



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105263475 A

(43) 申请公布日 2016. 01. 20

(21) 申请号 201480015321. 7

A61K 31/34(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 03. 15

A61K 31/57(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/794, 926 2013. 03. 15 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 09. 15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/030041 2014. 03. 15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/145303 EN 2014. 09. 18

(71) 申请人 制药创源有限公司

地址 美国加利福尼亚州雷德伍德市

申请人 迈洛克斯有限公司

(72) 发明人 安金华 何卫国 约翰·M·费德勒

约翰·H·马瑟

(74) 专利代理机构 深圳市博锐专利事务所

44275

代理人 张明

(51) Int. Cl.

A61K 9/107(2006. 01)

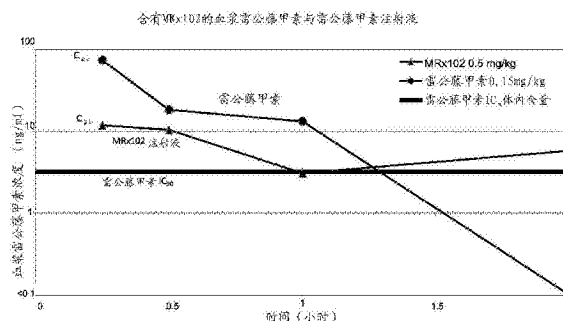
权利要求书2页 说明书28页 附图1页

(54) 发明名称

雷公藤甲素静脉注射乳剂用作免疫调制剂和抗癌药

(57) 摘要

一种雷公藤甲素和雷公藤甲素衍生物的静脉注射配方用于免疫调节和抗增殖剂。



1. 一种用于静脉注射乳剂成分, 含有雷公藤甲素或雷公藤甲素衍生物, 疏水性系数为 0.5 或更高, 所述乳剂含有 (a) 重量百分比为 15-45% 的脂质, (b) 重量百分比为 0-50% 的中链甘油三酯, (c) 重量百分比为 0.5-3% 的磷脂, (d) 重量百分比为 0-5% 的甘油, (e) 重量百分比为 0.1-0.3% 的胆酸钠, (f) 重量百分比约为 50-60% 的水, 以及 (g) 约 0.5 到约 3mg/mL 的雷公藤甲素或一种雷公藤甲素衍生物。

2. 根据权利要求 1 中的成分, 其中重量百分比为 15-45% 的脂质是由大豆油, 蓖麻油, 玉米油, 棉花籽油, 橄榄油, 花生油, 薄荷油, 红花油, 芝麻油, 椰子油或棕榈仁油组成的这组物质中选出的的一种脂质。

3. 根据权利要求 1 中的成分, 其中的中链甘油三酯重量百分比为 20%, 而且是从由三辛酸甘油酯, 三己酸甘油酯, 三庚酸甘油酯, 三壬酸甘油酯和癸酸丙三醇酯组成的这组物质中选出的。

4. 根据权利要求 1 中的成分, 其中的磷脂是从由氢化大豆磷脂酰胆碱, 二硬脂酰磷脂酰甘油酯, L- α -二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱和 L- α -二肉豆蔻酰甘油磷脂组成的这组物质中选出的。

5. 根据权利要求 1 中的成分, 其中的甘油是从由聚乙二醇 300, 聚乙二醇 400, 乙醇, 丙二醇, N 甲基-2-吡咯烷酮, 二甲基乙酰胺和二甲基亚砷组成的这组物质中选出的。

6. 根据权利要求 1 中的成分, 其中的胆酸钠是从由牛磺胆酸钠, 牛磺- β -鼠胆酸钠, 牛磺脱氧胆酸钠, 牛磺鹅去氧胆酸钠, 甘氨酸胆酸钠, 甘氨酸脱氧胆酸钠和甘氨酸鹅去氧胆酸钠组成的这组物质中选出的。

7. 根据权利要求 1 中的成分, 含有从由符合结构 I 的化合物组成的这组物质中选出的的一种雷公藤甲素衍生物。

8. 根据权利要求 1 中的成分, 含有从由符合结构 II 的化合物组成的这组物质中选出的的一种雷公藤甲素衍生物。

9. 根据权利要求 1 中的成分, 含有从由符合结构 III 的化合物组成的这组物质中选出的的一种雷公藤甲素衍生物。

10. 根据权利要求 1 中的成分, 含有从由符合结构 IV 的化合物组成的这组物质中选出的的一种雷公藤甲素衍生物。

11. 一种影响免疫抑制、免疫调节或抑制细胞增殖的方法, 包含针对需要此类治疗的研究对象的给药, 提供有效数量的权利要求 1 中的成分。

12. 一种引发细胞凋亡的方法, 包含用有效数量的权利要求 1 中的成分接触所述细胞。

13. 一种用于口服乳剂的成分, 含有雷公藤甲素或雷公藤甲素衍生物, 疏水性系数为 0.5 或更高, 所述乳剂含有 (a) 重量百分比为 15-45% 的脂质, (b) 重量百分比为 0-50% 的中链甘油三酯, (c) 重量百分比为 0.5-3% 的磷脂, (d) 重量百分比为 0-5% 的甘油, (e) 重量百分比为 0.1-0.3% 的胆酸钠, (f) 重量百分比约为 50-60% 的水, 以及 (g) 约 0.5 到约 3mg/mL 的雷公藤甲素或一种雷公藤甲素衍生物。

14. 根据权利要求, 所述乳剂含有 (a) 重量百分比为 15-45% 的脂质, (b) 重量百分比为 0-95% 的中链甘油三酯, (c) 重量百分比为 0.5-3% 的磷脂, (d) 重量百分比为 0-5% 的甘油, (e) 重量百分比为 0.1-0.3% 的胆酸钠, 以及 (f) 约 0.5 到约 3mg/mL 的雷公藤甲素或一种雷公藤甲素衍生物; 其中在给药之前加入水溶液。

15. 一种用于口服乳剂的成分, 含有雷公藤甲素或雷公藤甲素衍生物, 疏水性系数为 0.5 或更高, 所述乳剂含有 (a) 重量百分比为 15-45% 的脂质, (b) 重量百分比为 0-95% 的中链甘油三酯, (c) 重量百分比为 0.5-3% 的磷脂, (d) 重量百分比为 0-5% 的甘油, (e) 重量百分比为 0.1-0.3% 的胆酸钠, 以及 (f) 约 0.5 到约 3mg/mL 的雷公藤甲素或一种雷公藤甲素衍生物; 其中在给药之前加入水溶液。

雷公藤甲素静脉注射乳剂用作免疫调制剂和抗癌药

技术领域

[0001] 本发明公开了一种针对雷公藤甲素衍生化合物的配制,用作免疫调制剂、消炎药和抗癌药。

背景技术

[0002] 免疫抑制剂被广泛用于自身免疫疾病的治疗,并用于治疗或预防移植排斥反应,包括移植抗宿主疾病 (GVHD) 的治疗,在这种疾病中移植细胞会攻击受体 (宿主) 细胞。常见的免疫抑制剂包括咪唑硫嘌呤、皮质类固醇、环磷酰胺、甲氨蝶呤、6- 巯基嘌呤、长春新碱以及环孢霉素 A。一般而言,这些药物都不是完全有效的,而且大多数都受限于严重的毒副作用。举例来说,环孢霉素 A,一种广泛使用的药剂,对肾脏毒性作用显著。此外,有效治疗需要的剂量可能增加患者对各种机会感染原的易感染性。

[0003] 化合物雷公藤甲素取自于中国药用植物雷公藤 (TW),及其某些衍生物和前体药物,已经被确认具有显著的免疫抑制作用。雷公藤甲素的各种前体药物和其他类似物也表现出这类作用。例如,参见美国专利 4,005,108 ;5,294,443 ;5,648,376 ;5,663,335 ;5,759,550 ;5,843,452 ;5,962,516 和 6,150,539,这些专利的每一项都被完整引用纳入本文。据相关报告,雷公藤甲素及其某些衍生物 / 类似物和前体药物还具有显著的抗癌作用,包括减小体内的实体瘤 ;例如,参见 Kupchan 等人在美国化学会志 94:7194 (1972) 上的报告,以及共有美国专利编号 6,620,843,同样被完整引用纳入本文。雷公藤甲素及其前体药物以及其他类似物也表现出了显著的抗癌作用,包括减小体内的实体瘤 ;例如,参见共有美国专利编号 6,620,843,同样被完整引用纳入本文。例如,参见 Fidler 等人的分子癌症疗法 2 (9) :855-62 (2003)。

[0004] 如果类似物对给定的第一目标分子的结合亲和力与它对第二目标分子的结合亲和力的差异在 10 倍或以上,则该类似物可以被命名为“选择性结合”的类似物。

[0005] 尽管雷公藤甲素的衍生物和前体药物在药物动力学或生物分布等方面相对优于天然的雷公藤甲素,例如凭借在脂质或水溶性方面的差异,或通过其作为前体药物的作用,雷公藤甲素衍生物本身的生物作用往往显著低于天然的雷公藤甲素。

[0006] 相关领域的上述实例及其相关限制只用于说明,并非专有。相关领域的其他限制对该领域的技术人员来说,在阅读说明和研究图纸后将是显而易见的。

附图说明

[0007] 图 1 :注射前体药物 PG796 (MRx102) 后血浆中雷公藤甲素浓度随时间变化与注射雷公藤甲素的对比。

发明内容

[0008] 相关领域的实例及其相关限制,如上文所述,仅用于说明,并非专有。相关领域的其他限制对于该领域的技术人员来说,在阅读说明和研究图纸后将是显而易见的。

[0009] 一方面,专利提供了一种成分,用于含有雷公藤甲素或雷公藤甲素衍生物,疏水性系数为 0.5 或更高的乳剂的静脉注射,该乳剂含有 (a) 重量百分比为 15-45% 的脂质, (b) 重量百分比为 0-50% 的中链甘油三酯, (c) 重量百分比为 0.5-3% 的磷脂, (d) 重量百分比为 0-5% 的甘油, (e) 重量百分比为 0.1-0.3% 的胆酸钠, (f) 重量百分比约为 50-60% 的水, 以及 (g) 约 0.5 到约 3mg/mL 的雷公藤甲素或一种雷公藤甲素衍生物。在一些实施例中,未使用甘油。在一些实施例中,雷公藤甲素或雷公藤甲素衍生物的浓度为大约 0.5mg/mL 到大约 3mg/mL。在一些实施例中,雷公藤甲素或雷公藤甲素衍生物为约 1mg/mL 到约 2mg/mL。

[0010] 在一些实施例中,成分含有重量百分比为 15-45% 的脂质,其中脂质是从由大豆油、蓖麻油、玉米油、棉花籽油、橄榄油、花生油、薄荷油、红花油、芝麻油、椰子油或棕榈仁油组成的群组中选出的。

[0011] 在一些实施例中,中链甘油三酯的重量百分比为 20%,是从由三辛酸甘油酯、三己酸甘油酯、三庚酸甘油酯、三壬酸甘油酯和癸酸丙三醇酯组成的群组中选出的。

[0012] 在一些实施例中,磷脂是从由氢化大豆磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰甘油酯、L- α -二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱和 L- α -二肉豆蔻酰甘油磷脂组成的群组中选出的。

[0013] 在一些实施例中,甘油是从由聚乙二醇 300、聚乙二醇 400、乙醇、丙二醇、N-甲基-2-吡咯烷酮、二甲基乙酰胺和二甲基亚砷组成的群组中选出的。

[0014] 在一些实施例中,胆酸钠是从由牛磺胆酸钠、牛磺- β -鼠胆酸钠、牛磺脱氧胆酸钠、牛磺鹅去氧胆酸钠、甘氨酸胆酸钠、甘氨酸脱氧胆酸钠和甘氨酸鹅脱氧胆酸钠组成的群组中选出的。

[0015] 在一些实施例中,用于含有雷公藤甲素或雷公藤甲素衍生物,疏水性系数为 0.5 或更高的乳剂的静脉内给药的成分,乳剂中含有 (a) 重量百分比为 15-45% 的脂质, (b) 重量百分比为 0-95% 的中链甘油三酯, (c) 重量百分比为 0.5-3% 的磷脂, (d) 重量百分比为 0-5% 的甘油, (e) 重量百分比为 0.1-0.3% 的胆酸钠, 以及 (f) 约 0.5 到约 3mg/mL 的雷公藤甲素或一种雷公藤甲素衍生物,作为无水混合物储存,在给药之前加入水溶液。

[0016] 在一些实施例中,用于含有雷公藤甲素或雷公藤甲素衍生物,疏水性系数为 0.5 或更高的乳剂的口服给药的成分,乳剂中含有 (a) 重量百分比为 15-45% 的脂质, (b) 重量百分比为 0-95% 的中链甘油三酯, (c) 重量百分比为 0.5-3% 的磷脂, (d) 重量百分比为 0-5% 的甘油, (e) 重量百分比为 0.1-0.3% 的胆酸钠, 以及 (f) 约 0.5 到约 3mg/mL 的雷公藤甲素或一种雷公藤甲素衍生物,作为无水混合物储存,在给药之前加入水溶液。

