



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105287473 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 03

---

(21) 申请号 201510691499. X *A61P 25/00*(2006. 01)  
(22) 申请日 2011. 06. 02 *A61P 25/14*(2006. 01)  
(30) 优先权数据 *A61P 21/00*(2006. 01)  
61/350, 804 2010. 06. 02 US  
(62) 分案原申请数据  
201180033875. 6 2011. 06. 02  
(71) 申请人 扩散药品有限公司  
地址 美国弗吉尼亚州  
(72) 发明人 约翰·L·盖纳 R·穆雷  
(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127  
代理人 丁香兰 庞东成  
(51) Int. Cl.  
*A61K 31/202*(2006. 01)  
*A61K 47/40*(2006. 01)  
*A61P 3/00*(2006. 01)  
*A61P 35/00*(2006. 01)  
*A61P 25/16*(2006. 01)

权利要求书2页 说明书14页 附图5页

---

(54) 发明名称

包含双极性反式类胡萝卜素的组合物及其应用

(57) 摘要

本发明涉及包含双极性反式类胡萝卜素的组合物及其应用,所述组合物包含:i) 双极性反式类胡萝卜素,ii) 环糊精,和 iii) 包衣。本发明还涉及所述组合物在制备用于治疗患有代谢综合征的哺乳动物的药物中的应用,在制备用于治疗患有癌症的哺乳动物的药物中的应用,以及在制备用于治疗患有神经变性疾病的哺乳动物的药物中的应用。

1. 包含双极性反式类胡萝卜素的药物组合物在制备用于治疗患有代谢综合征的哺乳动物的药物中的应用, 其中, 对所述哺乳动物施用治疗有效量的所述药物, 而且, 所述药物组合物包含:

i) 双极性反式类胡萝卜素, 所述双极性反式类胡萝卜素具有下式的结构:



其中:

Y = 相同或不同的阳离子;

Z = 与阳离子相连的极性基团, Z 相同或不同; 和

TCRO = 反式类胡萝卜素骨架, 其具有共轭的碳-碳双键和单键, 并具有侧基 X, 其中侧基 X 相同或不同, 并且是: (1) 具有 10 个以下碳原子的线性或支化烃基; 或 (2) 卤素;

ii) 环糊精, 和

iii) 包衣, 所述包衣避免所述双极性反式类胡萝卜素在哺乳动物胃部的酸性条件下转化为顺式异构体。

2. 基本上由双极性反式类胡萝卜素构成的药物组合物在制备用于治疗患有癌症的哺乳动物的药物中的应用, 其中, 对所述哺乳动物施用治疗有效量的所述药物并且不对所述哺乳动物使用辐射, 并且药物组合物基本上由下述成分构成:

i) 双极性反式类胡萝卜素, 所述双极性反式类胡萝卜素具有下式的结构:



其中:

Y = 相同或不同的阳离子;

Z = 与阳离子相连的极性基团, Z 相同或不同; 和

TCRO = 反式类胡萝卜素骨架, 其具有共轭的碳-碳双键和单键, 并具有侧基 X, 其中侧基 X 相同或不同, 并且是: (1) 具有 10 个以下碳原子的线性或支化烃基; 或 (2) 卤素;

ii) 环糊精, 和

iii) 包衣, 所述包衣避免所述双极性反式类胡萝卜素在哺乳动物胃部的酸性条件下转化为顺式异构体。

3. 包含双极性反式类胡萝卜素的药物组合物在制备用于治疗患有神经变性疾病的哺乳动物的药物中的应用, 其中, 所述神经变性疾病选自帕金森氏症、肌萎缩侧索硬化、弗里德希氏共济失调、亨廷顿舞蹈症、路易体病和脊髓性肌萎缩组成的组, 并且对所述哺乳动物施用治疗有效量的所述药物, 其中, 所述药物组合物包含:

i) 双极性反式类胡萝卜素, 所述双极性反式类胡萝卜素具有下式的结构:



其中:

Y = 相同或不同的阳离子;

Z = 与阳离子相连的极性基团, Z 相同或不同; 和

TCRO = 反式类胡萝卜素骨架, 其具有共轭的碳-碳双键和单键, 并具有侧基 X, 其中侧基 X 相同或不同, 并且是: (1) 具有 10 个以下碳原子的线性或支化烃基; 或 (2) 卤素;

ii) 环糊精, 和

iii) 包衣, 所述包衣避免所述双极性反式类胡萝卜素在哺乳动物胃部的酸性条件下转

化为顺式异构体。

4. 如权利要求 1 ~ 3 中任一项所述的应用,其中,所述双极性反式类胡萝卜素是盐。
5. 如权利要求 1 ~ 3 中任一项所述的应用,其中,所述双极性反式类胡萝卜素是 TSC。
6. 如权利要求 1 ~ 3 中任一项所述的应用,其中,所述包衣是肠溶包衣。
7. 如权利要求 1 ~ 3 中任一项所述的应用,其中,所述包衣是在肠道内将释放所述双极性反式类胡萝卜素的包衣。
8. 如权利要求 1 ~ 3 中任一项所述的应用,其中,所述包衣是丙烯酸酯聚合物。
9. 如权利要求 1 ~ 3 中任一项所述的应用,其中,所述环糊精选自由  $\alpha$ -环糊精、 $\beta$ -环糊精和  $\gamma$ -环糊精组成的组。
10. 如权利要求 1 ~ 3 中任一项所述的应用,其中,所述组合物为片剂、丸剂或胶囊的形式。

## 包含双极性反式类胡萝卜素的组合物及其应用

[0001] 本申请是申请日为 2011 年 06 月 02 日的 PCT 国际申请 PCT/US2011/000997 的分案申请,原申请为发明专利申请,进入国家阶段的申请号为 201180033875.6,名称为“双极性反式类胡萝卜素的口服制剂”。

[0002] 本申请要求 2010 年 6 月 2 日递交的美国临时专利申请第 61/350,804 号的优先权,并通过引用将该临时申请的全部内容并入本文。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及扩散促进化合物的制剂。本发明的组合物通常包含双极性反式类胡萝卜素、环糊精和包衣。所包含的组合物用口服递送的 pH 响应型化合物进行肠溶包衣。

### 背景技术

[0004] 通常认为经口服递送疗法是对患者进行药物递送的最为常用的方法,这是因为这一途径通常增大了患者的依从性,减少与注射有关的副作用数量,并为使用者提供便利。这种施用途径非常有利于对慢性病患者给药。

[0005] 类胡萝卜素是一类由类异戊二烯单元构成的碳氢化合物。该分子的骨架由共轭的碳-碳双键和单键组成,且还可以具有侧基。已知藏花酸和反式藏花酸钠 (TSC) 能够增大氧在水溶液中的扩散性。

[0006] 美国专利第 6,060,511 号涉及反式藏花酸钠 (TSC) 及其用途。该专利覆盖了 TSC 的多种用途,例如改善氧的扩散性以及治疗出血性休克。

[0007] 美国专利申请第 10/647,132 号涉及用于制造双极性反式类胡萝卜素盐 (BTC) 的合成方法以及它们的使用方法。

[0008] 美国专利申请第 11/361,054 号涉及改进的 BTC 合成法以及 BTC 的新用途。

[0009] 美国专利申请第 12/081,236 号涉及双极性反式类胡萝卜素作为预治疗物的用途,和在外周血管疾病治疗中的用途。

[0010] 美国专利申请第 12/289,713 号涉及一类促进小分子扩散的新疗法。

[0011] 美国临时申请第 61/213,575 号涉及扩散促进化合物与溶栓药一起应用。

[0012] 已经公开了多种双极性反式类胡萝卜素制剂。参见共同拥有的美国专利申请第 10/647,132 号和美国专利申请第 11/361,054 号。

### 发明内容

[0013] 本发明的药物组合物包含扩散促进化合物、环糊精和包衣。本发明还涉及用于口服递送双极性反式类胡萝卜素的药物组合物的形成方法,所述方法包括使双极性反式类胡萝卜素与环糊精混合、将所述混合物添加至胶囊中或制成片剂、并添加包衣(有利的是肠溶包衣)。本发明中还包括哺乳动物体内氧的扩散性的提高方法,和患有以缺氧为特征的疾病或病况的哺乳动物的治疗方法,所述以缺氧为特征的疾病或病况例如包括缺血、癌症、创伤性脑损伤、呼吸道疾病、出血性休克、心血管病、多器官衰竭、动脉硬化症、PAD、PVD、心肌

