

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07D207/16

A61K 31/40



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 99808002.0

[45] 授权公告日 2004 年 5 月 5 日

[11] 授权公告号 CN 1148350C

[22] 申请日 1999.5.28 [21] 申请号 99808002.0

[30] 优先权

[32] 1998.5.28 [33] US [31] 60/087,064

[86] 国际申请 PCT/US1999/011924 1999.5.28

[87] 国际公布 WO99/061421 英 1999.12.2

[85] 进入国家阶段日期 2000.12.28

[71] 专利权人 拜奥根有限公司

地址 美国马萨诸塞

[72] 发明人 W-C·李 A·吉尔

审查员 刘元霞

[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

代理人 唐伟杰

权利要求书 1 页 说明书 37 页 附图 5 页

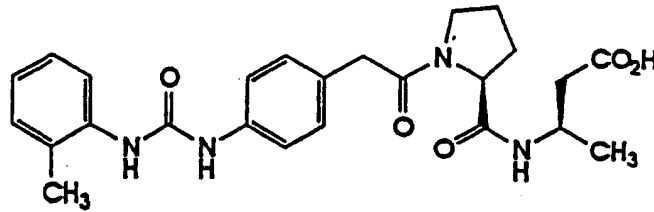
[54] 发明名称 新型 VLA-4 抑制剂: oMePUPA-V

[57] 摘要

本发明公开了一种细胞粘着抑制剂 oMePUPA-V, (R)-N-[[4-[[(2-甲基苯基氨基) 羰基] 氨基] 苯基] 乙酰基] -L-脯氨酸-3-甲基)-β-丙氨酸, 药物组合物, 和治疗细胞粘着介导的病状的方法。

ISSN 1008-4274

1. 一种细胞粘着抑制化合物



oMePUPA-V

及其药物上可接受的酯、药物上可接受的盐或其异构体。

2. 药物组合物，其含有权利要求1的化合物和药物上可接受的载体。

3. 权利要求2的药物组合物，还含有选自皮质类固醇、支气管扩张药、平喘药、消炎药、抗风湿剂、免疫抑制剂、抗代谢物、免疫调制剂、抗牛皮癣药和治疗糖尿病药的第二种试剂。

4. 药物组合物，其含有权利要求1的化合物和一种或多种 VLA-4 介导的细胞粘着抑制剂化合物。

5. 权利要求1的化合物用于制备预防、抑制或减少 VLA-4 介导的细胞粘着的药物的用途。

6. 权利要求1中的化合物用于制备预防、抑制或减少炎症药物的用途。

7. 权利要求1的化合物用于制备治疗哺乳动物中哮喘、过敏性鼻炎、多发性硬化、动脉粥样硬化、炎性肠病或多发性骨髓瘤的药物的用途。

8. 权利要求1的化合物用于制备治疗多发性硬化的药物的用途。

9. 权利要求1的化合物用于制备治疗炎性肠病的药物的用途。

10. 含有权利要求1的化合物的酯的药物组合物。

11. 权利要求10的组合物，其中所述酯是由权利要求1中的化合物与选自甲醇、乙醇、丙醇、丁醇和直链或支链烷基 C1-C10 的醇反应制得的。

12. 权利要求1的化合物用于制备治疗、预防或改善哮喘症状的药物的用途。

新型 VLA-4 抑制剂: oMePUPA-V

本发明涉及用于抑制、变更或预防细胞粘着和细胞粘着介导致病状的新化合物。本发明还涉及含有这些化合物的药物制剂, 以及使用它们抑制和预防细胞粘着和细胞粘着介导致病的方法。可以将本发明的这些化合物和药物组合物用作治疗和预防药物。它们特别适宜治疗许多炎症和自身免疫性疾病。

细胞粘着为细胞彼此结合、向特定靶子移动或定位在胞外基质中的过程。细胞粘着本身构成许多生物现象的基本机制之一。例如, 细胞粘着引起造血细胞粘附到内皮细胞上, 接着这些造血细胞移到血管外并移到损伤部位。细胞粘着本身在如哺乳动物的炎症和免疫反应的许多病状中起作用。

对细胞粘着的分子基础研究显示, 不同细胞表面的大分子—共同称之为粘着分子或受体—介导细胞-细胞和细胞-基质相互作用。例如, 所谓“整联蛋白”的超家族蛋白质是造血细胞和其微环境之间粘附相互作用的关键介导体 (M. E. Hemler, "整联蛋白家族中的 VLA 蛋白质: 结构、功能和其对白细胞的作用" *Ann. Rev. Immunol.*, 8, 第 365 页 (1990))。整联蛋白为非共价杂二聚体络合物, 由两个所谓的 α 和 β 亚单元组成。有至少 17 个不同的 α 亚单元($\alpha 1$ - $\alpha 10$ 、 α -L、 α -M、 α -D、 α -X、 α -IIB、 α -V 和 α -E)和至少 9 个不同的 β ($\beta 1$ - $\beta 9$)亚单元, 到目前为止它们都已被识别。基于其 α 和 β 亚单元组分的类型, 可以将每个整联蛋白归类到亚家族中。

整联蛋白 $\alpha 4\beta 1$, 最近也称之为抗原-4 ("VLA-4")或CD49d/CD29, 为参与广泛的细胞-细胞和细胞-基质粘附相互作用的白细胞细胞表面受体 (M. E. Hemler, *Ann. Rev. Immunol.*, 8, 第 365 页 (1990))。它被充当白细胞诱导的内皮细胞表面蛋白质的受体, 血管细胞粘着分子-1 ("VCAM-1"), 以及胞外基质蛋白质纤连蛋白 ("FN") 的受体 (Ruegg 等人, *J. Cell Biol.*, 177, 第 179 页 (1991)); Wayner 等人, *J. Cell Biol.*, 105, 第 1873 页 (1987); Kramer 等人, *J. Biol. Chem.*, 264, 第 4684 页

(1989); Gehlsen等人, Science, 24, 第1228页(1988))。抗-VLA-4单克隆抗体("mAb's")已显示出在体外和体内都抑制VLA-4-依赖性粘着相互作用(Ferguson等人, Proc. Natl. Acad. Sci., 88, 第8072页(1991); Ferguson等人, J. Immunol. 150, 第1172页(1993))。体内试验的结果暗示, 抑制VLA-4-依赖性细胞粘着可以预防、抑制或改变几种炎性和自体免疫病状。(R. L. Lobb等人, "The Pathophysiologic Role of $\alpha 4$ 整联蛋白在体内的病理生理作用, 94, 第1722-28页(1994))。

