



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102984939 A

(43) 申请公布日 2013. 03. 20

(21) 申请号 201180034088. 3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 07. 08

A01N 43/42 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/399, 297 2010. 07. 09 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013. 01. 09

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2011/043383 2011. 07. 08

(87) PCT申请的公布数据

W02012/006538 EN 2012. 01. 12

(71) 申请人 泰华制药工业有限公司

地址 以色列佩塔迪克瓦

(72) 发明人 维克多·皮尔雅汀斯盖

阿维塔勒·劳尔

(74) 专利代理机构 上海天翔知识产权代理有限

公司 31224

代理人 刘粉宝

权利要求书 5 页 说明书 39 页 附图 3 页

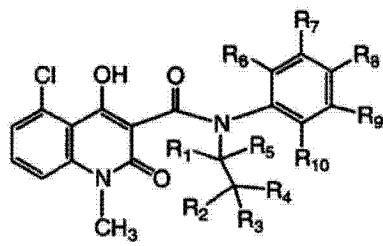
(54) 发明名称

氘化的 N- 乙基 -N- 苯基 -1, 2- 二氢 -4- 羟基 -5- 氯 -1- 甲基 -2- 氧代喹啉 -3- 甲酰胺、其盐和用途

(57) 摘要

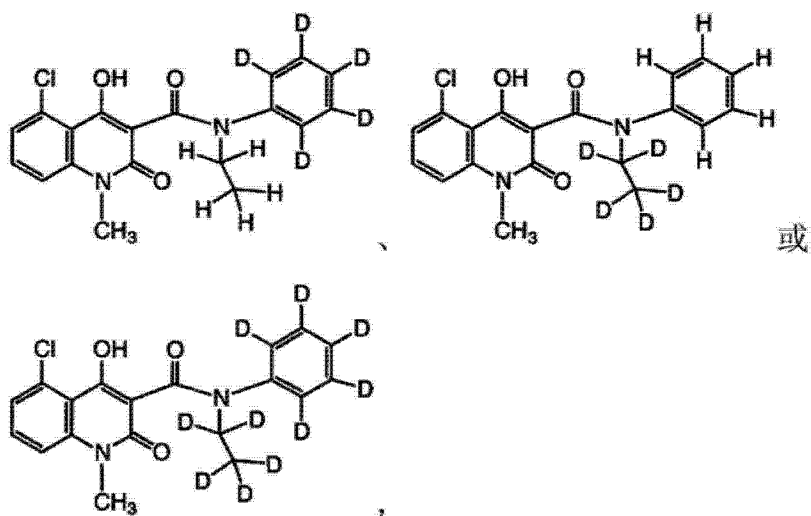
本发明提供氘化的 N- 乙基 -N- 苯基 -1, 2- 二氢 -4- 羟基 -5- 氯 -1- 甲基 -2- 氧代 - 喹啉 -3- 甲酰胺、其盐和用途。

1. 一种治疗罹患自身免疫性疾病的人类个体的方法,所述方法包含每天向所述人类个体投予 0.2mg-2.0mg 可有效治疗所述个体的具有以下结构的氘富集化合物:



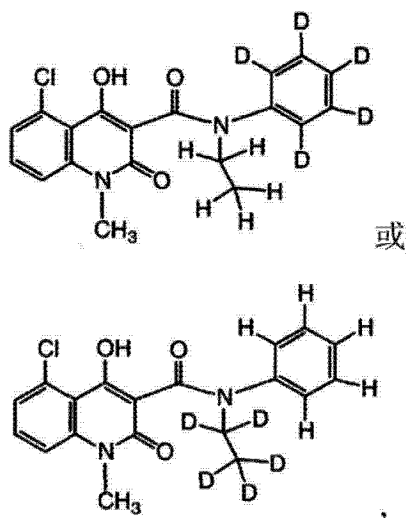
其中 R1-R10 中的每一者都独立地是 H 或 D, 并且 R1-R10 中的至少一者是 D, 或其医药学上可接受的盐。

2. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述氘富集化合物是



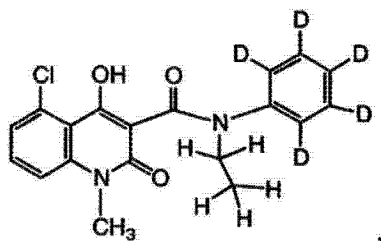
或其医药学上可接受的盐。

3. 根据权利要求 2 所述的方法, 其中所述氘富集化合物是



或其医药学上可接受的盐。

4. 根据权利要求 3 所述的方法, 其中所述氘富集化合物是



或其医药学上可接受的盐。

5. 根据权利要求1到4中任一权利要求所述的方法,其中所述自身免疫性疾病是多发性硬化症、全身性红斑狼疮症、狼疮肾炎、狼疮关节炎、克罗恩氏病或类风湿性关节炎。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述自身免疫性疾病是多发性硬化症。

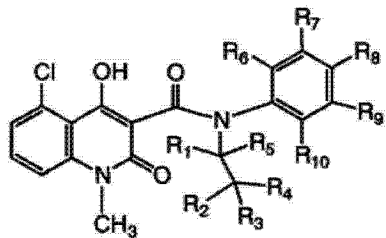
7. 根据权利要求1到6中任一权利要求所述的方法,其中在治疗所述自身免疫性疾病方面授予所述氘富集化合物比授予等摩尔量的非氘富集拉喹莫德更有效。

8. 根据权利要求1到7中任一权利要求所述的方法,其中与在向所述人类个体授予等摩尔量的非氘富集拉喹莫德时形成的5-氯-4-羟基-1-甲基-2-氧代-N-苯基-1,2-二氢喹啉-3-甲酰胺的水平相比,在授予所述氘富集化合物后在所述人类个体中形成的任选氘化的5-氯-4-羟基-1-甲基-2-氧代-N-苯基-1,2-二氢喹啉-3-甲酰胺的水平降低。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中任选氘化的5-氯-4-羟基-1-甲基-2-氧代-N-苯基-1,2-二氢喹啉-3-甲酰胺的水平降低至少50%。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中任选氘化的5-氯-4-羟基-1-甲基-2-氧代-N-苯基-1,2-二氢喹啉-3-甲酰胺的水平降低至少90%。

11. 一种诱导人类个体中任选氘化的5-氯-4-羟基-1-甲基-2-氧代-N-苯基-1,2-二氢喹啉-3-甲酰胺的形成减少的方法,所述方法包含向所述人类个体授予治疗有效量的具有以下结构的氘富集化合物:



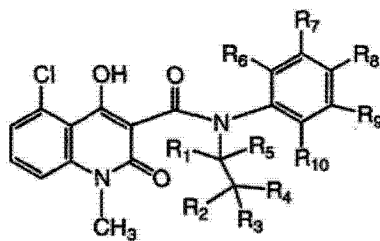
其中R1-R10中的每一者都独立地是H或D,并且R1-R10中的至少一者是D,或其医药学上可接受的盐,

其中所述形成减少是相对于在授予等摩尔量的非氘富集拉喹莫德后5-氯-4-羟基-1-甲基-2-氧代-N-苯基-1,2-二氢喹啉-3-甲酰胺的形成。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中与在向所述人类个体授予等摩尔量的非氘富集拉喹莫德时形成的5-氯-4-羟基-1-甲基-2-氧代-N-苯基-1,2-二氢喹啉-3-甲酰胺的水平相比,任选氘化的5-氯-4-羟基-1-甲基-2-氧代-N-苯基-1,2-二氢喹啉-3-甲酰胺的水平降低至少50%。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中任选氘化的5-氯-4-羟基-1-甲基-2-氧代-N-苯基-1,2-二氢喹啉-3-甲酰胺的水平降低至少90%。

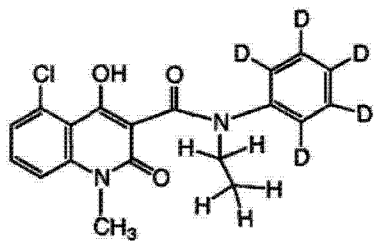
14. 一种至少两种氘富集化合物的混合物,每一化合物都具有以下结构:



其中 R1-R10 中的每一者都独立地是 H 或 D, 并且所述至少两种氘富集化合物中的每一者都在不同 R1-R10 处含有 D,

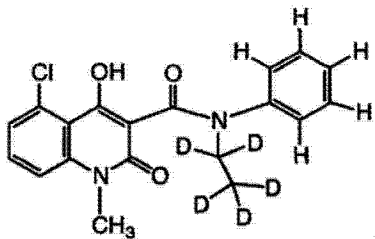
或其医药学上可接受的盐。

15. 根据权利要求 14 所述的混合物, 其中所述至少两种氘富集化合物中的一者具有以下结构:



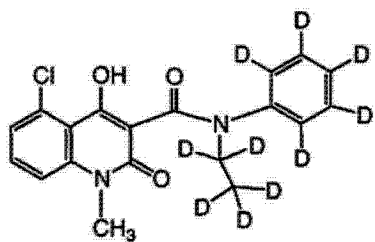
或其医药学上可接受的盐。

16. 根据权利要求 14 所述的混合物, 其中所述至少两种氘富集化合物中的一者具有以下结构:



或其医药学上可接受的盐。

17. 根据权利要求 14 所述的混合物, 其中所述至少两种氘富集化合物中的一者具有以下结构:



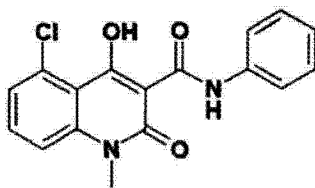
或其医药学上可接受的盐。

18. 一种医药组合物, 其包含根据权利要求 14 到 17 中任一权利要求所述的混合物或其医药学上可接受的盐; 和医药学上可接受的载体。

19. 一种医药组合物, 其包含以下的混合物:

- a) 氘富集拉喹莫德或其医药学上可接受的盐;
- b) 至少一种医药学上可接受的载体; 以及

c) 具有以下结构的化合物：

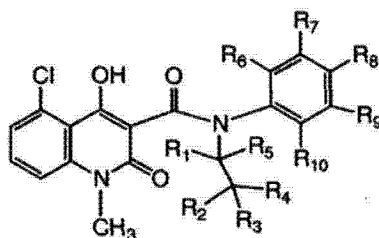


其以按所述化合物和氘富集拉喹莫德的组合重量计小于 0.1% 的量存在。

20. 根据权利要求 19 所述的医药组合物, 其中所述化合物以按所述化合物和氘富集拉喹莫德的组合重量计小于 3ppm 的量存在。

21. 根据权利要求 20 所述的医药组合物, 其中所述化合物以按所述化合物和氘富集拉喹莫德的组合重量计小于 2ppm 的量存在。

22. 根据权利要求 19 到 21 中任一权利要求所述的医药组合物, 其中所述氘富集拉喹莫德具有以下结构：



其中 R1-R10 中的每一者都独立地是 H 或 D, 并且 R1-R10 中的至少一者是 D, 或其医药学上可接受的盐。

23. 根据权利要求 22 所述的医药组合物, 其中在所述氘富集拉喹莫德中, R1-R5 中的每一者都是 D 并且 R6-R10 中的每一者都是 H, 或其医药学上可接受的盐。

24. 根据权利要求 22 所述的医药组合物, 其中在所述氘富集拉喹莫德中, R1-R5 中的每一者都是 H 并且 R6-R10 中的每一者都是 D, 或其医药学上可接受的盐。

25. 根据权利要求 22 所述的医药组合物, 其中在所述氘富集拉喹莫德中, R1-R10 中的每一者都是 D, 或其医药学上可接受的盐。

26. 根据权利要求 18 到 25 中任一权利要求所述的医药组合物, 其呈片剂形式。

27. 根据权利要求 18 到 26 中任一权利要求所述的医药组合物, 其在由人类个体摄取时, 相对于在等摩尔量的非氘富集拉喹莫德由所述人类个体摄取时形成的 5-氯-4-羟基-1-甲基-2-氧代-N-苯基-1,2-二氢喹啉-3-甲酰胺的水平, 提供降低水平的在所述人类个体中形成的任选氘化的 5-氯-4-羟基-1-甲基-2-氧代-N-苯基-1,2-二氢喹啉-3-甲酰胺。

28. 一种制备根据权利要求 18 到 27 中任一权利要求所述的医药组合物的工艺, 所述工艺包含：

a) 获得一批次氘富集拉喹莫德或其医药学上可接受的盐；

b) 通过装置测定存在于所述批次的氘富集拉喹莫德或其医药学上可接受的盐中的任选氘化的 5-氯-4-羟基-1-甲基-2-氧代-N-苯基-1,2-二氢喹啉-3-甲酰胺的总量；以及

c) 仅在所述批次经测定具有, 按重量计, 小于 0.1% 的任选氘化的 5-氯-4-羟基-1-甲

基-2-氧代-N-苯基-1,2-二氢喹啉-3-甲酰胺时,才使用所述批次制备所述医药组合物。

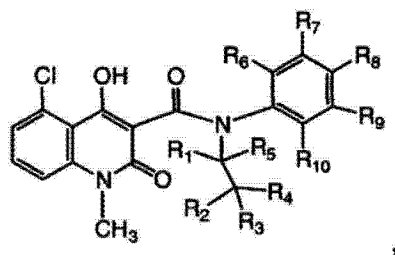
29. 一种制造经验证的批次的根据权利要求 18 到 27 中任一权利要求所述的医药组合物用于分发的工艺,所述工艺包含:

a) 获得一批次所述医药组合物;

b) 通过装置测定所述批次的样品中任选氘化的 5-氯-4-羟基-1-甲基-2-氧代-N-苯基-1,2-二氢喹啉-3-甲酰胺的总量;以及

c) 仅在所述批次的样品经测定含有,按重量计,相对于拉喹莫德和任选氘化的 5-氯-4-羟基-1-甲基-2-氧代-N-苯基-1,2-二氢喹啉-3-甲酰胺的组合重量,小于 0.1% 的任选氘化的 5-氯-4-羟基-1-甲基-2-氧代-N-苯基-1,2-二氢喹啉-3-甲酰胺时,才验证所述批次用于分发。

30. 一种氘富集化合物,其具有以下结构:



其中 R1-R10 中的每一者都独立地是 H 或 D, 并且 R1-R10 中的至少一者是 D, 或其医药学上可接受的盐,

其以每天 0.2mg-2mg 的量用以治疗人类个体的自身免疫性疾病。

氘化的 N- 乙基 -N- 苯基 -1, 2- 二氢 -4- 羟基 -5- 氯 -1- 甲基 -2- 氧代喹啉 -3- 甲酰胺、其盐和用途

[0001] 本申请案主张 2010 年 7 月 9 日申请的美国临时申请案第 61/399, 297 号的优先权, 所述申请案的内容以引用的方式并入本文中。

[0002] 在本申请案的全篇中, 参考了各种公开案、已公开的专利申请案和专利。这些文件的公开内容在此以全文引用的方式并入本申请案中, 以便更充分地描述与本发明有关的现有技术。

背景技术

[0003] 拉喹莫德(Laquinimod)是一种已在急性实验性自身免疫性脑脊髓炎(aEAE)模型中展示有效的化合物(美国专利第 6, 077, 851 号)。其化学名称是 N- 乙基 -N- 苯基 -1, 2- 二氢 -4- 羟基 -5- 氯 -1- 甲基 -2- 氧代喹啉 -3- 甲酰胺, 并且其化学登记号是 248281-84-7。拉喹莫德的合成工艺和其钠盐的制备公开于美国专利第 6, 077, 851 号中。拉喹莫德的另一合成工艺公开于美国专利第 6, 875, 869 号中。

[0004] 包含拉喹莫德钠的医药组合物公开于 PCT 国际申请公开案第 W02005/074899 号中。

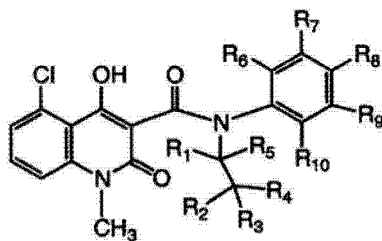
[0005] 拉喹莫德钠是一种具有高口服生物可用性的新颖合成化合物, 已提出将其作为口服调配物用于治疗多发性硬化症(MS)。(波尔曼 C (Polman, C) 等人, (2005) “用拉喹莫德治疗减少复发性 MS 中活动性 MRI 病变的发生(Treatment with laquinimod reduces development of active MRI lesions in relapsing MS)”, 神经病学(Neurology). 64:987-991; 桑德伯格 - 沃尔海姆 M(Sandberg-Wollheim M)等人 (2005) “患者中使用高剂量口服拉喹莫德的 48 周开放安全性研究(48-week open safety study with high-dose oral laquinimod in patients)”多发性硬化症 (MultScler). 11:S154) 研究还展示拉喹莫德可减少复发性 MS 中活动性 MRI 病变的发生。(波尔曼 C 等人, (2005) “用拉喹莫德治疗减少复发性 MS 中活动性 MRI 病变的发生”, 神经病学. 64:987-991)。

[0006] PCT 国际申请公开案第 W02010/028015 号提出拉喹莫德的氘富集变体。然而, W02010/028015 警示, “代谢转换可能产生不同比例的已知代谢物以及完全新颖代谢物”, 并且所述 “新颖代谢特征会赋予或多或少毒性”, 所述毒性 “对于任何药物种类都是不可先验预测的”。因此, W02010/028015 至少未提供拉喹莫德的氘富集变体的投予剂量, 并且未公开代谢特征。

发明内容

[0007] 本发明提供一种治疗罹患自身免疫性疾病的人类个体的方法, 所述方法包含每天向该人类个体投予 0. 2mg-2. 0mg 可有效治疗该个体的具有以下结构的氘富集化合物:

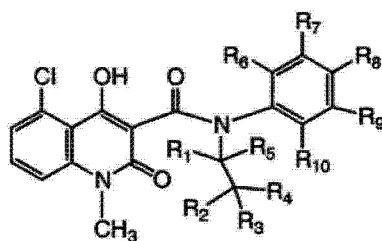
[0008]