梗塞、肺气肿、哮喘、ALI、ARDS、COPD、高血压、脑水肿、乳头状瘤、脊髓损伤、中枢神经系统的病况（特别是以神经变性为特征的疾病）和代谢综合征及其并发症。

### 附图说明

[0014] 图 1 示出了在实施例 2 中直接对 (●) 回肠 (原位给药) 和 (○) 胃施用 2.9mg/kg TSC 后的平均 TSC 血浆浓度。

[0015] 图 2 示出了在实施例 4 中  $\gamma$ -环糊精对大鼠空肠内的 TSC 吸收的影响 ( $\gamma$ -环糊精对 TSC 的血液吸收的影响)。

[0016] 图 3 示出了在实施例 4 中 TSC 原位施用至小肠后的 pk 曲线, 即 TSC 血浆浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ ) 与施用后时间 (分钟) 的关系。

[0017] 图 4 示出了在实施例 5 中, TSC- $\gamma$ -环糊精混合物中 TSC 剂量对  $C_{\text{max}}$  的影响, 即 TSC 剂量对于环糊精促进效果的影响。

[0018] 图 5 示出了在实施例 6 中, 在使大鼠口服施用包含在明胶胶囊 (包含相同量的 TSC, 约 4mg) 中的干粉后 7 个小时的时间内血流中的浓度。

[0019] 图 6 示出了在实施例 6 中, 采用未包衣的胶囊以及具有 Eudragits 包衣的胶囊所获得的吸收百分比的改善 (与仅有 TSC 相比)。

[0020] 图 7 示出了在实施例 7 中, 大鼠出血性中风模型中血肿周围的神经元细胞死亡的情况。

[0021] 图 8 示出了在实施例 7 中, 大鼠的帕金森氏症模型中  $10\ \mu\text{g}$  6-OHDA 预处理对神经元死亡的影响。

[0022] 图 9 示出了在实施例 7 中, 大鼠的帕金森氏症模型中  $5\ \mu\text{g}$  6-OHDA 预处理对神经元死亡的影响。

[0023] 图 10 示出了在实施例 7 中, 注射  $5\ \mu\text{g}$  6-OHDA 后黑质未治疗部分中活神经元的个数。

[0024] 图 11 示出了在实施例 8 中, C57B 小鼠肺中第 18 天的 B-16 肿瘤计数的结果 (中值数)。

[0025] 图 12 示出了在实施例 8 中, C57B 小鼠肺中第 18 天的 B-16 肿瘤计数的结果 (平均值  $\pm$  标准方差)。

### 具体实施方式

[0026] 尽管反式藏花酸钠 (TSC) 等双极性反式类胡萝卜素 (BTC) 是类胡萝卜素属化合物中的一员, 但其却不能按照与以胶囊或丸剂形式销售的其他类胡萝卜素 (例如,  $\beta$ -胡萝卜素或维生素 A) 类似的方式那样口服给药。在开发 BTC 化合物的口服制剂时必须考虑的两个因素是 pH 和溶解度, 这两个因素是与其他类胡萝卜素化合物完全不同的。用于配制其他类胡萝卜素化合物的方法完全不能应用于 TSC 等化合物。

[0027] TSC 在酸性条件 (例如, 在胃中存在的那些条件) 下沉淀。这种固体物质在胃的酸性环境中实际上是不溶的。TSC 在酸性条件下不稳定, 并且将转化为能够沉淀的顺式异构体。已经设计出在胃苛刻的酸性环境中保护 TSC, 并在更为有利的 pH 区域内释放 TSC 的系统。小肠内确实存在更为有利的 pH。原位闭环研究显示, 与施用至胃部相比, 当将 TSC 直接

施用至小肠时生物利用度增大。参见以下的实施例。据认为 TSC 的有效性依赖于体内得到的 TSC 浓度水平。通过口服施用 TSC 能够延长 TSC 的有效性。

[0028] 双极性反式类胡萝卜素的片剂包含通常用于制造片剂的赋形剂。有利的是，片剂还具有位于其上的肠溶包衣，因而片剂将在 pH 更高 (>5.5) 的消化道区域而非酸性胃部中溶解。

#### [0029] 本发明的组合物

[0030] 本发明的组合物均制成为药用级，即，药物组合物。这样的制剂可包含本领域的技术人员熟知的药学上可接受的载体和其他的治疗剂。有利的是，所述制剂不包含抑制扩散促进化合物改善扩散性能力的化合物。

[0031] 本发明的组合物包含 a) 扩散促进化合物，b) 环糊精，和 c) 包衣。作为选择，可以使用 pH 响应型载体（即，TSC 分散 / 保持在聚合物基质中），或延时释放体系（也称为缓释、控释等）。

#### [0032] A. 扩散促进化合物

[0033] 本发明的扩散促进化合物包括美国专利申请第 10/647, 132 号、美国专利申请第 11/361, 054 号、美国专利申请第 12/081, 236 号和美国专利申请第 12/289, 713 号中描述的那些化合物，在此通过引用将各篇文献全文并入。

[0034] 本发明的扩散促进化合物是反式类胡萝卜素，包括反式类胡萝卜素的二酯、二醇、二酮和二酸，双极性反式类胡萝卜素 (BTC) 和双极性反式类胡萝卜盐 (BTCS)。所包括的双极性反式类胡萝卜素化合物具有下式：

[0035] YZ-TCRO-ZY

[0036] 其中：

[0037] Y = 阳离子

[0038] Z = 与阳离子相连的极性基团，和

[0039] TCRO = 反式类胡萝卜素骨架，

[0040] 例如 TSC。

[0041] 更具体而言：

[0042] Y (在两端可以相同或不同) = H 或非氢阳离子，优选  $\text{Na}^+$  或  $\text{K}^+$  或  $\text{Li}^+$ 。Y 有利的是一价金属离子。Y 还可以是有机阳离子，例如  $\text{R}_4\text{N}^+$ 、 $\text{R}_3\text{S}^+$ ，其中 R 是 H 或  $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$ ，其中 n 为 1 ~ 10，有利的是 1 ~ 6。例如，R 可以是甲基、乙基、丙基或丁基。

[0043] Z (在两端可以相同或不同) = 与 H 或阳离子相连的极性基团。可选地包括类胡萝卜素（或类胡萝卜素相关化合物）上的末端碳，该基团可以是羧基 (COO) 或 CO 基团（例如，酯基、醛基或酮基）或羟基。该基团还可以是硫酸基 ( $\text{OSO}_3$ ) 或单磷酸基 ( $\text{OPO}_3$ )、( $\text{OP}(\text{OH})\text{O}_2$ )、二磷酸基、三磷酸基或其组合。该基团还可以是 COOR 的酯基，其中 R 为  $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$ 。

[0044] TCRO = 反式类胡萝卜素或类胡萝卜素相关的骨架（有利的是少于 100 个碳），该骨架是线性的，具有侧基（在下文定义）且通常包含“共轭的”或交替的碳-碳双键和单键（在一个实施方式中，如在番茄红素中那样，TCRO 未完全共轭）。侧基 (X) 通常为甲基，但也可以是下述其它基团。在一个有利的实施方案中，该骨架单元的连接方式使得其排列在分子的中心翻转。环绕碳-碳双键的 4 个单键都位于同一平面。如果侧基位于碳-碳双键的同一侧，则该基团被称为顺式（也称为“Z”）；如果侧基位于该碳-碳双键的异侧，则该基

团被称为反式（也称为“E”）。在本案中，异构体将被称为顺式和反式。

[0045] 本发明的化合物是反式的。顺式异构体通常是有害的并导致扩散性不会增加。在一个实施方案中，顺式异构体可以在骨架保持线性时使用。侧基的位置可以相对于分子的中心点对称，也可以不对称，使得分子的左侧看上去与分子的右侧在侧基类型或其相对于中心碳的空间关系上并不相同。

[0046] 侧基 X（可以相同或不同）是氢（H）原子、具有 10 个以下碳（有利的是 4 个以下，并可选地包含卤素）的线性或支化烃基或卤素。X 还可以是酯基（COO）或乙氧 / 甲氧基。X 的实例是甲基（CH<sub>3</sub>）、乙基（C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>）、苯基或环上具有或不具有侧基的单芳香环结构、诸如 CH<sub>2</sub>Cl 等含卤素的烷基（C1-C10）、如 Cl 或 Br 等卤素或甲氧基（OCH<sub>3</sub>）或乙氧基（OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>）。侧基可以相同或不同，但所用侧基必须使骨架保持线性。

[0047] 虽然存在许多天然的类胡萝卜素，但并不存在类胡萝卜素盐。共同拥有的美国专利第 6,060,511 号涉及反式藏花酸钠（TSC），在此通过引用的方式并入其整体。通过使天然存在的藏红花与氢氧化钠反应，随后进行主要选择反式异构体的提取而制得 TSC。

