

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
A61K 31/34



[12] 发明专利申请公开说明书

A61K 31/215 A61K 31/165

[21] 申请号 01810746. X

[43] 公开日 2003 年 7 月 30 日

[11] 公开号 CN 1433307A

[22] 申请日 2001.5.3 [21] 申请号 01810746. X
[30] 优先权
[32] 2000. 6. 5 [33] US [31] 09/587,458
[86] 国际申请 PCT/US01/14338 2001.5.3
[87] 国际公布 WO01/93862 英 2001.12.13
[85] 进入国家阶段日期 2002.12.5
[71] 申请人 联合治疗公司
地址 美国马里兰
[72] 发明人 罗伯特·肖尔 马蒂纳·罗思布拉特
迈克尔·本特利 赵 宣

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责
任公司
代理人 丁业平 王维玉

权利要求书 7 页 说明书 55 页 附图 5 页

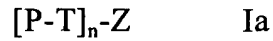
[54] 发明名称 用于治疗充血性心力衰竭的前列腺
素类化合物

[57] 摘要

本发明涉及向温血动物给药治疗充血性心力衰竭的前列腺素及其类似物，其包含连接于至少一个位点的药学可接受且能够减缓活性基团代谢速率的保护基。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 用于治疗充血性心力衰竭的药物组合物，其包含治疗充血性心力衰竭有效量的式 Ia 或 Ib 化合物及其药学可接受盐，和药学可接受的载体：



其中 P 是前列腺素类化合物或其类似物，T 表示 P 的活性基团，和

Z 是与 T 键合的减慢该化合物代谢速率的药学可接受基团；
n 是至少 1 的整数。

2. 权利要求 1 的药物组合物，其中 T 选自羧基、羟基、羰基、氧化碳水化合物和巯基。

3. 权利要求 1 的药物组合物，其中 T 是羧基或羟基。

4. 权利要求 1 的药物组合物，其中 Z 是药学可接受聚合物或乙酰基。

5. 权利要求 4 的药物组合物，其中所述药学可接受聚合物选自聚醚、葡聚糖、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酰胺、聚乙烯醇和含碳水化合物聚合物。

6. 权利要求 5 的药物组合物，其中所述药学可接受聚合物选自聚醚类化合物。

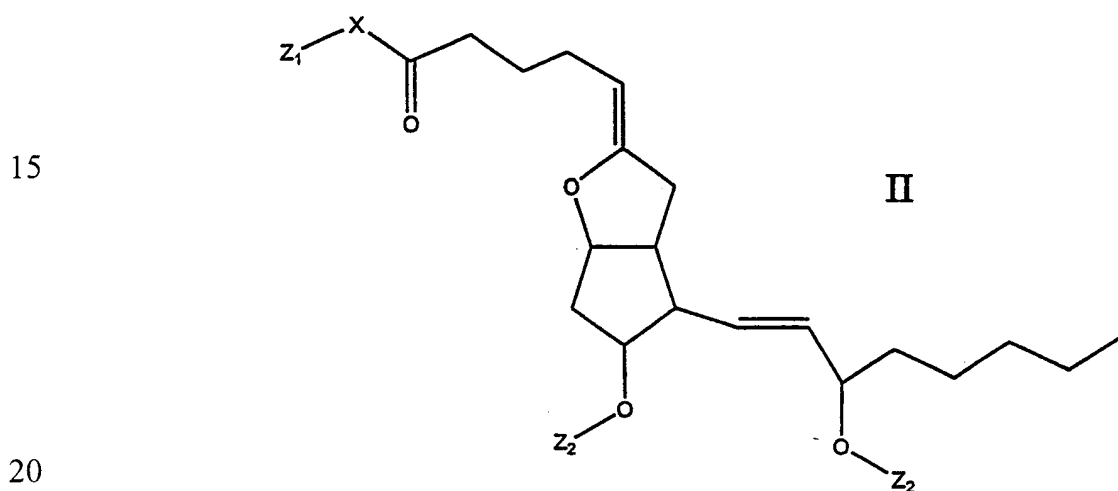
7. 权利要求 6 的药物组合物，其中所述聚醚选自聚乙二醇类化合物。

8. 权利要求 7 的药物组合物, 其中所述聚乙二醇类化合物的分子量是约 200 至 80,000。

9. 权利要求 7 的药物组合物, 其中所述聚乙二醇类化合物的分子量是约 2,000 至 42,000。

10. 权利要求 9 的药物组合物, 其中所述聚乙二醇类化合物的分子量是约 5,000 至 25,000。

11. 权利要求 1 的药物组合物, 其中所述化合物具有式 II 所示的结构:



其中 Z₁ 和 Z₂ 分别独立地选自氢、药学可接受聚合物和乙酰基, 条件是 Z₁ 和 Z₂ 中的至少一个不是氢, 且 X 选自 O 和 NH。

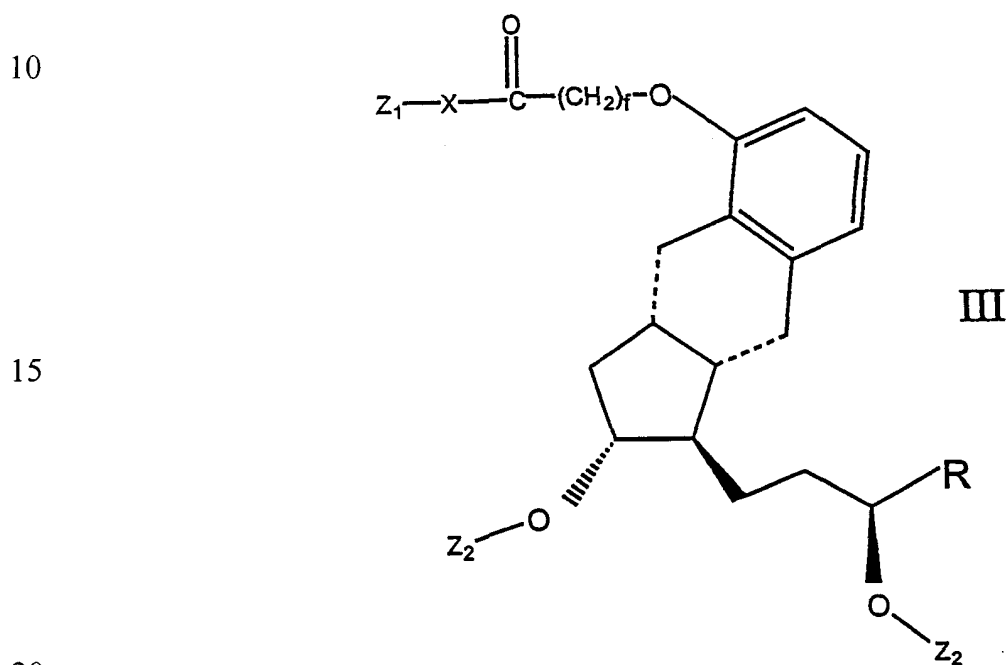
12. 权利要求 11 的药物组合物, 由第 1 组的化合物选出, 其中 Z₁ 是药学可接受聚合物, X 选自 O 和 NH, 并且各 Z₂ 独立地选自氢和乙酰基。

13. 权利要求 11 的药物组合物, 由第 2 组的化合物选出, 其中 Z₁ 为氢, X 选自 O, 且至少一个 Z₂ 是经酯基与氧原子连接的药学可接受

聚合物。

14. 权利要求 11 的药物组合物，由第 3 组的化合物选出，其中 Z_1 为药学可接受聚合物，X 选自 O 和 NH，并且至少一个 Z_2 是经酯基与氧原子连接的药学可接受聚合物。

15. 权利要求 1 的药物组合物，其中所述化合物具有式 III 所示的结构：



其中 Z_1 和 Z_2 分别独立地选自氢、药学可接受聚合物和乙酰基；

f 是 1 至 3 的整数；

X 选自 O 和 NH；和

R 选自氢和烷基。

16. 权利要求 15 的药物组合物，其中 R 是具有 1-6 个碳原子的烷基。

17. 权利要求 15 的药物组合物，由第 4 组的化合物选出，其中 Z_1 是药学可接受聚合物，X 选自 O 和 NH，并且各 Z_2 独立地选自氢和乙

酰基。

18. 权利要求 15 的药物组合物，由第 5 组的化合物选出，其中 Z_1 是氢，X 为 O，并且各 Z_2 是乙酰基或经酯基或醚基与氧原子连接的药
5 学可接受聚合物。

19. 权利要求 15 的药物组合物，由第 6 组的化合物选出，其中 Z_1 是药
10 学可接受聚合物，X 选自 O 和 NH，并且各 Z_2 是经酯基或醚基与氧原子连接的药
学可接受聚合物。

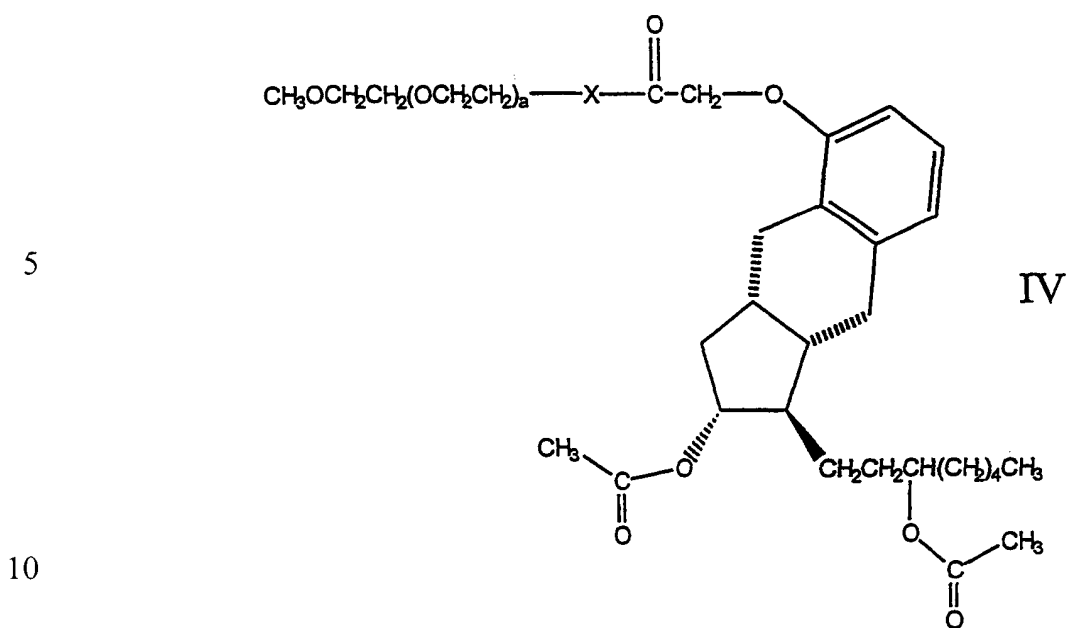
20. 权利要求 11 的药物组合物，其中所述药
15 学可接受聚合物是分子量为约 200 至 80,000 的聚乙二醇。

21. 权利要求 20 的药物组合物，其中所述聚乙二醇的分子量是
15 约 2,000 至 42,000。

22. 权利要求 15 的药物组合物，其中所述药
20 学可接受聚合物是分子量为约 200 至 80,000 的聚乙二醇。

23. 权利要求 22 的药物组合物，其中所述聚乙二醇的分子量是
20 约 2,000 至 42,000。

24. 权利要求 15 的药物组合物，其中所述化合物具有式 IV 所示
25 的结构：



其中 a 是约 6 至 600。

25. 权利要求 15 的药物组合物，其中 Z_1 是以甲基为末端的分子量约 5,000 的聚乙二醇，X 是 NH，且各 Z_2 为氢。

26. 权利要求 15 的药物组合物，其中 Z_1 是以甲基为末端的分子量约 5,000 的聚乙二醇，X 为 O，且各 Z_2 为乙酰基。

27. 权利要求 15 的药物组合物，其中 Z_1 是氢且各 Z_2 是以甲基为末端的分子量约 20,000 的聚乙二醇，该聚乙二醇通过 $-O-(CH_2)_2-CO-$ 与氧原子连接。

28. 权利要求 15 的药物组合物，其中 Z_1 是氢且各 Z_2 是乙酰基。

29. 权利要求 15 的药物组合物，其中 Z_1 是以甲基为末端的分子量约 20,000 的聚乙二醇，X 为 O，且各 Z_2 是乙酰基。

30. 权利要求 15 的药物组合物，其中 Z_1 是以甲基为末端的分子量约 20,000 的聚乙二醇，X 为 NH，且各 Z_2 为氢。

31. 权利要求 15 的药物组合物，其中 Z_1 是以甲基为末端的分子量约 20,000 的聚乙二醇，X 为 NH，且各 Z_2 是乙酰基。

5 32. 权利要求 15 的药物组合物，其中 Z_1 是以甲基为末端的分子量约 5,000 的聚乙二醇，X 为 NH，且各 Z_2 是乙酰基。

33. 权利要求 15 的药物组合物，其中 Z_1 是以甲基为末端的分子量约 350 的聚乙二醇，X 为 NH，且各 Z_2 是乙酰基。

10

34. 权利要求 15 的药物组合物，其中 Z_1 是以甲基为末端的分子量约 350 的聚乙二醇，X 为 O，且各 Z_2 是乙酰基。

15 35. 治疗充血性心力衰竭的方法，包括给温血动物施用如权利要求 1 所述的药物组合物。

36. 权利要求 35 的方法，包括将所述药物组合物以足以提供约 0.5 至 100mg/kg/天的量施用给所述温血动物。

20 37. 权利要求 35 的方法，其中 T 选自羧基、羟基、羰基、氧化碳水化合物和巯基。

38. 权利要求 35 的方法，其中 T 是羧基或羟基。

25 39. 权利要求 35 的方法，其中 Z 是药学可接受聚合物或乙酰基。

40. 权利要求 39 的方法，其中所述药学可接受聚合物选自聚醚、葡聚糖、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酰胺、聚乙烯醇和含碳水化合物聚合物。

30

41. 权利要求 40 的方法，其中所述药学可接受聚合物选自聚醚类化合物。

5

42. 权利要求 41 的方法，其中所述聚醚选自聚乙二醇类化合物。

43. 权利要求 42 的方法，其中所述聚乙二醇类化合物的分子量是 200 至 80,000。

10

44. 权利要求 42 的方法，其中所述聚乙二醇类化合物的分子量是 2,000 至 42,000。

45. 权利要求 45 的方法，其中所述聚乙二醇类化合物的分子量是约 5,000 至 25,000。

15

46. 权利要求 35 的方法，包括将所述药物组合物静脉内给药到所述温血动物。

47. 权利要求 35 的方法，包括将所述药物组合物皮下给药到所述温血动物。

20

48. 权利要求 35 的方法，包括将所述药物组合物通过吸入给药到所述温血动物。

49. 权利要求 35 的方法，包括将所述药物组合物经口服给药到所述温血动物。

25

50. 权利要求 1 的药物组合物，其中 P 是 PGE 型前列腺素。

51. 权利要求 35 的方法，其中 P 是 PGE 型前列腺素。

30

用于治疗充血性心力衰竭的前列腺素类化合物

5 发明领域

本发明涉及修饰的前列腺素类化合物，尤其涉及用于治疗充血性心力衰竭的含长效前列腺素的组合物。

发明背景

10 机体内几乎各种组织都可以产生前列腺素类物质。其它内分泌物或激素都无法像前列腺素类物质那样显示出多种或多变的效应。由于在血液和肺内往往是由酶引起快速降解，所以绝大多数前列腺素类物质的有效寿命仅为 3 至 10 分钟。

15 前列腺素类物质包括前列环素，它是一种由机体产生的前列腺素类似物并且涉及维持血管的正常功能。天然前列环素生来并不稳定，其有效寿命短于约 6 分钟。包括前列环素类在内的前列腺素类物质似乎通过三种途径维护血管正常发挥机能，1)它们扩张血管，在必要时，确保适当的血流；2)它们防止血小板聚集并由此减轻对血管的阻塞；
20 和 3)其参与调节血管周围平滑肌细胞的增殖，否则将收缩血管且进一步阻碍血液流动。前列腺素类物质的这些生理作用已显示出有益于充血性心力衰竭的治疗。

25 不管其病因，充血性心力衰竭的特征在于左心室和/或右心室心肌组织的衰弱以及由此导致难以向全身和/或肺部系统泵血和使血循环。心肌组织衰弱一般与循环和神经体液变化相关，所述变化导致不能向外周组织和器官输送足够的血液和氧气。所产生的变化中的一些包括较高的肺部压和系统压、较低的心脏输出、较高的血管阻力以及外周和肺部水肿。充血性心力衰竭可能还表现为在运力、在休息时的
30 呼吸短促或夜间呼吸困难。如果不进行治疗，充血性心力衰竭可导致

死亡。

前列腺素类物质已知可用于治疗人类充血性心力衰竭，这是由于这些化合物经扩张血管和针对血液的抗血小板作用来阻止和减少不希望

5 5 希望的血管收缩，从而对血流产生积极影响。参见，例如，Olschewski 等：Inhaled iloprost to treat severe pulmonary hypertension, Ann. Intern. Med. 132: 435-43 (2000)；Sueta 等：Safety and efficacy of epoprostenol in patients with severe congestive heart failure, Am. J. Cardiol. 75: 34A-43A (1995)；Kerins 等：Prostacyclin and prostaglandin E1: molecular

10 10 mechanisms and therapeutic utility, Prog. Hemost. Thromb. 10: 307-37 (1991)；Montalescot 等：Prostacyclin (epoprostenol) has a positive inotropic effect in patients with severe heart failure, European Heart Journal 18: 292 (1997)；Pacher 等：Prostaglandin E1 infusion compared with prostacyclin infusion in patient with refractory heart failure: effects

15 15 on hemodynamics and neurohumoral variables, J. Heart Lung Transplant 16: 878-81 (1997)；Patterson 等：Acute hemodynamic effects of the prostacyclin analog 15AU81 in severe congestive heart failure, Am. J. Cardiol. 75: 26A-33A (1995)；和 Prostacyclin: basic principles and clinical application in congestive heart failure and primary pulmonary hypertension.

