



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105451754 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 30

(21) 申请号 201480044142. 6

A61P 19/02(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 07. 07

(30) 优先权数据

13003923. 3 2013. 08. 06 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2016. 02. 04

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2014/001861 2014. 07. 07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02015/018472 DE 2015. 02. 12

(71) 申请人 默克专利股份有限公司

地址 德国达姆施塔特

(72) 发明人 M·克莱恩 R·沃德皮亚 H·居林

S·林德曼

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 邹智弘

(51) Int. Cl.

A61K 38/04(2006. 01)

权利要求书1页 说明书19页 附图5页

(54) 发明名称

在关节病的情况下胃酶抑素的关节内施用

(57) 摘要

本发明涉及包含胃酶抑素的用于关节内施用的药物制剂和药物,及其制备和用途,尤其在治疗
和 / 或预防关节病、创伤性软骨损伤、关节炎、疼痛、异常性疼痛或痛觉过敏中的用途,特别优选在
治疗和 / 或预防关节病中的用途。

1. 用于关节内施用的药物制剂,其包含胃酶抑素和/或其生理学可接受的盐、衍生物、溶剂合物、前药和立体异构体之一,包括它们以各种比例的混合物,和其它赋形剂和/或助剂。

2. 根据权利要求1的药物制剂,其包含至少一种其它药物活性物质。

3. 用于制备根据权利要求1或2的用于关节内施用的药物制剂的方法,其特征在于,使胃酶抑素和/或其生理学可接受的盐、衍生物、溶剂合物、前药和立体异构体之一,包括它们以各种比例的混合物,与固体、液体或半液体的赋形剂或助剂和任选的其它药物活性物质一起成为合适的剂型。

4. 根据权利要求1或2的用于关节内施用的药物制剂在治疗和/或预防选自关节病、创伤性软骨损伤、关节炎、疼痛、异常性疼痛或痛觉过敏的生理学和/或病理生理学病症中的用途。

5. 根据权利要求1或2的用于关节内施用的药物制剂在治疗和/或预防关节病中的用途。

6. 根据权利要求4或5的用途,其中将药物制剂如下在关节内施用:

- a) 每周一次至每年一次,
- b) 每两周一次至每半年一次,或
- c) 每月一次至每季度一次。

7. 用于关节内施用的胃酶抑素和/或其生理学可接受的盐、衍生物、溶剂合物、前药和立体异构体之一,包括它们以各种比例的混合物在治疗和/或预防选自关节病、创伤性软骨损伤、关节炎、疼痛、异常性疼痛和痛觉过敏的生理学 and/或病理生理学病症中的用途。

8. 用于关节内施用的胃酶抑素和/或其生理学可接受的盐、衍生物、溶剂合物、前药和立体异构体之一,包括它们以各种比例的混合物在治疗和/或预防关节病中的用途。

9. 根据权利要求7或8的用途,其中将胃酶抑素和/或其生理学可接受的盐、衍生物、溶剂合物、前药和立体异构体之一,包括它们以各种比例的混合物如下在关节内施用:

- a) 每周一次至每年一次,
- b) 每两周一次至每半年一次,或
- c) 每月一次至每季度一次。

在关节病的情况下胃酶抑素的关节内施用

[0001] 本发明涉及包含胃酶抑素的、用于关节内施用的药物制剂和药物,以及涉及其制备,和特别涉及其在治疗和/或预防关节病、创伤性软骨损伤、关节炎、疼痛、异常性疼痛或痛觉过敏中的用途,特别优选关节病中的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 关节病是全世界分布最广泛的关节疾病,关节病的放射学体征见于大多数65岁以上的老人。尽管这对于医疗卫生系统至关重要,但迄今为止关节病的原因仍然不清楚,此外有效的预防措施仍然是远期的目标。关节间隙减小(由关节软骨破坏引起的)伴随软骨下骨的变化和骨刺生成是该疾病的放射学特征。然而,对于患者而言,主要是疼痛(负荷依赖性和夜间静息痛)伴随随后的功能受限。这还促使患者由于相应的继发性疾病与社会隔离。

[0004] 根据在德国的非官方定义,术语“关节病”表示超过年龄的通常程度的“关节劳损”。病因被认为是过度应激(例如增加的体重)、出生的或创伤的原因,如关节的错位,或也可能是由于骨疾病如骨质疏松症引起的骨头变形。关节病同样可能是由于另一种疾病,例如关节炎(关节炎)的结果(继发性关节病)、或伴随超负荷引发的渗出(继发性炎症反应)带来的结果(活动性关节病)。英美专业文献区分骨关节炎[OA]和风湿性关节炎[RA],其中在骨关节炎中关节表面破坏很可能主要归因于负荷的作用,而在风湿性关节炎中主要是由于炎症部位的关节退化。

[0005] 原则上,关节病也可根据其病因区分。在之前存在尿黑酸尿的情况下尿黑酸尿性关节病以尿黑酸在关节内的沉积增加为基础。在血友病性关节病的情况下,在血友病(血友病性关节)的情况下出现有规律的关节内出血。尿酸性关节炎起因于尿酸盐晶体(尿酸)对健康软骨的机械影响(W.Pschyrembel等:Klinisches **Wörterbuch** mit klinischen Syndromen and einem Anhang Nomina Anatomica(带临床综合征和解剖学名词附件的临床词典).Verlag Walter de Gruyter&Co,第253版,1977)。

[0006] 关节病的典型病因是关节的发育不良。以髌部为例,显然在生理学髌部位态的情况下最大机械应力的区域相比在发育不良的髌部的情况下具有明显较大的面积。然而,通过作用于关节的力的负荷与关节形状基本上无关。它们基本上分布在一个或多个主要的应力带。经此在相对小的区域的情况下将出现相比在较大的区域的情况下更高的压力负荷。由此在发育不良的髌部的情况下,关节软骨上的生物机械压力负荷比在生理学髌部位置的情况下大。此规律通常被认为是由于与理想解剖形状不同的负重关节上频繁出现的关节炎性变化的原因。

[0007] 如果过早的劳损是由于外伤的后果,则称为创伤后关节病。所讨论的作为继发性关节病的其它病因有机械、炎症、代谢、化学(喹诺酮类)、营养、激素、神经学和遗传的原因。然而,在大多数情况下,给出的诊断结论为自发性关节病,医生这样诊断意指明显缺少病理性疾病(H.I.Roach和S.Tilley,Bone and Osteoarthritis F.Bronner和M.C.Farach-Carson(编辑),Verlag Springer,第4卷,2007)。

[0008] 关节病的医源性病因可能是例如促旋酶抑制剂类型的抗生素(氟喹诺酮类,如环丙沙星,左氧氟沙星)。这种药物导致血管化差的组织(透明的关节软骨,肌腱组织)中镁离

子的络合,其结果是结缔组织发生不可逆的损害。通常该损害在儿童和青少年的生长期更显著。肌腱病和关节病是此类药物的已知副作用。根据来自无关联的药理学家和风湿病学家的信息,在成人中此类抗生素导致透明关节软骨的生理学降解加速(M.Menschik等, *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 1997, 第2562-2565页; M.Egerbacher等, *Arch. Toxicol.* 73, 2000, 第557-563页; H.Chang等, *Scand. J. Infect. Dis.* 28, 1996, 第641-643页; A.Chaslerie等, *Therapie* 47, 1992, 第80页)。长期用苯丙香豆素治疗也可能在关节内部结构紧张的情况下由于骨密度降低促进关节病。

[0009] 除年龄之外,已知骨关节病风险因素是机械性过负荷、(微)创伤、由固定机制丧失引起的关节失去稳定性以及遗传因素。然而,既不能完全解释该发生的现象也不能完全解释可能的干预(H.I.Roach and S.Tilley, *Bone and Osteoarthritis* F.Bronner and M.C.Farach-Carson(编辑), Verlag Springer, 第4卷, 2007)。

[0010] 在受关节病影响的关节中,有时一氧化二氮的含量增加。已经观察到由于软骨组织的强烈的机械性刺激出现类似情形(P.Das等, *Journal of Orthopaedic Research* 15, 1997, 第87-93页。A.J.Farrell等, *Annals of the Rheumatic Diseases* 51, 1992, 第1219-1222页; B.Fermor等, *Journal of Orthopaedic Research* 19, 2001, 第729-737页),而中度机械性刺激倾向于具有正效应。因此机械力作用有因果地涉及骨关节病的发展(X.Liu等, *Biorheology* 43, 2006, 第183-190页)。

[0011] 原则上,关节病的治疗追求两个目标。第一在正常负荷下免除疼痛和第二预防关节中的机械性能受限或变化。从长远来看这些目标不能通过作为一种纯粹的对症疗法的疼痛治疗来实现,因为这种治疗不能阻止疾病的发展。如果要实现后者,就必须停止软骨破坏。由于成人患者的关节软骨不能再生,所以消除致病因素如关节发育不良或错位(这会导致关节软骨上增加的点压力负荷)更加非常重要。

[0012] 最后,可试图在药物的帮助下阻止或停止软骨组织内的退化过程。

[0013] 对于关节软骨的机能状态重要且因此对于其对应力的承受能力重要的是细胞外基质,其主要由胶原蛋白、蛋白聚糖和水组成。涉及细胞外基质降解的酶尤其包括金属蛋白酶、蛋白聚糖酶和组织蛋白酶。不过,其它酶原则上也可降解软骨基质,例如纤溶酶、激肽释放酶、中性白细胞弹性蛋白酶、类胰蛋白酶和糜蛋白酶。

[0014] 组织蛋白酶属于溶酶体蛋白酶的木瓜蛋白酶超家族。组织蛋白酶参与正常的蛋白水解并参与靶蛋白和组织的转化,以及参与蛋白水解级联的启动和酶原活化。此外,它们参与MHC II类的表达(Baldwin(1993)*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:6796-6800; Mixuochi(1994)*Immunol. Lett.*, 43:189-193)。不过,异常的组织蛋白酶表达可导致严重的疾病。因此,在癌细胞(例如在乳癌、肺癌、前列腺癌、成胶质细胞瘤和头颈癌)中可能检测到增强的组织蛋白酶表达,并且可能显示组织蛋白酶与乳癌、肺癌、头颈癌和脑瘤的不足的治疗成果有关(Kos等(1998)*Oncol. Rep.*, 5:1349-1361; Yan等(1998)*Biol. Chem.*, 379:113-123; Mort等;(1997)*Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 29:715-720; Friedrich等(1999)*Eur. J. Cancer*, 35:138-144)。此外,异常的组织蛋白酶表达似乎与炎性和非炎性疾病(例如,风湿性关节炎和骨关节病)的形成有关(Keyszer(1995)*Arthritis Rheum.*, 38:976-984)。

[0015] 组织蛋白酶活性的分子机制还没有得到完全解释。一方面,发现例如经诱导的组织蛋白酶的表达能保护B细胞(其血清被抽取)对抗细胞凋亡,以及用组织蛋白酶B的反义寡

