(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118416082 A
(43)申请公布日 2024.08.02

(21)申请号 202410393564.X

(22)申请日 2017.06.28

(30)优先权数据
62/355,844 2016.06.28 US
62/394,665 2016.09.14 US
62/446,213 2017.01.13 US
62/465,053 2017.02.28 US
62/507,397 2017.05.17 US
62/512,825 2017.05.31 US

(62)分案原申请数据
201780040478.9 2017.06.28

(71)申请人 应急生物防御行动兰辛有限责任公司
地址 美国特拉华州

(72)发明人 穆罕默德·安娜若·卡比尔
奥丁·约翰·纳德尔
厄玛·玛丽莎·格罗西

(74)专利代理机构 北京聿宏知识产权代理有限公司 11372
专利代理师 吴大建 邓树山

(51)Int.Cl.
A61K 31/675(2006.01)
A61K 47/26(2006.01)
A61K 47/18(2017.01)
A61K 47/02(2006.01)
A61P 31/12(2006.01)
A61P 31/22(2006.01)
A61P 31/14(2006.01)
A61P 31/20(2006.01)
A61K 9/08(2006.01)
A61K 9/19(2006.01)

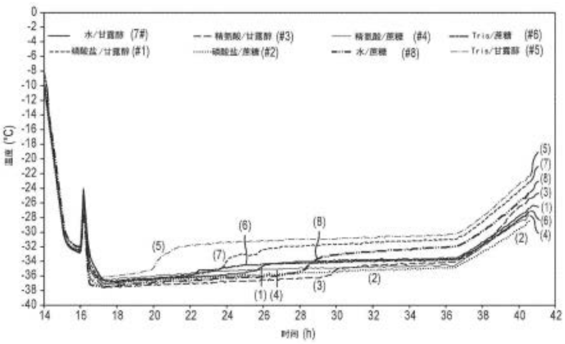
权利要求书1页 说明书166页 附图7页

(54)发明名称

布林西多福韦的制剂

(57)摘要

本发明公开了包含布林西多福韦的制剂。所述制剂可以是静脉制剂。该制剂可用于受试者口服布林西多福韦时出现胃肠道问题的情况。该制剂还可用于由于潜在的条件或口腔吸收不足而无法口服药物的情况。



1.一种药物组合物,其包含:

浓度为10.0mg/mL的布林西多福韦;

浓度为2.5%(w/v)-9%(w/v)的甘露醇;

浓度为100mM-200mM的L-精氨酸;和

水。

2.根据权利要求1所述的药物组合物,其特征在于,用HCl和/或NaOH调整pH。

3.一种水性药物组合物在制备用于治疗病毒感染的药物中的应用,所述药物组合物包含:

浓度为10.0mg/mL的布林西多福韦;

浓度为2.5%(w/v)-9%(w/v)的甘露醇;

浓度为100mM-200mM的L-精氨酸;和

水;

其中所述药物组合物的pH为8.0。

4.根据权利要求1所述的药物组合物,其特征在于,所述甘露醇以2.5%(w/v)的浓度存在。

5.根据权利要求1所述的药物组合物,其特征在于,所述甘露醇以5%(w/v)的浓度存在。

6.根据权利要求1所述的药物组合物,其特征在于,所述L-精氨酸以100mM的浓度存在。

7.根据权利要求1所述的药物组合物,其包含:

浓度为10.0mg/mL的布林西多福韦;

浓度为25mg/mL-50mg/mL的甘露醇;

浓度为17.4mg/mL的L-精氨酸;和

水;

其中所述组合物的pH为8.0。

8.根据权利要求1所述的药物组合物,其包含:

浓度为17.8mM的布林西多福韦;

浓度为137.5mM-275mM的甘露醇;

浓度为100mM的L-精氨酸;和

水;

其中所述组合物的pH为8.0。

9.根据权利要求3所述的应用,其中所述病毒感染选自多瘤病毒、乳头瘤病毒、单纯疱疹病毒、腺病毒、爱泼斯坦-巴尔病毒、巨细胞病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、水痘带状疱疹病毒、痘病毒或其组合。

10.根据权利要求3所述的应用,其不会导致溶血。

11.根据权利要求3所述的应用,其不会导致胃肠道毒性。

12.根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述组合物适合冷冻干燥。

布林西多福韦的制剂

[0001] 本申请是申请日为2017年6月28日、申请号为201780040478.9、发明名称为“布林西多福韦的制剂”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2016年6月28日提交的美国临时专利申请No.62/355,844;2016年9月14日提交的美国临时专利申请No.62/394,665;2017年1月13日提交的美国临时专利申请No.62/446,213;2017年2月28日提交的美国临时专利申请No.62/465,053;2017年5月17日提交的美国临时专利申请No.62/507,397和2017年5月31日提交的美国临时专利申请No.62/512,825的优先权和权益,其全部内容通过引用以其整体并入本文。

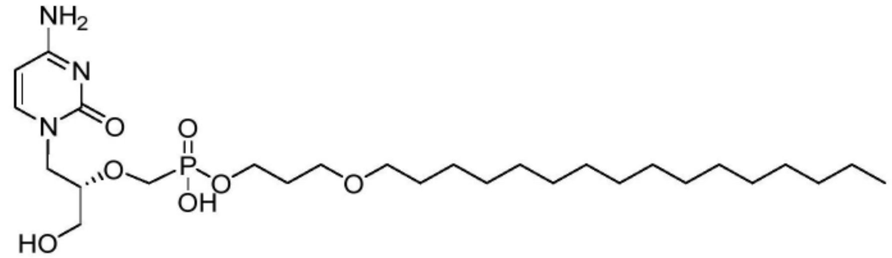
技术领域

[0004] 本发明涉及包含布林西多福韦的药物组合物(例如,冻干和/或水性组合物)及其使用方法。

背景技术

[0005] 布林西多福韦(BCV,CMX001)是口服生物可利用的脂质无环核苷膦酸盐,其在细胞内转化为活性抗病毒西多福韦二磷酸(CDV-PP)。布林西多福韦对双链DNA病毒具有广谱抗病毒活性。布林西多福韦的结构如下所示:

[0006]



发明内容

[0007] 本发明提供了包含布林西多福韦的组合物及其使用方法。所述组合物可以被冻干(例如,作为粉末)用于长期储存。冻干制剂可以被重构(例如,在糖水溶液中)作为用于静脉(IV)给药(例如,向有此需要的受试者)的生物相容性制剂。

[0008] 在一个方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含:布林西多福韦;填充剂;缓冲剂;和水;其中所述组合物的pH约为8.0。

[0009] 在一些实施方案中,所述填充剂为甘露醇或蔗糖。在一些实施方案中,所述填充剂为甘露醇。在一些实施方案中,所述缓冲剂为磷酸钠、L-精氨酸或氨丁三醇。在一些实施方案中,所述缓冲剂为L-精氨酸。在一些实施方案中,所述布林西多福韦以约10.0mg/mL的浓度存在。在一些实施方案中,所述填充剂以约2.5-9%(w/v)的浓度存在。在一些实施方案中,所述填充剂以约2.5%(w/v)的浓度存在。在一些实施方案中,所述填充剂以约5%(w/v)的浓度存在。在一些实施方案中,所述缓冲剂以约100-200mM的浓度存在。在一些实施方案

中,所述缓冲液以约100mM的浓度存在。在一些实施方案中,所述pH用HCl和/或NaOH调整。

[0010] 在一些实施方案中,所述药物组合物包含:浓度约为10.0mg/mL的布林西多福韦;浓度约为25-50mg/mL的甘露醇;浓度约为17.4mg/mL的L-精氨酸;和水;其中所述组合物的pH约为8.0。

[0011] 在一些实施方案中,所述药物组合物包含:浓度约为17.8mM的布林西多福韦;浓度约为137.5-275mM的甘露醇;浓度约为100mM的L-精氨酸;和水;其中所述组合物的pH约为8.0。

[0012] 在一些实施方案中,所述液体药物组合物被冻干,例如以除去水,形成冻干粉末。

[0013] 另一方面,本发明提供了一种冻干粉末,其包含:约13-23%重量的布林西多福韦;约48%-65%重量的甘露醇;和约22-40%重量的精氨酸。

[0014] 另一方面,本发明提供了一种冻干粉末,其包含:约13-19%重量的布林西多福韦;约48%-65%重量的甘露醇;和约22-33%重量的精氨酸。

[0015] 在一些实施方案中,冻干粉末含有约19%重量的布林西多福韦,约48%重量的甘露醇和约33%重量的精氨酸。在一些实施方案中,冻干粉末含有约13%重量的布林西多福韦,约65%重量的甘露醇和约22%重量的精氨酸。

[0016] 在一些实施方案中,所述冻干粉末的pH约为8.0。

[0017] 在另一方面,本发明提供了一种水性药物组合物,其包含:布林西多福韦;填充剂;缓冲剂;和糖醇水溶液、糖水溶液、林格氏溶液或盐(例如,氯化钠)水溶液。

[0018] 在一些实施方案中,所述水性药物组合物包含:布林西多福韦;甘露醇;L-精氨酸;和葡萄糖。

[0019] 在一些实施方案中,所述水性药物组合物包含:布林西多福韦;甘露醇;L-精氨酸;和葡萄糖;其中所述组合物的pH约为8.0。

[0020] 在一些实施方案中,所述糖水溶液为包含约5%重量葡萄糖的溶液。在一些实施方案中,所述盐水溶液为氯化钠水溶液。在一些实施方案中,所述氯化钠溶液的浓度为0.9重量%。在一些实施方案中,所述水性药物组合物还包含另外的水。

[0021] 在一些实施方案中,添加额外的水(例如,以调节制剂的张力、浓度或pH)。

[0022] 在一些实施方案中,所述水性药物组合物包含:浓度约为1.0mg/mL的布林西多福韦;浓度约为2.5-5mg/mL甘露醇;和浓度约为1.74mg/mL的L-精氨酸;和浓度约为50mg/mL的葡萄糖。在一些实施方案中,所述组合物的pH为约8.0、约7.5、约7.0、约6.5、约6.0或低于约6.0。

[0023] 在一些实施方案中,所述水性药物组合物包含:浓度约为1.78mM的布林西多福韦;浓度约为13.75-27.5mM的甘露醇;浓度约为10mM的L-精氨酸;和浓度约为287mM的葡萄糖。在一些实施方案中,所述组合物的pH为约8.0、约7.5、约7.0、约6.5、约6.0或低于约6.0。

[0024] 在一些实施方案中,所述水性药物组合物包含:浓度约为0.5mg/mL的布林西多福韦;浓度约为1.25-2.5mg/mL的甘露醇;和浓度约为0.87mg/mL的L-精氨酸;和浓度约为50mg/mL的葡萄糖。在一些实施方案中,所述组合物的pH为约8.0、约7.5、约7.0、约6.5、约6.0或低于约6.0。

[0025] 在一些实施方案中,所述水性药物组合物包含:浓度约为0.89mM的布林西多福韦;浓度约为6.85-13.7mM的甘露醇;浓度约为5mM的L-精氨酸;和浓度约为287mM的葡萄糖。在

一些实施方案中,所述组合物的pH为约8.0、约7.5、约7.0、约6.5、约6.0或低于约6.0。

[0026] 在一些实施方案中,所述水性药物组合物包含:浓度约为1.0mg/mL的布林西多福韦;浓度约为2.5-5mg/mL的甘露醇;和浓度约为1.74mg/mL的L-精氨酸;浓度约为50mg/mL的葡萄糖;其中所述组合物的pH约为8.0。

[0027] 在一些实施方案中,所述水性药物组合物包含:浓度约为1.78mM的布林西多福韦;浓度约为13.75-27.5mM的甘露醇;浓度约为10mM的L-精氨酸;和浓度约为287mM的葡萄糖;其中所述组合物的pH约为8.0。

[0028] 在一些实施方案中,所述水性药物组合物包含:浓度约为0.5mg/mL的布林西多福韦;浓度约为1.25-2.5mg/mL的甘露醇;和浓度约为0.87mg/mL的L-精氨酸;和浓度约为50mg/mL的葡萄糖;其中所述组合物的pH约为8.0。

[0029] 在一些实施方案中,所述水性药物组合物包含:浓度约为0.89mM的布林西多福韦;浓度约为6.85-13.7mM的甘露醇;浓度约为5mM的L-精氨酸;和浓度约为287mM的葡萄糖;其中所述组合物的pH约为8.0。

[0030] 在一些实施方案中,用于溶解布林西多福韦的冻干制剂的糖水溶液、糖醇水溶液、林格氏溶液或盐水溶液的体积约为100或200mL。换句话说,在一些实施方案中,将包含布林西多福韦的冻干粉末溶于约100mL或约200mL的糖水溶液、糖醇水溶液、林格氏溶液、盐水溶液或水中。在一些实施方案中,将冻干粉末溶于约100mL、约110mL、约120mL、约130mL、约140mL、约150mL、约160mL、约170mL、约180mL、约190mL或约200mL。例如,在一些实施方案中,本发明的冻干粉末可以溶解在约100mL的5%葡萄糖水溶液中。在一些实施方案中,本发明的冻干粉末可以溶解在约200mL的5%葡萄糖水溶液中。

[0031] 在一些实施方案中,所述水性药物组合物包含:约100mg的布林西多福韦;约250-500mg的甘露醇;约174mg的精氨酸;约5g的葡萄糖;和约100mL的水。在一些实施方案中,所述组合物的pH为约8.0、约7.5、约7.0、约6.5、约6.0或低于约6.0。

[0032] 在一些实施方案中,所述水性药物组合物包含:约200mg的布林西多福韦;约500-1000mg的甘露醇;约348mg的精氨酸;约10g的葡萄糖;和约200mL的水。在一些实施方案中,所述组合物的pH为约8.0、约7.5、约7.0、约6.5、约6.0或低于约6.0。

[0033] 在一些实施方案中,所述水性药物组合物包含:约50mg的布林西多福韦;约125-250mg的甘露醇;约87mg的精氨酸;约5g的葡萄糖;和约100mL的水。在一些实施方案中,所述组合物的pH为约8.0、约7.5、约7.0、约6.5、约6.0或低于约6.0。

[0034] 在一些实施方案中,所述水性药物组合物包含:约100mg的布林西多福韦;约250-500mg的甘露醇;约174mg的精氨酸;;约10g的葡萄糖;和约200mL的水。在一些实施方案中,所述组合物的pH为约8.0、约7.5、约7.0、约6.5、约6.0或低于约6.0。

[0035] 在一些实施方案中,所述水性药物组合物包含:约100mg的布林西多福韦;约250-500mg的甘露醇;约174mg的精氨酸;约5g的葡萄糖;和约100mL的水;其中所述组合物的pH约为8.0。

[0036] 在一些实施方案中,所述水性药物组合物包含:约200mg的布林西多福韦;约500-1000mg的甘露醇;约348mg的精氨酸;约10g的葡萄糖;和约200mL的水;其中所述组合物的pH约为8.0。

[0037] 在一些实施方案中,所述水性药物组合物包含:约50mg的布林西多福韦;约125-

250mg的甘露醇;约87mg的精氨酸;约5g的葡萄糖;和约100mL的水;其中所述组合物的pH约为8.0。

[0038] 在一些实施方案中,所述水性药物组合物包含:约100mg的布林西多福韦;约250-500mg的甘露醇;约174mg的精氨酸;约10g的葡萄糖;和约200mL的水;其中所述组合物的pH约为8.0。

[0039] 在一些实施方案中,在掺入本申请所述的水性药物组合物之前,所述布林西多福韦、填充剂和缓冲剂中的一种或多种被冻干。

[0040] 在一些实施方案中,所述水性药物组合物适合于静脉给药。在一些实施方案中,所述水性药物组合物是无菌的。

[0041] 在另一方面,本发明提供了用于静脉给药的无菌水性药物组合物,其包含:布林西多福韦;填充剂;缓冲剂和葡萄糖。

[0042] 在另一方面,本发明提供了用于静脉给药的无菌水性药物组合物,其包含:布林西多福韦;填充剂;缓冲剂和葡萄糖;其中所述组合物的pH约为8.0。

[0043] 在另一个方面,本发明提供了用于静脉给药的水性药物组合物,其包含:浓度为约0.5mg/mL至约1.0mg/mL的布林西多福韦;浓度为约2.5mg/mL至约5mg/mL的填充剂;浓度为约0.87mg/mL至约1.74mg/mL的缓冲剂;和浓度约为50mg/mL的葡萄糖。在一些实施方案中,所述组合物的pH为约8.0、约7.5、约7.0、约6.5、约6.0或低于约6.0。

[0044] 在另一个方面,本发明提供了用于静脉给药的水性药物组合物,其包含:浓度为约0.5mg/mL至约1.0mg/mL的布林西多福韦;浓度为约2.5mg/mL至约5mg/mL的填充剂;浓度为约0.87mg/mL至约1.74mg/mL的缓冲剂;和浓度约为50mg/mL的葡萄糖;其中所述组合物的pH约为8.0。

[0045] 在另一个方面,本发明提供了一种治疗患有病毒感染的受试者的方法,所述方法包括:向受试者施用如本发明所述的药物组合物或药物制剂。

[0046] 在另一个方面,本发明提供了一种治疗患有病毒感染的受试者的方法,所述方法包括:向受试者施用包含布林西多福韦;填充剂;缓冲剂;和葡萄糖的静脉药物组合物。

[0047] 在另一个方面,本发明提供了一种治疗患有病毒感染的受试者的方法,所述方法包括:向受试者施用包含布林西多福韦;填充剂;缓冲剂;和葡萄糖的静脉药物组合物,其中所述组合物的pH约为8.0。

[0048] 在另一个方面,本发明提供了一种治疗患有病毒感染的受试者的方法,所述方法包括:向所述受试者施用包含浓度为0.5mg/mL至约1.0mg/mL的布林西多福韦;浓度为约2.5mg/mL至约5mg/mL的填充剂;浓度为约0.87mg/mL至约1.74mg/mL的缓冲液;和浓度约为50mg/mL%的葡萄糖的静脉药物组合物。在一些实施方案中,所述组合物的pH为约8.0、约7.5、约7.0、约6.5、约6.0或低于约6.0。

[0049] 在另一个方面,本发明提供了一种治疗患有病毒感染的受试者的方法,所述方法包括:向所述受试者施用静脉药物组合物,其包含浓度为约0.5mg/mL至约1.0mg/mL的布林西多福韦;浓度为约2.5mg/mL至约5mg/mL的填充剂;浓度为约0.87mg/mL至约1.74mg/mL的缓冲液;和浓度约为50mg/mL%的葡萄糖;其中所述组合物的pH约为8.0。

[0050] 另一方面,本发明提供了一种用于治疗病毒感染的水性药物制剂或组合物,其通过包括以下步骤的方法制备:以任意顺序将一定量的布林西多福韦、填充剂和缓冲剂溶解

在水中形成第一溶液;将所述第一溶液冷冻干燥,形成冻干粉末;和将所述冻干粉末溶解在糖醇水溶液、糖水溶液、林格氏溶液或氯化钠溶液中以形成水性药物制剂或组合物。

[0051] 在另一方面,本发明提供了包含布林西多福韦、膨胀剂、缓冲剂、和糖醇水溶液或糖水溶液的水性药物组合物在制备用于治疗病毒感染的药物中的应用。

[0052] 在另一个方面,本发明提供了包含布林西多福韦、膨胀剂、缓冲剂和糖醇水溶液或糖水溶液的水性药物组合物在治疗病毒感染中的应用。

[0053] 在任何上述方面的一些实施方案中,待治疗的病毒感染为多瘤病毒、乳头瘤病毒、疱疹病毒、腺病毒、爱泼斯坦-巴尔病毒、巨细胞病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、水痘带状疱疹病毒、腺病毒、痘病毒或其组合。

[0054] 在一些实施方案中,向受试者施用如本发明所述的药物组合物不会导致溶血。在一些实施方案中,向受试者施用如本发明所述的药物组合物不会导致胃肠道毒性。

[0055] 在一些实施方案中,用于静脉给药的任何水性制剂或组合物的pH可具有低于约8.0的pH(例如,约8.0、约7.5、约7.0、约6.5、约6.0、约5.5、约5.0、约4.5、约4.0或约4.0以下)。在一些实施方案中,pH可高于8.0(例如,约8.5、约9.0、约9.5、约10.0、或高于约10.0)。

[0056] 不希望受理论束缚,与其他器官相比,口服布林西多福韦给药可导致在肠中显著更高的暴露;这种更高的暴露可导致口服布林西多福韦后的胃肠道毒性。如本文所述,静脉给药布林西多福韦可以防止肠道(例如,肠)过度暴露于布林西多福韦(例如,与口服BCV相比),改善胃肠道(GI)耐受性和降低GI毒性。在一些实施方案中,即使在比使用口服给药所需的剂量更低的剂量下,IV给药布林西多福韦可以提供与血浆和器官例如肝、肾和小肠相当的(例如,与口服给药相比)药物暴露。

[0057] 在一些实施方案中,静脉布林西多福韦可将药物递送至其他给药途径(例如,口服剂量)难以达到的器官(例如,脑)。在一些实施方案中,静脉布林西多福韦暴露于较高的CNS可治疗脑中的病毒感染(例如,新生儿和成人中的疱疹性脑炎;HHV-6脑炎;移植受者中的JC病毒/PML或患有多发性硬化的患者)。

[0058] 静脉布林西多福韦可以避免口服给药BCV可观察到的GI副作用,并提供治疗DNA病毒的机会(例如,在经历与口服给药BCV相关的GI副作用的患者中)。例如,像口服给药布林西多福韦一样,静脉给药布林西多福韦可以用作具有有限毒性的广谱抗病毒剂(例如,基本上没有血红素毒性,并且没有肾毒性),并且可以有效地治疗例如腺病毒和天花。另外,静脉给药布林西多福韦可用于治疗和预防例如巨细胞病毒、腺病毒和BK或JC病毒。例如,可以在造血细胞移植患者中治疗这些疾病。

[0059] 附加的特征和优点对于本领域技术人员而言是显而易见的,并且在下面的发明详述中阐述。

附图说明

[0060] 本领域技术人员将理解,附图主要是出于说明性目的,并且不旨在限制本文描述的发明主题的范围。附图不一定按比例绘制;在一些情况下,可以在附图中夸大或放大地示出本文公开的发明主题的各个方面,以便于理解不同的特征。在附图中,相同的附图标记通常表示相同的特征(例如,功能相似和/或结构相似的元件)。

[0061] 从以下结合附图的详细描述中将更清楚地理解以上和其他特征。

[0062] 图1是显示如实施例4中所述的产物探针记录的产物温度曲线图。

[0063] 图2是说明加速稳定性研究中货架期评估的一对图。

[0064] 图3是显示[^{14}C]布林西多福韦以15mg/kg或2mg/kg的目标剂量单次2小时静脉输注(IV)后,以及如实施例9中所述的以15mg/kg的单次口服(PO)剂量后,雄性Sprague Dawley(SD)和Long-Evans(LE)大鼠的血液和血浆放射性浓度的时间过程图。

[0065] 图4是如实施例9中所述的静脉和口服给药[^{14}C]布林西多福韦的小肠的组织浓度对时间的曲线图。

[0066] 图5是如实施例9中所述的静脉和口服给药[^{14}C]布林西多福韦的肾皮质的组织浓度对时间的图。

[0067] 图6是100mg口服、10mg IV和25mg IV剂量后的布林西多福韦血浆浓度图。

[0068] 图7A是如实施例10中所述的口服给药布林西多福韦后大鼠肠的直方图。

[0069] 图7B是如实施例10中所述的静脉给药布林西多福韦后大鼠肠的直方图。

[0070] 图8是显示在IV BCV单次递增剂量(SAD)试验中观察到的平均(+/-SE)丙氨酸氨基转移酶(ALT)的水平图。

[0071] 图9是示出对于组1-4中的受试者的平均血浆布林西多福韦浓度随时间的变化图,以及对于口服施用BCV的受试者的平均血浆BCV浓度随时间的变化图。

[0072] 图10是示出IV和口服BCV剂量后中值血浆西多福韦浓度随时间的变化图。

具体实施方式

[0073] 本发明涉及包含布林西多福韦的药物组合物(例如,冻干或水性组合物)及其使用方法。本发明还涉及包含本文所述的重构的冻干药物组合物的药物制剂。所述组合物和制剂可用于静脉给药。在一些实施方案中,静脉给药本发明的组合物或制剂不会导致溶血。所述制剂还可用于口服给药不可能或基本上不可能的情况,例如由于潜在的条件或口服吸收不足。

[0074] 本发明涉及至少三种类型的布林西多福韦组合物。首先,本发明涉及可以在储存之前冻干的布林西多福韦的散装制剂(例如,本发明的液体制剂或本发明的预冻干制剂)。冻干制剂(例如粉末)可以长时间储存。另外,冻干制剂可以在向患者给药(例如需要治疗的患者)之前(例如,紧接在之前)重构(例如,通过溶解在糖溶液中)。因此,本发明内容教导了用于给药的布林西多福韦预冻干制剂、冻干粉末和重构制剂(例如药物制剂)。

[0075] 公开的制剂

[0076] 预冻干制剂

[0077] 在一些实施方案中,在冻干(例如冷冻干燥)之前将布林西多福韦溶解在水中。可以将例如布林西多福韦与填充剂和缓冲剂共溶解。组分的溶解可以单独或同时发生,并且可以以任意顺序发生。

[0078] 在一些实施方案中,本发明的预冻干组合物包含缓冲剂。在一些实施方案中,本发明的预冻干组合物包含填充剂。在一些实施方案中,本发明的预冻干组合物包含缓冲剂和填充剂。在一些实施方案中,布林西多福韦的浓度为10mg/mL。在一些实施方案中,溶液的pH用HCl和/或NaOH调整。

[0079] 在一些实施方案中,缓冲剂选自磷酸钠、L-精氨酸、氨丁三醇和pH调节水。在一些

实施方案中,缓冲剂为磷酸钠、L-精氨酸或氨丁三醇。在一些实施方案中,缓冲剂为磷酸钠。在一些实施方案中,缓冲剂为精氨酸。在一些实施方案中,缓冲剂为L-精氨酸。在一些实施方案中,缓冲剂为氨丁三醇。在一些实施方案中,缓冲剂为pH调节水。在一些实施方案中,缓冲液以约100mM至约200mM的浓度存在。在一些实施方案中,缓冲剂以约25mM、约50mM、约75mM、约100mM、约125mM、约150mM、约175mM或约200mM的量存在。

[0080] 在一些实施方案中,填充剂为甘露醇或蔗糖。在一些实施方案中,缓冲剂为磷酸钠、L-精氨酸或氨丁三醇。在一些实施方案中,填充剂以约5-9%(w/v)的浓度存在。在一些实施方案中,填充剂以约2.5-9%(w/v)的浓度存在。在一些实施方案中,填充剂以约2.5%(w/v)、约5%(w/v)或约9%(w/v)的浓度存在。

[0081] 在一些实施方案中,本发明的组合物包含浓度为约10.0mg/mL、约6.4mg/mL或约3.2mg/mL的布林西多福韦。

[0082] 在一些实施方案中,本发明的组合物包含浓度约为10.0mg/mL的布林西多福韦,浓度约为25-50mg/mL的甘露醇,浓度约为17.4mg/mL的L-精氨酸和水,并且具有pH=8.0。

[0083] 在一些实施方案中,本发明的组合物包含浓度约为17.8mM的布林西多福韦,浓度约为137.5-275mM的甘露醇,浓度约为100mM的L-精氨酸和水,并且具有pH=8.0。

[0084] 在一些实施方案中,可冻干本文所述的任何预冻干制剂以除去水(例如用于储存)。

[0085] 在一些实施方案中,预冻干制剂可以直接用作药物制剂(即,可以直接给予患者)。然而,在一些实施方案中,这些制剂被冻干用于储存并随后重构(例如,在5%葡萄糖水溶液中)以给药于患者。

[0086] 在一些实施方案中,布林西多福韦的液体制剂在稀释于输注载体(例如,5%葡萄糖)后用于静脉给药。

[0087] 在一些实施方案中,本发明的液体制剂(即,本发明的预冻干制剂)与输注载体和临床环境中使用的材料(例如容器)相容。例如,本发明的液体制剂在与如无菌过滤器、小瓶、塞子、输液袋或IV系统的材料接触时,在外观、pH或布林西多福韦的回收率、或杂质的引入,没有显示出显著变化。在一些实施方案中,本发明的液体制剂在通过注射器过滤器过滤时,pH、布林西多福韦的损失或杂质的引入,没有经历显著变化。

[0088] 冻干制剂

[0089] 可以将预冻干制剂冻干以生产BCV、填充剂和缓冲剂的冻干制剂(例如,粉末)。冻干制剂可以长时间稳定,并且可以在给药于患者之前重建。在一些实施方案中,冻干制剂是无菌的。

[0090] 在一些实施方案中,冻干包括冷冻、退火和干燥冻干组合物。在一些实施方案中,干燥包括初级干燥和二级干燥。在一些实施方案中,冷冻和退火包括将制剂暴露于约5℃至-50℃之间的温度。在一些实施方案中,初级干燥在约35℃的温度下进行。在一些实施方案中,二级干燥在约20℃的温度下进行。

[0091] 在一些实施方案中,冷冻和/或退火持续约16h。在一些实施方案中,初级干燥阶段持续约20小时。在进一步的实施方案中,二级干燥需要约22小时(例如,21.7小时)或约28小时(例如,27.7小时)。

[0092] 在一些实施方案中,与在冻干过程中起泡的其他制剂相比,本发明的液体制剂(例

如,包含布林西多福韦、精氨酸和甘露醇的液体制剂)在冻干过程中不起泡。

[0093] 用于IV给药的重构药物组合物

[0094] 在对患者进行IV给药之前,可以重构上述冻干粉末,例如通过溶解在水性溶剂如水中。在一些实施方案中,水性溶剂为含有糖醇或糖(例如葡萄糖)的水。在一些实施方案中,水性溶剂为5%葡萄糖水溶液。水性溶剂同样可以是无菌的(例如,类似于无菌冻干制剂),并且可适合于向有需要的患者给药。在一些实施方案中,本发明的冻干粉末的重构产生本发明的水性组合物。

[0095] 如下所述,本文所述的用于IV给药的药物组合物可以使用比口服给药布林西多福韦所需的那些更低剂量的布林西多福韦提供治疗相关的布林西多福韦的血浆浓度。例如,使用本发明的制剂对布林西多福韦的静脉给药提供了先前在巨细胞病毒预防和腺病毒治疗中已经证明具有抗病毒效力的人体中的布林西多福韦的血浆浓度。IV制剂中使用的BCV的量(例如,约10mg或约25mg)是使用口服给药达到相似血浆浓度所需的BCV量的约十分之一。

[0096] 因此,在一些实施方案中,本公开教导了一种病毒感染的治疗,其包括向有此需要的受试者施用本文所述的布林西多福韦的IV制剂。在一些实施方案中,布林西多福韦的IV剂量小于口服给药剂量(例如,约50%的口服剂量、约40%的口服剂量、约30%的口服剂量、约20%的口服剂量、或者约10%的口服剂量),以达到类似的结果(例如,血浆浓度、抗病毒活性等)。因此,在一些实施方案中,可以使用比用于口服给药更少量的IV布林西多福韦来实现类似(例如,基本相同)的临床结果。另外,因为IV给药导致肠中较少量的布林西多福韦,在一些实施方案中,本发明还提供了不会导致胃肠道毒性的病毒感染的治疗。本发明教导了对不能口服给药的患者的治疗(例如,具有敏感肠道的患者或不能吞咽口服药物的患者)。

[0097] 在一些实施方案中,本发明的组合物包含浓度约为1.0mg/mL的布林西多福韦,浓度约为2.5-5mg/mL甘露醇,浓度约为1.74mg/mL的L-精氨酸和浓度约为50mg/mL的葡萄糖,并且具有pH=8.0。

[0098] 在一些实施方案中,本发明的组合物包含浓度约为17.8mM的布林西多福韦,浓度约为13.75-27.5mM的甘露醇,浓度约为10mM的L-精氨酸和浓度约为287mM的葡萄糖,并且具有pH=8.0。

[0099] 在一些实施方案中,本发明的组合物包含浓度约为0.5mg/mL的布林西多福韦,浓度约为1.25-2.5mg/mL的甘露醇,浓度约为0.87mg/mL的L-精氨酸和浓度约为50mg/mL的葡萄糖,并且具有pH=8.0。

[0100] 在一些实施方案中,本发明的组合物包含浓度约为0.89mM的布林西多福韦,浓度约为6.85-13.7mM的甘露醇,浓度约为5mM的L-精氨酸和浓度约为287mM的葡萄糖,并且具有pH=8.0。

[0101] 在一些实施方案中,本发明的药物组合物还包含糖。在一些实施方案中,糖在糖水溶液中。在一些实施方案中,糖水溶液为5%葡萄糖溶液。在一些实施方案中,糖水溶液的体积为约100或200mL。

[0102] 在一些实施方案中,本发明的组合物包含约100mg量的布林西多福韦、约250mg至约500mg量的甘露醇、约174mg量的精氨酸、约5g量的葡萄糖和约100mL量的水,并且具有pH

＝8.0。

[0103] 在一些实施方案中,本发明的组合物包含约200mg量的布林西多福韦、约500mg至约1000mg量的甘露醇、约348mg量的精氨酸、约10g量的葡萄糖和约100mL量的水,并且具有pH＝8.0。

[0104] 在一些实施方案中,本发明的组合物包含约50mg量的布林西多福韦、约125mg至约250mg量的甘露醇、约87mg量的精氨酸、约5g量的葡萄糖和约100mL量的水,并且具有pH＝8.0。

[0105] 在一些实施方案中,本发明的组合物包含约100mg量的布林西多福韦、约250mg至约500mg量的甘露醇、约174mg量的精氨酸、约10g量的葡萄糖和约200mL量的水,并且具有pH＝8.0。

[0106] 在一些实施方案中,本发明的组合物包含在100-200mL的5％葡萄糖溶液中浓度约为0.1-1.0mg/mL的布林西多福韦。在一些实施方案中,所述组合物包含:10mg布林西多福韦、100mM精氨酸和5％甘露醇(w/v),并且具有pH＝8.0。

[0107] 在一些实施方案中,本发明的冻干组合物用于在稀释后通过输注进行IV给药。

[0108] 在一些实施方案中,缓冲剂以约200mM存在。在一些实施方案中,先前已将布林西多福韦冻干。在一些实施方案中,本发明的组合物被冻干以除去水。在一些实施方案中,先前已将布林西多福韦、填充剂和缓冲剂冻干。

[0109] 在一些实施方案中,本发明提供了用于静脉给药的水性药物组合物,其包含布林西多福韦、甘露醇和精氨酸。在一些实施方案中,制剂的pH约为8.0。在一些实施方案中,组合物的pH用HCl和/或NaOH调整。

[0110] 在一些实施方案中,本发明的组合物适于用去离子水重构。在一些实施方案中,本发明的组合物在重构时不起泡。在一些实施方案中,本发明的组合物在重构时起泡并且泡沫在少于20分钟、少于10分钟、少于5分钟或少于1分钟内消散。在一些实施方案中,与包含50mM或更少的精氨酸的组合物相比,包含100mM或更多精氨酸的组合物在重构时显示出更快的泡沫或气泡消散。

[0111] 在一些实施方案中,本发明的冻干组合物在用输注载体(例如,5％葡萄糖)稀释时,例如在IV给药之前,不会经历外观、pH或布林西多福韦回收率的变化。

[0112] 在一些实施方案中,本发明的冻干组合物的重构不会导致布林西多福韦的损失。在一些实施方案中,本发明的冻干制剂在重构后是清晰和无色的。

[0113] <u>辅料和药学上可接受的载体</u>

[0114] 除了布林西多福韦、缓冲剂和填充剂之外,本发明的药物组合物可以包含额外的药学上可接受的载体。此类药学上可接受的载体可包括任意和所有溶剂、稀释剂或其他液体载体、分散或悬浮助剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂、固体粘合剂、润滑剂等,以适合于所需的特定剂型。Remington’s Pharmaceutical Sciences,Sixteenth Edition,E.W.Martin(Mack Publishing Co.,Easton,Pa.,1980)公开了用于配制药物组合物的各种载体和用于其制备的已知技术。除非任何常规载体介质与活性化合物(即,布林西多福韦)不相容,例如通过产生任何不期望的生物效应或以有害方式与药物组合物的任何其他组分相互作用,否则其用途被考虑到在本发明的范围内。可用作药学上可接受的载体的材料的一些实例包括但不限于糖,如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,如玉米淀粉和马铃薯淀

粉;纤维素及其衍生物,如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;粉末黄蓍草;麦芽;明胶;滑石;辅料,如可可脂和栓剂蜡;花生油、棉籽油等油类;红花油、芝麻油;橄榄油;玉米油和豆油;乙二醇;如丙二醇;油酸乙酯和月桂酸乙酯等酯类;琼脂;缓冲剂,如氢氧化镁和氢氧化铝;海藻酸;无热原水;等渗盐水;林格氏溶液,乙醇,和磷酸盐缓冲溶液,以及其他无毒相容润滑剂,如十二烷基硫酸钠和硬脂酸镁,以及着色剂、脱模剂、涂层剂、甜味剂、调味剂和芳香剂,防腐剂和抗氧化剂也可以根据制剂设计师的判断,存在于组合物中。

[0115] 使用的方法

[0116] 在一些实施方案中,本发明提供了治疗患有病毒感染的受试者的方法,包括向受试者施用本发明的组合物。在一些实施方案中,将本发明的组合物静脉施用于受试者。

[0117] 在一些实施方案中,本发明的制剂可包含一定体积的浓缩无菌液体溶液(例如,用于稀释)和/或冻干粉末(例如,用于重构)。在一些实施方案中,制剂可以储存至少12个月(例如,在约25℃)。在一些实施方案中,制剂可以倒置储存(例如,约24个月、或约36个月)。在一些实施方案中,制剂可以储存在冰箱中(例如,约12个月)。在一些实施方案中,冻干粉末易于在液体中溶解(例如,用于重构)。在一些实施方案中,液体体积可以很小(例如,用于肠胃外给药)。在一些实施方案中,制剂显示出可接受的过滤器和管道相容性。在一些实施方案中,制剂与包括但不限于D5W、NS和D5$^{1}/_{2}$NS的正常复苏液相容。

[0118] <u>患者人群</u>

[0119] 在一些实施方案中,施用本发明的组合物不会导致溶血。在一些实施方案中,施用本发明的组合物不会导致胃肠道毒性。

[0120] 因此,在一些实施方案中,本公开提供了患者的布林西多福韦的剂量,所述患者可能经历与口服布林西多福韦相关的不希望的副作用(例如,胃肠副作用,例如腹泻、疼痛、便秘等)。例如,在一些实施方案中,IV制剂可用于患有诸如贫血、肠易激综合症、便秘、腹泻、肠痛等症状的患者。另外,在一些实施方案中,本发明提供了对有此需要的受试者持续和/或重复给药布林西多福韦。例如,已经经历干细胞移植的患者可以施用本发明的IV制剂以预防与口服给药(例如,重复口服给药)的布林西多福韦相关的胃肠副作用。

[0121] <u>病毒适应症</u>

[0122] 在一些实施方案中,待治疗的病毒感染选自多瘤病毒(包括BK、约翰·坎宁安病毒(JCV)、梅克尔细胞病毒(MCV)、KI多瘤病毒(KIV)、WU多瘤病毒(WUV)、猿猴病毒40(SV 40)),乳头瘤病毒(包括人乳头瘤病毒、棉尾兔乳头瘤病毒、马乳头瘤病毒和牛乳头瘤病毒),疱疹病毒(如单纯疱疹病毒),腺病毒,爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV),人巨细胞病毒(HCMV),乙型肝炎病毒,丙型肝炎病毒,水痘带状疱疹病毒(VZV)或其组合。

[0123] 在一些实施方案中,IV制剂可用于预防有风险的(例如,CMV血清阳性)成人和儿科同种异体造血干细胞移植受体的临床显著巨细胞病毒感染。在一些实施方案中,本发明制剂可用于治疗成人和儿科免疫受损宿主中的腺病毒感染。在一些实施方案中,制剂可用于造血干细胞移植或实体器官移植患者。

[0124] <u>剂量方案</u>

[0125] 在一些实施方案中,本发明的制剂(例如,IV制剂)以约1mg至1000mg BCV的剂量施用。例如,制剂可以以约10mg至200mg BCV的剂量施用。在一些实施方案中,IV制剂可以约5mg;约10mg;约15mg;约20mg;约25mg;约30mg;约35mg;约40mg;约45mg;约50mg;约55mg;约

60mg;约65mg;约70mg;约75mg;约80mg;约85mg;约90mg;约95mg;约100mg;约105mg;约110mg;约115mg;约120mg;约125mg;约130mg;约135mg;约140mg;约145mg;约150mg;约155mg;约160mg;约165mg;约170mg;约175mg;约180mg;约185mg;约190mg;约195mg;或约200mg BCV施用。

[0126] 在一些实施方案中,可以施用本发明的IV制剂以递送约5至约50mg;约10至约50mg;约10至约40mg;约10至约30mg;约5至约25mg;约10至约25mg;约15至约25mg的BCV。制剂可以施用于人(例如,成年人)。

[0127] 在一些实施方案中,当以约10mg至100mg(例如,约10mg或约25mg)的剂量静脉给药时,所述制剂是安全且良好耐受的。例如,本公开的10mg和25mg剂量的布林西多福韦制剂可以给出有利的耐受性特征而没有不良事件。在一些实施方案中,约10mg和25mg本文所述制剂的剂量不产生胃肠道副作用。

[0128] 在一些实施方案中,本文教导的IV制剂可以每天施用多次,或者可以作为单剂施用。例如,IV制剂可以每天施用一次或者可以每天施用两次。在一些实施方案中,本发明的制剂每周施用一次,或每周施用两次。在一些实施方案中,每隔一天施用本发明的制剂。在一些实施方案中,每隔一周施用本发明的制剂。在一些实施方案中,本发明的制剂每月施用一次,或每月施用两次。本领域技术人员将能够确定患者的合适剂量方案。

[0129] IV布林西多福韦的给药持续时间(即,对于每个剂量)可根据个体受试者或有此需要的患者的需要而变化,并且其在本领域技术人员的专业知识范围内(例如,临床医生,如护士或医生)确定受试者服用布林西多福韦的适当时间。例如,静脉给药布林西多福韦可以持续约15分钟、约30分钟、约45分钟、约60分钟、约75分钟、约90分钟、约105分钟或约120分钟。

[0130] 在一些实施方案中,本发明的制剂可以与其他治疗剂或治疗组合施用。例如,其他治疗剂可以是顺铂、阿霉素、依托泊苷、伊立替康、托泊替康、紫杉醇、多西紫杉醇、埃坡霉素、他莫昔芬、5-氟尿嘧啶、甲氨蝶呤、替莫唑胺、环磷酰胺、lonafarib、替比法尼、4-((5-((4-(3-氯苯基)-3-氧代哌嗪-1-基)甲基)-1H-咪唑-1-基)甲基)苯甲腈盐酸盐、(R)-1-((1H-咪唑-5-基)甲基)-3-苄基-4-(噻吩-2-基磺酰基)-2,3,4,5-四氢-1H-苯并二氮杂-7-甲腈、西妥昔单抗、伊马替尼、干扰素α-2b、聚乙二醇化干扰素α-2b、芳香化酶组合、吉西他滨、尿嘧啶芥子气、氯甲嗪、异环磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥、胍血生、三亚乙基三聚氰胺、三乙烯硫代磷胺、白消安、卡莫司汀、洛莫司汀、链脲佐菌素、达卡巴嗪、氟尿嘧啶、阿糖胞苷、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、磷酸氟达拉滨、甲酰四氢叶酸、奥沙利铂、喷司他丁、长春碱、长春新碱、长春地辛、博来霉素、放线菌素、柔红霉素、表柔比星、伊达比星、光神霉素、脱氧肋间型霉素、丝裂霉素C、左旋天冬酰胺酶,替尼泊苷17、α-乙炔雌二醇、己烯雌酚、睾酮、泼尼松、氟甲睾酮、屈他雄酮丙酸酯、睾内酯、醋酸甲地孕酮、甲基强的松龙、甲基睾丸酮、泼尼松龙、曲安奈德、氯稀雌醚、17α-羟基孕酮、氨基乙酰亚胺、雌莫司汀、醋酸甲羟孕酮、醋酸亮丙瑞林、氟他胺、柠檬酸托瑞米芬、醋酸戈舍瑞林、卡铂、羟基脲、安吖啶、丙卡巴肼、米托坦、米托蒽醌、左旋咪唑、长春瑞滨、阿那曲唑、来曲唑、卡培他滨、雷洛昔芬、droloxafine、六甲基蜜胺、贝伐单抗、曲妥珠单抗、托西莫单抗、硼替佐米、药替伊莫单抗、三氧化二砷、卟吩姆钠、西妥昔单抗、塞替派、六甲蜜胺、氟维司群、依西美坦、利妥昔单抗、阿仑单抗、地塞米松、比卡鲁胺、苯丁酸氮芥或戊柔比星。药剂可以作为治疗方案的一部分施用,并且不一定同时

施用或在相同的时间表施用。

[0131] 术语

[0132] 出于促进对本文描述的实施方案的理解的目的,使用对优选实施方案和特定语言的引用来描述它们。这里使用的术语仅用于描述特定实施例的目的,并不意图限制本发明的范围。如在整个本发明中所使用的,单数形式"一"、"一"和"这"包括复数指代,除非上下文另有明确说明。因此,例如,对"组合物"的提及包括多种这样的组合物,以及单一组合物,并且提及"治疗剂"或"活性化合物"是指一种或多种治疗剂和/或药剂(例如,布林西多福韦)及其本领域技术人员已知的等同物。除非另有说明,本文所用的所有百分比和比例均以重量计。

[0133] 本文使用的术语"约"是指大约、在附近、大致或周围。当术语"约"与数值范围结合使用时,它通过扩展上述数值的上下边界来修改该范围。通常,术语"约"在本文中用于将所述值之上和之下的数值修改20%的方差。

[0134] 如在本发明中使用的,无论是在过渡短语中还是在权利要求的主体中,术语"包含"和"包括"将被解释为具有开放式含义。也就是说,术语将与短语"至少具有"或"至少包括"同义地解释。当在过程的上下文中使用时,术语"包含"意味着该过程至少包含所述步骤,但是可能包含其他步骤。当在分子、化合物或组合物的上下文中使用时,术语"包含"是指化合物或组合物至少包含所述特征或组分,但也可包括额外的特征或组分。

[0135] "药物组合物"是含有适于给药于受试者的形式的本发明化合物(例如,布林西多福韦)的制剂。术语"药物组合物"包括适于给药于哺乳动物例如人的制剂。药物组合物可以是,例如静脉(IV)制剂或口服制剂。

[0136] 术语"单一疗法"应理解为意指使用单一药物治疗特定病症或疾病。单一疗法与组合疗法的不同之处在于,组合疗法包括组合使用至少两种药物来治疗特定的病症或疾病。

[0137] 如本文所用,"治疗"、"治疗"或"治疗"描述了用于对抗疾病、状况或病症的患者的管理和护理,并且包括施用本发明的活性化合物(即,布林西多福韦),以减轻疾病、状况或病症的症状或并发症,或消除疾病、状况或病症。术语"治疗"还可包括治疗体外细胞或动物模型。

[0138] 如本文所用,"本发明的化合物"是指活性化合物(例如,布林西多福韦)以及非活性化合物(例如,填充剂、缓冲剂、甜味剂等)。

[0139] 本发明的活性化合物(即,布林西多福韦)也可用于预防相关疾病、状况或病症,或用于鉴定用于此类目的的合适候选物。如本文所用,"预防"、"预防"或"防止"描述了减少、改善或消除此类疾病、状况或病症的症状或并发症的发作。

[0140] 布林西多福韦还可用于预防疾病,例如病毒感染。预防被理解为意指为预防疾病而采取的行动。在本发明的上下文中,预防可以意指用例如布林西多福韦治疗。

[0141] 如本文所用,"治疗有效量"是指在患者中进行临床观察到的改善所必需的量。在一些实施方案中,配制本发明的化合物使得它们包含不会引起一种或多种不希望的副作用的量。例如,术语"治疗有效量"可以指用于治疗、改善或预防所识别的疾病或状况(例如,病毒感染),或显示可检测的治疗或抑制作用的任意一种或多种药剂(例如,布林西多福韦)的量。可以通过本领域已知的任何测定方法检测该效果。受试者的精确有效量取决于受试者的体重、大小和健康状况;状况的性质和程度;和选择用于给药的治疗剂的给药方案。

[0142] 对于给定情况的治疗有效量可以通过临床医生的技能和判断范围内的常规实验来确定。在一个优选的方面,待治疗的疾病或状况是病毒感染。此外,有效量的药剂是提供临床医生或其他合格观察者所指出的客观可识别的改善的药剂。

[0143] 如本文所用,短语"药学上可接受的"是指那些在合理的医学判断范围内适合用于与人类和动物组织接触的化合物、材料、组合物、载体和/或剂型。没有过多毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症,与合理的利益/风险比相称。

[0144] "药学上可接受的赋形剂或载体"是指可用于制备药物组合物的赋形剂或载体,所述药物组合物通常是安全的、无毒的,既不是生物学上也不是不合需要的,并且包括兽医用的可接受的赋形剂以及人用药物。如说明书和权利要求中所用的"药学上可接受的赋形剂"包括一种和多于一种这样的赋形剂。以上列出了药学上可接受的赋形剂和载体。

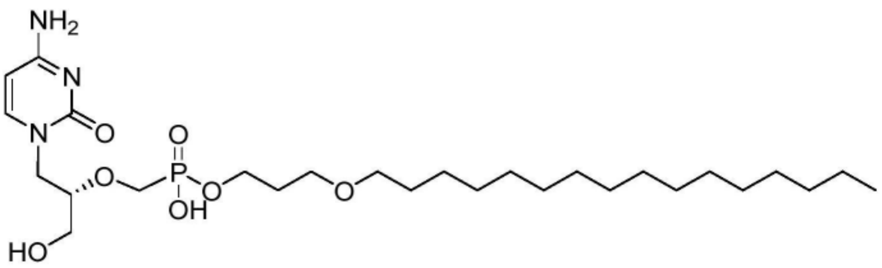
[0145] 如本文所用,"受试者"可与"有此需要的受试者"互换,两者均指具有病毒感染引起的病症的受试者(例如,患者)或具有相对于整个人群而言,发生病毒感染相关疾病或病症的风险增加的受试者。"受试者"包括哺乳动物。哺乳动物可以是例如,人或适当的非人哺乳动物,如灵长类动物、小鼠、大鼠、狗、猫、牛、马、山羊、骆驼、绵羊或猪。受试者也可以是鸟或禽。在一个实施方案中,哺乳动物是人。

[0146] 布林西多福韦的代表性"药学上可接受的盐"包括例如水溶性和水不溶性盐,如乙酸盐、氨芪磺酸盐(4,4-二氨基芪-2,2-二磺酸盐)、苯磺酸盐、苯甲酸盐、碳酸氢盐、硫酸氢盐、酒石酸氢盐、硼酸盐、溴化物、丁酸盐、钙盐、乙二胺四乙酸盐、右旋樟脑磺酸盐、碳酸盐、氯化物、柠檬酸盐、克拉维酸盐、二盐酸盐、乙二胺四乙酸盐、乙酸盐、依托酸盐、乙磺酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、葡萄糖酸盐、谷氨酸盐、对羟乙酰氨基苯胂酸盐(glycollylarsanilate)、六氟磷酸盐、己基间苯二酚、己基间苯二酚盐(hexylresorcinate)、海巴明盐(hydrabamine)、氢溴酸盐、盐酸盐、羟基萘甲酸盐、碘化物、连二硫酸盐(sethionate)、乳酸盐、乳糖酸盐、月桂酸盐、镁盐、苹果酸盐、马来酸盐、扁桃酸盐、甲磺酸盐、甲基溴盐、硝酸甲酯、甲基硫酸盐、粘酸盐、萘磺酸盐、硝酸盐、N-甲基葡糖胺铵盐、3-羟基-2-萘甲酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐(1,1-亚甲基-双-2-羟基-3-萘甲酸盐,依伯酸盐(einbonate))、泛酸盐、磷酸盐/二磷酸盐、苦味酸盐、聚半乳糖醛酸盐、丙酸盐、对甲苯磺酸盐、水杨酸盐、硬脂酸盐、亚乙酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、磺基水杨酸盐、琥珀酸盐、丹宁酸盐、酒石酸盐、茶氯酸盐(teoclate)、甲苯磺酸盐、三乙碘化物和戊酸盐。在一些实施方案中,药学上可接受的盐是钠盐、钾盐或钙盐。

[0147] 布林西多福韦

[0148] 布林西多福韦(CMX001,BCV)是西多福韦(CDV)的脂质缀合物,可用于预防和治疗由具有高度未满足的医学需求的双链DNA病毒引起的感染和疾病。本公开教导了布林西多福韦的IV制剂不仅作为向不能服用口服药物的患者递送BCV的方式,而且还作为潜在地减少或避免口服给药观察到的不良GI事件的方式。

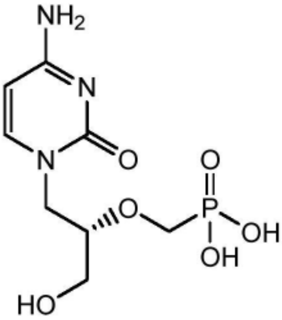
[0149] 如本文所用,术语"布林西多福韦"应理解为包含以下中性化合物:

[0150] 

[0151] 以及任何药学上可接受的盐。在下面的一些实例中,布林西多福韦被称为“测试项目”。

[0152] 西多福韦

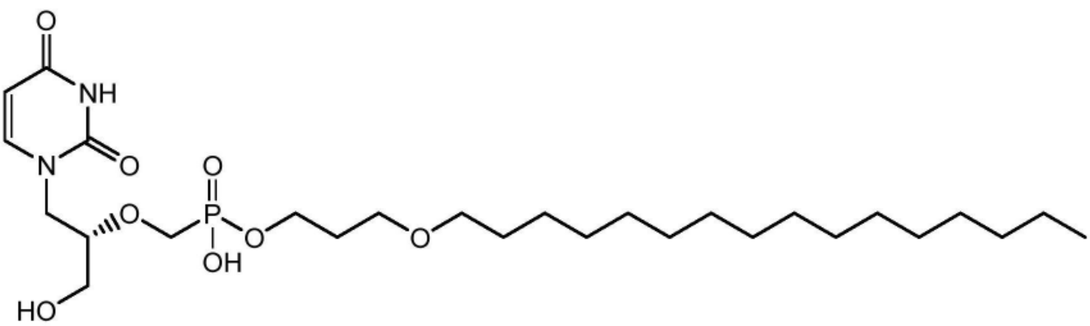
[0153] 西多福韦,也称为CDV,具有以下结构:

[0154] 

。

[0155] 布林西多福韦脱氨基产物

[0156] 在一些实施方案中,布林西多福韦可以在水性条件下(例如,在酸性pH下)脱氨基以产生相应的尿嘧啶衍生物。脱氨基产物如下所示:

[0157] 

。

[0158] 本发明涉及包含布林西多福韦的水性和冻干制剂及其使用方法。如本文所用,“冻干制剂”是指包含一定量的固体冻干的布林西多福韦的制剂,其溶解在溶剂(例如水或糖溶液)中。“冻干制剂”可以是本发明的药物组合物。

[0159] 预冻干制剂的特征

[0160] 如实施例4中所述,包含精氨酸作为缓冲剂和甘露醇作为填充剂的预冻干制剂产生白色均匀固体,冻干时仅有少量回熔。此外,与其他测试制剂相比,由包含精氨酸作为缓冲剂和甘露醇作为填充剂的预冻干制剂获得的冻干产品在重构时仅显示出轻微的起泡。例如,包含磷酸钠或经pH调节的水作为缓冲剂的制剂在重构时表现出起泡,并且通常在泡沫消散之前需要几分钟(例如,超过30分钟)。同样,发现包含蔗糖作为填充剂的制剂在重构时表现出起泡,并且通常在泡沫消散之前需要几分钟(例如,多于30分钟)。

[0161] 此外,如下文实施例4中所示,与其他制剂相比,还发现本发明的基于甘露醇的水性制剂在冻干后产生更紧凑、均匀的冻干饼。例如,基于蔗糖的制剂在冻干时表现出至少部

分的饼塌陷(并且在一些情况下显著的饼塌陷)以及增加的回熔(例如,大量回熔)。然而,发现基于甘露醇的水性制剂表现出较少的饼塌陷和较少的回熔。

[0162] 另外,在一些实施方案中,与使用精氨酸作为缓冲剂的制剂相比,基于磷酸盐的缓冲剂在冻干过程中表现出冷冻时的pH变化。因此,与其他测试制剂相比,本文所述的组合物发现具有所需的性质(例如,更高的稳定性和更好的易用性)。

[0163] 液体制剂的稳定性和材料相容性

[0164] 如实施例1中所述,当将含有20%甲醇的pH 6.0-8.0的50mM磷酸盐缓冲液中的布林西多福韦样品原液(50μg/mL)储存在2-8℃时,在pH7.0及以下观察到沉淀。然而,在较高pH(例如,pH=7.5和pH=8.0)下制备的样品显示在整个实验过程中没有可观察到的外观变化(例如,未观察到沉淀)。对于在40℃下储存的样品,在任何pH下样品都没有观察到外观的物理变化,并且在40℃所有研究的pH条件下观察到了最小的布林西多福韦浓度变化。

[0165] 在实施例1中呈现的研究中,使用5X磷酸钠缓冲剂原液(例如,在pH 6.0、6.5、7.0、7.5或8.0),各种张力调节剂(例如,66.5mM NaCl、68.8mM葡萄糖、49.8mM $MgCl_2$或35.7mM Ca D-葡萄糖酸盐)和各种赋形剂(例如,克列莫佛® 、乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、羟丙基β-环糊精(HPbCD)、聚乙二醇(PEG)300、乙醇、甘油、丙二醇(PG)、N,N-二甲基乙酰胺(DMA)/N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP)、聚山梨醇酯80、白蛋白或苄醇,或其混合物),制备布林西多福韦制剂的载体,其中布林西多福韦浓度为6.4mg/mL。不希望受理论束缚,包含葡萄糖或NaCl作为张力调节剂和克列莫佛®和DMA作为赋形剂的测试制剂在pH为6.5时,在12天的过程中不沉淀,包含葡萄糖但没有赋形剂的测试制剂,在pH为8.0时,在12天的过程中不沉淀,但在较低的pH值下沉淀。类似地,并且也不希望受理论束缚,包含NaCl、PEG300和聚山梨醇酯80的制剂,以及包含NaCl、克列莫佛®和乙醇的制剂,12天内在pH7下不沉淀,但在较低的pH值下沉淀。包含NaCl和克列莫佛® 的制剂在pH为7时不沉淀。不希望受理论束缚,实施例1中所述的HPLC回收率数据,表明在储存条件(2-8℃)和c(BCV)=6.4mg/mL下,一些制剂不适合以稳定的方式连续溶解布林西多福韦。

[0166] 如实施例2中所示,发现在包含100mM磷酸盐和69mM葡萄糖的水性输注载体中,布林西多福韦的平衡溶解度在较高pH下增加。例如,在含有100mM磷酸盐和69mM葡萄糖的水性输注载体中,布林西多福韦的平衡溶解度在pH=6.9时测定约为25mg/mL,在pH=8.0时测定为约>270mg/mL。

[0167] 如实施例5中所述,本发明的液体制剂在5%葡萄糖溶液中的溶解度,以产生包含10mg/mL布林西多福韦、100mM精氨酸和5%(w/v)甘露醇的液体制剂,在该液体制剂稀释后至少24小时为100%。此外,所得溶液保持清晰和无色,并且未观察到pH的显著变化。