[0017] 一方面,提供了用于含有雷公藤甲素或雷公藤甲素衍生物,疏水性系数为 0.5 或更高的乳剂的口服药的成分。

[0018] 在一些实施例中,成分中含有从由符合构造 I 的化合物组成的群组中选出的雷公藤甲素衍生物。在一些实施例中,成分中含有从由符合构造 II 的化合物组成的群组中选出的雷公藤甲素衍生物。在一些实施例中,成分中含有从由符合构造 III 的化合物组成的群组中选出的雷公藤甲素衍生物。在一些实施例中,成分中含有从由符合构造 IV 的化合物组成的群组中选出的雷公藤甲素衍生物。

[0019] 一方面,提供了影响免疫抑制、免疫调节或抑制细胞增殖的一种方法,其中该方法包括给需要对象以有效剂量静脉注射一种含有疏水性系数为 0.5 或更高的雷公藤甲素或雷公藤甲素衍生物的乳剂,用于免疫抑制、免疫调节或抑制细胞增殖。

[0020] 一方面,提供了一种细胞凋亡诱发方法,其中该方法包含给需要对象以有效剂量静脉注射一种含有疏水性系数为 0.5 或更高的雷公藤甲素或雷公藤甲素衍生物的乳剂用于诱发凋亡。

[0021] 本方法和成分的其他实施例以及类似方法和成分通过下列说明、图纸、实例和权利要求将是显而易见的。根据上述和下文的说明可以了解到,在假设这种组合中所包含的特性并不存在彼此不一致的情况下,本文所描述的每种和每项特性,以及两种或更多此类特性的每种和每项组合,都包含在本专利公开的范围内。此外,特性的任何特性或组合可能被特别排除在本专利公开的任何实施例范围以外。本公开发明的其他方面和优点列举在以下说明和权利要求中,尤其是在结合随附的实例和图纸考虑的情况下。

具体实施方式

[0022] 现在将在下文中更加全面地描述各个方面。但这些方面可能体现在多张不同的表格中,并且不应被理解为受限于本文中所列举的实施例;相反地,这些实施例的提供是为了让本专利公开周密和完整,并向该领域的技术人员完全了解其范围。

I. 定义

[0023] 正如在本说明书中的用法那样,单数形式的“一种”、“一项”和“那种”包含复数指示物,除非上下文另行明确说明。因此,举例来说,一种“聚合物”的说法包含单种聚合物,也包含两种或多种相同或不同的聚合物,一种“赋形剂”的说法包含单种赋形剂以及两种或多种相同或不同的赋形剂以及类似物。

[0024] 在提供一个数值范围的情况下,计划每个中间值近似到下限单位的十分之一,除非上下文另行明确说明,该范围的上下限与指定范围内任何其他设定值或中间值之间被包含在该专利公开的范围内。举例来说,如果指定了 1m 到 8m 的范围,那么预计 2m、3m、4m、5m、6m 和 7m 也得到了明确公开,同样公开的还有大于或等于 1m 的范围以及小于或等于 8m 的数值范围。本专利公开包含在设定范围内的任何设定值或中间值与该设定范围内的任何其他设定值或中间值之间的每个较小的范围。这些较小范围的上限和下限都可能被该范围单独包括或排除,而对于两个限值中有任意一个、均不或均包含在较小范围内的每个范围也包括在本专利公开范围内,具体情况取决于该设定范围内任何特别排除的限值。在设定范围包括一个或两个限值的情况下,排除任意一个或同时排除两个所包含的限值的范围也包括在本专利公开范围内。

[0025] “烷基”是指含有碳和氢的饱和非环状单价基,可能为直链或有支链。烷基基团的例子包括甲基、乙基、正丁基、叔丁基、正庚基和异丙基。“环烷基”是指含有碳和氢的完全饱和的环状单价基,可能进一步被烷基所取代。环烷基基团的例子包括环丙基、甲基环丙基、环丁基、环戊基、乙基环戊基和环己基。“低级烷基”是指含有一到六个碳原子的此类基团,而在一些实施例中含有一到四个碳原子。

[0026] “烯基”是指含有碳和氢的非环状单价基,可能为直链或有支链,至少含有一个碳-碳双键($C=C$)。“炔基”是指含有碳和氢的非环状单价基,可能为直链或有支链,至少含有一个碳-碳三键($C\equiv C$)。“低级烯基”或“低级炔基”此类基团含有二到六个碳原子,而在一些实施例中含有二到四个碳原子。

[0027] “酰基”是指含有 $-(C=O)R$ 结构的基团,其中 R 为烷基(烷基酰基)或芳基(芳

基芳基)。“酰氧基”是指含有 $-O(C=O)R$ 结构的基团。

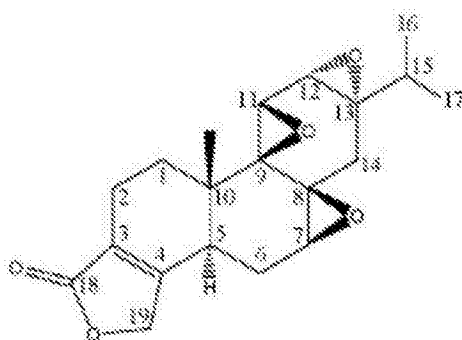
[0028] “芳基”是指含有一个环(如,苯)或两个稠环(如萘基)的单价芳香基。正如本文中的用法那样,芳基是单环和碳环(非杂环)的,如苯(苯基)环或取代苯环。“取代”的含义是用卤素(如氟、氯或溴)、低级烷基、硝基、氨基、低级烷氨基、羟基、低级烷氧基或卤代基团(低级烷基)等基团取代一个或多个环上的氢。

[0029] “芳基烷基”是指一种烷基,通常是低级(C_1-C_4 ,或 C_1-C_2)烷基,取代基进一步被芳基基团所取代;例子有苯甲基和苯乙基。

[0030] “杂环”是指非芳基环,通常为五元到七元环,环上的原子选自于由碳、氮、氧和硫组成的基团。在一些实施例中,环上的原子包括3到6个碳原子。举例来说,这种杂环包括吡咯烷、哌啶、哌嗪和吗啉。

[0031] “卤素”或“卤代基团”是指氟、氯、溴或碘。

[0032] 针对当前的专利公开,以下编号方案被用于雷公藤甲素和雷公藤甲素衍生物:



II. 雷公藤甲素类似物

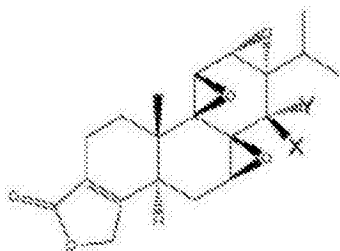
[0033] 雷公藤甲素类似物,作为本文中所使用的术语,包括天然产品雷公藤甲素(本文中命名为PG490)的各种结构变形。其中可能包括天然产生的类似物,如2-羟基雷公藤甲素或16-羟基雷公藤甲素(雷公藤乙素),尽管在本文中该术语通常是指合成制备的类似物。正如本文中的用法那样,“雷公藤甲素的相关化合物”是指雷公藤甲素及其类似物,优先指代类似物。

[0034] 举例来说,结构变形可能包括雷公藤甲素环氧环或内酯环的开环;羟基基团(天然产生或通过此类开环产生的)转化为羧酸酯、无机酯(如磺酸盐)、碳酸盐或氨基甲酸酯,通过氧化转化为醛或酮,或通过后续还原转化为氢原子;单键转化为双键,以及/或者氢原子被卤素、烷基、烯基、羟基、烷氧基、酰基或氨基基团所取代。雷公藤甲素类似物的例子在多项美国专利中已经进行了说明,包括美国专利号5,663,335、6,150,539、6,458,537以及6,569,893,其中每项专利都通过完整引用而纳入本文。如这些专利中所述,这些化合物可以从雷公藤甲素,一种源于植物的二萜三环氧化物中制得。如上文所述,雷公藤甲素及其类似物已经表现出了有益的免疫抑制和细胞毒性作用,例如在上面所引用的专利中。

[0035] 雷公藤甲素类似物的例子包括14-甲基雷公藤甲素(命名为PG670,参见美国应用公开号20040152767),雷公藤甲素14-叔丁基碳酸盐(命名为PG695,参见PCT公开号:WO 2003/101951),14-脱氧-14 α -氟代雷公藤甲素(命名为PG763;参见美国临时申请序号60/449,976),雷公藤甲素14-(α -二甲基氨基)乙酸盐(命名为PG702;参见美国专利号5,663,335),5- α -羟基雷公藤甲素(命名为PG701;参见美国临时申请序号60/532,702),19-甲基雷公藤甲素(命名为PG795;参见美国临时申请序号60/549,769),以及18-去

氧-19-脱氢-18-苯甲酸基-19-苯甲酰基雷公藤甲素（命名为PG796；参见美国临时申请序号 60/549,769）。这些应用和发布中的每一项都通过完整引用纳入本文。

[0036] 许多这类化合物都被认为会通过体内转化为雷公藤甲素而成为前体药物，正如在上述的 PG490-88 中所观察到的。其他化合物，如 14-脱氧-14 α -氟代雷公藤甲素 (PG763)，预期不会进行这种转化，然而仍展示出了雷公藤甲素所表现出的生物活性（如在人类 T 细胞淋巴瘤（淋巴瘤）细胞的细胞毒性以及 IL-2 的抑制），正如上文所引用的美国应用序号 60/449,976 所报告的那样。



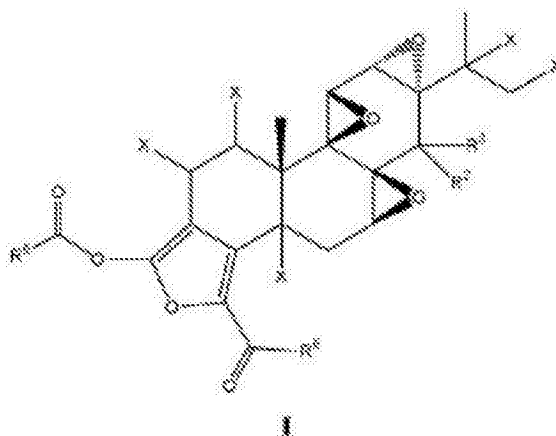
雷公藤甲素衍生物及前体药物示例

表 1

化合物	X	Y
PG490-88	-O (CO) CH ₂ CH ₂ COOH	-H
PG670	-OH	-CH ₃
PG695	-O (CO) OC (CH ₃) ₃	-H
PG702	-O (CO) CH ₂ N (CH ₃) ₂	-H
PG673	-H	-F

[0037] 通过组合化学或其他类型的制备方法可以产生用于筛选的雷公藤甲素类似物，生成各种化学结构或取代基。

[0038] 配方中的活性成分是雷公藤甲素或雷公藤甲素衍生物，如下文所述。举例来说，该专利公开提供了结构 I 的化合物：



其中

每个 R⁶单独选自烷基、烯基、炔基或芳基；

CR^2R^3 为 $CHOH$ 或 $C=O$;

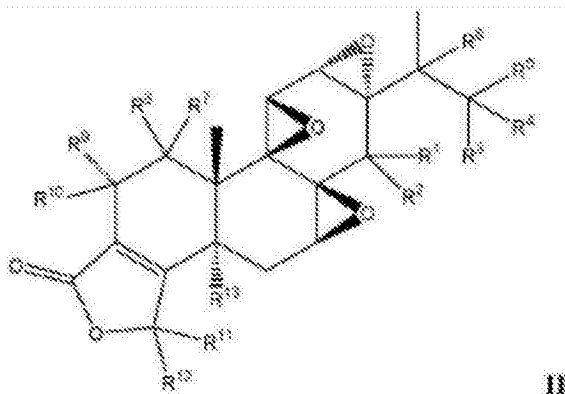
至多 X 基团中有一个为羟基,其余的 X 基团为氢。

[0039] 在结构 I 的一些实施例中, CR^2R^3 为 $CHOH$,通常含有对羟基结构。在一些实施例中,每个 X 为氢;但在选定的实施例中,所表示的基团 X 中恰有一个为羟基。羟基取代的位置通常包括碳 2 和碳 16,如上文中的编号方案所示。

[0040] 在一些实施例中,存在于结构 I 的化合物中的每个所述的烷基、烯基和炔基部分包括最多四个碳原子,而每个所述的芳基部分为单环非杂环;如被取代或未被取代的苯基。

[0041] 在结构 I 的选定实施例中,每个 R^6 为芳基;通常,每个 R^6 为苯基。其中包括本文中被命名为 PG796 的化合物,其中每个 R^6 为被取代或未被取代的苯基。

[0042] 本专利公开还提供了表示为结构 II 的化合物:



其中:

CR^1R^2 选自于 $CHOH$ 、 $C=O$ 、 CHF 、 CF_2 和 $C(CF_3)OH$;

CR^6 和 CR^{13} 选自于 CH 、 COH 和 CF ;

CR^7R^8 、 CR^9R^{10} 和 $CR^{11}R^{12}$ 选自于 CH_2 、 $CHOH$ 、 $C=O$ 、 CHF 和 CF_2 ;以及

$CR^3R^4R^5$ 选自于 CH_3 、 CH_2OH 、 $C=O$ 、 $COOH$ 、 CH_2F 、 CHF_2 和 CF_3 ;