[0009] 其中 R1-R10 中的每一者都独立地是 H 或 D, 并且 R1-R10 中的至少一者是 D, 或其医药学上可接受的盐。

[0010] 本发明还提供一种诱导人类个体中任选氧化的 5- 氯 -4- 羟基 -1- 甲基 -2- 氧代 -N- 苯基 -1, 2- 二氢喹啉 -3- 甲酰胺的形成减少的方法, 所述方法包含向该人类个体投予治疗有效量的具有以下结构的氧富集化合物:

[0011]

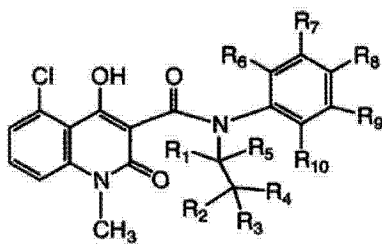


[0012] 其中 R1-R10 中的每一者都独立地是 H 或 D, 并且 R1-R10 中的至少一者是 D, 或其医药学上可接受的盐,

[0013] 其中形成减少是相对于在投予等摩尔量的非氧富集拉喹莫德后 5- 氯 -4- 羟基 -1- 甲基 -2- 氧代 -N- 苯基 -1, 2- 二氢喹啉 -3- 甲酰胺的形成。

[0014] 本发明进一步提供一种至少两种氧富集化合物的混合物, 每一化合物都具有以下结构:

[0015]



[0016] 其中 R1-R10 中的每一者都独立地是 H 或 D, 并且至少两种氧富集化合物中的每一者都在不同 R1-R10 处含有 D,

[0017] 或其医药学上可接受的盐。

[0018] 本发明进一步提供一种医药组合物, 其包含本文所描述的混合物或其医药学上可接受的盐; 和医药学上可接受的载体。

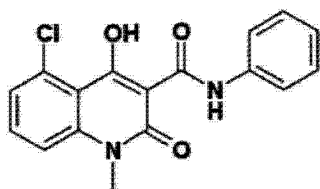
[0019] 本发明进一步提供一种医药组合物, 其包含以下的混合物:

[0020] a) 氧富集拉喹莫德或其医药学上可接受的盐;

[0021] b) 至少一种医药学上可接受的载体; 以及

[0022] c) 具有以下结构的化合物:

[0023]



[0024] 其以按化合物和氘富集拉喹莫德的组合重量计小于 0.1% 的量存在。

[0025] 本发明进一步提供一种制备本文所描述的医药组合物的工艺,所述工艺包含:

[0026] a) 获得一批次氘富集拉喹莫德或其医药学上可接受的盐;

[0027] b) 通过装置测定存在于所述批次的氘富集拉喹莫德或其医药学上可接受的盐中的任选氘化的 5-氯-4-羟基-1-甲基-2-氧代-N-苯基-1,2-二氢喹啉-3-甲酰胺的总量;以及

[0028] c) 仅在所述批次经测定具有,按重量计,小于 0.1% 的任选氘化的 5-氯-4-羟基-1-甲基-2-氧代-N-苯基-1,2-二氢喹啉-3-甲酰胺时,才使用所述批次制备所述医药组合物。

[0029] 本发明进一步提供一种制造经验证的批次的本文所描述的医药组合物用于分发的工艺,所述工艺包含:

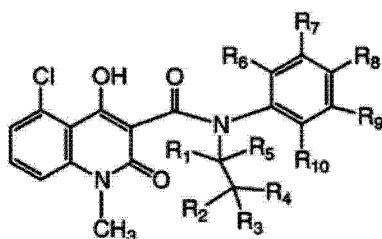
[0030] a) 获得一批次医药组合物;

[0031] b) 通过装置测定所述批次的样品中任选氘化的 5-氯-4-羟基-1-甲基-2-氧代-N-苯基-1,2-二氢喹啉-3-甲酰胺的总量;以及

[0032] c) 仅在所述批次的样品经测定含有,按重量计,相对于拉喹莫德和 5-氯-4-羟基-1-甲基-2-氧代-N-苯基-1,2-二氢喹啉-3-甲酰胺的组合重量,小于 0.1% 的任选氘化的 5-氯-4-羟基-1-甲基-2-氧代-N-苯基-1,2-二氢喹啉-3-甲酰胺时,才验证所述批次用于分发。

[0033] 本发明进一步提供一种氘富集化合物,其具有以下结构:

[0034]



[0035] 其中 R1-R10 中的每一者都独立地是 H 或 D,并且 R1-R10 中的至少一者是 D,或其医药学上可接受的盐,

[0036] 其以每天 0.2mg-2mg 的量用以治疗人类个体的自身免疫性疾病。

附图说明

[0037] 图 1 展示由拉喹莫德相较于化合物 2 以 0.2mg/kg 向大鼠口服投予之后形成的 DELAQ 的平均血浆浓度-时间曲线。

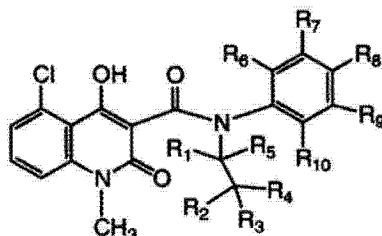
[0038] 图 2 展示拉喹莫德相较于化合物 2 以 0.2mg/kg 向大鼠口服投予之后的平均血浆浓度-时间曲线。

[0039] 图 3 展示用两种剂量的拉啞莫德和各种剂量的化合物 1、2 和 3 处理的小鼠中的 MOG 诱导的 EAE 的组平均记分比较。

具体实施方式

[0040] 本发明提供一种治疗罹患自身免疫性疾病的人类个体的方法,所述方法包含每天向该人类个体授予 0.2mg-2.0mg 可有效治疗该个体的具有以下结构的氘富集化合物:

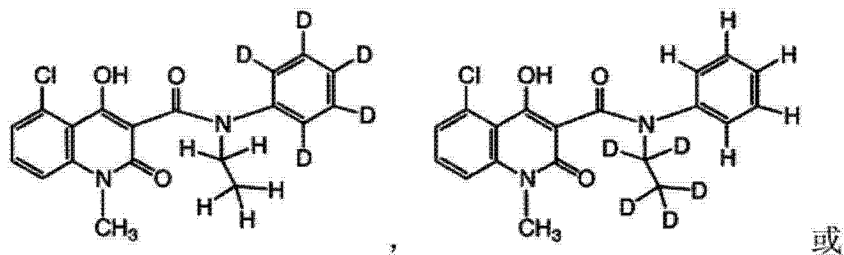
[0041]



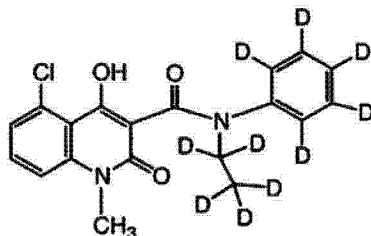
[0042] 其中 R1-R10 中的每一者都独立地是 H 或 D,并且 R1-R10 中的至少一者是 D,或其医药学上可接受的盐。

[0043] 在方法的一个实施例中,该氘富集化合物是

[0044]



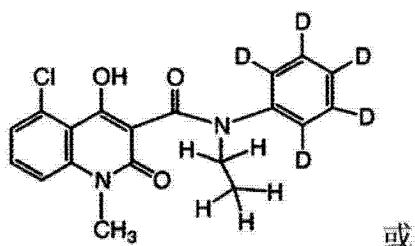
[0045]



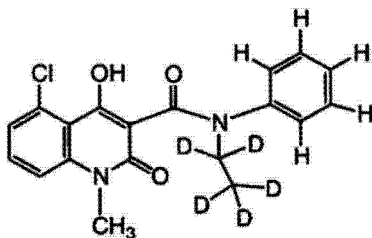
[0046] 或其医药学上可接受的盐。

[0047] 在方法的另一个实施例中,该氘富集化合物是

[0048]



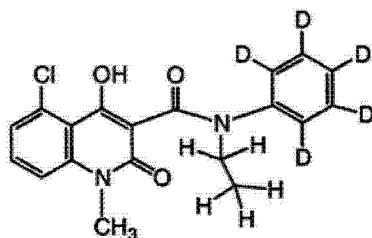
或



[0049] 或其医药学上可接受的盐。

[0050] 在方法的另一个实施例中,该氘富集化合物是

[0051]



[0052] 或其医药学上可接受的盐。

[0053] 在方法的另一个实施例中,该自身免疫性疾病是多发性硬化症、全身性红斑狼疮症、狼疮肾炎、狼疮关节炎、克罗恩氏病(Crohn's Disease)或类风湿性关节炎。

[0054] 在方法的另一个实施例中,该自身免疫性疾病是多发性硬化症。

[0055] 在方法的另一个实施例中,在治疗该自身免疫性疾病方面投予该氘富集化合物比投予等摩尔量的非氘富集拉喹莫德更有效。

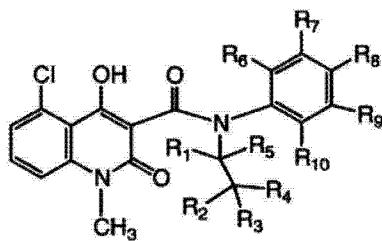
[0056] 在方法的另一个实施例中,与在向该人类个体投予等摩尔量的非氘富集拉喹莫德时形成的5-氯-4-羟基-1-甲基-2-氧代-N-苯基-1,2-二氢喹啉-3-甲酰胺的水平相比,在投予该氘富集化合物后在该人类个体中形成的任选氘化的5-氯-4-羟基-1-甲基-2-氧代-N-苯基-1,2-二氢喹啉-3-甲酰胺的水平降低。

[0057] 在方法的另一个实施例中,任选氘化的5-氯-4-羟基-1-甲基-2-氧代-N-苯基-1,2-二氢喹啉-3-甲酰胺的水平降低至少50%。

[0058] 在方法的另一个实施例中,任选氘化的5-氯-4-羟基-1-甲基-2-氧代-N-苯基-1,2-二氢喹啉-3-甲酰胺的水平降低至少90%。

[0059] 本发明还提供一种诱导人类个体中任选氘化的5-氯-4-羟基-1-甲基-2-氧代-N-苯基-1,2-二氢喹啉-3-甲酰胺的形成减少的方法,所述方法包含向该人类个体投予治疗有效量的具有以下结构的氘富集化合物:

[0060]



[0061] 其中 R1-R10 中的每一者都独立地是 H 或 D, 并且 R1-R10 中的至少一者是 D, 或其医药学上可接受的盐,

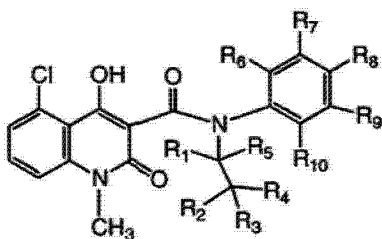
[0062] 其中该形成减少是相对于在授予等摩尔量的非氘富集拉喹莫德后 5- 氯 -4- 羟基 -1- 甲基 -2- 氧代 -N- 苯基 -1, 2- 二氢喹啉 -3- 甲酰胺的形成。

[0063] 在该方法的一个实施例中, 与在向该人类个体授予等摩尔量的非氘富集拉喹莫德时形成的 5- 氯 -4- 羟基 -1- 甲基 -2- 氧代 -N- 苯基 -1, 2- 二氢喹啉 -3- 甲酰胺的水平相比, 任选氘化的 5- 氯 -4- 羟基 -1- 甲基 -2- 氧代 -N- 苯基 -1, 2- 二氢喹啉 -3- 甲酰胺的水平降低至少 50%。

[0064] 在方法的另一个实施例中, 任选氘化的 5- 氯 -4- 羟基 -1- 甲基 -2- 氧代 -N- 苯基 -1, 2- 二氢喹啉 -3- 甲酰胺的水平降低至少 90%。

[0065] 本发明进一步提供一种至少两种氘富集化合物的混合物, 每一化合物都具有以下结构:

[0066]

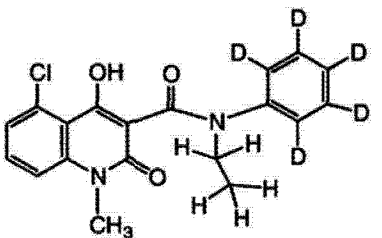


[0067] 其中 R1-R10 中的每一者都独立地是 H 或 D, 并且该至少两种氘富集化合物中的每一者都在不同 R1-R10 处含有 D,

[0068] 或其医药学上可接受的盐。

[0069] 在混合物的一个实施例中, 该至少两种氘富集化合物中的一者具有以下结构:

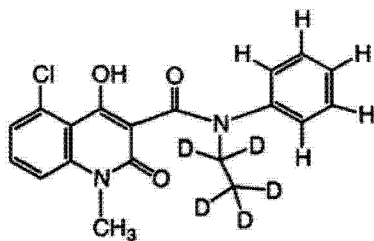
[0070]



[0071] 或其医药学上可接受的盐。

[0072] 在混合物的另一个实施例中, 该至少两种氘富集化合物中的一者具有以下结构:

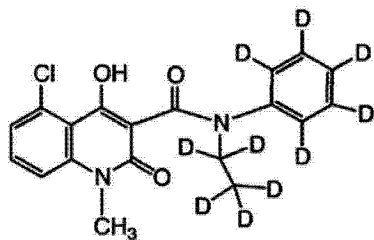
[0073]



[0074] 或其医药学上可接受的盐。

[0075] 在混合物的另一个实施例中,该至少两种氘富集化合物中的一者具有以下结构:

[0076]



[0077] 或其医药学上可接受的盐。

[0078] 本发明进一步提供一种医药组合物,其包含本文所描述的混合物或其医药学上可接受的盐;和医药学上可接受的载体。

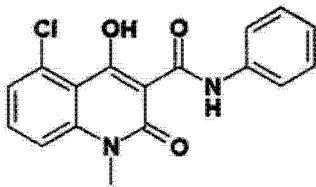
[0079] 本发明进一步提供一种医药组合物,其包含以下的混合物:

[0080] a) 氘富集拉喹莫德或其医药学上可接受的盐;

[0081] b) 至少一种医药学上可接受的载体;以及

[0082] c) 具有以下结构的化合物:

[0083]

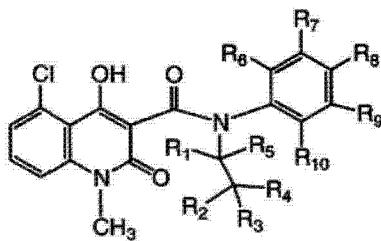


[0084] 其以按该化合物和氘富集拉喹莫德的组合重量计小于 0.1% 的量存在。

[0085] 在医药组合物的一个实施例中,该化合物以按该化合物和氘富集拉喹莫德的组合重量计小于 3ppm 或小于 2ppm 的量存在。

[0086] 在医药组合物的另一个实施例中,该氘富集拉喹莫德具有以下结构:

[0087]



[0088] 其中 R1-R10 中的每一者都独立地是 H 或 D,并且 R1-R10 中的至少一者是 D,或其医药学上可接受的盐。

[0089] 在医药组合物的另一个实施例中,在该氘富集拉喹莫德中,R1-R5 中的每一者都是 D 并且 R6-R10 中的每一者都是 H,或其医药学上可接受的盐。

[0090] 在医药组合物的另一个实施例中,在该氘富集拉喹莫德中,R1-R5 中的每一者都是 H 并且 R6-R10 中的每一者都是 D,或其医药学上可接受的盐。

[0091] 在医药组合物的另一个实施例中,在该氘富集拉喹莫德中,R1-R10 中的每一者都是 D,或其医药学上可接受的盐。

[0092] 在医药组合物的另一个实施例中,该医药组合物呈片剂形式。

[0093] 在该医药组合物的另一个实施例中,在由人类个体摄取时,相对于在等摩尔量的非氘富集拉喹莫德由人类个体摄取时形成的 5- 氯 -4- 羟基 -1- 甲基 -2- 氧代 -N- 苯基 -1, 2- 二氢喹啉 -3- 甲酰胺的水平,该医药组合物提供降低水平的在人类个体中形成的任选氘化的 5- 氯 -4- 羟基 -1- 甲基 -2- 氧代 -N- 苯基 -1, 2- 二氢喹啉 -3- 甲酰胺。

[0094] 本发明进一步提供一种制备本文所描述的医药组合物的工艺,所述工艺包含:

[0095] a) 获得一批次氘富集拉喹莫德或其医药学上可接受的盐;

[0096] b) 通过装置测定存在于所述批次的氘富集拉喹莫德或其医药学上可接受的盐中的任选氘化的 5- 氯 -4- 羟基 -1- 甲基 -2- 氧代 -N- 苯基 -1, 2- 二氢喹啉 -3- 甲酰胺的总量;以及

[0097] c) 仅在所述批次经测定具有,按重量计,小于 0.1% 的任选氘化的 5- 氯 -4- 羟基 -1- 甲基 -2- 氧代 -N- 苯基 -1, 2- 二氢喹啉 -3- 甲酰胺时,才使用所述批次制备所述医药组合物。

[0098] 本发明进一步提供一种制造经验证的批次的本文所描述的医药组合物用于分发的工艺,所述工艺包含:

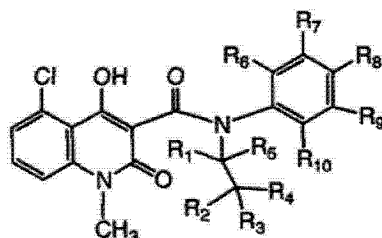
[0099] a) 获得一批次医药组合物;

[0100] b) 通过装置测定所述批次的样品中任选氘化的 5- 氯 -4- 羟基 -1- 甲基 -2- 氧代 -N- 苯基 -1, 2- 二氢喹啉 -3- 甲酰胺的总量;以及

[0101] c) 仅在所述批次的样品经测定含有,按重量计,相对于拉喹莫德和任选氘化的 5- 氯 -4- 羟基 -1- 甲基 -2- 氧代 -N- 苯基 -1, 2- 二氢喹啉 -3- 甲酰胺的组合重量,小于 0.1% 的任选氘化的 5- 氯 -4- 羟基 -1- 甲基 -2- 氧代 -N- 苯基 -1, 2- 二氢喹啉 -3- 甲酰胺时,才验证所述批次用于分发。

[0102] 本发明进一步提供一种氘富集化合物,其具有以下结构:

[0103]



