

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 31/515 (2006.01)

A61K 31/724 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200580010809.1

[45] 授权公告日 2009 年 11 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 100558362C

[22] 申请日 2005.3.31

[21] 申请号 200580010809.1

[30] 优先权

[32] 2004.4.1 [33] EP [31] 04007920.4

[86] 国际申请 PCT/EP2005/003345 2005.3.31

[87] 国际公布 WO2005/097133 英 2005.10.20

[85] 进入国家阶段日期 2006.9.30

[73] 专利权人 霍夫曼-拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

共同专利权人 列日大学

[72] 发明人 D·卡塔尔多 L·德拉特

B·埃夫拉尔 J-M·福伊达特

H-W·克雷尔

[56] 参考文献

CN1374954A 2002.10.16

CN1267296A 2000.9.20

审查员 韩 征

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

代理人 王 旭

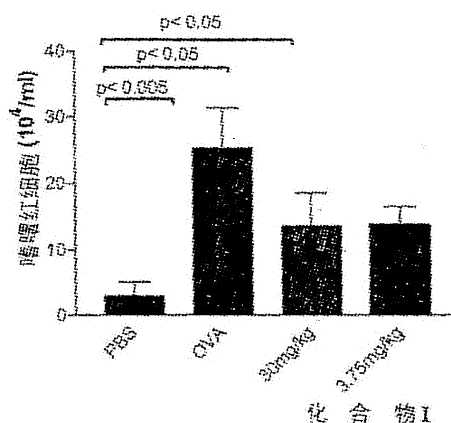
权利要求书 1 页 说明书 24 页 附图 8 页

[54] 发明名称

三氧嘧啶治疗和预防支气管炎症疾病的应用

[57] 摘要

本发明提供了对 MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 和 MMP-14 具有抑制活性的、定义如下的三氧嘧啶化合物在制备用于治疗或预防支气管炎症疾病的药物中的用途: a) 对 MMP-2, MMP-9 和 MMP-14 的每个小于 $5 \mu\text{M}$ 的 IC_{50} 值; b) 对 MMP-1: MMP-2, MMP-1: MMP-9, MMP-1: MMP-14 的 IC_{50} 值超过 100 的比率; 和 c) 对 MMP-3: MMP-2, MMP-3: MMP-9, MMP-3: MMP-14 的 IC_{50} 值超过 10 的比率。



1. 对 MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 和 MMP-14 具有抑制活性的三氧嘧啶化合物在制备用于在需要该治疗的宿主哺乳动物中治疗支气管炎疾病的药物中的应用, 所述抑制活性如下定义:
 - a) 对 MMP-2, MMP-9 和 MMP-14 的每个而言小于 5 μ M 的 IC_{50} 值;
 - b) 对 MMP-1:MMP-2, MMP-1:MMP-9, MMP-1:MMP-14 的 IC_{50} 值超过 100 的比率; 和
 - c) 对 MMP-3:MMP-2, MMP-3:MMP-9, MMP-3:MMP-14 的 IC_{50} 值超过 10 的比率,

其中所述的三氧嘧啶化合物选自由下列组成的组:

5-联苯-4-基-5-[4-(4-硝基-苯基)-哌嗪-1-基]嘧啶-2,4,6-三酮
5-(4-苯氧基-苯基)-5-(4-嘧啶-2-基-哌嗪-1-基)-嘧啶-2,4,6-三酮
5-[4-(4-氯-苯氧基)-苯基]-5-(4-嘧啶-2-基-哌嗪-1-基)-嘧啶-2,4,6-三酮
5-[4-(3,4-二氯-苯氧基)-苯基]-5-(4-嘧啶-2-基-哌嗪-1-基)-嘧啶-2,4,6-三酮
5-[4-(4-溴-苯氧基)-苯基]-5-(4-嘧啶-2-基-哌嗪-1-基)-嘧啶-2,4,6-三酮,

其中所述的三氧嘧啶化合物被水溶性环糊精复合。

三氧嘧啶治疗和预防支气管炎症疾病的应用

本发明涉及三氧嘧啶化合物用于治疗 and 预防支气管炎症疾病的应用。

导言

基质金属蛋白酶（MMPs）是能够降解细胞外基质(ECM)与基底膜的锌和钙依赖性蛋白酶家族(Egeblad, M., and Werb, Z., Nat. Rev. Cancer 2 (2002) 161-174; Overall, C.M., and Lopez-Otin, C., Nat. Rev. Cancer 2 (2002) 657-672)。据信它们在胚胎发育和生长中(Holmbeck, K., et al., Cell 99 (1999) 81-92; Vu, T.H., et al., Cell 93 (1998) 411-422)以及组织重塑和修复中(Shapiro, S.D., Curr. Opin. Cell Biol. 10 (1998) 602-608; Lund, L.R., et al., EMBO J. 18 (1999) 4645-4656) 扮演着重要的角色。MMPs 过量或者不当的表达可能因此与许多组织破坏性进程的发病机理相关, 包括肿瘤发展(Egeblad, M., and Werb, Z., Nat. Rev. Cancer 2 (2002) 161-174; Overall, C.M., and Lopez-Otin, C., Nat. Rev. Cancer 2 (2002) 657-672)和动脉瘤形成(Carmeliet, P., et al., Nat. Genet. 17 (1997) 439-444)。MMP 的作用还远不只限于 ECM 降解 (Chang, C., and Werb, D., Trends Cell Biol. 11 (2001) S37-43)。被 ECM 蛋白隐蔽的肽生长因子在 ECM 被 MMP-9 降解后就可以被利用了。(Manes, S., et al., J. Biol. Chem. 274 (1999) 6935-6945)。MMPs 可以增加 VEGF 的生物利用度(Bergers, G., et al., Nat. Cell Biol. 2 (2000) 737-744), 还可以通过切割血纤维蛋白溶酶原产生血管生成抑制剂如血管抑素(Dong, Z., et al., Cell 88 (1997) 801-810)。

用天然存在的金属蛋白酶组织抑制剂（TIMPs）或者用低分子量的抑制剂对 MMPs 的抑制作用, 在动物模型中导致显著的抗肿瘤和抗迁移

效果。(Brown, P.D., Med. Oncol. 14 (1997) 1-10)。大多数 MMPs 的低分子量抑制剂都衍生于异羟肟酸化合物类并且以广谱形式抑制 MMPs，而不只是对 MMP-2 和 MMP-9 有选择性，上述的两种 MMPs 是肿瘤侵袭、迁移扩张和血管形成的主要 MMPs。然而，来自另一个结构类别的 MMP 抑制分子三氧嘧啶 (trioxopyrimidine)，已经被描述在 WO 97/23465 和 WO 01/25217 中。这类的化合物特别有效并且是高度选择性的，几乎对 MMP-2 和 MMP-9 绝对特异，而对 MMP 蛋白酶家族的大多数其它成员不特异。

几种 MMP 抑制剂，主要是具有广谱基质特异性的异羟肟酸物质类的那些，曾经并且部分依然处在抗肿瘤治疗的临床测试中。这些抑制剂的所有公开的临床结果都很令人失望，显示出很少或者没有临床效力 (Fletcher, L., Nat. Biotechnol. 18 (2000) 1138-1139)。临床上缺乏效力的原因最可能是由于与这些广谱作用抑制剂相关的副作用，不能给予患者用来抗肿瘤或者抗转移活性的足够高的剂量。这些限制剂量的副作用主要是关节痛和肌肉痛。(Drummond, A.H., et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 878 (1999) 228-235)。作为一种避开这一问题的可能的方法，在动物研究中评价了组合使用 MMP 抑制剂与传统的细胞抑制/细胞毒性化合物。的确，在这些实验中，结合细胞抑制/细胞毒性药物使用的 MMP 抑制剂表现出了增加的肿瘤抑制效力 (Giavazzi, R., et al., Clin. Cancer Res. 4 (1998) 985-992)。此外，国际专利申请 No. PCT/EP02/04744 公开了结合三氧嘧啶基的明胶酶抑制剂和细胞毒性/细胞抑制化合物如 顺铂，紫杉醇，吉西他滨，足叶乙甙。

已经进行了许多鉴定预防或者抑制支气管炎症疾病的化合物的尝试。吸入的合成糖皮质激素(glucocorticosteroid)被广泛用于支气管性哮喘的治疗中，它们为该疾病提供了有效的一线治疗。但是，与这些药物相关的一些有害的副作用和通常复杂的给药方案使患者不适应。氯替泼诺碳酸乙酯，一种惰性代谢物软类固醇，正在用于临床测试中测试其对气道炎症的作用(Szelenyi, I., et al., Drugs Today 36 (2000) 313-320)。环索奈

德，一种前药软类固醇，已在哮喘患者的每日一次服用制剂中被证实了无副作用的效力，并且正被开发用于治疗哮喘和慢性阻塞性肺病 (Rohatagi, S., et al., J. Clin. Pharmacol. 43 (2003) 365-378)。

因此，存在对能被用于治疗或者预防支气管炎症疾病的高度有效物质的需要。

发明描述

令人惊讶地发现，对 MMP-2, MMP-9 和 MMP-14 具有高度选择性的三氧嘧啶基 MMP 抑制剂对于治疗或预防支气管炎症疾病有用。

本发明因此提供了三氧嘧啶化合物在需要这种治疗的宿主哺乳动物中治疗和预防支气管炎症疾病的应用，其中所述的化合物对 MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 和 MMP-14 具有被如下定义的抑制活性：