核苷酸处理细胞能诱导细胞凋亡(Shibata等(1998)Biochem.Biophys.Res.Commun.,251:199-20;Isahara等(1999)Neuroscience,91:233-249)。这些报道暗示组织蛋白酶的抗细胞凋亡作用。然而,这些报道与早期的报道完全相反,早期的报道将组织蛋白酶描述为细胞凋亡介体(Roberts等(1997)Gastroenterology,113:1714-1726;Jones等(1998)Am.J.Physiol.,275:G723-730)。

[0016] 组织蛋白酶作为非活性的酶原在核糖体上合成并转入溶酶体系统中。在N端前肽经蛋白水解切割之后,在溶酶体的酸性环境中组织蛋白酶浓度增加到1mM,且组织蛋白酶被溶酶体释放到细胞外介质中。

[0017] 就组织蛋白酶而言,区分为半胱氨酸组织蛋白酶B、C、H、F、K、L、O、S、V和W,天冬氨酰组织蛋白酶D和E,和丝氨酸组织蛋白酶G。

[0018] 在临床开发中组织蛋白酶抑制剂的实例是用于治疗关节病的组织蛋白酶K抑制剂和用于治疗关节炎、神经性疼痛和银屑病的组织蛋白酶S抑制剂。

[0019] 除组织蛋白酶D之外,天冬氨酰蛋白酶还包括HIV天冬氨酰蛋白酶(HIV-1蛋白酶)、肾素、胃蛋白酶A和C、BACE(Asp2,Memapsin)、疟原虫天冬氨酸蛋白酶(Plasmepsin)和天冬氨酰血红蛋白酶(**Aspartylhämoglobinasen**) (Takahashi, T. 等编辑,Aspartic Proteinases Structure,Function,Biology and Biomedical Implications(Plenum Press,New York,1995),Adams, J. 等,Ann.Rep.Med.Chem.31,279-288,1996;Edmunds J. 等,Ann.Rep.Med.Chem.31,51-60,1996;Miller, D.K. 等,Ann.Rep.Med.Chem 31,249-268,1996)。组织蛋白酶D通常参与细胞内的或被吞噬的蛋白质的降解,并因而在蛋白质代谢中(Helseth等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81,3302-3306,1984)、在蛋白质分解代谢中(Kay等,Intracellular Protein Catabolism(eds.Katunuma等,155-162,1989)和在抗原进程中(Guagliardi等,Nature,343,133-139,1990;Van Noort等,J.Biol.Chem.,264,14159-14164,1989)起重要作用。

[0020] 升高的组织蛋白酶D水平与一系列疾病有关。因此,升高的组织蛋白酶D水平与乳腺癌的预后不良相关,与增加的细胞侵入和增加的转移风险、以及治疗之后较短的无复发存活时间和较低的总生存率相关(Westley B.R.等,Eur.J.Cancer 32,15-24,1996;Rocheffort,H.,Semin.Cancer Biol.1:153,1990;Tandon,A.K.等,N.Engl.J.Med.322,297,1990)。乳腺癌中组织蛋白酶D的分泌率由于基因的过表达和由蛋白质的修饰加工促进。在生长的肿瘤的临近区域中产生的组织蛋白酶D及其它蛋白酶(例如,胶原酶)的增加水平,可能在肿瘤周围区域中降解细胞外基质,因而促进肿瘤细胞的分离并经淋巴和循环系统侵入到新组织中(Liotta L.A.,Scientific American Feb:54,1992;Liotta L.A.and Stetler-Stevenson W.G.,Cancer Biol.1:99,1990;Liudet E.,Cell Growth Differ.6:1045-1052,1995;Ross J.S.,Am.J.Clin.Pathol.104:36-41,1995;Dickinson A.J.,J.Urol.154:237-241,1995)。

[0021] 此外,组织蛋白酶D与脑的退化性变化,例如,阿尔茨海默病相关。因此,组织蛋白酶D与淀粉样β蛋白前体或增加转染细胞中淀粉样蛋白质表达的突变的前体的裂解有关(Cataldo, A.M. 等,Proc.Natl.Acad.Sci.87:3861,1990;Ladror, U.S. 等,J.Biol.Chem.269:18422,1994,Evin G.,Biochemistry 34:14185-14192,1995)。通过淀粉样β蛋白前体的蛋白水解形成的淀粉样β蛋白导致大脑内斑块形成且似乎对阿尔茨海默病

的形成负责。升高的组织蛋白酶D水平还发现于阿尔茨海默病患者的脑脊液中,并且可以显示针对突变的淀粉样 β 蛋白前体的高的组织蛋白酶D蛋白水解活性(Schwager, A.L.等, *J. Neurochem.* 64:443, 1995)。此外,在亨廷顿病患者的活组织检查中测得组织蛋白酶D活性的显著升高(Mantle D., *J. Neurol. Sci.* 131:65-70, 1995)。

[0022] 在关节病的发展过程中,组织蛋白酶D被认为在不同层面上具有实质性作用。因此,与健康狗比较在患自发性关节病的狗髌关节头中测得组织蛋白酶D的mRNA水平增加(Clements D.N.等, *Arthritis Res. Ther.* 2006; 8(6):R158; Ritchlin C.等, *Scand. J. Immunol.* 40:292-298, 1994)。Devauchelle V.等(*Genes Immun.* 2004, 5(8):597-608)也显示与风湿性关节炎相比较在关节病的情况下人患者中组织蛋白酶D的不同表达速率(还参见Keyszer G.M., *Arthritis Rheum.* 38:976-984, 1995)。在粘脂病中,组织蛋白酶D也似乎具有作用(Kopitz J., *Biochem. J.* 295, 2:577-580, 1993)。

[0023] 溶酶体的内肽酶组织蛋白酶D是软骨细胞中分布最广泛的蛋白酶(Ruiz-Romero C.等, *Proteomics.* 2005, 5(12):3048-59)。此外,已经在培养的来自骨关节病患者的滑膜中检测到组织蛋白酶D的蛋白水解活性(Bo G.P.等, *Clin. Rheumatol.* 2009, 28(2):191-9),并且在患风湿性关节炎的患者的滑膜切除组织中也发现增强的蛋白水解活性(Taubert H.等, *Autoimmunity.* 2002, 35(3):221-4)。Lorenz等(*Proteomics.* 2003, 3(6):991-1002)也这样描述,尽管与组织蛋白酶B和L对比还没有针对关节炎和关节病详细研究溶酶体的和分泌的天冬氨酰蛋白酶组织蛋白酶D,然而,Lorenz等发现与风湿性关节炎的患者相比较在患关节病的患者中滑膜组织内组织蛋白酶D的蛋白水平较高。

[0024] Gedikoglu等(*Ann. Rheum. Dis.* 1986, 45(4):289-92)同样检测到在滑膜组织中组织蛋白酶D的蛋白水解活性增强,Byliss和Ali(*Biochem. J.* 1978, 171(1):149-54)在患关节病患者的软骨中同样检测到在滑膜组织中组织蛋白酶D的蛋白水解活性增强。

[0025] 在关节病的情况下,在软骨的区域出现pH值局部降低。该pH值降低对于理解软骨中的分解代谢过程至关重要。

[0026] 在关节病的情况下,还发现关节组织中的低pH值与该疾病的严重程度和进程直接相关。在5.5的pH值下,出现软骨的自体消化。在外植体培养(例如来自小鼠、牛或人)中该过程可被胃酶抑素或利托那韦几乎完全抑制。这暗示了在关节病中组织蛋白酶D的实质性作用、或甚至是关键作用,因为胃酶抑素抑制天冬氨酰蛋白酶(除一个例外:BACE1),并且至今只在软骨组织中鉴定出这两种天冬氨酰蛋白酶。因此,Bo G.P.等(*Clin. Rheumatol.* 2009, 28(2):191-9)也描述了在关节病变中组织蛋白酶D的重要作用。

[0027] 已知的天冬氨酰蛋白酶抑制剂是胃酶抑素,这是最初从链霉菌培养物中分离出来的肽。胃酶抑素能有效抗胃蛋白酶、组织蛋白酶和肾素。因此许多天冬氨酰蛋白酶抑制剂类似于胃酶抑素结构的样本(美国专利第4,746,648号;Umezawa, H.,等, *J. Antibiot. (Tokyo)* 23:259-62, 1970;Morishima, H.,等, *J. Antibiot. (Tokyo)* 23:263-5, 1970;Lin, T.和Williams, H.R., *J. Biol. Chem.* 254:11875-83, 1979;Jupp, R.A.,等, *Biochem. J.* 265:871-8, 1990;Agarwal, N.S.和Rich, D.H., *J. Med. Chem.* 29:2519-24, 1986;Baldwin, E.T.等, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 90:6796-800, 1993;Francis, S.E.等, *EMBO J* 13:306-17, 1994)。

[0028] 天冬氨酰蛋白酶和组织蛋白酶D通常被描述为用于治疗神经变性疾病、认知障碍、

痴呆、阿尔茨海默病、癌症、疟疾、HIV感染和心血管系统疾病的活性化合物的靶蛋白,并且公开了用于治疗这些疾病的天冬氨酰蛋白酶或组织蛋白酶D的抑制剂,例如,在WO 2009013293、EP 1987834、EP 1872780、EP 1867329、EP 1745778、EP 1745777、EP 1745776、WO 1999002153、WO 1999055687、US 6150416、WO 2003106405、WO 2005087751、WO 2005087215、WO 2005016876、US 2006281729、WO 2008119772、WO 2006074950、WO 2007077004、WO 2005049585、US 6251928和US 6150416中。

[0029] 尽管已知的组织蛋白酶D抑制剂和两个模型化合物胃酶抑素和利托那韦有效地抑制组织蛋白酶D的活性,然而,它们对其它天冬氨酰蛋白酶具有相当低的选择性。肾素-血管紧张素系统(RAS)在调节血压和体液平衡和电解质平衡中的作用(Oparil, S.等, N.Engl. J. Med. 1974; 291:381-401/446-57)以及肾素抑制剂和胃蛋白酶抑制剂在心血管系统疾病中的功效已经充分已知,因此可预计特别是在这些低选择性组织蛋白酶D抑制剂口服或全身施用时的许多副作用,并且也可预计在局部施用由于化合物所预计的扩散到血液内而引起的全身性并发症。

[0030] 另外,肽化合物尤其普遍地在血浆、滑液和其它室的流体中具有低稳定性且它们经历非常快速的代谢降解,意味着可预见在血液中、在关节囊和其它室中的短停留时间。