使得:至少一个 R^1 - R^{13} 含氟;

不超过两个,而且往往不超过一个 $CR^3R^4R^5$ 、 CR^6 、 CR^7R^8 、 CR^9R^{10} 、 $CR^{11}R^{12}$ 和 CR^{13} 含有氟或氧;

而且,当 CR^1R^2 为 $CHOH$ 时, $CR^3R^4R^5$ 不是 CH_2F 。

[0043] 在一些实施例中, CR^7R^8 处的立体化学使得当 CR^7R^8 为 $CHOH$ 时,它包含一个 β -羟基结构,而当 CR^7R^8 为 CHF 时,它包含一个 α -氟基结构。相似地, CR^9R^{10} 处的立体化学往往使得当 CR^9R^{10} 为 $CHOH$ 时,它包含一个 β -羟基结构,而当 CR^9R^{10} 为 CHF 时,它包含一个 α -氟基结构。

[0044] 在结构 II 的一些实施例中, CR^1R^2 为 CHF ,包含一个 α -氟代结构。

[0045] 一些实施例还包括仅有一个选自 CR^1R^2 、 $CR^3R^4R^5$ 、 CR^6 、 CR^7R^8 、 CR^9R^{10} 和 $CR^{11}R^{12}$ 的碳中心含氟的化合物。在一些实施例中, CR^1R^2 、 CR^6 、 CR^7R^8 、 CR^9R^{10} 和 $CR^{11}R^{12}$ 中仅有一个含氟。

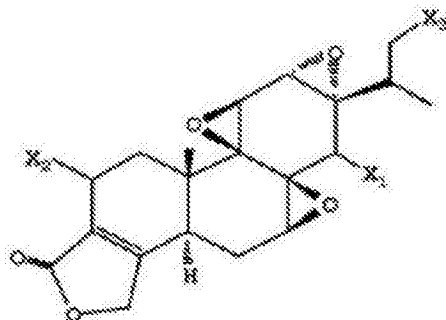
[0046] 在所选的实施例中,只有 CR^1R^2 含氟。因此,在这些实施例中, CR^1R^2 选自于 CF_2 、 CHF 和 $C(CF_3)OH$ 。 CR^1R^2 处的立体化学使得当 CR^1R^2 为 $C(CF_3)OH$ 时,它包含一个 β -羟基结构,而当 CR^1R^2 为 CHF 时,它包含一个 α -氟基结构。在所选的结构 II 实施例中,该化合物为 PG763。

[0047] 在结构 II 其他所选的实施例中, CR^9R^{10} 或 $CR^3R^4R^5$ 含氟,而 CR^1R^2 含氧;举例来说,

CR^1R^2 为 $\text{C}=\text{O}$, 或者, 在一些实施例中, 为 CHOH (β -羟基)。在这些实施例中, 举例来说, CR^9R^{10} 选自于 CF_2 和 CHF (例如, α -氟代), 或 $\text{CR}^3\text{R}^4\text{R}^5$ 选自于 CHF_2 或 CF_3 。

[0048] 在进一步选择的结构 III 的实施例中, CR^7R^8 或 $\text{CR}^{11}\text{R}^{12}$ 含氟, 而 CR^1R^2 含氧; 举例来说, CR^1R^2 为 $\text{C}=\text{O}$, 或者在一些实施例中, 为 CHOH (β -羟基)。在这些实施例中, 举例来说, CR^7R^8 选自于 CF_2 和 CHF (例如 α -氟代), 或 $\text{CR}^{11}\text{R}^{12}$ 选自于 CF_2 和 CHF 。

[0049] 本专利公开还给出了用结构 III 表示的化合物。



III

在结构 III 中, 各变量定义如下:

X^1 为 OH 或 OR^1 , 而 X^2 和 X^3 分别为 OH 、 OR^1 或 H , 规定 X^1 、 X^2 和 X^3 中至少一个为 OR^1 , 而 X^2 和 X^3 中至少一个为 H ; 而

OR^1 为 $\text{O}-(\text{C}=\text{O})-\text{Z}$, 其中 Z 选自于由 $-\text{OR}^2$ 、 $-\text{O}-\text{Y}-(\text{C}=\text{O})-\text{OR}^3$ 、 $-\text{O}-\text{Y}-\text{NR}^4\text{R}^5$ 、 $-\text{NR}^4\text{R}^5$ 、 $-\text{NR}^3-\text{Y}-(\text{C}=\text{O})-\text{OR}^3$ 和 $-\text{NR}^3-\text{Y}-\text{NR}^4\text{R}^5$ 构成的基团;

其中

Y 为含有多达六个碳原子的二价烷基、烯基或炔基基团;

R^2 选自于烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基、芳烷基、羟基烷基、烷氧基烷基、芳氧基烷基和酰氧基烷基;

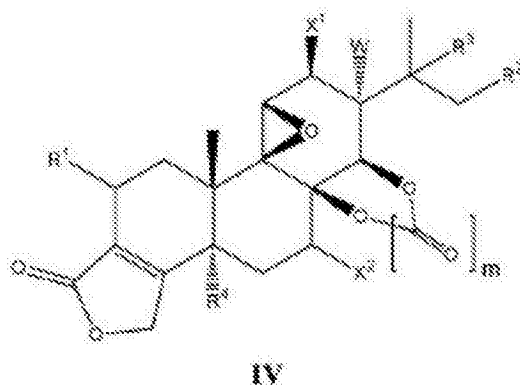
每个 R^3 分别选自氢和 R^2 ; 而

R^4 和 R^5 分别选自于氢、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基、芳烷基、羟基烷基、烷氧基烷基、芳氧基烷基和酰氧基烷基, 或 R^4 和 R^5 共同形成 5- 到 7- 元杂环, 其环上的原子选自于由碳、氮、氧和硫组成的基团, 其中环上的原子包含最多三个杂环原子。

[0050] 定义为 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 的基团, 当选自于烷基、烯基和炔基时, 可能含有多达六个碳原子。当选自于环烷基或环烯基时, 它们通常含有 3 到 7 个, 或对于环烯基来说, 含有 5 到 7 个碳原子。当选自于芳烷基、羟基烷基、烷氧基烷基、芳氧基烷基和酰氧基烷基时, 这些基团的烷基成分通常含有多达六个碳原子。在一个实施例中, 每个此类基团分别选自于烷基、芳基、芳烷基和烷氧基烷基。

[0051] 在所选的结构 III 的实施例中, $\text{X}^2=\text{X}^3=\text{H}$, 而 Y 为 $-\text{CH}_2-$ 或 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 。在进一步的实施例中, OR^1 选自于由 $\text{O}-(\text{C}=\text{O})-\text{OR}^2$ 、 $\text{O}-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-\text{Y}-(\text{C}=\text{O})-\text{OR}^3$ 和 $\text{O}-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-\text{Y}-\text{NR}^4\text{R}^5$ (碳酸盐衍生物) 组成的基团。在其他实施例中, OR^1 选自于由 $\text{O}-(\text{C}=\text{O})-\text{NR}^4\text{R}^5$ 、 $\text{O}-(\text{C}=\text{O})-\text{NR}^3-\text{Y}-(\text{C}=\text{O})-\text{OR}^3$ 和 $\text{O}-(\text{C}=\text{O})-\text{NR}^3-\text{Y}-\text{NR}^4\text{R}^5$ (氨基甲酸酯衍生物) 组成的基团。在所选的结构 III 的实施例中, 该化合物为 PG695。

[0052] 本专利公开还给出了用结构 IV 表示的化合物。



其中

每个 R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 分别选自于氢、羟基、 $-O(CO)_nX$ 、 $-O(CO)_nOR^5$ 和 $-O(CO)_nN(R^5)_2$, 其中 X 为卤素, R^5 为氢或低级烷基, 而 n 为 1-2,

并规定至少有三个 R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 为氢;

m 为 1-2;

X^2 为卤素, 如 F 或 Cl; 而

X^1 为卤素, 通常为 Cl, 而 W 为羟基; 或 X^1 和 W 共同形成一个环氧基。

[0053] 当任何一个 R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 选自于 $-O(CO)_nX$ 、 $-O(CO)_nOR^5$ 或 $-O(CO)_nN(R^5)_2$ 时, 变量 n 通常为 1。

[0054] 在所选的结构 IV 的实施例中, 每个 R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 均为氢。

在进一步选择的实施例中, $m = 1$ 。在所选的结构 IV 的实施例中, 化合物为 PG762。

III. 生物活性

[0055] 基于结构 I, 18-脱氧-19-脱氢-18-苯甲酸基-19-苯酰雷公藤甲素 (命名为 PG796), 可以采用标准 MTT 比色法对化合物的细胞毒性进行评估, 如例 3 所述, 而这类化合物的免疫抑制作用通过标准 IL-2 抑制试验进行评估, 如例 4 所述。PG796 在两项试验中都表现出了高于已知的前体药物, 雷公藤甲素 14-琥珀酸盐 (指定为 PG490-88) 的活性。特别值得一提的是, 人体血清中培养的雷公藤甲素 14-琥珀酸盐在这些试验中的活性要比在小鼠血清中培养的雷公藤甲素 14-琥珀酸盐低得多, 而 PG796 在两种情况下表现出了基本相当的高活性。(预期通过培养会将雷公藤甲素 14-琥珀酸盐转化为雷公藤甲素, 将 PG796 转化为单衍生物, 19-苯甲酰基雷公藤甲素, 参见上文中的合成方案。)

[0056] 可以按照例 2 的描述, 采用标准 MTT 比色法对命名为 PG757、PG762 和 PG830 的结构 IV 三种化合物以及另外一种命名为 PG782 的化合物的细胞毒性作用进行评估。可以按照例 3 的描述, 在标准 IL-2 抑制试验中对这些化合物的免疫抑制作用进行评估。

[0057] 在 MTT 比色法中血清培养的化合物 PG757 的细胞毒性明显强于雷公藤甲素; 参见下表 2。(表 2 中检测化合物的数据是针对血清培养 24 小时的化合物的。) 培养的 PG782 还比雷公藤甲素更有效, 而培养的 PG762 具有类似的效力。多种检测化合物在进行血清培养时, 在对 IL-2 的抑制方面相当于雷公藤甲素。

表 2

化合物	生存能力/细胞毒性 MTT (ED ₅₀)	免疫抑制 IL-2 (IC ₅₀)
PG490 (雷公藤甲素)	60 nM	4 nM
PG757	32 nM	9 nM
PG762	60 nM	9 nM
PG782	53 nM	2 nM

[0058] 血清培养能将前体药物转化为雷公藤甲素,而研究表明对于 PG757 和 PG762 来说,这会在大约 5 分钟内发生。

IV. 治疗成分

[0059] 含有本专利公开的雷公藤甲素衍生物的配方可能采用固体、半固体、冻干粉或液体剂型,比如片剂、胶囊、粉末、缓释配方、溶液、悬浮液、乳剂、药膏、乳液或气雾剂,而在一些实施例中为单位剂型适合于精确剂量的简单给药。成分通常包括传统的药物载体或赋形剂,可能额外包含其他药用制剂、载体或助剂。

[0060] 在一些实施例中,该成分约占本专利公开的一种化合物或多种化合物重量的大约 0.5% 到 75%,其余部分由合适的药用赋形剂构成。对于口服来说,这类赋形剂包括药用级别的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、明胶、蔗糖、碳酸镁及类似物。如果需要,成分中还可能含有少量的无毒助剂,如润湿剂、乳化剂或缓冲液。

[0061] 该成分可能通过口服、经皮或不经肠道,如通过静脉、皮下、腹膜或肌肉注射实现对象给药。用于口服液体剂型时,该成分可以制成溶液、悬浮液、乳剂或糖浆,以液体形式或适合在水或生理盐水中水化的干燥形式提供。对于不经肠道给药,不经肠道给药的可注射成分通常在合适的静脉注射液,如无菌的生理盐水溶液中含有雷公藤甲素衍生物。

[0062] 液体成分的制备方法是将雷公藤甲素衍生物(约 0.5% 到约 20%)和可选的药用辅料溶解或分散在药物学上可以接受的载体中,例如盐水、葡萄糖水溶液、甘油或乙醇,以形成溶液或悬浮液。

[0063] 该化合物的给药方式可能还包括气溶胶颗粒形式的吸入,可为固态或液态,通常为可吸入粒度。此类颗粒小得足以在吸入后通过口腔和咽喉,并进入肺部支气管和肺泡。一般来说,颗粒粒径为大约 1-10 微米,通常粒径小于大约 5 微米,是可呼吸的。吸入的液体成分包含分散在无菌无热原盐水溶液或无菌无热原水等水性载体中的活性药剂。如果需要,该成分可以与推进剂混合,促进该成分的喷洒和气雾剂的形成。

[0064] 此类剂型的制备方法是该领域的技术人员所了解或对他们来说将是显而易见的;举例来说,参见雷明顿药物科学(第 19 版,Williams&Wilkins,1995)。给药成分将含有一定量的选定化合物,有效剂量足以影响研究对象的免疫抑制或目标细胞的凋亡。