为了鉴定结合VLA-4所必需的最小活性氨基酸序列, Komoriya等人合成了许多以特种纤连蛋白的CS-1区域(VLA-4结合域)的氨基酸序列为基础的重叠肽。("在纤连蛋白的选择性剪接型III连接片段域中主细胞型特异性粘着位点的最小必需序列(CS1)为亮氨酸-天冬氨酸-缬氨酸"J. Biol. Chem., 266 (23). 第15075-79页(1991))。它们鉴定了一8-氨基酸肽, Glu-Ile-Leu-Asp-Val-Pro-Ser-Thr, 以及两个较小的重叠五肽, Glu-Ile-Leu-Asp-Val和Leu-Asp-Val-Pro-Ser, 它们具有抗FN-依赖性细胞粘着的抑制活性。这些结果暗示, 三肽Leu-Asp-Val是细胞粘着活性的最小序列。后来证实, Leu-Asp-Val仅结合表达VLA-4活性形式的淋巴细胞, 因此使人们不相信能在体内能利用这种肽(E. A. Wayner等人, "在纤连蛋白的V区域中LDV序列的造血细胞的激活依赖性识别", J. Cell. Biol., 116(2), 第489-497页(1992))。但是, 含有LDV序列的某些较大肽后来显示出在体内有活性(T. A. Ferguson等人, "两个整联蛋白结合肽使体内的T-细胞介导免疫反应无效", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 第8072-76页(1991);和S. M. Wahl等人, "合成纤连蛋白肽通过中断白细胞粘着和募集来抑制大鼠关节炎", J. Clin. Invest., 94, 第655-62页(1994))。还描述了能够抑制VLA-4和VLA-5粘着到FN上的环五肽。(参见例如, D.M. Nowlin等人"新型环五肽抑制 $\alpha 4\beta 1$ 和 $\alpha 5\beta 1$ 整联蛋白介导的细胞粘着", J. Biol. Chem., 268(27), 第20352-59页(1993);以及PCT申请PCT/US91/04862)。该五肽以来自己知为几种胞外基质蛋白质的识别位点中的常规主题的FN的三肽序列Arg-Gly-Asp为基础。

例如在未决美国专利申请08/376372和W098/04913(在此引入作为参考)中已报道了VLA-4抑制剂的其它例子。USSN 376372描述了具有细胞粘着

抑制活性的含 β -氨基酸的线性肽基化合物。国际专利申请94/15958和W092/00995(特别引入作为参考)描述了具有细胞粘着调节活性的环状肽和肽模拟化合物。国际专利申请W093/08823和W092/08464(本文特别引入作为参考)含有胍基、脲基和硫脲基的细胞粘着调节化合物。美国专利US5260277描述了胍基细胞粘着调节化合物,将其特别引入本文。

尽管有这些优点,但是还需要具有提高的药动学和药效性如口服生物可利用率和有效作用时间的低分子量VLA-4依赖性细胞粘着特异性抑制剂。这些化合物将提供对治疗、改变、预防或抑制通过细胞粘着和VLA-4结合所介导的各种病状有用的药物。

本发明的化合物为VLA-4整联蛋白抑制剂,因此阻断VLA-4结合到其各种配体上,如VCAM-1和纤连蛋白区域。因此这些化合物在抑制包括细胞激活、移动、繁殖和分化的细胞粘着过程中是有用的。这些化合物对抑制、预防和减少VLA-4介导的细胞粘着和与该粘着有关的病状如炎症和免疫反应,包括例如多发性硬化、哮喘、过敏性鼻炎、过敏性结膜炎、炎性肺病、类风湿性关节炎、脓毒性关节炎、I型糖尿病、器官移植、再狭窄、自体骨髓移植、病毒感染的炎性后遗症、心肌炎、包括溃疡性结膜炎和克罗恩氏病的炎性肠病、某些类型的毒性和免疫基肾炎、接触性皮肤过敏症、牛皮癣、瘤转移、多发性骨髓瘤和动脉粥样硬化是有用的。本发明的化合物可以单独使用也可以与抑制、变更、预防或减少细胞粘着的其它治疗或预防性试剂混合使用。本发明还提供了含这些VLA-4介导的细胞粘着抑制剂的药物制剂和使用本发明的化合物和组合物抑制细胞粘着的方法。

本发明的另一方面涉及本发明的细胞粘着抑制化合物用于制备预防、抑制或减少细胞粘着的药物的用途及其用于制备预防、抑制或减少炎症药物的用途;本发明还涉及细胞粘着抑制化合物用于制备治疗哺乳动物中哮喘、过敏性鼻炎、多发性硬化、动脉粥样硬化、炎性肠病或多发性骨髓瘤的药物的用途;本发明进一步涉及细胞粘着抑制化合物用于制备治疗多发性硬化、炎性肠病以及治疗、预防或改善哮喘症状的药物的用途。

附图简述

图1报道了绵羊用oMePUPA-V处理后的呼吸道反应性。绵羊,天然对猪蛔虫过敏,在以指定剂量给药oMePUPA-V气溶胶或等量载体之后2小时用猪蛔虫过敏原气溶胶攻击。在指定时间测定肺力学并被报道为基于研究

前基线值(左方格)的特异性呼吸道阻力的变化。在开始研究之前和过敏原攻击24小时之后(右方格)测定吸入的氨甲酰胆碱的呼吸道阻力。以攻击前和攻击后的PC₄₀₀(阻力增加400%所需的氨甲酰胆碱的量)值的比报道呼吸道反应性。

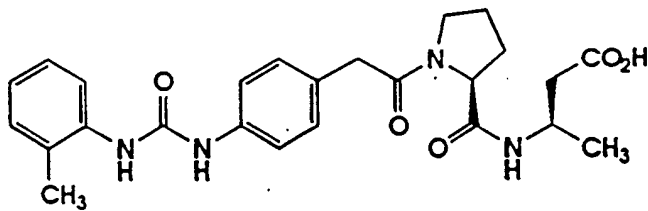
图2:绵羊,天性对猪蛔虫过敏,以指定剂量给药oMePUPA-V气溶胶或猪蛔虫气溶胶攻击。测定气溶胶攻击之后的呼吸道阻力的变化并将攻击后峰特异性肺阻力(cm H₂O/sec)与基线值比较。与对照组重复比较的Dunnett试验之后,与PBS对照比较,方差单向分析,*=p<0.05。统计显示,与PBS对照组比较的峰特异性肺阻力大大增加。

图3:绵羊,天性对猪蛔虫过敏,在给药oMePUPA-V气溶胶(0.03mg)或等量载体(乙醇:生理盐水,1:2,上方格;Tris:生理盐水,1:499,下方格)第4天之后用猪蛔虫过敏原气溶胶攻击24小时。在指定时间测定肺力学并被报道为基于研究前基线值(左方格)的特异性呼吸道阻力的变化。在开始研究之前和过敏原攻击24小时之后(右方格)测定吸入的氨甲酰胆碱的呼吸道阻力。以攻击前和攻击后的PC₄₀₀(阻力增加400%所需的氨甲酰胆碱的量)值的比报道呼吸道反应性。

图4: Balb/c小鼠,先前对DNFB过敏,通过对左耳背面施用DNFB并向右耳背面施用载体攻击。24小时后用微米计测定耳朵的厚度。在用DNFB攻击之后以给定剂量给药oMePUPA-V4小时,以最大有效肠道剂量供给阳性对照(+CTRL)化合物。值为8只动物的平均值±标准误差。上方格显示了耳朵的绝对膨胀。下方格显示了与载体(VEH)对照相比耳朵膨胀抑制的百分比。

图5: 在体外通过FACS分析测定 $\alpha 4\beta 1$ 拮抗物的LIBS诱导。在37℃下用仅含2mM MgCl₂(Mg⁺²-TBS)的TRIS缓冲盐水或试验化合物的系列稀释液将Jurkat细胞(2 × 10⁵/孔)预培养20分钟。将这些样品转移到冰浴中并以10 μ g/ml的最终浓度补充LIBS抗体9EG7。将这些细胞用Mg⁺²-TBS冲洗2次并将其再悬浮于在Mg⁺²-TBS中的1:200稀释的FITC共轭羊抗大鼠IgG中。通过FACS分析(Becton Dickinson FACScan)测定平均荧光强度(MFI)。上部图显示了用带有1mM Mn⁺²缓冲液的oMePUPA-V诱导的LIBS。下部图显示了与2mM Mg⁺²缓冲液相比的oMePUPA-V的LIBS诱导。

