

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580020912.4

[51] Int. Cl.

A61K 31/275 (2006.01)

C07C 3/00 (2006.01)

C07C 233/05 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

[43] 公开日 2007年5月30日

[11] 公开号 CN 1972682A

[22] 申请日 2005.3.19

[21] 申请号 200580020912.4

[30] 优先权

[32] 2004.5.20 [33] US [31] 10/849,039

[86] 国际申请 PCT/US2005/017588 2005.3.19

[87] 国际公布 WO2005/113565 英 2005.12.1

[85] 进入国家阶段日期 2006.12.22

[71] 申请人 田纳西大学研究基金会

地址 美国田纳西

[72] 发明人 詹姆斯·T·多尔顿

杜安·D·米勒 尹冬华 何雅丽

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 张晓威

权利要求书 17 页 说明书 94 页 附图 48 页

[54] 发明名称

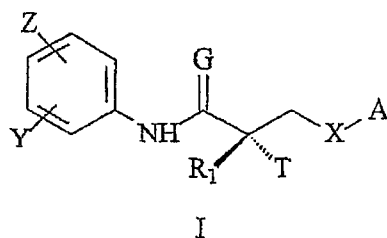
选择性雄激素受体调节剂的代谢物及其使用方法

[57] 摘要

本发明提供一类雄激素受体靶向活性剂 (AR-TA) 的代谢物。所述 SARM 化合物及其代谢物单独或作为组合物用于 a) 男性避孕; b) 治疗多种激素相关病症, 例如与年老男性雄激素减少 (ADAM) 有关的病症, 如疲劳、抑郁、性欲降低、性功能障碍、勃起功能障碍、性腺机能减退、骨质疏松、脱发、贫血、肥胖、肌肉减少、骨质减少、骨质疏松、良性前列腺增生、情绪和认知改变以及前列腺癌; c) 治疗与女性雄激素减少 (ADIF) 有关的病症, 如性功能障碍、性欲降低、性腺机能减退、肌肉减少、骨质减少、骨质疏松、认知和情绪改变、抑郁、贫血、脱发、肥胖、子宫内膜异位症、乳腺癌、子宫癌和卵巢癌; d) 治疗和/或预防急性和/或慢性肌肉消瘦症; e) 预防和/或治疗干眼症; f) 口服雄激素替代

治疗; g) 降低前列腺癌的发病率、阻止前列腺癌或导致前列腺癌消退; 和/或 h) 诱导癌细胞凋亡。

1. 一种选择性雄激素受体调节剂(SARM)化合物的代谢物, 其中所述 SARM 由式 I 的结构代表:



其中 G 是 O 或 S;

X 是 O;

T 是 OH、OR、-NHCOCH₃ 或 NHCOR;

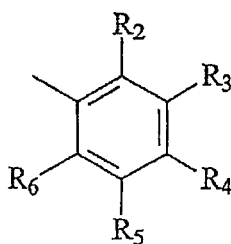
Z 是 NO₂、CN、COOH、COR、NHCOR 或 CONHR;

Y 是氢、烷基、羟基-烷基或烷基醛、CF₃、F、I、Br、Cl、CN、C(R)₃ 或 Sn(R)₃;

R 是烷基、卤代烷基、二卤代烷基、三卤代烷基、CH₂F、CHF₂、CF₃、CF₂CF₃、芳基、苯基、卤素、烯基或 OH;

R₁ 是 CH₃、CH₂F、CHF₂、CF₃、CH₂CH₃ 或 CF₂CF₃; 且

A 是或



其中

R₂、R₃、R₄、R₅、R₆ 独立地是氢、卤素、CN、NHCOCF₃、乙酰氨基或三氟乙酰氨基。

2. 权利要求 1 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中 G 是 O。

3. 权利要求 1 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中 T 是

OH。

4. 权利要求 1 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中 R_1 是 CH_3 。

5. 权利要求 1 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中 Z 是 CN 。

6. 权利要求 1 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中 Y 是 CF_3 。

7. 权利要求 1 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中 Q 在对位。

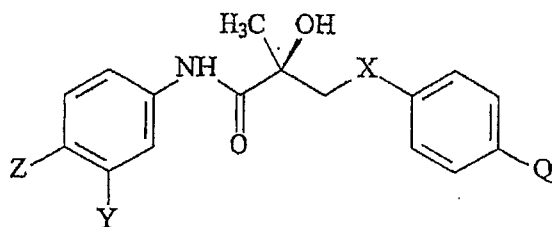
8. 权利要求 1 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中 Z 在对位。

9. 权利要求 1 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中 Y 在间位。

10. 权利要求 1 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中所述代谢物是雄激素受体激动剂。

11. 权利要求 1 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中所述代谢物是雄激素受体拮抗剂。

12. 权利要求 1 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中所述 SARM 由式 II 的结构代表:

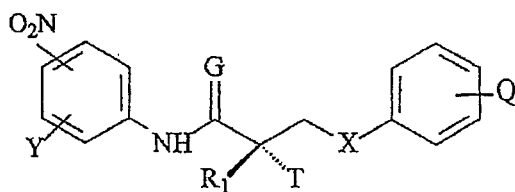


II

其中 Q 是乙酰氨基或三氟乙酰氨基。

13. 权利要求 1 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中所述

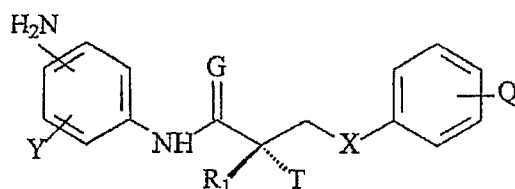
SARM 由式 VII 的结构代表:



VII

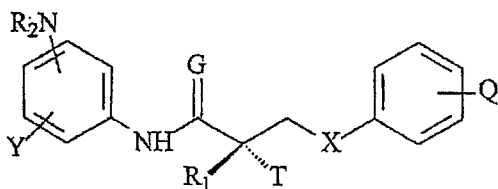
其中 Q 是乙酰氨基或三氟乙酰氨基。

14. 权利要求 13 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中所述代谢物由以下结构代表:



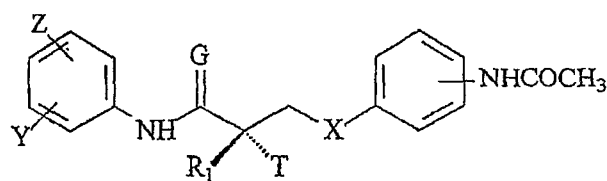
其中 Q 是乙酰氨基或三氟乙酰氨基。

15. 权利要求 13 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中所述代谢物由以下结构代表:



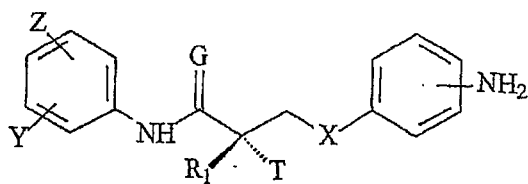
其中 Q 是乙酰氨基或三氟乙酰氨基, 且其中 NR_2 是 NO、NHOH、NHOSO₃ 或 NHO-葡萄糖苷酸。

16. 权利要求 1 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中所述 SARM 由式 VIII 的结构代表:



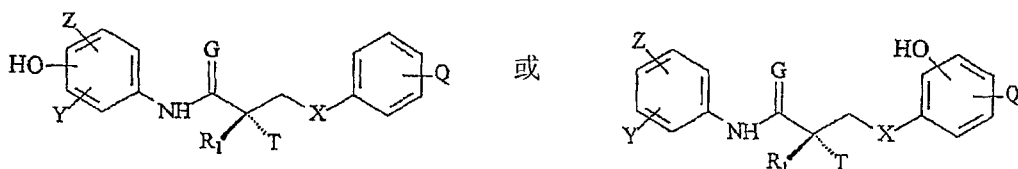
VIII

17. 权利要求 16 的选择性雄激素受体调节剂代谢物，其中所述代谢物由以下结构代表：



18. 权利要求 1 的选择性雄激素受体调节剂代谢物，其中所述代谢物是式 I 的 SARM 化合物的羟基化衍生物。

19. 权利要求 18 的选择性雄激素受体调节剂代谢物，其中所述代谢物由以下结构代表：



其中 Q 是乙酰氨基或三氟乙酰氨基。

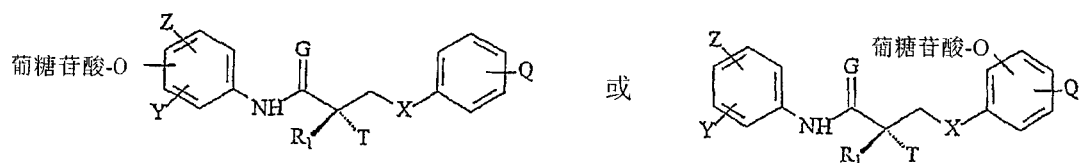
20. 权利要求 18 的选择性雄激素受体调节剂代谢物，其中所述代谢物由以下结构代表：



其中 Q 是乙酰氨基或三氟乙酰氨基。

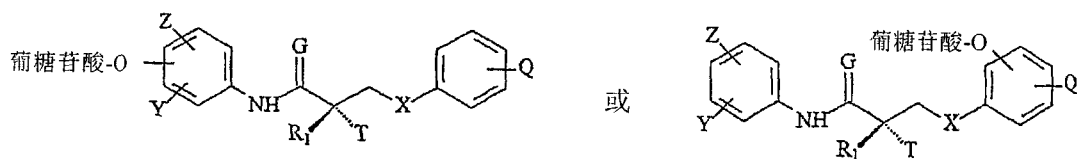
21. 权利要求 1 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中所述代谢物是式 I 的 SARM 化合物的 O-葡萄糖苷酸衍生物。

22. 权利要求 21 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中所述代谢物由以下结构代表:



其中 Q 是乙酰氨基或三氟乙酰氨基。

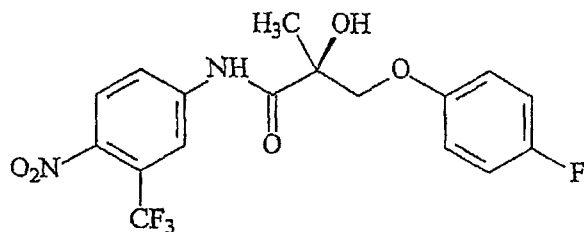
23. 权利要求 21 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中所述代谢物由以下结构代表:



其中 Q 是乙酰氨基或三氟乙酰氨基。

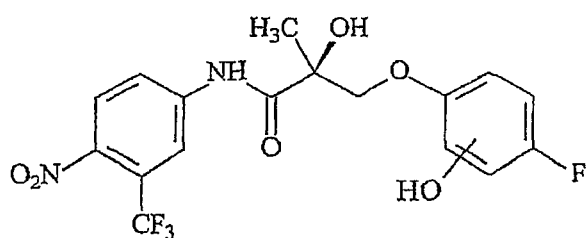
24. 权利要求 1 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中所述代谢物是式 I 的 SARM 化合物的甲基化衍生物。

25. 权利要求 1 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中所述 SARM 由式 III 的结构代表:

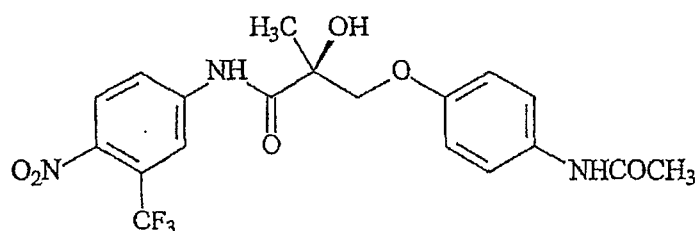


III

26. 权利要求 25 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中所述代谢物由以下结构代表:

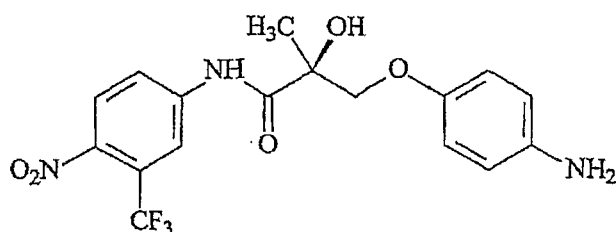


27. 权利要求 1 的选择性雄激素受体调节剂代谢物，其中所述 SARM 由式 IV 的结构代表：



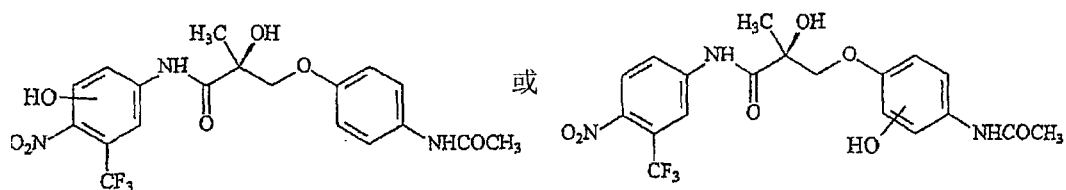
IV

28. 权利要求 27 的选择性雄激素受体调节剂代谢物，其中所述代谢物由以下结构代表：

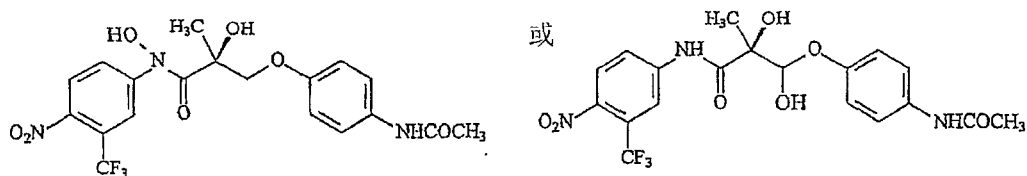


29. 权利要求 27 的选择性雄激素受体调节剂代谢物，其中所述代谢物是式 IV 的 SARM 化合物的羟基化衍生物。

30. 权利要求 29 的选择性雄激素受体调节剂代谢物，其中所述代谢物由以下结构代表：

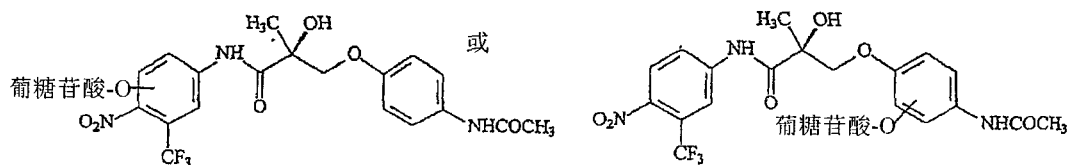


31. 权利要求 29 的选择性雄激素受体调节剂代谢物，其中所述代谢物由以下结构代表：

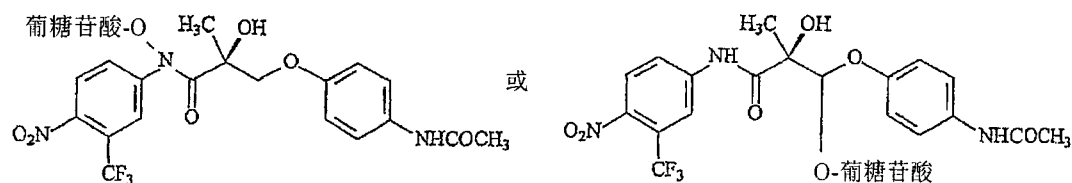


32. 权利要求 27 的选择性雄激素受体调节剂代谢物，其中所述代谢物是式 I 的 SARM 化合物的 O-葡萄糖苷酸衍生物。

33. 权利要求 32 的选择性雄激素受体调节剂代谢物，其中所述代谢物由以下结构代表：



34. 权利要求 32 的选择性雄激素受体调节剂代谢物，其中所述代谢物由以下结构代表：



35. 权利要求 27 的选择性雄激素受体调节剂代谢物，其中所述代谢物是式 IV 的 SARM 化合物的甲基化衍生物。

36. 一种组合物，其含有权利要求 1 的选择性雄激素受体调节剂代谢物和合适的载体或稀释剂。

37. 一种药物组合物，其含有有效量的权利要求 1 的选择性雄激素受体调节剂代谢物和药学可接受载体或稀释剂。

38. 一种使选择性雄激素受体调节剂化合物与雄激素受体结合的方法, 其包括使所述雄激素受体与有效使选择性雄激素受体调节剂代谢物与所述雄激素受体结合的量的权利要求 1 的选择性雄激素受体调节剂代谢物接触的步骤。

39. 一种抑制个体精子发生的方法, 其包括使所述个体的雄激素受体与有效抑制精子生成的量的权利要求 1 的选择性雄激素受体调节剂代谢物接触。

40. 一种男性个体避孕的方法, 其包括给予所述个体有效抑制所述个体精子生成从而实现所述个体避孕的量的权利要求 1 的选择性雄激素受体调节剂代谢物的步骤。

41. 一种激素治疗方法, 其包括使个体的雄激素受体与有效改变雄激素依赖病症的量的权利要求 1 的选择性雄激素受体调节剂代谢物接触的步骤。

42. 一种激素替代治疗方法, 其包括使个体的雄激素受体与有效改变雄激素依赖病症的量的权利要求 1 的选择性雄激素受体调节剂代谢物接触的步骤。

43. 一种治疗患有激素相关病症的个体的方法, 其包括给予所述个体有效改变雄激素依赖病症的量的权利要求 1 的选择性雄激素受体调节剂代谢物的步骤。

44. 一种治疗患有前列腺癌的个体的方法, 其包括给予所述个体有效治疗所述个体前列腺癌的量的权利要求 1 的选择性雄激素受体调节剂代谢物的步骤。

45. 一种预防个体前列腺癌的方法, 其包括给予所述个体有效预防所述个体前列腺癌的量的权利要求 1 的选择性雄激素受体调节剂前药的步骤。

46. 一种延迟患有前列腺癌的个体的前列腺癌进展的方法，其包括给予所述个体有效延迟所述个体前列腺癌进展的量的权利要求 1 的选择性雄激素受体调节剂代谢物的步骤。

47. 一种预防患有前列腺癌的个体的前列腺癌复发的方法，其包括给予所述个体有效预防所述个体前列腺癌复发的量的权利要求 1 的选择性雄激素受体调节剂代谢物的步骤。

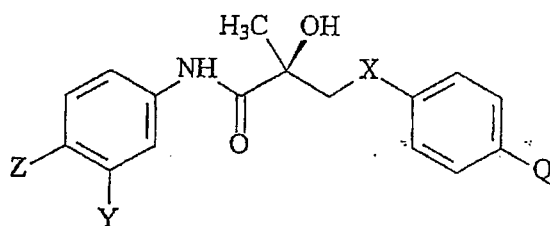
48. 一种治疗患有前列腺癌的个体的前列腺癌复发的方法，其包括给予所述个体有效治疗所述个体前列腺癌复发的量的权利要求 1 的选择性雄激素受体调节剂代谢物的步骤。

49. 一种治疗患有干眼症的个体的干眼症的方法，其包括给予所述个体有效治疗所述个体干眼症的量的权利要求 1 的选择性雄激素受体调节剂代谢物的步骤。

50. 一种预防个体干眼症的方法，其包括给予所述个体有效预防所述个体干眼症的量的权利要求 1 的选择性雄激素受体调节剂代谢物的步骤。

51. 一种诱导癌细胞凋亡的方法，其包括使所述细胞与有效诱导所述癌细胞凋亡的量的权利要求 1 的选择性雄激素受体调节剂代谢物接触的步骤。

52. 一种选择性雄激素受体调节剂(SARM)化合物的代谢物，其中所述 SARM 化合物由式 II 的结构代表：



II

其中 X 是 O;

Z 是 NO₂、CN、COOH、COR、NHCOR 或 CONHR;

Y 是 CF₃、F、I、Br、Cl、CN、CR₃ 或 SnR₃;

Q 是乙酰氨基或三氟乙酰氨基;

R 是烷基、卤代烷基、二卤代烷基、三卤代烷基、CH₂F、CHF₂、CF₃、CF₂CF₃、芳基、苯基、F、Cl、Br、I、烯基或 OH; 且

R₁ 是 CH₃、CH₂F、CHF₂、CF₃、CH₂CH₃ 或 CF₂CF₃。

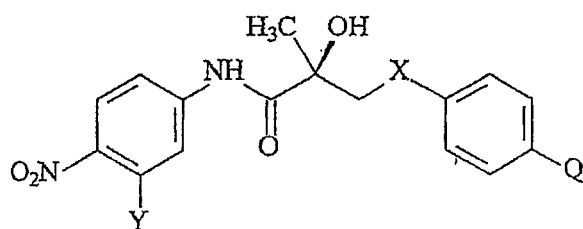
53. 权利要求 52 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中 Z 是 CN。

54. 权利要求 52 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中 Y 是 CF₃。

55. 权利要求 52 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中所述化合物是雄激素受体激动剂。

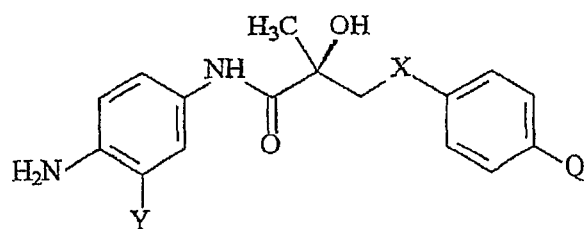
56. 权利要求 52 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中所述化合物是雄激素受体拮抗剂。

57. 权利要求 52 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中所述 SARM 由式 IX 的结构代表:

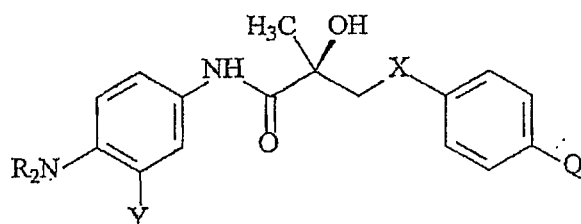


IX

58. 权利要求 57 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中所述代谢物由以下结构代表:

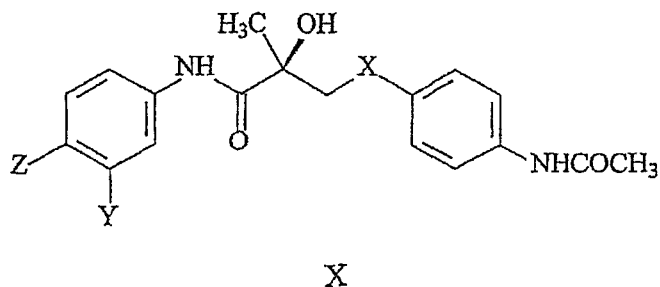


59. 权利要求 57 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中所述代谢物由以下结构代表:

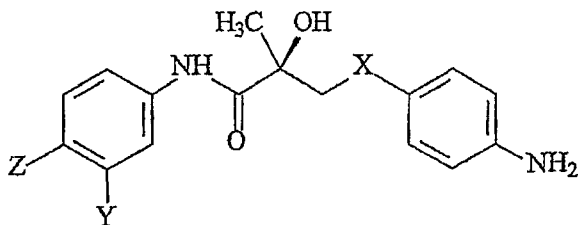


其中 NR_2 是 NHOH 、 NO 、 NHOSO_3 或 NHO -葡萄糖苷酸。

60. 权利要求 52 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中所述 SARM 由式 X 的结构代表:

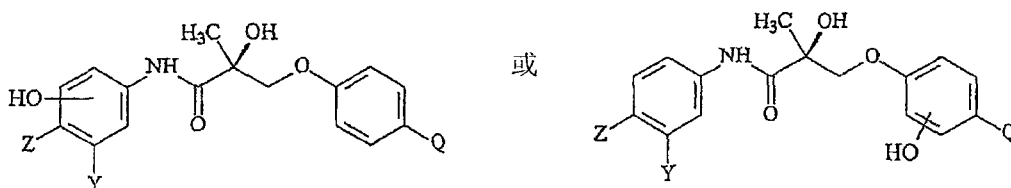


61. 权利要求 60 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中所述代谢物由以下结构代表:

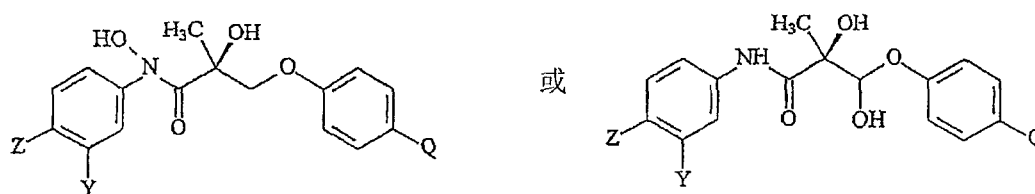


62. 权利要求 52 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中所述代谢物是式 II 的 SARM 化合物的羟基化衍生物。

63. 权利要求 62 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中所述代谢物由以下结构代表:

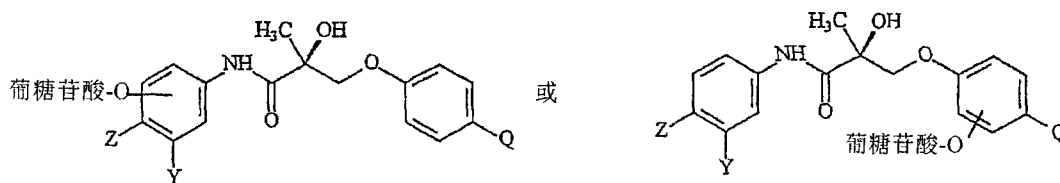


64. 权利要求 62 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中所述代谢物由以下结构代表:

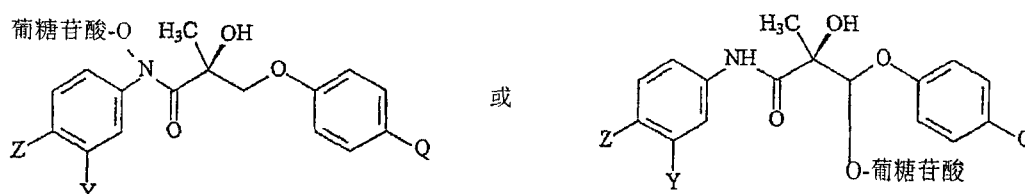


65. 权利要求 52 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中所述代谢物是式 II 的 SARM 化合物的 O-葡萄糖苷酸衍生物。

66. 权利要求 65 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中所述代谢物由以下结构代表:



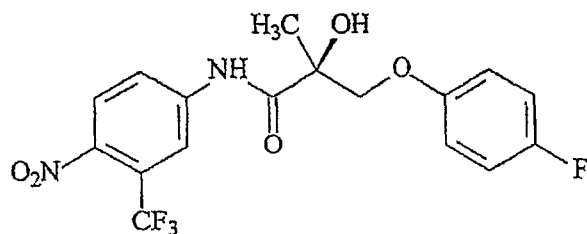
67. 权利要求 65 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中所述代谢物由以下结构代表:



68. 权利要求 52 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中所述

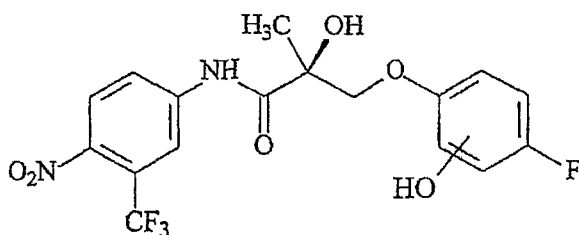
代谢物是式 II 的 SARM 化合物的甲基化衍生物。

69. 权利要求 52 的选择性雄激素受体调节剂代谢物，其中所述 SARM 由式 III 的结构代表：

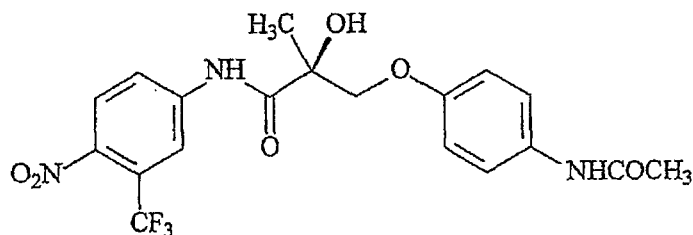


III

70. 权利要求 69 的选择性雄激素受体调节剂代谢物，其中所述代谢物由以下结构代表：

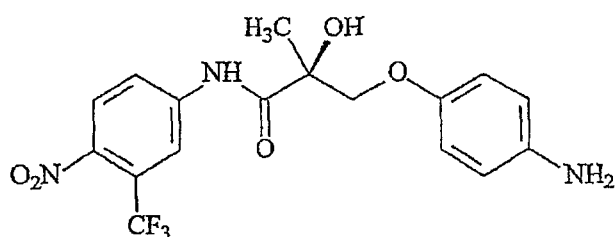


71. 权利要求 52 的选择性雄激素受体调节剂代谢物，其中所述 SARM 由式 IV 的结构代表：



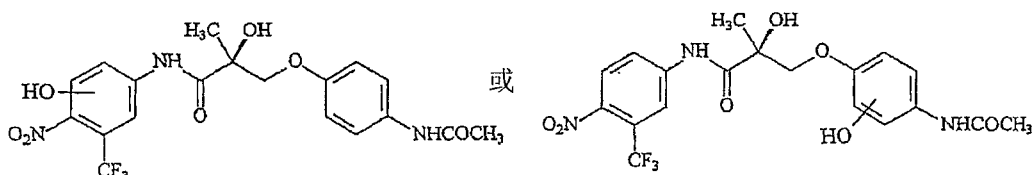
IV

72. 权利要求 71 的选择性雄激素受体调节剂代谢物，其中所述代谢物由以下结构代表：

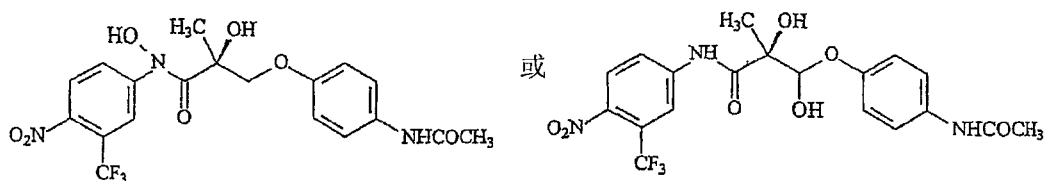


73. 权利要求 71 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中所述代谢物是式 IV 的 SARM 化合物的羟基化衍生物。

74. 权利要求 73 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中所述 SARM 代谢物由以下结构代表:

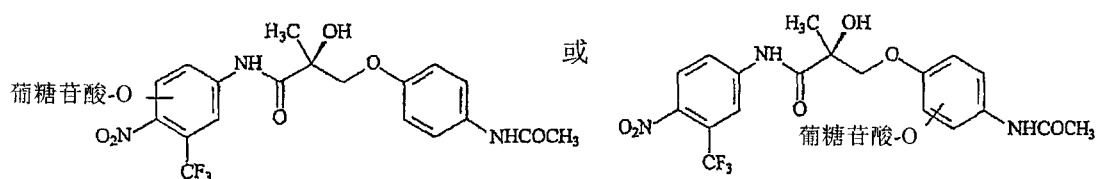


75. 权利要求 73 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中所述代谢物由以下结构代表:

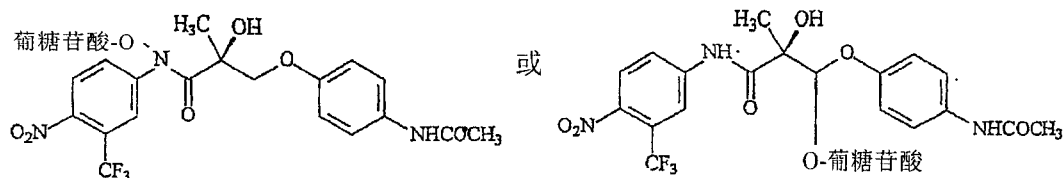


76. 权利要求 71 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中所述代谢物是式 IV 的 SARM 化合物的 O-葡萄糖苷酸衍生物。

77. 权利要求 76 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中所述代谢物由以下结构代表:



78. 权利要求 76 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中所述代谢物由以下结构代表:



79. 权利要求 71 的选择性雄激素受体调节剂代谢物, 其中所述代谢物是式 IV 的 SARM 化合物的甲基化衍生物。

80. 一种组合物, 其含有权利要求 52 的选择性雄激素受体调节剂代谢物和合适的载体或稀释剂。

81. 一种药物组合物, 其含有有效量的权利要求 52 的选择性雄激素受体调节剂代谢物和药学可接受载体或稀释剂。

82. 一种使选择性雄激素受体调节剂化合物与雄激素受体结合的方法, 其包括使所述雄激素受体与有效使选择性雄激素受体调节剂代谢物与所述雄激素受体结合的量的权利要求 52 的选择性雄激素受体调节剂代谢物接触的步骤。

83. 一种抑制个体精子发生的方法, 其包括使所述个体的雄激素受体与有效抑制精子生成的量的权利要求 52 的选择性雄激素受体调节剂代谢物接触。

84. 一种男性个体避孕的方法, 其包括给予所述个体有效抑制所述个体精子生成从而实现所述个体避孕的量的权利要求 52 的选择性雄激素受体调节剂代谢物的步骤。

85. 一种激素治疗方法, 其包括使个体的雄激素受体与有效改变雄激素依赖病症的量的权利要求 52 的选择性雄激素受体调节剂代谢物接触的步骤。

86. 一种激素替代治疗方法，其包括使个体的雄激素受体与有效改变雄激素依赖病症的量的权利要求 52 的选择性雄激素受体调节剂代谢物接触。

87. 一种治疗患有激素相关病症的个体的方法，其包括给予所述个体有效改变雄激素依赖病症的量的权利要求 52 的选择性雄激素受体调节剂代谢物的步骤。

88. 一种治疗患有前列腺癌的个体的方法，其包括给予所述个体有效治疗所述个体前列腺癌的量的权利要求 52 的选择性雄激素受体调节剂代谢物的步骤。

89. 一种预防个体前列腺癌的方法，其包括给予所述个体有效预防所述个体前列腺癌的量的权利要求 52 的选择性雄激素受体调节剂前药的步骤。

90. 一种延迟患有前列腺癌的个体的前列腺癌进展的方法，其包括给予所述个体有效延迟所述个体前列腺癌进展的量的权利要求 32 的选择性雄激素受体调节剂代谢物的步骤。

91. 一种预防患有前列腺癌的个体的前列腺癌复发的方法，其包括给予所述个体有效预防所述个体前列腺癌复发的量的权利要求 52 的选择性雄激素受体调节剂代谢物的步骤。

92. 一种治疗患有前列腺癌的个体的前列腺癌复发的方法，其包括给予所述个体有效治疗所述个体前列腺癌复发的量的权利要求 52 的选择性雄激素受体调节剂代谢物的步骤。

93. 一种治疗患有干眼症的个体的干眼症的方法，其包括给予所述个体有效治疗所述个体干眼症的量的权利要求 52 的选择性雄激素受体调节剂代谢物的步骤。

94. 一种预防个体干眼症的方法，其包括给予所述个体有效预防

所述个体干眼症的量的权利要求 52 的选择性雄激素受体调节剂代谢物的步骤。

95. 一种诱导癌细胞凋亡的方法，其包括使所述细胞与有效诱导所述癌细胞凋亡的量的权利要求 52 的选择性雄激素受体调节剂代谢物接触的步骤。

选择性雄激素受体调节剂的代谢物及其使用方法

发明领域

本发明涉及一类新的雄激素受体靶向活性剂(ARTA)的代谢物,所述雄激素受体靶向活性剂是选择性雄激素受体调节剂(SARM)。所述 SARM 化合物及其代谢物用于 a) 男性避孕; b) 治疗多种激素相关病症,例如与年老男性雄激素减少(ADAM)有关的病症,如疲劳、抑郁、性欲降低、性功能障碍、勃起功能障碍、性腺机能减退、骨质疏松、脱发、贫血、肥胖、肌肉减少、骨质减少、骨质疏松、良性前列腺增生、情绪和认知改变以及前列腺癌; c) 治疗与女性雄激素减少(ADIF)有关的病症,如性功能障碍、性欲降低、性腺机能减退、肌肉减少、骨质减少、骨质疏松、认知和情绪改变、抑郁、贫血、脱发、肥胖、子宫内膜异位症、乳腺癌、子宫癌和卵巢癌; d) 治疗和/或预防急性和/或慢性肌肉消瘦症; e) 预防和/或治疗干眼症; f) 口服雄激素替代治疗; g) 降低前列腺癌的发病率、阻止前列腺癌或导致前列腺癌消退; 和/或 h) 诱导癌细胞凋亡。

发明背景

雄激素受体(“AR”)是配体激活的转录调节蛋白,其通过其内源雄激素活性介导男性性发育和功能的诱导。雄激素通常被称为男性性激素。雄性激素是由睾丸和肾上腺皮质在体内产生,或者可以在实验室合成的类固醇。雄性激素类固醇在许多生理过程中起重要作用,包括男性性征如肌肉和骨量的发育和维持、前列腺生长、精子发生以及男性毛发分布(Matsumoto, Endocrinol. Met. Clin. N. Am. 23: 857-75 (1994))。内源类固醇雄激素包括睾酮和二氢睾酮(“DHT”)。睾酮是由睾丸分泌的主要类固醇,并且是在男性血清中发现的主要循环雄激

素。在许多外周组织中，睾酮被酶 5α -还原酶转化成 DHT。因此认为，对于大多数雄激素作用而言，DHT 起着胞内介质的作用(Zhou 等, *Molec. Endocrinol.* 9: 208-18 (1995))。其它类固醇雄激素包括睾酮的酯，如环戊丙酸酯、丙酸酯、苯基丙酸酯、环戊基丙酸酯、isocarporate、庚酸酯和癸酸酯，及其它合成雄激素，如 7-甲基去甲睾酮(“MENT”)及其乙酸酯(Sundaram 等, “7 Alpha-Methyl-Nortestosterone (MENT): The Optimal Androgen For Male Contraception,” *Ann. Med.*, 25: 199-205 (1993) (“Sundaram”)。由于 AR 参与男性性发育和功能，所以 AR 很可能是实现男性避孕或其它形式的激素替代治疗的靶。

世界范围的人口增长和计划生育的社会意识已经激励人们在避孕方面开展大量研究。在任何情况下避孕都是个难题。它充满文化和社会烙印、宗教牵连，而最确定的是重大的健康影响。当主题集中在男性避孕时，这一情形只是更为加剧。尽管有适宜的避孕器具，但历史上，社会还是期望妇女担负起避孕决定和其后果的责任。虽然出于对性传播疾病的考虑使得男性更多地意识到需要养成安全和负责任的性习惯，但是妇女仍然常常承受避孕选择的压力。妇女有许多选择，从暂时机械器具如海绵和隔膜到暂时化学器具如杀精子剂。妇女还具有受她们支配的更持久的选择，如包括 IUD 和宫颈帽在内的物理器具，以及诸如口服避孕药和皮下植入物的更持久的化学治疗。然而，迄今为止，男子仅有的选择包括使用避孕套和输精管切除术。不过，由于降低性敏感度、中断性自发性以及因破裂或不正确的使用而引起妊娠的明显可能性，所以许多男子不赞成使用避孕套。输精管切除术也未得到赞成。如果男子有更方便的避孕方法，特别是性行为前即刻无需预备活动的长效方法，此类方法可以显著地增加男子对避孕承担更多责任的可能性。

在此方面，给予男性性类固醇(例如睾酮及其衍生物)已经显示出特别的希望，这是由于这些化合物具有抑制促性腺激素和替代雄激素

的联合性质(Steinbefger 等, "Effect of Chronic Administration of Testosterone Enanthate on Sperm Production and Plasma Testosterone, Follicle Stimulating Hormone, and Luteinizing Hormone Levels: A Preliminary Evaluation of a Possible Male Contraceptive, Fertility and Sterility 28: 1320-28 (1977))。长期给予高剂量睾酮完全消除精子产生(无精子)或使精子减少至极低水平(精子减少)。对于产生不育所需的精子发生抑制的程度并不确切知道。然而,世界卫生组织的新近报告表明,每周肌肉注射睾酮庚酸酯在 98%的接受治疗的男子中引起无精子或严重的精子减少(即每毫升小于三百万个精子)和不育(World Health Organization Task Force on Methods and Regulation of Male Fertility, "Contraceptive Efficacy of Testosterone-Induced Azoospermia and Oligospermia in Normal Men, "Fertility and Sterility 65: 821-29 (1996))。

已经开发出肌肉注射后更慢地被吸收并因此导致更强的促雄性征作用的各种睾酮酯。在这些酯中,睾酮庚酸酯应用最为广泛。虽然睾酮庚酸酯在建立用于男性避孕的激素药的可行性方面有价值,但其具有若干缺陷,包括需要每周注射和肌肉注射后立即出现的睾酮的超生理峰水平的存在(Wu, "Effects of Testosterone Enanthate in Normal Men: Experience From a Multicenter Contraceptive Efficacy Study, "Fertility and Sterility 65: 626-36 (1996))。

结合 AR 并作为雄激素起作用的类固醇配体(例如睾酮庚酸酯)或作为抗雄激素起作用的类固醇配体(例如醋酸环丙孕酮)已知多年,并在临床上使用(Wu 1988)。尽管非甾族抗雄激素在临床上用于激素依赖性前列腺癌,但是,尚没有非甾族雄激素类的报道。因此,对用于男性避孕和激素替代治疗的雄激素类的研究主要集中在甾族化合物上。

在美国,前列腺癌是男性中最常发生的癌症之一,每年诊断出数十万新病例。不幸的是,新诊断的前列腺癌病例中有 60%以上发现

是病理上晚期的，无法治愈且预后不佳。解决这一问题的一个途径是通过筛选程序早期发现前列腺癌，从而减少晚期前列腺癌患者的数目。然而，另一方法是开发药物来预防前列腺癌。50 岁以上的男性中有 1/3 患有潜在形式的前列腺癌，其可能会被激活成威胁生命的临床前列腺癌形式。在 50 年代到 90 年代间，潜在前列腺肿瘤的发生频率每十年都显著增加，50 年代为 5.3-14%，而 90 年代为 40-80%。患有潜在前列腺癌的人的数目在所有文化、人种群和种族间相同，然而临床攻击性癌症的发生频率显著不同。这表明环境因素可能在激活潜在前列腺癌中起作用。因此，前列腺癌的治疗和预防策略的开发可能对前列腺癌的防治具有最大的整体医学和经济意义。

骨质疏松是一种全身性骨骼疾病，其特征在于低骨量和骨组织劣化，结果骨脆性增加并容易骨折。在美国，此病症影响大于 2500 万人，并导致每年超过 130 万例骨折，包括每年 500000 例脊柱骨折、250000 例髌骨折和 240000 例腕骨折。髌骨折是骨质疏松的最严重后果，有 5-20% 的患者在一年内死亡，超过 50% 的生存者无行为能力。年老者一般有最大的骨质疏松危险，因此，预计此问题随人口老龄化而显著增加。预计世界范围内的骨折发病率在随后 60 年内增加三倍，且一项研究估计 2050 年全世界将有 450 万例髌骨折。

女性骨质疏松的危险大于男性。女性在绝经后 5 年内骨损失明显加速。其它增大该危险的因素包括吸烟、酒精滥用、久坐的生活方式和低钙摄入。但是，男性也经常发生骨质疏松。已明确确定男性骨矿密度随年龄增加而降低。骨矿含量和密度量的减少与骨强度降低有关，并易骨折。性激素在非生殖组织中多效性作用的分子机理刚刚开始被认识，不过雄激素和雌激素的生理浓度在整个生命周期中对骨稳态的保持起重要作用是清楚的。因此，当雄激素或雌激素剥夺发生时，其结果是骨重塑速度增加，使吸收和形成的平衡倾斜为有利于吸收，这导致整体骨量损失。在男性中，成熟性激素的自然减少(雄激素的

直接减少和衍生自雄激素外周芳构化的雌激素的较低水平)与骨脆弱有关。这种作用也在阉割男性中观察到。

年老男性雄激素减少(ADAM)指雄激素产生的渐进减少,常见于中年后的男性。该综合征的特征是身体和智力方面的改变,其与雄激素环境有关并可通过控制雄激素环境来纠正。ADAM 的生物化学特征是不仅血清雄激素减少,而且其它激素如生长激素、褪黑激素和脱氢反雄甾酮也减少。临床表现包括疲劳、抑郁、性欲降低、性功能障碍、勃起功能障碍、性腺机能减退、骨质疏松、脱发、肥胖、肌肉减少、骨质减少、良性前列腺增生以及情绪和认知改变。

女性雄激素缺乏(ADIF)指多种激素相关病症,包括中年后女性中常见的病症。该综合征的特征是性功能障碍、性欲降低、性腺机能减退、肌肉减少、骨质减少、骨质疏松、认知和情绪改变、贫血、抑郁、贫血、脱发、肥胖、子宫内膜异位症、乳癌、子宫癌和卵巢癌。