- a) 对 MMP-2, MMP-9 和 MMP-14 的每个而言小于 5 μ M 的 IC_{50} 值；
- b) 对 MMP-1:MMP-2, MMP-1: MMP-9, MMP-1:MMP-14 的 IC_{50} 值超过 100 的比率；和
- c) 对 MMP-3:MMP-2, MMP-3: MMP-9, MMP-3:MMP-14 的 IC_{50} 值超过 10 的比率。

通过体外测试 MMP 的酶活性测定 IC_{50} 值。这种测试被描述在 Stack, M.S., 和 Gray, R.D., J. Biol. Chem. 264 (1989) 4277-4281 中。该测试基于确定二硝基酚基质上的 MMP 酶活性和 MMP 切割后基质的荧光测量。

本发明还提供了该三氧嘧啶化合物在制备用于治疗患有支气管炎症疾病的患者的药物中的应用。

基质金属蛋白酶在本领域为人熟知，并且其被通过例如它们的 EC 号被定义 (MMP-1 EC 3.4.24.7; MMP-2 EC 3.4.24.24; MMP-3 EC 3.4.24.17, MMP-9 EC 3.4.24.35, MMP-14 EC 3.4.24)。

用于本发明的三氧嘧啶是来自一个众所周知的结构类别的化合物。这些化合物被描述在例如美国专利 Nos. 6,242,455 和 6,110,924; WO

97/23465, WO 98/58915, WO 01/25217 中, 在此将其加入作为参考, 以及描述在 Grams, F., 等的 Biol. Chem. 382 (2001) 1277-1285, 其对于 MMP-2, MMP-9, 和 MMP-14 有效且高度选择。

依照本发明, 下面的化合物是特别优选的:

5-联苯-4-基-5-[4-(4-硝基-苯基)-哌嗪-1-基]嘧啶-2,4,6-三酮

(化合物 I)

5-(4-苯氧基-苯基)-5-(4-嘧啶-2-基-哌嗪-1-基)-嘧啶-2,4,6-三酮

(化合物 II)

5-[4-(4-氯-苯氧基)-苯基]-5-(4-嘧啶-2-基-哌嗪-1-基)-嘧啶-2,4,6-三酮

(化合物 III)

5-[4-(3,4-二氯-苯氧基)-苯基]-5-(4-嘧啶-2-基-哌嗪-1-基)-嘧啶-2,4,6-三酮

(化合物 IV)

5-[4-(4-溴-苯氧基)-苯基]-5-(4-嘧啶-2-基-哌嗪-1-基)-嘧啶-2,4,6-三酮

(化合物 V)。

按照本发明, 三氧嘧啶基抑制剂必须经由数月或者数年(特别是用于预防的情况下)给予患有这类疾病的患者, 给予需要这类治疗的患者。优选作为喷剂给予三氧嘧啶化合物, 其无毒性剂量范围在微摩尔和纳摩尔浓度间。

本发明涉及通过将本发明的三氧嘧啶化合物以药物有效量施用给患者, 在需要这种治疗的宿主哺乳动物例如患有该疾病的患者中治疗优选为哮喘和慢性阻塞性肺病(COPD)的支气管炎症疾病的方法。哮喘是一种与过敏原暴露相关或者不相关的支气管树炎症疾病。该炎症通过刺激支气管平滑肌收缩、增强黏液分泌和被认为对疾病进程是恶化因素的诱导支气管形态学变化, 在患者中引发症状。气道高响应性(Airway hyperresponsiveness)是该疾病的特征并且是多数症状形成的原因。支气管树是一个具有许多细胞类型(上皮细胞、平滑肌细胞、炎症细胞、神经、黏液产生细胞、成纤维细胞等)的非常复杂的组织, 而且包含许多方面的支气管重塑事件主要在于将细胞外基质组分沉积到支气管壁和粘

膜产生细胞的过度增生。使用本发明的三氧嘧啶化合物抑制了炎症细胞流入支气管肺泡灌洗室和支气管周围组织，并且抑制了被定义为对刺激剂如乙酰甲基胆碱异常反应的高反应性。该疾病及当前的治疗被综述在例如GINA Workshop Report, Global Strategy for Asthma Management and Prevention (NIH Publication No. 02-3659)和 Fabbri, L.M., 和 Hurd, S.S., Eur. Respir. J. 22 (2003) 1-2 中。

本发明因此还涉及一种使用治疗有效量的本发明三氧嘧啶化合物在患该病患者中治疗支气管炎症疾病的方法。

本发明优选地又涉及使用本发明三氧嘧啶化合物治疗治疗患肺气肿的患者的方法。在该疾病中，肺泡壁被蛋白分解过程破坏并且该破坏损害了氧到血液的运输。由于通过引起呼吸肌功能丧失的引起通气系统异常的衍生的充气过度并且由于导致心脏在晚期衰竭的肺动脉高血压，还出现了生理学的问题。

按照本发明，三氧嘧啶化合物必须经由数月或者数年给予需要这类治疗的患者。优选通过液体或者粉末制剂的雾化，以介于微摩尔和纳摩尔浓度每 kg 和天之间的无毒性剂量范围施与三氧嘧啶化合物。

MMP 抑制剂的确切剂量会变化，但可容易地确定。通常，优选的抑制剂日剂量介于 $1\ \mu\text{mol/kg}$ 和天— $100\ \text{nmol/kg}$ 和天的范围。

药物组合物是具有生理相容性的水性组合物。组合物还包括辅助物质，缓冲剂，防腐剂，溶剂和/或粘度调节剂。合适的缓冲系统基于磷酸钠，醋酸钠或者硼酸钠。需要防腐剂来防止药物组合物使用中的微生物污染。合适的防腐剂是例如苯扎氯铵，三氯叔丁醇，羟苯甲酯 (methylparabene)，羟苯丙酯 (propylparabene)，苯乙醇，山梨酸。这些防腐剂通常以 0.01 - 1%重量/体积使用。

合适的辅助物质和药物制剂被描述在 Remington 的 Pharmaceutical Sciences, 16th ed., 1980, Mack Publishing Co., Oslo et al.编辑中。通常，在制剂中使用合适量的药用盐从而使制剂等渗。药用物质的实例包括盐水，Ringer's 溶液，和葡萄糖溶液。溶液的 pH 值优选从大约 5—大约 8，

更优选大约 7—大约 7.5。

本发明另一个优选的目的是用于支气管炎疾病治疗的本发明三氧嘧啶的药用组合物及其应用，该组合物包含三氧嘧啶环糊精复合物（三氧嘧啶被包容在环糊精中），所述三氧嘧啶环糊精复合物由该三氧嘧啶或其盐和环糊精优选为水溶性环糊精衍生物（水溶性被定义为在 25℃ 下至少 0.5 g/100ml 的溶解度）形成。在该复合物中，优选 1mol 的三氧嘧啶被复合并被 1mol 的 α 、 β - 或 γ -环糊精或其衍生物包住。优选的环糊精是：

- α -环糊精及其合成的衍生物例如 HP α CD, 甲基化的 α CD, 羟基丁基 α CD, 麦芽糖基 α CD, 葡萄糖基 α CD。
- β -环糊精及其合成的衍生物例如 HP β CD, SBE β CD, RM β CD, DIME β CD, TRIME β CD, 羟基丁基 β CD, 葡萄糖基 β CD, 麦芽糖基 β CD。
- γ -环糊精及其合成的衍生物例如 HP γ CD, RM γ CD 和 DIME γ CD, 羟基丁基 γ CD, 葡萄糖基 γ CD, 麦芽糖基 γ CD。

按照本发明有用的环糊精是通过酶解淀粉生产的环状寡糖，其由多为 6, 7 或者 8 的可变数目的吡喃型葡萄糖单元组成：这些环糊精分别叫做 α 、 β 、和 γ 环糊精 (α CD, β CD 和 γ CD)。本发明的环糊精是环糊精本身或环糊精衍生物，其在 25℃ 下至少以 0.5 gr/100ml 的量溶于水。

本发明优选使用的水溶性环糊精衍生物指的是至少具有 β -环糊精水溶性的衍生物。这种水溶环糊精衍生物的实例是硫代丁基环糊精，羟基丙基环糊精，麦芽糖基环糊精，及其盐。特别地，硫代丁基- β -环糊精, 羟基丙基- β -环糊精, 麦芽糖基- β -环糊精，及其盐。

本发明优选的衍生物还是甲基环糊精（环糊精甲基化的产物），二甲基环糊精（DIMEB）（优选地在 2 和 6 位取代），三甲基环糊精（优选地在 2, 3, 和 6 位取代），“随机甲基化的”环糊精（RAMEB）（优选地随机在 2, 3, 和 6 位取代，但吡喃型葡萄糖单元具有大量 1,7 到 1,9 甲

基)，羟基丙基环糊精（HPCD，羟基丙基化的环糊精，优选主要随机在位置 2 和 3 随机取代（HP- β CD，HP- γ CD）），硫代丁醚环糊精（SBECD），羟基乙基-环糊精，羧基甲基乙基环糊精，乙基环糊精，通过在羟基基团中接枝烃链获得的、能够形成纳米颗粒的两亲环糊精（cyclodextrins amphiphiles），通过接枝单氨化的环糊精（具有间隔臂）获得的胆固醇环糊精和甘油三酯环糊精。