[0031] 因此,Powell, M.F.等(J. Pharm. Sciences, Vol. 81, No. 8, 731-735, 1992)研究了肽化合物在有风湿性关节炎患者的混合(储库)人血清中和混合滑液中的稳定性(参见第731页右栏倒数第二段)。在表1和2中,Powell等公开了大部分具有10至25个氨基酸长度的受试改性和未改性肽在试验介质,人血浆(HS)、滑液(SF)、胎牛血清(FCS)或小鼠肝脏匀浆(MLH)中具有低于一小时的半衰期(参见第735页右栏最后一段)。在有有关节炎的患者混合人血清和混合滑液中肽化合物的稳定性基本上同样低(参见第733页)。

[0032] 针对肽化合物在血浆中的低稳定性和短停留时间的背景和由于上述所预计的副作用,对于关节病的治疗不考虑肽组织蛋白酶D抑制剂的口服或全身施用。

[0033] 由于在滑液中所预计的短半衰期,而特别是由于在关节囊中所预计的短停留时间(经滑膜扩散和降解)和由于因扩散到血浆内引起的所预计的系统性副作用,本领域技术人员通常也认为肽化合物的关节内施用是不适合的。

[0034] 尤其,根据Powell等(1992)几小时的肽化合物的短半衰期意味着频繁关节内注射将是必需的。然而,注射到关节间隙内与对患者而言的疼痛和感染的显著风险有关,因此这种注射不应当比二至四周的间隔更频繁。

[0035] 因此本发明的目的是寻找新药物和药物制剂,其可用于预防和/或治疗关节病并且在局部或关节内施用时在滑液中足够稳定的且仅轻微程度地扩散通过滑膜进入血浆并由此在关节囊中具有长停留时间,使得活性物质浓度在注射之后最长可能的时间内保持在治疗有效的范围内。

[0036] 发明概述

[0037] 已令人惊讶地发现胃酶抑素,尽管在静脉内或口服施用的情况下高清除率,但在关节内注射悬浮液的情况下在较长时间内在关节囊中或在滑液中保持显著高于IC₅₀的浓度并因此保持药理学有效的浓度。另外,胃酶抑素,尽管其肽结构,但表现出在滑液中令人惊讶地高的稳定性(参见实施例)且因此胃酶抑素甚至显著超过Powell等测量的在滑液中肽化合物的最长稳定性(参见Powell等第733页的表II:编号8百日咳毒素具有在滑液中仅仅

两天的半衰期,编号15麻风分歧杆菌(*Mycobacterium leprae*)具有约七又二分之一小时的半衰期,所有其它肽化合物具有几分钟的半衰期),并且只有这种令人惊讶高的稳定性和令人惊讶长的在关节囊中的停留时间使得胃酶抑素能够具有在关节病的治疗中的相关应用,因为胃酶抑素,如根据Powell等预计的,不能在关节囊中保持在临床上相关水平仅仅几小时,而是以显著高于IC₅₀的浓度存在于两周以上。

[0038] 胃酶抑素因此令人惊讶地适合于局部施用或关节内施用用于预防和治疗关节病的药物和药物制剂且在长时期内保持高水平,使得根据本发明的药物和药物制剂只必须最多每周一次关节内、优选以一个月至几个月的间隔施用。

[0039] 胃酶抑素高效地抑制组织蛋白酶D,且预计在关节内施用用于治疗关节病的情况下几乎没有副作用,因为由于其在关节囊中长停留时间和自滑膜缓慢释放,胃酶抑素在关节内施用的情况下只达到低的系统水平(血浆水平)。

[0040] 尤其,胃酶抑素在关节囊中的长停留时间是令人惊讶的且是治疗上有价值的,因为基于例如Powell等(1992)的研究将已经预计肽化合物在滑液中的低稳定性且另外将已经预计小尺寸肽化合物从滑膜到血浆中的高释放,两个过程都将导致在关节囊中的短停留时间。然而,令人惊讶地,与预料的相反,胃酶抑素具有在关节囊中的长停留时间,因为不仅其在滑液中的稳定性高,而且自滑膜的释放似乎非常低。

[0041] 因此本发明的主题是用于关节内施用的药物制剂,其包含胃酶抑素((3S,4S)-3-羟基-4-[(S)-2-((3S,4S)-3-羟基-6-甲基-4-[(S)-3-甲基-2-[(S)-3-甲基-2-(3-甲基-丁酰氨基)丁酰氨基]丁酰氨基)庚酰基氨基)丙酰氨基]-6-甲基庚酸)和/或其生理学可接受的盐、衍生物、溶剂合物、前药和立体异构体之一,包括它们以各种比例的混合物。

[0042] 本发明的主题还有这样的根据本发明的药物制剂,其包含其它赋形剂和/或助剂。

[0043] 另外,本发明的主题还有上述根据本发明的药物制剂,其包含至少一种其它药物活性物质。

[0044] 本发明的主题还有包含肽组织蛋白酶D抑制剂的用于关节内施用的药物制剂,其具有与胃酶抑素相似的性质,即在纳摩尔的范围内的组织蛋白酶D抑制、在滑液中的高稳定性和在关节囊中的长停留时间。

[0045] 胃酶抑素包含多个手性中心,使得本发明的主题还有胃酶抑素的光学活性形式(立体异构体)、对映体、外消旋体、非对映异构体和水合物和溶剂合物的用途。

[0046] 例如,药学或生理学上可接受的衍生物是指例如胃酶抑素的盐,也指所谓的前药化合物。前药化合物是指例如被烷基或酰基(也参见下文的氨基-和羟基保护基团)、糖或寡肽修饰且其在有机体中迅速裂解或释放成有效胃酶抑素分子的胃酶抑素衍生物。这些还包括胃酶抑素的可生物降解的聚合物衍生物,例如描述于Int.J.Pharm.115(1995),61-67中的那些。

[0047] 胃酶抑素可以其最终的非盐形式使用。另一方面,本发明还包括药学上可接受的盐形式的胃酶抑素的用途,其中所述药学上可接受的盐可以根据本领域已知的方法衍生自多种有机和无机碱。胃酶抑素的药学上可接受的盐形式大多以常规方式制备。因为胃酶抑素包含羧酸基团,所以其合适的盐之一可通过使胃酶抑素与合适的碱反应成相应的碱加成盐而形成。这样的碱例如是碱金属氢氧化物,包括氢氧化钾、氢氧化钠和氢氧化锂;碱土金属氢氧化物如氢氧化钡和氢氧化钙;碱金属醇盐,例如乙醇钾和丙醇钠;以及多种有机碱如

哌啶、二乙醇胺和N-甲基谷氨酰胺。胃酶抑素的铝盐同样包括在内。

[0048] 此外,胃酶抑素的碱盐包括铝盐、铵盐、钙盐、铜盐、铁(III)盐、铁(II)盐、锂盐、镁盐、锰(III)盐、锰(II)盐、钾盐、钠盐和锌盐,但这不意图代表限制。

[0049] 在上述盐中优选的是铵盐;碱金属盐钠盐和钾盐、以及碱土金属盐钙盐和镁盐。由药学上可接受的有机无毒碱衍生而来的胃酶抑素的盐包括伯胺、仲胺和叔胺、经取代的胺的盐,也包括天然存在的经取代的胺、环胺以及碱性离子交换树脂的盐,例如精氨酸、甜菜碱、咖啡因、氯普鲁卡因、胆碱、N,N'-二苄基乙二胺(苄星青霉素)、二环己基胺、二乙醇胺、二乙胺、2-二乙氨基乙醇、2-二甲氨基乙醇、乙醇胺、乙二胺、N-乙基吗啉、N-乙基哌啶、葡糖胺、氨基葡萄糖、组氨酸、海巴明、异丙胺、利多卡因、赖氨酸、葡甲胺、N-甲基-D-葡糖胺、吗啉、哌嗪、哌啶、多胺树脂、普鲁卡因、嘌呤、可可碱、三乙醇胺、三乙胺、三甲胺、三丙胺以及三(羟甲基)甲胺(氨丁三醇)的盐,然而并不限于此。

[0050] 如所述,胃酶抑素的药学上可接受的碱加成盐由金属或胺诸如碱金属和碱土金属或有机胺形成。优选的金属为钠、钾、镁和钙。优选的有机胺为N,N'-二苄基乙二胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、N-甲基-D-葡糖胺和普鲁卡因。

[0051] 胃酶抑素的碱加成盐通过使游离酸形式与足量的期望的碱接触,由此以常规的方式形成盐来制备。游离酸能够通过使盐形式与酸接触和以常规的方式分离游离酸而再生。在某些物理性质方面如在极性溶剂中的溶解性,游离酸形式在某些方面与其相应的盐形式不同;不过,对本发明而言,盐在其它方面与其各游离酸形式相符。

[0052] 鉴于以上所述,可以看出在上下文中术语“药学上可接受的盐”是指包括以其盐之一的形式的胃酶抑素的活性物质,特别地,与活性物质的游离形式或任何先前使用的活性物质的其它盐形式相比较如果这种盐形式赋予活性物质改善的药代动力学性质时。活性物质的药学上可接受的盐的形式还可以第一时间给活性物质提供期望的药物动力学的性质,其中所述性质是它早期不具有的且甚至可能在体内的治疗效力方面对此活性物质的药物动力学有正面影响。

[0053] 胃酶抑素的溶剂合物是指惰性溶剂分子在胃酶抑素上的加合,这由于它们之间的相互吸引力形成。溶剂合物例如为水合物,如一水合物或二水合物,或醇盐,即与醇(例如与甲醇或乙醇)的加成化合物。

[0054] 已经发现胃酶抑素耐受良好且具有有价值的药理特性,因为其选择性地抑制天冬氨酰蛋白酶且尤其是抑制组织蛋白酶D。

[0055] 因此本发明的另一主题是胃酶抑素用于制备治疗和/或预防疾病的用于关节内施用的药物的用途,所述疾病由组织蛋白酶D和/或由组织蛋白酶D-促进的信号转导引起、促进和/或传播(propagieren)。

[0056] 因此本发明的主题尤其还有用于关节内施用的药物,其包含胃酶抑素和/或其生理学可接受的盐、衍生物、溶剂合物、前药和立体异构体之一(包括它们以各种比例的混合物),其用于治疗 and/或预防生理学 and/或病理生理学病症。

[0057] 特别优选地,尤其是与组织蛋白酶D有关的生理学 and/或病理生理学病症。

[0058] 生理学 and/或病理生理学病症是指医学上相关的生理学 and/或病理生理学病症,例如疾病或生病和医学紊乱、难受(Beschwerde)、病征(Komplikation)或并发症等,尤其疾病。

[0059] 本发明的另一主题是用于关节内施用的药物,其包含胃酶抑素和/或其生理学可接受的盐、衍生物、溶剂合物、前药和立体异构体之一(包括它们以各种比例的混合物),其用于治疗 and/或预防选自关节病、创伤性软骨损伤和关节炎,尤其是风湿性关节炎的生理学 and/或病理生理学病症。特别优选的是在治疗和/或预防关节病中的用途。

