

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07F 9/09 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01816806. X

[45] 授权公告日 2009年3月11日

[11] 授权公告号 CN 100467476C

[22] 申请日 2001.8.1 [21] 申请号 01816806. X

[30] 优先权

[32] 2000.8.3 [33] IL [31] 137672

[86] 国际申请 PCT/IL2001/000713 2001.8.1

[87] 国际公布 WO2002/011666 英 2002.2.14

[85] 进入国家阶段日期 2003.4.3

[73] 专利权人 迪-药品有限公司

地址 以色列雷霍沃特

[72] 发明人 A·科扎克 M·温尼科瓦

M·珀雅克 E·贝特-延奈

D·雷滋尼斯基-科亨

A·森德里克欣

[56] 参考文献

US6030961A 2000.2.29

US4837023A 1989.6.6

审查员 于海江

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张广育 徐雁漪

权利要求书5页 说明书38页 附图4页

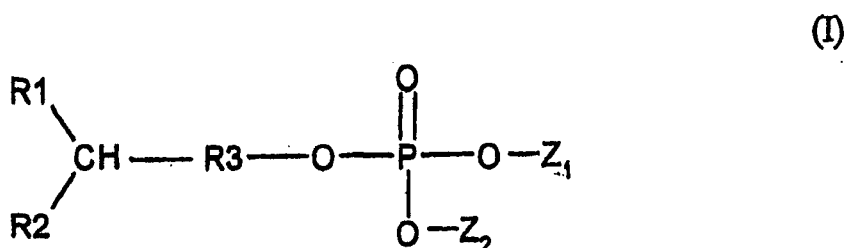
[54] 发明名称

支化链亲脂性分子衍生物及其用途

[57] 摘要

本发明公开了用于透过生物屏障和用于抑制肿瘤生长的支化链亲脂性分子的新的磷酸衍生物。本发明进一步公开了含有所述分子的药物组合物和它们的用途。

1. 通式 I 的化合物:



或者其药学可接受盐, 其中:

R1 和 R2 是相同或不同的, 饱和的或不饱和的具有 2-30 个碳原子的脂族链;

R3 是 A-[CH₂]_m-B-[CH₂]_n-C-[CH₂]_p-D, 其中 m, n 和 p 各自独立地是 0 或 1-12 的整数, 并且 A, B, C 和 D 各自独立地选自共价键和氧, 前提是没有两个氧原子直接彼此连接;

Z₁ 和 Z₂ 是相同或不同的, 各自可以不存在或者独立地选自 a) 氢, 钠, 锂, 钾, 铵, 一-, 二-, 三-和四-烷基铵, 或者 b) 和磷酸基团一起形成胆碱, 乙醇胺或丝氨酸的磷酸酯。

2. 根据权利要求 1 的化合物, 其中 R1 的长度是 3 个碳原子, R2 的长度是 12-16 个碳原子。

3. 根据权利要求 1 的化合物, 其中 R1 是丙基, R2 是十二烷基。

4. 根据权利要求 1 的化合物, 其中 R3 包括一-乙二醇或二-乙二醇部分。

5. 根据权利要求 1 的化合物, 其中 R2 和 R3 中碳原子总数是 6-26。

6. 根据权利要求 1 的化合物, 其中 R2 和 R3 中碳原子总数是 16-22。

7. 根据权利要求 1 的化合物, 其中 Z₁ 是胆碱。

8. 根据权利要求 1 的化合物, 其中 Z₁ 是钠, Z₂ 选自氢和钠。

9. 根据权利要求 1 的化合物, 选自下组:

磷酸 4-十六烷基酯,

磷酸 4-十八烷基酯，
 磷酸 4-二十烷基酯，
 磷酸 8-十五烷基酯)，
 磷酸 4-十六酰氧基乙酯，
 磷酸 2-(4'-十六酰氧基)乙氧基乙酯，
 磷酸 4-十六烷基氧基乙酯，
 磷酸 2-(4'-十六烷基氧基)乙氧基乙酯，
 4-十六烷基磷酸胆碱，
 2-(4-十六酰氧基)乙基磷酸胆碱，
 2-(4-十六酰氧基)乙氧基乙基磷酸胆碱，
 磷酸 2-{2'-[10''-(十六烷基-4-氧基)癸-1-氧基]乙氧基}乙酯，
 2-{2'-[10''-(十六烷基-4-氧基)癸-1-氧基]乙氧基}乙基磷酸胆碱，

碱，

磷酸 4-十八烷酰氧基乙酯，
 磷酸 2-(4'-十八烷酰氧基)乙氧基乙酯，
 磷酸 4-十八烷基氧基乙酯，
 磷酸 2-(4'-十八烷基氧基)乙氧基乙酯，
 4-十八烷基磷酸胆碱，
 2-(4-十八烷酰氧基)乙基磷酸胆碱，
 2-(4-十八烷酰氧基)乙氧基乙基磷酸胆碱，
 磷酸 4-二十酰氧基乙酯，
 磷酸 2-(4'-二十酰氧基)乙氧基乙酯，
 磷酸 4-二十烷基氧基乙酯，
 磷酸 2-(4'-二十烷基氧基)乙氧基乙酯，
 4-二十烷基磷酸胆碱，
 磷酸 2-(4-二十酰氧基)乙基磷酸胆碱，
 2-(4-二十酰氧基)乙氧基乙基磷酸胆碱，
 磷酸 10-(4'-十六酰氧基)癸酯，
 磷酸 10-(8'-十五酰氧基)癸酯，
 磷酸 2-[2'-(2''-丙基二十酰氧基)-乙氧基]乙酯，和
 2-(2'-丙基二十酰氧基)乙氧基乙基磷酸胆碱。

10. 根据权利要求1的化合物, 其是磷酸 2-(4'-十六酰氧基) 乙氧基乙酯一钠盐。

11. 根据权利要求1的化合物, 其是磷酸 2-(4'-十六酰氧基) 乙氧基乙酯二钠盐。

12. 根据权利要求1的化合物, 其是磷酸 2-(4'-十六烷基氧基) 乙氧基乙酯。

13. 根据权利要求1的化合物, 其是 2-(4-十六酰氧基) 乙基磷酸胆碱。

14. 根据权利要求1的化合物, 其是 2-(4-十六酰氧基) 乙氧基乙基磷酸胆碱。

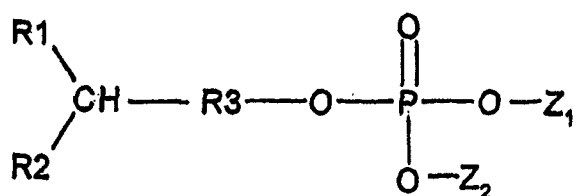
15. 根据权利要求1的化合物, 其是 2-[2'-[10''-(十六烷基-4-氧基) 癸-1-氧基]乙氧基]乙基磷酸胆碱。

16. 根据权利要求1的化合物, 其是 4-十八烷基磷酸胆碱。

17. 根据权利要求1的化合物, 其是磷酸 8-十五烷基酯。

18. 含有药学可接受载体和通式 I 的化合物或其药学可接受盐的药物组合物,

(I)



其中:

R₁ 和 R₂ 是相同或不同的, 饱和的或不饱和的具有 2-30 个碳原子的脂族链;

R₃ 是 A-[CH₂]_m-B-[CH₂]_n-C-[CH₂]_p-D, 其中 m, n 和 p 各自独立地是 0 或 1-12 的整数, 并且 A, B, C 和 D 各自独立地选自共价键和氧, 前提是没有两个氧原子直接彼此连接;

Z₁ 和 Z₂ 是相同或不同的, 各自可以不存在或者独立地选自 a) 氢, 钠, 锂, 钾, 铵, 一-, 二-, 三-和四-烷基铵, 或者 b) 和磷酸基团一起形成胆碱, 乙醇胺或丝氨酸的磷酸酯。

19. 根据权利要求 18 的药物组合物,其中通式 I 的化合物和权利要求 2-17 中任一项定义的一样。

20. 根据权利要求 18 或 19 的药物组合物,进一步包含一种生物活性剂。

21. 根据权利要求 20 的药物组合物,其中所述生物活性剂是治疗剂。

22. 根据权利要求 20 的药物组合物,其中所述生物活性剂是抗癌药物。

23. 根据权利要求 20 的药物组合物,其中所述生物活性剂是诊断剂。

24. 权利要求 1-17 的任一项的化合物制备药物的用途。

25. 权利要求 1-17 的任一项中定义的通式 I 的化合物在制备用于提高生物屏障通透性的药物中的用途。

26. 根据权利要求 25 的用途,其中所述生物屏障选自皮肤,角膜,结膜,鼻,支气管,颊,阴道,和胃肠上皮,血视网膜屏障,血脑屏障,血睾丸屏障,血肿瘤屏障和血肾界面。

27. 权利要求 1-17 的任一项中定义的化合物在制备用于允许或提高所述生物活性剂在特定位点或器官中的穿透和/或积累的药物组合物中的用途。

28. 根据权利要求 27 的用途,其中所述特定位点或器官是脊髓,脑,眼,睾丸,腺体或肿瘤。

29. 权利要求 18 或 19 的药物组合物和一种治疗剂在制备用于治疗中枢神经系统疾病或紊乱的药物中的用途。

30. 根据权利要求 29 的用途,其中所述治疗剂选自抗肿瘤剂,抗病毒剂,抗微生物剂,抗真菌剂,抗炎剂,神经保护剂和生物活性肽或蛋白质。

31. 权利要求 1-17 的任一项中定义的化合物在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。

32. 根据权利要求 31 的用途,其中所述化合物与抗癌药物组合。

33. 根据权利要求 32 的用途,其中所述抗癌药物配制在分开的药物组合物中。

34. 根据权利要求 31 的用途,其中所述肿瘤是在中枢神经系统内。
35. 根据权利要求 31 的用途,其中所述肿瘤是在脑内。
36. 根据权利要求 31 的用途,其中所述肿瘤选自癌,神经胶质瘤,成神经细胞瘤,成视网膜细胞瘤,淋巴瘤,白血病,肉瘤和色素瘤。
37. 根据权利要求 31 的用途,其中所述肿瘤是原发或继发肿瘤。
38. 权利要求 1-17 的任一项中定义的化合物在制备用于治疗眼科疾病或紊乱的药物中的用途。
39. 根据权利要求 38 的用途,其中所述药物与额外的生物活性剂组合。
40. 根据权利要求 38 的用途,其中所述眼科疾病或紊乱选自囊样黄斑水肿,与年龄相关的黄斑变性,眼内感染,眼内炎症和眼内恶性肿瘤。
41. 根据权利要求 27-40 任一项的用途,其中所述药物是口服,肠胃外或局部制剂或者是局部灌注,灌肠法或器官内灌洗制剂。
42. 根据权利要求 27-40 任一项的用途,其中所述药物是动脉内制剂。
43. 根据权利要求 27-40 任一项的用途,其中所述药物是鞘内制剂。
44. 权利要求 1-17 的任一项中定义的化合物在制备用于提高由生物屏障保护的器官中诊断剂积累的药物中的用途。
45. 根据权利要求 44 的用途,其中由所述生物屏障保护的器官是中枢神经系统。

支化链亲脂性分子衍生物及其用途

发明领域

本发明涉及新的支化链亲脂性分子磷酸衍生物, 涉及其药物组合物, 和其以可逆和选择方式提高生物屏障的通透性和抑制肿瘤生长的用途。

发明背景

很多药物和治疗性物质应用的主要局限性是它们穿过生物屏障的能力不足。这提出一个严重的问题, 尤其对于特定位置例如中枢神经系统(CNS)疾病和失调的治疗。

血脑屏障(BBB), 由通过紧密接合而连接的特殊微血管内皮细胞组成, 正常情况下负责保持脑内环境稳定并且保护它不受循环系统中存在的毒物和降解产物的作用。但是, 在一些病理学情形中, BBB的存在会干扰治疗物质运输到脑中, 因此妨碍中枢神经系统损伤的治疗, 包括肿瘤, 感染, 脓肿和退化性疾病。

以类似方式, 血肿瘤屏障(BTB)的存在干扰化学治疗药物送递到肿瘤中, 因此降低生物利用度并且在需要的情况下阻碍治疗有效作用。治疗物质不足以接近病灶的问题在CNS肿瘤情况下特别严重, 并且携带恶性脑部肿瘤的患者预后很不好。

为了在有限位点达到某些药物临床上有用的浓度, 经常要求以高全身剂量施用这些化合物。高全身剂量与不利的副作用及高水平毒性有关。

解决这个问题一个策略涉及改变亲水性药物分子的生物物理特征, 例如, 通过将这些药物与亲脂性载体连接。因为药物跨过生物膜的通透性取决于它的亲脂性, 增强化合物的亲脂性性质理论上应该提高它的生物利用度并且提高治疗效果。Yatvin等人的美国专利5,827,819中公开了与目标神经病学活性化合物的这样的极性脂质连接物。

避免BBB不通透性的另一个方法是通过使用瞬间开放BBB并且有利于特定药物或物质进入脑部的物质。已经证明象甘露糖醇这样的物质具有这种期望的作用并且已经用于将化学治疗药物送递给恶性脑肿

瘤(Hiesinger 等(1986), *Annals of Neurology*, 19 : 50-59)。但是脑肿瘤治疗中这种类型的高渗性 BBB 破坏的使用是有争议的, 因为除了药物通过 BBB 之外, 也允许进入其他分子, 例如神经毒素。这可以解释与使用通透口方法治疗相关的高发生率中风, 癫痫发作免疫反应和眼毒性。

