 PromoCell（BioConceptAG, Allschwil, Switzerland）。用于本研究的人肿瘤细胞系 A431（上皮癌）获自美国典型培养物保藏中心（ATCC, Rockville, MD, USA）。按照供应商的建议在体外培养所有的细胞系。

#### 内皮细胞增殖试验

作为 zoledronate 抑制对 VEGF 功能性反应的能力的试验，使用基于 BrdU 结合的内皮细胞增殖试验（BiotrakCellProliferationElisaSystemV.2, Amersham, England）。为了测试该反应的特异性，还测试了 zoledronate 和 EDTA（作为 zoledronate 离子螯合作用的对照）对 bFGF-和血清-诱发的 HUVEC 增殖的作用。以  $5 \times 10^3$  个细胞/孔的密度将分会合 HUVEC 接种入包被了 1.5% 明胶的 96 孔平板且然后在 37℃ 和 5% CO<sub>2</sub> 下的生长培养基（内皮细胞生长培养基（Endothelial cell Growth medium,）

PromoCellNr. C-22110, BioConcept AG, Allschwil, Switzerland) 中培养。24 小时后, 在有或没有测试化合物存在的情况下用含有人 VEGF<sub>165</sub> (10ng/ml)、bFGF (0.5ng/ml) 或 5% FCS 的基础培养基 (内皮细胞生长培养基 PromoCellNr. C-22110, BioConcept AG, Allschwil, Switzerland) 取代生长培养基。作为对照, 还包括不含生长因子的孔。在 24 小时培养后, 加入 BrdU 标记溶液并在固定、阻断和添加过氧化物酶标记的抗-BrdU 抗体前 24 小时将细胞进一步进行培养。然后使用 3, 3', 5, 5'-四甲联苯胺底物检测结合的抗体, 所述的底物形成着色反应产物, 可通过分光光度法在 450nm 处对该产物进行定量。

### 肿瘤细胞增殖试验

为了进一步测试 zoledronate 和 EDTA 的特异性, 测试它们对人肿瘤细胞系 (A431, 上皮癌) 增殖的作用。以  $1.5 \times 10^3$  个细胞/孔的密度将细胞接种入 96 孔平板并培养过夜。然后添加顺序稀释的测试化合物并将该平板培养 3 天, 此后用 3.3% v/v 戊二醛固定所述细胞、将其用水洗涤并用 0.05% w/v 亚甲蓝染色。洗涤后, 用 3% v/v HCl 洗脱染料并使用 Dynatech7000 分光光度计在 665nm 处测定光密度。通过使用公式  $(OD \text{ 检测值} - OD \text{ 起始值}) / (OD \text{ 对照值} - OD \text{ 起始值}) \times 100$  的计算机化系统测定与对照组相比接触化合物细胞的细胞生长降低百分比。将 IC<sub>50</sub> 值定义为在培养期限结束时使与对照培养物相比 (100%) 相比细胞数量减少 50% 的药物浓度。

### 内皮细胞迁移试验

作为 zoledronate 抑制对 VEGF 功能性反应的能力的试验, 使用内皮细胞迁移试验。给平板包被 1.5% 的明胶并安装环状防护物作为防止细胞从孔中心生长的屏障。以  $1 \times 10^5$  个细胞/孔的密度将分会合 HUVEC 接种入外部区域且然后在 37℃ 和 5% CO<sub>2</sub> 下的生长培养基 (内皮细胞生长培养基 PromoCellNr. C-22110, BioConcept AG, Allschwil, Switzerland) 中培养。24 小时后, 除去防护物在有或没有测试化合物存在的情况下用含有人 VEGF<sub>165</sub> (10ng/ml) 或 5% FCS 的基础培养基 (内皮细胞生长培养基 PromoCellNr. C-22110, BioConcept

AG, Allschwil, Switzerland) 取代生长培养基。为了抑制细胞增殖, 加入 50 $\mu$ g/ml 的 5-氟尿嘧啶 (Roche, Basel, Switzerland)。作为对照, 还包括不含生长因子的孔。在 60-70 小时培养后, 固定细胞并用 Diff-Quik (DadeBehring AG., Nr. 130832, Dürdingen, Switzerland) 染色。将 24 孔平板置于双目镜显微镜下并使用 KS-400 软件 (CarlZeissJena, Jena, Germany) 和特别设计的 macro (迁移.mcr) 对迁移的细胞数量进行计数。

### 统计学

通过一种方式方差分析、随后用 Dunnett's 检验分析数据以评价 zoledronate 或 EDTA 治疗组与对照组之间的显著性差异。将 Bonferroni 检验用于在特定浓度下评价各对 zoledronate 和 EDTA 治疗组之间的显著性差异。所有分析均使用 Instat<sup>®</sup> 软件 (GraphPadInc., SanDiego, USA) 进行。