肌肉消瘦症指肌肉量渐进损失和/或肌肉,包括控制运动的骨骼或随意肌、控制心脏的心肌(心肌病),和平滑肌的渐进变弱和退化。慢性肌肉消瘦症是慢性病症(即持续一段长时间),其特征是肌肉量的渐进损失,肌肉的变弱和退化。在肌肉消瘦症期间发生的肌肉量损失的特征可以是肌蛋白分解或降解。蛋白质降解发生的原因是异乎寻常地高的蛋白质降解速度、异乎寻常地低的蛋白质合成速度,或者二者的结合。蛋白质降解,不管是由高蛋白质降解度导致还是由低蛋白质合成度导致,都导致肌肉量减少和肌肉消瘦症。肌肉消瘦症与慢性、神经性、遗传性或传染性病理、疾病、病痛或病症有关。这些包括肌肉营养不良,如杜兴氏肌营养不良和肌强直性营养不良;肌萎缩症,如脊髓灰质炎后肌萎缩症(PPMA);恶病质,如心脏恶病质、AIDS 恶病质和癌症恶病质、营养不良、麻风、糖尿病、肾病、慢性阻塞性肺病(COPD)、癌症、末期肾衰、肺气肿、软骨病、HIV 感染、AIDS 和心肌病。此外,其它环境和病症与肌肉消瘦症有关,并可以导致肌肉

消瘦症。这些包括慢性下背疼痛、高龄、中枢神经系统(CNS)损伤、外周神经损伤、脊髓损伤、化学损伤、中枢神经系统(CNS)损伤、外周神经损伤、脊髓损伤、化学损伤、烧伤、在由于病痛或损伤导致四肢固定、长期住院时发生的废用性功能退化(disuse deconditioning), 以及酒精中毒。肌肉消瘦症如果不减弱的话, 可能有可怕的后果。例如, 在肌肉消瘦症期间发生的变化可能导致身体状况变弱, 这对个体的健康有害, 导致对感染的易感性增加、行为状态不良和易于受到损伤。

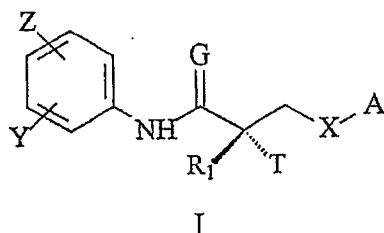
在基础科学和临床水平急切需要新的革新性方法来开发用于以下的化合物: a) 男性避孕; b) 治疗多种激素相关病症, 例如与年老男性雄激素减少(ADAM)有关的病症, 如疲劳、抑郁、性欲降低、性功能障碍、勃起功能障碍、性腺机能减退、骨质疏松、脱发、贫血、肥胖、肌肉减少、骨质减少、骨质疏松、良性前列腺增生、情绪和认知改变以及前列腺癌; c) 治疗与 ADIF 有关的病症, 如性功能障碍、性欲降低、性腺机能减退、肌肉减少、骨质减少、骨质疏松、认知和情绪改变、抑郁、贫血、脱发、肥胖、子宫内膜异位症、乳癌、子宫癌和卵巢癌; d) 治疗和/或预防急性和/或慢性肌肉消瘦症; e) 预防和/或治疗干眼症; f) 口服雄激素替代治疗; 和/或 g) 降低前列腺癌的发病率, 阻止前列腺癌或导致前列腺癌消退。

发明内容

本发明提供一类雄激素受体靶向活性剂(ARTA)的代谢物。该活性剂定义一类新的化合物, 其是选择性雄激素受体调节剂(SARM)。所述 SARM 化合物及其代谢物用于 a) 男性避孕; b) 治疗多种激素相关病症, 例如与年老男性雄激素减少(ADAM)有关的病症, 如疲劳、抑郁、性欲降低、性功能障碍、勃起功能障碍、性腺机能减退、骨质疏松、脱发、贫血、肥胖、肌肉减少、骨质减少、骨质疏松、良性前

列腺增生、情绪和认知改变以及前列腺癌；c) 治疗与女性雄激素减少(ADIF)有关的病症，如性功能障碍、性欲降低、性腺机能减退、肌肉减少、骨质减少、骨质疏松、认知和情绪改变、抑郁、贫血、脱发、肥胖、子宫内膜异位症、乳癌、子宫癌和卵巢癌；d) 治疗和/或预防急性和/或慢性肌肉消瘦症；e) 预防和/或治疗干眼症；f) 口服雄激素替代治疗；g) 降低前列腺癌的发病率、阻止前列腺癌或导致前列腺癌消退；和/或 h) 诱导癌细胞凋亡。

在一个实施方案中，本发明提供选择性雄激素受体调节剂(SARM)化合物的代谢物，其中所述 SARM 化合物由式 I 的结构代表：



其中 G 是 O 或 S；

X 是 O；

T 是 OH、OR、-NHCOCH₃ 或 NHCOR；

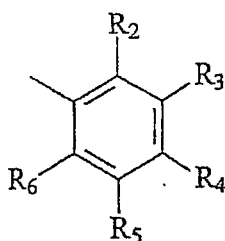
Z 是 NO₂、CN、COOH、COR、NHCOR 或 CONHR；

Y 是氢、烷基、羟基-烷基或烷基醛、CF₃、F、I、Br、Cl、CN、C(R)₃ 或 Sn(R)₃；

R 是烷基、卤代烷基、二卤代烷基、三卤代烷基、CH₂F、CHF₂、CF₃、CF₂CF₃、芳基、苯基、卤素、烯基或 OH；

R₁ 是 CH₃、CH₂F、CHF₂、CF₃、CH₂CH₃ 或 CF₂CF₃；且

A 是或

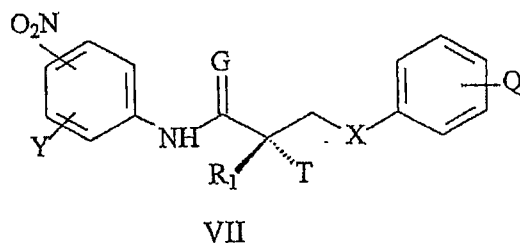


其中

R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 独立地是氢、卤素、CN、 NHCOCF_3 、乙酰氨基或三氟乙酰氨基；

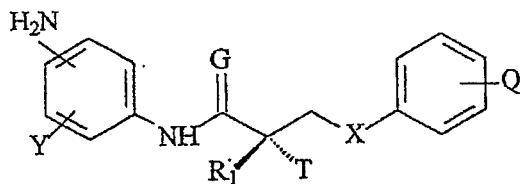
在一个实施方案中，在化合物 I 中 G 是 O。在另一个实施方案中，在化合物 I 中 T 是 OH。在另一个实施方案中，在化合物 I 中 R_1 是 CH_3 。在另一个实施方案中，在化合物 I 中 Z 是 NO_2 。在另一个实施方案中，在化合物 I 中 Z 是 CN。在另一个实施方案中，在化合物 I 中 Y 是 CF_3 。在另一个实施方案中，在化合物 I 中 Q 是 NHCOCF_3 。在另一个实施方案中，在化合物 I 中 Q 是在对位。在另一个实施方案中，在化合物 I 中 Z 是在对位。在另一个实施方案中，在化合物 I 中 Y 是在间位。在另一个实施方案中，在化合物 I 中 G 是 O，T 是 OH， R_1 是 CH_3 ，Z 是 NO_2 ，Y 是 CF_3 ，且 Q 是 NHCOCF_3 。在另一个实施方案中，在化合物 I 中 G 是 O，T 是 OH，Z 是 CN，Y 是 CF_3 ，且 Q 是 NHCOCF_3 。

在一个实施方案中，式 I 的 SARM 化合物由式 VII 的结构代表：



其中 Q 是乙酰氨基或三氟乙酰氨基。

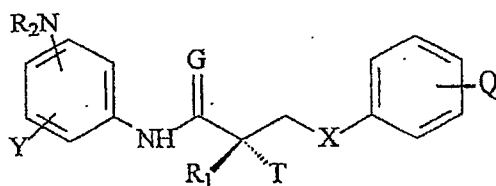
在一个实施方案中，式 VII 的 SARM 化合物的代谢物由以下结构代表：



其中 Q 是乙酰氨基或三氟乙酰氨基。

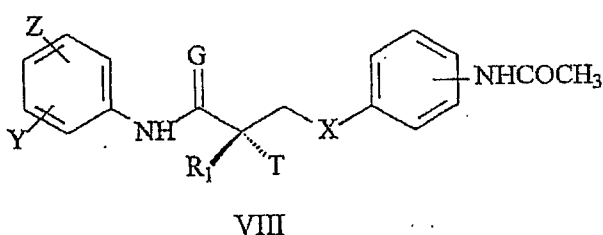
在另一个实施方案中，式 VII 的 SARM 化合物的代谢物由以下

结构代表:

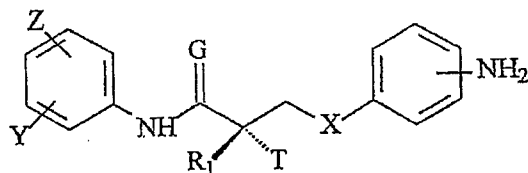


其中 Q 是乙酰氨基或三氟乙酰氨基, 且 NR_2 是 NO、NHOH、 $NHOSO_3$ 或 NHO-葡萄糖苷酸(NHO-glucoronide)。

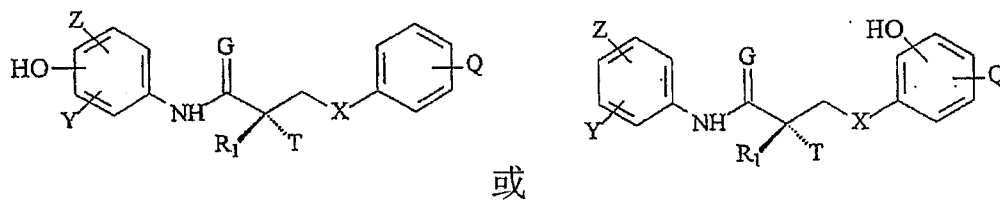
在一个实施方案中, 式 I 的 SARM 化合物由式 VIII 的结构代表:



在一个实施方案中, 式 VIII 的 SARM 化合物的代谢物由以下结构代表:

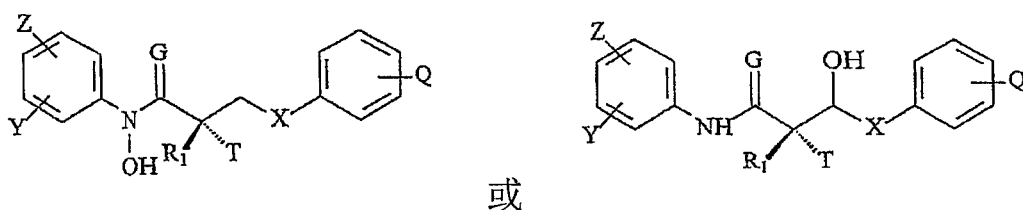


在一个实施方案中, 所述 SARM 代谢物是式 I 的 SARM 化合物的羟基化衍生物。根据这一实施方案, 该代谢物可以由以下结构代表:



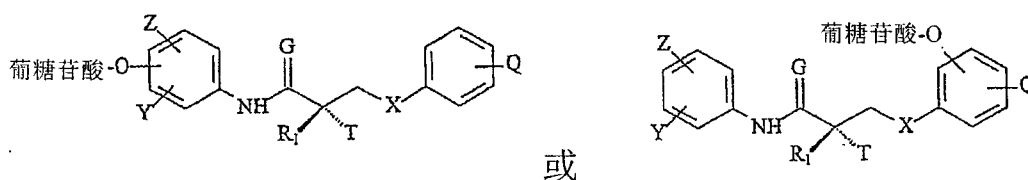
其中 Q 是乙酰氨基或三氟乙酰氨基。

在另一个实施方案中, 该羟基化代谢物由以下结构代表:



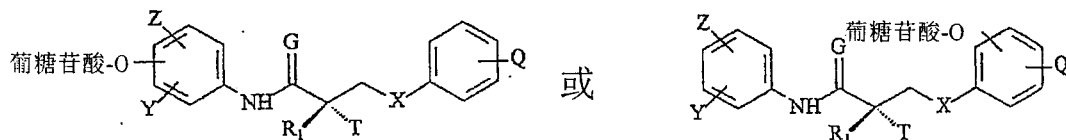
其中 Q 是乙酰氨基或三氟乙酰氨基。

在一个实施方案中, 所述 SARM 代谢物是式 I 的 SARM 化合物的 O-葡萄糖苷酸衍生物。根据这一实施方案, 该代谢物可以由以下结构代表:



其中 Q 是乙酰氨基或三氟乙酰氨基。

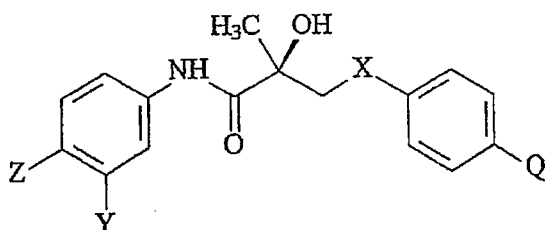
在另一个实施方案中, 该葡萄糖苷酸代谢物由以下结构代表:



其中 Q 是乙酰氨基或三氟乙酰氨基。

在另一个实施方案中, 所述 SARM 代谢物是式 I 的 SARM 化合物的甲基化衍生物。

在另一个实施方案中, 本发明提供选择性雄激素受体调节剂 (SARM) 化合物的代谢物, 其中所述 SARM 化合物由式 II 的结构代表:



II

其中 X 是 O;

Z 是 NO₂、CN、COOH、COR、NHCOR 或 CONHR;

Y 是 CF₃、F、I、Br、Cl、CN、CR₃ 或 SnR₃;

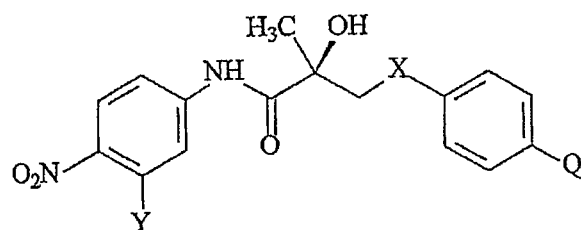
Q 是乙酰氨基或三氟乙酰氨基;

R 是烷基、卤代烷基、二卤代烷基、三卤代烷基、CH₂F、CHF₂、CF₃、CF₂CF₃、芳基、苯基、F、Cl、Br、I、烯基或 OH; 且

R₁ 是 CH₃、CH₂F、CHF₂、CF₃、CH₂CH₃ 或 CF₂CF₃。

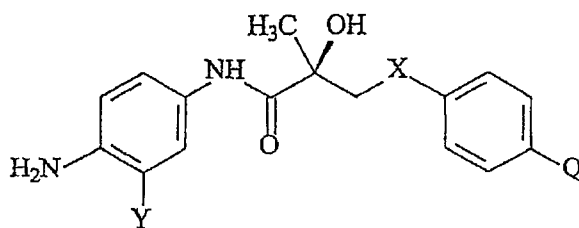
在一个实施方案中, 在化合物 II 中 Z 是 NO₂。在另一个实施方案中, 在化合物 II 中 Z 是 CN。在另一个实施方案中, 在化合物 II 中 Y 是 CF₃。在另一个实施方案中, 在化合物 II 中 Q 是 NHCOCH₃。在另一个实施方案中, 在化合物 II 中 Z 是 NO₂, Y 是 CF₃, 且 Q 是 NHCOCH₃。在另一个实施方案中, 在化合物 II 中 Z 是 CN, Y 是 CF₃, 且 Q 是 NHCOCH₃。

在一个实施方案中, 式 II 的 SARM 化合物由式 IX 的结构代表:

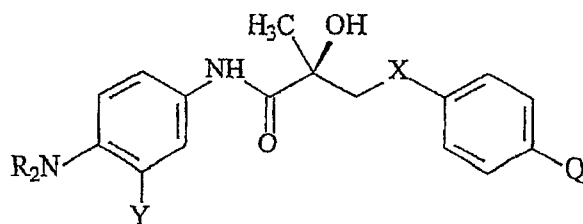


IX

在一个实施方案中, 式 IX 的 SARM 化合物的代谢物由以下结构代表:

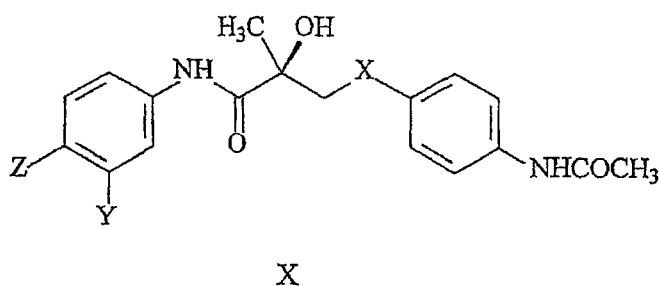


在另一个实施方案中, 式 IX 的 SARM 化合物的代谢物由以下结构代表:

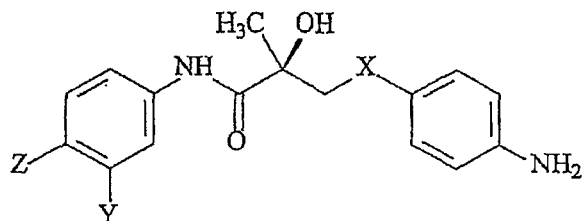


其中 NR_2 是 NO 、 $NHOH$ 、 $NHOSO_3$ 或 NHO -葡萄糖苷酸。

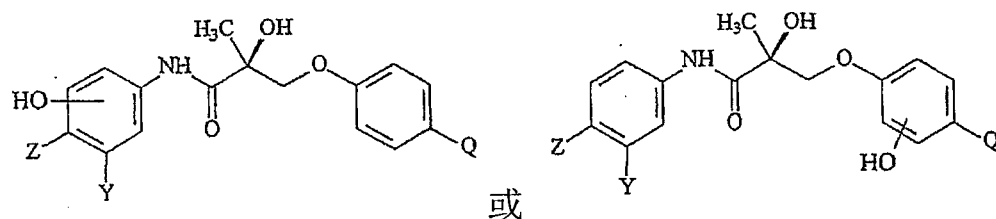
在一个实施方案中，式 II 的 SARM 化合物由以下式 X 的结构代表：



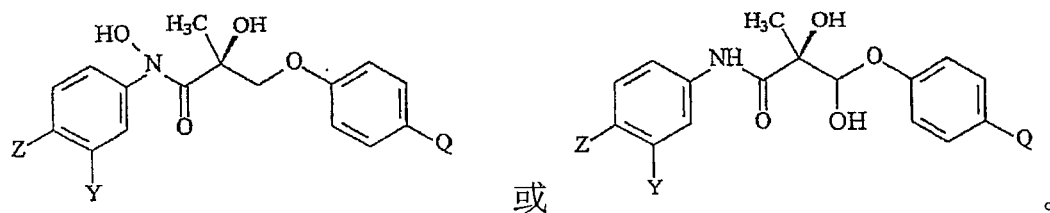
在一个实施方案中，式 X 的 SARM 化合物的代谢物由以下结构代表：



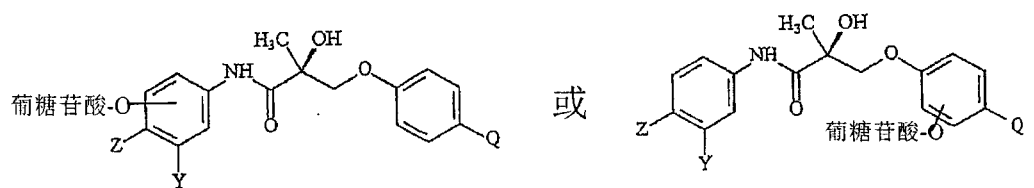
在一个实施方案中，所述 SARM 代谢物是式 II 的 SARM 化合物的羟基化衍生物。根据这一实施方案，该代谢物可以由以下结构代表：



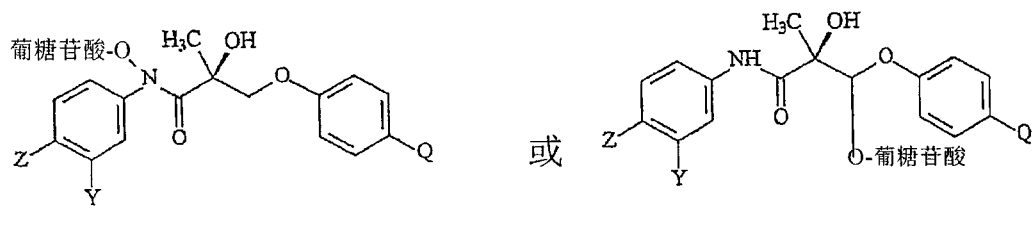
在另一个实施方案中，所述羟基化代谢物由以下结构代表：



在一个实施方案中,所述 SARM 代谢物是式 II 的 SARM 化合物的 O-葡萄糖苷酸衍生物。根据这一实施方案,所述代谢物可以由以下结构代表:

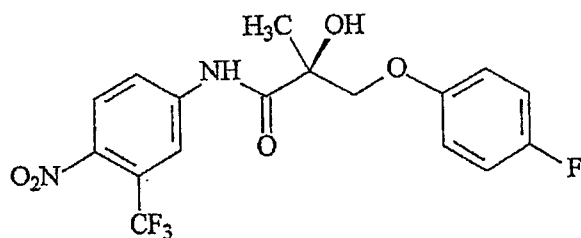


在另一个实施方案中,所述葡萄糖苷酸代谢物由以下结构代表:



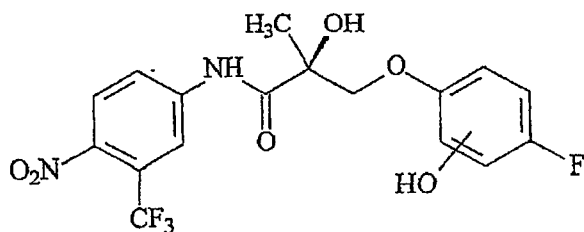
在另一个实施方案中,所述 SARM 代谢物是式 II 的 SARM 化合物的甲基化衍生物。

在一个实施方案中,本发明提供选择性雄激素受体调节剂 (SARM)化合物的代谢物,其中所述 SARM 化合物由式 III 的结构代表:

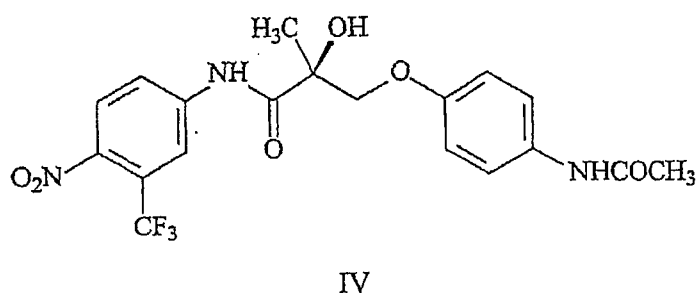


III

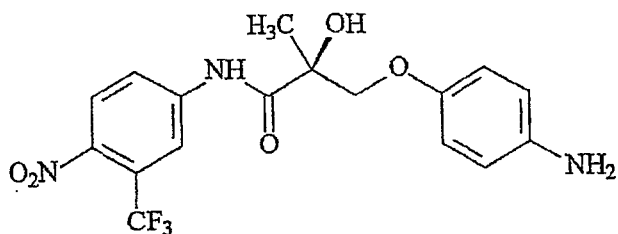
在一个实施方案中,式 III 的 SARM 化合物的代谢物由以下结构代表:



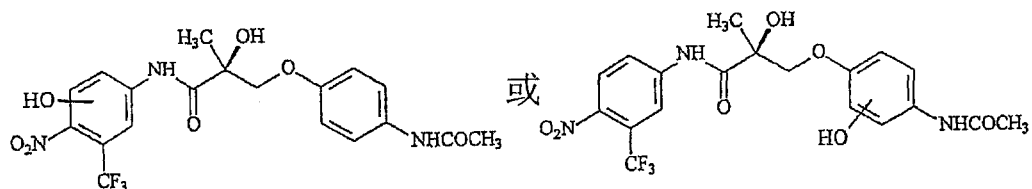
在一个实施方案中，本发明提供选择性雄激素受体调节剂 (SARM)化合物的代谢物，其中所述 SARM 化合物由式 IV 的结构代表：



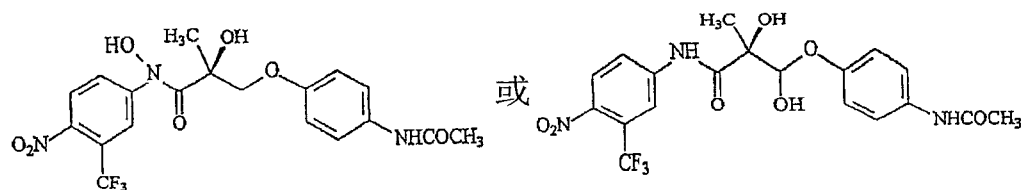
在一个实施方案中，式 IV 的 SARM 化合物的代谢物由以下结构代表：



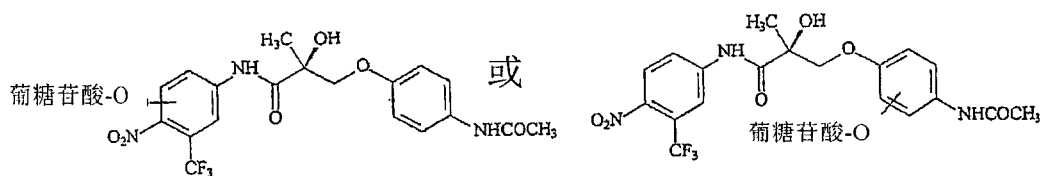
在一个实施方案中，所述 SARM 代谢物是式 IV 的 SARM 化合物的羟基化衍生物。根据这一实施方案，该代谢物可以由以下结构代表：



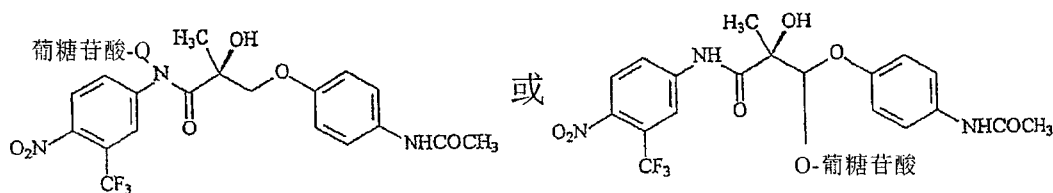
在另一个实施方案中，该羟基化代谢物由以下结构代表：



在一个实施方案中，所述 SARM 代谢物是式 IV 的 SARM 化合物的 O-葡萄糖苷酸衍生物。根据这一实施方案，该代谢物可以由以下结构代表：



在另一个实施方案中，所述葡萄糖苷酸代谢物由以下结构代表：



在另一个实施方案中，所述 SARM 代谢物是式 IV 的 SARM 化合物的甲基化衍生物。

在一个实施方案中，所述 SARM 代谢物是雄激素受体激动剂。

在另一个实施方案中，所述 SARM 代谢物是雄激素受体拮抗剂。

在一个实施方案中，本发明提供含有本发明的选择性雄激素受体调节剂代谢物和合适的载体或稀释剂的组合物。

在另一个实施方案中，本发明提供含有本发明的选择性雄激素受体调节剂代谢物和合适的载体或稀释剂的药物组合物。

在另一个实施方案中，本发明提供使选择性雄激素受体调节剂化合物与雄激素受体结合的方法，其包括使雄激素受体与有效使本发明的选择性雄激素受体调节剂代谢物与雄激素受体结合的量的选择性雄激素受体调节剂代谢物接触的步骤。

在另一个实施方案中，本发明提供抑制个体精子发生的方法，

其包括使所述个体的雄激素受体与有效抑制精子生成的量的本发明的选择性雄激素受体调节剂代谢物接触。

在另一个实施方案中，本发明提供男性个体避孕的方法，其包括给予所述个体本发明的选择性雄激素受体调节剂从而实现该个体避孕的步骤。

在另一个实施方案中，本发明提供激素治疗的方法，其包括使个体的雄激素受体与有效改变雄激素依赖性病症的量的本发明的选择性雄激素受体调节剂代谢物接触的步骤。

在另一个实施方案中，本发明提供激素替代治疗的方法，其包括使个体的雄激素受体与有效改变雄激素依赖性病症的量的本发明的选择性雄激素受体调节剂代谢物接触的步骤。

在另一个实施方案中，本发明提供治疗患有激素相关病症的个体的方法，其包括给予所述个体有效改变雄激素依赖性病症的量的本发明的选择性雄激素受体调节剂代谢物的步骤。

在另一个实施方案中，本发明提供治疗患有前列腺癌的个体的方法，其包括给予所述个体有效治疗所述个体前列腺癌的量的本发明的选择性雄激素受体调节剂代谢物的步骤。

在另一个实施方案中，本发明提供预防个体前列腺癌的方法，其包括给予所述个体有效预防所述个体前列腺癌的量的本发明的选择性雄激素受体调节剂代谢物的步骤。

在另一个实施方案中，本发明提供延迟患有前列腺癌的个体的前列腺癌进展的方法，其包括给予所述个体有效延迟所述个体前列腺癌进展的量的本发明的选择性雄激素受体调节剂代谢物的步骤。

在另一个实施方案中，本发明提供预防患有前列腺癌的个体的前列腺癌复发的方法，其包括给予所述个体有效预防所述个体前列腺癌复发的量的本发明的选择性雄激素受体调节剂代谢物的步骤。

在另一个实施方案中，本发明提供治疗患有前列腺癌的个体的

前列腺癌复发的方法，其包括给予所述个体有效治疗所述个体前列腺癌复发的量的本发明的选择性雄激素受体调节剂代谢物的步骤。

在另一个实施方案中，本发明提供治疗患有干眼症的个体干眼症的方法，其包括使所述个体的雄激素受体与有效治疗所述个体干眼症的量的本发明的选择性雄激素受体调节剂代谢物接触的步骤。

在另一个实施方案中，本发明提供预防个体干眼症的方法，其包括使所述个体的雄激素受体与有效预防所述个体干眼症的量的本发明的选择性雄激素受体调节剂代谢物接触的步骤。

在另一个实施方案中，本发明提供诱导癌细胞凋亡的方法，其包括使所述细胞与有效诱导所述癌细胞凋亡的量的本发明的选择性雄激素受体调节剂代谢物接触的步骤。

本发明的新的选择性雄激素受体调节剂代谢物用于 a) 男性避孕； b) 治疗多种激素相关病症，例如与 ADAM 有关的病症，如疲劳、抑郁、性欲降低、性功能障碍、勃起功能障碍、性腺机能减退、骨质疏松、脱发、肥胖、肌肉减少、骨质减少、良性前列腺增生以及情绪和认知改变； c) 治疗与 ADIF 有关的病症，例如性功能障碍、性欲降低、性腺机能减退、肌肉减少、骨质减少、骨质疏松、认知和情绪改变、抑郁、贫血、脱发、肥胖、子宫内膜异位症、乳腺癌、子宫癌和卵巢癌； d) 治疗和/或预防急性和/或慢性肌肉消瘦症； e) 预防和/或治疗干眼症； f) 口服雄激素替代治疗； g) 降低前列腺癌的发病率、阻止前列腺癌或导致前列腺癌消退；和/或 h) 诱导癌细胞凋亡。

本发明的选择性雄激素受体调节剂代谢物与类固醇雄激素治疗相比具有显著优势。本发明的几个选择性雄激素受体调节剂化合物具有意料不到的雄激素受体的非甾族配体的促雄性活性和合成代谢活性。本发明的其它选择性雄激素受体调节剂化合物具有意料不到的雄激素受体的非甾族配体的抗雄性活性。因此，用本发明的选择性雄激素受体调节剂化合物治疗将不伴有严重副作用、不方便的给药方式或

高成本，而仍具有口服生物利用度、不与其它甾族受体发生交叉反应和长生物半衰期的优点。

附图简述

从以下的具体实施方式并结合附图将更加全面地理解本发明，在附图中：

图 1：化合物 IV 在大鼠中的促雄性活性和合成代谢活性。大鼠为未处理(完整对照)、阉割(阉割对照)、用丙酸睾酮(TP)处理或用化合物 IV 处理，并测定体重增加以及雄激素反应性组织(前列腺、精囊和肛提肌)的重量。

图 2：化合物 IV 在大鼠中的促雄性活性和合成代谢活性。大鼠为未处理(完整对照)、阉割(阉割对照)、用 0.1、0.3、0.5、0.75 和 1.0 mg/日丙酸睾酮(TP)处理或用 0.1、0.3、0.5、0.75 和 1.0 mg/日化合物 IV 处理，并测定雄激素反应性组织(前列腺、精囊和肛提肌)的重量。

图 3：化合物 III 在大鼠中的促雄性活性和合成代谢活性。大鼠为未处理(完整对照)、阉割(阉割对照)、用 0.1、0.3、0.5、0.75 和 1.0 mg/日丙酸睾酮(TP)处理或用 0.1、0.3、0.5、0.75 和 1.0 mg/日化合物 III 处理，并测定雄激素反应性组织(前列腺、精囊和肛提肌)的重量。

图 4：静脉内给予 3 和 10 mg/kg 的化合物 IV 后，化合物 IV 在比格犬中的平均血浆浓度-时间曲线。

图 5：口服给予 10 mg/kg 溶液形式的化合物 IV 后，化合物 IV 在比格犬中的平均血浆浓度-时间曲线。

图 6：静脉内给予 mg/kg 胶囊形式的化合物 IV 后，化合物 IV 在比格犬中的平均血浆浓度-时间曲线。

图 7：化合物 III 和化合物 IV 对 LH 水平的影响。

图 8：化合物 III 和化合物 IV 对 FSH 水平的影响。

图 9：化合物 IV 的合成路线。

图 10: 化合物 IV 及其胺代谢物的 MS² 谱。图 10A: 化合物 IV 的碎裂方式。图 10B: 胺代谢物的碎裂方式。

图 11: 给予化合物 IV 后 24 小时内大鼠尿和粪便样本的放射图。图 11A: 尿样品。图 11B: 粪便样品。

图 12: 化合物 IV 在大鼠和狗中的代谢曲线。

图 13: 化合物 IV 被人重组 CYP Supersomes[®] 的体外代谢(n=2)。将化合物 IV (2 μM) 与人重组 CYP Supersomes[®] (40 皮摩尔) 一起在 37 °C 下温育 2 小时。测量化合物 IV 的消失。

图 14: 化合物 III 被人重组 CYP Supersomes[®] 的体外代谢(n=2)。将化合物 III (2 μM) 与人重组 CYP Supersomes[®] (40 皮摩尔) 一起在 37 °C 下温育 2 小时。测量化合物 IV 的消失。温育后, 人 CYP3A4 代谢了 20% 的化合物 III。

图 15: 化合物 IV 在人肝微粒体(HLM)中的体外代谢。

图 16: 化合物 III 在人肝微粒体(HLM)中的体外代谢。

图 17: 化合物 IV 被 CYP 体外代谢为 M1。一式三份测定 M1 的出现。

图 18: 化合物 IV 被 HLM (0.2 mg/ml) 体外代谢为 M1。一式三份测定 M1。

图 19: A. 在人、大鼠和狗肝脏制备物中测定的 ¹⁴C-S4 (均一标记的 B 环) 的 I 相代谢途径。B. 展示汇集的人肝脏 S9 对 ¹⁴C-S4 代谢的放射色谱图。

图 20: S4 的 MS² 谱(ESI 负离子模式)以及还原和脱乙酰产物 M1、M4 和 M5。

图 21: 氧化产物 S4-OH、M1-OH 和 M4-OH 的 MS² 谱(ESI 负离子模式)。鉴定出三种具有不同碎裂方式(A、B、C)的不同 S4 氧化代谢物。

图 22: A. 通过 NHS-生物素的 S4 生物素化反应。B. 展示生物

素化 ^{14}C -M2 和 ^{14}C -M2-OH 从 ^{14}C -M3 分离的放射色谱图。

图 23: 酰胺键水解产物 M3、M3-OH 以及生物素化 M2 和 M2-OH (B、C) 的 MS2 谱(ESI 负离子模式)。

图 24: 与不同的肝脏酶制备物温育后 ^{14}C -S4 的主要体外代谢产物的相对丰度。A. 在人、大鼠和狗肝脏 S9 存在下 ^{14}C -S4 的代谢曲线。在不同的人肝脏亚细胞部分存在下 ^{14}C -S4 的代谢曲线。

图 25: 通过测量 S4 的消失而测定的经 CYP3A4 的 S4 代谢酶动力学。反应在 200 皮摩尔/ml CYP3A4 存在下在 37°C 下进行 10 分钟。

图 26: 利用共转染测定法测定的 M1 的体外 AR 转录激活。M1 的激活表示为 0.1 nM DHT 存在下所获得的激活的百分比。

图 27: 在 Sprague-Dawley 大鼠(n=5/剂量组)中静脉内和口服给予后 S-1 的血浆浓度-时间曲线。实心符号表示经口服途径给药, 空心符号表示经静脉内途径给药。三角形, 30 mg/kg; 方块, 10 mg/kg; 圆圈, 1 mg/kg; 菱形, 0.1 mg/kg。

图 28: S-1 碎裂质谱。

图 29: 在碰撞诱导的解离条件下推断的 S-1 碎裂途径。

图 30: 大鼠尿中鉴定出的 S-1 代谢物。

图 31: M1 与合成标准品 3-(4-氟苯氧基)-2-羟基-2-甲基-丙酸(使用流动相 2)的色谱行为和质谱行为的比较。A. 0-12 小时大鼠尿样品。B. 合成标准品。

图 32: 在雄性 Sprague-Dawley 大鼠中推断的 S-1 主要代谢途径。

图 33: 72 小时处理后经 SRB 测定法(n=3)测定的 HepG2 细胞中 S-1 和 S-4 的细胞毒性。数据表示为均值±SD。

图 34: S-4 (2 μM)、S-1 (2 μM)、利福平(RIF) (10 μM)和 β -萘黄酮(BNF) (50 μM)对 CYP1A2 活性和表达的影响。一式三份测量 CYP 酶的活性, 结果表示为均值±SD。通过将带密度与用 Supersome®制备物建立的标准曲线进行比较估算酶含量, 用 β -肌动蛋白表达水平进

行标准化。人肝微粒体(HLM)样品作为免疫印迹的阳性对照。mRNA水平的倍数变化相对于对照样品进行标准化。

图 35: S-4 (2 μM)、S-1 (2 μM)、利福平(RIF) (10 μM)和 β -萘黄酮(BNF) (50 μM)对 CYP2C9 活性和表达的影响。一式三份测量 CYP 酶的活性, 结果表示为均值 \pm SD。通过将带密度与用 Supersome®制备物建立的标准曲线进行比较估算酶含量, 用 β -肌动蛋白表达水平进行标准化。人肝微粒体(HLM)样品作为免疫印迹的阳性对照。mRNA水平的倍数变化相对于对照样品进行标准化。

图 36: S-4 (2 μM)、S-1 (2 μM)、利福平(RIF) (10 μM)和 β -萘黄酮(BNF) (50 μM)对 CYP2C19 活性和表达的影响。一式三份测量 CYP 酶的活性, 结果表示为均值 \pm SD。通过将带密度与用 Supersome®制备物建立的标准曲线进行比较估算酶含量, 用 β -肌动蛋白表达水平进行标准化。人肝微粒体(HLM)样品作为免疫印迹的阳性对照。mRNA水平的倍数变化相对于对照样品进行标准化。

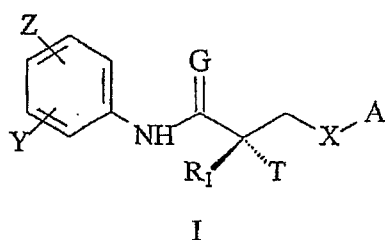
图 37: S-4 (2 μM)、S-1 (2 μM)、利福平(RIF) (10 μM)和 β -萘黄酮(BNF) (50 μM)对 CYP2D6 活性和表达的影响。一式三份测量 CYP 酶的活性, 结果表示为均值 \pm SD。通过将带密度与用 Supersome®制备物建立的标准曲线进行比较估算酶含量, 用 β -肌动蛋白表达水平进行标准化。人肝微粒体(HLM)样品作为免疫印迹的阳性对照。mRNA水平的倍数变化相对于对照样品进行标准化。

图 38: S-4 (2 μM)、S-1 (2 μM)、利福平(RIF) (10 μM)和 β -萘黄酮(BNF) (50 μM)对 CYP3A4 活性和表达的影响。一式三份测量 CYP 酶的活性, 结果表示为均值 \pm SD。通过将带密度与用 Supersome®制备物建立的标准曲线进行比较估算酶含量, 用 β -肌动蛋白表达水平进行标准化。人肝微粒体(HLM)样品作为免疫印迹的阳性对照。mRNA水平的倍数变化相对于对照样品进行标准化。

具体实施方式

在一个实施方案中，本发明提供一类雄激素受体靶向活性剂 (ARTA) 的代谢物。这些活性剂定义一亚类新的化合物，其是选择性雄激素受体调节剂 (SARM)。这些 SARM 化合物中几个具有意料不到的雄激素受体的非甾族配体的促雄性活性和合成代谢活性。所述 SARM 化合物单独或作为组合物用于 a) 男性避孕；b) 治疗多种激素相关病症，例如与年老男性雄激素减少 (ADAM) 有关的病症，如疲劳、抑郁、性欲降低、性功能障碍、勃起功能障碍、性腺机能减退、骨质疏松、脱发、贫血、肥胖、肌肉减少、骨质减少、骨质疏松、良性前列腺增生、情绪和认知改变以及前列腺癌；c) 治疗与女性雄激素减少 (ADIF) 有关的病症，如性功能障碍、性欲降低、性腺机能减退、肌肉减少、骨质减少、骨质疏松、认知和情绪改变、抑郁、贫血、脱发、肥胖、子宫内膜异位症、乳腺癌、子宫癌和卵巢癌；d) 治疗和/或预防急性和/或慢性肌肉消瘦症；e) 预防和/或治疗干眼症；f) 口服雄激素替代治疗；g) 降低前列腺癌的发病率、阻止前列腺癌或导致前列腺癌消退；和/或 h) 诱导癌细胞凋亡。

在一个实施方案中，本发明提供选择性雄激素受体调节剂 (SARM) 化合物的代谢物，其中所述 SARM 化合物由式 I 的结构代表：



其中 G 是 O 或 S；

X 是 O；

T 是 OH、OR、-NHCOCH₃ 或 NHCOR；

Z 是 NO₂、CN、COOH、COR、NHCOR 或 CONHR；

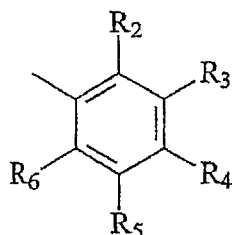
Y 是氢、烷基、羟基-烷基或烷基醛、CF₃、F、I、Br、Cl、CN、

$C(R)_3$ 或 $Sn(R)_3$;

R 是烷基、卤代烷基、二卤代烷基、三卤代烷基、 CH_2F 、 CHF_2 、 CF_3 、 CF_2CF_3 、芳基、苯基、F、Cl、Br、I、烯基或 OH;

R_1 是 CH_3 、 CH_2F 、 CHF_2 、 CF_3 、 CH_2CH_3 或 CF_2CF_3 ; 且

A 是或



其中

R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 独立地是氢、卤素、CN、 $NHCOCF_3$ 、乙酰氨基或三氟乙酰氨基。

如本文所考虑, 本发明提供式 I 的选择性雄激素受体调节剂代谢物。但是, 本发明的范围还考虑包括式 I 的化合物的类似物、异构体、代谢物、衍生物、药学可接受的盐、药品、水合物、N-氧化物、不纯物、多晶型物或晶体或它们的任意组合。

在一个实施方案中, 本发明提供式 I 的化合物的类似物。在另一个实施方案中, 本发明提供式 I 的化合物的衍生物。在另一个实施方案中, 本发明提供式 I 的化合物的异构体。在另一个实施方案中, 本发明提供式 I 的化合物的代谢物。在另一个实施方案中, 本发明提供式 I 的化合物的药学可接受的盐。在另一个实施方案中, 本发明提供式 I 的化合物的药品。在另一个实施方案中, 本发明提供式 I 的化合物的水合物。在另一个实施方案中, 本发明提供式 I 的化合物的 N-氧化物。在另一个实施方案中, 本发明提供式 I 的化合物的不纯物。在另一个实施方案中, 本发明提供式 I 的化合物的多晶型物。在另一个实施方案中, 本发明提供式 I 的化合物的晶体。

在另一个实施方案中, 本发明提供式 I 的化合物的类似物、衍生

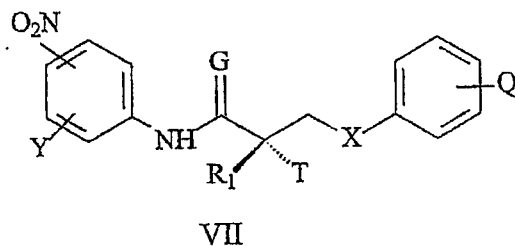
物、代谢物、异构体、药学可接受的盐、药品、水合物、N-氧化物、不纯物、代谢物、多晶型物或晶体的任意组合。