本发明的三氧嘧啶-环糊精复合物可以通过生产含有其三氧嘧啶化合物和水溶性环糊精衍生物的水溶液获得。水溶性环糊精衍生物所使用的量优选为 1mol 或者更多/1mol 三氧嘧啶，更优选 1—10mol，特别优选 1—2mol 环糊精/mol 三氧嘧啶。

水溶性环糊精衍生物的浓度越高，三氧嘧啶的溶解度增加得越多。制造所述水溶液的方法没有具体的限制，例如通过使用水或者温度范围大约从-5℃—35℃的缓冲液生产。

当搅动具有过量三氧嘧啶的环糊精水溶液的时候，在这两种分子间形成复合物。过滤该溶液容许回收过滤物中的溶液形式的三氧嘧啶复合物，所述的复合物是溶于水的。该复合物也可以通过计算适当比例、通过水溶液中混合溶解的已知量的三氧嘧啶和溶解的已知量的 CD 获得。

另一种获得复合物的方法是向环糊精水溶液中增加溶剂（如乙醇、丙酮等）中的三氧嘧啶溶液。该复合物可以在充分的搅拌后蒸发溶剂，或者甚至在溶剂存在的情况下形成。

本发明复合物溶液的冻干或者雾化容许以固体形式获得该复合物。从而可以获得无定形粉末形式的复合物。也可能以这样的方式获得固体状态的该复合物：在适当有机溶剂中溶解 CD 和三氧嘧啶后再将溶剂蒸发。

其它方法可以被用来制备固体复合物，它们是：在非常少量的水中激烈搅拌三氧嘧啶和 CD 的悬浮液，随后在干燥或者使用超临界状态 CO₂ 以在超临界状态 CO₂ 存在时混合三氧嘧啶和 CD 复合物后收集复合物。

本发明的复合物可以例如以本身已知的方式从溶液中制备，也可以使用糊剂法，其中环糊精对三氧嘧啶的重量比必须为 2—540，优选 2—25，特别优选在 2.6—3.5 的区域（对 1: 1 的环糊精复合）或者 5.2—6.2 的区域（对 1: 2 的环糊精复合）。

优选从浓缩的、水性环糊精制剂中制备复合物。制剂的环糊精浓度优选 50—400mM。优选 100—250 nM 的环糊精浓度。取决于一致性，化合物被激烈地搅拌或者捏合。环糊精的重量百分比基于水性环糊精制剂的总重量。

反应温度通常介于 20° C 和 80° C，优选介于 20° C 和 60° C，特别优选介于 25° C 和 45° C。反应时间取决于温度，并且介于 1 小时和一些天。优选的反应时间是至少 7 天以使复合物形成平衡。

依照本发明，已经确立三氧嘧啶和环糊精的复合物惊人地增加了三氧嘧啶在水中的溶解度。同样很明显，复合物的形成并没有干扰三氧嘧啶的药理学性质。

所有这些性质容许制备液体制剂以作为用于注射或者喷雾的溶液，并且容许生物利用度的改善，特别是口服。本发明的三氧嘧啶环糊精复合物可以被如此应用或者以粉末形式应用，粉末形式是通过去除共存的水获得的。用来移除水的方法的实例包括在减压下冻干和干燥。由冻干获得的粉末产品是特别优选的。

本发明的三氧嘧啶环糊精化合物通过口服给予或者肠胃外给予表现出了其效果，其优选被形成到用于肠胃外给予的制剂中，特别是注射剂或者局部给予，特别是气溶胶制剂。

制剂形式的实例包括片剂，胶囊，粉剂和粒剂。这些可以通过已知的技术通过使用典型添加剂例如赋形剂，润滑剂和粘合剂生产。

优选的用于雾化的药物制剂含有三氧嘧啶，环糊精（CD），NaCl 和水。特别优选的是下列的组合（对 200ml 的溶液）：
三氧嘧啶 0.05-0.2 g，优选 0.1 g; 10-50 g CD, 优选 20 g CD，优选 HP β CD; 氯化钠 1.2-1.5 g 优选 1.42 g (等渗性)和水，优选无热原、无菌、纯化的

水，加到 200ml。

这样的制剂用于治疗支气管炎疾病。

该溶液通过将 CD 溶于 100ml 纯化的水中，搅拌加入三氧嘧啶和氯化钠以使其溶解并用水补足以得到 200ml 溶液而制备。优选地，溶液被通过 0.22 μm 聚丙烯膜过滤或者通过蒸气灭菌法灭菌。

以下的实施例，参考文献和图仅提供用于理解本发明，真正的保护范围在后附的权利要求中提出。应该理解可以在不离开本发明精神的情况下对所提出的步骤进行修饰。

附图说明：

图 1. 腹膜内注射化合物 I 悬液对 BAL 嗜曙红细胞计数（图 1a）和支气管周炎症记分（图 1b）的影响。对照是仅暴露于 PBS 而不是过敏原的小鼠（PBS）以及通过吸入暴露于 ova 和腹膜内注射安慰剂的小鼠（OVA）。

图 2. 短期（5 天）经气溶胶给予过敏原暴露模型化合物 I-HP- β -CD 复合物，氟替卡松（fluticasone），和安慰剂（PLAC）对 BAL 嗜曙红细胞（2a），支气管周炎症记分（2b），和组织嗜曙红细胞浸润记分（2c）的治疗性作用。

图 3. 长期（11 周）经气溶胶给予过敏原暴露模型化合物 I-HP- β -CD 复合物，氟替卡松，和安慰剂（PBC）对 BAL 嗜曙红细胞（3a），支气管周炎症记分（3b），和组织嗜曙红细胞浸润记分（3c）的治疗性作用。用 PBS 吸入剂对敏化但是未暴露于过敏原的小鼠（PBS）和敏化并且暴露于 OVA（PLAC）的小鼠进行处理。

图 4. 化合物 I 与纯化水(●)，L-赖氨酸 50mM(x)，L-赖氨酸 500 mM(▲)的相溶解度图表。

图 5. 静脉给予(5 mg/kg)绵羊 (n=6) 后，化合物 I 血清浓度平均值 ($\pm$ S.D.) (a) 或者化合物 I 血清浓度平均值的对数 (b) 相对时间曲线。

图 6. 口服给予(15 mg/kg)绵羊 (对溶液 n=5，对悬液 n=6) 溶液(▲) 和悬液(●)后，化合物 I 血清浓度平均值 ($\pm$ S.D.) (a) 或者化合物 I 血清

浓度平均值的对数 (b) 相对时间曲线。

缩写

CD	环糊精
HP β CD 或 HP- β -CD	羟基丙基 β -环糊精
I.V.	静脉内
MMP	基质金属蛋白酶
OVA	卵清蛋白
PBS	磷酸盐缓冲液 β -环糊精

实施例 1

化合物 I 与环糊精 (CD) 可溶性复合物的制备

- 1.1 称重 20mg 的化合物 I。加入 2ml 200 mM HP β CD 溶液。在 37°C 搅动 24 小时。经 Millipore filter Millex HV 0.45 μ m 过滤。过滤后获得的溶液含有溶液形式的化合物 I-CD 复合物。
- 1.2 称重 2.5mg 的化合物 I。加入 2ml 200 mM HP β CD 溶液。在 37°C 搅动 24 小时或者直到化合物 I 完全溶解。如此获得的溶液含有化合物 I-CD 复合体。

实施例 2

通过添加 L-赖氨酸溶液提高可溶性化合物 I 和环糊精 (CD) 复合体的溶解度

溶解度研究如 Higuchi, T., 和 Connors, K.A. 的 *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation* 4 (1965) 117-212 所描述的那样进行。加入过量的化合物 I 以增加在 5ml 溶解介质中 HP- β -CD 的浓度 (0 – 200 mM), 所述的介质是纯化的水或者 L-赖氨酸溶液 (50 mM 或 500 mM)。密封玻璃容器并且在 25°C 水浴中振荡悬液直到达到复合平衡 (7 天)。将等份试样滤过 0.45 μ m 的 PVDF 膜滤器并且通过有效的液相色谱 (LC) 方法测

定化合物 I 的含量。

图 4 显示了在 25°C HP- β -CD 存在的情况下, 获得的化合物 I 于纯化水、50mM L-赖氨酸溶液和 500 mM L-赖氨酸溶液中的相溶解度图表。在这三种情况下, 化合物 I 的水中溶解度作为 CD 浓度的函数增加。不存在 L-赖氨酸时获得的溶解度图表证实了以前提到的结果:“化合物 I 在 200 mM HP- β -CD 溶液中的溶解度是大约 5.5 mg/ml (11 mM), 这相应于化合物 I 水中溶解度的大约 10,000 倍的增加。