本发明提供了能够通过抑制配体结合到受体上抑制VLA-4介导的细胞粘着的化合物。优选的化合物是(R)-N-[[4-[[[(2-甲基苯基氨基)羰基]氨基]苯基]乙酰基]-L-脯氨酸基-3-甲基)- β -丙氨酸,本文称之为“oMePUPA-V”,如下式I所示:



oMePUPA-V

并且本文称之为“oMePUPA-V”。本发明还包含 oMePUPA-V 的药物上可接受的衍生物、盐和酯。

式 I 的化合物含有一个或多个不对称中心因此可以外消旋混合物、简单的对映体、非对映体混合物和单个非对映体形式存在。本发明包括式 I 化合物的所有这些异构形式。

本发明还包含药物上可接受的式 I 盐。术语“药物上可接受的盐”是指由药物上可接受的非毒性碱或酸包括无机或有机碱和无机或有机酸制备的盐。由无机碱获得的盐包括铝、铵、钙、铜、铁、亚铁、锂、镁、锰盐、亚锰、钾、钠、锌等。特别优选铵、钙、镁、钾和钠盐。由药物上可接受的有机非毒性碱获得的盐包括伯、仲和叔胺盐，取代胺包括天然存在的取代胺、环胺和碱性离子交换树脂，如精氨酸、甜菜碱、咖啡因、胆碱、N, N'-二苄基乙二胺、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、还原葡糖胺、葡糖胺、组氨酸、羟基胺、异丙胺、赖氨酸、甲葡糖胺、吗啉、哌嗪、哌啶、聚胺树脂、普鲁卡因、嘌呤、可可碱、三乙胺、三甲胺、三丙胺、氨丁三醇等。

当本发明的化合物为碱性时，盐可以由包括无机和有机酸的药物上可接受的非毒性酸制备。这些酸包括乙酸、苯磺酸、苯甲酸、樟脑磺酸、柠檬酸、乙磺酸、富马酸、葡萄糖酸、谷氨酸、氢溴酸、盐酸、羟乙磺酸、乳酸、马来酸、苹果酸、杏仁酸、甲磺酸、粘酸、硝酸、扑酸、泛酸、磷酸、琥珀酸、硫酸、酒石酸、对甲苯磺酸等。特别优选柠檬酸、氢溴酸、马来酸、磷酸、硫酸和酒石酸。

此外，本发明包含药物前体，特别是酯前体药物，其中将 (R)-N-[[4-[[2-甲基苯基氨基]羰基]氨基]苯基]乙酰基]-L-脯氨酸-3-甲基)-β-丙氨酸的羧基用任意醇酯化。优选的醇为甲醇、乙醇、丙醇、丁醇、或直链或支链 C1-10 烷基醇。

式 I 化合物对抗 VLA-4 作用的能力使它们可以用于预防、治疗或逆转由 VLA-4 结合到其配体上诱导的症状、紊乱或疾病。因此这些对抗剂将抑制包括细胞激活、移动、繁殖和分化的细胞粘着过程。因此，本发明的另一方面提供了治疗、预防、减轻或抑制 VLA-4 路径所介导的疾病或紊乱。这些疾病和紊乱包括例如哮喘、多发性硬化、过敏性鼻炎、过敏性结膜炎、炎性肺病、类风湿性关节炎、多发性骨髓瘤、脓毒性关节炎、I 型糖尿病、器官移植排斥、炎性肠病和其它。

可以使用任意常规技术合成本发明的化合物，在本发明中列举了几种这些技术。优选地，由可容易获得的原料如 α -氨基酸及其功能性等价物化学合成这些化合物。合成这些化合物的模块和汇集法也是优选的。在汇集法中，例如在合成的最后阶段，大段最终产物汇聚在一起，而不是通过将小片段增量加成到成长的分子链上。

本发明的化合物还可以通过附加增强选择性生物性能的适宜功能团修饰。这些修饰法在本领域中是已知的并包括增加进入给定生物体系（例如血液、淋巴系统、中枢神经系统）的生物穿透性、增加口服利用度、增加通过注射给药的溶解性、改变新陈代谢和改变排泄速度的那些。这些修饰的例子包括，但不限于，用聚乙二醇的酯化、用新戊酸酯或脂肪酸取代物衍生、转化成氨基甲酸酯、芳环羟基化和芳环中杂原子取代。

本申请全文中所用的术语“患者”是指哺乳动物，包括人。并且术语“细胞”是指任意细胞，优选哺乳动物细胞，包括人细胞。

一旦合成，可以使用体外和体内试验测定本发明化合物的活性和 VLA-4 特异性。

例如，这些化合物的细胞粘着抑制活性可以通过测定阻断 VLA-4-表达细胞结合到纤连蛋白-或 CS1-涂布平板上所需的抑制剂的浓度来测定。在这种测定中，微量滴定孔用纤连蛋白（含有 CS-1 序列）或者用 CS-1 涂布。如果使用 CS-1，它必须共轭到载体蛋白质如牛血清白蛋白上，以便结合到这些孔上。一旦将这些孔涂布，然后将不同浓度的试验化合物与适宜标记的 VLA-4-表达细胞一起添加。或者，可以首先添加试验化合物，用所涂布的孔培养，然后加入细胞。使这些细胞在这些孔中培养至少 30 分钟。培养之后，将这些孔倒空并冲洗。通过定量每种不同浓度的试验

化合物和不含试验化合物的对照附着在平板上的荧光性或放射性测定结合抑制。

可以用于本实验的 VLA-4-表达细胞包括 Ramos 细胞、Jurkat 细胞、A375 黑瘤细胞和人周围血液淋巴细胞 (PBL)。可以任意适宜方式, 例如荧光或放射性标记, 标记本测定中所用的细胞。

还可以使用直接结合测定定量本发明化合物的抑制活性。在该测定中, 将含有附着在 IgG1 分子 (“VCAM 2D-IgG”) 的铰链区上的首先的两个免疫球蛋白域的 VCAM-IgG 融合蛋白共轭到标志酶如碱性磷酸酯酶 (“AP”) 上。该 VCAM-IgG 融合的合成描述在 PCT 申请 W090/13300 中, 将其加入本文作为参考。该熔融与标志酶的共轭是通过本领域中众所周知的交联法完成的。

然后将该 VCAM-IgG 酶共轭物放入多孔过滤板的孔中, 例如在微孔多级筛分测定体系 (Millipore Corp., Bedford, MA) 中所含的。然后向这些孔中加入不同浓度的试验抑制化合物, 之后加入 VLA-4-表达细胞。将这些细胞、化合物和 VCAM-IgG 酶共轭物混合在一起并在室温下培养。

培养之后, 将这些孔抽空, 留下细胞和任意附着的 VCAM。通过加入与 VCAM-IgG 共轭的酶的适宜比色底物并测定反应产物的量来确定附着的 VCAM 的量。反应产物降低说明结合抑制活性增加。下面描述了一些测定方案:

为了评价本发明化合物的 VLA-4 抑制特异性, 测定整联蛋白即 $\beta 2$ 和 $\beta 3$ 以及其它 $\beta 1$ 整联蛋白如 VLA-5、VLA-6 和 $\alpha 4\beta 7$ 的其它主要基团。这些测定可以与上述的粘着抑制和直接结合测定相似, 取代适宜的整联蛋白表达细胞和相应配体。例如, 多形核细胞 (PMN) 在其表面上表达 $\beta 2$ 整联蛋白并结合到 ICAM 上。 $\beta 3$ 整联蛋白涉及血小板聚集作用并且可以在标准血小板聚集测定中测定抑制性。VLA-5 特异性地结合到 Arg-Gly-Asp 序列上, 而 VLA-6 结合到昆布氨酸上。最近发现 $\alpha 4\beta 7$ 为 VLA-4 同系物, 它也结合纤连蛋白和 VCAM。在利用上述 VCAM-IgG-酶标志共轭物和表达 $\alpha 4\beta 7$ 的细胞系, 但不是 VLA-4, 如 RPMI-8866 或 JY 细胞的结合测定中测定 $\alpha 4\beta 7$ 的特异性。

一旦鉴定 VLA-4 特异性抑制剂, 还可以进一步将它们体内测定中鉴

定。一种这样的测定试验在动物中的接触过敏性抑制，例如 P. L. Chisholm 等人描述的“整联蛋白 α -4 亚单元的单克隆抗体抑制鼠科接触过敏性反应”，*Eur. J. Immunol.*, 23, 第 682-688 页 (1993) 以及“免疫学中的目前方案”中，J. E. Coligan 等人编辑，John Wiley & Sons, New York, 1, 第 4.2.1-4.2.5 页 (1991)，将它们加入本文作为参考。在该测定中，将动物的皮肤与刺激物如二硝基氟苯接触，然后通过轻微的物理刺激如用尖端轻轻擦涂皮肤使其过敏。恢复一段时间之后，用相同步骤将动物再致敏。过敏几天后，将动物的一只耳朵与该化学刺激物接触，同时另一只耳朵用没有刺激物的对照溶液处理。将这些耳朵处理之后不久，通过皮下注射给予这些动物不同剂量的 VLA-4 抑制剂。通过测定处理和未处理的耳朵中动物的耳朵膨胀反应评价与细胞粘着相关的炎症的体内抑制。使用测径规或其它适宜仪器测定耳朵厚度来测定膨胀。以这种方式，人们可以鉴定最适宜抑制炎症的本发明的抑制剂。

用来检测本发明抑制剂的另一体内测定是绵羊哮喘测定。基本上如 W. M. Abraham 等人在“ α 4-整联蛋白介导绵羊中抗原诱导的 Late Bronchial 反应和延长的呼吸道过反应性”，*J. Clin. Invest.*, 93, 第 776-87 页 (1994) 中所述的进行该测定，将其加入本文作为参考。该测定测定了过敏绵羊中蛔虫属抗原诱导的后期呼吸道反应和呼吸道过敏反应性的抑制。还可以在血小板聚集测定中检验本发明化合物。

本发明 VLA-4 抑制剂出人意料地显示出有益的活性和选择性。通常，这些化合物对 VLA-4 (>1000 倍的 α 4 β 7 和 α 5 β 1) 具有选择性，在常规 PanLabs 和非 GLP Ames 测定中为阴性，在标准辅助药理试验中洁净并在按照人一天一次预定使用量 1mg/天或更少在绵羊模型中有效。

与结构上相关的 VLA-4 抑制剂相比，本发明的化合物具有出人意料优良的效能。例如，蛔虫属过敏的绵羊用雾化药剂以 0.1mg/kg 一天一次处理 4 天，然后用抗原攻击 24 小时，最后剂量之后，预先试验的化合物基本上使早期反应减弱并阻止了后期支气管缩小和非特异性过敏反应性的发展。假设在人中生物等值，那么在 70kg 人中将需要总剂量 7mg。而且，通过气管内管以估计为人口服吸入器装置典型达到的 2 倍的沉积速度向绵羊给药。此外，可以将赋形剂加入最后固体制剂中，以使装置填充和

药物释放最佳。这些因素建议，在人体中超过技术限制 1-5mg 的 14mg 或更多的可能剂量需要可以通过干粉吸入器 (DPI) 装置准确释放。然而所需剂量可以通过该 DPI 的多次使用释放，这在哮喘市场上将呈现出竞争性缺陷，通常吸入的类固醇计量为 0.2-1.0mg。

在抗原攻击之前当以 0.003mg/kg 的最小剂量以单雾化剂量给药 2 小时，oMePUPA-V 使早期反应减弱，阻止了后期支气管缩小并使过反应性正常化。而且，以每天剂量 0.001mg/kg 用抗原攻击 4 天，最后剂量 24 小时之后，得到最大反应。因此，与市场上最好的吸入类固醇的剂量水平相比，oMePUPA-V 比以前的化合物的效能高出 30-100 倍。oMePUPA-V 及其末段合成中间物为高度结晶。(参见图 1，表 1)

此外，与已知 VLA-4 抑制剂化合物相比，oMePUPA-V 具有改善的新陈代谢轮廓。例如，给药气溶胶之后，本发明的化合物很快转变成低活性代谢产物，它是从支气管肺泡流体 (BALF) 中回收的主要产物，并且也是体循环中观察到的主要产物，在体循环中它比母化合物呈现出更长的血液半衰期。然而向低活性化合物的快速代谢转化是实现减少全身接触的有用的策略，代谢成几乎没有或本质上没有活性的副产物的化合物在进展上呈现出更少的复杂性，并且从后面角度来看是优选的。

由于 oMePUPA-V 的潜在蛋白水解产物在 VLA-4 结合测定中无活性，因此蛋白水解将产生无活性产物。尽管如此，体外代谢研究和大鼠、狗和绵羊中的体内 PK 研究显示 oMePUPA-V 在蛋白水解上是稳定的。

表 1: 与以前已知的抑制剂相比的 oMePUPA-V 的性能

性能	以前的化合物	oMePUPA-V
抗 VLA-4-VCAM-Ig 结合的 IC50	1.5nM	2.7nM
抗 α 4 β 7-VCAM-Ig 结合的 IC50	2.7 μ M	>100 μ M
抗 α 5 β 1-FN 粘着的 IC50	>100 μ M	>100 μ M
绵羊模型中最小有效剂量		
-单剂量	0.1mg/kg	0.003mg/kg
-重复剂量	0.03-0.1mg/kg	0.001mg/kg
结晶性	无	有
体外药物筛分 85 试验	1 周击中	干净

ACE 活性	ACE 底物	干净
葡萄糖醛酸化	低水平	预定的
Ames 试验(诱变性)	干净	干净
辅助药理学(副作用)	干净	
全身接触, 10mg 气溶胶剂量(绵羊)	40ng/ml × hr	完成
代谢轮廓	活性新陈代谢产 物	
口服利用度	<1%	<1%
整体稳定性(40℃, 75% RH)	“不稳定”	稳定>4 周
配制稳定性(40℃)	0.2%降解/天	稳定>4 周

可以将本发明的化合物配制成可以经口、非肠道、吸入法喷射、局部、直肠、鼻、口腔、阴道、或通过植入的储器给药的药物组合物。本文中所用的术语“非肠道”包括皮下、静脉内、肌内、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘内、肝内、病灶内和颅内注射或输注技术。