在一个实施方案中，在化合物 I 中 G 是 O。在另一个实施方案中，在化合物 I 中 T 是 OH。在另一个实施方案中，在化合物 I 中 R₁ 是 CH₃。在另一个实施方案中，在化合物 I 中 Z 是 NO₂。在另一个实施方案中，在化合物 I 中 Z 是 CN。在另一个实施方案中，在化合物 I 中 Y 是 CF₃。在另一个实施方案中，在化合物 I 中 Q 是 NHCOCH₃。在另一个实施方案中，在化合物 I 中 Q 是在对位。在另一个实施方案中，在化合物 I 中 Z 是在对位。在另一个实施方案中，在化合物 I 中 Y 是在间位。在另一个实施方案中，在化合物 I 中 G 是 O，T 是 OH，R₁ 是 CH₃，Z 是 NO₂，Y 是 CF₃，且 Q 是 NHCOCH₃。在另一个实施方案中，在化合物 I 中 G 是 O，T 是 OH，R₁ 是 CH₃，Z 是 CN，Y 是 CF₃，且 Q 是 NHCOCH₃。

取代基 Z 和 Y 可以在带有这些取代基的环(以下称“A 环”)的任何位置。在一个实施方案中，取代基 Z 在 A 环的对位。在另一个实施方案中，取代基 Y 在 A 环的间位。在另一个实施方案中，取代基 Z 在 A 环的对位，取代基 Y 在 A 环的间位。

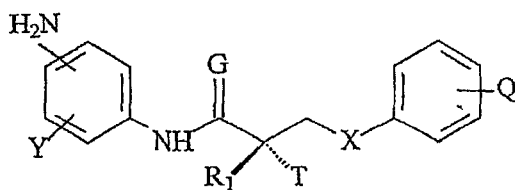
取代基 Q 可以在带有该取代基的环(以下称“B 环”)的任何位置。在一个实施方案中，取代基 Q 在 B 环的对位。在另一个实施方案中，取代基 Q 是 NHCOCH₃，且在 B 环的对位。在另一个实施方案中，取代基 Q 是 F，且在 B 环的对位。

在一个实施方案中，式 I 的 SARM 化合物由式 VII 的结构代表：

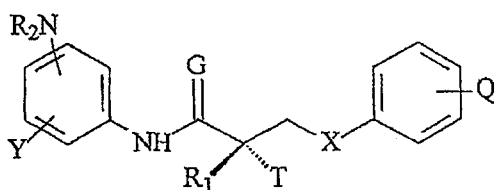


在一个实施方案中，式 VII 的 SARM 化合物的代谢物由以下结

构代表:

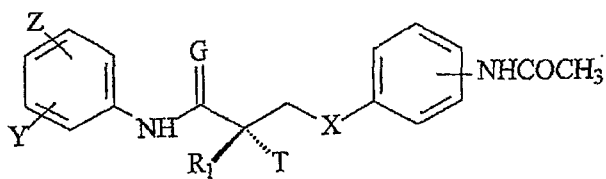


在另一个实施方案中, 式 VII 的 SARM 化合物的代谢物由以下结构代表:



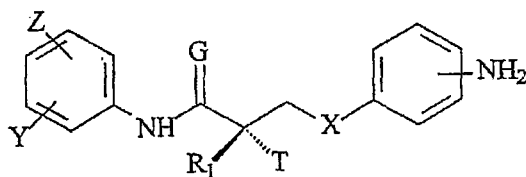
其中 NR₂ 是 NO、NHOH、NHOSO₃ 或 NHO-葡萄糖苷酸。

在一个实施方案中, 式 I 的 SARM 化合物由式 VIII 的结构代表:

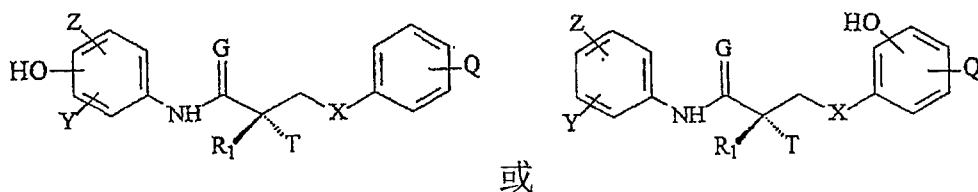


VIII

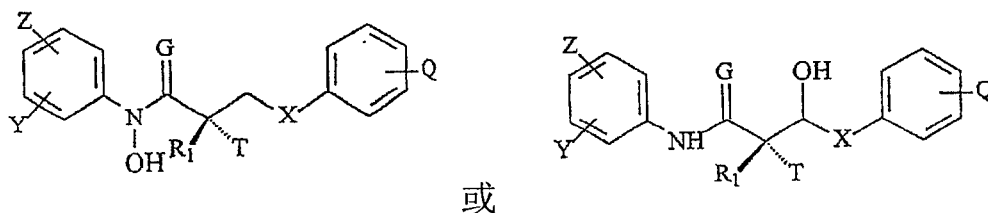
在一个实施方案中, 式 VIII 的 SARM 化合物的代谢物由以下结构代表:



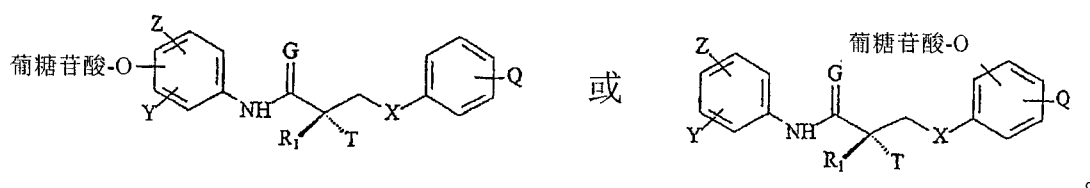
在一个实施方案中, 所述 SARM 代谢物是式 I 的 SARM 化合物的羟基化衍生物。根据这一实施方案, 该代谢物可以由以下结构代表:



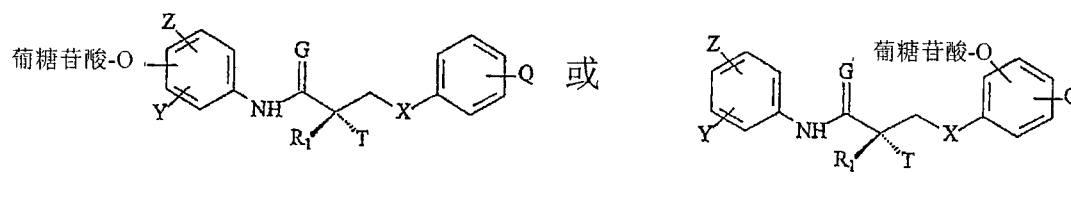
在另一个实施方案中，该羟基化代谢物由以下结构代表：



在一个实施方案中，所述 SARM 代谢物是式 I 的 SARM 化合物的 O-葡萄糖苷酸衍生物。根据这一实施方案，该代谢物可以由以下结构代表：

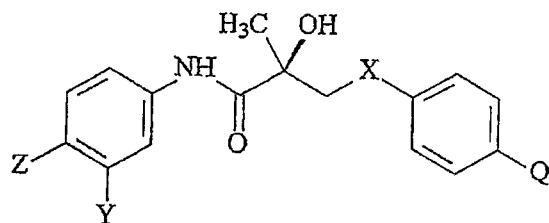


在另一个实施方案中，该葡萄糖苷酸代谢物由以下结构代表：



在另一个实施方案中，所述 SARM 代谢物是式 I 的 SARM 化合物的甲基化衍生物。

在另一个实施方案中，本发明提供选择性雄激素受体调节剂 (SARM) 化合物的代谢物，其中所述 SARM 化合物由式 II 的结构代表：



II

其中 X 是 O；

Z 是 NO₂、CN、COOH、COR、NHCOR 或 CONHR；

Y 是 CF₃、F、I、Br、Cl、CN、CR₃ 或 SnR₃；

Q 是乙酰氨基或三氟乙酰氨基；

R 是烷基、卤代烷基、二卤代烷基、三卤代烷基、 CH_2F 、 CHF_2 、 CF_3 、 CF_2CF_3 、芳基、苯基、F、Cl、Br、I、烯基或 OH；且

R_1 是 CH_3 、 CH_2F 、 CHF_2 、 CF_3 、 CH_2CH_3 或 CF_2CF_3 。

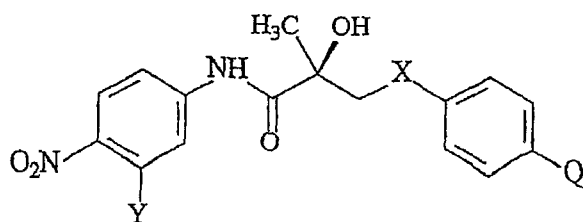
如本文所考虑，本发明提供式 II 的选择性雄激素受体调节剂的代谢物。但是，本发明的范围还考虑包括式 II 的化合物的类似物、异构体、代谢物、衍生物、药学可接受的盐、药品、水合物、N-氧化物、不纯物、多晶型物或晶体或它们的任意组合。

在一个实施方案中，本发明提供式 II 的化合物的类似物。在另一个实施方案中，本发明提供式 II 的化合物的衍生物。在另一个实施方案中，本发明提供式 II 的化合物的异构体。在另一个实施方案中，本发明提供式 II 的化合物的代谢物。在另一个实施方案中，本发明提供式 II 的化合物的药学可接受的盐。在另一个实施方案中，本发明提供式 II 的化合物的药品。在另一个实施方案中，本发明提供式 II 的化合物的水合物。在另一个实施方案中，本发明提供式 II 的化合物的 N-氧化物。在另一个实施方案中，本发明提供式 II 的化合物的不纯物。在另一个实施方案中，本发明提供式 II 的化合物的多晶型物。在另一个实施方案中，本发明提供式 II 的化合物的晶体。

在另一个实施方案中，本发明提供式 II 的化合物的类似物、衍生物、代谢物、异构体、药学可接受的盐、药品、水合物、N-氧化物、不纯物、代谢物、多晶型物或晶体的任意组合。

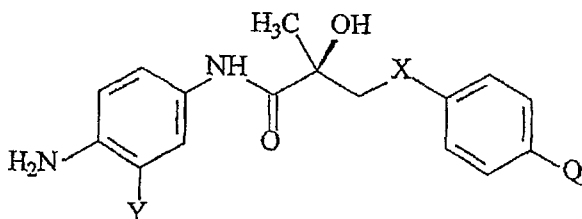
在一个实施方案中，在化合物 II 中 Z 是 NO_2 。在另一个实施方案中，在化合物 II 中 Z 是 CN。在另一个实施方案中，在化合物 II 中 Y 是 CF_3 。在另一个实施方案中，在化合物 II 中 Q 是 NHCOCH_3 。

在一个实施方案中，式 II 的 SARM 化合物由式 IX 的结构代表：

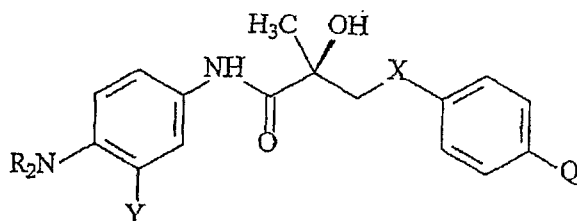


IX

在一个实施方案中,式 IX 的 SARM 化合物的代谢物由以下结构代表:

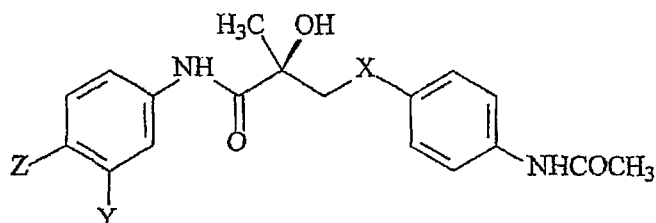


在另一个实施方案中,式 IX 的 SARM 化合物的代谢物由以下结构代表:



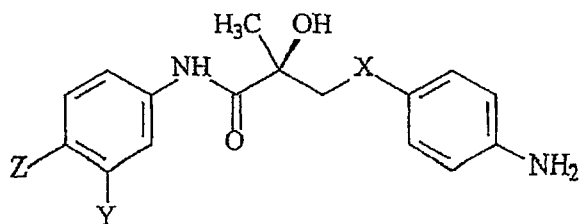
其中 NR_2 是 NO 、 $NHOH$ 、 $NHOSO_3$ 或 NHO -葡萄糖苷酸。

在一个实施方案中,式 II 的 SARM 化合物由式 X 的结构代表:

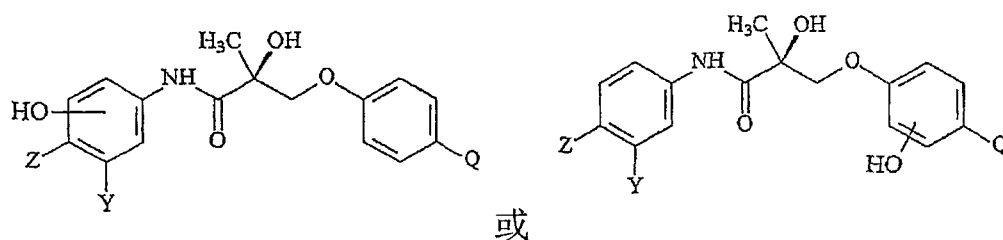


X

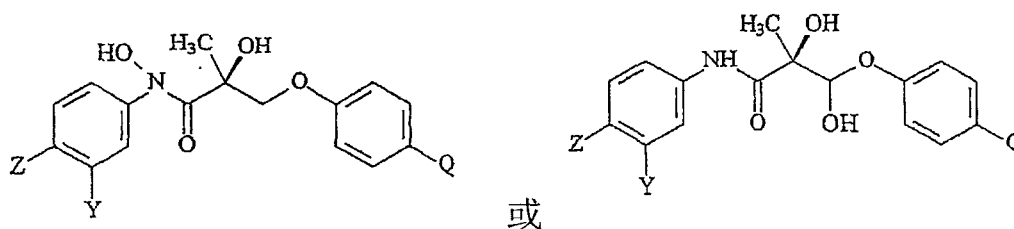
在一个实施方案中,式 X 的 SARM 化合物的代谢物由以下结构代表:



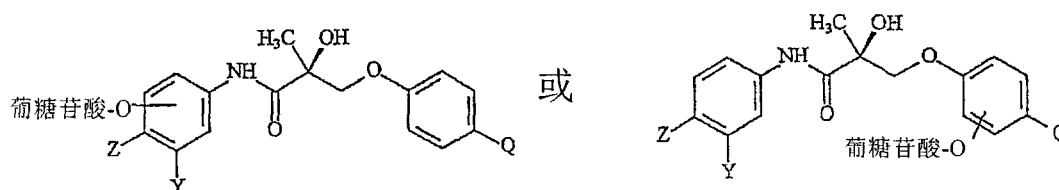
在一个实施方案中,所述 SARM 代谢物是式 II 的 SARM 化合物的羟基化衍生物。根据这一实施方案,该代谢物可以由以下结构代表:



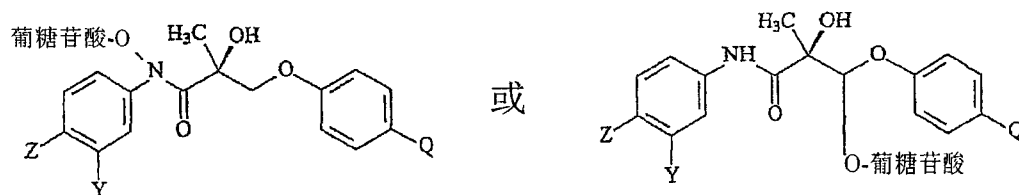
在另一个实施方案中,所述羟基化代谢物由以下结构代表:



在一个实施方案中,所述 SARM 代谢物是式 II 的 SARM 化合物的 O-葡萄糖苷酸衍生物。根据这一实施方案,所述代谢物可以由以下结构代表:



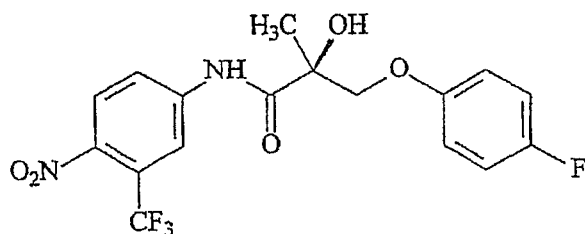
在另一个实施方案中,所述葡萄糖苷酸代谢物由以下结构代表:



在另一个实施方案中,所述 SARM 代谢物是式 II 的 SARM 化合

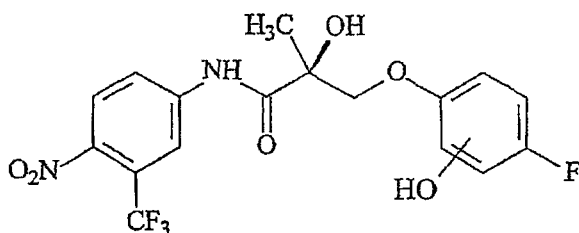
物的甲基化衍生物。

在一个实施方案中，本发明提供选择性雄激素受体调节剂 (SARM)化合物的代谢物，其中所述 SARM 化合物由式 III 的结构代表：

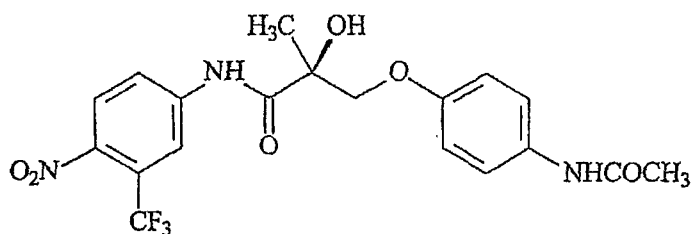


III

在一个实施方案中，式 III 的 SARM 化合物的代谢物由以下结构代表：

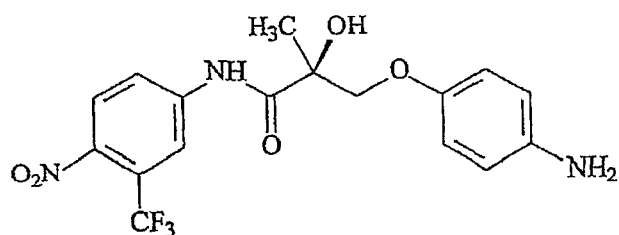


在一个实施方案中，本发明提供选择性雄激素受体调节剂 (SARM)化合物的代谢物，其中所述 SARM 化合物由式 IV 的结构代表：

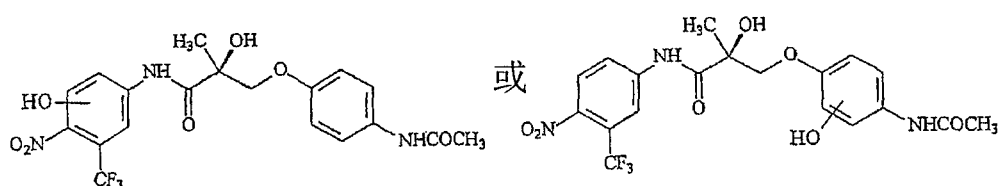


IV

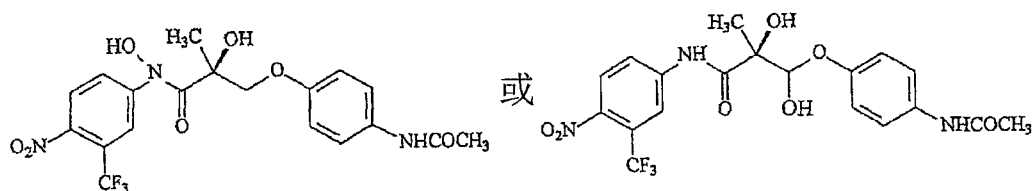
在一个实施方案中，式 IV 的 SARM 化合物的代谢物由以下结构代表：



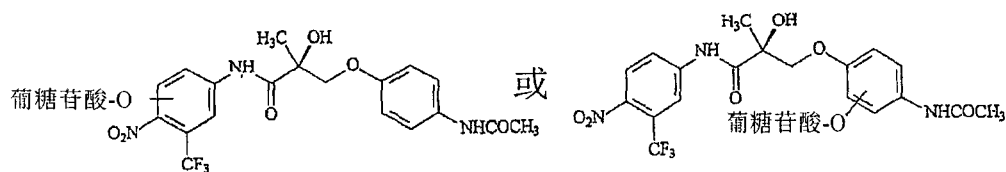
在一个实施方案中，所述 SARM 代谢物是式 IV 的 SARM 化合物的羟基化衍生物。根据这一实施方案，所述代谢物可以由以下结构代表：



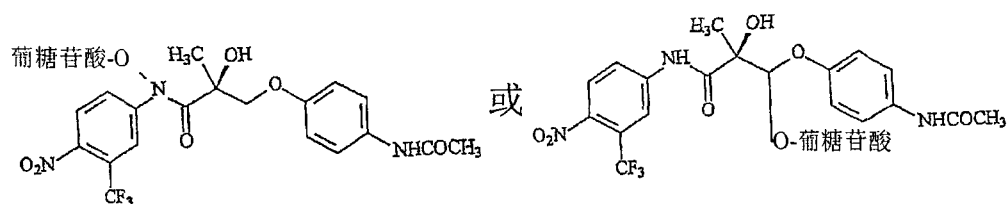
在另一个实施方案中，所述羟基化代谢物由以下结构代表：



在一个实施方案中，所述 SARM 代谢物是式 IV 的 SARM 化合物的 O-葡萄糖苷酸衍生物。根据这一实施方案，所述代谢物可以由以下结构代表：



在另一个实施方案中，所述葡萄糖苷酸代谢物由以下结构代表：



在另一个实施方案中，所述 SARM 代谢物是式 IV 的 SARM 化

化合物的甲基化衍生物。

在一个实施方案中，所述 SARM 代谢物是雄激素受体激动剂。

在另一个实施方案中，所述 SARM 代谢物是雄激素受体拮抗剂。

在一些实施方案中，所述代谢物可以使用不同的肝脏酶制备物鉴定。

在一些实施方案中，本发明的 SARM 代谢物包括脱乙酰基衍生物、水解衍生物或包括氧化衍生物在内的衍生物，或在另一个实施方案中，包括还原硝基或芳环还原。

在一些实施方案中，代谢物将包括代谢不定位点的修饰，该修饰在一个实施方案中提高化合物的代谢稳定性，在另一个实施方案中，维持激动剂活性。

在一个实施方案中，脱乙酰基代谢物与 AR 结合并启动体外转录激活，在另一个实施方案中其有助于化合物 S4 的体内药理活性。

如本文所例示，酰胺键水解和乙酰胺脱乙酰在人肝脏制备物的胞质部分和微粒体部分中均发生。胞质酶主要催化水解反应，而微粒体酶主要催化脱乙酰反应，这表明微粒体 CYP 酶也可能负责该分子的水解和脱乙酰。CYP3A4 负责氧化代谢 70%以上的上市药物，氧化是最常见的代谢反应。相似地，CYP3A4 负责 S4 的体外氧化，甚至负责人比卡鲁胺的氧化，但是，令人惊奇地，CYP3A4 看起来也是能够催化水解反应的主要微粒体 CYP 酶之一。

在一个实施方案中，通过使用对代谢物进行 HPLC 分离和 MS 分析可以实现体外代谢物的鉴定。在一个实施方案中，羧基和胺基在该分子中的存在可能导致该分子极度亲水，其中由于该分子在酸性或碱性条件下均不易从溶剂前沿分离出来，所以这样的分析可能是困难的，如本文所例示。为有助于该分离而不在样品制备和/或分离中使用严谨条件，可以使用氨基酸分析中常用的衍生化方法，例如使用 NHS-生物素修饰伯胺基团。芳族胺基团也可以作为类似修饰的底物。

如本文所例示,添加生物素大基团增加该分子的柱保留时间和 MS 分析中的电离效率。温和的反应条件(室温,中性 pH)排除了人为作用(即强酸条件)引起的水解的可能性。因此,在其它实施方案中,本文提出的方案提供含有伯胺基团的高度亲水性代谢物的分析策略。

定义

本文取代基 R 定义为烷基、卤代烷基、二卤代烷基、三卤代烷基、 CH_2F 、 CHF_2 、 CF_3 、 CF_2CF_3 、芳基、苯基、F、Cl、Br、I、烯基或羟基(OH)。

“烷基”是指饱和脂族烃,包括直链、支链烷基和环状烷基。在一个实施方案中,烷基具有 1-12 个碳。在另一个实施方案中,烷基具有 1-7 个碳。在另一个实施方案中,烷基具有 1-6 个碳。在另一个实施方案中,烷基具有 1-4 个碳。烷基可以是未取代的或被一个或多个选自卤素(如 F、Cl、Br、I)、羟基、烷氧羰基、酰氨基、烷基酰氨基、二烷基酰氨基、硝基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、羧基、硫代和硫代烷基的基团取代。

“卤代烷基”是指被一个或多个卤素原子如 F、Cl、Br 或 I 取代的以上定义的烷基。“卤素”是指元素周期表中 VII 组中的元素,如 F、Cl、Br 或 I。

“芳基”是指具有至少一个芳族碳环基团或芳族杂环基团的芳族基团,其可以是未取代的或被一个或多个选自卤素(如 F、Cl、Br 或 I)、卤代烷基、羟基、烷氧羰基、酰氨基、烷基酰氨基、二烷基酰氨基、硝基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、羧基、硫代或硫代烷基的基团取代。芳环的非限制性实例有苯基、萘基、吡喃基、吡咯基、吡嗪基、嘧啶基、吡啶基、咪唑基、噁吩基、噻吩基、咪唑基、异噻唑基等。

“羟基”是指 OH 基团。“烯基”是指具有至少一个碳碳双键的

基团。

“芳基烷基”是指与芳基结合的烷基，其中烷基和芳基如以上所定义。芳基烷基的实例是苄基。

如本文所考虑，本发明提供本发明的选择性雄激素受体调节剂代谢物的用途。但是，本发明的范围还考虑包括本发明的化合物的类似物、异构体、代谢物、衍生物、药学可接受的盐、药品、水合物、N-氧化物、不纯物、多晶型物或晶体或它们的任意组合。

在一个实施方案中，本发明提供所述 SARM 化合物的类似物的用途。在另一个实施方案中，本发明提供所述 SARM 化合物的衍生物物的用途。在另一个实施方案中，本发明提供所述 SARM 化合物的异构体的用途。在另一个实施方案中，本发明提供所述 SARM 化合物的代谢物的用途。在另一个实施方案中，本发明提供所述 SARM 化合物的药学可接受的盐的用途。在另一个实施方案中，本发明提供所述 SARM 化合物的药品的用途。在另一个实施方案中，本发明提供所述 SARM 化合物的水合物的用途。在另一个实施方案中，本发明提供所述 SARM 化合物的 N-氧化物的用途。在另一个实施方案中，本发明提供所述 SARM 化合物的多晶型物的用途。在另一个实施方案中，本发明提供所述 SARM 化合物的晶体的用途。

在另一个实施方案中，本发明涉及本发明的 SARM 化合物的类似物、衍生物、异构体、代谢物、药学可接受的盐、药品、水合物、N-氧化物、代谢物、多晶型物或晶体的任意组合的用途。

如本文所定义，术语“代谢物”是指可在体内通过诸如水解、酯化、脱酯化、活化、形成盐等反应而被转化为生物活性剂的物质。

如本文所定义，术语“异构体”包括但不限于旋光异构体和类似物、结构异构体和类似物、构象异构体和类似物等。

在一个实施方案中，本发明包括所述 SARM 化合物的各种旋光异构体的用途。本领域技术人员将理解，本发明的 SARM 化合物含

有至少一个手性中心。因此，本发明的方法中使用的 SARM 化合物可能以旋光形式或外消旋形式存在或被分离。一些化合物还可以表现同质多晶。还应理解本发明包括具有用于本文所述方法的性质的任何外消旋、旋光、多晶型或立体异构形式或它们的混合物。在一个实施方案中，所述 SARM 化合物是纯(R)-异构体。在另一个实施方案中，所述 SARM 化合物是纯(S)-异构体。在另一个实施方案中，所述 SARM 化合物是(R)和(S)异构体的混合物。在另一个实施方案中，所述 SARM 化合物是含有等量(R)和(S)异构体的外消旋混合物。本领域众所周知如何制备旋光形式(例如通过重结晶技术拆分外消旋形式、通过从旋光原料合成、通过手性合成或通过使用手性固定相进行色谱分离)。

本发明包括氨基取代化合物与有机酸和无机酸如柠檬酸和盐酸形成的药学可接受的盐。本发明还包括本文所述的氨基取代化合物的 N-氧化物。药学可接受的盐还可以通过用无机碱如氢氧化钠处理从酚化合物制备。此外，可以用脂族和芳族羧酸制备酚化合物的酯如乙酸酯和苯甲酸酯。

本发明还包括所述 SARM 化合物的衍生物。术语“衍生物”包括但不限于醚衍生物、酸衍生物、酰胺衍生物、酯衍生物等。此外，本发明还包括所述 SARM 化合物的水合物。术语“水合物”包括但不限于半水合物、一水合物、二水合物、三水合物等。

本发明还包括所述 SARM 化合物的代谢物。术语“代谢物”是指从另一种物质经代谢或代谢过程而产生的任何物质。

本发明还包括所述 SARM 化合物的药品。术语“药品”是指适用于药学用途的组合物(药物组合物)，如本文所定义。

本发明还包括所述 SARM 化合物的晶体。此外，本发明提供所述 SARM 化合物的多晶型物。术语“晶体”是指处于晶态的物质。术语“多晶型物”是指具有特定物理性质如 X-射线衍射、IR 光谱、熔点等的特定晶态的物质。

选择性雄激素受体调节剂化合物的生物活性

选择性雄激素受体调节剂(SARM)化合物是一类新的雄激素受体靶向活性剂(ARTA)，以前已证明其可用于 a) 男性避孕；b) 治疗多种激素相关病症，例如与年老男性雄激素减少(ADAM)有关的病症，如疲劳、抑郁、性欲降低、性功能障碍、勃起功能障碍、性腺机能减退、骨质疏松、脱发、贫血、肥胖、肌肉减少、骨质减少、骨质疏松、良性前列腺增生、情绪和认知改变以及前列腺癌；c) 治疗与女性雄激素减少(ADIF)有关的病症，如性功能障碍、性欲降低、性腺机能减退、肌肉减少、骨质减少、骨质疏松、认知和情绪改变、抑郁、贫血、脱发、肥胖、子宫内膜异位症、乳腺癌、子宫癌和卵巢癌；d) 治疗和/或预防急性和/或慢性肌肉消瘦症；e) 预防和/或治疗干眼症；f) 口服雄激素替代治疗；g) 降低前列腺癌的发病率、阻止前列腺癌或导致前列腺癌消退；和/或 h) 诱导癌细胞凋亡。

如本文所用，细胞外信号转导分子受体统称为“细胞信号转导受体”。许多细胞信号转导受体是细胞表面上的跨膜蛋白，当它们与细胞外信号转导分子(即配体)结合时，它们被激活以产生改变细胞行为的细胞内信号级联。相反，在一些情况下，这些受体在细胞内，且信号转导配体必须进入细胞来激活它们，因此这些信号转导分子必须足够小和疏水，以扩散通过细胞的质膜。

类固醇激素是直接扩散穿过靶细胞质膜并与细胞内细胞信号转导受体结合的疏水性小分子的一个实例。这些受体结构上互相关联，构成细胞内受体超家族(或类固醇激素受体超家族)。类固醇激素受体包括孕酮受体、雌激素受体、雄激素受体、糖皮质激素受体和盐皮质激素受体。本发明特别涉及雄激素受体。

除了配体与受体结合之外，可以将受体阻断以阻止配体结合。当物质与受体结合时，该物质的三维结构以球和槽的构型适合由受体三

维结构形成的空间。球与槽适合得越好，其保持越紧密。这种现象称为亲合力。如果物质的亲合力大于原始的激素，它将与激素竞争并更频繁地与结合部位结合。一旦结合，信号可以通过受体送达细胞内，导致细胞以某种方式应答。这称为激活。一旦激活，则激活的受体直接调节特定基因的转录。但是该物质和受体可能具有某些除亲合力之外的属性，以激活细胞。物质的原子和受体的原子之间可能形成化学键。在某些情况下，这导致受体构型改变，从而足以启动激活过程(称为信号转导)。

在一个实施方案中，本发明涉及为激动剂化合物的选择性雄激素受体调节剂化合物。受体激动剂是与受体结合并激活之的物质。因此，在一个实施方案中，本发明的 SARM 化合物用于与类固醇激素受体结合并激活之。在一个实施方案中，本发明的激动剂化合物是与雄激素受体结合的激动剂。在一个实施方案中，该化合物与雄激素受体具有高亲和力。在另一个实施方案中，所述激动剂化合物 B 还具有合成代谢活性。在另一个实施方案中，本发明提供具有对雄激素受体的非甾族化合物的激动和合成代谢活性的选择性雄激素调节剂化合物。

在另一个实施方案中，本发明涉及为拮抗剂化合物的选择性雄激素受体调节剂化合物。受体拮抗剂是与受体结合并使之灭活的物质。因此，在一个实施方案中，本发明的 SARM 化合物用于与类固醇激素受体结合并使之灭活。在一个实施方案中，本发明的拮抗剂化合物是与雄激素受体结合的拮抗剂。在另一个实施方案中，该化合物与雄激素受体具有高亲和力。

在另一个实施方案中，本发明的 SARM 化合物可以归类为部分 AR 激动剂/拮抗剂。所述 SARM 在一些组织中是 AR 激动剂，引起 AR 反应性基因转录水平升高(如肌肉合成代谢作用)。在其它组织中这些化合物作为 AR 抑制剂，以阻止天然雄激素的激动作用。

测定本发明的化合物是 AR 激动剂还是 AR 拮抗剂的测定法是本领域技术人员所熟知的。例如 AR 激动活性可以通过监测 SARM 化合物维持和/或刺激含有 AR 的组织如前列腺和精囊生长的能力来测定, 如通过测量重量来进行。AR 拮抗活性可以通过监测 SARM 化合物抑制含有 AR 的组织的生长的能力来测定。

本发明的化合物与雄激素受体可逆或不可逆结合。在一个实施方案中, 所述雄激素受体是哺乳动物雄激素受体。在另一个实施方案中, 所述雄激素受体是人雄激素受体。在一个实施方案中, 所述 SARM 化合物与哺乳动物如人雄激素受体可逆结合。化合物与受体的可逆结合是指化合物在结合后可以与受体分离。

在另一个实施方案中, 所述 SARM 化合物与哺乳动物如人的雄激素受体不可逆结合。因此, 在一个实施方案中, 本发明的化合物可以含有使雄激素受体烷基化(即形成共价键)的官能团。因此, 在该情况下, 所述化合物是与受体不可逆结合的烷化剂, 因此, 不能被类固醇如内源性配体 DHT 和睾酮置换。本文定义的“烷化剂”是指使细胞组分如 DNA、RNA 或酶烷化(形成共价键)的活性剂。烷化剂是具有高活性的化学物质, 其将烷基引入生物活性分子中, 从而阻止它们正常的功能。烷化基团是与细胞组分中的亲核部分相互作用的亲电子基团。

根据本发明的一个实施方案, 提供通过使雄激素受体与 SARM 代谢物和/或其类似物、衍生物、异构体、代谢物、药学可接受的盐、药品、水合物、N-氧化物、代谢物、多晶型物或晶体或它们的任意组合在有效导致该选择性雄激素受体调节剂化合物与该雄激素受体结合的条件下接触而使本发明的 SARM 代谢物与雄激素受体结合的方法。选择性雄激素受体调节剂化合物与雄激素受体的结合能够使本发明的化合物可用作男性避孕药和用于多种激素治疗。激动剂化合物与雄激素受体结合并激活之。拮抗剂化合物与雄激素受体结合并使之灭

活。激动剂或拮抗剂的结合是可逆或不可逆的。

根据本发明的一个实施方案，提供通过使个体的雄激素受体与有效使选择性雄激素受体调节剂化合物与雄激素受体结合并抑制精子发生的量的本发明的 SARM 代谢物和/或其类似物、衍生物、异构体、代谢物、药学可接受的盐、药品、水合物、N-氧化物、代谢物、多晶型物或晶体或它们的任意组合接触而抑制个体精子发生的方法。

在另一个实施方案中，本发明提供男性避孕的方法，其包括给予所述个体有效抑制个体精子生成的量的本发明的 SARM 化合物和/或其类似物、衍生物、异构体、代谢物、药学可接受的盐、药品、水合物、N-氧化物、代谢物、多晶型物或晶体或它们的任意组合，从而实现个体避孕的步骤。

根据本发明的另一个实施方案，提供对患者(即患有雄激素依赖性病症的个体)进行激素治疗的方法，其包括使患者的雄激素受体与有效使选择性雄激素受体调节剂化合物与所述雄激素受体结合并改变雄激素依赖性病症的量的本发明的 SARM 代谢物和/或其类似物、衍生物、异构体、代谢物、药学可接受的盐、药品、水合物、N-氧化物、代谢物、多晶型物或晶体或它们的任意组合接触。

根据本发明的另一个实施方案，提供对患者进行激素替代治疗的方法，其包括使患者的雄激素受体与有效使选择性雄激素受体调节剂化合物与所述雄激素受体结合并改变雄激素依赖性病症的量的本发明的 SARM 代谢物和/或其类似物、衍生物、异构体、代谢物、药学可接受的盐、药品、水合物、N-氧化物、代谢物、多晶型物或晶体或它们的任意组合接触。

根据本发明的另一个实施方案，提供治疗患有激素相关病症的个体的方法，其包括给予所述个体有效使 SARM 化合物与所述雄激素受体结合并改变雄激素依赖性病症的量的本发明的 SARM 代谢物和/或其类似物、衍生物、异构体、代谢物、药学可接受的盐、药品、水

合物、N-氧化物、代谢物、多晶型物或晶体或它们的任意组合。

可以根据本发明治疗的雄激素依赖性病症包括与衰老有关的病症，例如性腺机能减退、肌肉减少、红细胞生成、骨质疏松和任何其它已确定的取决于低雄激素(如睾酮)水平的病症。

根据本发明的另一个实施方案，提供治疗患有前列腺癌的个体的方法，其包括给予所述个体有效治疗所述个体前列腺癌的量的本发明的 SARM 代谢物和/或其类似物、衍生物、异构体、代谢物、药学可接受的盐、药品、水合物、N-氧化物、代谢物、多晶型物或晶体或它们的任意组合的步骤。

根据本发明的另一个实施方案，提供预防个体前列腺癌的方法，其包括给予所述个体有效预防所述个体前列腺癌的量的本发明的 SARM 代谢物和/或其类似物、衍生物、异构体、代谢物、药学可接受的盐、药品、水合物、N-氧化物、代谢物、多晶型物或晶体或它们的任意组合的步骤。

根据本发明的另一个实施方案，提供延迟患有前列腺癌的个体的前列腺癌进展的方法，其包括给予所述个体有效延迟所述个体前列腺癌进展的量的本发明的 SARM 代谢物和/或其类似物、衍生物、异构体、代谢物、药学可接受的盐、药品、水合物、N-氧化物、代谢物、多晶型物或晶体或它们的任意组合的步骤。

根据本发明的另一个实施方案，提供预防患有前列腺癌的个体的前列腺癌复发的方法，其包括给予所述个体有效预防所述个体前列腺癌复发的量的本发明的 SARM 代谢物和/或其类似物、衍生物、异构体、代谢物、药学可接受的盐、药品、水合物、N-氧化物、代谢物、多晶型物或晶体或它们的任意组合的步骤。

根据本发明的另一个实施方案，提供治疗患有前列腺癌的个体的前列腺癌复发的方法，其包括给予所述个体有效治疗所述个体前列腺癌复发的量的本发明的 SARM 代谢物和/或其类似物、衍生物、异

构体、代谢物、药学可接受的盐、药品、水合物、N-氧化物、代谢物、多晶型物或晶体或它们的任意组合的步骤。

此外，刺激雄激素受体刺激泪液的产生，因此本发明的 SARM 化合物可用于治疗干眼症。因此，根据本发明的另一个实施方案，提供治疗患有干眼症的个体的干眼症的方法，其包括给予所述个体有效治疗所述个体干眼症的量的本发明的 SARM 代谢物和/或其类似物、衍生物、异构体、代谢物、药学可接受的盐、药品、水合物、N-氧化物、代谢物、多晶型物或晶体或它们的任意组合的步骤。

根据本发明的另一个实施方案，提供预防个体干眼症的方法，其包括给予所述个体有效预防所述个体干眼症的量的本发明的 SARM 代谢物和/或其类似物、衍生物、异构体、代谢物、药学可接受的盐、药品、水合物、N-氧化物、代谢物、多晶型物或晶体或它们的任意组合的步骤。

在另一个实施方案中，本发明提供诱导癌细胞凋亡的方法，其包括使所述细胞与有效诱导所述癌细胞凋亡的量的本发明的 SARM 代谢物和/或其类似物、衍生物、异构体、代谢物、药学可接受的盐、药品、水合物、N-氧化物、代谢物、多晶型物或晶体或它们的任意组合接触的步骤。

如本文所定义，“接触”是指将本发明的 SARM 代谢物引入于试管、烧瓶、组织培养芯片、阵列、板、微量滴定板、毛细管等中的含有该酶样品中，并在一定温度下培养足以允许所述 SARM 与酶结合的时间。使样品与所述 SARM 或其它特定结合组分接触的方法对于本领域技术人员而言是已知的，可以根据所使用的测定方案的类型进行选择。培养方法对于本领域技术人员而言也是标准和已知的。

在另一个实施方案中，术语“接触”是指本发明的 SARM 代谢物被引入接受治疗的个体中，允许所述 SARM 化合物与雄激素受体体内接触。

本文所用的术语“性欲”意指性欲望。

本文所用的术语“勃起”意指能够竖立。勃起组织是能够大幅扩大并通过其所含的大量血管的膨胀而变硬的组织。

“性腺机能减退”是由异常的性腺功能活性降低导致或以其为特征的病症，伴有生长和性发育迟缓。“骨质减少”指骨钙化或密度降低。这是包括所有可见这种病症的骨骼系统的术语。

“骨质疏松”指由于钙和骨蛋白丧失而导致的骨变细和骨量减小。骨质疏松使人易于骨折，并且骨折经常治愈缓慢且难以治愈。未加抑制的骨质疏松可能导致姿势改变、身体异常和灵活性降低。

“BPH(良性前列腺增生)”是前列腺的非恶性增大，并且是在任何内部器官中所见的最常见的非恶性增生性异常，并且是成年男性发病的主要原因。年龄超过50岁的男性的BPH发病率超过75%，到90年代发病率达到88%。BPH通常导致横穿前列腺的尿道部分(前列腺尿道)的渐进挤压。这导致患者因为膀胱排空不完全经常急切地想要排尿和急切排尿。尿流的阻塞还可能导致一般性排尿失控，包括希望时开始排尿的困难和因为不能从膀胱中排空尿液而停止尿流的困难，该病症称为溢出性尿失禁，它可能导致尿路梗阻和排尿不能。

“认知”指认识的过程，特别是知道、认知、思考、学习和判断的过程。认知与心理学、语言学、计算机科学、神经科学、数学、行为学和哲学有关。术语“情绪”指脾气或精神状态。本文考虑的改变意指认知和/或情绪的任何积极或消极变化。

术语“抑郁”指涉及身体、心情和思想的疾病，它影响人的吃饭、睡眠的方式以及自我感觉和对于物体思考的方式。抑郁的征候和症状包括丧失活动兴趣、丧失食欲或吃得过多、丧失表情、空虚、感觉绝望、悲观、罪恶或无助、社会退缩、疲劳、睡眠失调、注意力集中困难、记忆困难或决定困难、坐立不安、易怒、头痛、消化疾病或慢性疼痛。

术语“脱发”在医学上称为秃头症，指非常常见形式的男性模式的秃顶。秃顶一般开始于头皮上的片秃，有时发展成完全秃顶，甚至丧失体毛。脱发影响男性和女性。

“贫血”指红细胞数小于正常值或血液中血红蛋白数小于正常值的病症。因此血液的载氧能力降低。患贫血的人可能感觉容易劳累和疲劳，面目苍白，产生心悸和通常变得呼吸短促。贫血由四个基本因素导致：a) 出血(流血)；b) 溶血(红细胞的过多破坏)；c) 红细胞产生不足；和 d) 无足够的正常血红蛋白。存在许多形式的贫血，包括再生障碍性贫血、苯中毒、范可尼综合征贫血、新生儿溶血性疾病、遗传性球形红细胞性贫血、铁缺乏性贫血、骨硬化症、恶性贫血、镰刀形红细胞病、地中海贫血、脊髓发育异常综合征和多种骨髓疾病。如本文考虑，本发明的 SARM 化合物用于预防和/或治疗任一种或多种上述贫血形式。