[0060] 疼痛是一种复杂的感官知觉,其作为急性事件,具有警告和控制信号的特征,但作为慢性疼痛已经丧失这种作用,在这种情况下(作为慢性疼痛综合征)现在应当被认为是一种独立的病症和作为一种独立的病症进行治疗。痛觉过敏是在医学中用于对疼痛过度敏感和对通常的疼痛刺激过度反应而使用的术语。可触发疼痛的刺激是例如压力、热、冷或炎症。痛觉过敏是一种感觉过敏的形式,用于对刺激过度敏感的通用术语。异常性疼痛是在医学中使用的用于被通常不引起疼痛的刺激触发的疼痛感觉的术语。

[0061] 本发明的另一主题是用于关节内施用的药物,其包含胃酶抑素和/或其生理学可接受的盐、衍生物、溶剂合物、前药和立体异构体之一(包括它们以各种比例的混合物),其用于治疗 and/或预防选自疼痛、异常性疼痛和痛觉过敏的生理学 and/或病理生理学病症。

[0062] 因此,本发明的特别优选的主题是用于关节内施用的药物,其包含胃酶抑素和/或其生理学可接受的盐、衍生物、溶剂合物、前药和立体异构体之一(包括它们以各种比例的混合物),其用于治疗 and/或预防选自关节病、创伤性软骨损伤、关节炎、疼痛、异常性疼痛和痛觉过敏,特别优选用于治疗 and/或预防关节病的生理学 and/或病理生理学病症。

[0063] 意图是上文公开的药物包括胃酶抑素用于制备治疗和/或预防上述生理学 and/或病理生理学病症的用于关节内施用的药物的相应用途。

[0064] 另外的意图是上文公开的药物包括用于治疗 and/或预防上述生理学 and/或病理生理学病症的关节内施用的相应方法,其中将胃酶抑素施用至需要这种治疗的患者。

[0065] 因此本发明的优选的主题是用于关节内施用的根据本发明的药物制剂在治疗和/或预防选自关节病、创伤性软骨损伤、关节炎、疼痛、异常性疼痛或痛觉过敏的生理学 and/或病理生理学病症中的用途。

[0066] 在此,本发明的特别优选的主题是用于关节内施用的根据本发明的药物制剂在治疗和/或预防关节病中的用途。

[0067] 因此,本发明优选的主题还有用于在关节内施用的胃酶抑素和/或其生理学可接受的盐、衍生物、溶剂合物、前药和立体异构体之一(包括它们以各种比例的混合物)在治疗和/或预防选自关节病、创伤性软骨损伤、关节炎、疼痛、异常性疼痛和痛觉过敏的生理学 and/或病理生理学病症中的用途。

[0068] 在此,本发明的特别优选的主题是胃酶抑素和/或其生理学可接受的盐、衍生物、溶剂合物、前药和立体异构体之一(包括它们以各种比例的混合物)用于在关节内施用的在治疗和/或预防关节病中的用途。

[0069] 本发明的主题还有用于关节内施用的与胃酶抑素具有相似性质,即在纳摩尔的范围内的组织蛋白酶D抑制、在滑液中具有高稳定性和在关节囊中具有长停留时间的肽组织蛋白酶D抑制剂在治疗和/或预防选自关节病、创伤性软骨损伤、关节炎、疼痛、异常性疼痛和痛觉过敏的生理学 and/或病理生理学病症中,特别优选在治疗和/或预防关节病中的用途。

[0070] 胃酶抑素表现出有利的生物学活性,所述生物学活性可在酶活性试验和动物实验

中容易得到证实,如实施例中所描述。在这种基于酶的试验中,胃酶抑素表现且产生抑制作用,这通常以在合适的范围内、优选在微摩尔的范围内和特别优选在纳摩尔的范围内的 IC_{50} 值记载。

[0071] 胃酶抑素可给药至人或动物,尤其是哺乳动物,如猿、马、狗、猫、大鼠或小鼠,可用于治疗人或动物体和用于对抗上面提到的疾病。此外其还可用作诊断剂或试剂。

[0072] 胃酶抑素可用于尤其是通过非化学方法制备用于关节内施用的药物制剂。在这种情况下,使其与至少一种固体、液体和/或半液体的赋形剂和/或助剂一起以及任选地与一种或多种其它活性物质组合成合适的剂型。

[0073] 因此,本发明的另一主题尤其还有用于关节内施用的药物制剂,其包含胃酶抑素和/或其生理学可接受的盐、衍生物、溶剂合物、前药和立体异构体之一(包括它们以各种比例的混合物),其包含其它赋形剂和/或助剂,以及还有包含至少一种其它药物活性物质的用于关节内施用的药物制剂。

[0074] 尤其是,本发明的主题还有制备用于关节内施用的药物制剂的方法,其特征在于使胃酶抑素和/或其生理学可接受的盐、衍生物、溶剂合物,前药和立体异构体之一(包括它们各种比例为混合物),与固体、液体或半液体的赋形剂和/或助剂一起,以及任选地与其它药物活性物质一起,成为合适的剂型。

[0075] 本发明的药物制剂可用作人药或兽药的药物。患者或宿主可属于任何哺乳动物物种,例如灵长类物种,特别是人;啮齿类,包括小鼠、大鼠和仓鼠;兔;马、牛、狗、猫等。动物模型对于实验研究是有价值的,其中它们提供治疗人的疾病的模型。

[0076] 合适的载体物质为适合于关节内施用且不与本发明化合物反应的有机或无机物质。由于其专业知识,本领域技术人员熟悉适于期望的药物配制剂的助剂。除溶剂(例如水,生理盐水溶液或醇,例如乙醇、丙醇或甘油,糖溶液,如葡萄糖或甘露醇溶液,或所述溶剂的混合物)和其它活性物质载体之外,也可以使用稳定剂和/或湿润剂、乳化剂、影响渗透压的盐、抗氧化剂、分散剂、消泡剂、缓冲物质、防腐剂、或增溶剂。如果期望的话,则根据本发明的制剂或药物可包含一种或多种其它活性物质,例如一种或多种维生素或在预防和/或治疗上述医学适应症中有效的活性物质。

[0077] 如有期望的话,本发明的制剂或药物可包含一种或多种其它活性物质和/或一种或多种作用增强剂(佐剂)。

[0078] 术语“药物配制剂”和“药物制剂”在本发明的范围内作为同义词使用。

[0079] 如本申请中使用的“药物耐受的”是指能够将由其得到的药物制剂给药至哺乳动物而没有不期望的生理学副作用的药物、沉淀剂、赋形剂、助剂、稳定剂、溶剂及其它试剂。

[0080] 在用于肠胃外给药的药物制剂中,要求配制剂、所用的助剂和最初的包装的耐受性和安全性(低毒性)、等渗性以及水合正常。令人惊讶地,胃酶抑素优选具有如下的优点:直接使用是可能的,因而在药物制剂使用前,除去毒理学不能接受试剂(例如,高浓度的有机溶剂或其它毒理学不能接受的助剂)的进一步纯化步骤是不必要的。

[0081] 本发明特别优选的主题还有用于关节内施用的药物制剂,其包含以沉淀的非晶体、沉淀的晶体形式或以溶解的或混悬的形式的胃酶抑素以及任选的赋形剂和/或助剂和/或其它药物活性物质。

[0082] 胃酶抑素优选使得能够制备高浓缩的配制剂而不出现不利的不期望的胃酶抑素

聚集。因此,具有高活性物质含量的即用溶液可借助胃酶抑素与含水溶剂或在含水介质中制备。

[0083] 还可将胃酶抑素和/或其生理学可接受的盐和溶剂合物冻干,且将所得冻干物例如用于制备用于关节内施用的注射制剂。

[0084] 用于关节内施用的含水制剂可通过将胃酶抑素溶解或悬浮于含水溶液中和任选地添加助剂来制备。为此目的,有利地将具有限定体积的包含限定浓度的所述其它助剂的储备溶液添加到具有限定浓度的胃酶抑素的溶液或悬浮液中,并任选地用水稀释至预先计算的浓度。可替代的是,可以固体形式添加助剂。在各种情况下必要的储备溶液和/或水的量可随后添加至所得到的水溶液或混悬液中。也可以将胃酶抑素有利地直接溶解或悬浮于包含所有其它助剂的溶液中。

[0085] 可有利地制备包含胃酶抑素的、具有4至10的pH值、优选具有5至9的pH值、和渗透压浓度为250至350mOsmol/kg的溶液或悬浮液。因此该药物制剂可以无痛地直接关节内给药。另外,可以将用于关节内施用的制剂添加至输注溶液,例如葡萄糖溶液、等张盐溶液或林格氏液(其还可以包含其它活性物质),因此也可以施用相对大量的活性物质。

[0086] 胃酶抑素是生理学上耐受良好的,易于制备,可精确计量并且优选地在存贮以及运输期间和在多重冻融过程中就含量、分解产物和聚集物而言是稳定的。其优选地在冰箱温度(2-8°C)和在室温(23-27°C)和60%相对大气湿度(R.H.)下可以稳定贮存至少3个月至两年的时间。

[0087] 例如,胃酶抑素可通过干燥以稳定的方式贮存且在必要的情况下通过溶解或悬浮转变为即用的药物制剂。可能的干燥方法是例如但不局限于这些实例:氮气干燥、真空烘箱干燥、冷冻干燥、用有机溶剂洗涤并随后空气干燥、液体床干燥、流化床干燥、喷雾干燥、滚筒干燥、层干燥;在室温空气干燥和其它方法。

[0088] 术语“有效量”表示在组织、系统、动物或人中产生生物学或医学响应的药物或药物活性物质的量,其是例如研究人员或医生所寻找或追求的。

[0089] 另外,术语“治疗有效量”表示与没有获得此量的相应受试者相比较有下述结果的量:改善的治疗,痊愈,疾病、病征、病症、难受、障碍的预防或消除或防止副作用或疾病、难受或障碍的发展减轻。术语“治疗有效量”还包括有效增强正常生理机能的量。

[0090] 在使用用于关节内施用的根据本发明的制剂或药物时,胃酶抑素和/或其生理学可接受的盐和溶剂合物类似于已知的、可商购获得的制剂或药剂按常规使用。在此,剂量依赖于患者的年龄、性别、体重和健康状态和体质及其疾病的严重程度和其它个体因素。

[0091] 用于关节内施用的根据本发明的药物制剂优选每周一次至每年一次、特别优选每两周一次至每半年一次、非常特别优选每月一次至每季度一次关节内给药。

[0092] 因此,本发明的另一主题是根据本发明的药物制剂的根据本发明的用途,其中将根据本发明的药物制剂如下在关节内施用:

[0093] a)每周一次至每年一次,

[0094] b)每两周一次至每半年一次,或

[0095] c)每月一次至每季度一次。

[0096] 因此本发明的主题还有用于关节内施用的胃酶抑素和/或其生理学可接受的盐、衍生物、溶剂合物、前药和立体异构体之一(包括它们以各种比例的混合物)在治疗和/或预