本发明的药物组合物含有本发明任意的化合物或其药物上可接受的衍生物和任意药物上可接受的载体。本文中所用的术语“载体”包括可接受的佐剂和载体。可以用于本发明药物组合物的药物上可接受的载体包括,但不限于,离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白如人血清蛋白、缓冲物如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸部分甘油酯混合物、水、盐或电解质如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢二钾、氯化钠、锌盐、胶态的二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯稀基吡咯烷酮、纤维素基物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯-聚氧丙烯-嵌段聚合物、聚乙二醇和羊毛脂。

根据本发明,药物组合物可以为可无菌注射制剂的形式,例如可无菌注射的含水或含油悬浮液形式。可以使用适宜的分散或润湿剂和悬浮剂根据本领域中已知的技术配制该悬浮液。可无菌注射的该制剂还可以为非毒性非肠道可接受的稀释剂或溶剂中的可无菌注射的溶液或悬浮液,例如在1,3-丁二醇中的溶液。可以接受的载体和可以使用的溶剂为水、林格溶液和等渗氯化钠溶液。此外,无菌固定油常用作溶剂或悬浮介质。为此目的,可以使用包括合成的单或二甘油酯的任意混合不挥发油。脂

肪酸，例如油酸和其甘油酯衍生物以及作为天然药物上可接受的油，如橄榄油或蓖麻子油，特别是它们的聚氧乙基化变体在制备可注射物中是有用的。这些油溶液或悬浮液还可以含有长链醇稀释剂或分散剂。

本发明的药物组合物可以任意口服可接受的剂量形式口服给药，这些形式包括，但不限于，胶囊、片剂、含水悬浮液或溶液。在为口服用的片剂时，常用的载体包括乳糖和玉米淀粉。典型地还加入如硬脂酸镁的润滑剂。对于以胶囊形式口服而言，有用的稀释剂包括乳糖和干玉米淀粉。当口服需要含水悬浮液时，将该活性组分与乳化和悬浮试剂混合，如果需要的话，还可以添加某些甜味剂、调味剂或着色剂。

另外，本发明的药物组合物可以直肠投药的栓剂形式给药。可以通过将该试剂与适宜的在室温下为固体但在直肠温度下为液体并因此溶于直肠中释放该药物的无刺激赋形剂混合来制备它们。这些物质包括可可脂、蜂蜡和聚乙二醇。

还可以经局部给药本发明的药物组合物，特别是当所处理的靶子包括通过局部涂敷可以容易地达到的区域或器官，包括例如眼、皮肤或下面肠道的疾病。对于每种这些区域或器官，能够容易地制备适宜的局部制剂。

可以直肠栓剂(参见上面的)或适宜的灌肠剂实现下面肠道的局部施加。还可以使用局部透皮贴剂。

为了局部施加，可以将药物组合物配制成含悬浮或溶解于一种或多种载体中的活性组分的适宜软膏。局部给药本发明组合物的载体包括，但不限于，矿物油、液体凡士林、白色凡士林、丙二醇、聚氧乙烯、聚氧丙烯化合物、乳化石蜡和水。或者，可以将该药物组合物配制成含有悬浮或溶于一种或多种药物上可接受的载体中的该活性组分的适宜洗液或乳膏。适宜的载体包括，但不限于，矿物油、脱水山梨糖醇单硬脂酸酯、吐温 60、鲸蜡基酯石蜡、鲸蜡醇、2-辛基十二烷醇、苯甲醇和水。

对眼用而言，可以将该药物组合物配制成在等渗、pH 经过调整的无菌生理盐水中的微粒化悬浮液，或者优选在有或没有例如氯化苯甲羟胺的等渗、pH 经过调整的无菌生理盐水中的溶液。或者，对眼用而言，可以将该药物组合物配制在例如凡士林的软膏中。

还可以通过鼻气溶胶或通过使用雾化器、干粉吸入器或计量吸入器吸入给药本发明的药物组合物。根据药物制剂领域中众所周知的技术制备这些组合物并可使用苯甲醇或其它适宜的防腐剂、提高生物利用度的吸收促进剂和/或其它传统增溶或分散剂将它们制成生理盐水的溶液。此外，本发明的组合物可以包括任意药物上可接受的载体，例如用于干粉制剂的乳糖。

可以与载体材料混合生产单剂量形式的活性组分的量随所处理的宿主和给药的具体方式而变化。但是，应理解为，任意特定患者的具体剂量和处理机制将取决于很多因素，包括具体所用化合物的活性、年龄、体重、一般健康状况、性别、饮食、给药时间、排泄速度、药物组成和处理医师的判断和所处理的特定疾病的严重性。活性组分的量还可能取决于治疗或预防试剂，如果有的话，将其与该组分共同给药。

对预防、减轻或抑制细胞粘着有效的本发明组合物的剂量和给药速度将取决于很多因素，如抑制剂的性质、患者大小、处理的目标、待处理的病状的性质、所用的特定药物组合物和处理医师的判断。每天每 kg 体重约 0.001-约 100mg、优选约 0.01-约 50mg 并且更优选约 10mg 的该活性组分化合物的剂量水平是有用的。

就使用静脉内给药的组合物而言，适宜剂量范围为约 0.001mg-约 25mg/kg、更优选约 0.01mg-约 1mg/kg。

根据另一实施方式，含有本发明化合物的组合物还可以含有第二种试剂，它们选自皮质类固醇、支气管扩张药、平喘药、肥大细胞稳定剂、消炎药、抗风湿剂、免疫抑制剂、抗代谢物、免疫调制剂、治牛皮癣药和治疗糖尿病药。每种这些类的特定化合物可以选自下面适宜组标题所列的任意那些：“综合性药用化学品”英国牛津 Pergamon 出版社，第 970-986 页 (1990)，将其内容引入本文作为参考。在该组中还包括了如下化合物：茶叶碱、柳氮磺胺吡啶、对氨基水杨酸盐 (消炎药)；环孢菌素、FK-506 和雷帕霉素 (免疫抑制剂)；环磷酰胺和甲氨蝶呤 (抗代谢物)；类固醇 (吸入、口服或局部) 和干扰素 (免疫调制剂)。而且，可以将本发明的化合物与其它细胞粘着抑制剂一起给药。当与所述 VLA-4 抑制剂一起给药一种或多种其它试剂时，可以将这些活性组分配在一起，或者可

以结合给药。基本上可以同时或依次给药与本发明的 VLA-4 抑制剂结合的一种或多种活性试剂。根据所给予的试剂、所需结果和处理的患者及其条件，本领域技术人员可以容易地测定最适宜的给药。

根据其它实施方式，本发明提供了预防、抑制或减轻患者中与细胞粘着相关的炎症和与细胞粘着相关的免疫或自体免疫反应的方法。与 VLA-4-相关的细胞粘着在许多炎症、免疫和自体免疫疾病中起核心作用。因此，可以将通过本发明化合物的细胞粘着抑制剂用于治疗或预防炎症、免疫和自体免疫疾病的方法中。优选本发明方法治疗的疾病选自哮喘、关节炎、牛皮癣、移植排斥、多发性硬化、糖尿病和炎性肠病。