[0168] 如实施例5和实施例3中所述,测试了布林西多福韦的液体制剂(例如,包含10mg/mL布林西多福韦、100mM精氨酸和5%(w/v)甘露醇的制剂;包含10mg/mL或15mg/mL布林西多福韦和200nM磷酸钠的制剂;或包含2mg/mL布林西多福韦和4mM磷酸钠的制剂)与输注载体以及来自制造和临床阶段的一系列材料(例如,灭菌过滤器、直立和倒立条件下的小瓶和塞子、输液袋和输注系统)的相容性。在某些情况下,制剂在测试之前用5%葡萄糖稀释。不希望受理论束缚,任何制剂在研究结束时没有观察到沉淀、pH变化或在布林西多福韦的恢复中的显著损失。

[0169] 布林西多福韦的溶血潜力

[0170] 在一些实施方案中,药物(例如,静脉药物)不引起溶血(即,不破坏红细胞)是有利的。

[0171] 实施例7描述了,布林西多福韦的溶血潜力,使用立即收集的(在4小时内)全人或全大鼠的血液,使用氰化高铁血红蛋白法以评估溶血。该研究测量了在布林西多福韦存在下从红细胞释放的血红蛋白,以确定布林西多福韦裂解红细胞的程度。

[0172] 不希望受理论束缚,红细胞的裂解可引起局部反应,例如蜂窝织炎、静脉炎并且可影响器官功能。本文提供的结果表明,当静脉给药时,布林西多福韦的IV制剂不引起溶血反应。

[0173] 从4只大鼠和1个人供体获得大鼠和人全血(用K_2EDTA稳定)。将用于大鼠的每种浓度(0.2、0.5和1.6mg/mL)的布林西多福韦与大鼠全血以1:4的比例分别混合,同时将用于人的每种浓度(0.2、0.5和1.6mg/mL)的布林西多福韦与人全血以1:4的比例分别混合。然后将所有样品在37±1℃温育20分钟。孵育后,含有BCV的血液样品,以及类似制备的等渗盐水(阴性对照),1%皂苷(阳性对照),5%葡萄糖(载体对照)和未处理的全血对照样品,被离心并使用氰化高铁血红蛋白法分析溶血(上清血红蛋白浓度)。分析等渗盐水中的代表性BCV样品以确保BCV不干扰上清液血红蛋白浓度的分析。

[0174] 不希望受理论束缚,布林西多福韦在大鼠全血中显示出溶血潜在影响,其似乎是浓度依赖性的,在1.6mg/mL处观察到溶血的迹象。然而,布林西多福韦在人全血中发现没有溶血潜能,直至测试的最高浓度,对应的最终浓度为0.2、0.5和1.6mg/mL。

[0175] 因此,在一些实施方案中,对于患者,包括患有血液疾病(例如贫血症)的患者,可以安全地施用布林西多福韦。

[0176] 大鼠的最大耐受剂量和7天剂量范围确定(DRF)研究

[0177] 实施例8给出了大鼠中BCV的最大耐受剂量和7天剂量范围确定(DRF)研究。结果详细描述了大鼠的急性范围确定。在一些实施方案中,该数据可用于产生信息以允许人们合理地设定在进一步的毒理学研究中施用的剂量。

[0178] <u>阶段1</u>

[0179] 设计阶段1以确定大鼠静脉输注(2小时)后的布林西多福韦的最大耐受剂量(MTD)。阶段1包含单个逐步递增的剂量臂以评估通常在暴露于BCV的48+/-小时期内可出现一般临床体征的任何急性毒性(例如,“毒性综合征”)。不希望受理论束缚,递增的剂量臂可以识别过量剂量的任何明显体征或症状。

[0180] 在研究的阶段1中,当通过单次2小时IV输注给药时,所有剂量都是良好耐受的。因此,布林西多福韦的最大耐受剂量未确定。然而,基于在0.75mg/mL以上的布林西多福韦浓度下溶血的体外证据,通过2小时IV输注0.75mg/mL布林西多福韦的溶液递送的15mg/kg代表最大可行剂量。换句话说,即使在测试的最大可行剂量下,在大鼠中也没有观察到相应的影响(例如,对平均体重或体重增加)。此外,在眼科学、血液学、临床化学或尿分析参数方面没有影响。即使在比口服给药更高的剂量水平下,大鼠也没有发现明显的毒性或死亡。

[0181] <u>阶段2</u>

[0182] 阶段2,重复剂量范围确定(DRF)阶段(阶段II),被设计用于评估布林西多福韦的毒性和布林西多福韦及其代谢物之一西多福韦的血浆毒代动力学特征。当静脉给药于动物

和人时,已知西多福韦会引起肾毒性。在第1、3和7天通过静脉(2小时)输注施用两剂量水平的布林西多福韦(1mg/kg和15mg/kg)的第一次和最后一次剂量给药后,评估毒代动力学参数。

[0183] 在本研究的阶段2中,动物接受高(15mg/kg)或低(1mg/kg)BCV IV输注剂量的短期治疗(在9天的过程中3个剂量)。不希望受理论束缚,该研究的第二阶段用于确定重复给药是否可能发生任何潜在的累积毒性。不希望受理论束缚,第二阶段还包括毒代动力学臂以确定在单次(第一剂量给药)和重复(最后一次剂量给药)BCV IV输注剂量后建立的IV毒代动力学。

[0184] 在研究的第2阶段,布林西多福韦的峰值浓度通常在2小时静脉输注结束时观察到,并且迅速下降。通常,平均布林西多福韦C_{max}和AUC的增加与剂量从1至15mg/kg的增加大致成比例,尽管AUC在1mg/kg剂量后的几个浓度值上被确定。第7天的布林西多福韦C_{max}和AUC_{last}值显示出第7天与第1天相比较低的趋势(第7天/第1天累积比(AR)为0.44至0.54)。此外,没有观察到布林西多福韦TK参数的性别差异。不希望受理论束缚,代谢物西多福韦的暴露增加小于布林西多福韦剂量增加的比例,TK参数中没有明显的性别差异,并且重复给药后TK参数没有变化。在该研究的条件下,在第1、4和7天通过2小时IV输注,单剂量施用1或15mg/kg的布林西多福韦是良好耐受的。

[0185] 布林西多福韦:对14天恢复期的大鼠进行28天静脉输注毒性研究

[0186] 实施例10详述了在大鼠中用IV BCV进行的重复剂量亚慢性研究。不希望受理论束缚,该研究探索了在一系列剂量下施用的布林西多福韦的累积生物效应(例如,临床、宏观和微观)。效果可以是定性的,例如靶器官,效果的性质或定量,例如观察到效果的血浆或组织水平。不希望受理论束缚,该研究可以确定毒性和恢复或进展的可能性。

[0187] 如实施例10中所述,并且不希望受理论束缚,本研究中动物没有经历腹泻。在研究期间,所有动物都获得了预期的体重。终末尸检时肠道无GI表现。最高给药剂量的IV布林西多福韦(15mg/kg)在生活中没有临床发现。没有观察到转氨酶升高。

[0188] 不希望受理论束缚,在口服给药布林西多福韦后观察到肠绒毛中上皮细胞显著减少。相比之下,在IV给药布林西多福韦后,注意到最小的单细胞效应。例如,图7A显示口服给药布林西多福韦后大鼠肠的直方图的直方图,图7B显示IV给药布林西多福韦后大鼠肠的直方图。如图所示,布林西多福韦的IV给药在肠中更耐受。

[0189] 如实施例10中所述,通过以0(2X磷酸钠缓冲剂溶液)、1、4或15mg/kg/剂量向斯泼累格·多雷(Sprague-Dawley)CD®大鼠(15/性别/组)静脉输注2小时,每周两次给药布林西多福韦,持续28天。多达5只动物/性别/组在给药后14天内恢复。

[0190] 布林西多福韦的给药导致两种性别中≥4mg/kg/剂量的一些动物的间歇性(通常在输注后)临床症状(主要是异常呼吸和驼背姿势),并且分别在≥1mg/kg/剂量和15mg/kg/剂量时,在雄性和雌性中最低限度地减少食物消耗。

[0191] 布林西多福韦相关的发现存在于,≥4mg/kg/剂量的雄性生殖道(睾丸生殖细胞损耗,附睾中的腔细胞碎片和精囊中上皮细胞凋亡增加)和肠道(单细胞坏死),和15mg/kg/剂量的皮脂腺(萎缩)。所有与布林西多福韦相关的发现完全恢复,除了≥4mg/kg/剂量的雄性睾丸变化,不希望受理论束缚,预计在2周内不会完全恢复。此外,给药15mg/kg/剂量的一些动物在恢复结束时具有降低的骨髓细胞性和单侧或双侧柔性和/或小睾丸和附睾。

[0192] 在该研究的条件下,基于≥4mg/kg/剂量的雄性睾丸生殖细胞损耗和15mg/kg/剂量的1只雌性中度肠单细胞坏死,未观察到不利的布林西多福韦的效果水平(NOAEL)在雄性中被认为是1mg/kg/剂量,在雌性中被认为是4mg/kg/剂量。

[0193] 因此,在一些实施方案中,该研究可以为人类临床研究的开始或继续进行提供支持。在一些实施方案中,该研究还可用于建立用于长期研究的剂量。不希望受理论束缚,本研究还可以指导参数,例如在进行长期研究时评估的动物数量。该研究还包含第一次和最后一次给药剂量后的毒代动力学臂。

[0194] 单次口服或静脉给药[^{14}C]布林西多福韦后大鼠定量全身放射自显影的质量平衡、药代动力学和组织分布

[0195] 进行研究以表征,[^{14}C]布林西多福韦的单次静脉(IV,2小时输注)或口服(PO,强饲法)剂量给药后,雄性斯泼累格·多雷(Sprague-Dawley)(SD)和Long-Evans(LE)大鼠的总放射性的组织分布。此外,检查了单次静脉(IV,2小时输注)给药[^{14}C]布林西多福韦后,雄性斯泼累格·多雷(Sprague-Dawley)大鼠的总放射性的排泄率(质量平衡)和药代动力学(PK)。

[0196] 通过2小时IV输注或通过口服强饲法,将15mg/kg剂量的[^{14}C]布林西多福韦给药色素和非色素大鼠。在给药后35天的时间点通过定量全身放射自显影确定组织分布。

[0197] IV或口服给药后放射性很好地分布,放射性的定性分布模式相似。定量地,IV给药后小肠组织中的组织放射性浓度约为口服给药后小肠组织中浓度的1/10。对于大多数其他组织,IV给药后的组织放射性暴露通常高于口服强饲法给药后。大多数组织中的放射性峰值浓度发生在口服给药后4至8小时,或在2小时静脉输注结束时。无论给药途径如何,具有最高放射性浓度的组织与清除或消除器官相关,例如肝、肾和小肠。这些器官中的组织与血浆比率(T/P)高(>30),并且对于IV和口服给药途径,肾皮质和肝脏相似。放射性浓度最低的组织是脑、脊髓、骨骼肌、白色脂肪组织和骨骼。IV给药后脑和脊髓中放射性的关联性较高(血浆浓度约为20%,口服给药后约为5%)。在给药后35天,放射性低于IV给药后除骨髓、淋巴结、脾和肾上腺外的所有组织中的定量限。这与口服给药后的残留浓度组织(肾皮质、肝脏和小肠)不同。没有检测到与含黑色素组织(眼睛、葡萄膜)特异性相关的证据。

[0198] 与口服途径相比,[^{14}C]布林西多福韦的IV给药导致较低的BCV相关放射性小肠浓度,这与重复IV BCV给药大鼠后毒理学研究中GI发现的较低发生率和严重性一致。

[0199] 在一些实施方案中,在IV BCV输注后偶尔会注意到小肠和大肠中的单细胞坏死。这些轻微和可逆的GI发现可通过静脉输注[^{14}C]布林西多福韦后肠组织中较低的放射性浓度来解释。此外,GI发现不会导致任何剂量限制的GI毒性(即胃病、肠病或肠炎)。因此,本发明内容提供了BCV的IV制剂和IV BCV给药方法,其可用于减轻与BCV相关的GI干扰。

[0200] 与口服BCV相比,IV[^{14}C]布林西多福韦输注后放射性的分布在所有组织中更高,除了小肠,其中浓度为口服给药的约1/10。

[0201] 排泄和分布概要

[0202] IV给药后排泄

[0203] 在雄性SD大鼠中以15mg/kg静脉输注[^{14}C]布林西多福韦2小时后,放射性消除的主要途径是尿液,在168小时收集期间,其占给药剂量平均值的51.2%。在粪便中回收给药剂量平均值的42.2%。在168小时收集期间,第1组雄性大鼠的尿液和粪便中放射性的总回收

率平均为剂量的93.5%。在给药后的最初24小时内,大多数(~86%)尿液和粪便的放射性排泄发生。

[0204] IV给药后的分布

[0205] 以15mg/kg(组2)IV输注给药雄性SD大鼠2小时后,血浆中[^{14}C]布林西多福韦总放射性的C_{max}为10.3μg当量/mL,其发生在T_{max}为2小时(即,输注结束),并且在给药后72小时浓度降低至0.045μg当量/mL。[^{14}C]布林西多福韦总放射性的AUC_{last}为64.4μg当量·h/mL,且$t_{1/2}$为13.0h。

[0206] [^{14}C]布林西多福韦衍生的放射性在以15mg/kg静脉输注2小时后很好地分布到白化病和有色素的雄性大鼠的大多数组织中,并且大多数组织的浓度略高于血浆,特别是排泄和消化道组织,远高于血浆(组织AUC_{all}:血浆比率>1.9)。当大多数组织的浓度在1.0和6.0μg当量/g之间时,在给药后2小时(即,输注结束)大多数组织中[^{14}C]布林西多福韦衍生的放射性的C_{max}被发现。

[0207] 血液与血浆的比率通常显示,在IV输注给大鼠后,[^{14}C]布林西多福韦衍生的放射性类似地分布,在输注开始后1至24小时期间,范围为0.89-1.46。在72小时时,分别在给药2mg/kg和15mg/kg后观察到血液与血浆的比率为1.42和3.06。

[0208] 以15mg/kg静脉输注2小时后,在相应T_{max}下具有最高浓度(>20.0μg当量/g)的白化病和色素雄性大鼠的组织,在肝脏、肾皮质、小肠、肾髓质和膀胱中被观察到。在相应T_{max}下具有最低浓度(<1.0μg当量/g)的组织是:脑、脊髓、白色脂肪、骨、骨骼肌和眼睛晶状体。

[0209] 以15mg/kg静脉输注2小时后,在膀胱内容物、胆汁和消化道内容物中观察到通过QWBA测定的最高总浓度(>400μg当量/g),这反映了IV给药后[^{14}C]布林西多福韦衍生的放射性的消除途径。

[0210] 大多数组织中的组织浓度稳定下降,但在给药后168小时,大多数组织中药物相关物质的消除不完全;然而,所有含有放射性的组织的浓度均<1.0μg当量/g。在给药后840小时(最后采样的时间点),放射性仍存在于骨髓、淋巴结、脾和肾上腺中,但它们接近这些组织中的LLOQ,除了脾。所有组织的$t_{1/2}$(具有足够的数据点和可接受的r^2)范围从血液(心脏)的14.2小时到脾脏的378小时。$t_{1/2}$时间最长的组织为脾脏(378h)、淋巴结(345h)、无色素皮肤(310h)和骨髓(276h)。在840小时具有可定量浓度的组织的$t_{1/2}$范围为254小时(肾上腺)至378小时(脾)。

[0211] 以2mg/kg的较低剂量给予2小时IV输注的大鼠中观察到类似的组织分布模式。与15mg/kg剂量相比,2mg/kg IV给药后的大多数组织浓度与剂量大致呈比例地增加(即,剂量增加7.5,浓度变化4至15倍)。然而,在小肠中,随着剂量从2mg/kg增加到15mg/kg,小肠浓度的增加大于比例。

[0212] 口服给药后的分布

[0213] 以15mg/kg PO给药雄性LE大鼠后,血浆中[^{14}C]布林西多福总放射性的C_{max}在T_{max}为8h时为1.5μg当量/mL,并且给药后24小时浓度降低至0.180μg当量/mL。[^{14}C]布林西多福总放射性的AUC_{last}为21.0μg当量·h/mL,由于数据点不足,无法确定$t_{1/2}$。

[0214] 血液与血浆的比率显示,给雄性LE大鼠施用PO剂量的[^{14}C]布林西多福韦后,[^{14}C]布林西多福韦衍生的放射性类似地从1小时到24小时(范围在0.76-1.13)之间分布。

[0215] 以15mg/kg PO给药后,[^{14}C]布林西多福韦衍生的放射性很好地分布到色素和无色

素雄性大鼠的大多数组织中,并且大多数组织具有稍高的血浆浓度,尤其对于排泄和消化道组织,它们的含量要高得多(组织AUC_{all}:血浆比>4.1)。当大多数组织的浓度在0.7和17.8μg当量/g之间时,在给药后8小时(38个组织中的22个)大多数组织中[^{14}C]布林西多福韦衍生的放射性的C_{max}被发现。

[0216] 以15mg/kg PO给药后,在相应T_{max}下具有最高浓度(>3.3μg当量/g)的有色素雄性大鼠的组织,在小肠、肝肾皮质、胃(胃粘膜)、肾髓质、盲肠、食道、大肠中被观察到。相应T_{max}下具有最低浓度(<1.0μg当量/g)的组织是:脊髓、脑、骨、白色脂肪和眼睛晶状体。

[0217] 以15mg/kg PO给药后,在膀胱内容物、胆汁和消化道内容物中观察到通过QWBA测定的最高总浓度(>36.0μg当量/g),这反映了PO给药后[^{14}C]布林西多福韦药物衍生的放射性的消除途径。

[0218] 有色素雄性大鼠的大多数组织中的组织浓度稳定下降,但在给药后168小时,在大多数组织中药物相关物质的消除不完全;然而,除小肠(5.9μg当量/g)外,所有组织的浓度均<0.4μg当量/g。在给药后840小时(最后采样的时间点),肾皮质、肝脏和小肠中仍存在放射性,但接近LLOQ。血浆的$t_{1/2}$约为5小时。所有组织的$t_{1/2}$(具有足够的数据点和可接受的r^2)范围从食道37.2小时到脂肪(棕色)234小时。具有最长$t_{1/2}$的组织是脂肪棕(234h)、脾(115h)、垂体(106h)和肺(93h)。唯一具有可靠$t_{1/2}$和840小时可定量浓度的组织是98.1小时的小肠。

[0219] PO给药和2小时IV输注后组织分布的比较

[0220] 对Long-Evans大鼠和斯泼累格·多雷(Sprague-Dawley)大鼠进行2小时静脉输注或口服强饲[^{14}C]布林西多福韦后,AUC_{all}血液与血浆的比率范围在1.1和1.4之间。对于个体点,血液与血浆的比率范围为0.64至1.5,中值为1.00。不希望受理论束缚,在两种给药途径后血液和血浆之间的放射性的类似分布表明[^{14}C]布林西多福韦从血浆到血细胞的分布的最小限制。

[0221] 给予15mg/kg单次口服剂量的[^{14}C]布林西多福韦的大鼠组织在4或8小时达到最大观察浓度,并且峰值浓度通常为给予2小时静脉输注的大鼠中观察到的峰值组织浓度的约10-25%。然而,在小肠中,与IV相比,口服给药后观察到高6倍的Cmax。放射性的口服生物利用度(AUC_{all} PO/AUC_{all} IV)为48%(血液)至61%(血浆)。与IV相比,在口服给药后约1/3的组织中观察到较低的组织AUC比率(AUC_{PO}/AUC_{IV}<25%),特别是在中枢神经系统、皮肤、骨骼肌和一些内分泌和生殖组织中。通过这两种途径,具有最高放射性浓度的组织与排泄器官(即肝、肾和肠)相关。对于这些组织中的每一个,组织与血浆的比率高(>30),并且在肾皮质和肝脏中,IV和口服给药途径之间的组织/血浆比率相似。口服给药后小肠组织与血浆的比例最高(T/P=428),基于给药途径预期,然而,在IV输注后,显著的放射性与小肠(组织与血浆比率32)相关。在口服给药后840小时,组织消除不完全,在PO给药后肾脏皮质、肝脏和小肠中存在放射性,这与在相同时间点IV输注2小时后观察到的不同。在小肠中,口服给药大鼠(5.9μg当量/g)的168小时残留浓度显著高于通过静脉输注(组织浓度BQL)给药[^{14}C]布林西多福韦的大鼠。在840小时,与PO给药后观察到的浓度(BQL)相比,在IV输注2小时后血管/淋巴组织系统中的残留浓度高得多。

[0222] 色素组织中的分布

[0223] 非色素组织和色素组织之间放射性的组织分布的比较显示色素组织(即,眼睛葡

萄膜和色素皮肤)中的浓度与在非色素组织中观察到的那些浓度相似,这表明[^{14}C]布林西多福韦药物衍生的放射性与黑色素没有特定的关联。

[0224] 不希望受理论束缚,在大多数组织中,在IV给药后观察到更高浓度的放射性,这可以反映更高的血液浓度。一个例外是胃肠组织。从最高到最低,浓度最高的组织为用于静脉给药的肝、肾皮质、小肠和肾髓质,以及用于口服给药的小肠、肝、肾皮质、肾髓质和盲肠。840小时后残留药物的组织是用于IV给药的肾上腺、脾、淋巴结和骨髓,以及用于口服给药的小肠、肝和肾皮质。

[0225] 因此,在一些实施方案中,静脉给药的较低剂量的BCV可提供与在较高剂量下口服给药所观察到的相似的血浆浓度。因此,本发明内容提供了使用比口服给药所需的更低剂量的BCV在有需要的受试者中治疗病毒感染。

[0226] 布林西多福韦IV给药的药代动力学

[0227] 如下文实施例11中所述,将布林西多福韦口服和静脉给药于健康受试者。发现以10mg布林西多福韦静脉给药提供了与100mg口服给药的布林西多福韦相似的暴露。因此,本发明内容教导了静脉给药布林西多福韦。在一些实施方案中,在静脉给药布林西多福韦时未观察到与药物相关的不良事件(例如,无胃肠道事件)。在一些实施方案中,未观察到分级实验室异常(例如,没有溶血毒性和无肾毒性)。

[0228] 实施例

[0229] 通过以下实施例进一步说明本发明,所述实施例不应解释为将本发明的范围或精神限制于本文所述的具体程序。应理解,提供实施例是为了说明某些实施方案,并且因此不旨在限制本发明的范围。应进一步理解,在不脱离本发明的精神和/或所附权利要求的范围的情况下,可以对本领域技术人员可以提出的各种其他实施例、修改和等同物进行求解。

[0230] 本节提供了可能在整个过程中常用的术语和概念的缩写和定义。

[0231] AUC 时间-浓度曲线下的面积

[0232] AUC_{all} 包含所有时间点的时间-浓度曲线下的面积

[0233] AUC_{inf_obs} 外推到无限观察的时间-浓度曲线下的面积

[0234] AUC_{last} 包含数据高于定量下限的最后一个时间点的时间-浓度曲线下的面积

[0235] BQL 低于检测限

[0236] ℃ 摄氏度

[0237] C(BCV) 液体或水性制剂中的布林西多福韦的浓度

[0238] C(填充剂) 液体或水性制剂中的填充剂的浓度

[0239] ca Circa(大约)

[0240] C_{max} 最大观察浓度

[0241] cpm 每分钟计数

[0242] %CV 变异系数的百分比

[0243] DMA N,N-二甲基乙酰胺

[0244] dpm 每分钟崩解

[0245] EDTA 乙二胺四乙酸二钠

[0246] FVC 股静脉空心管

[0247] g 克

[0248] h 小时

[0249] HPLC 高效液相色谱

[0250] HPbCD 羟丙基β-环糊精

[0251] IV 静脉

[0252] kg 千克

[0253] L 升

[0254] LE 长埃文斯(Long-Evans)

[0255] LLOQ 检测限下限

[0256] LSC 液体闪烁计数

[0257] MB 质量平衡

[0258] MBq 兆贝可

[0259] mCi/mmol 每豪摩尔豪居里

[0260] MCID 微型计算机图像设备

[0261] MDC 分子动力学计数

[0262] mg 毫克

[0263] mSv 毫希沃特

[0264] μg当量/g 每克组织微克当量

[0265] min 分钟

[0266] mL 毫升

[0267] mm 毫米

[0268] n 观察数量

[0269] NA 不适用

[0270] NI 未识别

[0271] NC 未计算

[0272] NS 未采样

[0273] NMP N-甲基-2-吡咯烷酮

[0274] PEG 聚乙二醇

[0275] PG 丙二醇

[0276] PK 药代动力学

[0277] PO 口服(口服剂量)

[0278] ROA 给药途径

[0279] SD 斯泼累格·多雷(Sprague Dawley)或标准偏差

[0280] $t_{1/2}$ 终端消除半衰期

[0281] T_{max} C_{max}的时间

[0282] ULOQ 检测限上限

[0283] QWBA 定量全身放射自显影

[0284] 实施例1-液体制剂研发

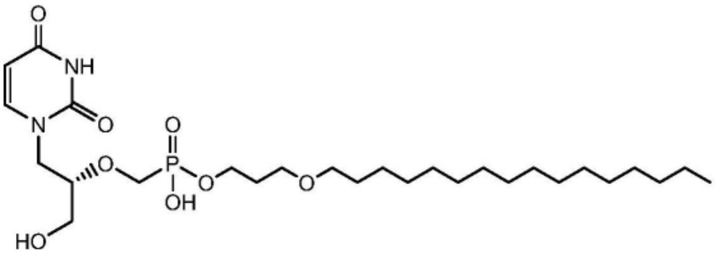
[0285] 制备各种普通液体制剂(即,预冻干制剂或散装制剂)并进行测试,以开发布林西多福韦的静脉制剂。

[0286] 布林西多福韦的pH稳定性:在含有20%甲醇的pH 6.0-8.0的50mM磷酸盐缓冲液中制备布林西多福韦样品原液(50μg/mL)。将样品等分并在两个温度(T=2-8℃和T=40℃)下储存,并在两周的时间内在多个时间点监测pH和布林西多福韦恢复。在两种条件下,样品在整个实验过程中保持pH水平。

[0287] 在2-8℃下储存:对于在2-8℃储存的样品,对于pH6.0和6.5,在t=2天观察到沉淀。对于pH 7.0,在t=4天观察到沉淀。在较高的目标pH(pH=7.5和pH=8.0)下制备的样品,显示在整个实验过程中没有可观察到的外观变化,而在pH6.0、6.5和7.0下制备的样品,相对初始时间点显示出明显降低的布林西多福韦浓度。该降低可能与观测到的沉淀有关。在t>8天时观察到pH 7.0的变化。检测到一种杂质(RT=4.7分钟)超过了用于峰积分的设定总峰面积阈值。对于pH6和6.5的样品,总峰面积的百分比低于0.4%,对于更高pH的样品,总峰面积的百分比低于0.1%。

[0288] 在40℃下储存:对于在40℃下储存的样品,样品在任何pH下都没有观察到外观的物理变化。对于所有研究的pH条件,在40℃下观察到了布林西多福韦浓度的最小变化。虽然布林西多福韦的浓度显示出一些波动,但是没有观察到显著的趋势。HPLC色谱图的概要显示揭示了在实验过程中在不同pH条件下杂质形成的差异。对于较低pH的样品,观察到与布林西多福韦的脱氨基产物相关的峰,包括pH6.0的1.91面积%,pH6.5的0.58面积%。

[0289] 在中性pH及以上未观察到降解物峰。

[0290] 

(脱氨基产物)

[0291] 布林西多福韦制剂的制备和表征

[0292] 载体和制剂的制备:布林西多福韦制剂的载体由有机赋形剂、5X磷酸钠缓冲液原液(pH6.0、6.5、7.0、7.5和8.0)以及张力调节剂和EDTA的原液制备。将固体布林西多福韦溶解于载体中,得到浓度c(BCV)=6.4mg/mL。评价外观(包括在2-8℃下储存时的沉淀),并测量pH。研究结果总结在表1中。

[0293] 表1:载体和制剂的沉淀状态和pH。除了制剂#30-32之外的所有制剂都用磷酸钠缓冲液(100nM)制备。

[0294]

#	制剂组成			目标 pH	载体 pH	制剂 pH	沉淀状态[1]				
	张力调节剂	赋形剂 #1	赋形剂 #2				初始	1 天	2 天	7 天	12 天
1	NaCl, 66.5 mM	克列莫佛®, 40%	DMA, 10%	6.00	6.05	6.03	N	N	N	N	Y
2	NaCl, 66.5 mM	克列莫佛®, 40%	DMA, 10%	6.50	6.18	6.68	N	N	N	N	N
3	NaCl, 66.5 mM	-	-	7.00	6.87	6.83	Y	Y	Y	Y	Y
4	NaCl, 66.5 mM	-	-	7.50	7.33	7.23	N	N	N	Y	Y
5	NaCl, 66.5 mM	-	-	8.00	7.80	7.39	N	N	N	Y	Y
6	葡萄糖, 68.8 nM	克列莫佛®, 40%	DMA, 10%	6.00	6.38	6.07	N	N	N	N	Y
7	葡萄糖, 68.8 mM	克列莫佛®, 40%	DMA, 10%	6.50	7.22	6.78	N	N	N	N	N
8	葡萄糖, 68.8 mM	-	-	7.00	6.88	6.83	N	N	N	Y	Y
9	葡萄糖, 68.8 mM	-	-	7.50	7.35	7.21	N	N	N	Y	Y
10	葡萄糖, 68.8 mM	-	-	8.00	7.89	7.45	N	N	N	N	N
11	MgCl2, 49.8 mM	-	-	7.00	6.22	6.42	Y	Y	Y	Y	Y

[0295]

12	Ca D-葡萄糖酸盐, 35.7 mM	-	-	7.00	6.49	6.63	Y	Y	Y	Y	Y
13	NaCl, 66.5 mM	EDTA, 50 μM	-	7.00	6.82	6.95	Y	Y	Y	Y	Y
14	NaCl, 66.5 mM	HPbCD, 1.8%	-	7.00	6.86	6.93	N	N	N	Y	Y
15	NaCl, 66.5 mM	HPbCD, 6.4%	-	7.00	6.92	6.85	N	N	N	Y	Y
16	NaCl, 66.5 mM	PEG 300, 10%	-	7.00	7.29	6.99	Y	Y	Y	Y	Y
17	NaCl, 66.5 mM	聚山梨醇酯80, 2%	-	7.00	6.82	6.87	N	N	N	N	Y
18	NaCl, 66.5 mM	PEG 300, 10%	聚山梨醇酯80, 2%	6.00	6.28	6.20	Y	Y	Y	Y	Y
19	NaCl, 66.5 mM	PEG 300, 10%	聚山梨醇酯80, 2%	7.00	7.31	6.98	N	N	N	N	N
20	NaCl, 66.5 mM	乙醇, 10%	-	7.00	7.35	7.02	N	N	N	Y	Y
21	NaCl, 66.5 mM	克列莫佛®, 10%	-	7.00	6.93	6.87	N	N	N	N	N
22	NaCl, 66.5 mM	克列莫佛®, 10%	乙醇, 10%	6.00	6.19	6.03	N	N	N	Y	Y
23	NaCl, 66.5 mM	克列莫佛®, 4%	乙醇, 10%	7.00	7.30	7.00	N	N	N	N	N
24	NaCl, 66.5 mM	克列莫佛®, 10%	乙醇, 10%	7.00	7.51	7.13	N	N	N	N	N
25	NaCl, 66.5 mM	甘油, 10%	-	7.00	7.02	7.06	N	N	N	Y	Y
26	NaCl, 66.5 mM	PG, 10%	-	7.00	7.36	7.08	Y	Y	Y	Y	Y
27	NaCl, 66.5 mM	DMA, 10%	-	7.00	7.63	7.20	Y	Y	Y	Y	Y
28	NaCl, 66.5 mM	NMP, 1%	-	7.00	7.13	7.07	N	N	N	Y	Y
29	NaCl, 66.5 mM	白蛋白, 5%	-	7.00	7.24	6.95	N	N	N	Y	Y
30	-	克列莫佛®, 50%	乙醇, 50%	N/A	N/A	N/A	Y	Y	Y	Y	Y
31	-	克列莫佛®, 50%	乙醇, 44%; DMA 6%	N/A	N/A	N/A	Y	Y	Y	Y	Y
32	-	克列莫佛®, 50%	乙醇, 30%; 聚山梨醇酯80, 8%; 苄醇, 2%	N/A	N/A	N/A	Y	Y	Y	Y	Y

[0296] [1]制剂在环境温度下制备并保持在环境条件下直至第1天的时间点。在第1天,进行溶血测定,之后将样品储存在2-8℃。[2]N:未观察到沉淀。[3]Y:观察到沉淀。[4]N/A:不适用或未测量。

[0297] 载体是清晰、无色溶液。对于载体#11和#12观察到沉淀,而载体#29是清晰的淡黄色溶液。制剂#11和#12继承了其载体的沉淀。在制备后第1天制剂#18、#30、#31和#32观察到沉淀。从第2天开始将制剂储存在2-8℃,并在12天内监测外观。

[0298] 布林西多福韦恢复:对表1的布林西多福韦制剂在制备后第2天和第7天对c(BCV)进行分析。在第2天未测试显示初始沉淀的制剂。直至第7天显示沉淀的制剂进行离心和HPLC恢复分析。结果总结在表2中。

[0299] 表2:布林西多福韦制剂的HPLC恢复

[0300]

制剂 #	目标 c(BCV) (mg/mL)	制剂分析（第2天）		上清液分析（第7天）	
		观察到的c（BCV）(mg/mL)	恢复（%）	观察到的c（BCV）(mg/mL)	恢复(%)
1	6.4	8.01	125	-	-
2	6.4	8.06	126	-	-
3	6.4	-	-	1.15	18
4	6.4	7.20	112.	1.17	18
5	6.4	7.41	116	7.18	112
6	6.4	11.25	176	-	-
7	6.4	8.70	136	-	-
8	6.4	8.15	127	0.94	15
9	6.4	8.43	132	6.89	108
10	6.4	7.96	124	-	-
11	6.4	-	-	0.52	8
12	6.4	-	-	8.30	130
13	6.4	-	-	0.88	14
14	6.4	9.78	153	1.41	22
15	6.4	10.12	158	4.58	72
16	6.4	-	-	0.52	8
17	6.4	8.53	133	-	-
18	6.4	-	-	2.22	35
19	6.4	9.11	142	-	-
20	6.4	7.66	120	1.85	29
21	6.4	7.79	122	-	-
22	6.4	8.11	127	3.74	58
23	6.4	8.33	130	-	-
24	6.4	8.15	127	-	-
25	6.4	8.67	136	0.57	9
26	6.4	-	-	1.14	18
27	6.4	-	-	0.60	9
28	6.4	7.93	124	0.73	11
29	6.4	9.56	149	3.44	54
30	6.4	-	-	0.70	11
31	6.4	-	-	0.72	11
32	6.4	-	-	1.12	18

[0301] 发现载体#11和#12在制剂制备时形成沉淀(即加入布林西多福韦)。具有低pH的制剂在增溶赋形剂如克列莫佛®、PEG 300、聚山梨醇酯80和乙醇(制剂#1、#6、#18和#22)存在下沉淀,而制剂具有相同的组成,但是较高的pH(制剂#2、#7、#19和#24)保持了溶解布林西多福韦的能力(表1)。纯有机制剂(制剂#30、#31和#32)对布林西多福韦显示出有限的增溶能力。

[0302] HPLC恢复数据表明,在储存条件(2-8℃)和c(BCV)＝6.4mg/mL下,一些制剂不适合连续溶解布林西多福韦。此外,数据表明pH大于或等于约8.0的制剂可溶解布林西多福韦。

[0303] 制备其他制剂(制剂#33-40和#49-56)并测试其中的布林西多福韦平衡溶解度和过滤性。

[0304] 制剂载体#33-40和#49-56用布林西多福韦饱和并在环境条件下旋转。在不同时间点测定样品上清液中布林西多福韦的恢复,以确定何时达到溶解度平衡。

[0305] 对平衡溶解度研究的饱和上清液进行过滤性评估。为此，通过注射器过滤器(25mm，0.2μmPES膜)过滤大约900μL的饱和溶液。记录过滤的容易程度，测量滤液中的pH，并通过HPLC分析测定布林西多福韦的恢复。为了评估无菌过滤是否引入杂质，在过滤前和过滤后阶段对饱和制剂载体的HPLC色谱图进行定性比较并显示。制剂#33-40和#49-56中每一种的组成，以及它们在溶解度平衡下的pH、c(BCV)和过滤的容易程度总结在表3中。

[0306] 表3：布林西多福韦溶解度和过滤性评估的总结。所有制剂中的缓冲液均为100mM磷酸钠。

[0307]

[0308]

制剂#	组成		目标pH	测量 pH		过滤体积(μL)	过滤的容易程度	观察到的 c（BCV）(mg/mL)	
	张力调节剂	赋形剂		载体	BCV 饱和滤液			在溶解平衡	过滤后
33	葡萄糖, 68.8 mM	-	8.0	8.1	6.9	900	容易	27	27
34	NaCl, 66.5 mM	克列莫佛®, 10%	7.5	7.6	6.5	900	容易	30	31
35	NaCl, 66.5 mM	克列莫佛®, 5%	7.5	7.6	6.6	900	容易	27	29
36	葡萄糖, 68.8 mM	克列莫佛®, 5%	7.5	7.6	6.7	900	容易	26	26
37	NaCl, 66.5 mM	克列莫佛®, 2%	7.5	7.6	6.7	900	容易	25	26
38	NaCl, 66.5 mM	HPbCD, 4%	7.5	7.6	6.8	600	容易	19	16
39	NaCl, 66.5 mM	SBEbCD, 7.5%	7.5	7.6	6.3	200	容易	4	4
40	NaCl, 66.5 mM	-	7.5	7.6	6.8	900	容易	22	22
49	葡萄糖, 68.8 mM	-	7.5	7.6	6.9	1000	容易	25	24
50	葡萄糖, 68.8 mM	-	7.5	7.6	6.9	1000	容易	24	25
51	葡萄糖, 68.8 mM	-	7.5	7.6	6.9	1000	容易	27	25
52	NaCl, 66.5 mM	-	7.5	7.6	6.8	1000	容易	29	27
53	NaCl, 66.5 mM	-	7.5	7.6	6.8	1000	容易	27	27
54	NaCl, 66.5 mM	-	7.5	7.6	6.8	1000	容易	24	29
55	葡萄糖, 68.8 mM	-	8.0	8.0	6.9	1000	容易	28	31
56	葡萄糖, 68.8 mM	-	8.0	8.0	6.9	1000	容易	29	30

[0309] 在测试制剂中布林西多福韦的平衡溶解度范围为4至30mg/mL，在表观pH＝6.3-6.9(环境温度)的范围内，平均溶解度c(BCV)＝25mg/mL。在一些实施方案中，在平衡溶解度测试中观察到的相对高的布林西多福韦浓度导致载体pH的显著变化。通过选择的注射器过

滤器对布林西多福韦饱和制剂的过滤,没有发现任何关于过滤容易程度、布林西多福韦损失或杂质引入的问题。

[0310] 实施例2-布林西多福韦制剂测试

[0311] 制备包含100mM磷酸盐和69mM葡萄糖(载体/制剂#57)的制剂载体,并进一步测试a)平衡溶解度和b)过滤性。

[0312] a)布林西多福韦溶解度评估

[0313] 载体#57的两个样品用布林西多福韦饱和。一个样品载体用布林西多福韦饱和,无需进一步调节pH(导致制剂pH为6.9),且将第二样品的pH使用氢氧化钠溶液(1N)重新调节至pH＝8.0。在布林西多福韦溶解后,pH向较低的pH值漂移,其反过来又改变了布林西多福韦的溶解度,直至达到平衡。因此,在加入更多的布林西多福韦之前,必须使pH接近目标pH。对于pH调节的样品,在平衡溶解度条件下,布林西多福韦浓度未达到。用大约300mg/mL额外的布林西多福韦固体补充样品后,停止加入固体布林西多福韦。

[0314] 在平衡时和24小时后测定两种样品溶液/上清液中的布林西多福韦的恢复(HPLC测定)。在环境温度下,在表观pH为pH＝6.9,制剂57的布林西多福韦平衡溶解度为c(BCV)＝25mg/mL,24小时后为26mg/mL。对于pH＝8的样品,24小时后观察到的布林西多福韦浓度为348mg/mL,并且在c(BCV)>270mg/mL时未达到平衡溶解度。

[0315] b)过滤性评估

[0316] 在c(BCV)＝20、10和0.5mg/mL下测试制剂#57的过滤性。使用NaOH溶液(1N)将c(BCV)＝20mg/mL的测试溶液调节至pH＝8.0,并且作为原液应用,以通过用D5W稀释来制备较低浓度的测试溶液。通过注射器过滤器(25mm,0.2μmPES膜)过滤测试溶液(5mL过滤器通过)。观察过滤的容易程度,并在过滤前和过滤后阶段记录pH以及布林西多福韦的恢复(HPLC测定)。没有观察到pH的显著变化、布林西多福韦的损失或杂质的引入(表4)。

[0317] 表4:制剂57载体中的布林西多福韦的过滤性评估

[0318]

制备的 c(BCV)	测量的 pH		观察到的 c(BCV) (mg/mL)	
	过滤前	过滤后	过滤前	过滤后
20 mg/mL	8.0	8.0	23	26
10 mg/mL	8.1	8.1	13	12
0.5 mg/mL	8.0	8.1	0.8	0.9

[0319] 实施例3-制剂研究和评估

[0320] 研发了用于制备布林西多福韦制剂的复合方法,并且对无张力调节剂(葡萄糖)的制剂进行了详细说明。对于稳定性研究和测试,以高达0.5L的规模制备以下布林西多福韦制剂:

[0321] 10mg/mL布林西多福韦,200mM磷酸钠,pH＝8.0、69mM葡萄糖

[0322] 15mg/mL布林西多福韦,200mM磷酸钠,pH＝8.0、69mM葡萄糖

[0323] 10mg/mL布林西多福韦,200mM磷酸钠,pH＝8.0(无张力调节剂)

[0324] 含有张力调节剂的制剂(含葡萄糖)

[0325] 含有葡萄糖作为张力调节剂的布林西多福韦制剂应用于稳定性研究I以及输注载体相容性评估中。相应制剂配方的概要如下:

[0326] 1.通过使用容量瓶将相应的磷酸钠物质溶解在去离子水中来制备500mM(2.5X)磷

酸二氢钠溶液和500mM(2.5X)磷酸氢二钠溶液。

[0327] 2.在pH下混合500mM(2.5X)磷酸二氢钠和磷酸氢二钠溶液以制备pH＝8.0的500mM(2.5X)磷酸钠缓冲溶液。

[0328] 3.通过将固体葡萄糖溶解在pH＝8.0的500mM(2.5X)磷酸钠溶液中,制备pH＝8.0的400mM(2X)磷酸钠,138mM(2X)葡萄糖的载体原液,并且用水进行定量分析(Q.S.)。

[0329] 4.使用容量瓶将布林西多福韦以2倍所需的最终浓度溶解在载体原液(400mM(2X)磷酸钠,138mM(2X)葡萄糖溶液,pH＝8.0)中。在pH控制下,加入氢氧化钠溶液以将溶液调节至pH＝8.0。用去离子水进行定量分析(Q.S.),得到含有200mM(1X)磷酸钠,69mM(1X)葡萄糖糖,pH＝8.0的所需布林西多福韦浓度的制剂。

[0330] 无张力调节剂的制剂(不含葡萄糖)

[0331] 缺少葡萄糖的布林西多福韦制剂应用在稳定性研究II中以及在吸附评估中,并且大多数实验与材料相容性评估相关。无张力调节剂的制剂按如下制备:

[0332] 1.通过将相应的磷酸钠物质溶解在水(容量瓶)中制备400mM(2X)磷酸二氢钠溶液和400mM(2X)磷酸氢二钠溶液。

[0333] 2.在pH控制下混合400mM(2X)磷酸二氢钠和磷酸氢二钠溶液以制备pH＝8.0的400mM(2X)磷酸钠缓冲溶液(载体溶液)。

[0334] 3.使用500mL容量瓶,将布林西多福韦以最终浓度的2倍溶解于载体溶液(pH 8.0的400mM(2X)磷酸钠溶液)中。以V_{NaOH}[mL]＝1.65×mBCV[g]的体积加入1N氢氧化钠溶液。用去离子水进行定量分析(Q.S.),在pH＝8.0的200mM磷酸钠缓冲液中得到所需布林西多福韦浓度的制剂。

[0335] 4.为了制备较低的布林西多福韦浓度,将制备的制剂用相应的载体稀释至所需的强度。稳定性研究I:含有张力调节剂(葡萄糖)的布林西多福韦制剂

[0336] 设计和设置:在该研究中,评估了制剂57的化学和物理稳定性。化学降解的测试在加速稳定性研究设置中进行,其应用热作为加速器/应激源。进行阿列纽斯分析(Arrhenius分析),以提供API半衰期和较低温度下的降解速率。在所需的储存温度(2-8℃)下评估物理稳定性;基准/参考条件同样包含在研究中。研究的设置如下:

[0337] 测试溶液:

[0338] 10mg/mL布林西多福韦,200mM磷酸钠,69mM葡萄糖,pH＝8.0,

[0339] 15mg/mL布林西多福韦,200mM磷酸钠,69mM葡萄糖,pH＝8.0,

[0340] 载体对照1:200mM磷酸钠,69mM葡萄糖,pH＝8.0(仅在75℃下),

[0341] 载体对照2:200mM磷酸钠,pH＝8.0(仅在75℃下)。

[0342] 稳定站温度:

[0343] 加速稳定性研究:50℃、60℃、65℃、70℃、75℃,

[0344] 物理降解和基准稳定性研究:2-8℃、25℃。

[0345] 时间点:

[0346] 加速稳定性研究:初始、2天、6天、9天、14天,

[0347] 物理降解和基准稳定性研究:初始、14天和28天,

[0348] 载体对照:初始、1、5、8和14天。

[0349] 测试:

[0350] 布林西多福韦制剂:外观、pH、c(BCV)恢复(HPLC)、纯度(HPLC)和液体颗粒计数(物理降解和基准稳定性研究),

[0351] 载体对照:外观和pH值。

[0352] 在表8和表9中分别总结了10mg/mL和15mg/mL的制剂在稳定性研究过程中稳定性测试结果(加速条件),即pH的变化和布林西多福韦恢复的趋势。具有强双相速率趋势的加速稳定性研究不允许在典型的储存条件下进行Arrhenius分析和计算布林西多福韦半衰期或外推至降解速率。加速稳定性研究中的载体对照试验结果(仅75℃站)总结在表5中。

[0353] 表5:10mg/mL布林西多福韦制剂的加速稳定性研究结果(研究I)

[0354]

样品条件 站温度(℃)	样品条件 时间点(天)	外观[1]	测量的 pH	观察到的 c(BCV)[2] (mg/mL)	BCV 恢复[2,3](%)	BCV 纯度(%)
50	0	清晰,黄色(0)	8.1	10.1	100	99
	2	清晰,黄色(0)	7.8	9.0	89	91
	6	清晰,黄色(0)	7.5	9.0	89	96
	9	清晰,黄色(1)	7.4	8.9	88	96
	14	清晰,黄色(1)	7.4	8.8	87	95
60	0	清晰,黄色(0)	8.1	10.1	100	99
	2	清晰,黄色(0)	7.5	9.0	89	98
	6	清晰,黄色(2)	7.3	9.2	91	96
	9	清晰,黄色(2)	7.4	9.2	91	96
	14	清晰,黄色(2)	7.3	9.1	90	96
65	0	清晰,黄色(0)	8.1	10.1	100	99
	2	清晰,黄色(1)	7.5	9.5	94	99
	6	清晰,黄色(3)	7.3	9.4	93	97

[0355]

	9	清晰，黄色(3)	7.3	9.3	92	96
	14	清晰，黄色(4)	7.2	9.0	89	95
70	0	清晰，黄色(0)	8.1	10.1	100	99
	2	清晰，黄色(4)	7.4	9.3	92	97
	6	清晰，黄色(5)	7.2	9.3	92	96
	9	清晰，黄色(6)	7.1	9.2	91	95
	14	清晰，黄色(7)	7.0	8.7	86	93
75	0	清晰，黄色(0)	8.1	10.1	100	99
	2	清晰，黄色(6)	7.3	9.4	93	98
	6	清晰，黄色(8)	6.9	9.1	90	93
	9	清晰，黄色(8)	6.9	8.7	86	90
	14	清晰，黄色(9)	6.8	7.9	78	84

[0356] [1]溶液的黄色以0至10的等级表示：0，无色；5，深黄色；10，琥珀色。[2]三(3)次重复的平均值。[3]BCV恢复＝c(BCV)$_{n天}$/c(BCV)$_{0天}$×100％。

[0357] 表6：15mg/mL布林西多福韦制剂的加速稳定性研究结果(研究I)

[0358]

样品条件		外观[1]	测量的pH	观察到的c(BCV)[2] (mg/mL)	BCV恢复[2,3] (%)	BCV纯度(%)
站温度(°C)	时间点(天)					
50	0	清晰，黄色(0)	8.1	15.0	100	99
	2	清晰，黄色(0)	7.8	13.6	90	98
	6	清晰，黄色(0)	7.5	13.6	90	97
	9	清晰，黄色(2)	7.5	13.3	88	98
	14	清晰，黄色(2)	7.4	13.7	91	97

[0359]

60	0	清晰，黄色(0)	8.1	15.0	100	99
	2	清晰，黄色(0)	7.6	13.8	92	98
	6	清晰，黄色(2)	7.3	13.8	92	97
	9	清晰，黄色(2)	7.4	13.7	91	97
	14	清晰，黄色(3)	7.3	13.8	92	96
65	0	清晰，黄色(0)	8.1	15.0	100	99
	2	清晰，黄色(1)	7.5	14.0	93	99
	6	清晰，黄色(3)	7.3	14.0	93	97
	9	清晰，黄色(4)	7.3	13.8	92	96
	14	清晰，黄色(5)	7.2	13.1	87	95
70	0	清晰，黄色(0)	8.1	15.0	100	99
	2	清晰，黄色(3)	7.4	13.9	93	98
	6	清晰，黄色(5)	7.2	13.9	92	96
	9	清晰，黄色(5)	7.2	13.8	91	95
	14	清晰，黄色(7)	7.1	13.1	87	93
75	0	清晰，黄色(0)	8.1	15.0	100	99
	2	清晰，黄色(5)	7.3	14.1	94	98
	6	清晰，黄色(8)	6.9	13.7	90	92
	9	清晰，黄色(9)	6.9	12.9	86	89
	14	清晰，黄色(10)	6.7	11.7	78	83

[0360] [1]溶液的黄色以0至10的等级表示：0，无色；5，深黄色；10，琥珀色。[2]三(3)次重复的平均值。[3]BCV恢复＝c(BCV)n天/c(BCV)0天×100％。它在初始时间点定义为100％。

[0361] 表7：加速稳定性研究：载体对照的结果(研究I)

[0362]

样品条件			外观[1]	测量的 pH
样品	站温度 (°C)	时间点(天)		
载体对照 1 (加葡萄糖)	75	0	清晰，黄色(0)	8.1
		1	清晰，黄色(5)	7.3
		5	清晰，黄色(6)	7.1
		8	清晰，黄色(7)	6.9
		14	清晰，黄色(9)	6.9
载体对照 2 (无葡萄糖)	75	0	清晰，黄色(0)	8.1
		1	清晰，黄色(0)	8.0
		5	清晰，黄色(0)	8.0
		8	清晰，黄色(0)	8.0
		14	清晰，黄色(0)	8.0

[0363] [1]溶液的黄色以0至10的等级表示:0,无色;5,深黄色;10,琥珀色。

[0364] 该研究显示,在两周的时间内,布林西多福韦降低16％(50℃)至22％(75℃)。虽然观察到一些布林西多福韦恢复的损失(测定损失),但对于高达70℃的温度,布林西多福韦的纯度分别保持在95％和93％。在75℃站,在两种起始浓度下均观察到高达16％的杂质。在较高温度下的降解伴随着向较低pH值的强pH漂移和溶液的染色。初始时间点的pH变化和降解速率较高,并且在2天后,降解和pH变化显著减慢(双相趋势不遵循一级分解)。

[0365] 物理降解和基准稳定性研究

[0366] 两种测试制剂的物理/基准稳定性的结果分别总结在表11和表12中。通过比较在研究期间在不同温度和时间点获得的色谱图来确定制剂在不同温度下的纯度。在一个月内观察到6％(2-8℃)和8％(25℃)之间的降解,而布林西多福韦的纯度停滞在99％,表明布林西多福韦质量不足。

[0367] 表8:10mg/mL布林西多福韦制剂的物理降解和基准稳定性研究结果(研究I)

[0368] [0369]

样品条件		外观	测量的 pH	观察到的 c(BCV)[1] (mg/mL)	BCV 恢复[1,3] (%)	BCV 纯度 (%)
站温度 (°C)	时间点 (天)					
2-8	0	清晰，无色	8.1	10.1	100	99
	14	清晰，无色	8.0	9.6	95	100
	28	清晰，无色	8.1	9.5	94	99
25	0	清晰，无色	8.1	10.1	100	99
	14	清晰，无色	7.9	9.3	92	99
	28	清晰，无色	8.0	9.3	92	99

[0370] [1]三(3)次重复的平均值。[2]综合区域:2.00-13.00分钟。[3]BCV恢复＝c(BCV)n天/c(BCV)0天×100％。它在初始时间点定义为100％。

[0371] 表9:15mg/mL布林西多福韦制剂的物理降解和基准稳定性研究结果(研究I)

[0372]

样品条件		外观	测量的 pH	观察到的 c(BCV)[1] (mg/mL)	BCV 恢复[1,3] (%)	BCV 纯度 (%)
站温度 (°C)	时间点 (天)					
2-8	0	清晰,无色	8.1	15.0	100	99
	14	清晰,无色	8.0	14.3	95	100
	28	清晰,无色	8.1	14.6	97	100
25	0	清晰,无色	8.1	15.0	100	99
	14	清晰,无色	7.9	13.8	92	99
	28	清晰,无色	8.0	13.9	93	99

[0373] [1]三次重复的平均值。[2]综合区域:2.00-13.00分钟。[3]BCV恢复＝c(BCV)$_{n天}$/c(BCV)$_{0天}$×100％。它在初始时间点定义为100％。

[0374] 光阻测量:为了制备用于液体颗粒计数的样品,在最佳清洁条件下,将来自六个血清小瓶(1.0mL填充物)的制剂样品小心地组合(避免起泡)到无颗粒的离心管中。然后给管子盖上盖子并超声处理1分钟,然后对样品进行液体颗粒计数。分析1mL的4个样品冲程。液体颗粒计数器的拉速为10mL/min。在研究过程中未观察到颗粒物质的显著增加。测试的测试结果总结在表10中。

[0375] 表10:10和15mg/mL布林西多福韦制剂的液体颗粒计数结果(研究I)

[0376]

[0377]

制剂	时间点 (天)	稳定站温度 (°C)			
		2-8		25	
		10 μm 颗粒数	25 μm 颗粒数	10 μm 颗粒数	25 μm 颗粒数
10 mg/mL 布林西多福韦制剂	0	1	0	1	0
	14	11	1	7	0
	28	4	0	5	0
15 mg/mL 布林西多福韦制剂	0	0	0	0	0
	14	7	1	4	0
	28	3	1	3	0

[0378] 稳定性研究II:不含张力调节剂(葡萄糖)的布林西多福韦制剂

[0379] 设计和设置:在没有葡萄糖存在的情况下重复设计用于评价液体布林西多福韦制剂的化学和物理降解性质的稳定性研究I。溶液的颜色变化(潜在的美拉德褐变)和pH变化可能与葡萄糖的存在相关,因此葡萄糖可能影响降解途径并损害观察到的布林西多福韦降

解速率。针对测试的试剂以及稳性站参数修改了该重复分析的研究设置。确切的参数如下：

[0380] 测试溶液：

[0381] 15mg/mL布林西多福韦,200mM磷酸钠,pH＝8.0,

[0382] 载体对照1:200mM磷酸钠,pH＝8.0。

[0383] 稳定站温度：

[0384] 加速稳定性研究:50℃、60℃、70℃和75℃

[0385] 物理降解和基准稳定性研究:2-8℃和25℃。

[0386] 时间点：

[0387] 加速稳定性研究:初始、3天、6天、10天、14天,

[0388] 物理降解和基准稳定性研究:初始、14天和28天。

[0389] 测试：

[0390] 布林西多福韦制剂:外观、pH、c(BCV)恢复(HPLC)、纯度(HPLC)和液体颗粒计数(仅物理降解和基准稳定性研究样品),

[0391] 载体对照:外观、pH和液体颗粒计数(仅物理降解和基准稳定性研究样品)。

[0392] 结果:测试制剂和载体对照的布林西多福韦恢复和纯度的稳定性测试结果分别总结在表11和表12中。

[0393] 表11:15mg/mL布林西多福韦制剂的加速稳定性研究结果(研究II)

[0394]

样品条件		外观	测量的pH	观察到的c(BCV)[a] (mg/mL)	BCV恢复[a,b] (%)	BCV纯度%)
站温度(°C)	时间点(天)					
50	0	清晰，无色	8.0	15.4	100	99
	3	清晰，无色	8.0	15.0	98	98
	6	清晰，无色	8.0	14.6	95	98
	10	清晰，无色	8.0	14.6	95	97
	14	清晰，无色	7.9	14.2	92	97
60	0	清晰，无色	8.0	15.4	100	99
	3	清晰，无色	7.9	14.8	96	98
	6	清晰，无色	8.0	14.2	92	96
	10	清晰，无色	8.0	14.3	93	95
	14[c]	-	-	-	-	-
70	0	清晰，无色	8.0	15.4	100	99
	3	清晰，无色	7.9	14.6	95	96

[0395]

	6	清晰，无色	7.9	13.8	90	94
	10	清晰，无色	7.9	14.0	91	92
	14	清晰，无色	7.9	13.2	86	90
75	0	清晰，无色	8.0	15.4	100	99
	3	清晰，无色	7.9	14.3	93	95
	6	清晰，无色	7.9	13.4	87	93
	10	清晰，无色	7.9	13.3	86	90
	14	清晰，无色	7.9	12.9	84	88

[0396]　[a]三(3)次重复的平均值。[b]综合区域:0.00-13.00分钟。[c]此时间点的数据由于烤箱故障受到损害,因此不包括在下面的图形表示或计算中

[0397]　表12:载体对照的加速稳定性研究结果(研究II)

[0398]

样品条件		外观	测量的 pH
站温度(°C)	时间点 (天)		
n.a.[a]	0	清晰，无色	8.0
50	3	清晰，无色	8.0
	6	清晰，无色	8.1
	10	清晰，无色	8.0
	14	清晰，无色	8.0
60	3	清晰，无色	8.0
	6	清晰，无色	8.0
	10	清晰，无色	8.0
	14[b]	-	-
70	3	清晰，无色	8.0
	6	清晰，无色	8.1

[0399]

	10	清晰，无色	8.0
	14	清晰，无色	8.1
75	3	清晰，无色	8.0
	6	清晰，无色	8.0
	10	清晰，无色	8.0
	14	清晰，无色	8.0