[0048] 类胡萝卜素或类胡萝卜素盐的顺式异构体和反式异构体的存在可以通过观察溶于水溶液中的类胡萝卜素样品的紫外 - 可见光谱来确定。给定光谱后，在 380nm ~ 470nm 可见光的波长范围内出现最高峰的吸光度（该数值取决于所用溶剂和 BTC 或 BTCS 的链长）。侧基的加入或链长的不同都会改变该峰值吸光度，但本领域技术人员将认识到，可见光范围内存在的吸光度峰对应于这些分子的共轭骨架结构，上述波长范围内的峰值吸光度除以 UV 波长范围 220nm ~ 300nm 内出现的峰的吸光度可以用来确定反式异构体的纯度水平。当反式类胡萝卜素二酯（TCD）或 BTCS 溶于水时，可见光波长范围的最高峰将位于 380nm ~ 470nm（取决于确切的化学结构、骨架长度和侧基），UV 波长范围的峰将位于 220nm ~ 300nm。根据 M. Craw 和 C. Lambert, *Photochemistry and Photobiology*, Vol. 38(2), 241-243 (1983)（在此通过引用并入其全部内容），计算结果（在分析藏花酸时）为 3.1，纯化后提高到 6.6。

[0049] 对美国专利申请第 10/647,132 号和美国专利申请第 11/361,054 号中描述的合成 TSC 进行 Craw 和 Lambert 分析，该比值为大于 7.0（例如，7.0 ~ 8.5），有利的是大于 7.5（例如，7.5 ~ 8.5），最有利的是大于 8。合成的材料是“更纯的”或高度纯化的反式异构体。

[0050] 有利的是，所述反式类胡萝卜素是藏花酸、藏花素、双极性反式类胡萝卜素（BTC）盐如 TSC，或是类胡萝卜素的二酯、醇或酸。

[0051] B. 环糊精

[0052] 已经提出了许多赋形剂来增加药物在胃肠道的生物利用度，所述赋形剂例如包括表面活性剂、螯合剂、二醇类、聚乙二醇等；不过，环糊精与双极性反式类胡萝卜素一起配合极好。

[0053] 在共同拥有的申请美国申请第 11/361,054 号中可见环糊精与双极性反式类胡萝卜素组合的详细描述，在此通过引用并入其全部内容。

[0054] 有利的是，双极性反式类胡萝卜素是包含反式类胡萝卜素和环糊精（例如， $\alpha$ -环糊精、 $\beta$ -环糊精或  $\gamma$ -环糊精）的组合物的形式。所述环糊精可以是羟基丙基- $\beta$ -环糊精或 2-羟基丙基- $\gamma$ -环糊精。在另一实施方式中，所述组合物还包含甘露醇或盐水。在又一实施方式中，所述组合物还包含诸如碳酸氢盐或甘氨酸等调节 pH 的化合物。

[0055] 有利的是,双极性反式类胡萝卜与环糊精的比率不超过 1:10。有利的是,不超过 1:4,例如,2:1、1:1 或 1:4。

[0056] C. 包衣

[0057] 肠溶包衣是对口服药物施加的屏障,用来控制在消化系统内吸收的位置。肠溶性指的是小肠,因此肠溶包衣阻止药物在达到小肠前释放。多数肠溶包衣通过在胃中的高酸性 pH 下显示出稳定表面,而该表面在弱酸性(相对偏碱性)pH 下迅速分解而起作用。例如,肠溶包衣将不溶解在胃的酸性汁液(pH 为 1 ~ 3)中,但将溶解在小肠内存在的较高 pH(超过 pH 5.5)下。用于肠溶包衣的材料包括脂肪酸、蜡和虫胶以及塑料。

[0058] 双极性反式类胡萝卜素在酸性条件下沉淀。对于该类型的药物,可以在制剂上添加肠溶包衣以保护活性物质免于接触胃酸,而将活性物递送至其更容易溶解的碱性 pH 环境(肠内的 pH 5.5 及以上)中,并能够提供其所需的作用。

[0059] 据认为 TSC 的有效性依赖于体内得到的 TSC 浓度水平。通过口服施用 TSC 能够延长 TSC 的有效性。由于 TSC 在酸性条件下沉淀,因此本发明的组合物可在胃苛刻的酸性环境中保护 TSC,并在肠道内更为适宜的 pH 区域中释放 TSC。

[0060] 肠溶包衣应用于口服剂型制剂以保护活性物质免于溶解在胃内的胃液中。使用肠溶包衣最常用的原因如下:

[0061] ● 保护活性物质免受胃酶或胃液酸度的影响

[0062] ● 掩盖目标(task)或气味

[0063] ● 防止包括恶心和呕吐在内的胃部刺激

[0064] ● 缓释以控制吸收

[0065] ● 将活性物质递送至更有利于全身性吸收的消化道内特定位置

[0066] 另一实施方式包括使用响应于更宽的 pH 值范围的肠溶包衣,从而允许 TSC 等双极性反式类胡萝卜素在肠道更多部分进行吸收,从而增大吸收的表面积。

[0067] 包衣的组成

[0068] 有许多可获得的材料可以用于肠溶包衣材料。大多数是通过缓慢侵蚀包衣材料(巴西棕榈蜡、角蛋白、谷朊等)或通过 pH 响应型包衣来发挥作用。依赖于侵蚀机制的材料取决于胃的排空时间。第二类(即, pH 响应型包衣)在低 pH 条件下是疏水性的且不溶于水,在较高的 pH 下则可溶。因此,所述包衣在胃苛刻的酸性环境中是不溶的,而在肠道较高的 pH 范围则发生溶解。可获得多种 pH 敏感型聚合物,其根据应当发生分解的特定 pH 来选择。下表列出了一些最为常用的 pH 敏感型聚合物。

[0069] 用于肠溶包衣的常用 pH 敏感型聚合物

[0070]

邻苯二甲酸乙酸纤维素(CAP)

琥珀酸乙酸纤维素

丙烯酸酯聚合物

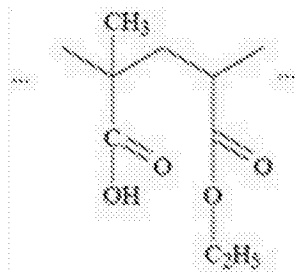
羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯

乙酸羟丙基甲基纤维素琥珀酸酯

聚乙酸乙烯邻苯二甲酸酯

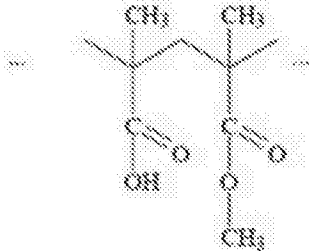
[0071] 三种市售的丙烯酸酯聚合物,即来源于丙烯酸和甲基丙烯酸的酯的共聚物是 Eudragit L30D-55、L100 和 FS30D。这些聚合物的 pH 依赖性机能取决于其官能性羧酸基团:

[0072]



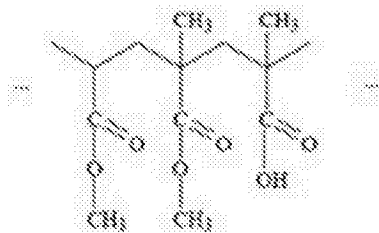
[0073] Eudragit L30D-55:在 pH 为 5.5 以上时发生溶解,靶向释放区域在十二指肠。

[0074]



[0075] Eudragit L100:在 pH 超过 6.0 时发生溶解,靶向释放区域在空肠。

[0076]



[0077] Eudragit FS30D:在 pH 超过 7.0 时发生溶解,靶向释放区域在结肠。

[0078] D. 其他成分

[0079] 可以添加试剂来缓冲扩散促进化合物。可以添加其他的试剂来影响渗透压度,或者作为口服制剂所需的配合剂。具体的缓冲剂包括甘氨酸、碳酸钠、碳酸氢钠、碳酸镁和氢氧化铝。影响渗透压度的具体实例包括甘露醇和多糖。

[0080] 其他可以添加的试剂包括:

[0081] Prosolv 90 是硅化微晶纤维素。据认为 PROSOLV SMCC 90 为片剂制剂提供了极佳压实与流动之间的最佳平衡。其改善了制剂的流动,促进了颗粒的固结,并改善了含量均一性。