20 20 Proceeding of a symposium. Bolgna, Italy, 1993 年 11 月 20 日. Am. J. Cardiol. 75: 1A-73A (1995)。但是，一些前列腺素和其类似物，包括前列环素，具有非常短的有效寿命，提供短时间的缓解，需要重复

25 25 给药。因此，任何使用该前列腺素类物质的治疗需要连续和持续给药以为患者提供有效治疗。已有报道暗示，前列腺素类物质短的有效寿命实际可由快速改变血管以帮助血流而对心脏造成压力。迄今，由于

其化学不稳定性、短的有限寿命和有限的有效给药方式，在治疗充血性心力衰竭中，前列腺素类物质和其类似物的应用受到严格限制。

前列腺素类物质的短的有效寿命归因于 a)分子的活性基团在酶的作用

30 30 下迅速失活，和 b)其低分子量使它们易于被清除或排泄到体外。

前列腺素类物质具有一般为羟基或羧基形式的活性位点。酶可以迅速将这些活性基团灭活，由此使化合物失效。为了克服这个问题，一直采用连续输注或频繁给予高剂量的前列腺素类化合物使该化合物在患者中保持在治疗有效水平。然而，这样的给药方案是不利的，因为疗法昂贵，并且意外副作用的可能性相对较高，包括可能的压力增大。一些副作用包括恶心、肿胀、胃肠道不适、颌疼、皮疹和头痛。在某些患者中，严重的副反应致使治疗中断。

多数前列腺素类物质及其类似物如前列环素业已被制备，目的在于发现能够提供较高稳定性、更宽范围的给药方式、更有效的活性和/或较长有效寿命的药学上可接受的试剂。研究人员已经寻找到可以经口服有效给药的前列腺素类物质及其类似物，提供更少介入和更方便的医药治疗。前列腺素类物质及其类似物的现有口服形式一般具有至多 1.5 小时的有效寿命，并且在某些情况中仅为数分钟。短的有效寿命要求患者频繁摄取该药物，致使给药成为患者的难题，尤其对于患有慢性疾病的那些患者。

已有建议说生物活性物质如蛋白质、酶等和聚合物的偶联能够提高活性物质在体内的有效寿命、水溶性和抗原性。譬如，美国专利 No. 4,179,337 公开了将肽或多肽与聚乙二醇(PEG)和类似的水溶性聚醚类化合物偶联，该文献在此引入作为参考。还可以参见，Nucci M., Shorr RGL&Abuchowski A., "Advanced Drug Delivery Reviews", 6 : 133-151 : 1991 ; Harris JM (ed.); 和 "Polyethylene Glycol Chemistry : Biotechnical and Biomedical Application", Plenum Press, NY, 1992。一般通过治疗剂与如数倍摩尔过量的聚合物反应可以制成偶联物，所述聚合物业已改性为含有末端连接基团，该连接基团确保活性物质与聚合物结合。以这种方式修饰的多肽表现出降低了的免疫原性/抗原性，并且趋于在血流中具有比其未修饰形式更长的有效寿命。

为了使聚醚和活性物质偶联，至少一个末端羟基被转化为反应性官能团。这个过程常常被称作“活化”并且产物称作“活化聚醚”。按照类似方法也可以“活化”或“官能化”其它基本上无抗原性的聚合物。

5

活化聚合物与具有亲核性官能团作为连接位点的治疗剂反应。一种常用作连接位点的亲核性官能团是赖氨酸的 ϵ -氨基。游离羧基、适当活化的羰基、氧化的糖基部分和巯基也可以用作连接位点。

10

在聚合物和母体生物活性部分之间可以形成具有可水解键(键合)的生物活性聚合物偶联物，成为前药(其中在体内最终释放出母体分子)。业已公开了数种制备前药的方法。前药包括生物活性母体化合物的化学衍生物，其在给药时最终将活性母体化合物释放在体内。前药是适宜的，因为它们确保了生物活性化合物在体内作用的启动和/或持续时间的改进。前药常常是活性化合物的生物上惰性或基本上失活的形式。活性药物的释放速率受到若干因素的影响，包括连接生物活性化合物和前药载体(如聚合物)的连接基的水解速率。

15

20

虽然前列腺素及其类似物如前列环素有希望作为治疗剂，但需要 a)提高此类化合物的稳定性，b)延长此类化合物的有效寿命，以在患者中提供更有效的连续治疗剂水平，由此尽可能降低心脏压力，和 c)确保此类化合物能够以更加适宜患者而不是目前所采用的给药方案给药。

25

因此，如果可以开发出前列腺素类物质及其类似物和采用它们的组合物，使其具有改进的稳定性，持续时间足以确保以合理次数给药的有效寿命，并具有较小的由治疗剂水平快速变化带来心脏压力的风险，和以更适宜患者而不是现有疗法采用前列腺素及其类似物的方式，那将是药物治疗领域中的显著进步，尤其对于充血性心力衰竭的治疗而言。

30

发明概述

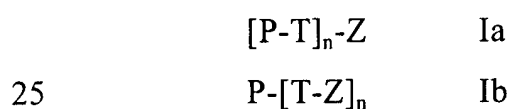
5 本发明广义上涉及新的前列腺素类化合物及其类似物，它们具有适于治疗充血性心力衰竭的活性，包括舒张相关血管和针对血液的抗血小板作用。

10 本发明提供用于治疗充血性心力衰竭的化合物、组合物和所述化合物和组合物的给药方法。本发明的化合物具有提高了的化学稳定性和有效寿命，在温血动物中其改进了所述化合物以药学可接受组合物形式用于治疗充血性心力衰竭的传递。通过修饰已知前列腺素化合物的一个或多个活性位点可以获得改进的稳定性、有效寿命和更可接受的给药方式和剂量方案。

15 因此，本发明的一个方面中，本发明的前列腺素类化合物或其类似物的一个或多个活性位点提供减慢化合物代谢速率的药学可接受基团。代谢速率的减慢使活性化合物的有效寿命增长，其 a)提供更有有效的活性化合物的给药，和 b)确保更适宜患者的给药方案。

20 在本发明的另一方面中，提供一种治疗表现充血性心力衰竭疾病的温血动物的方法，包括给予该动物治疗有效量的本发明的经修饰前列腺素类化合物及其类似物。

本发明的另一方面中，提供具有下式 Ia 或 Ib 的化合物：



其中 P 是前列腺素类化合物或其类似物，T 表示 P 的修饰活性基团，Z 是和 T 键合的减慢该化合物代谢速率的药学可接受基团；和 n 是至少 1 的整数；

30 及其药学可接受盐。

附图简述

图 1 表示一个剂量的 mPEG20kDa-酰胺-化合物 X 对肺动脉压的影响，该化合物是作为静脉内输注施用给静脉内给予肺动脉高压剂诱发的绵羊；

图 2 表示一个剂量的 mPEG20kDa-酯-化合物 X 作为静脉内快速浓注给药对绵羊肺部动脉血压的影响，该绵羊肺动脉高压是由静脉内给予肺动脉高压剂引起；

图 3 是一个剂量的 mPEG20kDa-酯-化合物 X 作为气溶胶给药对绵羊肺部动脉血压的影响，该绵羊肺动脉高压是由静脉内给予肺动脉高压剂引起；

图 4 表示一个剂量的 mPEG20kDa-酯-化合物 X 作为静脉内快速浓注给药对绵羊肺部动脉血压的影响，该绵羊肺动脉高压是由静脉内给予肺动脉高压剂引起；和

图 5 表示 mPEG5kDa-酯-化合物 X 和天然化合物 X 以气溶胶的形式给药对各绵羊的肺部动脉血压的影响，绵羊的肺动脉高压是由静脉内给予肺动脉高压剂引起。

发明详述

本发明涉及新的前列腺素类化合物及其类似物，其中至少一个活性位点连接在惰性、无抗原性、无免疫原性的基团上，该基团具有当对温血动物(包括人)给药时保护该活性位点的结构，由此使该化合物具有较长的有效寿命。因此，更多的化合物可用于在更长的时间内通过处理维护心脏的主要血管来有效治疗充血性心力衰竭。由于利用了更多的活性化合物，给药方案可以减轻患者的负担。此处所用术语"有效寿命"是指本发明化合物在温血动物中以其活性形式存在的持续时间。

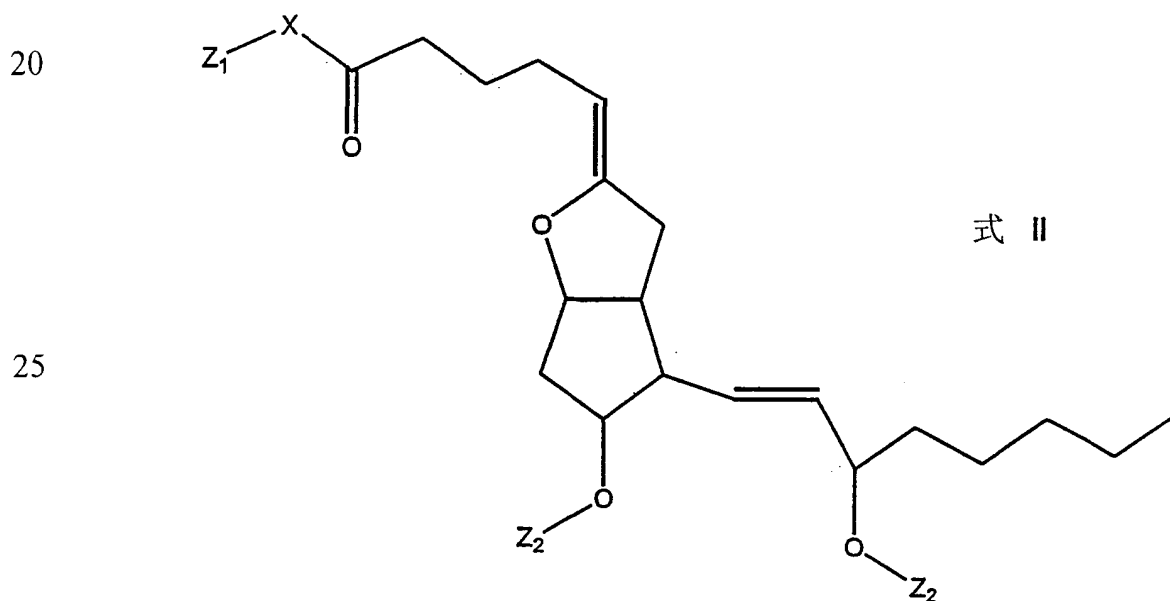
至少一个活性基团的保护一般可以增加前列腺素类化合物的有效寿命，使它们比天然或未保护形式的前列腺素类化合物更加适合不同的

给药方式，和提供更小的可能由快速治疗剂水平变化带来心脏压力的风险。

5 此处所用术语"前列腺素化合物及其类似物"在下文中将总称为"前列腺素类化合物"，是指所有前列腺素类化合物及其变型，它们具有至少一个活性基团(例如 COOH 和/或 OH)并且至少最小限度地对温血动物中的充血性心力衰竭有效。此处所用术语"本发明前列腺素化合物"是指所定义的前列腺素化合物，其具有本发明所述的修饰。此处所用术语"活性基团"是指前列腺素化合物上的位点，其能够结合或与靶向组织(如血管组织)反应。

10 本发明包括所有种类的本发明前列腺素(PG)化合物。例如，本发明采用的本发明前列腺素类化合物包括修饰的 PGA、PGB、PGC、PGD、PGE、PGF 和 PGI 型化合物以及上述的亚类，优选 PGE。前列腺素类化合物可以分离或提取自温血动物原料或利用所属领域普通技术人员已知的方法合成制得。

优选的本发明前列腺素类化合物由结构式 II 表示：



其中 Z_1 和 Z_2 独立地选自氢和之前在结构式 I 中为 Z 定义的基团，条件是 Z_1 和 Z_2 中的至少一个不是氢；和

X 选自 O 或 NH。

5 更加优选的结构式 II 的化合物是第 1、2 和 3 组定义如下的化合物，其中：

对于第 1 组的化合物：

Z_1 是和 X 结合并减慢该化合物的代谢速率的药学可接受聚合物；

和

10 X 选自 O 和 NH，和 Z_2 选自 H 和乙酰基；

对于第 2 组的化合物：

Z_1 是氢；

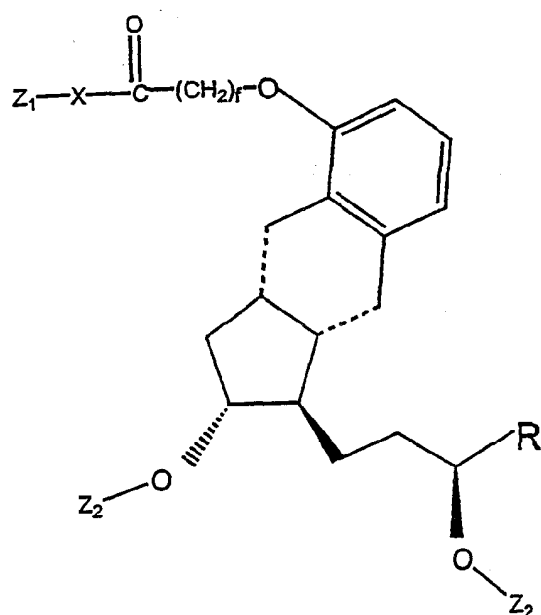
X 是 O，和 Z_2 是减慢该化合物的代谢速率并且通过酯基连接于氧的药学可接受聚合物；和

15 对于第 3 组化合物：

Z_1 是第 1 组定义的药学可接受聚合物；

X 是 O 或 NH，和 Z_2 是第 2 组定义的、经酯基连接于氧的药学可接受聚合物。

20 优选的化合物还是结构式 III 表示的化合物：



式 III

其中 Z_1 和 Z_2 包括如上面结构式 II 定义的不同基团；

f 是 1 至 3 的整数；

5 X 选自 O 和 NH；和

R 选自氢和烷基，优选具有 1-6 个碳原子。

更加优选的结构式 III 的化合物是第 4、5 和 6 组的化合物，其中：

对于第 4 组的化合物：

10 Z_1 是和 X 结合并减慢该化合物的代谢速率的药学可接受聚合物；

X 选自 O 和 NH，和 Z_2 选自氢和乙酰基；

对于第 5 组的化合物：

Z_1 是氢，X 是 O，和 Z_2 是乙酰基，或减慢该化合物的代谢速率并且经酯基或醚基连接于氧的药学可接受聚合物；

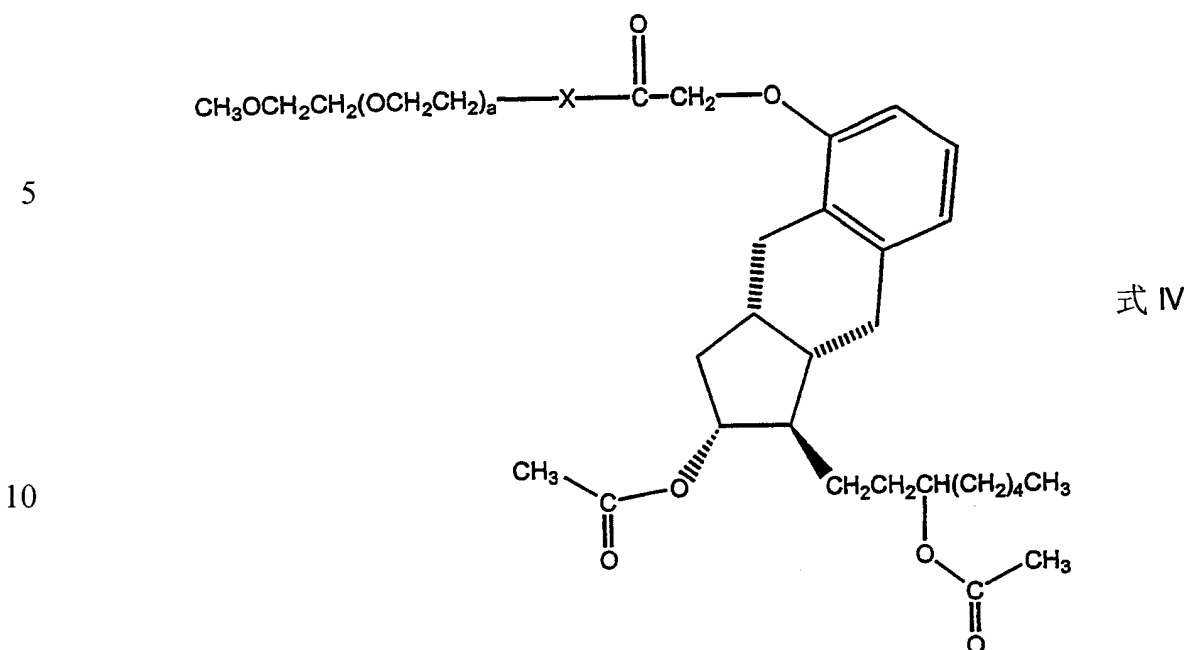
15 对于第 6 组的化合物：：

Z_1 是第 4 组定义的药学可接受聚合物，

X 选自 O 和 NH，和 Z_2 是如第 5 组定义的药学可接受聚合物。

20 非常优选的化合物是那些其中 Z_1 和/或 Z_2 基团是具有结构式 $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_a$ 的聚乙二醇，其中 a 是 1 至约 1000。