“肥胖”指大大超过正常体重的状态。通常，如果一个人比其理想体重高出 20%，则认为他肥胖。美国国立卫生研究所(NIH)对肥胖进行了更精确的定义，即身体质量指数(BMI)为 30 或以上为肥胖。肥胖经常是多因素的，既有遗传因素，也有行为因素。由肥胖导致的超重是健康问题是重要原因。它增加产生包括以下的多种疾病的风险：II 型(成人发作)糖尿病；高血压；中风(脑血管意外或 CVA)；心脏病发作(心肌梗塞或 MI)；心衰(充血性心衰)；癌症(某些形式如前列腺癌和结肠与直肠癌)；胆石症和胆囊疾病(胆囊炎)；痛风和痛风性关节炎；膝、髌和下背的骨关节炎(变性关节炎)；睡眠呼吸暂停(在睡眠期间不能正常呼吸，血氧减少)；和匹克威克综合征(肥胖、面红、换气不足和睡意)。如本文考虑，术语“肥胖”包括任何一种上述与肥胖有关的病症和疾病。因此，本发明的 SARM 化合物用于预防和/或治疗肥胖和任一种或多种上述与肥胖有关的病症和疾病。

“前列腺癌”是美国男性中最常发生的癌症之一，每年诊断出

数十万新病例。新诊断的前列腺癌病例中有 60%以上发现是病理上发展的，无法治愈且预后不佳。50 岁以上的男性中有 1/3 患有潜在形式的前列腺癌，其可能会被激活成威胁生命的临床前列腺癌形式。在 50 年代到 90 年代间，潜在前列腺肿瘤的发生频率每十年都显著增加，50 年代为 5.3-14%，而 90 年代为 40-80%。患有潜在前列腺癌的人的数目在所有文化、人种群和种族间相同，然而临床攻击性癌症的发生频率显著不同。这表明环境因素在激活潜在前列腺癌中可能起作用。

药物组合物

在一个实施方案中，本发明的治疗方法包括给予含有 SARM 化合物如本发明的 SARM 代谢物的药物制剂。在另一个实施方案中，本发明的治疗方法包括给予含有所述 SARM 化合物的类似物、衍生物、异构体、代谢物、药学可接受的盐、药品、水合物、N-氧化物、多晶型物或晶体或它们的任意组合和药学可接受载体的药物制剂。

本文使用的术语“药物组合物”是指含有“有效量”的活性成分即 SARM 化合物以及药学可接受的载体或稀释剂的组合物。

本文使用的术语“有效量”是指就给定的病症和给药方案而言提供治疗效果的数量。本文使用的 SARM 化合物的“有效量”可以为 1-500 mg/日。在一个实施方案中，该剂量为 1-100 mg/日。在另一个实施方案中，该剂量为 100-500 mg/日。在另一个实施方案中，该剂量为 45-60 mg/日。在另一个实施方案中，该剂量为 15-25 mg/日。在另一个实施方案中，该剂量为 55-65 mg/日。在另一个实施方案中，该剂量为 45-60 mg/日。所述 SARM 化合物可以以含有整个日剂量的量的单个剂型每日给予或者可以以多剂量例如每日两次或每日三次每日给予。所述 SARM 化合物也可以间断给予，例如每隔一天一次、一周三次、一周四次、一周五次等。

本文使用的术语“治疗”包括预防性和疾病缓解性治疗。本文

使用的术语“减少”、“压制”和“抑制”共同含义理解为减轻或减少。本文使用的术语“促进”具有通常的增加速率的含义。本文使用的术语“提高”具有通常的增加的意义。本文使用的术语“进展”意指范围或严重程度增加、前进、生长或恶化。

本文使用的术语“给予”是指使个体与本发明的 SARM 化合物接触。本文使用的术语给予可以在体外即在试管中完成，或者在体内即在细胞中或活生物体如人的组织中完成。在一个实施方案中，本发明包括将本发明的化合物给予个体。在一个实施方案中，该个体是哺乳动物个体。在另一个实施方案中，该个体是人。

含有所述 SARM 活性剂的药物组合物可以通过本领域技术人员已知的任何方法，例如肠胃外、癌旁侧(paracancerally)、经粘膜、经皮、肌内、静脉内、皮内、皮下、腹膜内、心室内、颅内、阴道内或肿瘤内给予个体。

在一个实施方案中，所述药物组合物经口服给予，因此将其制备为适合于口服给药的形式，即固体或液体制剂。合适的固体口服剂型包括片剂、胶囊剂、丸剂、颗粒剂、小丸等。合适的液体口服剂型包括溶液剂、混悬剂、分散剂、乳剂、油剂等。在本发明的一个实施方案中，所述 SARM 化合物制备为胶囊剂。根据这一实施方案，本发明的组合物除了 SARM 活性化合物之外，还含有惰性载体或稀释剂，硬明胶胶囊。

此外，在另一个实施方案中，所述药物组合物以静脉内、动脉内或肌内注射液体制剂的方式给予。合适的液体剂型包括溶液剂、混悬剂、分散剂、乳剂和油剂等。在一个实施方案中，所述药物组合物经静脉内给予，因此制备为适合于静脉内给予的形式。在另一个实施方案中，所述药物组合物以动脉内形式给予，因此制备为适合于动脉内给予的形式。在另一个实施方案中，所述药物组合物肌内给予，因此制备为适合于肌内给予的形式。

此外，在另一个实施方案中，所述药物组合物局部给予体表，因此制备为适合于局部给予的形式。合适的局部制剂包括凝胶剂、软膏剂、乳膏剂、洗剂、滴剂等。对于局部给予，所述 SARM 活性剂或其生理学可耐受的衍生物如盐、酯、N-氧化物等作为于含有或不含有药学载体的生理学可接受的稀释剂中的溶液剂、混悬剂或乳剂制备并施用。

此外，在另一个实施方案中，所述药物组合物以栓剂如直肠栓剂或尿道栓剂给予。此外，在另一个实施方案中，所述药物组合物经皮下植入小丸的形式给予。在另一个实施方案中，该小丸提供 SARM 活性剂在一段时间内的控释。

在另一个实施方案中，所述活性化合物可以在囊泡，尤其是脂质体中递送(参见 Langer, *Science* 249: 1527-1533 (1990); Treat 等, in *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein 和 Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, 同前, pp. 317-327; 参见同前)。

本文使用的“药学可接受的载体或稀释剂”对本领域技术人员而言是熟知的。载体或稀释剂可以是供固体制剂使用的固体载体或稀释剂、供液体制剂使用的液体载体或稀释剂或它们的混合物。

固体载体/稀释剂包括但不限于树胶、淀粉(如玉米淀粉、预胶化淀粉(pregeletanized starch)、糖(如乳糖、甘露醇、蔗糖、葡萄糖)、纤维素物质(如微晶纤维素)、丙烯酸盐(如聚甲基丙烯酸盐)、碳酸钙、氧化镁、滑石以及它们的混合物。

对于液体制剂而言，药学可接受的载体可以是水溶液或非水溶液、悬浮液、乳液或油。非水溶剂的实例有丙二醇、聚乙二醇和可注射有机酯如油酸乙酯。水溶液载体包括水、醇/水溶液、乳液或悬浮液，包括盐水和缓冲介质。油的实例有来源于石油、动物、植物或合成的油，如花生油、豆油、矿物油、橄榄油、向日葵油和鱼肝油。

(用于皮下、静脉内、动脉内或肌内注射)的肠胃外载体包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸林格氏液和固定油。静脉内载体包括液体营养补充剂、电解质补充剂如基于林格氏葡萄糖的补充剂等。实例有无菌液体如水和油, 加入或不加入表面活性剂和其它药学可接受的助剂。一般而言, 水、盐水、葡萄糖水溶液和相关糖溶液以及多元醇如丙二醇或聚乙二醇是优选的液体载体, 特别是对于可注射溶液而言。油的实例有来源于石油、动物、植物或合成的油, 如花生油、豆油、矿物油、橄榄油、向日葵油和鱼肝油。

另外, 所述组合物还可以含有粘合剂(如阿拉伯胶、玉米淀粉、明胶、卡波姆、乙基纤维素、瓜耳胶、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮)、崩解剂(如玉米淀粉、马铃薯淀粉、海藻酸、二氧化硅、交联甲羧纤维素钠(croscarmellose sodium)、聚乙烯吡咯烷酮、瓜耳胶、羟基乙酸淀粉钠)、各种 pH 和离子强度的缓冲物(例如 Tris-HCl、乙酸盐、磷酸盐)、添加剂如用于防止表面吸附的白蛋白或明胶、洗涤剂(例如 Tween 20、Tween 80、Pluronic F68、胆酸盐)、蛋白酶抑制剂、表面活性剂(如十二烷基硫酸钠)、渗透增强剂、增溶剂(例如 cremophor、甘油、聚乙二醇、苯扎氯铵(benzalkonium chloride)、苯甲酸苄酯、环糊精、脱水山梨糖醇(sorbitan)酯、硬脂酸)、抗氧化剂(例如抗坏血酸、焦亚硫酸钠、丁基化羟基苯甲醚)、稳定剂(如羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素)、增粘剂(如卡波姆、胶态二氧化硅、乙基纤维素、瓜耳胶)、甜味剂(如天冬甜素、柠檬酸)、防腐剂(例如乙基汞硫代水杨酸钠、苄醇、对羟基苯甲酸酯)、润滑剂(如硬脂酸、硬脂酸镁、聚乙二醇、十二烷基硫酸钠)、助流剂(如胶态二氧化硅)、增塑剂(如邻苯二甲酸二乙酯、柠檬酸三乙酯)、乳化剂(如卡波姆、羟丙基纤维素、十二烷基硫酸钠)、聚合物包衣(如泊洛沙姆或 poloxamines)、包衣或成膜剂(如乙基纤维素、丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯)和/或助剂。

在一个实施方案中，本文提供的药物组合物为控释组合物，即给药后其中的 SARM 化合物在一段时间内释放的组合物。控释或缓释组合物包括在亲脂性贮存单元(例如脂肪酸、蜡、油)中的制剂。在另一个实施方案中，所述组合物为速释组合物，即给药后其中的全部 SARM 化合物立刻释放的组合物。

在另一个实施方案中，所述药物组合物可以通过控释系统递送。例如，可以通过静脉输注、可植入的渗透泵、经皮药贴、脂质体或其它给药方式给予药物。在一个实施方案中，可以使用泵(参见 Langer, 上述); Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14: 201 (1987); Buchwald 等, *Surgery* 88: 507 (1980); Saudek 等, *N. Engl. J. Med.* 321: 574 (1989))。在另一个实施方案中，可以使用聚物质。在另一个实施方案中，可以将控释系统置于治疗靶，即脑的附近，因此只需全身剂量的一部份(参见，例如 Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, 上述, vol. 2, pp. 115-138 (1984))。其它控释系统在 Langer 的综述中得到讨论(*Science* 249: 1527-1533 (1990))。

所述组合物还可包含将活性物质引入或引至聚合物例如聚乳酸、聚乙醇酸、水凝胶等的颗粒制剂中或其上，或者引至脂质体、微乳、微囊、单层或多层囊泡、红细胞影或球形体上。这样的组合物将影响物理状态、溶解度、稳定性、体内释放速率和体内清除速率。

本发明还包括用聚合物(例如泊洛沙姆或 poloxamines)包衣的颗粒组合物和偶联于针对组织特异性受体、配体或抗原的抗体的化合物，或偶联于组织特异性受体的配体的化合物。

本发明还包括通过水溶性聚合物如聚乙二醇、聚乙二醇和聚丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮或聚脯氨酸的共价连接而修饰的化合物。已知修饰的化合物静脉内注射后在血液中的半衰期显著长于相应的未经修饰的化合物(Abuchowski 等, 1981; Newmark 等, 1982; 以及 Katre 等, 1987)。这样

的修饰也可以增加化合物在水溶液中的溶解性，消除聚集，增强化合物的物理和化学稳定性，并大大降低化合物的免疫原性和反应性。结果，通过以比未经修饰的化合物低的剂量或比其低的给药频率给予这种聚合物-化合物加合物，可以实现期望的体内生物学活性。

含有活性成分的药物组合物的制备在本领域中已知，例如通过混合、造粒或压片方法制备。活性治疗成分通常与药学可接受的并且与活性成分相容的赋形剂混合。对于口服给药，将 SARM 药物或它们的生理学可耐受的衍生物如盐、酯、N-氧化物等与常规用于此目的的添加剂如赋形剂、稳定剂或惰性稀释剂混合，并通过常规方法转化成适于给药的形式，如片剂、包衣片剂、硬或软明胶胶囊、水溶液、醇溶液或油溶液。对于非胃肠给药，将 SARM 药物或它们的生理学可耐受的衍生物如盐、酯、N-氧化物等转化成溶液、悬浮液或乳液，如果需要，与常规用于和适于此目的的物质，例如增溶剂或其它辅剂一起转化。

可以将活性成分制成中性的药学可接受的盐形式的组合物。药学可接受的盐包括酸加成盐(由多肽或抗体分子的游离氨基形成)，它们由无机酸如盐酸或磷酸，或有机酸如醋酸、草酸、酒石酸、苦杏仁酸等形成。从游离羧基形成的盐也可以由无机碱如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁，以及有机碱如异丙胺、三甲胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等衍生而来。

为作医用，SARM 的盐是药学可接受的盐。但是，其它盐可用于制备本发明的化合物或它们的药学可接受的盐。本发明的化合物的适宜的药学可接受的盐包括酸加成盐，例如它们可以通过混合本发明的化合物的溶液与药学可接受的酸如盐酸、硫酸、甲磺酸、富马酸、马来酸、琥珀酸、醋酸、苯甲酸、草酸、柠檬酸、酒石酸、碳酸或磷酸的溶液而形成。

在一个实施方案中，本发明的方法包括将 SARM 化合物作为唯

一的活性成分给予。但是本文所公开的以下的方法也包括在本发明的范围内：a) 男性避孕；b) 治疗多种激素相关病症，例如与年老男性雄激素减少(ADAM)有关的病症；c) 治疗与女性雄激素减少(ADIF)有关的病症；d) 治疗和/或预防急性和/或慢性肌肉消瘦症；e) 预防和/或治疗干眼症；f) 口服雄激素替代治疗；g) 降低前列腺癌的发病率、阻止前列腺癌或导致前列腺癌消退；和/或 h) 诱导癌细胞凋亡，其包括将 SARM 化合物与一种或多种治疗活性剂组合给予。这些活性剂包括但不限于：LHRH 类似物、可逆性抗雄激素、抗雌激素、抗癌药、5- α 还原酶抑制剂、芳香酶抑制剂、孕激素或通过其它核激素受体起作用的活性剂。

因此，在一个实施方案中，本发明提供含有选择性雄激素受体调节剂代谢物和 LHRH 类似物的组合物和药物组合物。在另一个实施方案中，本发明提供含有选择性雄激素受体调节剂代谢物和可逆性抗雄激素的组合物和药物组合物。在另一个实施方案中，本发明提供含有选择性雄激素受体调节剂代谢物和抗雌激素的组合物和药物组合物。在另一个实施方案中，本发明提供含有选择性雄激素受体调节剂代谢物和抗癌药的组合物和药物组合物。在另一个实施方案中，本发明提供含有选择性雄激素受体调节剂代谢物和 5- α 还原酶抑制剂的组合物和药物组合物。在另一个实施方案中，本发明提供含有选择性雄激素受体调节剂代谢物和芳香酶抑制剂的组合物和药物组合物。在另一个实施方案中，本发明提供含有选择性雄激素受体调节剂代谢物和孕激素的组合物和药物组合物。在另一个实施方案中，本发明提供含有选择性雄激素受体调节剂代谢物和通过其它核激素受体起作用的活性剂的组合物和药物组合物。

以下实施例是为更充分地例示本发明的优选实施方案。但是决不应该将它们理解为限制本发明的广泛范围。

实验细节部分

实施例 1

具有促雄性活性和合成代谢活性的非甾族配体

设计并合成本文提供的一些 SARM 化合物并对其体外和体内药理学活性进行评价。研究体外雄激素受体结合亲和力以及在阉割动物中维持雄激素依赖性组织生长的能力。以所述 SARM 化合物维持和/或刺激前列腺和精囊生长的能力来监测促雄性活性，所述 SARM 化合物维持和/或刺激前列腺和精囊生长的能力通过测量体重来衡量。以所述 SARM 化合物维持和/或刺激肛提肌生长的能力来监测合成代谢活性，所述 SARM 化合物维持和/或刺激肛提肌生长的能力通过测量重量来衡量。

合成方法

(2R)-1-异丁烯酰基吡咯烷-2-羧酸(R-129)。将 D-脯氨酸(R-128, 14.93 g, 0.13 mol)溶于 71 mL 2 N NaOH 中，在冰浴上冷却，用丙酮(71 mL)稀释所得的碱性溶液。在 40 分钟内将异丁烯酰氯 127 (13.56 g, 0.13 mol)的丙酮溶液(71 mL)和 2N NaOH 溶液(71 mL)同时加至冰浴中的 D-脯氨酸水溶液中。加入异丁烯酰氯的过程中将混合物的温度保持在 10-11°C。搅拌(室温 3 小时)后，将混合物在 35-45°C 下真空蒸发以去除丙酮。用乙醚洗涤所得溶液，用浓盐酸酸化至 pH 2。用氯化钠将酸性混合物饱和，用 EtOAc (100 mL x 3)萃取。将合并的萃取物用硫酸钠干燥，滤过硅藻土(Celite)，真空蒸发得到粗产物，为无色油状物。将该油状物从乙醚和己烷中重结晶得到 16.2 (68%)期望的化合物，为无色晶体：熔点 102-103°C (lit. [214] 熔点 102.5-103.5 C); 该化合物的 NMR 谱表明存在标题化合物的两者旋转异构体。¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 第一异构体 5.28 (s)和 5.15 (s)，第二异构体 5.15 (s)和 5.03 (s) (两个旋转异构体均为总共 2H, 乙烯基 CH₂)，第一异构体 4.48-4.44，第二异构体 4.24-4.20 (m) (两个旋转异构体均为总

共 1H, 手性中心 CH), 3.57-3.38 (m, 2H, CH₂), 2.27-2.12 (1H, CH), 1.97-1.72 (m, 6H, CH₂, CH, Me); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 主要异构体 173.3, 169.1, 140.9, 116.4, 58.3, 48.7, 28.9, 24.7, 19.5; 次要旋转异构体 174.0, 170.0, 141.6, 115.2, 60.3, 45.9, 31.0, 22.3, 19.7; IR (KBr) 3437 (OH), 1737 (C=O), 1647 (CO, COOH), 1584, 1508, 1459, 1369, 1348, 1178 cm⁻¹; [α]_D²⁶ +80.8° (c = 1, MeOH); 分析 C₉H₁₃NO₃ 计算值: C 59.00, H 7.15, N 7.65, 实测值: C 59.13, H 7.19, N 7.61。

(3R,8aR)-3-溴甲基-3-甲基-四氢-吡咯并[2,1c][1,4]噁嗪-1,4-二酮(R, R-130)。在室温、氩气下, 将 NBS (23.5g, 0.132 mol) 在 100 mL DMF 中的溶液逐滴加入搅拌的化合物 R-129 (16.1g, 88mmol) 在 70 mL DMF 中的溶液中, 将所得混合物搅拌 3 日。真空除去溶剂, 有黄色固体沉淀出。将固体悬浮于水中, 在室温下搅拌过夜, 过滤并干燥得到 18.6 (81%) (干燥后重量减轻~34%) 的标题化合物, 为黄色固体: 熔点 152-154°C (对于 S-异构体 lit. [214] 熔点 107-109°C); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 4.69 (dd, J = 9.6 Hz, J = 6.7 Hz, 1H, 手性中心 CH), 4.02 (d, J = 11.4 Hz, 1H, CHH_a), 3.86 (d, J = 11.4 Hz, 1H, CHH_b), 3.53-3.24 (m, 4H, CH₂), 2.30-2.20 (m, 1H, CH), 2.04-1.72 (m, 3H, CH₂ 和 CH), 1.56 (s, 2H, Me); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO- d₆) δ 167.3, 163.1, 83.9, 57.2, 45.4, 37.8, 29.0, 22.9, 21.6; IR (KBr) 3474, 1745 (C=O), 1687 (C=O), 1448, 1377, 1360, 1308, 1227, 1159, 1062cm⁻¹; [α]_D²⁶ + 124.5° (c = 1.3, 氯仿); 分析 C₉H₁₂BrNO₃ 计算值: C 41.24, H 4.61, N 5.34. 实测值: C 41.46, H 4.64, N 5.32.

(2R)-3-溴-2-羟基-2-甲基丙酸(R-131)。将溴代内酯 R-130 (18.5g, 71 mmol) 在 300 mL 24% HBr 中的溶液加热回流 1 小时。用盐水(200 mL)稀释所得溶液, 并用乙酸乙酯(100 mL x 4)萃取。将合并的萃取物用饱和碳酸氢钠溶液(100 mL x 4)洗涤。用浓盐酸将水溶液酸化至 pH = 1, 并用乙酸乙酯(100 mL x 4)萃取。将合并的有机溶液用硫酸钠干燥, 滤过硅藻土, 真空蒸发至干。从甲苯中重结晶得到 10.2 g (86%)

期望的化合物，为无色晶体；熔点 107-109°C (S-异构体的 lit. [214]熔点 109-113°C)；¹H NMR(300 MHz, DMSO-d₆) δ 3.63 (d, J = 10.1 Hz, 1H, CHH_a), 3.52 (d, J = 10.1 Hz, 1H, CHH_b), 1.35 (s, 3H, Me); IR (KBr) 3434 (OH), 3300-2500 (COOH), 1730 (C=O), 1449, 1421, 1380, 1292, 1193, 1085 cm⁻¹; [α]_D²⁶ +10.5° (c = 2.6, MeOH); 分析 C₄H₇BrO₃ 计算值: C 26.25, H 3.86, 实测值: C 26.28, H 3.75。

N-[4-硝基-3-(三氟甲基)苯基]-(2R)-3-溴-2-羟基-2-甲基丙酰胺 (R-132)。在-5至-10°C、氩气下，将亚硫酸酐(8.6 g, 72 mmol)逐滴加入溴代酸 R-131 (11.0 g, 60 mmol)在 70 mL DMA 中的溶液中。在相同条件下将所得混合物搅拌 2 小时。向上述溶液中逐滴加入 4-硝基-3-三氟甲基-苯胺(12.4 g, 60mmol)在 80mL DMA 中的溶液，将所得混合物在室温下搅拌过夜。使用高真空油泵在旋转蒸发仪上除去溶剂，用饱和碳酸氢钠溶液稀释残余物，并用乙醚(100 mL x 3)萃取。将合并的萃取物用无水硫酸钠干燥，滤过硅藻土，并用二氯甲烷作为洗脱剂经硅胶闪蒸色谱纯化，得到 18.0 g (80%)期望的化合物：熔点 98- 100 °C (R_f=0.2, 硅胶, CH₂Cl₂)；¹H NMR(300 MHz, DMSO-d₆) δ 10.54 (s, 1H, NH), 8.54 (d, J = 2.1 Hz, 1H, ArH), 8.34 (dd, J = 9.0 Hz, J = 2.1 Hz, 1H, ArH), 8.18 (d, J = 9.0 Hz, 1H, ArH), 6.37 (s, 1H, OH), 3.82 (d, J = 10.4 Hz, 1H, CHH_a), 3.58 (d, J = 10.4 Hz, 1H, CHH_b), 1.48 (s, 3H, Me); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 173.6 (C=O), 143.0, 127.2, 123.2, 122.6 (q, J = 33.0 Hz), 122.0 (q, J = 271.5 Hz), 118.3 (q, J = 6.0 Hz), 74.4, 41.4, 24.9; IR (KBr) 3344 (OH), 1680 (C=O), 1599, 1548 (C=C, Ar), 1427, 1363, 1161 cm⁻¹; MS (ESI): m/z 370.8 (M)⁺; 分析 C₁₁H₁₀BrN₂O₄ 计算值: C 35.60, H 2.72, N 7.55, 实测值: C 35.68, H 2.72, N 7.49。

N-[4-硝基-3-(三氟甲基)苯基]-(2S)-3-[4-(乙酰氨基)苯氧基]-2-羟基-2-甲基丙酰胺(S-147, 化合物 IV)。标题化合物从化合物 R-132 (0.37 g, 1.0 mmol)、4-乙酰氨基苯酚(0.23 g, 1.5 mmol)、K₂CO₃ (0.28 g, 2.0

mmol)制备和于 20 mL 甲基乙基酮中的作为相转移催化剂的 10% 苄基三丁基氯化铵在氩气氛下加热回流过夜来制备。反应接着进行 TLC, 将所得混合物滤过硅藻土, 真空浓缩至干。经硅胶闪蒸色谱(己烷-乙酸乙酯, 3:1)纯化获得 0.38 g (86%)($R_f = 0.18$, 己烷: 乙酸乙酯, 3:1)的期望化合物, 为浅黄色粉末: 熔点 70-74°C; 该固体可从乙酸乙酯和己烷中重结晶); $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6) δ 10.62 (s, 1H, NH), 9.75 (s, 1H, NH), 8.56 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, ArH), 8.36 (dd, $J = 9.1$ Hz, $J = 1.9$ Hz, 1H, ArH), 8.18 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H, ArH), 7.45-7.42 (m, 2H, ArH), 6.85-6.82 (m, 2H, ArH), 6.25 (s, 1H, OH), 4.17 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, CHH_a), 3.94 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, CHH_b), 1.98 (s, 3H, Me), 1.43 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, DMSO-d_6) δ 174.6 (C=O), 167.7, 154.2, 143.3, 141.6, 132.8, 127.4, 123.0, 122.7 (q, $J = 33.0$ Hz), 122.1 (q, $J = 271.5$ Hz), 120.1, 118.3 (q, $J = 6.0$ Hz), 114.6, 74.9, 73.8, 23.8, 23.0; IR (KBr) 3364 (OH), 1668 (C=O), 1599, 1512 (C=C, Ar), 1457, 1415, 1351, 1323, 1239, 1150, 1046 cm^{-1} ; MS (ESI): m/z 464.1 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$; 分析 $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_6$ 计算值: C 51.71, H 4.11, N 9.52, 实测值: C 52.33, H 4.40, N 9.01。

各种 SARM 化合物的合成利用最后反应步骤的共同中间体。使用溴中间体以使得各种酚化合物取代溴化物以得到所期望的醚产物。将溴代醇(bromohydrin)转化成环氧化物以打开环氧化物从而获得该同一期望的醚产物。

所述 SARM 化合物特别是化合物 IV 的体外活性显示高的雄激素受体结合亲和力($K_i = 7.5$ nM)。用 SARM 化合物特别是化合物 IV 进行的动物实验表明其是有效的促雄性和合成代谢非甾族活性剂。在这些实验中使用四组大鼠: (1) 完整对照; (2) 阉割对照; (3) 用丙酸睾酮(100 g/日)处理的阉割动物; 和(4) 用化合物 IV 处理的阉割动物(1000 g/日)。睾酮和化合物 IV 都以恒定速率通过皮下渗透泵递送 14 日。

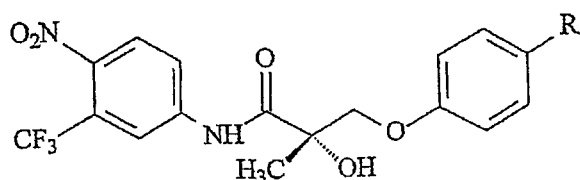
这些实验的结果见图 1。阉割使促雄性组织(如前列腺和精囊)和

合成代谢组织(如肛提肌)重量显著降低,但对动物体重(BW)影响较小。用丙酸睾酮或化合物 IV 处理阉割动物保持促雄性组织达相同的程度。化合物 IV 与丙酸睾酮有相似的促雄性活性(即前列腺和精囊重量相同),但化合物 IV 作为合成代谢活性剂的效力则高得多。化合物 IV 在测试剂量显示比丙酸睾酮更高的合成代谢活性(即肛提肌保持与完整对照组相同的重量,但比睾酮组观察到的重量高)。本文报告的实验是首次体内结果,其表明了雄激素受体的非甾族配体的组织选择性促雄性活性和合成代谢活性(即不同的促雄性效力和合成代谢效力)

实施例 2

具有促雄性活性和合成代谢活性的非甾族配体

在大鼠中测试四种新的非甾族雄激素(化合物 III、IV、VI 和 VII)的体内效力和急性毒性。体外测定确定这些化合物与雄激素受体以非常高的亲和力结合。该四种化合物的结构和名称显示如下:



化合物 III R= F

化合物 IV R=NHCOCH₃

化合物 VI R=COCH₃

化合物 VII R=COC₂H₅

实验方法

材料: 化合物 III、IV、VI 和 VII 的 S 异构体和化合物 III 的 R 异构体根据图 9 中所示的路线合成。丙酸睾酮(TP)、聚乙二醇 300 (PEG300, 试剂级)和中性缓冲福尔马林(10% w/v)购自 Sigma

Chemical Company (St Louis, MO)。Alzet 渗透泵(2002 型)购自 Alza Corp. (Palo Alto, CA)。

动物：未成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠，体重 90-100 g，购自 Harlan Biosciences (Indianapolis, IN)。动物在 12 小时光照-黑暗周期下保持，可以自由获得食物和水。动物实验方案由 Institutional Laboratory Animal Care and Use Committee 审查并批准。

实验设计：将大鼠随机分为 29 组，每组 5 只动物。处理组的描述见表 1。药物处理前 1 天，将第 2 组至第 29 组的动物单个从笼中取出，称重并以腹膜内途径用氯胺酮/甲苯噻嗪(87/13 mg/kg; 约 1 mL/kg)麻醉。当适当地麻醉(即对趾部掐捏没有反应)时，在动物耳朵上作标记以便于识别。然后将动物至于无菌垫上，用聚维酮碘和 70% 乙醇洗涤腹部和阴囊。经阴囊中线切开切除睾丸，用无菌缝线结扎睾丸上部组织然后再手术切除每侧睾丸。用无菌不锈钢伤口夹闭合手术伤口，用聚维酮碘清理伤口。然后使动物在无菌垫上恢复(直至能够站立)，然后将其放回笼中。

24 小时后，将第 2 组至第 29 组的动物再次用氯胺酮/甲苯噻嗪麻醉，将 Alzet 渗透泵(2002)置于肩胛区域皮下。在该情况下，将肩胛区域的毛剃掉并清洁(聚维酮碘和乙醇)，然后用无菌手术刀切开一个小口(1 cm)。插入渗透泵，用无菌不锈钢伤口夹闭合伤口。使动物恢复并放回笼中。渗透泵含有溶于聚乙二醇 300 (PEG300)中的适宜的处理药(表 1 中指定的)。植入前一天向渗透泵中充满适宜的溶液。每日监测动物对药物处理的急性毒性征象(如嗜睡、皮毛粗糙)。

药物处理 14 天后，用氯胺酮/甲苯噻嗪麻醉动物。然后在麻醉下通过放血处死动物。经腹主动脉穿刺收集血样，进行全血细胞分析。将血样的一部分置于另一个试管中，在 12000 g 下离心 1 分钟，移出血浆层，在 -20℃ 下冷冻。取出前列腺腹叶、精囊、肛提肌、肝脏、肾脏、脾脏、肺和心脏，清除外部组织，称重并置于含有 10% 中性缓

冲福尔马林的试管中。将防腐的组织送往 GTx, Inc.进行组织病理学分析。

在数据分析中,所有器官的重量都用体重进行标准化,用单因素 ANOVA 分析任何统计学显著性差异。前列腺和精囊的重量作为评价促雄性活性的指数,肛提肌重量用于评价合成代谢活性。

结果

在阉割大鼠模型中给药 14 天后检测化合物 III、IV、VI 和 VII 的 S 异构体和化合物 III 的 R 异构体的促雄性活性和合成代谢活性。以增加剂量的丙酸睾酮作为合成代谢作用和促雄性作用的阳性对照。

如图 2 和 3 所示,由于切断了内源性雄激素的产生而使阉割大鼠、载体处理大鼠的前列腺、精囊和肛提肌的重量显著降低。外源给予促雄性和合成代谢类固醇丙酸睾酮以剂量依赖性方式增加阉割大鼠的前列腺、精囊和肛提肌的重量。化合物 III 的 R 异构体以及化合物 VI 和 VII 的 S 异构体对阉割动物的前列腺、精囊和肛提肌的重量没有影响(数据未显示)。化合物 IV 的 S-异构体(图 2: V)和化合物 III 的 S 异构体(图 3: III)以剂量依赖性方式增加了前列腺、精囊和肛提肌的重量。与丙酸睾酮相比,化合物 IV 在增加前列腺和精囊重量方面显示较弱效力,但在增加肛提肌重量方面显示较高效力和内在活性。特别地,化合物 IV 剂量低至 0.3 mg/日时,能够将阉割动物的肛提肌重量维持在与完整对照动物相同的水平。因此,化合物 IV 是有效的非甾族合成代谢活性剂,具有较低的促雄性活性,但具有高于丙酸睾酮的合成代谢活性。这相对于以前的权利要求而言有显著进步,在于该化合物选择性地刺激肌肉生长和其它合成代谢作用,同时对前列腺和精囊作用较小。这对于担心前列腺癌发生或进展的年老男性可能特别有关。

化合物 III 的效力弱于化合物 IV,但显示较高的组织选择性(图 2 和 3 中比较了对前列腺和精囊的作用)。化合物 III 显著增加了肛提肌

的重量，但刺激前列腺和精囊生长的能力几乎没有或没有(即前列腺和精囊重量比完整动物中或用丙酸睾酮处理的动物中所观察到的低20%)。

结果表明受试化合物中没有一个对体重或其它器官(即肝脏、肾脏、脾脏、肺和心脏)重量产生显著影响。也没有任何化合物引起任何急性毒性征象，如经诊断性血液学测试和对接受处理的动物的视觉观察所度量。重要的是，化合物 IV 在剂量为 0.3 mg/日(即表现出最大合成代谢作用的剂量)时没有抑制黄体生成素(LH)或促卵泡激素的产生。

总之，化合物 IV 在动物中表现出优异的合成代谢活性，其通过去除内源性雄激素后维持肛提肌的重量来表明。这一发现代表开发治疗上有用的非甾族雄激素的重大进展，并相对于以前的该类药物也是一个重大进步(即组织选择性和效力)。化合物 III 和化合物 IV 与促雄性和合成代谢类固醇丙酸睾酮相比显示出选择性合成代谢活性。组织选择性实际上是非甾族雄激素在合成代谢相关应用方面的优势之一。

虽然化合物 III-IV 和 VI-VII 的 S 异构体在结构上和体外功能性活性方面具有相似性，但是在体内活性方面却显示出显著差异。化合物 IV 在动物中的促雄性活性和合成代谢活性最有效，其合成代谢活性高于丙酸睾酮的。化合物 III 显示较低的促雄性活性，但合成代谢活性与丙酸睾酮相当。相反，化合物 VI 和 VII 没有产生任何体内促雄性活性或合成代谢活性。

这些实验表明发现了一类新的选择性雄激素受体调节剂(SARM)中的两个成员(III 和 IV)，该类新的选择性雄激素受体调节剂表现强的合成代谢作用(如肌肉生长)且具有较低的促雄性活性(如前列腺生长)。这类新的药物与非选择性雄激素相比具有几个优势，包括在男性和女性中用于调节生育力、红细胞生成、骨质疏松、性欲的可能治疗应用以及在患有前列腺癌或具有前列腺癌高风险的男性中的可能

治疗应用。

此外,图7和图8表明化合物III和化合物IV对大鼠LH和FSH水平的影响。这些结果进一步表明这些SARM具有新颖性,因为它们对这些生殖激素具有不同的作用,因而表明具有组织特异性药理学活性。图7中,在剂量等于或大于0.3 mg/日时,TP和化合物III处理的阉割动物的LH水平显著低于未处理动物(即阉割对照)。但是要求化合物IV在较高剂量(即0.5 mg/日或更高)时才观察到LH水平的显著下降。因此,化合物IV在能够引发最大程度刺激肌生长的剂量不抑制LH水平。在图8中,当剂量为0.5 mg/日或更高时,化合物III处理的阉割动物的FSH水平显著低于未处理动物(即阉割对照)。类似地,TP处理的动物中观察到较低的FSH水平。但是只是这一差异仅仅在剂量为0.75 mg/日时为显著性差异。在任何受试剂量时化合物IV处理的动物的FSH水平与未处理动物相比均没有显著性差异。因此,化合物IV在能够引发最大程度刺激肌生长的剂量不抑制FSH水平。

表1 动物分组和实验设计

组号	阉割?	药物	剂量	动物数
1	否	无	无	5
2	是	无	仅载体	5
3	是	睾酮	0.1 mg/日	5
4	是	睾酮	0.3 mg/日	5
5	是	睾酮	0.5 mg/日	5
6	是	睾酮	0.75 mg/日	5
7	是	睾酮	1.0 mg/日	5
8	是	R-III	1.0 mg/日	5
9	是	S-III	0.1 mg/日	5
10	是	S-III	0.3 mg/日	5

11	是	S-III	0.5 mg/日	5
12	是	S-III	0.75 mg/日	5
13	是	S-III	1.0 mg/日	5
14	是	S-VI	0.1 mg/日	5
15	是	S-VI	0.3 mg/日	5
16	是	S-VI	0.5 mg/日	5
17	是	S-VI	0.75 mg/日	5
18	是	S-VI	1.0 mg/日	5
19	是	S-VII	0.1 mg/日	5
20	是	S-VII	0.3 mg/日	5
21	是	S-VII	0.5 mg/日	5
22	是	S-VII	0.75 mg/日	5
23	是	S-VII	1.0 mg/日	5
24	是	S-IV	0.1 mg/日	5
25	是	S-IV	0.3 mg/日	5
26	是	S-IV	0.5 mg/日	5
27	是	S-IV	0.75 mg/日	5
28	是	S-IV	1.0 mg/日	5
29	是	无	仅载体	5

实施例 3

化合物 IV 在狗中的药代动力学

表征新的选择性雄激素受体调节剂(SARM) S-化合物 IV 在比格犬中的药代动力学。在该研究中使用四次给药、四个时间段的交叉设计,共包括 6 只比格犬,每种性别三只。每只动物以随机指定的顺序接受 3 mg/kg IV 剂量、10 mg/kg IV 剂量、10 mg/kg 口服溶液剂量和 10 mg/kg 口服胶囊剂量。每次给药之间有一个星期的清除期。给药后

收集直至 72 小时的血浆样品。用经验证的 HPLC 方法分析化合物 IV 的血浆浓度。使用非房室方法确定清除率(CL)、分布容积(V_{ss})、半衰期(T_{1/2})以及其它药代动力学参数。结果表明化合物 IV 给药后化合物 IV 从狗血浆中清除的终末 T_{1/2} 为约 4 小时, CL 为 4.4 mL/min/kg, 图 4、5 和 6 分别显示给予静脉内溶液、口服溶液、口服胶囊后化合物 IV 的血浆浓度-时间曲线。药代动力学是剂量和性别依赖性的。不同剂型的化合物 IV 的口服生物利用度不同, 溶液剂平均为 38%, 胶囊剂平均为 19%。因此, 表明化合物 IV 在比格犬中具有中等的半衰期、慢的清除以及中等的生物利用度, 确定其是一类新的口服可利用的组织选择性雄激素受体调节剂中的第一个。

实施例 4

化合物 IV 的 HPLC 分析

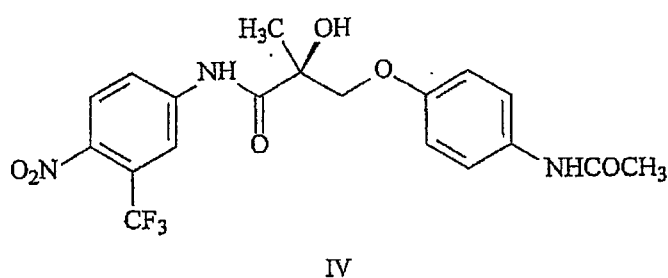
建立反相高压液相色谱(HPLC)测定法定量测定狗血浆中化合物 IV 的浓度。经静脉穿刺获得狗血浆样品, 在 1000 g 下离心 15 分钟。将样品于 -20℃ 下冷冻储存直至分析。将单个样品迅速冻融, 向等分试样(0.5 ml)中加入内标(20 μl 200 g/ml CM-II-87 水溶液)。向样品中加入等分 1 ml 乙腈以沉淀血浆蛋白。将样品涡旋混合, 然后在 1000 g 下离心 15 分钟。将上清液滗出至玻璃萃取管中, 加入 7.5 ml 乙酸乙酯。将萃取混合物在室温下放置 20 分钟, 其间涡旋混合几次。然后将样品在 1000 g 下离心 10 分钟, 移去有机相并置于圆锥底玻璃管中。在氮气下蒸发有机相。将样品在 200 μl 流动相(35:65 乙腈:水)中复制并转移至自动进样小瓶中供 HPLC 注射(Waters 717 plus 自动进样器, Waters Corp., Milford, MA)。等梯度流动相为 35% (v/v)乙腈水溶液, 泵流速为 1 ml/min (510 型, Waters Corp.)。固定相为 C18 反相柱 (Novapak C18, 3.9 x 150 mm)。用 UV 检测器(486 型吸收检测器, Waters Corp.)在 270 nm 处监测分析物。化合物 IV 和 CM-II-87 的保留

时间分别为 11.1 和 16.9 分钟。收集色谱数据，并用 Millennium 软件分析。化合物 IV 在每个样品中的血浆浓度通过与校正曲线对比来确定。通过向狗血浆中加入已知量的化合物 IV 建立校正曲线。在校正曲线中使用的狗血浆样品中化合物 IV 的终浓度为 0.08、0.2、0.4、2、4、10 和 20 $\mu\text{g/ml}$ 。校正曲线在这一浓度范围内是线性的，相关系数 (r^2) 为 0.9935 或更高。标准品的日内差和日间差从 0.08 $\mu\text{g/ml}$ 的 6.4% 至 20 $\mu\text{g/ml}$ 的 7.9%。

在 Thomas-Hoover 毛细管熔点仪上测定熔点，测量结果未经校正。用 Perkin Elmer System 2000 FT-IR 记录红外谱。用 Autopol[®] III Automatic Polarimeter (Rudolph Research Model III-589-10, Fairfield, New Jersey) 测量旋光性。用 Bruker AX 300 波谱仪(对于 ^1H 和 ^{13}C 分别为 300 和 75 MHz) 获得质子和碳 13 核磁共振谱。化学位移值报告为相对于四甲基硅烷(TMS)的每百万分部分(δ)。谱数据与归属结构一致。在 Bruker-HP Esquire LC System 测定质谱。元素分析由 Atlantic Microlab Inc. (Norcross, GA) 进行，实测值在理论值的 0.4 % 范围内。在铝板硅胶(硅胶 60 F 254, 20 x 20 cm, Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, WI) 上进行常规薄层色谱(TLC)。在硅胶(Merck, 等级 60, 230-400 筛, 60) 上进行闪蒸色谱。通过用金属钠蒸馏干燥四氢呋喃(THF)。通过用 P_2O_5 蒸馏干燥乙腈(MeCN)和二氯甲烷(CH_2Cl_2)。

实施例 5

化合物 IV 在大鼠和狗中的代谢



目的:

化合物 IV 是一种有潜能且有效的选择性雄激素受体调节剂 (SARM)。这些研究评价化合物 IV 在大鼠和狗尿液和粪便中的代谢物的特征。

方法:

代谢研究: 大鼠接受 300 mg/kg 口服剂量的化合物 IV, 而比格犬接受 100 mg/kg 静脉内(IV)剂量的化合物 IV。给药前和给药后 8 小时和 24 小时收集尿液和粪便。将每 6 g 粪便样品在 10 mL 水中匀浆。将所有的样品储存于-20℃下直至分析。用 LC/MS/MS 分析样品以确定代谢物结构。

放射性终末处置研究: 使用 C-14 标记的化合物 IV 在大鼠中进行单独研究以定量静脉内给药后化合物 IV 的总体整个处置和质量平衡。将导管植入 Sprague-Dawley 大鼠的颈静脉内, 允许动物恢复 24 小时。然后将动物置于塑料 Nalgene®代谢笼中。将适宜量的^[14C]化合物 IV 溶于乙醇中, 并用 PEG 300 稀释。乙醇在给药溶液中的终浓度低于 5%。经颈静脉插管在 5 分钟内一次性静脉给予 100 μCi [14C]化合物 IV。给药前和给药后 8、24 和 48 小时收集粪便和尿液。给药后 24 小时和 48 小时处死动物, 采集肝脏、脾、心脏、肾、肠(小肠和大肠)、肛提肌、胰腺、胃壁、腹部脂肪和前列腺。

样品的制备和 LC/MS 测定法: 用液液萃取法制备血浆和粪便样品。将器官样品称重并用手术刀切碎。将每种器官样品等分试样置于 1 mL ScintiGest®组织增溶剂(Fisher Scientific Company, Fair Lawn, NJ)中并用 Pro 200 匀浆器(Pro Scientific, Monroe, CT)匀浆。将样品在 60℃下温育直至组织溶解。使用 Beckman LS6000 IC 液体闪烁计(Beckman-Coulter, Fullerton, CA)测定组织、尿和粪便样品的总放射性。还使用反相柱分离放射性尿样品和粪便样品以鉴定母体药物和代谢物的部分。每隔 2 分钟从 HPLC 收集洗脱的部分, 并如上所述进行