[0082] Crospovidone XL 90 是交联性聚乙烯吡咯烷酮,在压片时其用作滚圆助剂或用来替代微晶纤维素。滚圆、整丸 (marmumerization)、制粒和微粒化的含义相同:制造小球状产品用于制药及相关行业。通过这些过程制造的所有产品均可称为球状体、球体、微球体、丸粒、微丸粒或药物丸粒。所有这些术语的含义均相同。尺寸范围通常为约 0.8mm ~ 1.5mm(直径),不过可能更小和更大。相反,术语造粒通常指的是在一个批次中具有较大尺寸范围的不规则形状颗粒。经造粒的材料一般都不太致密。

[0083] 硬脂酸镁(也被称为十八烷酸的镁盐)是在室温时为固体的白色物质。其化学式为  $C_{36}H_{70}MgO_4$ 。其是含有两个当量的硬脂酸根(硬脂酸的阴离子)和一个当量的镁阳离子( $Mg^{2+}$ )的盐。硬脂酸镁在约 88°C 时熔融,不溶于水,通常认为其可供人安全食用。因为它被广泛认为是无害的,因此常常用作医疗片剂和胶囊制造时的填充剂。从这点来看,该物质也是有用的,因为其具有润滑性,在将化学粉末挤压为固体片剂时能够防止成分与制造设备粘连。

[0084] 科利当(kollidon)是分子量可变的聚乙烯基聚合物;用作悬浮分散剂和药用载体。

#### [0085] 配制方法

[0086] 本发明适于口服的制剂可以作为独立单元存在,如丸剂、胶囊、扁囊剂或片剂,可以为粉末或颗粒,或者为溶液、悬浮液或乳液。适于口服施用的制剂还包括锭剂和软锭剂。所述制剂可以方便地以单位剂型存在,也可以通过制药领域中已知的方法来制备。所述制剂可用于速释、缓释或控释扩散促进化合物。缓释系统(也称为延时释放、控释等)的优点在于,与同一药物的其他制剂相比给药频率能够得到降低,并且全身性的药物浓度能够在较长的时间内更为稳定。

[0087] 本发明组合物的适宜剂量将取决于给定化合物的代谢,以及接受治疗的病况的严重程度。关于“治疗有效的”剂量,其必须具有所需的效果,即,其必须减轻所针对的适应症的症状。治疗有效的剂量将取决于所治疗的病况、病况的严重程度、所应对的各哺乳动物患者的阶段和个体特征和扩散促进效果的清除性。

[0088] 通常,本发明的组合物通过混合双极性反式类胡萝卜素和选定的环糊精以不超过 1:10 的混合比来制备。通过任何药学上可接受的方法进行混合。混合物随后装入胶囊容器中,或者压成片剂(其也可以包含前文提到的成分以促进脱模等)。胶囊或片剂随后以形成连续包衣的方式包覆 pH 敏感型聚合物(如 Eudragit)。

[0089] 在本发明的一个实施方式中,将多种类型的肠溶包衣珠粒放在口服递送的胶囊或其他体系中。所述珠粒由具有第一包衣的第一部分或第一组珠粒和具有第二包衣的第二部分或第二组珠粒构成。也可以加入具有不同包衣的其他组珠粒。一个实例是包含具有三种不同类型的 Eudragit 包衣的珠粒的胶囊,这些珠粒在不同的 pH 值下释放,并且与仅包含一种类型珠粒的胶囊相比能够在更长的时间内释放。

#### [0090] 治疗用途和施用模式

[0091] 本发明的组合物在治疗患有组织经历低氧水平(缺氧)的哺乳动物或在与中枢神

经系统有关的多种病况中具有治疗用途。

[0092] 本发明的组合物的用途包括在共同拥有的美国专利第 6,060,511 号、美国专利申请第 10/647,132 号、美国专利申请第 11/361,054 号、美国专利申请第 12/081,236 号和美国临时专利申请第 61/213,575 号中公开的那些用途,在此通过引用并入上述各文献的全部内容。

[0093] 本发明的口服组合物可用于治疗以下疾病:

[0094] 出血性休克,

[0095] 呼吸道疾病、哮喘、肺气肿、ALI、ARDS、COPD,

[0096] 缺血,

[0097] 心血管病、动脉硬化症、心肌梗塞、高血压、心室纤颤,

[0098] 中风、创伤性脑损伤、脑水肿,

[0099] 中枢神经系统的病况(阿尔茨海默氏病、帕金森氏病和其他神经变性疾病);神经变性是神经元的结构或功能逐渐丧失(包括神经元的死亡)的涵盖性术语;变性神经疾病的实例包括:阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、肌萎缩侧索硬化、弗里德希氏共济失调、亨廷顿舞蹈症、路易体病和脊髓性肌萎缩;参见实施例 7;

[0100] 关节炎,

[0101] 贫血(早产儿贫血、范可尼贫血、溶血性贫血、小红细胞性贫血、正常红色素贫血、巨红细胞性贫血、遗传性球形红细胞性贫血、镰状细胞性贫血、温性自体免疫性溶血性贫血、冷凝集素溶血性贫血),

[0102] 慢性肾功能衰竭、高血压,

[0103] 乳头状瘤、脊椎损伤,

[0104] 癌症(有利的是作为以下的辅助剂:i)放射治疗,包括外束放射、伽马刀、近距离放射治疗、螺旋断层放疗以及质子束,包括分割 3D 适形放射治疗、腔内放射和调强放射治疗(IMRT),和/或 ii)化学疗法,包括替莫唑胺)。

[0105] 糖尿病、糖尿病性视网膜病变,

[0106] 外周血管疾病/跛行、栓塞、血液凝块、椎管狭窄/神经源性跛行,

[0107] 器官获氧不足的疾病,例如韦格氏肉芽肿病。

[0108] 本发明组合物还用作预防治疗物或治疗有患上所述疾病/病况风险的哺乳动物。

[0109] 本发明的组合物还可用于神经保护,即,用于预防或延迟与神经变性紊乱如帕金森病或阿尔茨海默病相关的并发症。通过在手术之前、期间或之后施用所述组合物,这些组合物还可用于减少哺乳动物的因手术所导致的出血量。

[0110] 所述组合物还可用于当呼吸/用力增加或加强时提高性能,增加有氧代谢,以及在诸如跑步、步行或负重等体力活动期间增大耐力。

[0111] 对于以下用途,所述扩散促进化合物通过任何合适的途径来施用,包括口服、鼻腔或吸入、局部、胃肠外(包括皮下、肌内、静脉内、皮内、透皮和骨内)、阴道或直肠。优选的施用途径取决于具体情况。吸入途径,或静脉内或肌内注射对于需要扩散促进化合物极为快速进入血流的紧急情况治疗是有利的。在一个实施方式中,可以通过肌内(IM)或者通过静脉内(IV)注射溶解在无菌水中的环糊精与双极性反式类胡萝卜素的组合物。因而,制剂包含那些适合于通过这些途径来施用的物质(待雾化的液体或粉末)。应当理解,优选的途径

可以不同,例如,随患者的病况和年龄而不同。

[0112] 严重肢体缺血,

[0113] 帕金森氏病、肌萎缩侧索硬化、弗里德希氏共济失调、亨廷顿舞蹈症、路易体病和脊髓性肌萎缩,

[0114] 多发性硬化,

[0115] 代谢综合征,

[0116] 周围神经病变,

[0117] 大脑性麻痹,

[0118] 癌症—双极性反式类胡萝卜素盐(如 TSC)是用于造成许多种类的癌变肿瘤衰退的化学疗法,也就是说,不使用辐射或其他化学疗法。实施例 8 涉及用 TSC 治疗癌变肿瘤。TSC 并不通过杀死癌细胞来发挥作用,而是(不希望受到理论的限制)据认为通过使细胞恢复为更成熟的(因而也更接近于正常的)细胞来发挥作用。本发明不包括类维生素 A(例如所有的反式视黄酸)或其盐治疗癌症的用途。可以治疗的癌症/肿瘤类型的实例包括皮肤、肺、乳、脑、膀胱、前列腺和结肠的癌症/肿瘤。

[0119] 在一个实施方式中,施用了多于一种的扩散促进化合物。作为选择,可以一同服用血红蛋白或碳氟化合物与扩散促进化合物。

[0120] 以下的实施例是描述性的,而非限制本发明的组合物和方法。对于本领域技术人员显而易见的是,对常见的各种条件和参数的其它合适的修饰和改变也包含在本发明的实质和范围之内。

[0121] 实施例

[0122] 实施例 1

[0123] 片剂组合物(无环糊精)

[0124] 制备了由以下成分构成的两种制剂:

[0125] 65%的共混物

[0126] 65.0% TSC

[0127] 26.0% Prosolv 90

[0128] 2.9% Crospovidone XL 90

[0129] 1.5% 硬脂酸镁

[0130] 4.6% 科利当

[0131] 60%的共混物

[0132] 60.4% TSC

[0133] 30.1% Prosolv 90

[0134] 3.8% Crospovidone XL 90

[0135] 1.4% 硬脂酸镁

[0136] 4.3% 科利当

[0137] TSC 片剂按照三(3)步制造:

[0138] 步骤 1:含有 70% TSC、25% Prosolv 90 和 5%科利当 25 的混合物在袋中混合 5 分钟,然后使用 Vector 辊式压实机进行辊压。辊式压实机的条件如下:辊压 = 800psi,螺杆速度 = 10rpm,辊速 = 0.95rpm。由此制得称为 TSC 共混物 I 的共混物。

[0139] 步骤2:使用Crospovidone XL 10和硬脂酸镁对来自步骤1的TSC共混物I进行辊压。百分比如下:TSC共混物I为97.5%,Crospovidone XL 10为2%,硬脂酸镁为0.5%。该步骤的产物被称为TSC颗粒II。

[0140] 步骤3:来自步骤2的带状物用手粉碎,然后通过20目的筛进行筛分。使得到的颗粒与赋形剂(见下)混合,从而获得最终的共混物,其包含65%的TSC和60%的TSC。

[0141]

<u>65% TSC 共混物</u>	<u>60% TSC 共混物</u>
95.2% TSC 颗粒 II	88.5 % TSC 颗粒 II
2.8 % Prosolv 90	8.5 % Prosolv 90
1% Crospovidone XL	2% Crospovidone XL
1%硬脂酸镁	1%硬脂酸镁

[0142] 步骤4:片剂用CAP(邻苯二甲酸乙酸纤维素)包覆。

[0143] 为了说明胃内和肠内吸收的差异,进行了下列研究。

[0144] 实施例2

[0145] TSC 溶液的吸收

[0146] 使体重为约300克~400克的雄性Sprague-Dawley(SD)和Wistar大鼠各自禁食24小时,然后用于各项试验。随意饮水,使用带有金属网底的笼子来防止食粪。用异氟烷诱发麻醉并维持该状态。使颈动脉露出,并用PE-50管进行插管。使用丝缝线来固定套管,并对伤口施用2%的利多卡因。

[0147] 在插管之后,使大鼠分置于两组中的一组:TSC剂型制剂直接施用至1)胃内(通过管饲法),或2)离体肠段。关于给药至离体肠段,形成前端体中线(front midline),露出腹部和肠段。在该研究中,回肠离体,并用PE-50管进行插管,然后用37°C生理盐水洗涤直至洗涤液清澈为止。使肠段复位,钳住腹部,让大鼠稳定1小时。随后将TSC制剂引入离体肠段内。使肠道复位,用缝合线使腹部闭合。在施用TSC后以不连续的时间间隔由颈动脉获取约0.3mL血样。使用少量肝素钠作为抗凝血剂。对血样进行离心分离,使得到的血浆与3倍体积的甲醇混合,然后使其涡旋。血浆混合物随后进行离心分离,上清液用HPLC分析从而确定TSC水平。

[0148] 该研究中施用的TSC剂型制剂由静脉注射制剂(20mg/mL TSC、8% $\gamma$ -环糊精、50mM甘氨酸和2.3%甘露醇)构成。如图1显示,与施用至胃部相比,TSC直接施用至小肠时生物利用度增大。

[0149] 实施例3

[0150] 肠溶包衣片剂(无环糊精)

[0151] TSC在胃苛刻的酸性环境中沉淀,几乎是不溶的。必须保护TSC使其免受胃的苛刻环境影响,并使其在小肠内更为有利的高pH范围下释放。为了本研究,制得TSC片剂(表1),并用Eudragit L100或者邻苯二甲酸乙酸纤维素(CAP)进行肠溶包衣。在USP溶解研究中确认两种类型的保护性包衣的完整性,在该研究中,首先将肠溶包衣片剂放在包含人工胃液(SGF)的溶解槽中,然后将其转移至包含人工肠液(SIF)的另一个槽中。包衣和片剂在SGF中保持完好,而在SIF中则发生溶解。根据USP方案进行该研究。

[0152] 表 1. TSC 片剂制剂

[0153]

<u>65% TSC 共混物</u>	<u>60% TSC 共混物</u>
95.2% TSC 颗粒 II	88.5 % TSC 颗粒 II
2.8 % Prosolv 90	8.5 % Prosolv 90
1% Crospovidone XL	2% Crospovidone XL
1%硬脂酸镁	1%硬脂酸镁

[0154] 使用本领域的技术人员已知的压片技术制造这些片剂。

[0155] 然后,为了检验肠溶包衣型 TSC 所发生的状况,包覆有 CAP 并含有 300mg TSC(使用 65%共混物)的片剂对狗进行口服使用。发现血浆 TSC 浓度极低,这表明该制剂对于临床应用而言生物利用度过低。

[0156] 实施例 4

[0157] TSC 的肠吸收和环糊精的作用

[0158] 为了确定 TSC 添加  $\gamma$ -环糊精后对全身性吸收的影响,还进行了额外的研究。

[0159] 使体重为约 300 克~400 克的雄性 Sprague-Dawley (SD) 和 Wistar 大鼠各自禁食 24 小时,然后用于各项试验。随意饮水,使用带有金属网底的笼子来防止食粪。用异氟烷诱发麻醉并维持该状态。使颈动脉露出,并用 PE-50 管进行插管。使用丝缝线来固定套管,并对伤口施用 2%的利多卡因。

[0160] 在插管之后,形成前端体中线,露出腹部和肠段。在该研究中,空肠离体,然后将 TSC 制剂施用至近端空肠。以 0.5:1 ~ 4:1 的多种  $\gamma$ -环糊精比率(TSC 重量: $\gamma$ -环糊精重量)施用约 60mg/kg TSC。TSC 在肠段内的移动并不限于施用部位的远端。使肠道复位,用缝合线使腹部闭合。在施用 TSC 后以不连续的时间间隔由颈动脉获取约 0.3mL 血样。使用少量肝素钠作为抗凝血剂。对血样进行离心分离,使得到的血浆与 3 倍体积的甲醇混合,然后使其涡旋。血浆混合物随后进行离心分离,上清液用 HPLC 分析从而确定 TSC 水平。

[0161] 如图 2 所示, $\gamma$ -环糊精极大地促进了 TSC 的吸收。

[0162] 图 3 是 TSC 原位施用至小肠后的 pk 曲线。曲线显示,环糊精显著地增大了 TSC 的肠吸收。

[0163] 图 3 是 TSC 血浆浓度( $\mu$ g/mL)与施用后时间(分钟)的关系。

[0164] 实施例 5

[0165] C<sub>max</sub> 的可扩展性

[0166] 已经发现, $\gamma$ -环糊精极大地促进了 TSC 在胃肠道内的全身性吸收。以上研究中所用的 TSC 剂量很大,因此,为了确定全身性吸收(以 C<sub>max</sub> 计)相对于 TSC 给药量的可扩展性,以  $\gamma$ -环糊精的比率为 1:1(TSC 重量: $\gamma$ -环糊精重量)施用了其他剂量的 TSC。关于以下研究,TSC 以下述剂量施用至空肠肠段:2.5mg/kg、5mg/kg、10mg/kg 和 60mg/kg。

[0167] 关于该研究,使体重为约 300 克~400 克的雄性 Sprague-Dawley (SD) 和 Wistar 大鼠各自禁食 24 小时,然后用于各项试验。随意饮水,使用带有金属网底的笼子来防止食粪。用异氟烷诱发麻醉并维持该状态。使颈动脉露出,并用 PE-50 管进行插管。使用丝缝线来固定套管,并对伤口施用 2%的利多卡因。

[0168] 在插管之后,形成前端体中线,露出腹部和肠段。在该研究中,空肠离体,然后将 TSC 制剂施用至近端空肠。TSC 在肠段内的移动并不限于施用部位的远端。使肠道复位,用缝合线使腹部闭合。在施用 TSC 后以不连续的时间间隔由颈动脉获取约 0.3mL 血样。使用少量肝素钠作为抗凝血剂。对血样进行离心分离,使得到的血浆与 3 倍体积的甲醇混合,然后使其涡旋。血浆混合物随后进行离心分离,上清液用 HPLC 分析从而确定 TSC 水平。

[0169] 结果显示在图 4 中。图 4 中的线为数据的线性回归,显示出获得了优异的拟合。这表明包含有  $\gamma$ -环糊精时获得的数据可以扩展到其他的 TSC 剂量。