特别优选的本发明前列腺素类化合物是那些具有结构式 IV 的化合物：



其中 a 和 X 定义如上。优选 a 是约 6 至 600，首选是约 6 至 460。

15

本发明还涉及一种患有充血性心力衰竭的温血动物的治疗方法，包括给予该温血动物有效量的结构式 I 的化合物。含有所述化合物的适合以上述目的施用给温血动物的组合物是本发明的一部分。

20

充血性心力衰竭的特征在于血管的异常缩小引起血流减少和血管阻力增高直至心脏损伤。向患有充血性心力衰竭的患者施用本发明的前列腺素类化合物，经减弱血管收缩来降低血管阻力，由此促进增加血液流经患病血管。结果，对产生较小的心脏压力，并使心脏组织可得到较高水平的氧。此外，本发明前列腺素类化合物的抗血小板聚集和细胞保护活性必然能够通过抑制炎症反应来促使损伤组织愈合，并

25

本发明前列腺素类化合物据信可以引发血管扩张，导致心脏外周动脉血管中平滑肌的松弛。这些作用联合引起全身和肺部的动脉压和血管阻力大幅度降低，并引起心脏输出增加。在患有充血性心力衰竭

30

的患者中，这些反应使心脏能泵更多的血液，并缓解与较差心室性能相关的症状。

在本发明的一个方面，本发明前列腺素类化合物的一个或多个活性基团(例如 COOH 和 OH)连接于惰性、非抗原性和非免疫原性的直链、支链和/或环状聚合物和共聚物。此外，聚合物必须能够以适合将本发明前列腺素转运至温血动物的全身和肺部血管系统的速率与本发明的前列腺素类化合物分离。对于任何聚合物保持连接在前列腺素化合物的程度，其不对充血性心力衰竭的治疗产生不良影响。

为了使前列腺素类化合物和聚合物如聚醚偶联，聚合物的一个或多个羟基被转化为能够进行偶联反应的反应性官能团。

活化聚合物与前列腺素类化合物反应，由此连接优先发生在游离羧基和/或羟基上。如果可利用或被利用在前列腺素类化合物上，适当的活化羰基、氧化的碳水化合物部分和巯基也可以用作偶联位点。

在本发明的一个优选方面中，羧基或羟基和活化聚醚之间形成酰胺或酯键。聚合物被尿烷形成键或类似的键活化，并且使聚合物易于经羧基或其它基团连接于前列腺素化合物的其它官能团也属于本发明。

在基本上非抗原性聚合物中，聚醚类化合物(PAO)尤其是单活化的、以烷基为末端的聚醚如聚乙二醇类(PEG)和尤其是以单甲基为末端的聚乙二醇类(mPEG)。双活化聚醚也被考虑用来交联前列腺素化合物或提供连接其它部分(如靶向试剂)的方式使聚合物-前列腺素偶联物定位在靶向区域内，如肺或肢体血管内。

适合的聚合物、尤其是 PEG 或 mPEG 基本上在重量上有所改变。本发明一般采用分子量为约 200 至约 80,000 道尔顿的聚合物。优选分

子量约 2,000 至 42,000 道尔顿, 并且特别优选分子量约 5,000 至 28,000 道尔顿。

5 本发明优选作为保护基的聚合物在室温下可溶于水。此类聚合物的非限定实例包括聚醚均聚物如 PEG 和 mPEG, 或聚丙二醇类、聚氧乙烯化多元醇、及其共聚物和嵌段共聚物。除了 mPEG 以外, 以 C₁₋₄ 烷基为末端的聚合物也适用。

10 作为另一种含 PAO 聚合物, 可以采用有效的非抗原性材料, 如葡聚糖、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酰胺、聚乙烯醇、含碳水化合物聚合物等。前列腺素类化合物的修饰可以进一步包括但不限于乙酰化、羧基化、葡糖基化、磷酸化、脂化和酰化。所属领域的普通技术人员将理解上述内容仅仅是举例说明, 所有具有本发明所述品质的聚合物材料均可以被考虑。

15 前列腺素类化合物与上述保护基偶联生成本发明的前列腺素类化合物, 其可以有效地将活性化合物转运到靶向区域, 并且使本发明的前列腺素化合物在该靶向区域内保持比已知前列腺素化合物更长的时间。因此, 本发明前列腺素类化合物特别适合于充血性心力衰竭的治疗。

20

如上所述, 许多应用在充血性心力衰竭疗法中的已知前列腺素类化合物在温血动物中具有非常短的有效寿命, 通常少于 1 小时。根据本发明, 提供了本发明的前列腺素类化合物, 它们具有可以持续达数

25 小时的改进的有效寿命, 较长的有效寿命减少具有潜在损伤性的治疗剂水平显著变化的量, 并减少本发明前列腺素类化合物的给药次数。本发明的前列腺素类化合物因此可以以较低的剂量单位量和较低的频率给药, 对于患者具有较低的风险。

30 本发明前列腺素类化合物的活性基团包括 COOH 和 OH。这些活

性基团的一个或多个由下文详细描述的保护基保护。保护基一般可以具有 500,000 或更高的分子量。在本发明的优选形式中，当 OH 未保护时，分子量至少为 5,000 道尔顿的基团与 COOH 偶联，更优选至少 20,000 道尔顿。分子量至少为 5,000 道尔顿的保护基可以减慢该化合物的排泄，由此能够提高在温血动物中的有效寿命。

所述保护基是任何可以起保护活性基团(COOH 和 OH)不被过早代谢但可以很容易地以受控方式与活性基团分离和/或与该活性基团连接但对该化合物的功能无不良影响的基团。所述保护基包括，例如聚合物、直链和支链烷基、芳烷基、芳基、酰基、杂环基、亚烷基，其全部可以被选自例如烷基、芳基和芳烷基等的取代基取代。

在可以和活性基团偶联的聚合物中包括聚二醇类、聚乙烯聚合物、聚酯、聚酰胺、多糖和聚合酸、脂质、氨基酸、核酸、碳水化合物，和它们的联合形式。

优选的聚二醇包括聚乙二醇和聚丙二醇。

优选的多糖是选自多糖 B 的那些。

在多元酸中本发明优选聚氨基酸和聚乙酸。

在上述种类的聚合物中，优选的聚合物是聚乙二醇类化合物(PEG)。

除了上述聚合物以外，所述聚合物如葡聚糖、纤维素聚合物和淀粉类也可以用于本发明。

所述聚合物可以通过一个基团如酰胺基、酯基等连接于活性 COOH 或 OH 基团。

结构式 I 的化合物一般用作治疗心血管疾病(包括充血性心力衰竭)药物组合物的组成部分, 该组合物含有药学可接受载体。出于这种目的所用的化合物一般是以 0.5 至 100mg/kg/天, 优选约 25 至 35 mg/kg/天的量给药。

可以通过例如采用常规固态或液态载体或稀释剂, 以及适合预期给药方式的药学添加剂(例如赋形剂、粘合剂、防腐剂、稳定剂、矫味剂等)、按照如药剂领域中已知的技术配制上述含有至少一种结构式 I 的化合物的药物组合物。

结构式 I 的化合物可以以任何适合方式给药, 例如口服给药, 如片剂、胶囊、颗粒或粉末; 舌下给药; 经颊给药; 非肠道给药, 如皮下、静脉内、肌肉内, 或胸骨内注射或输注技术(例如灭菌可注射含水或非水溶液或混悬液); 鼻部给药如喷射吸入; 局部给药如乳剂或软膏方式; 直肠给药如栓剂; 以含有无毒、药学可接受赋形剂或稀释剂的剂量单位制剂给药。通过应用适当的含有本发明化合物的药物组合物, 本发明的前列腺素类化合物可以是被即时释放或延迟释放, 特别是在延迟释放的情况中, 可以采用装置如皮下植入物或渗透泵。本发明也可以以脂质体形式给药。

口服给药的组合物实例包括: 混悬液, 其可以含有例如微晶纤维素提供疏松作用, 藻酸或藻酸钠作为助悬剂, 甲基纤维素作为粘度增强剂, 和甜味剂或矫味剂, 如所属领域已知的那些; 和即时释放片剂, 其可以含有例如微晶纤维素、磷酸二钙、淀粉、硬脂酸镁和/或乳糖和/或其他赋形剂、粘合剂、填料、崩解剂、稀释剂和润滑剂, 如所属领域已知的那些。本发明的化合物也可以经口腔转运通过舌下和/或经颊给药。铸模片剂、压缩片剂或冻干片剂是可采用的示例剂型。组合物实例包括那些将本发明化合物和速溶稀释剂如甘露糖醇、乳糖、蔗糖和/或环糊精配制。在这些制剂中还包括高分子量赋形剂, 如纤维素(微

晶纤维素)一起。所述制剂中也含有有助于粘膜附着的赋形剂,例如羟丙基纤维素(HPC)、羟丙基甲基纤维素(HPMC)、羧甲基纤维素钠(SCMC)、马来酸酐共聚物(例如 Gantrez),和控释试剂,例如聚丙烯酸共聚物(例如卡巴浦尔 934)。加入润滑剂、助悬剂、矫味剂、着色剂和稳定剂可以易于制备和应用。

鼻用气雾剂或吸入给药的组合物实例包括存在于盐水中的溶液,其可以含有例如苧醇或其他适宜的防腐剂、提高生物利用度的吸收促进剂,和/或其他增溶或分散剂,譬如所属领域已知的那些。

非肠道给药的组合物实例包括可注射溶液或混悬液,其含有例如适宜的无毒、肠胃外可接受的稀释剂或溶剂,如甘露糖醇、1,3-丁二醇、水、林格氏溶液(一种等渗氯化钠溶液);或其他适当的分散剂或湿润剂和助悬剂,包括合成甘油一-或二酯,和脂肪酸,包括油酸。

直肠给药的组合物实例包括栓剂,其可以含有例如适宜的无刺激赋形剂,如可可脂或合成甘油酯,它们在常温下为固体,但在直肠腔中液化和/或溶解释放出药物。

局部给药的组合物实例包括局部载体,例如 Plastibase(和聚乙烯胶凝的矿物油)。

所属领域普通技术人员可以测定出本发明前列腺素类化合物的有效量,包括成年人的例举剂量为约 0.5 至 100mg 本发明前列腺素类化合物/kg 体重/天,其可以以单剂量或分开的剂量形式给药,例如每天给药 1 至 4 次。应理解,对于任何特定对象可以改变具体剂量水平和给药次数,这取决于多种因素,包括特定化合物的活性,对象的种族、年龄、体重、全身健康、性别和饮食,给药方式和次数,排泄速率,药物联用,和特定病症的严重性。治疗优选的对象是患有心力衰竭的动物,首选哺乳动物如人,和宠物,如狗、猫等。

一般地，与已知天然或非偶联的前列腺素类化合物相比，本发明前列腺素类化合物获得预期效果、即扩张有关患病脉管系统所需要的剂量明显较低。由于天然或非偶联形式的已知前列腺素类化合物在体内快速代谢和由此产生可能对心脏压力有作用的治疗活性水平快速变化，这些药物需要以较大剂量长时间连续输注才能在被治疗患者中维持有效的血液水平。然而，在其他副作用中，由高血液水平的已知前列腺素类化合物引起的低血压、心动过速和腹泻限制了已知前列腺素的可供药量。前列腺素类化合物的高费用在价格上妨碍了以大剂量静脉内给药。本发明的方法提供了本发明前列腺素类化合物以低成本和低副作用有效给药。

本发明的前列腺素类化合物可以经皮下以液体重构形式的冻干粉末形式给药，液体重构冻干粉末可以另外含有防腐剂、缓冲剂、分散剂等。优选地，用静脉内注射常用的介质如无防腐剂灭菌水重构该前列腺素类化合物。通过连续静脉内或皮下输注或通过静脉内注射可以完成给药。为了连续输注，可以将日剂量加入普通盐水或其他溶液中，将该溶液通过机械泵或通过重力输注。

下列实施例举例说明本发明的实施方式。在不脱离本发明实质和范围下，所属领域技术人员很容易理解对本发明的改变、改进和差异，本发明的范围是由本申请组成部分的权利要求书定义的。

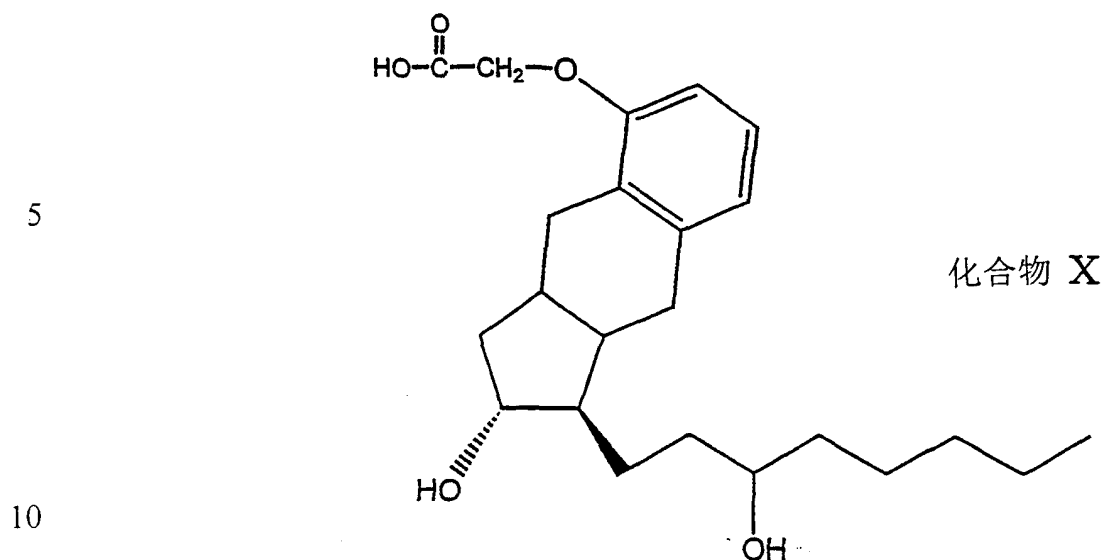
实施例 1

mPEG-5kDa-酰胺-化合物 X 的合成

此后称作“化合物 1”

按照下列方式制备第 4 组的化合物，其中 Z_1 为分子量约为 5,000 道尔顿的 mPEG，X 是 NH 和 Z_2 为氢。

将 200mg 具有下列结构式的化合物 X:



置于含有 mPEG5k 胺(2.5g)、2-羟基苯基三唑(HOBT, 67mg)、4-(二甲基氨基)吡啶(DMAP, 61mg)和二环己基碳二亚胺(DCC, 140mg)的圆底烧瓶内。反应物和 60ml 无水二氯甲烷混合。该混合物在室温下搅拌过夜, 此后蒸发除去溶剂。把残余物溶解在 25ml 的 1,4-二氧六环中, 过滤除去不溶物。浓缩溶剂, 随后沉淀在 100ml 的 50:50/乙醚:异丙醇中。过滤收集沉淀, 真空下干燥。产物收率为 2.5g(93%)。¹H NMR (DMSO-d₆): δ 3.5(br m, PEG), 7.897 (t, -PEGNH-CO- (化合物 X)), 4.49 (d, (化合物 X)-OH¹), 4.24 (d, (化合物 X)-OH²), 0.864 (t, (化合物 X)-CH₃), 4.436 (s, (化合物 X)CH₂CONHPEG), 7.045 (t, 化合物 X 芳族质子), 6.7 (d+d, 化合物 X 芳族质子)。

15

20

实施例 2

mPEG5kDa-酯-化合物 X 二乙酸酯的合成

25 此后称作“化合物 2”

按照下列方式制备第 4 组的化合物, 其中 Z₁ 是分子量约 5,000 道尔顿的 mPEG, X 为 O 和各 Z₂ 为乙酰基。

30 在圆底烧瓶中, 将化合物 X(400mg)和吡啶(200μl)在 35ml 的无水二氯甲烷中混合, 向该混悬液中加入 500μl 的乙酸酐。化合物在数小

5 时内变均相，该溶液在室温下搅拌过夜。浓缩溶剂，向残余物中加入磷酸盐缓冲液(0.1M, pH 7.4)。将该混合物快速搅拌 30 分钟，用二氯甲烷提取该混合物 3 次。合并的有机相用硫酸钠干燥，蒸发除去溶剂。得到油状产物，化合物 X 二乙酸酯。产量为 340mg(80%)。¹H NMR (DMSO-d₆) : 1.91 (s, (化合物 X)-O¹COCH₃), 2.00 (s, (化合物 X)-O²COCH₃), 0.84 (t, (化合物 X)-CH₃)。