防选自关节病、创伤性软骨损伤、关节炎、疼痛、异常性疼痛和痛觉过敏的生理学和/或病理生理学病症中,特别优选在治疗和/或预防关节病中的用途,其中胃酶抑素和/或其生理学可接受的盐、衍生物、溶剂合物、前药和立体异构体之一(包括它们以各种比例的混合物)如下在关节内施用:

[0097] a)每周一次至每年一次,

[0098] b)每两周一次至每半年一次,或

[0099] c)每月一次至每季度一次。

[0100] 然而,患者的个体剂量和给药间隔也取决于大量个体因素,例如取决于所用的具体化合物的效力,取决于年龄、体重、总体健康状态、性别、营养,取决于施用时间和方法,取决于排泄率,取决于与其它药物的组合以及取决于具体疾病的严重程度和持续时间。

[0101] 在有机体内药物活性物质的摄取量是其生物利用度。如果将药物活性物质以注射溶液的形式关节内递送至有机体内,其绝对生物利用度即以未变化的形式到达关节间隙的药物的比例为100%。关于药代动力学即关于生物利用度的数据,可按类似于J. Shaffer等(J. Pharm. Sciences, 88(1999), 313-318)的方法获得。

[0102] 此外,这样的药物可按药物领域中公知的方法之一来制备。

[0103] 药物能够适应于通过关节内途径施用。这样的药物可通过药物领域中已知的所有方法来制备,例如通过将活性物质与一种或多种赋形剂或一种或多种助剂组合来制备。

[0104] 关节内施用有如下的优点:将本发明的化合物直接施用到关节软骨附近的滑液中,而且还能从那里扩散到软骨组织中。因此根据本发明的药物制剂也可直接注射至关节间隙中,并因此可直接在意图的作用部位发挥其作用。根据本发明的化合物还适于制备具有受控、均匀和/或延迟的活性物质释放的待关节内施用的药物。因此胃酶抑素还适于制备长效制剂,这对患者是有利的,因为只需要在相对大的时间间隔施用。

[0105] 适于关节内给药的药物,包括含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和溶质(通过该试剂使得制剂与待治疗的接受者的滑液等张)的含水和非含水无菌注射溶液;以及可包含悬浮介质和增稠剂的含水和非含水无菌悬浮液。所述制剂可在单剂量容器或多剂量容器(例如密封的安瓿和小瓶)中递送,和以冷冻干燥(冻干)状态贮存,使得只需要在临用前即刻添加无菌载体液体,例如注射用水。按照配方制备的注射溶液和悬浮液可由无菌粉末、颗粒剂和片剂制备。

[0106] 胃酶抑素也可以脂质体递送系统的形式例如小单层囊泡、大单层囊泡和多层囊泡施用。脂质体可由各种磷脂例如胆固醇、硬脂胺或磷脂酰胆碱形成。

[0107] 胃酶抑素也可与作为靶向药物赋形剂的可溶性聚合物偶联。这样的聚合物可包括聚乙烯吡咯烷酮、吡喃共聚物、聚羟丙基甲基丙烯酸酰胺苯酚、聚羟乙基门冬酰胺苯酚或聚氧乙烯聚赖氨酸,其被棕榈酰基基团取代。此外,胃酶抑素可与适于实现药物控释的可生物降解的聚合物偶联,其中可生物降解的聚合物为例如聚乳酸,聚 ϵ -己内酯,聚羟基丁酸,聚原酸酯,聚缩醛,聚二羟基吡喃,聚氰基丙烯酸酯,聚乳酸-乙醇酸共聚物,聚合物如右旋糖酐和甲基丙烯酸酯之间的缀合物,聚磷酸酯,各种多糖和聚胺和聚- ϵ -己内酯,白蛋白,壳聚糖,胶原蛋白或改性明胶和水凝胶的交联或两亲性嵌段共聚物。

[0108] 不言而喻,除上面特别提及的成分之外,就药物配制剂的具体类型而言还可包含现有技术中其它常规试剂。

[0109] 此外,根据本发明的药物可在某些已知的治疗中使用以提供累加或协同作用和/或可使用以恢复某些已有治疗的效力。

[0110] 除胃酶抑素之外,根据本发明的药物制剂还可包含其它药物活性物质,例如用于治疗关节病的其它药物活性物质,其它组织蛋白酶D抑制剂,NSAIDS, Cox-2抑制剂,糖皮质激素,透明质酸,硫唑嘌呤,甲氨蝶呤,抗CAM抗体,例如抗ICAM-1抗体,和/或FGF-18。为了治疗所提及的其它疾病,除胃酶抑素之外,根据本发明的药物制剂还可包含在其治疗中本领域技术人员已知的其它药物活性物质。

[0111] 即使没有其它实施方式,也可以设想本领域技术人员能在最宽的范围内利用上面的描述。因此优选的实施方式应当仅仅被认为是描述公开的内容,无论如何绝不是起限制作用。

[0112] 因此以下实施例意在解释本发明而不是限制本发明。除非另有指明,百分比数据表示重量百分比。所有温度以摄氏度表示。“常规的精制”:如有必要则加入水,如有必要根据最终产品的组成将pH值调至2至10之间,用乙酸乙酯或二氯甲烷萃取,分离,有机相经硫酸钠干燥、过滤、蒸干,并通过色谱法在硅胶上纯化和/或通过结晶纯化。

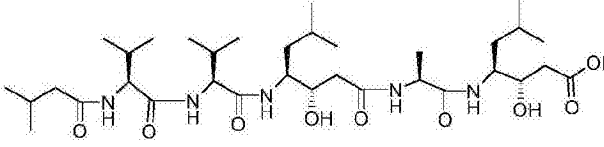
[0113] 硅胶上的Rf值;质谱:EI(电子碰撞电离):M⁺,FAB(快原子轰击):(M+H)⁺,THF(四氢呋喃),NMP(N-甲基吡咯烷酮),DMSO(二甲基亚砷),EE(乙酸乙酯),MeOH(甲醇),DC(薄层色谱法)

[0114] 合成并表征胃酶抑素。然而,胃酶抑素的制备和表征也可由本领域技术人员使用的其它方法进行。

[0115] 实施例1:胃酶抑素-一种肽组织蛋白酶D抑制剂

[0116] 表1

[0117]

结构	根据实施例2的 组织蛋白酶D IC ₅₀ [M]	根据实施例3的 组织蛋白酶D IC ₅₀ [M]
 <p>胃酶抑素: (3S,4S)-3-羟基-4-[(S)-2-((3S,4S)-3-羟基-6-甲基-4-[(S)-3-甲基-2-[(S)-3-甲基-2-(3-甲基-丁酰氨基)-丁酰氨基]-丁酰氨基]-庚酰基氨基)-丙酰基氨基]-6-甲基庚酸</p>	1.6-1.90E-09	0.69-2.40E-09

[0118] 及其生理学可接受的盐、衍生物、溶剂合物、前药和立体异构体,包括它们以各种

比例的混合物。

[0119] 另外,胃酶抑素以相对于肾素对组织蛋白酶D的高选择性($IC_{50} > 10,000nM$)、良好的软骨渗透和无可测的毒性或生殖毒性为特征。

[0120] 实施例2:鉴定组织蛋白酶D抑制剂的体外荧光试验

[0121] 为了鉴定组织蛋白酶D调节剂的活性,用带有荧光基团(MCA=(7-甲氧基香豆素-4-基)乙酰基)的合成肽在Greiner 384-孔微量滴定板中进行连续的酶试验,该试验可通过从在相同分子上的Dpn(2,4-二硝基苯基)基团的能量转移而中止。肽类底物被组织蛋白酶D裂解导致荧光强度增强。为了测定物质的效能,将在该物质的存在下荧光强度的时间依赖性增强与在不存在物质下时间依赖性的荧光增强进行对比。作为参比物,使用胃酶抑素A(Sigma-Aldrich)。作为底物,使用MCA-GKPILFFRLK(Dnp)-d-R-NH₂(Enzo Life Sciences, **Lörrach**)。作为酶使用最终浓度为1.4nM的从人肝脏中分离的组织蛋白酶D(Sigma-Aldrich)。在100mM醋酸钠缓冲液,1.25%(v/v)的DMSO,0.25%(w/v)的Chaps,pH5.5中进行试验。将2 μ l的具有连续稀释的物质浓度的每种物质溶液各自加入到4 μ l的组织蛋白酶D溶液中并在室温下温育10min。通过添加2 μ l的底物溶液(终浓度5 μ M)开始反应。采用Envision多标签读数器(Perkin Elmer)进行起点荧光测量(激发波长340nm/发射波长450nm),将反应在室温下温育60min。随后通过测定在450nm(激发波长340nm)下荧光强度的增强来测量在反应时间期间裂解的肽片段的量。

[0122] 结果:胃酶抑素在纳摩尔的范围内抑制组织蛋白酶D(参见表1)。

[0123] 实施例3:软骨外植试验

[0124] 为了研究潜在的组织蛋白酶D抑制剂对软骨降解的影响,使用pH诱导的基于牛外植体的模型。在此将培养外植体的培养基的pH与关节病膝盖的病理生理pH匹配。此pH为pH 5.5。在此体外模型中,随后对潜在的组织蛋白酶D抑制剂关于其阻止软骨降解过程的作用进行研究。如果软骨破坏,则糖胺聚糖(GAGs)释放到细胞培养物上清液中。可借助于DMMB(二甲基亚甲基蓝盐酸盐)定量测定释放的GAG的量。如果用二甲基亚甲基蓝盐酸盐检测到硫酸化的GAG,则采用在633nm处的吸收的降低。由于采用非常低的GAG浓度也是可能的,所以即使用GAG长时间温育DMMB之后染料/GAG复合物也不沉淀析出,而这在其它测量方法中有时只在短时间之后就发生。为了测定浓度,同时记录硫酸软骨素的校准线。GAG值可用于计算 IC_{50} 值,即物质显示出50%的其作用时的浓度。

[0125] 溶液:

[0126] 温育介质,pH 7.4:

[0127] 不含FBS的DMEM,添加1%的Pen/Strep和30 μ g/ml的抗坏血酸,该培养基不贮存。

[0128] 温育介质,pH 5.5:

[0129] 不含FBS的DMEM,通过添加MES调节pH值并利用pH计监测,添加1%的Pen/Strep和30 μ g/ml的抗坏血酸。

[0130] 用于GAG测量的溶液:

[0131] DMMB染色溶液(V=500ml):

[0132] 将8mg的DMMB(二甲基亚甲基蓝)溶解于2.5ml的乙醇+1g的甲酸钠+1ml的甲酸中,用重蒸馏水补足至500ml。

[0133] 温育介质:FBS(不含FBS的培养基)

[0134] 硫酸软骨素溶液(标准曲线)