[0400] [a]不适用。[b]此时间点的数据由于烤箱故障受到损害，因此不包括在下面的图形表示中。

[0401] 应注意，布林西多福韦恢复和纯度的值不一致。这至少部分归因于以下事实：色谱迹线的注入峰面积(0.00-2.1分钟)未被整合，这可能会高估纯度值，因为非整合的保留时间面积可能容纳已知的降解物。此外，使用现有方法无法实现布林西多福韦与其脱氨基产物之间的基线分离，这可能会影响恢复值(降解)和纯度值。

[0402] 应用所获得的恢复数据以通过Arrhenius分析确定不同温度下的降解速率，即通过对数绘制作为时间函数的布林西多福韦恢复，并通过线性拟合确定速率常数。无葡萄糖的15mg/mL布林西多福韦制剂的半衰期分别在5℃和25℃的稳定站温度下测定为729天和295天。Arrhenius分析如图2所示。

[0403] 物理降解和基准稳定性研究

[0404] 所研究的制剂和载体对照的物理/基准稳定性的结果分别总结在表13和表14中。

[0405] 表13：15mg/mL布林西多福韦制剂的物理降解和基准稳定性研究结果(研究II)

[0406]

样品条件		外观	测量的 pH	观察到的 c(BCV)[1] (mg/mL)	BCV 恢复[1,3] (%)	BCV 纯度 (%)
站温度 (°C)	时间点 (天)					
2-8	0	清晰，无色	8.0	15.4	100	99
	14	清晰，无色	8.0	14.9	97	100
	28	清晰，无色	8.1	15.2	99	99
25	0	清晰，无色	8.0	15.4	100	99
	14	清晰，无色	8.0	14.9	97	99
	28	清晰，无色	8.0	15.2	99	99

[0407] [1]三次重复的平均值。[3]BCV恢复＝$c(BCV)_{n天}/c(BCV)_{0天}$×100％。它在初始时间点定义为100％。

[0408] 表14：载体对照的物理降解和基准稳定性研究结果(研究II)

[0409]

样品条件	外观	测量的 pH

[0410]

站温度 (°C)	时间点(天)		
n.a.[1]	0	清晰，无色	8.0
2-8	14	清晰，无色	8.1
	28	清晰，无色	8.1
25	14	清晰，无色	8.1
	28	清晰，无色	8.0

[0411]　[1]不适用。

[0412]　对于颗粒物质的分析,将来自一个血清小瓶(5.0mL填充物)的制剂样品超声处理1分钟,然后对小瓶进行去卷。如上所述的用于含有张力调节剂的制剂,对无张力剂的样品进行液体颗粒计数。分析结果总结在表15中。

[0413]　表15:无张力剂的15mg/mL布林西多福韦制剂和载体对照的液体颗粒计数结果(研究II)

[0414]

溶液	时间点(天)	稳定站温度 (°C)			
		2-8		25	
		10 μm 颗粒数	25 μm 颗粒数	10 μm 颗粒数	25 μm 颗粒数
15 mg/mL 布林西多福韦制剂	0	0	0	0	0
	14	80	2	45	0
	28	87	0	4	0
载体对照	0	0	0	0	0
	14	0	0	0	0
	28	0	0	0	0

[0415]　在储存条件(2-8℃和25℃)下,无张力调节剂的制剂中的布林西多福韦的降解在一个月的过程中可忽略不计。1%的名义降解在布林西多福韦量化的误差范围内;没有观察到质量不足或颗粒物质。

[0416]　布林西多福韦对小瓶和塞子吸附的评估

[0417]　设计和设置:测试布林西多福韦对小瓶和/或塞子的吸附以对布林西多福韦进行吸附评估。为此,评估了可能具有影响(例如小瓶取向)的不同储存条件。在制剂强度(10mg/mL)和低浓度(0.2mg/mL)下研究了布林西多福韦的溶液。

[0418]　为了测试吸附,在不同时间点用适于再溶解吸附材料的有机溶剂(甲醇)处理,并与用水处理或未处理的样品进行比较。在含有甲醇的样品中观察到较高的布林西多福韦浓度(在稀释标准化后),表明存在吸附效应。不考虑应用的溶剂之间施加的体积收缩的差异。该研究使用10mg/mL和0.2mg/mL的布林西多福韦在200mM磷酸钠(pH=8.0)中的溶液,在2-8℃和25℃的温度下进行。首先测试溶液的外观、pH、布林西多福韦恢复(HPLC)和纯度(HPLC),并在1、2和7天后测试。通过添加甲醇(1.0mL)或水(1.0mL)进一步处理一些样品。研究结果总结在表16和表17中。

[0419]　表16:10mg/mL布林西多福韦制剂在吸附评估中的测试结果

[0420]

样品条件				外观	测量的pH	观察到的c(BCV)[a] (mg/mL)	BCV恢复[a,b] (%)	BCV纯度(%)
站温度(°C)	小瓶方向	处理	时间点(天)					
2-8	直立	未处理	0	清晰，无色	8.0	10.5	100.00	99.80
			1	清晰，无色	8.0	10.5	100.36	99.55
			2	清晰，无色	8.0	10.5	99.57	99.67
			7	清晰，无色	8.0	10.6	99.93	99.61
		添加甲醇	0	清晰，无色	8.3	10.4	100.00	99.90
			1	清晰，无色	8.4	10.2	98.10	99.52
			2	清晰，无色	8.4	10.3	98.90	99.73
			7	清晰，无色	8.4	10.5	100.41	99.43
		添加水	0	清晰，无色	8.1	10.5	100.00	99.32
			1	清晰，无色	8.1	10.3	98.56	99.72
			2	清晰，无色	8.0	10.6	101.14	99.47
			7	清晰，无色	8.1	10.6	100.68	99.61
	倒立	未处理	0[c]	清晰，无色	8.0	10.5	100.00	99.80
			1	清晰，无色	8.1	10.5	100.11	99.74
			2	清晰，无色	8.0	10.4	99.18	99.78
			7	清晰，无色	8.0	10.5	99.41	99.77
		添加甲醇	0[c]	清晰，无色	8.3	10.4	100.00	99.90
			1	清晰，无色	8.4	10.6	102.34	99.46
			2	清晰，无色	8.4	10.7	103.30	99.64
			7	清晰，无色	8.4	10.7	102.56	99.44
			0[c]	清晰，	8.1	10.5	100.00	99.32

[0421]

		添加水		无色				
			1	清晰，无色	8.1	10.4	99.50	99.46
			2	清晰，无色	8.0	10.4	99.53	99.47
			7	清晰，无色	8.0	10.6	100.21	99.54
25	直立	未处理	0	清晰，无色	8.0	10.5	100.00	99.80
			1	清晰，无色	8.1	10.5	99.78	99.47
			2	清晰，无色	8.0	10.4	99.02	99.66
			7	清晰，无色	8.0	10.4	98.72	99.73
		添加甲醇	0	清晰，无色	8.3	10.4	100.00	99.90
			1	清晰，无色	8.4	10.6	101.66	99.57
			2	清晰，无色	8.3	10.3	98.83	99.61
			7	清晰，无色	8.4	10.5	100.52	99.74
		添加水	0	清晰，无色	8.1	10.5	100.00	99.32
			1	清晰，无色	8.1	10.6	101.21	99.61
			2	清晰，无色	8.1	10.6	101.00	99.76
			7	清晰，无色	8.1	10.6	100.13	99.70
	倒立	未处理	0^c	清晰，无色	8.0	10.5	100.00	99.80
			1	清晰，无色	8.1	10.6	101.40	99.57
			2	清晰，无色	8.0	10.6	101.08	99.82
			7	清晰，无色	8.0	10.5	99.22	99.60
		添加甲醇	0^c	清晰，无色	8.3	10.4	100.00	99.90
			1	清晰，无色	8.4	10.7	102.92	99.60
			2	清晰，无色	8.4	10.6	101.97	99.61
			7	清晰，无色	8.4	10.5	100.47	99.81
		添加水	0^c	清晰，	8.1	10.5	100.00	99.32

[0422]

				无色				
			1	清晰,无色	8.0	10.5	100.55	99.47
			2	清晰,无色	8.0	10.5	100.56	99.63
			7	清晰,无色	8.0	10.5	99.92	99.68

[0423] [1]接受处理的样本的三(3)次重复的平均值。[2]BCV恢复=c(BCV)$_{n天}$/c(BCV)$_{0天}$×100%。它在初始时间点定义为100%。对于处理和未处理的样品,在初始时间点BCV恢复定义为100.00%。[3]不适用于未处理的样品。[4]初始时间点的样品没有受到任何条件。

[0424] 表17:0.2mg/mL布林西多福韦制剂在吸附评估中的测试结果

[0425]

样品条件				外观	测量的pH	观察到的c(BCV)[a] (mg/mL)	BCV恢复[a,b] (%)	BCV纯度(%)
站温度(°C)	小瓶方向	处理	时间点(天)					
2-8	直立	未处理	0	清晰,无色	8.0	0.19	100.00	99.37
			1	清晰,无色	8.1	0.19	100.23	99.37
			2	清晰,无色	8.1	0.19	100.01	99.45
			7	清晰,无色	8.1	0.20	100.26	99.52
		添加甲醇	0	清晰,无色	8.3	0.20	100.00	99.28
			1	清晰,无色	8.4	0.20	100.91	99.45
			2	清晰,无色	8.4	0.20	100.79	99.55
			7	清晰,无色	8.4	0.20	101.74	99.57
		添加水	0	清晰,无色	8.0	0.19	100.00	99.48
			1	清晰,无色	8.1	0.20	100.38	99.27
			2	清晰,无色	8.1	0.20	100.78	99.35
			7	清晰,无色	8.1	0.20	100.30	99.37
	倒立	未处理	0[c]	清晰,无色	8.0	0.19	100.00	99.37
			1	清晰,无色	8.1	0.19	99.21	99.38
			2	清晰,无色	8.1	0.19	99.68	99.50
			7	清晰,无色	8.0	0.19	99.61	99.66
		添加甲醇	0[c]	清晰,无色	8.3	0.20	100.00	99.28
			1	清晰,无色	8.5	0.20	100.09	99.51
			2	清晰,无色	8.4	0.20	100.17	99.54
			7	清晰,无色	8.4	0.20	100.04	99.66
		添加水	0[c]	清晰,无色	8.0	0.19	100.00	99.48
			1	清晰,无色	8.1	0.19	99.81	99.30
			2	清晰,无色	8.0	0.19	99.67	99.42
			7	清晰,无色	8.1	0.19	99.27	99.62
25	直立	未处理	0	清晰,无色	8.0	0.19	100.00	99.37
			1	清晰,无色	8.1	0.19	100.18	99.46
			2	清晰,无色	8.0	0.19	100.12	99.27
			7	清晰,无色	8.1	0.19	99.92	99.42
		添加甲醇	0	清晰,无色	8.3	0.20	100.00	99.28
			1	清晰,无色	8.4	0.20	101.00	99.54
			2	清晰,无色	8.4	0.20	101.25	99.45

[0426]

			7	清晰，无色	8.4	0.20	101.87	99.53
		添加水	0	清晰，无色	8.0	0.19	100.00	99.48
			1	清晰，无色	8.1	0.20	100.60	99.54
			2	清晰，无色	8.1	0.20	100.22	99.31
			7	清晰，无色	8.1	0.20	100.45	99.44
	倒立	未处理	0[c]	清晰，无色	8.0	0.19	100.00	99.37
			1	清晰，无色	8.1	0.19	99.38	99.45
			2	清晰，无色	8.1	0.19	98.91	99.55
			7	清晰，无色	8.1	0.19	98.96	99.62
		添加甲醇	0[c]	清晰，无色	8.3	0.20	100.00	99.28
			1	清晰，无色	8.5	0.20	100.25	99.62
			2	清晰，无色	8.4	0.20	99.70	99.39
			7	清晰，无色	8.4	0.20	99.76	99.52
		添加水	0[c]	清晰，无色	8.0	0.19	100.00	99.48
			1	清晰，无色	8.1	0.19	99.28	99.37
			2	清晰，无色	8.1	0.19	99.31	99.43
			7	清晰，无色	8.1	0.19	98.99	99.53

[0427] [a]接受处理的样本的三(3)次重复的平均值。[b]BCV恢复＝$c(BCV)_{n天}/c(BCV)_{0天}\times$100％。它在初始时间点定义为100％。对于处理和未处理的样品，在初始时间点BCV恢复定义为100.00％。[c]初始时间点的样品没有受到任何条件。

[0428] 不同处理的样品的比较未显示任何吸附现象的证据；没有观察到研究参数的显著差异，即外观或纯度没有显著变化，并且没有明显的布林西多福韦损失。观察到的质量不足在样品制备误差的范围内，如重复制剂的标准偏差所表示的。

[0429] 制剂相容性评估

[0430] 测试一系列材料与制剂的相容性。这包括来自制造阶段、临床前毒理学以及临床测试的测试材料。应用的相容性测试评估1)通过吸附或沉淀(外观、通过HPLC检测的布林西多福韦恢复)可能损失的布林西多福韦和2)可能损害稳定性的pH的变化。测试的材料包括输注载体、灭菌过滤器、产品小瓶和塞子，用于测试动物(大鼠)输注系统和输液袋以及用于临床应用的IV系统。

[0431] 用测试输注载体(5％葡萄糖溶液)稀释包含10mg/mL布林西多福韦、200mM磷酸钠和69mM葡萄糖(pH＝8.0)的布林西多福韦制剂，得到c(BCV)＝0.5和1.0mg/mL溶液。将稀释的溶液在环境条件下储存，并且在实验开始时以及在2小时、8小时和24小时后收集样品并评估外观、pH和c(BCV)的恢复(通过HPLC)。在环境条件下，在24小时内观察到测试溶液的外观、pH或c(BCV)没有显著变化。该研究的详细结果总结如下(表18)。

[0432] 表18：输注载体相容性评估的结果

[0433]

输注载体中c(BCV)(mg/mL)	时间点 (h)	外观	测量的pH	观察到的c(BCV)[a] (mg/mL)	BCV恢复[a,b] (%)
0.5	0	清晰，无色	8.2	0.51	100
	2	清晰，无色	8.3	0.51	100
	8	清晰，无色	8.2	0.51	100
	24	清晰，无色	8.2	0.49	99
1.0	0	清晰，无色	8.2	1.0	100
	2	清晰，无色	8.2	1.0	99
	8	清晰，无色	8.2	1.0	99
	24	清晰，无色	8.2	1.0	100

[0434] [a]三(3)次重复的平均值。[b]BCV恢复＝c(BCV)$_{n小时}$/c(BCV)$_{0小时}$×100％。样品在初始时间点定义为100％。

[0435] 灭菌过滤器相容性

[0436] 评估本发明制剂的灭菌过滤器相容性。如下所述，通过相应的注射器过滤器过滤测试的布林西多福韦制剂的等分试样：

[0437] A：过滤器：0.2μm，25mm，注射器过滤器，Supor®膜(PES)，无菌；测试溶液：10mg/mL布林西多福韦、200mM磷酸钠，pH＝8.0；测试体积：10mL。

[0438] B：过滤器：0.2μm，25mm，注射器过滤器，Posidyne®膜，无菌；测试溶液：10mg/mL布林西多福韦、200mM磷酸钠，pH＝8.0；测试体积：10mL。

[0439] C：过滤器：0.22μm，33mm，注射器过滤器，Durapore® PVDF膜，γ-辐射；测试溶液：2mg/mL布林西多福韦、4mM磷酸钠，pH～8，约5％葡萄糖(50X稀释10mg/mL布林西多福韦、200mM磷酸钠，pH＝8.0，含5％葡萄糖溶液)；测试体积：50mL。

[0440] 收集第一个和最后一个10％的滤液。评估所收集的滤液的样品以及过滤前制剂的样品的外观、pH和c(BCV)。

[0441] 表19：灭菌过滤器相容性评估的结果

[0442]

过滤膜	条件	外观	测量的pH	观察到的c(BCV)[a] (mg/mL)	BCV恢复[a,b] (%)
PES	过滤前	清晰，无色	8.1	9.9	100
	第一个 10%过滤体积	清晰，无色	8.0	9.8	99
	最后一个 10% 过滤体积	清晰，无色	8.0	9.8	99
Posidyne	过滤前	清晰，无色	8.1	9.9	100
	第一个 10%过滤体	清晰，	8.0	9.7	98

[0443]

	积	无色			
	最后一个 10% 过滤体积	清晰,无色	8.0	9.8	99
PVDF	过滤前	清晰,无色	8.0	0.20	100
	第一个 10%过滤体积	清晰,无色	8.1	0.20	99
	最后一个 10% 过滤体积	清晰,无色	8.1	0.20	100

[0444]　[a]三(3)次重复的平均值。[b]BCV恢复＝$c(BCV)_{\text{过滤后}}/c(BCV)_{\text{预过滤}}\times 100\%$;预过滤样品定义为100％。

[0445]　当将滤液溶液与相应的过滤前样品进行比较并且在过滤期间没有引入杂质时,未观察到外观、pH或c(BCV)的显著变化。

[0446]　药品小瓶和塞子相容性

[0447]　评估本发明的制剂的灭菌过滤器相容性。将测试制剂(5mL,10mg/mL布林西多福韦,200mM磷酸钠,pH＝8.0)分配到一组Afton灭菌的Ready-To-Fill®小瓶中。用WestNovaPure®塞子塞住小瓶,用AftonReady-To-Fill®灭菌密封圈卷曲,并在环境条件下以直立和倒立方向储存6小时。在填充之前和在相应条件下储存6小时之后收集填充溶液的样品。评估收集的样品的外观、pH和c(BCV)。在与测试的小瓶和塞子接触6小时后,观察到测试制剂的外观、pH或c(BCV)没有显著变化。接触后没有引入额外的杂质。

[0448]　表20:药品小瓶和塞子相容性评估的结果

[0449]

储存条件	外观	测量的 pH	观察到的 c(BCV)[a] (mg/mL)	BCV 恢复[a,b] (%)
填充前	清晰, 无色	8.0	9.5	100
直立, 6 h	清晰, 无色	8.0	9.5	100
倒立, 6 h	清晰, 无色	8.0	9.4	99

[0450]　[a]三(3)次重复的平均值。[b]BCV恢复＝$c(BCV)_{n\text{小时}}/c(BCV)_{\text{预填充}}\times 100\%$。预填充样品定义为100％。

[0451]　临床前材料相容性评估(大鼠)

[0452]　输注系统组件(大鼠)

[0453]　测试以下布林西多福韦制剂与用于给药大鼠(由注射器、系绳、导管和注射泵组成)的输注系统组件的相容性:

[0454]　a.)0.2mg/mL的布林西多福韦,4mM磷酸钠,pH～8.0,约4.90％葡萄糖;

[0455]　b.)1.5mg/mL的布林西多福韦,30mM磷酸钠,pH～8.0,约4.25％葡萄糖。

[0456]　通过用5％葡萄糖溶液稀释研制的布林西多福韦制剂(10mg/mL布林西多福韦,200mM磷酸钠,pH＝8.0)来制备两种溶液。测试程序可归纳如下:

[0457]　1.在接触前评估批量测试溶液的外观、pH和c(BCV)(0.2mg/mL BCV,4mM磷酸钠,pH～8.0,约4.90％葡萄糖和1.5mg/mL BCV,30mM磷酸钠,pH 8.0,约4.25％葡萄糖)。

[0458]　2.将约5mL的测试溶液吸入注射器中,然后将注射器连接到组装的输注系统(血管通路线束(VAH)系绳套件,用于大鼠夹套的VAH端口,和导管)。

[0459] 3.用测试溶液手动填充输注系统。将大约200μL的测试溶液推出输注系统并收集作为线末样品(t_0)用于评估外观和c(BCV)。

[0460] 4.将测试输注系统的注射器安装到注射泵上,并将流速设定为1.2mL/h(20μL/min)的流量,总分配体积为2.4mL(120min)。

[0461] 5.在实验过程中收集了整个流通液。在各自时间点(t_{10min},t_{105min}),收集线末样品(约200μL)用于分析。

[0462] 6.在实验结束时(t_{120min})测量整体流通液的pH,因为从先前时间点(200μL)获得的样品体积对于标准pH测量而言太小。

[0463] 研究结果总结在表21中。

[0464] 表21:临床前输注系统相容性评估的结果

[0465]

测试溶液 c(BCV) (mg/mL)	条件	外观	测量的 pH	观察到的 c(BCV)[a] (mg/mL)	BCV 恢复 [a,b] (%)
0.2 (测试#1)	接触前(批量溶液)	清晰,无色	8.0	0.21	100
	t_0	清晰,无色	n.a.	0.19	90
	$t_{10\ min}$	清晰,无色	n.a.	0.16	93
	$t_{105\ min}$	清晰,无色	n.a.	0.20	94
	$t_{120\ min}$(批量溶液)	清晰,无色	8.0	n.a.	n.a.
1.5 (测试#2)	接触前(批量溶液)	清晰,无色	8.2	1.5	100
	t_0	清晰,无色	n.a.	1.5	100
	$t_{10\ min}$	清晰,无色	n.a.	1.5	100
	$t_{105\ min}$	清晰,无色	n.a.	1.5	100
	$t_{120\ min}$ (批量溶液)	清晰,无色	8.2	n.a.	n.a.

[0466] [a]三(3)次重复的平均值。[b]BCV恢复=$c(BCV)_{n分钟}/c(BCV)_{接触前}\times100\%$,接触前样品定义为100%。n.a.:不适用或不可用。

[0467] 对于测试#1(0.2mg/mL布林西多福韦),观察到c(BCV)的初始10%损失,其可归因于测试输注系统的吸收。在低浓度下,经常观察到初始吸附效应(表面饱和),在目前的情况下,在测试时未观察到观察到的损失的完全恢复;在t=105min时,观察到6%的布林西多福韦损失。没有观察到外观或pH的显著变化。对于测试#2,在实验过程中未观察到c(BCV)的显著损失或外观或pH的变化。

[0468] 临床材料评估

[0469] 输液袋相容性

[0470] 使用以下制剂对标准微型输液袋(100mL)进行材料相容性测试:

[0471] 15mg/mL布林西多福韦,200mM磷酸钠,pH=8.0。

[0472] 稀释至输液袋后测试的制剂强度约为:

[0473] 0.1mg/mL布林西多福韦,5.3mM磷酸钠,pH≈8.0(在5%葡萄糖中),

[0474] 1.0mg/mL布林西多福韦,13.3mM磷酸钠,pH≈8.0(在5%葡萄糖中)。

[0475] 测试临床输液袋规定如下:

[0476] 注射用5%葡萄糖,USP,100mL VIAFLEX输液袋

[0477] 通过注射到输注袋中将研制的布林西多福韦制剂(15mg/mL布林西多福韦,200mM磷酸钠,pH＝8.0)稀释至c(BCV)＝0.1和c(BCV)＝1.0mg/mL。然后将输液袋储存在环境条件下,并在时间点(t_0、t_{1h}、t_{8h}和t_{24h})从输液袋收集样品,用于评估外观、pH和c(BCV)。作为对照,从单独的输液袋中取出5％葡萄糖溶液,并使用相同的稀释因子进行具有5％葡萄糖溶液的测试制剂的外部稀释(标准实验室玻璃器皿)。同样分析外部稀释溶液的样品。结果总结在表22中。

[0478] 表22:临床输液袋相容性评估的结果

[0479]

在测试的输液袋中 c(BCV) (mg/mL)	条件	外观	测量的 pH	观察到的 c(BCV)[a] (mg/mL)	BCV 恢复[a,b] (%)
0.1	外部稀释	清晰,无色	7.9	0.098	106
	t_0	清晰,无色	7.9	0.092	100
	$t_{1\,h}$	清晰,无色	7.9	0.093	101
	$t_{8\,h}$	清晰,无色	7.9	0.093	101
	$t_{24\,h}$	清晰,无色	7.9	0.093	101
1.0	外部稀释	清晰,无色	8.2	0.94	108
	t_0	清晰,无色	8.2	0.87	100
	$t_{1\,h}$	清晰,无色	8.2	0.87	100
	$t_{8\,h}$	清晰,无色	8.2	0.87	100
	$t_{24\,h}$	清晰,无色	8.1	0.86	99

[0480]

[0481] [a]三(3)次重复的平均值。[b]BCV恢复＝$c(BCV)_{n小时}/c(BCV)_{0小时}$×100％。$t_0$样品定义为100％。

[0482] 对于c(BCV)测试输液袋中的稀释溶液,未观察到外观、pH或c(BCV)的显著变化。从外部稀释液中获得的较高的布林西多福韦恢复很可能是由于输液袋通常过满(105-115mL,平均110mL,对于100mL袋-由Baxter传达的信息)。通过应用相同的稀释因子并使用t_0时间点(稀释至输液袋中)进行标准化(定义为100％),对外部稀释测定的浓度被高估。对单个输液袋进行的内部研究评估了输注液在100mL输液袋中的体积,≈109mL。

[0483] 临床输注系统相容性

[0484] 测试两种输注系统(Baxter Non-DEHP CONTINUO-FLO溶液组,其具有2个INTERLINK注射部位,雄性Luer-lok适配器;和BrownRateFlow®调节剂IV组,其具有15微米过滤器,1个无针自由注射部位)与以下制剂的相容性:

[0485] 15mg/mL布林西多福韦,200mM磷酸钠,pH=8.0。

[0486] 稀释至输液袋后测试的制剂强度约为:

[0487] 0.1mg/mL布林西多福韦,5.3mM磷酸钠,pH≈8.0(在5%葡萄糖中),

[0488] 1.0mg/mL布林西多福韦,13.3mM磷酸钠,pH≈8.0(在5%葡萄糖中)。

[0489] 测试程序可总结如下:

[0490] 1.将研制的布林西多福韦制剂(15mg/mL布林西多福韦,200mM磷酸钠,pH8.0)注入上述输液袋(储库功能)中,得到c(BCV)=0.1或1.0mg/mL的测试溶液。从输液袋收集样品用于评估c(BCV)($t_{24h,袋}$)。

[0491] 2.在环境条件下将输液袋温育("老化")24小时,然后从输液袋收集另一个样品($t_{0,袋}$)用于评估(外观、pH、c(BCV))。

[0492] 3.将测试的输注系统连接到输液袋上,并用输液袋中的溶液手动填充。收集大约1mL(一式三份)测试溶液作为用于分析的末端样品($t_{0,eol}$)。

[0493] 4.关闭测试的输注系统,并在环境条件下储存,直到下一个时间点。排出大约17mL的测试溶液(输注系统的体积),然后收集另一个末端样品(1mL,一式三份)用于分析($t_{10min,eol}$,$t_{3h,eol}$和$t_{6h,eol}$))。

[0494] 表23:临床输注系统相容性评估的结果

[0495]

测试的输注系统	在输液袋中c(BCV)(mg/mL)	条件	外观	测量的 pH	观察到的c(BCV)[a](mg/mL)	BCV恢复[a,b](%)
Baxter	0.1	$t_{-24\ h,袋}$	n.a.	n.a.	0.090	100
		$t_{0,袋}$	清晰,无色	7.7	0.091	100
		$t_{0,eol}$	清晰,无色	7.7	0.088	96
		$t_{10\ min,eol}$	清晰,无色	7.7	0.092	100
		$t_{3\ h,eol}$	清晰,无色	7.7	0.091	100
		$t_{6\ h,eol}$	清晰,无色	7.7	0.092	100
	1.0	$t_{-24\ h,袋}$	n.a.	n.a.	0.85	100
		$t_{0,袋}$	清晰,无色	8.1	0.86	100
		$t_{0,eol}$	清晰,无色	8.1	0.85	100
		$t_{10\ min,eol}$	清晰,无色	8.1	0.86	100
		$t_{3\ h,eol}$	清晰,无色	8.1	0.86	100
		$t_{6\ h,eol}$	清晰,无色	8.1	0.86	100
B. Braun	0.1	$t_{-24\ h,袋}$	n.a.	n.a.	0.090	100
		$t_{0,b\ 袋}$	清晰,无色	7.8	0.091	100
		$t_{0,eol}$	清晰,无色	7.7	0.086	94
		$t_{10\ min,eol}$	清晰,无色	7.7	0.091	100
		$t_{3\ h,eol}$	清晰,无色	7.7	0.090	99
		$t_{6\ h,eol}$	清晰,无色	7.7	0.091	100
	1.0	$t_{-24\ h,袋}$	n.a.	n.a.	0.86	100
		$t_{0,袋}$	清晰,无色	8.1	0.86	100
		$t_{0,eol}$	清晰,无色	8.1	0.86	100
		$t_{10\ min,eol}$	清晰,无色	8.1	0.86	100
		$t_{3\ h,eol}$	清晰,无色	8.1	0.86	100
		$t_{6\ h,eol}$	清晰,无色	8.1	0.86	100

[0496]

[0497] [a]三(3)次重复的平均值。[b]BCV恢复＝c(BCV)$_{n小时}$/c(BCV)$_{0小时}$×100％。$t_{0,袋}$样品定义

为100％。

[0498] 在两种测试的临床输注系统中，对于具有低c(BCV)＝0.1mg/mL的测试溶液，观察c(BCV)的初始损失(高达6％)。这种观察很可能用管材料的初始饱和吸附来解释。在实验过程中(6h)，布林西多福韦的浓度恢复率到约100％。对于两种测试的输注系统，没有观察到外观、pH或c(BCV)的显著总体变化。

[0499] 实施例4-冻干和重构制剂的稳定性和特征

[0500] 如下表24中所示制备预冻干制剂并进行冻干过程。

[0501] 表24：预冻干制剂。

[0502]

制剂#	缓冲剂	c(缓冲剂) [mM]	c(BCV) [mg/mL]	目标 pH	填充剂	c(填充剂) (w/v) [%]
1	磷酸钠	200	10.0	8.0	甘露醇	5
2	磷酸钠	200	10.0	8.0	蔗糖	9
3	精氨酸	200	10.0	8.0	甘露醇	5
3a	精氨酸	100	10.0	8.0	甘露醇	5
3b	精氨酸	50	10.0	8.0	甘露醇	5
3c	精氨酸	25	10.0	8.0	甘露醇	5
4	精氨酸	200	10.0	8.0	蔗糖	9
5	氨丁三醇(三羟甲基氨基甲烷)	200	10.0	8.0	甘露醇	5
6	氨丁三醇 (三羟甲基氨基甲烷)	200	10.0	8.0	蔗糖	9
7	水(pH-调节)	------	10.0	8.0	甘露醇	5
8	水(pH-调节)	------	10.0	8.0	蔗糖	9

[0503] 通过差示扫描量热法(DSC)分析测定表27的制剂1-8的玻璃化转变温度Tg'(无定形)、共晶熔点$_{Teu}$(结晶)、熔融$T_{melt,onset}$的起始温度和冷冻温度T_{freeze}。为此，将5μL的每种制剂分配到铝样品盘中并密封。以5℃/min的升温速率在+25℃至-65℃至+25℃的温度范围内，通过向下和向上扫描进行DSC扫描。测试的制剂显示出明显的凝固点和明确的熔融转变。DSC研究的结果总结在表25中。

[0504] 表25：DSC分析的结果

[0505]

制剂#	缓冲剂	填充剂	$T_{g'}/T_{eu}$ [°C]	T_{freeze} [°C]	T_{melt} [°C]	$T_{melt, onset}$ [°C]
1	磷酸钠	甘露醇	-45.0	-20.0	-0.5	-3.0
2	磷酸钠	蔗糖	-32.0	-18.0	-0.2	-3.4
3	精氨酸	甘露醇	-45.0	-20.0	-0.5	-4.2
4	精氨酸	蔗糖	-32.0	-18.0	-0.2	-4.2
5	氨丁三醇	甘露醇	-16.0	-21.0	-0.4	-5.2
6	氨丁三醇	蔗糖	-43.0	-20.0	-0.4	-5.2
7	去离子水 (pH-调节)	甘露醇	-30.5	-21.2	-0.01	-2.2
8	去离子水 (pH-调节)	蔗糖	-34.8	-16.6	-0.8	-2.9

[0506] 冻干循环

[0507] 应用保守的冻干循环以冻干布林西多福韦制剂，包括通过DSC分析得到的参数(参见表28)。该循环由以下步骤组成：冷冻、退火、初级干燥和二级干燥。表26总结了示例性冻

干循环中每个步骤的设定点温度、升温速率、步骤时间和加载时间。

[0508] 表26:冻干循环参数(循环#1)

[0509]

阶段	类型	T_{shelf}(设定点) [°C]	升温速率 [°C/h]	步骤时间 [min]	总时间[h]
加载	保留	5	N/A	0	0
冷冻/退火	保留	5	0	60	1
冷冻/退火	比率	-50	20	165	3.8
冷冻/退火	保留	-50	N/A	180	6.8
冷冻/退火	比率	-8	20	174	9.7
冷冻/退火	保留	-8	N/A	240	13.7
冷冻/退火	比率	-35	20	81	15.0
冷冻/退火	保留	-35	N/A	60	16.0
初级干燥	保留	-35	N/A	1200	36.0
二级干燥	比率	20	2.5	1300	57.7
二级干燥	保留	20	N/A	360	63.7

[0510] 在生物安全柜中最佳清洁条件下处理样品小瓶(5mL小瓶尺寸,1mL填充体积)。对于每种制剂,制备九个样品。对于每种制剂条件,在整个冻干循环中,一个样品小瓶配备有产物探针以监测产物温度($T_{产物}$)以及冻干机的架温($T_{架子}$)。初步干燥的结束被确定为观察到$T_{产物}≈T_{架子}$的时间。在冻干循环结束时,将样品小瓶回填氮气(N_2),塞住并从冷冻干燥器中取出以进行检查和分析。

[0511] 将初级干燥阶段的步骤时间设定为20小时。图1显示了该步骤中制剂1-8的产品温度曲线。在测试的制剂中,在真空泵活化并在总循环时间约16小时后将产物温度降至$T_{(产物)}<T_{(架子)}$后,在15小时内在不同制剂中观察到温度跃变。温度跃变表示样品干燥成功。

[0512] 基于冻干饼的结构和均匀性评估冻干产品。观察到“回熔”或“饼塌陷”导致排名下降。随机选择来自每种制剂的四个小瓶用于外观评估。评估和排名总结在表27中。

[0513] 表27:冻干产品的评估和重构性能

[0514]

制剂				冻干产品	重构					排名	
#	缓冲剂	填充剂	约pH	蛋糕外观	重构时间[s]	起泡*	泡沫消散时间[min]	测量的pH	c(BCV)[mg/mL]	外观排名	重构排名
1	磷酸钠	甘露醇(5%)	7.9	白色均匀固体 轻微的回熔	50	+	7	7.8	10.4	2	4
2	磷酸钠	蔗糖(9%)	7.9	白色均匀固体 轻微的回熔 从小瓶中轻微脱离	80	++	45	7.8	10.5	5	7
3	精氨酸	甘露醇(5%)	8.0	白色均匀固体 轻微的回熔 从底部轻微脱离（饼塌陷）	60	-	-	7.9	10.3	3	1
4	精氨酸	蔗糖(9%)	8.0	较多的回熔 显著的饼塌陷	45	++	35	7.9	9.8	7	5
5	三羟甲基氨基甲烷	甘露醇(5%)	8.0	轻微的回熔并从底部脱离 轻微的饼塌陷	90	-	-	8.1	10.6	4	2
6	三羟甲基氨基甲烷	蔗糖(9%)	8.0	大量的回熔和饼塌陷	15	++	45	8.0	10.4	8	6
7	去离子水(pH-调节)	甘露醇(5%)	8.3	白色均匀固体 轻微的回熔	45	+	3	8.4	10.6	1	3
8	去离子水(pH-调节)	蔗糖 (9%)	8.3	强烈的回熔和饼塌陷 蛋糕从小瓶脱离	60	++	60	8.3	10.3	6	4

[0515] 在测试制剂中，基于甘露醇的制剂(制剂1、3、5和7)产生更紧凑和均匀的冻干饼，并且基于蔗糖的制剂(制剂2、4、6和8)显示部分饼塌陷以及增加的回熔。

[0516] 冻干制剂的重构评估

[0517] 在冻干之前和之后称量冻干产品小瓶，以确定重构溶液的体积。用去离子水重构冻干产物。加入溶剂后，轻轻旋转小瓶，记录重构外观和重构时间。进一步分析重构产物的pH和布林西多福韦恢复(通过HPLC测定)。对于重构排名，通过记录起泡强度以及泡沫消散时间来补充所述参数。制剂1-8的重构评估结果总结在表30中。

[0518] 发现制剂3在重构时没有起泡，并且发现制剂7能够用不同的缓冲剂或输注载体重构。

[0519] 实施例5-冷冻干燥过程研发

[0520] 为了研发布林西多福韦的冻干药物产品，已经执行了五种不同的活动：i)冻干可行性评估，ii)冻干过程研发，iii)短期稳定性研究，iv)用于稳定性测试的药物产品批次的制备，和v)材料相容性评估。

[0521] 捕获了每种活动的目的、结果和成果的项目概述总结在表28中。在工艺研发期间某些冻干运行的冻干循环参数的细节可以在表29中找到。

[0522] 表28：项目概述和决策依据。

[0523]

活动	循环#	目的	制剂	结果
可行性评估	1	起始基质制剂的冻干（可行性）；1 mL 填充体积, 5 mL 小瓶	1-8	含有氨丁三醇和蔗糖的制剂没有足够的稳定性。
	2	产品单位尺寸刻度(5 mL 填充，20 mL 小瓶)	1, 3, 7	i) 在初级干燥阶段放大阻止干燥的完成。 ii) ＃3 观察到较少的起泡（重构）。
	3	i) 循环参数调整 ii) 获得具有可接受的残余水分的产品	1, 3, 7	获得的产物具有 2%的挥发物。 没有对该冻干循环进行重构分析。
工艺研发	4	--- 循环失败 ---		
	5	i) 研究起泡程度 ii) 评估重构过程，包括 48h 重构稳定性	1, 3, 3a, 3b, 3c	i) #3、#3a 的可比起泡。 ii) 在重建后 48h 内未观察到布林西多福韦的损失（所有制剂）。
短期稳定性（2 周）	6	评估冻干产品的稳定性（固体）	1, 3, 3a	(i) ＃1 的残余水分增加，因此降解更强。 (ii) ＃3a 与＃3 的优异稳定性。 (iii) 在冻干前后＃1，＃3 观察到的布林西多福韦恢复损失（pot.处理错误，高分析变异性）。

[0524]

药物产品的制备	7	用于稳定性测试的药物产品的制备	3a	制备 200 个小瓶 (5 mL 填充, 20 mL 小瓶)。 冻干前后观察到恢复（未降解）的损失，（pot.处理错误，高分析变异性）。
材料相容性评估	NA	评估无菌过滤器、小瓶、塞子、输液袋、IV 系统的相容性。.	3a	制剂(3a) 与所有测试材料相容。在低 c（BCV）下观察到 IV 系统的初始吸附/饱和效应。 c（BCV）= 0.1mg / mL 的样品显示出更显著的 pH 变化。

[0525] 表29:冻干循环参数(循环#2,#3,#5,#6)

[0526]

步骤	类型	循环#2				循环#3				循环#5				循环 #6			
		斜率[°C/h]	T架子[°C]	时间[min]	总时间[h]	斜率[°C/h]	T架子[°C]	时间[min]	总时间[h]	斜率[°C/h]	T架子[°C]	时间[min]	总时间[h]	斜率[°C/h]	T架子[°C]	时间[min]	总时间[h]
加载	保留	N/A	5	0	0	N/A	5	0	0	N/A	5	0	0	N/A	5	0	0
冷冻/退火	保留	0	5	60	1	0	5	60	1	0	5	60	1	0	5	60	1
冷冻/退火	比率	20	-50	165	3.8	20	-50	165	3.8	20	-50	165	3.8	20	-50	165	3.8
冷冻/退火	保留	N/A	-50	180	6.8	N/A	-50	180	6.8	N/A	-50	180	6.8	N/A	-50	180	6.8
冷冻/退火	比率	20	-4	174	9.7	20	-4	174	9.7	20	-4	174	9.7	20	-4	174	9.7
冷冻/退火	保留	N/A	-4	240	13.7	N/A	-4	240	13.7	N/A	-4	240	13.7	N/A	-4	240	13.7
冷冻/退火	比率	20	-38	81	15	20	-35	81	15	20	-35	81	15	20	-35	81	15
冷冻/退火	保留	N/A	-38	60	16	N/A	-35	60	16	N/A	-35	180	18	N/A	-35	180	18
初级干燥	保留	N/A	-38	1200	36	N/A	-35	2160	52	N/A	-35	2160	54	N/A	-35	2160	54
二级干燥	比率	2.5	20	1300	57.7	30	30	130	54.2	30	30	130	56.2	30	30	390	60.5
二级干燥	保留	N/A	20	360	63.7	N/A	30	360	60.2	N/A	30	360	62.2	N/A	30	360	66.5

[0527] i)可行性评估:配制和重构

[0528] 为了在不同的冻干循环冻干后根据重构进一步评估制剂,如下所述制备和评估液体填充溶液。对于冻干循环#1、#2和#5,制备液体填充溶液,包括:

[0529] a)布林西多福韦原液c(BCV)＝10mg/mL(pH值调节至pH＝8.0),

[0530] b)10X缓冲剂原溶液或去离子水(pH调节至pH＝8.0),和

[0531] c)12.5％(w/v)甘露醇原液(pH调节至pH＝8.0)

[0532] d)去离子水。

[0533] 对于循环#6和#7,制备液体填充溶液,包括:

[0534] a)布林西多福韦(固体),

[0535] b)甘露醇(固体),

[0536] c)10X精氨酸原液(pH调节至pH＝8.0),

[0537] d)NaOH溶液(1M),和

[0538] e)去离子水。

[0539] 对于循环#1、#2和#5,通过对每种制剂冻干之前和之后的产品小瓶的重量分析来确定应用的重构体积。在循环#1和#2的情况下,应用特定的测量体积。为了重构循环#5的冻干产物,将平均重构体积应用于所有制剂。对于冻干循环#7的冻干产品,根据先前确定的液体填充和重构体积之间的差异来缩放液体填充体积。

[0540] 在每个冻干循环后,评估冻干产品的滤饼结构、均匀性和外观缺陷。在用去离子水重构后,评估在重构期间和之后溶液的外观(例如起泡强度、泡沫消散时间)、pH和布林西多福韦的恢复。通过HPLC分析确定了布林西多福韦的恢复。通过热重分析(TGA)测定挥发物的分数。表30总结了重构评估的结果。

[0541] 表30:药物产品评估和重构过程。

[0542]

循环#	制剂#	挥发物分数[%]	平均外观	平均重构时间[s]	平均泡沫消散时间*[min]	pH	冻干前c(BCV)[mg/mL]	冻干后c(BCV)[mg/mL]	纯度c(BCV)[%]
1	1	N/A	轻微的回熔	50	7	7.8	N/A	10.43	N/A
	2	N/A	轻微的回熔	80	45	7.8	N/A	10.53	N/A
	3	N/A	轻微的回熔	60	<1	7.9	N/A	10.33	N/A
	4	N/A	饼塌陷	45	35	7.9	N/A	9.83	N/A
	5	N/A	饼塌陷	90	<1	8.1	N/A	10.63	N/A
	6	N/A	饼塌陷	15	45	8.0	N/A	10.43	N/A
	7	N/A	多孔，均匀	45	3	8.4	N/A	10.63	N/A
	8	N/A	饼塌陷	60	60	8.3	N/A	10.33	N/A
2	1	0.3	小裂缝	100	32	8.0	9.8	9.6	N/A
	3	1.5	多孔，均匀	45	8	8.0	9.9	9.6	N/A
	7	3.8	轻微的回熔	105	30	8.4	9.5	9.5	N/A
3	1	0.3	小裂缝	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	3	2.0	多孔，均匀	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	7	0.8	轻微的回熔	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
5	1	N/A	细微的裂纹	45	>30 (轻微起泡)	7.9	N/A	10.4	N/A
	3	N/A	多孔，均匀	45	<20	8.0	N/A	10.2	N/A
	3a	N/A	多孔，均匀	130	<20	7.9	N/A	10.1	N/A

[0543]

循环#	制剂#	挥发物分数[%]	平均外观	平均重构时间[s]	平均泡沫消散时间*[min]	pH	冻干前c(BCV)[mg/mL]	冻干后c(BCV)[mg/mL]	纯度c(BCV)[%]
	3b	N/A	多孔，均匀	95	>30 (轻微起泡)	7.9	N/A	10.0	N/A
	3c	N/A	多孔，均匀	80	>30 (轻微起泡)	7.9	N/A	10.0	N/A
	7	N/A	轻微的回熔	15	>30	8.2	N/A	10.2	N/A
6	1	4.2	几个裂缝	40	>30 (轻微起泡)	7.9	10.3	9.8	N/A
	3	1.0	多孔，均匀	30	<20	7.9	10.7	9.5	99.7
	3a	0.3	多孔，均匀	91	>30 (轻微起泡)	7.9	10.5	9.6	99.6
7	3a	0.5	多孔，均匀	83	<20	8.0	10.7	9.9	N/A

[0544] *三个小瓶的平均值。对于循环#1-2,记录了近似的消散时间(持续观察)。对于循环#5-7,在重构后10、20和30分钟评估器起泡强度。<20表示泡沫消散时间在10到20分钟之间。<30表示泡沫消散时间在20到30分钟之间。如果起泡仍然持续30分钟,则表示消散时间>30分钟。

[0545] ii)工艺研发:冻干制剂的稳定性研究-48h研究

[0546] 为了评估重构溶液的物理和化学稳定性,在重构时(t_0)、1天(t_{24h})后和2天(t_{48h})后,在环境温度下评估制剂1、3、3a、3b、3c和7中的每一种的外观和pH,以及c(BCV)的恢复。通过HPLC测定c(BCV)的恢复。

[0547] 所有测试的制剂(制剂#1、3、3a、3b、3c和7)在外观上是清晰和无色的,并且在重构后48小时内完全恢复了布林西多福韦(即,没有显著的布林西多福韦损失,恢复的变化在误差范围内)。发现制剂3和3a比制剂3b和3c显示出更快的泡沫/气泡消散(表33)。iii)短期稳

定性研究:冻干制剂的稳定性研究-2周研究

[0548] 通过评估每种制剂的外观和pH,以及c(BCV)的恢复,在重构时(t_0)、2天($t_{2天}$)、7天($t_{7天}$)、10天($t_{10天}$)、14天($t_{14天}$)后,在25℃和60℃下评估制剂1、3和3a的稳定性。此外,在重构后10、20和30分钟评估起泡强度。

[0549] 通过HPLC测定布林西多福韦的恢复。在HPLC色谱图中观察到的降解物被鉴定为脱氨基产物,可能是西多福韦,以及其他降解物。pH的移动或变化与降解无关。在测试的制剂中,制剂3a在所应用的条件下显示出最低程度的降解,在60℃下14天后纯度为99.2%。实验结果总结在表31、表32和表36中。

[0550] 表31:制剂1(200mM磷酸盐)的稳定性研究结果

[0551] [0552]

条件		平均蛋糕外观	平均重构外观	平均重构时间 [s]	平均起泡时间 [min]*	pH	观察到的c(BCV)[a] (mg/mL)	BCV恢复[b] [%]	BCV纯度 [%]
站温度(°C)	天								
冻干前	N/A	N/A	N/A	N/A	7.9	10.3	0.4	N/A	冻干前
25	0**	几个裂缝	清晰,无色	40	>30 (轻微起泡)	7.9	9.8	100	N/A
	2	几个裂缝	清晰,无色	41	>30 (轻微起泡)	8.0	9.9	101	N/A
	7	几个裂缝	清晰,无色	33	>30 (轻微起泡)	8.0	10.0	102	N/A
	10	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	14	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
60	0**	几个裂缝	清晰,无色	40	>30 (轻微起泡)	7.9	9.8	100	N/A
	2	大量的坍塌	清晰,无色	30	>30 (轻微起泡)	8.0	9.8	100	N/A
	7	大量的坍塌	清晰,无色	32	>30 (轻微起泡)	8.0	9.6	98	N/A
	10	N/A	N/A	N/A	N/A	N/ A	N/A	N/A	N/A
	14	N/A	N/A	N/A	N/A	N/ A	N/A	N/A	N/A

[0553] *三个小瓶的平均值。在重构后10、20和30分钟评估起泡强度。<20表示泡沫消散时间在10到20分钟之间。<30表示泡沫消散时间在20到30分钟之间。如果起泡仍然持续30分钟,则表示消散时间>30分钟。

[0554] [a]接受处理的样本的三次重复的平均值。

[0555] [b]BCV恢复$=c(BCV)_{n天}/c(BCV)_{0天}\times 100\%$。

[0556] **T=25℃时t_0和T=60℃时t_0的样本相同。注意:HPLC样品的可变性解释了样品之间的分析变异性。小瓶到小瓶的可变性说明了药品小瓶之间的可变性。

[0557] 表32:制剂3(200mM精氨酸)的稳定性研究结果

[0558]

条件 站温度(°C)	条件 天	平均蛋糕外观	平均重构外观	平均重构时间[s]	平均起泡时间[min]*	pH	观察到的c(BCV)[a] (mg/mL)	BCV恢复[b] [%]	BCV纯度[%]
冻干前		N/A	N/A	N/A	N/A	8.0	10.7	N/A	N/A
25	0**	均匀	清晰，无色	30	10	7.9	9.5	100	99.7
	2	均匀	清晰，无色	24	10	7.9	9.6	101	99.6
	7	均匀	清晰，无色	24	<10	7.9	9.7	102	99.7
	10	均匀	清晰，无色	18	<10	8.0	9.9	104	99.8
	14	均匀	清晰，无色	16	<10	8.0	9.8	103	99.7

[0559]

60	0**	均匀	清晰，无色	30	10	7.9	9.5	100	99.7
	2	均匀	清晰，无色	34	10	7.9	9.5	100	99.6
	7	均匀	清晰，无色	20	10	7.9	9.6	101	99.0
	10	均匀	清晰，无色	18	<30 (轻微起泡)	7.9	9.7	102	98.9
	14	均匀	黄色色调	20**	<20	7.9	9.6	101	95.9

[0560] *三个小瓶的平均值。在重构后10、20和30分钟评估起泡强度。<20表示泡沫消散时间在10到20分钟之间。<30表示泡沫消散时间在20到30分钟之间。如果起泡仍然持续30分钟，则表示消散时间>30分钟。[a]接受处理的样本的三次重复的平均值。[b]BCV恢复＝$c(BCV)_{n天}/c(BCV)_{0天}\times100\%$。**T＝25℃时$t_0$和T＝60℃时$t_0$的样本相同。注意：HPLC样品的可变性解释了样品之间的分析变异性。小瓶到小瓶的可变性说明了药品小瓶之间的可变性。

[0561] 表33：制剂#3a(100mM精氨酸)的稳定性研究结果

[0562]

条件		平均饼外观	平均重构外观	平均重构时间[s]	平均起泡时间[min]*	pH	观察到的c(BCV)[a] (mg/mL)	BCV恢复[b] (%)	BCV纯度(%)
站温度(°C)	天								
冷冻前		N/A	N/A	N/A	N/A	7.9	10.5	N/A	N/A
25	0**	均匀	清晰,无色	91	>30 (轻微起泡)	7.9	9.6	100	99.6
	2	均匀	清晰,无色	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	7	均匀	清晰,无色	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	10	均匀	清晰,无色	80	>30 (轻微起泡)	8.0	10.0	104	99.7
	14	均匀	清晰,无色	65	>30(轻微起泡)	8.0	9.9	103	99.7
60	0**	均匀	清晰,无色	91	>30 ((轻微起泡)	7.9	9.6	100	99.6
	2	均匀	清晰,无色	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	7	均匀	清晰,无色	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	10	均匀	清晰,无色	49	>30 (轻微起泡)	7.9	9.8	102	99.8
	14	均匀	清晰,无色	26	>30 (轻微起泡)	8.0	9.8	102	99.2

[0563]

[0564] [a]接受处理的样本的三次重复的平均值。[b]BCV恢复＝c(BCV)$_{n天}$/c(BCV)$_{0天}$×100％。**T＝25℃时t_0和T＝60℃时t_0的样本相同。注意:HPLC样品的可变性解释了样品之间的分析变异性。小瓶到小瓶的可变性说明了药品小瓶之间的可变性。

[0565] iv)用于稳定性测试的药物产品批次的制备

[0566] 预冻干制剂的制备:根据以下程序配制制剂3a:在Q.S.(定量分析)前,在pH控制下,使用盐酸(35-37％)将在去离子水中的精氨酸的1M缓冲溶液的pH调节至8。然后将甘露醇加入缓冲溶液中,接着加入BCV。使用氢氧化钠将所得溶液的pH调节至8。在单独的容量瓶中,去离子水用于Q.S.(定量分析)溶液。然后将两种溶液混合并无菌过滤,得到所需的制剂3a。该方法得到制剂3a具有9.9mg/mL的观察到的c(BCV)。

[0567] 冻干制剂的制备:在最佳清洁条件下,将根据上述方法制备的约200小瓶液体制剂3a在冻干位置塞住小瓶并根据冻干循环#7进行冻干。测试所得冻干产品的外观、重构外观、pH和布林西多福韦的恢复。通过HPLC和热重分析测定布林西多福韦的恢复。表34总结了根据本文概述的程序制备的冻干制剂中的外观,重构外观和布林西多福韦恢复的测试结果。

[0568] 表34:冻干前和冻干后批次制剂的外观、重构和恢复。

[0569]

条件	挥发物分数 [%][a]	外观.	重构时间 [s]	泡沫消散时间 [min]*	pH	平均 c(BCV)[b] [mg/mL]
冻干前	N/A	N/A	N/A	N/A	8.0	10.7
释放测试	0.5	多孔, 均匀	83	<20	8.0	9.9

[0570] *三个小瓶的平均值。在重构后10、20和30分钟评估起泡强度。20表示泡沫消散时间在10到20分钟之间。<30表示泡沫消散时间在20到30分钟之间。如果起泡仍然持续30分钟,则表示消散时间>30分钟。[a]扫描范围＝25℃至150℃,斜率＝10℃/min。[b]接受处理的样本的三(3)次重复的平均值。

[0571] v)冻干制剂的相容性

[0572] 测试用于冻干制剂3a的液体填充溶液与输注载体以及来自制造和临床阶段的一系列材料的相容性。输注载体相容性测试的结果总结在表38中。在研究结束时没有观察到沉淀、pH变化或布林西多福韦的恢复显著损失。

[0573] 输注载体相容性

[0574] 用输注载体(5％葡萄糖)溶液稀释制剂3a,得到c(BCV)＝0.5mg/mL和1.0mg/mL溶液。在制备测试溶液时(t_0)和2小时(t_{2h})、8小时(t_{8h})和24小时(t_{24h})后评估外观、pH和布林西多福韦恢复(通过HPLC测定)。

[0575] 表35:输注载体相容性评估的结果。

[0576]

在输注载体中 c(BCV) (mg/mL)	时间点 (h)	外观	测量的 pH	观察到的 c(BCV)[a] (mg/mL)	BCV 恢复[a,b] (%)
0.5	t_0	清晰, 无色	7.9	0.492	100
	t_{2h}	清晰, 无色	7.9	0.493	100
	t_{8h}	清晰, 无色	7.7	0.492	100
	t_{24h}	清晰, 无色	7.7	0.492	100
1.0	t_0	清晰, 无色	7.9	0.967	100
	t_{2h}	清晰, 无色	7.8	0.966	100
	t_{8h}	清晰, 无色	7.8	0.969	100
	t_{24h}	清晰, 无色	7.7	0.967	100

[0577] [a]三次重复的平均值。[b]BCV恢复＝$c(BCV)_{n小时}/c(BCV)_{0小时}$×100％。在$t_0$处的BCV恢复值定义为100％。

[0578] 灭菌过滤器相容性

[0579] 测试液体制剂3a与两个用于无菌处理的注射器过滤器的相容性。将10mL液体制剂3a通过其中一个过滤器a(0.2μm,25mm,注射器过滤器,Posidyne®膜)或b(0.2μm,25mm,注射

器过滤器,Supor®膜(PES))过滤,评估第一个和最后一个10%滤液的外观、pH和布林西多福韦的恢复。

[0580] 评估结果总结在表36中。未观察到沉淀、pH变化或布林西多福韦恢复的显著损失。样品看起来清澈和无色。未观察到降解峰。

[0581] 表36:制剂3a的灭菌过滤器相容性评估结果。

[0582]

[0583]

过滤膜	条件	外观	测量的pH	观察到的 c(BCV)[a] (mg/mL)	BCV 恢复[a,b] (%)
Posidyne®	过滤前	清晰,无色	7.9	10.25	100
	第一个 10%滤液体积	清晰,无色	7.9	10.16	99
	最后一个 10%滤液体积	清晰,无色	7.9	10.12	99
PES®	过滤前	清晰,无色	7.9	10.25	100
	第一个 10%滤液体积	清晰,无色	7.9	10.21	100
	最后一个 10%滤液体积	清晰,无色	7.9	10.15	99

[0584] [a]三次重复的平均值。[b]BCV恢复=c(BCV)$_{n小时}$/c(BCV)$_{填充前}$×100%。在t_0处的BCV恢复值定义为100%。

[0585] 药品小瓶和塞子相容性

[0586] 测试液体制剂3a与小瓶和塞子的相容性。将小瓶用5mL液体制剂3a填充、塞住、卷曲,并在环境条件下以直立和倒立方向储存6小时。用于测试的小瓶是透明的,20mL,A级硼硅酸盐玻璃血清小瓶,塞子是20mm Novapure®塞子,带有FluroTec®涂层。

[0587] 表37总结了该研究的结果。在整个研究中未观察到沉淀、pH变化或布林西多福韦恢复的显著损失。在HPLC中未观察到降解峰。

[0588] 表37:药物产品小瓶和塞子相容性评估的结果。

[0589]

条件	外观	测量的 pH	观察到的 c(BCV)[a] (mg/mL)	BCV 恢复[a,b] (%)
填充前	清晰,无色	7.9	10.25	100
直立, 6 h	清晰,无色	7.9	10.15	99
倒立, 6h	清晰,无色	7.9	10.20	100

[0590] [a]三次重复的平均值。[b]BCV恢复=c(BCV)$_{n小时}$/c(BCV)$_{填充前}$×100%。在t_0处的BCV恢复值定义为100%。

[0591] 输液袋相容性

[0592] 测试液体制剂3a与100mL输液袋的相容性。制剂3a在5%葡萄糖注射载体中的溶液以两种不同的制剂强度(1.0mg/mL和0.1mg/mL的布林西多福韦)制备,并在环境条件下储存

在输液袋中。在研究开始时(t_0)、8小时后(t_{8h})和24小时后(t_{24h}),评估来自输液袋和来自外部稀释的标准物的样品的外观、pH和布林西多福韦恢复(通过HPLC测定)。输液袋相容性评估的结果总结在表38中。

[0593] 表38:输液袋相容性评估的结果

[0594]

在测试的输液袋中 c(BCV) (mg/mL)	袋重复 #	条件	外观	测量的 pH	观察到的 $c(BCV)^a$ (mg/mL)	BCV 恢复^{a,b} (%)
0.1	1	外部稀释	清晰,无色	7.2	0.0909	101
		t_0	清晰,无色	7.3	0.0896	100
		t_{1h}	清晰,无色	7.1	0.0893	100
		t_{8h}	清晰,无色	7.3	0.0909	101
		$t_{24\,h}$	清晰,无色	7	0.0906	101
	2	t_0	N/A	N/A	0.0886	100
		t_{24h}	清晰,无色	7	0.0883	100
	3	t_0	N/A.	N/A	0.111	100
		t_{24h}	清晰,无色	7	0.0891	81
1	1	外部稀释	清晰,无色	7.9	0.927	101
		t_0	清晰,无色	7.9	0.915	100
		t_{1h}	清晰,无色	7.7	0.908	99
		t_{8h}	清晰,无色	7.8	0.914	100
		t_{24h}	清晰,无色	7.7	0.915	100
	2	t_0	N/A	N/A	1.108	100
		t_{24h}	清晰,无色	7.7	1.106	100
	3	t_0	N/A.	N/A	0.903	100
		t_{24h}	清晰,无色	7.7	0.903	100