[0065] 如本文所述,举例来说,在 Panchagnula 等(2000)的研究中,药物制剂的分配系数或 logP 可能影响各种给药途径的适用性,包括口服生物利用度。本文中所描述的化合物,凭借氟对一个或多个羟基基团的取代,预期具有比母体化合物,雷公藤甲素,更高的 logP

计算值,这使得它们在口服利用度方面成为了更好的候选药剂。

[0066] 本文公开的脂质配方能有效用于静脉注射,以及口服给药。基于脂质和表面活性剂的配方作为提高溶解性差的化合物的口服生物利用度的可行方法而广受认可。利用基于脂质和表面活性剂的配方的多种口服药品在市场上均有销售。例如, Sandimmune® 和 Sandimmune、Neoral® (环孢霉素 A, 诺华公司)、Norvir® (利托那韦), 和 Fortovase® (沙奎那韦) 已经配制成了自乳化药物释放系统。实际上,最近的一份评论对水溶性差的药物的口服脂质基配方的已发布的针对人体研究对象药物动力学研究进行了总结。(Fatouros 等 (2007) 疗法与临床风险管理 3(4):591-604)。

V. 免疫调节和抗炎治疗

[0067] 依据结构 I 的化合物, 18- 脱氧 -19- 脱氢 -18- 苯甲酰氧基 -19- 苯甲酰基雷公藤甲素 (命名为 PG796), 以剂量依赖的方式, 抑制了白血病细胞中 IL-2 的产生 (参见例 3)。本专利公开因此包括了含有作为免疫抑制剂的活性成分的配方的使用, 例如作为移植程序的一种助剂或用于自体免疫疾病的治疗。

[0068] 本专利公开所预期的一种功效是用于治疗免疫系统调节异常的人体疾病的治疗。研究已经表明免疫调节异常存在于各类自体免疫和慢性炎症性疾病中, 包括全身性红斑狼疮、慢性类风湿性关节炎、I 型和 II 型糖尿病、炎症性肠病、胆汁性肝硬化、葡萄膜炎、多发性硬化症以及其他失调症状, 比如克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、天疱疮、大疱性类天疱疮、结节病、牛皮癣、鱼鳞癣、格雷夫斯眼病、格雷夫瓦病和哮喘。虽然上述每种病症潜在的发病机制可能差异巨大, 但它们共同拥有各种自身抗体和自反应性淋巴细胞的外观。这种自反应性可能部分是由于丧失了正常免疫系统运行的稳态控制。

[0069] 同样地, 在完成来自于含有成熟淋巴细胞的供体组织来源的骨髓移植或造血干细胞的其他移植之后, 所转移的淋巴细胞会将宿主组织的抗原视为异质。这些细胞被激活, 并攻击宿主 (移植植物抗宿主反应), 可能威胁生命。而且, 在器官移植之后, 宿主淋巴细胞会识别出器官移植的外来组织抗原, 并增加细胞和抗体介导的免疫反应 (宿主对抗移植的反应), 导致移植受损和排斥。

[0070] 自体免疫或排斥反应的一个结果是炎症细胞以及它们所释放的中介体造成的组织破坏。像 NSAID 这样的消炎药的主要作用方式是阻断这种中介体的作用或分泌, 但它并不会更改这种疾病的免疫学基础。另一方面, 类似环磷酰胺的细胞毒性药物的作用是非特异性的, 使得正常反应和自体免疫反应被同时关闭。实际上, 用这种非特异性免疫抑制剂治疗的病人死于感染的可能性与他们死于其自体免疫疾病的可能性是一样高的。

[0071] 本专利公开的成分能有效应用于雷公藤甲素及其前体药物和其他衍生物被证明有效的用途, 例如, 用于免疫抑制的治疗, 正如治疗自体免疫疾病, 避免移植排斥反应, 或者治疗或预防移植植物抗宿主疾病 (GVHD)。例如, 参见共有的美国专利号 6, 150, 539, 通过引用纳入本文。雷公藤甲素与本衍生物同样能有效用于治疗其他炎症性疾病, 如创伤性炎症, 以及降低雄性生育力。

[0072] 这类成分能有效抑制来自不相容的人类供体的实体器官移植、组织移植或细胞移植的排斥反应, 从而延长移植器官的存活和功能以及受体的存活。这种用途可能包括, 但不限于, 实体器官移植 (如心脏、肺部、胰腺、四肢、肌肉、神经、肾脏和肝脏), 组织移植 (如皮肤、角膜、肠道、性腺、骨骼和软骨), 以及细胞移植 (例如胰腺细胞, 比如胰岛细胞、大脑和

神经组织、肌肉、皮肤、骨骼、软骨和肝脏)包括异种移植等。

[0073] 这类成分还能有效用于抑制异种移植(种间)排斥反应;即避免来自非人类动物的实体器官移植、组织移植或细胞移植的排斥反应,不论是天然构造还是经过生物工程改造(转基因)来表达人类基因、RNA、蛋白质、肽或其他非原生异基因分子,或经过生物工程改造去除动物天然基因的、RNA、蛋白质、肽或其他正常表达分子的表达。本专利公开还包括使用上述成分来延长来自非人类动物的此类实体器官移植、组织移植或细胞移植的存活。

[0074] 同时包括自体免疫疾病或具有自体免疫性表现的疾病的治疗方法,比如爱迪生氏病、自体免疫性溶血性贫血、自体免疫性甲状腺炎、克罗恩氏病、糖尿病(I型,青少年型或最近发生的糖尿病)、格雷夫斯氏病、格林-巴利综合征、全身性红斑狼疮(SLE)、狼疮性肾炎、多发性硬化症、重症肌无力、牛皮癣、原发性胆汁性肝硬化、风湿性关节炎、葡萄膜炎、哮喘、动脉硬化、桥本氏甲状腺炎、过敏性脑脊髓炎、肾小球性肾炎以及各种过敏症。

[0075] 进一步的用途可能包括炎症性和快速增生性皮肤病的治疗与预防以及免疫介导疾病的临床表现,比如牛皮癣、异位性皮炎、天疱疮、荨麻疹、皮肤嗜酸性粒细胞增多症、痤疮和斑秃;各种眼部疾病,比如结膜炎、葡萄膜炎、角膜炎和结节病;粘膜和血管的炎症,比如胃溃疡、缺血性疾病和血栓症造成的血管损伤、缺血性肠道疾病、炎症性肠道疾病,以及坏死性小肠结肠炎;肠道炎症/过敏症,比如乳糜泄、克罗恩氏病和溃疡性结肠炎;肾脏疾病,比如间质性肾炎、古德帕斯彻综合征、溶血性尿毒症综合征和糖尿病肾病;造血系统疾病,比如血小板减少性紫癜和自身免疫性溶血性贫血;皮肤疾病,比如皮炎和皮肤T细胞淋巴瘤;循环系统疾病,比如动脉硬化和动脉粥样硬化;肾病综合症,比如肾小球性肾炎;肾脏疾病,比如缺血性急性肾功能不全和慢性肾功能不全;以及白塞病。

[0076] 本专利公开的成分和方法同样能有效用于炎症性疾病的治疗,比如哮喘,同时包括内在和外在表现,例如支气管哮喘、过敏性哮喘、内源性哮喘、外源性哮喘以及粉尘性哮喘,特别是慢性或长期哮喘(例如晚发型哮喘和气道高反应),或者包括过敏症和可逆阻塞性气道疾病在内的其他肺部疾病,包括支气管炎等等。该成分和方法还可以用于治疗其他炎症性病症,包括创伤性炎症、莱姆病中的炎症、慢性支气管炎(慢性感染性肺病)、慢性鼻窦炎、败血症相关的急性呼吸窘迫综合征以及肺结节病。对于哮喘此类呼吸疾病的治疗,该成分通常通过吸入给药,但所有传统的给药途径可能都有效。

[0077] 在自体免疫性病症的治疗中,向病人定期提供该成分,例如每周1-2次,剂量水平足以减少症状并提高病人的舒适度。尤其是对于风湿性关节炎的治疗,该成分可以通过静脉注射或直接注射进入受影响的关节来进行给药。在病人开始出现疾病症状之后的几周内,病人可以按至少24小时的重复周期进行治疗。给药剂量通常在每千克病人体重每天1-25mg/kg的范围内,通常肠胃外给药剂量较低,而口服剂量较高。最佳剂量可以按照该技术领域的已知方法通过常规试验确定。

[0078] 对于移植排斥的治疗,本方法特别用于心脏、肾脏、肝脏、细胞以及骨髓移植排斥反应的治疗,还可以用于GVHD的治疗。治疗通常在手术前后开始,可以在外科移植程序之前或之后不久,并继续每天给药,持续至少数周时间,用于治疗急性移植排斥反应的治疗。在治疗过程中,病人可以通过例如使用包含同种异体淋巴细胞的混合淋巴细胞反应或进行移植组织的活检,定期检查免疫抑制水平。

[0079] 此外,该成分可以长期给药来预防移植排斥,或用于治疗晚期移植排斥的急性发

作。如上所述,给药剂量通常是每千克病人体重每天 1-25mg/kg,肠胃外给药剂量较低,而口服剂量较高。根据病人的响应情况以及治疗期内病人的抗感染能力,剂量可以适当增减。

[0080] 在由于受体接受匹配或不匹配的骨髓、脾脏细胞、胎儿组织、脐带血,或者动员或采集干细胞的移植所造成的移植物抗宿主病的治疗和预防中,在口服或非胃肠给药的情况下,剂量范围通常是每千克体重每天 0.25-2mg/kg,通常为 0.5-1mg/kg/天。

[0081] 同时在本专利公开的范围内是含有本专利公开的一种化合物以及一种或多种传统的免疫抑制剂的联合治疗。在本专利公开的范围内的这些免疫抑制剂包括,但不限于,Imurek®(咪唑硫嘌呤钠盐)、布喹那钠、Spanidin™(三盐酸胍立莫司,也被称为脱氧精胍菌素)、咪唑立宾(也被称为布雷青霉素)、Cellcept®(霉酚酸酯)、Neoral®(环孢霉素 A;也以 Sandimmune® 的商标销售不同的配方)、Prograf™(他克莫司,也被称为 FK-506)、Rapimmune®(西罗莫司,也被称为雷帕霉素)、来氟米特(也被称为 HWA-486)、Zenapax®、像泼尼松龙及其衍生物这样的糖皮质激素、像奥素健体(OKT3)这样的抗体,以及像胸腺细胞球蛋白这样的抗胸腺细胞球蛋白。如上所述,这些化合物可以有效用作增效剂与另一种免疫抑制药同时给药用于免疫抑制治疗。因此,类似上述的传统免疫抑制药的给药量要远远低于(例如,标准剂量的 20%到 50%)该化合物单独给药的情况。或者,所公开配方的给药量可以使得所产生的免疫抑制作用大于单独使用该药物和所公开的化合物所获得的效果总和的预期或成果。通常来说,免疫抑制药和增效剂在至少 2 周的时间内按有规律的间隔给药。

[0082] 本专利公开的化合物也可能结合一种传统的抗炎药(多种药物)进行给药,其中药物或给药量本身对于适当抑制炎症不起作用。

[0083] 化合物在体内的免疫抑制作用可以使用该领域内已知的已经建立的动物模型进行评估。这种试验可以用于评估免疫抑制性化合物的相对效力,以及估计用于免疫抑制治疗的合适剂量。举例来说,这类试验包括针对同种异体移植的清楚定性的大鼠模型系统,由 Ono 和 Lindsey(1969)说明,其中移植的心脏连接在同种异体受体动物的腹部大血管上,根据受体动物心脏的搏动能力来判定移植心脏的生存能力。Wang(1991)和 Murase(1993)描述了受体动物属于不同种类的一个异种移植模型。评估抗 GVHD 效力的模型包括给正常的 F1 小鼠注射亲本脾脏细胞;小鼠出现以脾脏肿大和免疫抑制为特点的 GVHD 综合症(Korngold,1978;Gleichmann,1984)。从单个脾脏制备单细胞悬浮液,并在存在和不存在伴刀豆蛋白 A 的情况下建立微孔基质来评估促有丝分裂的响应性的程度。

VI. 抗癌治疗

[0084] 研究表明下列疾病状态可以接受雷公藤甲素及其前体药物和其他类似药物的治疗。这类疾病状态是第二代雷公藤甲素类似物治疗的目标领域。雷公藤甲素类似物以及/或者前体药物化合物还可以与传统治疗药物结合使用。

[0085] 正如本文中的用法那样,“癌症”是指哺乳动物,尤其是人类体内发现的各类癌症或肿瘤或恶性肿瘤,包括白血病、肉瘤、癌和黑素瘤。癌症的例子包括脑癌、乳腺癌、子宫颈癌、结肠癌、头颈癌、肾肿瘤、肺癌、非小细胞肺癌、黑素瘤、间皮瘤、卵巢癌、肉瘤、胃癌、子宫癌和成神经管细胞瘤。“白血病”一词广义上是指造血器官的进展性恶性疾病,一般特点是血液和骨髓中白血球及其前体的扭曲性增殖和发展。“肉瘤”一般是指由胚性结缔组织一类

的物质构成的肿瘤,通常由嵌入纤维或均质物质的密集细胞组成。“黑素瘤”的含义是肿瘤源自于皮肤和其他器官的黑色素细胞系统。“癌症”一词是指由易于渗入周边组织并引发转移的上皮细胞构成的恶性增生。