在 L-赖氨酸存在时, 化合物 I 在 HP- β -CD 溶液中的溶解度甚至更高。200 mM HP- β -CD 溶液的溶解度在存在 50 mM 和 500 mM L-赖氨酸的时候分别增加了约 2 和 7 倍。表 8 显示了化合物 I 在不同介质中的溶解度资料。结果显示了 L-赖氨酸和 HP- β -CD 的协同效应。在 500 mM L-赖氨酸和 200 mM HP- β -CD (38.14 mg/ml) 存在时的溶解度高于通过分别加入 HP- β -CD 和 L-赖氨酸 (5.53 mg/ml 和 0.09 mg/ml) 所预计的值。这种 L-赖氨酸和 HP- β -CD 之间的协同效应容许化合物 I 水中溶解度重要的增加。(70,000-倍, 对于 500 mM L-赖氨酸和 200 mM HP- β -CD)。

表 1

有或者没有 HP- β -CD (200 mM) 的纯化水和 L-赖氨酸(50 mM 和 500 mM) 中化合物 I [mg/ml] 的溶解度

	没有 CD 的溶解度 [μ g/ml]	有 HP- β -CD (200 mM) 的溶解度 [μ g/ml]
纯化的水	0.56	5530
L-赖氨酸 50 mM	50	17080
L-赖氨酸 500 mM	90	38140

实施例 3

MMP 酶活性的确定

在如 Stack, M.S.,和 Gray, R.D., J. Biol. Chem. 264 (1989) 4277-4281 所描述的修改的荧光测试中测试抑制剂。人 MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 和 MMP-14 是可以商购的(例如从 Calbiochem)。用 1mM APMA (37°C 孵育 30 分钟) 在测试即时活化酶原。将活化的酶在孵育缓冲液 (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 10mM CaCl₂, pH 7.6) 中稀释到 100 ng/ml。将这些化合物溶解在 100%DMSO 中。对于 IC₅₀ 确定, 需要准备最少 8 个 0.5 - 1000 nM 的稀释步骤。将 DNP-底物(Bachem M1855, 255μM)溶解在孵育缓冲液中。

试管含有 970μl 孵育缓冲液, 10μl 抑制剂溶液, 和 10μl 酶溶液。通过加入 10μl 底物溶液起始反应。

使用在 280 nm 的激发和 346nm 的发射在 FluoroMax™ (Spex Industries Inc., Edison, NJ, USA) 上经 120 秒测量确定活性动力学。DMSO 被用来替代抑制剂溶液以作为对照。

IC₅₀ 被定义成抑制剂的浓度, 该浓度发出的信号是阳性酶对照的 50 %。

IC₅₀ 值 (nM) 如表 1 所示。

表 2

	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-9	MMP-14
化合物 I [nM]	53,000	65	3,500	260	1
Batimastat [nM]	25	32	67	23	19

实施例 4

药物组合物

非详尽性地例举不同的制剂组合物。

可注射制剂的优选实例是:

- HP-βCD 200 mM; 化合物 I 1 mg/ml; 适量注射用无菌水。

对于 25 ml 的溶液:

a) 溶液制备:

称重 6.77 g 的 HP β CD (4.2 % H₂O)并通过注射将其溶解到 25 ml 水中。加入 25mg 化合物 I 并在水浴中加热直到后者完全溶解。过滤消毒溶液。

b) 溶液特性:

溶液的重量摩尔渗透压浓度是 308 mOs/kg。pH 是 7.2。

化合物 I 和/或 CD 的浓度可以依照需要修改。优选通过加入 NaCl 调节张力。

优选的雾化制剂是:

对于 200ml 溶液:

- 化合物 I	0.1 g
- 没有热原的(pyrogenic)HP β CD	20.15 g (75mM)
- 氯化钠	1.42 g (等渗性)
- 无热源, 无菌, 纯化的水,	适量, 加至 200 ml

a) 称重 20.15 g 的没有热原的 HP β CD (3.2 % H₂O, ROQUETTE)并将其溶解到 100ml 纯化的水中。

b) 称重 0.1 g 的化合物 I, 和 1.42 g 的氯化钠, 并将其通过积极搅动加入到溶液中以使其溶解。

c) 补足水以获得 200 ml 的溶液。

d) 通过 0.22 μ m 的聚丙烯膜过滤除菌。

实施例 5

含有化合物 I 和 HP β CD 的制剂在哮喘小鼠模型中用于治疗过敏原诱导的气道炎症和支气管超响应性的应用

材料

HP- β -CD (取代度= 0.64)源自 Roquette (法国)。不致热的磷酸盐缓冲

液 (PBS) 购自 Bio-Wittaker (Verviers, Belgium), 乙酰甲基胆碱购自 Sigma-Aldrich (Germany)。所有其它材料都是分析级的。注射用无菌水在该研究中贯穿使用。无菌的、不致热的和等渗的 CD 溶液被制备成 20, 50 和 75 mM。用于吸入的可商购的氟替卡松溶液(Flixotide® 1mg/ml)购自 Glaxo-Smithkline (Genval, Belgium)。

敏化, 过敏原暴露和治疗方案

为了研究腹膜内注射化合物 I 对气道炎症的调节, 在第 0 和 7 天腹膜内注射 10 μ g 的吸附了 alumin 的卵清蛋白 (ovalbumin alumin-adsorbed) (aluminject, perbio, Erembodegem, Belgium) 将小鼠敏化, 随后从 21—24 天, 将其暴露于 1%OVA 或者 PBS 气溶胶 30 分钟。腹膜内注射在 OVA 吸入前 30 分钟进行。不同的注射制剂是: cremophor 10%-DMSO 10%-PBS 80%-化合物 I 30 mg/kg (悬浮液); cremophor 10%-DMSO 10%-PBS 80%-化合物 I 3.75 mg/kg (溶液); HP β CD 200 mM 化合物 I 7.5 mg/kg (溶液); HP β CD 200 mM。所有的结果都与敏化并暴露于 PBS 和腹膜内注射 PBS 处理的 OVA 的小鼠进行比较。为了研究吸入化合物 I 对气道炎症的调节, 将小鼠按照前述敏化。使用被称为短暴露激发和长期暴露激发的两种方法。在短暴露激发中, 在 Plexilgas 暴露室(30 x 20 x 15 cm)中从 21—27 天将小鼠暴露于以下浓度的化合物 I-复合物的气溶胶: 水溶液中 0.03 和 0.3 mg/ml 的活性化合物。化合物 I 吸入后, 从 23—27 天将小鼠暴露于 OVA 气溶胶中 30 分钟。在所谓的长期吸入激发中, 将小鼠暴露于复合了水溶液中 HP β CD 的浓度为 0.03 和 0.3 mg/ml 的化合物 I 的气溶胶中 30 分钟, 奇数周 5 天, 暴露于 OVA 气溶胶奇数周 3 天, 持续 11 周。偶数周不进行吸入。

通过使用 ultrasonic nebuliser SYSTAM (Système Assistance Medical, Le Ledat, France)生产气溶胶, 其振荡率频率是 2.4MHz, 具有可变的振动强度和通风水平。将振荡强度固定在位置 6 并且通风水平是 25($v_{1/2}$) l/min。气道响应性测量

最后的过敏原暴露后 24 小时, 如 Hamelmann, E.,等, *Am. J Respir. Crit. Care Med.* 156 (1997) 766-775)提出的那样使用气压计体积变动记录仪 (barometric plethysmograph) 测量 Penh 来确定支气管超响应性。在基线以及吸入增加剂量(25, 50, 75 和 100 mM)的乙酰甲基胆碱 (Mch) 后 5 分钟测量 Penh。

支气管肺泡灌洗 (BAL)和组织学

在评价气道响应性后即刻处死小鼠, 1ml 无离子化钙和镁但补充了 0.05mM 钠 EDTA 的 PBS 被经由气管套管滴入 4 次并通过轻柔的手工抽气回收。将回收的支气管肺泡灌洗流体 (BAL) 离心 (4°C 1800rpm 10 分钟)。将细胞沉淀清洗两次并最终重悬于 1ml PBS 中。在 Thoma 室中进行总细胞计数, 并且在用 Diff-Quick (Dade, Germany)染色后, 使用标准的形态学标准在细胞离心的制剂(Cytospin 2; Cytospin, Shandon td., Runcorn, Cheshire, U.K.)上对至少 400 细胞进行不同的细胞计数。BAL 后, 将胸廓打开并将左主支气管夹住。将左肺切除并立刻冷冻在液氮中用于蛋白质化学和 mRNA 提取, 而将右肺用于组织学。如前所述 (Cataldo, D.D., et al, *Am. J. Pathol.* 161 (2002) 491-498), 用 4%多聚甲醛灌注右肺并包埋于石蜡。将来自所有肺叶的 5 μ m 厚度的切片用苏木精和曙红染色。用炎症记分来估计支气管周浸润的程度。将切片编码并且以盲法的方式使用其它处描述的可重现的评分系统(Cataldo, D.D., et al, *Am. J. Pathol.* 161 (2002) 491-498)对支气管周炎症进行打分。将从 0 到 3 的每个标准的值赋予每个评分的组织部分。当没有可以检测到炎症的时候, 给予 0 的值; 偶尔出现炎症细胞的用 1 的值; 当多数支气管被一薄层 (1—5 个细胞) 炎症细胞环绕的时候用 2 的值; 当多数支气管被一厚层 (大于 5 个细胞) 炎症细胞环绕的时候用 3 的值。由于每只小鼠有 5—7 个随机选择的组织切片被记分, 炎症记分可以被表达成平均值/动物, 而且可以被组间比较。另一个记分被称为组织嗜曙红细胞浸润记分, 其特别地反映了嗜曙红细胞浸润支气管壁的量, 其被测定如下: 刚果红染色后, 对