10 在圆底烧瓶中，将 mPEG5k(3.8g)、上步制得的化合物 X 二乙酸酯(320 mg)、2-羟基苄基三唑(HOBT, 103mg)、4-(二甲基氨基)吡啶(DMAP, 93mg)和二环己基碳二亚胺(DCC, 238mg)溶解在 50ml 无水二氯甲烷中。该溶液在室温下搅拌过夜，蒸发除去溶剂。残余物溶于 35ml 的 1,4-二氧六环，过滤除去不溶物。浓缩溶剂，沉淀在 100ml 的 50:50/乙醚:异丙醇中。过滤收集沉淀，真空下干燥。产量为 3.2g(78%)。¹H NMR(DMSO-d₆) : δ 3.5 (br m, PEG), 4.23 (t, -PEGOCH₂CH₂O-CO-(化合物 X)), 1.91 (s, (化合物 X)O¹COCH₃), 2.00 (s, (化合物 X)-O²COCH₃), 0.84 (t, (化合物 X)-CH₃), 4.77 (s, (化合物 X)-CH₂COOPEG), 7.03 (t, 化合物 X 芳族质子), 6.7 (d+d, 化合物 X 芳族质子)。

实施例 3

20 mPEG20KDa-酯-化合物 X 的合成

此后称作“化合物 3”

按照下列方式制备第 5 组的化合物，其中各 Z₂ 为分子量约 20,000 道尔顿的经-CO-(CH₂)₂-O-连接的 mPEG。

25 在圆底烧瓶中，把化合物 X(200mg)和氢氧化钠(21mg)在 40ml 无水乙腈中混合。向该混悬液中加入 90mg 溴苄，将该混合物回流 2 天。过滤除去固体，浓缩溶剂，残余物在真空下干燥。得到油状产物，化合物 X-苄酯。产量为 210mg(100%)。¹H NMR (DMSO-d₆) : δ 7.37 (s, C₆H₅-CH₂-OCO-(化合物 X)), 5.19 (s, C₆H₅-CH₂-OCO-(化合物 X)), 4.83 (s, (化合物 X)-CH₂COOBz), 4.49 (d, (化合物 X)-OH¹), 4.24 (d, (化合物 X)-

30

OH¹), 0.864 (t, (化合物 X)-CH₃), 7.025 (t, 化合物 X 芳族质子), 6.7 (d+d, 化合物 X 芳族质子)。

5 在圆底烧瓶中, mPEG 20k (3 g)、化合物 X-苄酯(上步制备, 100mg)、HOBT(3mg)、DMAP(25mg)和 DCC(42mg)溶于 40ml 无水二氯甲烷中。该溶液在室温下搅拌过夜, 蒸发除去溶剂。将残余物溶解在 30ml 的 1,4-二氧六环中, 过滤除去不溶固体。浓缩溶剂, 随后沉淀在 100ml 的 50:50/乙醚:异丙醇中。过滤收集沉淀。真空下干燥。产量为 2.7g (90%)。¹H NMR (DMSO-d₆): δ 3.5 (br m, PEG), 2.48 (t, mPEG-OCH₂CH₂COO- (化合物 X)), 7.35 (s, C₆H₅-CH₂-OCO- (化合物 X)), 5.17 (s, C₆H₅-CH₂-OCO- (化合物 X)), 4.83 (s, (化合物 X)-CH₂COOBz), 0.857 (t, (化合物 X)-CH₃), 7.025 (t, 化合物 X 芳族质子), 6.7 (d+d, 化合物 X 芳族质子)。

15 存在于 1,4-二氧六环(30ml)中的 mPEG-化合物 X 苄酯(上步制得, 2.7g)的溶液用 H₂(2 atm 压力)和 1g 的 Pd/C(10%)氢化过夜。过滤除去催化剂, 催化剂用新制二氯甲烷洗涤。利用旋转蒸发浓缩合并的溶液, 将残余浆液加入 300ml 乙醚中。过滤收集产物并且真空下干燥。产量为 2g(74%)。¹H NMR (DMSO-d₆): δ 3.5(br m, PEG), 2.48(t, mPEG-OCH₂CH₂COO-(化合物 X)), 4.61 (s, mPEG- (化合物 X)-CH₂COOH), 0.857 (t, (化合物 X)-CH₃), 7.025 (t, 化合物 X 芳族质子), 6.7 (d+d, 化合物 X 芳族质子)。

25 实施例 4

化合物 X 和化合物 1-3 对体外人血浆的抗血小板作用

介绍

30 按照下列方式测定本发明化合物 X 和化合物 1-3 对采自健康志愿者的人血浆的抗血小板活性。此外, 与贫血小板血浆(PPP)和含水载体温育不同的时间后测定各化合物的抗血小板反应。通过观察上述化合物的抗聚集作用, 可测量所述活性的持续时间和大小。据信抗聚集作

用经防止或减少血小板在血管中聚集，由此维持相对未阻塞的循环通路，从而有益于治疗充血性心力衰竭。

方法

5 富血小板血浆(PRP)的制备

从至少 14 天内没有摄取任何药物的健康志愿者中采集血液，通过静脉穿刺收集到 3.15%(w/v)柠檬酸三钠(9:1 v/v)中。血液在 800g 下离心 15 分钟制成 PRP。PRP 进一步在 12,000 g 下离心 1 分钟制成 PPP。

10 血小板聚集的光度测量

利用双通道 Payton 血小板凝集计测量血小板聚集，该仪器用 PRP (0%)和 PPP(100%)分别校正透光度。将 PRP 的试样(500 μ l)加入硅化比色杯中，搅拌(1000 转/分钟)并加热至 37 $^{\circ}$ C。测试前将血小板温育 1 分钟建立稳定的基线。把次最大浓度的凝集剂胶原(1 μ g/ml)加入 PRP 中，在 4 分钟内随着透光率的增加测定血小板聚集作用。

15 抗聚集反应

令化合物 X(1-100ng/ml)和化合物 1-3(0.1-10 mg/ml)分别和 PRP 一起温育 1 分钟，随后加入胶原(1 μ g/ml)，一种凝固剂。利用加入胶原后 4 分钟内观察的透光率峰的增量与对照值比较计算出血小板聚集的抑制百分比。利用采自至少 3 名志愿者的 PRP 重复这个试验。

试验结果在表 1 中给出。表 1 中的结果例证了化合物 X 和化合物 1 至 3 在上述试验条件下对人血小板聚集作用的浓度依赖性效应。

25

用含水载体和 PPP 温育后的抗聚集反应

在各试验中，令化合物 X(30 和 300ng/ml)的样本和化合物 1(0.3 和 3mg/ml)、化合物 2(0.03、0.3 和 3mg/ml)和化合物 3(3mg/ml)的样本与 500 μ l 含水载体(乙酸盐缓冲液)在 37 $^{\circ}$ C 下一起温育不同的时间，包括 15 分钟、1 小时和 4 小时。温育期后，取 50 μ l 含有相应样本化合

30

物的含水载体加入新制 PRP(450 μ l)中, 测定胶原刺激后的抗聚集活性。利用采自至少 3 名志愿者的 PRP 重复这个试验。化合物 X 和化合物 1-3 在和含水载体(乙酸盐缓冲液)温育 15 分钟、1 小时和 4 小时后对人血小板聚集的影响分别在表 2 中详细给出。化合物 X 和化合物 1-3 在和 PPP 温育 15 分钟、1 小时和 4 小时后对人血小板聚集的影响分别在表 3 中详细给出。表 2 和 3 中的数据表示 n 个供体的平均值和标准偏差。

结果

化合物 X 对血小板聚集的影响

如表 1 所示, 化合物 X(1-100 ng/ml)在加入胶原之前和 PRP 一起温育 1 分钟, 引起胶原诱发的血小板聚集的浓度依赖性抑制。在较高浓度(30 和 100ng/ml)下, 化合物 X 完全抑制聚集反应(参见表 1)。化合物 X 抑制 50%聚集反应的浓度(ID₅₀)测定出为 20ng/ml。

参考表 3, 化合物 X(3 和 300 ng/ml)与 PPP 温育 15 分钟、1 小时和 4 小时对于抗血小板活性没有显著作用。同样地, 化合物 X(30 和 300 ng/ml)与含水载体单独 15 分钟、1 小时和 4 小时的温育对于抗血小板活性的水平也没有明显影响, 如表 2 所示。

化合物 1 对血小板聚集的影响

化合物 1(0.1-3mg/ml)在加入胶原之前与 PRP 温育 1 分钟, 引起血小板聚集的浓度依赖性抑制, 如表 1 所示。最高浓度(3mg/ml)下, 化合物 1 完全抑制对胶原的聚集反应(参见表 1)。化合物 1 在温育 1 分钟后抑制血小板聚集的活性比化合物 X 的抗聚集活性低约 10⁵ 倍。

如表 3 所示, 化合物 1 的抗聚集活性在分别与 PPP 温育 1 小时和 4 小时后是以时间依赖的方式增高。1 小时后, 活性提高 7 倍; 4 小时后, 活性比 1 分钟温育后观察到的活性提高了约 22 倍(参见表 3)。

通过比较, 化合物 1 和含水载体单独的温育在任何试验时间点对

抗血小板活性都没有影响(参见表 2)。

化合物 2 对血小板聚集的影响

5 如表 1 所示, 在所评估的最高浓度(10 mg/ml)下, 化合物 2 在与 PRP 温育 1 分钟时产生约 20%的血小板聚集抑制率。较低浓度的化合物 2 在 1 分钟温育后没有显著的抗血小板活性(参见表 1)。

10 如表 3 所示, 观察到化合物 2 的活性在和 PPP 温育 1 小时和 4 小时后以时间依赖性方式大大提高。当在 PPP 中温育 1 小时这种活性比 1 分钟的温育提高了 50 倍。此外, 这种活性在温育 4 小时后比 1 分钟温育后观察到的活性提高了至少 3,500 倍(参见表 3)。

然而, 化合物 2 和含水载体单独的温育对抗血小板活性在任何试验时间点都没有上述作用(参见表 2)。

15

化合物 3 对血小板聚集的影响

如表 1 所示, 化合物 3(0.3-10 mg/ml)与 PRP 温育 1 分钟, 引起血小板聚集的浓度依赖性抑制。在最高浓度(10mg/ml)时, 化合物 3 完全抑制该聚集反应(参见表 1)。

20

化合物 3(300µg/ml)以 1 分钟温育后无效的浓度和 PPP 一起温育 4 小后, 可以引起活性增高, 达到 40%血小板聚集的抑制率(参见表 3)。由于在这样的温育期后活性较弱, 所以没有进一步评价其他浓度。

25 化合物 3 和含水载体的温育在任何试验时间点都对于抗血小板活性没有影响(参见表 2)。

结论

30 上述有关化合物 X 和化合物 1-3 的发现表明, 分子量为 5,000 至 20,000 道尔顿的 PEG 部分的包含以及乙酸酯基化可以降低化合物 X

5 的抗(血小板)聚集活性。然而，这些化合物的活性在和人血浆但不是单独的缓冲液一起温育约 4 小时期间有所提高，这表明存在对这些衍生物的酶促水解，由此活性化合物可以长时间释放。这种长时间释放效果产生有效和连贯的反应，该反应通过减少血小板在血管中聚集而有益于维持改善的血流。

表 1
化合物 X 和化合物 1-3 对人血小板聚集的浓度依赖性作用

化合物 浓度 (终浓度)	血小板聚集（对照的%）											
	化合物 X			化合物 1			化合物 2			化合物 3		
	平均	SEM	n	平均	SEM	n	平均	SEM	N	平均	SEM	n
1ng/ml	101	1	3									
3ng/ml	98	1	3									
10ng/ml	60	24	3									
30ng/ml	1	1	3									
100ng/ml	1	1	3									

100µg/ml				94	7	3						
300µg/ml				95	4	3				100	1	3
1mg/ml				90	7	3	100	3	3	98	2	3
3mg/ml				1	1	3	95	2	3	80	8	3
10mg/ml							78	10	3	1	1	3

10 表 2
化合物 X 和化合物 1-3 在和含水载体(乙酸盐缓冲液)温育后对人血小板聚集的影响

化合物 浓度 (终浓度)	血小板聚集（对照的%）								
	15 分钟			1 小时			4 小时		
	平均	SEM	n	平均	SEM	N	平均	SEM	n
化合物 X (3 ng/ml)	98	2	3	107	2	3	94	3	3
化合物 X (30 ng/ml)	3	3	3	8	8	3	8	8	3
化合物 1 (30 µg/ml)	102	3	3	105	4	3	98	3	4
化合物 1 (300 µg/ml)	105	3	3	104	3	3	97	3	4
化合物 2 (3 µg/ml)	105	1	4	107	3	4	99	2	4
化合物 2 (30 µg/ml)	102	2	4	104	5	4	97	3	4
化合物 2 (300 µg/ml)	103	3	3	104	4	3	98	2	3
化合物 3 (300 µg/ml)	103	2	3	103	2	3	91	2	4

表 3
化合物 X 和化合物 1-3 在和人 PPP 温育后对人血小板聚集的影响

化合物 浓度 (终浓度)	血小板聚集 (对照的%)								
	15 分钟			1 小时			4 小时		
	平均	SEM	n	平均	SEM	n	平均	SEM	n
化合物 X (3 ng/ml)	101	2	3	100	3	3	91	5	3
化合物 X (30 ng/ml)	1	1	3	1	1	3	1	1	3
化合物 1 (30 µg/ml)	101	2	3	107	3	3	84	4	4
化合物 1 (300 µg/ml)	95	5	3	45	23	3	1	1	4
化合物 2 (3 µg/ml)	102	3	4	105	2	4	78	5	4
化合物 2 (30 µg/ml)	99	3	4	102	2	4	1	1	4
化合物 2 (300 µg/ml)	101	4	4	75	12	3	1	1	4
化合物 3 (300 µg/ml)	97	7	3	101	2	3	69	6	4

5 实施例 5
静脉内给药的化合物 X 和化合物 1-3 在麻醉大鼠中的体内全身血液动力学作用
介绍

这个研究报导了化合物 1-3 和化合物 X 比较在硫喷妥钠麻醉大鼠
10 中的生物活性的效价、活化和持续时间。观察各化合物在快速浓注静脉内注射后对血压(BP)和心搏率的影响。评价启动时间、最大反应以及反应回归到基线值的 50%所需的时间用于对比有效寿命。在其他作用中，通过降低血管血流阻力和由此对心脏施加的工作负荷，降低血管中的血压对于治疗充血性心力衰竭是有益的。结果，心脏不需要费力地经这些血管泵血。
15

材料和方法

用硫喷妥钠麻醉雄性 Wistar 大鼠(INTRAVAL[®], 120 mg kg⁻¹ i.p.)。插入导管便于呼吸。将右颈动脉插导管并且和血压传感器(Spectramed
20 P23XL)相连，用于测量平均动脉血压(MAP)和心搏率(HR)，在四道 Grass 7D 多种波动描记器上连续记录(Grass, Mass., USA)。在左股静脉或右颈静脉插管用于给药。试验动物的体温利用直肠探针式温度计维

持在 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，该温度计与恒温毯式控制单元(Harvard Apparatus Ltd)相连。

15 分钟稳定期后，给动物静脉内注射一次选定剂量的各种化合物，并且连续监测 3 小时的血液动力学参数，以确定被研究化合物的作用时间。

结果

10 化合物 X 分别以 0.1mg/kg 和 1mg/kg 的静脉内剂量的给药引起 MAP 的即时、剂量相关性衰减，和剂量相关性心搏率加快。约 70mm Hg 的 MAP 最大衰减出现在化合物 X 给药后的第 1 分钟内。化合物 X 的有效寿命与回归到基线值的 50% 的 MAP 反应直接相关，化合物 X 在 0.1mg/kg 剂量时的有效寿命约为 15 分钟，在 1.0mg/kg 剂量时化合物 X 的有效寿命约为 30 分钟。

15 化合物 1 以静脉内剂量为 0.1mg/kg 和 1mg/kg 的给药引起 MAP 的即时、剂量相关性衰减，其与心搏率的剂量相关性加快有关。 60mm Hg 的 MAP 最大衰减出现在化合物 1 给药后的第 1 分钟内。有效寿命是回归到基线值的 50% 之前的 MAP 衰减持续时间的函数，对于 20 10mg/kg 和 30mg/kg 的化合物 1，有效寿命分别约为 15 分钟和约 30 分钟。

对于化合物 2，即时的 MAP 衰减出现在 10 和 30mg/kg 剂量的给药时，与心搏率的剂量相关性加快有关。注射 10mg/kg 化合物 2 后，25 30mm Hg 的 MAP 最大衰减出现在该化合物给药后的 10 分钟内。有效寿命是由 10mg/kg 化合物 2 引起的 MAP 衰减持续时间的函数，该有效寿命约为 125 分钟。注射 30mg/kg 化合物 2 后， 30mm Hg 的 MAP 最大衰减出现在化合物给药后的 5 分钟内。此后 MAP 似乎向基线回归。然而，在约 30 分钟时 MAP 出现第 2 次衰减(其如同第 1 次衰减般明显)。由 30mg/kg 化合物 2 引起的两次观察到的 MAP 衰减的有效 30