[0086] 举例来说,癌症可能涉及源于生殖组织的细胞(如睾丸支持细胞、生殖细胞、正在形成或更加成熟的精原细胞、精细胞或精母细胞以及营养细胞、生殖细胞以及卵巢的其他细胞),淋巴或免疫系统(如霍奇金病和非霍奇金淋巴瘤),造血系统,以及上皮细胞(如皮肤,包括恶性黑素瘤,以及胃肠道)、实质性器官、神经系统,例如神经胶质瘤(参见 Y. X. Zhou 等,2002),以及肌肉骨骼组织。此类化合物可以用于治疗各种癌症,包括,但不限于,脑癌、头颈癌、肺癌、甲状腺癌、乳腺癌、结肠癌、卵巢癌、子宫颈癌、子宫癌、睾丸癌、膀胱癌、前列腺癌、肝癌、肾肿瘤、胰腺癌、食道癌以及/或者胃癌。其中特别考虑乳腺癌、结肠癌、肺癌和前列腺癌的治疗。治疗的目标是减缓肿瘤的生长、预防肿瘤的生长、诱发肿瘤的部分消退以及诱发肿瘤的完全消退,直至完全消失,以及预防实体瘤造成的转移结果。可以用本专利公开的化合物进行治疗的其他癌症包括,例如,多发性骨髓瘤、成神经管细胞瘤、淋巴瘤、成神经细胞瘤、黑素瘤、前恶性皮肤损伤、横纹肌肉瘤、原发性血小板增多症、原发性巨球蛋白血症、小细胞肺癌、大细胞肺癌、原发性脑瘤、子宫内膜癌、恶性胰岛素瘤、恶性类癌综合征、恶性高钙血症和肾上腺皮质癌。

[0087] 如上文所述,本类化合物可以通过任何传统的给药途径提供给遭受癌症和/或白血病折磨的病人。这种方法能有效减缓肿瘤的生长,预防肿瘤的生长,诱发肿瘤的部分消退以及诱发肿瘤的完全消退,直至完全消失。这种方法还能有效预防实体瘤造成的转移结果。

[0088] 本专利公开的成分可以作为唯一的疗法或配合其他对研究对象不具有抗癌作用的支持性或治疗性用药提供。这种方法还包括本专利公开的成分与一种或多种传统抗癌药物或生物蛋白剂的组合给药,其中药剂本身用量对于适当抑制肿瘤生长不起作用,其药量能为研究对象有效提供预期的抗癌作用。此类抗癌药物包括放线菌素 D、喜树碱、卡铂、顺铂、环磷酰胺、阿糖胞苷、道诺霉素、阿霉素、依托泊苷、氟达拉滨、5-氟尿嘧啶、羟基脲、吉西他滨、伊立替康、甲氨蝶呤、丝裂霉素 C、米托蒽醌、紫杉醇、泰索帝、替尼泊苷、拓扑替康、长春花碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨。抗癌生物蛋白剂包括肿瘤坏死因子(TNF)、肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)、其他 TNF 相关或 TRAIL 相关配体和因子、干扰素、白细胞介素-2、其他白介素、其他细胞因子、趋化激素和因子,以及肿瘤相关分子或受体的抗体(如抗 HER2 抗体)、以及与这类药剂反应或结合的药剂(如受体 TNF 超家族的成员、其他受体、受体拮抗剂以及对这些药剂有特异性的抗体)。

[0089] 如相关研究所述,例如 Fidler 等人的美国专利号 6,620,843,一种特定成分的体内抗肿瘤活性可以采用已经建立的动物模型进行评估。临床剂量和方案可以按照临床医生已知的方法,根据疾病严重程度和病人的整体状况确定。

[0090] 结构 I 的一种化合物,18-脱氧-19-脱氢-18-苯甲酸基-19-苯甲酰基雷公藤甲素(命名为 PG796)根据剂量,对白血病细胞具有细胞毒性(依据例 2)。因此本专利公开包括使用所公开的化合物作为细胞毒素剂,特别用于治疗癌症。

VII. 其他适应症

[0091] 本专利公开的化合物还可以用于治疗某些 CNS 疾病。谷氨酸酯实现了多种生理机能,但在不同的神经系统和精神疾病的病理生理学中也发挥了重要作用。谷氨酸酯的兴奋

毒性和神经毒性与缺氧、局部缺血和创伤,以及慢性神经退行性疾病或神经代谢疾病、阿尔茨海默氏痴呆、亨廷顿舞蹈病和帕金森病有关。鉴于雷公藤甲素所报道的神经保护作用,尤其是针对谷氨酸酯引发的细胞死亡的保护(Q. He 等,2003 ;X. Wang 等,2003),本专利公开的化合物设想用于对抗谷氨酸酯的神经毒性作用,从而成为此类疾病的一种创新疗法。

[0092] 最近有关于处于复发期的 MS 患者的证据表明,MS 患者的大脑中出现了改变了的谷氨酸体内平衡。神经毒性状况出现在 MS 中,它们可能是造成患有脱髓鞘病的病人体内少突细胞和神经细胞死亡的原因。通过采用本专利公开的化合物进行治疗来对抗谷氨酸酯受体介导的兴奋毒性,可能对 MS 病人具有治疗作用。诸如格林-巴利综合征、美尼尔氏病、多神经炎、单神经炎和神经根病之类的其他神经系统疾病可以用本专利公开的化合物进行治疗。

[0093] 本专利公开的化合物还可以用于治疗器官纤维化,包括某些肺病。特发性肺纤维化(PF)是一种进展性间质性肺病,病因不明。PF 的特点是肺间质中细胞内基质和胶原的过度沉积以及由于炎症和纤维化,肺泡被瘢痕组织逐渐取代。随着疾病的进展,瘢痕组织的增加干扰了肺部向血流输送氧气的的能力。根据相关报告,雷公藤甲素的一种 14-琥珀酰亚胺酯能够阻断博来霉素引发的 PF(G. Krishna 等,2001)。因此,本专利披露的化合物和配方可以有效治疗 PF。同时考虑了类肉瘤病、纤维化肺和特发性间质性肺炎等其他呼吸道疾病的治疗。

[0094] 其他设想可以采用本专利公开的化合物进行治疗的肺部相关疾病包括严重急性呼吸综合症(SARS)和急性呼吸窘迫综合征(ARDS)。尤其是对于 SARS 来说,如下文所述,在疾病过程达到峰值之前病毒含量的减少(SARS-CoV)和皮质类固醇治疗的有效性表明 SARS 最严重的危及生命的影响的形成可能是由于身体对感染的多度反应(免疫超敏反应),而不是病毒本身的作用。(同样参见正在共同审理中和共同拥有的美国临时申请序号 60/483,335,通过引用纳入本文。)皮质类固醇治疗已经被用于 SARS 病人来抑制可能描绘免疫超敏反应特点的细胞因子的大量释放,希望它会在下一阶段终止肺病的发展。皮质类固醇治疗在减少 SARS 的部分主要症状方面已经产生了良好的临床效果。尽管如此,也存在多种与治疗相关的副作用,而且存在对选择性更高的免疫抑制剂以及/或者抗炎药的明显需求。

[0095] 雷公藤甲素的相关化合物还可以用于治疗某些 CNS 疾病。谷氨酸酯实现了多种生理机能,包括在各种神经系统和精神疾病的病理生理学中也发挥了重要作用。谷氨酸酯的兴奋毒性和神经毒性与缺氧、局部缺血和创伤,以及慢性神经退行性疾病或神经代谢疾病、阿尔茨海默症(AD)、亨廷顿舞蹈病和帕金森病有关。鉴于雷公藤甲素所报道的神经保护作用,尤其是针对谷氨酸酯引发的细胞死亡的保护(He 等,2003 ;Wang 等,2002a),本专利公开的化合物设想用于对抗谷氨酸酯的神经毒性作用,从而可能成为此类疾病的一种创新疗法。

[0096] 大脑淀粉样血管病是 AD 的病理特征之一,而 PC12 细胞对突变型 β 淀粉样蛋白质聚集体所引发的神经毒性极其敏感。采用 β 淀粉样蛋白治疗的 PC12 细胞表现出了细胞内活性氧累计量的增加,并出现凋亡样死亡(Gu 等,2004)。 β 淀粉体的治疗引发了 PC12 细胞中 NF- κ B 的激活,并提高了细胞内的 Ca^{2+} 含量。研究表明雷公藤甲素能显著抑制 β 淀粉样蛋白诱发的凋亡,从而抑制由于 β 淀粉体引发的细胞内 Ca^{2+} 浓度的增加。因此,雷公藤

甲素的相关化合物对于预防 β 淀粉样蛋白引发的细胞凋亡级联以及保护 AD 病人的神经元存活可能是有效的。

[0097] 雷公藤甲素凭借减少亚硝酸盐积累、TNF- α 和 IL-1 β 的释放,以及这些炎症因素的 mRNA 诱导表达,对脂多糖 (LPS) 激活小胶质作用表现出了强大的抑制影响。(Zhou 等, 2003)。雷公藤甲素还减弱了主要中脑神经元 / 神经胶质混合培养基中 LPS- 诱发的 ^3H - 多巴胺摄取量的减少以及酪氨酸羟化酶阳性神经元的损耗 (Li 等, 2004)。不含 LPS 的雷公藤甲素表现出了神经营养性效应。雷公藤甲素还阻断了 LPS 诱发的小神经胶质的激活以及 TNF- α 和亚硝酸盐的过度产生。雷公藤甲素可以通过抑制小神经胶质的激活,保护多巴胺能神经元免受 LPS 诱发的伤害,这与帕金森病相关,进一步说明了雷公藤甲素的相关化合物的神经保护潜力。

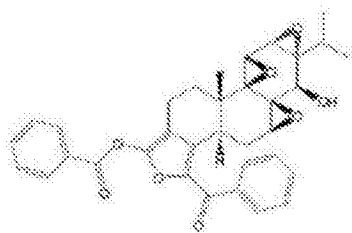
[0098] 雷公藤氯内酯醇已经证明是雷公藤甲素的一种前体药物,促进了在初代培养的大鼠中脑神经元中的多巴胺能神经元轴突伸长,并保护多巴胺能神经元免遭由 1- 甲基 -4- 苯基吡啶离子引发的神经毒性损伤 (Li 等, 2003)。原位杂交显示雷公藤氯内酯醇刺激了源于大脑的神经营养因子 mRNA 的表达。而且,在 PD 的一个体内大鼠模型中,FK506 表现出了神经营养活性,以 0.5-1 $\mu\text{g/kg}$ 的剂量服用的雷公藤氯内酯醇促进了接受神经外科治疗的大鼠的复原,产生了 SN 神经元的显著保留并保护了酪氨酸羟化酶阳性神经元周围的树突过程,减弱了多巴胺耗竭,增加了多巴胺能神经元的存活,并减弱了大脑中 TNF- α 和 IL-2 水平的提高 (Cheng 等, 2002)。而且,雷公藤氯内酯醇在低于神经保护和免疫抑制活性所需的浓度下表现出了神经营养活性。

[0099] 近期有来自处于复发期的 MS 病人的证据表明大脑中存在改变了的谷氨酸体内平衡。神经毒性状况出现在 MS 病人中,它们可能是造成少突细胞和神经细胞死亡的原因。通过采用雷公藤甲素的相关化合物进行治疗来对抗谷氨酸酯受体介导的兴奋毒性,可能对 MS 病人具有治疗作用。诸如格林 - 巴利综合征、美尼尔氏病、多发性神经炎、多神经炎、单神经炎和神经根病之类的其他神经系统疾病可以用雷公藤甲素的相关化合物进行治疗。

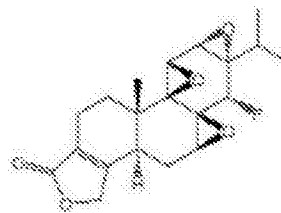
VIII. 活性配方

[0100] 活性成分可能是 PG796、PG763、PG762 或 PG695,相关结构,或疏水性系数大于 0.5 的任何雷公藤甲素衍生物 (参见下面的表 3)。

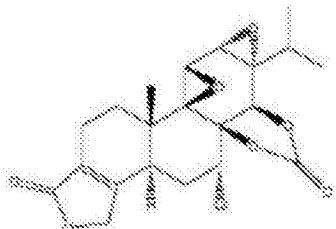
[0101] 示例性雷公藤甲素类似物的化学结构如下所示:



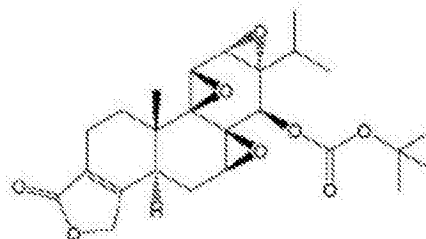
PG796



PG763



PG762



PG695

[0102] 正如化学和制药科学领域的技术人员所了解的那样,分配系数或分布系数是一种化合物在处于平衡的两种非混相的混合物中的浓度比值。这种系数是化合物在这两种相中溶解度差异的一种度量。一般来说,混合物中的一种溶剂是水,而第二种是辛醇这样疏水性的。因此,分配系数是一种化学物质亲水性(“爱水的”)或疏水性(“恐水的”)程度的一种度量。在医疗实践中,举例来说,分配系数可以有效估计药物在体内的分布情况。辛醇/水分配系数高的疏水性药物优先分配给疏水性间室,比如细胞的脂质二重层,而亲水性药物(辛醇/水分配系数低)在血清这样的亲水性间室中优先发现。因此可以根据在水和脂肪中的溶解度分析一种配方的特点,这是因为口服药物需要在服用后通过肠道内层,在血液中携带,并渗透脂质细胞膜到达细胞的内侧。亲脂性细胞膜的一种模型化合物是辛醇(一种亲脂烃),因此辛醇/水分配系数的对数,被称为“LogP”,被用于预测潜在的口服药物的溶解性。该系数可以通过实验测定或进行预测计算,在这种情况下它有时被称为“计算分配系数”或“疏水性系数”。

[0103] 表 3 雷公藤甲素和雷公藤甲素类似物/衍生物的疏水性系数

化合物	化学类别	疏水性系数	
		方法 A	方法 B
雷公藤甲素		-0.08	0.27
PG796 (MRx102)	内酯	3.68	4.11
PG763 (MRx103)	卤素	0.63	0.87
PG762 (MRx104)	c-环	1.60	1.89
PG490-88 (MRx108)	酯类	-0.18	0.19
PG695 (MRx109)	碳酸盐	1.61	1.85

方法 A - Crippen 片段化法 :J. Chem. Inf. Comput. Sci., 27, 21 (1987)

方法 B - Viswanadhan 片段化法 :J. Chem. Inf. Comput. Sci. , 29, 163(1989)

[0104] 通过文献调查,可以获得关于某些药物类别的最佳 LogP 值的一些一般准则。(参见 LogP 和 pKa 的测定及其使用指南,作者:Mark Earll www.raell.demon.co.uk/chem/logp/logppka.html)。

一般来说,假设为被动吸收,

- 最佳 CNS 渗透,约为 $\text{LogP} = 2 \pm 0.7$ (Hansch)
- 最佳口服吸收,约为 $\text{LogP} = 1.8$
- 最佳肠道吸收 $\text{LogP} = 1.35$
- 最佳结肠吸收 $\text{LogP} = 1.32$
- 最佳舌下吸收 $\text{LogP} = 5.5$
- 最佳经皮 $\text{LogP} = 2.6$ (和低 mw)

[0105] 配方及剂型:

- 低 LogP (小于 0) 可注射
- 中 (0-3) 口服
- 高 (3-4) 经皮
- 非常高 (4-7) 在脂肪组织中发生毒性累积

[0106] 总体来说,认为疏水性系数为 0.5 或更高的雷公藤甲素化合物不适合于用于注射的配方。举例来说,在表 3 的化合物中,熟练的技术人员通常预测化合物 PG796、PG763、PG762 或 PG695 不具备适于静脉注射给药的可操作疏水性系数。然而,出人意料的是疏水性系数为 0.5 或更高的化合物的有效可注射配方(举例来说,比如 PG796、PG763、PG762 或 PG695) 设计且标识如下。

示例

[0107] 以下示例实质上是说明性的,而且不可能打算构成限制。

例 1

乳剂制备

[0108] 乳剂组分包括三辛酸甘油酯 (g) 20% ;大豆油 (g) 20% ;磷脂 ([60%]L- α -卵磷脂、L-卵磷脂、 σ 61755) (g) 2% ;胆酸钠 (g) 0.2% ;甘油 (g) 2.5% ;水 (ml) 55%

含有 PG796 (MRx102) 的乳剂制剂

1. 称量三辛酸甘油酯、大豆油和磷脂 (L-卵磷脂),放入 15mL 锥形塑料离心管或合适的试管(如,采用塑料试管以便破损)中。

2. 将试管放在超声波仪探针的底部上方,使得超声波仪的尖端距离试管底部大约 5mm,而且探针不接触试管的侧面。将其夹好。本阶段不要使用冷水浴。

3. 将超声发生器的功率等级设定为略低于微探头限值,占空比为 50%。开启超声波仪 20 秒。

4. 触摸试管评估其温度,并仔细观察其内容物,以判定磷脂是否分散。超声波仪能非常高效地产生剪切能和气穴现象,但不是高效的混合器,因此可能需要松开管夹,用探针作为搅拌棒来打碎磷脂。

5. 为了分散磷脂,应让液体加热到 40°C -50°C。继续短时间进行超声波降解直至液体变温,但不要烫手。一旦液体完成升温,将试管悬放在装有温水的烧杯中,并继续进行超声

波降解 5 分钟或直至磷脂达到完全分散,取时间长的一种。

6. 称量 PG796 (MRx 102) 并将其加入约为 20℃ -25℃ 的液体中。对溶液进行短时间的超声波降解 (每次大约 20 秒) 直至 PG796 (MRx102) 溶解。每次超声波降解处理后,将试管悬放在装有水 (大约 15℃ -20℃) 的烧杯中冷却到确保温度低于 40-45℃。可能大约要进行 10 次超声波降解使 PG796 (MRx102) 完全溶解。

7. 测定 / 称量水和胆酸钠,放入烧杯,使胆酸钠溶解。加入甘油并使其溶解在胆酸钠溶液中。

8. 将装有磷脂 / 油 / PG796 (MRx102) 的试管悬放在冷水浴中,加入大约 1/3 的水 / 胆酸钠 / 甘油混合物,调节超声发生器的功率等级,使其略低于微探头的限值 (约为 4.9),让试管在冷水浴中进行超声波降解 1 分钟。

9. 再加入 2/3 的水 / 胆酸钠 / 甘油混合物,重复超声波降解 1 分钟。加入最后一份水 / 胆酸钠 / 甘油混合物,再进行超声波降解 1 分钟。如果水 / 胆酸钠 / 甘油混合物在乳剂中未能完全溶解,则进一步进行超声波降解。

10. 从超声探针上取下试管,检查 pH 值 (本配方约为 7.6)。根据需要,使用 0.1N 氢氧化钠小心将 pH 值调节到 7.5 到 8.5 的范围内。更接近 7.5 的 pH 值在生理学上适合于动物给药。

11. 将试管放回冷水浴中的超声探针上,连续进行 8 分钟的超声波降解。

12. 注意乳剂应为白色不透明,类似浓奶油。

13. 用 0.45 μm 的过滤膜 (聚醚砜 0.45 μm 孔径的过滤膜,如 Millipore Millex-HP 注射器式过滤器 SLHPM33RS,放射消毒)。乳剂最好看来未发生改变。

14. 将含有乳剂的 PG796 (MRx102) 用于测试对象开展适当的研究。

[0109] 用于制备 5ml 含有 PG796 (MRx102) 的乳剂的成分

配合 PG796 (MRx102) 的成分	数量
三辛酸甘油酯 (g)	1
大豆油 (g)	1
磷脂 (g)	0.1
甘油 (g)	0.125
胆酸钠 (g)	0.01
PG796 (MRx102) (mg)	5
水 (ml)	2.77

[0110] 成分 (赋形剂) 浓度范围

成分 ↓ 配方 →	范围	E-0212-4
三辛酸甘油酯	0% -50%	20%

大豆油	0% -45%	20%
磷脂	1% -3%	2%
甘油	1% -5%	3%
胆酸钠	0.1% -0.3%	0.2%
水	50% -60%	55%

[0111] 可选成分（赋形剂）

可选成分或赋形剂如下所示。

1. 三辛酸甘油酯包括
 - a. 三己酸甘油酯
 - b. 三庚酸甘油酯，
 - c. 三壬酸甘油酯，
 - d. 癸酸丙三醇酯
2. 大豆油
 - a. 蓖麻油，
 - b. 玉米油，
 - c. 棉花籽油，
 - d. 橄榄油，
 - e. 花生油，
 - f. 薄荷油，
 - g. 红花油，
 - h. 芝麻油，
 - i. 氢化植物油，
 - j. 氢化大豆油，以及
 - k. 椰子油的中链甘油三酯
 1. 中链甘油三酯棕榈仁油
3. 磷脂
 - a. 氢化大豆磷脂酰胆碱，
 - b. 二硬脂酰磷脂酰甘油酯，
 - c. L- α -二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱，
 - d. L- α -二肉豆蔻酰甘油磷脂
4. 甘油
 - a. 聚乙二醇 300，
 - b. 聚乙二醇 400，
 - c. 乙醇，
 - d. 丙二醇，
 - e. N-甲基-2-吡咯烷酮，

- f. 二甲基乙酰胺, 以及
- g. 二甲亚砷
- 5. 胆酸钠
 - a. 牛磺胆酸钠,
 - b. 牛磺- β -鼠胆酸钠,
 - c. 牛磺脱氧胆酸钠,
 - d. 牛磺鹅去氧胆酸钠,
 - e. 甘氨酸胆酸钠,
 - f. 甘氨酸脱氧胆酸钠, 以及
 - g. 甘氨酸鹅去氧胆酸钠

[0112] 或者上述规程可以通过步骤 8 的第一部分执行, 其中那个 PG796 (MRx102) 悬浮 / 溶解在磷脂 / 油混合物中, 而悬浮液 / 溶液随后可以作为药品储存。因此, 本成分无水, 最大程度地降低了雷公藤甲素或雷公藤甲素类似物的水解可能性, 延长了保存期限, 然后可以按照步骤 8 加入水 / 胆酸钠 / 甘油混合物, 并可以执行剩余程序, 继续进行到上述的步骤 14, 到向研究对象给药为止。

[0113] 同样地, 为了促进稳定性、分散和过滤, 可以对该成分进行消毒 (如过滤、高压蒸汽灭菌), 以及 / 或者可以加入其他赋形剂以促成所需大小的药丸。

[0114] 初步的乳剂评估

[0115] 打算注射或输液给药药用乳剂通常包含甘油三酯, 如含有天然磷脂 (蛋黄或大豆) 的大豆油 (SBO), 采用高压均质机乳化。非离子型表面活性剂, 如吐温类 (聚山梨醇酯)、Solutol® 和 Kolliphor (Cremophor®), 一般不用于注射或输液配方, 因为它们受热会发生相转化, 而可注射的乳剂通常是经过高温消毒的。但一些初步调研是从非离子型表面活性剂着手的。

[0116] 探究了非离子型表面活性剂聚山梨醇酯 80 (又名吐温 80) 与 Span 80 的各种比值, 制备并检测了以下配方。将三辛酸甘油酯 (GTO) 作为甘油三酯油, 因为研究表明 PG796 (MRx102) 在 GTO 中的溶解度比在 SBO 中大大约 3.4 倍。配方及结果如表 4 所示。这项初步实验的结果是鼓舞人心的, 因为含有近 70% 水的配方达到了相当高的溶解度。

[0117] 表 4: 初步乳剂配方及溶解度

GTO	Span 80	吐温 80	水	PG796 (MRx102) 的溶解度 ($\mu\text{g/ml}$)
29.4%	1.65%	0.31%	68.6%	681

[0118] 由于大鼠静脉注射时缺少副作用可以接受的共溶剂 / 表面活性剂配方, 因此考虑了乳剂。为乳剂配方选择了下列预期的特性:

- 单独作为媒介, 在体内 (对啮齿动物) 不具备明显副作用。
- PG796 (MRx102) 的稳定浓度 $>2\text{mg/ml}$,
- 过滤后保留了 95% 的 PG796 (MRx102) 浓度,
- 可在 7 天内保持可以接受的稳定度, 以及
- 与 MRx 100 相容。

[0119] 使用探头超声波仪在水相中分散油相,形成奶油状不透明悬浮液,来配制乳剂配方。

[0120] 范围确定配方

[0121] 典型的乳剂配方含有 10-30% 的甘油三酯,最常见的是 SBO,用 0.5-2% 的磷脂分散在水相中,其中含有甘油作为张度剂。然而,由于 PG796 (MRx102) 观察到的低溶解度,初始配方采用 40% 的 GTO,一种中链甘油三脂,配制,研究发现其中的 PG796 (MRx102) 溶解度较高。此外,部分配方加入了 PEG-400 和乙醇以降低水相的极性,以提高溶解度。一些配方包含胆酸钠作为助表面活性剂。这些配方,加上目测评估和 PG796 (MRx102) 的溶解度值参见表 5。所有配方都达到了至少为 1mg/mL 的溶解度。在每种情况下,储存八天后发现效力有所损失,但保持了大部分的原始效力。PEG-400 和乙醇对于提高溶解度只是略微有益,其中一种含有 PEG-400 的配方未能形成均质的乳剂。

[0122] 表 5:第一轮乳剂配方及溶解度

配方号→ 组分↓		E-1	E-2	E-3	E-4	E-5
三辛酸甘油酯		40%	40%	40%	40%	40%
磷脂		2%	2%	2%	2%	2%
PEG-400		10%	--	--	10%	--
乙醇		--	10%	--	--	10%
胆酸钠		--	--	0.2%	0.2%	0.2%
水		48%	48%	58%	48%	48%
PG796 (MRx102)		-----2mg/mL-----				
目测评估		2 层	均质	均质	均质	均质
PG796 (MRx102) 的溶解度 (μg/mL)	0 小时	1560	1913	1529	1787	1673
	1 小时	1677	1879	1514	1795	1680
	24 小时	1484	1939	1353	1762	1654
	8 天	--	1353	1176	1470	1329