[0104] 其中 R1-R10 中的每一者都独立地是 H 或 D,并且 R1-R10 中的至少一者是 D,或其医药学上可接受的盐,

[0105] 其以每天 0.2mg-2mg 的量用以治疗人类个体的自身免疫性疾病。

[0106] 本文所公开的任何范围都意指所述范围内的所有百分之一、十分之一和整数单位量都作为本发明的一部分明确公开。因此,举例来说,0.01mg 到 50mg 意指 0.02mg、0.03mg……0.09mg ;0.1mg、0.2mg……0.9mg ;和 1mg、2mg……49mg 单位量作为本发明的实施例包括在内。

[0107] 氘(D 或 $2H$) 是氢的稳定非放射性同位素,并且具有 2.0144 的原子量。化合物中的氢原子以同位素 $1H$ (氢或氕)、D ($2H$ 或氘) 和 T ($3H$ 或氚) 混合物形式天然存在。氘的天然丰度是 0.0156%。因此,化合物中任何氢原子位点处的氘水平已经富集而大于其天然丰度 0.0156% 的化合物新颖优于其非富集对应物。

[0108] 如本文所用,“氘富集(deuterium-enriched)”化合物意指在一定量的化合物中化合物的任何相关位点处的氘丰度大于那个位点处天然存在的氘丰度。如上文所用的化合物的相关位点是在非氘富集时在化合物的化学结构表示中指定为“H”的位点。如上文所用的天然存在的是指在无任何使氘丰度富集的确认证步骤的情况下制备化合物时存在于化合物的相关位点处的氘丰度。因此,在“氘富集”化合物中,其相关位点中的任一者处的氘丰度都可能在大于 0.0156% 到 100% 的范围内。获得氘富集化合物的方法的实例是用氘交换氢或用氘富集起始物质合成化合物。

[0109] 在毫克量或更多量的化合物的任何相关位点处获得 100% 氘化可能较困难。因此,应了解,即使氘原子明确展示于化学结构中,仍可能存在一些百分比的氢。因此,当化学结构含有“D”时,由所述结构表示的化合物在由“D”表示的位点处是氘富集的。

[0110] 化合物特征是指化合物所展示的任何性质,例如通过 $1H$ 核磁共振法、质谱法、红外、紫外或荧光分光光度法、气相色谱法、薄层色谱法、高效液相色谱法、元素分析、艾姆斯试验(Ames test)测定的峰或保留时间,可通过分析方法测定的溶解、稳定性和任何其它性质。一旦已知化合物的特征,信息即可用于例如筛选或测试样品中化合物的存在。

[0111] 如本文所用,“医药学上可接受的(pharmaceutically acceptable)”载体或赋形剂是适于供人类和 / 或动物使用而无过度不良反应(例如毒性、刺激和过敏反应)并且与合理的效益 / 风险比相称的载体或赋形剂。

[0112] 如本文所用,“原料药(drug substance)”是指药品中的活性成分,其在诊断、治愈、缓解、治疗或预防疾病中提供药理学活性或其它直接作用,或影响人类或动物身体的结构或任何功能。

[0113] 如本文所用,“药品”是指成品剂型,其含有原料药以及至少一种医药学上可接受的载体。

[0114] 如本文所用,“经分离的”化合物是按照确认的分离行为从粗反应混合物中分离的化合物。分离行为必然涉及使化合物与粗反应混合物的其它已知组分分离,其中允许粗反应混合物的某些杂质、未知副产物和剩余量的其它已知组分余留。纯化是确认的分离行为的一个实例。

[0115] 如本文所用,“无”化学实体的组合物意指所述组合物含有(如果有的话)按照打算消除组合物中化学实体的存在的确认行为不能被避免的量的化学实体。

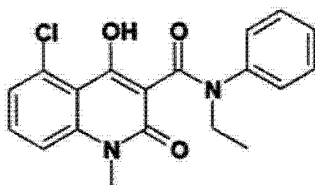
[0116] 如本文所用,“稳定性测试”是指在具体时间间隔和各种环境条件(例如温度和湿度)下进行的测试,以查看药品在其指定的储存寿命内降解与否或达到什么程度。测试的具体条件和时间能够促进药品在其储存寿命内预期遭遇的条件。举例来说,用于成品药物的

稳定性测试的具体要求编纂于 21C.F.R § 211.166 中,其全部内容以引用的方式并入本文中。

[0117] 如本文所用,“约”在数值或范围的情形下意指所叙述或所主张的数值或范围的 ±10%。

[0118] 拉喹莫德是具有以下化学结构的小分子:

[0119]



[0120] 拉喹莫德

[0121] 其是口服免疫调节剂,其已在各种实验性炎性 / 自身免疫性动物模型中展示治疗性作用,所述模型例如为实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)、用于多发性硬化症(MS)的动物模型、用于炎性肠道疾病的葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的结肠炎、用于 I 型糖尿病(IDDM)的非肥胖糖尿病(NOD)小鼠、用于格林 - 巴利综合症(Guillain-Barre Syndrome)、全身性红斑狼疮症(SLE)、狼疮肾炎、狼疮关节炎、克罗恩氏病和类风湿性关节炎的实验性自身免疫性神经炎(EAN)。拉喹莫德在这些模型中的治疗活性由多种机制作用引起,所述机制作用包括通过调节趋化因子介导的 T 细胞粘附而减少白细胞浸润到目标组织中、调节细胞因子平衡、使引起抗原呈递变化的 MHC II 类下调以及对树突状细胞亚群的作用。

[0122] 拉喹莫德以及本文中氧化的化合物的医药学上可接受的盐包括锂盐、钠盐、钾盐、镁盐、钙盐、锰盐、铜盐、锌盐、铝盐和铁盐。拉喹莫德的盐调配物和其制备工艺描述于例如美国专利申请公开案第 2005/0192315 号和 PCT 国际申请公开案第 W02005/074899 号中,所述公开案在此以引用的方式并入本申请案中。

[0123] 剂量单位可包含单一化合物或其化合物的混合物。剂量单位可经制备用于口服剂型,例如片剂、胶囊、丸剂、散剂和颗粒剂。

[0124] 拉喹莫德以及本文中氧化的化合物可与就预定授予形式来说适当选择并且与常规医药实践一致的适合的医药稀释剂、增量剂、赋形剂或载体(本文中统称为医药学上可接受的载体)混合授予。单位优选地呈适于口服授予的形式。拉喹莫德以及本文中氧化的化合物可单独授予,但通常与医药学上可接受的载体混合,并且以片剂或胶囊、脂质体的形式或以聚结粉末的形式共授予。适合的固体载体的实例包括乳糖、蔗糖、明胶和琼脂。胶囊或片剂可容易地调配,并且可被制成易于吞咽或咀嚼;其它固体形式包括颗粒和松散粉末。片剂可含有适合的粘合剂、润滑剂、崩解剂、着色剂、调味剂、流动诱导剂和熔融剂。举例来说,对于以片剂或胶囊的剂量单位形式口服投药,可将活性药物组分与口服无毒的医药学上可接受的惰性载体(例如乳糖、明胶、琼脂、淀粉、蔗糖、葡萄糖、甲基纤维素、磷酸二钙、硫酸钙、甘露糖醇、山梨糖醇、微晶纤维素等)组合。适合的粘合剂包括淀粉、明胶、天然糖(例如葡萄糖或 β - 乳糖)、玉米淀粉、天然和合成胶(例如阿拉伯胶、黄蓍胶或海藻酸钠)、聚维酮(povidone)、羧甲基纤维素、聚乙二醇、蜡等。用于这些剂型的润滑剂包括油酸钠、硬脂酸钠、苯甲酸钠、乙酸钠、氯化钠、硬脂酸、硬脂富马酸钠、滑石等。崩解剂包括(但不限于)淀粉、甲基纤维素、琼脂、膨润土(bentonite)、三仙胶(xanthan gum)、交联羧甲基纤维素钠、

羟基乙酸淀粉钠等。

[0125] 可用于调配本发明的口服剂型的技术、医药学上可接受的载体和赋形剂的具体实例描述于例如美国专利申请公开案第 2005/0192315 号、PCT 国际申请公开案第 W02005/074899 号、第 W02007/047863 号和第 W02007/146248 号中。

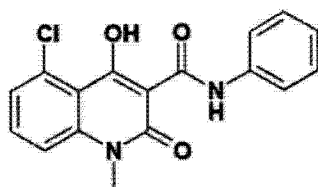
[0126] 用于制造适用于本发明的剂型的一般技术和组合物描述于以下参考文献中：7 现代制药学 (7Modern Pharmaceuticals), 第 9 章和第 10 章(班克 (Banker) 和罗德斯 (Rhodes) 编, 1979); 药物剂型：片剂 (Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets) (利伯曼 (Lieberman) 等人, 1981); 安斯艾尔 (Ansel), 药物剂型引言 (Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms) 第 2 版 (1976); 雷明顿氏制药科学 (Remington's Pharmaceutical Sciences), 第 17 版 (宾夕法尼亚州伊斯顿的默克出版公司 (Mack Publishing Company, Easton, Pa.), 1985); 制药科学进展 (Advances in Pharmaceutical Sciences) (戴维甘德顿 (David Ganderton), 崔佛琼斯 (Trevor Jones) 编, 1992); 制药科学进展第 7 卷 (戴维甘德顿, 崔佛琼斯, 詹姆斯麦吉尼蒂 (James McGinity) 编, 1995); 用于药物剂型的水性聚合包衣 (药物和制药科学) (Aqueous Polymeric Coatings for Pharmaceutical Dosage Forms (Drugs and the Pharmaceutical Sciences)), 36 系列 (詹姆斯麦吉尼蒂编, 1989); 药物微粒载体：治疗应用：药物和制药科学 (Pharmaceutical Particulate Carriers: Therapeutic Applications: Drugs and the Pharmaceutical Sciences), 第 61 卷 (阿伦罗兰德 (Alain Rolland) 编, 1993); 药物向胃肠道的递送 (Drug Delivery to the Gastrointestinal Tract) (生物科学中的埃利斯霍伍德丛书：制药技术系列 (Ellis Horwood Books in the Biological Sciences. Series in Pharmaceutical Technology)); J.G. 哈迪 (J.G. Hardy), S.S. 戴维斯 (S.S. Davis), 克莱夫 G. 威尔逊 (Clive G. Wilson) 编; 现代制药学药物和制药科学 (Modern Pharmaceuticals Drugs and the Pharmaceutical Sciences), 第 40 卷 (吉尔伯特 S. 班克 (Gilbert S. Banker), 克里斯多夫 T. 罗德斯 (Christopher T. Rhodes) 编)。这些参考文献在此以全文引用的方式并入本申请案中。

[0127] 来自化合物的代谢物, 无论是固有的还是药用的, 都作为降解和消除化合物的天然生物化学工艺的一部分形成。化合物的降解速率是其作用的持续时间和强度的重要决定因素。描绘医药化合物的代谢物的药物代谢是药物发现的重要部分, 导致了解任何不合需要的副作用。

[0128] 拉喹莫德的代谢

[0129] 已展示拉喹莫德由 CYP3A4 (细胞色素 P4503A4) 缓慢代谢以形成数种微量代谢物, 并且其中有些可能通过 2 期代谢反应进行进一步代谢。参见 (例如) 楚文森 (Tuveson) 等人 “细胞色素 P4503A4 是负责拉喹莫德 (一种新颖免疫调节剂) 代谢的主要的酶 (Cytochrome P4503A4 is the major enzyme responsible for the metabolism of laquinimod, a novel immunomodulator)”, 药物代谢和处置 (Drug Metabolism and Disposition), 第 33 卷, 第 6 期, 第 866-872 页。具有以下化学结构的 DELAQ (脱乙基拉喹莫德; 5-氯-4-羟基-1-甲基-2-氧代-N-苯基-1,2-二氢喹啉-3-甲酰胺) 是拉喹莫德的氧化代谢物之一。

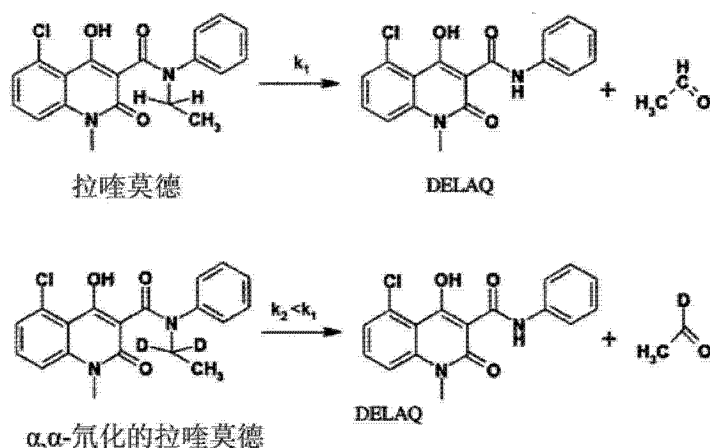
[0130]



[0131] 此外,临床资料已显示,人体的 DELAQ 水平在或者 C_{max} 或者 AUC 方面与拉喹莫德水平呈某一恒定比率。这种特性表明,代谢物 DELAQ 的形成是 PK “形成率受限的”。

[0132] 下文所述是展示拉喹莫德的氧化形式对代谢变化、尤其由细胞色素 P450 系统所介导的那些变化抵抗性更大的实验。待要氧化的 C-H 键的氧化可能改变药物代谢的路径(代谢转换)。以下代谢方案说明了用氧化的拉喹莫德较慢形成 CYP3A4 介导的 DELAQ。

[0133]



[0134] 在乙基的 α -碳氧化之前苯基部分的氧化可能影响酰胺键相对于 CYP 催化中心的位置。这可以解释为什么在乙基和 / 或苯基部分具有各种氧化的氧化的拉喹莫德导致例如任选氧化的 DELAQ 的形成减少。

[0135] 作为杂质的 DELAQ

[0136] DELAQ 也是拉喹莫德合成的不合需要的合成副产物。DELAQ 的任何活性尚未充分表征。还通常优选的是使原料药和最终药品中杂质的量降到最低。

[0137] 通过 HPLC 方法测试作为拉喹莫德钠原料药中杂质的 DELAQ, 并且此杂质的规格以不超过 0.1% 提供。拉喹莫德钠的 GMP 原料药批次已经测试, 并且已发现这些批次中 DELAQ 的水平小于 3ppm。因此提供相似参数用于含有本发明化合物的药品。

[0138] 已开发用于测定任选氧化的 DELAQ 浓度的数种分析和生物分析方法。当前用于各种基质中任选氧化的 DELAQ 分析的生物分析方法是基于 LC-MS, 并且在低皮克 / 毫升血浆水平下具有灵敏性。

[0139] 通过参考后续实验细节将更好地理解本发明, 但所属领域的技术人员将易于了解所详述的具体实验仅说明如更充分地描述于其后随附权利要求书中的本发明。

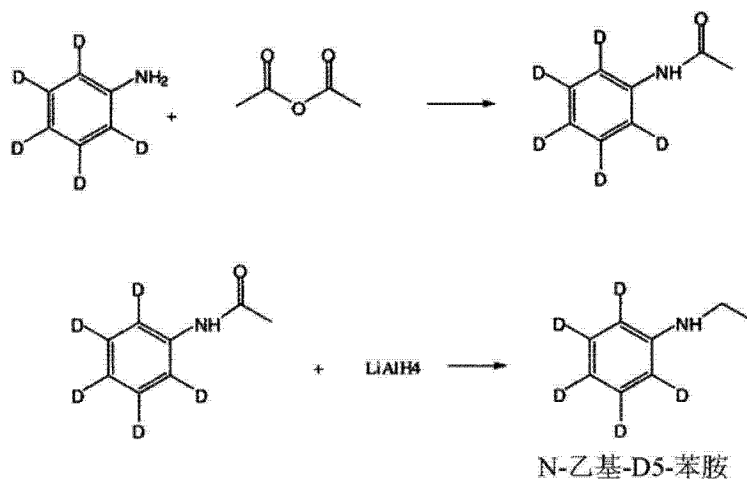
[0140] 实验细节:

[0141] 实例 1: 制备氧化的拉喹莫德

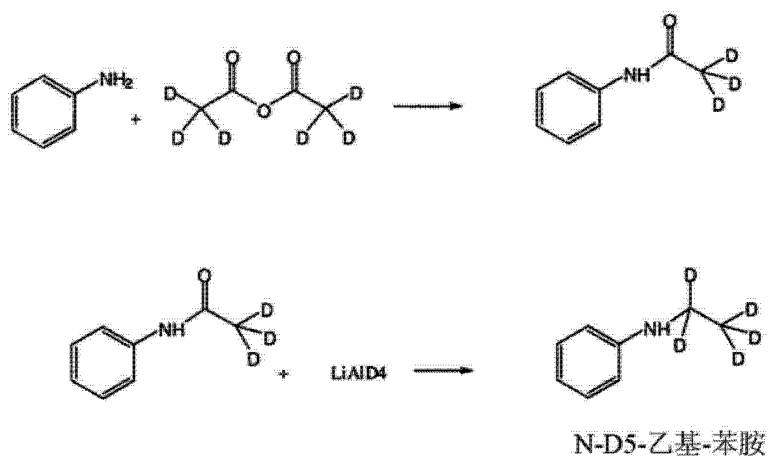
[0142] 步骤 1: 合成氧化的 N-乙基-苯胺

[0143] N-乙基-D5-苯胺

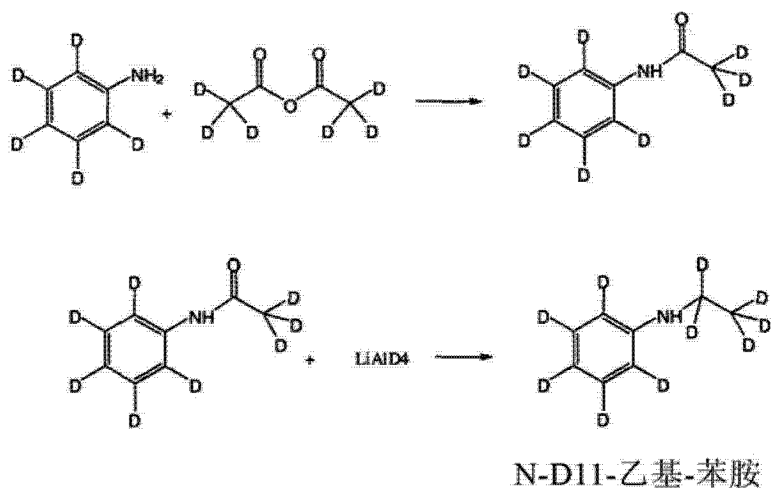
[0144]