也公开过提高血脑屏障通透性的各种各样的其他治疗方法, 包括: 使用缓激肽激动剂 (Alkermes 的 WO 91/16355) 和一些其他的肽 (Alkermes 的 WO 92/18529) ; 使用细菌细胞壁片段 (Rockefeller Univ. 的 WO 91/16064) 或者使用抗百日咳杆菌丝状血凝素或脑内皮 x-分子抗体 (Rockefeller Univ. 的 WO 92/19269) 。也有人报道过象油酸这样的一些脂肪酸可逆地开放 BBB (Sztriha 和 Betz (1991), *Brain Res.* 336 : 257-262)。

公开过在施用诊断试剂 (Oregon Health Sci. U. 的美国专利 5, 059, 415) 或治疗试剂 (Oregon Health Sci. U. 的 WO 89/11299) 之前可逆提高血脑屏障的通透性的方法是没有用的。

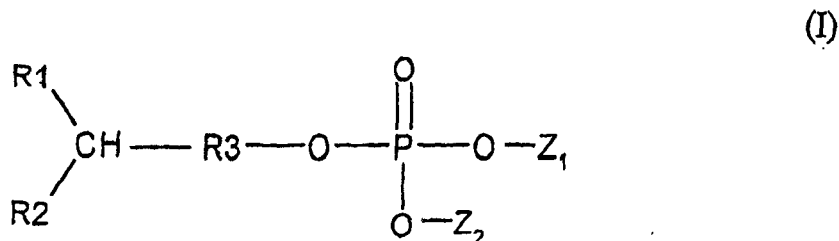
本发明人以前在国际专利申请公开号 WO 99/02120 中公开过支化脂肪酸及其某些亲脂性衍生物对于可逆性透过生物膜是有用的。但是, 没有人公开过包括磷酸酯部分的化合物。此外, 没有人公开过通过加入磷酸酯部分修饰支化脂肪酸有可能以特定的和有差别的方式调节生物学屏障的开放。

毫无疑问, 目前开发的通透生物膜和屏障的组分产生严重的副作用。因此, 还有这样的没有满足的需要, 即对将足量的治疗物质和诊断物质送递到限定位点提供有效而安全的方法。

人们提出很多种用于治疗各种癌症的组分, 其中包括包含烃链和磷酸胆碱部分的化合物。Eibl 的美国专利 4, 837, 023 和 5, 049, 552 公开了用于治疗癌症的组合物和方法。这些情况下活性物质是已知的物质十六烷基磷酸胆碱 (HePC)。但是, 根据这些专利的公开内容, 所有的试验的化合物中只有 HePC 具有实际上有用的抗肿瘤作用, 而具有较短烷基的同系物不具有或具有太低的抗肿瘤作用, 具有较长烷基的同系物毒性大得多。现有技术即没有公开也没有提示本发明主题的任何一种这样的化合物。

发明概述

一方面，本发明提供了通式 I 的化合物：



或者其药学可接受盐，其中：

R₁ 和 R₂ 是相同或不同的，饱和的或不饱和的具有 2 - 30 个碳原子的脂族链；

R₃ 是 A-[CH₂]_m-B-[CH₂]_n-C-[CH₂]_p-D，其中 m, n 和 p 各自独立地是 0 或 1 - 12 的整数，并且 A, B, C 和 D 各自独立地选自共价键，氨基，酰氨基，氧，硫，羰基，羧基，氧羰基，硫羰基，磷酸酯，氨基磷酸酯，一-，二-和三-氨基磷酸酯基团，前提是没有两个氧原子直接彼此连接；

Z₁ 和 Z₂ 是相同或不同的，各自可以不存在或者独立地选自 a) 氢，钠，锂，钾，铵，一-，二-，三-和四-烷基铵，或者 b) 和磷酸基团一起形成丙三醇，胆碱，乙醇胺，肌醇，丝氨酸，单糖或寡糖的磷酸酯。

在一个优选的实施方案中，通式 I 的化合物是 α-支化脂肪酸分子，其中 R₁ 和 R₂ 分别是具有 3 和 12 - 16 个碳原子的烃链。

根据另一个优选的实施方案，通式 I 的化合物的 R₃ 包括一-或二-乙二醇部分。

根据本发明的一般优选的化合物是：

磷酸 4-十六烷基酯 (3, 12-PO₄)，

磷酸 4-十八烷基酯 (3, 14-PO₄)，

磷酸 4-二十烷基酯 (3, 16-PO₄)，

磷酸 8-十五烷基酯 (7, 7-PO₄)，

磷酸 4-十六酰氧基乙酯 (3, 12-MEG-PO₄)，

磷酸 2- (4'-十六酰氧基) 乙氧基乙酯 (3, 12-DEG-PO₄)，

磷酸 4-十六烷基氧基乙酯 (3, 12-(醚)-MEG-PO₄)，

磷酸 2-(4'-十六烷基氧基) 乙氧基乙酯 (3, 12-(醚)-DEG-PO₄),
 4-十六烷基磷酸胆碱 (3, 12-PC),
 2-(4-十六酰氧基) 乙基磷酸胆碱 (3, 12-MEG-PC),
 2-(4-十六酰氧基) 乙氧基乙基磷酸胆碱 (3, 12-DEG-PC),
 磷酸 2-{2'-[10''-(十六烷基-4-氧基) 癸-1-氧基] 乙氧基} 乙酯
 (3, 12-0-C₁₀-DEG-PO₄),
 2-{2'-[10''-(十六烷基-4-氧基) 癸-1-氧基] 乙氧基} 乙基磷酸胆
 碱 (3, 12-0-C₁₀-DEG-PC),
 磷酸 4-十八烷酰氧基乙酯 (3, 14-MEG-PO₄),
 磷酸 2-(4'-十八烷酰氧基) 乙氧基乙酯 (3, 14-DEG-PO₄),
 磷酸 4-十八烷基氧基乙酯 (3, 14-(醚)-MEG-PO₄),
 磷酸 2-(4'-十八烷基氧基) 乙氧基乙酯 (3, 14-(醚)-DEG-PO₄),
 4-十八烷基磷酸胆碱 (3, 14-PC),
 2-(4-十八烷酰氧基) 乙基磷酸胆碱 (3, 14-MEG-PC),
 2-(4-十八烷酰氧基) 乙氧基乙基磷酸胆碱 (3, 14-DEG-PC),
 磷酸 4-二十酰氧基乙酯 (3, 16-MEG-PO₄),
 磷酸 2-(4'-二十酰氧基) 乙氧基乙酯 (3, 16-DEG-PO₄),
 磷酸 4-二十烷基氧基乙酯 (3, 16-(醚)-MEG-PO₄),
 磷酸 2-(4'-二十烷基氧基) 乙氧基乙酯 (3, 16-(醚)-DEG-PO₄),
 4-二十烷基磷酸胆碱 (3, 16-PC),
 磷酸 2-(4-二十酰氧基) 乙基磷酸胆碱 (3, 16-MEG-PC),
 2-(4-二十酰氧基) 乙氧基乙基磷酸胆碱 (3, 16-DEG-PC),
 磷酸 10-(4'-十六酰氧基) 癸酯,
 磷酸 10-(8'-十五酰氧基) 癸酯,
 磷酸 2-[2'-(2''-丙基二十酰氧基)-乙氧基] 乙酯 (3, 18-DEG-PO₄),

和

2-(2'-丙基二十酰氧基) 乙氧基乙基磷酸胆碱 (3, 18-DEG-PC)。

一般最优选的化合物是:

磷酸 2-(4'-十六酰氧基) 乙氧基乙酯, 一钠盐,

磷酸 2-(4'-十六酰氧基) 乙氧基乙酯, 二钠盐,

磷酸 2-(4'-十六烷基氧基) 乙氧基乙酯,

2-(4-十六酰氧基) 乙基磷酸胆碱, 和

2-(4-十六酰氧基)乙氧基乙基磷酸胆碱。

本发明的化合物用于提高生物屏障的通透性。因此,另一方面,本发明提供了含有有效量的上述通式 I 的化合物,或者其药学可接受盐,和药学可接受载体的药物组合物。

本发明的药物组合物还可以另外含有药学有效量的一种生物活性剂。在一个优选的实施方案中,所述生物活性剂是一种治疗剂。所述治疗剂可以选自但不限于抗肿瘤剂,抗病毒剂,抗微生物剂,抗真菌剂,抗炎剂,神经保护剂和生物活性肽和蛋白质。

在另一个优选的实施方案中,本发明的药物组合物进一步含有一种诊断剂。

所述药物组合物用于促进将生物活性分子,例如治疗剂和诊断剂,施用到组织和器官中,特别是在生物屏障优先保护的位点。

在一个特定的实施方案中,所述药物组合物用于增强通过血视网膜屏障(BRB),血脑屏障(BBB)和血肿瘤屏障(BTB)的药物递送。根据本发明的药物组合物还可以用于提高其他生物学屏障的通透性,例如,促进通过皮肤,角膜,结膜,鼻,支气管,颊,阴道,和胃肠道上皮吸收,和通过血睾丸屏障和血肾界面。

可以通过口服,肠胃外或局部给药或者通过局部灌注,灌肠法或器官内灌洗施用药物组合物。优选地,本发明的药物组合物经动脉内或鞘内给药。

另一方面,本发明提供了提高生物学屏障的通透性的方法。这些方法包括使所述屏障暴露于有效量的通式 I 的化合物,或者其药学可接受盐,这样允许或提高生物学屏障的通透性。

另一方面,本发明提供了将生物活性剂施用到特定定位点或器官中的方法,包括在有效量的根据本发明的化合物的存在下使所述位点或器官暴露于所述生物活性剂,这样允许或提高生物活性剂在特定定位点或器官中的穿透和/或积聚。所述特定定位点或器官可以选自但不限于脊髓,脑,眼,睾丸,腺体和肿瘤。

另一方面,本发明提供了治疗肿瘤的方法,包括对需要的患者施用治疗有效量的含有作为活性成分的根据本发明的通式 I 的化合物的药物组合物。所述肿瘤可以选自但不限于,癌(例如乳腺癌,结肠癌,直肠癌和膀胱癌),神经胶质瘤(例如星形细胞瘤),成神经细胞瘤,成视

网膜细胞瘤, 眼内恶性肿瘤, 淋巴瘤, 白血病, 肉瘤和黑素瘤。肿瘤可以是原发或继发肿瘤。

本发明进一步提供了治疗中枢神经系统疾病或失调的方法, 包括与治疗剂联合对需要的患者施用治疗有效量的含有通式 I 的化合物, 或者其药学可接受盐的药物组合物。所述治疗剂可以包含在含有通式 I 的化合物的相同药物组合物中, 或者在分开的组合物中。

在优选的实施方案中, 治疗的中枢神经系统疾病是脑肿瘤, 治疗剂是抗癌药物。在另一个优选的实施方案中, 治疗的疾病是眼科疾病或紊乱, 例如囊样黄斑水肿 (CME), 与年龄相关的黄斑变性 (ARMD), 眼内感染, 眼内炎症和眼内恶性肿瘤。

另一方面, 本发明提供了增加诊断剂在生物学屏障保护的器官中的积累的方法, 包括与有效量的上面定义的通式 I 的化合物联合对个体施用所述诊断剂, 从而增加诊断剂在生物学屏障保护的器官中的积累。所述诊断剂可以包含在含有通式 I 的化合物的相同药物组合物中, 或者在分开的组合物中。

在一个优选的实施方案中, 生物学屏障保护的所述器官是中枢神经系统。

附图简要说明

图 1 说明 3, n-型 α -支化脂肪酸的各种链长与这些化合物在 Evans 蓝-白蛋白复合物外渗进入大鼠脑部中的效能的相关性。

图 2A-C 说明单侧施用下面的化合物之后携带双侧神经胶质瘤的大鼠脑切片中 Evans 蓝的积累: $10\mu\text{M}$ 3, 12-DEG- HPO_4Na (图 2A), $40\mu\text{M}$ 3, 12-Na (图 2B) 或甘露糖醇 25% (图 2C)。

图 3A-C 说明单独施用 F-Na, 或者与 3, 12-DEG- HPO_4Na (图 3B) 或赋形剂 (图 3C) 联合施用荧光素钠盐 (F-Na) 之后 30 秒和 10 分钟时记录的大鼠眼后部的血管造影。

图 4A-B 说明根据实施例 26 的步骤, 与 3, 12-DEG- HPO_4Na (图 4A) 或赋形剂 (图 4B) 联合施用 F-Na 之后 10 分钟时记录的眼前部的 F-Na 积累。

本发明的详细描述

本发明涉及用于提高生物屏障通透性和用于抑制肿瘤生长的化合物，组合物和方法。

促进将治疗剂或诊断剂运送到限定位点(例如脑，眼，睾丸等)的期望的物质是能透过限制性生物屏障的物质。但是，优选的通透作用一定要以差别方式实现而没有产生不可接受程度的副作用。例如，在治疗脑肿瘤情况下，使用在完整相邻脑组织中比BBB大得多的程度透过BTB的物质是有利的。在这种情况下，通透作用使得毒性药物优先在病理组织中积累，同时对周围健康脑组织引起最小损伤或者没有损伤。对于其他屏障有相似的考虑。例如，期望有这样一种试剂，其能够增强递送药物或其他有益分子以短暂而特异方式通过皮肤和肠屏障。

本发明涉及新的化合物并且基础在于出人意料的发现，即这些化合物可以以可逆和选择性方式提高生物屏障的通透性。根据本发明的教导，所述新的化合物是如上定义的通式 I 的化合物或者其药学可接受盐。