寿命分别为 105-160 分钟。

5 当化合物 3 以 30mg/kg 的剂量给药时，可以观察到小但即时的 MAP 衰减。然而，在注射化合物 3 后的 45 和 120 分钟时，MAP 出现渐进式衰减。化合物 3 注射后 135-165 分钟内 MAP 的这种延迟性衰减向基线回归。30 mm Hg 的 MAP 最大衰减出现在该化合物给药后的 75 分钟内。由 30mg/kg 引起的 MAP 衰减的有效寿命大于 105 分钟。

结论

10 已经证实化合物 X 引起基本上为剂量相关性的 MAP 衰减。与化合物 X 相似，化合物 1 引起 MAP 在数量和时间上相似的剂量相关性衰减。化合物 2 和 3 产生较小的 MAP 衰减，但它们各自的作用时间相对较长。化合物 2 引起血压明显且长时间的衰减，该化合物在 10mg/kg 的剂量下与心搏率的明显加快无关。化合物 2 引起的 MAP 即时衰减
15 不如化合物 X 和化合物 1 那样明显，通过降低血压大波动变化导致的心脏压力，所述发现呈现了安全性方面的优越性。该改善的作用持续时间提供了较长时间内更连贯和较缓和的降血压效果，对充血性心力衰竭病症是有益的。此外，通过松弛血管紧张性以改善血流，所述化合物有降血压的作用。这一作用潜在地减缓或甚至阻止心脏泵血活性的
20 丧失，该丧失通常与充血性心力衰竭相关。

实施例 6

化合物 X 二乙酸酯的合成

此后称作“化合物 4”

25 以下列方式制备第 5 组的化合物，其中 Z_1 是氢，X 是 O 和各 Z_2 是乙酰基。

30 在圆底烧瓶中，将化合物 X(400mg)和吡啶(200 μ l)在 35ml 的无水二氯甲烷中混合，向该悬浮液中加入 500 μ l 的乙酸酐。混合物在数小时内变均相，该溶液在室温下搅拌过夜。浓缩溶剂，向残余物中加入

磷酸盐缓冲液(0.1M, pH 7.4)。将该混合物快速搅拌 30 分钟, 用二氯甲烷提取该混合物 3 次。合并的有机相用硫酸钠干燥, 蒸发除去溶剂。得到油状产物, 化合物 X 二乙酸酯。产量为 340mg(80%)。¹H NMR (DMSO-d₆): 1.91 (s, (化合物 X)-O¹COCH₃), 2.00 (s, (化合物 X)-O²COCH₃), 0.84 (t, (化合物 X)-CH₃)。5

实施例 7

mPEG20K-酯-化合物 X 二乙酸酯的合成

此后称作“化合物 5”

10 以下列方式制备第 4 组的化合物, 其中 Z₁ 是分子量约 20,000 道尔顿的 mPEG, X 是 O 和各 Z₂ 是乙酰基。

在圆底烧瓶中, 将 mPEG 20 千道尔顿(5.2g)、化合物 X 二乙酸酯(140 mg)、1-羟基苄基三唑(HOBT, 35mg)、4-(二甲基氨基)吡啶(DMAP, 30mg)和二环己基碳二亚胺(DCC, 75mg)溶解在 60ml 无水二氯甲烷中。15 该溶液在室温下搅拌过夜, 蒸发除去溶剂。残余物与 35ml 的 1,4-二氧六环混合, 过滤除去不溶固体。真空下浓缩溶液, 随后加入 200ml 的 50:50/乙醚:异丙醇中。过滤收集沉淀, 真空下干燥。产量为 4.8g(92%)。¹H NMR (DMSO-d₆): δ3.5 (br m, PEG), 4.23 (t, -PEGOCH₂CH₂O-CO-(化合物 X)), 1.91 (s, (化合物 X)-OCOCH₃), 2.00 (s, (化合物 X)-OCOCH₃), 0.84 (t, (化合物 X)-CH₃), 4.77 (s, (化合物 X)-CH₂COOPEG), 7.03 (t, 化合物 X 芳族质子), 6.7 (d+d, 化合物 X 芳族质子)。20

实施例 8

化合物 X 和化合物 4-7 对人血浆的体外抗血小板作用

介绍

25 按照下列方式测定乙酰化化合物 X(此后称作化合物 4)和本发明的化合物 5-7 对采自健康志愿者的人血浆的抗血小板作用, 并且与天然化合物 X 的抗血小板活性相比较。与贫血小板血浆(PPP)和含水载体(乙酸盐缓冲液)温育四(4)小时, 在此期间不同时间测定各化合30

物的抗血小板反应。

- 5 化合物 6 和 7 分别是 mPEG 20kDa-酰胺-化合物 X 和 mPEG20kDa-酰胺-化合物 X 二乙酸酯并且按照类似于实施例 1 的化合物 1 制备。每种化合物 6 和 7 是第 4 组的化合物，其中 Z_1 是分子量约为 20,000 道尔顿的 mPEG 和 X 是 NH。对于化合物 6， Z_2 是氢，对于化合物 7， Z_2 是乙酰基。

方法

10 富血小板血浆(PRP)的制备

从至少 14 天内没有摄取任何药物的健康志愿者中采集血液，通过静脉穿刺收集到 3.15%(w/v)柠檬酸三钠(9:1 v/v)中。血液在 800g 下离心 15 分钟制成 PRP。PRP 进一步在 12,000 g 下离心 1 分钟制成 PPP。共 12 名志愿者献血用于该研究。

15

血小板聚集的光度测量

- 利用双通道 Payton 血小板凝集计测量血小板聚集，该仪器用 PRP(0%)和 PPP(100%)分别校正透光度。将 PRP 的试样(500 μ l)加入硅化比色杯中。搅拌(1000 转/分钟)并加热至 37 $^{\circ}$ C。将血小板温育 1 分钟建立稳定的试验前基线。把次最大浓度的凝集剂胶原(1 μ g/ml)加入 PRP。在 4 分钟内随着透光率的增加测定血小板聚集作用。

20

抗聚集活性

- 25 令化合物 X(1-100ng/ml)和化合物 4(1-300 ng/ml)和 PEG 偶联衍生物，化合物 5-7(0.1-10mg/ml)分别和 PRP 一起温育 1 分钟，随后加入胶原(1 μ g/ml)，一种凝固剂。利用加入胶原后 4 分钟内观察的透光率的峰增量与对照值比较计算出血小板聚集的抑制百分比。利用采自至少 3 名志愿者的 PRP 对被研究化合物重复这个试验。

30 与含水载体和 PPP 温育后的抗聚集反应

在各试验中，令不同浓度的化合物 X(30 和 300ng/ml)和化合物 4 和化合物 5-7 与 500 μ l PPP 或含水载体(乙酸盐缓冲液)在 37 $^{\circ}$ C 下一起温育不同的时间，包括 15 分钟、1 小时和 4 小时。温育期后，取 PPP 或含水载体的试样加入新制 PRP(450 μ l)中用于测定抗血小板活性。利用采自至少 3 名志愿者 (50 μ l) 的 PPP 对各化合物重复这个试验。

结果

化合物 X 对血小板聚集的作用

化合物 X(1-100ng/ml)和 PRP 温育一(1)分钟，引起胶原诱导血小板聚集的浓度依赖性抑制。在较高浓度(30 和 100ng/ml)，化合物 X 完全抑制该聚集反应。化合物 X 抑制 50%聚集反应的浓度(IC₅₀)为 19 $\pm$ 1ng/ml。

化合物 4 对血小板聚集的影响

化合物 4、化合物 X 二乙酸酯(1-300 μ g/ml)和 PRP 温育一(1)分钟，引起血小板聚集的浓度依赖性抑制。在最高浓度(300 μ g/ml)，化合物 4 完全抑制对胶原的聚集反应，抑制 50%聚集反应的浓度为 68 $\pm$ 2 μ g/ml。化合物 4 在温育一(1)分钟后抑制血小板聚集的活性比化合物 X 的抗聚集活性低约 3 x 10³ 倍。

20

化合物 4 的抗血小板活性在与 PPP 温育后第 1 个 15 分钟后提高。15 分钟后，活性提高了约 10 倍，同时 IC₅₀ 为 5 $\pm$ 0.2 μ g/ml。当该化合物在盐水中温育的过程中也可以观察到这种效果。然而，当在 PPP 中温育达 4 小时观察到活性没有进一步提高。

25

化合物 5 对血小板聚集的影响

化合物 5 在最高评估浓度(10mg/ml)时与 PRP 一起温育一(1)分钟时引起约 10%的血小板聚集抑制率。较低浓度的化合物 5 在这种 1 分钟温育后没有显著的抗血小板活性。

30

高浓度的化合物 5 的活性在与 PPP 温育一(1)和四(4)小时后以时间依赖方式提高。当在 PPP 中温育四(4)小时后这种活性提高了十(10)倍以上,同时 IC_{50} 为 $513 \pm 18 \mu\text{g/ml}$ 。然而,化合物 5 与含水载体的温育在任何试验时间点对抗血小板活性都无影响。

5

化合物 6 对血小板聚集的影响

化合物 6(0.1-3mg/ml)与 PRP 温育一(1)分钟,引起血小板聚集的浓度依赖性抑制。在最高浓度(3mg/ml)下,化合物 6 接近最大抑制聚集反应。化合物 6 的 IC_{50} 为 $600 \pm 34 \mu\text{g/ml}$ 。

10

化合物 6($100 \mu\text{g/ml}$)以一(1)分钟后无效的浓度与 PPP 温育四(4)小时,引起活性提高,达到 85%的血小板聚集抑制率。化合物 6 的在(4)小时温育后的 IC_{50} 为 $60 \pm 5 \mu\text{g/ml}$ 。由于在上述温育期后活性微弱,所以没有进一步评价其他浓度。

15

化合物 6 和含水载体的温育对抗血小板活性在任何试验时间点没有影响。

化合物 7 对血小板聚集的影响

20

化合物 7(10mg/ml)以最高浓度与 PRP 温育一(1)分钟,无法显著抑制聚集反应。

化合物 7(10mg/ml)与 PPP 或含水载体四(4)小时的温育,表现出活性没有提高。由于在上述温育期后活性微弱,所以没有进一步评价其他浓度。

25

结论

本发明研究证实了前列环素的苯并茛苈生物,化合物 X 在人富血小板血浆中的有效体外抗血小板聚集活性,利用光学凝集计测定。在本研究中这种化合物在与血小板混悬液温育一(1)分钟后,其功效类似

30

于上述的实施例 4。在上述研究中，通过和无血小板血浆或含水载体在 37℃下温育四(4)小时对于抗血小板活性没有影响，证明了其在生理条件下的化学稳定性。

5 本研究的发现表明，化合物 X 具有明显高于二乙酸酯衍生物，化合物 4 的抗血小板活性，二乙酸酯的活性约低 3,000 倍。这种乙酰化衍生物在与血浆或含水载体温育时其活性在开始十(10)分钟内提高了约 10 倍，但这种活性的提高在温育四(4)小时后不再增高。这种早期增高的机理可以反映出二乙酸酯在与 PPP 介质温育时的瞬时不稳定性。

10

本研究还表明，化合物 X 具有比化合物 4-7 明显高的抗血小板活性。化合物 6 在与富血小板血浆温育一(1)分钟后是三种 PEG 偶联衍生物(化合物 5-7)中活性最高的，但有效性明显低于化合物 X，活性低约 3×10^4 倍。

15

在于贫血小板血浆(PPP)温育四(4)小时的作用下，化合物 5-7 的抗血小板活性有所变化。利用人血浆无法体外试验大于四(4)小时的时间点，因为血小板聚集反应在收集后 6 小时快速衰减。化合物 5 和 6 的活性在四(4)小时的温育后提高了 10 倍以上，当在盐水中温育时没有观察到这种作用。这些发现表明这些 PEG 偶联衍生物(化合物 5-7)的活性基团在人血浆中存在的酶的作用下、在 37℃下温育四(4)小时后以时间依赖方式释放，即在人血浆中这些分子上的酯基和乙酸酯基分别水解。然而，应注意到由这些化合物观察到的活性提高基本上低于实施例 4 中研究的某些化合物。

20

25

有关化合物 5-7 的上述发现表明，分子量 20,000 道尔顿的 PEG 部分以及乙酸酯基的包含降低了化合物 X 的抗聚集活性。然而，化合物 5 和 6 的活性在与人血浆温育四(4)小时时提高，这表明这些取代基水解。在与人血浆温育 4 小时后观察到这些化合物的活性提高了 10

30

倍，但当单独在缓冲液中温育时活性不提高，这表明这些衍生物中的酯键和酰胺键被酶促水解，同时释放活性基团。上述发现证实了创造出基于 PEG 取代的化合物 X 的缓释衍生物，它们可以在人血浆中活化。所述抗聚集反应有益于维持全身和肺部系统较低的血管阻力，用以改善血流，特别是用在充血性心力衰竭患者中。

实施例 9

化合物 X 和化合物 4-7 在麻醉大鼠中的体内全身血液动力学影响介绍

在本研究中，观察化合物 4-7 在硫喷妥钠麻醉大鼠中的心血管活性。测定在快速浓注静脉内注射后这些化合物对血压(BP)和心搏率的影响。记录启动的时间和最大反应，以及反应回归到基线所需的时间。各化合物以单剂量向各只动物给药，建立剂量-反应曲线。

在它们的其他作用中，化合物 4-7 体外引起肠系膜动脉的浓度依赖性松弛，当静脉内给予麻醉大鼠时，这造成平均动脉血压(MAP)的可测量减少。为了证实化合物 4-7 比化合物 X 的有效寿命有所改进，申请人寻找到测量 MAP 随时间的变化，外推出化合物的有效寿命，其被定义为反应回归到基线值的 50%所需要的时间。在其他作用中，降低血管中的血压对于治疗充血性心力衰竭是有益的，通过降低血管血流阻力来进行，这实质上降低施加在心脏上的工作负荷。结果，心脏不需要费力地经这些血管泵血。

材料和方法

本研究包括选用硫喷妥钠(Intraval®, 120mg kg⁻¹ i. p.)麻醉的雄性 Wistar 大鼠插入导管便于呼吸。将右颈动脉插导管并且和血压传感器(Spectramed P23XL)相连，用于测量平均动脉血压(MAP)和心搏率(HR)，连续记录在 4 道 Grass 7D 多种波动描记器(Grass, Mass., USA)。在左股静脉或右颈静脉插管用于给药。试验动物的体温利用直肠探针式温度计维持在 37±1 °C，该温度计与恒温毯式控制单元(Harvard

Apparatus Ltd)相连。

15 分钟稳定期后，给动物分别静脉内注射选定单剂量的天然化合物 X 和化合物 4-7，并且连续监测 3 小时的血液动力学参数，以确定被研究化合物的作用时间。

结果

化合物 4 分别以 1、3 和 10mg/kg 的静脉内剂量的给药引起 MAP 快速的、剂量相关性衰减，其与心搏率的剂量依赖性加快相关联。注射 1mg/kg 后，约 30mm Hg 的 MAP 最大衰减出现在该化合物给药后 30 分钟。由 1mg/kg 的化合物 4 引起的 MAP 衰减的有效寿命约为 110 分钟。

一个剂量的化合物 X 的给药(1mg/kg i.v.)引起与最高剂量的化合物 4(10mg/kg i.v.)相似的 MAP 最大衰减。当和化合物 X 进行比较时，化合物 4 引起的 MAP 衰减实质上持续时间更长，同时其有效寿命约为 90 分钟，而化合物 X 的为 30 分钟。化合物 4 的作用时间比 10 倍最大剂量的化合物 X 所激发的作用时间长。这个发现表明，由该衍生物观察到的作用时间的增加是超大剂量的化合物 X 所无法获得的。此外，化合物 4 引起的心动过速比化合物 X 引起的心动过速开始得慢。应注意化合物 4 引起的心动过速在化合物注射后 3 小时仍然非常显著。

化合物 5(3、10 和 30mg/kg i.v.)的给药引起 MAP 剂量相关性衰减，其不如化合物 4 或化合物 X 所引起的那样明显，并且其与心搏率的明显加快无关。反应在 15 分钟后达到其最大值，同时作用时间非常长，有效寿命约为 120 分钟。

化合物 6(3、10 和 30 mg/kg i.v.)的给药引起 MAP 即时、剂量相关性衰减，其启动缓慢并且出现在较高剂量，在该化合物注射后 3 小

时达到最大。在 10 分钟内最大衰减约为 60mm Hg。然而，该反应的起始相的持续时间较短，随后是一个血压向静止值恢复的平缓相。令人感兴趣地，化合物 6 没有引起心搏率明显改变。

5 化合物 4 和化合物 6 均使 MAP 快速和明显衰减。然而，在化合物 4 的情况中，MAP 的衰减还伴随着心搏率的明显加快。虽然化合物 4 所产生的 MAP 衰减持续较长的时间，但是 MAP 的快速衰减和造成的心动过速对于安全性而言是不利的。