[0123] pH 值对稳定性的影响

[0124] 药用乳剂一般是在中性或略碱性 pH 值下配制的,因为它们是通过脑磷脂、游离脂肪酸盐和胆酸盐这类对 pH 值很敏感的阴离子表面活性剂产生的液滴之间的静电排斥实现稳定的。然而,这一 pH 值范围对 PG796 (MRx102) 的化学稳定性来说有可能不是最理想的。为了检测这一点,在 4-8 之间的不同 pH 值下配制了多种乳剂。加入了缓冲液来控制 pH 值,并加入了对 pH 值不敏感的表面活性剂,十二烷基硫酸钠来代替胆酸钠,以确保甚至是在低 pH 值乳剂中的负电荷。配方和结果如表 6 所示。所有配方在室温下在长达两周的时间内都相当稳定。尽管效力和纯度有所差异,但相对于 pH 值没有明显趋势,这说明乳剂中 PG796 (MRx102) 的稳定性在这一范围内与 pH 值无关。

[0125] 表 6:pH 值对乳剂中 PG796 (MRx102) 稳定性的影响

目标 pH 值 →		4.0	5.0	6.0	7.0	8.0
组分 ↓						
三辛酸甘油酯		40%	40%	40%	40%	40%
磷脂		2%	2%	2%	2%	2%
乙醇		10%	10%	10%	10%	10%
缓冲液中 0.1% SDS		48%	48%	48%	48%	48%
缓冲液（10 mM）		乙酸盐	乙酸盐	组氨酸	磷酸盐	三异丙基乙磺酰
PG796（MRx102）		-----1mg/mL-----				
测得的 pH 值		4.06	4.97	5.98	7.03	8.05
PG796 （MRx102）的 溶解度 （μg/mL）	0 小时	870	1006	1093	996	929
	24 小时	917	922	890	849	929
	1 周	1001	972	948	760	1041
	2 周	848	910	850	822	930
PG796 （MRx102）的 纯度 值面积 %	0 小时	98.9	99.2	99.2	99.4	98.7
	24 小时	99.3	99.4	99.2	99.1	99.2
	1 周	98.9	99.1	98.9	98.8	99.1
	2 周	97.2	98.3	98.8	91.0	98.3

[0126] 第二轮乳剂配方

[0127] 为了改变 40% 的三辛酸甘油酯媒介, 配方的配制采用含量较低的甘油三酯和 / 或部分或全部取代的大豆油来代替三辛酸甘油酯。这种配方及其溶解度数据如表 7 所示。列出两个值时, 针对的是重复分析。这些配方在 121℃ 下高温消毒 8 分钟。还配制了配方 E-0212-4 的安慰剂版本, 并对其进行消毒处理, 以测定安慰剂成分在 HPLC 分析中的共出峰水平, 试验发现该水平为 1.23%。

[0128] 正如所预期的那样, 降低甘油三酯的含量并用大豆油取代部分或全部的三辛酸甘油酯导致药物的溶解度有所降低。但只有在甘油三酯的含量从 40% 降到了 30%, 所有 GTO 被大豆油所取代的配方 E-0212-1 中, PG796 (MRx102) 的溶解度远低于 1mg/mL。

[0129] 表 7 第二轮乳剂配方

配方号 →	E-0212-1	E-0212-2	E-0212-3	E-0212-4	E-0212-5
组分 ↓					
三辛酸甘油酯	--	15%	30%	20%	--
大豆油	30%	15%	--	20%	40%
磷脂	2%	2%	2%	2%	2%
甘油	3%	3%	3%	3%	3%
胆酸钠	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%
水	65%	65%	65%	55%	55%
PG796 (MRx102)	-----1mg/mL-----				

PG796 (MRx102) 的溶解度 (μ g/mL)	初始	682	929, 928	968	1090, 991	934, 867
	消毒后	621	771, 847	913	1046, 905	913, 867
PG796 (MRx102) 的纯度 (峰值面积 %)	初始	96.2%	96.5, 96.6%	97.9%	98.1, 97.3%	95.5, 96.1%
	消毒后	94.6%	95.6, 96.3%	97.2%	97.4, 96.7%	99.6, 95.9%

[0130] 关于乳剂的毒理学发现

[0131] 大鼠静脉注射了 5mL/kg 的配方 E-3 (40% GTO, 2% 磷脂, 0.2% 胆酸钠)。这些动物注射后短期内表现正常, 但变得嗜睡, 而且随后在 5-10 分钟内由于呼吸困难而倒下。大鼠在 60-90 分钟内复原并表现正常。第二天第二次给药观察到会造成更加严重的症状。接下来两天的注射产生了类似的反应。第二组大鼠静脉注射 5mL/kg 的配方 E-5 (与 E-3 相同的配方, 但添加了 10% 的乙醇)。所有这些动物都在 10 分钟后躺倒不动, 并在大约 45 分钟后死亡。

[0132] 在 2mg/mL PG796 (MRx102) 的高浓度下对配方 E-3 进行检测, 发现它是可溶的。较高的浓度使剂量响应降低。因此, 一组大鼠以 1.5mL/kg 的配方 E-3 的降低剂量给药。这些动物注射后 8-10 分钟内表现正常, 随后躺倒 8-10 分钟。因此不良反应较为不严重, 而且这种剂量下躺倒的时间和复原的时间较短。三个实验的结果汇总于表 8。

[0133] 表 8: 采用乳剂配方的初始大鼠研究

	实验 1	实验 2	实验 3
组分 ↓ 配方 →	E-3	E-5	E-3
三辛酸甘油酯	40%	40%	40%
磷脂	2%	2%	2%
乙醇	- -	10%	- -
胆酸钠	0.2%	0.2%	0.2%
水	58%	48%	58%
注射量 i. v.	5ml/kg	5ml/kg	1.5ml/kg
死亡	无	全部	无
复原时间	60-90 分钟	不适用	15-17 分钟

[0134] 在乳剂与纯大豆油 (40%, 乳剂 E0212-4) 和三辛酸甘油酯和大豆油的等量混合物 (每种 20%, 乳剂 E0212-5) 的比较中, 大鼠每天静脉注射 3mL/kg, 注射 4 天。在注射的第一

天,这些动物注射的是 E0212-4,注射后在 7 分钟时变得略微嗜睡,到 40 分钟完全复原。注射 E0212-5 的大鼠在 8 分钟时略微嗜睡,到 35 分钟完全复原。之前的测试已经表明大鼠在静脉注射不同的乳剂配方后会躺倒很长一段时间,症状更严重。采用这两种最新的乳剂配方为大鼠进行静脉注射时,结果有所改善。为大鼠进行乳剂注射的副作用在第 2-4 天与第 1 天观察到的情况非常相似。使用 40% 的 SBO 不能完全消除使用 20% GTO/20% SBO 时观察到的副作用。第一次注射后观察到的副作用不如 5ml/kg,甚至是 1.5ml/kg 的配方 3 严重。没有出现呼吸困难,只有轻微的嗜睡,而较早的研究出现了呼吸困难和嗜睡。

[0135] 20% GT/20% SBO 的乳剂配方 (E-0212-4) 表现出了可以接受的化学溶解度 / 稳定性,在大鼠研究的媒介单独检测中是非致死性的,会造成轻微的副作用 (小于其他乳剂配方制剂),它被选为用于 PG796 (MRx102) 和 MRx100 针对大鼠的升级剂量 /7 天重复剂量比较研究,以及 PG796 (MRx102) 针对犬类的升级剂量 /7 天重复剂量研究的修改媒介配方。

[0136] 表 9 比较乳剂配方的大鼠副作用研究

组分 ↓ 配方 →	E-0212-4	E-0212-5
三辛酸甘油酯	20%	- -
大豆油	20%	40%
磷脂	2%	2%
甘油	3%	3%
胆酸钠	0.2%	0.2%
水	55%	55%
注射量 i. v.	3ml/kg	3ml/kg
死亡数	无	无
复原时间	40 分钟	35 分钟

[0137] 药代动力学 / 毒性动力学的考虑

[0138] 雷公藤甲素分子作用机理仍然难以捉摸,但根据有关报告,雷公藤甲素与转录因子 TFIIH 的亚单位,人体 XPB (也被称为 ERCC3) 共价结合,抑制其依赖于 DNA 的 ATP 酶活性,造成对 RNA 聚合酶 II- 介导转录以及可能的核苷酸切除修复的抑制。确认 XPB 为雷公藤甲素的目标解释了雷公藤甲素的许多已知生物作用。例如,雷公藤甲素与 XPB 结合导致包括 NF kappa B (NF- κ B) 在内的一些生长和存活促进剂以及抑凋亡因子 Mc1-1 和 XIAP 的下调。(Titov, 等,自然化学生物学 (2011) 7 (3):182-8)。随后,还发现雷公藤甲素衍生物 MRx102 具有降低 mRNA 水平、降低 NF- κ B 以及降低 Mc1-1 和 XIAP 等作用。在纳摩尔级的低浓度下,MRx102 还会引发 AML 患者 CD34(+) 源祖细胞,以及更重要的是 CD34(+)CD38(-) 干细胞 / 源祖细胞的大量凋亡,甚至是在他们受到与源自骨髓的间充质干细胞的共培养保护的情况下。在体内,MRx102 会大大降低白血病的负担,并延长带有 Ba/F3-ITD 细胞的非肥

胖型糖尿病 / 重度联合免疫缺陷小鼠的存活时间。因此,MRx102 在体外和体内都具备有效的抗白血病作用,有可能消除 AML 干细胞 / 源祖细胞,攻克白血病细胞的微环境保护,并保证了临床研究。(Carter 等, (2012) 白血病 26:443-50)。而且,雷公藤甲素和雷公藤甲素衍生物可以作为新型分子探针用于研究转录,还可能通过抑制 XPB 的 ATP 酶活性成为新型抗癌药。

[0139] XPB 结合的另一个结果是抑制核苷酸切除修复。阻断 DNA 修复这种作用会增强以 DNA 为靶标的药物的活性,包括针对实体瘤的顺铂和拓扑异构酶 1 抑制剂;研究表明这两种药物都会与雷公藤甲素发生增效作用。采用 MV4-11 细胞在体外对 MRx102 与用于 AML 的两种药物,阿糖胞苷和依达比星,之间可能的增效作用进行了研究,证明 MRx102 与用于 AML 的这两种药物之间存在增效作用。

[0140] 有关雷公藤甲素和雷公藤甲素衍生物的一个担忧是它们的环氧结构,被认为可能有毒;但蛋白酶体抑制剂抗癌药卡非佐米(来那度胺)是含有环氧化物的一种环氧甲酮四肽,最近获得了 FDA 的核准。而且雷公藤甲素虽然是一种三环氧化物,但 Titov 等人(见上文)的研究表明它在结合特性方面具有灵敏的选择性,而不是混杂的。尽管如此,在一些动物研究以及临床中所报告的雷公藤甲素安全问题已经造成了“形象问题”,并构成了可能的安全挑战;因此雷公藤甲素仍未被视为适于临床使用,也尚未进行商业开发。

[0141] 通常认为雷公藤甲素前体药物比雷公藤甲素更为安全。在一项最初的啮齿动物毒理学研究中,PG796(MRx102)在 7 天高达 1.5mg/kg/ 天的静脉注射剂量下未表现出总体的或组织病理学的毒性作用。雷公藤甲素前体药物作为乳剂配方,被认为其毒性动力学曲线的特点是平坦的 AUC 加上最小化的 $C_{\text{最大}}$ 。[两者结合,假定要达到最佳功效需要对 RNA 聚合酶进行持续抑制,则反过来需要长期服用药物的药代动力学曲线]。图 1 给出了 PG796(MRx102) 和雷公藤甲素并行比较毒理学研究,其中两种药物都采用本文所公开的创新型乳剂配方向啮齿动物进行静脉给药,研究证明,基于总体和组织病理学标准,PG796(MRx102) 的毒性至少要比雷公藤甲素低 20 倍。PG796(MRx102) 的无作用剂量(“NOAEL”)对于啮齿动物七天静脉注射再次超过 1.5mg/kg/ 天,确认了初始结果。有趣的是询问雷公藤甲素的前体药物为什么会比天然产品本身更安全;在不希望被理论所束缚的同时,也许答案就在于直接服用或通过其载体 PG796(MRx102) 释放的雷公藤甲素的药代动力学曲线。单独提供雷公藤甲素时(参见图 1 中连接圆圈的线条),其 $C_{\text{最大}}$ 非常高而且急速下降使得在给药后两个小时,循环中再无残留。尽管如此,施用前体药物 PG796(MRx102) 时,雷公藤甲素的 $C_{\text{最大}}$ 约为雷公藤甲素直接给药情况下(参见图 1 中连接三角形的线条)的十分之一,而雷公藤甲素的血液浓度仍较为稳定,而且正如在两小时时间点所观察的那样,证明了较长的 AUC(“曲线下面积”)。它也仍高于治疗水平(用不带符号的粗线表示)。在 PG796(MRx102) 对比雷公藤甲素的 $C_{\text{最大}}$ /AUC 曲线图中的差异被认为是由于脂质前体药物 / 乳剂配方组合的理化特性。一般来说,疏水性系数大于 0.5 的雷公藤甲素前体药物相对于水来说,更易溶于油脂,而且预期要花更长的时间来转化药物剂型;这些特点可能产生更平的转化曲线和较少的药物释放 $C_{\text{最大}}$ 尖峰。