[0145] N-D5-乙基-苯胺

[0146]

[0147] N-D11-乙基-苯胺

[0148]



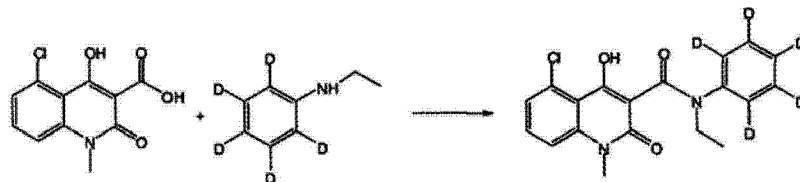
[0149] 将苯胺(0.01 摩尔)溶解于甲苯(10ml)中,在氮气下冷却到 0℃,并且整份添加乙酸酐(0.02 摩尔)。去除冷却浴,并且搅拌混合物 90 分钟,并且然后在旋转蒸发器上蒸发。在真空中干燥中间物乙酰苯胺,并且然后将其溶解于 THF (20ml) 中,并且在氮气下冷却到 0℃。在 25 分钟期间中添加氢化锂铝(0.025 摩尔)。将混合物回流 2 小时,并且然后将其冷却。添加硅胶(3 克),接着添加 1M NaOH 溶液(1.8 克)。搅拌混合物 30 分钟,并且然后通

过硫酸钠垫过滤。用乙醚洗涤滤饼,并且在旋转蒸发器上浓缩有机相,得到标题化合物。

[0150] 步骤 2:合成氘化的拉喹莫德

[0151] N-乙基-N-D5-苯基-1,2-二氢-4-羟基-5-氯-1-甲基-2-氧代喹啉-3-甲酰胺(化合物 1)

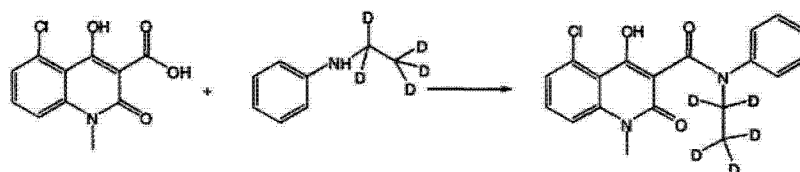
[0152]



化合物 1

[0153] N-D5-乙基-N-苯基-1,2-二氢-4-羟基-5-氯-1-甲基-2-氧代喹啉-3-甲酰胺(化合物 2)

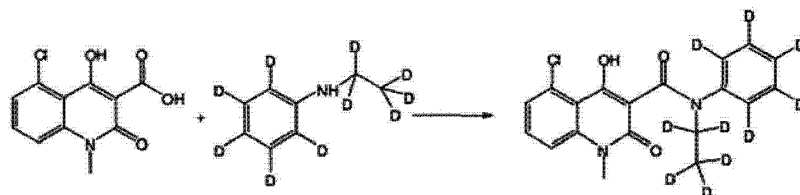
[0154]



化合物 2

[0155] N-D5-乙基-N-D5-苯基-1,2-二氢-4-羟基-5-氯-1-甲基-2-氧代喹啉-3-甲酰胺(化合物 3)

[0156]



化合物 3

[0157] 在二氯甲烷(32ml)中搅拌 N-乙基-苯胺(0.01 摩尔)和 MCQCA (1,2-二氢-4-羟基-5-氯-1-甲基-2-氧代-喹啉-3-甲酸) (2.03 克,0.008 摩尔),并且添加三乙胺(4.2ml)。在冰/水浴中在氮气下冷却混合物,并且在 30 分钟期间逐滴添加亚硫酸氯(1.33 克)。再在 0℃下搅拌混合物 3 小时,并且然后用冷 1M 硫酸水溶液萃取。用 1M NaOH 溶液萃取有机相,并且在旋转蒸发器上稍微浓缩水相以去除痕量有机溶剂。添加 5M HCl 到 pH 为 1-1.5,并且搅拌所得悬浮液 30 分钟。过滤沉淀的产物,用水洗涤,并且在真空中干燥。然后获得氘化的拉喹莫德(86-93% 产率)。

[0158] 步骤 3:制备氘化的拉喹莫德钠盐

[0159] 将步骤 2 中制备的氘化的拉喹莫德悬浮于乙醇中,并且用 20%NaOH 水溶液进行处理。搅拌沉淀的钠盐 3 小时,过滤,并且用乙醇洗涤。在真空中干燥,得到氘化的拉喹莫德钠盐(92-94% 产率)。通过 NMR、MS 和 HPLC 证明身份和纯度。

[0160] 氘化的化合物 1-3 的同位素纯度和分析

[0161]

化合物	同位素纯度 (LC/MS/MS)	分析
1	100.0%	94.0%
2	100.0%	95.4%
3	100.0%	95.6%

[0162] 实例 2:DELAQ 的分析

[0163] DELAQ 在授予拉喹莫德后在啮齿动物以及人体中作为代谢物形成。已开发用于测定 DELAQ (作为代表性代谢物) 浓度的数种分析和生物分析方法。当前用于各种基质中 DELAQ 分析的生物分析方法是基于 LC-MS, 并且在低皮克 / 毫升血浆水平下具有灵敏性。

[0164] 以下条件用于测定人血浆中的 DELAQ。通过在用 LUDOX AS-40 胶态二氧化硅溶液沉淀后的联机 SPE 来纯化血浆, 接着用 HPLC 及 MS/MS 检测进行分析。

[0165] 条件 1:

[0166]

装置	LC/MS/MS SCIEX, QTRAP4000 岛津 (Shimadzu) Prominence HPLC 系统控制器: 岛津 CBM-20A 泵: 泵 A: 岛津 LC-20AD 泵 B: 岛津 LC-20AD 泵 C: 岛津 LC-20AB 自动取样器: 岛津 SIL-20AC 柱加热炉: 岛津 CTO-20AC
数据采集系统	分析器 1.4.2 或更高版本
用于联机过滤器分析的柱	沃特世 (Waters) Symmetry Shield RP18, 3.5 μm , 2.1 $\times$ 100 mm, Javelin 0.2 μm 过滤器 (热电公司 (Thermo Electron Corp), 第 88200 号) 或等效物
用于 SPE 的柱	菲罗门 (Phenomenex) C18-E, 20 μm , 2 $\times$ 20 mm
柱温	30 $^{\circ}\text{C}$
自动取样器温度:	15 $^{\circ}\text{C}$
注射体积	160 μL
运行时间	约 7 分钟 (包括联机 SPE 和分析)
分流比	无
流动相	溶液 A: 0.01% TFA 的水溶液 溶液 B: 0.01% TFA 的 MeOH 溶液
清洗液 1	200 mM PCA 的水溶液
清洗液 2	丙酮
预处理 A (泵 A)	0.01% TFA 的水溶液
预处理 B (泵 B)	0.01% TFA 的 MeOH 溶液

[0167] 条件 2.

[0168]

装置	LC/MS/MS SCIEX, QTRAP4000 岛津 Prominence HPLC 系统控制器: 岛津 CBM-20A 泵: 泵 A: 岛津 LC-20AD 泵 B: 岛津 LC-20AD 泵 C: 岛津 LC-20AB 自动取样器: 岛津 SIL-20AC 柱加热炉: 岛津 CTO-20AC
数据采集系统	分析器 1.4.2 或更高版本
用于联机过滤器分析的柱	沃特世 Symmetry Shield RP18, 3.5 μm , 2.1 $\times$ 100 mm, Javelin 0.2 μm 过滤器 (热电公司, 第 88200 号) 或等效物
用于 SPE 的柱	菲罗门 C18-E, 20 μm , 2 $\times$ 20 mm
柱温	30 $^{\circ}\text{C}$
自动取样器温度:	15 $^{\circ}\text{C}$
注射体积	160 μL
运行时间	约 7 分钟 (包括联机 SPE 和分析)
分流比	无
流动相	溶液 A: 0.01% TFA 的水溶液 溶液 B: 0.01% TFA 的 MeOH 溶液
清洗液 1	200 mM PCA 的水溶液
清洗液 2	丙酮
预处理 A (泵 A)	0.01% TFA 的水溶液
预处理 B (泵 B)	0.01% TFA 的 MeOH 溶液

[0169]

[0170] 还在以下条件下测定大鼠血浆中的 DELAQ。通过在用 LUDOX AS-40 胶态二氧化硅溶液沉淀后的联机 SPE 来纯化血浆,接着用 HPLC 及 MS/MS 检测进行分析。

[0171]

装置	LC/MS/MS SCIEX, QTRAP4000 岛津 Prominence HPLC 系统控制器: 岛津 CBM-20A 泵: 泵 A: 岛津 LC-20AD 泵 B: 岛津 LC-20AD 泵 C: 岛津 LC-20AB 自动取样器: 岛津 SIL-20AC 柱加热炉: 岛津 CTO-20AC
数据采集系统	分析器 1.4.2 或更高版本
用于联机过滤器分析的柱	沃特世 Symmetry Shield RP18, 3.5 μm , 2.1 $\times$ 100 mm, Javelin 0.2 μm 过滤器 (热电公司, 第 88200 号) 或等效物
用于 SPE 的柱	菲罗门 C18-E, 20 μm , 2 $\times$ 20 mm
柱温	30 $^{\circ}\text{C}$
自动取样器温度:	15 $^{\circ}\text{C}$
注射体积	80 μL
运行时间	约 7 分钟 (包括联机 SPE 和分析)
分流比	无
流动相	溶液 A: 0.01% TFA 的水溶液 溶液 B: 0.01% TFA 的 MeOH 溶液
清洗液 1	200 mM PCA 的水溶液
清洗液 2	丙酮
预处理 A (泵 A)	0.01% TFA 的水溶液
预处理 B (泵 B)	0.01% TFA 的 MeOH 溶液

[0172] 实例 3: 药物动力学和部分代谢评估

[0173] 此实例的主要目标是:

[0174] • 使用 LC/MS/MS 生物分析方法定量大鼠血浆中的化合物 1、化合物 2、化合物 3 和拉喹莫德。

[0175] • 表征化合物 1、化合物 2、化合物 3 和拉喹莫德在以 0.2mg/kg 的剂量口服 (PO) 投予之后的药物动力学特征。

[0176] • 测量所收集的血浆样品中的 DELAQ 浓度。

[0177] 此实例中所选的剂量水平已用于先前用拉喹莫德进行的药理学研究中。

[0178] 一般设计

[0179] 使用通过聚乙烯管在右颈总静脉处插管的大鼠。在生前部分中, 用 0.2mg/kg 剂量的四种测试物品的每一者处理三只插管的雌性大鼠。

[0180] 在五个不同时间点从大鼠中抽出血液用于制备血浆。使用可适用的 LC/MS/MS 方法测定这些血浆样品中化合物 1、化合物 2、化合物 3、拉喹莫德和 DELAQ 的浓度。

[0181] 材料

[0182] 测试化合物

[0183] a. 实例 1 中制备的 N-乙基-N-D5-苯基-1, 2-二氢-4-羟基-5-氯-1-甲基-2-氧代喹啉-3-甲酰胺钠盐 (化合物 1):

[0184] 分子量: 383.8

- [0185] 外观 : 白色粉末
- [0186] 储存 : 2℃ -8℃, 避光保存
- [0187] 纯度 : 假设 100% 纯度。
- [0188] b. 实例 1 中制备的 N-D5- 乙基 -N- 苯基 -1, 2- 二氢 -4- 羟基 -5- 氯 -1- 甲基 -2- 氧代喹啉 -3- 甲酰胺钠盐(化合物 2) :
- [0189] 分子量 : 383.8
- [0190] 外观 : 白色粉末
- [0191] 储存 : 2℃ -8℃, 避光保存
- [0192] 纯度 : 假设 100% 纯度。
- [0193] c. 实例 1 中制备的 N-D5- 乙基 -N-D5- 苯基 -1, 2- 二氢 -4- 羟基 -5- 氯 -1- 甲基 -2- 氧代喹啉 -3- 甲酰胺钠盐(化合物 3) :
- [0194] 分子量 : 388.8
- [0195] 外观 : 白色粉末
- [0196] 储存 : 2℃ -8℃, 避光保存
- [0197] 纯度 : 假设 100% 纯度。
- [0198] d. 拉喹莫德钠盐
- [0199] 分子量 : 378.8
- [0200] 外观 : 白色粉末
- [0201] 储存 : 控制的室温 (15℃ -25℃), 避光保存
- [0202] 通过 HPLC 分析 : 100.8%
- [0203] 纯度 : 假设 100% 纯度。
- [0204] 媒剂
- [0205] 水, 高纯度 (Direct Q, 实验室制造)
- [0206] 其它材料
- [0207] 用于麻醉的异氟烷 (FORANE®, ABBOTT)
- [0208] EDTA (乙二胺四乙酸二钠盐二水合物, 西格玛奥德里奇 (Sigma Aldrich), 产品号 : E4884-100g)
- [0209] 肝素钠盐 (来自猪肠粘膜, 西格玛奥德里奇, 产品号 : H9399-25KU)
- [0210] 测试系统
- [0211] 动物规格
- [0212] 物种 : 大鼠
- [0213] 品系 : SD (史泊格多利 (Sprague Dawley) CD 大鼠)
- [0214] 健康状态 : SPF
- [0215] 年龄大小 : 8 周
- [0216] 动物数目 : 20 只插管的雌性
- [0217] 体重范围大小 : 200-225g
- [0218] 适应新环境 : 至少 3 天
- [0219] 在治疗起始时 :
- [0220] 动物数目 : 12 只插管的雌性

[0221] 大概的年龄 :9 周

[0222] 选择测试系统的理由

[0223] SD 大鼠是适合用于药物动力学研究的啮齿动物物种和品系并且可为管理机构接受。此外,史泊格多利大鼠中拉喹莫德的药物动力学特征经充分表征。

[0224] 标识系统

[0225] 通过身体上去不掉的标记来标识每一动物。用指定品系、动物代码、组代码、药物投予的日期和时间、测试项目和研究代码的个别卡片标记各笼。

[0226] 具体抚养计划

[0227] 剂量投予前后的动物豢养

[0228] 将动物在到达设施之后分组装笼地豢养于环境上受到控制的房间中。使大鼠在具有锯屑作为底板垫的个别聚碳酸酯或聚磺酸酯笼中适应。

[0229] 环境条件

[0230] 将控制器设定为维持 $21 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 的温度和 30-70% 的相对湿度。自动地维持 12 小时亮 /12 小时暗的亮 / 暗循环。

[0231] 饮用水

[0232] 随意给予通过 $0.2 \mu\text{m}$ 过滤器过滤的自来水。常规地分析(每三个月一次)水的微生物总数和不存在绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)和梭菌种(*Clostridium* sps)。

[0233] 喂食

[0234] 在整个研究期间随意提供用于啮齿动物的 Altromin VRF1 热压处理过的食物。周期性地分析食物。

[0235] 褥草

[0236] 使用 LIGNOCEL (SAWI, 木刨花) 热压处理过的褥草。褥草材料的品质得到制造商保证。

[0237] 已知污染物不以可干扰研究目标的水平存在于食物、水或褥草中。

[0238] 实验设计

[0239] 适应新环境

[0240] 由合格人员检查每一动物,并且通过动物接收后能够抽出血液样品来验证套管的开放。使经判断处于良好健康中的动物适应新环境至少 3 天。所有动物都在适应期的最后一天接受由可靠兽医进行的详细身体检查。

[0241] 随机化

[0242] 在适应期之后,将经判断处于良好健康中并且适用于测试的动物基于其体重分配到研究中。在随机化时,动物的体重在总平均值的 $\pm 20\%$ 之内。

[0243] 动物剂量水平和治疗方案的组织

[0244] 表 1. 插管的动物分配到实验组

[0245]

组代码	剂量体积 [ml/kg]	投予测试项目 [0.2 mg/kg*, PO]	剂型 [0.04 mg/ml*]	组大小/ 动物代码
组 1C	5	化合物 1	化合物 1	3/1-3
组 2C	5	化合物 2	化合物 2	3/4-6
组 3C	5	化合物 3	化合物 3	3/7-9
组代码	剂量体积 [ml/kg]	投予测试项目 [0.2 mg/kg*, PO]	剂型 [0.04 mg/ml*]	组大小/ 动物代码
组 4C	5	拉喹莫德钠	拉喹莫德钠	3/10-12

[0246]

[0247] * 剂量基于非氘化的拉喹莫德游离酸形式。

[0248] 测试项目分子量比就化合物 1 和化合物 2 来说是 1.0757。测试项目分子量比就化合物 3 来说是 1.0898。测试项目分子量比就拉喹莫德钠来说是 1.0616。应用这些校正因子来将浓度调节为与非氘化的拉喹莫德游离酸等效。

[0249] 通过使用钝喂食不锈钢针 (Popper&Sons, 美国) 以 5ml/kg 的剂量体积口服管饲来进行口服投药。在剂量投予之前测量体重, 并且基于个别体重计算剂量。

[0250] 选择剂量和投予途径的理由

[0251] 此研究中所选的剂量水平已用于先前用拉喹莫德进行的药理学研究中。投予途径将为口服, 这是因为其是人类暴露的预期途径。

[0252] 制备调配物和测量所达到的浓度

[0253] 制备给药溶液

[0254] 称重适当量的测试项目, 并且将其溶解于水 (媒剂) 中以达到所需浓度, 所述浓度在每一情况下都与 0.04mg/mL 非氘化的拉喹莫德游离酸等效。

[0255] 通过轻缓震荡、搅拌、低速涡旋或超声波仪来溶解测试项目。不应用校正因子调节纯度。

[0256] 调配物的储存和稳定性

[0257] 所有给药溶液都储存于 2-8°C 下紧密封闭的琥珀玻璃容器中, 避光保存。在使用之前, 从冰箱中取出调配物, 并且然后使其达到环境室温 (15-25°C)。基于类似拉喹莫德给药溶液的稳定性资料, 假设给药溶液稳定至少 48 小时。