[0595] [a]三次重复的平均值。[b]BCV恢复=$c(BCV)_{n小时}/c(BCV)_{0小时}\times 100\%$。在$t_0$处的BCV恢复值定义为100%。

[0596] 样品看起来是清晰和无色的。对于两种样品浓度,在24小时内未观察到布林西多福韦恢复的显著损失。对于c(BCV)=0.1mg/mL的一个袋重复,观察到明显的布林西多福韦损失(19%);进一步观察到,将布林西多福韦制剂稀释至输注载体中,产生c(BCV)=0.1mg/mL的浓度导致显著的pH变化至pH=7。在实验中未观察到降解。

[0597] 输注系统相容性

[0598] 测试了布林西多福韦制剂(10mg/mL布林西多福韦,100mM精氨酸,5%甘露醇,pH=8.0)与两种输注系统的相容性(Baxter,Non-DEHP CONTINU-FLO;B Braun,RateFlow®IV调节剂组)。如前所述将液体制剂稀释至输液袋中(测试的最终浓度:1.0mg/mL和0.1mg/mL),并从输液袋收集等分试样用于分析24小时后的布林西多福韦恢复(t0,袋)。然后将输注系统连接到输液袋并手动填充来自输液袋的溶液。收集等分试样作为用于分析的末端样品(t0,eol)。IV线路在时间点之间关闭,其中输注物在输注系统内静止并储存在环境温度下。在测试时间点,排出大约17mL(IV系统的大约体积)的输注溶液,这导致IV系统中的溶液从袋储存器中更换。在该替换之后,收集另一个生产线末端样品用于评估(t10min,eol,t3h,eol和t6h,eol)。评估样品的外观、pH和布林西多福韦恢复。输注系统相容性测试的结果总结在表42中。

[0599] 在低c(BCV)下观察到两种IV系统的初始吸附/饱和效应,表明由布林西多福韦恢复损失7-11%。这种损失在接下来的6小时内部分恢复。在该研究过程中未观察到降解物的出现。如前所述,在用5%葡萄糖溶液稀释时,c(BCV)=0.1mg/mL的样品显示pH变化大约1个pH单位至pH=7。在研究过程中样品看起来是清晰和无色的。

[0600] 表39:输注系统相容性评估的结果。

[0601]

测试的输注系统	在输液袋中c(BCV)(mg/mL)	条件	外观	pH	观察到的c(BCV)[a](mg/mL)	BCV恢复[a,b](%)
Baxter	0.1	$t_{0,bag}$	清晰,无色	7	0.0883	100
		$t_{0,\ eol}$	清晰,无色	6.9	0.0826	93
		$t_{10\ min,\ eol}$	清晰,无色	6.9	0.0868	98
		$t_{3\ h,\ eol}$	清晰,无色	7	0.0876	99
		$t_{6\ h,\ eol}$	清晰,无色	7	0.0863	98
	1	$t_{0,bag}$	清晰,无色	7.7	1.106	100
		$t_{0,\ eol}$	清晰,无色	7.7	1.095*	99
		$t_{10\ min,\ eol}$	清晰,无色	7.7	1.121	101
		$t_{3\ h,\ eol}$	清晰,无色	7.7	1.136	103
		$t_{6\ h,\ eol}$	清晰,无色	7.7	1.107	100
B Braun	0.1	$t_{0,bag}$	清晰,无色	7	0.0891	100
		$t_{0,\ eol}$	清晰,无色	6.9	0.0796	89
		$t_{10\ min,\ eol}$	清晰,无色	6.9	0.0854	96
		$t_{3\ h,\ eol}$	清晰,无色	7	0.0849	95
		$t_{6\ h,\ eol}$	清晰,无色	6.9	0.0844	95
	1	$t_{0,bag}$	清晰,无色	7.7	0.903	100
		$t_{0,\ eol}$	清晰,无色	7.7	0.9	100

[0602]

测试的输注系统	在输液袋中c(BCV)(mg/mL)	条件	外观	pH	观察到的c(BCV)[a](mg/mL)	BCV恢复[a,b](%)
		$t_{10\ min,\ eol}$	清晰,无色	7.6	0.908	101
		$t_{3\ h,\ eol}$	清晰,无色	7.7	0.909	101
		$t_{6\ h,\ eol}$	清晰,无色	7.7	0.909	101

[0603] [a]三次重复的平均值。[b]BCV恢复=c(BCV)$_{n小时}$/c(BCV)$_{0小时}$×100%。在t0处的BCV恢复

值定义为100％。

[0604]　实施例6-稳定性测试

[0605]　进一步测试了本发明的散装液体制剂和冻干制剂的稳定性。将含有精氨酸、甘露醇和浓度为10mg/mL的布林西多福韦的液体制剂保存在10mL玻璃瓶中，塞住(橡胶塞或20mm血清塞)并密封(铝封)，在大约5℃或大约25℃下保存长达12个月。在不同的时间间隔(即，2周后、1个月后、2个月后、3个月后、6个月后、9个月后和12个月后)监测储存的制剂的外观、pH值和布林西多福韦含量以及杂质和颗粒物。通过HPLC评价杂质，并通过它们的相对保留时间在此进行确认。对于含有10mg/mL的布林西多福韦的冻干粉末的溶液，重复进行上述相同的实验。对于冻干制剂，使用20mL玻璃瓶和20mm橡胶塞。此外，记录了冻干粉末(即，冻干饼)的外观。

[0606]　5℃和25℃下散装液体制剂的稳定性研究结果分别总结在表40A和40B中。5℃和25℃下冻干制剂的稳定性研究结果分别总结在表41A、41B和42中。

[0607]　表40A：5℃(±3℃)下液体制剂的稳定性

[0608]

规格		稳定性间隔							
测试	验收标准	初始	2 周	1 个月	2 个月	3 个 月	6 个月	9 个 月	12 个月
外观	清澈，无色；无可见颗粒物	符合	符合	符合	符合	符合	符合	不符合	符合
布林西多福韦含量-平均	90.0 至 110.0%	100.3	100.7	100.4	100.0	101.2	101.3	99.9	99.8
药物相关杂质 – RRT 0.80	报告结果	<0.05	<0.05	<0.05	0.05	0.06	0.07	0.12	0.15
药物相关杂质 – RRT 1.13	报告结果	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
药物相关杂质 – RRT 1.19	报告结果	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
药物相关杂质 – RRT 1.34	报告结果	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
药物相关杂质 – RRT 1.42	报告结果	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
药物相关杂质 – 总杂质	报告结果	<0.05	<0.05	<0.05	0.05	0.06	0.07	0.12	0.15
pH - 平均	7.5 至 8.5	8.0	8.0	7.9	7.8	8.0	8.0	7.8	7.9
颗粒物 - 10 μm	≤ 6000	148	N/T	274	N/T	181	135	N/T	N/T
颗粒物 - 25 μm	≤ 600	1	N/T	1	N/T	2	2	N/T	N/T

[0609]

[0610]　表40B：25℃(±2℃)和60％相对湿度(±5％相对湿度)下液体制剂的稳定性

[0611]

规格		稳定性间隔						
测试	**验收标准**	**初始**	**2 周**	**1 个月**	**2 个月**	**3 个月**	**6 个月**	**12 个月**
外观	清澈，无色；无可见颗粒物	符合	符合	符合	符合	符合	符合	符合
布林西多福韦含量 – 平均	90.0 至 110.0%	100.3	100.9	100.1	99.4	98.9	99.9	97.5
药物相关杂质 – RRT 0.80	报告结果	<0.05	0.10	0.21	0.37	0.54	1.0	2.0
药物相关杂质 – RRT 1.13	报告结果	<0.05	<0.05	0.06	0.07	0.12	0.29	0.60
药物相关杂质 – RRT 1.19	报告结果	<0.05	<0.05	0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
药物相关杂质 – RRT 1.34	报告结果	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.05	<0.05	<0.05
药物相关杂质 – RRT 1.42	报告结果	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.05
药物相关杂质 – 总杂质	报告结果	<0.05	0.10	0.32	0.45	0.71	1.3	2.7
pH – 平均	7.5 至 8.5	8.0	8.0	7.9	7.9	8.0	8.0	7.9
颗粒物-10 μm	≤6000	148	N/T	N/T	N/T	N/T	325	N/T
颗粒物 - 25 μm	≤600	1	N/T	N/T	N/T	N/T	7	N/T

[0612]

表41A：5℃（±3℃）下冻干制剂的稳定性

规格		稳定性间隔							
测试	验收标准	初始	2 周	1 个月	2个 月	3 个月	6 个月	9 月	12 个月
冻干饼的外观-外观	报告结果	白色 多孔 结构均匀且在饼上方的瓶中存在一些固体沉着物	白色 多孔 结构均匀且在瓶中饼的上方存在一些固体沉着物。 瓶中在瓶塞上存在一些饼颗粒。	白色 均匀 上方存在一些沉着物质的饼	白色 均匀 壁的上方存在一些沉着物质的饼。 一个饼在-20℃，两个饼在5℃，以及一个饼在40℃，可以从瓶底移除。	白色 多孔 结构均匀 且在瓶中饼的上方存在一些固体沉着物。	白色 饼位于瓶底	白色 多孔 结构均匀 且在瓶中饼的上方存在一些固体沉着物。	白色 多孔 结构均匀 且在瓶中饼的上方存在一些固体沉着物。
溶液的完整性和清彻度	满足USP <1>的需求	N/T	N/T	N/T	符合	未测试	符合	符合	符合
布林西多福韦平均含量	90.0 至 110.0 %	100.3	100.4	98.6	98.7	98.2	100.1	98.4	98.2
药物相关杂质-Synergi imp	报告结果	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
药物相关杂质-XBridge imp	报告结果	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
药物相关杂质–总杂质	报告结果	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出

=XBridge + Synergi									
pH	7.5 至 8.5	7.9	7.9	7.9	7.9	7.9	7.8	7.9	7.9
重建时间 – Prep 1	报告结果	90	N/T	N/T	136	129	105	152	160
重建时间– Prep 2	报告结果	95	N/T	N/T	160	90	125	148	130
颗粒物– 10 μm	≤6000	188	N/T	52	N/T	N/T	84	N/T	N/T
颗粒物– 25 μm	≤600	4	N/T	0	N/T	N/T	3	N/T	N/T
水分平均值	报告结果	N/T	N/T	N/T	0.3	0.8	0.5	N/T	0.5

[0613]

表 41B：25℃（±2℃）和 60%相对湿度（±5%相对湿度）下冻干制剂的稳定性

规格		稳定性间隔						
测试	**验收标准**	**初始**	**2 周**	**1 个月**	**3 个月**	**6 个月**	**9 个月**	**12 个月**
冻干饼的外观-外观	报告结果	白色 多孔 结构均匀且在饼上方的瓶中存在一些固体沉着物	白色 多孔 结构均匀且在瓶中饼的上方存在一些固体沉着物。 瓶中在瓶塞上存在一些饼颗粒。	白色 均匀 上方存在一些沉着物质的饼	白色 多孔 结构均匀 且在瓶中饼的上方存在一些固体沉着物。	白色 饼位于瓶底	白色 多孔 结构均匀 且在瓶中饼的上方存在一些固体沉着物。	白色 多孔 结构均匀 且在瓶中饼的上方存在一些固体沉着物。

[0614]

溶液的完整性和清彻度	满足 USP <1> 的需求	N/T	N/T	N/T	未测试	符合	符合	符合
布林西多福韦平均含量	90.0 至 110.0 %	100.3	98.0	98.5	98.4	101.2	98.2	98.5
药物相关杂质-Synergi imp	报告结果	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
药物相关杂质-XBridge imp	报告结果	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
药物相关杂质-总杂质 = XBridge + Synergi	报告结果	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
pH	7.5 至 8.5	7.9	7.9	7.9	7.9	7.8	7.9	7.9
重建时间– Prep 1	报告结果	90	N/T	N/T	92	111	147	177
重建时间– Prep 2	报告结果	95	N/T	N/T	91	103	135	189
颗粒物–10 μm	≤6000	188	N/T	N/T	N/T	83	N/T	N/T
颗粒物–25 μm	≤600	4	N/T	N/T	N/T	2	N/T	N/T
水分平均值	报告结果	N/T	N/T	N/T	0.6	0.5	0.6	0.6

表 42：40℃（±2℃）和 60%相对湿度（±5%相对湿度）下冻干制剂的稳定性

规格		稳定性间隔					
测试	验收标准	**初始**	2 周	1 个月	2 个月	3 个月	6 个月
溶液的完整性和	报告结果	白色多孔	白色多孔	白色	白色 均匀	白色多孔	白色饼位于瓶

[0615]

清彻度		结构均匀且且在饼上方的瓶中存在一些固体沉着物	结构均匀且在瓶中饼的上方存在一些固体沉着物。 瓶中在瓶塞上存在一些饼颗粒	均匀 上方存在一些沉着物质的饼	壁的上方存在一些沉着物质的饼。 一个饼在-20℃，两个饼在5℃，以及一个饼在40℃，可以从瓶底移除。	结构均匀且在瓶中饼的上方存在一些固体沉着物。	底
溶液的完整性和清彻度	满足 USP <1> 的需求	未测试	未测试 按照方案	未测试 按照方案	符合	未测试	符合
布林西多福韦平均含量	90.0 至 110.0 %	100.3	97.5	99.1	98.8	98.5	99.6
药物相关杂质-Synergi imp	报告结果	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
药物相关杂质-XBridge imp	报告结果	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
药物相关杂质-总杂质=XBridge + Synergi	报告结果	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
pH	7.5 至 8.5	7.9	7.9	7.9	7.9	7.9	7.8
重建时间– Prep 1	报告结果	90	未测试 按照方案	未测试 按照方案	135	82	99

[0616]

重建时间- Prep 2	报告结果	95	未测试按照方案	未测试按照方案	126	77	106
颗粒物 – 10 μm	≤6000	188	未测试按照方案	未测试按照方案	未测试按照方案	未测试按照方案	未测试按照方案
颗粒物 – 25 μm	≤600	4	未测试按照方案	未测试按照方案	未测试按照方案	未测试按照方案	未测试按照方案
水分平均值	报告结果		未测试按照方案	未测试按照方案	未测试按照方案	0.6	0.6

[0617] 实施例7-大鼠和人全血相容性测定

[0618] 引言

[0619]　对于大鼠，各浓度的测试项目分别按1:4的比例与大鼠全血混合，而对于人，各浓度的测试项目分别按1:4的比例与人全血混合。这些样本加上对照样本[载剂对照(载剂+全血，1只大鼠和1个人)，阳性对照(1％皂苷+全血)，未处理全血和阴性对照(盐水+全血)进行溶血分析(上清液血红蛋白浓度)。

[0620]　将大鼠和人全血样品在测试或对照项目中于37±1℃下孵育20分钟，然后立即(在2分钟内)在室温下以3500±100rpm(2740g)离心5-10分钟。采用氰化高铁血红蛋白法在西门子Advia 120血液分析仪上提取上清液并进行血红蛋白分析。如果测试项目具有引起溶血的潜力，那么可以通过在氰化钾存在下将溶液中的血红素铁从亚铁氧化为铁状态的反应来量化从溶解的红细胞释放到血浆上清液中的血红蛋白。该反应导致高铁血红蛋白的形成，高铁血红蛋白之后与氰化物结合形成稳定的氰化高铁血红蛋白。当在546nm处测定分光光度时，氰化高铁血红蛋白的吸光度遵循比尔定律，并与释放到溶液中的血红蛋白的浓度成正比。此外，各评估浓度的配制的测试项目与生理盐水以1:4的比例混合，然后直接分析，以确保测试项目制剂不会干扰西门子Advia的血红蛋白的测量。

[0621]　材料和方法

[0622]　如下所述，实验分2个阶段进行：

[0623]　表43：第1阶段，大鼠血液中的布林西多福韦

[0624]

试管	大鼠血液*	测试项目(BCV)[a]	载剂[b]	阳性对照[c]	盐水[d]
1[e]	+	+ 0.2, 0.5 和 1.6 mg/mL	-	-	-
2[f]	-	+ 0.2, 0.5 和 1.6 mg/mL	-	-	+
3[g]	+	-	+	-	-
4[h]	+	-	-	+	-
5[i]	+	-	-	-	-
6[j]	+	-	-	-	+

[0625]

*1.0 mL加入到试管 1 (各浓度使用单独的试管) 和试管 3-6
[a]250 μL 加入到试管 1-2 (各浓度使用单独的试管)
[b]250 μL加入到试管3
[c]250 μL加入到试管4
[d]1.0 mL加入到试管2；250 μL加入到试管6
[e]测试项目测定溶血：
试管1A包含0.2 mg/mL
试管 1B 包含 0.5 mg/mL
试管 1C包含1.6 mg/mL
[f]测试项目干扰控制：
试管 2A 包含0.2 mg/mL
试管 2B 包含 0.5 mg/mL
试管 2C 包含 1.6 mg/mL
[g]载剂对照的溶血
[h]阳性对照的溶血；使用1% 皂苷作为阳性对照
[i]未处理全血对照的溶血
[j]阴性对照的溶血
+ 加入到试管
- 未加入到试管
注：各个阶段试管 3-6 在每阶段运行一次。

[0626]　表44：第2阶段，人血液中的布林西多福韦

[0627]

试管	人血*	测试项目(BCV)[a]	载剂[b]	阳性对照[c]	盐水[d]
1[e]	+	+0.2, 0.5 和 1.6 mg/mL	-	-	-
2[f]	-	+0.2, 0.5 和 1.6 mg/mL	-	-	+
3[g]	+	-	+	-	-
4[h]	+	-	-	+	-
5[i]	+	-	-	-	-
6[j]	+	-	-	-	+

[0628] *1.0 mL加入到试管1(各浓度使用单独的试管)和试管3-6

[a]250 μL 加入到试管1-2(各浓度使用单独的试管)

[b]250 μL加入到试管3

[c]250 μL加入到试管4

[d]1.0 mL加入到试管2;250 μL加入到试管6

[e]测试项目测定溶血:

试管1A包含0.2 mg/mL

试管 1B 包含 0.5 mg/mL

试管 1C包含1.6 mg/mL

[f]测试项目干扰控制:

试管 2A 包含0.2 mg/mL

试管 2B 包含 0.5 mg/mL

试管 2C 包含 1.6 mg/mL

[g]载剂对照的溶血

[h]阳性对照的溶血;使用1%皂苷作为阳性对照

[i]未处理全血对照的溶血

[j]阴性对照的溶血

+ 加入到试管

- 未加入到试管

注:各个阶段试管 3-6 在每阶段运行一次。

[0629] 对照项目(载剂)

[0630] 对照项目的剂量制剂为2份磷酸钠缓冲液(400mM,pH=8.0);1.0N氢氧化钠溶液;注射用无菌水;和5%葡萄糖溶液。

[0631] 测试准备与分析

[0632] 将布林西多福韦注射液原料制剂配制成15mg/mL布林西多福韦,来自于原料溶液的复合物包括三个(3)步骤:(1)制备2X磷酸钠缓冲液(400mM,pH=8.0);(2)购买1.0N氢氧化钠溶液;由固体布林西多福韦、1.0N氢氧化钠溶液、2X磷酸钠缓冲液和WFI(注射用水)制备布林西多福韦注射液原料制剂(15mg/mL布林西多福韦,200mM磷酸钠,pH=8.0)。

[0633] 在冷藏条件(2至8℃)下,布林西多福韦注射液原料制剂能够稳定存在28天。用5%葡萄糖稀释布林西多福韦注射液原料制剂,以获得所需剂量浓度。

[0634] 在试验当天制备新鲜剂量制剂。当不使用时,冷藏(2至8℃)剂量制剂。

[0635] 试验当天,用盐水稀释皂苷至适当浓度。

[0636] 测试系统

[0637] 在K_2EDTA抗凝剂存在下,收集大鼠(从4只动物中采集样品用于试验)全血(~20mL)并倒置混合。

[0638] 在K_2EDTA抗凝剂存在下,从一名人类志愿者收集人全血(~20mL)用于本研究。

[0639] 血样采集后,其在室温下保存不超过4小时,用于本研究的溶血潜力测试。

[0640] 测试方法

[0641] 对于大鼠,各浓度的测试项目分别按1:4的比例与大鼠全血混合,对于人,各浓度的测试项目分别按1:4的比例与人全血混合。这些样本加上对照样本[载剂对照(载剂+全血,1只大鼠和1个人),阳性对照(1%皂苷+全血),未处理全血和阴性对照(盐水+全血)进行溶血分析(上清液血红蛋白浓度)。

[0642] 将大鼠和人全血样品在测试或对照项目中于37±1℃下孵育20分钟,然后立即(在2分钟内)在室温下以3500±100rpm(2740g)离心5-10分钟。

[0643] 采用氰化高铁血红蛋白法在西门子Advia 120血液分析仪上提取上清液并进行血红蛋白分析。不希望拘泥于理论,如果测试项目具有引起溶血的潜力,那么可以通过在氰化钾存在下将溶液中的血红素铁从亚铁氧化为铁状态的反应来量化从溶解的红细胞释放到血浆上清液中的血红蛋白。该反应导致高铁血红蛋白的形成,高铁血红蛋白之后与氰化物结合形成稳定的氰化高铁血红蛋白。当在546nm处测定分光光度时,氰化高铁血红蛋白的吸光度遵循比尔定律,并与释放到溶液中的血红蛋白的浓度成正比。

[0644] 此外,各评估浓度的配制的测试项目与生理盐水以1:4的比例混合,然后直接分析,以确保测试项目制剂不会干扰西门子Advia的血红蛋白的测量。

[0645] 测试分2个阶段进行。

[0646] 使用4只正常大鼠和1位人供血者的全血进行两次独立地分析运行,以组成1批。

[0647] R&D系统全血质量控制装置在批前后运行,以验证仪器的运行性能,对于该对照组使用既定标准,对于对照材料,按指定制造商的范围设置。为了验证溶液相中血红蛋白测定的控制等级顺序,运行了一组独立的(点科学)低、中和高含血红蛋白对照组。阴性和阳性对照组,和测试样品以单线态运行。

[0648] <u>溶血潜力标准</u>

[0649] 运行标准:

[0650] 1%皂苷阳性对照必须显示血红蛋白值>(阴性对照+0.5g/dL)才能认为检测是可接受的。

[0651] 未经处理的全血必须显示血红蛋白值<(阴性对照+0.5g/dL)。

[0652] 盐水+未经处理的全血(阴性对照)必须显示血红蛋白值<0.5g/dL。

[0653] R&D系统全血对照组应该在规定的制造商的目标范围内。

[0654] 点科学液态血红蛋白对照没有针对ADVIA仪器建立目标范围,但应根据高>中>低的反应(基于浓度)显示等级顺序。

[0655] <u>样品分析标准</u>

[0656] 测试项目+盐水样品必须显示血红蛋白值<(阴性对照+0.5g/dL)才能被认为试验运行有效。

[0657] 载剂对照样品必须显示血红蛋白值<(阴性对照+0.5g/dL)才能被认为试验运行有效。

[0658] 使用从低、中和高浓度的人红细胞制备的包含溶血产物的(Pointe Scientific)液体QC对照组验证使用Advia氰化高铁血红蛋白工艺采用Advia测量液体溶血产物的能力。第1阶段的低、中和高液体对照组的返回值分别为:7.9、11.7和15.6g/dL。根据在西门子Advia上的测量,第2阶段的低、中和高液体对照组的返回值分别为:8.1、11.9和15.6g/dL。对照组的排名顺序满足方案标准。

[0659] 使用(R&D系统)全血质量对照组来验证西门子Advia 120血液学仪器的操作性能。记录在原始数据中的QC值在Advia仪器指定制造商的可接受的范围内。

[0660] 利用与胆固醇结合的两亲性糖苷皂苷在细胞膜双层中形成孔并引起红细胞裂解,进行阳性溶血对照。对于1％皂苷处理的大鼠和人全血溶血阳性对照。溶血在上清液中产生的平均血红蛋白浓度分别为3.9和11.0g/dL(表47、48、49和50)。这些值满足方案限定的试验血红蛋白浓度的允许标准(阴性对照+0.5g/dL)。

[0661] 第1、2阶段大鼠和人全血的载剂对照(5％葡萄糖)产生的平均血红蛋白浓度为0.0g/dL(表47、48、49和50)。两个阶段的载剂对照满足方案限定的样品分析标准<阴性对照+0.5g/dL)。

[0662] 来自两个阶段的血浆和阴性对照表现出0.0g/dL(表47、48、49和50)的平均血红蛋白浓度。这些值满足方案限定的未处理全血血红蛋白浓度<(阴性对照+0.5g/dL)以及盐水与未处理的全血血红蛋白浓度<0.5g/dL的试验允许标准。

[0663] 载剂对照为阴性,并且方法对照提供了预期目标值。所有对照检验表明在第1和2阶段中可接受的运行。

[0664] <u>布林西多福韦溶血潜力</u>

[0665] 大鼠全血中的布林西多福韦为0.2、0.5和1.6mg/mL时分别表现出0.0、0.25和1.35g/dL的平均血红蛋白浓度(表47、48、49和50),并概括如下:

[0666] 表45:大鼠全血中的布林西多福韦

[0667]

试管	含量	平均 HgB 浓度 (g/dL)	预计 % 溶血*
1A	测试项目 (0.2 mg/mL) + 全血	0.0	-
1B	测试项目 (0.5 mg/mL) + 全血	0.25	2.4%
1C	测试项目 (1.6 mg/mL) + 全血	1.35	13.0%

[0668] *计算为:(HgB血浆)/(正常HgB全血×稀释因子)*100

[0669] 基于正常全血大鼠血红蛋白值为13g/dl(根据我们的HCD)

[0670] 点科学对照(Point Scientific controls)是验证溶液相中血红蛋白测量的系统试验。如本文所述,布林西多福韦在大鼠全血中显示出溶血潜能效应,该效应似乎与浓度有关。在0.5mg/mL浓度下观察到该效应的推定证据,在1.6mg/mL浓度下观察到更明显的溶血证据。

[0671] 本研究中血红蛋白可检测水平的预计％溶血可以用大鼠全血平均正常血红蛋白浓度和适宜的稀释因子计算。例如,用实验方法校正稀释的大鼠全血正常血红蛋白值为13g/dL,结果值为10.4g/dL(13x 0.8)。血红蛋白值为0.25和1.35g/dL的计算％溶血分别为2.4％和13.0％。制剂的溶血值<10％被认为是非溶血的,而值>25％被认为有溶血的危险(Amin and Dannenfelser,2006)。不希望拘泥于理论,0.2mg/mL的浓度显示出未检测的血红蛋白,因此被认为是非溶血性的。0.5和1.6mg/mL的浓度导致大鼠全血中可检测的血红蛋白水平,但上述水平不被认为具有溶血风险。

[0672] 来自于第2阶段的两次(n＝2)独立分析运行结果表明,浓度为0.2、0.5和1.6mg/mL时,布林西多福韦对人全血的血液相容性没有影响,并概括如下:

[0673] 表46:人全血中的布林西多福韦

[0674]

[0675]

试管	含量	平均HgB 浓度(g/dL)	预计%溶血*
1A	测试项目 (0.2 mg/mL) + 全血	0.0	-
1B	测试项目 (0.5 mg/mL) + 全血	0.0	-
1C	测试项目 (1.6 mg/mL) + 全血	0.0	-

[0676] *计算为:(HgB血浆)/(正常HgB全血×稀释因子)*100

[0677] 基于正常全血女性血红蛋白值为14g/dL(根据Mayo诊所的在线数据)

[0678] 此外,在第1和2阶段均未发现布林西多福韦干扰血红蛋白浓度的测定(表47、48、49和50)。测试项目对照满足方案限定的样本分析标准,该标准表明第1和2阶段的可接受的运行。

[0679] 来自于第1阶段的两次(n=2)独立分析运行结果表明,不希望拘泥于理论,布林西多福韦在大鼠全血中表现出溶血可能效应,该效应似乎与浓度有关。不希望拘泥于理论,在0.5mg/mL浓度下观察到该效应推定证据,在1.6mg/mL浓度下观察到溶血的明确证据。溶血值<10%的制剂被认为是非溶血的,而值>25%的制剂被认为有溶血的危险。0.2mg/mL浓度表现出没有可检测的血红蛋白,因此被认为是非溶血性的。0.5和1.6mg/mL的浓度导致大鼠全血中可检测的血红蛋白水平,但上述水平不被认为是溶血风险。

[0680] 来自于第2阶段的两次(n=2)独立分析运行结果表明,浓度为0.2、0.5或1.6mg/mL时,布林西多福韦对人全血的血液相容性没有影响。

[0681] 不希望拘泥于理论,并非所有物种都对阳性溶血试剂的反应相同,这可能代表物种之间的RBC脆性差异。

[0682] 表47:溶血潜能结果概述;第1阶段中大鼠血中的布林西多福韦

[0683]

试管	含量	平均 HgB 浓度 (g/dL)	预计% 溶血*
1A	测试项目 (0.2 mg/mL) + 全血	0.0	-
1B	测试项目 (0.5 mg/mL) + 全血	0.25	2.4%
1C	测试项目 (1.6 mg/mL) + 全血	1.35	13.0%
2A	测试项目 (0.2 mg/mL) + 盐水	0.0	-
2B	测试项目 (0.5 mg/mL) + 盐水	0.0	-
2C	测试项目 (1.6 mg/mL) + 盐水	0.0	-
3	测试项目载剂 + 全血	0.0	-
4	阳性对照 (全血+ 1.0% 皂苷)	3.9	37.5%
5	血浆对照 (全血)	0.0	-
6	阴性 (盐水+全血)	0.0	-

[0684] *计算为:(HgB血浆)/(正常HgB全血×稀释因子)*100

[0685] 基于正常全血大鼠血红蛋白值为13g/dl(根据我们的HCD)

[0686] 表48:溶血潜能结果概述;第2阶段人血中的布林西多福韦

[0687]

试管	含量	平均 HgB 浓度 (g/dL)	预计 % 溶血*
1A	测试项目 (0.2 mg/mL) +全血	0.0	-
1B	测试项目 (0.5 mg/mL) +全血	0.0	-
1C	测试项目 (1.6 mg/mL) +全血	0.0	-
2A	测试项目 (0.2 mg/mL) +盐水	0.0	-
2B	测试项目 (0.5 mg/mL) +盐水	0.0	-
2C	测试项目 (1.6 mg/mL) +盐水	0.0	-
3	测试项目 载剂+全血	0.0	-
4	阳性对照 (全血+ 1.0% 皂苷)	11.0	98.2%
5	血浆对照 (全血)	0.0	-
6	阴性 (盐水+全血)	0.0	-

[0688] *计算为:(HgB血浆)/(正常HgB全血×稀释因子)*100

[0689] 基于正常全血女性血红蛋白值为14g/dL(根据Mayo诊所的在线数据)

[0690] 表49:溶血潜能结果(血红蛋白浓度g/dL):第1阶段大鼠血中的布林西多福韦

[0691]

	试管编号						
测试样品	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3
运行 1	0.0	0.2	1	0.0	0.0	0.0	0.0
运行 2	0.0	0.3	1.7	0.0	0.0	0.0	
平均	0.0	0.25	1.35	0.0	0.0	0.0	0.0
SD	0.0	0.1	0.5	0.0	0.0	0.0	
	试管编号						
对照	4	5	6				
运行 1	3.9	0.0	0.0				

[0692] 表50:溶血潜能结果(血红蛋白浓度g/dL):第2阶段人血中的布林西多福韦

[0693]

	试管编号						
测试样品	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3
运行 1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
运行 2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
平均	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
SD	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	

[0694]

	试管编号						
对照	4	5	6				
运行 1	11.0	0.0	0.0				

[0695] 1A＝0.2mg/mL时测试项目的溶血试验

[0696] 1B＝0.5mg/mL时测试项目的溶血试验

[0697] 1C＝1.6mg/mL时测试项目的溶血试验

[0698] 2A＝0.2mg/mL时测试项目干扰控制

[0699] 2B＝0.5mg/mL时测试项目干扰控制

[0700] 2C＝0.5mg/mL时测试项目干扰控制

[0701] 3＝载剂对照的溶血

[0702] 4＝溶血阳性对照;1％皂苷作为一个阳性对照

[0703] 5＝未处理全血对照的溶血

[0704] 6＝阴性对照的溶血

[0705] SD＝标准差

[0706] 实施例8-大鼠的最大耐受剂量和7天剂量范围确定(DRF)研究

[0707] 2-阶段研究的目的是确定布林西多福韦的最大耐受剂量(MTD),当通过单次2小时的静脉输注给药给大鼠并评估毒性时,以及在第1、4天和第7天,当通过2小时的静脉输给药加给大鼠时,布林西多福韦的单次、重复和毒性动力学特征。

[0708] 本研究的结果可以允许作出关于当通过静脉输注给药时布林西多福韦的后续毒性研究的剂量水平的决定。

[0709] 本研究设计纳入了毒性研究的一般管理指南的要素。

[0710] 总结

[0711] 本研究包括两个阶段,第1阶段为最大耐受剂量(MTD)研究,第2阶段为重复剂量范围确定(DRF)研究。

[0712] 第1阶段期间评估的参数为:存活率和临床观察。

[0713] 对于第1阶段,通过一次2小时的IV输注以2、4、10或15mg/kg对Sprague-Dawley CD®大鼠(2/性别/给药间隔)给药布林西多福韦。最大可行剂量(MFD)限制为15mg/kg,因为当给药溶液中布林西多福韦的浓度超过1mg/mL时,溶血潜力增加。对于所有给药间隔,剂量体积为10mL/kg/hr。每次剂量给药后进行2-3天的观察期。在第1阶段治疗期结束时,对所有动物实施安乐死并丢弃而不进行宏观检查。

[0714] 第2阶段期间评估的参数为:存活率、临床观察、体重、食物消耗、血液学(结束给药)、临床化学(结束给药)和宏观观察。

[0715] 对于第2阶段,在第1天、第4天和第7天通过2小时的IV输注以一次0[2X磷酸钠缓冲液(400mM,pH 8.0±0.04)]、1或15mg/kg对Sprague-Dawley CD®大鼠(5/性别/组)给药布林西多福韦。所有组的剂量体积为10mL/kg/hr。在第1阶段治疗期结束时,对所有动物实施安乐死并进行尸体剖检。对第2阶段卫星动物(3/性别/组1和6/性别/组2-3)进行类似剂量给药,并在第1天和第7天收集血液样品用于布林西多福韦及其代谢产物西多福韦的毒性动力学分析。

[0716] 术语的缩写和定义列表

[0717]

缩写或专业术语	说明
AUC_{inf}	从时间 0 推算到无穷大，血浆浓度-时间曲线下的面积
AUC_{inf} % Extrap	T_{last} 后发生的 AUC_{inf} 百分比
AUC_{last}	从时间 0 到最后可测量血浆浓度的时间，血浆浓度-时间曲线下的面积
$AUC_{last/D}$	从时间 0 到最后可测量血浆浓度归一化为剂量的时间，血浆浓度-时间曲线下的面积
BLQ	低于检测极限
CL	表观总清除率
C_{max}	在给药间隔期间观察到的最大浓度
布林西多福韦	十六烷氧基丙基-西多福韦
CMX021	布林西多福韦代谢物：西多福韦
%CV	变异系数（%）
DRF	确定的剂量范围
K_2EDTA	抗凝血剂
LLOQ	低于量化下限
M/P 比:	代谢物和母体的曝光参数(C_{max} 和/或 AUC_{last}) 的比率。通过首先将相关参数转换为摩尔单位，然后将代谢物的摩尔暴露值除以母体化合物的摩尔暴露值来计算 M/P 比。
MTD	最大耐受剂量
IV	静脉给药
TK	毒性动力学（s）
$t_{½}$	表观终末半衰期(aka $t_{1/2elim}$)
T_{last}	最后可测量浓度的时间
T_{max}	最大血浆浓度的时间
V_z	表观分布体积，终末相

[0718] 第1阶段

[0719] 通过2小时的IV输注以2、4、10或15mg/kg的单剂量的布林西多福韦对所有动物给药,使其存活直至其预定的安乐死。

[0720] 以2、4或15mg/kg给药布林西多福韦时,在一些雄性和雌性动物中导致间歇性临床症状。在动物中以10mg/kg布林西多福韦给药未观察到临床症状。间歇性临床症状包括快速呼吸和俯卧姿势,有或没有毛发直立,部分闭合的眼睛,和活动减少,或呼吸不规则,或有或没有不规则呼吸、毛发直立和双侧部分闭合的眼睛的活动减少。临床症状是可逆的并且在显示出症状的第1和2组动物中,在输注结束时或在输注结束后45分钟内临床症状消退。临床症状是可逆的并且在显示出症状的组4中,在输注结束后3小时和22分钟内临床症状消退。

[0721] 在本研究中的条件下,所有剂量都是良好耐受的。因此,未确定最大耐受剂量水平,并且15mg/kg被认为是最大可行剂量(MFD)。

[0722] 第2阶段

[0723] 在7天的时间内以三次1和15mg/kg/天的布林西多福韦总剂量对所有动物给药,使其存活直至其预定的安乐死。

[0724] 在雄性或雌性动物中以1mg/kg/天或15mg/kg/天给药布林西多福韦不会导致任何

与布林西多福韦相关的临床症状。

[0725] 在第1天和第7天(第1组)开始给药后2小时,或在第1天开始给药后1、2、8和24小时和在给药之前和在第7天(第2和3组)开始给药后2、8和24小时收集血浆样品(108),并通过LC/MS/MS分析以确定布林西多福韦和其代谢物西多福韦)的浓度。

[0726] 通常在2小时IV输注结束时观察到布林西多福韦的峰值浓度,并迅速下降。通常,平均布林西多福韦C_{max}和AUC增加大致与从1至15mg/kg的剂量增加相符,然而1mg/kg之后的AUC基于有限的浓度-时间数据。与第1天相比,在第7天的布林西多福韦C_{max}和AUC_{last}值显示出第7天的值较低的趋势[第7天/第1天累积比(AR)为0.44至0.54]。未观察到布林西多福韦TK参数具有性别差异。总体而言,代谢物西多福韦的增加小于布林西多福韦剂量增加的比例。西多福韦TK参数中没有出现明显的性别差异并且重复给药后TK参数没有变化。

[0727] 与布林西多福韦相关的血液学发现局限于雄性和雌性网织红细胞的轻微下降,给药15mg/kg布林西多福韦(分别为-33%和-30%对照;仅在雄性中具有统计学显著性),在雌性(+2.1%对照,统计学显著性)中与平均细胞血红蛋白浓度(MCHC)相关。在7天的给药阶段结束时,红细胞量(血红蛋白,血细胞比容,红血细胞)减少可忽略不计(相对于-4.2%对照)。

[0728] 在给药15mg/kg布林西多福韦的雄性中(+3.8%;不具有统计学显著性)以及给药≥1mg/kg布林西多福韦的雌性中(+4.9%;统计学显著性)具有最小的与布林西多福韦相关的总钙含量的增加,并且在给药15mg/kg的雌性中(+29%;统计学显著性)具有最小尿素(BUN)的增加。

[0729] 在第1、4和7天通过2小时的IV输注给药1和15mg/kg/天布林西多福韦,耐受性良好。

[0730] <u>给药的途径、持续时间和频率</u>

[0731] 在第1阶段,通过2小时的静脉输注向每只动物给药单剂量布林西多福韦。在每个剂量间隔,对幼稚动物以递增的剂量给药,以确定最大耐受剂量(MTD)。MTD数据被用于选择第2阶段的剂量。

[0732] 在第2阶段,在第1、4和7天,通过2小时的静脉输注给药选择的剂量以评估布林西多福韦的重复剂量的毒性,并有助于后续毒性研究的剂量的选择。七天的研究可以适合于为随后的重复剂量GLP毒性研究选择剂量。

[0733] <u>动物数量</u>

[0734] 本研究中的动物数量被认为是统计、监管和科学原因所必需的最小数量。

[0735] 第1阶段(MTD)中的动物数量(2/性别/剂量间隔)是确定雄性和雌性大鼠中最大耐受剂量所需的最小数量。预计四个剂量水平布林西多福韦足以确定最大耐受剂量。尽管存在2-3天的观察期,在每个剂量水平使用新动物以消除重复给药可能产生的加性效应,这种加性效应可能混淆最大耐受单剂量水平的确定。

[0736] 第2阶段(DRF)中的主要研究动物(5/性别/组)的数量是控制动物之间预期变异性的最小数量。

[0737] 阴性对照组和接受建议的低倍数和高倍数的人类剂量的两个布林西多福韦处理的组被认为是建立基准和提供一系列效应以及允许对结果进行外推以进行额外的重复剂量研究所需的最小组数。

[0738] 考虑到分布、代谢和排泄过程的固有变异性,在第2阶段(DRF)毒性动力学评估卫星毒性动力学研究的动物(6/性别/治疗组)数量被认为是提供有意义数据所必需的最小数量。具有每种性别3只动物的对照组证实没有布林西多福韦暴露。

[0739] 剂量选择

[0740] 本研究的第1阶段的起始剂量为2mg/kg。

[0741] 基于本发明研究的第2阶段的研究结果,选择本研究第2阶段的低剂量和高剂量(1和15mg/kg)。在一些实施方式中,在本研究的第1阶段期间,在给药15mg/kg的动物中,在给药后观察期间由于缺乏临床症状而选择低剂量和高剂量。

[0742] 实验大纲

[0743] 对于第1阶段(MTD),通过静脉输注(2小时)在幼稚雄性大鼠和雌性大鼠中以单剂量递增的方式给药多达四个剂量水平的布林西多福韦。每次剂量给药伴随着2-3天观察期。根据对先前剂量的反应,增加随后的每个剂量水平并给幼稚动物给药,直到确定最大耐受剂量(MTD),或者直到实现基于先前溶血证据的15mg/kg的最大可行剂量(MFD)。

[0744] 表51:4个给药间隔构成的第1阶段(MTD)研究

[0745]

剂量间隔(组)	治疗	剂量(mg/kg)[a]	动物数量		浓度(mg/mL)	体积剂量(mL/kg/hr)
			雄性	雌性		
1	BCV	2	2	2	0.1	10
2	BCV	4	2	2	0.2	10
3	BCV	10	2	2	0.5	10
4	BCV	15	2	2	0.75	10

[a]剂量表示活性成分

[0746] 对于第2阶段(DRF),在第1、4和7天通过对大鼠进行2小时的IV输注,向测试组和对照组给药。

[0747] 表52:第2阶段研究:1个对照组和2个治疗组

[0748]

组	治疗	剂量(mg/kg)[a]	动物数量				浓度(mg/mL)	体积剂量(mL/kg/hr)
			主要研究		卫星研究(satellite study)[b]			
			雄性	雌性	雄性	雌性		
1	对照	0	5	5	3	3	0	10
2	BCV	1	5	5	6	6	0.05	10
3	BCV	15	5	5	6	6	0.75	10

[a]剂量表示的是活性成分

[b]卫星动物仅用于毒性动力学血液采样。

[0749] 通过混合适量的磷酸二氢钠溶液(400mM)和磷酸一氢钠溶液(400mM)制备2X磷酸钠缓冲液(400mM,pH 8.0±0.04)载剂溶液。必要时用磷酸二氢钠溶液(400mM)调节溶液的pH值。溶液滤过位于层流净化罩之下的0.22μm Millex®-GP过滤器而进入无菌容器。

[0750] 在2-8℃冷藏条件下储存载剂(对照组)。在每个阶段之前制备一次新鲜载剂溶液，并在制备后一个月内使用。

[0751] 通过混合适量的布林西多福韦与2X磷酸钠缓冲液、注射用无菌水、USP和1N氢氧化钠(NaOH)制成15mg/mL布林西多福韦原料。溶液滤过位于层流净化罩之下的0.22μm Millex® -GP过滤器而进入无菌容器。

[0752] 在位于层流净化罩下的无菌瓶中，通过适量的5％葡萄糖注射液，USP稀释适量的布林西多福韦原液(15mg/mL)或适量的原液载剂(2X磷酸钠缓冲溶液)，并倒置10次使其混合以制备用于第1阶段和第2阶段的剂量制剂。在第1阶段和第2阶段，在每个给药日制备新鲜剂量制剂，并2-8℃的条件下冷藏储存，并在不使用时防止光线照射。

[0753] 给药方法

[0754] 途径

[0755] 静脉输注持续2小时。在20mL/kg/2小时的恒定剂量下进行处理。

[0756] 输注导管植入程序

[0757] 输注导管在剂量给药前约1-2周植入。所有动物，包括备用的动物，通过手术植入导管。

[0758] 手术部位是根据无菌的、恢复性外科手术的测试设备的标准操作程序(SOP)准备的。动物预先接受镇痛剂(氟尼辛葡胺(USP)2mg/kg，皮下)。

[0759] 所有动物在腹股沟和背部进行麻醉(异氟醚)并剃毛。制作小切口并分离股静脉。在血管上执行小切口，并将无菌导管放置在血管内。导管经股静脉插入，逆行进入肾脏尾端的下腔静脉。用缝线固定导管，然后从皮下穿出，以便在颈后部排出。在外部部位制作一个小口袋，其中留有一圈导管。通过缝合线将腹股沟区域缝合。

[0760] 将动物置于夹套中，植入的导管用带帽的隔膜连接器固定在销上。导管用滔罗定柠檬酸盐(taurolidine citrate)封闭溶液封闭。每只动物在手术当天肌内注射5.0mg/kg的恩氟沙星。

[0761] 输注导管维护程序

[0762] 在将动物用于研究之前，根据测试设备的SOP评估植入的股静脉导管的通畅性。

[0763] 体积剂量(速率)

[0764] 20mL/kg/2小时(10mL/kg/小时)。

[0765] 个体剂量浓度

[0766] 根据最近记录的排定的体重计算个体动物浓度。

[0767] 频率和持续时间

[0768] 在第1阶段，每只动物通过静脉输注解释单次计量给药，在每个剂量间隔后伴随有2-3天的观察期。在单次静脉(2小时)输注后，移除动物的口袋和给药装置，并且不返回生理盐水维持。

[0769] 在第2阶段，在第1、4和7天通过静脉输注(2小时)向每只动物给药布林西多福韦。在给药之间，动物位于速率为0.5mL/小时的无菌盐水中。在第7天完成剂量给药后，将导管打结(将结置于导管中，且导管在皮肤下退回)并移除口袋。

[0770] 给药部位

[0771] 在股静脉/腔静脉的通过外科手术植入的插管。

[0772] 给药程序

[0773] 在给药开始前一至两天,从每只动物的植入的导管中取出封闭溶液(如果可能的话),在连接到系绳和输注给药装置之前,用盐水冲洗导管。在连接到动物的导管后,通过校准的Medfusion注射器泵以0.5mL/hr的速率向动物注射无菌盐水(0.9%NaCl,USP),直至第1天剂量给药。

[0774] 在输注管路中注入盐水冲洗液以输送布林西多福韦,并确保完全剂量(以与布林西多福韦相同的速率,额外~0.5至1mL体积来冲洗导管线路)的输送。

[0775] 给药精度

[0776] 计算并且检查每天输注的可计量性(确认实际剂量给药)以进行日常调整。在每个阶段,在给药开始前和剂量给药结束后检查泵的准确性。

[0777] 采集次数和动物数量

[0778] 获得血液样品,用于第2阶段期间布林西多福韦的血浆浓度的测定。

[0779] 表53:采集次数和动物数量

[0780]

间隔	时间点	动物数量
第 1 天	剂量给药开始后 2 小时	3 只动物/性别/第 1 组
	剂量给药开始后 1、2、8 和 24 小时	3 只动物/性别/第 2-3 组
第 7 天	剂量给药开始后 2 小时	3 只动物/性别/ 第 1 组
	给药前,以及剂量给药开始后 2、8 和 24 小时	3 只动物/性别/第 2-3 组

[0781] 在第1天和第7天,获取血液样品并用于上述时间点的毒性动力学测定。

[0782] 采集程序

[0783] 在每个时间点通过尾静脉从每只动物获得大约0.4mL的全血。在采集血液之前动物没有禁食。在处理之前,根据设备SOP,将血液收集到含有K_2EDTA抗凝剂的管中,并以直立的状态放置在湿冰上。通过离心分离血浆(10分钟,在约2000g,在约2-8℃)。将约0.10mL血浆转移到一个冷冻管中,并适当地用研究数、动物数、时间点、取样日期和样品类型标记。剩余的血浆被转移到第二个冷冻管,并作为备用样品保留。每份血样采集后约2小时内,在大约80±10℃下冷冻血浆直至分析。动物在最后采血后被安乐死(CO_2吸入)。

[0784] 所有血浆样品管被冷冻储藏(80±10℃)并运输(冷冻,在干冰上)美国科罗拉多州科罗拉多斯普林斯市的Pyxant实验室进行分析。样品在收集的1个月内运输。

[0785] 一般来说,采用Phoenix WinNonLin(V 6.3),使用来自复合血液采样设计的布林西多福韦和西多福韦衍生物的平均血浆浓度来估计TK参数。

[0786] 每天两次观察笼子里的动物的死亡率和严重毒性或药理作用的症状。

[0787] 对于剂量观察,第1阶段:记录在输注期间观察到的亚健康或毒性或药理作用的症

状(例如,一般情况、外观、活动、行为、呼吸等中的异常)。

[0788] 将动物从笼子中取出,并进行一次预检查。检查包括一般情况、皮肤和皮毛、眼睛、鼻子、口腔、腹部和外部生殖器的观察,以及呼吸的评估。

[0789] 体重

[0790] 第1阶段:将动物从笼中取出并在每次给药前预称重两次。

[0791] 第2阶段:将动物从笼中取出并在每次给药前和第7天下午期间最后一次剂量给药之后预称重两次。最终,仅在尸检前获得禁食体重。

[0792] 在第2阶段给药前一周开始,每周测量(称重)食物消耗。

[0793] 将在轻度异氟醚麻醉下,通过眶窦(球后静脉丛)作为终末工序获得的血液用于分析给药终止时所有动物的血液学和临床化学参数。在血液采集前,动物被禁食过夜。在血液采集后,不允许动物从麻醉中恢复。

[0794] 血液学

[0795] 将血液样品(约0.25mL)收集到含有K_2EDTA抗凝剂的试管中,并使用西门子ADVIA 120血液分析仪进行下列分析:血红蛋白浓度(HGB);红细胞压积(HCT);红细胞计数(RBC);血小板计数(PLT);平均红细胞体积(MCV);平均红细胞血红蛋白(MCH);红细胞平均血红蛋白浓度(MCHC);红细胞分布宽度(RDW);白细胞总数(WBC);网织红细胞计数(RETIC);分化白细胞计数(进行手动分化白细胞计数以用于核实,必要时计算绝对值);中性白细胞(ANEU);淋巴细胞(ALYM);嗜酸性粒细胞(AEOS);嗜碱性粒细胞(ABASO);单核细胞(AMONO);大的未染色细胞(ALUC);

[0796] 在每个血液采集间隔为每只动物准备末梢区域的血液涂片,用于确认自动化结果和/或临床病理学家认为必要的其他评价。

[0797] 临床化学

[0798] 将血液样品(约1mL)收集到没有抗凝剂的试管中,使其凝固,离心以获得血清,并使用西门子ADVIA 1800化学分析仪进行下列分析:天冬氨酸氨基转移酶(AST)(动力学-改性的Bergmeyer);丙氨酸转氨酶(ALT)(动力学-改性的Bergmeyer);碱性磷酸酶(ALKP)(动力学-Tietz AMP缓冲液);血尿素氮(BUN)(酶-Roch-Ramek和脲酶);肌氨酸酐(CREAT)(碱性介质中的Jaffe Picric酸);葡萄糖(GLU)(葡萄糖己糖激酶II法);胆固醇(CHOL)(酶酯酶/氧化酶-Trand端点);甘油三酯(TRIG)(Fossati三步法酶-Trinder端点);总蛋白质(TP)(缩二脲技术);清蛋白(ALB)(溴甲酚绿法);总胆红素(TBILI)(钒酸盐氧化);钠(NA^+)(离子选择电极);钾(K^+)(离子选择电极);氯(Cl^-)(离子选择电极);钙(Ca^{++})(Michaylova&Ilkova,偶氮胂III);无机磷(磷钼酸盐-UV法)。

[0799] 验尸

[0800] 第1阶段:所有动物通过在吸入二氧化碳后放血实施安乐死,并在观察期结束后不经宏观检查而被丢弃。

[0801] 第2阶段:主要DRF研究动物在吸入异氟醚后通过放血实施安乐死,以及TK卫星动物通过二氧化碳吸入实施安乐死。

[0802] 在第8天,对第2阶段的主要研究动物进行尸体剖检。动物在尸体剖检前禁食过夜。

[0803] 对第2阶段的主要研究动物进行全面的宏观检查。宏观检查包括检查外表面和所有孔;脑和脊髓的外表面;颅、胸、腹、盆腔和颈部的器官和组织;以及尸体的其余部分是否

存在肉眼可见的形态异常。在检查后丢弃所有动物;不收集或保存任何组织。

[0804] 以下缩写用于血液学:CS:凝血标本;LA:实验室事故;NVIM;因结果不可靠而无效;CLSE:注意到严重的血小板聚集;CLSL:注意到轻微的血小板聚集;NCLP:无聚集。

[0805] 血液化学:未计算低于分析极限(<0.2)的TBILI值。

[0806] 按照:总蛋白-清蛋白计算球蛋白(GLOB)

[0807] 按照:清蛋白/球蛋白比(A/G)计算清蛋白/球蛋白

[0808] 以个体动物作为基本实验单元,对雄性和雌性分别进行所有统计学分析。

[0809] 对于第2阶段,在每个时间点分别分析以下数据类型:体重;从间隔到间隔的体重变化;从基线的累积体重变化食物消耗、血液学和临床化学。分析的参数被确认为连续的、离散的或二进制的。然后使用以下程序比较布林西多福韦治疗组和对照组。

[0810] 生活研究行为

[0811] 下表54总结了关于研究行为的细节,包括但不限于试验动物、研究材料、研究设计、给药、观察和结果。

[0812] 表54:实验设计研究总结(第2阶段)

[0813]

		物种和品种: 雄性和雌性 [Crl:CD (SD)BR] (源自 Sprague-Dawley)	载剂:200 mM 磷酸钠缓冲液,pH 8,用 5% 葡萄糖变量稀释
研究设计			
组数	剂量 (mg/kg)	采样方案	
1	0	在第 1 天和第 7 天: 3 只动物/性别: 剂量载剂给药开始后 2 小时	
2	1	第 1 天: 3 只动物/性别/时间点: 剂量给药开始后 1、2、8、和 24 小时 第 7 天: 3 只动物/性别/时间点: 给药前,剂量给药开始后 2、8、和 24 小时	
3	15	与第 2 组相同	

[0814] 采样

[0815] 使用复合血液采样设计,使得对每只大鼠在每个采样日取样两次。根据表54中所示的方案采集血液样品。通过尾静脉从未麻醉的动物中将血液收集到含有抗凝血剂的管中,并将其以直立的状态放置于湿冰上。在血液采集动物没有被禁食。通过离心(在约2000g时为10分钟,在约2-8℃)分离血浆,并转移到单独标记的冷冻管中。对所有含有收集的血浆样品的冷冻管适当标记了研究数量、动物数量、时间点、取样日期和样品类型。

[0816] 获得所有血浆样品并在收集每个血液样品后约2小时内在约-80℃(±10℃)冷冻直至分析。

[0817] 所有血浆样品被冷冻储存[约-80℃(±10℃)]并运输(冷冻,在干冰上)到Pyxant实验室进行分析。

[0818] 生物分析方法

[0819] 通过Pyxant实验室进行大鼠血浆生物分析。在LC-MS/MS分析之后,使用基于蛋白质沉淀萃取的方法测定血浆样品中布林西多福韦和西多福韦的浓度;对于大鼠血浆中50μL的等分试样,布林西多福韦和西多福韦的校正范围分别为1.00-1500ng/mL和5.00-750ng/mL(Pyxant第3025号研究)。作为非-GLP研究的一部分,不进行ISR样品分析。

[0820] 数据分析

[0821] 毒性动力学分析

[0822] 为了生成均值曲线,所有低于定量极限(BLQ)的样品浓度都设置为0。

[0823] 将这些值记录在表61和表62中,原始的BLQ在标记为[浓度]的列中,平均值计算的估算值在标记为[估算浓度]的列中。

[0824] 用于NCA目的的均值曲线BLQ值的处理记录在表63和表64中,并且原始的均值曲线BLQ在标记为[平均浓度]的列中,用于NCA分析的估算值在标记为[估算平均浓度]的列中。将在早期时间点(T_{max}之前)的BLQ值设置为0,将在T_{max}之后的时间点的BLQ值设置为丢失。

[0825] 使用非分区的模型(用于IV输注给药的模型200-202)完成所有药代谢动力学参数估计。使用线性在上记录在下梯形法则计算AUC_{last}和AUC_{inf}。

[0826] 统计分析仅限于描述性统计分析,包括算术平均值、标准偏差、算术平均值的%CV。

[0827] 对于布林西多福韦,平均血浆浓度的变异系数(%CV)的范围为(9.98至173%CV),以及对于西多福韦,平均血浆浓度的变异系数(%CV)的范围为(4.82至173% CV)。

[0828] 布林西多福韦的峰值浓度通常在2小时IV输注结束时观察到,并迅速下降;1mg/kg给药开始8小时后和15mg/kg给药之后24小时,布林西多福韦浓度处于或接近定量下限(LLOQ,1ng/mL)。由于没有足够的数据点来表征消除阶段,因此不能确定终末半衰期(t1/2)、CL和Vss。一般来说,平均布林西多福韦C_{max}和AUC增加大致正比于从1至15mg/kg给药的增加,尽管在1mg/kg给药之后AUC根据少量浓度值测定。与第1天相比,在第7天的布林西多福韦C_{max}和AUC_{last}值显示出第7天的值较低的趋势[第7天/第1天累积比(AR)为0.44至0.53]。进一步地,未观察到布林西多福韦TK参数具有性别差异。

[0829] 总体而言,代谢物西多福韦暴露量增加小于布林西多福韦给药增加的比例,TK参数没有明显的性别差异,并且重复给药后TK参数没有变化。

[0830] 仅在第2阶段期间对收集的108个血浆样品进行生物分析,以确定布林西多福韦和西多福韦代谢物,西多福韦的浓度。在第1天和第7天(第1组)给药开始后2小时,或在第1天给药开始后1、2、8和24小时,以及在第7天(第2组和第3组)在给药前和给药开始后2、8和24小时收集血浆样品,并通过LC/MS/MS进行分析。

[0831] 仅对第2阶段进行了布林西多福韦和西多福韦的血浆浓度的毒性动力学分析。

[0832] 在第1天和第7天,布林西多福韦C_{max}的增加大致与剂量成比例(对于雌性大鼠),或小于剂量的比例(对于雄性大鼠)。当从1mg/kg至15mg/kg的15倍的剂量增加时,对于雌性C_{max}增加17.3倍至18.2倍,对于雄性C_{max}增加9.2倍至18.6倍。在第1天和第7天,布林西多福韦AUC_{last}大致成比例增加(对于雌性大鼠);当剂量增加15倍时,AUC_{last}增加14.1倍至16.1倍。由于1mg/kg给药后雄性大鼠中数据点的不足,无法确定AUC_{last}的比例。