[0135] 制备以下浓度的标准溶液:50 $\mu\text{g}/\text{ml}$;25 $\mu\text{g}/\text{ml}$;12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$;6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$;3.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$;1.56 $\mu\text{g}/\text{ml}$;0.78 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和空白对照介质。在还进行实验的介质中制备标准溶液。

[0136] 1.) 步骤:pH-诱导的牛外植体的软骨降解

[0137] 首先制备牛外植体。在96多孔板中进行软骨降解的诱导。每个孔培养一个外植体。各自添加200 μl 的不含FBS的DMEM(温育介质pH5.5)+30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的抗坏血酸。将作为阴性对照的外植体(n=4)在pH7.4下(不含FBS)温育。该对照不包括在数据的计算中,而是确保pH值变化对GAG的释放具有期望的作用。在此点下,添加待测的物质。不进行外植体的预温育。将外植体于培养箱中在37 $^{\circ}\text{C}$ 和7.5%CO₂下用相应的物质培养3天。

[0138] 2.) 温育步骤

[0139] 为了研究组织蛋白酶D抑制剂对GAG(糖胺聚糖)释放的影响,使用期望浓度的物质并培养3天。在第一实验中将待测化合物在1 μM 的浓度下和在1%的DMSO中进行试验。在下一个实验中将对GAG释放产生>50%影响(这相当于在Assay Explorer中<50%的对照)的物质在100nM下和在1%的DMSO中进行试验。将在这些条件下对GAG释放产生>50%影响(这相当于在Assay Explorer中<50%的对照)的物质进行浓度/作用关系试验。在此在下列浓度下对化合物进行研究:30 μM ,10 μM ,3 μM ,1 μM ,0.3 μM ,0.1 μM ,0.03 μM ,0.01 μM 。

[0140] 所用的阳性对照为0.01 μM 浓度的胃酶抑素A。试验窗口(assay window)定义如下:对照(pH5.5),定义为0%效果,而对照pH5.5+0.01 μM 胃酶抑素A,定义为100%效果。温育3天后,收集细胞培养物上清液并在-20 $^{\circ}\text{C}$ 下贮存或直接测量。通过光度计测量释放的GAG的量。

[0141] 报告1 μM 和100nM下各物质基于阳性对照(pH5.5+0.01 μM 胃酶抑素A)和阴性对照(pH5.5)的%的效果(1个数值)。该数值代表4次平行测定的平均值。在浓度/作用关系的测定中,将IC₅₀值报告到数据库中(Assay Explorer)。

[0142] 4.) 测量

[0143] 细胞培养物上清液(200 μl)或者直接测量或者在-20 $^{\circ}\text{C}$ 下贮存。为确保GAG浓度(上清液中GAG的 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的准确测定,测定值必须位于标准曲线的线性区域内。为确保这样,按常规引入不同的稀释(1/5,1/10,1/20,1/40)。用介质制备稀释液并自动引入(Hamilton)到384-多孔板(15 μl)中。同样自动添加60 μl 的DMMB溶液(或使用多通道吸量管)。发生快速的显色反应,随后使用读板仪(例如Envision)在633nm下测量。

[0144] 根据存在的样品的量,进行至少一次双重测定。

[0145] 由MTP读板仪以csv或xls文件的形式提供数据并以基于该格式(xls)的原始数据形式贮存或用于计算各化合物的百分比效果。

[0146] 5.) 质量控制

[0147] 作为诱导pH诱导的软骨降解的对照,将4个外植体在pH7.4下温育。这相当于软骨的生理学pH,因此这里可预见到对GAG的释放没有影响。因此这些GAG值(上清液的 $\mu\text{g}/\text{ml}$)总是显著低于在pH5.5下温育的GAG值。

[0148] 其它对照为胃酶抑素对照(pH5.5+0.01 μM 胃酶抑素A),既起实验校验的作用,也对于试验窗口的定义同样重要。该物质非特异性地阻断大多数蛋白酶的活性,因而可测定化合物可能的效果的最大值。

[0149] 6.) 结果

[0150] 胃酶抑素在GAG检测中表现出在纳摩尔范围内的IC₅₀值(参见表1)。

[0151] (1) Klomp makers, A. & Hendriks, T. (1986) *Anal. Biochem.* 153, 80-84, Spectrophotometrischer Nachweis für sulfatierte Glycosaminoglycane(硫酸化糖胺聚糖的分光光度检测)。

[0152] (2) Groves, P. J. 等(1997) *Anal. Biochem.* 245, 247-248

[0153] Polyvinylalkohol-stabilisierte Bindung von sulfatierten GAGs an Dimethylmethylenblau(以聚乙烯醇稳定的硫酸化GAGs与二甲基亚甲基蓝的结合)。

[0154] 实施例4: 动物体内抗痛觉过敏作用的研究

[0155] 为了诱发炎症反应, 将角叉菜胶溶液(CAR, 1%, 50 μ l)在一侧关节内注入大鼠膝关节内。未注射的一侧用于对照的目的。每组使用六只动物。利用螺旋测微器(膝关节上的中间侧面)测定阈值, 并通过Hargreaves方法(Hargreaves等1988)利用定向的红外线光源在脚掌上测量热痛觉过敏。由于炎症的位置(膝关节)与测量的位置(爪子的脚掌)不同, 本申请中使用术语继发性热痛觉过敏, 其机制对于发现有效的镇痛药有重大意义。

[0156] 热痛觉过敏的实验描述(Hargreaves试验): 将实验动物置入在石英玻璃片上的塑料室中。试验前, 首先给实验动物约5-15分钟的时间使其自身熟悉环境。一旦实验动物在熟悉阶段之后(探究阶段结束)不再那么频繁移动, 就将红外线光源(其焦点在玻璃钮扣平面上)直接置于待刺激的后爪下。然后通过按电钮开始实验操作: 红外光导致后爪的皮肤温度升高。当已经达到预先指定的最高温度时通过实验动物抬起后爪(作为达到痛觉阈的表达)或通过自动切断红外线光源终止实验。只要实验动物坐着不动就记录爪子反射的光。爪子的撤退会中断该反射, 之后切断红外线光源并记录从接通到切断的时间。校准仪器使得红外线光源在10s内升高皮肤温度至约45摄氏温度(Hargreaves等, 1988)。将由Ugo Basile公司制造的用于此目的的仪器用于该试验。

[0157] CAR购自Sigma-Aldrich。根据本发明的特异性组织蛋白酶D抑制剂的施用在CAR之前在关节内进行30分钟。10 μ g/关节的曲安西龙(TAC)用作阳性对照, 且溶剂(载体)用作阴性对照。痛觉过敏以发炎和未发炎的爪子撤退次数的差别提供。

[0158] 结果: TAC能降低CAR诱导的肿胀, 但胃酶抑素不降低CAR诱导的肿胀。相反, 胃酶抑素能以剂量的函数降低热痛觉过敏的程度。

[0159] 评价: 已经显示胃酶抑素起抗痛觉过敏的作用。可以假定该结论因为胃酶抑素表现出对炎性肿胀没有影响因而对痛觉过敏触发没有影响。因此可以设想胃酶抑素在人体内产生疼痛减轻作用。

[0160] 实施例5: 胃酶抑素在牛滑液中的稳定性

[0161] 1.) 牛滑液的提取

[0162] 在牛外植体(用于扩散小室或其它试验)的制备中, 使用奶牛蹄(掌骨关节)或奶牛膝关节。滑液可由两种关节获得。为此目的, 采用10ml注射器和导管将滑液小心地从开放性关节中取出并转入预备的2ml Eppendorf容器中。根据动物(奶牛许可证可获得)标记Eppendorf容器。本发明中必须确保在关节的制备过程中血液不进入关节间隙。如果是这种情况, 滑液变成微红色, 因此必须弃去。滑液基本上非常粘且颜色为透明至淡黄色。记录切除以及滑液的目测分析。

[0163] 2.) 物质在SF中的稳定性试验的批次

[0164] 为了检查单个化合物的稳定性,将4种不同的牛滑液混于一池。为此目的,使用每SF约1ml。在5ml玻璃容器中直接配制该混合物以使任何吸收效应最小化。将SF充分地、但小心地混合。不应当有气泡或泡沫生成。为此目的,在最低的速度下使用涡流仪。在1 μ M的初浓度下(除非另有要求)测试待测化合物。在添加物质后,再次将该批次充分地并小心地混合。为了目视监测,将所有SF批次拍照,并将相应实验的图片编入eLabBio文档内。将这些批次在保温箱中在37 $^{\circ}$ C和在7.5%CO₂下温育48h。

[0165] 3.) 取样

[0166] 取样在预先确定的时间进行(如果没有其它要求,参见下文)。将4 \times 200 μ l的SF从每个时间点的混合物中取出并直接转入到0.5ml“低结合的(low-binding)”Eppendorf容器中。为了使物质与容器的塑料的相互作用最小化,使用“低结合的”Eppendorf容器。已将各自200 μ l的乙腈引入Eppendorf容器中,使此后形成SF的1+1混合物。这简化了随后的分析,但蛋白质沉淀可能在添加SF之后立即发生。对此应当记录在案。在添加物质之后立即采取0h样品。这对应于稳定性计算中的100%值。理想地,这里所采用的浓度应当恢复。可将样品在-20 $^{\circ}$ C下冷冻。

[0167] ● 0h

[0168] ● 6h

[0169] ● 24h

[0170] ● 48h

[0171] 作为阴性对照,使用不含物质的SF。作为阳性对照,使用具有1 μ M物质的SF。这对应于0h值且因而为100%稳定性。

[0172] 将样品于-20 $^{\circ}$ C下贮存在“低结合的”Eppendorf容器内。随后定量测量样品。相应物质的检测通过质谱进行。

[0173] 4.) 数据处理

[0174] 在图中画出所测得的浓度(ng/ml)对时间的曲线(GraphPad **Prism**[®])。在此测定物质的百分比稳定性。所使用的100%值为在时间0h时SF中的初值。数据以各自的实验编号存放在eLabBio中并报告在MSR数据库中(在相应的温育时间之后以百分比稳定性报告)。

[0175] 5.) 结果

[0176] 胃酶抑素在滑液中在至少两周的时间内保持稳定(参见图1)。

[0177] 实施例6:关节内注射之后的药代动力学数据

[0178] 为了该研究(KK-Rat-12-003),使用14只雄性Lister头巾大鼠(Hooded Ratten)。在时间“0”时对所有大鼠给予单次关节内注射到两个膝关节内。注射液由30 μ l构成,其中均匀地悬浮约700 μ g的化合物(悬浮液=在PBS中具有0.25%Tween20的0.5%Methocel K4M中的化合物)。悬浮液经25G导管施用。在生活参数的任何变化方面,例如体重、膝肿胀或解除的姿势没有记录特点。在表2中所述的每个时间点,将动物处死,准备膝关节(除去皮肤和肌肉组织)并冷冻用于进一步处理。