[0258] 所达到的给药溶液浓度

[0259] 在处理之前, 一式两份从溶液中取出的样品通过经验证的 HPLC 方法和 UV 检测测定给药溶液中的拉喹莫德浓度。所达到的浓度在标称浓度的 $\pm 10\%$ 之内。

[0260] 临床观测

[0261] 记录死亡率、疾病征象或对处理的严重反应。

[0262] 血液取样, 血浆制备

[0263] 如下表中所详述, 在以下时间点从动物抽出血液: 给药之后 1、2、4、8 和 24 小时。记录实际取样时间。

[0264] 表 2. 血液收集的时间点

[0265]

动物代码	1 小时	2 小时	4 小时	8 小时	24 小时
1-12	是	是	是	是	是

[0266] 从插管的大鼠收集血液

[0267] 稳固地钳制每一动物。在去除密封之后,用安放于含有 PBS 的注射器上的适当钝针进入套管口。在抽出约 100 μ L 血液之后,将注射器更换为清洁肝素化的注射器。收集约 250 μ L 血液用于制备血浆。将第一 100 μ L 部分的血液送回并且通过导管将 250 μ L 的 PBS 提供给动物。由通过将 10ml 储备肝素 (200IU/ml) 与 10ml 无菌甘油 ($d=1.26\text{g/mL}$) 混合而制备的肝素化的甘油 (100IU/ml) 溶液填充导管。即刻混合血液标本并且将其置于水冰上。

[0268] 制备血浆

[0269] 一旦切实可行就进行离心,并且从收集到离心不超过 40 分钟。

[0270] 在 4°C 下以 2500g 离心全血 10 分钟,并且将经分离的血浆转移到预标记的聚丙烯管中,并且在收集 70 分钟内将管冷冻于 -70°C 下。

[0271] 将冷冻的样品转移到生物分析实验室用于测定拉喹莫德浓度,其中其储存于标称 -70°C 下直到分析。

[0272] 血浆样品的生物分析

[0273] 通过使用可靠的 LC/MS/MS 分析来测定血浆样品中测试项目 (化合物 1、化合物 2、化合物 3 和拉喹莫德) 的浓度和 DELAQ 的浓度。

[0274] 药物动力学数据分析

[0275] 计算药物动力学参数,并且评估平均血浆水平相较于时间曲线。

[0276] 从化合物 1、化合物 2、化合物 3 和拉喹莫德的平均血浆浓度 - 时间数据 (三只动物在每一时间点的平均值) 测定以下药物动力学参数。

[0277]

参数	定义
AUC (0-t)	从时间零点达到最后可侦测浓度的时间 (t_z) 的血浆浓度 - 时间曲线下面积
AUC (0- ∞)	从时间零点达到无穷大的血浆浓度 - 时间曲线下面积
C _{max}	观测到的最大血浆浓度
t _{max}	观测到的最大血浆浓度的时间
t _{1/2}	表观末端消除半衰期

[0278] 结果概要

[0279] 如以下表 3-6 和图 2 中所示,氘富集拉喹莫德的平均血浆浓度与非氘富集拉喹莫德的平均血浆浓度类似。

[0280] 测试项目的浓度 - 时间曲线并不显著不同。最大平均浓度在投予之后 1 或 2 小时达到,并且在 703 与 798 纳克 / 毫升之间变化。平均浓度到给药后 24 小时时降低到 194-227 纳克 / 毫升。拉喹莫德、化合物 1、化合物 2 和化合物 3 的 AUC 值分别是 15506. 0、13783. 4、

12289.8 和 15750.2, 也表明在暴露方面没有显著差异。

[0281] 表 3. 以 0.2mg/kg 口服投予之后大鼠中拉喹莫德的个别和平均 PK 参数

[0282]

PK 参数	C _{max} (纳克/毫升)	T _{max} (小时)	T _{1/2} (小时)	AUC _{最后} (小时*纳克/毫升)	AUC _{无穷大} (小时*纳克/毫升)
10 号大鼠	770.0	2.0	12.0	11013.8	14691.6
11 号大鼠	774.8	1.0	12.4	12659.7	17141.8
12 号大鼠	838.8	2.0	10.9	11487.3	14684.6
平均值	794.5	1.7	11.8	11720.3	15506.0
标准差	38.4	0.6	0.8	847.3	1416.6

[0283] 表 4. 以 0.2mg/kg 口服投予之后大鼠中化合物 1 的个别和平均 PK 参数

[0284]

PK 参数	C _{max} (纳克/毫升)	T _{max} (小时)	T _{1/2} (小时)	AUC _{最后} (小时*纳克/毫升)	AUC _{无穷大} (小时*纳克/毫升)
1 号大鼠	730.7	2.0	12.1	10011.7	13617.9
2 号大鼠	611.9	2.0	9.5	8039.3	9733.8
3 号大鼠	809.5	2.0	10.0	10061.6	12447.9
13 号大鼠	944.9	1.0	13.4	13681.5	19333.9
平均值	774.3	1.8	11.3	10448.5	13783.4
标准差	139.8	0.5	1.8	2352.1	4042.2

[0285] 表 5. 以 0.2mg/kg 口服投予之后大鼠中化合物 2 的个别和平均 PK 参数

[0286]

PK 参数	C _{max} (纳克/毫升)	T _{max} (小时)	T _{1/2} (小时)	AUC _{最后} (小时*纳克/毫升)	AUC _{无穷大} (小时*纳克/毫升)
4 号大鼠	827.6	1.0	13.6	10422.1	14699.6
5 号大鼠	551.4	2.0	13.4	8741.6	12439.0
6 号大鼠	816.2	2.0	14.6	11975.3	11975.3
15 号大鼠	703.6	2.0	13.6	10045.4	10045.4
平均值	724.7	1.8	13.8	10296.1	12289.8
标准差	128.4	0.5	0.5	1331.0	1911.9

[0287] 表 6. 以 0.2mg/kg 口服投予之后大鼠中化合物 3 的个别和平均 PK 参数

[0288]

PK 参数	C _{max} (纳克/毫升)	T _{max} (小时)	T _{1/2} (小时)	AUC _{最后} (小时*纳克/毫升)	AUC _{无穷大} (小时*纳克/毫升)
7 号大鼠	728.9	2.0	12.7	11280.4	15225.2
8 号大鼠	833.2	1.0	12.0	5317.8	14845.1
9 号大鼠	904.3	1.0	11.6	11156.0	14643.7
17 号大鼠	907.5	1.0	11.5	12110.0	15790.7
18 号大鼠	800.4	2.0	14.4	12471.5	18246.2
平均值	834.9	1.4	12.4	10467.1	15750.2
标准差	75.0	0.5	1.2	2931.2	1462.1

[0289] 如以下表 7 和 8 和图 1 中所示,口服投予氘富集拉啞莫德之后形成的 DELAQ 的量低于投予非氘富集拉啞莫德之后形成的 DELAQ 的量。与用拉啞莫德处理的动物的血浆相比,观测到在化合物 2 处理的动物的血浆中测量的 DELAQ 浓度平均约十倍降低。在化合物 2 处理的群组中,平均 DELAQ 浓度在 18.3 与 75.4 皮克/毫升之间变化,并且在接受拉啞莫德的群组中,其在 142 与 878 皮克/毫升之间变化。在两个群组中,最低 DELAQ 浓度都在投予之后 1 小时测量到,并且 DELAQ 浓度增加直到在给药后 24 小时取得最后样品。

[0290] 表 7. 以 0.2mg/kg 口服投予之后大鼠中由拉啞莫德形成的 DELAQ 的个别和平均 PK 参数

[0291]

PK 参数	Cmax (皮克/毫升)	Tmax (小时)	AUC _{最后} (小时*皮克/毫升)
10 号大鼠	654	24	10369.0
11 号大鼠	1123	24	14606.5
12 号大鼠	858	24	13266.5
平均值	878.3	24	12747.3
标准差	235.2	0	2165.9

[0292] 表 8. 以 0.2mg/kg 口服投予之后大鼠中由化合物 2 形成的 DELAQ 的个别和平均 PK 参数

[0293]

PK 参数	Cmax (皮克/毫升)	Tmax (小时)	AUC _{最后} (小时*皮克/毫升)
4 号大鼠	62.0	24	1106.0
5 号大鼠	82.5	24	1065.3
6 号大鼠	77.3	24	1125.5
15 号大鼠	79.9	24	1318.8
平均值	75.4	24	1153.9
标准差	9.2	0	112.8

[0294]

[0295] 测试结果显示,氘富集拉啞莫德使 DELAQ 的形成减少,同时维持与非氘化的拉啞莫德类似的血浆浓度-时间曲线。

[0296] 实例 4:评估氘化的拉啞莫德(化合物 1、2 和 3)在 MOG (髓磷脂-少突神经胶质细胞-糖蛋白)诱导的 EAE (实验性自身免疫性脑脊髓炎)中的功效

[0297] 此研究的目标是使用 MOG 诱导的 EAE 在 C57BL/6 小鼠中评估拉啞莫德的三种氘化的形式(即化合物 1、2 和 3)与拉啞莫德相比的功效。

[0298] EAE 是一种用于多发性硬化症的公认的动物模型,并且在 C57BL/6 中用 MOG 诱导是充分确立的模型。

[0299] 一般设计

[0300] 通过注射致脑炎的乳液在小鼠中诱导疾病。

[0301] 从研究起始(第 0 天)直到结束(第 30 天),以 10mg/kg 投予化合物 1、2 和 3,以 10 和 25mg/kg 投予拉啞莫德,或投予媒剂。所有群组都每天口服处理。

- [0302] 材料：
- [0303] 如实例 1 中所述制备化合物 1、2 和 3。
- [0304] 拉喹莫德，梯瓦(Teva) 制造。
- [0305] 纯化水(Direct-Q, 密理博(Millipore))。
- [0306] 百日咳(Pertussis) 毒素：西格玛，代码号 2980，批号 044K1449。
- [0307] MOG35-55：Mnf 诺瓦泰德(MnfNovatide)，批号 90016-71-1。
- [0308] 完全弗氏佐剂(Complete Freund's Adjuvant, CFA)：西格玛，代码：F-5881，批号 104K8930。
- [0309] 盐水：Mnf-DEMO S.A，代码号 05029，批号 0101610。
- [0310] 结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) H37RA (MT)：Mnf- 蒂夫科 (Mnf-Difco)。
- [0311] 物种、品系和供应商
- [0312] 2010 年 1 月 26 日将获自以色列 (Israel) 哈伦动物育种中心 (Harlan Animal Breeding Center) 的 C57BL/6 品系的健康未产过仔的未怀孕雌性小鼠用于研究中。动物在到达时体重是 15-22g，并且是约 7-8 周大。在交付当天记录动物的体重。在处理开始之前将明显健康的动物任意分配到研究组。通过使用耳标将小鼠个别地标识。每一笼上的颜色编码的卡片提供包括笼号、组号和身份的信息。维持动物豢养和护理条件。
- [0313] EAE 诱导
- [0314] 通过注射由 MOG (150.0 μ g / 小鼠) 和富集有结核分枝杆菌的 CFA (1mg/mL CFA) 组成的致脑炎混合物(乳液) 来诱导 EAE。
- [0315] 皮下注射 0.2ml 体积的乳液到小鼠的胁腹。
- [0316] 在诱导当天和 48 小时后腹膜内注射百日咳毒素(总量是 0.2ml 剂量体积中的 0.1+0.1=0.200 μ g / 小鼠)。
- [0317] 将小鼠分配到 6 个处理组：媒剂、拉喹莫德 (25mg/kg 和 10mg/kg) 和每一者 10mg/kg 的化合物 1、2 和 3。
- [0318] 制备和授予致脑炎乳液
- [0319] 油部分：CFA (含有 1mg/mL MT)
- [0320] 液体部分：将 15.0mg MOG 稀释于 10.0ml 生理盐水 (Normal Saline) 中，得到 1.5mg/mL MOG 储备溶液。由用 Leur 锁与彼此连接的两个注射器中的等份油和液体部分 (1:1) 制造乳液，将其转移到胰岛素注射器中，并且向每一小鼠的右胁腹注射 0.2ml。
- [0321] 制备和授予百日咳毒素
- [0322] 添加 55 μ L 百日咳毒素 (200 微克 / 毫升) 到 21.945ml 盐水中，得到 500 纳克 / 毫升。在致脑炎病毒注射当天和 48 小时后腹膜内授予百日咳毒素 (100.0 纳克 / 0.2 毫升 / 小鼠 $\times$ 2 = 200.0 纳克 / 小鼠)。
- [0323] 制备和授予测试调配物
- [0324] 在纯化水中制备 2.5mg/ml 浓度拉喹莫德以达到剂量水平 25.0mg/kg。将测试调配物储存于 2 到 8°C 下琥珀色瓶中直到使用。每天一次通过口服管饲以 200 微升 / 小鼠的体积剂量水平向 25mg/kg 拉喹莫德组的小鼠授予拉喹莫德(如表 4b 中所示)。
- [0325] 在纯化水中制备 1.0mg/mL 浓度拉喹莫德以达到常规的 10.0mg/kg 剂量水平拉喹

莫德或化合物 1、2 和 3。将测试调配物储存于 2 到 8℃ 下琥珀色瓶中直到使用。

[0326] 每天一次通过口服管饲以 200 微升 / 小鼠的体积剂量水平向拉啞莫德 10mg/kg 组的小鼠授予常规的拉啞莫德。以类似方式授予测试化合物。以类似方式向阴性对照组 (组号 1) 授予媒剂 (重蒸馏水)。

[0327] 发病率和死亡率

[0328] 每天一次检验所有动物以检测是否有垂死的。每周一次称重小鼠。

[0329] EAE 临床征象

[0330] 从 EAE 诱导后 10 天开始每天观测小鼠, 并且将 EAE 临床征象记分。根据下表 4a 中所述的等级将记分记录在观测卡上。

[0331] 表 4a : 评估 EAE 临床征象

[0332]

记分	征象	描述
0	正常特性	无神经学征象。
1	无力的尾巴	部分或整个尾巴无力并且下垂。
2	翻正反射	动物在仰躺着时难以翻滚到脚着地。
3	后肢虚弱	摇摆的行走——当小鼠行走时, 后肢不稳。
4	后肢麻痹	小鼠拖着其后肢但能够使用其前肢走动。
5	完全麻痹	小鼠不能走动, 其看来变瘦并且憔悴起来。
6	垂死 / 死亡	

[0333] 记分是 1 和 1 以上的所有小鼠都视为患病。当第一临床征象出现时, 向所有小鼠提供浸于水中的食物, 其在笼的褥草上的不同位置处散布。为了进行计算, 进行被处死或死亡的动物的记分 (6)。

[0334] 结果阐明

[0335] 计算疾病发病率 (疾病比率)

[0336] 合计每一组中的患病动物的数目。疾病发病率经计算为

[0337]

$$\text{疾病发病率} = \left(\frac{\text{处理组中的患病小鼠的数目}}{\text{对照组中的患病小鼠的数目}} \right)$$

[0338] 对应于发病率的抑制百分比经计算为

[0339]

$$\text{发病率的抑制 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{处理组中的患病小鼠的数目}}{\text{对照组中的患病小鼠的数目}} \right) \times 100$$

[0340] 计算死亡 / 垂死率 (死亡率)

[0341] 合计每一组中的死亡或垂死的动物的数目。疾病死亡率经计算为

[0342]

$$\text{疾病死亡率} = \left(\frac{\text{处理组中死亡或垂死的小鼠的数目}}{\text{对照组中死亡或垂死的小鼠的数目}} \right)$$

[0343] 对应于死亡率的抑制百分比经计算为

[0344]

$$\text{死亡率的抑制}(\%) = \left(1 - \frac{\text{处理组中死亡或垂死的小鼠的数目}}{\text{对照组中死亡或垂死的小鼠的数目}} \right) \times 100$$

[0345] 计算疾病持续时间

[0346] 以天为单位表示的疾病的平均持续时间经计算为

[0347]

$$\text{平均持续时间} = \left(\frac{\sum \text{每一小鼠的疾病持续时间}}{\text{组中小鼠的数目}} \right)$$

[0348] 计算疾病发作的平均延迟

[0349] 以天为单位表示的疾病的平均发作经计算为

[0350]

$$\text{平均发作} = \left(\frac{\sum \text{每一小鼠的疾病发作}}{\text{组中小鼠的数目}} \right)$$

[0351] 通过从测试组减去疾病对照组的平均发作来计算以天为单位表示的疾病发作的平均延迟。

[0352] 计算平均最大记分和抑制百分比

[0353] 每一组的平均最大记分(MMS)经计算为

[0354]

$$MMS = \left(\frac{\sum \text{每一小鼠的最大记分}}{\text{组中的小鼠的数目}} \right)$$

[0355] 对应于 MMS 的抑制百分比经计算为

[0356]

$$MMS \text{ 的抑制}(\%) = \left(1 - \frac{\text{处理组的 MMS}}{\text{对照组的 MMS}} \right) \times 100$$

[0357] 计算组平均记分和抑制百分比

[0358] 合计测试组中每一小鼠的每天记分,并且个别平均每天记分(IMS)经计算为

[0359]

$$IMS = \left(\frac{\sum \text{小鼠的每天记分}}{\text{观测期(天数)}} \right)$$

[0360] 平均组记分(GMS)经计算为

[0361]

$$GMS = \left(\frac{\sum \text{每一小鼠的 IMS}}{\text{组中的小鼠的数目}} \right)$$

[0362] 抑制百分比经计算为

[0363]

$$GMS的抑制(\%) = \left(1 - \frac{\text{处理组的GMS}}{\text{对照组的GMS}}\right) \times 100$$

[0364] 每一组的发病率、死亡率、MMS、GMS、疾病持续时间、疾病发作和活性的概要展示于下表 4b 中。

[0365] 表 4b. 与媒介剂相比的死亡率、发病率、MMS、GMS、EAE 活性的持续时间和发作

[0366]