在说明书中，通式 I 的化合物总称为"DP-BFAs"或者可互换地通称为支化链亲脂性分子的磷酸衍生物，缩写是"P-BFA"。不带有磷酸酯部分的支化链亲脂性分子称作"BFA"或"碳-BFA"。

在一个优选的实施方案中，P-BFAs 是通式结构 $R_1(R_2)-CH-$ 的 α -支化亲脂性分子的磷酸衍生物。在本发明的另一个实施方案中，P-BFAs 是通式结构 $R_1(R_2)-CH-[CH_2]_m-$ 的支化亲脂性分子的磷酸衍生物，其中 m 是 1 至 12，因此称作 ω -支化亲脂性分子，例如在位置 β ($m=1$)， γ ($m=2$) 等支化。

下文中，分别通过存在的它们的特定 R_1 和 R_2 ，支化链亲脂性分子侧链和主链上的碳原子数，来称谓特定的 DP-BFAs。

其中 R_3 是一乙二醇或二乙二醇的通式 I 的化合物分别称作 $R_1, R_2-PEG-PO_4$ 和 $R_1, R_2-DEG-PO_4$ 。在某些情况下，具体指明连接支化链部分和相邻化学基团的键，例如，在 $3, 12-O-C_{10}-DEG-PO_4$ ， $3, 12-(醚)-DEG-PO_4$ 等。其中 Z_1 是胆碱的通式 I 的化合物称作 R_1, R_2-PC 。

根据本发明的教导，通过改变通式 I 的化合物的结构中的各个部分来实现分子稳定性和它们对生物屏障的通透作用的精密调节是可能的。例如，改变烷基 R_1 和 R_2 中的碳原子数目和饱和度会影响分子的

总体疏水性,从而使得优化其通过特定生物膜的能力。

根据本发明的优选化合物是其中 R1 碳链长度是 2-14, 并且 R2 和 R3 的碳原子总数是 6-26 的 DP-BFA 分子。目前更优选的化合物是 α -支化链化合物, 其中 R1 是 3 个碳原子并且 R2 是 12-16 个碳原子。通式 I 优选的化合物包括从磷酸酯基团至支化的亲脂性分子的支化点长度最多是 20 个碳原子的脂族链。如上定义的通式 I 的 R3 部分中估计的碳原子数最适合通过 DP-BFA 分子的有效膜干扰, 从而引起期望的通透作用。应该注意到上述脂族链可以是连续的烃链, 或者其中可以有一个或多个选自氧, 硫, 氮和磷原子的杂原子, 这包括在 R3 的定义中。

在根据本发明的一个优选的实施方案中, 通式 I 的分子的 R3 包括通过酯键连接支化链部分和至少一个二元醇部分的羰基。在另一个优选的实施方案中, R3 包括通过醚键连接支化链部分和至少一个二元醇部分的共价键。在生理条件下, 醚键一般不易酶解, 因此预期比酯键更稳定。

可以影响 DP-BFA 化合物通过各种生物屏障的能力的另一个因素是分子中不同化学基团的极性。这也可帮助不同通透作用的精密调节。

本发明优选的化合物是盐的形式, 是通式 I 的化合物的一价盐或二价盐。合适的盐可以包括含一价或二价抗衡离子的任何药学可接受盐, 可以选自但不限于, Na^+ , Li^+ , K^+ , NH_4^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} , 一-, 二-, 三-和四-烷基铵。更优选的化合物包括一价盐。特别优选的是钠盐形式的 DP-BFA 分子, 是一-或二-钠盐。

通过本领域公知的化学合成方法可以制备本发明的化合物。下面的实施例中详细描述了一些这样的方法。也可以使用本领域技术人员公知的替代方法。

发现本发明的化合物体外破坏细胞紧密连接和体内提高生物屏障的通透作用是有用的。此外, 本发明以这样的出人意料的发现为基础, 即一些磷酸支化链亲脂性分子的衍生物对开放 BBB 和 BTB 屏障有不同的作用。因此, 本发明的不同的 P-BFA 化合物可以用于产生生物屏障的通透作用而同时产生最小的毒性和副作用。

一些 DP-BFA 化合物就能差异通过生物屏障来说对于不同大小的分

子是有选择性的。这一特征归因于磷酸-BFA 物质更高的安全性水平。一些 DP-BFAs 作用时间不同，这可以证明是其中期望限定屏障瞬时选择性通透的某些治疗环境下另一个有益因素。

本发明的化合物和含有它们的药物组合物可以使得或有利于递送生物活性剂通过生物屏障。

术语"生物活性剂"意指包括能激发生物学反应，对生物系统具有作用或者作为指示工具的所有的天然存在的和合成的化合物。这些生物活性剂可以是治疗或诊断剂。

治疗剂可以包括但不限于，抗肿瘤剂，抗增生剂，抗炎剂，神经病药物，抗细菌剂，抗霉菌剂和抗病毒剂。这些化合物和本发明的化合物联合特别用于治疗限定部位的病理状况，疾病和紊乱。例如，用于治疗中枢神经系统和损害，包括肿瘤，感染，脓肿和退化性紊乱。

诊断剂可以包括但不限于，成像剂，造影剂和染料。诊断剂的例子包括放射性标记物质(例如镓-99m 和氟-18 为基础的试剂)和造影剂例如钆为基础的化合物。本发明的化合物可以用于，例如诊断和鉴定脑病变的方法。在这种情况下，本发明的化合物用于提高 BBB 通透性，可以和以可以被监测的方式标记的化学试剂一起导入(在相同的或分开的组合物中)。

要监测的化学试剂可以是，例如，对脑细胞或结构的一般指示剂，或者在某些脑区域或脑病变中特异性而排它性结合或者积累的试剂。然后可以对脑组织分析来确定标记试剂的存在。可以利用本领域公知的扫描和成像方法进行分析(例如磁性共振成像技术(MRI)，正电子发射 X 线断层摄影术(PET)和计算机 X 线断层摄影术(CT))。

在本发明的其它实施方案中，DP-BFA 化合物可以用于增强药物在肠中的吸收或透过皮肤吸收。肠和皮肤中的生物屏障阻止很多种物质被动扩散通过胃肠或皮肤上皮，从而阻止某些有用的化学物质，营养物质和药物的有效吸收。通过和 DP-BFA 化合物联合施用期望的有用的化学物质，营养物质和药物可以克服这个障碍。

对本领域技术人员显而易见的是，很多种生物活性化合物适合与通式 I 的支化亲脂性分子联合，因此包括在本发明的范围内，作为用于根据本发明的治疗或诊断的药物组合物或方法的化合物。根据本发明，与期望的生物活性剂联合施用 P-BFA 化合物。毫无疑问，所述期望的

生物活性剂可以包括在相同的通式 I 的化合物的药物组合物之中，或者可以在分开的组合物中施用。优选地，两种活性剂，即通式 I 的化合物和期望的生物活性剂，被同时施用，或者在短时间间隔之内依次施用。在施用 P-BFA 化合物之前或者之后可以施用所述生物活性剂，前提是它在一个时间窗之内，使得 P-BFA 对生物屏障的作用足以促进相关的物质通过进入限定的部位。

下面的情况也是有可能的，即不是在施用 P-BFA 的同时附近施用期望的生物活性剂，而是所述期望的生物活性剂已经存在于血液之中（或者是体内自然产生或者作为缓慢释放药物而产生）。一些例子包括生物活性肽和蛋白质，例如神经递质，生长因子，激素，抗体等。在这种情况下，要求发生目标屏障的通透作用，同时存在足够量的期望的生物活性剂来发挥其生物作用。

本发明的化合物在生物屏障的通透作用中的改进的活性导致施用的药物生物利用度提高，从而扩大了这些药物在对低剂量药物没有反应的状况中的治疗用途。这在治疗脑部和眼部限定部位的疾病和症状中特别适当。

另外，本发明的化合物是有益的，它们能降低药物的有用剂量，从而减少不期望的全身副作用。此外，因为本发明的分子能允许选择性通过屏障，它们可以优先增加特定位点（例如肿瘤）的药物吸收而对相邻细胞和组织则不这样。

在对携带肿瘤的大鼠体内检查 P-BFA 的通透作用时，令人惊奇地发现一些试验化合物对肿瘤表现出显著的细胞毒性作用，证实它们显著抑制被治疗的肿瘤的生长能力。因此确定了一些本发明的化合物可以用作抗癌剂。此外，当体外对不同的正常的和肿瘤细胞测试它们的作用时，一些本发明的化合物具有经证实的不同的细胞毒素活性。

根据本发明原理，不同的 DP-BFA 分子可以特异制备以适合特定目标部位和特定指征。例如，发现本发明的分子在开放 BBB 和 BTB 屏障中以不同的方式作用。在这种情况下，某些 DP-BFAs 对 BTB 的通透作用比对 BBB 的作用程度更大。一些 DP-BFA 分子的作用的另一些有益特征是对允许通过的化合物保持一定的区别水平。因此 DP-BFAs 以比碳-BFA 或高渗剂例如甘露糖醇更具选择性的方式影响屏障通透作用。作为结果，与本领域已知的其它通透剂相比，预期 P-BFA 化合物引起较

小毒副作用。此外，因为发现它们的通透作用是可逆的，本发明的化合物也可以用于药物的长期给药。

如说明书和权利要求书中提到的，P-BFA的“有效量”指发挥根据本发明的期望的有益作用的本发明的化合物的量。根据本发明的一个方面，其是显著提高相关屏障对感兴趣的分子的通透性的P-BFA量。即，提高相关屏障的通透性以允许足够量的感兴趣的分子通过生物屏障这样以发挥其治疗或预防作用或者允许诊断程序的P-BFA量。根据本发明的另一方面，它是作为抗癌剂的治疗有效的P-BFA量。即，是抑制不受控制的细胞生长的P-BFA的量。

在个体的基础上并且至少部分在考虑到个体大小，具体的疾病，要治疗的症状的严重程度等的基础上确定有效量。因此，本领域技术人员使用这些因素并且使用日常经验容易确定有效量。

使用的剂量范围和给药方案取决于给药途径，接受者的年龄，性别，健康状况和体重以及对特定DP-BFA的效能和施用的相关的有用的药物或试剂。技术人员为了获得期望的作用时间和程度能调节DP-BFA组合物和剂量。

药物组合物可以是液体，气溶胶或固体剂型，并且可以配制成任何合适的制剂，包括但不限于溶液，悬浮液，胶束，乳剂，微乳剂，气溶胶，软膏，凝胶，栓剂，胶囊，片剂，等，这些根据给药途径所要求。

本发明包括的合适的给药途径包括但不限于口服，静脉内，肌内，皮下，吸入，鼻内，局部，直肠或者其他已知途径。在对CNS通透作用的优选的实施方案中，本发明的药物组合物是通过动脉内或鞘内给药。对于用作抗肿瘤药物，本发明相关的药物组合物优选通过口服或静脉内或局部施用或者通过局部灌注，灌肠或器官内灌注。

现在通过下面的非限制性实施例详细说明本发明。

实施例

I. 化学实施例

为了清楚起见，下面举例说明特定P-BFA分子及其盐的合成方法。但是应该明白相似方法也适用于其它的本发明的P-BFA分子的合成，包括但不限于，其中R1和/或R2是包括环烷基的脂族链的饱和的和不饱和的支化的链状分子和化合物。也可以获得P-BFA分子的各种

药可接受盐,包括但不限于钠盐,钾盐,铵盐和烷基-铵盐和与二价抗衡离子的盐。

所有的合成的化合物都通过 NMR, 质谱和元素分析加以鉴定。

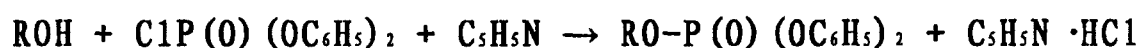
实施例 1: 磷酸烷基酯的合成

制备通式 $RO-P(O)(OH)_2$ 的磷酸盐。R 代表 $R_1(R_2)-CH$ 结构的支化链烷基部分, 其中 R_1 指侧烷基链中碳原子数目, R_2 指主烷基链中碳原子数目。

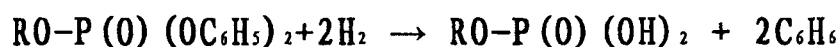
$RO-P(O)(OH)_2$ 分子的合成是三阶段程序。

第一阶段, 利用格林反应从醛和烷基溴制备相应的醇 ($R-OH$) (Vogel's, "有机化学实用手册" ("Textbook of practical organic chemistry"), Wiley, New York, pg. 531, (1996))。

第二阶段, 从所述醇和氯化磷酸二苯酯制备磷酸二苯酯:



第三阶段, 通过所述二苯酯的氢化作用获得磷酸二氢烷基酯。



磷酸 4-十六烷基二苯酯。

室温下, 振荡下, 向十六烷-4-醇(2.4 克, 0.01 摩尔)的无水吡啶(5 ml)溶液缓慢加入氯化磷酸二苯酯(4.0 克, 0.015 摩尔)。将烧瓶用塞子塞住并且放置 48 小时; 然后将内含物倒到冰冷的 1N 盐酸(100 ml)中。分离重油状物, 用乙醚萃取。乙醚层用 1N 盐酸(3 次), 5% 碳酸氢钠(5 次), 和水(5 次)洗涤。干燥($MgSO_4$)之后, 去除乙醚, 并且用柱色谱法纯化残余物(石油醚(bp 30-60 °C): 乙醚, 10: 1)。蒸发溶剂之后, 获得 3.5g 液体。产率 74%。

磷酸 4-十六烷基酯. (3, 12- PO_4)