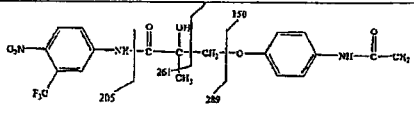
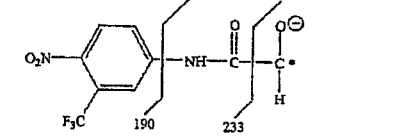
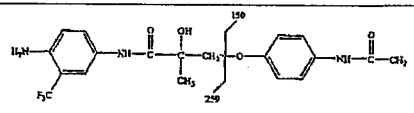
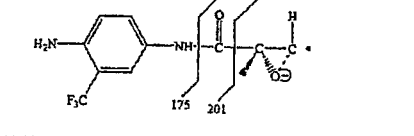
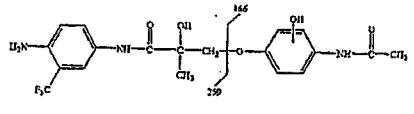
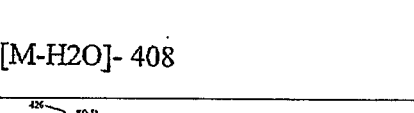
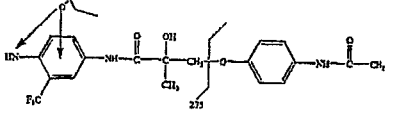
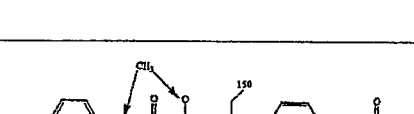
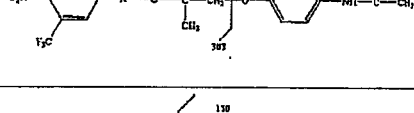
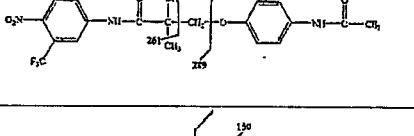
计数。将非放射性尿样品和粪便样品过滤并用 LC/MS 分析。LC/MS 系统由 Surveyor MS 泵、Surveyor 自动进样器和 LCQ Deca MS (Thermo-Finnigan, San Jose, CA)组成。使用空白粪便样品和尿样品以从给处理样品中去除背景谱,以鉴定药物相关峰。使用代谢物 ID 软件通过比较代谢物与真正化合物 IV 的 MS 和 MS2 鉴定代谢物峰。

结果:

化合物 IV 及其胺代谢物的 MS2 谱: 化合物 IV (m/z 440)的碎裂产生三种主要的子离子(m/z 150、261 和 289) (图 10A)。通过将化合物 IV 的碎裂方式与它的胺代谢物(m/z 410)的碎裂方式进行比较鉴定代谢转化位点(图 10B)。此外,获得每个代谢物和化合物 IV 的主要子离子的 MS3 谱以进一步证实结构(未显示)。

大鼠和狗中化合物 IV 的推断的碎裂方式及代谢物: 使用代谢物峰的 LC/MS 和 LC/MS2 碎裂来确定代谢物结构。将代谢物与母体化合物的碎裂方式进行比较以确定代谢修饰的位点。结果见表 2。每行中的最后结构表示通过 LC/MS2 碎裂收集的结构信息。

表 2

分子离子 [M-H]-	产生离子 (m/z 值)	归属结构和推断的碎裂方式
440 (化合物 IV)	150、205、261、289	
子离子 261	190、218、233	
410	150、259、308、380	
子离子 259	175、201、209	
426	166、220、259、324、 336、365、396、408	 [M-H2O]- 408
506	225、275、366、406、 426	
子离子 426	275	
454	150、303	
440 (化合物 IV)	150、205、261、289	
424 (化合物 IV-O)	150、245、273	
子离子 245	183、202	

368 子离子 259	108、175、201、231、 259 175、201、209	
426 子离子 245 子离子 216	150、245、275、405 159 161、216、275 160、186	

放射性末端处置

24 小时大鼠尿样品和粪便样品的放射图

A. 尿(图 11A): 在 5 分钟和 47 分钟处可见两个主峰。5 分钟处的峰(水解产物)相应 25%的注射剂量, 而 47 分钟处的较小峰(胺代谢物)相应 11%的注射剂量。

B. 粪便(图 11B): 在 43 分钟和 51 分钟处可见两个主峰, 在 7 分钟、15 分钟和 27 分钟处可见三个小峰。51 分钟处的峰(母体化合物)相应 18.5%的注射剂量。三个小峰(II 相代谢物)相应 0.8%的注射剂量。

在狗和大鼠中推断的代谢曲线: 化合物 IV 的主要代谢物是在大鼠尿中发现的水解产物。N-脱乙酰基代谢物(m/z 368)是狗特有的代谢物。所有的 II 相代谢物均在粪便中发现。化合物 IV 的代谢曲线归纳于图 12 中。

结论:

化合物 IV 是在选择性雄激素受体调节剂(SARM)的体外筛选中鉴定出的几个新的非甾族雄激素中的第一个。表明化合物 IV 具有线性药代动力学和剂量依赖性的口服生物利用度。这些研究中的数据表明化合物 IV 被广泛地代谢,在大鼠和狗的尿中只发现不到 1%的原型母体药物。尿和粪便中的代谢物的特征表明化合物 IV 由 I 相和 II 相代谢酶代谢。

化合物 IV 的代谢和最终处置研究表明:

1. 尿和粪便中的代谢物含有作为酰胺键断裂形成的水解产物的主要代谢物。

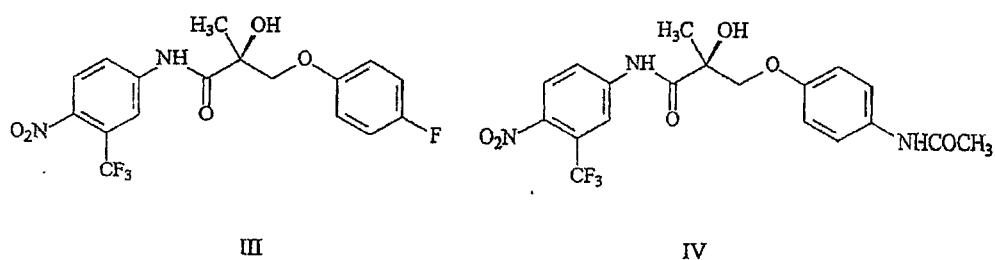
2. 注射的剂量中大部分以母体化合物存在于粪便中。这可能是由于母体化合物或其葡糖醛酸代谢物的胆汁排泄。

3. 已表明狗尿中存在的 N-脱乙酰基代谢物在体外转录激活研究中是雄激素受体拮抗剂。但是,在大鼠放射性处置研究中未发现显著水平的该代谢物。这是因为大鼠具有 N-乙酰基转移酶而狗没有。

总之,化合物 IV 的代谢与比卡鲁胺大不相同。在大鼠和狗中化合物 IV 的硝基-还原产物被鉴定为是主要的代谢物。尽管在狗中发现的化合物 IV 的 N-脱乙酰基代谢物没有在大鼠中鉴定出来,但是显示大鼠和狗具有相似的代谢曲线。体外研究显示该 N-脱乙酰产物是雄激素拮抗剂。

实施例 6

使用人肝微粒体的选择性雄激素受体调节剂(SARM)化合物 III 和 IV 的 I 相代谢研究



目的:

化合物 III 和 IV 是有潜力且有效的选择性雄激素受体调节剂 (SARM)。该体外研究的目的是使用汇集的人肝微粒体(HLM)和重组 CYP 鉴定化合物 III 和 IV 的主要 I 相代谢物以及参与化合物 III 和 IV 的 I 相代谢的细胞色素 P450。

方法:

化合物 III 和化合物 IV 被人重组 CYP Supersomes[®]的体外代谢: 人重组 CYP Supersomes[®]购自 BD Gentest (Woburn, MA)。将所有样品在 37°C 下冻融, 将 40 皮摩尔酶与 2 μ M 化合物 IV 在反应缓冲液中在 37°C 下一起温育 2 小时, 一式两份。以同样方法制备对照样品, 只是不加入酶制备物。加入含有用于 HPLC 分析的内标的冰冷乙腈(1:1, v:v)终止反应。用 HPLC 测量每份温育物(incubate)中化合物 III 和 IV 的浓度。化合物 III 和 IV 均是利用在 230 nm 处它们的 UV 吸光度检测。

由 HLM 鉴定化合物 III 和 IV 的体外代谢物: 将人肝微粒体与 2 μ M 化合物 III 或化合物 IV 在 37°C 下在 100 mM 磷酸盐缓冲液(pH 7.5)和 1 mM NADPH 中一起温育 2 小时。加入冰冷乙腈(1:1, v:v)终止反应。蛋白沉淀后, 用 LC-MS 分析上清液以鉴定温育物中的主要代谢物。

使用 HLM 和人重组 CYP 测量 M1 形成动力学参数: 将 HLM (0.2 mg/ml)或重组 CYP (每个反应 10 皮摩尔)与 NADPH (1 mM)和化合物 IV (0.2 μ M-150 μ M)一起温育。将温育物在 37°C 下保持 10 分钟, 加入

含有用于 HPLC 分析的内标的冰冷乙腈(1:1, v:v)终止反应。用 HPLC 测量每份温育物中的 M1 浓度。根据 M1 的出现计算起始反应速度, 并对起始底物浓度作图。还包括了标准底物非那西汀、双氯芬酸、美芬妥因、丁呋洛尔和睾酮分别测试 CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 和 CYP3A4 的活性。使用 WinNonlin (4.0 版本, Pharsight Corporation, Mountain View, CA)和 S 型 Emax 模型经非线性回归分析确定动力学参数 K_m 和 V_{max} 。

结果:

化合物 IV 被人重组 CYP Supersomes[®]的体外代谢(n=2): 将化合物 IV (2 μM)与人重组 CYP Supersomes[®] (40 皮摩尔)在 37°C 下一起温育 2 小时。测量化合物 IV 的消失。如图 13 所示, 温育后, 大于 95% 的化合物 IV 被人 CYP3A4 代谢。

化合物 IV 被人重组 CYP Supersomes[®]的体外代谢(n=2): 将化合物 III (2 μM)与人重组 CYP Supersomes[®] (40 皮摩尔)在 37°C 下一起温育 2 小时。测量化合物 III 的消失。如图 14 所示, 温育后, 20% 的化合物 IV 被人 CYP3A4 代谢。

化合物 IV 在 HLM 中的体外代谢: 如图 15 所示, 化合物 IV 的主要 I 相代谢包括氨基脱乙酰(M1)、酰胺键水解和氧化。

化合物 III 在 HLM 中的体外代谢: 如图 16 所示, 化合物 III 的主要体外代谢途径是氧化。

经 CYP 化合物 IV 体外代谢为 M1: 一式三份测量 M1 的出现。CYP3A4 的动力学参数为: 化合物 IV (0.2 μM -100 μM)与 CYP 一起温育后测定 K_m (1.65 μM)和 V_{max} (19.7 纳摩尔/(皮摩尔 CYP*min))。较低浓度的化合物 IV 与 CYP2C19、CYP2D6 和 CYP1A2 一起温育时未检测到 M1。在测试浓度下, 化合物 IV 与 CYP2C9 一起温育后没有 M1 形成。结果见图 17。

经 HLM (0.2 mg/ml)化合物 IV 体外代谢为 M1: 一式三份测量

M1 的出现。化合物 IV (0.2 μM -150 μM)与 HLM 一起温育后测定动力学参数 K_m (58.4 μM)和 V_{max} (348.6 皮摩尔/(mg 蛋白质*min))。结果见图 18。

结论:

细胞色素 P450 介导的氧化是化合物 III 在 HLM 中的主要代谢途径。

CYP3A4 介导的脱乙酰是化合物 IV 在 HLM 中的主要代谢途径。也发生氧化和水解, 但程度较低。

化合物 IV 与重组 CYP3A4 的表观 K_m 为 1.65 μM , 大大低于在 HLM 中 M1 形成的表观 K_m (58.4 μM , 图 18)。这可能是由于 CYP 2C19、2D6 和 1A2 的存在, 其使较高浓度的化合物 IV 形成 M1。

CYP3A4 看起来是使得临床相关浓度下化合物 IV 代谢的主要 I 相酶。

总之, 化合物 III 和 IV 是显示出具有组织选择性促雄性作用和合成代谢作用的非甾族 SARM (JPET 304(3): 1334-1340, 2003)。用人肝微粒体进行的初步体外 I 相代谢研究表明化合物 III (2 μM)和化合物 IV (2 μM)主要由 CYP3A4 代谢。

实施例 7

选择性雄激素受体调节剂(SARM)在人、大鼠和狗中的代谢

材料与方法

材料

化合物 S4 和 M1 以及 ^{14}C -S4 在我们实验室合成。重组人 CYP 酶(Supersome®)、汇集的人、大鼠和狗肝微粒体、胞质以及 S9 制备物购自 BD Gentest (Wobum, MA)。4'-羟基-双氯芬酸、4'-羟基-美芬妥因、美芬妥因、1'-羟基-丁呋洛尔和丁呋洛尔也购自 BD Gentest。EcoLite™(+)闪烁混合物购自 ICN Research Products Division (Costa

Mesa, CA)。所有的其它化学药品和试剂均购自 Sigma Chemical Company (St Louis, MO)。所有的分析柱均购自 Waters Corporation (Milford, MA)。NHS-生物素购自 PIERCE (Rockford, IL)。

体外代谢反应

根据 BD Gentest 提供的说明书进行体外酶反应。所有的 I 相反应均在 37°C 和 1 mM NADPH (还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸)存在下在 100 mM 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)中进行不同的时间。对于肝微粒体、胞质或肝脏 S9 制备物, 反应中使用的总蛋白浓度为 2 mg/ml, 重组 CYP 酶的终浓度为 200 皮摩尔/ml。一般而言, 代谢物鉴定的温育时间为 2 小时, 而测定酶动力学参数的温育时间为 10 分钟。使用 WinNonlin (4.0 版本, Pharsight Corporation, Mountain View, CA)和 S 型 Emax 模型经非线性回归分析测定动力学参数 K_m 和 V_{max} 。加入含有用于 HPLC 分析的内标(S4 结构类似物 CM-II-87)的冰冷乙腈(1:1, v:v)终止反应。离心使反应混合物中的蛋白沉淀(> 16000 g, 30 分钟, 4°C), 上清液用适当的流动相稀释或直接用于 HPLC 分析。S4 在反相柱(Symmetry® C8, 3.9 x 150 mm)上分离, 流动相为于去离子水中的 45%乙腈和 50 mM 磷酸盐缓冲液(pH 4.8), 流速 1.0 ml/min., 以在 230 nm 处的 UV 吸光度检测。

S4 的 I 相代谢物的鉴定

将 14C-S4 (2 μ M)与人、大鼠或狗肝脏制备物在 37°C 下温育 2 小时。用乙腈(1:1, v:v)沉淀蛋白后, 在氮气下蒸发留在上清液中的有机相, 将所得浓缩样品用于 HPLC 分析。14C-S4 及其代谢物用反相柱(NovaPak C18, 3.0 x 300 mm)分离, 流动相为于去离子水中的乙腈, 流速为 1 ml/min。起始流动相含有 0%乙腈, 该组成保持 3 分钟。接着的 7 分钟内乙腈的百分比线性增加至 5%, 在随后的 5 分钟内进一步增加至 30%。接着的 15 分钟内乙腈的百分比再缓慢增加至 35%, 然后再一个 5 分钟内快速增加至 95%。最后, 在最后 5 分钟内乙腈的

百分比降回 0%。从 HPLC 收集洗脱的部分(30 秒钟每部分), 在 EcoLite™(+)闪烁混合物中计数每个部分的总放射性(DPM)。

用非放射性标记的 S4 进行类似的研究。在该情况下, 含有可能代谢物的洗脱部分用负离子电喷雾离子化(ESI-)质谱(ThermoFinnigan LCQ DECA 离子捕获质谱仪器, San Jose, CA)如前所述(Wu 等, 2004)分析。对于 MS 系统, 毛细管加热温度设定为 200°C, 喷雾电压为 3.5 kV, 鞘气和辅助气的流速分别为 60 和 20 ml/min。所有的其它参数均设定为达到 S4 离子化和检测的最佳条件。数据采集由 Xcalibur 软件(Revision B, ThermoQuest Corp., San Jose, CA)控制。对于 MS2 分析, S4 或代谢物离子用 1.5 m/z 的宽度分离, 并使用碎裂能量范围为 15-50%进行碎裂。

水解代谢物的生物素化

如上所述, 收集梯度洗脱的开始 3 分钟的 HPLC 洗脱液并在氮气下浓缩。将 NHS-生物素溶于 DMSO 中, 加至浓缩的 HPLC 洗脱液(1:10/v:v)中至终浓度为 20 mM。生物素化反应在室温下进行 1 小时。然后将反应混合物离心, 并使用如上所述相同的条件将上清液进行 HPLC 分析。

雄激素受体结合测定

用从阉割的雄性 Sprague-Dawley 大鼠(约 250 g)的前列腺腹叶制备的胞质 AR 测定脱乙酰基代谢物 M1 的结合亲和力, 如以前所述测定(Mukherjee 等, 1996)。

转录激活测定

用共转染系统测试化合物影响 AR 介导的转录激活的能力, 如以前所述测定(Yin 等, 2003b)。在从 0.1 至 1000 nM 的多个浓度下测量 M1 的转录激活, 并报告为用 0.1 nM DHT 观察到的转录激活的百分比。

结果

S4 的 I 相代谢物的鉴定

将 ^{14}C -S4 (2 μM)与肝脏 S9 在 37°C 下一起温育 2 小时, ^{14}C -代谢物用 HPLC 分离。该浓度根据药理学相关剂量下的 S4 的肝脏浓度进行选择, S4 的肝脏浓度由大鼠全身放射自显影来确定(数据未显示)。使用非放射性标记的 S4 重复类似实验,收集与 ^{14}C -代谢物相应的部分并进行 MS 分析。

鉴定出四条主要的代谢途径(图 19A): 1) B 环乙酰胺基团的脱乙酰; 2) 酰胺键的水解; 3) A 环硝基的还原; 和 4) B 芳环的氧化。与鉴定出的代谢物相应的放射色谱显示在图 19B 中。MS2 谱和 S4 及其代谢物的推断的碎裂方式见图 20、21 和 23。

脱乙酰产物 M1、水解产物 M2、M2-OH 和 M3 以及还原产物 M4 是 S4 在肝脏 S9 中主要的体外代谢物。S4 和 M1 的碎裂方式非常相似(图 20), 只是由于 B 环的乙酰胺基团的脱乙酰, M1 的 MS2 谱中没有 150 m/z 处的碎片离子。M4 和 M5 也都观察到了相似的碎裂方式。

除了这些主要代谢物之外, 还观察到相应的氧化产物 S4-OH、M1-OH 和 M4-OH。如图 19A 和图 21A-C 所示, 鉴定出多种 S4 的氧化产物, 其可能是由于 B 环上的羟基化位置的不同而产生的。未观察到 S4 的 A 环羟基化产物。但是, 不象 S4, M1 和 M4 的氧化只在 A 环中观察到而没有在 B 环中观察到的。M1-OH 和 M4-OH 的碎裂方式也有很大的变化, 如图 21D 和 E 所示。此外, 经 HPLC 分离观察到两种不同的 M1 氧化产物(图 19B)。但是, 两种产物具有相同的碎裂方式, 如图 21D 所示。

在所有鉴定出的代谢物中, 水解产物由于羧基的存在是最亲水的, 水解产物大部分随溶剂前沿一起洗脱出来(图 19B)。特别是 M3 在 B 环上含有氨基, 这类似氨基酸的结构, 使该代谢物的分析更困难。为使该分子的分离和检测更容易, 我们收集并浓缩了相应的

HPLC 洗脱液, 并对芳族胺基进行了修饰。NHS-生物素是常用的标记蛋白的试剂, 其特异性修饰伯胺基团(图 22A)。B 环胺基的生物素化大大地促进了含有芳族胺基的水解产物的 HPLC 分离, 如图 22B 的色谱图所示。另一方面, 具有于 B 环上的完整乙酰胺基团的水解产物 M3 没有被修饰, 并仍与溶剂前沿一起洗脱出来。M3、M3-OH 和 M2 的生物素化代谢物的 MS2 碎裂方式见图 23。

虽然 M3 不能被修饰, 但酸性条件可能降低羧基的离子化并增加其在柱上的保留时间, 而具有胺基的水解产物将被高度离子化并随溶剂前沿一起洗脱出来。收集在中性 pH 下分离(如上所述)的含有 M3 的 HPLC 洗脱物(开始 3 分钟)并在氮气下浓缩。在类似的 HPLC 条件下 pH 4.0 (0.2 % 乙酸)下进一步将 M3 从溶剂前沿中分离出来, 在 15 分钟处洗脱(数据未显示)。

S4 在不同物种中的 I 相代谢的特征

对 S4 在不同物种中的代谢进行表征, 并使用人、大鼠和肝脏 S9 进行比较。所有反应都使用相似的总蛋白浓度(2 mg/ml)。每部分在不同反应混合物中的相对丰度见图 24A, 表示为代谢的 ¹⁴C-S4 的百分比。类似地, 在受试物种中观察到了全部四条代谢途径。主要代谢物 M1 在人、大鼠和狗 S9 中分别占代谢的 S4 的 61%、44%和 58%。但是, 在这三个物种中其它途径的相对贡献却大不相同。

在人 S9 中, 除脱乙酰之外, 其它三条代谢途径对 S4 的代谢贡献非常相似, 水解、还原和氧化分别占代谢的 S4 的 11%、16%和 12%。但是, 与大鼠(7%)和狗(2%)相比, S4 的还原在 S4 代谢中的贡献程度相对较大(16%)。

另一方面, 水解在大鼠 S9 的 S4 代谢中占代谢的 S4 的 27%, 与人和狗 S9 中的 11%和 14%相比发挥了较大作用。更有趣的是, M3 是大鼠 S9 中观察到的唯一水解产物, 而人和狗 S9 的水解产物包含 M2、M3 及它们的氧化产物, 这表明水解在大鼠 S9 中是比脱乙酰和

氧化更快的过程。

此外，S4 和 M1 的氧化占大鼠和狗 S9 代谢的 S4 的 20%以上，但却只占人 S9 代谢的 S4 的 12%。考虑到与大鼠 S9 相比狗 S9 温育物中观察到的氧化水解代谢物更多这一事实，因此氧化在狗 S9 中对 S4 代谢的贡献可能更显著。

总而言之，在三个受试物种中观察到的主要代谢途径是相似的：脱乙酰产物 M1 是 S4 的主要 I 相代谢产物，三个物种中也都观察到了水解、还原和氧化产物。

S4 在不同亚细胞部分中 I 相代谢的特征

进一步表征 S4 在人肝脏制备物的不同亚细胞部分包括汇集的人肝微粒体(HLM)和人肝胞质的温育物中的 I 相代谢。S4 与 HLM 和人肝胞质部分一起温育后的代谢曲线非常不同(图 24B)。由于大部分 I 相酶都位于 HLM 中，在与 HLM 的反应中观察到的代谢曲线与如上所述用人肝脏 S9 观察到的非常相似(图 24A)。但是，在人肝胞质存在下，脱乙酰产物 M1 与 HLM 温育物中观察到的 53%相比不再是观察到的主要代谢物，其只占代谢的 S4 的 16%。相反，还原产物 M4 与 HLM 温育物中观察到的 11%相比，占人肝胞质代谢的 S4 的 50%。这些结果表明 S4 在人肝脏中主要由微粒体酶脱乙酰，而主要由胞质酶还原。

虽然一般认为酰胺键水解反应由胞质部分中存在的酯酶催化，但 S4 的水解对 HLM 的 S4 代谢的贡献与胞质部分的 9%相比，达到更高的程度为 20%。此外，由于脱乙酰反应在微粒体部分更优先，M3 成为人肝胞质温育物中主要的水解产物，而观察到在 HLM 温育物中乙酰基产物(M3)和脱乙酰基水解产物(M2 和 M2-OH)具有相似的量。因此，可合理地推测在微粒体部分中的细胞色素 P450 酶对 S4 的水解可能有贡献。

为进一步鉴定负责 S4 的 I 相代谢的主要 CYP 酶，将五种主要的

人 CYP 酶包括 CYP 1A2、2C9、2C19、2D6 和 3A4 与 S4 (2 μM) 在 37°C 下一起温育 2 小时后通过测试 S4 的消失对上述酶进行测试。在五种受试酶中, CYP3A4 被鉴定为负责在 2 μM 下 S4 代谢的主要 CYP 酶(数据未显示)。与 14C-S4 (2 μM) 一起温育时, CYP3A4 对 S4 的代谢曲线和与 HLM 温育后观察到的曲线相似(图 24B)。重组人 CYP3A4 主要催化脱乙酰、水解和氧化反应, 分别占代谢的 S4 的 43%、30% 和 24%。

经重组人 CYP3A4 的 S4 代谢动力学

测定 S4 的消失作为估计 CYP3A4 的酶动力学参数的初步量度(图 24)。显示 S4 (16.1 μM) 与 CYP3A4 的亲合力和睾酮(13 μM) 与 CYP3A4 的相似, 但与睾酮(7.6 皮摩尔/(皮摩尔*min)) 相比, V_{max} 较低(1.6 皮摩尔/(皮摩尔*min)), 数据未显示。

M1 作为 S4 活性代谢物的特征

S4 脱乙酰产物 M1 保持了药效团的核心结构, 这提示它也可能与 AR 相互作用并作为活性代谢物。体外受体结合测定研究表明与 S4 (K_i , 4.0 nM) 相比 M1 与 AR 以相对较低的亲合力结合(K_i , 24.6 nM) (图 25)。此外, 它在体外转录激活测定中表现为部分激动剂(图 26), 在 1 μM 时, 与 0.1 nM DHT 相比, 相对激动活性为 42%。这些结果表明 M1 也可能在体内激活 AR, 并且可能对 S4 的体内药理学活性有贡献。

实施例 8

丙酰胺选择性雄激素受体调节剂(SARM)的代谢

材料与方法

化学药品和试剂

根据以前描述的方法(Marhefka 等, 2004)合成 S-1,3-(4-氟苯氧基)-2-羟基-2-甲基-N-[4-硝基-3-(三氟甲基)苯基]-丙酰胺。利用这些方

法还获得两个内标 S-1 的 4-氯类似物和 4-溴类似物。利用相似的方法合成 3-(4-氟苯氧基)-2-羟基-2-甲基-丙酸。使用元素分析、质谱和质子核磁共振确认化学纯度。HPLC 级乙腈、水和乙酸购自 Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ)。聚乙二醇-300 (PEG-300)和二甲亚砜 (DMSO)从 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO)获得。乙醇购自 Pharmaco Products Inc. (Brookfield, CT)。

动物和方法

雄性 Sprague-Dawley 大鼠从 Harlan Bioscience (Indianapolis, IN) 获得, 体重约为 250 g, 根据俄亥俄州立大学的 Institutional Laboratory Animal Care and Use Committee 批准的动物实验方案饲养。动物保持在 12 小时光照/黑暗周期下, 自由获得食物和水。给药前 20 小时, 向每只大鼠的右侧颈静脉植入插管, 取出血液(Harlan Teklad 22/5 啮齿动物食谱)。大鼠自由饮水, 给药前即刻称重。给药后 12 小时恢复食物供应。40 只雄性 Sprague-Dawley 大鼠随机分配至给药组, 接受静脉内或口服给予 S-1, 给药剂量水平为 0.1、1、10 或 30 mg/kg。给药溶液在于 PEG-300 (v/v)中的 5% DMSO 中制备, 给药前 12 小时制备, 并在-20℃下储存。静脉内给药后立即用肝素化盐水溶液(100 U/mL, 与给药溶液等体积)冲洗颈静脉插管。经静脉内途径给药后 5、10、20、30、60、120、240、480、720 和 1440 分钟时收集系列血样, 而经管饲法口服给药后 30、60、90、180、240、360、480、720、1440、1800 和 2160 分钟时获得血样。立即离心(800 g 10 分钟 4℃)分离血浆, 并将样品在在-20℃下储存直至分析。口服给药溶液含有于 PEG-300 中的 5% DMSO (v/v)和于 PEG-300 中的 5 或 10%的乙醇溶液, 给药剂量水平为 10 mg/kg, 经静脉内和口服途径给药以检测溶解度或载体对 S-1 口服吸收或清除率的影响。对于代谢曲线, 向雄性 Sprague-Dawley 大鼠(n = 2)静脉内给予 S-1 (50 mg/kg)。用代谢笼每隔 6-12 小时收集尿样品和粪便样品, 共达到 48 小时, 分析前合并以提

供足够体积的尿和代谢物浓度用于分析，并保护免于室温下的降解。所有的尿样品和粪便样品都储存在 -80°C 下直至分析。用于 HPLC 方法的萃取程序：向大鼠血浆(100 μL)等份试样中加入内标(30 μL , S-1 的 4-溴类似物作为 Istd)并与 1 mL 乙腈混合。样品在 16100 g 下离心 10 分钟。移去上清液，在洁净离心管中在氮气下蒸发至干。将残余物在 150 μL HPLC 流动相中复制，在 16100 g 下离心 5 分钟，并向 HPLC 中注入 100 μL 等分试样。

血浆中 S-1 的 HPLC-UV 测量

10 和 30 mg/kg 的静脉内和口服剂量组的血浆浓度用已验证的 HPLC 方法测量。使用 515 型 HPLC 泵(Waters)、717 plus 型自动进样器(Waters)和 486 型吸光度检测器(Waters)进行 HPLC 分析。HPLC 分离的流动相为乙腈/ H_2O (54:46 v/v)，柱为 Waters Nova-pak C18 柱(3.9 x 150 mm, 4 μm) (Milford, MA)，流速为 1 mL/min，检测波长设定为 297 nm。分析数据由 Millennium 软件(Waters Corporation, Milford, MA)采集。HPLC 分析的定量限为 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在 0.05–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内建立标准校正曲线。日内和日间精密度在变异系数为 1.8-18.2%范围内，准确度为标示浓度的 90.0-92.4%。S-1 在大鼠血浆中的相对回收率为 90.5-97.5%。

用于 LC/MS 测定的萃取方法

向大鼠血浆(100 μL)等分试样中加入内标(Istd) (30 μL , S-1 的 4-氯类似物用作 Istd)并与 1 mL 乙腈混合。将样品在 16100 g 下离心 10 分钟。移去上清液，并与 1 mL 水混合，然后在 13 mL 萃取试管中用乙酸乙酯(7.5 mL)萃取。将样品在室温下振摇 10 分钟，然后在 1540 g 下离心 10 分钟。移去有机上清液，在洁净试管中在氮气下蒸发至干。将残余物在 150 μL 起始流动相中复制，在 16100 g 下离心 5 分钟，并将 100 μL 等分试样注入 LC/MS 中。

血浆中 S-1 的 LC/MS 测量

1.0 和 0.1 mg/kg 的静脉内和口服剂量组的血浆浓度用已验证的 HPLC 方法测量。LC/MS (Agilent 1100 series, Palo Alto, CA)分析使用 ESI 源和以下条件进行：干燥气流速 12 L/min；喷雾器压力 45 psi；干燥气温度 350℃；毛细管电压 1500 v；碎裂电压 180 v。所有其它的 LC/MS 参数设定为默认值。使用负离子模式的单离子监测(SIM)在 m/z 401.10 和 417.10 处分别检测 S-1 和内标。将单个样品注射至整体柱(SpeedRod RP 18e, 4.6 x 50 mm, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)上，分析期间保持 25℃。用含有乙腈(A)和 0.1%乙酸水溶液(B)的梯度流动相将感兴趣的化合物从干扰物中分离出来，流速为 1 mL/min。每次色谱运行的开始 5 分钟的流动相含有 50:50 的组分 A 和 B 的混合物，从 5.1 至 7.5 分钟以线性梯度增加至 100% B，然后在 7.6 分钟时回至 50% B。柱与起始流动相的平衡时间为 1.5 分钟。分析数据由 ChemStation 软件采集。LC/MS 分析的定量限为 0.3 ng/mL。在 0.3-30 ng/mL 范围建立标准校正曲线。日内和日间精密度在变异系数为 0.4-12.4 %范围内，准确度为标示浓度的 87.1-104.8%。S-1 在大鼠血浆中的相对回收率为 99.4-105.7%。

药代动力学数据分析

用 WinNonlin 4.0 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA)经非房室分析法分析血浆浓度-时间数据。用梯形法则外推至无穷大来计算从 0 到无穷大的血浆浓度-时间曲线下面积(AUC_{0-∞})。按照 $0.693/\lambda_z$ 计算终末半衰期($t_{1/2}$)，其中 λ_z 是终末相消除常数。血浆清除率(CL)按照 $CL = \text{剂量 i.v.}/AUC_{i.v., 0-\infty}$ 计算，其中剂量 i.v.和 $AUC_{i.v., 0-\infty}$ 分别是静脉内剂量和相应的从零至无穷大的曲线下面积。口服剂量组的最高血浆浓度(C_{max})和最高血浆浓度发生时的时间(T_{max})通过对血浆浓度-时间曲线的目测获得。稳态表观分布容积(V_{dss})的计算为 $V_{dss} = CL \cdot MRT$ ，其中 MRT 是静脉内一次剂量给药后的平均保留时间。MRT 的计算为 $MRT = (AUMC_{i.v., 0-\infty})/(AUC_{i.v., 0-\infty})$ ，其中

AUMCi.v., 0-∞是血浆浓度-时间曲线的第一时刻外推至无穷大的曲线下面积。每个剂量的口服生物利用度(F)用 $F = (\text{AUC}_{\text{p.o.}} \times \text{剂量 i.v.}) / (\text{AUC}_{\text{i.v.}} \times \text{剂量 p.o.})$ 来计算, 其中剂量 p.o.、剂量 i.v.、AUCi.v. 和 AUCp.o. 分别是每个剂量的平均口服剂量、平均静脉内剂量和相应的从零至无穷大的平均曲线下面积。

统计学分析

用单因素方差分析(ANOVA)进行统计学分析。p < 0.05 被认为是具有统计学显著性差异。

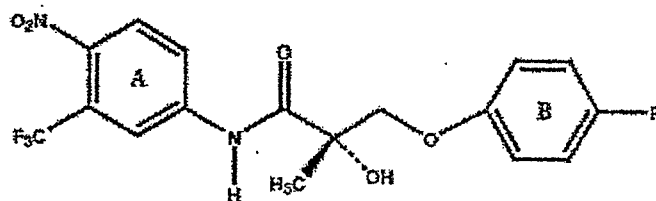
代谢物的鉴定

将尿样品冻融, 并用体积五倍于尿样品的乙酸乙酯萃取。萃取程序重复两次, 将合并的有机相和合并的水相在 35°C 下于旋转蒸发仪上蒸发。将粪便样品冻融, 并用 30 mL 甲醇萃取。将甲醇部分在 1540 g 下离心 10 分钟, 并将上清液在氮气下蒸发至干。将残余物溶于 3 mL 甲醇/H₂O (50:50)中, 用 7.5 mL 乙酸乙酯萃取。萃取程序重复两次。将合并的有机相和合并的水相在氮气下蒸发至干。将来自有机相和水相的残余物分别使用 ACN:H₂O (50:50)和 ACN:H₂O (10:90)溶解。将每个溶液滤过 Acrodisc 注射器滤器(0.2 μm, 13 mm; Pall Corporation, East Hills, NY)。将每部分的 20 微升直接注入使用负离子电喷雾离子化模式的 Thermo Finnigan LCQDECA 四极离子捕获质谱仪(Thermo Electron, Franklin, MA)中。HPLC 分离在具有 XTerra 保护柱(2.1 x 150 mm, 3.5 μm)的 Waters XTerra C18 柱(2.1 x 150 mm, 3.5 μm)上进行, 流速 0.2 mL/min, 梯度流动相由乙腈(A)和水(B)组成, 流速为 1 mL/min。对于每次色谱运行的开始 10 分钟的流动相由 90:10 的组分 A 和 B 的混合物组成, 从 10 至 60 分钟以线性梯度增加至 60% B, 然后从 60 至 65 分钟进一步增加至 95% B 并保持 10 分钟, 最后在 76 分钟时回到 10% B。柱用起始流动相平衡 10 分钟。在一些情况下使用包含于 A 和 B 中的 0.1%乙酸的流动相系统。两种流动相系统都使用相

同的梯度程序。毛细管加热器设定在 180 或 225℃，喷雾电压为 3.6 kV。全程扫描分析的程序设定为从 m/z 100 至 900 每秒扫描。

结果

在雄性 Sprague-Dawley 大鼠中评价具有如下结构的 S-1 的药代动力学：



。静脉内和口服给予 S-1 后的血浆浓度-时间曲线见图 27。静脉内给予 S-1 后血浆浓度以多指数方式下降。静脉内给予剂量水平 0.1、1、10 和 30 mg/kg 的 S-1 的全身清除率(CL)分别为 5.2、4.4、4.0 和 3.6 mL/min/kg。虽然较高剂量有较低 CL 值的趋势，但是统计学分析揭示四个剂量水平 CL 值没有显著性差异，这表明 S-1 的 CL 在研究的剂量范围(即 0.1-30 mg/kg)内没有剂量依赖性。我们实验室以前进行的体内研究表明经皮下渗透泵或每日皮下注射在阉割大鼠中表现出合成代谢作用或在完整对照大鼠中选择性降低前列腺重量的所需剂量分别为低于 25 mg/kg/日。因此，在药理学剂量范围内 S-1 表现为线性药代动力学。经口服途径在相应的剂量水平 0.1、1、10、30 mg/kg S-1 的半衰期($t_{1/2}$)分别为 217、241、248 和 315 分钟。AUC 随剂量成比例升高。S-1 的稳态分布容积(V_{ss})在测试的四个静脉内剂量水平为约 1.5 L/kg，表明 S-1 的分布程度中等。尿排泄数据表明少于 0.4% 的剂量以原型排泄，表明 S-1 的肾清除率可以忽略不计。根据 S-1 的 CL 为 5.2 mL/min/kg 以及大鼠肝血流量为 55.2 mL/min/kg，可知 S-1 的肝脏提取率小于 0.1。这表明口服给药后肝脏首过代谢将不显著地限制对 S-1 的接触。口服给药后 S-1 的 T_{max} 为 4.6-8.5 小时，表明 S-1 吸收缓慢。在相应剂量，口服给药后 S-1 的终末半衰期与静脉内

给予 S-1 后观察到的半衰期相当。S-1 的口服生物利用度为约 60%，且不随剂量变化。

用单因素方差分析(ANOVA)进行统计学分析。 $p < 0.05$ 被认为是具有统计学显著性差异。比较给予载体对 S-1 药代动力学参数的影响，在剂量水平 10 mg/kg 时，使用乙醇代替 DMSO 与 PEG-300 一起使用。血浆浓度对时间曲线见图 28。在给药溶液中使用乙醇没有影响 S-1 的 CL 或 V_{ss} ，但使 T_{max} 从 4.8 降至 1.77 小时，并使生物利用度从 54.9% 增至 95.9%，表明溶解度是影响 S-1 口服吸收的重要因素。

大鼠尿和粪便中 S-1 代谢物的鉴定

进行代谢研究以鉴定 S-1 的主要代谢途径和代谢物，特别是具有化学活性的代谢物，并进一步评价 S-1 的临床潜力。此外，完全的 S-1 代谢曲线将有助于在丙酰胺模板上进行结构修饰以获得更有潜能且代谢更稳定的丙酰胺化合物作为 SARM。S-1 碎裂的质谱见图 28。对在碰撞诱导的解离条件下 S-1 的碎裂途径的推断见图 29。对 S-1 代谢物的鉴定基于对母体化合物的碎裂途径的理解。从大鼠尿和粪便中鉴定出的 S-1 的代谢物在图 30 中列出。在所使用的两个流动相系统下 S-1 都是在 58.39 分钟处被洗脱出来。在以静脉内途径接受 50 mg/kg S-1 的雄性 Sprague-Dawley 大鼠的尿和粪便中共发现 S-1 的 40 种 I 相和 II 相代谢物。从 24-48 小时收集的大鼠尿样品和粪便样品中鉴定的代谢物也在 0-24 小时收集的尿样品和粪便样品中发现。

S-1 的两种主要尿代谢物是源于 S-1 或其代谢物的酰胺水解的羧酸和 4-硝基-3-三氟甲基苯基胺的硫酸缀合物。M1 被证实为 3-(4-氟苯氧基)-2-羟基-2-甲基-丙酸，通过证明其具有与合成标准品相同的色谱行为(即保留时间)和质谱行为(即分子质量和碎裂方式)来证实(图 31)。从 0-24 小时和 24-48 小时收集的尿样品中都观察到了 M1。通常使用四极离子捕获质谱仪(即 LCQDECA)对 m/z 200 附近的离子有碎裂限制。因此，图 28 和 29 中推断的、使用 LCQDECA 通过 MS 或 MS2

模式阐述的单环代谢物的结构需要通过使用用于比较的合成标准品进一步证实或分离和纯化后通过获得 NMR 数据进一步证实。但是，给予 S-1 后经过与从同一大鼠收集的空白尿样品相比较，这些单环代谢物清楚地出现在大鼠尿样品和粪便样品中。根据我们在弱酸存在下对负离子电喷雾电离效率的研究结果(Wu 等, 2004)，单环代谢物比二环代谢物的电离效率低，特别是如果单环代谢物亲脂性更强时。我们比较了可以获得的合成标准品(M1)与母体化合物在相同色谱和质谱条件下的电离效率(数据未显示)，并证实了上述结论。虽然没有标准品使用 LC/MS 不可能定量代谢物，但是根据对色谱分离和电离效率的理解合理地估算相对量。单环代谢物与二环代谢物相比具有相似信号强度，甚至更强的信号强度，这表明它们以显著高的浓度存在。换言之，推论 M1 和 M6 是 S-1 的两个主要代谢物。

来自 A 环硝基还原为芳族胺和 B 环羟基化的 I 相代谢物在大鼠的尿样品和粪便样品中也被鉴定出来。此外还发现来自硫酸化、葡糖醛酸化或甲基化的各种 II 相代谢物。除了以上提及的水解代谢物之外，A 环上的硝基还原和 B 环上羟基化在 S-1 的生物转化中发挥重要作用，因为大部分的二环代谢物都引入硝基还原，包括羟胺中间体，和/或 B 环上的羟基化。总之，S-1 易于三种 I 相代谢途径-酰胺键的水解、A 环上的硝基还原和 B 环上的羟基化。S-1 的 II 相代谢途径包括硫酸化、葡糖醛酸化和甲基化。

S-1 的主要代谢途径概述于图 31 中。还提出了可能涉及 S-1 代谢的酶。S-1 的代谢有三个主要代谢途径-硝基还原、B 环上羟基化和酰胺键水解。酰胺水解速率虽然很慢，但是可以在非特异性血浆酯酶的作用下发生。S-1 的酰胺键更可能被肝脏酰胺酶水解，不过发现酰胺酶在每个组织和生理液体中都广泛表达。P450 也可能负责硝基的还原，但是其它酶(如黄嘌呤氧化酶、微粒体 NADPH-细胞色素 C)也可能涉及。此外，对于口服给予的药物而言，还原可以在小肠厌氧菌的

还原酶的作用下进行。

非甾族抗雄激素比卡鲁胺的结构与 S-1 相似, 氰基代替 A 环上的硝基, 磺酰基代替醚与 B 环连接。比卡鲁胺有两条主要代谢途径: 酰胺键水解和 B 环羟基化。在比卡鲁胺在大鼠中的药代动力学研究中, 剂量水平为 0.5 mg/kg 时, 外消旋比卡鲁胺的半衰期、CL 和 V 分别为 17.7 小时、0.80 mL/min/kg、1.23 L/kg。S-1 与比卡鲁胺具有相似的 V, 但 CL 约高六倍, 半衰期约短五倍。

该现象可能由两种化合物不同的代谢来解释。在大鼠中观察到大量 S-1 的硝基还原代谢物, 表明该途径对该化合物的快速 CL 贡献很大。此外, A 环中硝基取代基的存在可能影响酰胺水解的速率, 并进一步对较快的 S-1 代谢用贡献。比较而言, 比卡鲁胺中存在的磺酰基连接是一个强的吸电子基团, 其可能对 B 环有灭活作用, 并使之不易被氧化, 而比卡鲁胺的 A 环中氰基取代基不易被还原。因此, 比卡鲁胺的半衰期比 S-1 长的多, 分布容积与 S-1 相似。这样, 在 S-1 的体内代谢中 B 环的硝基还原和羟基化可能比水解发挥更为重要的作用。我们在本文中检测了 S-1 在 0-24 小时和 24-48 小时时间期间的代谢曲线。不久将使用放射性标记 S-1 进行酶动力学研究以理解这三种 I 相代谢途径和和相关的 II 相反应如何定量地控制 S-1 的代谢。