每个小鼠的 7 个支气管进行研究。在支气管周围气道壁的限度内计数嗜曙红细胞，测量上皮基膜的周长并将结果表达为嗜曙红细胞/mm 基膜的数量。将左肺快速冷冻在液氮中并用 Mikro-Dismembrator S (Braun Biotech International, Melsungen, Germany)碾压，研究前将提取物储存在-80℃。将肾脏切除并用石蜡包埋，用苏木精和曙红染色 5μm 的切片。通过心脏穿刺对血液取样并且将血清储存在-80℃直到进行分析。

所有的体内操作均通过地方兽医道德委员会的批准。

化合物 I 的腹膜内注射

与安慰剂相比（图 1a），剂量为 3.75—30 mg/kg 的化合物 I（溶液或者沉淀）的腹膜内注射在 BAL 中降低了过敏原诱导的气道嗜曙红细胞炎症。在相同的剂量，化合物 I 同样显著降低了支气管周炎症记分，所有测试的制剂具有相同的效力（图 1b）。组织嗜曙红细胞浸润记分被剂量为 7.5 和 25 mg/kg 的化合物 I 腹膜内注射显著地降低了。

对化合物 I 和化合物 I-HPβCD 复合物的吸入暴露

通过在短期暴露中使用纯 DMSO 中 40mg/ml 化合物 I 溶液，化合物 I 的内在活性首先被评价为局部活性的抗炎制剂。当与单独 DMSO 吸入比较的时候，该制剂的吸入导致 BAL 嗜曙红细胞 ($p<0.005$)，支气管周炎症记分 ($p<0.01$)，以及支气管超响应性 ($p<0.05$) 的显著减少。

在短期暴露方案中，我们评价了含有 HP-β-CD 化合物 I 复合物的制剂对气道炎症和超响应性的作用。将含有 HP-β-CD 化合物 I 复合物的制剂的吸入效果与作为参照治疗的安慰剂（PBS）或者氟替卡松（1mg/ml）的效果比较。当与安慰剂比较时，以 0.03 和 0.3mg/ml 的剂量吸入那些含有化合物 I 的制剂在 BAL 中诱导嗜曙红细胞炎症的显著降低，其程度相当于氟替卡松 ($p<0.0001$) (图 2a)。当与安慰剂比较时，支气管周炎症记分也降低 ($p<0.0001$) (图 2b)，组织嗜曙红细胞浸润记分也一样 ($p<0.01$) (图 2c)。

长期过敏原暴露后，BAL 嗜曙红细胞在被含有 HP-β-CD 化合物 I 复

合物的制剂吸入处理后显著降低($p<0.001$), 其程度相当于氟替卡松(图 3a)。支气管周围炎症记分同样被吸入含有 HP- β -CD 化合物 I 复合物的制剂所显著降低, 氟替卡松也一样($p<0.0001$)(图 3b)。在被化合物 I 吸入处理后, 组织嗜曙红细胞浸润记分也被降低, 其程度相当于氟替卡松处理的小鼠($p<0.01$)(图 3c)。

实施例 6

对生物利用度的药物动力学研究

开发具有 HP- β -CD 和 L-赖氨酸组合的用于药物动力学研究的溶液, 其容许具有生物相容 pH 值的高化合物 I 浓度。

剂型制剂

通过将化合物 I(10 mg/ml)溶解在含有 HP- β -CD(200 mM), L-赖氨酸(20 mM)和注射用水的溶液中获得化合物 I / HP- β -CD 静脉内溶液。该溶液的重量摩尔渗透压浓度(大约 325 mOsmol/kg)和 pH 值(大约 8.2)与静脉内注射是相容的。将该溶液通过 0.20 μ m 无菌醋酸纤维素滤器在无菌条件下消毒。

通过将化合物 I(15 mg/ml)溶解到含有 HP- β -CD(200 mM), L-赖氨酸(50 mM)和水的溶液中制备化合物 I / HP- β -CD 口服溶液。

化合物 I 悬浮液由化合物 I (15 mg/ml), 作为湿润剂的聚山梨酯 80 (0.1 mg/ml), 作为稠化剂的硅镁铝 (VEEGUM HV[®], 1 % m/v)和甲基纤维素 (METHOCEL A400[®], 0.4 % m/v)组成。

动物试验方案和药物给予

6 只健康的绵羊 (2 雄和 4 雌) 被用作实验动物, 其体重范围为 45—82kg。在测试中, 这些动物随意进食和进水。

按照下表 3 方案而实现的该试验研究, 包括随机双向交叉 (two-way cross-over) 设计以用于口服给予, 而后通过静脉给予。每次给予之间,

容许 3 周的清除期。

表 3:

用于给予含有化合物 I 的溶液和悬浮液的动物试验设计

绵羊	1 st 期	2 nd 期	3 rd 期
1	口服悬浮液	口服溶液	I.V.溶液
2	口服悬浮液	口服溶液	I.V.溶液
3	口服悬浮液	口服溶液	I.V.溶液
4	口服溶液	口服悬浮液	I.V.溶液
5	口服溶液	口服悬浮液	I.V.溶液
6	口服溶液	口服悬浮液	I.V.溶液

对于口服剂型，每个动物从两种制剂中接受等于 15mg/kg 体重的化合物 I 剂量。为了适应剂型体积，将这些绵羊在药物给予的那天称重。经口给予前和 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 28, 32, 48, 72, 96, 120, 144, 168 小时后从颈静脉抽取血样。

对于静脉内剂型，所有 6 只绵羊均接受 5mg 化合物 I/kg 体重。将溶液通过左颈静脉给予，并且在开始静脉给予前和 5, 10, 15, 20, 30, 45 分钟, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 28, 32, 48, 72, 96, 120, 144, 168 小时后从右颈静脉抽取血样。

将所有血样离心并且将血清储存在-80℃下直到测试。

生物分析方法

开发了全自动的方法来在血清中 LC 确定该化合物。通过在线将填充了限制存取材料 (restricted access material, RAM) 即 LiChrospher RP-8 ADS (alkyl diol silica) 的前置柱与分析柱通过柱转换技术偶联来净化样品。ADS 吸附剂属于内表面反相支柱的组，并且其已经被成功用于在 LC 分析前净化生物样品(Yu, Z., and Westerlund, D., Chromatographia 44 (1997) 589-594; Hubert, Ph., et al., S. T. P. Pharma Pratiques 9 (1999) 160-180;

Souverain, S., et al., *Journal of Chromatography B* 801 (2004) 141-156)。操作条件描述在先前的文章中(Chiap, P., et al., *Journal of Chromatography B* 817 (2005), 109-117)。根据基于考虑到全部测量误差的准确测量的新方法, 该方法被证明是完全有效的(Hubert, P., et al., *Analytica Chimica Acta* 391 (1999) 135-148; Hubert, Ph., et al., *S. T. P. Pharma Pratiques* 13 (2003) 27-64; Hubert, Ph., et al., *J Pharm Biomed. Anal.* 36 (2004) 579-586)。

对于生物分析研究, 因为要被确定的高浓度, 所述方法的剂量范围必须增加到 50 µg/ml。进行部分重新生效测定, 反应功能、真实度、精确度、准确度和线性度均得到了良好的结果。

药物动力学和统计学分析

对于静脉内给予研究, 对每个动物使用具有一级分布和消除的线性两室模型确定药物动力学参数(Boroujerdi, M., *Pharmacokinetics, Principles and Applications*. McGraw-Hill Companies, USA, 2002)。在取样时期, 用线性梯形法则计算曲线值下的区域 (AUCs₀₋₁₆₈)。使用与化区分析相关的常规方程式计算外推的 AUC 到无限值(AUCs_{0-∞}), 全身清除值(CI_t), 生物半衰期(T_{1/2β})期, 和分布的总体积(Vd_t) (Boroujerdi, M., *Pharmacokinetics, Principles and Applications*, McGraw-Hill Companies, USA, 2002)。

对于口服给予研究, 使用具有一级输入和一级输出的线性一室模型对每个动物和对悬浮液和溶液确定药物动力学参数。(Boroujerdi, M., *Pharmacokinetics, Principles and Applications*. McGraw-Hill Companies, USA, 2002)。如上所述通过梯形求和计算 AUCs₀₋₁₆₈。AUCs_{0-∞}用下面的方程式估算(方程式 1)：

$$AUC_{0-\infty} = C_0 \left(\frac{1}{K} - \frac{1}{k_a} \right)$$

方程式 1

其中 K 和 k_a 分别是总消除率常数和吸收率常数, C₀ 是从起点外推的浓度。

用两种不同的方法确定每只动物血浆中药物的最大浓度($C_{\max}$)和相应的时间($T_{\max}$): 直接从浓度-时间表($C_{\max \text{ 实验的}}$ 和 $T_{\max \text{ 实验的}}$), 和使用下列方程式 (方程式 2 和 3) 计算 ($C_{\max \text{ 计算的}}$ 和 $T_{\max \text{ 计算的}}$):

$$C_{\max \text{ calculated}} = C_0 (e^{-K T_{\max}} - e^{-k_a T_{\max}})$$

方程式 2

$$T_{\max \text{ calculated}} = \frac{2.303}{k_a - K} \log \frac{k_a}{K}$$

方程式 3

绝对生物利用度 (F_{absol}) 使用下面的关系估算 (方程式 4) :

$$F_{\text{absol}} = \frac{AUC_{\text{oral}, D_{\text{IV}}}}{AUC_{\text{IV}, D_{\text{oral}}}}$$