氢气保护下振荡氧化铂(Adams 催化剂)(0.32 g)的冰醋酸(20 ml)悬浮液, 直到停止吸收。然后通过倾析, 用 2N 盐酸, 水, 并且最后用冰醋酸将 Adams 催化剂充分洗涤。将磷酸 4-十六烷基二苯酯(3.2 g)的冰醋酸(40 ml)溶液加给所述催化剂, 并且在氢气下振荡该溶液直到停止吸收。滤出催化剂并且用氯仿洗涤。真空下从滤液去除溶剂。残余物用石油醚(bp 30-60 °C)重结晶, 并且在 65 °C 下干燥。获得 2.01 g

终产物。产率 92%。

磷酸 4-十六烷基酯二钠。 (3, 12-PO₄Na₂)

磷酸 4-十六烷基酯 (1 g, 0.0031 摩尔) 溶解于乙醇 (100 ml)。加入 NaOH (0.25 g, 0.0062 mol) 并且将混合物搅拌 1 小时后蒸发。加入乙醇 (2 x 100 ml) 并且蒸发。加入乙醚 (100 ml) 并且蒸发。残余物用丙酮 (30 ml) 重结晶, 并且在 65°C (15 mm. Hg) 下干燥。获得 0.9 g 终产物。产率 79%。

¹H-NMR (CD₃OD) : δ 0.89 (m, 6H), 1.27 (s, 22H), 1.58 (m, 4H), 4.22 (m, 1H)。

MS (FAB) : m/z 367.06 (M + H)⁺。

磷酸 4-十六烷基酯一钠。 (3, 12-HPO₄Na)

磷酸 4-十六烷基酯 (3.13 g, 0.0097 mol) 溶解于乙醇 (150 ml)。加入 NaOH (0.37 g, 0.0092 mol), 并且将该混合物搅拌 48 小时之后蒸发。加入乙醇 (2 x 150 ml) 并且蒸发。加入乙醚 (2 x 100 ml) 并且蒸发。得到的固体用丙酮 (100 ml) 研制并且在 1 mm. Hg 气压下干燥过夜。获得 2.98g 终产物。产率 87%。

¹H-NMR (CD₃OD) : δ 0.87 (m, 6H), 1.25 (s, 22H), 1.51 (m, 4H), 4.12 (m, 1H)。

MS (FAB): m/z 345.11 (M + H)⁺。

磷酸 4-十八烷基酯二钠。 (3, 14-PO₄Na₂)

¹H-NMR (CD₃OD) : δ 0.89 (m, 6H), 1.27 (s, 26H), 1.58 (m, 4H), 4.17 (m, 1H)。

MS (FAB): m/z 395.20 (M + H)⁺。

磷酸 4-十八烷基酯一钠。 (3, 14-HPO₄Na)

¹H-NMR (CD₃OD): δ 0.90 (m, 6H), 1.28 (s, 26H), 1.56 (m, 4H), 4.14 (m, 1H)。

MS (FAB) : m/z 373.29 (M + H)⁺。

磷酸 8-十五烷基酯二钠。 (7, 7-PO₄Na₂)

¹H-NMR (CD₃OD): δ 0.90 (m, 6H), 1.30 (s, 20H), 1.60 (m, 4H), 4.12 (m, 1H)。

MS (FAB): m/z 352.93 (M + H)⁺。

磷酸 8-十五烷基酯一钠。 (7, 7-HPO₄Na)

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) : δ 0.90 (m, 6H), 1.30 (s, 20H), 1.60 (m, 4H), 4.12 (m, 1H).

MS (FAB): m/z 353.05 ($M + \text{Na}$)⁺.

实施例 2: 磷酸 2-(2'-丙基十四酰氧基)乙酯的合成

通过实施例 1 中如上所述相同的方法制备该化合物, 使用醇: $\text{C}_3\text{H}_7-\text{C}(\text{C}_{12}\text{H}_{25})\text{H}-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ 。从 2-丙基戊酸的氯化酸酐和乙二醇获得该醇 (Vogel's, "Textbook of practical organic chemistry", Wiley, New York, pg. 698, (1996))。

磷酸 2-(2'-丙基十四酰氧基)乙酯二钠. (3, 12-MEG- PO_4Na_2)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ 0.87 (m, 6H), 1.24 (s, 22H), 1.54 (m, 4H), 2.33 (m, 1H).

3.87 (m, 2H), 4.26 (m, 2H). MS (FAB): m/z 439.19 ($M + \text{H}$)⁺.

磷酸 2-(2'-丙基十四酰氧基)乙酯一钠. (3, 12-MEG- HPO_4Na)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ 0.87 (t, 6H), 1.24 (s, 20H), 1.42 (m, 2H), 1.56 (m, 2H), 2.34 (m, 1H). 4.02 (m, 2H), 4.28 (m, 2H). MS (FAB) : m/z 417.19 ($M + \text{H}$)⁺.

实施例 3 : 磷酸 2-[2'-(2''-丙基十四酰氧基)-乙氧基]乙酯的合成

通过实施例 1 中如上所述相同的方法制备该化合物, 使用醇: $\text{C}_3\text{H}_7-\text{C}(\text{C}_{12}\text{H}_{25})\text{H}-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ 。从 2-丙基戊酸的氯化酸酐和二乙二醇获得该醇 (Vogel's, "Textbook of practical organic chemistry", Wiley, New York, pg. 698, (1996))。

磷酸 2-[2'-(2''-丙基十四酰氧基)-乙氧基]乙酯二钠. (3, 12-DEG- PO_4Na_2)

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): δ 0.90 (m, 6H), 1.30 (s, 20H), 1.44 (m, 2H), 1.59 (m, 2H) 2.39 (m, 1H), 3.72 (m, 4H), 4.09 (m, 2H), 4.24 (m, 2H). MS (FAB): m/z 483.03 ($M + \text{H}$)⁺.

磷酸 2-[2'-(2''-丙基十四酰氧基)-乙氧基]乙酯一钠. (3, 12-DEG- HPO_4Na)

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): δ 0.90 (m, 6H), 1.30 (s, 20H), 1.44 (m, 2H), 1.59 (m, 2H) 2.39 (m, 1H), 3.72 (m, 4H), 4.09 (m, 2H), 4.24 (m, 2H). MS (FAB): m/z 461.31 ($M + H$) $^+$.

用类似方法制备另外的化合物。例如, 通过使用醇: $\text{C}_3\text{H}_7\text{-C}(\text{C}_{13}\text{H}_{27})\text{H-C(O)-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$ 制备磷酸 2-[2'-(2''-丙基二十酰氧基)-乙氧基]乙酯化合物。从 2-丙基花生酸的氯化酸酐和乙二醇获得该醇。

磷酸 2-[2'-(2''-丙基二十酰氧基)-乙氧基]乙酯一钠。(3,18-DEG- HPO_4Na)

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): δ 0.90 (m, 6H), 1.30 (s, 34H), 1.44 (m, 2H), 1.59 (m, 2H) 2.39 (m, 1H), 3.72 (m, 4H), 4.09 (m, 2H), 4.24 (m, 2H).

MS (FAB): m/z 544.31 ($M + H$) $^+$.

实施例 4: 磷酸 2-[2'-[10''-(十六烷基-4-氧)癸-1-氧基]乙氧基]乙酯一钠盐(3,12-0- C_{10} -DEG- HPO_4Na)的合成

通过实施例 1 中如上所述相同的方法制备该化合物, 使用醇: $\text{C}_3\text{H}_7\text{-C}(\text{C}_{12}\text{H}_{25})\text{H-O-(CH}_2)_{10}\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH-}$ 。用两步方法获得该醇: 首先, 使甲苯磺酸 4-十六烷基酯 (Vogel's, "Textbook of practical organic chemistry", Wiley, New York, pg. 698, (1996)) 与 1,10-癸二酸一钠反应产生 10-(十六烷基-4-氧基)癸醇。第二步, 通过使(第一步产生的)甲苯磺酸 10-(十六烷基-4-氧基)癸酯与 2-(2-羟基乙基氧基)乙酸钠反应制备醇 2'-[10''-(十六烷基-4-氧基)癸基-乙基氧基]乙醇。

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): δ 0.90 (m, 6H), 1.30 (s, 38H), 1.44 (m, 2H), 1.59 (m, 2H) 3.15 (m, 1H), 3.37 (m, 4H), 3.45-3.62 (6H), 3.95 (m, 2H).

MS (FAB): m/z 565.45 ($M + H$) $^+$.

实施例 5: 磷酸 2-(4-十六烷氧基)乙氧基乙酯的合成

通过实施例 1 中如上所述相同的方法制备该化合物, 使用醇: $\text{C}_3\text{H}_7\text{-C}(\text{C}_{12}\text{H}_{25})\text{H-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$ 。从 2-(2-羟基乙氧基)乙

酸钠和甲苯磺酸 10-(十六烷基-4-氧基)癸酯获得该醇 (Vogel's, "Textbook of practical organic chemistry", Wiley, New York, pg. 698, (1996)).

4-十六烷磺酰氯

将4-十六醇 (12.29 g 0.051 mol) 和对甲苯磺酰氯 (12 g 0.063 mol) 溶解于吡啶 (100 ml), 并且在室温下搅拌过夜。加入二氯甲烷 (400 ml)。然后将二氯甲烷溶液用水, H₂SO₄ (3%), 水, NaHCO₃ (3%) 和水充分洗涤, 用无水硫酸镁 (10 g) 干燥。蒸发溶剂之后, 得到 20 g 4-十六烷磺酰氯 粗产物。

2 (4-十六烷氧基) 乙氧基乙磺酰氯

60℃下将钠小块 (3.5 g 0.15 mol) 加给二(乙二醇) (140 ml 1.5 mol)。相同温度下向得到的溶液加入甲苯磺酸 4-十六烷酯 (粗产物 20 g) 的 THF (300 ml) 溶液。溶液在回流下搅拌 6 小时。室温下向混合物加入水 (100 ml)。用乙酸乙酯 (300 ml) 萃取混合物。蒸发溶剂之后, 残余物通过柱色谱法纯化 (石油醚 (bp 30-60℃): 乙醚, 1:1)。得到 4 g 2 (4-十六烷氧基) 乙氧基乙磺酰氯。从 4-十六醇开始的产率是 24%。

磷酸 2 (4-十六烷氧基) 乙氧基乙酯二钠 (3, 12-醚-DEG-PO₂Na₂)

¹H-NMR (CD₃OD): δ 0.9 (m, 6H), 1.28 (s, 22H), 1.43 (m, 4H), 3.30 (m, 1H), 3.60 (m, 4H), 3.69 (m, 2H), 4.07 (m, 2H)。MS (FAB): m/z 455.45 (M + H)⁺。

实施例 6: 2-(2'-丙基十四酰氧基) 乙氧基乙基磷酸胆碱

如下制备式 C₃H₇-C(C₁₂H₂₅)H-C(O)-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-PO⁻(O)-O-CH₂CH₂N⁺(CH₃)₃ 的磷酸胆碱:

2-(2'-丙基十四酰氧基) 乙氧基乙基磷酸胆碱 (3, 12-DEG-PC)

向冷却的 (0℃) 2-(2'-丙基十四酰氧基) 乙氧基乙醇 (15.8 g, 0.044 mol) 和三乙胺 (10 ml, 0.075 mol) 的无水乙醚 (250 ml) 溶液加入 2-氯-2-氧-1, 3, 2-二氧杂 phospholane (7ml, 0.075 mol) 的 200 ml 无水乙醚溶液。将该混合物在室温下搅拌 2 小时。滤出沉淀的晶体 (C₂H₅)₃N·HCl, 并且真空去除溶剂。残余物溶解于 500 ml 三甲胺的无水乙腈溶液 (0.27M) 中, 并且转移至耐压瓶。耐压瓶在 60-65℃

的油浴中保持 48 小时。然后将耐压瓶冷却并且打开。去除溶剂, 残余物通过柱色谱法纯化(CHCl_3 : CH_3OH : H_2O , 1 : 9 : 1)。65℃下将蒸发溶剂之后获得的油状物冻干 72 小时。得到 17.4 g 浅黄色蜡状物。产率 75%。

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) : δ 0.9 (t, 6H), 1.29 (s, 22H), 1.46 (m, 2H), 1.59 (m, 2H), 2.38 (m, 1H), 3.25 (S, 9H), 3.69 (m, 6H), 3.99 (m, 2H), 4.29 (m, 4H)。MS (FAB) : m/z 524.6 ($\text{M} + \text{H}$)⁺。

通过类似于上述的方法合成下面的化合物。

2-(2'-丙基二十酰氧基)乙氧基乙基磷酸胆碱 (3,18-DEG-PC)

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) : δ 0.9 (t, 6H), 1.29 (s, 34H), 1.46 (m, 2H), 1.59 (m, 2H), 2.38 (m, 1H), 3.25 (S, 9H), 3.69 (m, 6H), 3.99 (m, 2H), 4.29 (m, 4H)。MS (FAB) : m/z 608.6 ($\text{M} + \text{H}$)⁺。

2-{2'-10''-(十六烷基-4-氧基)癸-1-氧基}乙氧基}乙基磷酸胆碱 (3,12-O-C₁₀-DEG-PC)

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) : δ 0.9 (t, 6H), 1.29 (s, 34H), 1.46 (m, 2H), 1.59 (m, 2H), 2.38 (m, 1H), 3.25 (S, 9H), 3.69 (m, 6H), 3.99 (m, 2H), 4.29 (m, 4H)。MS (FAB) : m/z 608.6 ($\text{M} + \text{H}$)⁺。