### 结果

Zoledronate 以剂量依赖性方式抑制了血清诱发的 HUVEC 增殖, 其中 IC<sub>50</sub> 为 4.1 $\pm$ 0.6 $\mu$ M。它对由 VEGF 和 bFGF 诱发的增殖也具有相似的作用, IC<sub>50</sub> 分别为 6.9 $\pm$ 0.4 $\mu$ M 和 4.2 $\pm$ 0.4 $\mu$ M。Zoledronate 在较高浓度下对增殖的抑制作用明显不同于对照组。对所有刺激物来说, 在最高测试浓度的 zoledronate 下 (30 $\mu$ M) 观察到了细胞形态的改变。

作为二膦酸螯合物的二价阳离子, 将 EDTA 用作平行实验的对照组。EDTA 在 30 $\mu$ M 下抑制由 FCS、VEGF 和 bFGF 诱发的 HUVEC 增殖分别达 23.7%、55.6% 和 49.5%。对于所有刺激物来说, EDTA 的作用低于 zoledronate 的作用, 它没有在测试浓度范围内达到血清诱发的增殖的统计学显著性, 而它在 3 $\mu$ M 和 3 $\mu$ M 以上 EDTA 浓度下使用 VEGF 和 bFGF 刺激达到了。对于用血清或 bFGF 刺激来说, zoledronate 的抑制作用显著高于在 3 $\mu$ M 和 3 $\mu$ M 以上浓度下 EDTA 的抑制作用, 而使用 VEGF 刺激仅在 30 $\mu$ M 下具有显著性差异。

通过 zoledronate 抑制了人肿瘤细胞系 A431 的增殖, 其中 IC<sub>50</sub> 为 1.35 $\mu$ M。EDTA 在测试剂量范围内对 A431 增殖没有显著作用, 尽管在

30 $\mu$ M 下似乎有轻度抑制作用（8.8%）。

Zoledronate 在达到 10 $\mu$ M 的浓度下刺激了基础培养基中以及含有血清或 VEGF 的培养基中 HUVEC 的迁移。在 30 $\mu$ M 下迁移受到了完全抑制且观察到了细胞形态的改变。EDTA 对迁移没有一致的作用。

这些研究证实 zoledronate 抑制了由血清、VEGF 和 bFGF 诱发的人内皮细胞增殖。

a)

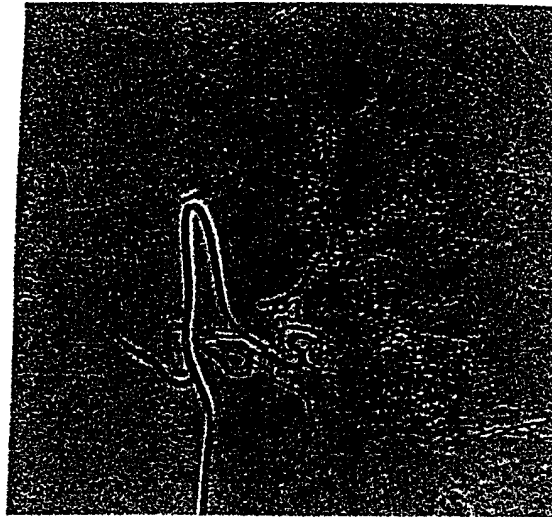
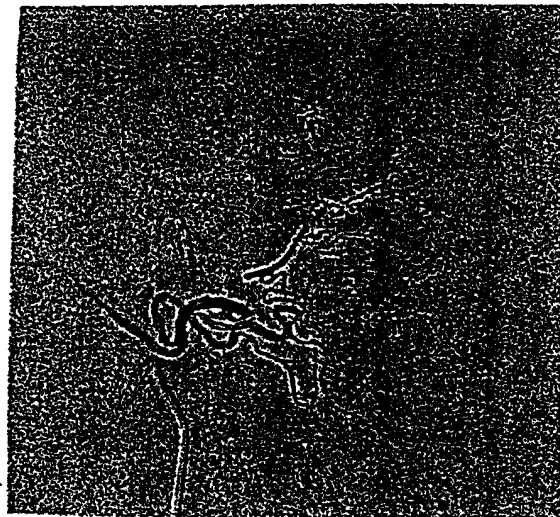


图 1

b)

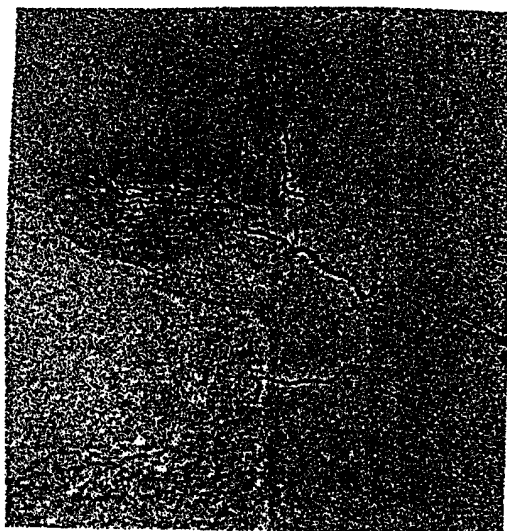


a)



图 2

b)



a)



图 3

b)