含有伯胺的药物通常与特异性药物反应的高发生率有关。芳胺化合物的活性代谢物包括氧化为羟胺, 然后该氧与较好的离去基团(如乙酸酯或硫酸酯)缀合, 通过失去较好的离去基团的缀合物产生氮烯阳离子而导致致癌反应。但是含有在氨基的对位的吸电子基团的伯芳胺以降低的速率形成氮烯阳离子。这些代谢物可能导致经亚硝基代谢物的共价键合。虽然巯基可以与亚硝基代谢物反应形成亚磺酰胺, 但该亚磺酰胺在非常弱的酸性或碱性条件下容易地被水解回胺。芳胺还可能被活化的中性粒细胞氯化形成活性代谢物, 该活性代谢物导致粒细胞缺乏症。

除共价键合之外，芳胺的中间代谢物易受到广泛的氧化还原循环，导致高铁血红蛋白血症和溶血性贫血。芳族硝基药物在形成一些化学活性代谢物的方面与芳胺相似，因为通过硝基的还原作用形成相同的羟胺代谢物和亚硝基代谢物，与芳胺的氧化所形成的代谢物一样。因此，芳族硝基药物也与特异性药物反应的高发生率有关。从图 28 和 29 可见，水解和硝基还原产生的代谢产物(如 M6、13、14、15 等)可以被认为是化学活性代谢物。此外，观察到的 M34 和 M40 导致尿样品中另一种化学活性代谢物的产生。M40 是在体内有可能被氧化为醛然后成为羧酸的二醇。随着羧酸基团和水分子的丢失，可以形成迈克尔受体(m/z 259)，迈克尔受体是一种弱亲电子试剂，其易与巯基反应可能引起不同类型的特异性药物反应。M39 中丢失水分子也可能产生不同类型的迈克尔受体(m/z 289)。由于迈克尔受体是易与巯基反应的弱亲电子试剂，因此在 m/z 452 (M37)处观察到谷胱甘肽捕获得到的稳定产物，该产物是与该迈克尔受体缀合的巯基尿酸。尽管只观察到了巯基尿酸缀合形式，但这些发现证实了迈克尔受体(m/z 289)在体内存在。该迈克尔受体(m/z 289)在肝脏、肾脏、肺和肠中经微粒体混合功能氧化酶系统的 O-脱烷基反应而形成。M37 低的信号强度可能表明该迈克尔受体(m/z 289)及其谷胱甘肽缀合物低的体内浓度，而从酰胺键水解形成的羧酸代谢物在排泄物特别是尿中的水平则很高。

目前为止在 S-1 的临床前代谢研究中鉴定出了三种类型的化学活性代谢物。它们主要是胺、硝基还原代谢物和迈克尔受体。

化合物的理化性质在决定小分子药物的吸收、分布、代谢、排泄和毒性中发挥重要作用。药物的化学结构决定它们的理化性质。S-1 与比卡鲁胺的药代动力学参数、理化性质和结构信息的比较有助于鉴定这两种化合物的代谢差异。作为 SARM 被研究的先导化合物 S-4 是 S-1 的结构类似物，其与 S-1 具有同样的化学基团和骨架，只是 B

环的对位引入的是乙酰氨基而不是氟。S-4 的药代动力学研究表明它与 S-1 相比半衰期较短、分布容积较小、清除速率较低。S-1 的较高的 LogP 值和较低的血浆蛋白结合率可能解释其分布容积高于 S-4。乙酰氨基取代基与氟基团相比较低的电负性可能导致 S-4 的 B 环氧化更快。但是，乙酰氨基取代基在生物转化中的脱乙酰和乙酰化使利用结构信息预测 S-4 的药代动力学变得复杂。

卤素基团通常用于阻断代谢或可能使环系统灭活。卤素原子的类型、数目和位置在调节卤代芳族化合物的物理和生化性质方面特别是代谢方面发挥重要的作用。显然环结构的性质可能也有影响。一般而言，氧化代谢的速率随卤素取代基(电负性 F, 4.0; Cl, 3.0; Br, 2.8; I, 2.5)的电负性降低而降低。此外，由于位阻，当芳环中卤素的数目增加时代谢的速率通常降低。化合物的亲脂性有利于吸收和分布，而相邻未取代的碳原子则有利于代谢并从而利于排泄。C-6 是 S-1 的另一个结构类似物，其在 B 环上的对位和间位分布具有氯和氟基团，并与 S-1 具有相同的化学骨架和其它基团。对 C-6 的药代动力学研究表明其比 S-1 具有较长的半衰期、较小的分布容积以及较低的清除率。C-6 的两个卤素取代基在空间上和电性上阻止代谢的能力可能解释其较低的清除率。令人惊奇的是，LogP (6.171)比 S-1 高的 C-6 显示具有较低的分布容积。C-6 的较高的血浆蛋白结合率可能解释这一观察结果。C-6 的较高 LogP 值可能有助于其更好的吸收和静脉内和口服给药后较高的 AUC。如果取代的丙酰胺具有药理学活性，则预期卤素原子在 B 环上的不同取代(即数目和位置)将进一步更大程度地阻断氧化代谢。

综上所述，动物模型中具有高度效力和潜能、临床前物种中具有可以接受的药代动力学且具有适宜的理化性质的 S-1 是临床开发的有希望的 SARM 候选药物。

实施例 9

SARM 对细胞色素 P450 酶表达的影响

材料与方法

材料

人重组 CYP 酶(Supersomes[®])、肝微粒体制备物、新鲜人肝细胞、Hepato-STIM 培养基和补充剂以及人 CYP 1A2、2C9、2C19、2D6、3A4 的一抗购自 BD Gentest (Woburn, MA)。4'-羟基-双氯芬酸、4'-羟基-美芬妥因、美芬妥因、1'-羟基-丁哌洛尔和丁哌洛尔也购自 BD Gentest。兔抗肌动蛋白 IgG、山羊抗小鼠 IgG 和兔抗山羊 IgG 购自 Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA)。6 β -羟基-睾酮购自 Steraloids Inc. (Newport, RI)。增强化学发光试剂盒购自 Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK)。Trizol[®]试剂和 Superscript[™] First-strand Synthesis System 购自 Invitrogen Corp. (Carlsbad, California)。PCR 引物由 IDT, Inc. (Coralville, IA)合成。SYBR[®]绿色核酸凝胶染料购自 Molecular Probes (Eugene, OR)。SmartCycler[®]添加剂购自 Cepheid (Sunnyvale, CA)。所有其它的化学药品和试剂都购自 Sigma Chemical Company (St Louis, MO)。所有的分析柱都购自 Waters Corporation (Milford, MA)。

HepG2 细胞中的细胞毒性

将 HepG2 细胞铺于 24 孔板中，用溶剂(0.1% DMSO)或不同浓度(1-100 μ M)的 S-1 或 S-4 处理 72 小时。每个浓度包括三个孔。每隔 24 小时换一次培养基。处理结束时，使比色硫罗丹明 B (SRB)测定法测定细胞数目，结果报告为对照样品中观察到的百分比。

人肝细胞的原代培养

将从一个供体(BD Gentest, 批号 54, 供体号 HH129, 女性, 白种人, 49 岁, 死于中风)分离的人肝细胞的原代培养物铺板于 24 或 48 孔板中, 并在分离后 24 小时运送。该培养物在 37 $^{\circ}$ C 下于 Hepato-STIM

培养基中保持。培养基中不含酚红，但添加有表皮生长因子(EGF, 1 mg/100 ml)和地塞米松(0.1 μ M)。

送达后将肝细胞保持在 Hepato-STIM 培养基中保持两天以使之从运送中恢复过来，然后与 S-1 (2 μ M)、S-4 (2 μ M)、利福平(RIF) (10 μ M)、 β -萘黄酮(BNF) (50 μ M)或溶剂(0.1% DMSO)一起培养 72 小时。每种处理包括 15 孔，每一活性测定用三孔。也包括未处理的细胞，作为对照。每天含有药物的溶液用 DMSO 新制，然后用培养基稀释至期望的浓度。每隔 24 小时换一次培养基。

CYP 酶功能测定

在 48 孔板中处理 3 天后，用空白培养基将完整肝细胞洗涤三次，然后与 CYP 酶特异性底物一起在 37 $^{\circ}$ C 下温育 1 小时以测试酶活性，所述 CYP 酶特异性底物包括非那西汀 100 μ M (CYP1A2)、双氯芬酸 100 μ M (CYP2C9)、美芬妥因 100 μ M (CYP2C19)、丁呋洛尔 100 μ M (CYP2D6)和睾酮 200 μ M (CYP3A4)。每一反应使用三孔，在适宜内标存在下用 HPLC 分析评价培养基中代谢物的出现(表 1)。

表 1 人重组 CYP 酶、NAT1 和 NAT2 的特异性底物以及用于 HPLC 分析的内标

酶	底物	代谢物	用于 HPLC 分析的内标
CYP1A2	非那西汀	乙酰氨基苯酚	2-乙酰氨基苯酚
CYP2C9	双氯芬酸	4'-羟基-双氯芬酸	伊索昔康
CYP2C19	美芬妥因	4'-羟基-美芬妥因	苯并巴比妥
CYP2D6	丁呋洛尔	1'-羟基-丁呋洛尔	CM-II-87*
CYP3A4	睾酮	6 β -羟基-睾酮	地塞米松

* S-4 的结构类似物

功能测定后将细胞裂解,用 Bradford 方法(Bio-Rad Protein Assay)测定裂解物中的总蛋白含量。所有的酶活性数据都用每孔的总蛋白含量标准化。

乙酰氨基苯酚(CYP1A2 代谢物)在反相柱(μ BondaPak C18, 3.9 x 300 mm)上分离,流动相为于去离子水中的 15%乙腈,流速 1.5 ml/min,在 244 nm 处检测其 UV 吸光度。4'-羟基-双氯芬酸(CYP2C9 代谢物)在反相柱(NovaPak C18, 3.9 x 150 mm)上分离,流动相为于去离子水中的 40%乙腈和 0.5%甲酸(pH 2.65),流速为 1 ml/min,在 280 nm 处检测其 UV 吸光度。4'-羟基-美芬妥因(CYP2C19 代谢物)在反相柱(NovaPak C18, 3.9 x 300 mm)上分离,流动相为于去离子水中的 25%乙腈和 25 mM 磷酸钾(pH 7.4),流速为 1 ml/min,在 214 nm 处检测其 UV 吸光度。1'-羟基-丁呋洛尔(CYP2D6 代谢物)在反相柱(NovaPak C18, 3.9 x 150 mm)上分离,流动相为于去离子水中的 50%乙腈和 2 mM 高氯酸,流速为 1 ml/min,用荧光检测器在激发波长 252 nm、发射波长 302 nm 处检测。6 β -羟基-睾酮(CYP3A4 代谢物)在反相柱(NovaPak C18, 3.9 x 150 mm)上分离,流动相为于去离子水中的 40%乙腈,流速为 1 ml/min,在 254 nm 处检测其 UV 吸光度。

Western 免疫印迹分析

功能测定后制备的细胞裂解产物用于 CYP 免疫印迹分析。 β -肌动蛋白也作为加样对照进行分析。用购自 Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK)的增强化学发光试剂盒检测信号。使用已知酶含量的人重组 CYP Supersomes[®]建立每种 CYP 亚型的标准曲线。带密度用 ImageJ 软件(<http://rsb.info.nih.gov/ij>)分析。

实时 PCR 分析

对单独的肝细胞 24 孔板进行如上所述相似地处理。每一处理包括 4 孔。处理 72 小时后,用 Trizol[®]试剂提取总 RNA。利用

Superscript™ First-strand Synthesis System 从分离的总 RNA 样品制备 cDNA，然后用于实时 PCR 分析。用引物 3 程序 (<http://www.genome.wi.mit.edu/genome~software/other/primer3.html>) 设计 CYP 1A1、2C9、2C19、2D6、3A4 和 GAPDH (表 2) 的基因特异性引物。

表 2 实时 PCR 分析的寡核苷酸序列

引物	序列(5'至 3')	T _m ⁷
CYP 1A2 ¹		89°C
正向	CAGAATGCCCTCAACACCTT	
反向	CTGACACCACCACCTGATTG	
CYP2C9 ²		89°C
正向	AAGAACCTTGACACCACTCCA	
反向	TAATGCCCCAGAGGAAAGAG	
CYP2C19 ³		88°C
正向	TGGGACAGAGACAACAAGCA	
反向	TGGGGATGAGGTCGATGTAT	
CYP2D6 ⁴		92°C
正向	AGGGAACGACACTCATCACC	
反向	CAGGAAAGCAAAGACACCAT	
CYP3A4 ⁵		86°C
正向	AATAAGGCACCACCCACCTA	
反向	CTTGGAATCATCACCACCAC	
GAPDH ⁶		91°C
正向	GTCAGTGGTGGACCTGACCT	
反向	TGAGCTTGACAAAGTGGTCG	

¹ 根据已发表的 CYP1A2 序列(NM 000761.2)

² 根据已发表的 CYP2C9 序列(NM 000771)

³ 根据已发表的 CYP2C19 序列(NM 000769)

⁴ 根据已发表的 CYP2D6 序列(NM 000106)

⁵ 根据已发表的 CYP3A4 序列(NM 017460)

⁶ 根据已发表的 GAPDH 序列(NM 002046)

⁷ 扩增子解链温度™获自熔解曲线分析

使用 Smart Cycler (Cepheid, Sunnyvale, CA)如下进行扩增: 95°C 300 秒, 95°C 20 秒循环 35 次, 58°C 30 秒, 72°C 30 秒。72°C 300 秒的延伸循环后是从 60°C 开始以速率为 0.2°C/秒升温至 95°C 的熔解分析。作为 PCR 产物解链温度特征的一阶导数负峰用于鉴定特异性 PCR 产物。反应条件: 1 μ l (50-100 ng) cDNA 溶液, 14.6 μ l DEPC 水, PCR 缓冲液(10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl 和 1.5 mM MgCl₂), 200 μ M dNTP, 200 nM 正义和反义引物, 用 DMSO 以 1:12500 稀释 SYBR® 绿色核酸凝胶染料 10000X, 1.0 单位 Taq DNA 聚合酶和 5 μ l SmartCycler® 添加剂, 每次反应总体积 25 μ l。对于每个 CYP 亚型和 GAPDH, 每个 cDNA 样品都进行双份反应。

利用比较 Ct 方法(Livak KJ 和 Schmittgen TD (2001) Methods 25: 402-408)定量 mRNA。该方法比较感兴趣的基因与参比基因如 GAPDH 的相对表达。达到任意荧光阈值所必须的循环数(Ct)用于计算 Δ Ct, 通过从参比基因的 Ct 中减去目标基因的 Ct 来计算。计算对照细胞(以培养基培养)和实验处理的细胞的 Δ Ct。从对照组的 Δ Ct 中减去实验组的 Δ Ct 得到 $\Delta\Delta$ Ct。用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 确定相对于对照的倍数变化。所有参数的统计学分析用单因素 ANOVA 进行, α 值设定为 $p < 0.05$ 。

结果

在 HepG2 细胞中 S-1 和 S-4 的细胞毒性

评价 S-1 和 S-4 在肝细胞癌细胞系 HepG2 细胞中的细胞毒性以确定将用于处理人肝细胞的浓度。在浓度高于 10 μ M 时 S-1 和 S-4 在 HepG2 细胞中显示出一些毒性(图 33)。但在较低浓度时未观察到毒

性。S-4 造成毒性所需浓度远远高于 I 期临床试验中观察到的最高血浆浓度(约 0.03 μM)。为充分地评价 S-1 和 S-4 对 CYP 表达的影响而不引起细胞毒性, 在人肝细胞研究中选择浓度为 2 μM 。

S-1 和 S-4 对 CYP 酶功能、蛋白表达和 mRNA 水平的影响

单个 CYP 酶的结果总结在图 34 至 38 中, 包括测量作探针底物向代谢物转化的酶活性、由免疫印迹法测定的 CYP 酶蛋白的表达水平以及由实时 PCR 定量的相对 mRNA 水平。

在未处理的对照细胞中 CYP1A2 的活性(图 34)为约 50 皮摩尔/(mg*min)。用溶剂(0.1% DMSO)、S-1 (2 μM)和 S-4 (2 μM)处理没有显著改变 CYP1A2 的活性、蛋白表达水平或 mRNA 水平。由于以获得的总 RNA 量有限, 所以在溶剂处理的样品中未检测到 mRNA 信号。BNF (50 μM)是已知的 CYP1A2 诱导剂, 显著地使 CYP1A2 活性增加了 10 倍, 同时伴随 CYP1A2 蛋白表达的增加。相应地, BNF 处理后该酶的 mRNA 水平也增加了 7 倍, 表明 CYP1A2 活性的升高是由于 BNF 对酶表达的诱导。

CYP2C9 (图 35)和 CYP2C19 (图 36)的酶活性和表达对不同处理的反应显示非常相似的变化。溶剂和 BNF 处理对 CYP2C9 和 CYP2C19 的酶活性和表达水平有很小的影响。RIF (10 μM)处理分别使 CYP2C9 和 CYP2C19 活性增加了 2 倍和 6 倍, 蛋白表达水平稍有轻微升高, 但 mRNA 水平没有显著升高。S-1 和 S-4 没有引起 CYP2C9 和 CYP2C19 蛋白表达或 mRNA 水平的显著变化。但是, 两种处理使酶活性向探针底物方向降低。S-4 分别使 CYP2C9 和 CYP2C19 的活性降低了 57%和 73%, 而 S-1 使 CYP2C9 和 CYP2C19 的活性分别降低了 16%和 47%。由于未观察到酶表达的显著变化, 考虑到 S-4 在较高 μM 浓度时对 CYP2C19 有一些亲和力, S-1 和 S-4 处理的样品中酶活性的降低可能与 SARM 和/或其代谢物直接抑制酶活性有关。

RIF 和 BNF 处理稍稍增加了 CYP2D6 的表达, CYP2D6 的活性

也增加了2倍以上。用S-1或S-4处理后CYP2D6酶、mRNA或活性未见显著变化。

虽然S-4是CYP3A4的底物,但它没有影响该酶在肝细胞中的表达或活性(图38)。在溶剂、S-1和BNF处理的样品中也观察到相似的结果。RIF是较强的CYP3A4诱导剂,其显著增强了该酶的活性(7倍)以及该酶在mRNA水平(3.69倍)和蛋白水平(10倍以上)的表达,表明酶活性的增强是由于酶表达的增加。

RIF (10 μ M)使CYP 2C9、2C19和3A4的酶活性显著增加,分别增加了2倍、6倍和7倍。BNF (50 μ M)使CYP1A2的酶活性显著增加了10倍。酶活性的这些变化与酶表达的变化更相关,因为RIF和BNF处理后,在蛋白表达水平上也观察到了相似的变化。用S-4处理的肝细胞中,CYP2C9和2C19的酶活性分别降低了57%和73%。用S-1处理的肝细胞中,CYP2C9和2C19的酶活性分别降低了16%和47%。但是,在S-1和S-4处理的细胞中,这些酶中没有的mRNA或蛋白水平具有显著的变化,表明观察到的酶活性的下降可能是由于该酶的直接抑制所引起。

如以前所述, NR在调节CYP酶表达中发挥重要作用。本次研究中使用的两种模式诱导剂RIF和BNF实际上是NR配体。BNF通过激活芳烃受体(AhR)诱导CYP1A2表达,而RIF通过激活人PXR(孕烷X受体)诱导CYP2C9和3A4的表达。最近用CYP2C19启动子的研究也鉴定出CAR(组成型雄烷受体)和GR结合位点。凝胶移位测定表明人PXR也与CAR反应元件结合,这表明CYP2C19的表达也可能直接由PXR配体(即利福平)调节。使用人原代肝细胞进行的CYP2C基因诱导研究也表明利福平在蛋白和mRNA水平都诱导CYP 2C9和2C19表达。在该研究中观察到的结果与这些发现一致。

人CYP2D6表达受另一孤儿受体肝细胞核因子4 α (HNF4 α)调节。没有证据表明RIF或BNF是HNF4 α 配体。虽然HNF4 α 直接调节PXR

和 CAR 的基因表达，但不清楚 PXR 和 CAR 是否调节 HNF4 α 表达。RIF 和 BNF 对 CYP2D6 表达的诱导可能与 PXR、CAR 和 HNF4 α 之间的“串话”有关。

SARM 处理没有引起主要 CYP 酶表达的任何显著性变化，表明 AR 可能不涉及这些 CYP 酶表达的直接调节，而且 SARM 与孤儿受体之间不可能有任何直接调节 CYP 酶表达的相互作用发生。

虽然 S-1 和 S-4 在转录水平或蛋白表达水平均没有显示对 CYP 酶表达有任何调节作用，但是 S-1 和 S-4 处理降低了 CYP 2C9 和 2C19 的酶活性，这可能是培养物中剩余的残余量的药物或代谢物对该酶的直接抑制引起的，这在使用肝细胞的酶诱导研究中观察到的常见问题。然而，考虑到观察到的 SARM 与 CYP2C 酶之间的相互作用，药物-药物相互作用也是可能的。

总体而言，S-1 和 S-4 在人原代肝细胞中不诱导或抑制主要 CYP 酶的表达，不过这些药物可能直接抑制 CYP 2C9 和 2C19 酶活性。但是，本研究中使用的药物浓度(2 μ M)比在临床相关剂量下可能获得的血浆浓度高 50 倍以上。因此，S-1 和 S-4 对 CYP 2C9 和 2C19 的抑制作用在体内可能观察不到。