实施例 7: 2-(2'-丙基十四酰氧基)乙基磷酸胆碱的合成

通过上述实施例 6 中相同的方法制备式 $\text{C}_3\text{H}_7\text{-C}(\text{C}_{12}\text{H}_{25})\text{H-C}(\text{O})\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-PO}(\text{O})\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ 的磷酸胆碱, 除了使用相应的醇, 即 2-(2'-丙基十四酰氧基)乙醇代替 2-(2'-丙基十四酰氧基)乙氧基乙醇。

2-(2'-丙基十四酰氧基)乙基磷酸胆碱 (3,12-MEG-PC)

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) : δ 0.9 (t, 6H), 1.29 (s, 22H), 1.46 (m, 2H), 1.59 (m, 2H), 2.39 (m, 1H), 3.24 (S, 9H), 3.66 (m, 2H), 4.07 (m, 2H), 4.28 (m, 4H)。MS (FAB) : m/z 480.7 ($\text{M} + \text{H}$)⁺。

实施例 8: 烷基磷酸胆碱的合成

通过上述实施例 6 中相同的方法制备式 $\text{RO-PO}^-(\text{O})\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ 的磷酸胆碱化合物, 除了在起始步骤中使用 R-OH 作为醇。R 代表 $\text{R}_1\text{-C}(\text{R}_2)\text{H}$ -型支化链烷基。

4-十六烷基磷酸胆碱 (3, 12-PC)

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): δ 0.91 (t, 6H), 1.28 (s, 22H), 1.57 (m, 4H), 3.21 (s, 9H), 3.62 (m, 2H), 4.25 (m, 3H). MS (FAB): m/z 408.68 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

4-十八烷基磷酸胆碱 (3, 14-PC)

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): δ 0.9 (t, 6H), 1.28 (s, 26H), 1.57 (m, 4H), 3.21 (s, 9H), 3.61 (m, 2H), 4.23 (m, 3H). MS (FAB): m/z 436.91 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

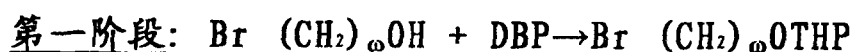
8-十五烷基磷酸胆碱 (7, 7-PC)

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): δ 0.92 (t, 6H), 1.32 (s, 20H), 1.59 (m, 4H), 3.23 (s, 9H), 3.63 (m, 2H), 4.26 (m, 3H). MS (FAB): m/z 394.35 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

实施例 9: ω -支化 P-BFA 的合成

使用相关的 ω -醇通过上述实施例 1 和 6 中相同的方法制备 ω -支化 P-BFA 化合物。

ω -支化 P-BFA 的制备是六阶段合成, 起始试剂是 1-溴- ω -醇和 c 和 n -烷基- m -烷基酮。第一阶段是根据 Kocienski ("Protecting Group"; Georg. Thieme Verlag Stuttgart. N-Y. pg. 83-84 (1994)) 所述方法用二氢吡喃 (DHP) 保护 1-溴- ω -醇的羟基。



I

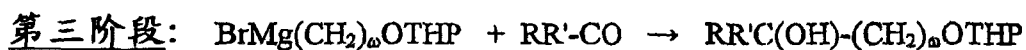
II

THP 表示四氢吡喃醚。

第二阶段和第三阶段是如下叔醇的标准格利雅合成 (Vogel's, "Textbook of practical organic chemistry", Wiley, New York, pgs. 475, 538, (1996))。



III



IV

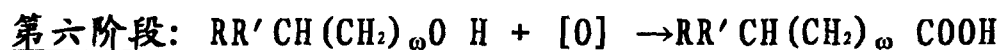
R, R' -代表烷基。

第四阶段是根据 Carey 和 Tremper. (JACS, v. 91, p. 2967, (1969)) 所述方法通过离子氢化反应对化合物 (IV) 的叔羟基的还原作用。



第五阶段是从得到的 ω -支化醇 (V) 裂解保护基团 ("Protecting Group" ; Georg. Thieme Verlag Stuttgart. N-Y. pg.83-84 (1994))。

最后阶段, 第六阶段, 是将 ω -支化醇氧化成相应的 ω -支化 BFA. 这根据 Manger 和 Lee (Tetrahedron letters, v. 22, N. 18, p. 1655, (1981)) 描述的方法进行。



II. 生理化学性质:

实施例 10: DP-BFAs 的体外亲脂性测定

通过比较这些化合物在有机溶液和水溶液中的溶解度估计支化脂肪酸的各种衍生物的亲脂性值。使用辛醇和生理盐水分别作为有机溶液和水溶液。通过摇瓶技术测定分配系数 (Pc) 值, 即辛醇/盐水分布。表 1 给出了结果, 即以 mg/ml 表示的在辛醇和水中的溶解度和计算的 LogP_c。

表 1: 辛醇-盐水分配系数 (Pc)

分子 *	辛醇 mg/ml	水 mg/ml	LogP _c
7,7	>50	>25	1.33
3,12	>20	>10	0.99
3,14	>20	>10	1.26
3,16	>20	9.4	1.26
7,7-PO ₄	>10	>10	<5
3,12- PO ₄	<5	<2.5	1.9
3,14- PO ₄	>10	<0.5	1.11
3,12-MEG-PO ₄	>10	>10	1.09
3,12-DEG-PO ₄	>5	8	1.31
3,12-(醚)-DEG-PO ₄	>5	>5	0.83
3,12-PC	>10	>10	
3,12-MEG-PC	>10	>10	1.22
3,12-DEG-PC	>50	>10	0.73

*支化脂肪酸和它们的 PO₄ 衍生物的钠盐。

实施例 11: 结构-功能相关性

在该项研究中, 评价支化链分子的生理化学性质和它们的生物学作用之间的相关性。研究的目的在于找出支化链分子的链长和它们在大鼠脑 Evans 蓝 (EB) 外渗中的效能之间是否存在相关性 (参见对于测定 EC₅₀ 值中使用的方法的实施例 18)。使用 3, n-型各种支化脂肪酸, 其中一个支化链是 3 个碳原子, 并且第二个烃链, n, 是 7 - 16 个碳原子。图 1 中图示给出结果。

如图 1 所示, 发现 BFAs 3, 12, 3, 14 和 3, 16 在 BBB 的透化作用中是有活性的。在使用的实验条件下, 实验化合物中最有效的化合物是 BFA-3, 12。

III. 生物学实施例:

III-a) 体外研究

实施例 12: 体外毒性比较研究

为了确定它们的毒性，在培养的中国仓鼠卵巢(CHO) AA8 细胞系中筛选各种 DP-BFA 分子。从剂量反应曲线计算引起细胞群 50% 死亡的浓度，即 LC_{50} 值，将磷酸-BFAs 的 LC_{50} 值与相应的支化脂肪酸的相比较 (=碳-BFAs)。

方法

乳酸脱氢酶(LDH)释放被用作细胞膜完整性分析，这样，用于毒性估计。细胞(2×10^5 /ml)接种在含有 10%FCS 的 RPMI-1640 培养基的 96 孔板上。两天之后，以从 500 至 1 微克/毫升递减的浓度向平板加入试验 DP-BFA 化合物或对照化合物十四烷酸。1 小时之后收集细胞。在收集之前 45 分钟，为了证明指示细胞死亡的完全溶解和最大乳酸脱氢酶释放，向前 6 个孔加入 16.5 微升溶胞溶液。其它对照物包括两个空白孔和 5 个含有没有加入药物的细胞的孔。离心之后(1500 rpm, 5 分钟)，使用 45 微升 LDH 测试混合物 (Tox-7 试剂盒, Sigma) 将 75 微升上清液转移给新的平板。室温 10-20 分钟之后，使用 Elisa Reader 490nm 测定吸光率。

表 2 总结了与不同的 DP-BFAs 温育 1 小时之后得到的毒性数据。各个实验都重复进行三次。

表 2: BFAs 和它们的磷酸衍生物对细胞培养物的毒性

检测的化合物	LC_{50} (μ M)
7,7-Na	65
7,7- PO_4Na_2	320
3,12-Na	165
3,12- PO_4Na_2	320
3,12-DEG- PO_4Na_2	320

一般情况下，发现细胞对碳-BFA 更敏感，对试验的磷酸-BFA 衍生物较不敏感。估计温育 1 小时之后对碳-BFA 的亚毒性剂量在 30-100 μ M 之间。在相同的条件下，估计对试验磷酸-BFA 衍生物的亚毒性剂量是 160 μ M 至 640 μ M 以上。

结论: 一般情况下，发现与相应的碳-BFAs 分子相比磷酸-BFAs 毒

性小大约 2 - 5 倍。

实施例 13: DP-BFA 对上皮细胞连接的作用

使用人腺癌细胞系 (A431) 研究各种 BFA 衍生物对细胞-细胞连接的作用。这些细胞具有肠细胞的极化结构特征。

在该项研究中, 监测了与紧密连接复合体相关的蛋白质 ZO₂ 的亚细胞分布的定量变化 (Anderson 等 (1993), Current Opinion in Cell Biology 5 : 772-778) 。

在存在或不存在亚毒性剂量的 DP-BFA 下, 在盖玻片上在含血清的 DMEM 中培养的 A431 细胞被温育 1 小时。用 3% 低聚甲醛和 0.5% Triton-X-100 的混合物固定细胞并且渗透 2 分钟, 然后单独用 3% 低聚甲醛进一步固定 20 分钟。固定的细胞被清洗, 并且在室温下与兔多克隆抗体 ZO₂ (Zymed Laboratories, Inc. USA) 在室温下温育 45 分钟, 用 PBS 冲洗三次, 并且与荧光标记的二抗温育 45 分钟。在显微镜检查之前染色的盖玻片安装在 Elvanol (Mowiol 4-88, Hoechst, 法兰克福, 德国) 中。监测免疫荧光标记的 ZO₂ 蛋白质的分布。

使用与抑制磷酸酪氨酸磷酸酶从而破坏细胞连接的过钒酸盐温育了 1 小时的 A431 细胞作为阳性对照。

ZO₂ 的荧光成像表明 DP-BFA 对破坏 A431 细胞的紧密联接有明确的作用。

实施例 14: DP-BFA 对上皮细胞单层的通透性的作用

该项研究的目的是评价 DP-BFA 化合物在改变上皮细胞单层的通透性的动力学和总的作用, 它作为生物屏障特别是肠屏障的体外模型系统。

为了测定 DP-BFA 生物屏障透过性的作用, 采用两种方法。一种方法是使放射性标记的化合物运送通过上皮细胞单层。第二种方法是监测电阻变化, 作为指示细胞层通透性水平的量度。

在膜过滤器 (0.4 微米, 1 cm²) 上培养上皮细胞。在供者和受者室两个隔室之间放置带有上皮细胞单层的膜。对顶端 (供者) 侧加给预定无毒浓度的试验 P-BFA 化合物, 和 ¹⁴C-蔗糖放射性示踪剂 (1 Ci, 溶于 0.5 ml 缓冲液)。在实验期间以 10 分钟间隔从基底外侧 (受者)

收集每份 0.5 ml 的样品, 收集 90 分钟。在 70 rpm 摇动的同时在含有 1% FCS 的组织培养基中进行温育。在每一个取样时间点将顶室和膜转移到新的接受者室。为了在顶室中保持示踪剂浓度不变和两个室中液体体积不变而进行。使用 Trilux microbeta 计数器 (Wallac, Finland) 估计收集的样品中放射性示踪剂的浓度。计算示踪剂运送速率并且表示为通透性系数。

在温育开始和结束时通过使用 millicell-ERC (Millipore) 测定反式-上皮电阻 (TEER) 监测实验中使用的上皮单层的完整性。

使用和上述相同的实验体系进行一套平行的实验, 但是没有加入放射性示踪剂。每 10 分钟监测一次反式-上皮电阻 (TEER), 监测 90 分钟。

结论: i) P-BFAs 显著加强蔗糖通过通过上皮细胞单层, 和 ii) 降低单层的 TEER, 这两个事实支持这样的结论, 即 P-BFA 化合物透过生物屏障。

实施例 15: 各种 DP-BFAs 对正常的和恶性的细胞类型的细胞毒活性

在包括正常的和恶性的细胞类型的细胞培养物中体外测定支化链脂肪酸 (DP-BFAs) 的各种磷酸衍生物的细胞毒活性。使用下面的细胞系:

原代成纤维细胞 (人)

正常骨髓 (BM) 细胞 (小鼠)

原代支气管上皮细胞 (人, 来自 Clonetics, cat. no. CC-2541)

Caco-2-结肠癌细胞系 (人, ATCC, HTB-37)

C6 神经胶质瘤细胞系 (大鼠, ATCC, CRL-2199)

神经 2a-成神经细胞瘤细胞系 (小鼠, ATCC, CCL-131)

SKBR-3-乳腺癌细胞系 (人, ATCC, HTB-30)

HL60-骨髓白血病细胞系 (人, ATCC, CCL-240)

U937-骨髓白血病细胞系 (人)

在 37°C 下在微量滴定板中含有 2mM L-谷氨酰胺, 100 单位/毫升青霉素, 100 微克/毫升链霉素和 10% FCS 的 MEM 中接种细胞。如所指明的在不存在 (对照组) 或存在各种 DP-BFAs 的条件下在线性生长

期温育培养的细胞。试验的 DP-BFA 的最终浓度范围是 1.5 - 200 微摩尔。温育期结束时,即对于骨髓细胞是 5 天,对于所有的其它细胞系是 3 天,通过利用比色 MTT 分析法估计加入的 P-BFA 对细胞的细胞毒素作用。MTT 分析法 (Mosmann (1983) J. Immunol Methods 65: 55-63) 测定线粒体还原酶活性并且用于定量测定细胞存活率。与对照组相比较引起细胞存活率降低 50% 的药物浓度定义为 EC_{50} 。从对不同的分析的细胞系建立的剂量反应曲线计算试验 DP-BFA 化合物的 EC_{50} 值。表 3 总结了结果。各个 EC_{50} 值是来自 1-5 个独立的实验的 EC_{50} 值的平均值。