10 相反，化合物 7(3、10 和 30mg/kg i.v.)引起 MAP 渐进式衰减，其在 135-165 分钟后才达到其平台水平。该渐进式衰减逐步进行并且在 3 小时试验期结束时达到约 30mm Hg 的最大值。MAP 的这种衰减与心动过速无关。

15 结论

 本发明化合物的心血管性能能够定义某些结构-活性关系，由此设计表现出较长的作用时间的化合物 X 衍生物。此外，上述化合物可以制成缓慢开始起作用，其使任何能潜在压迫和损伤心脏的初期低血压危象的可能性最小化。比较 5,000 或 20,000 道尔顿 PEG 偶联的化合物的性能，虽然两种 PEG 的大小在 MAP 性能和降血压作用的时间上没有差异，但存在一种趋势，含有 20,000 道尔顿 PEG 的化合物对心搏率的作用较小。需要进一步考虑潜在的与反射性心动过速缺失有关的临床优越性。

25 比较经酰胺或酯键与 PEG 取代基相连的化合物的性能，表明对于酰胺键，MAP 衰减的启动比用酯键观察到的更缓慢，并且没有观察到诱发反射性心动过速。

实施例 10

30 化合物 2 的皮下给药在麻醉大鼠中的全身血液动力学作用

皮下给药后评价化合物 2。雄性 Wistar 大鼠(250-330)用硫喷妥钠 (INTRAZAL[®], 120mg/kg i.p.)麻醉。插入导管便于呼吸。将右颈动脉插导管并且和血压传感器(Spectramed P23XL)相连, 用于测量平均动脉血压(MAP)和心搏率(HR), 连续记录在 4 道 Grass 7D 多种波动描记器 (Grass, Mass., USA)。试验动物的体温利用直肠探针式温度计维持在 37±1℃, 该温度计与恒温毯式控制单元(Harvard Apparatus Ltd)相连。15 分钟稳定期后, 化合物 2 以快速浓注皮下注射到颈内。

化合物 2 的皮下给药(30mg/kg s.c.)引起 MAP 大的衰减, 其启动缓慢并且在该化合物注射后 45 分钟时达到最大。此外, 化合物 2 引起心搏率加快。当与实施例 5 的化合物 2 的静脉内给药(30mg/kg i.v.)对比时, 皮下给药引起的 MAP 的长时间持续衰减更加明显, 但启动较慢。3 小时时, 产生较大的数值, 它大于同一化合物静脉内给药所产生的数值。值得对这种和其他化合物的皮下给药进行进一步的分析。

实施例 11

化合物 X、化合物 4、化合物 7 和 mPEG5kDa-酰胺-化合物 X 二乙酸酯的皮下给药在麻醉大鼠中的体内全身血液动力学作用

化合物 X、化合物 4、化合物 7 和 mPEG5kDa-酰胺-化合物 X 二乙酸酯(此后称作化合物 8)在皮下给药后进行评估。用硫喷妥钠 (INTRAVAL[®], 120mg/kg i.p.)麻醉雄性 Wistar 大鼠(250-330g)。插入导管便于呼吸。将右颈动脉插导管并且和血压传感器(Spectramed P23XL)相连, 用于测量平均动脉血压(MAP)和心搏率(HR), 连续记录在 4 道 Grass 7D 多种波动描记器(Grass, Mass., USA)。试验动物的体温利用直肠探针式温度计维持在 37±1℃, 该温度计与恒温毯式控制单元(Harvard Apparatus Ltd)相连。15 分钟稳定期后, 化合物 X、化合物 4、化合物 7 或化合物 8 以快速浓注皮下注射到颈内。

所述化合物 8 按照类似于实施例 1 的化合物 1 的方法制备。该化

合物为第 4 组的化合物,其中 Z_1 是分子量约为 20,000 道尔顿的 mPEG, X 是 NH 和 Z_2 是乙酰基。

结果

5 化合物 4 分别以 1、3 和 10mg/kg 的皮下剂量的给药引起 MAP 剂量相关性衰减,其还和心搏率的剂量依赖性加快有关。注射 1mg/kg 后, 26mm Hg 的 MAP 最大衰减出现在该化合物给药后 60 分钟,并且在 210 分钟时出现另一次 28 mm Hg 的最大衰减。由化合物 4 的三种剂量分别引起的 MAP 衰减的有效寿命分别为>300、>330 和>300 分钟
10 (参见表 5)。

 化合物 X(0.1、0.3 和 1mg/kg s.c.)的给药引起 MAP 的快速、剂量相关性衰减,其与心搏率的剂量依赖性加快有关。(参见表 4)。皮下注射 1mg/kg 后,约 70 mm Hg 的 MAP 最大衰减出现在该化合物给药后
15 15 分钟。当和化合物 X 相比,化合物 4 引起的 MAP 衰减持续时间很长。化合物 4 引起的心动过速在启动时比化合物 4 引起的心动过速要慢很多,应注意化合物 4 引起的心动过速对于 10mg/kg 的剂量在该化合物注射后 6 小时仍然明显。在较低剂量下,对于 1mg/kg 和 3mg/kg,心搏率分别在注射后约 5 分钟和 45 分钟稳定。

20 化合物 7 的给药(3、10 和 30mg/kg)引起 MAP 渐进式、进行性剂量相关性衰减,其连续衰减至注射后 6 小时。活性的数值比天然化合物 X 和化合物 4 低。对于 3、10 和 30mg/kg 的剂量 MAP 的最大衰减分别为 35、29 和 25 mm Hg。全部最大衰减是在注射后约 330 至 360
25 分钟出现(参见表 6)。

 化合物 8(3、10 和 30mg/kg s.c.)引起 MAP 的缓慢剂量相关性衰减,并且在最大剂量注射后约 240 分钟达到约 24mm Hg 的最大值。有效寿命大于 120 分钟 (参见表 7)。

30

这一时间延长的动脉压降低实质上帮助降低血管阻力，由此在较长时间减轻与充血性心力衰竭相关的病症。

表 4

5 化合物 X(皮下给药)约 6 小时期间测量的平均动脉压(mm Hg)

时间 (分钟)	载体	化合物 X		
		0.1 mg/kg	0.3 mg/kg	1 mg/kg
0	121±6	123±6	121±6	134±6
1	127±4	111±6	91±11	82±4
5	124±5	83±7	70±9	67±5
10	124±3	81±6	69±11	67±6
15	124±2	78±4	71±11	63±7
30	122±3	82±6	80±11	67±4
60	116±4	90±7	88±9	75±3
120	114±5	97±10	101±12	88±5
180	112±5	101±13	111±10	98±6
240	-	102±13	103±8	93±8
360	-	100±13	92±5	95±9
Δ _{最大} 时间	9±4 ¹⁸⁰	46±5 ¹⁵	52±12 ¹⁰	71±8 ¹⁵
t _{1/2}	-	165	80-110	135-290
n	3	5	5	5

表 5

化合物 4(皮下给药)约 6 小时期间测量的平均动脉压(mm Hg)

时间 (分钟)	载体	化合物 4		
		1 mg/kg	3 mg/kg	10 mg/kg
0	121±6	115±11	119±7	128±6
1	127±4	116±9	116±7	116±7
5	124±5	110±9	96±6	107±7
10	124±3	104±8	86±6	92±8
15	124±2	99±6	82±6	95±5
30	122±3	93±4	78±4	86±6
60	116±4	90±5	82±4	83±5
120	114±5	91±5	86±3	82±6
180	112±5	92±5	87±4	86±5
240	-	87±3	86±4	86±6
360	-	94±3	86±5	81±9
Δ _{最大} 时间	9±4 ¹⁸⁰	26±6 ⁶⁰ , (28±7 ²¹⁰)	41±4 ³⁰	45±5 ⁶⁰ , (48±6) ¹⁵⁰
t _{1/2}	-	>300	>330	>300
n	3	5	5	5

表 6

化合物 7(皮下给药)约 6 小时期间测量的平均动脉压(mm Hg)

时间 (分钟)	mPEG 20kDa	化合物 7		
		3 mg/kg	10mg/kg	30 mg/kg
0	135±5	136±9	133	136±5
1	138±4	141±7	132	136±3
5	135±6	139±6	130	138±4
10	139±3	133±7	128	134±4
15	136±5	135±8	128	134±4
30	130±8	127±9	123	130±2
60	127±9	117±6	114	131±3
120	128±15	114±7	114	127±4
180	123±10	104±9	114	117±5
240	113±7	106±11	111	115±5
360	112±10	104±7	104	111±4
$\Delta_{\text{最大}}$ 时间	27±5 ³³⁰	35±8 ³³⁰	29±5 ³⁶⁰	25±9 ³⁶⁰
$t_{1/2}$	-	-	-	-
n	5	5	5	5

5

表 7

化合物 8(皮下给药)约 6 小时期间测量的平均动脉压(mm Hg)

时间 (分钟)	mPEG 5k	化合物 8		
		3 mg/kg	10mg/kg	30 mg/kg
0	113±11	119±11	116±6	134±8
1	111±14	124±11	117±12	133±8
5	110±13	122±10	119±7	135±8
10	109±15	121±9	115±5	132±8
15	103±14	122±9	116±4	132±7
30	105±12	119±10	105±9	127±8
60	103±13	123±11	110±1	121±8
120	97±8	122±11	108±2	113±8
180	98±10	119±9	105±2	116±8
240	-	112±7	108±6	109±5
360	-	110±15	113±5	111±5
$\Delta_{\text{最大}}$ 时间	-	14±12 ²⁷⁰	11±5 ³⁰	24±7 ²⁴⁰
$t_{1/2}$	17±4 ¹²⁰	-	-	>120
n	4	5	5	5

实施例 12

mPEG350Da-酰胺-化合物 X 二乙酸酯

此后称作“化合物 9”

- 5 按照下列方式制备第 4 组的化合物，其中 Z_1 是分子量约 350 道尔顿的 mPEG，X 为 NH 和各 Z_2 是乙酰基。

在圆底烧瓶中，将化合物 X(400mg)、mPEG(350Da)胺(360mg)、HOBT(15mg)和 DCC(267mg)在 20ml 无水二氯甲烷中混合，混合物在
10 室温下搅拌过夜。过滤除去不溶固体，有机溶液用 5%(重量)碳酸氢钠溶液洗涤。有机相用硫酸钠干燥，真空下除去溶剂。所得产物溶于 10ml 的乙腈，过滤除去不溶固体。向该溶液加入乙酸酐(3ml)和吡啶(0.3ml)。所得溶液在 40℃下加热过夜。向该溶液加入 300ml 的 5%(重量)碳酸氢钠溶液，该混合物在室温下搅拌 30 分钟。该混合物用二氯甲烷提
15 取，有机相用磷酸盐缓冲液(0.1M, pH 2)洗涤并且用硫酸钠干燥。除去溶剂并且在真空下干燥该产物。产量为 600mg(72%)。¹H NMR (DMSO-d₆) : δ 3.5 (br m, PEG), 7.897 (t, -PEGNH-CO- (化合物 X)), 1.91 (s, (化合物 X)-O¹COCH₃), 2.00 (s, (化合物 X)-O²COCH₃), 0.864 (t, (化合物 X)-CH₃), 4.436 (s, (化合物 X)-CH₂CONHPEG), 7.045 (t, 化合物 X 芳族质子), 6.7 (d+d, 化合物 X 芳族化合物)。
20

实施例 13

mPEG350Da-酯-化合物 X 二乙酸酯的合成

此后称作“化合物 10”

- 25 按照下列方式制备第 4 组的化合物，其中 Z_1 是分子量约 350 道尔顿的 mPEG，X 为 O 和各 Z_2 是乙酰基。

在圆底烧瓶中，将化合物 X(3g)和三乙胺(TEA, 1.5 μ l)在 100ml 无水乙腈中混合。向该溶液中加入 3ml 的乙酰氯。该混合物室温下搅拌
30 过夜。此溶液与 5%(重量)碳酸氢钠溶液混合，室温下搅拌 30 分钟。

水相用二氯甲烷提取。有机相用磷酸盐缓冲液(0.1M, pH 2)洗涤, 随后硫酸钠干燥。产量为 3.3g(80%)。¹H NMR (DMSO-d₆): 1.91 (s, (化合物 X)-O¹COCH₃), 2.00 (s, (化合物 X)-O²COCH₃), 0.84 (t, (化合物 X)-CH₃).

5 在圆底烧瓶中, 将 mPEG(350Da)(550 mg)、上步制得的化合物 X 二乙酸酯(750mg)、HOBT(60mg)、DMAP(150mg)和 DCC(375mg)溶于 30ml 无水二氯甲烷。该溶液在室温下搅拌过夜。经过滤除去不溶性固体, 用 5%(重量)碳酸氢钠溶液和磷酸盐缓冲液(0.1M, pH 2)洗涤该溶液。有机相用硫酸钠干燥, 真空下浓缩。所得产物溶于 10ml 乙腈中, 10 过滤除去不溶性固体。蒸发除去溶剂, 得到的产物为澄清油。产量 1g(76%)。 ¹H NMR(DMSO-d₆): δ 3.5 (br m, PEG), 4.23 (t, PEGOCH₂CH₂O-CO- (化合物 X)), 1.91 (s, (化合物 X)-O¹COCH₃), 2.00 (s, (化合物 X)-O²COCH₃), 0.84 (t, (化合物 X)-CH₃), 4.77 (s, (化合物 X)-CH₂COOPEG), 7.03 (t, 化合物 X 芳族质子), 6.7 (d+d, 化合物 X 芳族质子)。

15

实施例 14

评价 mPEG 350Da-酰胺-化合物 X 二乙酸酯在麻醉大鼠体内对全身性血液动力学的作用

20 在本研究中, 评价前列环素的化学上稳定的苯并茛类似物的新的低级聚乙二醇(PEG)衍生物, 化合物 X, 在静脉内和口服给药后在大鼠中的心血管活性。合成了 mPEG350Da-酰胺-化合物 X 二乙酸酯, 或此后称作化合物 9, 试图生产经口服途径有效的衍生物。口服有效类似物将使稳定的前列环素类似物在多种治疗应用中的临床潜力得到进

25 一步的发展。

上述研究评价了多种与不同分子量的基团相连的化合物 X 的衍生物。在那些研究中, 5,000 和 20,000 道尔顿的 PEG 的高分子量聚合物通过酯或酰胺键连接于天然化合物的不同区域, 同时还研究了乙酰化游离羟基的效果。其全身性血液动力学性能是在静脉内快速浓注给药

30

后的麻醉大鼠中进行研究，在后面的研究中，是在皮下快速浓注后进行。本研究评价了分子量 350 的 PEG 衍生物在静脉内或口服给药后对大鼠全身动脉血压的作用。

5 所评价的化合物

本研究中所用化合物是乙酰化 mPEG 350Da 化合物 X-酰胺(mPEG 350-NHCO-化合物 X-Ac)，此后称作“化合物 9”，其中分子量为 350 道尔顿的 PEG 是经酰胺键与化合物 X 的羧基连接并且化合物 X 的羟基被乙酰化。

10

通用方法

本发明的这组研究是针对上述化合物在硫喷妥麻醉大鼠中的心血管活性。在这些研究中，观察到化合物 9 在快速浓注静脉内和口服给药后对血压(BP)和心搏率的影响。测定启动的时间和最大反应，以及反应回归到基线值的 50%所需要的时间。各化合物以单剂量给予各组的各个动物，建立剂量-反应关系，测定静脉内给药后 3 小时和口服给药 6 小时的心血管参数。

15

20

用硫喷妥钠(INTRAVAL[®], 120mg/kg i.p.)麻醉雄性 Wistar 大鼠(250-330g)。插入导管便于呼吸。将右颈动脉插导管并且和血压传感器(Spectramed P23XL)相连，用于测量平均动脉血压(MAP)和心搏率(HR)，连续记录在 4 道 Grass 7D 多种波动描记器(Grass, Mass., USA)。在左股静脉或右颈静脉插管用于给药。试验动物的体温利用直肠探针式温度计维持在 37±1℃，该温度计与恒温毯式控制单元(Harvard Apparatus Ltd)相连。

25

静脉内给药的方法

30

将化合物 9 溶于绝对乙醇得到 200mg/ml 的储备液，其保存在-20℃的冰箱中。在使用前即时取出储备液的试样，并且溶于盐水中。大鼠接受 3、10 和 30mg/kg 的化合物 9，也就是接受 0.3ml 的 1.5%、5%

和 15%的乙醇。在对照组中，大鼠接受最高浓度的乙醇，0.3ml 的 15 %乙醇溶液。

5 15 分钟稳定期后，化合物 9(3、10 和 30mg/kg)以静脉内快速浓注给药。

口服给药的方法

将橡胶导管置于胃内(经食道)便于口服给药。20 分钟稳定期后，化合物 9 共计 1ml 的大丸剂经此导管给药。

10

化合物 9 溶于绝对乙醇中得到 200mg/ml 的储备液中，将其保存在-20℃的冰箱内。在使用之前即时取出储备液的试样，并且溶于盐水中。接受 30mg/kg 化合物 9 的大鼠也就是接受 1.0ml 的 15%乙醇。在对照组中，大鼠接受 1ml 的 15%乙醇溶液。