[0142] PG490-88 通过静脉给药,进入临床试验并在 AML 患者身上表现出了前景广阔的作用。(Xia Zhi Lin 和 Zhen You Lan,血液学,93:14(2008))。尽管如此,作为一种前体药物,它被不完全不规律地转化为活性实体,雷公藤甲素,而且,正因为如此,可能成为产生

毒性的原因。但 PG490-88 的确具备得到优化的 AUC, 随时间推移相对平坦, 没有强烈的 $C_{\text{最大}}$ 。利用人体血清将 PG796 (MRx102) 快速而且完全地转化为雷公藤甲素 (同样在大鼠和犬类体内观察到), 而 PG490-88Na 在人体血清中不完全地被转化为雷公藤甲素的发现论证了 PG796 (MRx102) 的转化并不取决于种酶 (酯酶) 活性的变化, 而是取决于脂质前体药物 / 乳剂配方的理化特性。

[0143] 将脂质乳剂作为药物释放体系的研究已经开展了一段时间。(参见 Hippalgaonkar 等, (2010) AAPS 制药科技 11 (4): 1526—1540; Stevens 等, (2003) 商业简报: 制药技术 2003, p. 1-4)。固体脂质纳米粒 (SLN) 释放体系可能相对于具有生物活性的植物提取物具备优势, 比如提高溶解度和生物利用度, 提供抗毒保护, 以及提高药理活性。根据相关报告, 一种雷公藤多苷 (TG) 的固体脂质纳米粒 (TG-SLN) 释放体系具有抗 TG- 引发的雄性生殖毒性的保护作用。在一项针对大鼠的 TP-SLN 和游离 TP 的毒代动力学和组织分布的比较研究中, 雷公藤甲素 (TP) 被作为一种模型药物。开发出了一种快速而灵敏的 HPLC-APCIMS/MS 方法用于测定大鼠血浆中的雷公藤甲素。十四只大鼠被随机分为 2 组, 每组各七只大鼠, 每只都进行毒代动力学分析, 一组使用游离 TP (450 $\mu\text{g/kg}$) 而另一组采用 TP-SLN 配方 (450 $\mu\text{g/kg}$)。给药之前以及给药后 0.083, 0.17, 0.25, 0.33, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3 和 4 小时进行抽血。三十六只大鼠被随机等分成六个组进行组织分布研究。一般的大鼠接受 TP (450 $\mu\text{g/kg}$) 的灌胃给药, 而另一半接受 TP-SLN (450 $\mu\text{g/kg}$) 给药。在给药后 15, 45 和 90 分钟, 采取血液、肝脏、肾脏、脾脏、肺部和睾丸组织的样本。采用 LC-APCI-MS-MS 测定样本中的 TP 浓度。纳米配方的毒代动力学结果表现出了曲线下面积 (AUC) 的显著增大 ($P < 0.05$), $T(\text{最大})$ 和平均停留时间 (MRTs) ($0-t$) 的大幅延长 ($P < 0.05$), $C(\text{最大})$ 的明显减小 ($P < 0.05$)。纳米配方促进了吸收, 具有缓释特点, 说明毒代动力学的改变对于提高纳米配方的功效来说可能是最重要的机理。组织分布的结果说明了肺部和脾脏中 TP 浓度趋于增加, 同时 TP-SLN 组中血浆、肝脏、肾脏和睾丸中的 TP 浓度趋于降低。在多个时间点, TP-SLN 组睾丸组织的 TP 浓度低于游离 TP 组。这为采用 TP-SLN 时所观察到的生殖毒性的降低提供了一条重要线索。总体而言, 口服的雷公藤甲素脂质纳米粒配方促进了吸收, 具有缓释特点 (Xue 等, (2012) 欧洲制药科学杂志, 47 (4): 713-7)。纳米配方的毒代动力学结果表现出了 AUC 的显著增加和 $C_{\text{最大}}$ 的减小。这些结果说明毒代动力学的变化是提高安全性的一个考虑因素。

[0144] 药代动力学数据

[0145] Calvert 和 SRI 研究中雷公藤甲素含量的 TK 比较 - 雄性和雌性

[0146] 血浆雷公藤甲素浓度 (ng/ml)

血浆雷公藤甲素浓度 (ng/ml)

时间 (小时) >	0	0.25	0.5	1	2	24
PG796 (MRx102)						
0.5 mg/kg (乳剂)	0	11.8	10.5	3.1	5.8	0
雷公藤甲素						
0.15 mg/kg (乳剂)	0	74.6	18.4	13.2	0	0
PG796 (MRx102)						
1.5 mg/kg (DMSO/PEG400/PBS)	0	36.4	29.1	16.7	4.11	0

MRx1020.5mg/kg 和雷公藤甲素 0.15mg/kg 来自于 Calvert 研究 ;结果来自于雌性。

MRx1021.5mg/kg 来自于 SRI 研究,结果来自于雄性。

SRI 研究 -3, 4, 8 小时。雷公藤甲素浓度 = 0ng/ml

[0147] Calvert 和 SRI 研究中雷公藤甲素含量的 TK 比较 - 仅雄性

时间 (小时) >	血浆雷公藤甲素浓度 (ng/ml)					
	0	0.25	0.5	1	2	24
PG796 (MRx102) 0.5 mg/kg (乳剂)	0	32.5	10.9	0.7	1.0	0
雷公藤甲素 0.15 mg/kg (乳剂)	0	59.0	14.9	3.6	0	0
PG796 (MRx102) 1.5 mg/kg (DMSO/PEG400/PBS)	0	36.4	29.1	16.7	4.1	0

MRx1020.5mg/kg 和雷公藤甲素 0.15mg/kg 来自于 Calvert 研究 ;结果来自于雄性。

MRx1021.5mg/kg 来自于 SRI 研究 ;结果来自于雄性

SRI 研究 -3, 4, 8 小时。雷公藤甲素浓度 = 0ng/ml

[0148] 给药途径

[0149] 虽然在一些实施例中给药途径是静脉注射,但其他途径包括 :皮肤表面或局部、皮内、皮下、鼻腔、动脉内、肌肉内、心脏内、骨内输液、囊内、腹膜内、膀胱内、玻璃体内、海绵体内注射、阴道内以及子宫内。

例 2

细胞毒性 (MTT) 试验

[0150] 检测化合物可以以 20mM 的浓度溶解在 DMSO 中。进一步的稀释可以在用 10% 的胎牛血清补充的 RPMI1640 媒介 (GIBCO, Rockville, MD) 中完成 (HyClone 实验室, Logan, UT)。

在标准 MTT 试验中使用细胞增殖试剂盒 I (#1465007, 罗氏诊断公司, 曼海姆, 德国) 测定化合物的细胞毒性。简单而言,在存在检测化合物连续三倍稀释液或含有和每个稀释点的检测样品浓度相同的 DMSO 的培养基的情况下,将人类 T 细胞淋巴瘤 (白血病) 细胞 (每孔 4×10^5 个) 在 96 孔组织培养皿中培养 24 小时。随后培养基用 10 μ l/ 孔的 MTT 试剂补充 4 小时,然后再加入 0.1ml/ 孔的增溶试剂,再持续 16 小时。在 ThermoScan 微孔板分析仪 (Molecular Devices, Menlo Park, CA) 上测定 570 纳米 (OD_{570}) 处的光密度。

例 3

IL-2 生产试验

[0151] 检测样品在完全组织培养基中可以稀释到 1mM。将等分试样放置在涂有抗 CD3 抗体 (用于刺激白血病细胞产生的 IL-2) 的微量细胞培养板中,制备系列稀释液,使最终浓度包含从 0.001 到 10,000nM 按对数增长的范围。采集在白血病人 T 细胞株的指数膨胀培养基中产生的细胞 (#TIB-152, 取自美国标准菌库, 马纳萨斯, VA), 离心清洗一次, 将其重新悬浮在完全组织培养基中, 并稀释到 2×10^6 个细胞 /ml 的浓度。将体积为 50 μ l 的白血病细胞 (1×10^5 个细胞) 加入含有 100 μ l 稀释化合物的孔中, 将 50 μ l PMA (10ng/ml) 加入每个孔, 随后将培养板放在 37°C 下在 5% CO₂ 恒温箱中进行培养。24 小时后, 对培养板进行离心

处理以沉淀细胞,从每个孔中取出 150 μ l 的上清液,将样品储存在 -20°C 下。使用 Luminex 100 (Luminex 公司, Austin, TX)、Luminex 微球体结合抗 IL-2 捕捉抗体,以及结合荧光的抗 IL-2 检测抗体来分析所储存的上清液的人体 IL-2 浓度。数据用 pg/ml 的 IL-2 来表示。

[0152] 虽然上文探讨了示例的一些方面和实施例,但该领域的那些技术人员将认识到其中的某些修改、置换、添加和重组。因此以下随附的权利要求书和下文介绍的权利要求书预期包含在其真实意志和范围内的所有此类修改、置换、添加和重组。

含有MRx102的血浆雷公藤甲素与雷公藤甲素注射液

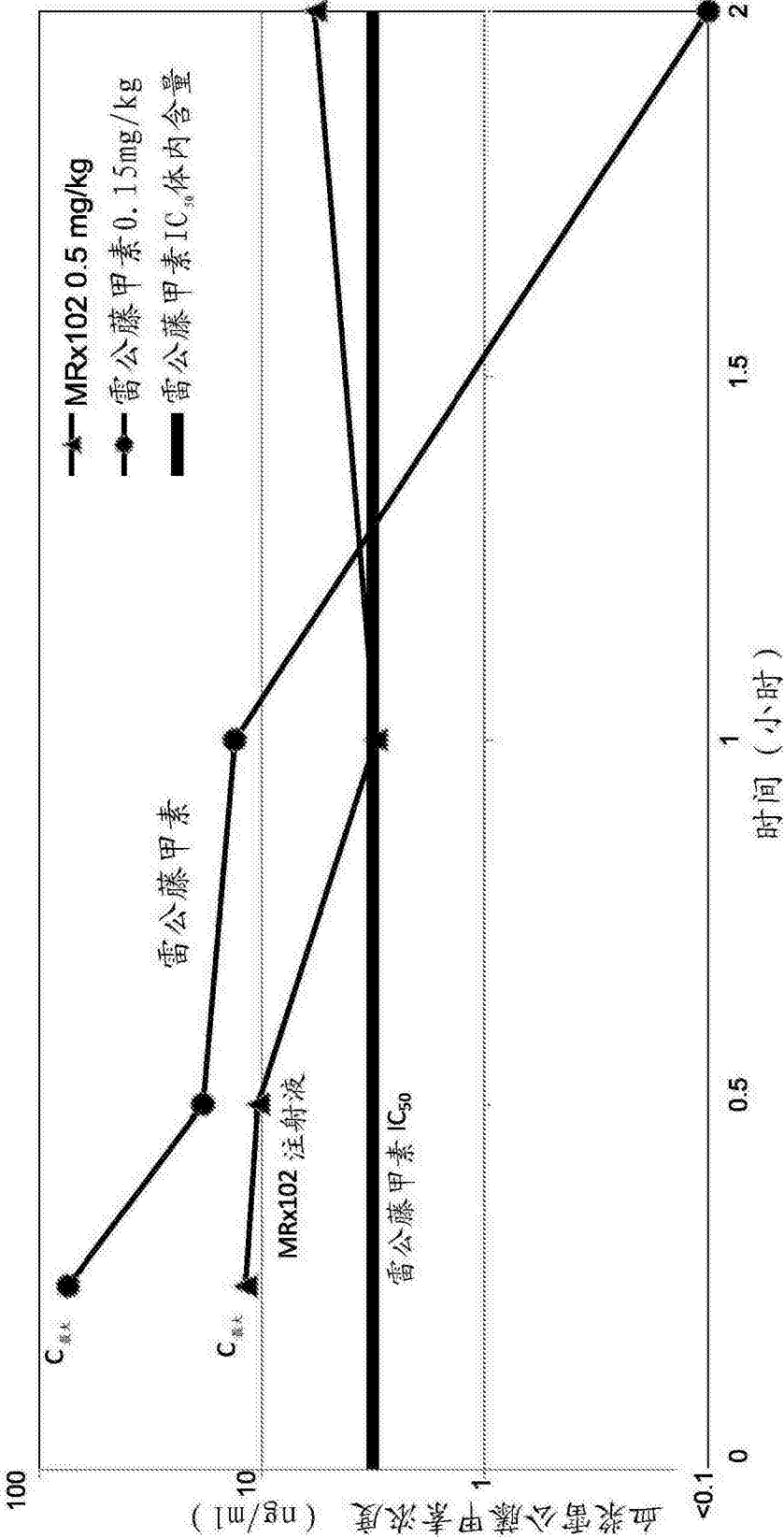


图 1