处理	死亡率	发病率	抑制% 1	MMS 值	抑制% 2	GMS 值	抑制% 3	平均持续时间 (天数)	平均发作 (天数)
媒介剂水	0/15	14/15	-	3.2±1.3	-	2.21±0.98	-	19.1±5.5	11.9±5.5
拉啞莫德 (25 mg/kg)	0/15	4/15	71.4%	1.3±1.8	59.4% (p<0.001)	0.5±0.13	97.7% (p<0.001)	3.0±5.8 (p<0.001)	28.0±5.8 (p<0.001)
拉啞莫德 (10 mg/kg)	0/15	9/15	35.7%	2.1±1.9	34.4% (p=0.17)	1.14±0.5	48.4% (p=0.01)	9.3±8.3 (p<0.001)	21.6±8.4 (p<0.001)
化合物 2 (10 mg/kg)	0/15	13/15	7.1%	2.1±1.3	34.4% (p=0.02)	0.79±0.2	64.3% (p=0.001)	13.2±7.7 (p=0.004)	15.3±6.8 (p=0.01)
化合物 3 (10 mg/kg)	0/15	10/15	28.6%	1.6±1.6	50.1% (p=0.01)	0.89±0.94	59.7% (p=0.001)	9.6±9.4 (p=0.001)	21.5±9.3 (p<0.001)
化合物 1 (10 mg/kg)	0/15	8/15	42.9%	1.5±1.7	53.1% (p=0.01)	0.74±0.86	66.5% (p<0.001)	7.9±8.2 (<0.001)	22.1±8.9 (p<0.001)

[0367]

[0368] 发病率和死亡率

[0369] 在媒介剂处理的对照组中 14/15 小鼠因 EAE 而患病。与用化合物 2、3 和 1 处理的组中分别是 13/15、10/15 和 8/15 相比,在用拉啞莫德 (10mg/kg)处理的组中,9/15 小鼠患病。在用 25mg/kg 拉啞莫德处理的阳性对照组中 4/15 小鼠患病。在处理组中的任一者中都没有观测到死亡。

[0370] 在用拉啞莫德 (10mg/kg) 处理的所有组中临床征象出现都有延迟,其中与对照组 (发作 11.9±5.5 天)相比发作在 15.3 与 22.1 天之间。这些处理组中的 EAE 临床征象的持续时间与媒介剂处理的对照组相比 (与对照组 19.1±5.5 天相比) 在 7.9 与 13.2 天之间。

[0371] 平均最大记分 (MMS) 和组平均记分 (GMS)

[0372] 媒介剂处理的阴性对照组的 MMS 和 GMS 分别是 3.2±1.3 和 2.2±1.0。阳性拉啞莫德 (25mg/kg) 对照组分别展示对应于 MMS (记分 1.3±1.8) 和 GMS (记分 0.5±0.1) 的 59.4% 和 97.7%EAE 抑制。

[0373] 当用化合物 1、2 和 3 处理的组与拉啞莫德相比时,在活性方面没有观测到显著差异。然而,有趋势展示用化合物 1、2 和 3 处理的组比拉啞莫德组活性更大。

[0374] 如图 3 中所示,在 GMS 标度上,与用化合物 2、3 和 1 处理的组中分别是 64.3%、59.7% 和 66.5% 的活性相比,拉啞莫德 (10mg/kg) 组展示 48.4% 活性。

[0375] 讨论

[0376] 测试结果显示,氘富集拉啞莫德使代谢物、特别是任选氘化的 DELAQ 的形成减少,

同时维持与非氧化的拉唑莫德类似的血浆浓度-时间曲线。

[0377] 测试结果还显示, 氧富集拉唑莫德在抑制 EAE 临床征象方面的活性与拉唑莫德相比一样或更佳。研究结果使得可产生氧富集拉唑莫德的给药参数。

[0378] 实例 5: 拉唑莫德和化合物 2 作为培养的人类肝细胞中的细胞色素 P450 表达的诱导剂的体外评估

[0379] 1. 引言

[0380] 此研究的目标是研究用拉唑莫德或化合物 2 处理新鲜人类肝细胞的原代培养物对 CYP 酶表达的作用。

[0381] 培养的肝细胞经证明是一种用于评估 NCE 的诱导作用的可靠测试系统。肝细胞可以从不可移植的人类肝脏中分离(布扬松(Bjornsson)等人,(2003), 体外和体内药物间相互作用研究的实施: 美国药物研究和制造商协会(PhRMA)展望(The conduct of in vitro and in vivo drug-drug interaction studies: a Pharmaceutical Research and Manufacturers of America(PhRMA) perspective). 药物代谢和处置(Drug Metab Dispos) 31:815-832; 穆德拉(Mudra)和帕金森(Parkinson), (2001), 肝细胞的制备(Preparation of hepatocytes), 毒物学实验室指南(Current Protocols in Toxicology), 第 2 卷(梅因斯 MD(Maines MD)编)第 14.2 单元, 第 13 页, 约翰威立父子公司(John Wiley and Sons, Inc.), 纽约(New York)), 并且在融合的单层细胞中培养(乐克鲁伊斯(LeCluyse)等人,(1994), 通过以胶原蛋白夹层形态培养的大鼠肝细胞形成广泛小管网络(Formation of extensive canalicular networks by rat hepatocytes cultured in collagen-sandwich configuration). 美国生理学杂志 266(Am J Physiol 266)(细胞生理学 35(Cell Physiol. 35)):C1764-C1774)。在培养物中两到三天之后, 这些细胞恢复其形态完整性, 并且用原型诱导剂处理导致适当 CYP 酶的诱导(乐克鲁伊斯等人,(1996), 培养的大鼠肝细胞 Cultured rat hepatocytes), 医药生物技术(Pharmaceutical Biotechnology.) 第 8 卷, 用于评估药物吸收和代谢的模型(Models for Assessing Drug Absorption and Metabolism). (博查特 RT (Borchardt RT), 威尔逊 G (Wilson G) 和史密斯 P (Smith P) 编) 第 121-159 页, 普莱南出版社(Plenum Press), 纽约; 罗伯特森 (Robertson) 等人,(2000), 通过莫达非尼对人类肝细胞色素 P450 酶的体外抑制和诱导(In vitro inhibition and induction of human hepatic cytochrome P450 enzymes by modafinil). 药物代谢和处置 28:664-671; 马登(Madan)等人,(2003), 原型微粒体酶诱导剂对培养的人类肝细胞中的细胞色素 P450 表达的作用(Effects of prototypical microsomal enzyme inducers on cytochrome P450 expression in cultured human hepatocytes). 药物代谢和处置 31:421-431)。为此, 使用培养的人类肝细胞测定 NCE 导致 CYP 酶诱导的可能性是可接受的。

[0382] 此研究经设计以使得可将测试物品的任何诱导作用针对两种机制不同并且临床上相关的 CYP 诱导剂(即奥美拉唑(omeprazole)(一种 AhR 活化剂和 CYP1A2 诱导剂)和利福平(rifampin)(一种 PXR 激动剂和 CYP3A4 诱导剂))归类(帕金森和奥格尔维(Ogilvie), (2008), 异种生物质的生物转化(Biotransformation of xenobiotics), 卡萨瑞特 & 道尔毒物学(Casarett & Doull's Toxicology), 毒物基础科学(The Basic Science of Poisons). 第 7 版, (克拉森 CD(Klaassen CD)编)第 161-304 页, 麦格劳希尔公司

(The McGraw Hill Companies, Inc.), 纽约)。为此,连续三天每天一次用 DMSO (0.1%v/v, 媒剂对照)、五个浓度的拉喹莫德 (0.01、0.05、0.1、1 或 10 μ M) 或化合物 2 (0.01、0.05、0.1 或 10 μ M) 中的一者处理来自一个肝脏的培养的人类肝细胞的一个制备物。

[0383] 在处理之后,就地用标记底物培育细胞以供通过 LC/MS/MS 来分析非那西丁 (phenacetin) 0- 脱烷基化 (CYP1A2 的标记) 和咪达唑仑 (midazolam) 1'- 羟基化 (CYP3A4/5 的标记)。在就地培育之后,用 TRIzol 从相同处理组收集相同肝细胞以分离 RNA, 通过 qRT-PCR 分析 RNA 以评估拉喹莫德和化合物 2 对 CYP1A2 和 CYP3A4 mRNA 水平的作用。用于此研究中的研究设计、测试系统和探针底物的选择和浓度是基于以下中的建议: FDA 对药物相互作用研究——研究设计、数据分析和给药和加标记的含义的草拟指导文件和现行 FDA 评论文章 (食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration), (2006), 行业草拟指南: 药物相互作用研究——研究设计、数据分析和给药和加标记的含义 (Draft Guidance for Industry: Drug Interaction Studies—Study Design, Data Analysis, and Implications for Dosing and Labeling), 第 55 页, 美国卫生和公众服务部 (U. S. Department of Health and Human Services), 罗克维尔 (Rockville), 马里兰州 (MD); 黄 (Huang) 等人, (2008), 药物相互作用评估的新纪元: 美国食品药品监督管理局关于 CYP 酶、转运体和指导工艺的更新 (New Era in Drug Interactions Evaluation: US Food and Drug Administration Update on CYP Enzymes, Transporters and the Guidance Process). 临床药理学杂志 (J Clin Pharmacol) 48:662-670; 张 (Zhang) 等人, (2009), 预测药物间相互作用: FDA 展望 (Predicting Drug-Drug Interactions: An FDA Perspective). AAPS 杂志 (The AAPS Journal) 11:300-306) 和 PhRMA 对酶诱导的展望 (朱 (Chu) 等人, (2009), 细胞色素 P450 的体外和体内诱导: 现行实践和建议的调查: 美国药物研究和制造商协会 (PhRMA) 展望 (In vitro and in vivo induction of cytochrome P450: a survey of the current practices and recommendations: a Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (PhRMA) perspective). 药物代谢和处置 27029 (第 87 页) doi:10.1124/dmd.109.0270)。

[0384] 2. 材料和方法

[0385] 2.1 材料

[0386] 2.1.1 酶活性分析

[0387]

酶	试剂使用	名称	制造商
CYP1A2	底物	非那西丁	西格玛-奥德里奇
	底物代谢物	乙酰胺酚	西格玛-奥德里奇
	内标	乙酰胺酚-d ₄	专有信息 (Proprietary information)
CYP3A4/5	底物	咪达唑仑	西格玛-奥德里奇
	底物代谢物	1'-羟基咪达唑仑	瑟瑞里恩特 (Cerilliant)
	内标	1'-羟基咪达唑仑-d ₄	专有信息

[0388]

[0389] 2.1.2 其它分析

[0390]

分析	名称	制造商
qRT-PCR	不含 RNase 的水	飞世尔科学 (Fisher Scientific)
qRT-PCR	具有 RNase 抑制剂的大容量 cDNA 反转录试剂盒	应用生物系统 (Applied Biosystems)
qRT-PCR	TaqMan 通用混合物	应用生物系统
qRT-PCR	TaqMan 基因表达分析	应用生物系统
qRT-PCR	TRIzol 试剂	英杰 (Invitrogen)
qRT-PCR	氯仿	飞世尔科学
qRT-PCR	2-丙醇	飞世尔科学
qRT-PCR	乙醇, 200 普鲁夫 (proof)	西格玛-奥德里奇
qRT-PCR	1X tris-EDTA, pH 8.0	安比昂 (Ambion)
qRT-PCR	RNeasy 迷你试剂盒	凯杰 (Qiagen)
qRT-PCR	不含 RNase 的 DNase 装置	凯杰
qRT-PCR	蛋白酶 K	凯杰
qRT-PCR	RNA 6000 纳米芯片实验室 (Nano LabChip) 试剂盒	安捷伦技术 (Agilent Technologies)

[0391] 2.1.3 其它试剂

[0392]

名称	制造商
乙腈	飞世尔科学
乙酸铵	西格玛-奥德里奇
二氧化碳	赫杰气体 (Helget Gas)
地塞米松 (dexamethasone)	西格玛-奥德里奇
DMSO	西格玛-奥德里奇
EDTA	西格玛-奥德里奇
乙醇	飞世尔科学
甲酸	EM 科学 (EM Science)
ITS +	BO 生物科学 (BO Biosciences)
L-精氨酸	西格玛-奥德里奇
L-谷氨酰胺	西格玛-奥德里奇
氯化镁	西格玛-奥德里奇
甲醇	飞世尔科学
二氯甲烷 (Methylene chloride, dichloromethane)	西格玛-奥德里奇
米贝地尔 (mibefradil)	西格玛-奥德里奇
改良伊格尔培养基 (Modified Eagle Medium, MCM) (许博士的改良 (Dr. Chee's Modification))	英杰
奥美拉唑	西格玛-奥德里奇

[0393]

青霉素-链霉素 (Penicillin-Streptomycin, Pert-Strep)	英杰
氢氧化钾	飞世尔科学或基因测试 (Gentest)
磷酸钾 (一碱价的和二碱价的)	马林克罗特贝克 (Mallinckrodt Baker)
利福平	西格玛-奥德里奇
碳酸氢钠	西格玛-奥德里奇
碳酸钠	飞世尔科学
氯化钠溶液 (内毒素测试)	西格玛-奥德里奇
氢氧化钠	飞世尔科学
无菌高纯度水	泽诺技术 (XenoTech)
蔗糖	西格玛-奥德里奇
胸苷	西格玛-奥德里奇
Tris	西格玛-奥德里奇

[0394] 2.2 测试系统

[0395] 在此研究中处理由位于 16825 西 116 号街, 雷内克萨 (Lenexa), 堪萨斯州 (KS) 66219 的泽诺技术有限责任公司 (XenoTech, LLC) 提供的新鲜分离的人类肝细胞 (下文称为 H971) 的一个制备物。

[0396] 2.2.1 处理培养的人类肝细胞

[0397] 连续三天每天处理肝细胞培养物, 并且根据 SOP L5021.01 (泽诺技术有限责任公司) 和先前描述的方法培养 (罗伯特森等人, (2000), 通过莫达非尼对人类肝细胞色素 P450 酶的体外抑制和诱导. 药物代谢和处置 28:664-671; 马登等人, (2003), 原型微粒体酶诱导剂对培养的人类肝细胞中的细胞色素 P450 表达的作用. 药物代谢和处置 31:421-431; 帕里斯 (Paris) 等人, (2009), 通过米那普仑对人类肝细胞色素 P450 (CYP) 酶的体外抑制和诱导 (In vitro inhibition and induction of human liver cytochrome P450 (CYP) enzymes by milnacipran). 药物代谢和处置 37:2045-2054)。用含有 0.1% DMSO (媒剂, 阴性对照)、五个浓度的拉喹莫德 (0.01、0.05、0.1、1 或 10 μ M) 或化合物 2 (0.01、0.05、0.1、1 或 10 μ M) 中的一者、米贝地尔 (10 μ M) 或两种已知人类 CYP 酶诱导剂 (即奥美拉唑 (100 μ M) 和利福平 (10 μ M)) 阳性对照中的一者的补充 MCM (每一孔用 0.2mL 处理) 处理培养物。

[0398] 2.2.2 从培养的人类肝细胞分离 RNA、纯化和定量

[0399] 在最后处理之后约 24 小时, 在就地标记底物培育之后, 将肝细胞溶解于 TRIzol 试剂中, 并且将细胞溶解产物储存于 $-75 \pm 5^\circ\text{C}$ 下。就人类肝细胞制备物 H971 来说, 每处理组从六个孔吸出培养基, 并且添加约 132 μ L TRIzol 到每一孔中。通过重复吸取将细胞溶解产物混合。使用 TRIzol 方案 (英杰) 从细胞溶解产物分离总 RNA, 并且使用 RNeasy 迷你试剂盒 (凯杰公司) 根据 SOP L6161.02 纯化。通过在具有 KC4 信号 (KC4Signature) 软件 (3.4 版 21 修正 (Rev21), 伯腾仪器公司 (BioTek Instruments, Inc.)) 的伯腾协作 HT (BioTek Synergy HT) 板式读取器 (伯腾仪器公司) 上根据 SOP L6162.02 测量 260 和 280nm 下的吸光度来测定 RNA 品质和浓度。用 RNA6000 纳米分析试剂盒在安捷伦 2100 生物分析器 (Agilent2100Bioanalyzer) (安捷伦技术公司) 上根据 SOP L6162.02 进行 RNA 完整性的分析。用 RT 混合物 (RT Master Mix) 使用 AB7300 实时 PCR 系统热循环程序或 AB7900HT 快速实时 PCR 系统热循环程序 (应用生物系统) 根据 SOPL6160.04 从 RNA 制备单链 cDNA。RT 混合物包含 10X RT 缓冲液、25X 脱氧 NTPs、10X 无规六聚物、RNase 抑制剂 (20U/ μ L)、

MultiScribe 反转录酶(50U/ μ L)和不含 RNase 的水。将 RT 混合物添加到每一 RNA 样品中以使反应的组分完全。在分析中包括无模板对照(No template control, NTC)。就 NTC 反应来说,添加不含 RNase 的水代替 RNA 样品。在通过 qRT-PCR 分析之前,将 cDNA 制备样品储存于 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 下。

[0400] 2.3 测试样品

[0401] 根据美国专利第 6,077,851 号中所述的程序制备拉喹莫德钠,并且根据实例 1 中所述的程序制备化合物 2。

[0402]

	拉喹莫德	化合物 2
测试样品的储存:	锁定储存于 2 到 8°C 下, 避光和水分保存	锁定储存于 2 到 8°C 下, 避光和水分保存
收到数量:	53.09 mg	50.58 mg
分子质量:	378.78 g/mol (钠盐) 356.80 g/mol (游离酸)	383 g/mol
纯度:	100%	95.4%
外观:	白色粉末	浅黄色
用于溶解的溶剂:	高纯度无菌水	高纯度无菌水
储备溶液的浓度:	0.01、0.05、0.1、1、2、10 和 20 mM 0.01、0.05、0.1、1、2、10 和 20 μM	0.01、0.05、0.1、1 和 10 mM 0.01、0.05、0.1、1 和 10 μM (储备
工作溶液的浓度:	(储备液稀释于补充 MCM 培养基 中; DMSO 于培养基中的最终浓度 =0.1% v/v)	液稀释于补充 MCM 培养基中; DMSO 于培养基中的最终浓度=0.1% v/v)
储备溶液的储存:	$-20\pm 5^{\circ}\text{C}$	$-20\pm 5^{\circ}\text{C}$