15

本研究是在未禁食动物中进行，它们在餐后胃内含有食物，或研究之前 15 小时未进食的大鼠。

静脉内给药的结果

20

在麻醉大鼠中，静脉内注射化合物 9(3、10 和 30mg/kg i.v.)引起 MAP 快速剂量依赖性衰减(参见表 8A)，但对心搏率的影响不显著。采用最大剂量，这种降血压反应在 15 分钟内达到其峰值，而且具有较长的作用时间，同时有效寿命至少为 120 分钟。应注意，较高剂量的化合物 9 可以引起心搏率暂时性衰减(参见表 8B)。

25

在此观察到的时间延长的动脉压降低实质上帮助降低血管阻力，由此在较长时间内减轻与充血性心力衰竭相关的病症。

表 8A

化合物 9 的静脉内给药的剂量反应

(平均动脉压, mm Hg)

时间 (分钟)	乙醇载体	化合物 9		
		3 mg/kg	10 mg/kg	30 mg/kg
0	131±10	121±7	128±10	137±7
1	123±10	117±9	109±10	92±8
5	123±10	111±6	114±6	96±8
10	122±10	108±4	114±6	99±6
15	122±10	109±4	112±4	101±5
30	123±10	110±6	109±6	103±8
45	122±9	110±3	108±4	106±7
60	118±9	110±5	100±4	105±3
75	117±9	112±5	105±7	105±5
90	115±8	108±7	106±5	104±5
105	115±7	107±6	108±6	104±3
120	116±9	107±7	105±5	105±4
135	112±8	106±6	106±6	107±4
150	108±7	107±7	107±5	107±4
165	108±7	110±8	105±4	107±3
180	109±8	113±8	108±5	109±4
$\Delta_{\text{最大}}$ 时间	23±4 ¹⁵⁰	15±3 ¹⁰⁵	28±11 ⁶⁰	45±4 ¹
$t_{1/2}$	-	-	-	-
n	6	5	5	5

表 8B

化合物 9 的静脉内给药的剂量反应
(心搏率)

时间 (分钟)	乙醇载体	化合物 9		
		3 mg/kg	10 mg/kg	30 mg/kg
0	379±23	333±8	361±18	391±19
1	380±22	354±14	313±8	318±23
5	394±22	364±18	331±13	322±19
10	392±25	351±19	339±13	348±14
15	393±28	346±22	344±17	359±17
30	392±30	341±23	322±13	384±21
45	394±30	353±20	322±12	395±13
60	385±29	337±13	358±17	390±11
75	380±25	355±18	346±12	387±9
90	393±24	352±18	356±27	378±11
105	372±26	347±17	342±8	376±11
120	367±25	346±20	363±14	371±13
135	358±25	350±15	347±7	371±10
150	363±25	353±15	376±21	373±13
165	363±26	361±16	336±15	368±12
180	353±25	358±10	364±20	368±12
n	6	5	5	5

5 口服给药的结果

在麻醉大鼠中，化合物 9(30mg/kg)对进食或饥饿大鼠的口服给药均引起 MAP 衰减，该衰减启动缓慢，进行性衰减并且长时间作用(参见表 9A)。MAP 的衰减在 120 分钟后达到其峰值，并且在 6 小时的观察期结束时 MAP 始终被抑制。在观察期 6 小时结束时观察到约 33 mm Hg 的 MAP 最大衰减。然而应注意，含有乙醇载体(0.3ml 15%乙醇)也引起 MAP 小的、渐进式衰减，其启动缓慢并且在 6 小时后达到 20 mm Hg 的最大值(参见表 9A)。对化合物 9 的血管减压反应在进食或饥饿大鼠之间没有差异。

乙醇载体引起心搏率进行性衰减(参见表 9B)，这种衰减比试验药物本身引起的任何心搏率衰减都更加显著(参见表 9B)。

在此观察到的时间延长的动脉压降低实质上帮助降低血管阻力，
由此在较长时间内减轻与充血性心力衰竭相关的病症。

5

表 9A

对化合物 9 的口服给药的反应

(平均动脉压, mm Hg)

时间 (分钟)	乙醇载体	化合物 9 (30 mg/kg)	
		进食	饥饿
0	139±4	135±7	133±4
1	132±4	132±8	134±6
5	127±7	121±7	129±6
10	130±6	120±8	125±6
15	131±5	116±10	122±5
30	133±8	109±11	117±5
45	131±7	109±11	114±6
60	131±8	112±8	113±6
90	123±5	114±8	111±8
120	124±9	107±9	103±9
150	127±9	105±10	109±5
180	120±12	107±8	111±5
210	127±8	107±8	114±8
240	122±8	106±9	108±8
270	120±7	104±12	104±7
300	123±2	104±9	101±9
330	120±5	104±9	102±9
360	119±6	104±8	102±10
$\Delta_{\text{最大}}$ 时间	20±7 ³⁶⁰	33±9 ³⁶⁰	31±9 ³⁶⁰
$t_{1/2}$	-	-	-
n	5	5	5

表 9B

对化合物 9 的口服给药的反应
(心搏率)

时间 (分钟)	乙醇载体	化合物 9 (30 mg/kg)	
		进食	饥饿
0	389±15	384±20	383±10
1	375±20	375±21	381±10
5	369±17	377±19	376±10
10	379±15	388±15	382±9
15	368±19	385±19	378±11
30	366±20	364±21	367±14
45	388±25	360±21	379±8
60	372±24	365±23	380±11
90	348±18	355±21	378±17
120	349±27	343±21	369±20
150	332±19	342±14	373±20
180	321±13	361±19	368±19
210	337±25	353±19	374±15
240	318±11	353±18	366±19
270	307±15	305±27	343±28
300	321±20	316±20	349±24
330	303±18	341±19	356±27
360	314±17	343±18	355±32
n	5	5	5

5

结论

这些在大鼠中化合物 9 的静脉内给药的发现表明, 该分子具有快速启动的作用和长时间的效应。然而, 虽然分子量低 10 倍, 但化合物 9 作为降血压药的效价可以和早期研究报导的 mPEG 5kDa-酰胺化合物 X(化合物 1)的相比。其原因不很清楚, 但可以反映出向活性物质的缓慢转化。这种可能性难以用 PEG 衍生物的现有知识作出解释, 但可代表酰胺键的酶促水解的重要特征, 以及去除保护性的乙酰基成为羟基。低分子量 PEG 可以比更刚性更高分子大小的 PEG 基团受到更少约束, 并且不会使化合物 X 上的酰胺键充分暴露, 令该分子不易被

10

攻击并且释放出活性物质。不同大小取代基如何影响化合物 X 的苯并茛化学主链上静电荷的分布仍不清楚，但这也可以调控 PEG 类似物的水解速率或随后释放游离天然化合物 X 的速率，假设游离天然化合物 X 是诱发降血压反应的活性物质。

5

经酰胺键连接 5,000 道尔顿或 20,000 道尔顿 PEG 的二乙酰化化合物，其静脉内给药的早先研究显示，乙酰化作用导致该分子产生小的 MAP 渐进式衰减，同时恢复速率缓慢。MAP 的渐进式衰减与反射性心动过速无关。相反，在本发明研究中，化合物 9 具有快速启动的作用，并且和心搏率的初始衰减有关。因此，在通过酯基或酰胺基相连的分子量为 5,000 或 20,000 道尔顿的 PEG 中经乙酰化保护的羟基，不调控低分子量化合物中活性物质的释放。这是否也适用于低分子量乙酰化酯类衍生物还有待于进一步研究。但是，这对于未连接 PEG 的化合物 X 的乙酰化形式同样产生快速启动的作用具有重要意义。这表明，这种在肠胃外给药后减弱作用的快速启动的化学途径只有大于 350 道尔顿的 PEG 衍生物才能实现。

10

15

20

25

口服给药后，虽然衰减的大小在载体(含有乙醇作为溶剂用于溶解所提供的油)所引起的小的 MAP 渐进式衰减的作用下难以辨认，但最高剂量的化合物 9 的确产生了 MAP 渐进式衰减。由于这种作用的数值，没有再研究更低剂量。然而，比较禁食和进食大鼠中的这种血压降低作用，数据表明在这两种条件下生物利用度相当。由于化合物 9 在静脉内给药和口服给药后的血压性能的差异性，这些研究中难于测定出口服途径的绝对生物利用度。

30

先前发现，乙酰化 mPEG 5,000 或 20,000 道尔顿化合物 X 酰胺衍生物的血液动力学性能在静脉内或皮下给药后相类似，这表示这些类似物缓慢激活、随后缓慢代谢或消除。相反地，本发明有关化合物 9 的研究表明，虽然其分子量较低，但这种化合物不产生增高的效价，在非肠道给药后对心血管活动的作用的缓慢启动没有潜在益处。然

而，使用低分子量的 PEG 衍生物，就可以提供合理的化学方式，开发新的、长效口服吸收的前列环素衍生物。

实施例 15

5 评价 mPEG 350 Da-酯-化合物 X 二乙酸酯在麻醉大鼠体内对于全身血液动力学的作用

10 本研究中，评价前列环素的化学上稳定的苯并茛类似物化合物 X 的低级聚乙二醇(PEG)衍生物在静脉内给药后在大鼠中的心血管活性。合成 mPEG 350Da-酯-化合物 X 二乙酸酯(此后称作“化合物 10”)，尝试研究该化合物对全身血液动力学的影响。

评价的化合物

15 试验化合物是乙酰化 mPEG 350 Da-酯-化合物 X，此后称作“化合物 10”，其中分子量 350 道尔顿的 mPEG 与化合物 X 的羧基经酯键相连，并且化合物 X 的羟基乙酰化。

方法

20 用硫喷妥钠(INTRAVAL[®], 120mg/kg i.p.)麻醉雄性 Wistar 大鼠(250-330g)。插入导管便于呼吸。将右颈动脉插导管并且和血压传感器(Spectramed P23XL)相连，用于测量平均动脉血压(MAP)和心搏率(HR)，连续记录在 4 道 Grass 7D 多种波动描记器(Grass, Mass., USA)。左股静脉或右颈静脉插管用于给药。试验动物的体温利用直肠探针式温度计维持在 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，该温度计与恒温毯式控制单元(Harvard Apparatus Ltd)相连。

25

15 分钟稳定期后，化合物 10 以静脉内快速浓注给药(0.3、3、10 和 30mg/kg)。

30 化合物 10 溶于乙醇中，保存在 -20°C 。在使用前取出储备液的试样在含水载体中稀释。

结果

5 化合物 10(0.3、3、10 和 30mg/kg i.v.)的静脉内给药引起 MAP 剂量相关性衰减(参见表 10A)。较高剂量的化合物 10(10 和 30mg/kg)诱发心搏率小幅度加快或反射性心动过速，其在化合物 10 的给药后 45 分钟时达到最大(参见表 10B)。

表 10A

对化合物 10 的静脉内给药的剂量反应
(平均动脉压, mm Hg)

10

时间 (分钟)	化合物 10			
	0.3 mg/kg	3 mg/kg	10 mg/kg	30 mg/kg
0	110±8	135±6	122±4	142±7
1	104±7	113±6	94±4	117±2
5	105±7	101±9	88±6	108±9
10	106±7	106±7	87±4	111±7
15	103±7	108±5	86±3	112±8
30	106±7	102±4	87±5	111±8
45	105±7	111±5	92±5	104±3
60	103±7	104±2	92±7	107±3
75	108±8	110±4	91±5	108±4
90	102±8	109±3	89±6	107±4
105	100±8	106±2	91±4	108±4
120	108±10	108±3	92±3	112±8
135	111±9	106±2	90±3	110±6
150	108±8	106±7	91±5	112±8
165	106±7	104±4	91±4	110±6
180	104±8	104±2	89±2	111±8
Δ _{最大} 时间	10±4 ¹⁰⁵	33±5 ³⁰	36±4 ¹⁵	41±10 ⁵
t _{1/2}	15	-	-	-
n	5	5	5	5

表 10B

对化合物 10 的静脉内给药的剂量反应

(心搏率)

时间 (分钟)	化合物 10			
	0.3 mg/kg	3 mg/kg	10 mg/kg	30 mg/kg
0	408±15	428±20	387±14	384±10
1	420±13	438±18	396±12	396±10
5	421±16	420±25	408±15	400±7
10	421±16	420±25	417±14	414±14
15	425±17	426±24	423±15	414±18
30	423±15	435±22	426±18	429±19
45	441±17	447±17	441±16	423±17
60	420±16	444±15	429±13	420±13
75	420±20	444±11	429±13	414±10
90	423±19	441±9	418±8	417±19
105	429±17	423±10	417±10	407±13
120	426±22	426±12	411±8	408±12
135	426±22	421±8	402±6	399±15
150	432±27	429±9	402±9	400±14
165	423±26	426±11	393±9	402±12
180	415±32	429±9	393±11	393±14
Δ _{最大} 时间	33±11 ⁴⁵	19±7 ⁴⁵	54±10 ⁴⁵	45±20 ³⁰
t _{1/2}	~45	75	75	~90
n	5	5	5	5

5 比较化合物 10 的全身血液动力学作用和实施例 12 中化合物 9 所产生的作用。

10 在 3mg/kg 的剂量下，由化合物 10 引起的 MAP 衰减比化合物 9 引起的(最大:约 15mm Hg)更显著(约 30 mm Hg)。两种化合物对心搏率的影响类似。

在 10mg/kg 的剂量下，由化合物 10 引起的 MAP 衰减比化合物 9 引起的(最大:约 25mm Hg)更显著(约 33 mm Hg)。化合物 10 引起轻微的心搏率加快，而化合物 9 似乎引起心搏率轻微降低。由化合物 9 观

察到的心搏率降低可以归因于在化合物 9 载体中乙醇的浓度(4.5% v/v)高于用作化合物 10 载体的乙醇终浓度(2.5% v/v)。

5 在 30mg/kg 下，化合物 10 和化合物 9 引起的 MAP 最大衰减相似(约 45 mm Hg)。化合物 10 造成心搏率轻微加快，而化合物 10 似乎使心搏率轻微降低。后者的作用也可以归因于在化合物 9 的载体中(15% v/v)和在化合物 10 的载体中(8.5% v/v)的乙醇浓度的差异。

10 将化合物 10 的全身血液动力学效应也与由 mPEG 5kDa-酯-化合物 X 二乙酸酯(化合物 2)或 mPEG 20kDa-酯-化合物 X 二乙酸酯(化合物 5)引起的效应作对比。显然，根据结果，MAP 的衰减取决于 PEG-部分的大小，具有最低 PEG 分子量的化合物激发最大的 MAP 衰减。例如，在 10mg/kg 下，化合物 10 激发的 MAP 最大衰减是 35 mm Hg，而化合物 5 引起的 MAP 衰减为 20 mm Hg。同样地，含最低分子量 PEG
15 的化合物引起最大反射性心动过速。

在 30mg/kg 下，化合物 10 激发的 MAP 最大衰减是约 40mm Hg，而化合物 5 引起的 MAP 衰减约为 30 mm Hg。所有化合物对心搏率的影响相似。

20

将化合物 9 的全身血液动力学影响与由 mPEG 5kDa-酰胺-化合物 X 二乙酸酯(化合物 8)或 mPEG 20kDa-酰胺-化合物 X 二乙酸酯(化合物 7)引起的效应作对比。

25 MAP 的衰减取决于 PEG 部分的大小，含有最低分子量 PEG 的化合物激发最快的 MAP 衰减。譬如，在 10mg/kg 下，化合物 9 在 1 分钟内激发的 MAP 衰减约为 20 mm Hg(最大：约 25 mm Hg，在 60 分钟时)，而化合物 7 在 1 分钟内引起的 MAP 衰减可以忽略不计(最大：约 30 mm Hg，在 180 分钟)。溶于乙醇中的化合物 9(4.5%)引起心搏率
30 轻微降低。而其它化合物(溶于醋酸盐缓冲液)对心搏率没有影响。

在 30mg/kg 下,化合物 9 在 1 分钟内激发的 MAP 衰减约为 45 mm Hg (最大: 约 45 mm Hg, 在 1 分钟时), 化合物 7 在 1 分钟内引起的 MAP 衰减忽略不计(最大: 约 30 mmHg, 在 180 分钟时)。溶于乙醇中的化合物 9(15%)引起心搏率明显衰减, 而其它化合物(溶于醋酸盐缓冲液)对心搏率没有影响。

实施例 16

化合物 X 和 PEG 偶联的化合物 X 在绵羊体内对肺血管高血压的影响

监测各绵羊测量肺动脉压(PPA)、左动脉压(PLA)、全身动脉压(PSA)、心输出量(CO)和心搏率(HR)。在整个试验中从绵羊对象采集血浆样本测量血液中的药物水平。试验开始时是以常规方式将已知的肺动脉高血压诱导剂静脉内输注。调节诱导的速率使肺血管阻力(PVR)提高到初始基线 PVR 的 3 至 4 倍。PVR 计算作 PPA 和 PLA 之间的差, 除以 CO。在稳定期后, 经外科有备的气管切开术用 MEDICATOR[®] 气溶胶给药系统(Healthline Medical Inc., Baldwin Park, CA), 或经静脉内输注, 施用本发明前列腺素化合物的样本。