方程式 4

其中 D_{oral} 和 D_{IV} 分别是经口和 I.V. 给予药量。

除了计算自平均 $AUC_{0-\infty}$ 的绝对生物利用度, 所有的药物动力学参数被报道为平均值 $\pm$ 标准偏差。

当单独的 AUC 值比平均值 ± 2 标准偏差高或者低的时候, 数据被认为是异常的。基于此, 在口服溶液给予后, 一只绵羊被排除出药物动力学参数确定和统计学分析。

使用方差双向分析 (双向 ANOVA) 来比较两个口服剂型的药物动力学参数。对数转化以将分布标准化后, 比较每个算出的参数的平均值。在 5% 的临界水平, 结果被认为是显著的($p < 0.05$)。

静脉内给予后化合物 I 的药物动力学

单次给予绵羊静脉溶液(5 mg/kg) 后获得的平均化合物 I 血清浓度相对时间曲线被报道在图 5a。图 5b 中 (平均化合物 I 血清浓度相对时间曲线的对数), 其显示化合物 I 的药物动力学遵循两室模型。在该静脉内给予后计算的不同药物动力学参数列于表 4。

表 4:

静脉内(5 mg/kg)给予绵羊(n = 6)后获得的化合物 I 药物动力学参数
(平均值 ± S.D.)

	I.V. 溶液
AUC _{0-168h} (µg.h/ml)	858,11 ± 211,58
AUC _{0-∞} (µg.h/ml)	858,87 ± 212,08
Cl _t (ml/h)	358,76 ± 67,47
Vd _t (l)	8,18 ± 2,16
T _{1/2β} (h)	15,76 ± 2,34

分布期是短的（大约 30 分钟），表明化合物 I 快速分布在有机体中。总分布体积是小的（大约 8 升），表明化合物 I 分布将被限制到细胞外流体中并且化合物 I 扩散到组织将不是非常重要的。另一方面，化合物 I 的生物半衰期是长的（大约 15.5 小时），因此，药物清除非常慢。考虑到其小的分布体积，有机体内的累积将不会是通过如脂肪中存储引起的，而可能是通过强力结合血浆中的蛋白或者其它组分所致。全身清除值也被算出，大约是 358.5 ml/h。

口服悬浮液和溶液后化合物 I 的药物动力学

口服单一剂量化合物 I(15 mg/kg)溶液和悬浮液后获得的化合物 I 的平均血清浓度相对时间分布见图 6a。在对数转化平均血清浓度后，看起来口服给予后的药物动力学将遵循一室模型 (图 6b)。药物动力学参数总结在表 5 中。

表 5:

口服给予(15 mg/kg)绵羊后获得的化合物 I 药物动力学参数 (平均值 ± S.D., 除了 F)

	口服溶液 (n=5)	悬浮液 (n=6)	p-值 (n=5)
AUC _{0-168h}	1848,66 ± 854,97	208,94 ± 103,82	

($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$)			
$\text{AUC}_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$)	$2070,13 \pm 943,79$	$214,65 \pm 103,04$	0.0035
$C_{\text{最大实验的}}$ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	$51,84 \pm 23,73$	$4,84 \pm 1,95$	0.0009
$C_{\text{最大计算的}}$ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	$56,85 \pm 24,67$	$5,34 \pm 2,24$	0.0010
$T_{\text{最大实验的}}$ (h)	$3,59 \pm 1,52$	$12,34 \pm 5,99$	0.0094
$T_{\text{最大计算的}}$ (h)	$3,98 \pm 0,57$	$10,42 \pm 3,01$	0.0046
F_{absol}	0,80	0,08	

给予溶液后化合物 I 的血清浓度明显高于用等剂量悬浮液给予获得的那些。对溶液所观察到的吸收期（大约 4 小时）要比给予悬浮液后所达到的吸收期（大约 10 小时）短。还可以看到溶液和悬浮液的药物动力学有显著差别 ($p < 0.05$) (表 5)。分别给予溶液和悬浮液后，平均化合物 I 血清峰浓度是大约 54 和 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。溶液的 C_{max} 是大约比悬浮液的高 10 倍。用溶液(大约 3.8h)获得了比用悬浮液(大约 11h)早 3 倍的 T_{max} 。AUC 值遵循相同的趋势， C_{max} 值也是：给予溶液后的 AUC 是大约 10 倍高于给予悬浮液后的 AUC。因此，在与 I.V.溶液比较后，溶液的绝对生物利用度(80%)要比悬浮液(8%)高得多。

参考文献表

Bergers, G., et al., Nat. Cell Biol. 2 (2000) 737-744

Boroujerdi, M., Pharmacokinetics, Principles and Applications, McGraw-Hill Companies, USA, 2002

Carmeliet, P., and Jain, R.K., Nature 407 (2000) 249-257

Carmeliet, P., et al., Nat. Genet. 17 (1997) 439-444

- Cataldo, D.D., et al, *Am. J. Pathol.* 161 (2002) 491-498
- Chang, C., and Werb, D., *Trends Cell Biol.* 11 (2001) S37-43
- Chiap, P., et al., *Journal of Chromatography B* 817 (2005), 109-117
- Drummond, A.H., et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 878 (1999) 228-235
- Egeblad, M., and Werb, Z., *Nat. Rev. Cancer* 2 (2002) 161-174
- Fletcher, L., *Nat. Biotechnol.* 18 (2000) 1138-1139
- Giavazzi, R., et al., *Clin. Cancer Res.* 4 (1998) 985-992
- Grams, F., et al., *Biol. Chem.* 382 (2001) 1277-1285
- Hamelmann, E., et al., *Am. J Respir. Crit. Care Med.* 156 (1997) 766-775
- Higuchi, T., and Connors, K.A., *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation* 4 (1965) 117-212
- Holmbeck, K., et al., *Cell* 99 (1999) 81-92
- Hubert, P., et al., *Analytica Chimica Acta* 391 (1999) 135-148
- Hubert, Ph., et al., *J Pharm Biomed. Anal.* 36 (2004) 579-586
- Hubert, Ph., et al., *S. T. P. Pharma Pratiques* 9 (1999) 160-180
- Hubert, Ph., et al., *S. T. P. Pharma Pratiques* 13 (2003) 27-64
- Lund, L.R., et al., *EMBO J.* 18 (1999) 4645-4656
- Manes, S., et al., *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 6935-6945
- Overall, C.M., and Lopez-Otin, C., *Nat. Rev. Cancer* 2 (2002) 657-672
- Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 16th ed., 1980, Mack Publishing Co.,
edited by Oslo et al.
- Rohatagi, S., et al., *J. Clin. Pharmacol.* 43 (2003) 365-378
- Shapiro, S.D., *Curr. Opin. Cell Biol.* 10 (1998) 602-608
- Souverain, S., et al., *Journal of Chromatography B* 801 (2004) 141-156
- Stack, M.S., and Gray, R.D., *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 4277-4281
- Szelenyi, I., et al., *Drugs Today* 36 (2000) 313-320
- US Patent No. 6,110,924
- US Patent No. 6,242,455