[0403] 通过将适当量的拉喹莫德或者化合物 2 溶解于高纯度无菌水中来制备拉喹莫德或化合物 2 的溶液(10mM 高纯度无菌水溶液)。就拉喹莫德来说,用高纯度无菌水将 10mM 储备溶液稀释到 2、1 和 0.1 μM 。此外,用高纯度无菌水将 1 μM 溶液稀释到 0.05 和 0.01mM。就化合物 2 来说,用高纯度无菌水将 10mM 储备溶液稀释到 1 和 0.1 μM 。此外,用高纯度无菌水将 1 μM 溶液稀释到 0.05 和 0.01mM。将拉喹莫德和化合物 2 的溶液(所有 mM 浓度)分成充足数目的等分试样以个别用于研究中,并且用琥珀色玻璃器皿或铝箔避光保存,并且冷冻($-20\pm 5^{\circ}\text{C}$)储存,有效期是两个月。

[0404] 在每天处理之前,将等分试样的拉喹莫德和化合物 2 储备溶液调节到室温并且以低设定轻轻地震荡或涡旋。然后在两个小时稀释(约 15 分钟到 65 分钟)内,将拉喹莫德(0.01、0.05、0.1、1 和 10mM)和化合物 2 (0.01、0.05、0.1、1 和 10mM)的储备溶液稀释于细胞培养基(1:1000 稀释)中,并且将所得工作给药溶液添加到肝细胞培养物中,得到最终浓度的拉喹莫德(0.01、0.05、0.1、1 和 10 μM)和化合物 2 (0.01、0.05、0.1、1 和 10 μM)。在应用到肝细胞之前进行储备和给药溶液的定性目测检查以便确定在测试系统中的溶解度。

[0405] 在处理之前即刻、在每天处理时,和在培育标记底物之前即刻,从媒剂、拉喹莫德和化合物 2 处理组收集废弃培养基(废弃给药培养基)。从每一上述处理组的三个孔的每一者收集约 150 μL ,并且对于每一样品汇合成约 450 μL 的最终体积。分析这些废弃培养基样品的残余拉喹莫德、化合物 2 和脱乙基化的代谢物(DELAQ)。

[0406] 2.4 阳性对照和媒剂

[0407] 以下化学品或媒剂用于向肝细胞给药。

	化学品	目录号	批号	储存条件 ^a	媒剂	纯度	供应商
[0408]	DMSO	D2650	079K2305 089K2310	室温	不适用的	不适用的	西格玛-奥德里奇
	奥美拉唑	O104	079K1584	2 到 8°C	DMSO	99%	西格玛-奥德里奇
	利福平	R3501	115K1498	-20±5°C	DMSO	100%	西格玛-奥德里奇
	米贝地尔	M5441	026K47034	室温	高纯度水	99%	西格玛-奥德里奇

[0409] a 纯化合物的储存条件。

[0410] 将奥美拉唑和利福平溶解于DMSO中以使得DMSO于培养基中的最终浓度是0.1%v/v。在高纯度无菌水中制备米贝地尔。根据SOP L5021.01 (泽诺技术有限责任公司),在每一处理日处理之前不到两小时(约15分钟到65分钟)从储备溶液新鲜制备媒剂和阳性对照的工作溶液。

[0411] 2.5 分析条件

[0412] 2.5.1 用培养的人类肝细胞对探针底物的就地培育

[0413] 根据SOP L5041.02 进行用探针底物对肝细胞的培育。在最后处理之后约24小时,从孔中吸出废弃培养基,并且用预加温的(37±2°C)新鲜培养基冲洗每一孔两次。从孔中吸出培养基,并且通过添加200 μL 含有探针底物的预加温的培养基到每一孔中使反应开始。将培养多孔板置于加湿培养腔(37±1°C,95%相对湿度下,95/5%空气/CO₂)中,并且培育30分钟(表1)。在30分钟时,移出等分试样(150 μL)的培育混合物,并且将其添加到含有300 μL 终止试剂(乙腈)和内标的96孔板的孔中(表2)。将混合物充分地混合,并且使其在2-8°C下静置至少15分钟。在2-8°C下以2000×g离心样品10分钟,并且通过LC/MS/MS分析上清液部分。在每一分析中,在表1中指示的条件下进行培育。

[0414] 表1:测量微粒体CYP酶活性的分析条件的概要

[0415]

酶	底物	底物浓度 (μM)	底物溶剂 (v/v, 最终培育浓度)	培育时间(分钟)
CYP1A2	非那西丁	100	甲醇(0.4%)	30
CYP3A4/5	咪达唑仑	30	甲醇(1%)	30

[0416] 培育体积=200 μL

[0417] 表2:通过液体色谱串联质谱分析进行代谢物分析的概要

[0418]

酶	所监测的代谢物	离子化 模式 ^a	所遵循的分析 SOP	内标	内标浓度(纳克/ 毫升) ^b
CYP1A2	乙酰胺酚	ESI-	L8120.06	乙酰胺酚-d ₄	300
CYP3A4/5	1'-羟基咪达唑仑	ESI+	L8170.05	1'-羟基咪达唑仑-d ₄	1000

[0419] a. 指示离子化的类型(即电喷雾离子化[ESI])和极性(+或-)。

[0420] b. 值指示内标的储备浓度。当添加到终止培育混合物中时,将此浓度稀释16倍。

[0421] 通过添加可信的代谢物标准物来类似地制备标准物和品质对照样品。

[0422] 2.6 分析方法

[0423] 2.6.1 LC/MS/MS 方法

[0424] 所有分析都用经验证的 LC/MS/MS 方法来进行。用于分析每一代谢物的程序遵循可适用的 LC/MS/MS 分析方法 SOPs 并且概述于表 2 中。MS 设备是具有岛津 HPLC 泵和自动取样器系统的 ABI Sciex (应用生物系统 /MDS SCTEX) API4000 或 API3000 仪器。

[0425]

酶	所监测的代谢物	API 仪器 ^a	HPLC 柱 ^b
CYP1A2	乙酰胺酚	3000	沃特世亚特兰蒂斯 (Atlantis) dC 18
CYP3A4/5	1'-羟基咪达唑仑	4000	(5 μ m, 100 mm $\times$ 2.1 mm)

[0426] a. 来自应用生物系统 /MDS SCIEX 的 LC/MS/MS 系统的模型。

[0427] b. 在所有 HPLC 柱前都加上菲罗门 Luna C-8 保护柱 (4.0mm $\times$ 2.0mm)。

[0428] 使用可信的代谢物标准物, 并且氧化的代谢物在所有分析中都用作内标。零时培育充当空白。分别根据 SOP L8013.02、L8020.02 和 L8011.02 (泽诺技术有限责任公司) 进行样品分析、积分和报导。

[0429] 通过参考标准校准曲线基于加权 (1/x) 线性最小二乘回归法的反算来定量代谢物。回归拟合是基于由校准标准样品计算得到的分析物与内标的峰比率, 所述校准标准样品是从可信的代谢物标准物制备。用应用生物系统 /MDS SCDEX 分析器数据系统, 1.4.2 版求峰面积的积分。

[0430] 2.6. 2mRNA 分析

[0431] 根据 SOP L6160.04 (泽诺技术有限责任公司) 和应用生物系统方案进行定量 RT-PCR。一式三份地进行每一 PCR。制备引子混合物 (Primer Mix) 用于每一基因表达分析。典型引子混合物含有 TaqMan 通用混合物 (IX)、基因表达分析 (IX, 900nM 正反向引子) 和不含 RNase 的水。通过将引子混合物添加到 cDNA 中来制备反应混合物。一定百分比的样品 (不少于 10%) 包括 NACs。 (NACs 是非反转录的 RNA 样品, 并且用来展示 mRNA, 非基因组 DNA 是 PCR 的荧光信号的来源。) 在应用生物系统实时 PCR 序列检测系统 (AB7300 或 AB7900HT) 上分析反应。通过 $\Delta\Delta Ct$ 方法 (应用生物系统用户公告 2 号) 测定目标 cDNA 与对照 cDNA (GAPDH) 相比的相对量。相对定量测量测试样品中 mRNA 表达相对于对照样品 (例如 DMSO) 中 mRNA 表达的变化。此方法假设目标扩增的效率与内源性对照扩增的效率近似相等。

[0432] 2.7 数据处理

[0433] 处理数据, 并且用计算机程序微软电子表格 2003 (Microsoft Excel2003) (微软公司 (Microsoft Inc.)) 绘图。将类似处理组的个别反应速率平均, 并且对 $n \geq 3$ 的那些组测定标准差。通过用每一处理组的酶促速率除以媒介对照的酶促速率来测定增加倍数 (fold increases)。用以下方程式计算阳性对照百分比:

[0434]

$$\text{阳性对照百分比} = \left(\frac{\text{测试物品处理的细胞活性} - \text{媒介对照活性}}{\text{阳性对照活性} - \text{媒介对照活性}} \right) \times 100$$

[0435] 在 qRT-PCR 中, 使用用于相对定量的序列检测系统 (SDS) 软件 1.4 版 (应用生物系统) 处理数据。此软件使用比较 Ct 方法 ($\Delta\Delta Ct$) 分析相对基因表达, 其将目标转录物的 PCR 信号与未经处理的对照中的目标的 PCR 信号联系起来。针对内源性对照 (GAPDH) 正规化经处理的样品和未经处理的对照信号, 所述内源性对照的表达不受处理的影响并且表达在整个受测试的组织中是恒定的。此方法的结果表示为表达相对于未经处理的对照中的目

标转录物表达的变化倍数。计算如下：

[0436] 1. $\Delta Ct = Ct(\text{目标}) - Ct(\text{内源性对照})$

[0437] 2. $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct(\text{经处理的样品}) - \Delta Ct(\text{未经处理的对照})$

[0438] 3. 表达的变化倍数 $= 2^{-\Delta \Delta Ct}$

[0439] 软件内的算法自动地从分析中去除离群值。接收数据的准则是应用生物系统专有的。离群值被视为 Ct 值与相关一式多份孔显著不同的孔, 并且典型地是不充分扩增(即使有的话)的孔。

[0440] 如下计算 mRNA 表达相对于阳性对照的水平：

[0441]

$$\text{阳性对照百分比} = \frac{[(\text{经处理的样品中的变化倍数}) - 1]}{[(\text{阳性对照中的变化倍数}) - 1]} \times 100$$

[0442] 3. 结果和讨论

[0443] 用拉喹莫德和化合物 2 处理人类肝细胞对 CYP 酶活性和 mRNA 水平的作用展示于表 3-7 中。除非另作说明, 否则图和表中的数据都以来自一个人类制备物的一式三份培育物的数据平均值 $\pm$ 标准差形式呈现, 四舍五入到三个有效数字(significant figure)。平均增加倍数概述于表 4 和 6 中。增加倍数以对照的分数形式或以超出对照的增加倍数形式呈现, 其中对照是指相应媒剂处理的样品。将增加倍数四舍五入到三个有效数字。测试物品与原型诱导剂的比较(阳性对照百分比)展示于表 5 和 7 中, 并且四舍五入到三个有效数字。

[0444] 表 3 : CYP 活性 : 用拉喹莫德、化合物 2 或原型诱导剂处理培养的人类肝细胞对就地细胞色素 P450 (CYP) 酶活性的作用

[0445]

处理	浓度	酶活性 (pmol/mg 蛋白质/分钟) ^a	
		非那西丁 <i>O</i> -脱烷基化 (CYP1A2)	咪达唑仑 1'-羟基化 (CYP3A4/5)
二甲基亚砜	0.1% (v/v)	2.99 $\pm$ 0.13	0.195 $\pm$ 0.011
拉喹莫德	0.01 μ M	25.2 $\pm$ 0.8	0.180 $\pm$ 0.023
拉喹莫德	0.05 μ M	54.0 $\pm$ 4.5	0.161 $\pm$ 0.013
拉喹莫德	0.1 μ M	65.1 $\pm$ 1.9	0.151 $\pm$ 0.002
拉喹莫德	1 μ M	131 $\pm$ 12	0.106 $\pm$ 0.004
拉喹莫德	10 μ M	183 $\pm$ 7	0.0957 $\pm$ 0.0067
化合物 2	0.01 μ M	22.1 $\pm$ 2.7	0.179 $\pm$ 0.006
化合物 2	0.05 μ M	31.6 $\pm$ 2.6	0.151 $\pm$ 0.009
化合物 2	0.1 μ M	48.2 $\pm$ 2.4	0.140 $\pm$ 0.010
化合物 2	1 μ M	90.8 $\pm$ 11.5	0.109 $\pm$ 0.010
化合物 2	10 μ M	180 $\pm$ 8	0.101 $\pm$ 0.003
奥美拉唑	100 μ M	84.9 $\pm$ 5.4	NA
米贝地尔	10 μ M	11.3 $\pm$ 2.1	NA
利福平	10 μ M	NA	0.941 $\pm$ 0.019

[0446]

[0447] a 值是人类肝细胞制备物 H971 的一式三份测定数据的平均值 ± 标准差 (四舍五入到三个有效数字)。

[0448] 表 4 :CYP 活性增加倍数 :用拉喹莫德、化合物 2 或原型诱导剂处理培养的人类肝细胞对就地细胞色素 P450 (CYP) 酶活性的作用

[0449]

处理	浓度	增加倍数 ^a	
		非那西丁 <i>O</i> -脱烷基化 (CYP1A2)	咪达唑仑 1'-羟基化 (CYP3A4/5)
二甲基亚砷	0.1% (v/v)	1.00	1.00
拉喹莫德	0.01 μM	8.43	0.92
拉喹莫德	0.05 μM	18.06	0.82
拉喹莫德	0.1 μM	21.75	0.78
拉喹莫德	1 μM	43.79	0.54
拉喹莫德	10 μM	61.02	0.49
化合物 2	0.01 μM	7.39	0.91
化合物 2	0.05 μM	10.54	0.77
化合物 2	0.1 μM	16.12	0.72
化合物 2	1 μM	30.36	0.56
化合物 2	10 μM	60.21	0.51
奥美拉唑	100 μM	28.38	NA
米贝地尔	10 μM	3.76	NA
利福平	10 μM	NA	4.82

[0450] a 值是人类肝细胞制备物 H971 的结果 (四舍五入到三个有效数字)。

[0451] 表 5 :CYP 活性阳性对照百分比 :用拉喹莫德、化合物 2 或原型诱导剂处理培养的人类肝细胞对就地细胞色素 P450 (CYP) 酶活性的作用

[0452]

处理	浓度	阳性对照百分比 ^a	
		非那西丁 <i>O</i> -脱烷基化 (CYP1A2)	咪达唑仑 1'-羟基化 (CYP3A4/5)
二甲基亚砷	0.1% (v/v)	0	0
拉喹莫德	0.01 μM	27.1	-2.04
拉喹莫德	0.05 μM	62.3	-4.63
拉喹莫德	0.1 μM	75.8	-5.89
拉喹莫德	1 μM	156	-12.0
拉喹莫德	10 μM	219	-13.4
化合物 2	0.01 μM	23.3	-2.24
化合物 2	0.05 μM	34.9	-5.94
化合物 2	0.1 μM	55.2	-7.46
化合物 2	1 μM	107	-11.5
化合物 2	10 μM	216	-12.7
奥美拉唑	100 μM	100	ND
米贝地尔	10 μM	10.1	ND
利福平	10 μM	ND	100

[0453]

[0454] a 值是人类肝细胞制备物 H971 的结果(四舍五入到三个有效数字)。

[0455] ND 未测定。

[0456] 就 CYP1A2 来说,阳性对照是奥美拉唑并且媒介对照是 DMSO。

[0457] 就 CYP3A4/5 来说,阳性对照是利福平并且媒介对照是 DMSO。

[0458] 表 6 :mRNA 增加倍数 :用拉喹莫德、化合物 2 或原型诱导剂处理培养的人类肝细胞对微粒体细胞色素 P450 (CYP) mRNA 水平(如通过 qRT-PCR 测定(就地培育后))的作用

[0459]

处理	浓度	增加倍数 ^a	
		CYP1A2	CYP3A4
二甲基亚砷	0.1% (v/v)	1.00	1.00
拉喹莫德	0.01 μ M	4.22	0.621
拉喹莫德	0.05 μ M	7.90	0.347
拉喹莫德	0.1 μ M	9.50	0.427
拉喹莫德	1 μ M	16.8	0.286
拉喹莫德	10 μ M	20.5	0.636
化合物 2	0.01 μ M	2.84	0.437
化合物 2	0.05 μ M	4.98	0.428
化合物 2	0.1 μ M	7.20	0.339
化合物 2	1 μ M	13.1	0.252
化合物 2	10 μ M	24.3	0.689
奥美拉唑	100 μ M	8.58	NT
米贝地尔	10 μ M	0.423	NT
利福平	10 μ M	NT	4.63

[0460] a 值是人类肝细胞制备物 H971 的结果(四舍五入到三个有效数字)。

[0461] NT 未由研究设计测试。

[0462] 表 7 :mRNA 阳性对照百分比 :用拉喹莫德、化合物 2 或原型诱导剂处理培养的人类肝细胞对微粒体细胞色素 P450 (CYP) mRNA 水平(如通过 qRT-PCR 测定(就地培育后))的作用

[0463]

处理	浓度	阳性对照百分比 ^a	
		CYP1A2	CYP3A4
二甲基亚砷	0.1% (v/v)	0	0
拉喹莫德	0.01 μ M	42.5	-10.4
拉喹莫德	0.05 μ M	91.1	-18.0

[0464]

拉喹莫德	0.1 μM	112	-15.8
拉喹莫德	1 μM	209	-19.7
拉喹莫德	10 μM	257	-10.0
化合物 2	0.01 μM	24.2	-15.5
化合物 2	0.05 μM	52.5	-15.8
化合物 2	0.1 μM	81.7	-18.2
化合物 2	1 μM	159	-20.6
化合物 2	10 μM	307	-8.57
奥美拉唑	100 μM	100	ND
米贝地尔	10 μM	-7.61	ND
利福平	10 μM	ND	100