该试验测定静脉内输注 mPEG20kDa-酰胺-化合物 X 的效果, 该化合物的制备类似于实施例 1 的化合物 1 和实施例 3 中称作化合物 3 的 mPEG20kDa-酯-化合物 X, 及在肺动脉高压诱导过程中气溶胶化 mPEG 20kDa-酯-化合物 X(化合物 3)。参见图 1, 在约 15 分钟基线建立之后, 利用已知药物 (PGH2 类似物, U44069 或 9,11-二脱氧, 9 α ,11 α -环氧甲烷前列腺素 F_{2 α})的静脉内给药在绵羊中诱发肺动脉高压。使绵羊达到稳态约 85 分钟后, 静脉内输注 mPEG20kDa-酰胺-化合物 X(1.25g I.V.)。mPEG20kDa-酰胺-化合物 X 输注 75 分钟后, 在试验其余的时间内观察到肺部动脉高血压的完全逆转。

参见图 2, 使绵羊获得 30 分钟稳态后进行 mPEG20kDa-酯-化合物 X(1.25g I.V.)的静脉内快速浓注。在给药后 30 分钟内 PPA-PLA 读

数由约 28 cmH₂O 降低到约 17 cmH₂O。此后约 5 小时内血压抑制维持在同样的水平，并且此后在下一小时内逐渐升高至约 25 cmH₂O。

参见图 3，在 U44069 输注后令绵羊获得稳态约 30 分钟后，
5 mPEG20kDa-酯-化合物 X(0.625g)作为气溶胶给药约 1 小时。PPA-PLA 迅速由约 32.5 cmH₂O 降低至约 21 cmH₂O。在气溶胶输注中断之前血压略微上升至约 22.5 cmH₂O。在约另一个 135 分钟内血压稳定保持在约 22.5 cmH₂O，并且在此后 105 分钟内逐渐地上升至约 32.5 cmH₂O。

10 参见图 4，在输注 U44069 后令绵羊达到稳态约 30 分钟，随后给予较小静脉内快速浓注的 mPEG 20kDa-酯-化合物 X(0.625 g I.V.)。PPA-PLA 在约 1 小时的过程中由最大读数的约 37.5 降低至约 31 cmH₂O。血压在约 90 分钟内保持稳定，此后的约 1 小时内开始缓慢上升至约 35 cmH₂O。

15 参见图 5，在另一个试验中，利用和上述方法相同的方法，对比显示天然化合物 X 和按照类似于实施例 3 的化合物 3 制备的 mPEG5k-酯-化合物 X 之间在 U44069 诱导的肺动脉高压中的作用。在令 U44069 输注绵羊达到稳态约 90 分钟后，在 15 分钟内天然化合物 X 以 1μg/kg
20 在一种气溶胶制剂中给药。在此图中 PPA-PLA 水平正常化。在天然化合物 X 的气溶胶化输注结束后 10 分钟由约 11.25 cmH₂O 降低到约 5 cmH₂O。此后，仅在化合物 X 输注结束后 30 分钟后血压迅速升高至约 10 cmH₂O。

25 在 U44069 输注绵羊达到稳态约 90 分钟后，在约 15 分钟内 mPEG5k-酯-化合物 X 以 1mg/kg 作为气溶胶制剂给药。输注结束后 30 分钟血压出现急剧下降，由约 18.25 cmH₂O 降低到基线读数以下 1 cmH₂O。血压在此后一小时内保持抑制在约 1.5 cmH₂O。血压在此后约 2.5 小时内逐渐地上升至约 7.5 cmH₂O。血压在 mPEG5k-酯-化合物
30 X 的气溶胶化输注结束后整个 240 分钟内维持在最大读数的 50%以

下。

实施例 17

本发明前列腺素类化合物的气溶胶化给药在绵羊体内的全身血液动力学作用

通用方案

本发明前列腺素化合物对绵羊对象进行气溶胶化给药，测定所述化合物对全身血液动力学的影响。

监测每只绵羊的肺动脉压(PPA)、左动脉压(PLA)、全身动脉压(PSA)、心输出量(CO)和心搏率(HR)。在整个试验中从绵羊对象采集血浆样本测量血液中的药物水平。试验开始时是静脉内给予U44069(9,11-二脱氧, 9 α ,11 α -环氧甲烷前列腺素 F_{2 α} , 一种 PGH₂ 类似物)人为诱导肺动脉高血压。调节 U44069 输注的速率使肺血管阻力(PVR)提高到初始基线 PVR 的 3 至 4 倍。PVR 计算作 PPA 和 PLA 之间的差，除以 CO。在稳定期后，经外科有备的气管切开术用MEDICATOR[®] 气溶胶给药系统(Healthline Medical Inc., Baldwin Park,CA)，施用一种本发明的前列腺素化合物。

具体方案

A. 进行第一组试验测定本发明前列腺素类化合物的合理有效剂量，其可以逆转 U44069 诱导的肺部动脉高血压，并且确定所施用的本发明前列腺素类化合物的特定剂量的有效持续时间。

在对所列全部变量进行基线测量 20 分钟后，以足以引起 PVR 提高到其基线值的 3 至 4 倍的速率静脉内输注 U44069。10 分钟达到相对稳定反应后，将本发明的一种前列腺素类化合物作为气溶胶以 3000ng/kg/分钟的速率给药 60 分钟(即，对于 30 kg 的绵羊：3000 ng*30*60=5.4mg 药物或 270mg 的药物/PEG)。如果本发明的前列腺素类化合物对于升高的 PVR 产生了可测量效应，则连续输注 U44069 直

至观察到稳定反应。在达到稳定反应后，U44069 停止输注 20 分钟并且在下一个 10 分钟恢复。重复该过程直至 U44069 诱导的 PVR 提高不再被本发明前列腺素类化合物样本衰减。

5 如果样本化合物剂量在其给药的 30 至 60 分钟内无效，可以将剂量升高 3 倍。如果该样本化合物剂量有效，则选用新的绵羊对象并且用原剂量三分之一的新剂量重复该试验。重复这种方法直至测定出其最低有效剂量及其相应的有效剂量。

10 B. 进行第 2 组试验测定本发明前列腺素类化合物对对照绵羊的效应。在附加试验中制备本发明前列腺素类化合物的三种剂量。第一种剂量是由第一组试验中测定出的最低有效剂量。本发明前列腺素类化合物的第二种剂量是最低有效剂量的两倍，并且第三种剂量是最低有效剂量的 5 倍。监测相应剂量给药的绵羊，每一给药剂量最少进行
15 2 小时。

一只绵羊中静脉内输注 20kPEG-UT15(酰胺)
对 U44069 诱导肺血管高血压的作用

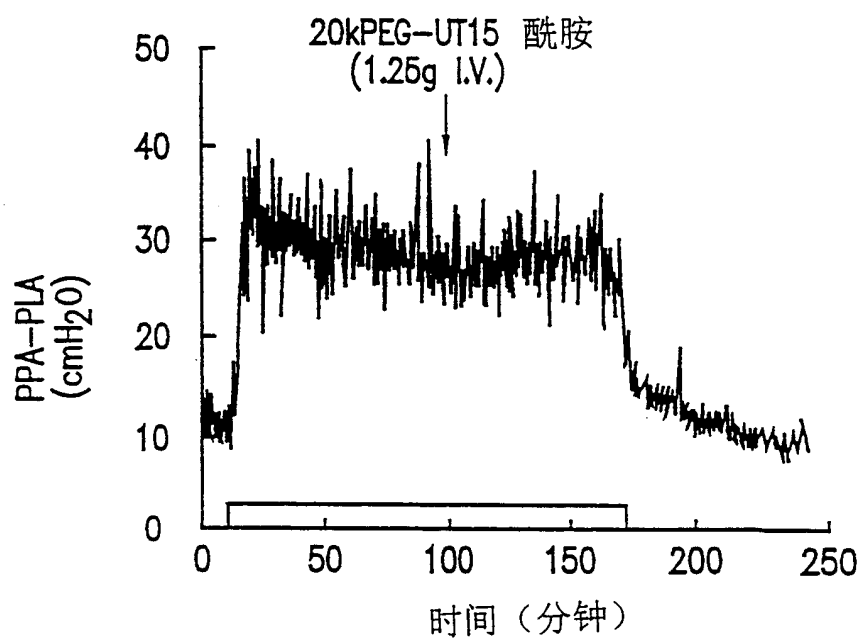


图 1

一只绵羊中静脉内快速浓注 20kPEG-UT15(酯)
对 U44069 诱导肺血管高血压的作用

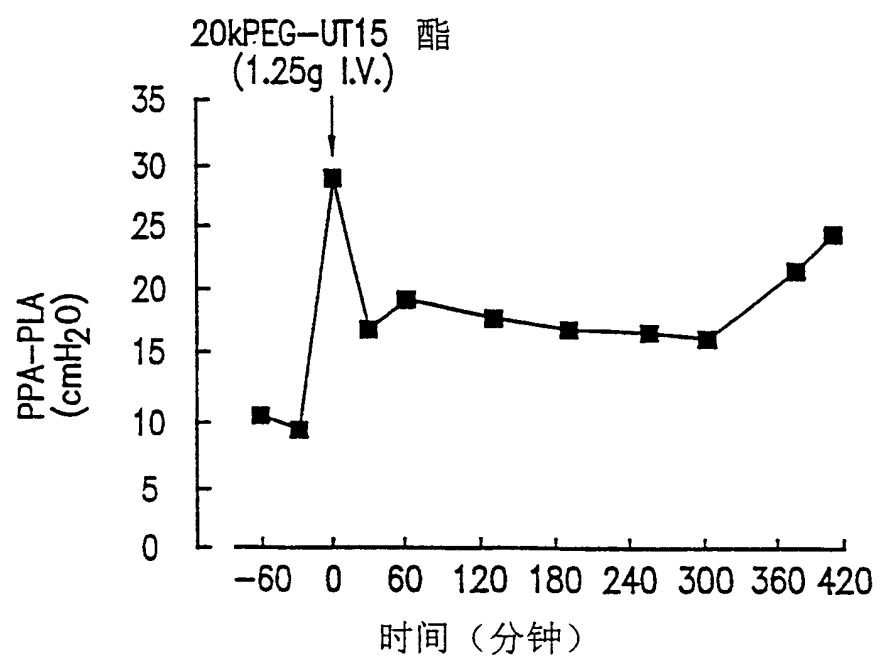


图 2

一只绵羊中气雾剂化 20kPEG-UT15(酯)
对 U44069 诱导肺血管高血压的作用

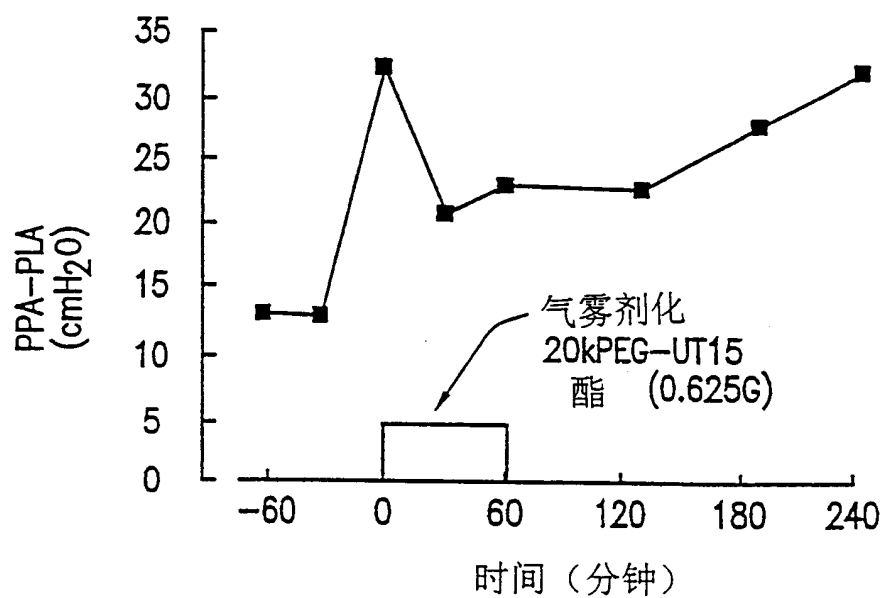


图 3

一只绵羊中静脉内快速浓注 20kPEG-UT15(酯)
对 U44069 诱导肺血管高血压的作用

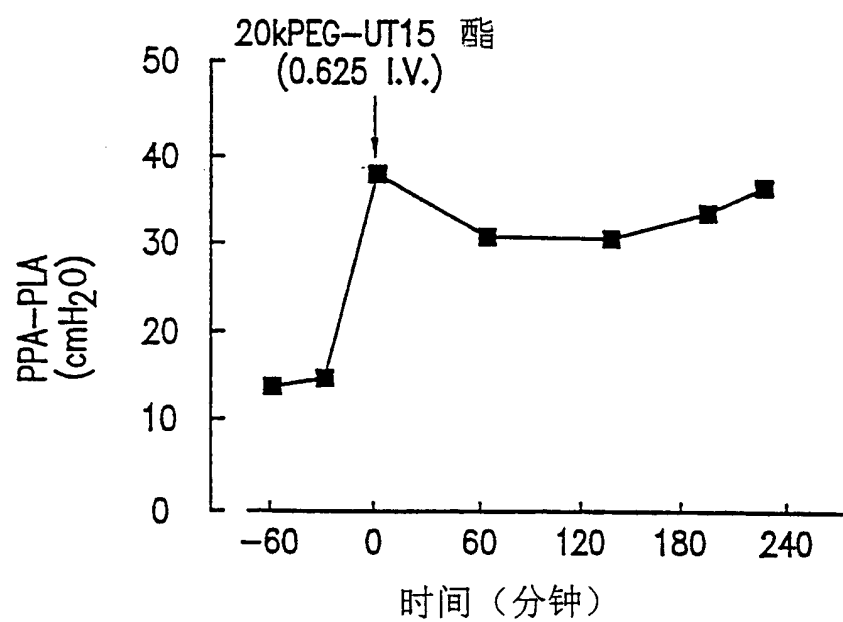


图 4

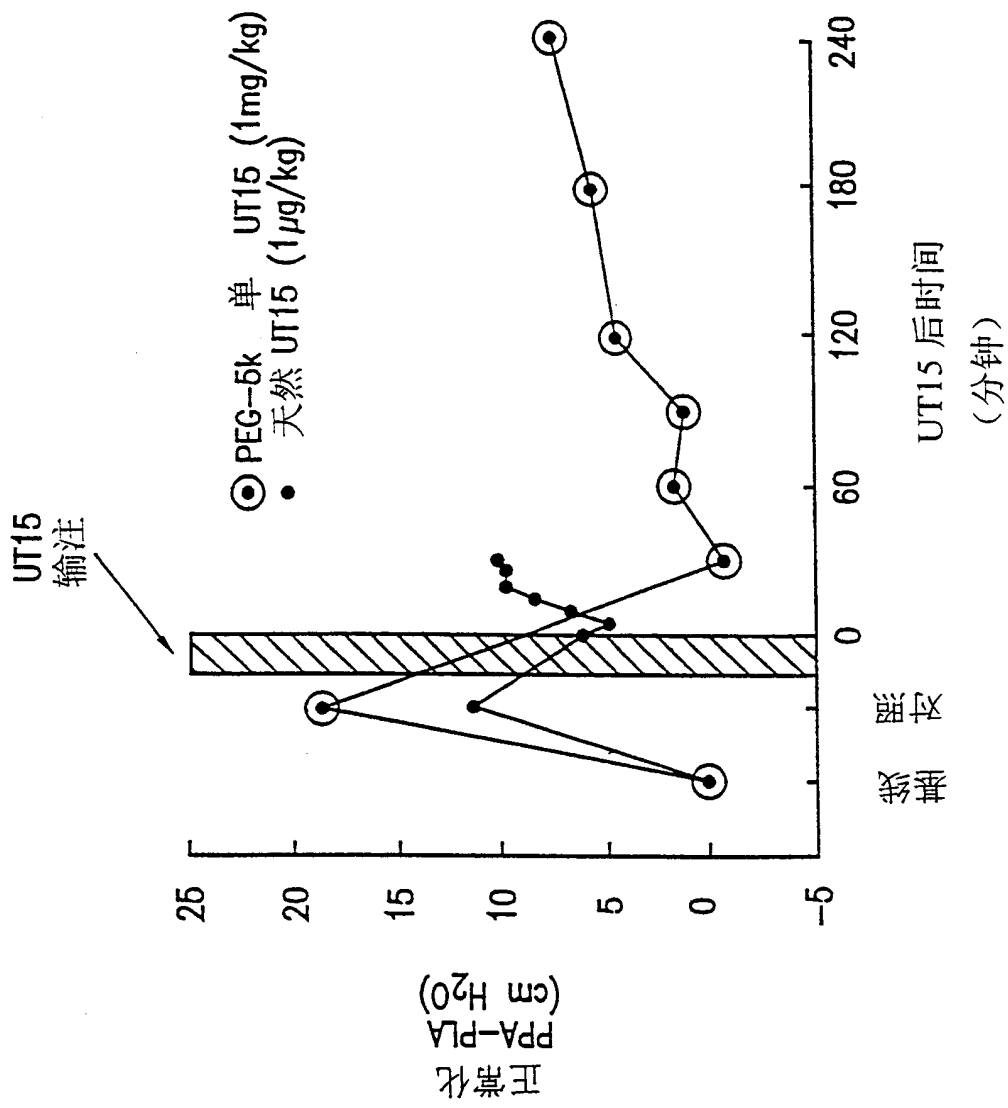


图 5