[0833] 在雌性和雄性动物之间,对于1或15mg/kg给药,在第1天和第7天的布林西多福韦C_{max}是相似的(差异在54%以内)。由于数据点不足以计算雄性的AUC,对于1mg/kg给药,无法比较布林西多福韦AUC_{last}。对于15mg/kg给药,第1天和第7天的布林西多福韦AUC_{last}在雌性和雄性动物之间是相似的(差异在16%以内)。

[0834] 和第1天相比,对于雌性动物以1mg/kg每周两次给药布林西多福韦后,以及对于雌性和雄性动物,15mg/kg后,第7天的布林西多福韦C_{max}和AUC_{last}值,表现出在第7天趋向于更低的C_{max}和AUC_{last}(第7天/第1天累积比(AR)为0.44至0.53)。

[0835] 表55:在第1、3和7天对大鼠单次和多次2小时静脉输注给药布林西多福韦后布林西多福韦TK参数(第2阶段)

[0836]

TK 参数	布林西多福韦剂量 (mg/kg)							
	1				15			
	雄性		雌性		雄性		雌性	
	时期				时期			
	第 1 天	第 7 天	第 1 天	第 7 天	第 1 天	第 7 天	第 1 天	第 7 天
T_{max} (h)	2	2	2	2	1	2	1	2
T_{last} (h)	2	2	8	8	24	24	24	24
C_{max} (ng/mL)	235	208	191	95.4	4370	1910	3470	1660
C_{max}/剂量 [(ng/mL)/(mg/kg)]	235	208	191	95.4	291	127	231	110
AUC_{last} (h*ng/mL)	NR	NR	459	244	8780	4090	7360	3420
AUC_{last}/剂量 [(h*ng/mL)/(mg/kg)]	NR	NR	459	244	585	273	491	228
AR: C_{max} 第 7 天/第 1 天	NA	NR	NA	0.50	NA	0.44	NA	0.48
AR: AUC_{last} 第 7 天/第 1 天	NA	NR	NA	0.53	NA	0.47	NA	0.46

[0837] NA,不适用;NR,由于数据点不足而无法报告

[0838] 如表55和表56所示,第1天和第7天,西多福韦C_{max}的增长通常小于剂量的比例。对于从1mg/kg至15mg/kg的15倍的布林西多福韦剂量的增加,雌性动物西多福韦C_{max}增加2.9倍-4.1倍,雄性动物增加5.6倍-16.8倍。在第1天和第7天,对于雌性动物,西多福韦AUC_{last}的增加小于剂量的比例;对于布林西多福韦剂量增加15倍,西多福韦AUC_{last}增加9.4倍-16.2倍。由于雄性大鼠中1mg/kg给药后数据点的不足,不能确定AUC_{last}的比例。

[0839] 在15mg/kg布林西多福韦剂量后,在第1天和第7天的西多福韦C_{max}和AUC_{last}在雌性和雄性动物之间是相似的(差异在33%以内)。

[0840] 对于雌性动物,以1mg/kg每周两次给药布林西多福韦后,第7天的布林西多福韦C_{max}和AUC_{last}值,和第1天相比,表现出在第7天趋向于更高的C_{max}和AUC_{last}(第7天/第1天AR为1.64至1.9)。然而,对于雌性和雄性动物,给药15mg/kg后(3剂量),C_{max}和AUC_{last}是相似的(第7天/第1天AR为1.0至1.1)。

[0841] 以摩尔为基础计算代谢物与母体(M/P)的比率,对于雌性动物,对于1mg/kg和15mg/kg的布林西多福韦剂量,第1天的AUC_{last}分别为0.190和0.661。对于雌性动物,对于1mg/kg和15mg/kg的布林西多福韦剂量,第7天的M/P比分别为0.193和0.444。

[0842] 在雄性大鼠中1mg/kg给药后,由于数据点不足,不能确定AUC_{last}的M/P比。15mg/kg布林西多福韦给药后,第1天和第7天的M/P比分别为0.126和0.307。

[0843] 表56:在第1、3和7天对大鼠单次和多次2小时静脉输注给药布林西多福韦后西多福韦TK参数

[0844]

TK 参数	布林西多福韦剂量(mg/kg)							
	1				15			
	雄性		雌性		雄性		雌性	
	时期				时期			
	第 1 天	第 7 天	第 1 天	第 7 天	第 1 天	第 7 天	第 1 天	第 7 天
T_{max} (h)	8	8	2	2	8	8	8	8
T_{last} (h)	8	8	8	8	24	24	24	24
C_{max} (ng/mL)	1.95	5.73	9.35	15	32.8	32.8	38.6	43.6
C_{max}/剂量 [(ng/mL)/(mg/kg)]	1.95	5.73	9.35	15	2.18	2.18	2.57	2.91
AUC_{last} (h*ng/mL)	NR	NR	43.4	80.1	548	624	705	756
AUC_{last}/剂量 [(h*ng/mL)/(mg/kg)]	NR	NR	43.4	80.1	36.5	41.6	47	50.4
AR: C_{max} 第 7 天/第 1 天	NA	2.94	NA	1.60	NA	1.00	NA	1.13
AR: AUC_{last} 第 7 天/第 1 天	NA	NR	NA	1.85	NA	1.14	NA	1.07
M/P 比: C_{max} (摩尔当量)	0.017	0.056	0.099	0.316	0.035	0.015	0.022	0.053
M/P 比: AUC_{last} (摩尔当量)	NR	NR	0.190	0.661	0.126	0.307	0.193	0.444

[0845] 对于第1阶段和第2阶段,使所有动物存活直至预定的终止。

[0846] 临床观察

[0847] 第1阶段

[0848] 剂量1(2mg/kg):两只雄性动物的临床症状由快速呼吸和俯卧姿势,有或无立毛,部分闭眼以及活动减少组成。

[0849] 剂量2(4mg/kg);雄性和雌性动物的临床症状由呼吸不规则组成。

[0850] 剂量3(10mg/kg):雄性或雌性动物中均未观察到临床症状。

[0851] 剂量4(15mg/kg):两只雄性和一只雌性动物的临床症状包括有或无呼吸不规则的活动减少、立毛,和双侧部分闭眼。

[0852] 所有临床症状都是可逆的,在输注结束后立即消失。

[0853] 第2阶段

[0854] 在雄性或雌性动物中,以1mg/kg/天或15mg/kg/天剂量给药布林西多福韦不会导致任何与布林西多福韦相关的临床症状。对体重(仅评估第2阶段)或与布林西多福韦治疗相关的食物消耗没有影响。

[0855] 临床病理学

[0856] 布林西多福韦相关的血液学发现仅限于在15mg/kg时雄性和雌性中网织红细胞的轻微降低(对照组分别为-33%和-30%,仅在雄性中具有统计学显著性),其与雄性(对照组+2.1%,统计学显著性)中平均细胞血红蛋白浓度(MCHC)的增加相关。在7天的给药阶段结束时,红细胞数量(血红蛋白,血细胞比容,红血细胞)的减少可忽略不计(相对于对照组的-4.2%)。网织红细胞减少对红细胞数量的最小影响归因于大鼠红细胞(~45-68天)相对于

网织红细胞的寿命长(2-5天)。随着持续给药,预计红细胞数量的减少将更加明显。网织红细胞减少表明造血组织中红细胞生成减少。在没有食物消耗或体重减少或临床状况不佳的情况下,它们可能是由于与布林西多福韦相关的红细胞生成的抑制,使用这种类型的药物(核苷酸类似物)并不出乎意料。

[0857] 雄性在15mg/kg时(对照组+3.8%;不具有统计学显著性)以及雌性在≥1mg/kg(对照组+4.9%;统计学显著性)时具有最小的与布林西多福韦相关的总钙增加,并且雌性在15mg/kg时(对照组+29%;统计学显著性)具有最小的尿素(BUN)增加。观察到两项发现均伴随有肾功能改变(尿排泄减少)。此外,不希望拘泥于理论,总钙的增加可以反映来自骨的动员增加或肠吸收增加。

[0858] 第3048号动物的变化(BUN、肌酐和磷的轻微增加)不被认为与布林西多福韦有关,并且认为其是继发于由于缺乏左肾而导致的肾小球滤过率降低(宏观上注意到)。

[0859] 由于其方向、小量级、罕见发生、与剂量无关、与相关终点不一致、和/或因为数值与研究控制范围相当,所有其它与对照组,统计学显著性还是在其他方面的差异,都不被认为是与布林西多福韦相关的。

[0860] 病理

[0861] 宏观发现很少,偶尔发生,并且不被认为是与布林西多福韦相关,因为它们在对照动物中以相似的发生率发生,缺乏剂量关系,或者被认为是先天性异常(第3048号动物)。雄性第3048号动物没有左精囊或左肾;左肾的缺失与该动物血液尿素氮(BUN)、肌酐和磷升高有关。

[0862] 对于第1阶段,在研究的条件下,通过单次2小时静脉输注给药时,所有剂量都是良好耐受的。因此,未确定布林西多福韦的最大耐受剂量。然而,通过0.75mg/mL的布林西多福韦溶液的2小时静脉输注输送的15mg/kg代表基于在布林西多福韦浓度高于0.75mg/mL时溶血的体外证据的最大可行剂量。

[0863] 对于第2阶段,通常在2小时IV输注结束时观察到布林西多福韦的峰值浓度,并且迅速降低。

[0864] 通常,平均布林西多福韦C_{max}和AUC增加大约与从1至15mg/kg剂量的增加成比例,尽管在1mg/kg剂量后,AUC根据少量浓度值确定。与第1天相比,在第7天的布林西多福韦C_{max}和AUC_{last}值显示出第7天的值较低的趋势(第7天/第1天累积比(AR)为0.44至0.53)。进一步地,未观察到布林西多福韦TK参数具有性别差异。总体而言,代谢物西多福韦暴露量增加小于布林西多福韦剂量增加的比例,TK参数没有明显的性别差异,并且重复给药后TK参数没有变化在本研究的条件下,在第1、4和7天通过2小时IV输注的单剂量给药是良好耐受的。

[0865] 血浆中布林西多福韦的浓度

[0866] 1mg/kg和15mg/kg的单次和重复给药后的布林西多福韦的浓度-时间数据汇总在表59和表60中。

[0867] 所有对照组血浆样品中布林西多福韦和西多福韦的浓度为每种分析物的BLQ(分别为<1.0ng/mL和<5.0ng/mL)。

[0868] 在2小时期间的单次IV输注给药布林西多福韦后,在第一个样品中(1小时)检测到了两个剂量水平(1mg/kg和15mg/kg))的血浆布林西多福韦浓度。每周两次的给药(在第1、3和7天为3剂量)后,预剂量样品中的布林西多福韦为BLQ,但是布林西多福韦可以在第7天在

第一次预剂量样品中(2小时,输注结束)被检测到。布林西多福韦的峰值浓度的中值时间发生在单次和每周两次1mg/kg给药后2小时,以及发生在单次15mg/kg给药后1小时和发生在每周两次15mg/kg给药后2小时。1mg/kg给药后8小时在所有雄性和一些雌性中布林西多福韦的浓度达到BLQ,以及在15mg/kg给药后24小时达到或接近LLOQ。对于雌性动物布林西多福韦的平均血浆浓度的变异系数(%CV)为13.0%至173%,对于雄性动物布林西多福韦的平均血浆浓度的变异系数(%CV)为9.98%至28.1%。一般来说,当浓度达到或接近LLOQ时,在之后的时间点观察到最高的%CV。

[0869] 血浆中的布林西多福韦的毒性动力学

[0870] 用于菲尼克斯温诺林(Phoeneix WinNonlin)分析的输入文件中的平均血浆布林西多福韦浓度-时间信息包含在表63中。作为静脉输注给大鼠的单周和每周两次布林西多福韦给药后的布林西多福韦TK参数总结在表56中。由于没有足够的数据点来表征消除阶段而不能确定终末半衰期(t1/2)、CL和Vss。

[0871] 在第1天和第7天,布林西多福韦C_{max}大致按照剂量的比例增加(对于雌性大鼠),或小于剂量的比例(对于雄性大鼠)。对于从1mg/kg至15mg/kg的15倍的剂量的增加,对于雌性动物西多福韦C_{max}增加17.3倍至18.2倍,对于雄性动物增加9.2倍至18.6倍。在第1天和第7天,布林西多福韦AUC_{last}大致成比例增加(对于雌性大鼠);对于15倍的剂量增加,AUC_{last}增加14.1至16.1倍。由于1mg/kg给药后雄性大鼠中数据点的不足,不能确定AUC_{last}的比例。

[0872] 在雌性和雄性动物之间,对于1或15mg/kg剂量,在第1天和第7天的布林西多福韦C_{max}是相似的(差异在54%以内)。由于数据点不足以计算雄性的AUC,对于1mg/kg剂量,无法比较布林西多福韦AUC_{last}。对于15mg/kg剂量,第1天和第7天的布林西多福韦AUC_{last}在雌性和雄性动物之间是相似的(差异在16%以内)。

[0873] 和第1天相比,对于雌性动物以1mg/kg每周两次给药布林西多福韦后以及对于雌性和雄性动物15mg/kg后,第7天的布林西多福韦C_{max}和AUC_{last}值表现出在第7天趋向于更低的C_{max}和AUC_{last}[第7天/第1天累积比(AR)为0.44至0.53]。

[0874] 表57:在第1、3和7天对大鼠单次和多次2小时静脉输注给药布林西多福韦后的布林西多福韦TK参数

[0875]

TK 参数	布林西多福韦剂量 (mg/kg)							
	1				15			
	雄性		雌性		雄性		雌性	
	时期				时期			
	第1天	第7天	第1天	第7天	第1天	第7天	第1天	第7天
T_{max} (h)	2	2	2	2	1	2	1	2
T_{last} (h)	2	2	8	8	24	24	24	24
C_{max} (ng/mL)	235	208	191	95.4	4370	1910	3470	1660
C_{max}/剂量 [(ng/mL)/(mg/kg)]	235	208	191	95.4	291	127	231	110
AUC_{last} (h*ng/mL)	NR	NR	459	244	8780	4090	7360	3420
AUC_{last}/剂量 [(h*ng/mL)/(mg/kg)]	NR	NR	459	244	585	273	491	228

[0876]

AR: C_{max} 第7天/第1天	NA	NR	NA	0.50	NA	0.44	NA	0.48
AR: AUC_{last} 第7天/第1天	NA	NR	NA	0.53	NA	0.47	NA	0.46

[0877] 血浆中西多福韦的浓度

[0878] 1mg/kg和15mg/kg每日单次和重复给药后的西多福韦的浓度-时间数据汇总在表59至表60中。

[0879] 在雌性动物中,单次IV输注给药布林西多福韦后,在1mg/kg(第二个时间点)给药后2小时或在15mg/kg(第一个时间点)给药后1小时检测到西多福韦的血浆浓度。在每周两次布林西多福韦给药后,在预剂量样品中西多福韦的血浆浓度为BLQ,但其可以在第7天的所有2小时样品(第一次预剂量时间点)中被检测到。单次和每周两次1mg/kg布林西多福韦给药后2小时,以及在单次和每周两次15mg/kg布林西多福韦给药后8小时,出现西多福韦中位T_{max}。

[0880] 在雄性动物中,单次IV输注给药布林西多福韦后,仅在1mg/kg给药后单个时间点8小时观察到可检测到的西多福韦的血浆浓度。然而,在15mg/kg给药后第一个样品(1小时)中检测到西多福韦。在每周两次布林西多福韦给药后,在预剂量样品和第一个预剂量样品(2小时)中西多福韦的血浆浓度为BLQ,但其可以在1mg/kg给药后第7天8小时样品中和15mg/kg给药后第7天2小时样品(第一个预剂量样品)中被检测到。单次或每周两次1mg/kg或15mg/kg布林西多福韦给药后8小时出现西多福韦中位T_{max}。在雄性和雌性动物中,单次和每周两次给药1mg/kg布林西多福韦后24小时西多福韦浓度达到BLQ,并且单次或每周两次15mg/kg布林西多福韦给药后24小时(最后一个时间点)未达到BLQ。西多福韦平均浓度的%CV对于雌性动物为4.82至88.4%,以及对于雄性动物为5.49至173%。当西多福韦浓度达到或接近LLOQ时,在早期或更晚的时间点观察到最高的%CV。血浆中的西多福韦的毒性动力学

[0881] 用于菲尼克斯温诺林分析的输入文件中的平均血浆西多福韦浓度-时间信息包含在表64中。作为静脉输注给大鼠的单周和每周两次布林西多福韦给药后的布林西多福韦TK参数总结在表58中。

[0882] 在第1天和第7天,西多福韦C_{max}的增加通常小于剂量的比例。对于从1mg/kg至15mg/kg的15倍的布林西多福韦剂量的增加,对于雌性动物西多福韦C_{max}增加2.9至4.1倍,对于雄性动物西多福韦C_{max}增加5.7至16.8倍。在第1天和第7天,对于雌性动物,西多福韦AUC_{last}的增加小于剂量的比例;对于15倍的布林西多福韦剂量的增加,西多福韦AUC_{last}增加9.4至16.2倍。由于1mg/kg剂量后雄性大鼠中数据点的不足,无法确定AUC_{last}的比例。

[0883] 在雌性和雄性动物之间,15mg/kg的布林西多福韦剂量后,在第1天和第7天西多福韦C_{max}和AUC_{last}是相似的(差异在33%以内)。

[0884] 对于雌性动物,以1mg/kg每周两次给药布林西多福韦后,和第1天相比,第7天的西多福韦C_{max}和AUC_{last}表现出第7天的C_{max}和AUC_{last}较高的趋势(第7天/第1天AR范围为1.6至1.9)。然而,给药15mg/kg(3剂量)的雌性动物和雄性动物的西多福韦C_{max}和AUC_{last}是相似的(第7天/第1天AR范围为1.0至1.1)。

[0885] 对于雌性动物,对于布林西多福韦的1mg/kg和15mg/kg的剂量,第1天的AUC_{last}的

代谢产物/母体(M/P)比分别为0.190和0.661。对于雌性动物,对于布林西多福韦的1mg/kg和15mg/kg的剂量,第7天的M/P比分别为0.193和0.444。

[0886] 由于1mg/kg剂量后雄性大鼠中数据点的不足,不能确定AUC_{last}的M/P比。15mg/kg布林西多福韦给药,第1天和第7天的M/P比分别为0.126和0.307。

[0887] 表58:在第1、3和7天对大鼠单次和多次2小时静脉输注给药布林西多福韦后的西多福韦TK参数

[0888]

TK 参数	布林西多福韦剂量(mg/kg)							
	1				15			
	雄性		雌性		雄性		雌性	
	时期				时期			
	第1天	第7天	第1天	第7天	第1天	第7天	第1天	第7天
T_{max} (h)	8	8	2	2	8	8	8	8
T_{last} (h)	8	8	8	8	24	24	24	24
C_{max} (ng/mL)	1.95	5.73	9.35	15	32.8	32.8	38.6	43.6
C_{max}/剂量 [(ng/mL)/(mg/kg)]	1.95	5.73	9.35	15	2.18	2.18	2.57	2.91
AUC_{last} (h*ng/mL)	NR	NR	43.4	80.1	548	624	705	756
AUC_{last}/剂量 [(h*ng/mL)/(mg/kg)]	NR	NR	43.4	80.1	36.5	41.6	47	50.4
AR: C_{max} 第7天/第1天	NA	2.94	NA	1.60	NA	1.00	NA	1.13
AR: AUC_{last} 第7天/第1天	NA	NR	NA	1.85	NA	1.14	NA	1.07
M/P 比: C_{max} (摩尔当量)	0.017	0.056	0.099	0.316	0.035	0.015	0.022	0.053
M/P 比: AUC_{last} (摩尔当量)	NR	NR	0.190	0.661	0.126	0.307	0.193	0.444

[0889] 表59:以1mg/kg的标示的布林西多福韦剂量对雌性和雄性大鼠单次和多次2小时静脉输注给药后的布林西多福韦和西多福韦的血浆浓度

[0890]

				性别			
				雄性		雌性	
				BCV	西多福韦	BCV	西多福韦
剂量 (mg/kg)	时期	时间 (h)	受试者	估算浓度[a] (ng/mL)			
1	第 1 天	1	2031	156	0.00	NS	NS
			2033	244	0.00	NS	NS
			2035	280	0.00	NS	NS
			2542	NS	NS	109	0.00
			2544	NS	NS	126	0.00
			2546	NS	NS	177	0.00
			平均值	227	0.00	137	0.00
			SD	63.8	0.00	35.4	0.00
			%CV	28.1	NC	25.8	NC
			N	3	3	3	3
1	第 1 天	2	2032	220	0.00	NS	NS
			2034	283	0.00	NS	NS
			2036	203	0.00	NS	NS
			2543	NS	NS	253	9.62
			2547	NS	NS	164	6.22
			2572	NS	NS	155	12.2
			平均值	235	0.00	191	9.35
			SD	42.1	0.00	54.2	3.00
			%CV	17.9	NC	28.4	32.1
			N	3	3	3	3
1	第 1 天	8	2031	0.00	5.85	NS	NS
			2033	0.00	0.00	NS	NS
			2035	0.00	0.00	NS	NS
			2542	NS	NS	2.30	7.12
			2544	NS	NS	1.45	5.60

[0891]

			2546	NS	NS	0.00	0.00
			平均值	0.00	1.95	1.25	4.24
			SD	0.00	3.38	1.16	3.75
			%CV	NC	173	93.0	88.4
			N	3	3	3	3
1	第1天	24	2032	0.00	0.00	NS	NS
			2034	0.00	0.00	NS	NS
			2036	0.00	0.00	NS	NS
			2543	NS	NS	0.00	0.00
			2547	NS	NS	0.00	0.00
			2572	NS	NS	0.00	0.00
			平均值	0.00	0.00	0.00	0.00
			SD	0.00	0.00	0.00	0.00
			%CV	NC	NC	NC	NC
			N	3	3	3	3
1	第7天	0	2031	0.00	0.00	NS	NS
			2033	0.00	0.00	NS	NS
			2035	0.00	0.00	NS	NS
			2542	NS	NS	0.00	0.00
			2544	NS	NS	0.00	0.00
			2546	NS	NS	0.00	0.00
			平均值	0.00	0.00	0.00	0.00
			SD	0.00	0.00	0.00	0.00
			%CV	NC	NC	NC	NC
			N	3	3	3	3
1	第7天	2	2032	255	0.00	NS	NS
			2034	189	0.00	NS	NS
			2036	179	0.00	NS	NS
			2543	NS	NS	115	13.5
			2547	NS	NS	82.1	13.8
			2572	NS	NS	89.2	17.6
			平均值	208	0.00	95.4	15.0
			SD	41.3	0.00	17.3	2.29
			%CV	19.9	NC	18.1	15.3
			N	3	3	3	3

[0892]

1	第7天	8	2031	0.00	5.67	NS	NS
			2033	0.00	5.45	NS	NS
			2035	0.00	6.07	NS	NS
			2542	NS	NS	6.58	9.51
			2544	NS	NS	0.00	7.84
			2546	NS	NS	0.00	5.36
			平均值	0.00	5.73	2.19	7.57
			SD	0.00	0.314	3.80	2.09
			%CV	NC	5.49	173	27.6
			N	3	3	3	3
1	第7天	24	2032	0.00	0.00	NS	NS
			2034	0.00	0.00	NS	NS
			2036	0.00	0.00	NS	NS
			2543	NS	NS	0.00	0.00
			2547	NS	NS	0.00	0.00
			2572	NS	NS	0.00	0.00
			平均值	0.00	0.00	0.00	0.00
			SD	0.00	0.00	0.00	0.00
			%CV	NC	NC	NC	NC
			N	3	3	3	3

[0893] [a]对具有BLQ生物分析结果的样品进行归零。

[0894] 表60:以15mg/kg的标示的布林西多福韦剂量对雌性和雄性大鼠单次和多次2小时静脉输注给药后的布林西多福韦和西多福韦的血浆浓度

[0895]

				性别			
				雄性		雌性	
				BCV	西多福韦	BCV	西多福韦
剂量 (mg/kg)	时期	时间 (h)	受试者	估算浓度 [a]			
15	第1天	1	3053	4020	8.97	NS	NS
			3055	4030	0.00	NS	NS
			3057	5060	7.08	NS	NS
			3564	NS	NS	3030	14.5
			3566	NS	NS	3930	20.5
			3568	NS	NS	3450	10.3
			平均值	4370	5.35	3470	15.1
			SD	598	4.73	450	5.13
			%CV	13.7	88.4	13.0	33.9
			N	3	3	3	3

[0896]

15	第 1 天	2	3054	2510	25.9	NS	NS
			3058	2990	13.1	NS	NS
			3074	3010	15.1	NS	NS
			3565	NS	NS	2460	10.9
			3567	NS	NS	1860	41.2
			3569	NS	NS	3380	34.1
			平均值	2840	18.0	2570	28.7
			SD	283	6.89	766	15.8
			%CV	9.98	38.2	29.8	55.2
			N	3	3	3	3
15	第 1 天	8	3053	10.7	35.8	NS	NS
			3055	8.23	29.5	NS	NS
			3057	9.85	33.0	NS	NS
			3564	NS	NS	5.05	37.3
			3566	NS	NS	7.97	37.7
			3568	NS	NS	6.57	40.7
			平均值	9.59	32.8	6.53	38.6
			SD	1.25	3.16	1.46	1.86
			%CV	13.1	9.63	22.4	4.82
			N	3	3	3	3
15	第 1 天	24	3054	1.20	20.5	NS	NS
			3058	1.10	14.0	NS	NS
			3074	1.36	15.5	NS	NS
			3565	NS	NS	2.32	24.6
			3567	NS	NS	1.25	23.2
			3569	NS	NS	2.48	18.6
			平均值	1.22	16.7	2.02	22.1
			SD	0.131	3.40	0.669	3.14
			%CV	10.7	20.4	33.2	14.2
			N	3	3	3	3
15	第 7 天	0	3053	0.00	0.00	NS	NS
			3055	0.00	0.00	NS	NS
			3057	0.00	0.00	NS	NS
			3564	NS	NS	0.00	0.00
			3566	NS	NS	0.00	0.00
			3568	NS	NS	0.00	0.00
			平均值	0.00	0.00	0.00	0.00
			SD	0.00	0.00	0.00	0.00
			%CV	NC	NC	NC	NC
			N	3	3	3	3
15	第 7 天	2	3054	1640	38.8	NS	NS
			3058	1940	15.0	NS	NS
			3074	2150	18.3	NS	NS
			3565	NS	NS	2220	20.2
			3567	NS	NS	995	49.1
			3569	NS	NS	1750	34.2
			平均值	1910	24.0	1660	34.5
			SD	256	12.9	618	14.5
			%CV	13.4	53.7	37.3	41.9

[0897]

			N	3	3	3	3
15	第7天	8	3053	9.82	38.4	NS	NS
			3055	7.60	31.1	NS	NS
			3057	8.73	28.8	NS	NS
			3564	NS	NS	5.32	36.4
			3566	NS	NS	6.27	54.2
			3568	NS	NS	4.75	40.2
			平均值	8.72	32.8	5.45	43.6
			SD	1.11	5.01	0.768	9.37
			%CV	12.7	15.3	14.1	21.5
			N	3	3	3	3
15	第7天	24	3054	1.85	27.2	NS	NS
			3058	1.32	17.9	NS	NS
			3074	1.17	19.9	NS	NS
			3565	NS	NS	2.37	30.0
			3567	NS	NS	0.00	7.10
			3569	NS	NS	0.00	23.8
			平均值	1.45	21.7	0.790	20.3
			SD	0.357	4.90	1.37	11.8
			%CV	24.7	22.6	173	58.3
			N	3	3	3	3

[0898] [a]对具有BLQ生物分析结果的样品进行归零。

[0899] 表61:测量和估算的平均生成的布林西多福韦浓度数据

[0900]

					时期			
					第1天		第7天	
分析物	剂量 (mg/kg)	时间 (h)	受试者	性别	C (ng/mL)	IC (ng/mL)	C (ng/mL)	IC (ng/mL)
BCV	0	2	1015	雄性	BLQ	0.00	BLQ	0.00
	0	2	1016	雄性	BLQ	0.00	BLQ	0.00
	0	2	1017	雄性	BLQ	0.00	BLQ	0.00
	0	2	1523	雌性	BLQ	0.00	BLQ	0.00
	0	2	1524	雌性	BLQ	0.00	BLQ	0.00
	0	2	1525	雌性	BLQ	0.00	BLQ	0.00
	1	0	2031	雄性	NS	NS	BLQ	0.00
	1	0	2033	雄性	NS	NS	BLQ	0.00
	1	0	2035	雄性	NS	NS	BLQ	0.00
	1	0	2542	雌性	NS	NS	BLQ	0.00
	1	0	2544	雌性	NS	NS	BLQ	0.00
	1	0	2546	雌性	NS	NS	BLQ	0.00
	1	1	2031	雄性	156	156	NS	NS
	1	1	2033	雄性	244	244	NS	NS
	1	1	2035	雄性	280	280	NS	NS
	1	1	2542	雌性	109	109	NS	NS
	1	1	2544	雌性	126	126	NS	NS
	1	1	2546	雌性	177	177	NS	NS
	1	2	2032	雄性	220	220	255	255
	1	2	2034	雄性	283	283	189	189

[0901]

	1	2	2036	雄性	203	203	179	179
	1	2	2543	雌性	253	253	115	115
	1	2	2547	雌性	164	164	82.1	82.1
	1	2	2572	雌性	155	155	89.2	89.2
	1	8	2031	雄性	BLQ	0.00	BLQ	0.00
	1	8	2033	雄性	BLQ	0.00	BLQ	0.00
	1	8	2035	雄性	BLQ	0.00	BLQ	0.00
	1	8	2542	雌性	2.30	2.30	6.58	6.58
	1	8	2544	雌性	1.45	1.45	BLQ	0.00
	1	8	2546	雌性	BLQ	0.00	BLQ	0.00
	1	24	2032	雄性	BLQ	0.00	BLQ	0.00
	1	24	2034	雄性	BLQ	0.00	BLQ	0.00
	1	24	2036	雄性	BLQ	0.00	BLQ	0.00
	1	24	2543	雌性	BLQ	0.00	BLQ	0.00
	1	24	2547	雌性	BLQ	0.00	BLQ	0.00
	1	24	2572	雌性	BLQ	0.00	BLQ	0.00
	15	0	3053	雄性	NS	NS	BLQ	0.00
	15	0	3055	雄性	NS	NS	BLQ	0.00
	15	0	3057	雄性	NS	NS	BLQ	0.00
	15	0	3564	雌性	NS	NS	BLQ	0.00
	15	0	3566	雌性	NS	NS	BLQ	0.00
	15	0	3568	雌性	NS	NS	BLQ	0.00
	15	1	3053	雄性	4020	4020	NS	NS
	15	1	3055	雄性	4030	4030	NS	NS
	15	1	3057	雄性	5060	5060	NS	NS
	15	1	3564	雌性	3030	3030	NS	NS
	15	1	3566	雌性	3930	3930	NS	NS
	15	1	3568	雌性	3450	3450	NS	NS
	15	2	3054	雄性	2510	2510	1640	1640
	15	2	3058	雄性	2990	2990	1940	1940
	15	2	3074	雄性	3010	3010	2150	2150
	15	2	3565	雌性	2460	2460	2220	2220
	15	2	3567	雌性	1860	1860	995	995
	15	2	3569	雌性	3380	3380	1750	1750
	15	8	3053	雄性	10.7	10.7	9.82	9.82
	15	8	3055	雄性	8.23	8.23	7.60	7.60
	15	8	3057	雄性	9.85	9.85	8.73	8.73
	15	8	3564	雌性	5.05	5.05	5.32	5.32
	15	8	3566	雌性	7.97	7.97	6.27	6.27
	15	8	3568	雌性	6.57	6.57	4.75	4.75
	15	24	3054	雄性	1.20	1.20	1.85	1.85
	15	24	3058	雄性	1.10	1.10	1.32	1.32
	15	24	3074	雄性	1.36	1.36	1.17	1.17
	15	24	3565	雌性	2.32	2.32	2.37	2.37
	15	24	3567	雌性	1.25	1.25	BLQ	0.00
	15	24	3569	雌性	2.48	2.48	BLQ	0.00

[0902] 表62:测量和估算的平均生成的西多福韦浓度数据

[0903]

					时期			
					第1天		第7天	
分析物	剂量水平(mg/kg)	时间(h)	受试者	性别	C (ng/mL)	IC (ng/mL)	C (ng/mL)	IC (ng/mL)
西多福韦	0	2	1015	雄性	BLQ	0.00	BLQ	0.00
	0	2	1016	雄性	BLQ	0.00	BLQ	0.00
	0	2	1017	雄性	BLQ	0.00	BLQ	0.00
	0	2	1523	雌性	BLQ	0.00	BLQ	0.00
	0	2	1524	雌性	BLQ	0.00	BLQ	0.00
	0	2	1525	雌性	BLQ	0.00	BLQ	0.00
	1	0	2031	雄性	NS	NS	BLQ	0.00
	1	0	2033	雄性	NS	NS	BLQ	0.00
	1	0	2035	雄性	NS	NS	BLQ	0.00
	1	0	2542	雌性	NS	NS	BLQ	0.00
	1	0	2544	雌性	NS	NS	BLQ	0.00
	1	0	2546	雌性	NS	NS	BLQ	0.00
	1	1	2031	雄性	BLQ	0.00	NS	NS
	1	1	2033	雄性	BLQ	0.00	NS	NS
	1	1	2035	雄性	BLQ	0.00	NS	NS
	1	1	2542	雌性	BLQ	0.00	NS	NS
	1	1	2544	雌性	BLQ	0.00	NS	NS
	1	1	2546	雌性	BLQ	0.00	NS	NS
	1	2	2032	雄性	BLQ	0.00	BLQ	0.00
	1	2	2034	雄性	BLQ	0.00	BLQ	0.00
	1	2	2036	雄性	BLQ	0.00	BLQ	0.00
	1	2	2543	雌性	9.62	9.62	13.5	13.5
	1	2	2547	雌性	6.22	6.22	13.8	13.8
	1	2	2572	雌性	12.2	12.2	17.6	17.6
	1	8	2031	雄性	5.85	5.85	5.67	5.67
	1	8	2033	雄性	BLQ	0.00	5.45	5.45
	1	8	2035	雄性	BLQ	0.00	6.07	6.07
	1	8	2542	雌性	7.12	7.12	9.51	9.51
	1	8	2544	雌性	5.60	5.60	7.84	7.84
	1	8	2546	雌性	BLQ	0.00	5.36	5.36
	1	24	2032	雄性	BLQ	0.00	BLQ	0.00
	1	24	2034	雄性	BLQ	0.00	BLQ	0.00
	1	24	2036	雄性	BLQ	0.00	BLQ	0.00
	1	24	2543	雌性	BLQ	0.00	BLQ	0.00
	1	24	2547	雌性	BLQ	0.00	BLQ	0.00
	1	24	2572	雌性	BLQ	0.00	BLQ	0.00
	15	0	3053	雄性	NS	NS	BLQ	0.00
	15	0	3055	雄性	NS	NS	BLQ	0.00
	15	0	3057	雄性	NS	NS	BLQ	0.00
	15	0	3564	雌性	NS	NS	BLQ	0.00
	15	0	3566	雌性	NS	NS	BLQ	0.00
	15	0	3568	雌性	NS	NS	BLQ	0.00

[0904]

	15	1	3053	雄性	8.97	8.97	NS	NS
	15	1	3055	雄性	BLQ	0.00	NS	NS
	15	1	3057	雄性	7.08	7.08	NS	NS
	15	1	3564	雌性	14.5	14.5	NS	NS
	15	1	3566	雌性	20.5	20.5	NS	NS
	15	1	3568	雌性	10.3	10.3	NS	NS
	15	2	3054	雄性	25.9	25.9	38.8	38.8
	15	2	3058	雄性	13.1	13.1	15.0	15.0
	15	2	3074	雄性	15.1	15.1	18.3	18.3
	15	2	3565	雌性	10.9	10.9	20.2	20.2
	15	2	3567	雌性	41.2	41.2	49.1	49.1
	15	2	3569	雌性	34.1	34.1	34.2	34.2
	15	8	3053	雄性	35.8	35.8	38.4	38.4
	15	8	3055	雄性	29.5	29.5	31.1	31.1
	15	8	3057	雄性	33.0	33.0	28.8	28.8
	15	8	3564	雌性	37.3	37.3	36.4	36.4
	15	8	3566	雌性	37.7	37.7	54.2	54.2
	15	8	3568	雌性	40.7	40.7	40.2	40.2
	15	24	3054	雄性	20.5	20.5	27.2	27.2
	15	24	3058	雄性	14.0	14.0	17.9	17.9
	15	24	3074	雄性	15.5	15.5	19.9	19.9
	15	24	3565	雌性	24.6	24.6	30.0	30.0
	15	24	3567	雌性	23.2	23.2	7.10	7.10
	15	24	3569	雌性	18.6	18.6	23.8	23.8

[0905] 表63:测量和估算的NCA布林西多福韦浓度数据

[0906]

				时期			
				第1天		第7天	
分析物	剂量(mg/kg)	性别	时间(h)	MC (ng/mL)	IMC (ng/mL)	MC (ng/mL)	IMC (ng/mL)
BCV	1	雌性	0	NS	NS	0.00	0.00
	1	雌性	1	137	137	NS	NS
	1	雌性	2	191	191	95.4	95.4
	1	雌性	8	1.25	1.25	2.19	2.19
	1	雌性	24	0.00	丢失	0.00	丢失
	1	雄性	0	NS	NS	0.00	0.00
	1	雄性	1	227	227	NS	NS
	1	雄性	2	235	235	208	208
	1	雄性	8	0.00	丢失	0.00	丢失
	1	雄性	24	0.00	丢失	0.00	丢失
	15	雌性	0	NS	NS	0.00	0.00
	15	雌性	1	3470	3470	NS	NS
	15	雌性	2	2570	2570	1660	1660
	15	雌性	8	6.53	6.53	5.45	5.45
	15	雌性	24	2.02	2.02	0.790	0.790
	15	雄性	0	NS	NS	0.00	0.00
	15	雄性	1	4370	4370	NS	NS
	15	雄性	2	2840	2840	1910	1910
	15	雄性	8	9.59	9.59	8.72	8.72

[0907]

	15	雄性	24	1.22	1.22	1.45	1.45

[0908] 表64:测量和估算的NCA西多福韦浓度数据

[0909]

				时期			
				第1天		第7天	
分析物	剂量(mg/kg)	性别	时间(h)	MC (ng/mL)	IMC (ng/mL)	MC (ng/mL)	IMC (ng/mL)
西多福韦	1	雌性	0	NS	NS	0.00	0.00
	1	雌性	1	0.00	0.00	NS	NS
	1	雌性	2	9.35	9.35	15.0	15.0
	1	雌性	8	4.24	4.24	7.57	7.57
	1	雌性	24	0.00	丢失	0.00	丢失
	1	雄性	0	NS	NS	0.00	0.00
	1	雄性	1	0.00	0.00	NS	NS
	1	雄性	2	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	雄性	8	1.95	1.95	5.73	5.73
	1	雄性	24	0.00	丢失	0.00	丢失
	15	雌性	0	NS	NS	0.00	0.00
	15	雌性	1	15.1	15.1	NS	NS
	15	雌性	2	28.7	28.7	34.5	34.5
	15	雌性	8	38.6	38.6	43.6	43.6
	15	雌性	24	22.1	22.1	20.3	20.3
	15	雄性	0	NS	NS	0.00	0.00
	15	雄性	1	5.35	5.35	NS	NS
	15	雄性	2	18.0	18.0	24.0	24.0
	15	雄性	8	32.8	32.8	32.8	32.8
	15	雄性	24	16.7	16.7	21.7	21.7

[0910] 实施例9-[^{14}C]布林西多福韦的单次口服或静脉注射给药后通过大鼠的定量全身射线自显迹法的质量平衡、药物动力学和组织分布

[0911] 本研究的目的是表征单次静脉注射(IV,2小时输注)或口服(PO,强喂)给药[^{14}C]布林西多福韦后雄性Sprague Dawley(SD)和Long-Evans(LE)大鼠的总放射性组织分布。此外,检查了布林西多福韦的单次输注(IV,2小时输注)给药后雄性Sprague Dawley大鼠的排泄物的速率和程度(质量平衡)和总放射性的药物动力学(PK)。本研究收集的残留血浆和排泄物在-70℃下储存,用于代谢物分布和在不同方案下进行的鉴定实验。

[0912] 材料与方法

[0913] 本研究使用4组雄性SD大鼠(白化病)和3组雄性LE大鼠(色素沉着);共39只。从Hilltop Lab Animals有限公司(Scottdale,PA)获得所有动物。在给药时,大鼠体重在214和265克之间。以15mg/kg的目标剂量,单次2小时(h)IV输注[^{14}C]布林西多福韦向第1、2、3和4组中的大鼠给药。以2mg/kg的目标剂量,单次2小时IV输注[^{14}C]布林西多福韦向第5组中的大鼠给药。以15mg/kg的目标剂量,单次口服强喂给药[^{14}C]布林西多福韦向第6和7组中的大鼠给药。在给药当天,在QPS制备了3种给药制剂(一种高剂量IV,一种低剂量IV,一种PO剂量)。第1、2、3和4组的IV制剂含有pH 8.0(±0.1)的5%葡萄糖溶液中的10mM磷酸钠缓冲液的载剂。第5组的IV制剂含有pH 8.0(±0.1)的5%葡萄糖溶液中的16mM磷酸钠缓冲液的载剂,以及PO给药制剂含有pH 8.0(±0.1)的12.5mM磷酸钠缓冲液的载剂。第5组的IV制剂和第6和7组的PO给药制剂含有较高浓度的缓冲液,由此在所有剂量制剂中最终的缓冲液浓度约为10mM。

[0914] 测试动物

[0915] 从Hilltop Lab Animals有限公司(Scottdale,PA)获得16只成年雄性SD大鼠,以及23只成年雄性LE大鼠,并将其用于本研究。第1-5组中的大鼠经手术改良,以具有用于IV输注的内置股静脉导管。动物的体重范围、来源、供货商和收货日期都记录在原始数据中。使用尾巴上的永久标记给本研究中使用的动物分配一个永久的识别号,而成功对本研究中使用的动物进行剂量给药后将未使用的备用动物被送回库存。通过导管通畅和QPS SOP进行随机化。

[0916] 表65和66给出了给药和样品收集方案的概述。

[0917] 表65:生活研究给药总结

[0918]

组数	研究	品系/给药途径	动物数量,性别	目标剂量水平(mg/kg)	目标放射性水平(μCi/kg)	目标剂量数据(mL/kg/g)[b]	目标剂量体积(mL/kg)	目标剂量浓度(mg/mL)
1	MB	SD/IV[a]	3M	15 mg/kg	180	10	20	0.75 mg/mL
2	PK	SD/IV[a]	7M	15 mg/kg	180	10	20	0.75 mg/mL
3	QWBA	SD/IV[a]	3M	15 mg/kg	180	10	20	0.75 mg/mL
4	QWBA	LE/IV[a]	9M	15 mg/kg	180	10	20	0.75 mg/mL
5	QWBA	LE/IV[a]	4M	2 mg/kg	200	1.33	2.66	0.75 mg/mL
6	QWBA	SD/PO	3M	15 mg/kg	200	-	5	3 mg/mL
7	QWBA	LE/PO	10M	15 mg/kg	200	-	5	3 mg/mL

[0919] [a]股静脉置管;[b]2小时输注时间

[0920] 表66:生活样品收集总结

[0921]

组数	预剂量, ROA, 品系	尿[a]	粪便[a]	笼中残留物	尸体	末梢血和血浆
1	MB, IV, SD	给药前, 0-8, 8-24, 以及168 h内24 h间隔 给药后; N=3	给药前, 0-24以及168 h内24 h 间隔 给药后; N=3	在24 h开始每日笼子清洗,以及在结束时清洗和擦拭笼子; N=3	安乐死后冷冻并保存用于可能的分析	NA
2	PK, IV, SD	NA	NA	NA	NA	在0.5, 1, 2 (输注结束), 4, 8, 24, 和 72 h; N=1/时间点
3	QWBA, IV, SD	NA	NA	NA	在 2 (输注结束), 24, 和 168 h ; N=1/时间点	在 2 (输注结束), 24, 和 168 h ; N=1/时间点
4	QWBA, IV, LE	NA	NA	NA	在1, 2 (输注结束), 4, 8, 24, 72, 96, 168 h 和 TBD; N=1/时间点	在 1, 2 (输注结束), 4, 8, 24, 72, 96, 168 和 840 h; N=1/时间点
5	QWBA, IV, LE	NA	NA	NA	在 2 (输注结束), 8, 24, 和 72 h	在 2 (输注结束), 8, 24,和 72 h
6	QWBA, PO, SD	NA	NA	NA	在 2, 24, and 168 h 给药后; N=1/时间点	在 2, 24, and 168 h 给药后; N=1/时间点
7	QWBA, PO, LE	NA	NA	NA	在0.5, 1, 2, 4, 8, 24, 72, 96, 168 h 和 TBD; N=1/时间点	在 0.5, 1, 2, 4, 8, 24, 72, 96, 168 和 840 h; N=1/时间点

[0922] ROA＝给药途径

[0923] NA＝不适用

[0924] TBD＝待定

[0925] [a]在干冰上收集样品

[0926] 剂量给药

[0927] 使用动物体重确定给药体积,在剂量给药当天的给药前测量动物体重。将剂量测定结果、动物体重和目标给药参数输入Debra LIMS,并且通过Debra LIMS确定每只动物的目标剂量体积。以15mg/kg的目标口服剂量(第1-4组)或2mg/kg(第5组)向动物给予[^{14}C]布林西多福韦的单次2小时IV输注,或以15mg/kg的目标口服剂量(第6和7组)向动物给予[^{14}C]布林西多福韦的口服强喂给药。通过Debra LIMS确定每只大鼠的实际剂量给药,其使用个体动物体重数据,通过从给药前的满的注射器/针或针/输液线的重量减去给药后的空剂量

注射器/针或针/输液线的重量。平均给药前放射性浓度(dpm/g给药溶液)乘以给药的给药溶液的净重,以计算向每只动物给药的放射性量。实际剂量列于表67中。

[0928] 表67:雄性Sprague Dawley大鼠(第1、2、3和6组)和雄性Long-Evans大鼠(第4、5和7组)的体重和[^{14}C]布林西多福韦给药剂量

[0929]

动物号	动物体重 (g)	给药制剂量 (g)	μCi 给药	μCi/kg	mg 测试项目给药 ^{a,b}	mg/kg 给药 ^{a,b}
Gp. 1, 质量平衡, 雄性 SD 大鼠, 2-h IV, 15 mg/kg						
1	251.2	5.0069	50.607	201.459	3.729	14.847
2	250.2	5.0375	50.916	203.501	3.752	14.997
3	261.9	5.2909	53.477	204.189	3.941	15.048
平均	254.4	5.1120	51.667	203.050	3.807	14.964
SD	6.5	0.1560	1.575	1.420	0.116	0.104
Gp. 2, PK, 雄性 SD 大鼠, 2-h IV, 15 mg/kg						
4c	251.8	1.3636	13.782	54.736	1.016	4.034
5c	250.0	2.4727	24.992	99.970	1.842	7.367
6	242.3	4.7611	48.122	198.606	3.546	14.636
7	249.9	5.1748	52.304	209.298	3.855	15.424
8	261.6	5.2120	52.680	201.375	3.882	14.840
9	264.6	5.2057	52.616	198.851	3.878	14.654
10	254.0	5.0652	51.196	201.558	3.773	14.854
平均	254.5	5.084	51.384	201.938	3.787	14.882
SD	9.0	0.190	1.918	4.338	0.142	0.320
Gp. 3, QWBA, 雄性 SD 大鼠, 2-h IV, 15 mg/kg						
11	247.3	4.9350	49.880	201.698	3.676	14.864
12	256.6	5.0999	51.547	200.883	3.799	14.804
13	248.4	4.8006	48.521	195.336	3.576	14.395

平均	250.8	4.945	49.983	199.306	3.684	14.688
SD	5.1	0.150	1.516	3.462	0.112	0.255
Gp. 4, QWBA, 雄性 LE 大鼠, 2-h IV, 15 mg/kg						
14[c]	240.5	2.3933	24.190	100.582	1.783	7.412
15	232.1	4.5816	46.308	199.517	3.413	14.703
16	234.9	4.6662	47.163	200.779	3.476	14.796
17	236.8	4.7293	47.801	201.861	3.523	14.876
18	214.4	4.2683	43.141	201.219	3.179	14.829
19	247.3	4.9154	49.682	200.897	3.661	14.805
20	237.9	4.7154	47.660	200.337	3.512	14.764
21	242.6	4.7892	48.406	199.531	3.567	14.705
22	235.0	4.5292	45.778	194.801	3.374	14.356
平均	235.1	4.649	46.992	199.868d	3.463	14.729
SD	9.7	0.195	1.969	2.198	0.145	0.162
Gp. 5, QWBA, 雄性 LE 大鼠, 2-h IV, 2 mg/kg						
23	231.9	0.6395	52.998	228.538	0.495	2.133
24	244.6	0.6611	54.788	223.990	0.511	2.090
25	231.8	0.6303	52.235	225.347	0.487	2.103
26	243.5	0.7172	59.437	244.095	0.555	2.278
平均	238.0	0.662	54.865	230.493	0.512	2.151
SD	7.1	0.039	3.231	9.267	0.030	0.087
Gp. 6, QWBA, 雄性 SD 大鼠, PO, 15 mg/kg						
27	250.7	1.2270	51.798	206.613	3.630	14.480
28	231.2	1.1460	48.379	209.250	3.390	14.665
29	254.8	1.3077	55.205	216.659	3.869	15.184
平均	245.6	1.227	51.794	210.841	3.630	14.776
SD	12.6	0.081	3.413	5.208	0.240	0.365
Gp. 7, QWBA, 雄性 LE 大鼠, PO, 15 mg/kg						
30	229.4	1.1586	48.910	213.210	3.428	14.942
31	236.1	1.1913	50.291	213.007	3.525	14.928
32	254.6	1.2685	53.550	210.330	3.753	14.740
33	234.1	1.1959	50.485	215.656	3.538	15.114
34	223.1	1.1223	47.378	212.362	3.320	14.883
35	246.6	1.1773	49.700	201.541	3.483	14.124
36	231.3	1.1473	48.433	209.397	3.394	14.675

[0930]

37	257.7	1.2626	53.301	206.833	3.735	14.495
38	234.7	1.2077	50.983	217.227	3.573	15.224
39	238.5	1.2192	51.469	215.802	3.607	15.124
平均	238.6	1.195	50.450	211.537	3.536	14.825
SD	11.1	0.047	1.987	4.729	0.139	0.332

[0931]

[0932]　[a]口服(PO)制剂的比活性为14.2689μCi/mg[^{14}C]布林西多福韦。PO制剂的剂量制备活性为42.2151μCi/g。

[0933]　[b]静脉(IV)输注制剂的比活性为13.5694(在15mg/kg)和101.5100(在2mg/kg)μCi/mg[^{14}C]布林西多福韦。IV制剂的剂量制备活性为10.1074μCi/g(在15mg/kg)和82.8740μCi/g(在2mg/kg)。

[0934]　[c]在IV输注期间终止动物的样品采集。从平均剂量计算中省略了这些动物。

[0935]　[d]第4组中所有动物的平均剂量,188.836μCi/kg用于放射量测定估算。

[0936]　注:SD＝标准偏差;MB＝质量平衡;PK＝药物动力学;QWBA＝定量全身射线自显迹法

[0937]　样品收集

[0938]　在本研究期间收集尿液、粪便、血液/血浆、笼残留样品和尸体,如下文每组所述排泄物收集(第1组)

[0939]　将3只雄性白化病大鼠分入第1组(IV输注)用于排泄物收集。

[0940]　在给药前(过夜)和在0-8h、8-24h的间隔以及随后的每24h间隔直至给药后168h,从每只动物中收集尿液样品并将其收集到预先标记的尿液收集管中。在干冰上收集所有尿液标本。记录每次尿液收集的总重量,并将样品在约-70℃冷冻储存直至LSC分析。分析后将样品保持在约-70℃,并保存以进行进一步分析,在单独的方案下进行。

[0941]　在给药前(过夜)和在给药后24h间隔直至给药后168h,从每只动物中收集粪便样品并将其收集到预先标记的粪便收集管中。在干冰上收集所有粪便标本,并记录每个粪便样品的总重量。在约-70℃储存样品直至均质化和LSC分析,并保存以进行进一步分析,在单独的方案下进行。

[0942]　收集笼残留样品。在开始于给药后24h的每次每天给药后排泄物收集后用约30mL去离子水冲洗笼子。在最后的排泄物收集后用约90mL的Windex溶液(或等效的洗涤剂溶液)喷洒新陈代谢笼的内表面并用纱布垫擦拭。将笼冲洗和笼洗涤样品收集到量皮重的和预先标记的容器中。记录每次笼冲洗和洗涤的总重量。约-20℃储存笼冲洗、笼洗涤和笼擦拭收集物。在约-20℃保留第1组和第2组中的动物尸体。因为排泄物中放射性的恢复率>90%,所以未分析尸体和笼残留物。

[0943]　血浆药物动力学样品采集(第2组)

[0944]　从第2组(IV输注)中的每只动物收集血液,用于在下列时间进行血浆和血液分析。

[0945]　通过心脏穿刺将末梢血样本收集到预先标记的含有作为抗凝剂的K_2EDTA血液收集管中。在输注开始后0.5、1、2、4、8、24和72h收集末梢样品(N＝1每时间点),并且体积不受限制。取出三份称重的血液等分试样(～0.100g),并使用燃烧及之后的LSC分析总放射性。在约4℃保持血液等分试样直至分析。在湿冰上(约4℃)保持剩余的血液样本,然后在血液收集时间1h内离心以获得血浆。在研究笔记本中记录离心机设置。通过LSC采用直接计数法分析复制的血浆(0.050mL)等分试样的放射性,在约-70℃储存剩余的血浆,并保存以用于将来可能的单独的研究方案下的分析。剩余的红细胞和第2组的动物尸体作为放射性废物丢弃。

[0946]　QWBA(第3-7组)

[0947]　在每只动物各自的终止时间点,在血液采集后立即实施安乐死立即用于QWBA分

析。每组每个时间点一只老鼠被安乐死,如下所列。

[0948] 第3组(IV)-2(输注结束)、24和168h

[0949] 第4组(IV)-1、2(输注结束)、4、8、24、72、96、168和840h

[0950] 第5组(IV)-2(输注结束)、8、24和72h

[0951] 第6组(PO)-2、24和168h

[0952] 第7组(PO)-2(输注结束)、0.5、1、2、4、8、24、72、96、168和840h

[0953] 通过异氟醚麻醉对每只大鼠经进行深度麻醉,通过心脏穿刺将血液样本(约2mL)收集到含有作为抗凝剂的K_2EDTA的管中,并将大鼠在已烷/固体二氧化碳浴中冷冻至少15min使其安乐死。在湿冰(约4℃)上保存血液样品,然后在血液收集时间1h内离心以获得血浆。在研究笔记本中记录离心机设置。通过LSC采用直接计数法分析复制的血浆(0.050mL)等分试样的放射性,在约-70℃储存剩余的血浆,并保存以用于将来可能的单独的研究方案下的分析。剩余的红细胞和第2组的动物尸体作为放射性废物丢弃。

[0954] <u>样品保存条件</u>

[0955] 在-20℃冷冻储存尸体和笼残留样品直至样品分析,在-70℃下冷冻储存剩余的血浆和排泄物。

[0956] 样品分析

[0957] <u>血液、血浆和排泄物的LSC分析</u>

[0958] 对粪便进行均质处理并分析其总放射性含量。每只大鼠的称重粪便样品在大约3体积的水(大约为粪便样品重量的3倍)中进行均质。测定各均质产物的总重量,并在Packard样品氧化器中燃烧三份称重的等分试样(~0.5g),之后进行LSC分析。记录了单独等分试样的实际重量和均质处理中使用的溶剂量。每个粪便均质产物的预称重部分置于含有燃烧室-垫®(Combusto-Pad®)的燃烧室-堆®(Combusto-Cone®)中,允许在通风罩中干燥过夜,并在样品氧化器中完全燃烧。

[0959] 在Packard样品氧化器中燃烧血液等分试样(仅第2组)的三份称重的等分试样(~0.100g),然后进行LSC分析。

[0960] 燃烧中释放的$^{14}CO_2$被捕集在Carbo-Sorb®溶液中,加入Permafluor®(闪烁液),用LSC测定放射性。氧化含有已知放射性量(0.100mL Spec-Chec®)的空白锥体,并与未燃烧标准进行比较,以确定燃烧过程的回收率。对这些对照组进行三份分析,在每天燃烧样品测定来自这些对照样品的^{14}C的定量回收。燃烧空白锥体(未添加放射性)以评估样品之间的放射性携带。

[0961] 在分析后在约-70℃保持排泄物的均质产物,并保存以用于进一步单独的研究方案下的分析。

[0962] 解冻尿液(0.300mL)和血浆(0.050mL)样品,如有必要,按体积配成两份并用LSC分析。在研究记录中记录了样品等分试样的体积或重量。每份尿液中加入Ultima金闪烁液(5mL,PerkinElmer),以及血浆等分试样,将等分试样混合均匀,之后用LSC分析放射性。

[0963] 通过外部标准化和猝火曲线将每个样品中的放射性(每分钟计数)转换为每分钟崩解(dpm)。通过2800TR型或2900TR型液体闪烁分析仪(PerkinElmer)定量放射性含量。所有样品计数至少5分钟或每分钟至少100000次(cpm)。如果有足够的体积对与平均值相差超

过10%的重复样品的LSC结果进行重新等分和重新分析。如果三份样品的LSC结果的CV%＞10%,如果有足够的体积,将样品进行重新均质化并重新分析。这些具体要求适用于所有平均放射性大于500dpm的样品等分试样,并且接受低于500dpm的值。定量下限(LLOQ)应用于等于背景样本的每分钟计数(CPM)值的2倍的数据。

[0964] QWBA

[0965] 将耳廓、远端肢体、毛发和尾巴从每个冷冻的尸体中移除,并将每个冷冻的尸体嵌入约2%(w/v)羧甲基纤维素的水混悬液中,并冷冻成块。在切片前在约20℃储存这些块。将每个块状的尸体安装在冷冻切片机(Leica CM3600 Cryomacrocut,Nussloch,Germany and Vibratome 9800,St.Louis,MO)的载物台上并保持在约-20℃和内部标准(3),在切片前将一个浓度(约0.05μCi/mL)的加足了[^{14}C]-葡萄糖的血浆放入冷冻块中,用于切片厚度质量控制。使用设定在-20℃的全身冷冻切片机,以各种感兴趣的水平在矢状平面上取出多个全身切片(约40μm厚)。将冷冻尸体的矢状切片(20-50μm厚)暴露于磷光体成像板。使用标准将组织中的图像区域转换成浓度。所有主要的组织、器官和生物流体被表示。将这些切片收集在胶带(Scotch 8210,3M Corp.,USA,并且在取出用于安装和暴露之前,在冷冻切片机中脱水至少48小时。

[0966] 测定以下组织和/或内容物的组织浓度数据:脂肪(棕色和白色)、肾上腺、胆汁(导管)、血液(心脏)、骨髓、脑(大脑,小脑,髓质)、盲肠(和内容物)、大肠(和内容物)、附睾、食道、眼睛(葡萄膜和晶状体)、哈德氏腺、心脏、肾脏(皮质和髓质)、肝脏、肺脏、淋巴结、胰腺、脑下垂体、前列腺、唾液腺、精囊、骨骼肌、皮肤(色素沉着和非色素沉着)、小肠(和内容物)、胃(胃粘膜和内容物)、脾脏、脊髓、睾丸、胸腺、甲状腺和膀胱(和内容物)。