[0179] 将深冻的关节简单地解冻,采用骨剪尽可能粉碎,并随后添加4倍体积的80%乙醇。随后用Ultraturrax将混合物匀化,将提取物在室温下振摇20min然后于-20 $^{\circ}$ C储存至少30min。然后将混合物在13,000rpm下离心5min,将10 μ l上清液的等分试样用内标准溶液稀释1:5000,转入PCR盘中并分析。

[0180] 将20 μ l的内标准溶液添加到20 μ l血浆中,添加100 μ l的甲醇,并振摇5分钟。然后将提取物于-20 $^{\circ}$ C储存至少30min并随后在13,000rpm下离心5min。将80 μ l的上清液转入PCR盘中并分析。

[0181] 所有样品借助UPLC-MS/MS系统进行分析。胃酶抑素的检测极限在血浆中为0.1ng/ml而在组织中为8 μ g/g。

[0182] 表2-膝关节直径(以mm计)

[0183]

注射后的天数	平均关节直径[mm]	SD	N(经注射的关节)
0	10.08	0.31746745	28
1	10.88	0.49042038	26
2	10.50	0.30862869	16
4	10.12	0.19734488	16
7	10.35	0.19478086	16
9	10.14	0.18101258	10
11	10.37	0.15579188	10
13	10.24	0.17707444	8
15	10.45	0.15238579	8
20	10.18	0.15942605	6
27	10.50	0.11189281	6

[0184] 在关节内给予悬浮液之后,胃酶抑素显示在大鼠中在膝关节内约106h的平均停留时间和在血液中由于从滑膜的缓慢释放和很高的清除率而仅极低的系统暴露量。胃酶抑素显示在血浆中所谓的触发(flip-flop)动力学,即末端血浆半衰期不由消除决定,而是由胃酶抑素从悬浮液的释放和经滑膜的扩散决定。不过,胃酶抑素在给药之后最多28天在血浆中以极低的浓度可检测(参见图2)。

[0185] 实施例7:在静脉给药(i.v.)和口服(p.o.)给药之后的药代动力学数据

[0186] 在给药呈最多4种物质的混合物形式的试验物质之后,胃酶抑素的药代动力学参数在Wistar大鼠(体重约250g)中进行测定。或者通过i.v.快速注射到尾部静脉内或者通过不锈钢导管经口管饲将胃酶抑素给药于雄性大鼠(n=3每个给药类型)。将测试物质溶解于DMSO/PEG200/水(2/60/38v/v)中,最终浓度为0.8mg/ml,并给药0.2mg/kg i.v.和0.5mg/kg口服的剂量。在给药之后在下列时间点下用轻异氟醚麻醉经舌下静脉取血样(200 μ l),iv:0.1,0.5,1,2,4,6和24h;po:0.25,0.5,1,2,4,6和24h。

[0187] 将血样收集在含Li肝素的离心管中并在约10,000g下于4 $^{\circ}$ C离心3min。将由此获得的血浆立即在-20 $^{\circ}$ C下冷冻并保存直到分析。血浆浓度通过标准的LC-MS/MS方法进行测定。药代动力学参数(C_{1p},V_{ss},T_{1/2},F)经NCA分析进行测定。

[0188] 在静脉给予之后,胃酶抑素显示很高的清除率(>100%肝脏血流)、平均分布容积和因此显示很短的血浆半衰期(约0.14h)。在口服给予之后,所有血浆浓度低于检测极限(参见图3)。

[0189] 实施例8:在关节病-ACLT tMx模型中胃酶抑素的效力(体内)

[0190] 选择大鼠作为实验动物。在剃刮和消毒之后,通过中间皮肤约1cm长度的皮肤切口

打开手术区域。准备膝关节囊并暴露中间髌韧带。在打开关节囊、切割中间韧带和将膝盖骨侧向位移之后,使用钝端弯刀切割前十字韧带(ACL=前十字韧带横切)。随后准备固定半月板在适当位置的前韧带和后韧带并切割,半月板为切除的tMx(切除内侧半月板)。在重新定位膝盖骨之后,最后将关节用无菌盐水溶液冲洗以除去可能已经形成的任何血液凝块。

[0191] 将膝盖骨复位,并在封闭囊的情况下将中间髌韧带通过连续缝合再固定。同样将肌肉缝合。随后通过单缝线使皮肤闭合。手术持续时间为约10分钟。手术后试验持续时间为6周。

[0192] 为了关节内注射,将动物用1.5-2体积%的异氟醚麻醉。在注射之前,皮下注射丁丙诺啡。轻轻地剃刮注射区域并消毒。使膝关节处于略微弯曲的位置,并将待测物质或载体注入关节内。

[0193] 对于本实验,使用在30 μ l中的1mg的胃酶抑素。作为阴性对照,仅将载体注入试验组。作为阳性对照,各自使用大鼠的未动手术的后腿。

[0194] 组织学处理

[0195] 将所取的组织样品在多聚甲醛(4%)中固定至少72小时,然后在流动的自来水下冲洗24小时。随后在4周的时间内通过Osteosoft使样品脱钙。然后用石蜡浸润组织并准备具有7 μ m厚度的组织切片。为了评价,将切片用番红精(Safranin)O坚牢绿染色。

[0196] 评价

[0197] 在暴露区域范围内的两个切片选自各个动物并采用评价系统由两个有经验的人进行评价。评价系统基于V.B.Kraus等的著作(Osteoarthritis&Cartilage,18,S3,2010)。

[0198] 结果

[0199] 胃酶抑素在体内也在关节病中显示显著的效力(参见图4)。

[0200] 实施例9:微透析

[0201] 在作用部位的游离药物水平对于药物的作用是关键。在关节内进行注射的情况下,在这方面在滑液中的分布空间令人非常感兴趣。

[0202] 由于滑液一方面代表用于肽分析测定的复合基质,另一方面只有游离的即非蛋白结合的药物部分对该作用是相关的,因而使用微透析方法。由微透析得到的洗脱液使得能够分析来自滑液的复合基质的游离药物水平。这样的原因在于使用了只有分子高达一定的尺寸才能通过的屏障膜(微透析膜)。除洗脱液的流速和作为物质交换驱动力的存在于滑液中的药物的游离浓度之外,该“孔径尺寸”决定洗脱液中药物的浓度。

[0203] 为了这些研究,使用装有铜纺膜和具有6kDa孔径尺寸的得自CMA公司的微透析探针(参考号000082;CMA 7;微透析样品1mm 3/包装)。洗脱液流速为0.5 μ l/分钟。

[0204] 首先,对在牛滑液中的释放动力学进行研究并与曲安西龙(TriamInjekt®20mg)(一种已被批准用于关节内注射的药物)相比较。曲安西龙在本发明中以已经溶解的晶体悬浮液使用而胃酶抑素晶体直接地且不经溶解地添加到滑液中。在玻璃容器中使用3mg药物每ml滑液,这大致相当于在关节内注射到膝关节中之后的浓度条件。令人惊讶地,与曲安西龙相反,测得非常高水平的未结合的胃酶抑素。或多或少恒定的水平也表明胃酶抑素在滑液中的快速溶出率与高稳定性(参见图5a)。

[0205] 由于胃酶抑素在滑液中的高溶解度,由在豚鼠上关节微透析得到的结果(Dunkin Hartley)是令人惊讶的:在关节内注射胃酶抑素[以50 μ l悬浮液1mg/关节施用]至多14天之

后,在关节中和在几乎所有研究的洗脱液中可检测显著性水平的胃酶抑素(参见附图5b和5c)。

胃酶抑素在唾液中的稳定性数据:

时间 (h)	% 剩余	ln 剩余
0	100	0,000
6	100	0,002
24	98,4	0,016
48	92,0	0,083
72	90,3	0,102
144	91,3	0,0912
216	89,9	0,106
312	71,6	0,335