从表 3 的结果可以看出,各种 DP-BFAs 分子对不同细胞的细胞毒素作用活性程度不同。试验化合物中,对于恶性细胞的最有效的细胞毒性剂是 3,12-DEG- PO_4 , 3,12-(醚)-DEG- PO_4 , 3,12-MEG-PC, 3,12-DEG-PC, 3,18-DEG-PC 和 3,14-PC。这些化合物中的两个,3,12-DEG- PO_4 和 3,12-(醚)-DEG- PO_4 , 发现对正常上皮细胞具有最低的细胞毒活性。另一种化合物,3,12-DEG-PC, 发现对正常的成纤维细胞和正常的骨髓细胞具有最低的细胞毒活性。

表 3: DP-BFAs 对各种细胞系的毒性

细胞系	Caco-2	C6 神经胶质瘤	Neuro2a	SKBR	HL60	U937	正常的原代成纤维细胞	正常骨髓细胞	正常原代上皮细胞
化合物	EC ₅₀ (μM)								
3,12-Na	100		76	130		68			
3,12- PO ₄ -Na ₂	>200		105	>200		90			
3,12-MEG-PO ₄ Na ₂	>200		60	>200		75			
3,12-DEG-PO ₄ Na ₂	40	38	58	60		25	65	62	>200
3,12-(醚)-DEG-PO ₄ Na ₂	47	40	37	58		10	65	68	>200
3,12-PC	150			62	47				
3,12-MEG-PC	75		70	50	20	9	160	95	94
3,12-DEG-PC	113	95	134	40	11	6	170	166	90
3,18-DEG-PC					13	6		80	60
3,14-PC					7	4		160	72

结论: 磷酸-BFA 化合物 具有经证实的细胞-类型特异性细胞毒作用。当对恶性细胞系试验时, 证明这些化合物中的几个是最有效的细胞毒物质, 而对来自不同的组织的正常细胞试验时, 具有低得多的毒性。这些数据提示这些化合物可能是有效的具有低细胞毒性副作用的抗癌物质。

实施例 16: 3, 12-DEG-PC 诱导成神经细胞瘤细胞系中 caspase-3 的激活和 DNA 片段化

为了进一步弄清各种 DP-BFAs 表现细胞毒作用的可能的机理, 研究了用于细胞凋亡, caspase-3 活性和 DNA 片段化的两个确定的标记 (Lincz (1998) Immunol. Cell Biol. 76: 1-19)。

在 37°C 下含有 2mM L-谷氨酰胺, 100 单位/毫升青霉素, 100 微克/毫升链霉素和 10% FCS 的 MEM 中接种 Neuro2a 成神经细胞瘤细胞 (ATCC, CCL-131)。24 小时之后, 当细胞处于对数生长期时, 加入 3, 12-DEG-PC 达 25 μM, 50μM 或 100μM 终浓度。只有赋形剂存在下培

养的细胞作为对照组。

对与药物分别温育 6 和 24 小时之后获得的细胞溶解产物进行 caspase-3 活性和 DNA 片段化分析。使用荧光团底物 Ac-DEVD-AMC (Pharmingen, Becton Dickinson, cat. no. 66081U) 并且根据生产商说明测定 caspase-3 活性。使用 Cell Death Detection Elisa plus 试剂盒 (Roche, cat. no. 1774 425) 并且根据生产商说明定量测定 DNA-片段化作用。

表 4 总结了结果。测得的 caspase 活性表示为标准化为蛋白质含量的对照平板中活性的百分比。DNA-片段化表示为 $\lambda=405\text{nm}$ 的 OD 值, 并且是重复进行的细胞培养物溶胞产物读数的平均值。

表 4: 用 3,12-DEG-PC 处理过的 Neuro2a 细胞中细胞凋亡标记

加入的药物	Caspase 活性 (%对照)	DNA 片段化 ($OD_{405\text{nm}}$)
无 (对照)	100%	0.030
3,12-DEG-PC, 25 μM	210%	0.036
3,12-DEG-PC, 50 μM	540%	0.153
3,12-DEG-PC, 100 μM	-	0.389

从表 4 中的结果可以看出, Neuro2a 细胞与化合物 3,12-DEG-PC 温育, 引起 caspase-3 活性提高大约 5 倍, 并且 DNA 片段化显著增加。当对来自结肠癌的另一恶性细胞系, caco-2, 测试这种化合物时, 获得相似结果。

结论: 某些恶性细胞中细胞凋亡可能是 BFAs 的磷酸胆碱衍生物发挥细胞毒作用的可能机理。

III-b) 体内研究

实施例 17: 用于测定 DP- BFA 对 BBB 通透性的作用的体内模型系统

通过监测以下两种标记在脑中的积累在大鼠模型系统研究 DP- BFA 对 BBB 的通透作用: a) Evans 蓝染料 (EB), 其体内快速结合白

蛋白 (MW 70 kD) , 并且是细胞旁运输的指标; 和 b) 荧光素钠盐 (F-Na), MW 376 D, 其通过细胞间隙被运输, 并且使得能够监测跨细胞运输。随着 BBB 破坏, Evans 蓝-白蛋白复合体在脑的细胞间间隙中不可逆地积累。可以胞内运输小得多的示踪剂荧光素, 占据脑中细胞间和细胞内间隙。

通过暂短接触 DP-BFA 来诱导 Sprague-Dawley 大鼠中血脑屏障通透作用。用 Rampun-Imalgen 麻醉动物, 并且通过外侧颈动脉逆行对脑施用 DP-BFA 试验化合物 (Smith, Q. R. , 研究方法 (Methods of study) , 于: 血脑屏障的生理学和药理学 (Physiology and Pharmacology of the Blood-Brain Barrier) , Bradbury M. B. 编著, Spinger-Verlag Berlin-Heidelberg-NY; 1992 : 24-52)。连接翼动脉-腭动脉, 以避免输入的溶液流向外头部血管系统。使用 Harvard 器针头泵, 经 30 秒或半小时输入 DP-BFA 溶液。血液流经颈总动脉, 只是在输入时有所间断。

从在水或乙醇中的贮备溶液通过用等渗甘露糖醇 (5%) 的氨基三丁醇缓冲液 (Sigma) 或 PBS (pH 7. 4) 溶液稀释 200-1000 倍, 来制备所有的试验 DP-BFA 分子。在施用试验 DP-BFA 之后立即, 或者如果研究作用的可逆性的话, 在施用试验 DP-BFA 之后特定时间间隔之后, 静脉内注射标记, Evans 蓝 (EB, 25 mg/ml) 和荧光素 (F-Na, 12.5 mg/ml) 1 毫升溶液。完成 8 分钟 F-Na (12.5 mg/ml 至 100 微升/分钟) 静脉内输入。颈动脉内 "闪光" 之后用盐水 (60 ml) 清洗脑 10 分钟。脑同侧和对侧大脑半球和肿瘤, 在合适的情况下, 分别用 50% 三氯乙酸 (TCA) 匀化。在合适的情况下, 分光荧光法测定皮层和肿瘤中标记物浓度 (Uyama, O. 等, (1988) J. Cereb. Blood Flow Metab 8, 282-284 : Abraham 等, (1996) 神经科学快报 (Neurosci. Lett.) 208, 85-88)。以每克脑组织标记物的微克数计算标记物含有。使用标准误差和 Student's 统计学意义检验。

实施例 18: 各种链长的支化链脂肪酸对 BBB 通透性的作用

在该项研究的第一阶段, 对不同链长的 BFA 分子筛选它们在透过血脑屏障 (BBB) 中的作用。

对体重 250-320g 的雄性 Sprague-Dawley 大鼠进行实验。下面是

上面实施例 17 中描述的方法。

通过两个参数评价试验化合物对开放 BBB 的作用：

a) 效力-就 Evans Blue 白蛋白积累(微克 EB/克脑组织)估计 BBB 开放程度；和

b) 效能-以 EC_{50} 和最小有效浓度 (MEC) 值测定。 EC_{50} 是产生 Evans Blue 外渗最大作用的 50% 的试验化合物的浓度。 MEC 定义为使得积累量是对照动物中积累的 Evans blue 量的三倍的浓度，在我们这个情况下，总计是 3 微克 EB/ 克脑组织。 EC_{50} 和 MEC 值越低，试验化合物的效能越高。

表 5 给出了不同的 DP-BFAs 对 BBB 通透性作用的评价结果。

表 5: 支化链脂肪酸对 BBB 通透性的作用

分子	EC_{50} (μ M)	MEC	μ g EB/g 脑组织 (在 EC_{50})
3,7-Na	>450	-	0.8
3,10-Na	~700	-	0.8
3,12-Na	20 ± 3	6.5 ± 0.7	32 ± 4
3,14-Na	40 ± 5	9.1 ± 1.2	16.5 ± 2.5
3,16-Na	137 ± 17	18 ± 2	34 ± 5
7,7-Na	184 ± 21	132 ± 19	4.2 ± 0.6

从表 5 的结果可以看出，根据 DP-BFA 链长，Evans Blue 外渗程度有相当大的变化。具有最短链长的那些分子在该模型系统中几乎完全无效。具有最高效力的分子是 BFAs 3,12-Na 和 3,16-Na，各自诱导大于 30 微克 EB/克脑组织的积累。在使用的实验体系中，3,12-Na 是最有效的通透剂，在试验化合物中具有最低的 EC_{50} 和 MEC 值。

结论：在使用的实验体系条件下，发现 BFA 3/12-Na 就效能和效力两方面来说是最有效的通透增强物质。因此，更详细地研究了以 BFA-3,12 为基础的 DP-BFA 衍生物。

实施例 19: 不同的 DP-BFAs 对 BBB 通透性的作用

如上文实施例 17 中所述, 在大鼠脑模型系统试验各种 DP-BFAs 对 BBB 通透性的作用。效力, 也就是 BBB 开放水平表示为脑髓中积累的 Evans 蓝的量 (微克 EB/克脑组织)。通过它们的计算的 EC_{50} 和最小有效浓度 (MEC) 值来估计试验分子的效能。

表 6: 不同的 DP-BFAs 对 BBB 通透性的作用 (大鼠脑中)

分子	EC_{50} (μ M)	MEC	μ g EB/g 脑 (在 EC_{50})
3,12- PO_4 - Na_2	55 ± 1	3.3 ± 0.5	20 ± 3
3,14- HPO_4 -Na	67 ± 11	6.2 ± 0.9	10 ± 1
7,7- HPO_4 -Na	150	-	1
3,12-MEG- PO_4Na_2	18 ± 3	11 ± 2	5 ± 1
3,12-DEG- PO_4Na_2	20 ± 2	3.3 ± 0.5	18 ± 3
3,12-(醚)-DEG- PO_4Na_2	54 ± 5	7.3 ± 1.4	26 ± 5.2
3,12-PC	76 ± 14	23 ± 4	10 ± 1
3,12-MEG-PC	19.5 ± 1.5	10 ± 1	15 ± 2
3,12-DEG-PC	70 ± 12	15 ± 2	14 ± 2
甘露糖醇	25%	-	10 ± 2

从表 6 可以看出, 各种 DP-BFAs 分子促进与 Evans 蓝示踪剂结合的白蛋白穿过 BBB。试验化合物的效能和效力不同。

在这种实验条件下, 最有效的 3,12-BFA 的衍生物是 3,12-DEG- PO_4Na_2 , 具有 20μ M 的 ED_{50} 值和 3.3μ M 的最小有效浓度 (MEC)。在提高 BBB 通透性方面最有效的化合物是 3,12-(醚)-DEG- PO_4Na_2 , 3,12- PO_4Na_2 和 3,12-DEG- PO_4Na_2 。用 ED_{50} 浓度的 3,12-(醚)-DEG- PO_4Na_2 , 3,12- PO_4Na_2 和 3,12-DEG- PO_4Na_2 处理之后大鼠脑中 Evans 蓝染料的积累水平分别是 26, 20 和 18 微克 EB/克脑组织。

实施例 20: DP-BFA 对 Evans 蓝结合的白蛋白和荧光素运送通过

过 BBB 的作用

在正常大鼠脑模型系统中检查各种 DP-BFAs 对 BBB 对不同大小的分子的通透性的作用。

运送的两个标记物如下: a) 与白蛋白结合的 Evans 蓝 (MW 70 kD) 作为细胞旁运送的指标; 和 b) 荧光素钠盐 (MW 376 D) 代表小分子。

根据上文实施例 17 描述的方法经 30 秒对颈外动脉输入 Evans 蓝染料 (EB) 和荧光素钠盐 (F-Na)。以它们的 EC_{50} 浓度使用试验化合物。用赋形剂溶液处理对照动物。