本领域技术人员应理解，本发明不受本文以上具体说明和描述的限制。本发明的范围由所附的权利要求书定义。

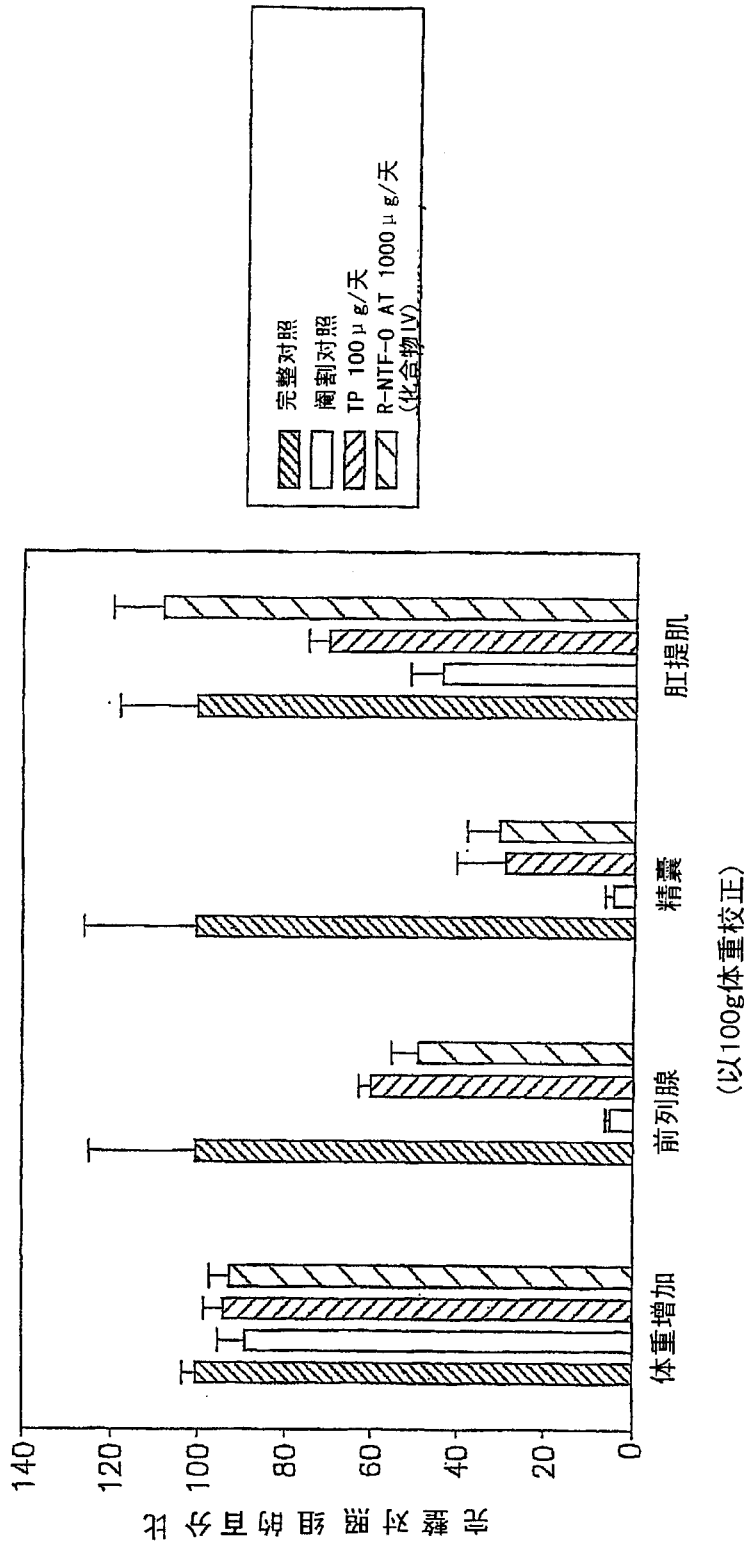


图1

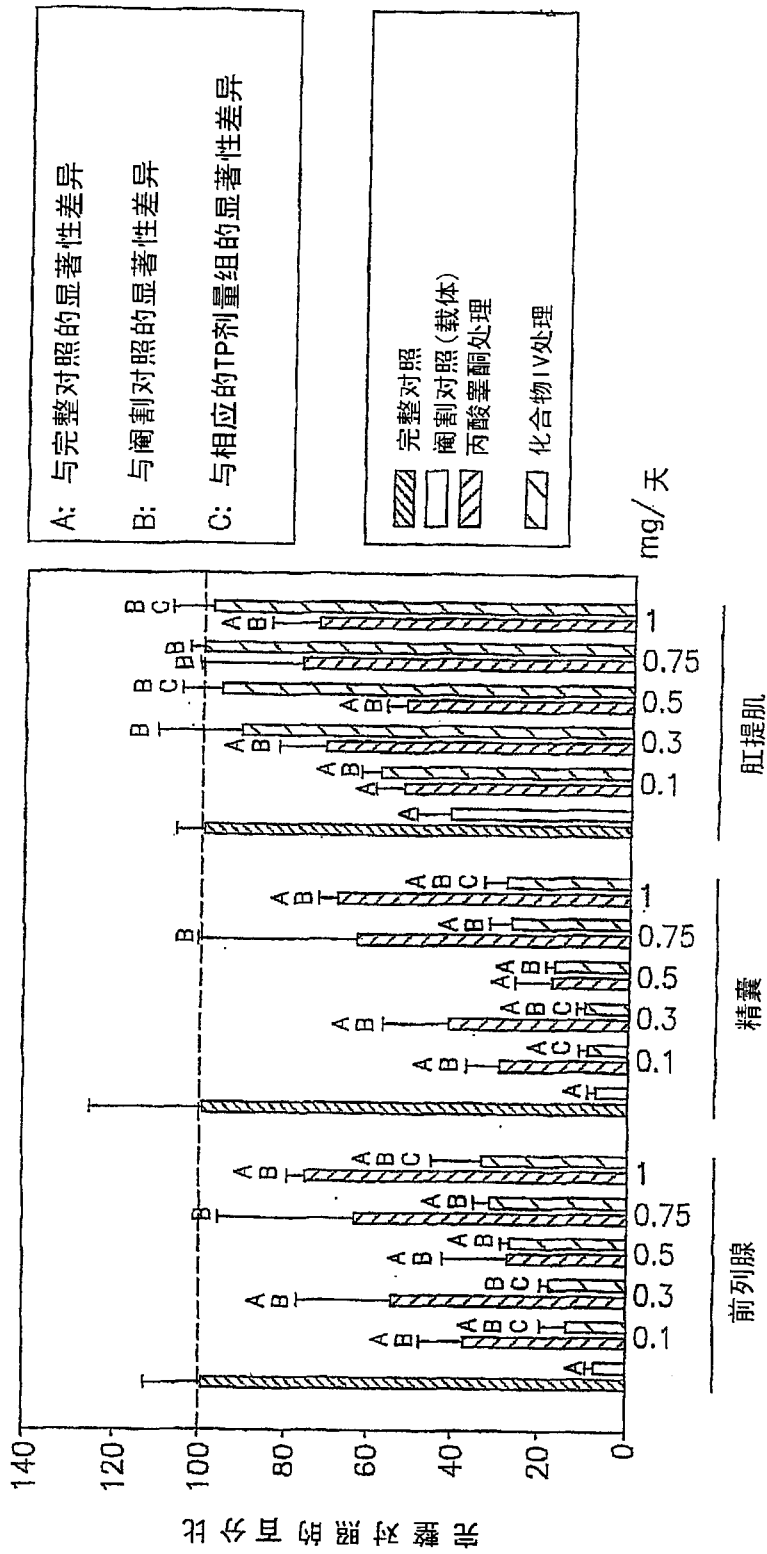


图2

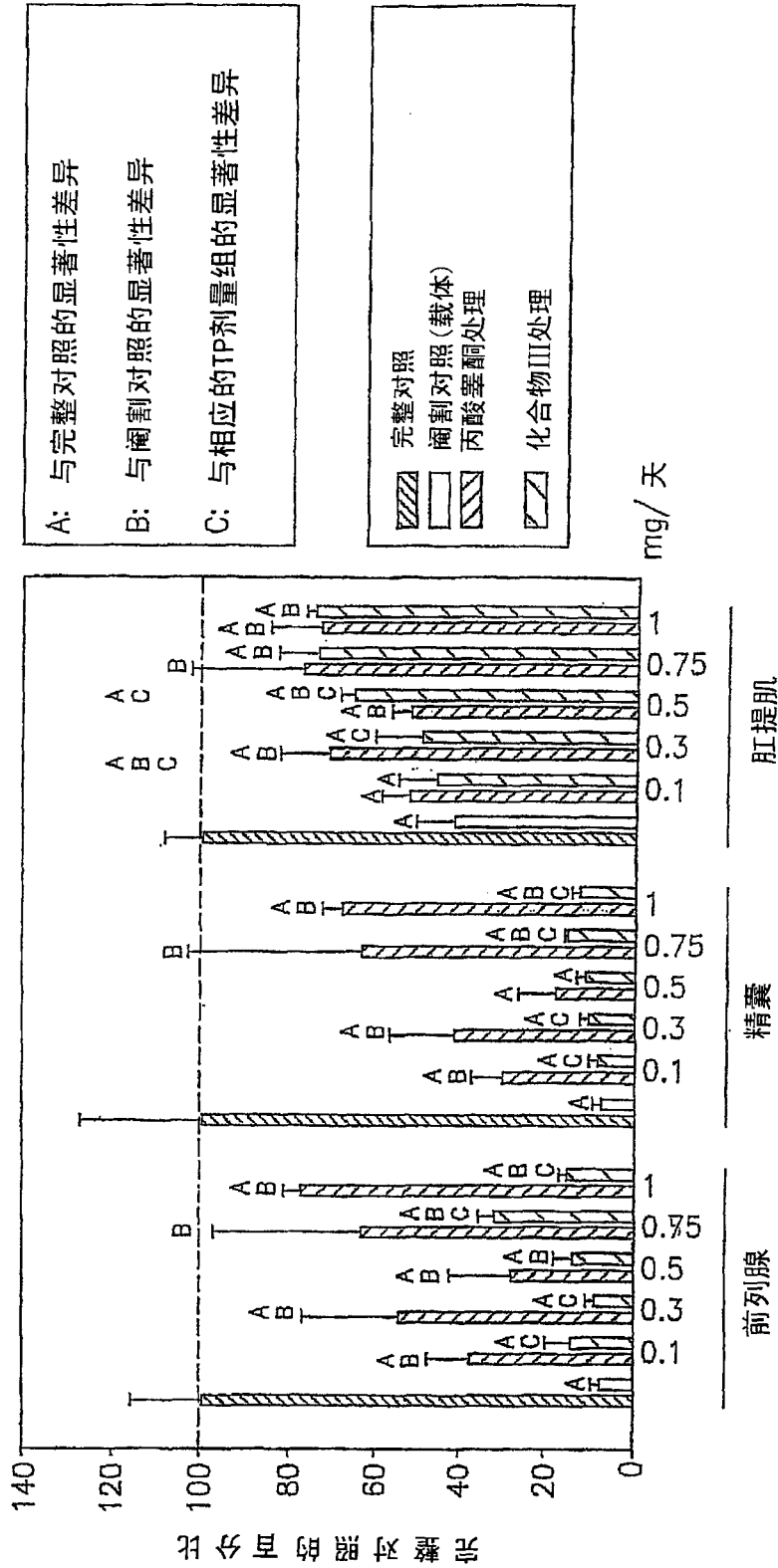


图3

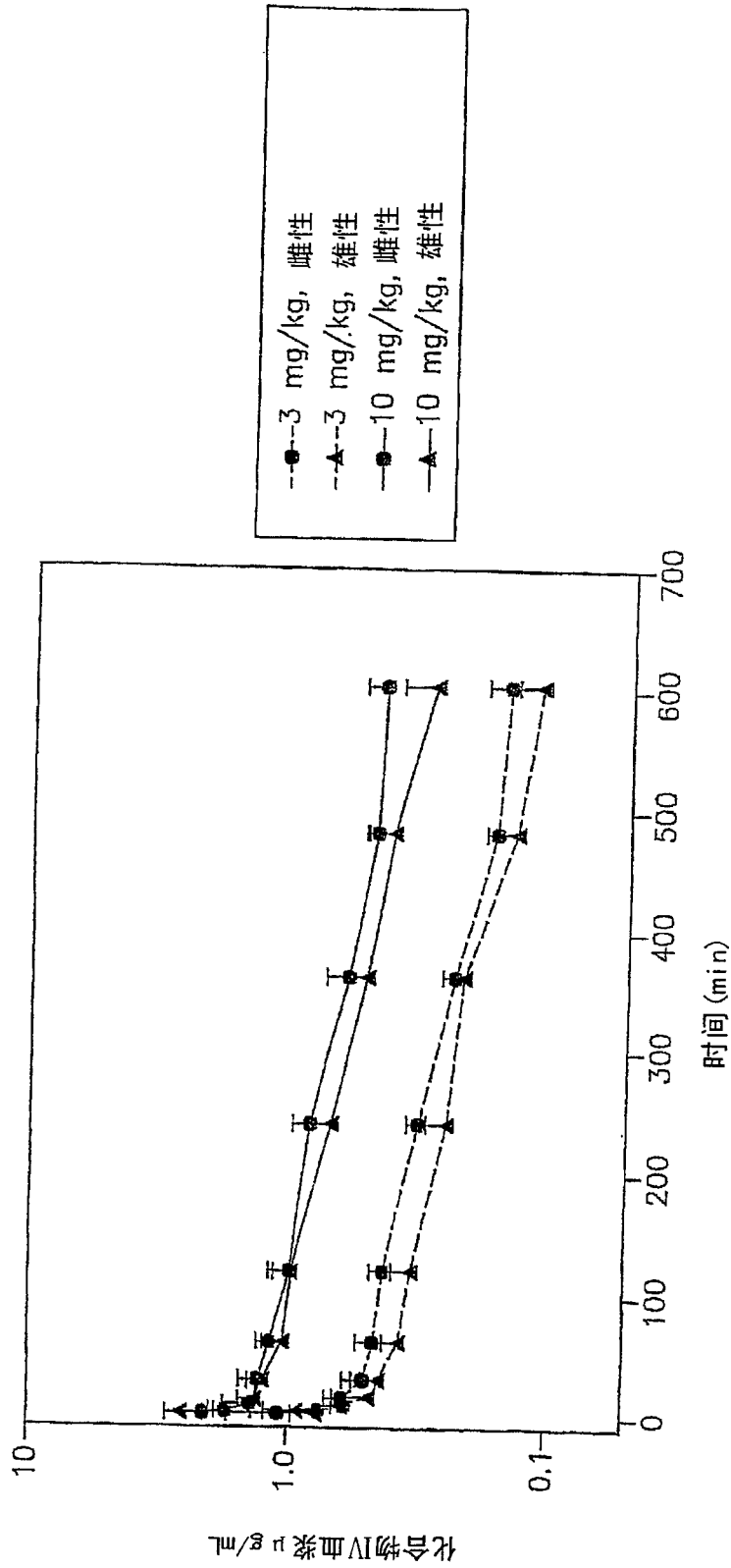


图4

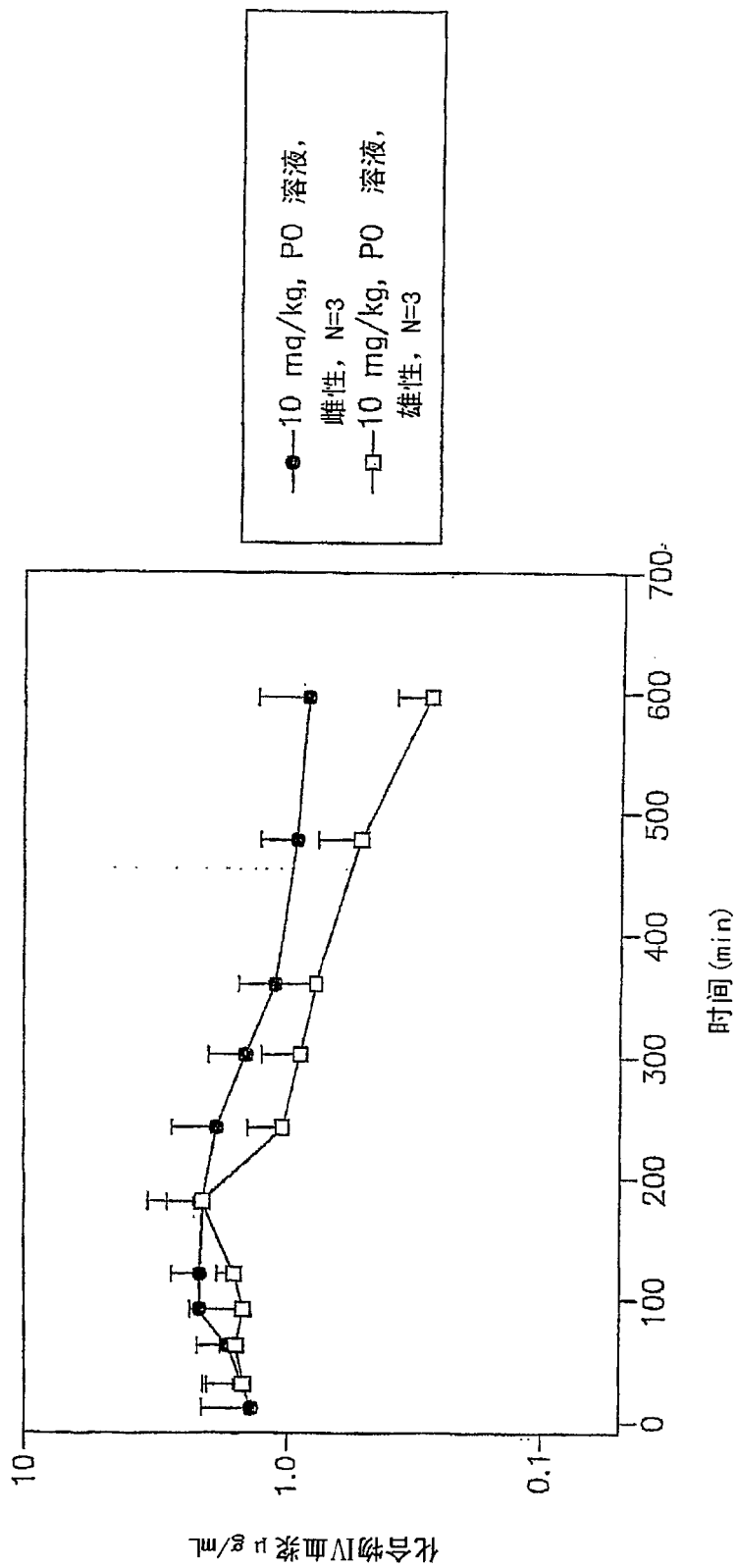


图5

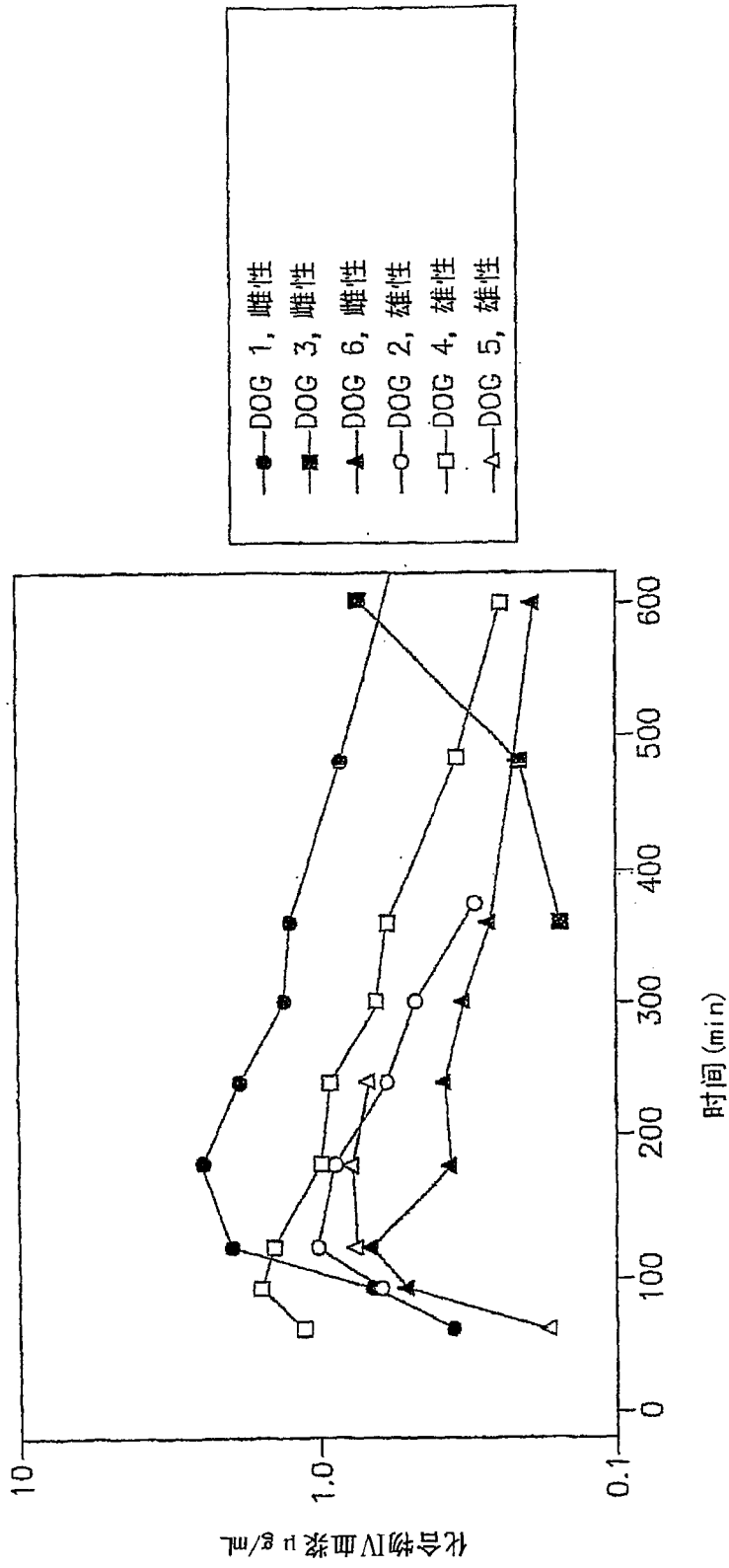


图6

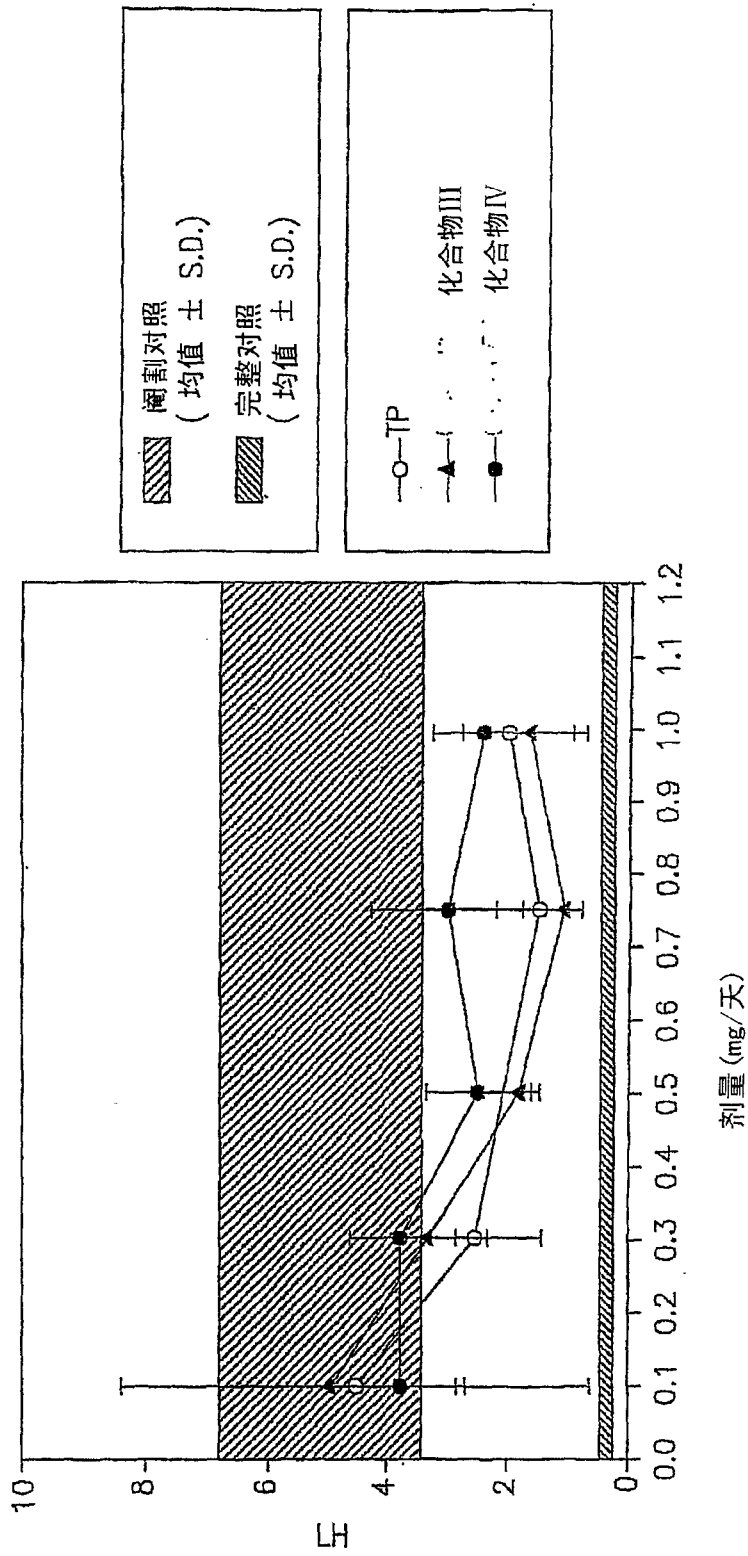


图7

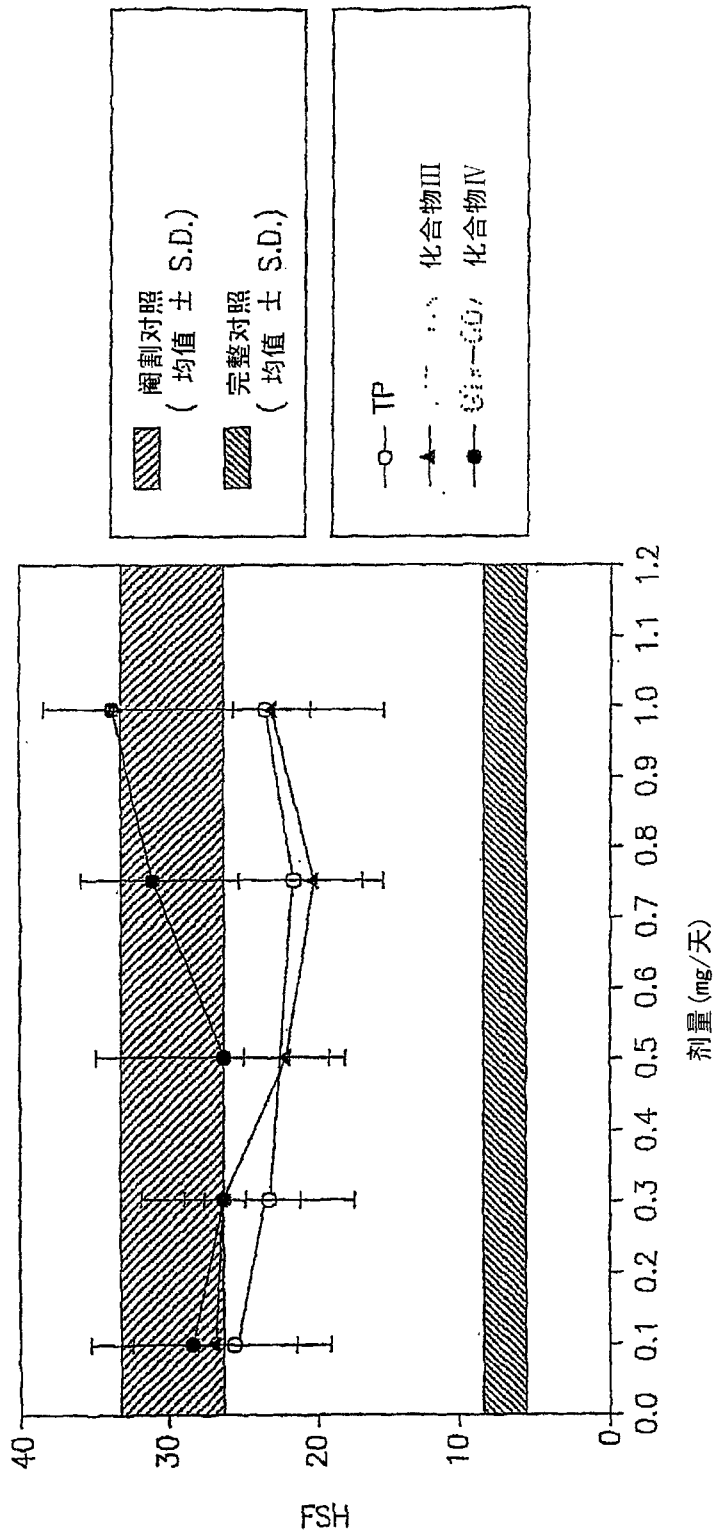
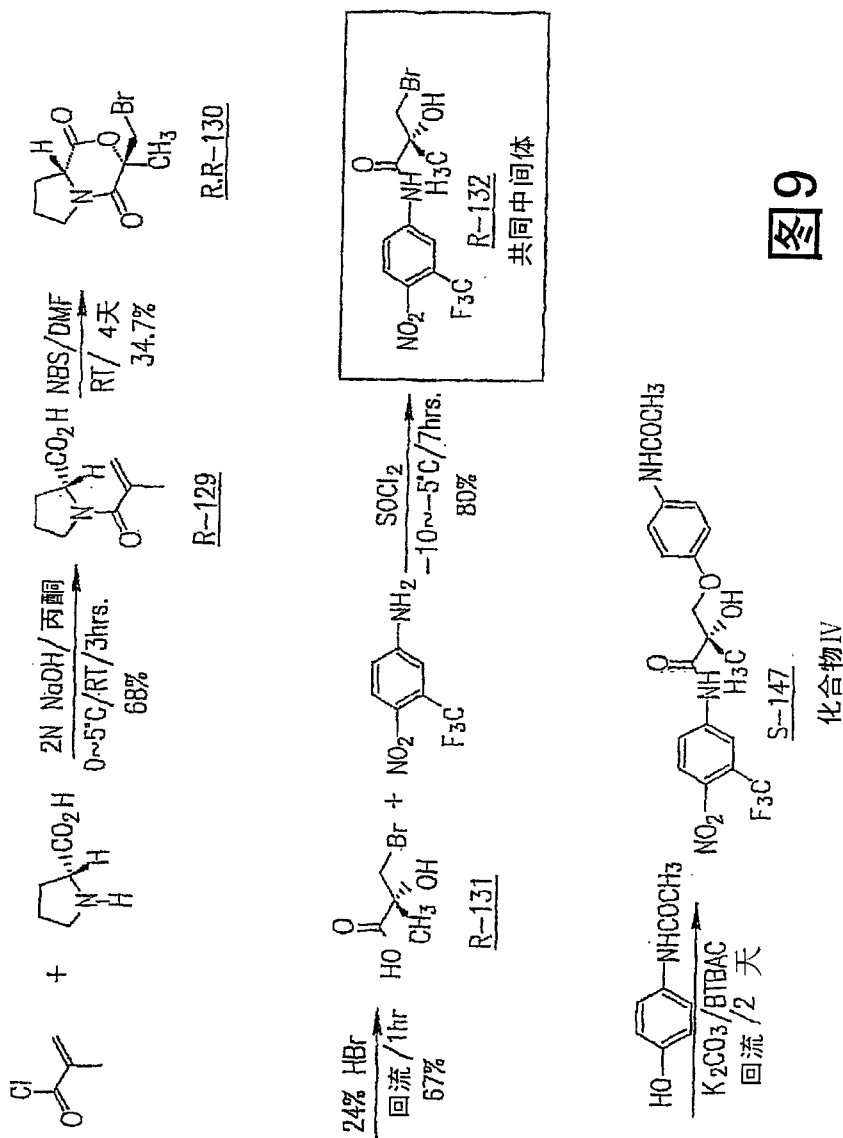


图8



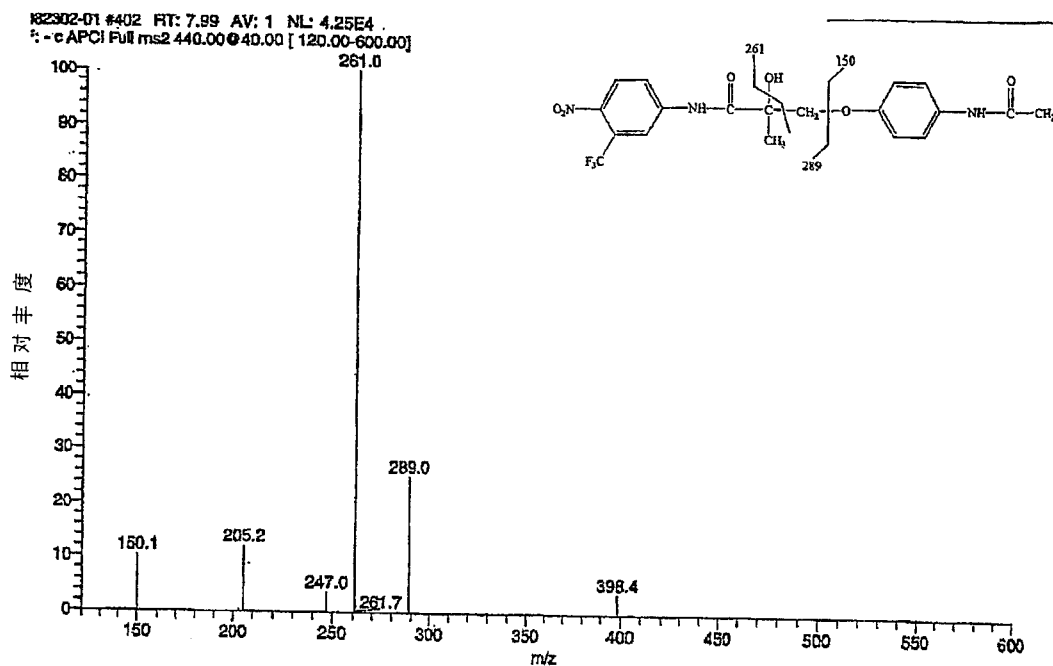
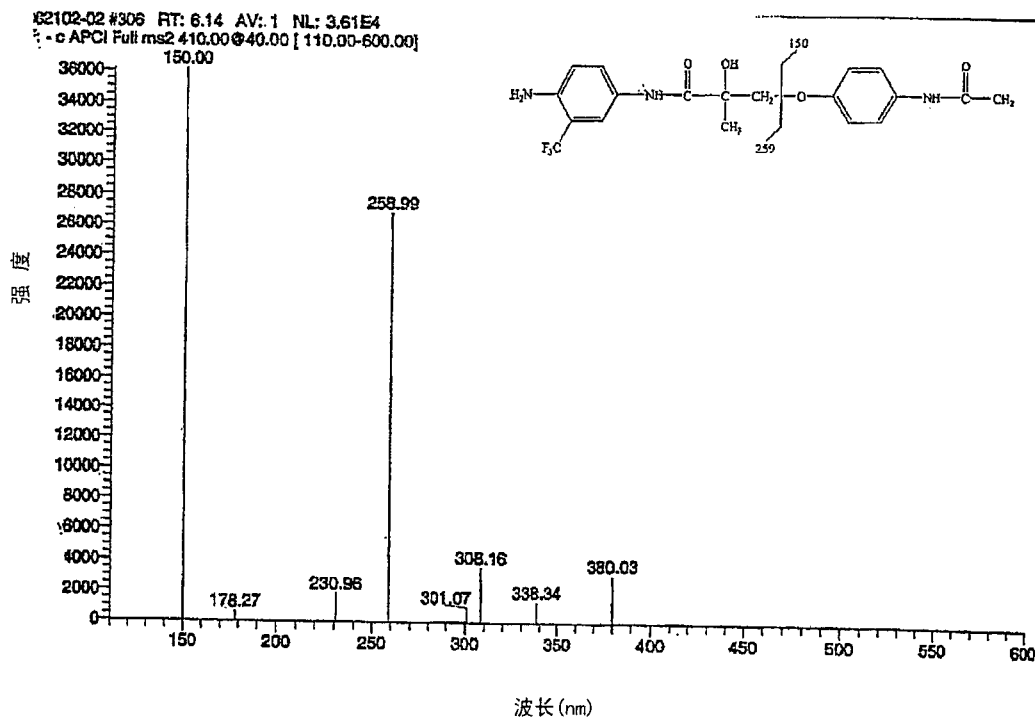


图10A



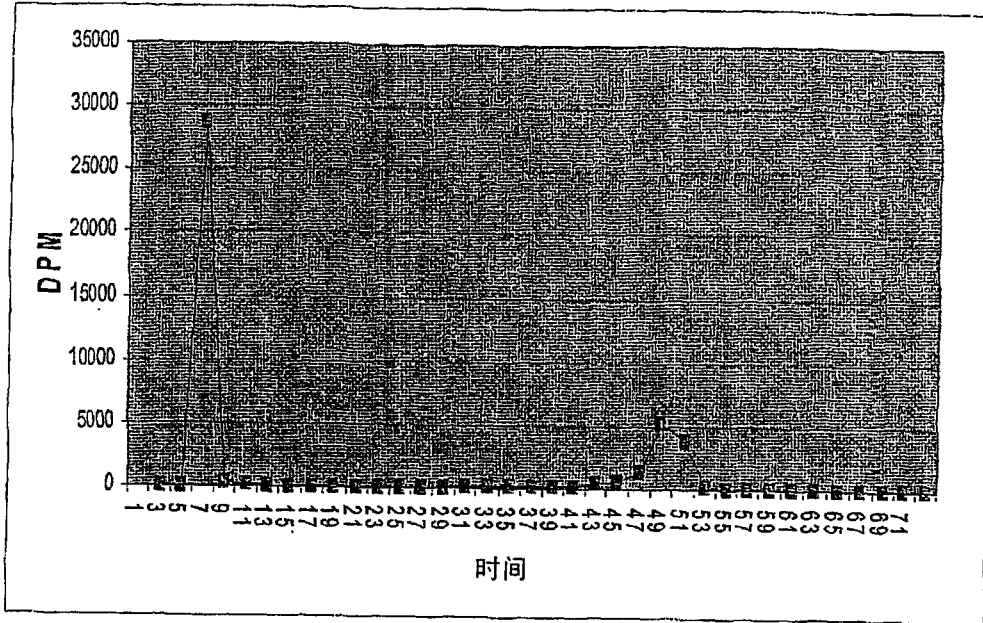


图10B

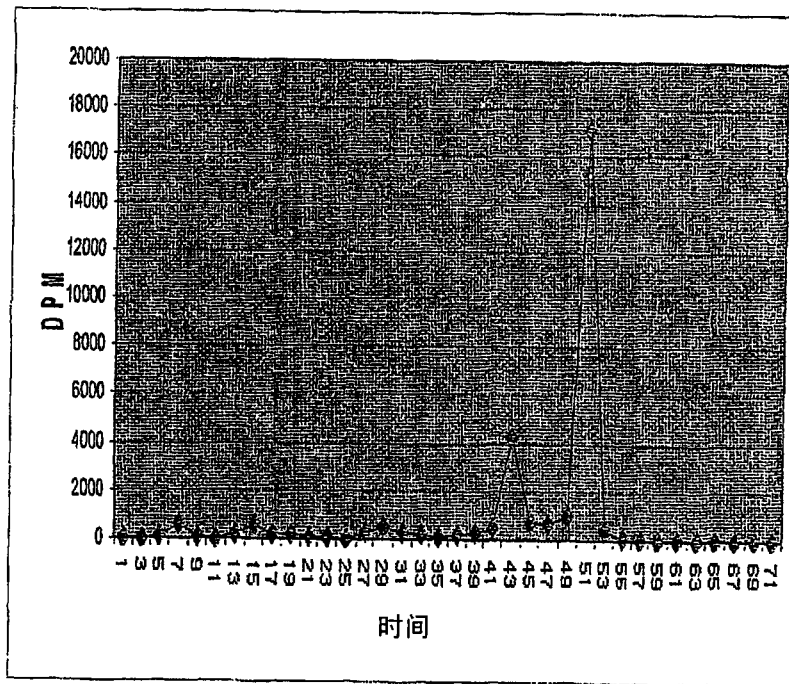


图11A

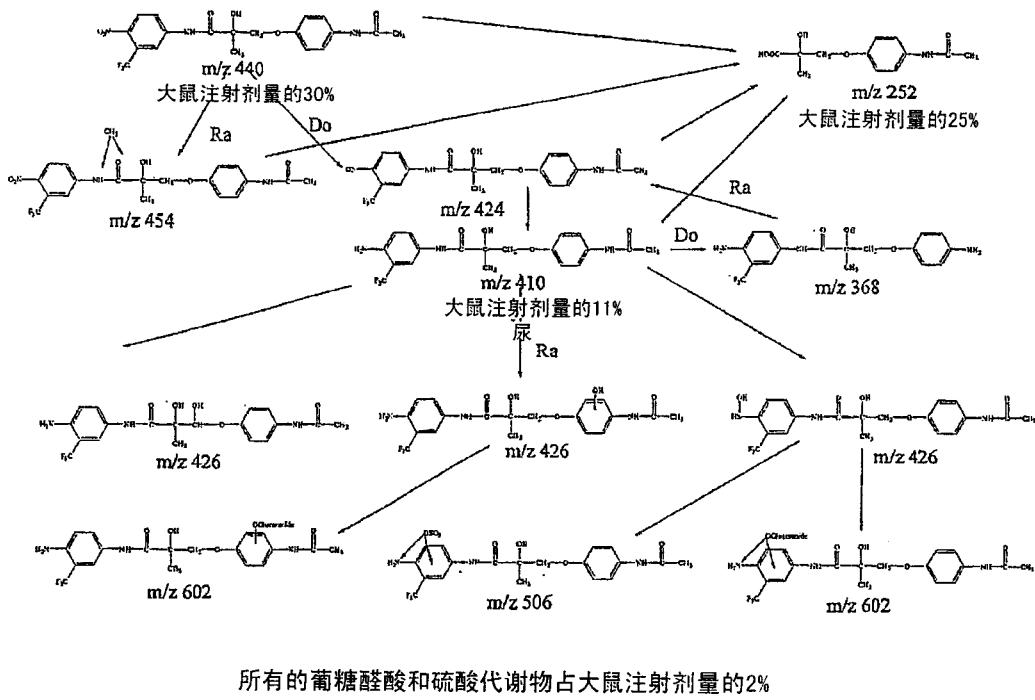


图11B

化合物IV在HLM中的体外代谢

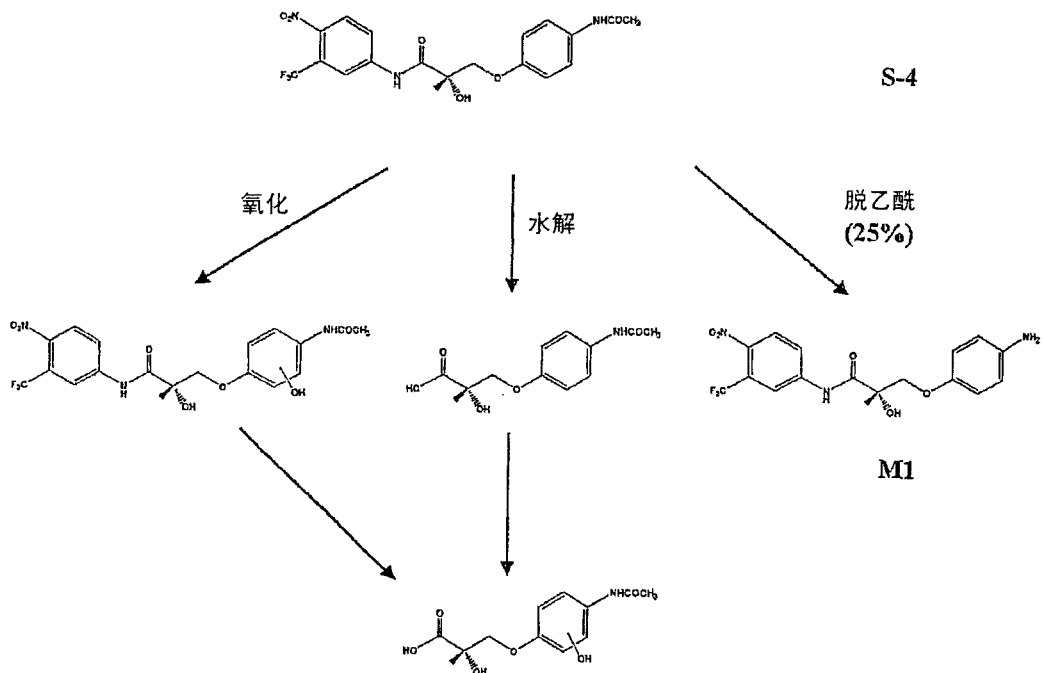


图12

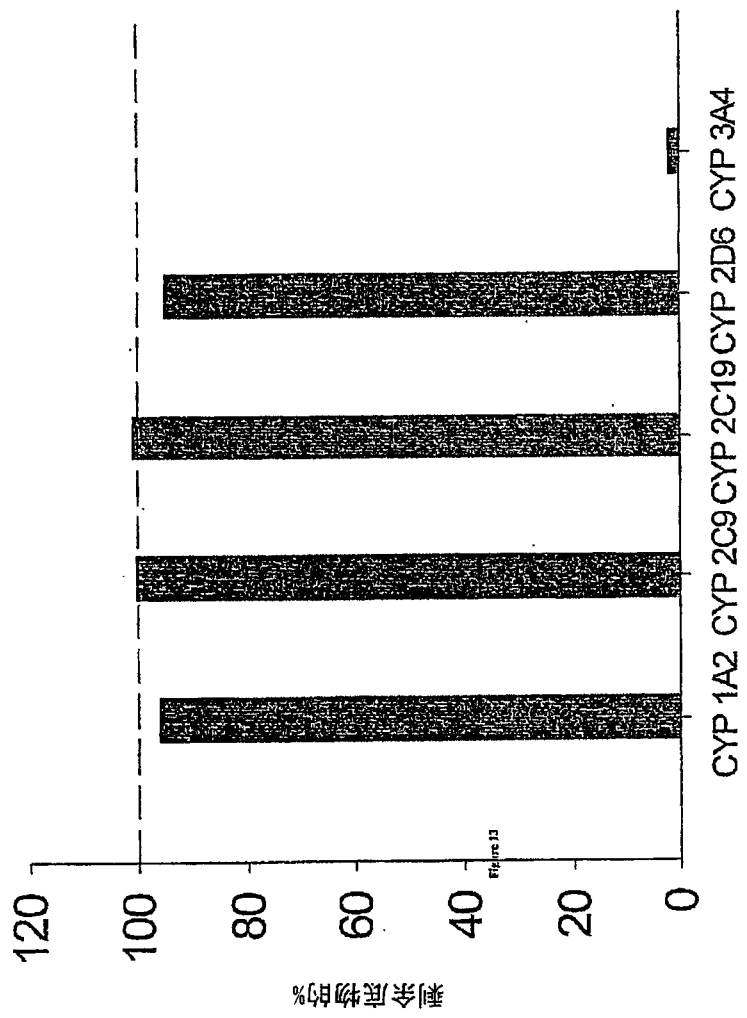


图13

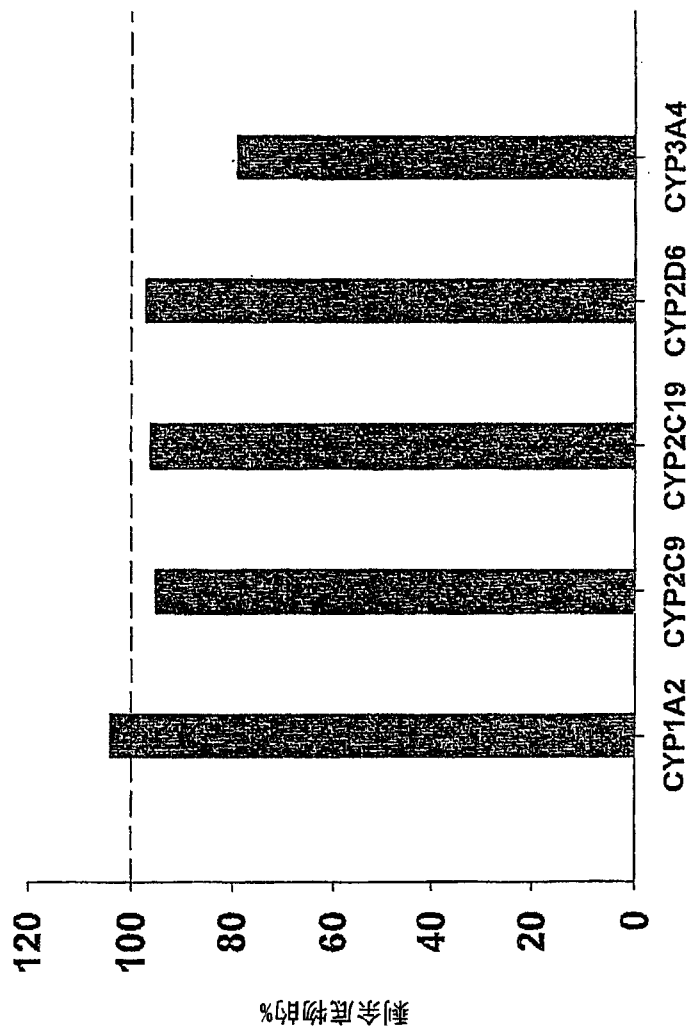


图14

图15

化合物III在HLM中的体外代谢

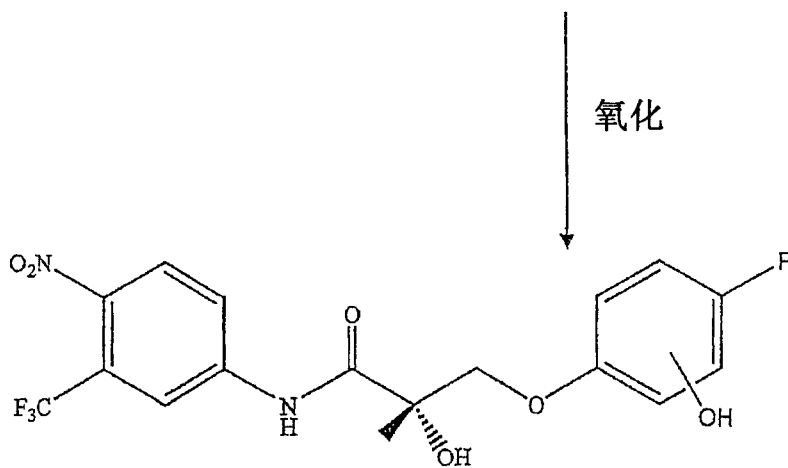
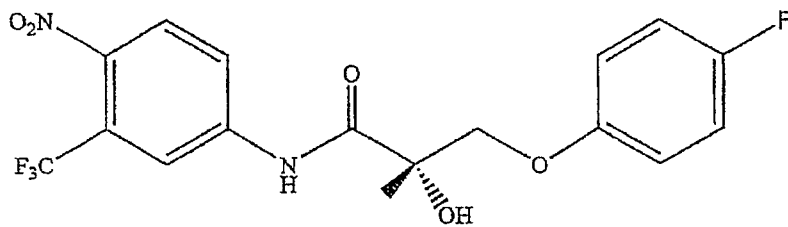


图16

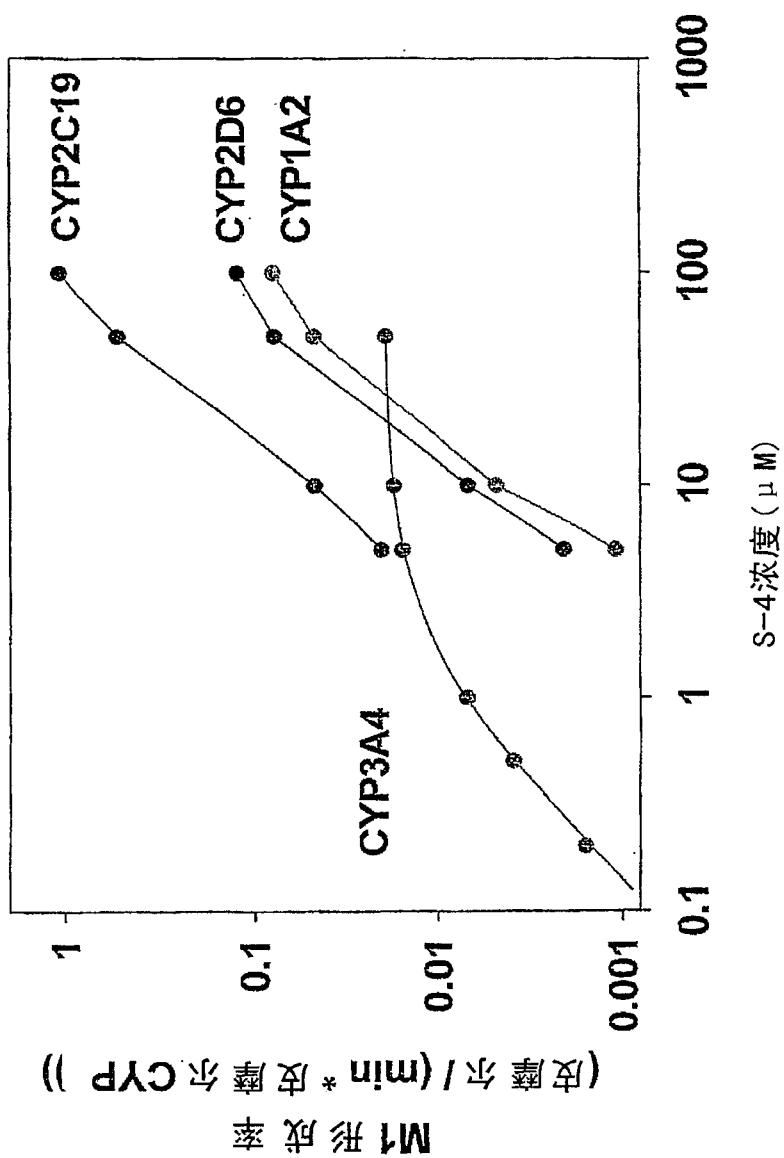


图17

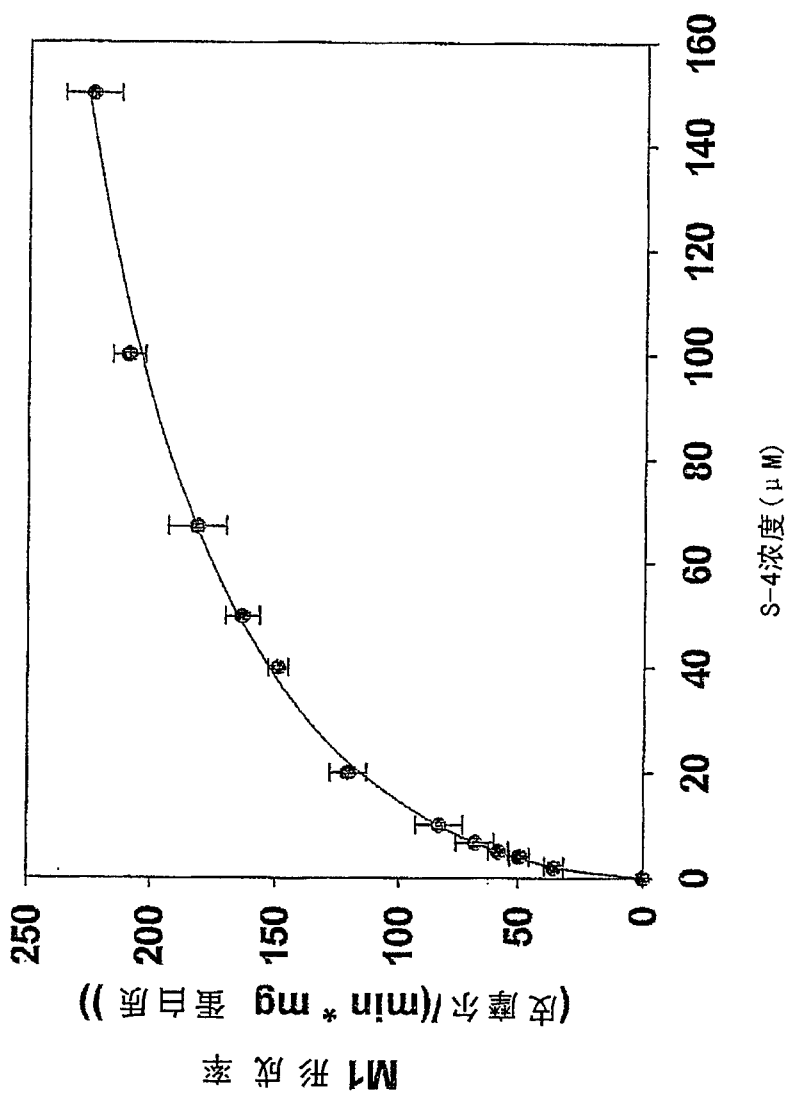
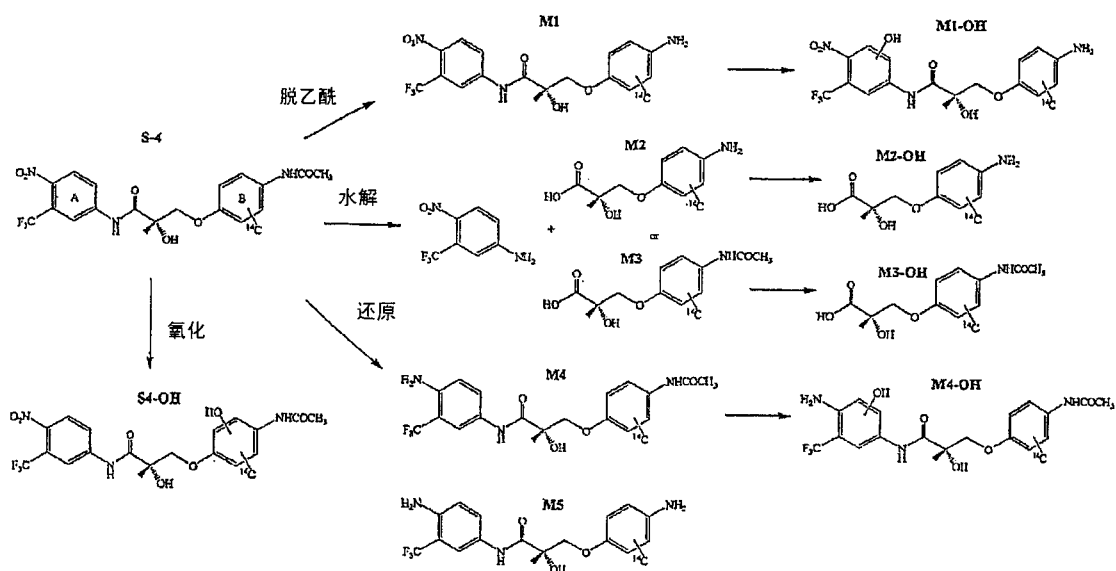


图18



B.