这些方法可以在单疗法中使用本发明的化合物或者与消炎药或免疫抑制剂结合使用。这些结合疗法包括以单剂量形式给药试剂或以复合剂量形式同时或不同时间给药。

实施例

实施例 1: oMePUPA-V 的制备

oMePUPA-V, (R)-*N*-[[4-[[[(2-甲基苯基氨基)羰基]氨基]苯基]乙酰基]-L-脯氨酸-3-甲基)- β -丙氨酸, 是在汇集合成中由商购的琥珀酰亚氨基 Boc-(L)-脯氨酸 (Boc-Pro-OSu; Bachem) 和 (R)-苯甲基-3-氨基丁酸半硫酸盐 (Celgene Corp.) 制备的。原料在有 Et₃N 下在 CH₂Cl₂ 中偶合, 然后用二噁烷中的 4N HCl 水解 Boc 基团, 从 CH₂Cl₂/Et₃O 中重结晶, 得到 HCl 盐。将该 HCl 盐与用相应酸 MPUPA-OH (Ricerca, Inc.) 制备的琥珀酰亚氨基-2-[4-[2-(甲基苯基氨基羰基)]氨基苯基]乙酸酯(盐) (MPUPA-OSu) 偶合, 提供结晶 oMePUPA-V-苯甲酯, 将其在 THF/H₂O (9:1) 中催化氢化 (10%Pd/C) 得到 oMePUPA-V。在从 20%含水丙酮中重结晶之后, 获得的最终产物为白色固体。

理化特性汇总

化学名称: (R)-*N*-[[4-[[[(2-甲基苯基氨基)羰基]氨基]苯基]乙酰基]-L-脯氨酸-3-甲基)- β -丙氨酸

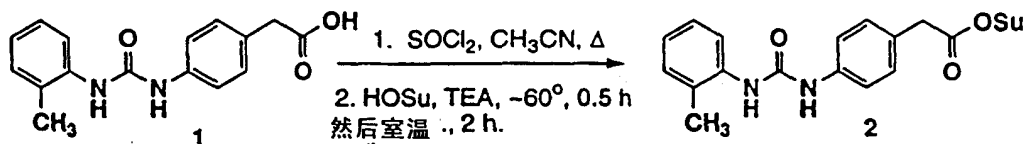
分子式: C₂₅H₃₀N₄O₅

分子量: 466.53

外观: 洁净白色粉末
 熔点: 153.6-154.4℃

方案 1:

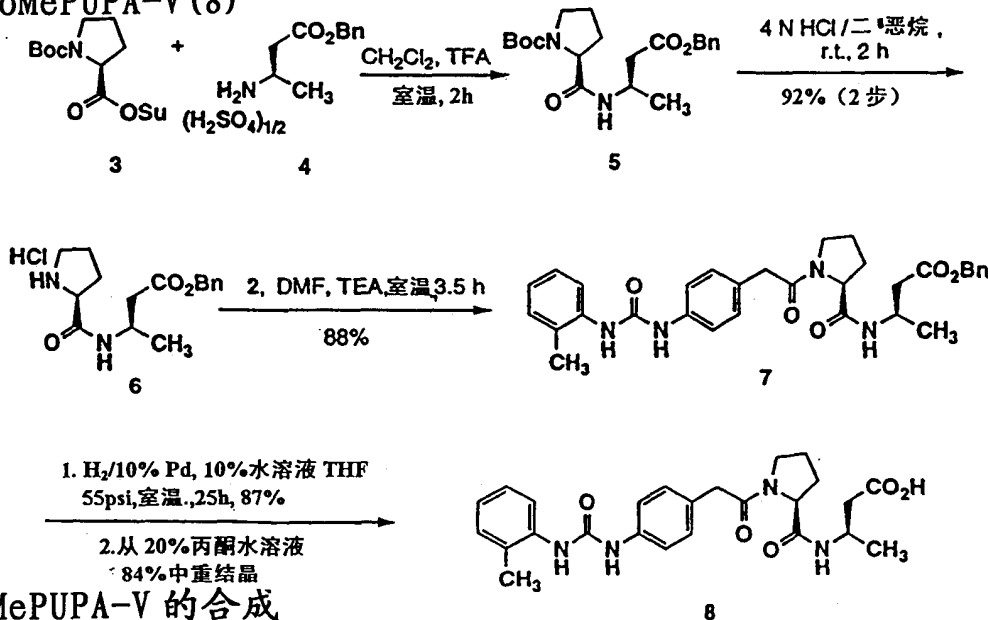
由 MPUPA-OH (1) 制备 MPUPA-OSu (2)



方案 2:

由 Boc-(L)-Pro-OSu (3) 和 苯甲基-(R)-3-氨基丁酸半硫酸酯(盐) (4)

合成 oMePUPA-V (8)



oMePUPA-V 的合成

用于制备 oMePUPA-V 的合成化学描述在方案 1 和 2 中。由商业源和合同厂商获得这些原料: 由 Ricerca, Inc., Painesville, OH 大量制备 (1); 从 Bachem Bioscience, Inc., King of Prussia, PA 获得 (3) 并从 Celgene Corp., Warren, NJ 获得 (4)。

oMePUPA-V 的制备:

常规化学方法 (¹H NMR, ¹³C NMR, MS, IR & HPLC)

在 Bruker AC 300 或 Varian 500 或 Varian 600 仪器上进行 ¹H NMR 测定, 或者在 DMSO-d₆ 中并参照 DMSO-d₆ (d 2.49 ppm) 或者在 CDCl₃ 中并参照残余 CHCl₃ (d 7.24 ppm) 测定样品。

在Varian 500或Varian 600仪器上进行¹³C NMR测定，或者在DMSO-d₆中并参照DMSO-d₆ (d 40.5 ppm)或者在CDCl₃中并参照CDCl₃ (d 77.0 ppm)测定样品。

在带有HP 1500型自动取样器的Fisons VG Platform LC-MS-DS质谱仪体系上进行质谱分析，并使用Fisons VG MassLynx质谱仪工作站处理数据。在VG Analytical ZAB 2SE高场质谱仪上使用快速原子轰击以M型扫描(PA)进行该HRMS工作，参照SOP# MS-002, MS-006, MS-012和MS-023。使用铯离子枪产生所需质谱的离子，它是使用PDP-11-250J数据体系记录的。

在Perkin Elmer 1600系列FTIR上进行IR谱测定。

分析HPLC色谱法按如下进行：

1. 使用带PB Nelson 3020积分仪的Perkin Elmer 785A UV检测器(固定在214 nm)和应用生物体系783A UV检测器(固定在254 nm)的Perkin Elmer 200系列 HPLC自动取样器体系获得使用程序1 (Equilibrate @ 20% B, 注射样品, 20% B (1分钟), 20%-70% B (24分钟), 70% - 100% B (17分钟))的色谱图。仅报道了面积百分比值。

2. 使用带783A波长UV检测器的应用生物体系400溶剂释放体系和Waters717自动取样器获得使用程序8 (Equilibrate @ 15% B, 注射样品, 15% B (1分钟), 15%-40% B (25分钟), 40% B (10分钟))的色谱图。使用HP 3396系列II积分仪处理该数据。用以下参数调整积分仪: 衰减 =8, 阈值= 5, 注射面积=10000, 峰宽=0.04, 记录纸速=0.2。使用Vydac C-18柱(5 μm孔径, 4.5 mm × 25cm, 测试# 218TP54)进行所有HPLC工作。

溶剂A (水+0.1% TFA)

溶剂B (乙腈+0.1% TFA)