[0170] 实施例 6

[0171] 具有和不具有肠溶包衣时的肠吸收

[0172] 为了调查经口服递送时包含 TSC 和  $\gamma$ -环糊精的益处,进行了额外的研究。关于该研究,将 TSC 和  $\gamma$ -环糊精以 1:4(TSC 重量: $\gamma$ -环糊精重量)的比率填装在 9 号明胶胶囊中,然后:1) 不进行包覆,2) 用 Eudragit L30D-55(本文也称为 LS30D55)进行肠溶包衣(应当在 pH 大于 5.5 时分解的包衣),或者 3) 用 FS30D 进行肠溶包衣(应当在 pH 大于 7 时分解的包衣)。还施用了仅含有 TSC 的未包衣胶囊(不含环糊精)。

[0173] 关于该研究,使体重为约 300 克~400 克的雄性 Sprague-Dawley (SD) 和 Wistar 大鼠各自禁食 24 小时,然后用于各项试验。随意饮水,使用带有金属网底的笼子来防止食粪。用异氟烷诱发麻醉并维持该状态。使颈动脉露出,并用 PE-50 管进行插管。使用丝缝线来固定套管,并对伤口施用 2% 的利多卡因。

[0174] 在插管之后,将包含药物产物的明胶胶囊经给药注射器(Torpac, Fairfield NJ)施用至胃部,然后经管饲法向胃内施用 0.3mL 无菌水。在施用 TSC 后以不连续的时间间隔由颈动脉获取约 0.3mL 血样。使用少量肝素钠作为抗凝血剂。对血样进行离心分离,使得到的血浆与 3 倍体积的甲醇混合,然后使其涡旋。血浆混合物随后进行离心分离,上清液用 HPLC 分析从而确定 TSC 水平。

[0175] 图 5 显示了在使大鼠口服施用包含在明胶胶囊中的干粉后 7 个小时的时间内血流中的浓度,所有的胶囊均包含相同量的 TSC(约 4mg)。

[0176] 仅有 TSC 表示胶囊中仅含有 TSC;

[0177] TSC:CD(1:4) 未包衣,其表示由 TSC 与环糊精的 1:4 混合物制成的胶囊,不过该明胶胶囊不具有包衣;

[0178] LS30D55,其表示具有 Eudragit LS30D55 包衣(应当在 pH 大于 5.5 时分解的包衣)的相同 1:4 胶囊;

[0179] FS30D,其表示具有 Eudragit FS30D 包衣(应当在 pH 大于 7 时分解的包衣)的相同 1:4 胶囊。

[0180] 图 6 的柱状图显示了采用未包衣的胶囊以及具有 Eudragits 包衣的胶囊所获得的吸收百分比的改善(与仅有 TSC 相比)。

[0181] 实施例 7

[0182] 神经变性疾病

[0183] 如上所述,任何神经变性疾病的主要方面均是神经元的死亡。已经进行了多个研究来探查不同的动物模型中 TSC 对神经元死亡的作用。

[0184] 以此为目的的第一项研究是使用出血性中风的大鼠模型进行的研究。关于该研

究,将胶原酶通过颅骨中的钻孔注射至右侧基底神经节,由此导致一部分脑血管破裂并出血。随后在施用胶原酶后 3 个小时开始注射 TSC,在施用胶原酶后 48 小时杀死大鼠。

[0185] 大脑出血时,血液汇集并形成血肿。血肿的周围神经元细胞死亡。不过,已经发现,用 TSC 处理则会使神经元的死亡减少约 20%。使用染色剂 (fluor Jade) 使技术人员能够对在给定的大脑切片中“死亡”的神经元的个数进行计数。在出血性中风大鼠模型中形成的血肿周围的区域进行上述计数。发现用 TSC 治疗的大鼠中神经元的死亡减少了约 30%,如图 7 所示。

[0186] 用来检验 TSC 对神经元存活率的影响的另一模型是帕金森氏症的大鼠模型。在该模型中,钻孔穿透颅骨,进入黑质区域。通过在大脑中注射 6-羟基多巴胺 (6-OHDA) 诱发帕金森样病况。在该模型中常常注射 10  $\mu$ g 量的 6-OHDA,然后用于第一项研究。

[0187] 采用该模型的第一项研究的目的在于模拟在参考文献中的研究,该参考文献中发现用藏花酸进行的预处理对于注射 10  $\mu$ g 6-OHDA 之后的神经元死亡具有有益效果。在研究中,在注射 6-OHDA 之前以 0.1mg/kg 的剂量注射 TSC 7 天(与在藏花酸的研究中进行的给药方案相同)。在注射 6-OHDA 之后,在随后的 4 周内不再进行其他的治疗。

[0188] 然后杀死大鼠,取出大脑并送至查尔斯河实验室 (Charles River Laboratories) 来计数活神经元。由此对大脑右侧(已经注射了 6-OHDA)以及大脑的未经治疗的左侧进行计数。从而能够比较已经用盐水进行预治疗的对照组与使用 TSC 进行预处理的大鼠的细胞死亡(治疗侧的计数/未治疗侧的计数)。图 8 显示了这些结果。

[0189] 可以看出,该治疗后活神经元的百分比几乎翻倍。还应注意到,这是非常严重的神经元死亡模型,因为对照组中大约 85%的神经元死亡。

[0190] 更为关注的是后治疗对于注射 6-OHDA 后神经元死亡的影响。为研究该影响,如前文那样将 5  $\mu$ g 6-OHDA 再次注射到黑质中,不同的是在该注射后开始治疗。大鼠随后被每日注射 TSC (0.25mg/kg),注射 4 周,然后将其杀死。取出大脑,送至查尔斯河实验室进行神经元计数。

[0191] 可以看出,用 TSC 进行治疗有更多活神经元(大约多 20%),这些数据具有统计学显著差异 ( $p < 0.05$ )。

[0192] 该研究受关注的结果是脑的无 6-OHDA 侧的脑切片不管在注射盐水或 TSC 时均显示出几乎相同数量的活神经元,正如图 10 所示。这表明 TSC 对于活神经元的存活率没有影响。

[0193] 这些结果与出血性中风模型中发现的那些结果相结合表明 TSC 在大脑中发挥了神经保护作用。

[0194] 实施例 8

[0195] 采用 TSC 的化学疗法

[0196] 肺转移小鼠模型是广泛使用的用于评估肿瘤治疗的模型。采用 B16(小鼠黑色素瘤)细胞,在尾静脉内进行静脉内细胞注射时基本上所有的细胞均开始“接种”,并优先在肺部形成肿瘤。因此,虽然广泛使用了术语肺转移,但是每个生成的肺部结节从技术上讲都是独立的“原发性”肿瘤而非真实的转移。

[0197] 由于 B16 细胞中的黑色素不会像其余的肺部组织那样变白,因此在费克特溶液 (Fekete's solution) 中对提取的肺部进行漂白后肿瘤结节易于可视化。然而总是有一小

部分结节是不含黑色素的（“白色”），这就需要仔细的计数以致不会低估肿瘤负荷。

[0198] 关于该课题研究，从查尔斯河实验室获得八周龄的雌性 C57BL/6 小鼠。小鼠圈养在 5 个以下的组中，随意接受食物和饮水。

[0199] 采用标准方案，B16 细胞由弗吉尼亚大学细胞信号转导中心 (Center for Cell Signaling of the University of Virginia) 培养。细胞在接收时处于指数增长阶段。细胞在 Hank 缓冲盐溶液 (HBSS) 中以  $5 \times 10^5$  细胞 / mL 的浓度供应。

[0200] 收到细胞后立即进行注射，并将注射当天指定为第 0 天。在第 0 天，所有的小鼠均在尾静脉内经静脉注射 0.1 mL 细胞悬浮液，这表明各小鼠均接受了  $0.5 \times 10^5$  个细胞。小鼠随后被单独留置直到第 4 天。

[0201] 在第 4 天，将小鼠分成两组：组 A，包括 5 只小鼠，尾静脉内经静脉注射接受 0.05 mL 盐水。组 B，包括 7 只小鼠，尾静脉内经静脉注射接受 0.05 mL TSC 溶液，TSC 的剂量为 0.142 mg/kg/天。在第 5 ~ 8 天和第 11 ~ 15 天重复相同的注射。在第 18 天，使用二氧化碳杀死小鼠。切除肺部，漂洗，并放在费克特溶液中，然后于室温保存。

[0202] 随后，以随机的盲序目视评估肺部，以获得肿瘤个数的可视计数。结果发现存在小肿瘤与中型肿瘤及大肿瘤的混合物。因此，分两个不同的组（小肿瘤和中 / 大肿瘤）目视计数肿瘤。尽管多数肿瘤是黑色的，但仍有一部分是白色肿瘤。