[0967] 将每只大鼠的一组全身切片安装在纸板背衬上,用薄的塑料包裹物覆盖,并与校准标准物一起暴露于对^{14}C敏感的磷光体成像板(Fuji Biomedical,Stamford,CT),所述校准标准物是与10种不同浓度(0.0009595至7.806μCi/g)的血液相混合的^{14}C-葡萄糖。将成像板和切片置于不透光的曝光盒中,置于铜衬铅保险箱中,在室温下曝光4天。使用Typhoon 9410图像采集系统(GE/Molecular Dynamics,Sunnyvale,CA,USA)扫描成像板,并将得到的图像存储在专用QPS计算机服务器上。使用MCID图像分析软件(v.7.0,Interfocus Imaging Ltd)和由综合响应构成的标准曲线[i.e.,Molecular Dynamics Counts per square millimeter(MDC/mm^2)]及[^{14}C]校准标准的额定浓度,通过图像密度测定法进行定量。放射性浓度表示为每克样品[14C]布林西多福韦的μg当量(μg equiv/g)。将定量下限(LLOQ)应用于数据(参见6.7.4节)。

[0968] 低于LLOQ的组织浓度被定义为低于定量极限(BQL)。未在放射自显影图像上显示的组织区域被定义为无样品(NS)并报告为BQL。如果在动物放射自显影图上没有看到组织,则不生成校准曲线,并且该动物的所有组织浓度都报告为BQL。

[0969] 这些结果是基于原始的、电子的、数字的图像,这些图像是从一组完整的自显影照片中选择的。

[0970] 动物观察

[0971] 在本研究中,在大鼠中未观察到可观察到的异常。

[0972] 第1组-2小时静脉输注后大鼠的质量平衡

[0973] 表68列出了第1组雄性SD大鼠的个体动物和总放射性的平均排泄物数据的总结。

表68:以15mg/kg的目标剂量对雄性Sprague Dawley大鼠2小时静脉输注[^{14}C]布林西多福韦后的总放射性的排泄物

[0974]

样品	时间点	回收率(% 剂量)				
		大鼠数量			平均值	SD
		01	02	03		
尿液	给药前	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0-8h	33.0	29.3	30.7	31.0	1.9
	8-24h	10.7	11.5	16.2	12.8	3.0
	24-48h	4.3	3.6	4.5	4.1	0.5
	48-72h	1.6	1.6	1.9	1.7	0.2
	72-96h	0.8	0.8	0.8	0.8	0.0
	96-120h	0.4	0.3	0.5	0.4	0.1
	120-144h	0.2	0.2	0.3	0.2	0.0
	144-168h	0.2	0.1	0.2	0.2	0.0
	小计	51.2	47.5	55.1	51.2	3.8
粪便	给药前	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0-24h	37.3	37.6	35.1	36.7	1.4
	24-48h	3.4	4.6	3.5	3.8	0.7
	48-72h	0.9	1.0	0.8	0.9	0.1
	72-96h	0.4	0.4	0.4	0.4	0.0
	96-120h	0.2	0.2	0.2	0.2	0.0
	120-144h	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0
	144-168h	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0
	小计	42.4	44.2	40.2	42.2	2.0
	总计	93.6	91.6	95.2	93.5	1.8

[0975] SD＝标准差;

[0976] 对雄性大鼠2小时IV输注给药15mg/kg[^{14}C]布林西多福韦后消除放射性的主要途径是尿,其在168h内占给药剂量的51.2％(平均值)。在粪便中获得了给药剂量的42.2％(平均值)。在168h收集期间,第1组雄性大鼠的尿液和粪便中的联合放射性的总回收率为给药的平均93.5％。大部分的尿排泄物(给药的43.8％或尿液中排出的放射性的放射性的86％)和粪便排泄物(给药的36.7％或粪便中排出的放射性的87％)的放射性发生在给药后第一个24h。

[0977] 第2组-IV给药15mg/kg后大鼠的毒性动力学

[0978] 表69报告了第2组的雄性SD大鼠的血浆总放射性浓度与时间、PK参数和血液与血浆的比。

[0979] 表69:单次2小时静脉输注15mg/kg的[^{14}C]布林西多福韦后的雄性Sprague Dawley大鼠的血液和血浆浓度以及药物动力学参数(第2组)

[0980]

时间点 (h)	血浆浓度 (μg/mL)	血液浓度 (μg equiv/mL)	血液与血浆比
0.5	2.557	1.666	0.65
1	4.609	3.017	0.65
2	10.297	6.393	0.62
4	5.363	3.845	0.72
8	1.961	1.584	0.81
24	0.234	0.294	1.26
72	0.045	0.057	1.27
$t_{1/2}$ (h)	13.0	14.5	
T_{max} (h)	2	2	
C_{max} (μg equiv/mL)	10.297	6.393	
AUC_{last} (μg equiv-h/mL)	64.448	50.836	
AU_{Call} (μg equiv-h/mL)	64.448	50.836	
AUC_{inf_obs} (μg equiv-h/mL)	65.292	52.028	

[0981] 以15mg/kg对雄性大鼠2小时IV输注给药后血浆中[^{14}C]布林西多福韦总放射性的C_{max}在2h的T_{max}(即输注结束)为10.3μg equiv/mL,并且浓度在给药后72h下降至0.045μg equiv/mL。血浆中[^{14}C]布林西多福韦的AUC_{last}为64.4μg equiv/mL,以及$t_{1/2}$为13.0h。

[0982] 第2组SD大鼠的血液与血浆比表明,[^{14}C]布林西多福韦衍生的放射性在0.5至8h(范围在0.62-0.8之间)最初优先分配至血浆而不是大鼠血液的细胞部分,但是之后在给药后24和72h分别以1.26和1.27的比例显示出更多的分配到细胞方面中。

[0983] <u>第3-7组-15mg/kg(IV和PO)和2mg/kg(IV)IV和PO给药后在白化病和色素沉着大鼠中血液与血浆浓度比的比较</u>

[0984] 表70报告了第3组至第7组雄性SD和LE大鼠的血液与血浆浓度比。图3表示的是从第3-7组获得的血液与血浆浓度与时间分布的比较。

[0985] 表70:单次2小时静脉输注或口服强喂给药[^{14}C]布林西多福韦后雄性大鼠中的血液与血浆比(第3-7组)

[0986] [0987]

组/品系	给药途径	剂量 (mg/kg)	血液:血浆比 给药开始后时间 (h)						
			0.5	1	2	4	8	24	72
3/SD	IV	15	NS	NS	0.96	NS	NS	1.23	NS
4/LE	IV	15	NS	1.10	1.08	0.92	1.39	1.46	3.06
5/LE	IV	2	NS	NS	0.89	NS	1.03	1.41	1.25
6/SD	PO	15	NS	NS	0.64	NS	NS	0.78	NS
7/LE	PO	15	ND	1.13	0.98	0.80	0.76	0.87	ND

[0988] ND＝未测定,血液和/或血浆BQLNS＝在该时间点未采集样本

[0989] 与第2组相似,在给药IV[^{14}C]布林西多福韦的其它动物组中(SD大鼠,第3组;LE大

鼠,第4和5组)观察到在较后时间点趋向于更高的血液:血浆比,尽管在早期(稀疏)时间点的比率大致一致。口服给药[^{14}C]布林西多福韦后,血液:血浆比在0.64-1.13之间,在较后的时间点(直到给药后24小时)没有观察到较高的血液:血浆比趋势。

[0990] 第3和4组-IV给药15mg/kg后白化病和色素沉着大鼠的QWBA组织分布

[0991] 表71和表72分别列出了雄性白化病(第3组;n＝3)和色素沉着大鼠(第4组;n＝9)中的[^{14}C]布林西多福韦组织分布总结。

[0992] 表71:以15mg/kg的目标剂量单次静脉输注[^{14}C]布林西多福韦后雄性Sprague Dawley(白化病,第3组)大鼠组织中的放射性浓度

[0993]

组织类型	组织	浓度 (μg equiv./g)		
		大鼠# 11	大鼠# 12	大鼠# 13
		2 h	24 h	168 h
血管/淋巴	血浆 (通过 LSC)	7.130	0.251	BQL
	血液 (心脏)	6.865	0.308	BQL
	骨髓	3.411	1.219	0.196
	淋巴结	4.055	1.004	0.247
	脾	4.536	2.244	0.694
	胸腺	2.373	0.556	0.105
排泄器官/ 新陈代谢	胆汁 (管道内)	NI	1.469	0.058
	肾皮质	106.513	32.109	0.474
	肾髓质	33.444	4.271	0.186
	肝脏	229.371	13.907	0.453

[0994]

	膀胱	35.978	2.264	0.132
	膀胱(内容物)	47.034	21.237	0.121
中枢神经系统	脑 (小脑)	0.907	0.161	BQL
	脑 (大脑)	0.803	0.107	BQL
	脑 (骨髓)	0.864	0.132	BQL
	脊髓	0.437	0.079	BQL
内分泌	肾上腺	4.308	1.680	0.647
	脑垂体	2.793	1.021	0.257
	甲状腺	2.751	0.791	0.239
分泌器官	哈德氏腺	2.081	1.278	0.954
	胰腺	1.974	0.557	BQL
	唾液腺	2.049	0.395	0.047
脂肪	动物脂肪(棕色)	2.088	0.473	0.391
	动物脂肪(白色)	0.386	0.135	BQL
皮肤的	皮肤 (无色素沉着)	2.277	0.602	0.121
生殖	附睾	2.391	0.566	0.234
	前列腺	2.033	0.254	0.051
	精囊	1.809	1.636	0.817
	睾丸	1.647	0.436	0.078
骨骼/肌肉	骨	0.449	0.095	BQL
	心脏	2.540	0.408	0.057
	骨骼肌	0.868	0.099	BQL
呼吸系统	肺	5.675	1.128	0.296
消化道	盲肠	3.658	5.981	0.099
	盲肠 (内容物)	0.085	58.016	0.196

[0995]

	食管	3.567	0.572	0.043
	大肠	3.581	2.019	0.129
	大肠(内容物)	BQL	35.809	0.374
	小肠	43.741	6.290	1.704
	小肠(内容物)	95.869	66.664	0.039
	胃(胃粘膜)	3.777	1.333	0.062
	胃(内容物)	3.827	26.408	0.051
眼部	眼睛(水晶体)	BQL	BQL	BQL
	眼睛(葡萄膜)	2.342	0.469	0.095

[0996] BQL＝值低于LLOQ;Ni＝在可接受的部分上未标识。

[0997] LLOQ＝0.00048400μCi/g/0.0135694μCi/μg＝0.036μg当量/g组织ULOQ＝20.97300000μCi/g/0.0135694μCi/μg＝1545.610μg当量/g组织

[0998]

表 72：以 15 mg/kg 的目标剂量单次 2 小时静脉输注[^{14}C]布林西多福韦后雄性 Long-Evans（色素沉着，第 4 组）大鼠组织中的放射性浓度

组织类型	组织	浓度（μg equiv/g 组织）								
		大鼠# 14	大鼠 t# 15	大鼠# 16	大鼠# 17	大鼠# 18	大鼠# 19	大鼠# 20	大鼠# 21	大鼠# 22
		1 h	2 h	4 h	8 h	24 h	72 h	96 h	168 h	840 h
血管/淋巴	血浆(通过 LSC[a])	2.754	4.918	3.080	1.207	0.154	0.017	BQL	BQL	BQL
	血液（心脏）	3.040	5.291	2.839	1.679	0.225	0.052	BQL	BQL	BQL
	骨髓	1.464	3.348	2.550	2.045	0.898	0.552	0.280	0.232	0.043
	淋巴结	1.682	4.002	2.244	1.936	0.745	0.710	0.270	0.247	0.062
	脾	2.081	4.314	3.249	2.728	1.870	1.675	1.106	0.892	0.273
	胸腺	1.223	2.125	1.205	1.107	0.403	0.359	0.215	0.100	BQL
排泄器官/新陈代谢	胆汁（管道内）	243.705	508.358	178.597	BQL	1.010	0.526	0.044	BQL	BQL
	肾皮质	36.713	97.276	76.678	56.528	19.453	4.070	1.041	0.330	BQL
	肾髓质	8.092	26.987	25.330	22.989	7.117	1.478	0.648	0.138	BQL
	肝脏	126.516	229.669	118.543	53.166	13.918	3.261	1.269	0.451	BQL
	膀胱	6.053	5.004	22.781	5.643	1.885	0.336	0.100	BQL	BQL
	膀胱(内容物)	19.057	26.805	814.445	82.440	22.258	1.911	0.357	0.104	BQL
中枢神经系统	脑（小脑）	0.569	1.144	0.422	0.284	0.099	0.073	BQL	BQL	BQL

[0999]

	脑 (大脑)	0.391	0.887	0.341	0.196	0.070	0.062	BQL	BQL	BQL
	脑 (骨髓)	0.498	0.858	0.376	0.199	0.085	0.059	BQL	BQL	BQL
	脊髓	0.462	0.940	0.277	0.116	0.060	BQL	BQL	BQL	BQL
内分泌	肾上腺	2.523	4.802	3.282	3.179	1.253	1.186	0.776	0.490	0.091
	脑垂体	2.397	6.343	4.081	1.089	0.431	0.603	0.297	0.189	BQL
	甲状腺	1.486	2.454	1.884	1.532	0.567	0.376	0.197	0.459	BQL
分泌器官	哈德氏腺	0.897	2.049	1.476	1.284	0.665	1.098	0.536	0.403	BQL
	胰腺	0.864	1.896	1.051	0.834	0.315	0.194	0.082	BQL	BQL
	唾液腺	1.335	2.508	1.153	0.821	0.314	0.190	0.134	0.056	BQL
脂肪	动物脂肪(棕色)	0.839	1.680	1.123	0.755	0.306	0.402	0.187	0.132	BQL
	动物脂肪(白色)	0.369	0.365	0.317	0.124	0.058	0.062	BQL	BQL	BQL
皮肤的	皮肤 (无色素沉着)	0.979	2.556	1.925	1.273	0.312	0.443	0.269	0.226	BQL
	皮肤 (色素沉着)	1.193	2.848	2.118	1.233	0.491	0.337	0.209	0.090	BQL
生殖	附睾	0.828	1.654	1.795	0.821	0.362	0.243	0.204	0.129	BQL
	前列腺	0.561	0.901	0.715	0.542	0.157	0.104	0.127	BQL	BQL
	精囊	0.938	1.834	2.285	1.717	1.127	1.374	1.038	0.361	BQL
	睾丸	0.595	1.321	1.021	0.802	0.285	0.240	0.196	0.098	BQL
骨骼/肌肉	骨	0.130	0.257	0.183	0.190	BQL	0.036	0.040	BQL	BQL
	心脏	1.190	2.401	0.997	0.815	0.226	0.173	0.118	0.062	BQL
	骨骼肌	0.427	0.611	0.343	0.152	0.063	0.070	0.040	BQL	BQL
呼吸系统	肺	3.063	6.350	3.690	2.233	0.585	0.886	0.362	0.178	BQL
消化道	盲肠	1.781	3.052	2.443	6.189	7.077	0.527	0.208	0.080	BQL

[1000]

	盲肠 (内容物)	0.099	1.065	42.166	175.858	30.022	1.987	0.159	0.123	BQL
	食管	1.750	2.456	1.803	1.747	0.377	0.357	0.098	0.041	BQL
	大肠	1.455	5.497	2.338	3.071	3.064	0.993	0.545	0.278	BQL
	大肠(内容物)	BQL	2.223	137.870	235.751	48.798	3.347	0.273	0.103	BQL
	小肠	6.622	71.029	42.479	48.384	3.184	4.569	0.911	0.339	BQL
	小肠(内容物)	50.503	422.957	55.541	22.421	0.962	0.615	0.120	BQL	BQL
	胃(胃粘膜)	1.446	2.518	1.430	1.223	0.295	0.225	0.110	0.069	BQL
	胃(内容物)	1.125	6.178	0.960	10.997	0.170	0.080	BQL	BQL	BQL
眼部	眼睛(水晶体)	0.039	0.077	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL
	眼睛(葡萄膜)	0.875	1.411	1.412	0.925	0.452	0.322	0.188	BQL	BQL

[1001] 第3组-白化病雄性大鼠QWBA组织分布(稀疏取样)

[1002] 在以15mg/kg 2小时IV输注后,[^{14}C]布林西多福韦衍生的放射性均匀地分布在白

化病雄性大鼠的大部分组织中(n＝1只动物在给药开始后2、24和168h),并且在给药结束时大多数组织的浓度略低于血液/血浆中的浓度,但在之后的时间点高于血液/血浆中的浓度。在所有时间点排泄物和消化道组织浓度都显著高于血液/血浆。血液中观察到的[^{14}C]布林西多福韦衍生的放射性的最高浓度为6.9μg equiv/g,其在2h被观察到(输注时间结束时和稀疏取样组的第一次采集时间点)。在给药后2h(第一次取样时间点)在大多数组织(37个组织中的35个)中发现了[^{14}C]布林西多福韦衍生的放射性的C_{max},此时大多数组织的浓度在1.0至6.0μg equiv/g之间。

[1003] 在各自的T_{max}下具有最高浓度(>20.0μg equiv/g)的组织是:肝脏(229.4μg equiv/g)、肾皮质(106.5μg equiv/g)、小肠(43.7μg equiv/g)、膀胱(36.0μg equiv/g)和肾髓质(33.4μg equiv/g)。在各自的T_{max}下具有最低浓度(<1.0μg equiv/g)的组织是:脑、脊髓、白色脂肪、骨、骨骼肌和眼睛晶状体。

[1004] 通过QWBA测定的最高总浓度在消化道内容物(C_{max}的范围从24h在胃中的26.4μgequiv/g至2h在小肠中的95.9μg equiv/g)以及膀胱内容物(在2h为47.0μg equiv/g)中观察到,其反映了在2小时IV输注后[^{14}C]布林西多福韦衍生的放射性的消除途径。

[1005] 在给药后168h,大多数组织中药物相关物质的消除不完全;但那些确定含有放射性的组织的浓度<1.0μg equiv/g。

[1006] 第4组-色素沉着雄性大鼠QWBA组织分布

[1007] 在以15mg/kg 2小时IV输注后,在给药开始后,[^{14}C]布林西多福韦衍生的放射性均匀地分布在色素沉着雄性大鼠的大部分组织中(n＝1只动物在1、2、4、8、24、72、96、168和840h),在较早时间点大多数组织的浓度略低于血液/血浆中的浓度(输注开始后直到4小时),但在之后的时间点高于血液/血浆中的浓度。基于AUC(AUC_{tissue}:AUC_{plasma};表78)的组织:血浆(T/P)比显示大多数组织的值>1,表明组织浓度高于血浆。在所有时间点排泄物和消化道组织浓度都显著高于血液/血浆。血液中观察到的[^{14}C]布林西多福韦衍生的放射性的最高浓度为5.3μg equiv/g,其在2h观察到(输注时间结束时和稀疏取样组的第二次采集时间点)。在给药后2h在大多数组织(38个组织中的33个)中发现了[^{14}C]布林西多福韦衍生的放射性的C_{max},此时大多数组织的浓度在1.0至6.0μg equiv/g之间。

[1008] 在各自的T_{max}下具有最高浓度(>20.0μg equiv/g)的组织是:肝脏(229.7μg equiv/g)、肾皮质(97.3μg equiv/g)、小肠(71.0μg equiv/g)、肾髓质(27.0μg equiv/g)和膀胱(22.8μg equiv/g)。在各自的Tmax下具有最低浓度(<0.5μg equiv/g)的组织是:脑(大脑和骨髓)、脊髓、白色脂肪、前列腺、骨、骨骼肌和眼睛晶状体。

[1009] 通过QWBA测定的最高总浓度在膀胱内容物(在4h为814.4μg equiv/g)、胆汁内容物(在2h为508.4μg equiv/g)和消化道内容物(C_{max}的范围从8h在胃中的11.0μg equiv/g至2h在小肠中的423.0μg equiv/g)中观察到,其反映了在2小时IV输注后[^{14}C]布林西多福韦衍生的放射性的消除途径。不希望拘泥于理论,胆汁可能是在早期时间点中具有高浓度放射性的肠内容物中高浓度放射性的来源。胃中的高浓度将支持这种观察,因为胃靠近胆汁进入消化系统的入口,尽管基于在168h胃粘膜中存在放射性的观察,胃分泌也是可能的。

[1010] 大多数组织中的组织浓度稳定下降,但在给药后168h,大多数组织中药物相关物质的清除不完全。在含有放射性的组织中,存在的浓度为<1.0μg equiv/g。在给药后840h(最后采样时间点),放射性仍然存在于骨髓、淋巴结、脾脏和肾上腺,但除了脾脏(0.270μg equiv/g)外这些组织接近LLOQ(0.036μg equiv/g)。

[1011] 在稀疏时间点检测SD大鼠(第3组),与给药相同剂量的LE大鼠相比,没有观察到组织浓度的显著差异(第4组)。比较无色素沉着(SD大鼠第3组)和有色素沉着组织(LE大鼠第4组)之间放射性的组织分布,发现有色素沉着组织(即眼葡萄膜束和色素沉着皮肤)与非色素沉着组织中观察到的浓度相似。这表明[^{14}C]布林西多福韦衍生的放射性与黑色素没有特异性关联。

[1012] 第5组-以2mg/kgIV给药后色素沉着雄性大鼠QWBA组织分布(稀疏取样)

[1013] 表73总结了以2mg/kg单次2小时IV输注给药后雄性色素沉着大鼠QWBA组织分布(n＝1只动物在初始给药后2、8、24和72h)。

[1014] 表73:以2mg/kg的目标剂量单次2小时静脉输注[^{14}C]布林西多福韦后雄性Long-Evans(色素沉着,第5组)大鼠组织中的放射性浓度

[1015]

组织类型	组织	浓度 (μg equiv/g 组织)			
		大鼠# 23	大鼠# 24	大鼠# 25	大鼠# 26
		2 h	8 h	24 h	72 h
血管/淋巴	血浆 (通过 LSC)	0.863	0.173	0.029	0.008
	血液 (心脏)	0.771	0.178	0.041	0.010
	骨髓	0.596	0.225	0.163	0.074
	淋巴结	0.453	0.219	0.149	0.085
	脾	0.821	0.561	0.358	0.284

[1016]

	胸腺	0.331	0.136	0.078	0.050
排泄器官/ 新陈代谢	胆汁 (管道内)	32.663	3.781	0.097	0.069
	肾皮质	11.047	8.188	3.570	0.772
	肾髓质	3.359	1.362	0.854	0.257
	肝脏	34.158	10.631	4.037	1.393
	膀胱	0.474	0.519	0.253	0.117
	膀胱 (内容物)	22.905	3.544	1.348	0.249
中枢神经系统	脑 (小脑)	0.172	0.036	0.020	0.012
	脑 (大脑)	0.150	0.030	0.016	0.006
	脑 (骨髓)	0.101	0.027	0.019	0.006
	脊髓	0.151	0.024	0.011	0.006
内分泌	肾上腺	0.685	0.440	0.245	0.167
	脑垂体	0.899	0.367	0.089	0.055
	甲状腺	0.348	0.157	0.105	0.056
分泌器官	哈德氏腺	0.300	0.162	0.116	0.100
	胰腺	0.406	0.089	0.052	0.022
	唾液腺	0.494	0.111	0.071	0.030
脂肪	动物脂肪(棕色)	0.356	0.099	0.050	0.039
	动物脂肪(白色)	0.120	0.015	0.033	0.005
皮肤的	皮肤 (无色素沉着)	0.288	0.268	0.108	0.068
	皮肤 (色素沉着)	0.460	0.186	0.116	0.047
生殖	附睾	0.328	0.088	0.089	0.037
	前列腺	0.166	0.039	0.035	0.015
	精囊	0.364	0.304	0.327	0.172
	睾丸	0.231	0.091	0.076	0.041
骨骼/肌肉	骨	0.022	0.017	0.019	0.010
	心脏	0.373	0.109	0.040	0.025
	骨骼肌	0.167	0.023	0.017	0.007
呼吸系统	肺	0.997	0.283	0.195	0.115
消化道	盲肠	0.507	0.696	0.145	0.090

[1017]

	盲肠 (内容物)	0.051	30.663	3.948	0.191
	食管	0.425	0.346	0.134	0.036
	大肠	0.545	1.028	0.504	0.128
	大肠(内容物)	0.059	48.477	4.244	0.335
	小肠	1.710	2.462	0.704	0.076
	小肠(内容物)	63.303	1.982	0.207	0.032
	胃(胃粘膜)	0.553	0.122	0.077	0.031
	胃(内容物)	0.014	0.051	0.006	0.008
眼部	眼睛(水晶体)	BQL	BQL	BQL	BQL
	眼睛(葡萄膜束)	0.352	0.144	0.092	0.061

[1018] BQL＝值低于LLOQ

[1019] LLOQ＝0.00048400μCi/g/0.10151μCi/μg＝0.005μg当量/g组织

[1020] ULOQ＝20.97300000μCi/g/0.10151μCi/μg＝206.610μg当量/g组织

[1021] 在以2mg/kg2小时IV输注后,[^{14}C]布林西多福韦衍生的放射性均匀地分布在色素沉着雄性大鼠的大部分组织中,并且在输注结束时大多数组织的浓度略低于血液/血浆中的浓度,但在之后的时间点高于血液/血浆中的浓度。在所有时间点排泄物和消化道组织都显著高于血液/血浆。血液中观察到的[^{14}C]布林西多福韦衍生的放射性的最高浓度为0.771μg equiv/g,其在2h被观察到(输注结束时和稀疏取样组的第一次采集时间点),比15mg/kg剂量后观察到的低7倍。在给药后2h(第一次取样时间点)在大多数组织(38个组织中的35个)中发现了[^{14}C]布林西多福韦衍生的放射性的C_{max},此时大多数组织的浓度在0.2至0.7μgequiv/g之间,比以15mg/kg对大鼠给药后观察到的低10倍。与15mg/kg(第4组)相比,IV给药2mg/kg(第5组)后的平均组织浓度比表明,组织浓度的增加在血管淋巴结、排泄器官/新陈代谢、中枢神经、内分泌、分泌、脂肪、真皮、生殖、骨骼/肌肉和呼吸(肺)中近似成剂量比例(表74)。小肠的平均组织浓度比通常较大,表明随着从2至15mg/kg的剂量增加小肠浓度以更大的比例增加。

[1022]

表 74：第 4 组（15 mg/kg）与第 5 组（2 mg/kg）的单个组织浓度的布林西多福韦比

		浓度(μg equiv/g 组织)											
		G5 (2mg/kg)	G 4 (15 mg/kg)		G 5 (2 mg/kg)	G4 (15 mg/kg)		G 5 (2 mg/kg)	G 4 (15 mg/kg)		G 5 (2 mg/kg)	G 4 (15 mg/kg)	
		大鼠 # 23	大鼠# 15	比	大鼠# 24	大鼠 #17	比	大鼠# 25	大鼠# 18	比	大鼠# 26	大鼠# 19	比
组织类型	组织	2 h	2 h	2 h	8 h Lo	8 h Hi	8 h	24 h Lo	24 h Hi	24 h	72 h Lo	72 h Hi	72 h
血管/淋巴	血液(心脏)	0.771	5.291	7	0.178	1.679	9	0.041	0.225	5	0.010	0.052	5
血管/淋巴	骨髓	0.596	3.348	6	0.225	2.045	9	0.163	0.898	6	0.074	0.552	7
血管/淋巴	淋巴结	0.453	4.002	9	0.219	1.936	9	0.149	0.745	5	0.085	0.710	8
血管/淋巴	脾	0.821	4.314	5	0.561	2.728	5	0.358	1.870	5	0.284	1.675	6
血管/淋巴	胸腺	0.331	2.125	6	0.136	1.107	8	0.078	0.403	5	0.050	0.359	7
排泄器官/新陈代谢	肾皮质	11.047	97.276	9	8.188	56.528	7	3.570	19.453	5	0.772	4.070	5
排泄器官/新陈代谢	肾髓质	3.359	26.987	8	1.362	22.989	17	0.854	7.117	8	0.257	1.478	6
排泄器官/新陈代谢	肝脏	34.158	229.669	7	10.631	53.166	5	4.037	13.918	3	1.393	3.261	2
排泄器官/新陈代谢	膀胱	0.474	5.004	11	0.519	5.643	11	0.253	1.885	7	0.117	0.336	3
中枢神经系统	脑(小脑)	0.172	1.144	7	0.036	0.284	8	0.020	0.099	5	0.012	0.073	6

[1023]

中枢神经系统	脑 (大脑)	0.150	0.887	6	0.030	0.196	7	0.016	0.070	4	0.006	0.062	10
中枢神经系统	脑(骨髓)	0.101	0.858	8	0.027	0.199	7	0.019	0.085	4	0.006	0.059	10
中枢神经系统	脊髓	0.151	0.940	6	0.024	0.116	5	0.011	0.060	5	0.006	BQL	NC
内分泌	肾上腺	0.685	4.802	7	0.440	3.179	7	0.245	1.253	5	0.167	1.186	7
内分泌	脑垂体	0.899	6.343	7	0.367	1.089	3	0.089	0.431	5	0.055	0.603	11
内分泌	甲状腺	0.348	2.454	7	0.157	1.532	10	0.105	0.567	5	0.056	0.376	7
分泌器官	哈德氏腺	0.300	2.049	7	0.162	1.284	8	0.116	0.665	6	0.100	1.098	11
分泌器官	胰腺	0.406	1.896	5	0.089	0.834	9	0.052	0.315	6	0.022	0.194	9
分泌器官	唾液腺	0.494	2.508	5	0.111	0.821	7	0.071	0.314	4	0.030	0.190	6
肥胖	脂肪(棕色)	0.356	1.680	5	0.099	0.755	8	0.050	0.306	6	0.039	0.402	10
肥胖	脂肪(白色)	0.120	0.365	3	0.015	0.124	8	0.033	0.058	2	0.005	0.062	12
皮肤的	皮肤(非色素沉着)	0.288	2.556	9	0.268	1.273	5	0.108	0.312	3	0.068	0.443	7
皮肤的	皮肤(色素沉着)	0.460	2.848	6	0.186	1.233	7	0.116	0.491	4	0.047	0.337	7
生殖	附睾	0.328	1.654	5	0.088	0.821	9	0.089	0.362	4	0.037	0.243	7
生殖	前列腺	0.166	0.901	5	0.039	0.542	14	0.035	0.157	4	0.015	0.104	7
生殖	精囊	0.364	1.834	5	0.304	1.717	6	0.327	1.127	3	0.172	1.374	8
生殖	睾丸	0.231	1.321	6	0.091	0.802	9	0.076	0.285	4	0.041	0.240	6
骨骼/肌肉	骨	0.022	0.257	12	0.017	0.190	11	0.019	BQL	NC	0.010	0.036	NC
骨骼/肌肉	心脏	0.373	2.401	6	0.109	0.815	7	0.040	0.226	6	0.025	0.173	7

[1024]

骨骼/肌肉	骨骼肌	0.167	0.611	4	0.023	0.152	7	0.017	0.063	4	0.007	0.070	10
呼吸道	肺	0.997	6.350	6	0.283	2.233	8	0.195	0.585	3	0.115	0.886	8
消化道	盲肠	0.507	3.052	6	0.696	6.189	9	0.145	7.077	49	0.090	0.527	6
消化道	食管	0.425	2.456	6	0.346	1.747	5	0.134	0.377	3	0.036	0.357	10
消化道	大肠	0.545	5.497	10	1.028	3.071	3	0.504	3.064	6	0.128	0.993	8
消化道	小肠	1.710	71.029	42	2.462	48.384	20	0.704	3.184	5	0.076	4.569	60
消化道	胃（胃粘膜）	0.553	2.518	5	0.122	1.223	10	0.077	0.295	4	0.031	0.225	7
眼部	眼睛(晶状体)	BQL	0.077	NC	BQL	BQL	NC	BQL	BQL	NC	BQL	BQL	NC
眼部	眼睛（葡萄膜束）	0.352	1.411	4	0.144	0.925	6	0.092	0.452	5	0.061	0.322	5
NC =未计算													
NI =切片期间未收集的组织													
NS =未取样，由于 BQL 放射性而无法在放射自显影仪上显示的组织													
BQL = 值低于 LLOQ													
LLOQ =	0.00048400	μCi/g /			0.10151			μCi/μg =			0.005	μg 当量/ g 组织	
ULOQ =	20.97300000	μCi/g /			0.10151			μCi/μg =			206.610	μg 当量/ g 组织	

[1025] 在各自的T_{max}下具有最高浓度>1.0μg equiv/g的组织是:肝脏(34.2μg equiv/g)、肾皮质(11.0μg equiv/g)、肾髓质(3.4μg equiv/g)、小肠(2.5μg equiv/g)和大肠(1.0μ gequiv/g)。在各自的T_{max}下具有最低浓度(<0.20μg equiv/g)的组织是:脑、脊髓、白色脂肪、前列腺、骨骼肌和眼睛晶状体。

[1026] 通过QWBA测定的最高总浓度在消化道内容物(C_{max}的范围从8h在胃中的0.051μgequiv/g至2h在小肠中的63.3μg equiv/g)、胆汁(在2h为32.7μg equiv/g)以及膀胱内容物(在2h为22.9μg equiv/g)中观察到,其反映了在2小时IV输注后[^{14}C]布林西多福韦衍生的放射性的消除途径。

[1027] 在大多数组织中组织浓度稳定下降,但在给药后72h(对该组进行分析的最后一个时间点),在所有组织中均检测到药物相关物质,但大多数与清除器官无关的组织的浓度<0.10μgequiv/g。

[1028] 第6和7组-以15mg/kg PO给药后在白血病和色素沉着雄性大鼠中QWBA组织分布

[1029] 表75和表76分别列出了雄性白化病(第6组;n=3)和色素沉着(第7组;n=10)中的[^{14}C]布林西多福韦组织分布总结。药物动力学参数在表77中给出。

[1030] 表75:以15mg/kg的目标剂量单次口服给药[^{14}C]布林西多福韦后的雄性Sprague Dawley(白化病,第6组)大鼠组织中的放射性浓度

[1031]

组织类型	组织	浓度 (μg equiv./g)		
		大鼠# 27	大鼠# 28	大鼠# 29
		2 h	24 h	168 h
血管/淋巴	血浆 (通过 LSC)	0.313	0.253	BQL
	血液 (心脏)	0.200	0.197	BQL
	骨髓	0.080	0.407	0.075
	淋巴结	0.095	0.329	0.124
	脾	0.116	0.831	0.239
	胸腺	0.045	0.142	BQL
排泄器官/ 新陈代谢	胆汁 (管道内)	9.639	0.465	0.045
	肾皮质	2.752	18.379	0.588
	肾髓质	2.189	7.926	0.274
	肝脏	7.260	20.567	0.450
	膀胱	4.367	17.321	0.087

[1032]

	膀胱 (内容物)	9.808	39.903	0.549
中枢神经系统	脑 (小脑)	0.035	BQL	BQL
	脑 (大脑)	BQL	BQL	BQL
	脑 (骨髓)	BQL	BQL	BQL
	脊髓	BQL	BQL	BQL
内分泌	肾上腺	0.114	0.927	0.035
	脑垂体	BQL	0.257	0.071
	甲状腺	0.084	0.291	0.036
分泌器官	哈德氏腺	0.062	0.315	0.100
	胰腺	0.092	0.164	0.034
	唾液腺	0.067	0.103	BQL
脂肪	动物脂肪(棕色)	0.053	0.212	BQL
	动物脂肪(白色)	BQL	0.079	BQL
皮肤的	皮肤 (无色素沉着)	0.088	0.189	0.063
生殖	附睾	0.073	0.091	0.075
	前列腺	0.069	0.217	BQL
	精囊	0.048	0.333	0.097
	睾丸	0.039	0.118	BQL
骨骼/肌肉	骨	BQL	0.047	BQL
	心脏	0.080	0.116	BQL
	骨骼肌	0.039	BQL	BQL
呼吸系统	肺	0.184	0.296	0.078
消化道	盲肠	0.109	7.533	0.064
	盲肠 (内容物)	BQL	28.579	0.170
	食管	0.593	0.271	BQL
	大肠	0.084	2.194	0.076
	大肠(内容物)	BQL	34.450	0.168
	小肠	236.279	84.063	2.680
	小肠(内容物)	321.878	11.948	0.054
	胃(胃粘膜)	11.183	1.075	0.041
	胃(内容物)	877.490	5.664	BQL

[1033]

眼部	眼睛(水晶体)	BQL	BQL	BQL
	眼睛(葡萄膜束)	0.145	0.290	BQL

[1034] BQL＝值低于LLOQLLOQ＝0.00048400μCi/g/0.0147μCi/μg＝0.034μg当量/g组织

[1035] ULOQ＝20.97300000μCi/g/0.0147μCi/μg＝1469.727μg当量/g组织

[1036] 表76:以15mg/kg的目标剂量单次口服给药[^{14}C]布林西多福韦后的雄性Long-Evans(色素沉着,第7组)大鼠组织中的放射性浓度

[1037]

组织类型	组织	浓度 (μg equiv/g 组织)									
		大鼠#30	大鼠#31	大鼠#32	大鼠#33	大鼠#34	大鼠#35	大鼠#36	大鼠#37	大鼠#38	大鼠#39
		0.5 h	1 h	2 h	4 h	8 h	24 h	72 h	96 h	168 h	840 h
血管/淋巴	血浆(通过LSC)	0.040	0.248	0.446	1.216	1.499	0.184	0.017	BQL	BQL	BQL
	血液 (心脏)	BQL	0.280	0.435	0.978	1.132	0.160	BQL	0.035	BQL	BQL
	骨髓	BQL	0.085	0.117	0.254	0.412	0.391	0.167	0.211	0.094	BQL
	淋巴结	0.050	0.153	0.097	0.380	0.421	0.389	0.339	0.141	0.129	BQL
	脾	0.267	0.111	0.166	0.319	0.533	0.759	0.469	0.466	0.274	BQL
	胸腺	0.083	0.065	0.104	0.154	0.224	0.116	0.040	0.083	BQL	BQL
排泄器官/ 新陈代谢	胆汁 (管道内)	0.572	8.660	20.537	36.265	17.878	0.614	2.425	0.317	0.140	BQL
	肾皮质	0.146	1.452	3.976	10.662	17.789	8.640	2.368	1.696	0.342	0.051
	肾髓质	0.096	0.602	3.593	5.104	9.070	2.724	1.023	0.653	0.201	BQL
	肝脏	0.432	7.701	12.037	36.137	34.744	18.184	2.183	2.680	0.393	0.034
	膀胱	BQL	1.146	0.214	1.588	3.728	0.659	0.177	0.256	0.076	BQL
	膀胱 (内容物)	0.200	11.376	7.593	17.825	110.910	11.541	0.205	1.292	0.278	BQL
中枢神经系统	脑 (小脑)	BQL	BQL	BQL	0.037	0.075	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL
	脑 (大脑)	BQL	BQL	BQL	0.035	0.066	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL
	脑 (骨髓)	BQL	BQL	BQL	0.049	0.043	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL
	脊髓	BQL	BQL	BQL	0.037	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL
内分泌	肾上腺	BQL	0.180	0.372	0.749	1.331	0.578	0.278	0.172	0.058	BQL
	脑垂体	BQL	0.045	0.085	0.330	0.266	0.151	0.076	0.073	0.042	BQL

[1038]

	甲状腺	BQL	0.118	0.168	0.317	0.298	0.139	0.117	0.089	0.038	BQL
分泌器官	哈德氏腺	BQL	0.046	0.090	0.181	0.244	0.150	0.155	0.194	0.110	BQL
	胰腺	0.066	0.166	0.193	0.255	0.214	0.096	0.051	0.044	BQL	BQL
	唾液腺	BQL	0.087	0.112	0.212	0.234	0.109	BQL	0.052	BQL	BQL
脂肪	动物脂肪(棕色)	0.040	0.099	0.084	0.302	0.240	0.099	0.050	0.044	0.037	BQL
	动物脂肪(白色)	BQL	BQL	0.063	0.089	0.076	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL
皮肤的	皮肤 (无色素沉着)	BQL	0.102	0.100	0.261	0.429	0.107	0.058	0.067	BQL	BQL
	皮肤 (色素沉着)	BQL	0.086	0.156	0.416	0.429	0.157	0.069	0.077	BQL	BQL
生殖	附睾	BQL	0.084	0.064	0.294	0.229	0.146	0.064	0.108	0.042	BQL
	前列腺	BQL	0.077	0.120	0.148	0.128	0.100	BQL	0.052	BQL	BQL
	精囊	BQL	1.018	0.109	0.221	0.244	0.259	0.156	0.185	0.063	BQL
	睾丸	BQL	0.042	0.051	0.142	0.223	0.152	0.078	0.098	0.041	BQL
骨骼/肌肉	骨	BQL	BQL	BQL	0.099	0.043	0.035	BQL	BQL	BQL	BQL
	心脏	BQL	0.083	0.182	0.247	0.358	0.121	0.061	0.077	0.045	BQL
	骨骼肌	BQL	0.046	0.060	0.074	0.098	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL
呼吸系统	肺	BQL	0.226	0.386	0.768	1.025	0.178	0.136	0.105	0.065	BQL
消化道	盲肠	BQL	0.127	0.289	0.931	7.561	0.688	0.189	0.327	0.137	BQL
	盲肠 (内容物)	BQL	BQL	0.050	38.957	256.303	35.629	1.035	0.698	0.071	BQL
	食管	BQL	BQL	0.185	4.636	0.458	0.179	BQL	0.071	BQL	BQL
	大肠	BQL	0.107	0.136	0.265	3.338	1.681	0.276	0.413	0.060	BQL
	大肠(内容物)	BQL	BQL	BQL	BQL	378.695	69.825	1.236	1.252	0.108	BQL
	小肠	72.672	374.771	295.445	458.485	178.332	74.587	6.889	16.979	5.867	0.070
	小肠(内容物)	53.944	82.546	72.107	187.589	98.195	69.109	0.215	9.654	BQL	BQL
	胃(胃粘膜)	2.769	7.730	11.955	0.833	0.880	0.937	0.108	0.101	0.042	BQL
	胃(内容物)	670.358	1004.619	328.988	274.917	17.792	0.056	BQL	BQL	BQL	BQL

[1039]

眼部	眼睛(水晶体)	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL
	眼睛(葡萄膜束)	BQL	BQL	0.193	0.227	0.601	0.178	BQL	0.075	BQL	BQL

[1040] BQL＝值低于LLOQLLOQ＝0.00048400μCi/g/0.01427μCi/μg＝0.034μg当量/g组织

[1041]　ULOQ＝20.97300000μCi/g/0.01427μCi/μg＝1469.727μg当量/g组织

[1042]　表77:以15mg/kg的目标剂量单次口服给药[14C]布林西多福韦后的大鼠组织药物动力学参数

[1043]

器官/组织	大鼠 PK						
	C_{max} (μg equiv/g)	$t_{1/2}$ (h)	$t_{1/2}$ 处的点数	r^2	T_{max} (h)	AUC_{all} (μg equiv•h/g)	AUC_{inf_obs} (μg equiv•h/g)
动物脂肪 (棕色)	0.302	233.5	3	0.96	4	24.3703	24.4043
动物脂肪(白色) [a]	0.089	17.6	2	1.00	4	1.1215	2.4387
肾上腺	1.331	43.2	3	1.00	8	74.5860	58.7136
血液(心脏) [a]	1.132	32.8	2	1.00	8	21.9165	22.3146
骨 [a]	0.099	53.9	2	1.00	4	1.8470	3.7274
骨髓 [a]	0.412	96.3	3	0.75	8	68.7413	50.2191
脑 (小脑)	0.075	ND	0	ND	8	0.8610	ND
脑 (大脑)	0.066	ND	0	ND	8	0.7650	ND
脑(骨髓)	0.049	ND	0	ND	4	0.5770	ND
盲肠 a	7.561	69.9	4	0.71	8	174.4118	142.1970
附睾 [a]	0.294	89.0	4	0.72	4	31.1150	22.3936
食管	4.636	37.2	3	0.88	4	27.9015	29.1559
眼睛 (水晶体)	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
眼睛(葡萄膜束) [a]	0.601	57.7	2	1.00	8	16.2765	19.8244
哈德氏腺 [a]	0.244	151.8	3	0.64	8	63.7645	50.8931
心脏 [a]	0.358	110.8	4	0.81	8	31.1603	23.2365
肾皮质 [a]	17.789	244.8	2	1.00	8	804.4980	822.5076
肾髓质	9.070	41.2	3	1.00	8	342.0130	286.4307
大肠 [a]	3.338	37.6	3	0.82	8	140.3313	123.4302
肝脏 [a]	36.137	190.3	2	1.00	4	1426.6340	1435.9700

[1044]

肺	1.025	93.0	3	0.99	8	53.1145	39.9962
淋巴结 [a]	0.421	86.4	3	0.56	8	85.04325	57.7701
胰腺 [b]	0.255	62.1	3	0.98	4	10.3720	12.7271
脑垂体	0.330	106.2	3	0.97	4	30.5073	22.8331
血浆 (LSC)	1.499	ND	ND	ND	8	22.3885	ND
前列腺	0.148	70.1	3	0.99	4	7.6578	11.0471
唾液腺 [a]	0.234	67.4	2	1.00	8	9.1933	12.3800
精囊	1.018	64.7	3	0.86	1	50.2500	34.9600
骨骼肌	0.098	ND	0	ND	8	1.3265	ND
皮肤 (无色素沉着) [a]	0.429	93.7	3	0.72	8	14.0275	20.6749
皮肤 (色素沉着) [a]	0.429	63.4	3	0.81	8	17.0405	21.3144
小肠	458.485	98.1	3	0.99	4	9575.1810	9585.0880
脊髓	0.037	ND	0	ND	4	0.1110	ND
脾	0.759	115.4	3	0.95	24	172.2208	125.7566
胃(粘膜)	11.955	66.8	3	0.97	2	90.7575	80.6917
睾丸 [a]	0.223	87.2	3	0.77	8	30.3920	21.7757
胸腺 [a]	0.224	96.9	3	0.23	8	12.0843	20.6983
甲状腺	0.317	59.0	3	1.00	4	31.3395	21.8086
膀胱	3.728	49.7	4	0.87	8	111.2445	91.1627

[1045] ND＝未确定;无法从数据中确定值。

[1046] [a]这些组织/器官的$t_{1/2}$值是从不足的数据点中获得的,和/或所得到的r^2值落在可接受标准(≥0.85)之外,因此,这些值应被视为估计。

[1047] <u>第6组-给药后白化病雄性大鼠QWBA组织分布(稀疏取样)</u>

[1048] 在以15mg/kg单剂量口服给药后,[^{14}C]布林西多福韦衍生的放射性均匀地分布在白化病雄性大鼠(n＝1只动物在给药后2、24和168h)中,并且在早期时间点(给药后2小时)大多数组织的浓度略低于血液/血浆中的浓度,但在之后的时间点高于血液/血浆中的浓度。在所有时间点排泄物和消化道组织浓度都显著高于血液/血浆。血液中观察到的[^{14}C]布林西多福韦衍生的放射性的最高浓度为0.200μg equiv/g,其在2h被观察到(稀疏取样组的第一次采集时间点)。在给药后24h(第二次取样时间点)在大多数组织(37个组织中的31个)中发现了[^{14}C]布林西多福韦衍生的放射性的C_{max},此时大多数组织的浓度在0.10至0.50μgequiv/g之间。

[1049] 在各自的T_{max}下具有最高浓度(>7.0μg equiv/g)的组织是:小肠(236.3μg equiv/g)、肝脏(20.6μg equiv/g)、肾皮质(18.4μg equiv/g)、膀胱(17.3μg equiv/g)、胃(11.2μgequiv/g)、肾髓质(7.9μg equiv/g)以及盲肠(7.5μg equiv/g)。在各自的T_{max}具有最低浓度(<0.10μg equiv/g)的组织是:脑、脊髓、白色脂肪、骨骼肌和眼睛晶状体。

[1050] 通过QWBA测定的最高总浓度在消化道内容物(C_{max}的范围从24h在盲肠中的28.6μg equiv/g至2h在胃中的877.5μg equiv/g)、膀胱内容物(在24h为39.9μg equiv/g)以及胆汁(在2h为9.7μg equiv/g)中观察到,其反映了以15mg/kg单次口服给药后[^{14}C]布林西多福韦衍生的放射性的剂量给药途径和/或消除途径。

[1051] 在给药后168h,药物相关物质的清除不完全,在大约一半组织中具有可检测到的浓度(<0.60μg equiv/g)。在小肠中,在168h观察到相对于其他组织较高的残留浓度(2.7μg equiv/g)。

[1052] 第7组-PO给药后色素沉着雄性大鼠QWBA组织分布

[1053] 在以15mg/kg单次口服给药后,[^{14}C]布林西多福韦衍生的放射性均匀地分布在色素沉着雄性大鼠的大部分组织中(n＝1只动物在给药后0.5、1、2、4、8、24、72、96、168和840h),在给药后时间点直至24小时大多数组织的浓度略低于血液/血浆中的浓度,但在之后的时间点高于血液/血浆中的浓度。在所有时间点排泄物和消化道组织浓度都显著高于血液/血浆。基于AUC(AUC_{tissue}:AUC_{plasma};表78)的组织:血浆(T/P)比显示大多数组织的值>1,表明组织浓度高于血浆。血液中观察到的[^{14}C]布林西多福韦衍生的放射性的最高浓度为1.1μg equiv/g,其在8h观察到。在给药后8h在大多数组织(38个组织中的20个)中发现了[^{14}C]布林西多福韦衍生的放射性的C_{max},此时大多数组织的浓度在0.20至0.40μg equiv/g之间。

[1054]

表 78：以 15 mg/kg 的目标剂量单次两小时静脉输注（第 4 组）或口服给药（第 7 组）[^{14}C]布林西多福韦后雄性 Long-Evans 大鼠总放射性的组织分布

组织	C_{max}				AUC_{all}		组织/血浆比		组织浓度	
	(μg equiv/g)		比		(μg equiv•h/g)	比	AUC_{all} 组织/AUC_{all} 血浆		μg equiv/g (168 h)	
	IV (第 4 组)	PO (第 7 组)	(PO/IV)	IV (第 4 组)	PO (第 7 组)	(PO/IV)	IV (第 4 组)	PO (第 7 组	IV (第 4 组)	PO (第 7 组)
血浆 (LSC)	4.918	1.499	0.30	36.3690	22.3885	0.62	1.0	1.0	BQL	BQL
血液 (心脏)	5.291	1.132	0.21	45.3555	21.9165	0.48	1.2	1.0	BQL	BQL
动物脂肪 (棕色)	1.68	0.302	0.18	96.6220	24.3703	0.25	2.7	1.1	0.132	0.037
动物脂肪 (白色)	0.369	0.089	0.24	7.1955	1.1215	0.16	0.2	0.1	BQL	BQL
肾上腺	4.802	1.331	0.28	384.2580	74.5860	0.19	10.6	3.3	0.49	0.058
骨	0.257	0.099	0.39	6.1805	1.8470	0.30	0.2	0.1	BQL	BQL
骨髓	3.348	0.412	0.12	197.3860	68.7413	0.35	5.4	3.1	0.232	0.094
脑(小脑)	1.144	0.075	0.07	12.1870	0.8610	0.07	0.3	0.04	BQL	BQL
脑 (大脑)	0.887	0.066	0.07	9.1765	0.7650	0.08	0.3	0.03	BQL	BQL
脑 (骨髓)	0.858	0.049	0.06	9.7470	0.5770	0.06	0.3	0.0	BQL	BQL
盲肠	7.077	7.561	1.07	360.7580	174.4118	0.48	9.9	7.8	0.08	0.137
附睾	1.795	0.294	0.16	95.0160	31.1150	0.33	2.6	1.4	0.129	0.042
食管	2.456	4.636	1.89	73.1850	27.9015	0.38	2.0	1.2	0.041	BQL
眼睛 (水晶体)	0.077	ND	ND	0.1545	ND	ND	0.0042	ND	BQL	BQL
眼睛(葡萄膜束)	1.412	0.601	0.43	51.5575	16.2765	0.32	1.4	0.7	BQL	BQL

[1055]

哈德氏腺	2.049	0.244	0.12	257.6905	63.7645	0.25	7.1	2.8	0.403	0.11
心脏	2.401	0.358	0.15	58.1205	31.1603	0.54	1.6	1.4	0.062	0.045
肾皮质	97.276	17.789	0.18	1919.6850	804.4980	0.42	52.8	35.9	0.33	0.342
肾髓质	26.987	9.07	0.34	717.8445	342.0130	0.48	19.7	15.3	0.138	0.201
大肠	5.497	3.338	0.61	310.7965	140.3313	0.45	8.5	6.3	0.103	0.06
肝脏	229.669	36.137	0.16	2149.7645	1426.6340	0.66	59.1	63.7	0.451	0.393
肺	6.35	1.025	0.16	180.1960	53.1145	0.29	5.0	2.4	0.178	0.065
淋巴结	4.002	0.421	0.11	208.8530	85.04325	0.41	5.7	3.8	0.247	0.129
胰腺	1.896	0.255	0.13	36.2010	10.3720	0.29	1.0	0.5	BQL	BQL
脑垂体	6.343	0.33	0.05	155.1085	30.5073	0.20	4.3	1.4	0.189	0.042
前列腺	0.901	0.148	0.30	24.3415	7.6578	0.62	0.7	0.3	BQL	BQL
唾液腺	2.508	0.234	0.09	60.9180	9.1933	0.15	1.7	0.4	0.056	BQL
精囊	2.285	1.018	0.45	297.3580	50.2500	0.17	8.2	2.2	0.361	0.063
骨骼肌	0.611	0.098	0.16	10.3485	1.3265	0.13	0.3	0.1	BQL	BQL
皮肤 (无色素沉着)	2.556	0.429	0.17	146.2340	14.0275	0.10	4.0	0.6	0.226	BQL
皮肤 (色素沉着)	2.848	0.429	0.15	95.5050	17.0405	0.18	2.6	0.8	0.09	BQL
小肠	71.029	458.485	6.45	1160.6505	9575.1810	8.25	31.9	427.7	0.339	5.867
脊髓	0.94	0.037	0.04	5.7830	0.1110	0.02	0.2	0.005	BQL	BQL
脾	4.314	0.759	0.18	642.3590	172.2208	0.27	17.7	7.7	0.892	0.274
胃 (粘膜)	2.518	11.955	4.75	70.2310	90.7575	1.29	1.9	4.1	0.069	0.042
睾丸	1.321	0.223	0.17	77.2835	30.3920	0.39	2.1	1.4	0.098	0.041
胸腺	2.125	0.224	0.11	92.4355	12.0843	0.13	2.5	0.5	0.1	BQL
甲状腺	2.454	0.317	0.13	238.0230	31.3395	0.13	6.5	1.4	0.459	0.038

[1056]

膀胱	22.781	3.728	0.16	215.5480	111.2445	0.52	5.9	5.0	BQL	0.076

BQL= 低于量化极限

LLOQ = 0.036 ug equiv/g (第 4 组 IV)

LLOQ = 0.034 ug equiv/g (第 7 组 PO)

ND =未确定，数据不足

[1057] 图4和图5示出了不同组织中布林西多福韦的浓度作为应变量与时间和给药途径的函数。图4比较了对于口服和IV给药小肠中布林西多福韦的浓度作为应变量与时间的函

数。图5比较了对于口服和IV给药肾皮质中布林西多福韦的浓度作为应变量与时间的函数。

[1058]　在各自的T_{max}下具有最高浓度(>2.0μg equiv/g)的组织是:小肠(458.5μg equiv/g)、肝脏(36.1μg equiv/g)、肾皮质(17.8μg equiv/g)、胃(12.0μg equiv/g)、肾髓质(9.1μgequiv/g)、盲肠(7.6μg equiv/g)、膀胱(3.7μg equiv/g)以及大肠(3.3μg equiv/g)。在各自的T_{max}具有最低浓度(<0.10μg equiv/g)的组织是:脑、脊髓、白色脂肪、骨骼肌和眼睛晶状体。

[1059]　通过QWBA测定的最高总浓度在消化道内容物(C_{max}的范围从4h在小肠中的187.6μgequiv/g至1h在胃中的1004.6μg equiv/g)、膀胱内容物(在8h为110.9μg equiv/g)以及胆汁(在4h为36.3μg equiv/g)中观察到,其反映了单次口服给药后[^{14}C]布林西多福韦衍生的放射性的剂量给药途径和/或消除途径。

[1060]　大多数组织中的组织浓度稳定下降,但在给药后168h,除小肠(5.9μg equiv/g)外,在约一半组织中检测到药物相关物质,其大多数浓度<0.40μg equiv/g。在给药后840h(最后一次采样时间点),小肠、肾皮质和肝脏中仍然存在放射性,但所有组织的浓度都接近LLOQ(0.034μg equiv/g)。

[1061]　对雄性SD大鼠以15mg/kg 2小时IV输注[^{14}C]布林西多福韦后放射性消除的主要途径为尿,其在168h收集期内占给药剂量的51.2%(平均值)。在粪便中获得了给药剂量的42.2%(平均值)。大部分(~86%)的尿排泄物和粪便排泄物的放射性发生在给药后第一个24h。

[1062]　2h IV输注后,在每个时间点,大多数组织(除小肠)的放射性的增加与剂量成比例。在小肠组织中,增加大于剂量的比例。口服给药后,放射性很容易被吸收。放射性分布良好,在口服给药后4-8h以及在IV输注结束时(2小时),在大多数组织(38中的34)中出现放射性峰值浓度。IV或口服给药后,放射性的定性分布模式相似;在定量上,组织放射性暴露调整为放射性生物利用度(大约50%),IV给药后通常比口服强喂后更大。放射性浓度最高的组织与排泄器官(即,肝脏、肾脏和肠)有关。各组织的组织与血浆的比均较高(>30),并且在IV和口服途径给药之间,在肾皮质和肝脏中比是相似的。根据给药途径可以预期,小肠组织与血浆的比在口服给药后最高(T/P=428)。然而,IV输注后,显著的放射性与小肠(组织与血浆的比为32)有关。高浓度(C_{max})与胆管中的胆汁有关,其在IV(C_{max} 508μg equiv/g)后比口服(C_{max}=36μg equiv/g)给药后高14倍,暗示IV给药后高小肠组织浓度的可能来源。放射性最低的组织为脑、脊髓、骨骼肌、白色脂肪组织和骨。IV给药(口服给药后血浆C_{max}浓度的~20%和血浆C_{max}浓度的~5%)后,脑和脊髓的放射性关联性更高。没有检测到与黑色素组织(眼睛、葡萄膜)有特定关联的证据。

[1063]　使用四种不同的方法(包括单组织和全身暴露估计)来估计人体在100μCi口服给药后的预测暴露,所有这些都导致人体暴露为4%或小于FDA和ICRP允许的限度。

[1064]　在研究中没有观察到SOP和/或方案集偏差,这对本研究的质量或完整性有不利影响。健康受试者的IV BCV单次上升剂量研究

[1065]　以10mg和25mg将布林西多福韦给药给健康受试者。发现以10mg IV布林西多福韦提供与以100mg口服给药布林西多福韦相似的暴露。结果发现,IV布林西多福韦剂量(10mg和25mg)通常都是安全的和良好耐受的。没有观察到药物相关的不良事件,没有胃肠道不良事件,没有分级实验室异常(例如,没有血液毒性和没有肾毒性)。