Evans 蓝外渗作用表示为每克脑组织积累的 EB 总量百分比。荧光素运送到脑中, 这取决于该分子的血清浓度, 表示为血清中 F-Na 水平百分比。

计算脑中积累的 F-Na 与 EB 的比例, 并且在表 7 中给出结果。

表 7: 不同的 DP-BFAs 对 BBB 对 EB-白蛋白和对荧光素的通透性的作用

分子	% F-Na/ 克脑组织	% EB/ 克脑组织	比例 * F-Na / EB
对照	0.3 ± 0.08	0.04 ± 0.01	9.5 ± 1.6
甘露糖醇 - 25%	2.4 ± 0.4	0.6 ± 0.21	4.0 ± 0.5
3,14-Na	3.8 ± 0.5	0.8 ± 0.07	4.7 ± 1.7
3,12-Na	6.4 ± 1.1	1.8 ± 0.2	4.9 ± 0.9
3,12-PO ₄ -Na ₂	8.2 ± 0.9	2.9 ± 0.6	5.9 ± 1.0
3,12-MEG-PO ₄ -Na ₂	5.0 ± 0.8	0.8 ± 0.1	8.4 ± 0.9
3,12-DEG-PO ₄ -Na ₂	9.0 ± 1.4	1.4 ± 0.2	9.0 ± 1.2
3,12-(醚)-DEG-PO ₄ Na ₂	4.4 ± 0.9	4 ± 0.8	1.1 ± 0.2
3,12-PC	3.0 ± 0.5	0.8 ± 0.1	7.8 ± 1.3
3,12-MEG-PC	5.2 ± 0.8	0.9 ± 0.2	6.9 ± 0.1
3,12-DEG-PC	2.9 ± 0.5	0.6 ± 0.1	6.8 ± 0.8

*--各比例的平均值

从表 7 可以看出, 正常 BBB (= 对照) 比 EB-白蛋白复合体对荧光素的通透性高大约 10 倍。高渗透剂, 甘露糖醇, 将 BBB 对 EB 的通透性提高至比 F-Na (F-Na/EB 之比等于 4) 更大的程度。类似地, 试验支化脂肪酸 3, 14-Na 和 3, 12-Na 分别表现出 F-Na/EB 之比是 4.7 和 4.9。

BFA 的不同的磷酸衍生物以不同的方式影响对两种标记物的 BBB 通透性。发现 3, 12- PO_4 将 BBB 对 EB-白蛋白复合体的通透性提高大约 1.5 倍, 大于对荧光素通透性的提高。另一方面, 发现 3, 12-DEG- PO_4 以更加生理学的方式提高 BBB 的通透性, 即将 F-Na 运送提高到和 EB 外渗相同的程度。接触 3, 12-DEG- PO_4 的大鼠大脑中 F-Na/EB 之比是 9 左右。

结论: 不同的 DP-BFA 化合物以不同方式影响 BBB 通透性。一些 DP-BFAs, 例如 3, 12-(醚)-DEG- PO_4Na_2 和 3, 12- PO_4 (F-Na/EB 之比分别是 1.1 和 5.9) 诱导 BBB 选择性开放, 与具有低分子量的分子相比, 有利于大分子运送。相反, 其它分子, 例如 3, 12-DEG- PO_4 , 同样提高小分子例如 F-Na 和较大分子例如 EB-白蛋白的运输。

实施例 21: DP-BFA 对 BBB 开放的作用的延续时间

施用 DP-BFA 之后在不同的时间点检查 DP-BFA 对大鼠脑组织中 Evans Blue 和荧光素外渗的作用。

根据上文实施例 17 描述的方法经 30 秒对 Sprague Dawley 大鼠的颈外动脉输入各种 DP-BFA 化合物。以它们的 EC_{50} 浓度施用试验化合物。施用 DP-BFA 之后 10, 30, 60, 120 和 240 分钟测定脑组织中 Evans Blue 和荧光素的外渗作用。使用每个时间点 2-3 只动物的平均值计算大鼠脑组织中 Evans Blue (微克/克) 和荧光素(血清的%)含量。

上述实验系统中获得的结果证明 DP-BFA 对 BBB 通透性的作用是可逆的。此外, 提出 DP-BFA 的 BBB 开放作用有相对短的寿命。大多数 DP-BFA-3, 12 的试验衍生物保持 BBB 通透性短于 1 小时, 具有 30 分钟左右的 $\text{D}_{1/2}$ 。 $\text{D}_{1/2}$ 定义为使用 EC_{50} 浓度的试验化合物至少 50% 开放 BBB 的持续时间。两种化合物, 3, 12-PC 和 3, 12-MEG-PC, 两者都包括磷酸胆碱部分, 被证明 $\text{D}_{1/2}$ 比其它试验 3, 12-BFA 衍生物长 4 倍, 即 $\text{D}_{1/2}$ 是 120 分钟左右。

结论：证明 DP-BFA 以可逆方式影响大鼠脑组织中 BBB 开放。不同 DP-BFA 具有不同的通透作用持续时间。

实施例 22: 毒理学和安全性研究

对 DP-BFA 分子评价安全性和毒性。根据上文实施例 17 中所述方法对大鼠动脉内 (i. a.) 施用递增剂量的试验化合物。24 小时监测动物成活率来评价致死浓度 (LC)。LC 定义为引起死亡的最小浓度。

表 8: 不同的 DP-BFAs 安全性数据比较 (大鼠)

分子 *	LC (μM)	MEC	安全性 LC / MEC
3,12	40 \pm 10	6.5 \pm 0.7	6.1
3,14	78 \pm 11	9.1 \pm 1.2	8.6
3,16	431 \pm 55	18 \pm 2	23.9
7,7	360 \pm 67	132 \pm 19	2.7
3,12-PO ₄	63 \pm 12	3.3 \pm 0.5	19.1
3,14-PO ₄	134 \pm 18	6.2 \pm 0.9	21.6
3,12-MEG-PO ₄	80 \pm 15	11 \pm 2	7.5
3,12-DEG-PO ₄	30 \pm 5	3.0 \pm 0.5	10
3,12-PC	80 \pm 16	23 \pm 4	3.5
3,12-MEG-PC	15 \pm 2	10 \pm 1	1.5
3,12-DEG-PC	300 \pm 60	15 \pm 2	20

* 钠盐

安全系数定义为致死剂量 (LC) 和最小有效浓度 (MEC) 之间的比例, 其中 MEC 相应于激发三倍于只用赋形剂处理的对照动物积累的 Evans 蓝的量的试验化合物的计算浓度, 即总共积累 3 微克 EB。LC/MEC 之比越高, 安全系数越高。

结论: 加入磷酸基团将安全系数提高 2-3 倍而不显著妨碍效能。

实施例 23: 用于测定 DP-BFA 对 BTB 通透作用的作用的体内模型 (携带肿瘤的大鼠)

为了研究 DP-BFA 化合物调制血肿瘤屏障 (BTB) 的能力, 使用携带 C6 神经胶质瘤大鼠模型系统。

根据 Bartus 等 (Exp Neurol (1996); 142: 1428) 所述方法用 C6 神经胶质肉瘤接种 Sprague Dawley (SD) 大鼠。在固定在立体定位设备中的大鼠的额头皮骨上钻一个小钻孔。使用 Hamilton 注射器, 对额皮层接种 10 微升或 5 微升的含有 2.5×10^5 C6 神经胶质肉瘤的培养基。坐标是囱后 1mm, 2.5 mm 宽, 并且 3 mm 深。针头在这里停留 5 分钟。取出针头之后, 缝合头皮缠上绷带。接种之后 6-8 天检查大鼠, 此时肿瘤长到足够大小 (20-60 mg)。

F-Na 造影术和解剖之后将肿瘤称重。对大鼠脑组织部分进行组织学检查并且监测同侧肿瘤组织, 肿瘤周组织和对侧组织的 Evans 蓝和荧光素摄入。

对对照的携带肿瘤的大鼠 (没有用本发明的化合物处理过) 进行的实验获得的结果 (没有给出) 证明血肿瘤屏障 (BTB) 对 EB 和荧光素的通透性分别比对于完整 BBB 观察到的高大约 2 倍和 4 倍。

实施例 24: 不同 BFAs 分子对 BBB 和 BTB 开放的作用 (对携带肿瘤的大鼠的研究)

使用上面实施例 23 描述的 C6 神经胶质肉瘤大鼠双侧肿瘤模型系统来对 DP-BFA 的各种衍生物筛选与它们对血肿瘤屏障 (BTB) 的作用相比较的它们通过血脑屏障 (BBB) 的能力。根据实施例 23 描述的实验方法, 除了进一步用 DP-BFA 处理携带肿瘤的大鼠。如实施例 17 所述经 30 秒对颈外动脉单侧输入它们 EC_{50} 值左右浓度的试验化合物。只用赋形剂处理的动物用作对照组。通过测定白蛋白结合的 Evans 蓝染料在肿瘤 (T) 与非肿瘤 (NT) 组织中的积累来定量测定通透作用。

表 9 总结了计算的效力值和特异性指数。特异性指数定义为肿瘤中积累的 EB 水平与非肿瘤脑组织中积累的 EB 水平之间的比例 (T/NT)。

表 9: 各种 DP-BFAs 对 BBB 和 BTB 开放之比较

分子	EC ₅₀ * (μ M)	BTB EB μ g /g 肿瘤	BBB EB μ g /g 非肿瘤 脑组织	特异性 肿瘤/非肿瘤
3,12-Na	22 \pm 4	44 \pm 8	43 \pm 9	1.1 \pm 0.3
3,12-PO ₄	10 \pm 2	14 \pm 6	2.5 \pm 1.5	6.3 \pm 1.3
3,12-MEG-PO ₄	22 \pm 3	25 \pm 3	21 \pm 4	1.2 \pm 0.2
3,12-DEG-PO ₄	7 \pm 2	34 \pm 8	2.0 \pm 0.2	22 \pm 5
3,12-PC	52 \pm 7	17 \pm 2	10 \pm 2	1.8 \pm 0.5
3,12-MEG-PC	20	12	6	2
3,12-DEG-PC	60	11	5	2
甘露糖醇	25%	12 \pm 2	7 \pm 2	2.1 \pm 0.5

*携带肿瘤大鼠的 EC₅₀ 值

从表 9 可以看出, 大多数试验化合物表现出在肿瘤和非肿瘤脑组织中 EB 积累水平相似, 即 T/NT 之比是大约 1 至 2。使用甘露糖醇 (25%), 肿瘤中 EB 积累水平大约是非肿瘤脑组织中 EB 积累水平的两倍。在使用的实验系统中, 化合物, 3,12-DEG-PO₄, 表现出开放肿瘤血液屏障 (BTB) 的高特异性, 因为肿瘤中 EB 积累比非肿瘤组织中 EB 水平高 22 倍 (T/NT 之比 = 22)。

结论: 3,12-DEG-PO₄ 对开放 C6 神经胶质瘤中 BTB 最具有特异性作用。该化合物透过 C6 神经胶质瘤的血肿瘤屏障 (BTB) 程度比通过正常血脑屏障 (BBB) 的大。因此 DP-BFA 衍生物可以用作能特异性且选择性开放 BTB 的物质。

实施例 25: 对携带 SD 肿瘤大鼠单侧施用 DP-BFA

对颈外动脉单侧输入 10 μ M 3,12-DEG-HPO₄Na (图 2A), 40 μ M 3,12-Na BFA (图 2B) 或 25%甘露糖醇 (图 2C) 之后检查 Evans 蓝和荧光素通透进入神经胶质瘤肿瘤。在如实施例 23 所述接种 C6 神经胶质

瘤细胞之后 9 - 12 天对大鼠脑输入相关化合物。

从图 2A 可以清楚地看出对双侧神经胶质瘤大鼠施用 3, 12-DEG- HPO_4 之后 Evans 蓝染色只是在同侧半球肿瘤组织中。另一方面, DP-BFA 的碳相应物, 即 BFA 3, 12, 和高渗物质, 甘露糖醇, 同样透过肿瘤和非肿瘤脑组织。

实施例 26: DP-BFA 对血视网膜屏障 (BRB) 通透性的作用

通过监测荧光标记物, 荧光素钠盐 (F-Na), 从巩膜血管的渗出来研究 DP-BFA 对大鼠血视网膜屏障 (BRB) 的通透作用。

用以 0.1 毫升/100 克体重注射的氯胺酮 (100mg/ml) 和甲苯噻嗪 (2%) 溶液麻醉体重 250 - 350 克的 Sprague-Dawley (SD) 大鼠。对麻醉的动物颈静脉注射 0.25ml F-Na (12.5mg/ml)。用与 c-固定于用于眼科手术的 INAMI L-0960 显微镜连接的 3-CCD 色照相机 (teli CS5850) 记录视网膜血管。显微镜装备有光源和用于 F-Na 检测的合适的滤光器。10 分钟后从视网膜清除 F-Na。此时, 30 秒动脉内注射 1.5ml 的 3, 12-DEG- HPO_4Na (12.5 微克/毫升), 伴随第二次静脉内注射 F-Na。在施用药物之后 $t = 0$ 和 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 和 10 分钟对血管照像。对第二组对照大鼠重复相同的实验, 其中动脉内注射 1.5ml 赋形剂 (Tab-甘露糖醇 5%) 代替 3, 12-DEG- HPO_4Na 。

通过在动物眼后部在视网膜水平监测 F-Na 在血管中的分布, 证明单独施用 F-Na 之后 10 分钟, 所有的荧光染料完全从视网膜血管周围的范围消失。但是, 与动脉内注射 3, 12-DEG- HPO_4Na 联合静脉内注射 F-Na, 导致血管周围在视网膜水平积累 F-Na。在 3, 12-DEG- HPO_4Na 存在下 F-Na 从血管渗出, 是血视网膜屏障通透作用的指征。在对照动物中, 其中只施用赋形剂代替 DP-BFA 药物, 结果类似于单独注射 F-Na 的那些动物, 即给药之后 10 分钟, 血管中或其周围在视网膜水平上检测不到荧光。图 3A-C 中给出的结果代表眼部血管造影术, 即在单独施用 F-Na (图 3A), 或联合施用 3, 12-DEG- HPO_4Na (图 3B) 或赋形剂 (图 3C) 之后 30 秒和 10 分钟记录的视网膜水平照取的眼部血液供应照片。