流速=1 mL/分钟

梯度程序如下：

程序1: Equilibrate @ 20% B, 注射样品, 20% B (2分钟), 20% - 70% B (25分钟), 100% B (5分钟)。

[4-[[[(2-甲基苯基)氨基]羰基]氨基]苯基]乙酸的理化数据(1,

MPUPA-OH; 由Ricerca Inc.生产的材料):

mp 210-215°C (分解);

IR (KBr) 3295 (宽带), 3034 (宽带), 1107, 1637, 1603, 1551, 1516, 1457, 1414.1302, 1241, 1189, 1118 cm^{-1} ;

^1H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) d 12.28 (bs, 1 H), 9.0 (s, 1 H), 7.91 (s, 1 H), 7.88 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.43 (d, $J=8.4$ Hz, 2 H), 7.19 (d, $J = 8.4$ Hz, 2 H), 7.16 (m, 2 H), 6.94 (dd, $J=7.8, 8.4$ Hz, 1 H), 3.51 (s, 2 H), 2.25 (s, 3 H);

^{13}C NMR (150 MHz, DMSO-d_6) d 173.0 (C), 152.7 (C), 138.5 (C), 137.5 (C), 130.2 (CH), 129.8 (CH), 128.3 (CH), 127.5 (CH), 126.2 (CH), 122.7 (CH), 121.0 (CH), 118.1 (CH), 40.1 (CH_2), 179 (CH_3);

MS (EI) m/z 285 ($\text{M}+1$)⁺, 193, 152, 134, 132, 109, 108, 106, 93, 91, 57;

$\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$ 的元素分析, 理论值: C, 67.59; H, 5.67; N, 9.85; 实测值: C, 67.60; H, 5.70; N, 10.01。

琥珀酰亚氨基[4-[[[(2-甲基苯基)氨基]羰基]氨基]苯基]乙酸酯的制备 (2, MPUPA-OSu)

在10分钟内边剧烈搅拌边向在乙腈(600 mL)中的o-甲基苯脲苯乙酸(1, MPUPA-OH; 150g, 0.501 mol; 来自Ricerca, Inc.)回流悬浮液中加入亚硫酸氯(41 mL, 0.558mol)。离析出大量HCl。继续搅拌1.5小时并将反应混合物冷却到室温。该反应混合物转变成粉红色浆液, 向其中加入一部分固体N-羟基琥珀酰亚胺(HOSu; 75.5g, 0.636 mol)。在30分钟内向该混合物中滴加三乙胺(174 mL), 同时用水浴将反应混合物的温度保持在60°C以下。继续搅拌2小时, 然后向该反应混合物中加入蒸馏水(500mL)。过滤出固体并用2L蒸馏水和乙腈(2 × 200mL)冲洗, 空气干燥, 在真空(-0.1 mmHg)下在 P_2O_5 中进一步干燥, 得到淡棕色粉末粗产物(175 g, 97%产率)。粗产物(174 g)从乙腈(3.5 L)中重结晶并用活性炭(10 g)脱色, 得到129 g白色MPUPA-OSu粉末(2; 68%产率)(纯度>99%)。

mp 211.2-211.8°C;

IR(KBr): 3905-3203(宽带), 1816, 1783, 1654, 1368, 1304, 1244,

1116, 1021 cm^{-1} ;

^1H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): d 9.04 (s, 1 H), 7.92 (s, 1 H), 7.82 (d, 1 H), 7.44 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H), 7.24 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H), 7.15 (m, 2 H), 6.93 (dd, $J = 7.4, 7.3$ Hz, 1 H), 4.02 (s, 2 H), 2.80 (s, 4 H), 2.23 (s, 3 H);

MS (EI, ES^+) m/z 382 $[(M+1)^+]$, 239, 108, 106.

琥珀酰亚氨基 Boc-(L)-脯氨酸 (Boc-Pro-OSu, 3; 从 Bachem Bioscience 获得的材料) 的理化数据:

mp 132 – 136 $^{\circ}\text{C}$;

IR (KBr) 3456, 2940, 1731, 1619, 1561, 1541, 1497, 1454, 1395, 1337, 1259, 1202, 1118, 1060 cm^{-1} ;

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) d 4.51 (dd, $J=3.8, 8.7$ Hz, 1H), 3.56 (m, 1 H), 3.44 (m, 1 H), 2.80 (s, 4H), 2.32 (m, 1 H), 2.27 (rn, 1 H), 1.94 (m, 2 H), 1.43 (s, 9 H);

MS (EI) m/z 335 $(M+N_2)^+$, 279, 213, 138, 114, 86;

HPLC 97.1%.

苯甲基-(R)-3-氨基丁酸半硫酸酯 (4; 从 Celgene Corp. 获得的材料) 的理化数据:

mp 249.4–249.8 $^{\circ}\text{C}$;

IR (KBr) 3515, 3383, 2989, 2945, 2880, 1821, 1788, 1744, 1701, 1476, 1454, 1421, 1394, 1368, 1260, 1241, 1202, 1159, 1077 cm^{-1} ;

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) d 7.85 (bs, 2 H), 7.26 (s, 5 H), 5.06 (ABq, $J=12.3$ Hz, 2 H), 4.35 (m, 2H), 3.73 (m, 1 H), 2.92 (dd, $J=6.4, 17.1$ Hz, 1 H), 2.66 (dd, $J=6.4, 17.0$ Hz, 1H), 1.35 (d, $J = 6.5$ Hz, 3 H);

MS (EI) m/z 195 $(M+3)^+$, 194 $(M+2)^+$, 106, 92, 91;

HPLC 99.0%.

N-(叔丁氧羰基)-L-脯氨酸-3-甲基-(R)- β -丙氨酸苯甲基酯 (5) 的制备

向 CH_2Cl_2 (200 mL) 中的苯甲基-R-3-氨基丁酸半硫酸酯(盐) (4; 66.7 g,

213mmol)的充分搅拌悬浮液中加入Boc-(L)-Pro-OSu (3; 53.9g, 222mmol)和Et₃N (95mL, 681mmol)。在室温下将该反应混合物搅拌2小时。将该反应混合物在EtOAc (1.5 L)和H₂O (250 mL)之间分开,有机层用10%柠檬酸(3 x 250mL)、H₂O(250mL)、饱和碳酸氢钠(250mL)、H₂O (250mL)和生理盐水(3 x 250mL)洗涤,经Na₂SO₄干燥并在旋转蒸发器(40℃; $\bar{80}$ mmHg)上经第一次浓缩,然后在高真空(室温, 16小时; 0.2 mmHg)下浓缩,得到粘性油中间体5(88.1g),它含残余EtOAc和CH₂Cl₂(通过NMR)且其纯度>98%(HPLC)。该材料不用进一步提纯下就可用于下面反应。

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) d 7.30 (m, 5 H), 6.44 (bs, 1 H), 5.10 (dd, J=12.3, 14.1 Hz, 2 H), 4.32 (m, 1 H), 4.13 (m, 1 H), 3.34 (bs, 2 H), 2.48 (d, J=5.1 Hz, 2 H), 2.1(m, 2 H), 1.75(bs, 2 H), 1.40 (s. 9H), 1.17 (d, J=6.0 Hz, 3 H);

MS (EI): m/z 413 [M+Na]⁺, 313, 291, 191, 194, 165, 91.