[1066] 以100mg和200mg口服BCV的单次剂量导致约5％的腹泻实例，以及350mg剂量导致约20％的腹泻实例。

[1067] 图6示出了在不同的100mg口服给药，10mg IV给药以及25mg IV给药时血浆布林西多福韦浓度(AUC_{inf}(ng*h/mL))的图表。如图6所示，IV给药10mg的布林西多福韦提供与口服给药100mg布林西多福韦基本相同的血浆浓度，而IV给药25mg IV的布林西多福韦提供比IV10 mg给药和口服100mg给药更高的血浆浓度。

[1068] 实施例10-布林西多福韦：具有14天恢复期的大鼠的28天静脉输注毒性研究

[1069] 总结

[1070] 通过2小时静脉滴注对Sprague-Dawley CD®大鼠(15/性别/组)给药0(2X磷酸钠缓冲液)、1、4或15mg/kg/剂量布林西多福韦，每周两次，在29天内共9次。对于所有给药组，给药速率为10mL/kg/hr。在治疗阶段结束时，多达10只动物/性别/组被安乐死和尸检。其余的动物(多达5只动物/性别/组)被保留以进行14天的恢复阶段，以确定任何与布林西多福韦相关的效应的进展或可逆性。对卫星动物(多达3/性别/组)进行类似给药，并在第1天和第29天从每只动物收集系列血液样本，用于布林西多福韦和布林西多福韦代谢物(西多福韦，CDV)的毒性动力学分析。研究期间评估的参数有：存活率、临床观察、眼科、体重、食物消耗、临床病理(给药终止和恢复结束)、器官重量、宏观观察和显微病理。

[1071] 在第1天和第29天随着剂量的增加布林西多福韦暴露量增加，其具有大于AUC_{last}相对于剂量的增加的比例的趋势。一般来说，不希望拘泥于理论，在29天的研究过程中，没有布林西多福韦的积累。布林西多福韦的雄性对雌性比表明在暴露中没有性别差异(基于C_{max}和AUC_{last})。

[1072] 在第1天和第29天，静脉输注布林西多福韦后，随着布林西多福韦剂量的增加(从1至15mg/kg)，CDV C_{max}和AUC_{last}值增加。总的来说，在整个研究过程中，具有很少至没有的CDV的积累，并且雄性对雌性比通常表明在CDV暴露中没有性别差异。

[1073] 没有与布林西多福韦相关的死亡率。本研究中有3例计划外死亡，毒性动物中有2例死亡，其被确定为与布林西多福韦无关，以及TK动物中有1例死亡，其原因无法确定。

[1074] 在眼科学、体重、血液学、凝血、临床化学或尿分析中没有与布林西多福韦相关的效应。

[1075] 在≥4mg/kg/剂量时，在所有性别中布林西多福韦的给药在一些但不是所有动物中导致间歇性(通常在输注后)临床症状(有和没有毛发直立的快速呼吸和俯卧姿势，部分闭合的眼睛，活动减少不规则呼吸，和/或扁平姿势)，以及在雄性中以≥1mg/kg/剂量和雌性中以15mg/kg/剂量具有最低限度的减少的食物消耗。

[1076] 在给药结束时，在4≥mg/kg/剂量时在雄性生殖道(睾丸、附睾和精囊)和肠道(十二指肠、空肠和/或回肠)中，以及在15mg/kg/剂量时在雄性和雌性皮肤(皮脂腺)中存在与布林西多福韦有关的发现。在雄性生殖道中，睾丸的变化的特征是睾丸重量减轻，以及在≥4mg/kg时轻微至明显的生殖细胞减少，在15mg/kg/剂量时具有最小的精子细胞保留以及Sertoli细胞空泡化。此外，雄性在15mg/kg/剂量时具有最小的附睾腔细胞碎片和最小地增加的精囊中上皮细胞凋亡。在肠道中，在所有性别中，在≥4mg/kg/剂量时在小肠(隐窝)中，以及在15mg/kg/剂量时在大肠(腺体)中观察到单细胞坏死。在15mg/kg时，在雄性和雌性中存在皮肤中的皮脂腺萎缩。

[1077] 表79:口服和静脉输注布林西多福韦的毒性比较

[1078]

[1079]

口服布林西多福韦 (单次给药)			IV 布林西多福韦 (重复给药)		
剂量 (mg/kg)	暴露 (ng/mL 或 ng•hr/mL)	发现	剂量 (mg/kg)	暴露 (ng/mL 或 ng•hr/mL)	初步发现
30	C_{max}-426 AUC-5564	小肠绒毛基部的粘膜隐窝或腺上皮细胞的单细胞坏死	1	C_{max}-298 AUC- 410	没有 GI 发现
100	C_{max}-1086 AUC-13552	腹泻, 脱水, ↓体重 胃扩张 肠炎伴上皮细胞丢失和炎症 38%死亡率	4	C_{max}-1200 AUC- 2759	最小到轻微的小肠坏死隐窝; 最小的隐窝增生
300	C_{max}-1186 AUC-20506	临床: 腹泻, 脱水, ↓体重 胃扩张, 空肠扩张 盲肠扩张, 结肠扩张 随着炎性渗透到固有层, 粘膜上皮细胞广泛减少 100%死亡率	15	C_{max}-4500 AUC-9893	轻微至最小的小肠隐窝坏死; 最小的隐窝增生; 最小的上皮腺坏死大肠
1000	C_{max}-1375 AUC-26449	临床: 腹泻, 脱水, ↓体重 胃扩张, 空肠扩张 盲肠扩张, 结肠扩张 与 300mg/kg 相似的 GI 毒性 100%死亡率	注: 输注 BCV 导致呼吸急促、俯卧姿势-在输注期间在一些动物中有或没有毛发直立的间歇性临床症状;以及在输注后不久完全解决。		

[1080] 经过14天的恢复期后,在≥4mg/kg/剂量时,在雄性中除睾丸重量下降和生殖细胞耗减外,所有的发现完全恢复;然而,不希望拘泥于理论,预计生殖细胞耗减不会在2周内完全恢复。此外,一些动物在15mg/kg/剂量下(3/5雄性;2/5雌性)具有骨髓细胞减少的细胞数以及柔软和/或小的睾丸和附睾(雄性)。不希望拘泥于理论,睾丸中的生殖细胞耗减和附睾头部区域的减少的精子反映了在给药期结束时观察到的由生殖细胞群丢失而导致的成熟耗减。

[1081] 在本研究的条件下,基于在≥4mg/kg/剂量时雄性中的睾丸生殖细胞耗减和在15mg/kg/剂量时1个雌性中的中度肠壁单细胞隐窝坏死,布林西多福韦的无明显损害作用水平(NOAEL)被认为在雄性中为1mg/kg/剂量和在雌性中为4mg/kg/剂量。

[1082] 引言

[1083] 本研究中使用以下缩写:

[1084]	M	雄性
[1085]	F	雌性
[1086]	～	约
[1087]	mg/kg	每体重的千克的测试项目的毫克
[1088]	mL/kg	每体重的千克的剂量制剂的毫升
[1089]	mL/kg/hr	每小时每体重的千克的剂量制剂的毫升
[1090]	mg/mL	每剂量制剂的毫升的测试项目的毫克
[1091]	IV	静脉注射的
	MTD	最大耐受剂量
[1092]	DRF	剂量范围发现

[1093] 本研究的目的是当通过静脉(2小时)输注对大鼠进行每周2次,在29天的过程中共9次的给药时,评估布林西多福韦的毒性和毒性动力学,并在14天的无药物治疗后恢复期期间评价布林西多福韦效应的进展或可逆性。

[1094] 本研究设计纳入了毒性研究的一般管理指南的要素。

[1095] 本研究是按照下列良好实验室规范进行的:美国食品和药物管理局的良好实验室规范(21CFR的第58部分);以及良好实验室规范的OECD原则(1997年修订),ENV/MC/CHEM(98)17

[1096] 这些原则符合由欧洲共同体、美国(EPA和FDA)以及日本(MHLW、MAFF和METI)和其他签署OECD相互接受数据协议的国家规定的良好实验室规范条例。

[1097] 本研究符合动物福利法规的所有适当部分:9CFR第1部分和第2部分最终规则,联邦登记册,第54卷,第168号,1989年8月31日,第36112-36163页,自1989年10月30日起生效以及9CFR第3部分动物福利标准;最终规则,联邦登记册,第56卷,第32号,1991年2月15日,第6426-6505页,自1991年3月18日起生效。

[1098] 管理机构(例如FDA)建议对两个物种或更多物种(一种啮齿动物,一种非啮齿动物)进行临床前研究以支持人体给药。大鼠是毒性研究中常用的动物模型。此外,历史数据库可用于比较评估。

[1099] 对测试项目进行静脉给药,每周高达2次。

[1100] 本研究中的动物数量被认为是统计、监管和科学原因所必需的最小数量。本研究的目的是监测毒性以及测试项目的效应的进展或可逆性。历史对照数据表明,个体动物的临床实验室数据、器官重量数据和组织的显微镜检查各不相同。进行亚慢性研究(10只动物/性别/组)所使用的大鼠数量由监管指导文件推荐,并被认为是解释动物间预期变异性的最小数量。为了确定测试项目的潜在效应的进展或可逆性,在研究中包括了额外的治疗后(恢复)动物(5只动物/性别/组)。接受低、中和高倍的拟议人体剂量的三个试验项目处理组和一个阴性对照组被认为是提供一系列效应所必需的最小组数,并且允许将结果外推到人。

[1101] 考虑到吸收、分布、代谢和排泄过程的固有变异性,选择用于毒性动力学评价的动物数量(3/性别/治疗组)被认为是提供有意义的数据所必需的最小数量。需要具有3只动物/性别的对照组来评价测试项目的缺失。

[1102] 在最大耐受剂量(MTD)阶段,在2小时的过程内,本研究(0、1、4和15mg/kg/剂量)的

剂量为2、4、10或15mg/kg/剂量,然后,在剂量范围发现(DRF)阶段中,在9天的过程中,在2小时的过程中对第二组动物给药1或15mg/kg/剂量的3剂量。在该2阶段的研究中给药的高剂量(15mg/kg)被确定为基于在较高浓度下观察到的溶血的最大可行剂量(MFD)。

[1103] 因为输注导管在给药的预定日期退回或不可用并且没有足够的时间来重新定位或修复该线,因此在第29天通过尾静脉注射给下列动物给药;在第28天发现第1511和1519号动物具有退回的导管,在第29天发现第4581号动物在外置术部位附近有溃疡。在此过程中,将这些动物限制在单个塑料锥体内不超过2.25小时(给药部位准备活动15分钟,剂量给药2小时)。

[1104] 表80:实验大纲

[1105]

组	治疗	剂量(mg/kg)[a]	动物数量					
			毒性研究		恢复阶段		卫星研究[b]	
			雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性
1	对照	0	15	15	5	5	3	3
2	BCV	1	15	15	5	5	3	3
3	BCV	4	15	15	5	5	3	3
4	BCV	15	15	15	5	5	3	3

[a]剂量代表活性成分。

[b]在第 1 天和第 29 天收集毒性动力学样品。

[1106] 给药的第一天被定义为研究的第1天。以白色粉末的形式提供布林西多福韦并将其在室温下储存。纯度确定为99.8%。

[1107] 稀释剂是5%葡萄糖注射用溶液(USP),并以透明液体(96.8%纯度)提供。将其在室温下储存。

[1108] 2X磷酸钠缓冲液用作对照。它由磷酸二氢钠(无水)制备,以白色结晶粉末形式提供并在室温下储存(100%纯度)。将磷酸盐缓冲(对照)液溶解在无菌水中,用氢氧化钠调节pH。

[1109] <u>剂量制剂的制备</u>

[1110] 通过混合适量的磷酸二氢钠溶液(400mM)和磷酸一氢钠溶液(400mM)制备2X磷酸钠缓冲液(400mM,pH 8.0±0.04)载剂溶液。必要时用磷酸二氢钠溶液(400mM)调节溶液的pH值。溶液滤过位于层流净化罩之下的0.22μm Millex®-GP(PES)过滤器而进入无菌容器。

[1111] 在2-8℃冷藏储存载剂(对照项目)。配制两次新鲜载剂溶液;一次在剂量1之前以及再一次在剂量4之前,并在制备后一个月内使用每个制剂。

[1112] 通过混合适量的布林西多福韦与2X磷酸钠缓冲液、注射用无菌水、USP和1N氢氧化钠(NaOH)制成15mg/mL布林西多福韦原料。溶液滤过位于层流净化罩之下的0.22μmMillex®-GP过滤器而进入无菌容器。布林西多福韦原料在剂量1之前制备一次,在剂量4之前再次制备,并在2-8℃下冷藏。

[1113] 在位于层流净化罩下的无菌瓶中,通过适量的5%葡萄糖注射液,USP稀释适量的布林西多福韦原液(15mg/mL)或适量的原液载剂(2X磷酸钠缓冲溶液),并倒置10次使其混合以制备剂量制剂。每周制备新鲜给药制剂,并在不使用时在2-8℃冷藏储存。

[1114] 表81:给药

[1115]

组	治疗	剂量 (mg/kg)	浓度 (mg/mL)	体积剂量 (mL/kg/hr)
1	对照	0	0	10
2	BCV	1	0.05	10
3	BCV	4	0.2	10
4	BCV	15	0.75	10

[1116] 保留了布林西多福韦使用的详细记录。在每次制备时测定制备制剂所需的布林西多福韦的量和实际使用的量。

[1117] 稳定性

[1118] 稳定性分析表明,本研究(0.05mg/mL和2.0mg/mL)中所使用的这类浓度的布林西多福韦制剂当在室温下储存时稳定存在24小时,在2至8℃冷藏保存8天。当在室温(标示20℃)下储存时,15.0mg/mL的布林西多福韦原料溶液稳定存在24小时,在2至8℃储存8、14和28天。

[1119] 确认分析

[1120] 在制备当天从每星期准备的每个给药制剂(包括对照)的中间区域取两个样品(每个5mL)。为了进行剂量确认分析,一个样品被重复分析,一个样品被冷藏保存(2至8℃)(由于初始结果在研究接受计划标准之外(±10%的名义),第2组保留的样品被重新分析1周和2周)。

[1121] 储存条件

[1122] 所有剂量制剂样品被冷藏储存(2至8℃)直到分析或最终安排。

[1123] 布林西多福韦给药

[1124] 通过持续2小时的静脉滴注给药布林西多福韦。以20mL/kg/2小时的恒定剂量治疗动物。

[1125] 输注导管植入程序

[1126] 输注导管在剂量给药前约1-3周植入。所有动物,包括备用的动物,通过手术植入导管。

[1127] 手术部位是根据无菌的、恢复性外科手术的测试设备的SOP准备的。动物预先接受镇痛剂(氟尼辛葡胺(USP)2mg/kg,皮下)。

[1128] 所有动物在腹股沟和背部进行麻醉(异氟醚)并剃毛。制作小切口并分离股静脉。在血管上执行小切口,并将无菌导管放置在血管内。导管经股静脉插入,逆行进入肾脏尾端的下腔静脉。用缝线固定导管,然后从皮下穿出,以便在颈后部排出。在外部部位制作一个小口袋,其中留有一圈导管。通过缝合线将腹股沟区域缝合。

[1129] 将动物置于夹套中,植入的导管用带帽的隔膜连接器固定在销上。导管用滔罗定柠檬酸盐封闭溶液封闭。每只动物在手术当天肌内地注射5.0mg/kg的恩氟沙星。

[1130] 在必要时,在试验前期间和在试验期间根据实验负责人的意见进行外科修复(每只动物限制修复1次)以恢复导管通畅。预先给药镇痛剂(氟尼辛葡胺(USP)2mg/kg,皮下)。接受外科修复的动物在手术当天接受适当剂量的抗生素(根据测试设施的标准操作程序)。

[1131] 仅在恢复前剂量给药完成后将导管打结(将结置于导管中,且导管在皮肤下退回)并移除口袋。

[1132] 输注导管维护程序

[1133] 在将动物用于研究之前,根据测试设备的SOP评估植入的股静脉导管的通畅性。

[1134] 体积剂量(速率)

[1135] 20mL/kg/2小时(10mL/kg/小时)。

[1136] 个体剂量浓度

[1137] 从大多数最近记录的排定的体重计算个体动物浓度。

[1138] 频率和持续时间

[1139] 通过2小时静脉输注对测试/对照项目进行给药,每周两次,共9个个体剂量,持续29天。测试/对照项目给药持续到终末期尸检前一天。在最后一次给药后,将恢复动物保留持续14天的观察期。

[1140] 给药部位

[1141] 在股静脉/腔静脉或通过末梢区域的尾静脉通过外科植入的插管。

[1142] 给药程序

[1143] 在给药开始前一至两天,从每只动物的植入的导管中取出封闭溶液(如果可能的话),在连接到系绳和输注给药装置之前,用盐水冲洗导管。在连接到动物的导管后,通过校准的Medfusion注射器泵以0.5mL/hr的速率向动物注射无菌盐水(0.9%NaCl,USP),直至第1天给药。

[1144] 在输注管路中注入盐水冲洗液以输送布林西多福韦,并确保完全剂量(以与布林西多福韦相同的速率,额外～0.5至1mL体积来冲洗导管线路)的输送。

[1145] 在剂量给药期间以盐水维持动物。盐水注射器至少每4天更换一次。

[1146] 当可能时,对有不能使用的/不起作用的导管的动物进行手术修复。如果不能进行修复,根据实验负责人的意见,在限制器内通过末梢区域的尾静脉对这些动物进行给药。将这些动物置于单个塑料锥体内不超过2.25小时(给药部位准备活动15分钟,通过尾静脉注射剂量给药2小时)。

[1147] 在第29天,通过末梢区域的尾静脉对第1511、1519和4581号动物给药剂量9。

[1148] 给药精度

[1149] 基于每个注射器给药前和给药后的重量来每天输注的可计量性(确认实际剂量给药)并检查以进行日常调整;数据保存在研究文件中。在给药开始前用生理盐水使用与本研究相同的给药速率长度检查泵的准确性,并在整个研究中使用给药后可计量性监测泵的性能。

[1150] 动物

[1151] 物种/品种

[1152] 白化病大鼠(使远系繁殖)VAF/Plus®;CD®(Sprague-Dawley衍生的)[Crl:CD®(SD)BR]

[1153] 动物数量

[1154] 共接收170只(85只雄性和85只雌性);144放置在测试中(72只雄性和72只雌性)。

[1155] 预测试期间

[1156] 预测试期间约为4周。在预测试期间检查所有动物,以确认其适合进行研究。直到动物被允许稳定5天,不进行预测试工序。

[1157] 在治疗开始时主要研究动物的年龄

[1158] 约10周

[1159] 在治疗开始时主要研究动物的体重范围

[1160] 雄性:290.6g至422.4g。雌性:203.8g至294.7g

[1161] 分配

[1162] 购买和稳定的动物比研究所需的更多。在随机选择进行组分配之前,根据预测试体格检查和导管通畅性排除被认为不适合研究的动物。通过计算机随机分类程序将被认为适合研究的动物分成4组,每组每性别18只,由此每组的体重均值具有可比性。由于测试前的眼科发现,将一些毒性动物与卫星动物交换,但仍在同一组中。置于测试中的动物的个体重量在每个性别的平均体重的±20%之内。

[1163] 动物的识别

[1164] 将编程有唯一编号的BMDSIMI-1000可植入射频应答器(微芯片)植入每只大鼠。该数字与测试设施指定的动物编号交叉引用;该数字加上研究编号包含每只动物的唯一识别号。此外,每个笼子都配有用颜色编码的笼子卡片,用于剂量水平识别,并包含研究编号和设施指定的动物编号信息。

[1165] 兽医护理

[1166] 通过技术人员监测动物的任何需要可能的兽医护理的状况并根据需要进行治疗。研究负责人审查了针对个体动物的各种各样的,非测试项目相关兽医评估,并将其记录在研究文件中。

[1167] 对来自卫星组的动物进行的系列观察仅限于临床观察、体重、眼科和食物消耗;这些数据未报告。

[1168] 获得血液样品用于测定布林西多福韦和布林西多福韦代谢产物西多福韦的血浆浓度。

[1169] 在第1天和第29天,获得血液样品,用于在下表中所示的时间点进行毒性动力学测定:

[1170] 表82:收集时间和动物数量

[1171]

间隔	时间点	毒性动力学动物数量
第 1 天	剂量给药开始后 2 和 24 小时	3 只动物/性别/组 (第 1 组)
	给药前, 剂量给药开始后 1, 2, 8, 24, 和 48 小时	3 只动物/性别/组 (第 2, 3, 4 组)
第 29 天	剂量给药开始后 2 和 24 小时	3 只动物/性别/组 (第 1 组)
	给药前, 剂量给药开始后 1, 2, 8, 24, 和 48 小时	3 只动物/性别/组 (第 2, 3, 4 组)

[1172] 采集程序

[1173] 在每个时间点通过尾静脉从每只动物获得大约0.4mL的全血。在采集血液之前动物没有被禁食。将血液收集到含有K_2EDTA抗凝剂的管中,并以直立的状态放置在湿冰上。通过离心分离血浆(10分钟,在约2000g,在约2-8℃)。将约0.150mL血浆转移到一个冷冻管中,并适当地用研究数、动物数、时间点、取样日期和样品类型标记。剩余的血浆被转移到第二个冷冻管,并作为备用样品保留。获得血浆并在每份血液样品采集后约2小时内,在大约80

±10℃下冷冻直至分析。动物在最后采血后被安乐死(CO_2吸入)。

[1174] 样品的储存和安排

[1175] 所有样品管被冷冻储藏(-80±10℃)并运输(冷冻,在干冰上)至美国科罗拉多州科罗拉多斯普林斯市的Pyxant实验室进行分析。

[1176] 分析/报告

[1177] 在Pyxant实验室,使用校正的液相色谱-三重四重质谱(LC-MS/MS)试验分析生物分析样品。

[1178] 当收到血浆浓度数据时,通过Nuventra,Inc.达拉漠(Durham),北卡罗来纳州(North Carolina)进行非分区的毒性动力学分析。

[1179] 日常观察

[1180] 每天两次观察在笼子里的动物的死亡率和严重毒性或药理作用的症状。确认健康极差或可能死亡的动物以进行进一步监测和可能的安乐死。

[1181] 给药观察

[1182] 在给药完成后立即以及2小时观察任何亚健康或毒性或药理作用的症状(例如,一般情况、外观、活动、行为、呼吸等异常)。

[1183] 症状

[1184] 将动物从笼中取出,在研究期间进行一次预测试和每周一次的检查。检查包括观察一般情况、皮肤和皮毛、眼睛、鼻子、口腔、腹部和外部生殖器,以及评估呼吸。

[1185] 检眼镜检查

[1186] 对所有动物进行预测试。所有存活的毒性动物在给药结束和恢复结束时进行检查。只有在预测试检查中在正常范围内的动物被置于试验中。

[1187] 目测检查眼睑、泪腺及结膜。间接检眼镜检查角膜、前房、晶状体、虹膜、玻璃体液、视网膜和视盘。

[1188] 每只动物的瞳孔在检查前用托吡卡胺眼液进行扩张。

[1189] 体重

[1190] 在预测试、治疗期间的每次给药的前一天和恢复期间的每周将动物从笼子里取出并称重两次。终末,禁食体重是在预定的尸检间隔之前获得的。在尸检之前,对出于福利原因被安乐死的动物进行称重。

[1191] 食物消耗

[1192] 在治疗前一周开始,每周测量食物消耗。

[1193] 临床病理学

[1194] 对于在给药结束时多达10个毒性动物/性别/组以及在恢复结束时多达5个恢复动物/性别/组,使用在轻度异氟醚麻醉下经眶窦(球后静脉丛)获取的血液分析血液学、凝血和临床化学参数。在每次血液采集间隔之前使动物禁食过夜。

[1195] 通过16小时的过夜采集期间获得多达10个毒性动物/性别/组在给药结束时和多达5个恢复动物/性别/组在恢复结束时的尿液并进行分析。动物在采集期间被禁食但不缺水。

[1196] 血液学

[1197] 将血液样品(约0.25mL)收集到含有K_2EDTA抗凝剂的试管中,并使用西门子ADVIA

120血液分析仪进行下列分析:血红蛋白浓度(HGB);红细胞压积(HCT);红细胞计数(RBC);血小板计数(PLT);平均红细胞体积(MCV);平均红细胞血红蛋白(MCH);红细胞平均血红蛋白浓度(MCHC);红细胞分布宽度(RDW);白细胞总数(WBC);网织红细胞计数(RETIC);分化白细胞计数(进行手动分化白细胞计数以用于核实,必要时计算绝对值);中性白细胞(ANEU);淋巴细胞(ALYM);嗜酸性粒细胞(AEOS);嗜碱性粒细胞(ABASO);单核细胞(AMONO);大的未染色细胞(ALUC)。

[1198] 在每个血液采集间隔为每只动物准备末梢区域的血液涂片,用于确认自动化结果和/或认为必要的其他评价。

[1199] 凝结

[1200] 将血液样品(约1.0mL)收集到含有柠檬酸钠抗凝剂的试管中,并使用诊断斯塔戈产品STA紧凑型(Diagnostica Stago Products STA Compact®)机械凝结检测系统进行下述分析:凝血酶原时间(PT):活化部分凝血活酶时间(APTT)。

[1201] 临床化学

[1202] 将血液样品(约1.0mL)收集到没有抗凝剂的试管中,使其凝固,离心以获得血清,并使用西门子ADVIA 1800化学分析仪进行下列分析:

[1203] 天冬氨酸氨基转移酶(AST)(动力学-改性的Bergmeyer);丙氨酸转氨酶(ALT)(动力学-改性的Bergmeyer);碱性磷酸酶(ALKP)(动力学-Tietz AMP缓冲液);血尿素氮(BUN)(酶-Roch-Ramek和脲酶);肌氨酸酐(CREAT)(碱性介质中的Jaffe Picric酸);葡萄糖(GLU)(葡萄糖己糖激酶II法);胆固醇(CHOL)(酶酯酶/氧化酶-Trand端点);甘油三酯(TRIG)(Fossati三步法酶-Trinder端点);总蛋白质(TP)(缩二脲技术);清蛋白(ALB)(溴甲酚绿法);总胆红素(TBILI)(钒酸盐氧化);钠(NA^+)(离子选择电极);钾(K^+)(离子选择电极);氯(Cl^-)(离子选择电极);钙(Ca^{++})(Michaylova&Ilkova,偶氮胂III);无机磷(PHOS)(磷钼酸盐-UV法)

[1204] 尿液分析

[1205] 从置于代谢笼中的毒性研究动物中收集尿液至冰冻的容器中过夜(约16小时)。

[1206] 使用多用试剂条对尿液样品进行下述分析,用西门子Clinitek Advantus解释:pH;蛋白质(PRO);葡萄糖(GLU);酮(KET);胆红素(BIL);以及潜血(BLD)。

[1207] 也采用人工方法对样本进行下述分析:

[1208] 外观(APP);比重(Sp.G.)(临床折射仪,Atago尿素-N);体积(VOL)。

[1209] 验尸

[1210] 安乐死的方法

[1211] 出于福利原因或在预定的处死间隔被处死的动物通过在异氟醚吸入后放血被安乐死。通过CO_2吸入对毒性动力学动物实施安乐死。

[1212] 预定的尸检

[1213] 在动物被治疗29天后,对多达10个毒性研究动物/性别/组进行尸检,并且在14天无治疗恢复期后,对多达5个毒性研究动物/性别/组进行尸检。在尸检前使动物禁食过夜。建立尸检时间表以确保在整个尸检期间在一天中的相似时间进行来自每组的两种性别的动物的检查。

[1214] 在第29天最后一次血液采集后,毒性动力学动物被安乐死并不经检查丢弃。

[1215] 宏观检查

[1216] 对所有动物进行全面的宏观检查。宏观检查包括检查外表面和所有孔;脑和脊髓的外表面;颅、胸、腹、盆腔和颈部的器官和组织;以及尸体的其余部分是否存在肉眼可见的形态异常。

[1217] 对出于福利原因被处死的第4107号TK动物进行宏观检查,保存组织但不进行显微镜检查。

[1218] 器官重量

[1219] 对所有存活的毒性和恢复研究动物,在预定的处死间隔内对下列器官进行称重。在称重之前,这些器官被仔细解剖并适当修剪,以便以统一的方式去除脂肪和其他邻近组织。为了避免干燥,在解剖后尽快对器官进行称重。配对的器官一起进行称重。

[1220] 组织保存和病理检查

[1221] 下列组织是从所有动物获得并保存下来的。此外,制备所示组织的切片并进行显微镜检查。记录在组织学处理期间观察到的肉眼检查期间未记录的任何异常。

[1222] 表83:组织称重、保存并在显微镜下检查

[1223]

器官名称	称重	保存	显微镜下检查
动物身份		X	
肾上腺	X	X	X
主动脉 (胸)		X	X
骨髓涂片(股骨)		X	

[1224]

器官名称	称重	保存	显微镜下检查
骨和骨髓(股骨关节)		X	X
骨和骨髓(胸骨)		X	X[a]
脑 (髓质、脑桥、大脑和小脑)	X	X	X
附睾	X	X	X
食管		X	X
眼睛		X	X
哈德氏腺		X	X
心	X	X	X
输注部位		X	X
肾脏	X	X	X
泪腺		X	X
大肠(结肠、直肠、盲肠)		X	X[b]
肝脏	X	X	X
肺(具有主干支气管)		X	X
淋巴结(腋窝、肠系膜的)		X	X
乳腺(腹股沟的)		X	X[c]
神经(坐骨神经的)		X	X
视神经		X	
卵巢	X	X	X
胰腺		X	X
脑垂体	X[d]	X	X
前列腺	X[e]	X	X
涎腺(下颌的)		X	X
精囊	X[e]	X	X
骨骼肌(*股直肌*)		X	X
皮肤(尾背基部)		X	X
小肠(十二指肠、回肠、空肠、淋巴集结\GALT)		X	X[c]
脊髓(颈、胸、腰)		X	X
脾	X	X	X
胃		X	X
睾丸	X	X	X
胸腺	X	X	X
甲状腺/甲状旁腺	X[d]	X	X
舌		X	
气管		X	X
膀胱		X	X

[1225]

器官名称	称重	保存	显微镜下检查
具有子宫颈的子宫(身体/角质)	X	X	X
阴道		X	X
泽姆巴尔腺		X	
肉眼可见的组织，包括组织块		X	X

[1226] [a]定性检查(无差异计数)。

[1227] [b]直肠未经显微镜检查。

[1228] [c]仅在常规切片中存在男性乳腺和GALT时对其进行评价。

[1229] [d]固定后称重。

[1230] [e]前列腺和精囊一起称重。

[1231] 防腐剂

[1232] 所有组织均保存于10％中性缓冲福尔马林(NBF)中。首先将眼睛和睾丸置于改性戴维森溶液中,然后保留在10％NBF中。在将肺浸入较大体积的同一固定液之前,在肺中注入10％ NBF。将来自股骨的骨髓的涂片制剂风干并固定在无水甲醇中。

[1233] 处理

[1234] 固定后,对来自于所有动物的组织和器官进行常规处理,包埋在石蜡中,在设定为4-7微米的切片机上切片,安装在玻璃载玻片上,使用苏木精和伊红染色并通过光学显微镜检查。在脱钙剂II™中使骨头脱钙。

[1235] 用于收集存活和死后数据的数据收集系统将研究分为几个阶段。每个阶段的开始于第1天/第1周。本报告中提出的阶段是:

[1236] 治疗前:动物到达的当天开始。阶段日/周被标记为P1、P2、P3等。在此阶段中,动物没有被给药,并且它们没有被分配其永久身份号码。

[1237] 随机化:从动物被分成小组并分配它们的永久身份号码的当天开始。阶段日/周被标记为Ra1、Ra2、Ra3等。在此阶段中,动物没有被给药。

[1238] 治疗:当每只动物接受其在研究计划中指定的第一次测试/对照项目给药时开始。

[1239] 恢复:在每只指定动物停止接受其指定剂量后的当天开始并持续直至研究完成。阶段日/周被标记为R1、R2、R3等。

[1240] 使用的死亡代码具有以下含义:

[1241] “FD”:发现死亡;“S1”:预定的安乐死1;“WE”:因福利原因而被安乐死;“Z1”:恢复安乐死1。

[1242] 临床观察

[1243] 对每个显示症状的动物进行临床观察,提供症状的类型的细节、发生日或周以及适用的症状持续时间的信息。“AM”:晨间观察;“PM”:下午观察;“Unsched”:非计划观察;“Post Dose”:给药完成后立即;“2Hr PD”:给药完成后2小时。

[1244] 眼科检查

[1245] 对表现出发现的每只动物进行观察。除非另有说明,否则观察是双侧的。

[1246] 食物消耗

[1247] 食物消耗(g/天)计算如下:

[1248]　消耗的食物克数÷#天数

[1249]　食物消耗(g/动物/天)计算如下:

[1250]　消耗的食物克数÷动物天数[a]

[1251]　[a]在每一个消耗期内,一整天笼中存活的每只动物的总和。如果一只动物死了,死亡日就不算是动物日。例如:4只动物在笼子里5天等于20个动物日;如果一只动物在第3天死亡,那么动物日等于1

[1252]　血液学

[1253]　使用了以下缩写:“ACMO”:通过人工观测使自动计数无效;“CS”:凝血标本;“NSAD”:没有样本动物死亡。

[1254]　使用以下缩写描述样本注释(SCM1):“CLSE”:注意到严重的血小板聚集;“CLSL”:注意到轻微的血小板聚集;“NCLP”:无聚集。

[1255]　凝结

[1256]　使用了以下缩写:“CS”:凝血标本;“NS”:无标本;“NSAD”:没有样本动物死亡;“NVIR”:由于不可再现的结果而无效。

[1257]　使用以下缩写描述样本注释(SCM1):“SLH”:轻度溶血。

[1258]　血液化学

[1259]　低于分析极限(<10)的BUN值不包括在计算中。低于分析极限(<0.2)的TBILI值不包括在计算中。

[1260]　使用以下缩写:“NS”:无样品;“NSAD”:没有样本动物死亡;“1+H”:最小溶血。

[1261]　球蛋白(GLOB)计算如下:

[1262]　总蛋白-清蛋白

[1263]　清蛋白/球蛋白比(A/G)计算如下:

[1264]　清蛋白/球蛋白

[1265]　尿液分析

[1266]　仅针对体积、pH和比重呈现组平均值。

[1267]　使用以下其他缩写:“NS”:无标本。

[1268]　使用以下缩写描述外观和颜色:“CLOU”:浑浊的;“CLR”:清澈的;“SLCL”:略微浑浊的;“STR”:稻草的;“YELL”:黄色。

[1269]　表84:多标准诊断试剂的定性结果根据以下惯例报告:

[1270]

蛋白质	NEG	阴性
	TR	检测到痕量水平
	30	30mg/dL
	100	100mg/dL
	≥300	≥300mg/dL
葡萄糖	NEG	阴性
	100	100mg/dL
	250	250mg/dL
	500	500mg/dL

	≥1000	≥1000mg/dL
酮类	NEG	阴性
	TR	检测到痕量水平
	15	15mg/dL
	40	40mg/dL
	≥80	≥80mg/dL
胆红素	NEG	阴性
	SM	检测到少量
	MOD	检测到适量
	LG	检测到大量
潜隐血	NEG	阴性
	TR	检测到痕量水平
	SM	检测到少量
	MOD	检测到适量
	LG	检测到大量

[1271] <u>器官重量</u>

[1272] 器官重量是绝对的,相对于尸体解剖当天记录的体重的末期体重,以及相对于脑重量。

[1273] <u>病理</u>

[1274] 除非在组织病理学说明中另有说明,否则所检查的器官/组织是所需的(常规)切片。

[1275] 使用以下缩写:“B-”:良性的;“Cath”:导管;“GALT”:与肠相关的淋巴组织;“Infuse”:输注;“LS”:纵向的;“M-”:恶性;“TS”:横向。

[1276] 组织病理学发现按以下比例分级:

[1277] 极小的 这种变化几乎无法辨别和/或极少/非常小的病灶或区域受到影响。

[1278]

[1279] 轻微的 变化更明显,但只有少数/小病灶或区域受到影响。

[1280]

[1281] 中等的 变化显然是存在的,并且有可观的大小和/或数量。

[1282]

[1283] 显著的 这一变化在该切片的许多区域是丰富的,和/或具有显著的规模。

[1284]

[1285] 严重的 该变化影响大部分组织和/或具有大尺寸。

[1286] 使用个体动物作为基本实验单元,对雄性和雌性分别进行所有统计学分析。

[1287] 分别在每个时间点分析以下数据类型:体重;从间隔至间隔体重的变化;食物消耗;血液学;凝结;临床化学;尿液分析;和器官重量。

[1288] 待分析的参数被定义为连续的、离散的或二元的。然后使用以下程序将测试项目处理组与对照进行比较。

[1289] 研究计划偏差

[1290] 在研究期间发生以下研究计划偏差,但不希望受理论束缚,不认为已经损害了研究的有效性或完整性。

[1291] 第1天,将第2至4组的经加工的8小时给药后的毒性动力学样品置于干冰上过夜。第二天早晨发现样品被冷冻。然而,所需的温度(-80℃(±10℃))在过夜期间没有被监测。在标示的-80℃(±10℃)下,立即将样品转移到SL301冷冻机。

[1292] 在预测试第13天,第1015号动物由于显著低体重而没有进行手术。

[1293] 在第13天,没有对剩余动物进行生存能力检查。然而,动物在第13天之前的一天和之后的一天处于正常范围内。

[1294] 第1592号(第21天)和第4078号(第10天)动物的外科修复分别在修复后7天和2天才得到实验负责人的承认。

[1295] 在第29天,因为动物"难以出血"和"出血缓慢",分别从第2036号(给药后8小时时间点)和第3050号(给药后2小时时间点)动物采集低血液体积的毒性动力学样品。

[1296] 第4074号动物的脑垂体组织是在恢复性尸检时收集的但后来发现在固定后修剪时丢失;未获得重量。

[1297] 在第29天,未对第4580号动物进行立即给药后观察。

[1298] 在第1天,在研究计划规定的"2小时内"处理第1016号和2036号动物的24小时毒性动力学样品1分钟。

[1299] 在末期尸检时,没有记录第1004号动物的临床病理样本收集地点。

[1300] 在第23天,由于福利原因,第4107号毒性动力学动物被转移到尸体解剖,然而,在适当的记录中没有记录该动物但对其进行了检查。

[1301] 根据研究计划,第1015号备用动物被安乐死而不是转移到内部群体。

[1302] 呈现在手术记录上的文件没有记载术后被单独放置导管的动物。

[1303] 在第19天,由于更换了赋形剂注射器,第1528号雌性TK动物的给药输注时间被中断14分钟。

[1304] 在第4天和第12天之间,毒性动力学动物的盐水和注射帽变化记录中没有记录盐水注射器的变化。

[1305] 在第29天,由于第23天的福利原因,第4107号雄性动物被实施了安乐死,因此仅从2只雄性动物中收集了毒性动力学样品,而不是第4组中的3只雄性/组/时间点。

[1306] 在第29天,在指定的时间点之后,超过±3分钟收集下列样品(每个SOP允许的时间):

[1307]

动物编号	天/间隔	排定时间	实际时间	分钟偏差
2029	29-1hr	10:59	11:04	2

[1308] 再对各种动物进行修剪或显微镜检查时以及在尸检间隔,注意到各种组织缺失。

[1309] 由于验证研究的时间安排,预计在给药的第一天之前可能尚未建立稳定性,因此根据原始研究计划将制剂制备改变为每日制备而不是每周制备。在给药前一天制备第1天剂量制剂,从而偏离当时的研究计划。一旦确定稳定性,将制剂制备改变回每周制备。

[1310] 一些剂量间隔在剂量可靠性方面具有不一致性,导致偏离研究计划因为动物接受的剂量多于或少于预期剂量(表84A)。这些可能会或可能不会导致超出范围的剂量责任标准,即±10.0%。

[1311] 表84A:剂量可计量性不一致的样品。

[1312]

动物编号	剂量编号	输注速率 (ml/hr)	理论体积 (ml)	实际体积 (ml)	百分比差异 (%)	代码
*3566	剂量 1	2.51	5.05	5.00	-0.40	A

[1313]

4061	剂量 8	4.08	8.16	9.76	19.61	B
3046	剂量 5	4.04	8.08	10.25	26.86	B
3551	剂量 5	2.47	4.94	4.99	1.01	A
2037	剂量 6	3.55	7.10	8.21	15.63	B
2030	剂量 6	4.04	8.08	7.21	-10.77	B
1511	剂量 9	2.67	5.34	1.07	-79.96	C
1519	剂量 9	2.79	5.58	6.22	11.47	B
4063	剂量 9	4.00	8.00	10.96	37.00	B

[1314] *TK动物

[1315] A=发现导管漏泄的时间量是不确定的B=没有明显的原因

[1316] C=尾静脉导管困难;因福利原因停止给药

[1317] 有一次,一些动物的给药被中断,或者泵设置需要调整,从而影响文件的可靠性。然而,变化小于期望剂量的10%偏差。此外,第1017号动物(TK)没有接受最后2分钟的盐水导管冲洗。

[1318] 在末期尸检当天,第1010、3047、3048、3049、3057、2538、2539和2594号动物在被禁食近26小时后由于福利原因被喂食。

[1319] 分析化学

[1320] 对初步混合物的分析证实,测试项目在室温下(标示20℃)于赋形剂中稳定存在至少24小时,在2至8℃(在本研究中使用的储存条件下)稳定存在至少8天。在治疗期间进行的分析证实除了第1天、1mg/mL(第2组)的制剂外,给药了适当浓度的剂量溶液。第1天、1mg/mL剂量溶液是标示的86.7%。不希望受理论束缚,得出结论,由于半月板处的相互作用,为了剂量制剂分析而收集的体积可能降低了分析结果。为分析而收集的体积在随后的每周制备中增加,并确认其浓度合适。

[1321] 表85:第1天的平均分析浓度

[1322]

组	标示浓度 (ppm) 或 (mg/mL)	分析浓度 (标示的%)
2	1	86.7
2 备份	1	76.9
2 重复制备	1	75.5
3	4	95.7
4	15	100.7

[1323] 表86:第2周的平均分析浓度

[1324]

[1325]

组	标示浓度 (ppm) 或 (mg/mL)	分析浓度 (标示的%)
2	1	90.1
2 备份	1	86.8
3	4	95.4
4	15	102.9

[1326] 表87:第3周的平均分析浓度

[1327]

组	标示浓度 (ppm) 或 (mg/mL)	分析浓度 (标示的%)
2	1	93.2
3	4	94.8
4	15	100.2

[1328] 表88:第4周的平均分析浓度

[1329]

组	标示浓度 (ppm) 或 (mg/mL)	分析浓度 (标示的%)
2	1	92.8
3	4	96.9
4	15	101.0

[1330] 表89:第5周的平均分析浓度

[1331]

组	标示浓度 (ppm) 或 (mg/mL)	分析浓度 (标示的%)
2	1	94.9
3	4	97.7
4	15	101.1

[1332] 布林西多福韦

[1333] 对于从1至15mg/kg的剂量范围,在布林西多福韦处理的动物中,第1天布林西多福韦的峰值血浆浓度发生在输注开始后1至2小时,具有215ng/mL至3670ng/mL的平均浓度范围。对于4和15mg/kg剂量组,在8小时时间点仍可定量测定布林西多福韦的血浆浓度,但是

对于1mg/kg剂量组仅在2小时时间点可定量测定布林西多福韦的血浆浓度。在第1天,随着剂量从1增加到15mg/kg,布林西多福韦的血浆浓度增加。

[1334] 表90:在第1天大鼠中通过治疗的组合的雄性和雌性血浆布林西多福韦毒性动力学参数汇总(TK参数群体)

[1335]

治疗	统计	C_{max} (ng/mL)	C_{max}/剂量 (kg*ng/mL/mg)	T_{max} (hr)	C_{last} (ng/mL)	T_{last} (hr)	AUC_{last} (hr*ng/mL)	AUC_{last}/剂量 ((hr*ng/mL)/(mg/kg))
1 mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6
	平均值	219	219	NC	209	NC	319	319

[1336]

治疗	统计	C_{max} (ng/mL)	C_{max}/剂量 (kg*ng/mL/mg)	T_{max} (hr)	C_{last} (ng/mL)	T_{last} (hr)	AUC_{last} (hr*ng/mL)	AUC_{last}/剂量 ((hr*ng/mL)/(mg/kg))
	SD	39.8	39.8	NC	39.5	NC	58.4	58.4
	CV%	18.2	18.2	NC	18.9	NC	18.3	18.3
	最小	171	171	1.00	157	2.00	249	249
	中值	210	210	1.00	206	2.00	305	305
	最大	271	271	2.00	271	2.00	398	398
4 mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6
	平均值	1010	252	NC	2.20	NC	2215	554
	SD	159	39.8	NC	0.819	NC	717	179
	CV%	15.8	15.8	NC	37.2	NC	32.3	32.3
	最小	825	206	1.00	1.26	8.00	1340	335
	中值	1000	250	2.00	2.31	8.00	2317	579
	最大	1220	305	2.00	3.38	8.00	3056	764
15 mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6
	平均值	3800	254	NC	9.68	NC	8815	588
	SD	565	37.7	NC	3.56	NC	1260	83.8
	CV%	14.9	14.9	NC	36.7	NC	14.3	14.3
	最小	2950	197	1.00	5.06	8.00	7368	491
	中值	3760	251	1.00	10.3	8.00	8777	585
	最大	4460	297	2.00	13.6	8.00	10565	704

[1337] NC=未计算;对于1mg/kg剂量组,仅使用2个可量化数据点计算AUC_{last}值。

[1338] 对于从1至15mg/kg的剂量范围,在第29天布林西多福韦处理的动物中,布林西多福韦的峰值血浆浓度发生在输注开始后1至2小时,具有297ng/mL至4500ng/mL的平均浓度范围。对于4和15mg/kg剂量组,在8小时时间点仍可定量测定布林西多福韦的血浆浓度,在1mg/kg剂量组中为6只动物中的1只。对于1mg/kg剂量组,对于所有动物在2小时时间点可以定量测定血浆浓度。对于大多数动物,在任何剂量给药下,在24小时或48小时时间点均没有可定量的浓度;不包括4mg/kg剂量组中显示出可测量浓度超过48小时的一只动物。在第29天,随着剂量从1增加至15mg/kg,布林西多福韦的血浆浓度增加。表91:在第29天大鼠中通过治疗的组合的雄性和雌性血浆布林西多福韦毒性动力学参数汇总(TK参数群体)

[1339]

治疗	统计	C_{max} (ng/mL)	C_{max}/剂量 (kg*ng/mL/mg)	T_{max} (hr)	C_{last} (ng/mL)	T_{last} (hr)	AUC_{last} (hr*ng/mL)	AUC_{last}/剂量 ((hr*ng/mL)/(mg/kg))
1 mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6
	平均值	298	298	NC	126	NC	410	410
	SD	130	130	NC	88.2	NC	190	190
	CV%	43.7	43.7	NC	69.9	NC	46.4	46.4
	最小	52.6	52.6	1.00	1.12	2.00	73.9	73.9
	中值	324	324	1.00	144	2.00	434	434
	最大	421	421	2.00	229	8.00	653	653
4 mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6
	平均值	1200	301	NC	2.06	NC	2759	690
	SD	297	74.3	NC	0.519	NC	851	213
	CV%	24.7	24.7	NC	25.2	NC	30.8	30.8
	最小	935	234	1.00	1.38	8.00	2119	530
	中值	1160	290	1.00	2.14	8.00	2549	637
	最大	1700	425	2.00	2.67	48.00	4415	1104
15 mg/kg	N	5	5	5	5	5	5	5
	平均值	4500	300	NC	10.9	NC	9893	660
	SD	742	49.5	NC	4.14	NC	1840	122
	CV%	16.5	16.5	NC	37.9	NC	18.6	18.6
	最小	3550	237	1.00	7.75	8.00	8001	533
	中值	4460	297	1.00	8.90	8.00	9528	635
	最大	5600	373	1.00	18.0	8.00	12928	862

[1340]

[1341] NC＝未计算;对于1mg/kg剂量组,仅使用2个可量化数据点计算AUC_{last}值。

[1342] 布林西多福韦代谢物西多福韦在1mg/kg(6只大鼠中0只)和4mg/kg(6只大鼠中1只)剂量组,在第1天布林西多福韦处理的动物中,代谢物CDV的个体血浆浓度通常不能用给药开始后收集的第一个样本来定量。然而,在15mg/kg剂量组中,6只大鼠中有5只在1小时样品收集时间点可定量测定CDV的个体血浆浓度。

[1343] 在第29天,在1mg/kg(6只大鼠中1只)剂量组,通常不能用给药(输注开始后1小时)开始后收集的第一个样品定量代谢物CDV的个体血浆浓度。然而,在4mg/kg剂量组中6只大鼠中的4只以及15mg/kg剂量组的5只大鼠中的5只在1小时取样时间点可定量测定CDV的个体血浆浓度。

[1344] 对于4mg/kg给药的动物在24小时时间点以及对于15mg/kg给药的动物在48小时时间点仍可定量CDV的血浆浓度,但对于1mg/kg剂量组仅可通过8小时时间点定量CDV的血浆浓度。随着布林西多福韦剂量从1增加至15mg/kg,CDV的血浆浓度通常增加。

[1345] 表92:在第1天大鼠中通过治疗的组合的雄性和雌性血浆CDV毒性动力学参数汇总(TK参数群体)

[1346]

治疗	统计	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (hr)	C_{last} (ng/mL)	T_{last} (hr)	T_{lag} (hr)	AUC_{last} (hr*ng/mL)
1 mg/kg	N	6	5	5	5	5	6
	平均值	5.64	NC	5.66	NC	NC	27.3
	SD	2.96	NC	0.486	NC	NC	20.2
	CV%	52.4	NC	8.6	NC	NC	74.1
	最小	0	2.00	5.01	2.00	1.00	0
	中值	6.06	2.00	5.87	8.00	1.00	37.8
	最大	8.60	8.00	6.18	8.00	1.00	45.2
4 mg/kg	N	6	6	6	6	6	6
	平均值	18.0	NC	7.69	NC	NC	280
	SD	5.85	NC	1.12	NC	NC	68.7
	CV%	32.5	NC	14.5	NC	NC	24.5
	最小	11.2	2.00	6.52	24.00	0	204
	中值	16.7	8.00	7.54	24.00	1.00	258
	最大	27.8	8.00	9.62	24.00	1.00	394
15 mg/kg	N	6	6	6	6	6	6
	平均值	32.1	NC	7.29	NC	NC	825
	SD	7.86	NC	1.32	NC	NC	122
	CV%	24.5	NC	18.0	NC	NC	14.8
	最小	23.5	8.00	5.53	48.00	0	699
	中值	33.0	8.00	7.42	48.00	0	817
	最大	39.6	8.00	9.18	48.00	1.00	973

[1347] NC＝未计算;对于1mg/kg剂量组,仅使用2个可量化数据点计算AUC_{last}值。

[1348] 表93:在第29天大鼠中通过治疗的组合的雄性和雌性血浆CDV毒性动力学参数汇总(TK参数群体)

[1349]

治疗	统计	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (hr)	C_{last} (ng/mL)	T_{last} (hr)	T_{lag} (hr)	AUC_{last} (hr*ng/mL)
1 mg/kg	N	6	5	5	5	5	6
	平均值	7.81	NC	8.31	NC	NC	38.6
	SD	4.18	NC	1.90	NC	NC	28.9
	CV%	53.5	NC	22.9	NC	NC	75.0
	最小	0	2.00	5.24	2.00	0	0
	中值	8.41	2.00	8.61	8.00	1.00	43.0

[1350]

	最大	12.5	8.00	10.4	8.00	1.00	74.8
4 mg/kg	N	6	6	6	6	6	6
	平均值	20.4	NC	8.76	NC	NC	399
	SD	9.41	NC	1.69	NC	NC	248
	CV%	46.2	NC	19.3	NC	NC	62.3
	最小	10.6	8.00	6.47	24.00	0	195
	中值	20.0	8.00	8.92	24.00	0	347
	最大	37.3	8.00	10.7	48.00	1.00	883
15 mg/kg	N	5	5	5	5	5	5
	平均值	41.3	NC	8.05	NC	NC	1068
	SD	16.0	NC	1.04	NC	NC	327
	CV%	38.8	NC	13.0	NC	NC	30.6
	最小	23.6	2.00	6.99	48.00	0	732
	中值	44.0	8.00	7.81	48.00	0	1117
	最大	60.9	8.00	9.40	48.00	0	1473

[1351] NC＝未计算;对于1mg/kg剂量组,仅使用2个可量化数据点计算AUC_{last}值。

[1352] 因为动物4107在第29天TK样品收集之前被安乐死,对于15mg/kg剂量组,N＝5。

[1353] 死亡率

[1354] 给药阶段

[1355] 本研究中有3例计划外死亡;没有一例是被认为与布林西多福韦有关的。两只动物(第2595和1005号毒性动物)的死亡原因被确定为与布林西多福韦无关。第三只动物(第4107号TK动物)的死因无法确定。

[1356] 由于可能与意外创伤有关的颅骨肿胀,在第23天出于福利原因对第2595号动物(毒性雌性在1mg/kg/剂量)实施了安乐死。在显微镜下观察到颅骨上的暗区与多灶性出血相关。在第23天,这只大鼠摸起来异常冷,并显示出活动减少和异常(吃力和不规则)呼吸。

[1357] 在第23天,出于福利原因对第4107号动物(毒性动力学雄性在15mg/kg/剂量)实施安乐死。在第23天,这只大鼠摸起来异常冷,并显示出活动减少、部分闭合的眼睑和眼睛无光和呼吸不规则。肝脏和脾脏扩张以及在总尸检时注意到正确的导管尖端位置。死亡原因不能从宏观数据确定,并且不进行微观评估以进一步确定死亡原因。

[1358] 在第27天发现第1005号动物(毒性雄性对照)死亡。在第27天,该动物具有活动减少以及红色水性鼻腔排出物。宏观和显微镜下发现与源自导管部位并散布到多个其他器官的细菌感染一致。

[1359] 恢复阶段

[1360] 没有与布林西多福韦相关的死亡率。

[1361] 临床观察

[1362] 给药阶段

[1363] 以4和15mg/kg/剂量给药布林西多福韦导致一些动物(两种性别)出现间歇性临床症状。间歇性临床症状包括快速呼吸和有或无立毛的俯卧姿势、部分闭合的眼睛、活动减

少、呼吸不规则和/或扁平姿势。进行手动差异白细胞计数以进行验证,并且如果必要的话计算绝对值,通常在第22天和第29天之间输注后观察到这些症状,并且发生率与剂量有关。

[1364] 恢复阶段

[1365] 在治疗阶段期间观察到的所有临床症状在恢复期的第一天完全恢复。在恢复期,没有与布林西多福韦相关的临床症状。

[1366] 眼科学

[1367] 在给药恢复阶段结束时,在眼科学上没有与布林西多福韦相关的效应。

[1368] 体重

[1369] 在体重或体重变化上没有与布林西多福韦相关的效应。

[1370] 食物消耗

[1371] 给药阶段

[1372] 在第1、2、3和/或4周(相对于在第4周的-16%的并发控制)给药≥1mg/kg/剂量的雄性,以及在第3和4周(相对于在第3周的-9.8%的并发控制)给药15mg/kg/剂量的雌性中,具有最小的、统计学显著性的布林西多福韦相关的食物消耗的减少。食物消耗的减少对体重或体重增加没有影响。

[1373] 恢复阶段

[1374] 在治疗阶段观察到的与布林西多福韦相关的食物消耗减少是完全可逆的,因为在恢复期内任何动物的食物消耗都没有与布林西多福韦有关的影响。

[1375] 临床病理学

[1376] 血液学:给药阶段

[1377] 没有与测试项目相关的血液学变化。

[1378] 不希望受理论束缚,所有血液学异常均被认为与输注过程有关,且无明显的剂量相关趋势。这些包括最小至轻微的红细胞数量(血红蛋白,血细胞比容,红血细胞)的减少,并伴随有网织红细胞的增加、血小板计数的增加以及中性粒细胞和/或单核细胞计数的增加。这些发现被认为反映了对导管静脉感染、炎症和增加的失血或破坏的适当的造血和免疫反应。

[1379] 血液学:恢复期

[1380] 在14天的恢复后,没有与测试项目相关的血液学发现。

[1381] 凝结:给药阶段

[1382] 在凝结时间上没有与测试项目相关的影响。

[1383] 不希望受理论束缚,由于其方向、小量级、罕见发生、与剂量无关、相关分析物之间缺乏一致性和/或因为数值与研究控制范围相当所有来自于对照组、统计学显著性或其他的差异,不被认为是与测试项目相关的。

[1384] 凝固:恢复期

[1385] 在14天的恢复后,所有值均与对照组相当。

[1386] 临床化学

[1387] 给药阶段

[1388] 没有测试项目相关的临床化学改变。

[1389] 不希望受理论束缚,所有异常被认为与输注工序有关并且没有表现出明显的剂量

相关趋势。这些包括天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALKP)、血尿素氮(BUN)、肌氨酸酐和球蛋白和清蛋白的减少和清蛋白与清蛋白的比。这些发现与肝脏中的炎症、骨疽、脓肿和梗塞以及肾脏中的炎症、脓肿、尿路上皮增生、管状嗜碱性粒细胞增多症和嗜酸性管状小球以及各种其他组织的一般炎症的微观证据相关。

[1390] 恢复阶段

[1391] 在14天的恢复后,无测试项目相关的临床化学发现。

[1392] 尿液分析

[1393] 给药阶段

[1394] 在尿液分析中无测试项目相关的影响。

[1395] 由于其方向、小量级、罕见发生、与剂量无关、相关分析物之间缺乏一致性和/或因为数值与研究控制范围相当所有来自于对照组、统计学显著性或其他的差异,不被认为是与测试项目相关的。

[1396] 恢复阶段

[1397] 在14天的恢复后,所有值均与对照组相当。

[1398] 器官重量

[1399] 与对照组相比,给药≥4mg/kg/剂量的雄性中存在布林西多福韦相关的,最小至轻微的剂量依赖性更低的睾丸重量(表94)。较低的睾丸重量与显微镜下生殖细胞耗减相关。15mg/kg/剂量雄性具有最小的更低附睾重量。不希望受理论束缚,然而,由于没有相关的显微镜下发现,认为较低的体重是偶然的,并且与睾丸的显微变化无关。

[1400] 表94:连续29天每周两次给药的大鼠中布林西多福韦相关的器官重量的变化(%相对于对照组的差异)

[1401]

组/性别	2M	3M	4M	2F	3F	4F
剂量(mg/kg/剂量)	1	4	15	1	4	15
睾丸						
绝对重量(%)	-	-9[a]	-24[a]	NA	NA	NA
vs.体重(%)	-	-3	-16[a]	NA	NA	NA
vs.脑重(%)	-	-9[a]	-22[a]	NA	NA	NA
附睾						
绝对重量(%)	-	-	-14[a]	NA	NA	NA
vs.体重(%)	-	-	-6	NA	NA	NA
vs.脑重(%)	-	-	-13[a]	NA	NA	NA

[1402] [a]对于布林西多福韦治疗组与对照组的平均值间的统计学显著性差异。-＝非CMX00相关的;NA＝不适用

[1403] 在给药结束时,所有其他器官重量的差异,不论是统计学显著性还是其它,均无微观相关性,并且由于生物变异而被认为是偶然的。

[1404] 在恢复期结束时,给药≥4mg/kg/剂量的雄性睾丸重量(表95)仍然低于对照组,并

且差异的幅度大于给药结束时的差异的幅度。不希望受理论束缚,这些变化,不希望受理论束缚,反映了在给药期结束时在显微镜下观察到的继发于生殖细胞阶段丢失的成熟耗减。

[1405] 表95:连续29天每周两次给药以及14天的恢复期后的大鼠中的布林西多福韦相关的器官重量的变化(%相对于对照组的差异)