[0465] a 值是人类肝细胞制备物 H971 的结果(四舍五入到三个有效数字)。

[0466] ND 未测定。

[0467] 就 CYP1A2 来说,阳性对照是奥美拉唑并且媒介对照是 DMSO。

[0468] 就 CYP3A4 来说,阳性对照是利福平并且媒介对照是 DMSO。

[0469] 3.1 培养的人类肝细胞的生存力和形态

[0470] 在分离时,人类肝细胞制备物的生存力是 70.9%。在 72 小时的适应期期间和之后,每天通过光学显微术观测培养物,并且在融合对于用测试和对照物品进行处理足够的情况下判断为形态正常。在最后处理之后 24 小时内,将肝细胞拍照以记录其形态完整性和测试物品毒性的任何明显征象。将代表性显微照片保持在测试设施上。这些显微照片显示,一般来说,用媒介(DMSO)、拉喹莫德和化合物 2 或已知 CYP 诱导剂处理的人类肝细胞展示正常肝细胞形态。在处理之前和期间,人类肝细胞培养物形成具有极少细胞间隙的融合的单层细胞;所述单层细胞是立方形的并且含有完整细胞膜和具有一或两个中心定位细胞核的颗粒细胞质。用拉喹莫德、化合物 2 或拉喹莫德和米贝地尔处理人类肝细胞培养物 H971 导致细胞形态无变化。

[0471] 3.2 拉喹莫德和化合物 2 对人类 CYP1A2 活性和 mRNA 水平的作用

[0472] 测定非那西丁 O-脱烷基酶(CYP1A2)活性

[0473] 在培养的人类肝细胞中,通过 CYP1A2 来催化非那西丁 O-脱烷基化, CYP1A2 是主要奥美拉唑诱导性 CYP 酶。用拉喹莫德或化合物 2 处理培养的人类肝细胞对就地非那西丁 O-脱烷基酶(CYP1A2)活性的作用展示于表 3 中并且概述于表 4 中。连续三天每天一次用奥美拉唑处理培养的人类肝细胞导致非那西丁 O-脱烷基酶(CYP1A2)活性的平均 28.4 倍增加。

[0474] 与媒介对照相比,用拉喹莫德(达到 10 μM) 处理肝细胞培养物 H971 导致 CYP1A2 活性达到 61.0 倍的浓度依赖性增加。在所测试的浓度(0.01 μM 到 10 μM) 下,在诱导 CYP1A2 活性方面,拉喹莫德的有效性是阳性对照奥美拉唑的 21.7% 到 291%。此外,连续三天每天一次单独用米贝地尔处理导致 CYP1A2 活性的 3.76 倍增加。

[0475] 此外,与媒介对照相比,用化合物 2 (达到 10 μM) 处理肝细胞培养物 H971 导致 CYP1A2 活性达到 60.2 倍的浓度依赖性增加。在所测试的浓度(0.01 μM 到 10 μM) 下,在诱导 CYP1A2 活性方面,化合物 2 的有效性是阳性对照奥美拉唑的 23.3% 到 216%。

[0476] 测定 CYP1A2mRNA 水平

[0477] 用拉喹莫德和化合物 2 处理培养的人类肝细胞对 CYP1A2mRNA 表达的作用展示于表 6 中。连续三天每天一次用奥美拉唑处理培养的人类肝细胞导致 CYP1A2mRNA 水平的平均 8.58 倍增加。

[0478] 类似于 CYP1A2 活性,与媒介对照相比,用拉喹莫德(达到 10 μ M)处理肝细胞培养物 H971 导致 CYP1A2mRNA 水平达到 20.5 倍的浓度依赖性增加。在所测试的浓度(0.01 μ M 到 10 μ M)下,在诱导 CYP1A2mRNA 水平方面,拉喹莫德的有效性是阳性对照奥美拉唑的 42.5% 到 257%。与 CYP1A2 活性相反,与媒介对照相比,连续三天每天一次单独用米贝地尔处理导致 CYP1A2mRNA 水平的 57.7% 降低。

[0479] 此外,与媒介对照相比,用化合物 2(达到 10 μ M)处理肝细胞培养物 H971 导致 CYP1A2mRNA 水平达到 24.3 倍的浓度依赖性增加。在所测试的浓度 0.01 μ M 到 10 μ M)下,在诱导 CYP1A2mRNA 水平方面,化合物 2 的有效性是阳性对照奥美拉唑的 24.2% 到 307%。

[0480] 3.3 拉喹莫德和化合物 2 对人类 CYP3A4/5 活性和 CYP3A4mRNA 水平的作用

[0481] 测定咪达唑仑 1'-羟化酶(CYP3A4/5)活性

[0482] 在培养的人类肝细胞中,通过 CYP3A4/5 催化咪达唑仑 1'-羟基化。CYP3A4 是主要利福平诱导性 CYP 酶。用拉喹莫德和化合物 2 处理培养的人类肝细胞对就地咪达唑仑 1'-羟化酶(CYP3A4/5)活性的作用展示于表 3 中并且概述于表 4 中。连续三天每天一次用利福平处理培养的人类肝细胞导致咪达唑仑 1'-羟化酶活性的增加(4.82 倍)。

[0483] 与媒介对照相比,用拉喹莫德(达到 10 μ M)或化合物 2(达到 10 μ M)处理肝细胞培养物 H971 分别导致 CYP3A4/5 活性 50.9% 和 48.2% 的浓度依赖性降低。

[0484] 测定 CYP3A4mRNA 水平

[0485] 用拉喹莫德和化合物 2 处理培养的人类肝细胞对 CYP3A4mRNA 表达的作用展示于表 6 中。连续三天每天一次用利福平处理培养的人类肝细胞导致 CYP3A4mRNA 水平的 4.63 倍增加。

[0486] 类似于 CYP3A4/5 活性,与媒介对照相比,用拉喹莫德(达到 10 μ M)或化合物 2(达到 10 μ M)处理肝细胞培养物 H971 分别导致 CYP3A4mRNA 水平 36.4% 和 31.1% 的浓度依赖性降低。

[0487] 测定化合物 2 或拉喹莫德与 DELAQ 比率

[0488] 测量在处理之前即刻、在每天处理时,和在培育标记底物之前即刻从培养基收集的废弃培养基等分试样中的化合物 2、拉喹莫德和 DELAQ 的浓度。形成的 DELAQ 在拉喹莫德培养基中的浓度比在化合物 2 培养基中高约 2 倍。在 10 μ M 处理浓度的化合物 2 或拉喹莫德下,化合物 2:DELAQ 的比率平均是 40.9,而拉喹莫德:DELAQ 的比率平均是 15.7。这表示与化合物 2 相比从拉喹莫德形成 DELAQ 约有 3 倍增加,并且由在乙基部分上存在氘(其导致较慢 N-脱乙基)而得到解释。

[0489] 4. 结论

[0490] 总之,在原型诱导剂导致 CYP 活性和 mRNA 水平预期和适当增加的情况下,用达到 10 μ M 拉喹莫德或化合物 2(拉喹莫德的氘化类似物)处理导致类似的 CYP1A2 活性和 mRNA 水平的浓度依赖性增加和 CYP3A4/5 活性和 CYP3A4mRNA 水平的浓度依赖性降低,但在化合物 2:DELAQ 与拉喹莫德:DELAQ 比率方面观测到约 3 倍差异。

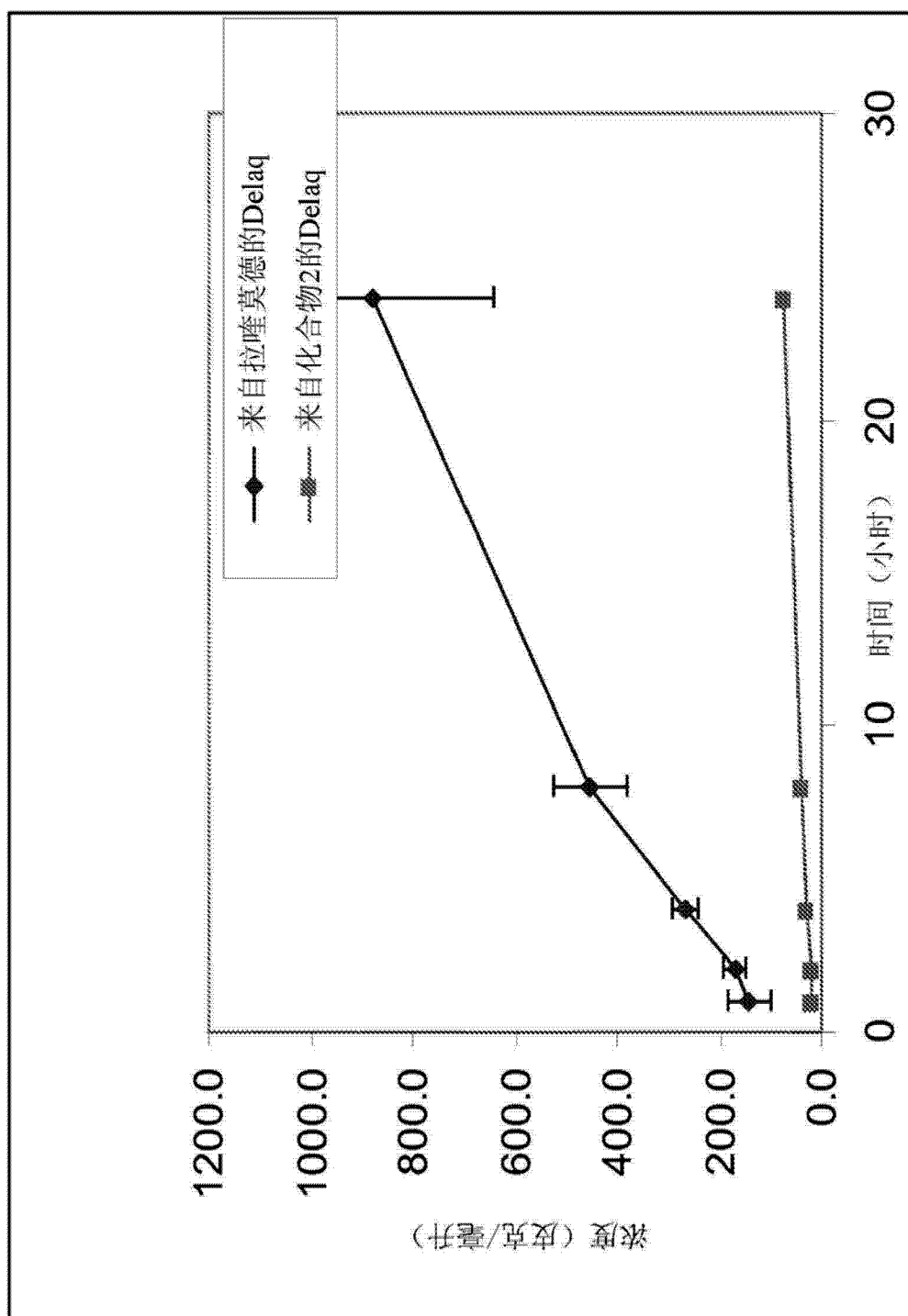


图 1

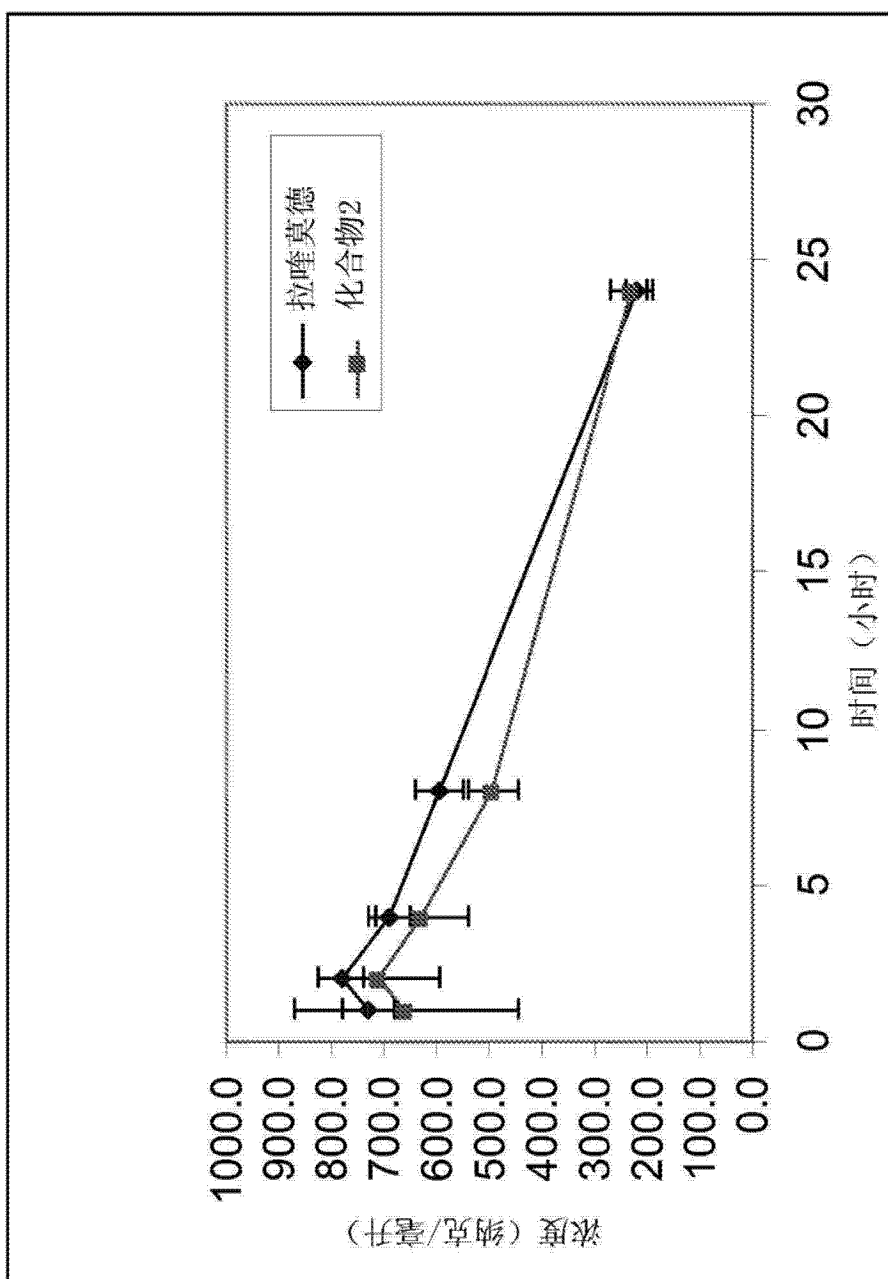


图 2

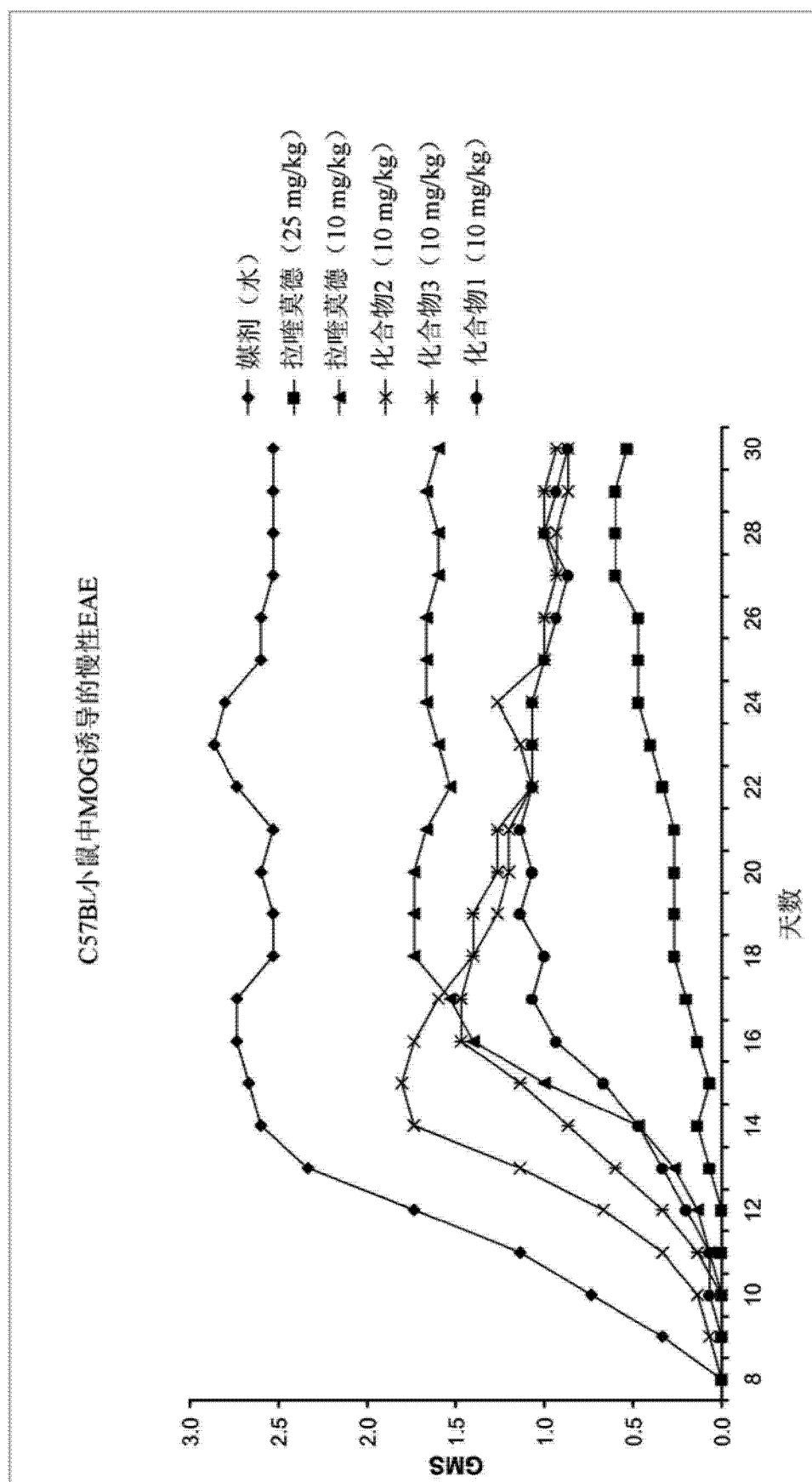


图 3