根据这个发现, 施用 F-Na 之后 10 分钟, 与只注射 F-Na 和赋形剂 (图 4A-B) 的对照动物的玻璃体相比, 对用 3, 12-DEG- HPO_4Na 处理的动物的玻璃体可以检测到更大量的 F-Na。玻璃体中荧光信号的积累是

由于 BRB 通透作用和视网膜水平的 F-Na 从血管的渗出。

结论：3,12-DEG-HPO₄Na 使得能够进行血视网膜屏障的通透作用，并且导致视网膜和玻璃体中 F-Na 积累。

实施例 27: DP-BFA 的抗肿瘤活性

在上文实施例 17 中描述的体内模型系统中研究各种 P-BFAs 的抗肿瘤作用。以预先测定的 BBB 和 BTB 对 Evans 蓝和荧光素外渗的通透作用有效的浓度动脉内施用试验 P-BFAs。和实施例 23 一样的接种肿瘤的实验方法如下。

接种 C6 神经胶质肉瘤细胞之后第 3-4 天，对大鼠外颈动脉插入套管，并且如实施例 17 所述经 30 秒输入试验 P-BFAs，除了在该项实验中不给予标记物。处理过的大鼠维持到第 7-9 天，然后杀死。获得冠状切片，用曙红-苏木紫染色，组织学检查确定肿瘤体积。只用赋形剂处理的动物用作对照。使用标准误差和 Student's 统计学意义检验。表 10 总结了结果。

从表 10 的结果可以看出，P-BFA 化合物体内对神经胶质瘤生长表现出抑制细胞作用。在使用的实验条件下，3,12-DEG-PO₄ 化合物表现出最突出的抗肿瘤作用。其它化合物，例如 3,12-MEG-PC，也证明有显著的抗肿瘤活性，但是程度较低。

结论：对携带 C6 神经胶质瘤的大鼠动脉内施用 P-BFAs 表现出对肿瘤的细胞毒作用。

表 10: 各种 P-BFAs 对肿瘤生长的抗肿瘤作用

分子	P-BFA 浓度 (μM)	肿瘤体积 (mm^3) \pm SE	P (与对照)
对照	0	8.1 ± 2.22	-
3,12-MEG-HPO ₄ Na	30	4.2 ± 1.6	>0.1
3,12-PC	50	3.8 ± 0.8	>0.1
3,12-MEG-PC	10	2.88 ± 0.6	<0.05*
3,12-DEG-PC	60	3.9 ± 1.0	>0.1
3,12-DEG-HPO ₄ Na	5	1.5 ± 0.3	<0.01*
3,12-DEG-PO ₄ Na ₂	30	1.6 ± 0.4	<0.01*

SE-平均值的标准误,

*-统计学差异

实施例 28: DP-BFA 的抗肿瘤作用

通过对携带 C6 神经胶质瘤的大鼠模型系统检测肿瘤体积和外观来评价 DP-BFA 的抗肿瘤作用。如下用 5 微升 PBS 中 2.5×10^5 个 C6 神经胶质瘤细胞接种 Sprague Dawley (SD) 大鼠。以放平头颅方式将大鼠固定在立体定位头部支架上。骨膜反射作用之后,按以下坐标用 1mm 钻头进行钻孔:前囟-1.0,左侧中线外侧 3.50mm,深 3.50mm。使用 10 微升 Hamilton 针管以 3.50mm 深度用手注射细胞悬浮液。以 3 ml/min 的速度对颈外动脉输入范围是 5 - 20 μM 的 3,12-二-乙二醇磷酸酯 (3,12-DEG-PO₄; 钠盐) 或赋形剂(等渗缓冲液, pH=7.4) 的单一剂量 30 秒接种后 72 小时处理携带肿瘤的大鼠。扎紧翼-腭动脉,在输液的同时夹紧颈总动脉。

C6 肿瘤细胞接种之后 5 天,用 0.1 毫升/100 克体重的氯胺酮 / 甲苯噻嗪 (1: 1) 麻醉大鼠,灌注盐水并且用 4% 甲醛溶液固定。取出脑组织并且在蔗糖溶液中低温保护 48 小时。然后在冠状切片中切碎脑组织,用苏木紫-曙红染色并且进行病理检查。

与没有处理的动物相比较，对处理过的动物观察到肿瘤体积的显著减小。赋形剂处理的动物肿瘤体积是 $8.1 \pm 2.2 \text{ mm}^3$ (N=7)，用 3,12-DEG-PO₄ 处理的动物是 $1.6 \pm 0.2 \text{ mm}^3$ (N=12)。另外，肿瘤生长的微环境和性质不同。赋形剂处理的携带肿瘤的大鼠表现出皮层、白质和脑膜中显著的局部的细胞膨胀。C6 神经胶质瘤表现出不规则的和高度的不可渗透性，并且表现出侵入血管周淋巴管间隙的较大倾向。相反，用 DP-BFA 处理，仅仅在细胞接种后第 3 天给予一次，就显著改变了肿瘤生长特征。C6 神经胶质瘤通过血管周间隙侵入被减少，并且观察到具有确定边界的实体肿瘤。在接种区和室管膜下发现对脑膜的有限侵入。

结论：3,12-DEG-PO₄ 表现出作为抑制肿瘤侵入和肿瘤生长速度的有效抗肿瘤作用。因此，DP-BFA 化合物可以用于抑制肿瘤的扩散和侵入。

本领域技术人员明白本发明公开的原理适用很多实施方案和变化或修饰，这些都在本发明范围之内。实施例不是限制性的，下面的权利要求书确定本发明的范围。

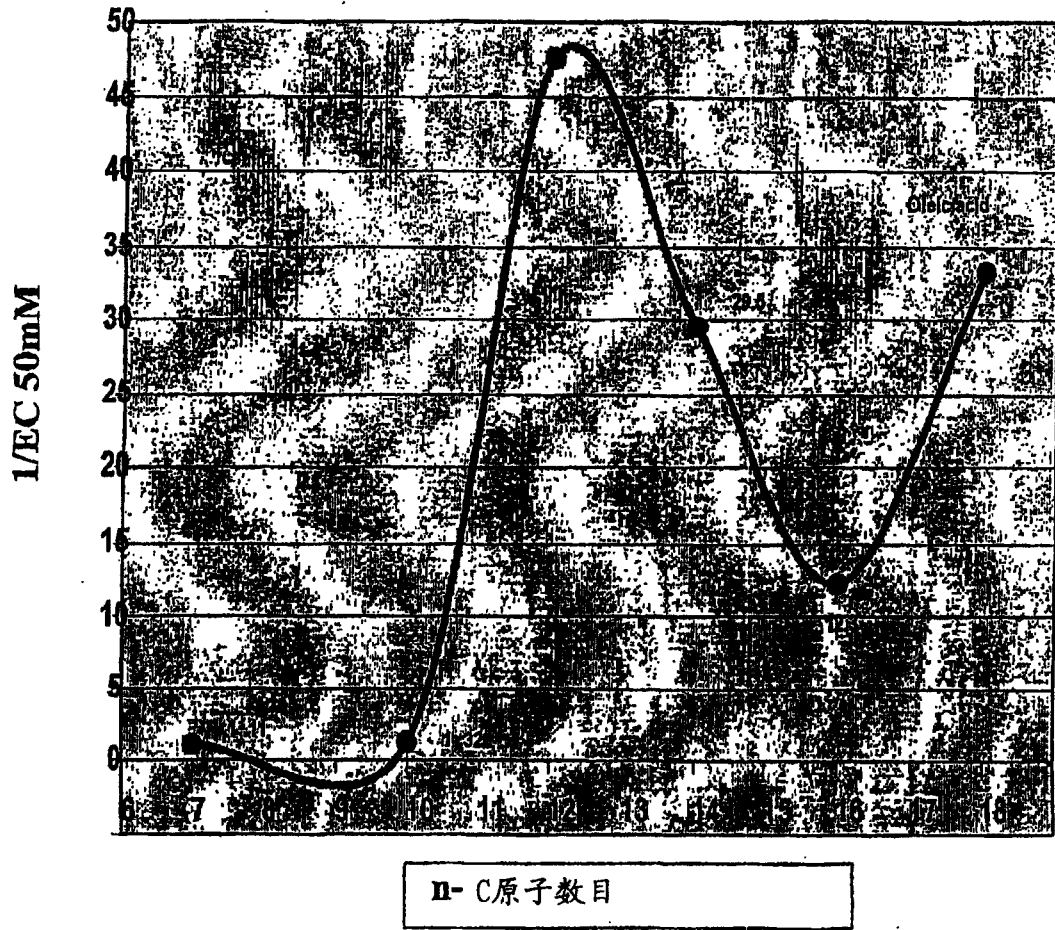


图 1

图 2A

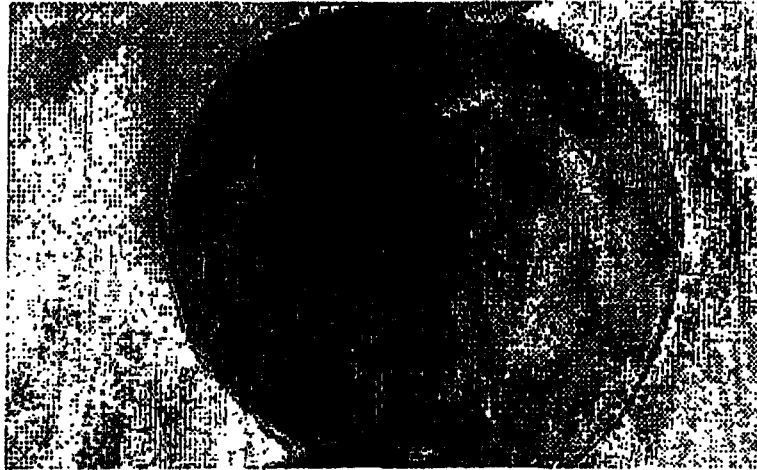


图 2B



图 2C



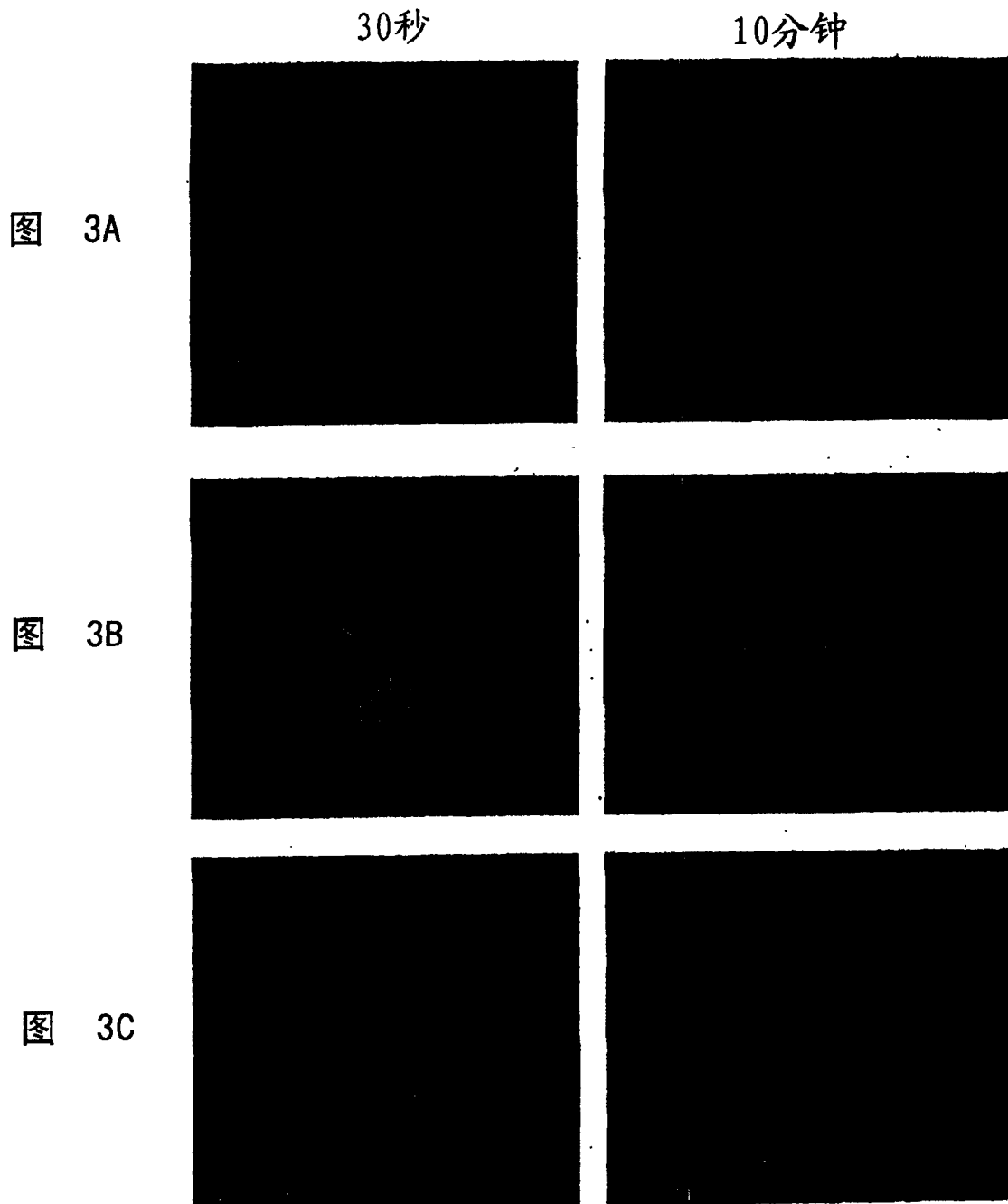


图 4A



图 4B