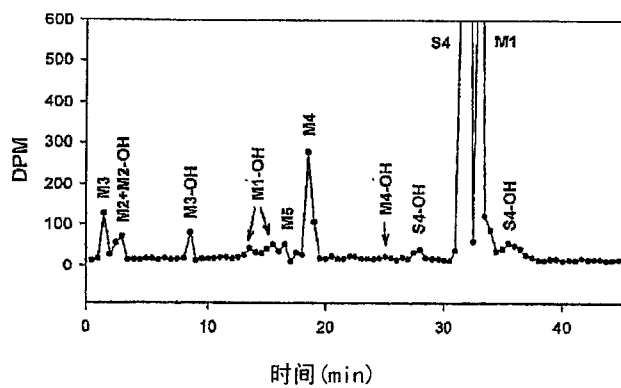


图19

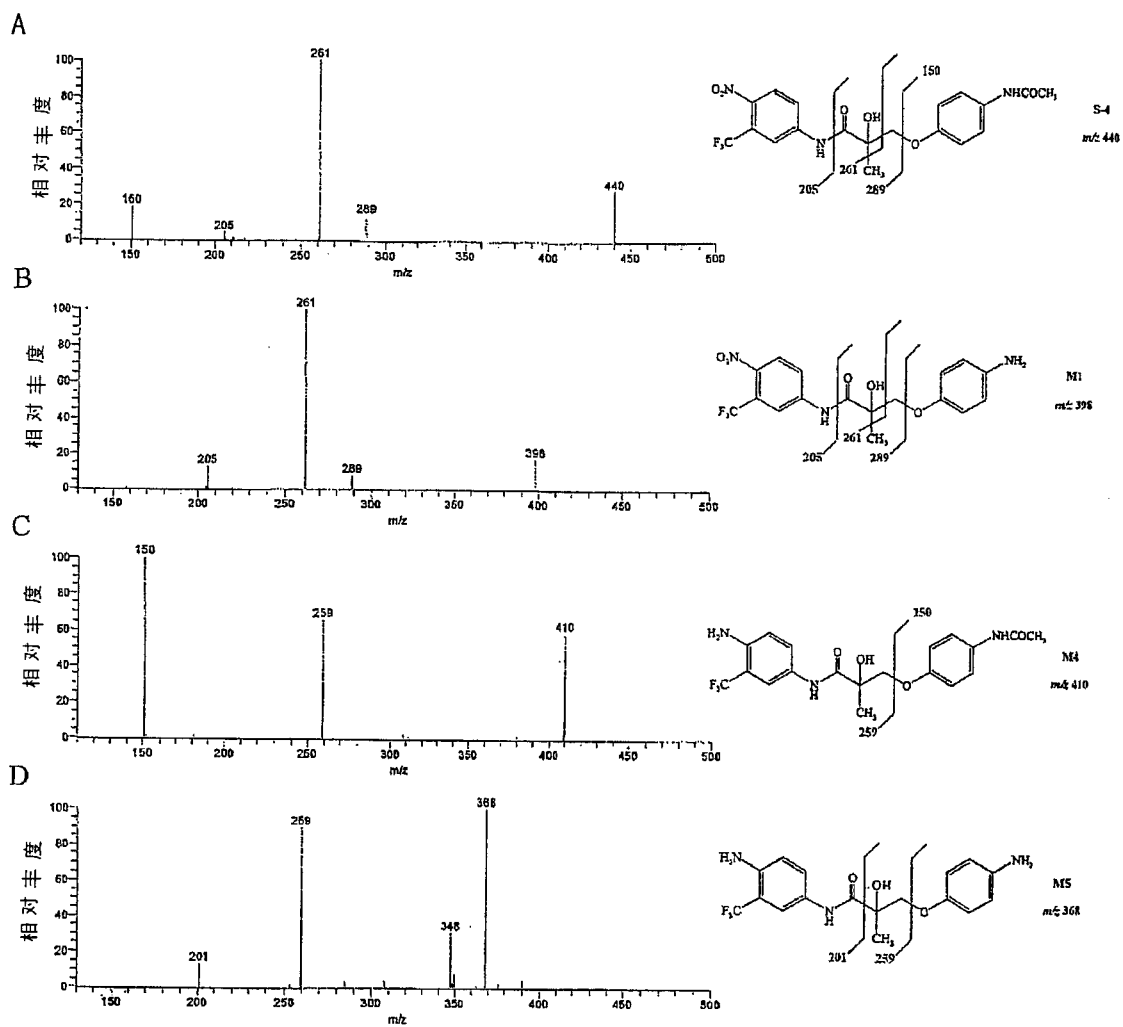


图 20

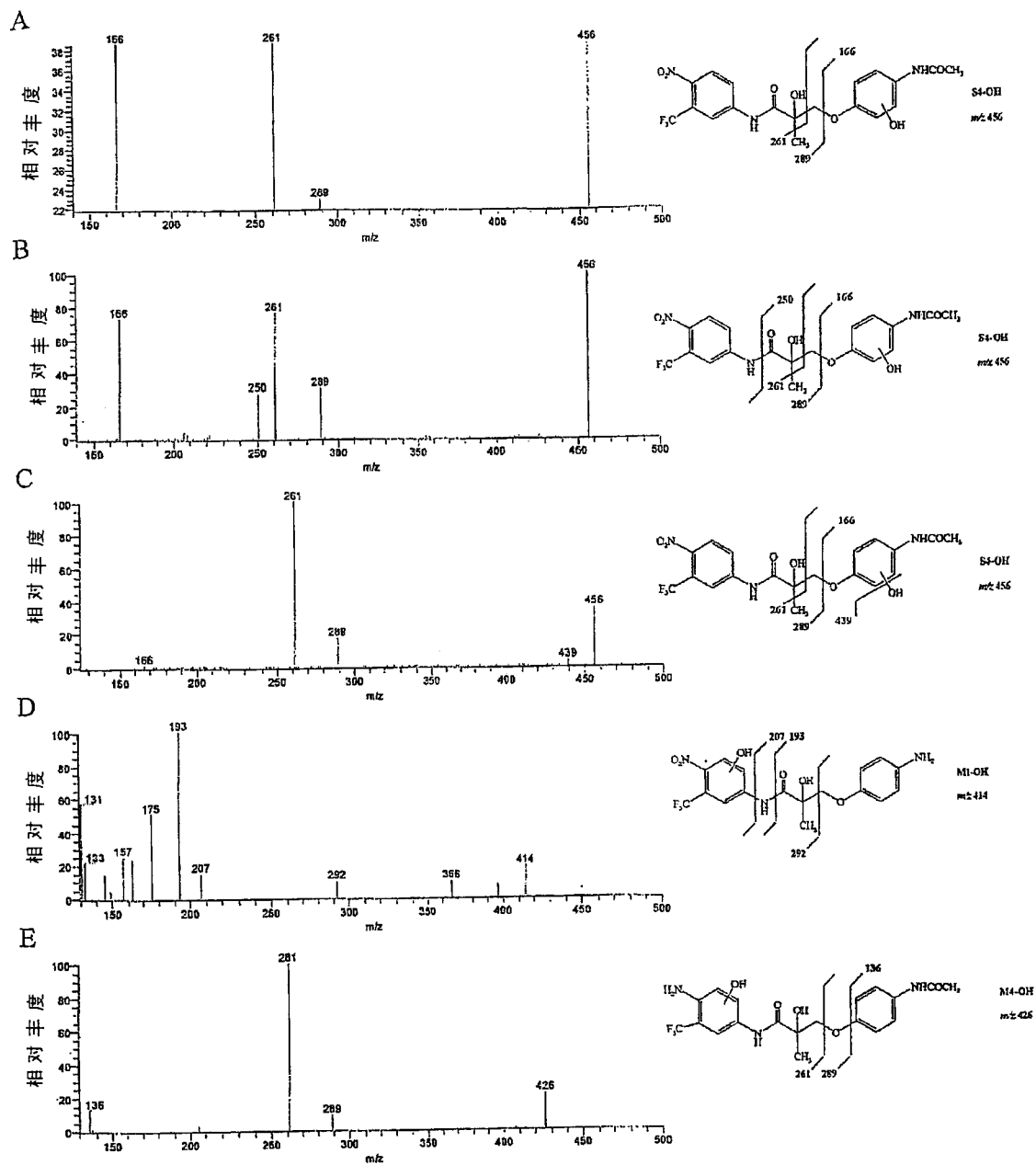


图21

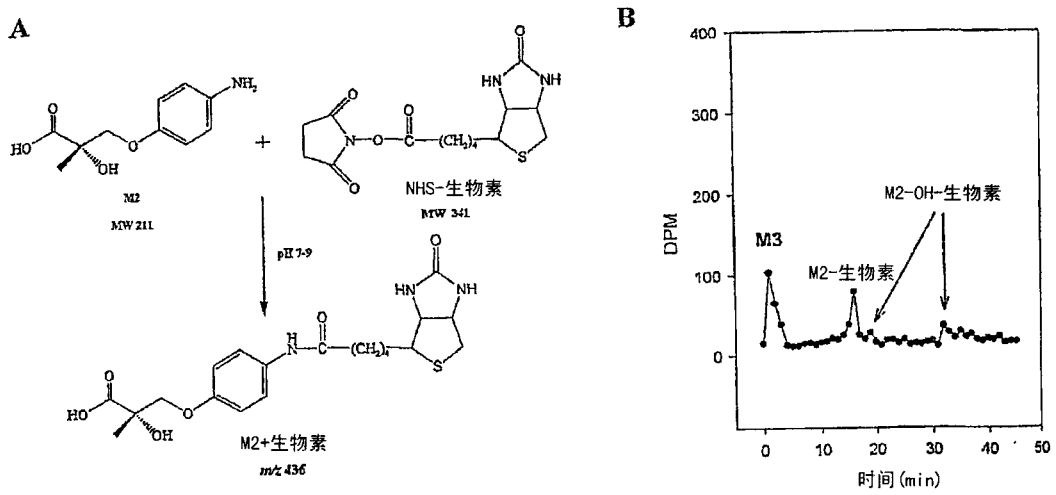


图22

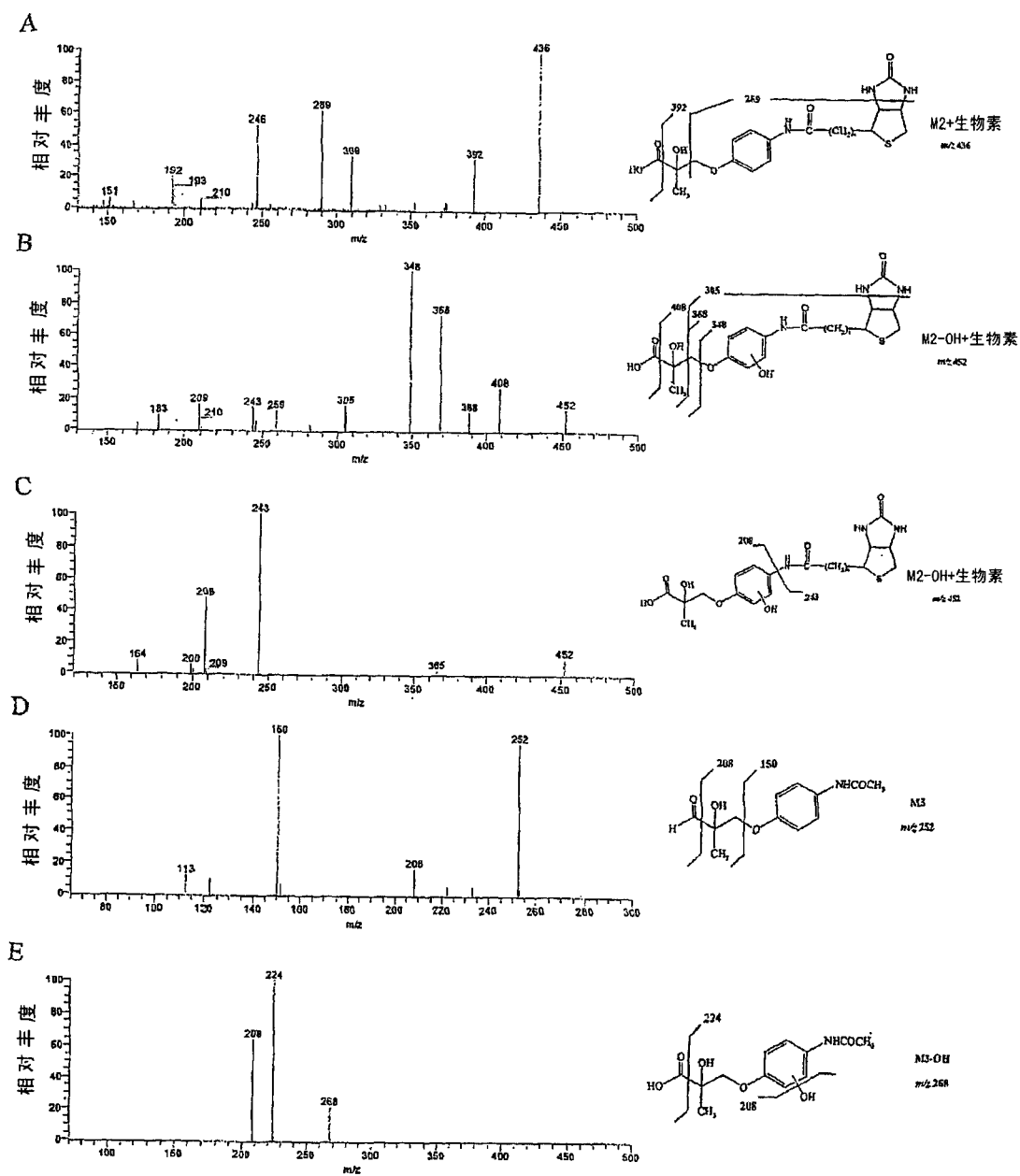


图23

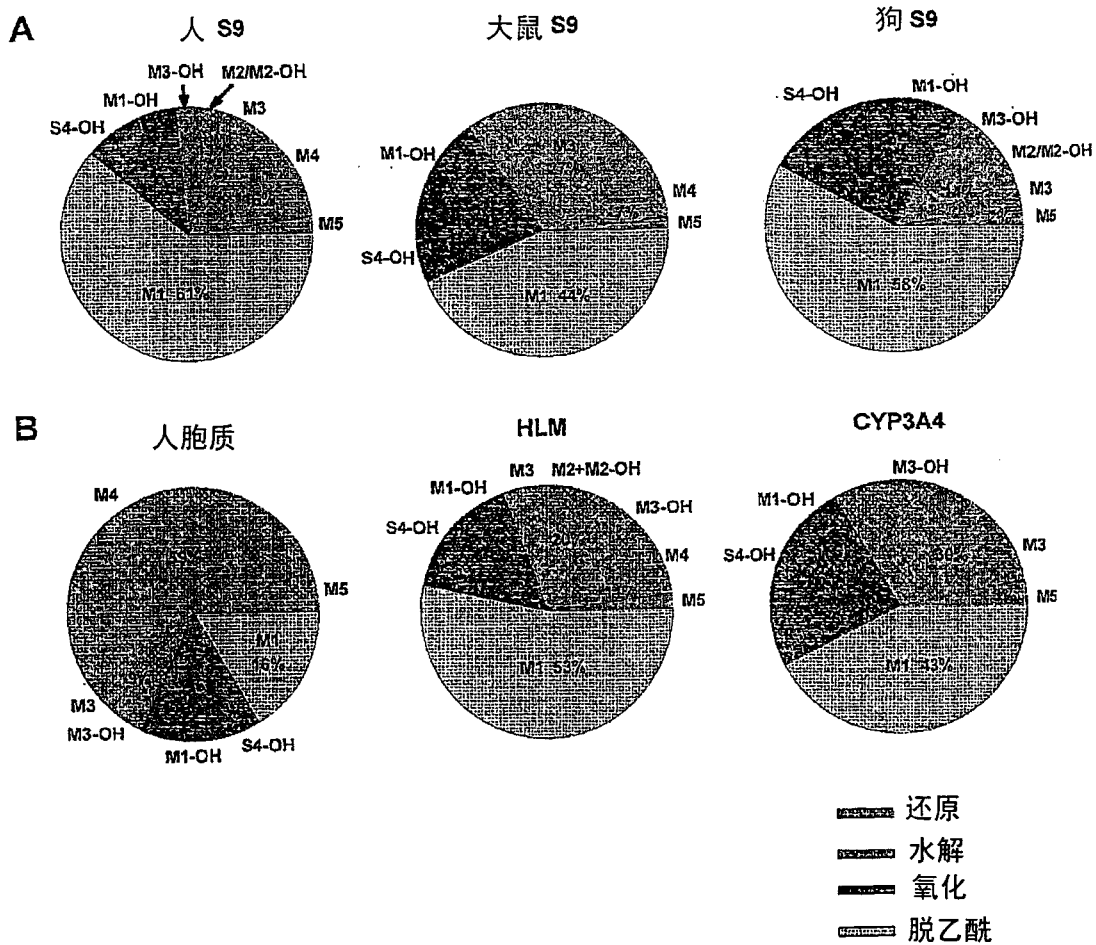


图24

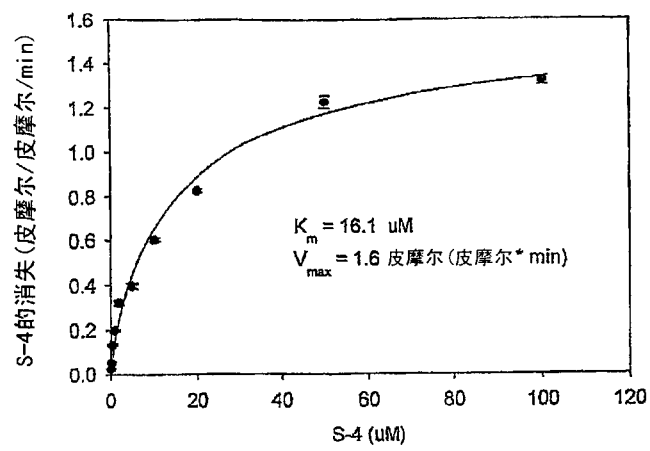


图25

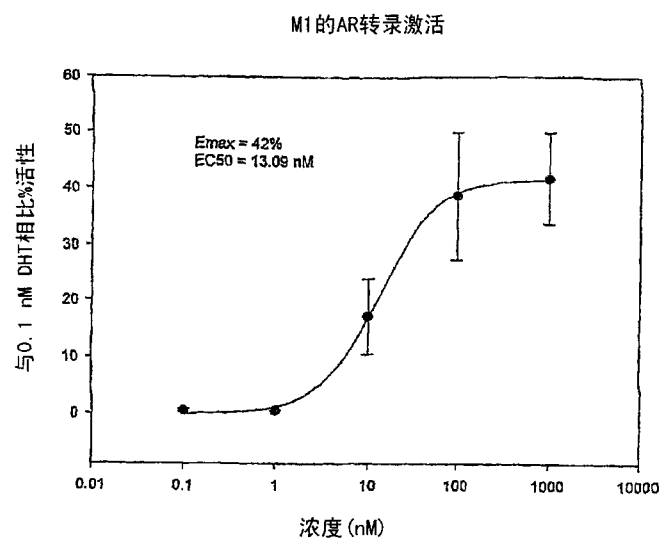


图26

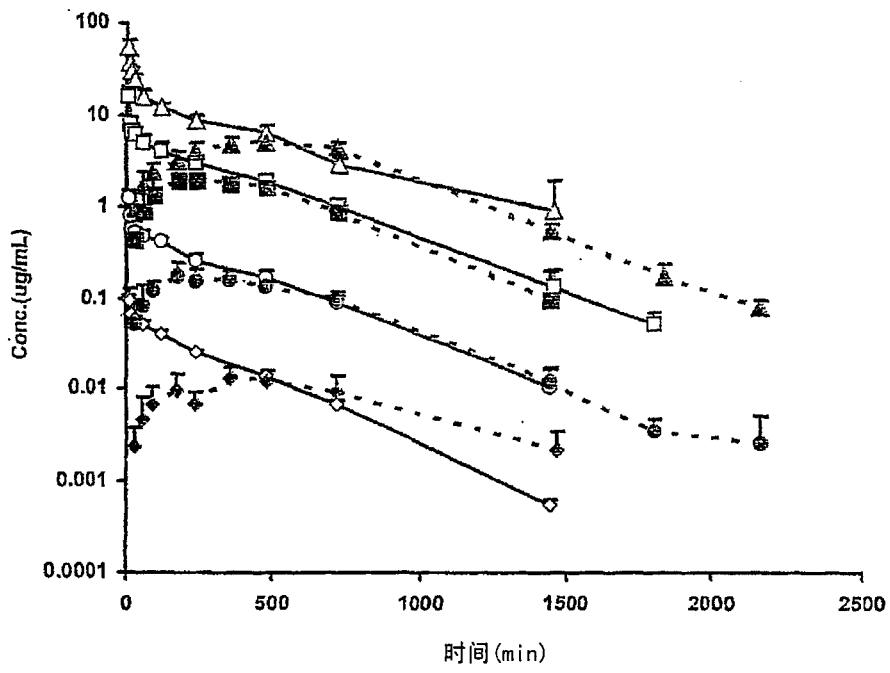


图27

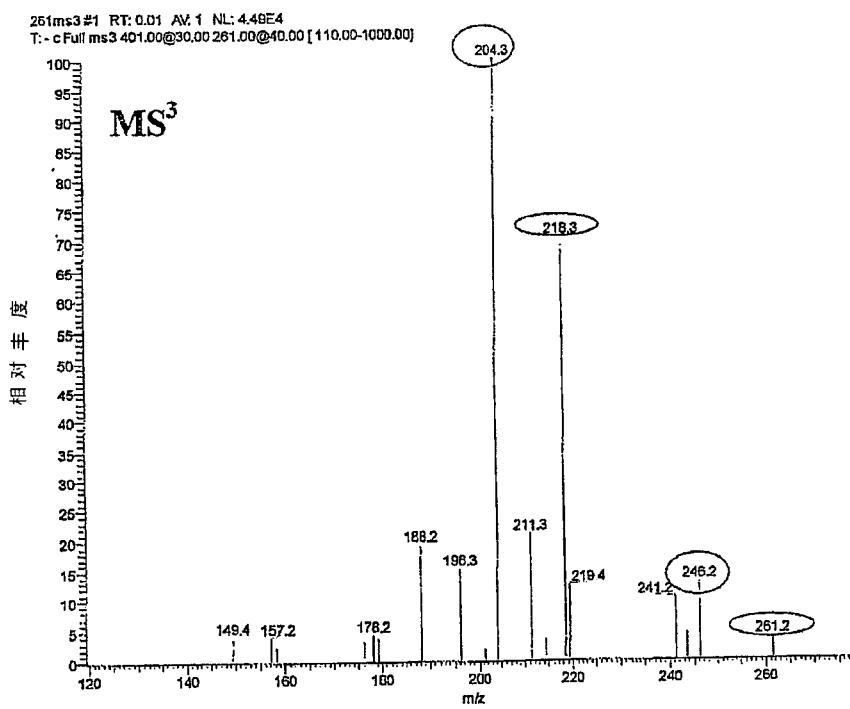
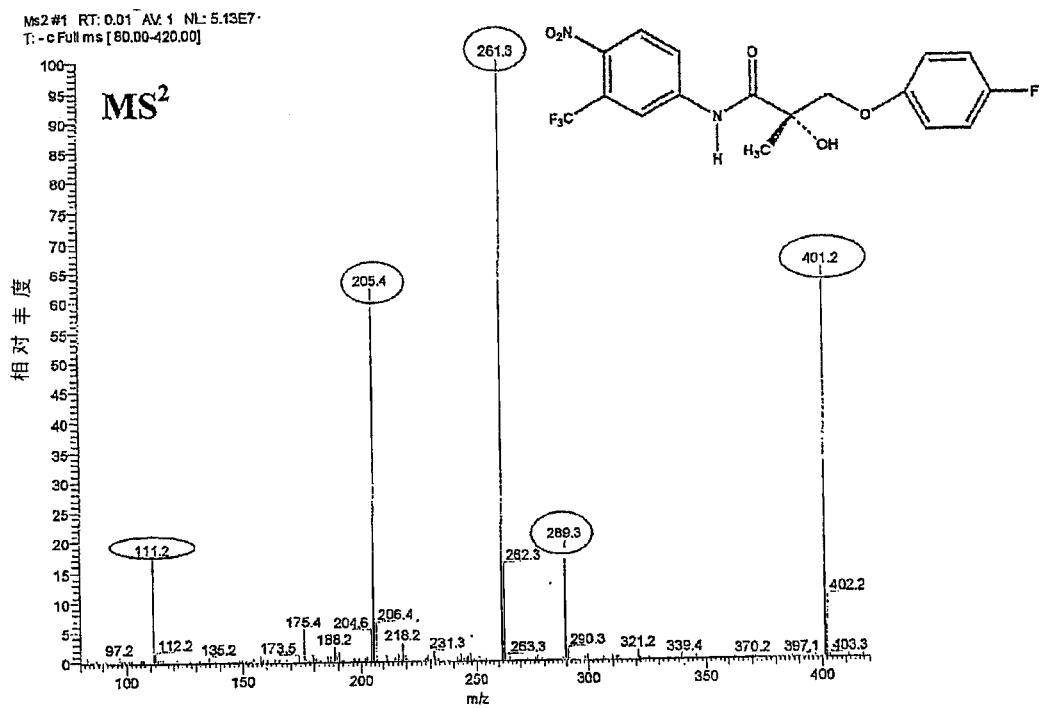


图28

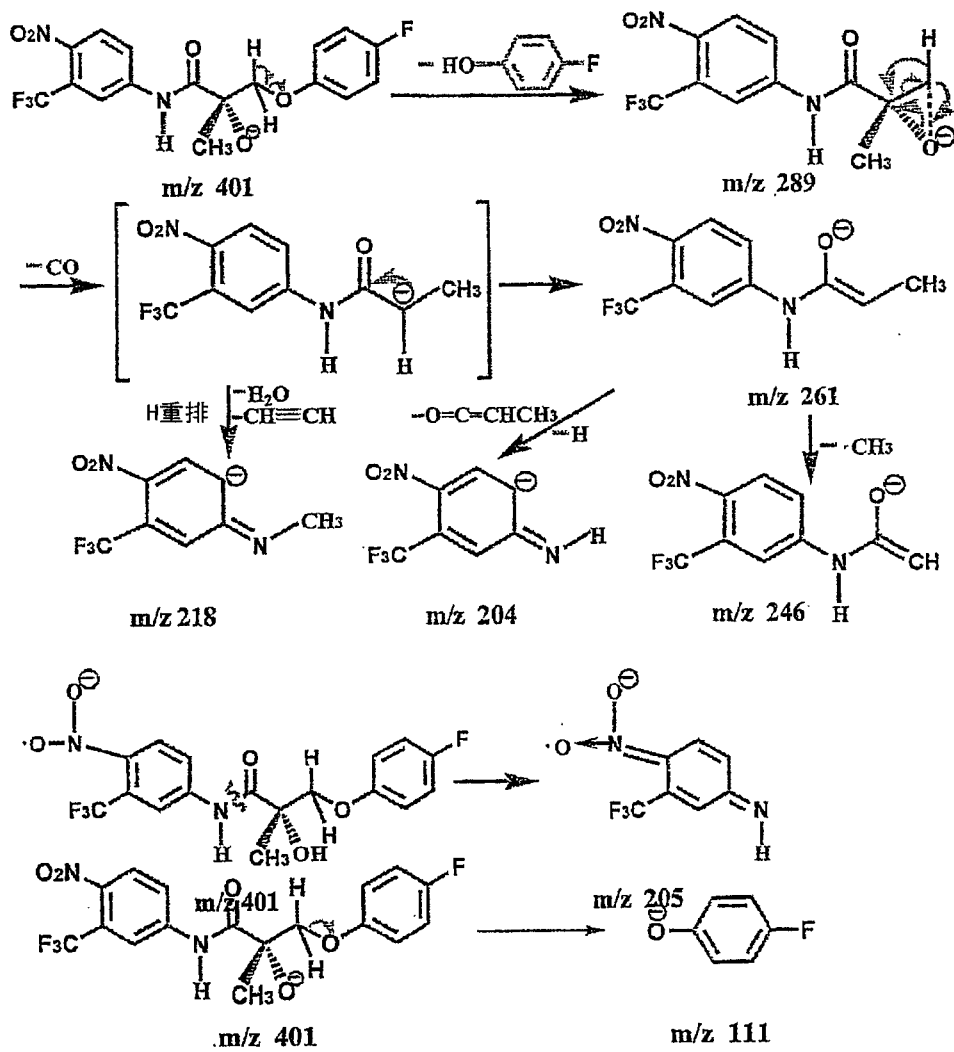


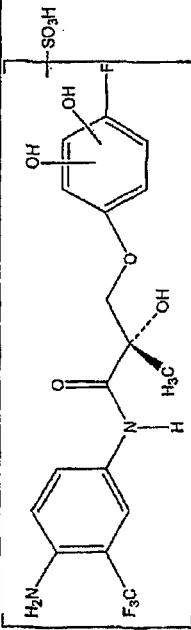
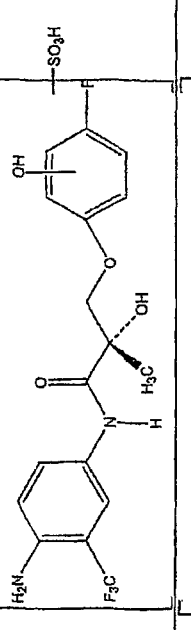
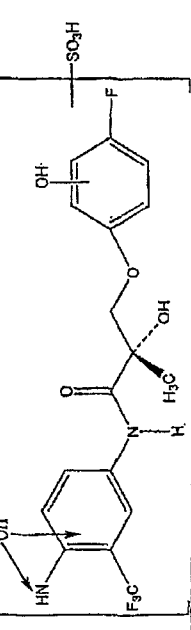
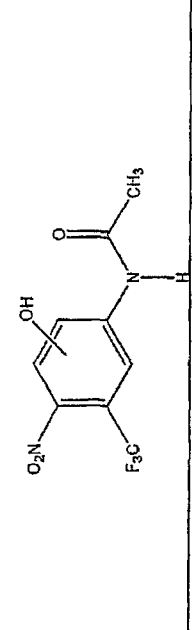
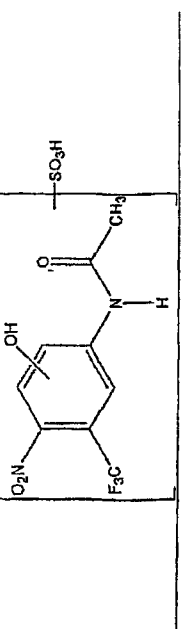
图29

在0-24hr的大鼠尿中鉴定出的S-1代谢物(使用流动相系统1)

代谢物 ID	保留时间 (min)	[M-H] ⁻ m/z	MS/MS m/z	推断的结构
1	15.56	213	111	
2	20.87	591	415; MS ³ of 415 → 287, 127 MS ⁴ of 287 → 229, 215, 203, 197 403;	
3	21.66	579	MS ³ of 403 → 143	
4	21.69	563	387; MS ³ of 387 → 259, 245, 127	
5	28.17	575	399; MS ³ of 399 → 287, 259, 203 MS ⁴ of 287 → 229	

图30

代谢物 ID	保留时间 (min)	[M-H] ⁻ m/z	MS/MS m/z	推断的结构
6	29.00	301	221; MS ³ of 221 → 191, 171	
8	29.18	415	287, 203, 127; MS ³ of 287 → 229, 215, 197 MS ⁴ of 229 → 172 435, 371, 259, 231, 201, 175	
9	29.44	547	MS ³ of 435 → 277, 231, 175 MS ⁴ of 277 → 231, 171	
10	30.59	467	387, 127; MS ³ of 387 → 259, 127	
10	31.86	415	287, 259, 229, 203; MS ³ of 287 → 244, 229, 215, 203, 189 MS ⁴ of 229 → 201, 189	

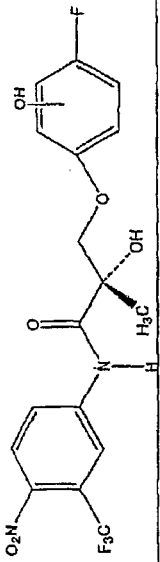
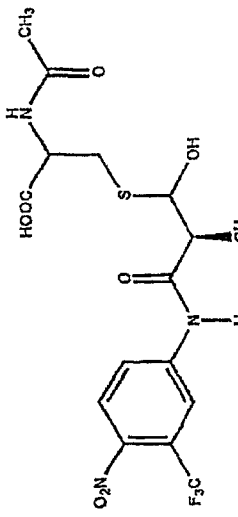
代谢物 ID	保留时间 (min)	[M-H] ⁻ m/z	MS/MS m/z	推断的结构
11	32.30	483	403; MS ³ of 403 → 143	
12	32.43	467	387; MS ³ of 387 → 259, 127	
13	34.65	483	403; MS ³ of 403 → 275, 259, 221 MS ⁴ of 275 → 255, 201	
14	34.90	263	221; MS ³ of 221 → 191, 171	
15	35.03	343	263; MS ³ of 263 → 221 MS ⁴ of 221 → 191, 171	

代谢物 ID	保留时间 (min)	[M-H] ⁻ m/z	MS/MS m/z	推断的结构
16	36.5	467	387; MS ³ of 387 → 275, 255, 191, 171, 111 MS ⁴ of 275 → 255, 191	
17	36.66	387	307, 275, 259, 127	
18	37.20	263	221; MS ³ of 221 → 191, 171	
19	38.07	513	433; MS ³ of 433 → 307, 289, 261, 227, 205, 143	
20	38.55	415	287, 127; MS ³ of 287 → 259, 245, 229, 217, 203, 201 MS ⁴ of 229 → 189	

代谢物 ID	保留时间 (min)	[M-H] ⁻ m/z	M/S/MS m/z	推断的结构
21	38.69	387	259, 127; MS ³ of 259 → 229, 201, 175	
22	39	513	433; MS ³ of 433 → 275, 204	
23	40.43	513	433; MS ³ of 433 → 289, 261, 227, 205, 143	
24	40.91	577	401; MS ³ of 401 → 289, 261, 205 MS ⁴ of 261 → 246, 218, 204, 190	
25	41.74	247		

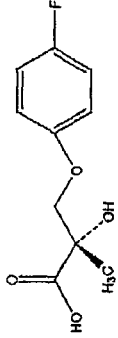
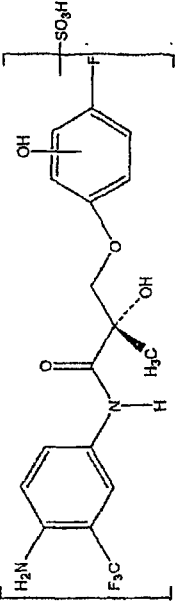
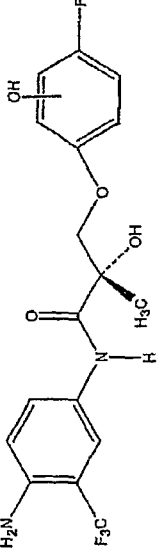
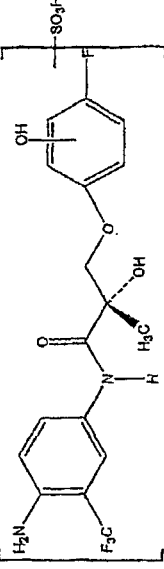
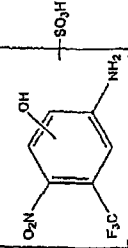
代谢物 ID	保留时间 (min)	[M-H] ⁻ m/z	MS/MS m/z	推断的结构
26	41.89	513	433; MS ³ of 433 → 289, 275, 227, 205, 183, 143	
27	42.78	403	143	
28	43.64	385	273, 245, 225, 217, 189 MS ³ of 245 → 225, 205, 203 MS ⁴ of 225 → 205	
29	44.5	387	259, 201, 127;	
30	45.49	497	417; MS ³ of 417 → 289, 205, 127 MS ⁴ of 205 → 175	

代谢物 ID	保留时间 (min)	[M-H] ⁻ m/z	MS/MS m/z	推断的结构
31	45.52	387	275, 255, 191, 111; MS ³ of 275 → 255	
32	46.62	371	259, 231, 111; MS ³ of 259 → 229, 201, 175	
33	47.31	385	273, 245, 225, 217, 189; MS ³ of 245 → 225, 203	
34	47.9	563	307; MS ³ of 307 → 289, 261, 205	
35	51.50	417	289, 261, 205; MS ³ of 289 → 261 MS ⁴ of 261 → 246, 218, 204, 190	

代谢物 ID	保留时间 (min)	[M-H] ⁻ m/z	MS/MS m/z	推断的结构
36	55.55	417	305, 289, 261, 205, 127 MS ² of 261 → 246, 218, 204, 190	
37	66.26	452	407, 289, 261 MS ³ of 289 → 261, 244, 233, 231, 205	

加粗的数是相应的MS谱中的基础质量峰的m/z值

在0-24hr的大鼠粪便中鉴定出的S-1代谢物(使用流动相系统2)

代谢物 ID	保留时间 (min)	[M-H] ⁻ m/z	MS/MS	推断的结构
1	26.62	213	111	
9	29.40	467	387, 127; MS ³ of 387 → 259, 201, 175 127 MS ⁴ of 259 → 229, 209, 201, 175	
17	32.34	387	259, 127; MS ³ of 259 → 201, 175	
12	32.55	467	387, 127; MS ³ of 387 → 259, 201, 175 127 MS ⁴ of 259 → 230, 201, 175	
6	38.	301	221; MS ³ of 221 → 191, 171	

代谢物 ID	保留时间 (min)	[M-H] ⁻ m/z	MS/MS m/z	推断的结构
38	38.14	467	387, 127; MS ³ of 387 → 259, 201, 175 127 MS ⁴ of 259 → 229, 209, 201, 175	
21	39.01	387	259, 201, 127; MS ³ of 259 → 229, 201, 175	
39	40.18	451	371; MS ³ of 371 → 259, 231, 201, 175, 111 MS ⁴ of 259 → 201, 175	
29	44.84	387	259, 127;	
31	45.52	387	275, 255, 111; MS ³ of 275 → 255	

代谢物 ID	保留时间 (min)	[M-H] ⁻ m/z	MS/MS m/z	推断的结构
32	47.19	371	259, 231, 201, 175, 111; MS ² of 259 → 229, 201, 175	
24	50.01	577	401, 307, 261, 205, 175	
40	52.56	307	289, 245, 205; MS ² of 289 → 245, 204	

加粗的数是相应的MS谱中的基础质量峰的m/z值

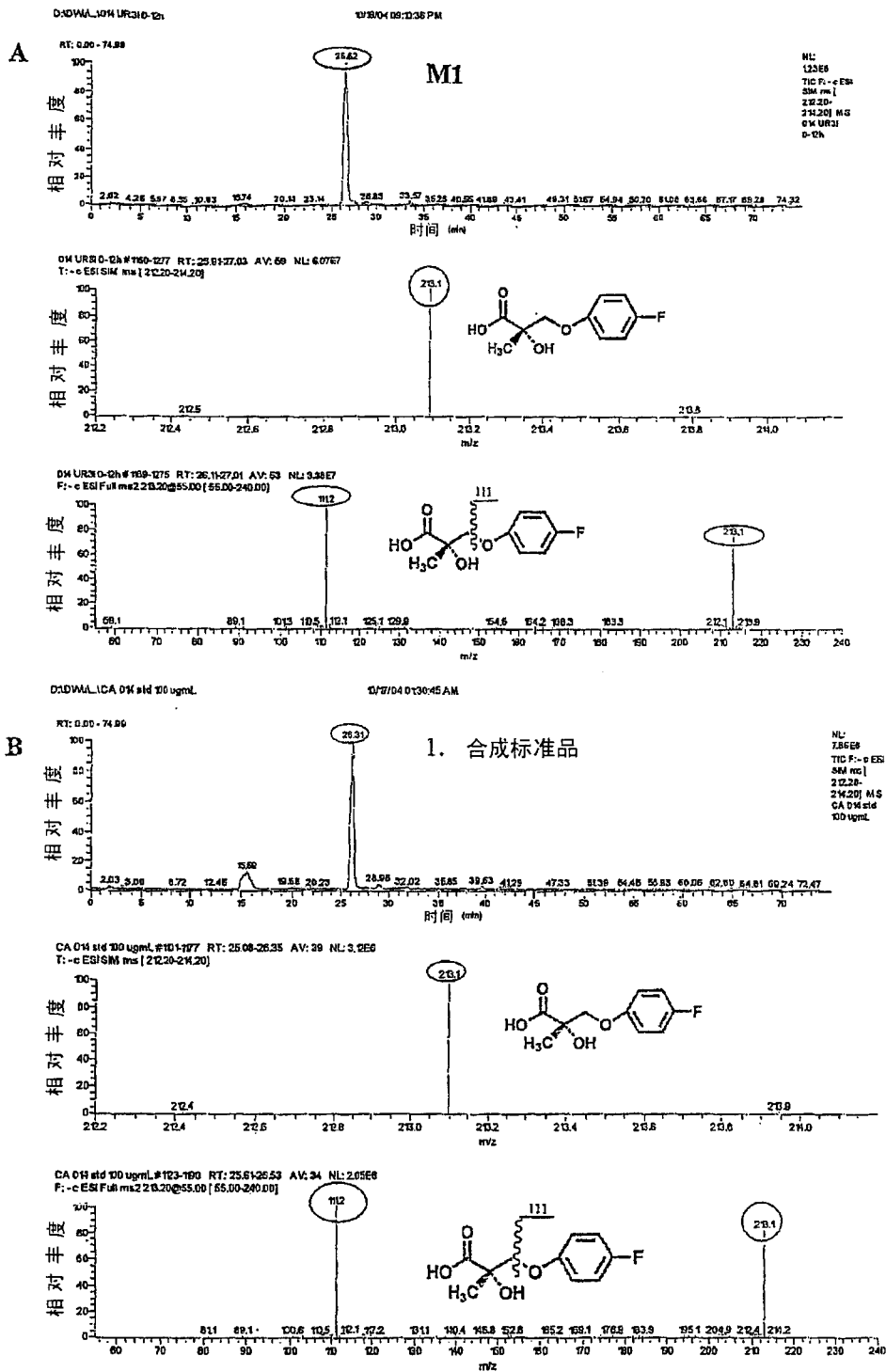


图31

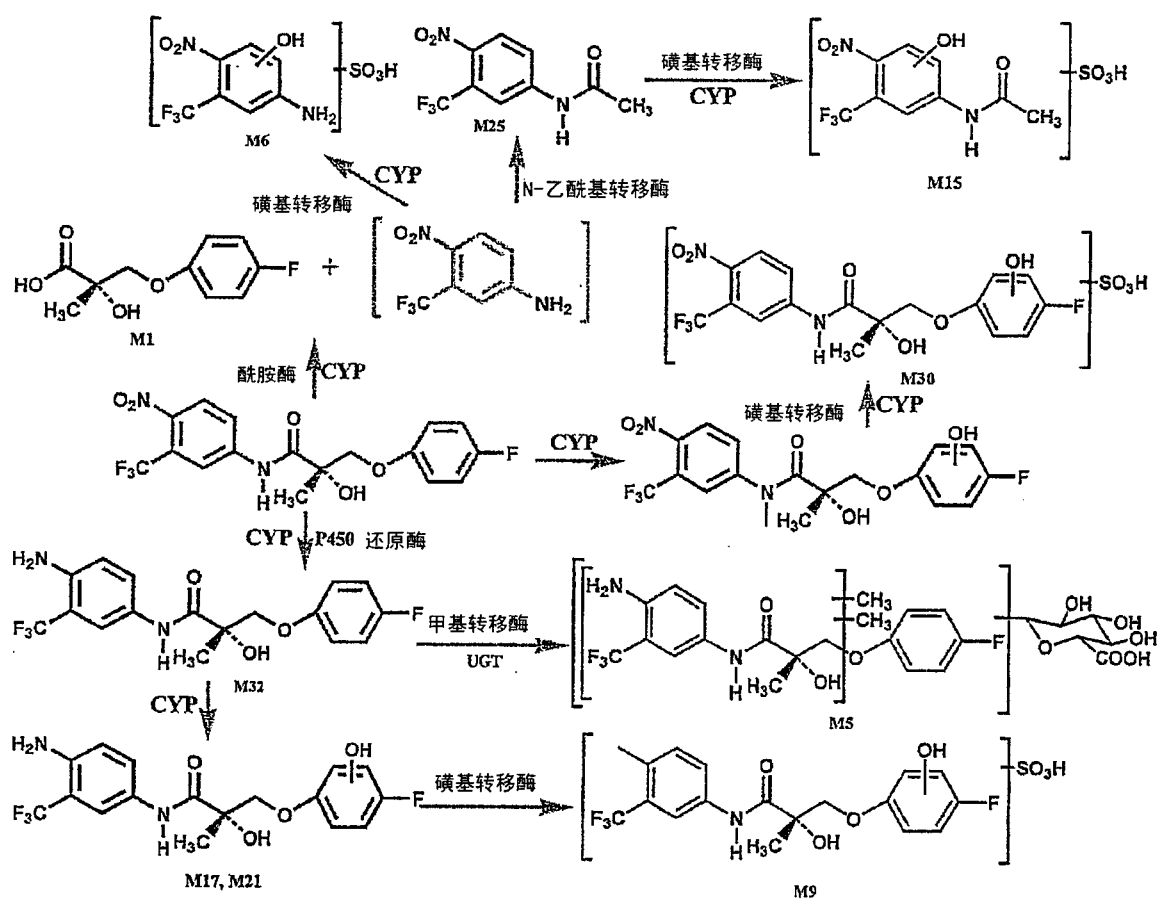


图32

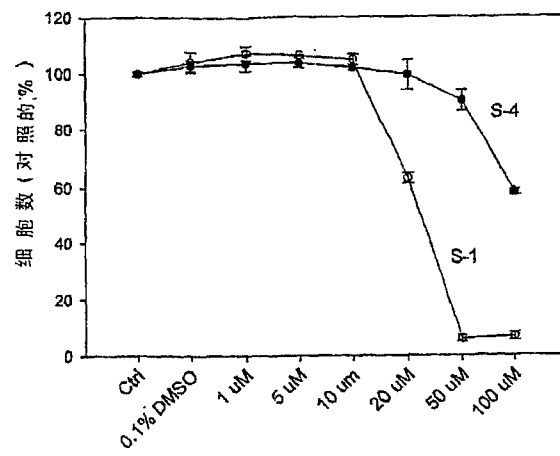


图33

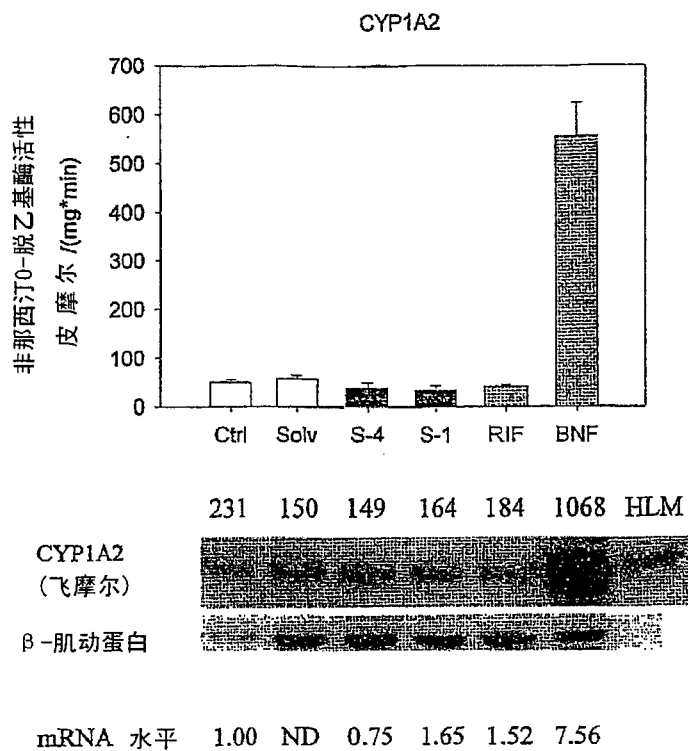


图34

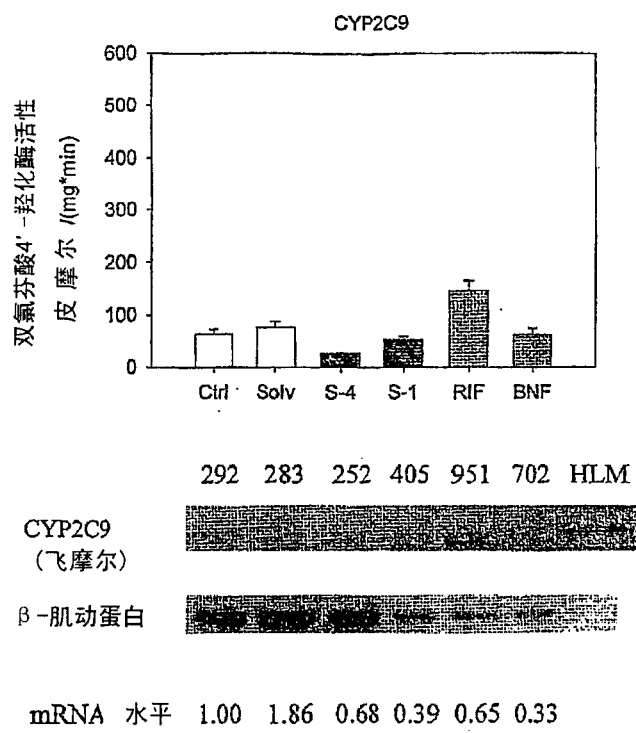


图 35

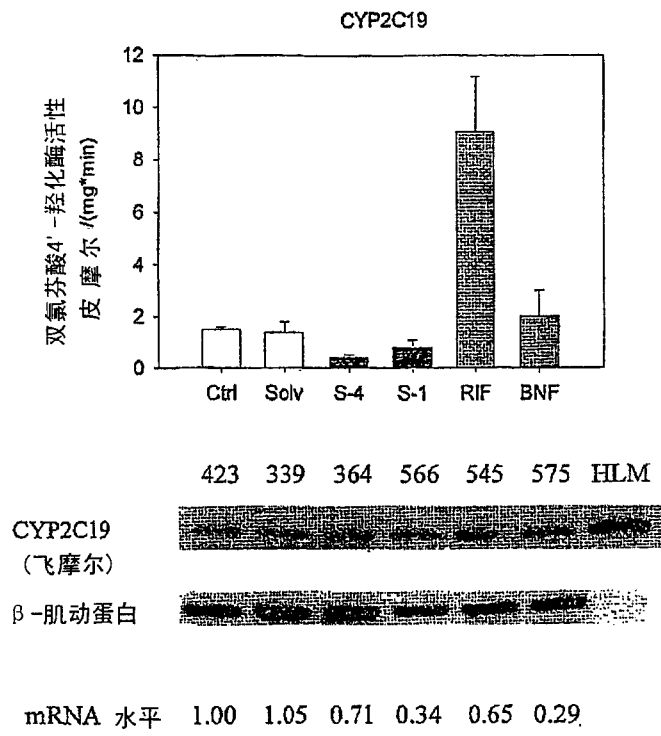


图 36

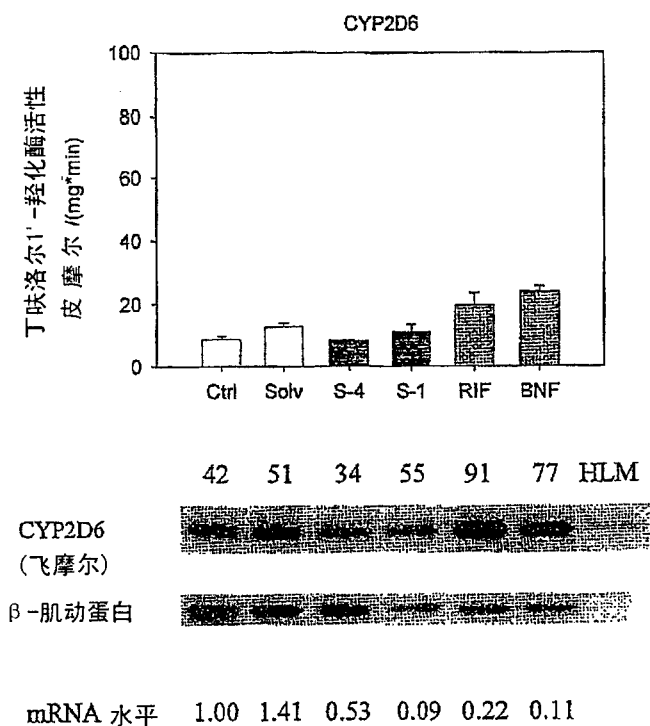


图37

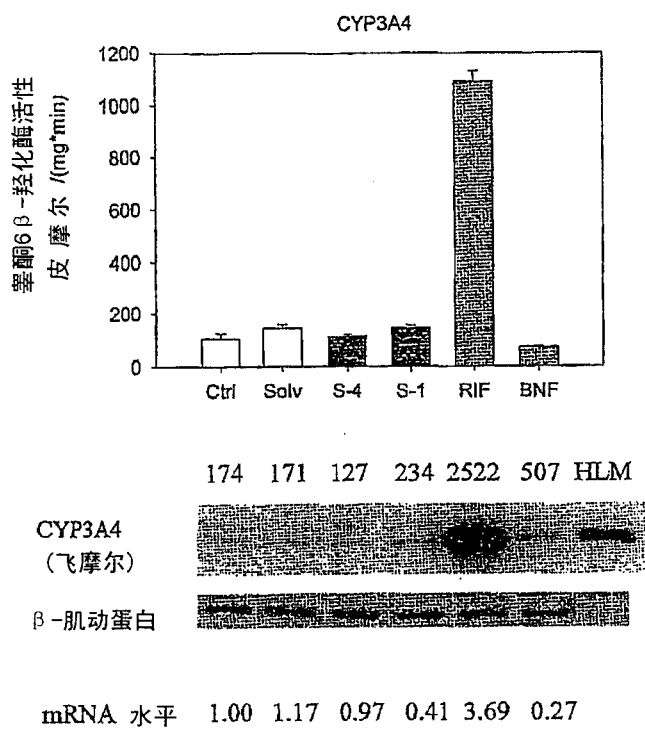


图38