[0203] 肿瘤计数的结果显示在下表 2 中以及图 11 和 12 中。下表 2 显示了各类型肿瘤组的中值 (med.) 数以及平均值  $\pm$  标准方差。图 11 显示了中值，图 12 显示了平均值。由于标准方差较大导致这些组不具有统计学差异。

[0204] 表 2

[0205]

组	N	小		中/大		总计	
		med.	平均值	med.	平均值	med.	平均值
盐水	5	55	$64 \pm 40$	57	$60 \pm 27$	109	$124 \pm 66$
TSC	7	18	$32 \pm 29$	19	$30 \pm 24$	34	$62 \pm 53$

[0206] 对于本领域技术人员显而易见的是，可以对本发明的化合物和组合物以及相关方法进行多种修饰和追加，而不脱离所公开的本发明。

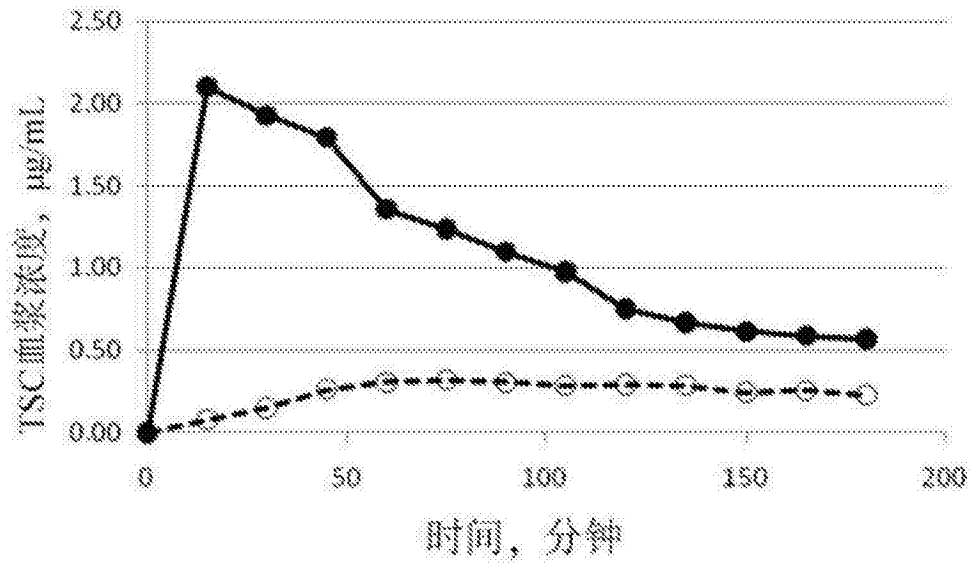


图 1

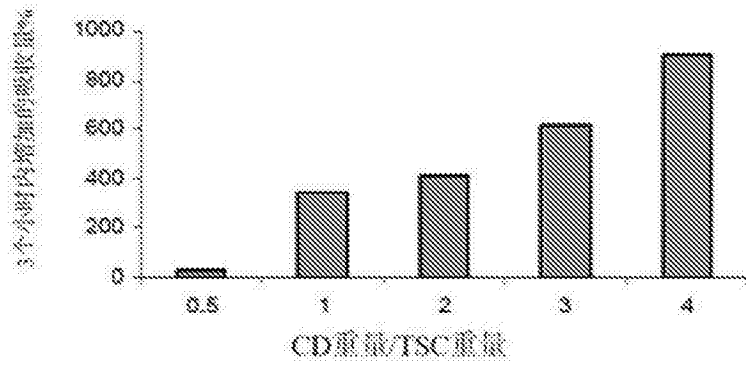


图 2