Vu, T.H., et al., Cell 93 (1998) 411-422

WO 01/25217

WO 97/23465

WO 98/58915

Yu, Z., and Westerlund, D., Chromatographia 44 (1997) 589-594

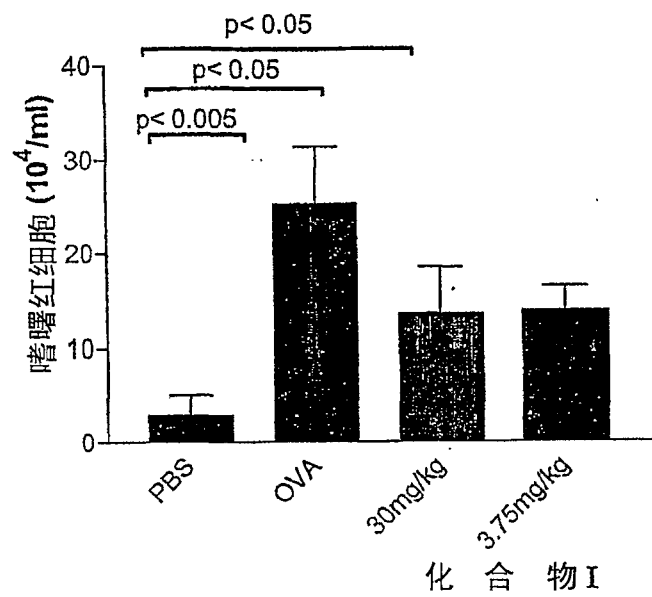


图 1a

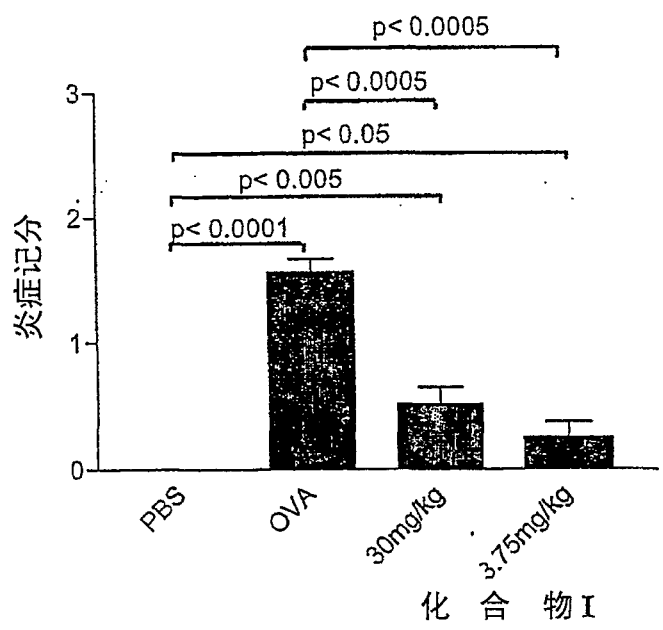


图 1b

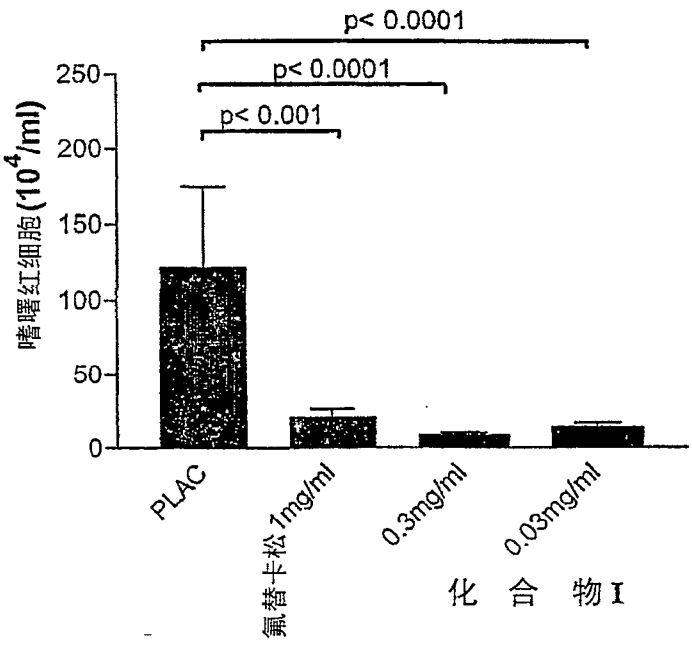


图 2a

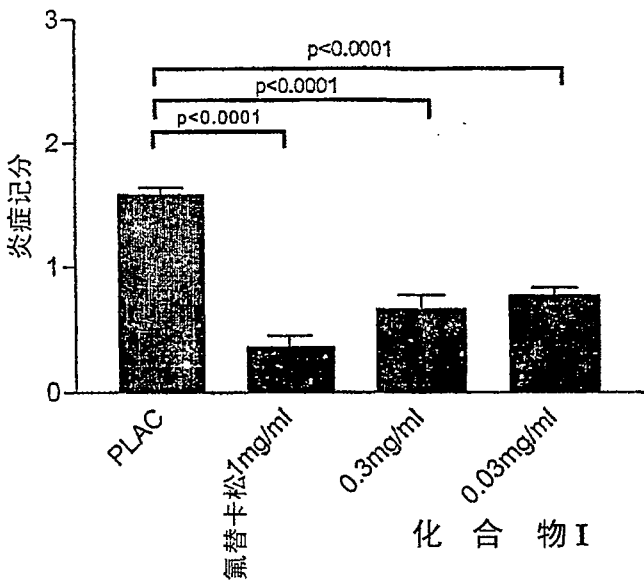


图 2b

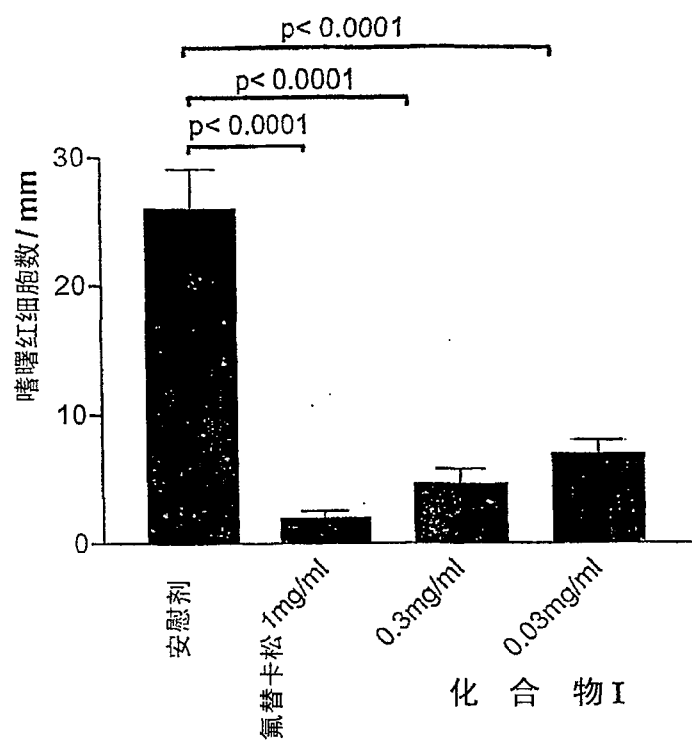


图 2C