[1406]

组/性别	2M	3M	4M	2F	3F	4F
剂量(mg/kg/剂量)	1	4	15	1	4	15
睾丸						
绝对重量(%)	-	-21[a]	-42[a]	NA	NA	NA
vs.体重(%)	-	-26[a]	-40[a]	NA	NA	NA
vs.脑重(%)	-	-18[a]	-41[a]	NA	NA	NA

[1407] [a]对于布林西多福韦治疗组与对照组的平均值间的统计学显著性差异。-＝非CMX00相关的;NA＝不适用

[1408] 所有其他器官重量差异没有微观相关性,并且由于生物变异而被认为是偶然的。

[1409] 病理学:宏观

[1410] 在本研究的给药期间,有三例计划外死亡。两只动物,一只对照组雄性以及一只给药1mg/kg/剂量的雌性在给药阶段由于与布林西多福韦无关的原因而死亡或被安乐死。第三只动物,给药15mg/kg/剂量的毒性动力学雄性,在给药阶段被安乐死;死亡原因无法确定。在恢复阶段,没有与布林西多福韦相关的死亡率。

[1411] 在第27天发现一只对照组雄性(第1005号动物)死亡。死亡原因是脓毒症。宏观和显微镜下发现与源自导管部位并散布到多个其他器官的细菌感染一致,导致许多器官的肿块,在微观上与炎症、脓肿形成、血栓症、梗塞形成和骨疽相关。在肿胀的肢体(左侧股骨胫关节)中也有炎症。骨髓中增加的细胞被认为是对感染的适应性反应性反应,胸腺、脾脏和淋巴结的细胞减少和/或坏死,肾上腺皮质肥大被认为与生理应激有关。

[1412] 由于可能与意外创伤有关的颅骨肿胀,在第23天,一只给药1mg/kg/剂量(第2595号动物)的雌性被安乐死。宏观上观察到的颅骨上的暗区与显微镜下的多病灶的出血相关。

[1413] 在第23天,一只给药15mg/kg/剂量(第4107号动物)的毒性动力学雄性被安乐死。肝脏和脾脏扩张以及在总尸检时注意到正确的导管尖端位置。死亡原因不能从宏观数据确定,并且不进行微观评估以进一步确定死亡原因。

[1414] 终末期处死

[1415] 布林西多福韦相关的发现

[1416] 在给药期结束时没有观察到布林西多福韦相关的宏观发现。

[1417] 程序相关的发现

[1418] 大多数的宏观发现与输注静脉的炎症有关,并存在于包括对照组在内的所有组中。这些发现包括导管植入部位结痂或增厚,以及与输注静脉有关的异常内容、肿块、增厚和/或水肿,肾脏中的颜色反常和肿块,肝脏中的不规则表面或肿块以及肺部暗或苍白区域和肿块。显微镜下,这些发现与炎症和坏死有关。淋巴结和脾脏肿大或颜色异常在显微镜下与反应性淋巴过程(淋巴结和脾脏中卵泡细胞增多)、炎症部位的血液引流(淋巴结中的红细胞增多症/红细胞吞噬症)或骨髓外造血(脾脏)相关。所有这些变化被认为是与输注部

位/程序相关的炎症相关的全身反应。

[1419] 不希望受理论束缚,所有其他宏观发现偶然发生或在对照组中发生,并且由于生物学变异性而被认为是偶然的。在一个15mg/kg/剂量的雄性(第4063号动物)中,异常的颜色(蓝色)和软的左侧睾丸和小的左侧附睾被认为是偶然发生的,并且自发的背景发现与睾丸生殖细胞耗减的布林西多福韦相关的变化无关。不定时发生的单侧睾丸精原细胞管状萎缩在啮齿动物中并不少见。

[1420] 恢复处死

[1421] 测试项目相关的发现

[1422] 在恢复期结束时,布林西多福韦相关的宏观发现仅限于15mg/kg/剂量雄性中的睾丸和附睾。

[1423] 5只雄性中有两只具有软的和/或小的睾丸和附睾。不愿受理论束缚,这些发现与睾丸中的生殖细胞耗减和附睾头部区域的精子减少有关。这些发现反映了在给药期结束时,在显微镜下观察到的继发于生殖细胞数量减少而导致的成熟耗减。一只雄性(第4071号动物)具有单侧(左侧)软的和/或小的睾丸和附睾,其与睾丸中的管状萎缩和整个附睾中精子减少有关;在该雄性中的单侧发现被认为是偶然的自发背景变化。

[1424] 程序相关的发现

[1425] 与输注程序有关的主要宏观发现包括输注静脉内容物异常、肿块、增厚和/或水肿、脾脏增大和肾淋巴结增大。这些发现与显微镜下输注静脉的炎症和脓肿形成、滤泡细胞增多和浆细胞增多有关。增大的肾上腺与皮质肥大有关(与生理应激有关)。

[1426] 病理学:微观

[1427] 布林西多福韦相关的显微镜下发现存在于在≥4mg/kg/剂量下的雄性睾丸、附睾和/或精囊中,在≥4mg/kg/剂量下的雄性和雌性中的肠道中,在15mg/kg/剂量下的雄性和雌性中的皮脂腺中。

[1428] 终末期处死

[1429] 布林西多福韦相关的发现

[1430] 雄性生殖道(睾丸、附睾、精囊)

[1431] 在≥4mg/kg/剂量时,雄性睾丸中存在与布林西多福韦相关的生殖细胞耗减(表96)。这些变化是双侧的,并且在4mg/kg/剂量时最小至轻微,在15mg/kg/剂量时轻微至中度,其严重程度分级一般反映受耗减影响的细胞类型的数量。在4mg/kg/剂量时,生殖细胞耗减的特征是通过前细线期精母细胞精原细胞不同程度的丧失。在15mg/kg/剂量时,生殖细胞耗减的特征是通过粗线期精母细胞精原细胞不同程度的丧失,通常伴有晚期小管中粗线期精母细胞的一些稀少,以及晚期小管中生殖细胞的偶尔的活性变性。

[1432] 与对照组相比,在15mg/kg/剂量时的布林西多福韦相关的发现也包括附睾中最小的管腔细胞碎片,精囊中最小的上皮细胞凋亡增加。后者的变化偶尔伴随有有丝分裂象的增加。最小的上皮细胞凋亡增加也存在于4只给药4mg/kg/剂量的雄性中。

[1433] 在一个15mg/kg/剂量雄性(第4063号动物)中观察到的单侧管状萎缩被认为是在实验室啮齿动物中偶发发生的偶然背景发现。

[1434] 表96:连续29天每周两次给药布林西多福韦的大鼠中的男性生殖道中的布林西多福韦的相关发现

[1435]

组/性别	1M	2M	3M	4M	1F	2F	3F	4F
剂量(mg/kg/剂量)	0	1	4	15	0	1	4	15
检查的组织数量	10	10	10	10	NA	NA	NA	NA
睾丸								
耗减,生殖								
最小的	-	-	6	-	NA	NA	NA	NA
轻微的	-	-	3	5	NA	NA	NA	NA
中等的	-	-	-	5	NA	NA	NA	NA
附睾								
细胞碎片,管腔								
最小的	-	-	-	9	NA	NA	NA	NA
精囊								
细胞凋亡,上皮的								
最小的	-	-	4	8	NA	NA	NA	NA
有丝分裂像,上皮的								
最小的	-	-	-	4	NA	NA	NA	NA
代表的动物总数	0	0	10	10	NA	NA	NA	NA

[1436] -＝没有发现。NA＝不适用。

[1437] 肠道

[1438] 在4mg/kg/剂量时,隐窝上皮(最小至中等)的单细胞坏死存在于雄性和雌性的小肠(十二指肠、空肠和/或回肠)中,并且关于严重程度和/或发生率呈剂量依赖性(表97)。这种变化偶尔伴随着最小的隐窝上皮增生。在15mg/kg/剂量时,最小的单细胞坏死也存在于雄性和雌性的大肠(盲肠和/或结肠)的腺上皮中。

[1439] 表97:连续29天每周两次给药布林西多福韦的大鼠的肠道中的布林西多福韦的相关发现

[1440]

组/性别	1M	2M	3M	4M	1F	2F	3F	4F
剂量(mg/kg/剂量)	0	1	4	15	0	1	4	15
检查的组织数量	10[c]	10	10	10	10	11[d]	10	10
小肠[a]								
坏死、上皮、隐窝								
最小的	-	-	8	2	-	-	9	3
轻微的	-	-	1	8	-	-	-	5
中等的	-	-	-	-	-	-	-	1
增生、上皮、隐窝								
最小的	-	-	5	2	-	-	-	5
大肠[b]								
坏死,上皮,腺体								
最小的	-	-	-	9	-	-	-	4
代表的动物总数	0	0	9	10	0	0	9	9

[1441] [a,b]严重程度等级的发生率代表记录的十二指肠、空肠和回肠[a]

[1442] 以及盲肠和结肠[b]的最高级别。

[1443] [c]十二指肠在一只动物中自溶以及不可读。

[1444] [d]发生率包括一例计划外死亡(第2595号动物)。

[1445] -＝没有发现。

[1446] 皮肤(皮脂腺)

[1447] 在15mg/kg/剂量时,皮脂腺萎缩(从轻微至显著)存在于雄性和雌性中(表98)。显著的严重程度表明显微镜下没有皮脂腺,剩余的附件没有变化(毛囊)。

[1448] 表98:连续29天每周两次给药布林西多福韦的大鼠的皮肤中的布林西多福韦的相关发现

[1449]

组/性别	1M	2M	3M	4M	1F	2F	3F	4F
剂量(mg/kg/剂量)	0	1	4	15	0	1	4	15
检查的组织数量	10	10	10	10	10	11[a]	10	10
萎缩,皮脂腺								
最小的	-	-	-	3	-	-	-	5
轻微的	-	-	-	3	-	-	-	3
中等的	-	-	-	4	-	-	-	2
代表的动物总数	0	0	0	10	0	0	0	10

[1450] [a]发生率包括一例计划外死亡(第2595号动物)。

[1451] -＝没有发现。

[1452] 程序相关的发现

[1453] 在载剂对照组和给药布林西多福韦的动物中观察到与输注程序相关的显微镜发现。不希望被理论束缚,许多发现通常与导管植入有关,包括围壁血栓、缝线肉芽肿和导管静脉的内膜增生(Weber,2011)以及肺中血管周嗜酸性炎症细胞浸润(Morton,1997)。在导管植入部位,一些动物有慢性活动性炎症、脓肿形成和血栓形成伴随导管静脉内的细菌菌落和皮肤的表皮坏死和/或炎症道和脓肿。慢性活动性炎症、脓肿形成、梗死和/或坏死偶见于其他器官,主要是肾脏和肝脏。不愿受理论的束缚,这些变化很可能是由于导管静脉的细菌感染引起的。发现指示的对感染的免疫响应包括骨髓中细胞总数增加或粒细胞增加、淋巴结中滤泡细胞数增加和浆细胞增多、滤泡细胞数增加、脾脏中巨噬细胞和/或髓外造血增加。淋巴器官的其他发现,如细胞减少和坏死,以及肾上腺皮质肥大和阴道粘液化被认为与应激有关。

[1454] 在胃(浆膜炎症)、心脏(瓣膜内皮肥大)和肺(肉芽肿、栓塞、巨噬细胞聚集、肺泡和血管炎症和/或血管内膜增生)中也观察到其他与工序相关的微观表现。还观察到了最小的局灶性/多灶性心肌炎症的实例,不希望受理论束缚,这些实例继发于输注工序或可能代表了实验室啮齿动物的常见背景发现。

[1455] 杂项发现

[1456] 肾

[1457] 以4mg/kg/剂量给药的雄性(第3048号动物)和雌性(第3560号动物)的肾皮质管状上皮中存在嗜酸性小球。没有相关的炎症或退行性变化。这些小球显示出对于铁用普鲁士

蓝染色以及对于红细胞将马休猩红蓝作为一般的着色剂是消极的。

[1458] 在对照组和布林西多福韦组中，所有其它显微镜下发现偶尔发生或具有相似的发生率和严重程度，且不希望受理论束缚，这一现象被认为是偶然的，并且是由于生物变异性。这些包括在一只4mg/kg/剂量雄性(第3044号动物)中的分化不良的唾液腺癌和15mg/kg/剂量雄性(第4068号动物)中的肾小管腺瘤。不希望受理论束缚，这些肿瘤被报道自发地在大鼠中发生，并且被认为是偶然的(Nishikawa 2010,Hardisty 2013)，且被认为与布林西多福韦无关。

[1459] 在14天的恢复期之后，在≥4mg/kg/剂量时，在雄性睾丸和/或附睾中仍存在显微镜下发现，且在15mg/kg/剂量时，在雄性和雌性的骨髓中仍注意到新的发现。在给药结束时，在肠道和皮脂腺中观察到的所有显微镜下发现均完全恢复。在恢复期结束时，也存在与输注程序相关的发现。

[1460] 雄性生殖道(睾丸，附睾)

[1461] 在恢复期结束时，在≥4mg/kg/剂量时，在终末期尸检动物中发现细胞群继续耗减，同时在雄性睾丸中成熟耗减(表99)。在15mg/kg/剂量时，这种变化的特征是大多数生殖细胞群的耗减，通常仅保留伸长的精子，常伴有多灶性肾小管萎缩。在4mg/kg/剂量时，早期小管中的精原细胞、精母细胞和圆形精子通过约第XIII期小管发生不同程度的丢失。

[1462] 在15mg/kg/剂量时，在雄性中，伴随有精子和附睾头部管腔细胞碎片的减少的成熟耗减。一只15mg/kg/剂量雄性(第4071号动物)具有伴随有附睾中具有筛状改变的精子减少(该发现与精子减少有关)的睾丸单侧管状萎缩。不希望受理论束缚，雄性中的这些单方面的发现被认为是自发的背景变化，且与布林西多福韦无关。

[1463] 表99:连续29天每周两次给药布林西多福韦以及14天的恢复期后大鼠雄性生殖道中的测试项目相关的发现

[1464]

组/性别	1M	2M	3M	4M	1F	2F	3F	4F
剂量(mg/kg/剂量)	0	1	4	15	0	1	4	15
检查的组织数量	5	5	5	5	NA	NA	NA	NA
睾丸								
耗减，生殖细胞								
最小的	-	-	1	-	NA	NA	NA	NA
轻微的	-	-	4	-	NA	NA	NA	NA
中等的	-	-	-	1	NA	NA	NA	NA
显著的	-	-	-	4	NA	NA	NA	NA
附睾								
精子，减少的，鲁米诺								
显著的	-	-	-	4	NA	NA	NA	NA
严重的	-	-	-	1	NA	NA	NA	NA
细胞碎片，鲁米诺								
最小的	-	-	-	5	NA	NA	NA	NA
代表动物总数	0	0	5	5	NA	NA	NA	NA

[1465] -＝没有发现。NA＝不适用

[1466] 骨髓

[1467] 在15mg/kg/剂量时,少数恢复期雄性和雌性骨髓中具有最小至轻微的细胞数减少(表100),给药期结束时没有观察到这一发现。

[1468] 表100:连续29天每周两次给药布林西多福韦以及14天的恢复期后大鼠骨髓中的测试项目相关的发现

[1469]

组/性别	1M	2M	3M	4M	1F	2F	3F	4F
剂量(mg/kg/剂量)	0	1	4	15	0	1	4	15
检查的组织数量	5	5	5	5	5	4	5	5
细胞数,减少[a]								
最小的	-	-	-	-	-	-	-	2
轻微的	-	-	-	3	-	-	-	-
代表动物总数	0	0	0	3	0	0	0	2

[1470] [a]严重度等级的发生率代表胸骨或股骨骨髓记录的最高等级。

[1471] -＝没有发现。

[1472] 程序相关的发现

[1473] 在恢复期结束时,与如上所述的早给药期结束时观察到的相似,存在一系列与程序有关的显微镜下发现这些发现与输注导管的感染有关,并且不愿受理论束缚,被认为与布林西多福韦无关。

[1474] 对照组和布林西多福韦组中,在所有其他的显微镜下发现偶尔发生或具有相似的发生率和严重程度,并且被认为是偶然的,并且由于生物变异性。

[1475] 以0(2X磷酸钠缓冲液)、1、4或15mg/kg/剂量,通过2小时静脉输注对Sprague-Dawley CD®大鼠进行给药(15/性别/组),每周两次,共29天。多达5只动物/性别/组进行了14天给药后恢复。

[1476] 在≥4mg/kg/剂量时,在两种性别中布林西多福韦给药导致一些动物中的间歇性(一般在输注后)临床症状(主要是呼吸异常和俯卧姿势),以及在雄性和雌性中分别在≥1mg/kg/剂量5mg/kg/剂量时,食物消耗减少最小。

[1477] 在≥4mg/kg/剂量时,在男性生殖道(睾丸生殖细胞耗减、附睾管腔细胞碎片、精囊上皮细胞凋亡增加)和肠道(单细胞坏死)中存在与布林西多福韦相关的发现,以及在15mg/kg/剂量时皮脂腺(萎缩)。除了预计在2周内不会完全恢复的在≥4mg/kg/剂量时雄性睾丸的变化外,所有与布林西多福韦有关的发现均完全恢复。此外,在恢复期结束时,少数给药15mg/kg/剂量的动物具有减少的骨髓细胞数和单侧或双侧柔软的和/或小的睾丸和附睾。

[1478] 在本研究的条件下,基于在≥4mg/kg/剂量时雄性睾丸生殖细胞耗减和15mg/kg/剂量时雌性中度小肠单细胞坏死,布林西多福韦的无明显损害作用水平(NOAEL)被认为是雄性1mg/kg/剂量以及雌性4mg/kg/剂量。

[1479] 实施例11-健康受试者的IV BCV上升剂量研究

[1480] 总结

[1481] 以10mg、25mg和50mg对健康受试者给药布林西多福韦。发现以10mg IV布林西多福韦提供与以100mg口服给药布林西多福韦相似的暴露。结果发现,IV布林西多福韦剂量(10mg和25mg)通常均是安全的和良好耐受的。没有观察到药物相关的不良事件,没有胃肠

道不良事件,没有分级实验室异常(例如,没有血液毒性和没有肾毒性)。

[1482] 本研究还评估了IV和口服混悬液BCV给药后CDV-PP的外周血单个核细胞(PBMC)PK。BCV在细胞内转化为活性二磷酸西多福韦(CDV-PP)。

[1483] 作为背景,以100mg和200mg口服BCV的单次给药导致约5%的腹泻实例,以及350mg给药导致约20%的腹泻实例。

[1484] 材料和方法

[1485] 在这项双盲研究中,在连续单次递增剂量队列中(表101和102,下方),受试者被随机分为3:1以接受IV BCV或安慰剂。连续7天采集血浆PK样品并通过HPLC-MS进行分析。通过非区间分析测定血浆BCV PK参数,并评价剂量比例关系。在14天内收集安全评估。

[1486] 表101:研究设计

[1487]

队列	N	实际剂量	IV输注持续时间
1	6种活性和2种安慰剂	BCV 10mg或安慰剂	2小时
2	6种活性和2种安慰剂	BCV 25mg或安慰剂	2小时
3	9种活性和3种安慰剂	BCV 50mg或安慰剂	2小时
4	9种活性和3种安慰剂	BCV 50mg或安慰剂	4小时

[1488] 表102:受试者人口统计

[1489]

队列	雄性 性别	年龄 (年)
1	8/8 (100%)	26 (18-34)
2	8/8 (100%)	23 (20-37)
3	12/12 (100%)	21 (18-26)
4	12/12 (100%)	26 (18-46)

[1490] 雄性性别表示为n/N(%)

[1491] Age表示为平均值(最小-最大)

[1492] CDV-PP的PBMC PK

[1493] 健康受试者的两项单剂量BCV研究为这一分析提供了数据。第一项研究是2期的杂交生物等效性研究,该研究纳入了24名受试者,这些受试者接受了两种BCV口服混悬液100mg禁食,在每期各一种。本研究包括第1期收集的12例具有PBMC的受试者的数据;这些受试者为100%女性,31-59岁以及58-88kg。第二项研究,如上所述,纳入了40名接受IV BCV或安慰剂的受试者。本研究包括接受2h或4h IV输注BCV 50mg的18名受试者的数据;这些受试者为100%男性,18-46岁以及64-106kg。连续14天采集连续的PBMC样品并通过HPLC-MS-MS分析。通过非区间分析测定PBMC CDV-PP PK参数。

[1494] 纳入了四十名健康男性受试者(18-46岁,83%为白人)并完成了该研究。血浆BCV $C_{ma}x$和AUC_{∞}与剂量成比例增加(表103,下方)。副反应和丙氨酸转氨酶(ALT)升高与剂量和输注时间有关。所有副反应和ALT升高均为暂时性的且无严重副反应发生。在其他化学和血液学参数方面,没有观察到安慰剂和IV BCV之间的显著差异。

[1495] 图6示出了在不同的100mg口服给药,10mg IV给药以及25mg IV给药时血浆布林西

多福韦浓度(AUC_{inf}(ng*h/mL))的图表。如图6所示,IV给药10mg的布林西多福韦提供与100mg布林西多福韦的口服给药基本相同的血浆浓度,而IV给药25mg IV的布林西多福韦提供比IV 10mg给药和口服100mg给药更高的血浆浓度。

[1496] 随着IV BCV可观察到与剂量相关的,可逆的ALT增加。在以前的研究中,在人体和临床前研究中,口服BCV具有可逆的与剂量相关的ALT增加。在IV BCV SAD研究中,在治疗性IV暴露(队列1和2)时,没有观察到2级或更高的ALT升高。在超治疗性IV暴露(队列3和4)时,仅在队列4中观察到短暂的2-3级ALT升高。在任何队列中均未观察到2级或更高胆红素。

[1497] 表103:IV输注后血浆BCV PK数据的初步总结

[1498]

	队列 1 BCV 10 mg 2h 输注 (n=6)	队列 2 BCV 25 mg 2h 输注 (n=6)	队列 3 BCV 50 mg 2h 输注 (n=9)	队列 4 BCV 50 mg 4h 输注 (n=9)	混合安慰剂 (n=10)
PK					
C_{max} (ng/mL)	613 (25%) [439-799]	1412 (27%) [973-1900]	2952 (19%) [2200-3940]	1586 (14%) [1360-2180]	NA
AUC_∞ (ng.h/mL)	1312 (26%) [875-1710]	2889 (37%) [1742-4790]	5948 (19%) [4446-7274]	6570 (15%) [5347-9048]	NA
$t_{1/2}$ (h)	3.42 (27%) [2.70-5.76]	5.89 (23%) [4.06-8.00]	6.54 (49%) [3.98-18.09]	5.10 (13%) [4.23-6.33]	NA
CL (L/h)	7.62 (26%) [5.85-11.4]	8.65 (37%) [5.22-14.4]	8.41 (19%) [6.87-11.3]	7.61 (15%) [5.53-9.35]	NA
Vss (L)	16.4 (24%) [12.0-22.2]	19.8 (25%) [15.0-30.3]	19.5 (21%) [13.9-24.9]	10.8 (19%) [7.67-14.5]	NA
药物相关的 AEs					
腹泻	0	0	1 (11%)	3 (33%)	0
恶心	0	0	0	2 (22%)	0
食欲下降	0	0	0	1 (11%)	
头痛	0	0	2 (22%)	2 (22%)	0
疼痛，输注部位发炎	0	0	1 (11%)	0	0
肝转氨酶升高[1]	0	0	0	1 (11%)	0

C_{max} and AUC_∞以几何平均值表示(%CVb) [最小值-最大值]

队列 1-3（2 小时输注）的 T_{max} 为 2 小时，以及 2.5 至 4 小时（4 小时输注）

1. 在 2 BCV 50 mg 4h 输注和 1 名安慰剂受试者中 ALT >2x ULN; 1 ALT 升高被认为是 AE

2. 在队列 3, 5 中，在 4 名受试者中有药物相关性 AEs。

3. 在队列 4, 9 中，在 5 名受试者中有药物相关性 AEs。

[1499] 表104:IV BCV PK和安全性:3级或4级药物相关的副反应

[1500]

	队列 1 BCV 10 mg 2h 输注 (n=6)	队列 2 BCV 25 mg 2h 输注 (n=6)	队列 3 BCV 50 mg 2h 输注 (n=9)	队列 4 BCV 50 mg 4h 输注 (n=9)	混合安慰剂 (n=10)
3 级或 4 级药物相关的 AEs					
腹泻	0	0	0	0	0
恶心	0	0	0	0	0
食欲下降	0	0	0	0	
头痛	0	0	0	0	0
疼痛，输注部位发炎	0	0	0	0	0
肝转氨酶升高 [1]	0	0	0	1 (11%)	0

[1501] 图9示出了队列1-4中受试者的平均血浆BCV浓度与时间的函数。图9还示出了口服BCV给药的受试者的平均血浆BCV浓度与时间的函数。

[1502] 表105示出了IV和口服给药(单剂量给药)后血浆BCV PK数据的总结。

[1503] 表105:IV和口服给药(单剂量给药)后血浆BCV PK数据的总结

[1504]

血浆 BCV PK 参数	10 mg 2 h IV 输注 N=6	25 mg 2 h IV 输注 N=6	50 mg 2 h IV 输注 N=9	50 mg 4 h IV 输注 N=9	100mg 口服片 N=52	200mg 口服片 N=15	200mg 口服片 N=63	350mg 口服片 N=70
C_{max} (ng/mL)	613 (25%) [439-799]	1412 (27%) [973-1900]	2952 (19%) [2200-3940]	1586 (14%) [1360-2180]	258 (42%) [97.0-586]	622 (33%) [384-1030]	802 (38%) [344-1980]	1482 (34%) [732-3600]
AUC_{inf} (ng.h/mL)	1312 (26%) [875-1710]	2889 (37%) [1742-4790]	5948 (19%) [4446-7274]	6570 (15%) [5347-9048]	1380 (41%) [555-3070]	3307 (35%) [1741-5190]	3744 (35%) [1605-8227]	6938 (31%) [3293-14132]
t1/2 (h)	3.42 (27%) [2.70-5.76]	5.89 (23%) [4.06-8.00]	6.54 (49%) [3.98-18.09]	5.10 (13%) [4.23-6.33]	7.62 (47%) [3.05-24.1]	12.0 (27%) [3.93-17.7]	–	–

[1505] 数据表示为几何平均值(CVb%)[最小值,最大值]

[1506] AUC_{last}代替AUC_{inf}用于CMX001-108研究

[1507] 表106示出了队列1-4的初步血浆CDV PK数据的总结。

[1508] 表106:IV输注后血浆CDV PK数据的初步总结

[1509]

血浆CDV PK 参数	10 mg 单次剂量 2 h IV 输注 N=6	25 mg 单次剂量 2 h IV 输注 N=6	50 mg 单次剂量 2 h IV 输注 N=9	50 mg 单次剂量 4 h IV 输注 N=9
C_{max} (ng/mL)	ND	5.94 (22%) [4.62-7.83]	12.7 (19%) [9.44-16.6]	12.1 (14%) [9.83-15.6]
AUC_{last} (ng.h/mL)[5]	ND	189 (81%) [77.6-419]	652 (38%) [341-1367]	654 (30%) [477-1151]
T_{max} (h)	ND	9.0 [8.0-10.0]	10.0 [8.00-12.0]	10.0 [8.00, 10.00]

[1510] 数据表示为几何平均值(CVb%)[最小值-最大值]

[1511] ND:因为大多数CDV浓度低于定量的下限,所以没有这样做

[1512] 由于高AUC外推百分比,未报告AUC_{inf}和t1/2

[1513] 图10示出了IV和口服BCV剂量后中值血浆CDV浓度与时间的函数。

[1514] CDV-PP的PBMC PK

[1515] 以2小时或4小时IV输注给药BCV 50mg的单次剂量细胞内递送CDV-PP暴与BCV100mg口服混悬液相当(表107)。PBMC CDV-PP暴露与输注时间呈负相关(表107)。

[1516] 图8示出了IV BCV SAD试验中观察到的平均(+/-SE)ALT水平。

[1517] 表107:BCV口服和IV给药后PBMC CDV-PP-PK的总结

[1518]

PBMC CDV-PP PK 参数	BCV 100 mg 口服混悬液 (n=12)	BCV 50 mg IV 2h 输注 (n=9)	BCV 50 mg IV 4h 输注 (n=9)
C_{max} (pg/10^6 细胞)	7.68 (41%)	14.3 (63%)	8.41 (57%)
AUC_{last} (pg.h/10^6 细胞)	1107 (50%)	1409 (36%)	963 (36%)

[1519] 以2小时IV输注给药BCV 10-50mg的单次剂量是良好耐受的,与显著的临床或实验室异常无关。BCV IV 10mg和BCV IV 50mg分别达到相似于以及4.5倍于BCV口服100mg片(C_{max}=251ng/mL和AUC_{∞}=1394ng·h/mL)所能达到的几何平均血浆BCV AUC_{∞}值。这些数据支持在健康受试者和病毒感染患者中重复剂量给药的评估。

[1520] 此外,与口服BCV相比,IV BCV以低剂量提供相当的PBMC CDV-PP暴露。不希望受理论束缚,在一些实施方式中,这可以允许改善BCV耐受性和功效。

[1521] 等效替代

[1522] 虽然已经结合上述的具体实施方式描述了本发明,但是对于本领域普通技术人员来说,许多替代方案、修改以及其它变化将是显而易见的。所有这些替代、修改和变化都旨在落入本发明的精神和范围内。

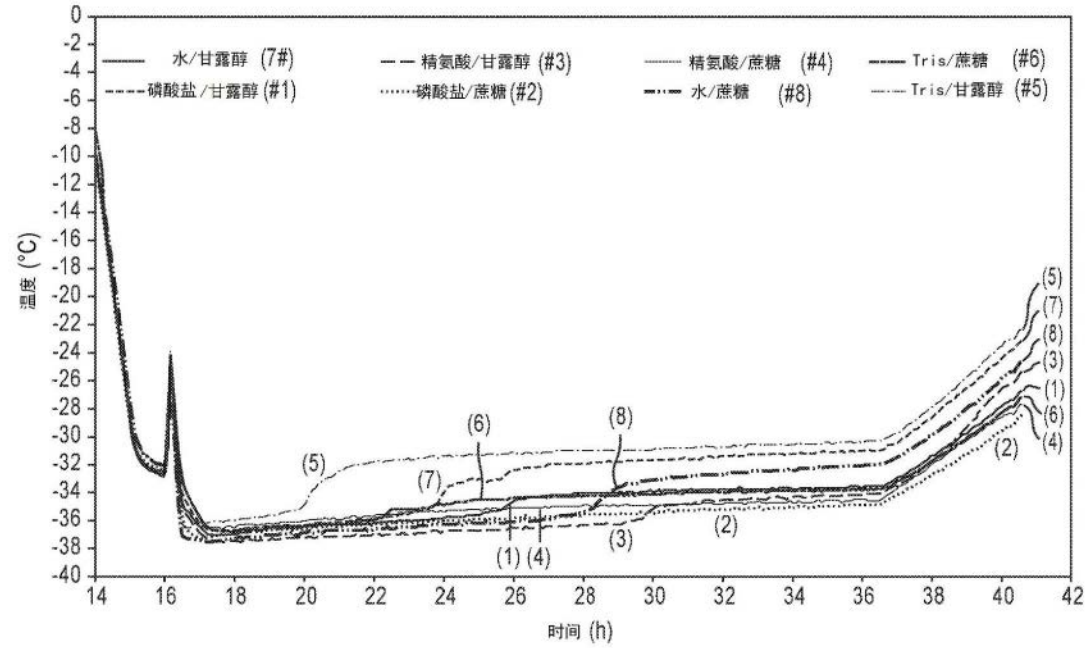

水/甘露醇 (7#)
精氨酸/甘露醇 (#3)
精氨酸/蔗糖 (#4)
Tris/蔗糖 (#6)
磷酸盐/甘露醇 (#1)
磷酸盐/蔗糖 (#2)
水/蔗糖 (#8)
Tris/甘露醇 (#5)
温度 (°C)
时间 (h)

图1

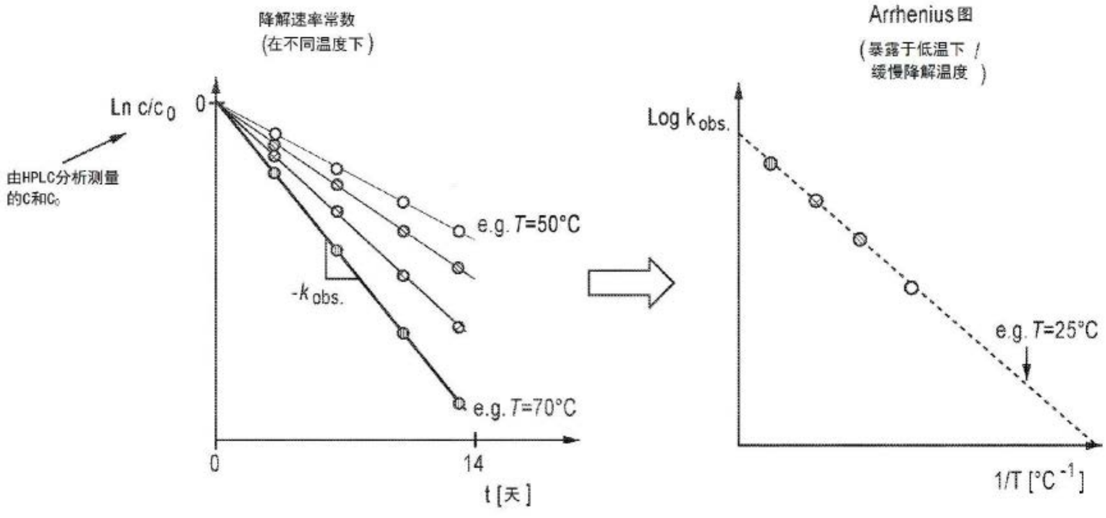

降解速率常数
(在不同温度下)
Ln c/c0
由HPLC分析测量的C和C0
e.g. T=50°C
-k obs.
e.g. T=70°C
t [天]
Arrhenius图
(暴露于低温下/缓慢降解温度)
Log k obs.
e.g. T=25°C
1/T [°C -1]

图2

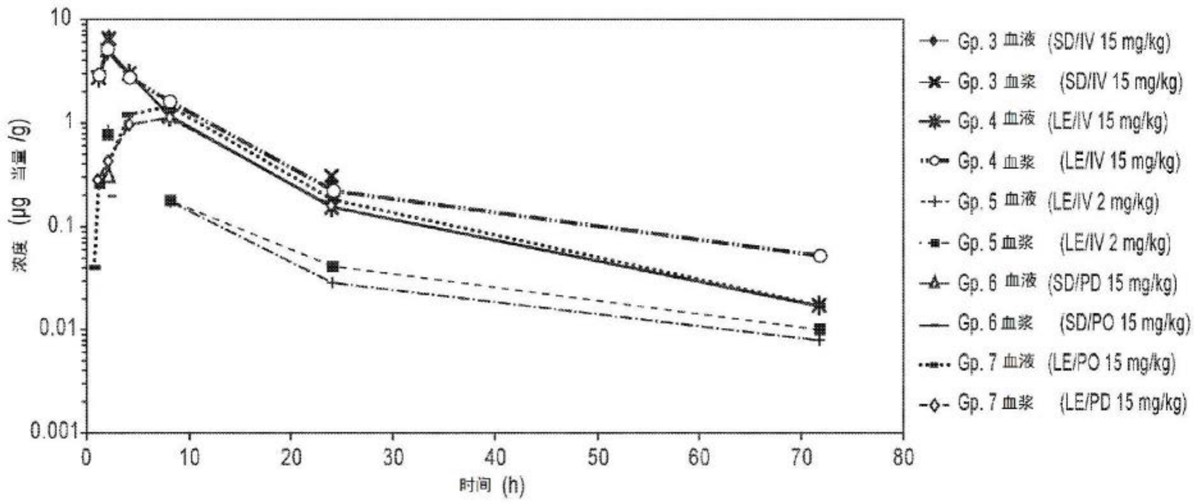

10
1
0.1
0.01
0.001
浓度 (μg 当量/g)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
时间 (h)
Gp. 3 血液 (SD/IV 15 mg/kg)
Gp. 3 血浆 (SD/IV 15 mg/kg)
Gp. 4 血液 (LE/IV 15 mg/kg)
Gp. 4 血浆 (LE/IV 15 mg/kg)
Gp. 5 血液 (LE/IV 2 mg/kg)
Gp. 5 血浆 (LE/IV 2 mg/kg)
Gp. 6 血液 (SD/PD 15 mg/kg)
Gp. 6 血浆 (SD/PO 15 mg/kg)
Gp. 7 血液 (LE/PO 15 mg/kg)
Gp. 7 血浆 (LE/PD 15 mg/kg)

图3

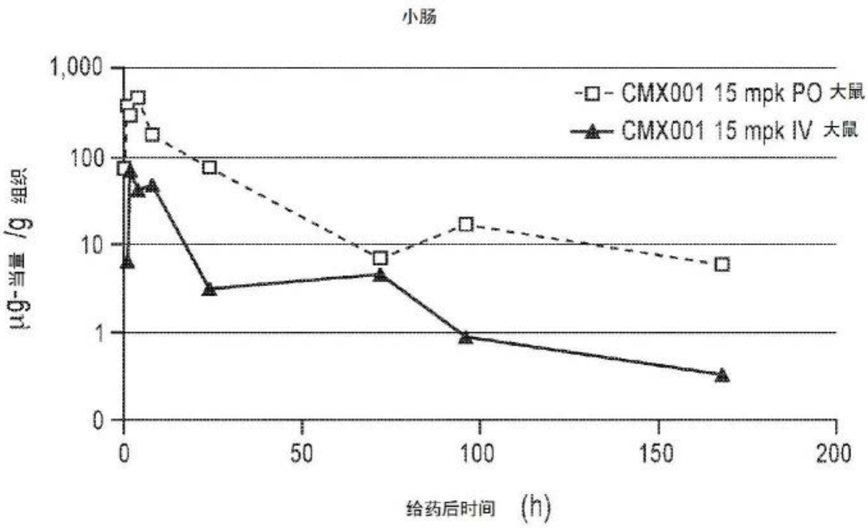
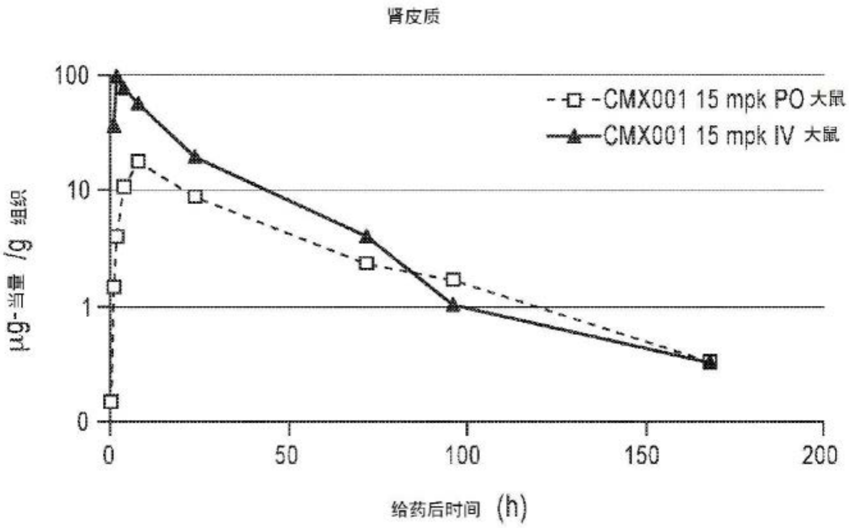
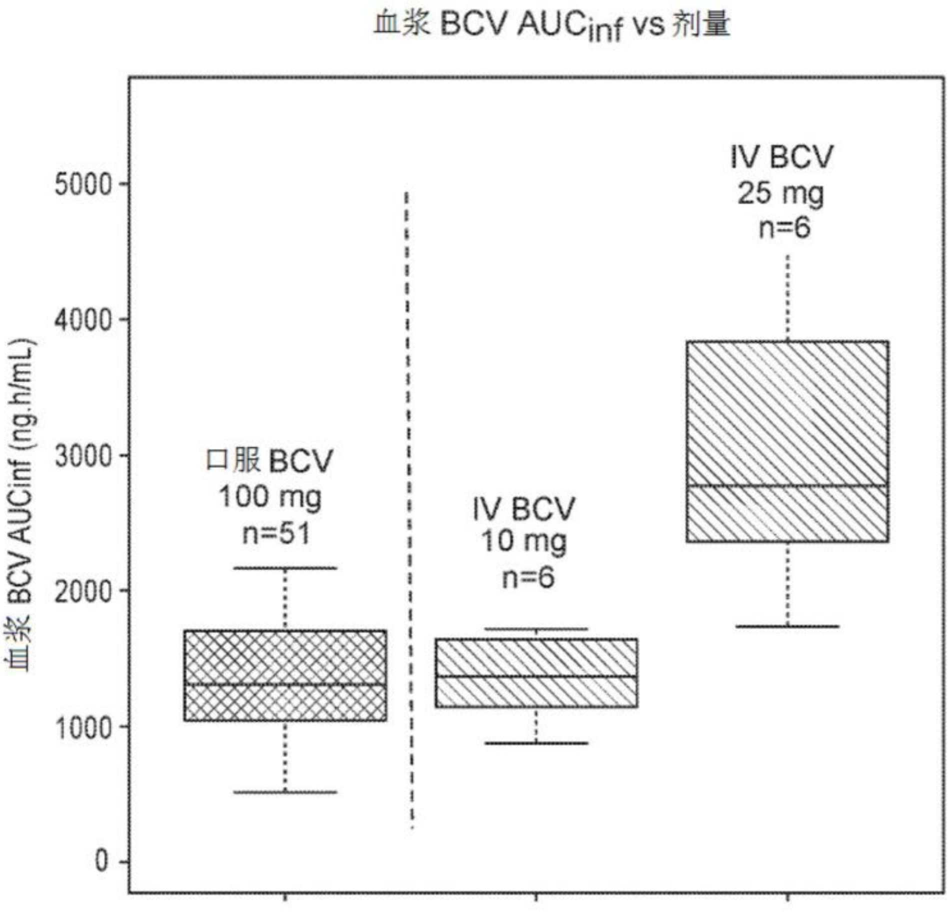

小肠
1,000
100
10
1
0
μg-当量/g 组织
CMX001 15 mpk PO 大鼠
CMX001 15 mpk IV 大鼠
0
50
100
150
200
给药后时间 (h)

图4



肾皮质
CMX001 15 mpk PO 大鼠
CMX001 15 mpk IV 大鼠
μg-当量 /g 组织
100
10
1
0
0
50
100
150
200
给药后时间 (h)

图5



血浆 BCV AUCinf vs 剂量
血浆 BCV AUCinf (ng.h/mL)
5000
4000
3000
2000
1000
0
口服 BCV
100 mg
n=51
IV BCV
10 mg
n=6
IV BCV
25 mg
n=6

图6

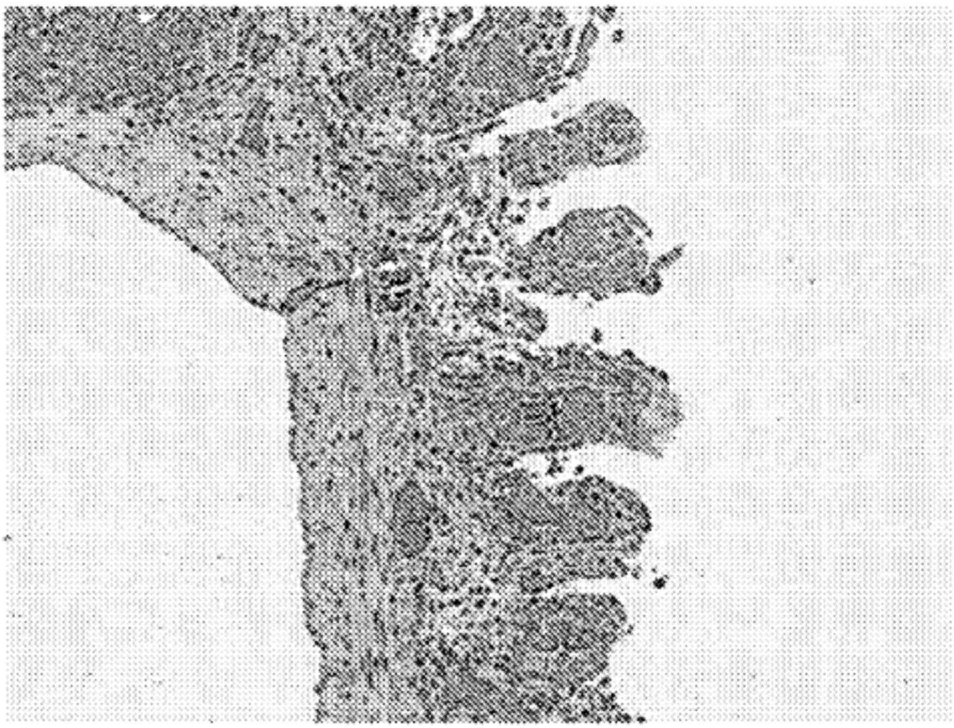


图7A

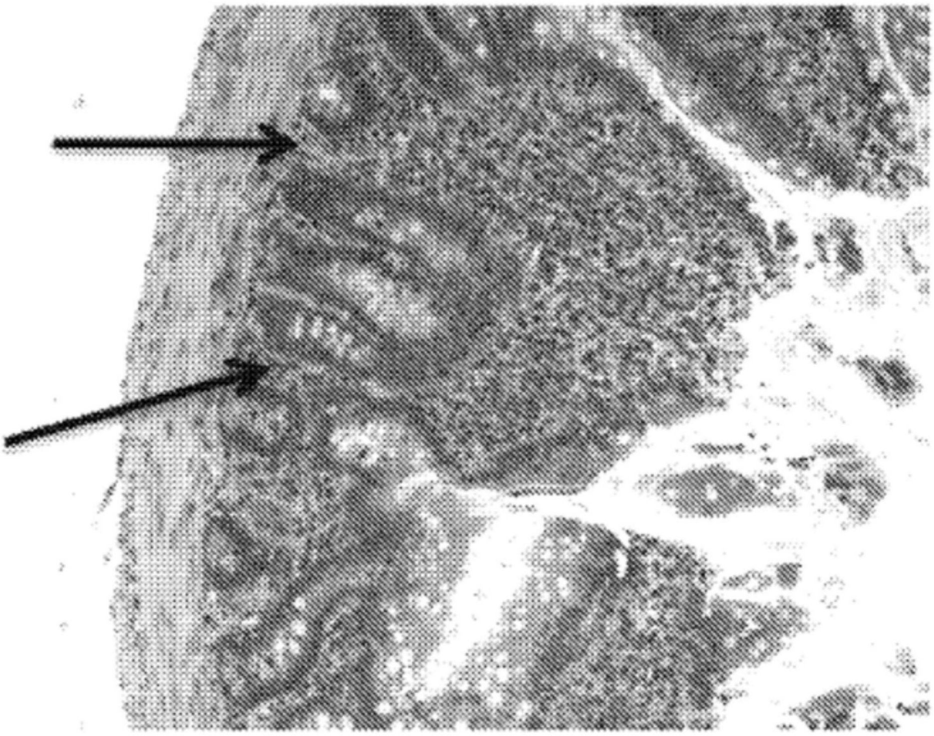


图7B

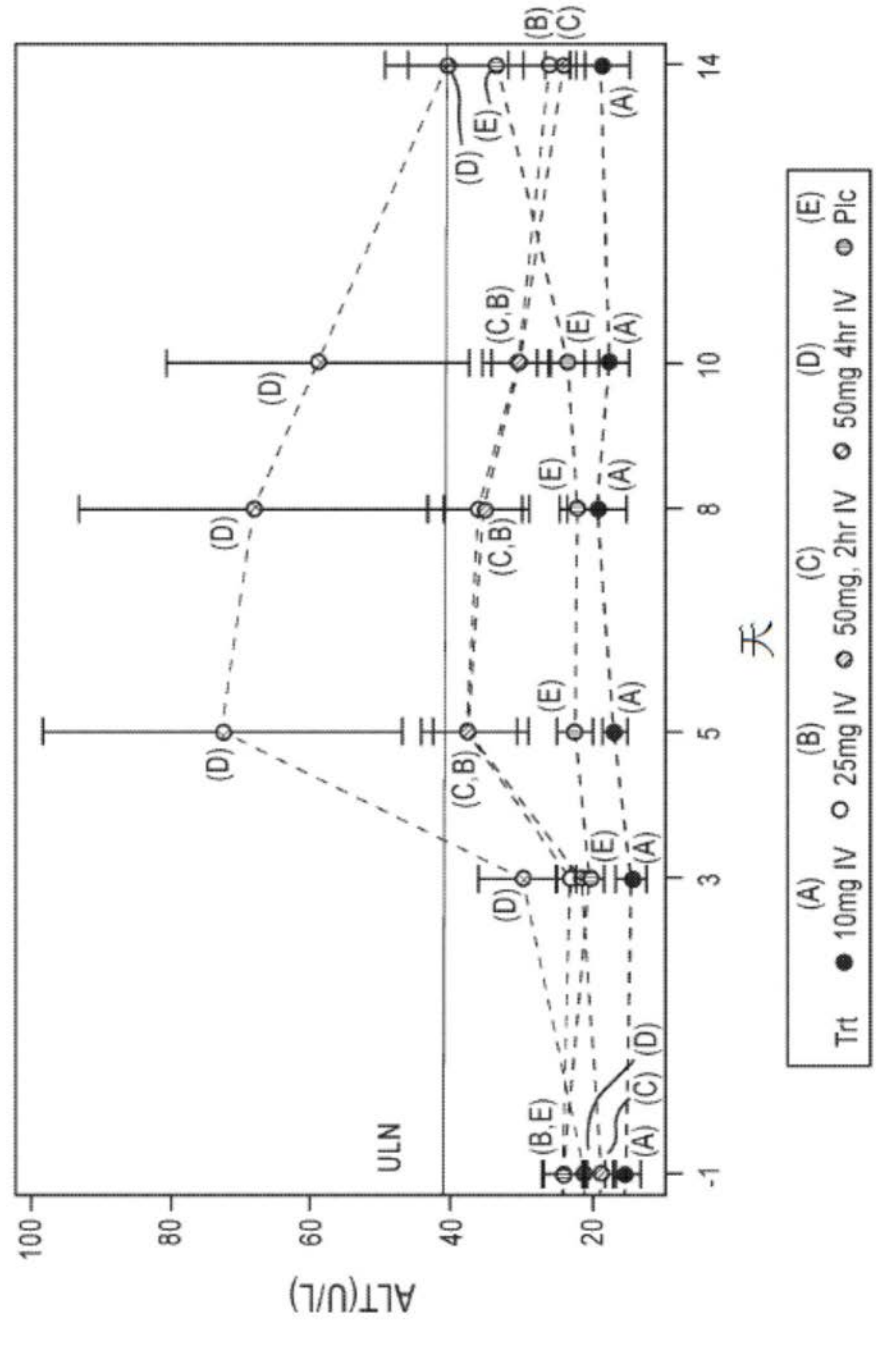

ALT(U/L)
ULN
天
Trt
(A) 10mg IV
(B) 25mg IV
(C) 50mg, 2hr IV
(D) 50mg 4hr IV
(E) Plc

图8

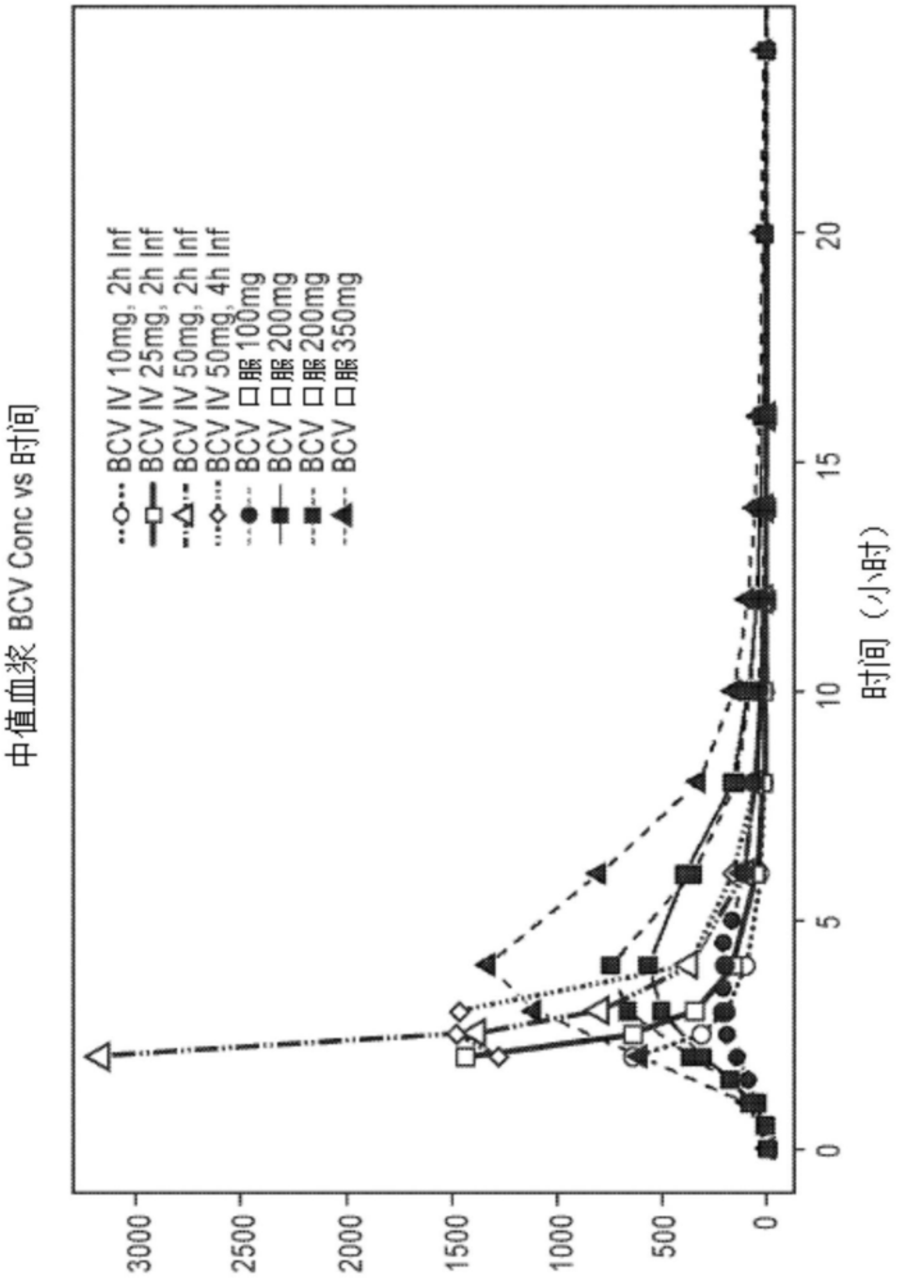

中值血浆 BCV Conc vs 时间
BCV IV 10mg, 2h Inf
BCV IV 25mg, 2h Inf
BCV IV 50mg, 2h Inf
BCV IV 50mg, 4h Inf
BCV 口服 100mg
BCV 口服 200mg
BCV 口服 200mg
BCV 口服 350mg
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
时间（小时）

图9

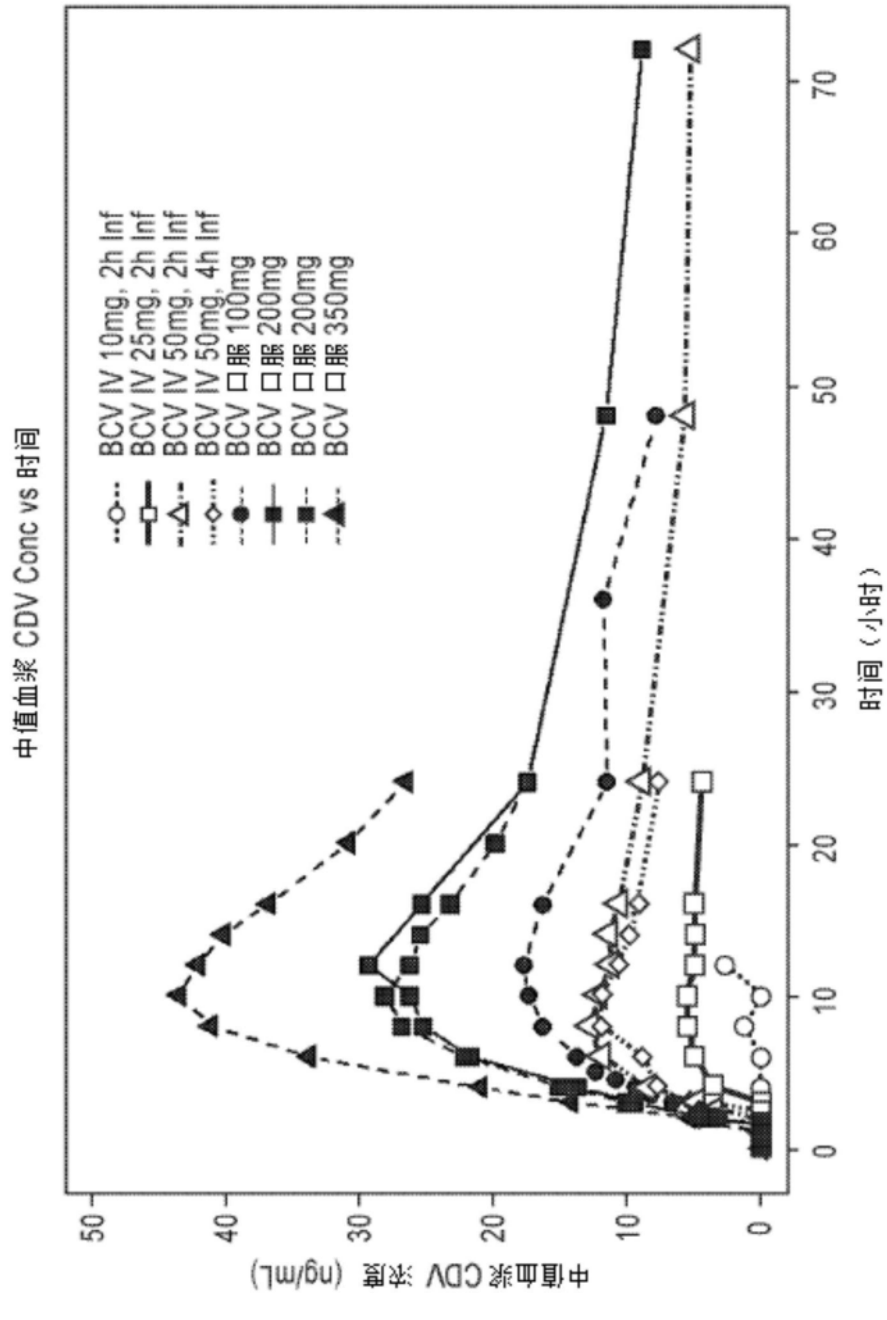

中值血浆 CDV Conc vs 时间
BCV IV 10mg, 2h Inf
BCV IV 25mg, 2h Inf
BCV IV 50mg, 2h Inf
BCV IV 50mg, 4h Inf
BCV 口服 100mg
BCV 口服 200mg
BCV 口服 200mg
BCV 口服 350mg
中值血浆 CDV 浓度 (ng/mL)
0
10
20
30
40
50
时间（小时）
0
10
20
30
40
50
60
70

图10