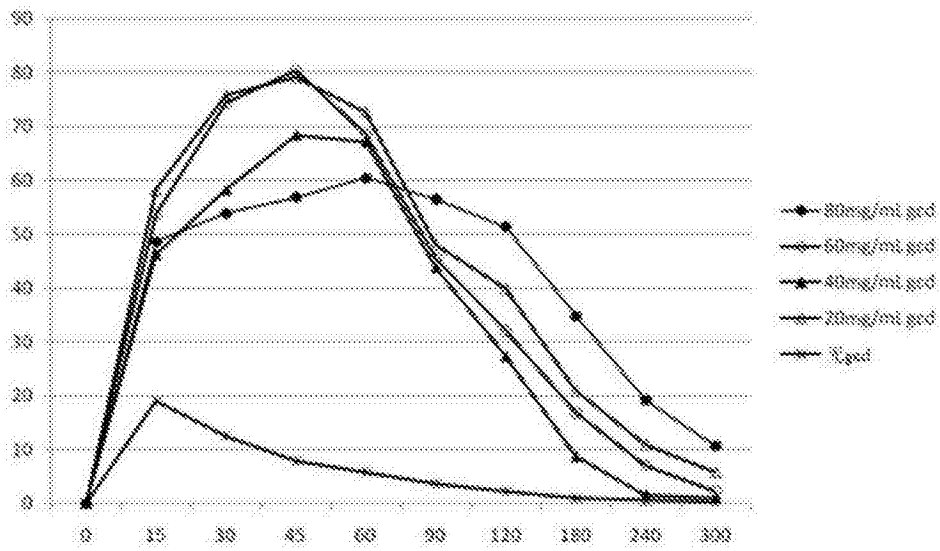


图 3

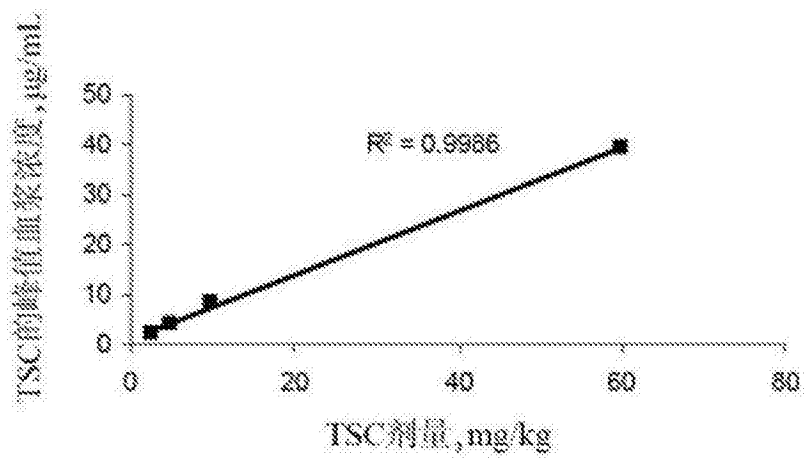


图 4

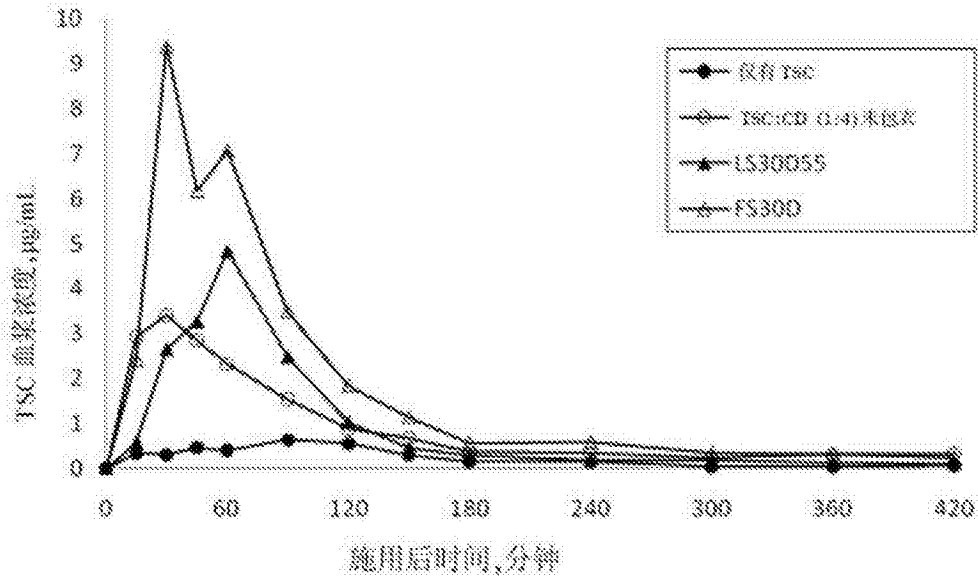


图 5

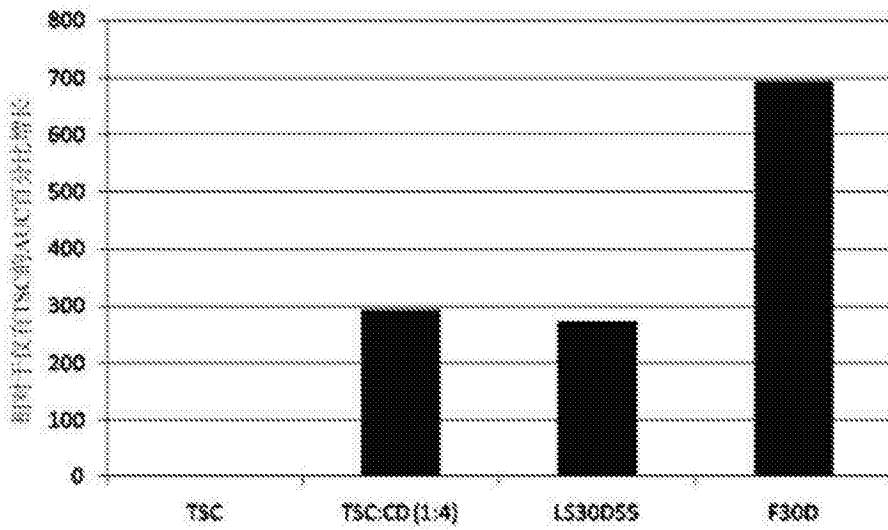


图 6

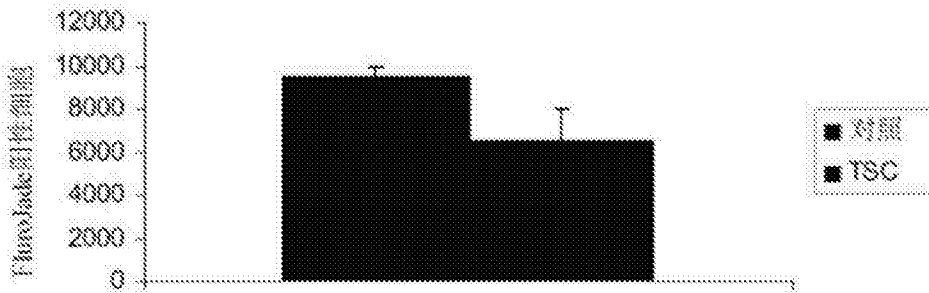


图 7

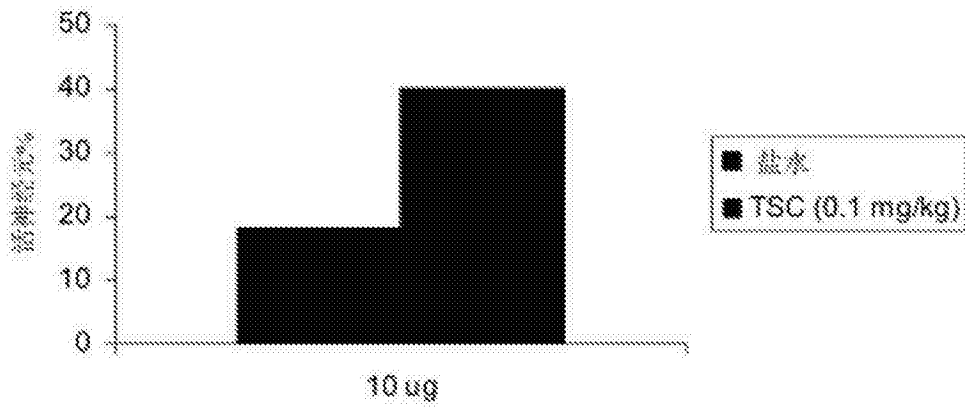


图 8

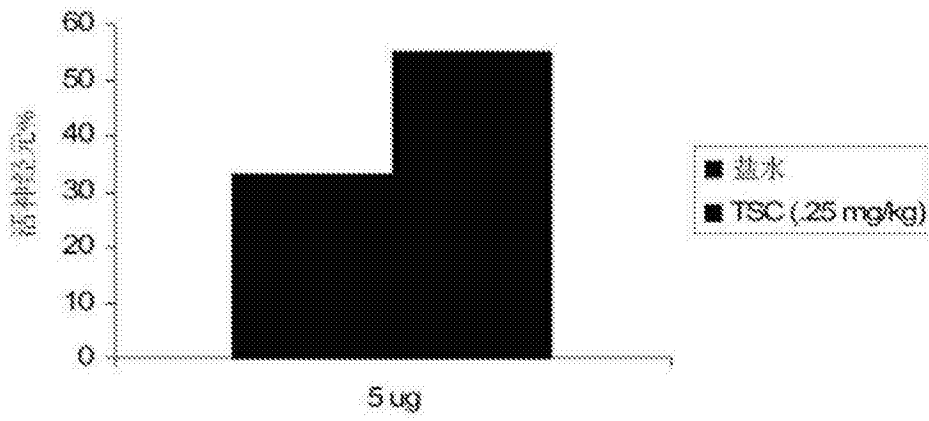


图 9

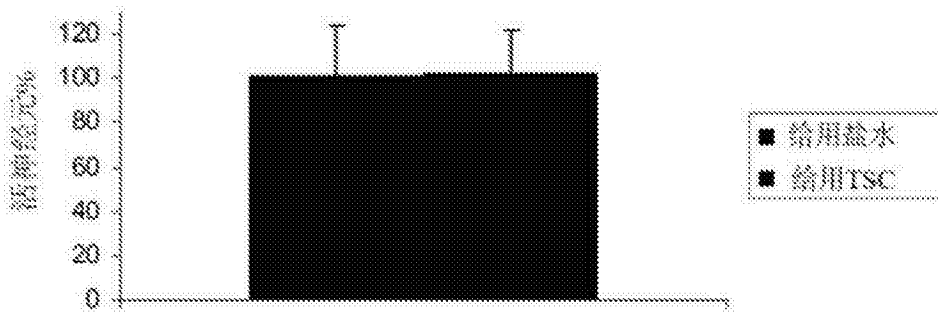


图 10

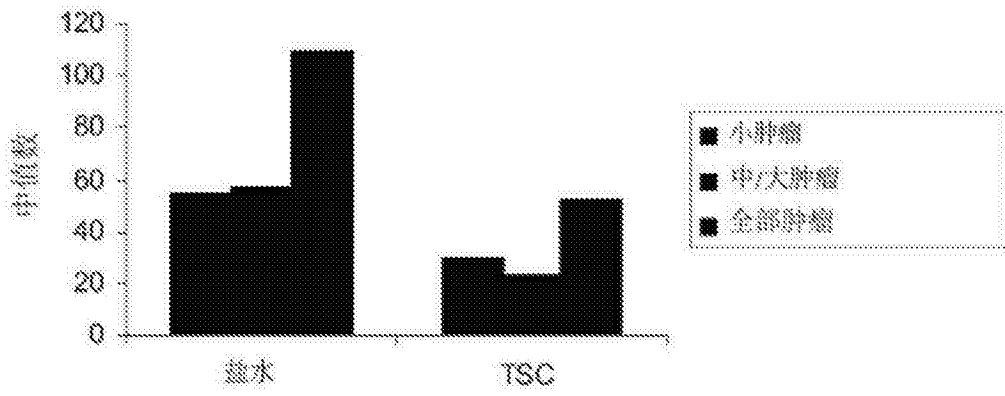


图 11

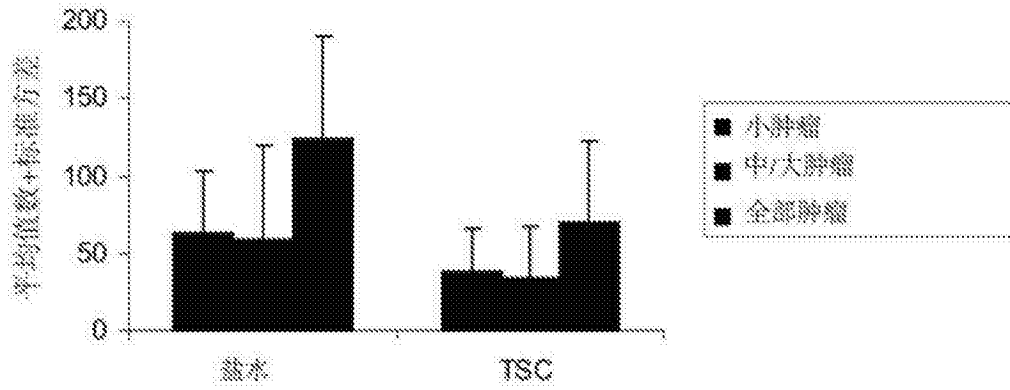


图 12