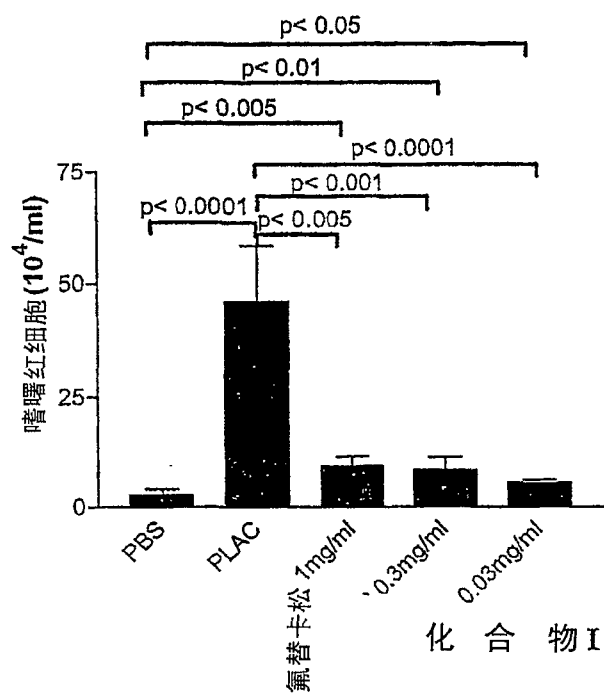


图 3a

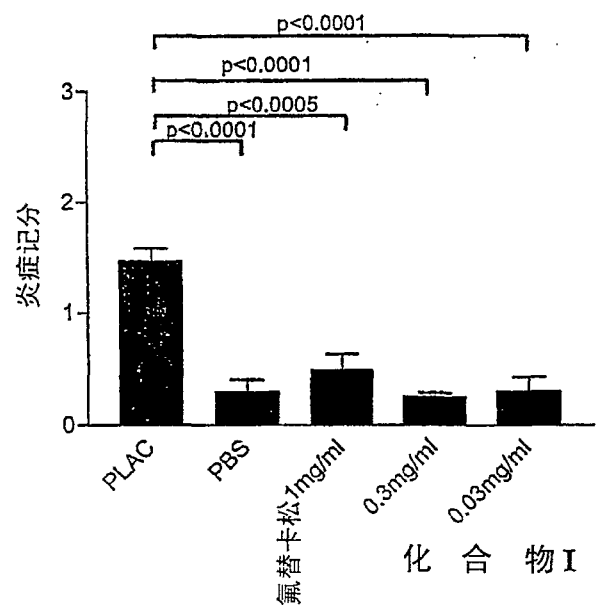


图 3b

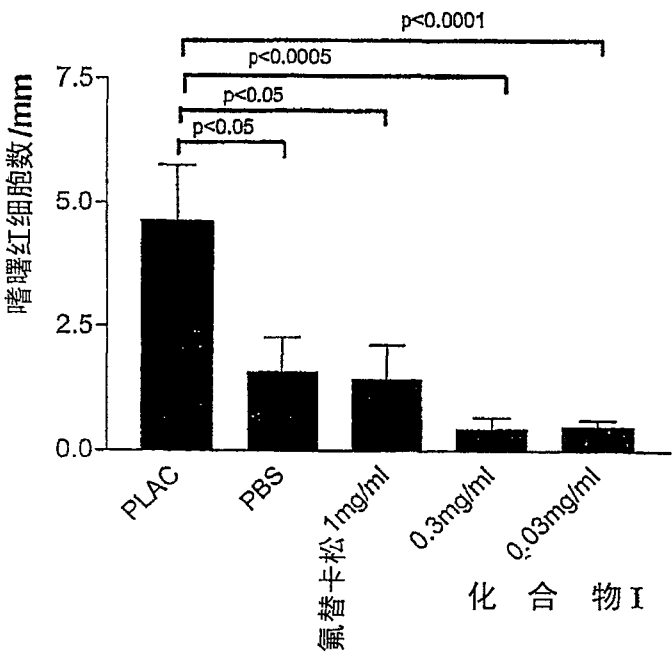


图 3C

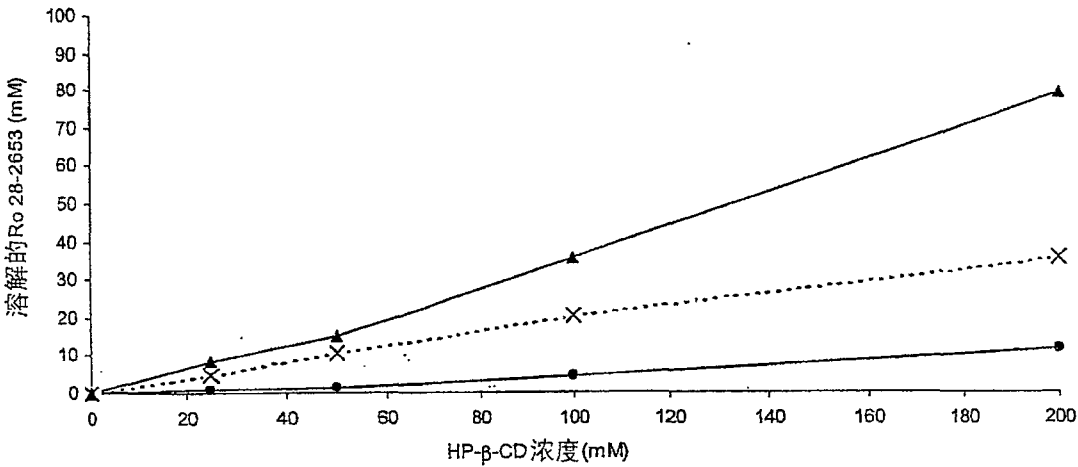


图 4

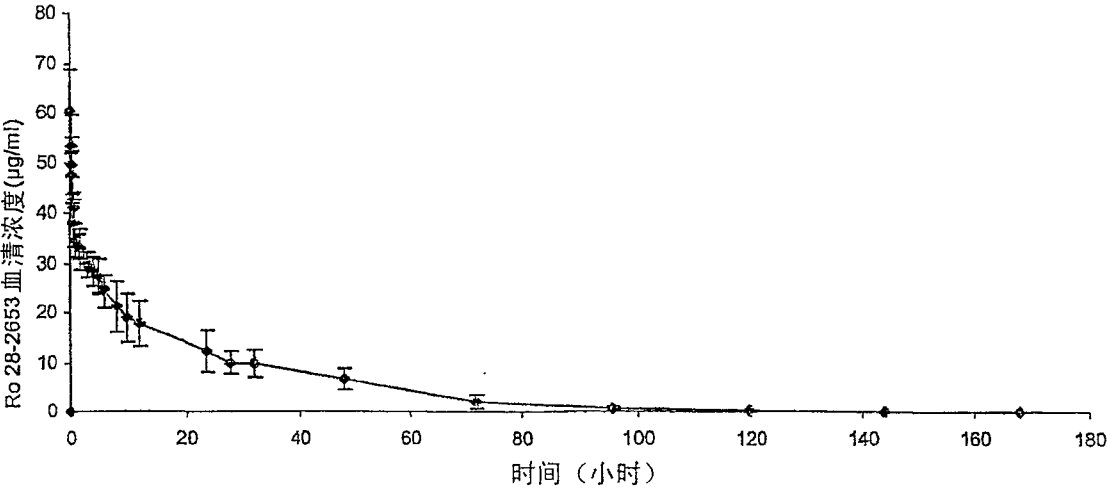


图 5A

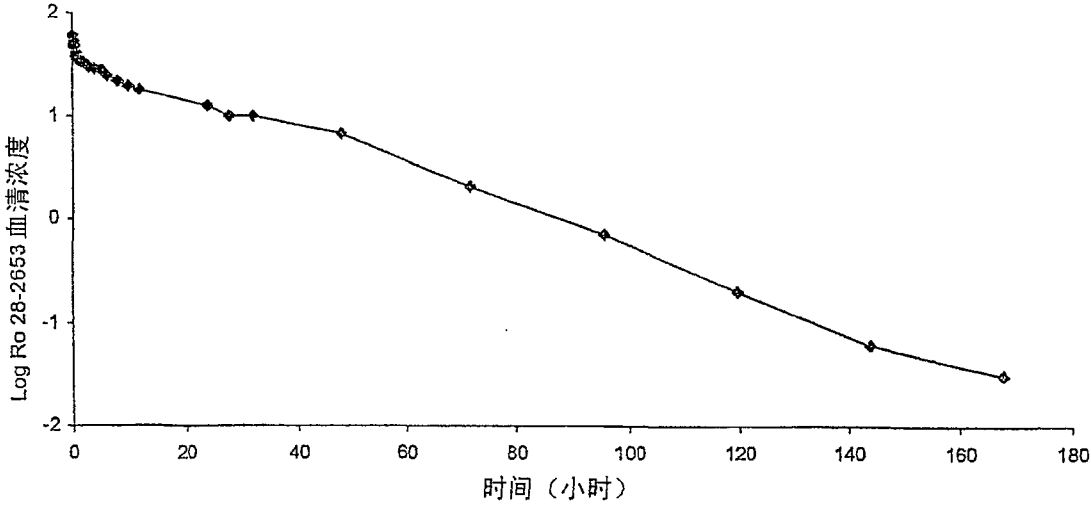


图 5B

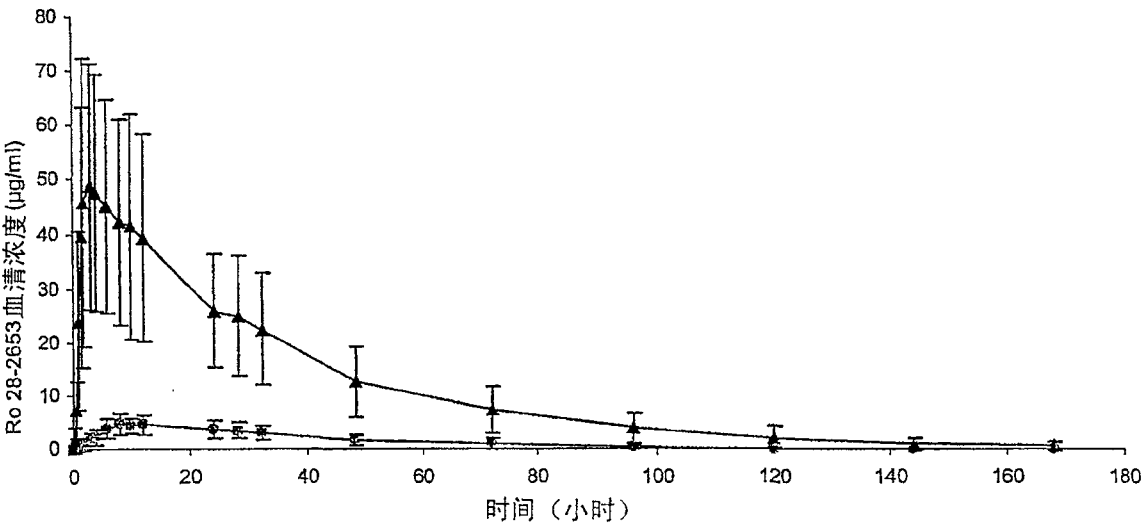


图 6a

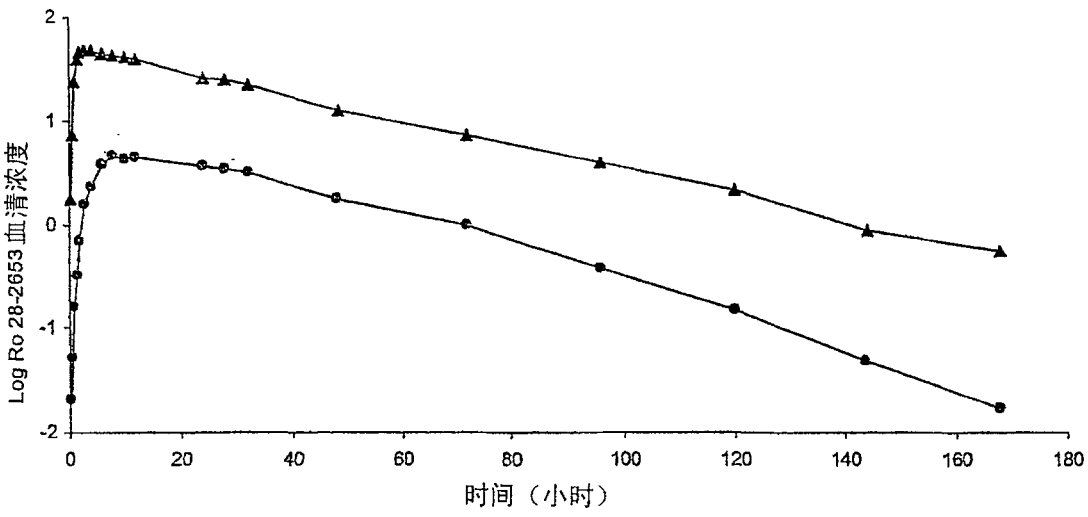


图 6b