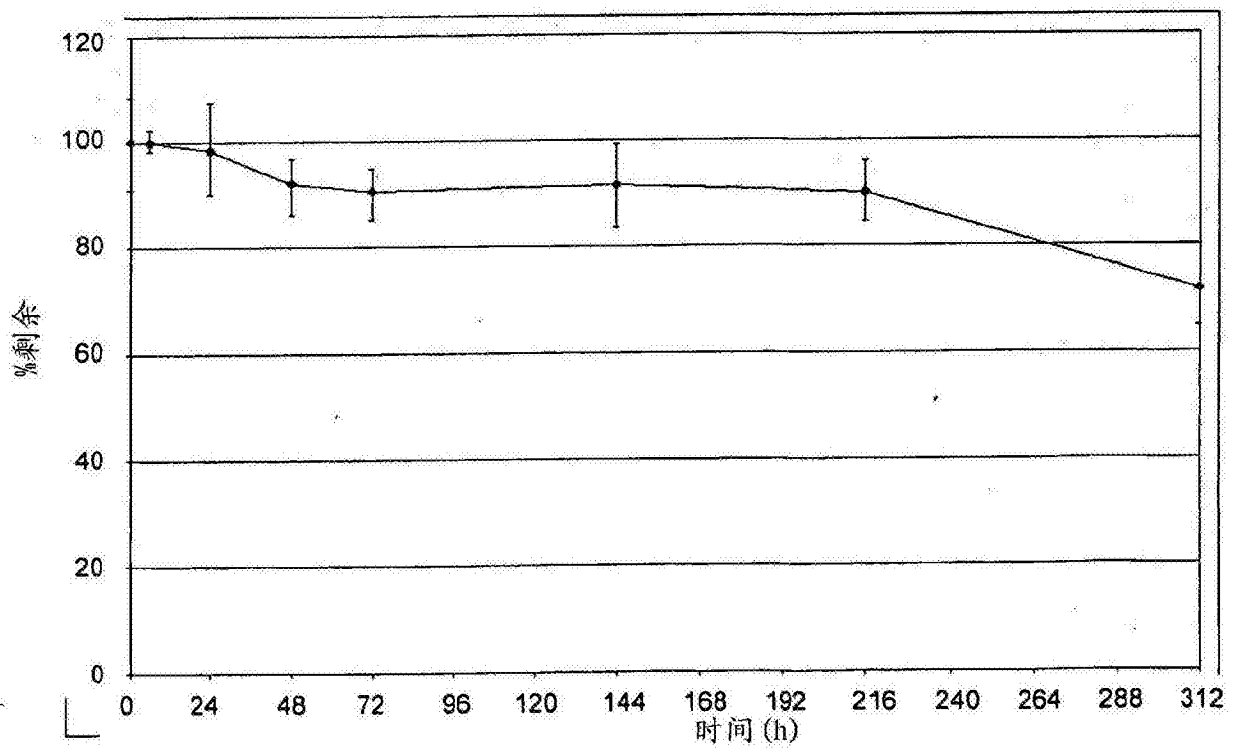


图1

药代动力学-在关节内施用之后胃酶抑素在关节中和在血浆中的停留时间

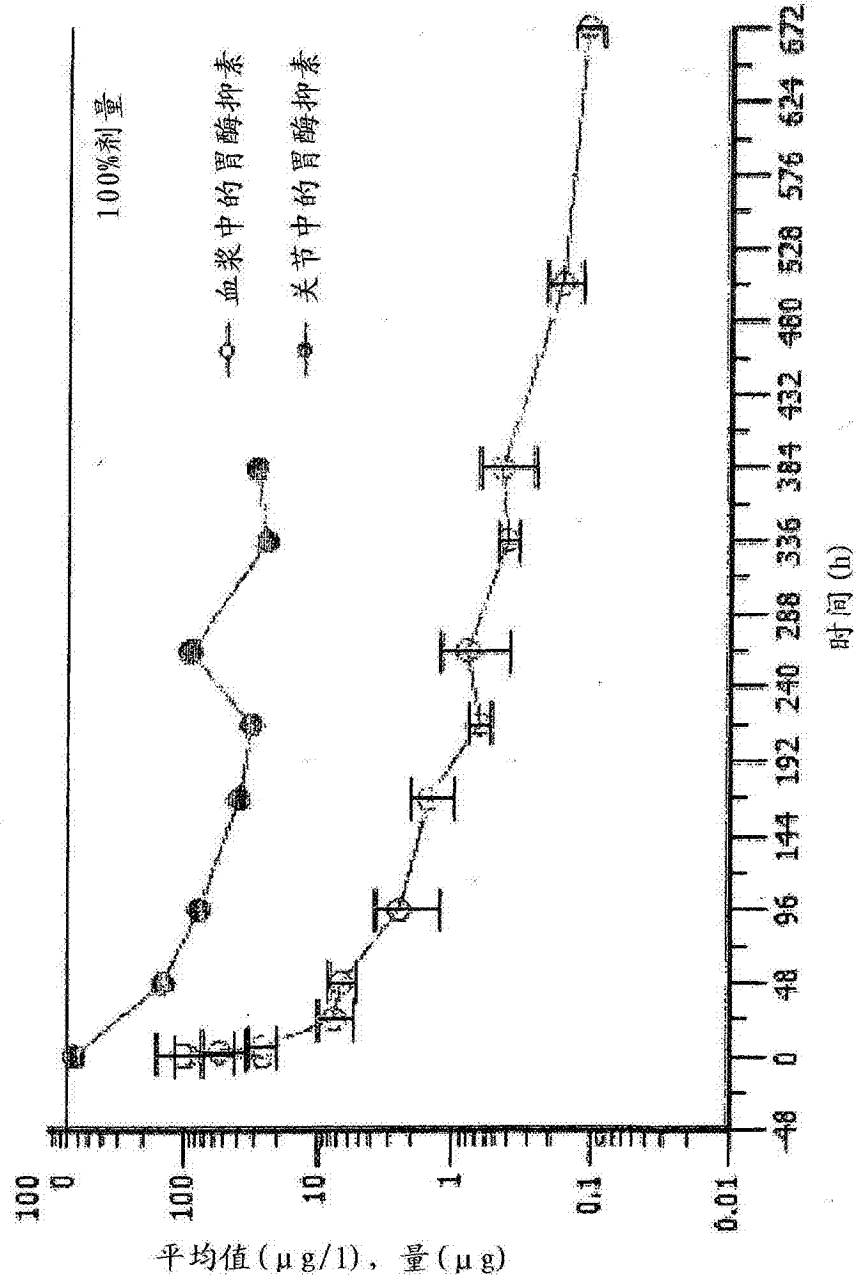


图2

药代动力学-在静脉和口服施用之后胃酶抑素在血浆中的停留时间

剂量-在雄性大鼠中在静脉(iv)和口服(po)给予之后标准化的血浆浓度 (C[ng/ml]/剂量[mg/ml])和药代动力学参数。

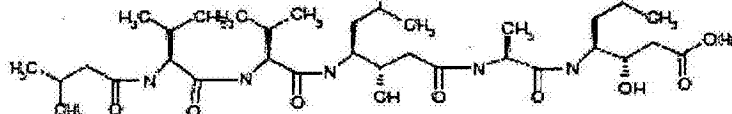
分子结构		
给药	iv	po
剂量[mg/kg]	0.2	0.5
培养基	血浆	血浆
时间[h]		
0.1	396	ND
0.25	ND	<LLOQ
0.5	17.7	<LLOQ
1	4.19	<LLOQ
2	<LLOQ	<LLOQ
4	<LLOQ	<LLOQ
6	<LLOQ	<LLOQ
24	<LLOQ	<LLOQ
参数		
C _{max} [ng/mL] / 剂量 [mg/kg]	396	<LLOQ
t _{max} [h]	0.100	NA
AUC [h · ng/mL] / 剂量 [mg/kg]		
0 - t _{最后}	113	NA
0 - ∞	114	
t _{1/2} [h]		
0.1 - t _{最后}	0.140	
CL [L/h/kg]	8.76	
V _{ss} [L/kg]	1.31	
粪便和尿中未变化的活性物质的回收率[剂量的%] (0-24h收集)		
粪便	52	37
尿	1.8	<1
生物利用度 (%)		<5
Cl _{int} [μL/min/mg]	<10	
F _{ub} [%]	>29	
游离的 C _{max} @ 1mg/kg [nM]	>173	NA
生物化学 IC ₅₀ [nM]	<1	
细胞 IC ₅₀ [nM]	NA	

图3

ACTL模型

胃酶抑素	PVP Lutrol	对照 (cl)
4,	21,	5,
8,	12,	4,
15,	17,	9,
13,	22,	5,
24,	21,	6,
9,	20,	2,

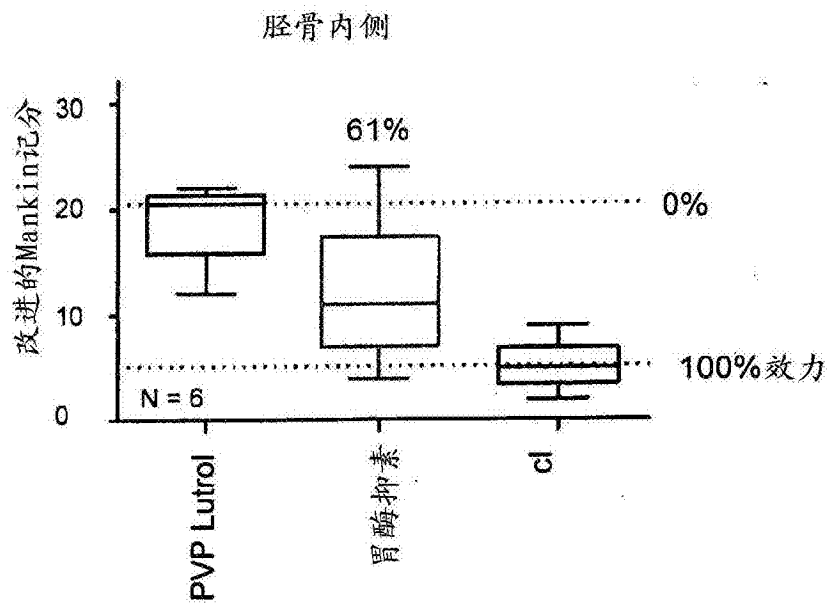


图4

体外：在牛滑液中微透析

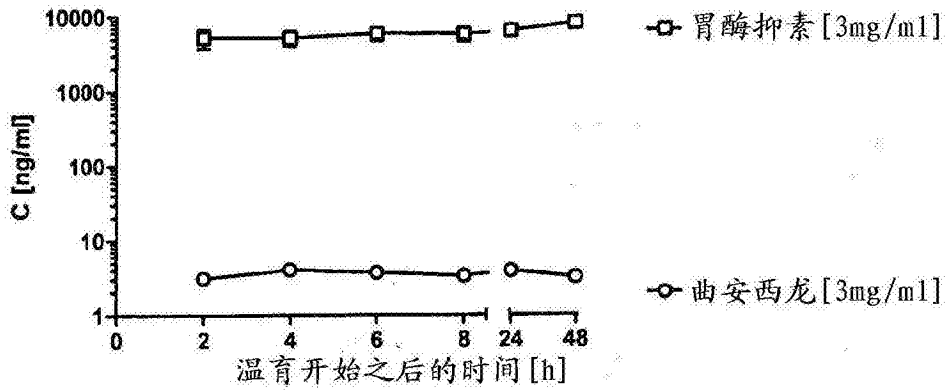


图5a

体内：在膝关节中微透析（豚鼠）

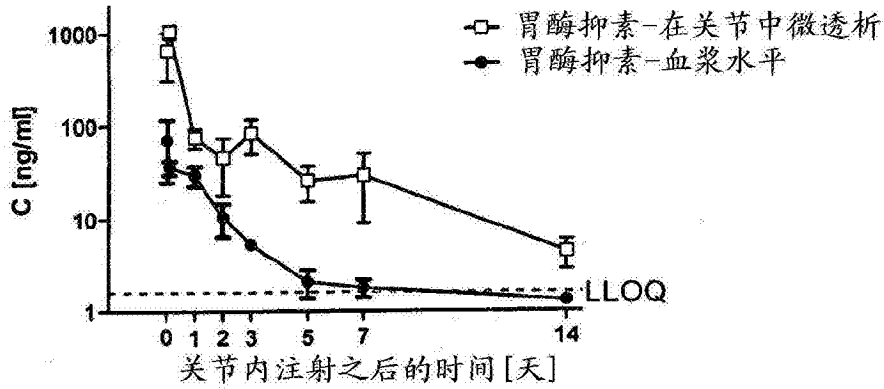


图5b

阳性洗脱液样品的数量

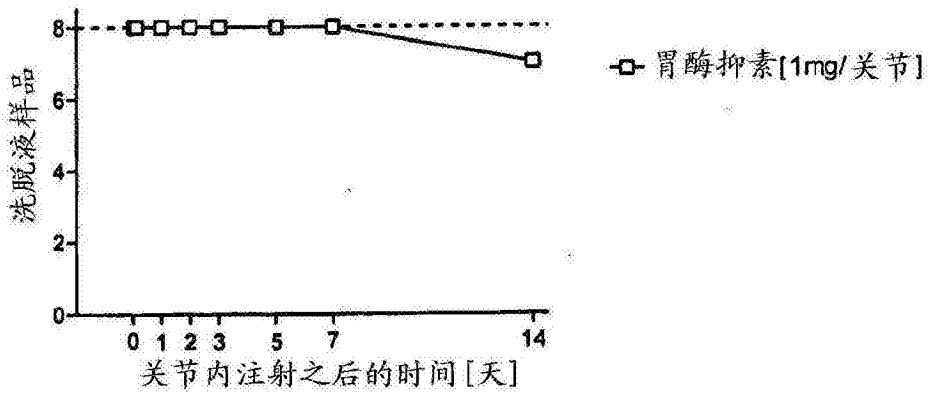


图5c