L-脯氨酰基-3-甲基-(R)-β-丙氨酸苯甲基酯盐酸盐(6)的制备

向来自上面反应的中间体5中慢慢加入在二噁烷(240mL)中的4N HCl溶液。保证快速放出气体(小心:放热)。将该反应混合物搅拌2小时,然后在旋转蒸发器(45℃; $\bar{80}$ mmHg)上经第一次浓缩,然后在高真空(室温, 14小时; $\bar{0.2}$ mmHg)下浓缩一夜,得到极粘材料,将其从CH₂Cl₂/Et₂O(600 mL/700mL)中结晶,得到64.0g (92 %两步的总产率)白色固体HCl盐6 (HPLC纯度99.6 %)。

mp 119.8 - 120.5℃;

IR (KBr): 3217, 3072, 2904, 2756, 1736, 1681, 1560, 1446, 1387, 1352, 1295, 1244, 1178, 1096cm⁻¹;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) d 10.21 (bs. 1 H), 8.71 (d, J = 8.0Hz, 1 H), 7.77 (bs, 1 H), 7.24 (m. 5 H). 5.00 (s. 2 H), 4.52 (bs. 1 H), 4.22 (表观t, J=6.5Hz. 1 H), 3.33 (bs, 2H), 2.67 (dd, J= 5.5, 15.5 Hz, 1 H), 2.44 (m, 2 H), 1.89 (m, 3 H), 1.15 (d, J= 6.5 Hz, 3 H);

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) d 171.03 (C=O), 167.67 (C=O). 135.58 (C), 128.43 (CH), 128.13 (CH), 128.06 (CH), 66.34 (CH₂), 59.71 (CH),

46.55 (CR₂), 43.34 (CH), 40.42 (CH₂), 30.50 (CH₂), 24.23 (CH₂), 19.92 (CH₃);

MS (EI) m/z 291 [M-C1]⁺, 199, 194, 160, 139, 92, 91;

C₁₆H₂₃N₂O₃Cl的元素分析、计算: C, 58.80; H, 7.094; N, 8.57; 实测: C, 58.95; H, 6.99; N, 8.46.

N-[[4-[[[(2-甲基苯氨基)羰基]氨基]苯基]乙酰基]-L-脯氨酸-3-甲基)-(R)-β-丙氨酸苯甲基酯(7)的制备

向DMF (125mL)中的HCl盐6 (61.77g, 189mmol)溶液中加入MPUFA-OSu (2; 69.39g, 181.9mmol), 然后加入Et₃N (90mL; pH⁻10)。将该反应混合物搅拌3.5小时, 然后用EtOAc (1 L)稀释并用H₂O (3 x 250 mL)提取。这时产物开始沉淀。将10%柠檬酸溶液(250 mL)添加到有机层中(小心: 放热!), 摇动, 形成很多沉淀。在多孔玻璃漏斗(2 L, M)上过滤该固体。将该固体用柠檬酸(10%, 2 x 250 mL)、H₂O (250mL)、饱和碳酸氢钠(2 x 250 mL), H₂O (250 mL)和生理盐水(3 x 250mL)洗涤, 在该漏斗上通过抽吸(-80 mmHg)将其干燥1夜(-14小时), 得到黄白色固体, 将其从THF/Et₂O (1L/4L)中重结晶, 得到83.3g白色固体化合物7(HPLC纯度99.6%)。

将滤液进一步用柠檬酸(10%, 3 x 250 mL)、H₂O (250 mL)、饱和碳酸氢钠(2 x 250 mL)、H₂O(250 mL)和生理盐水(3 x 250 mL)洗涤。伴随每次含水洗涤, 其他化合物沉淀出来; 但是继续洗涤, 小心别使沉淀物损失。过滤, 得到4.02g白色固体产物。最后将该滤液用Et₂O(1 L)稀释, 过滤, 固体用Et₂O (3 x 100mL)洗涤, 得到1.67g主白色固体的另一收获物。该反应的总产率为88 %。

mp 153 - 153.5°C;

IR (KBr) 3342, 3307, 3119, 2966, 1737, 1702, 1643, 1590, 1543, 1514, 1455, 1414, 1308, 1238, 1179cm⁻¹;

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): a 3:2旋转异构体混合物, (主构象峰): d 9.00 (bs, 1 H), 7.91 (bs, 1 H), 7.84 (d, J=8.3 Hz, 1 H), 7.68 (d, J=8.3 Hz, 1 H), 7.40-7.28 (m, 7 H), 7.13(3 H), 7.06 (d, J=8.8 Hz, 1 H), 6.92 (t, J=7.3 Hz, 1 H), 5.06 (ABq, J=12.2 Hz, Dn=8.9

Hz, 2 H), 4.18 (dd, $J=3.4, 8.8$ Hz, 1 H), 4.10 (四重峰, $J=6.8$ Hz, 1 H). 3.57 (m, 2 H), 3.50-3.22 (m, 3 H). 2.62-2.37 (m, 2 H), 2.23 (s, 3 H), 2.18-1.68 (rn, 3 H), 1.05 (d, $J=6.8$ Hz, 3 H) 和(次构象峰): d 9.00 (bs, 1 H), 7.91 (bs, 1 H), 7.84 (d, $J=8.3$ Hz, 1 H), 8.15 (d, $J=8.3$ Hz, 1 H), 7.40-7.28 (m, 7 H), 7.13 (3 H), 7.06 (d, $J=8.8$ Hz, 1 H), 6.92 (t, $J=7.3$ Hz, 1 H), 5.01 (ABq, $J=12.2$ Hz, $D_n=19.0$ Hz, 2 H), 4.32 (dd, $J=2.4, 8.8$ Hz, 1 H), 4.22 (四重峰, $J=6.8$ Hz, 1 H). 3.57 Cm, 2 H), 3.50-3.22 (m, 3 H), 2.62-2.37 (m, 2 H), 2.23 (s, 3 H), 2.18-1.68 (m, 3 H), 1.10 (d, $J=6.8$ Hz, 3 H);

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): 旋转异构体混合物, (主构象峰): d 170.80 (C=O), 170.52 (C=O), 169.18 (C=O), 152.61 (C=O), 138.10 (C), 137.38 (C), 136.04 (C), 130.05 (CR), 129.63 (CH), 129.47 (CH), 128.55 (C), 128.28 (CH), 127.89 (CH), 127.85 (C), 126.02 (CH), 122.50 (CH), 117.90 (CH), 117.81 (CH), 65.44 (CH₂), 59.61 (CH), 47.04 (CR₂), 41.75 (CH), 40.41 (CH₂), 40.00 (CH₂), 29.29 (CH₂), 24.13 (CH₂), 19.88 (CH₃), 17.78 (CH₃) 和(次构象峰): d 170.94 (C=O), 170.52 (C=O), 169.31 (C=O), 152.61 (C=O), 138.10 (C), 137.38 (C), 136.04 (C), 130.05 (CH), 129.63 (CH), 129.47 (CH), 128.65 (C), 128.28 (CH), 127.89 (CH), 127.85 (C), 126.02 (CH), 120.940 (CH), 117.90 (CH), 117.81 (CH), 65.44 (CH₂), 59.91 (CH), 46.51 (CH₂), 42.01 (CH), 40.13 (CH₂), 39.84 (CH₂), 31.75 (CH₂). 22.11 (CH₂), 20.05 (CH₃), 17.78 (CH₃);

MS (EI): m/z 579 [M+Na]⁺, 557, 454, 426, 357, 336, 293, 267, 201;

C₃₂H₃₆N₄O₅的元素分析、计算: C, 69.05; H, 6.52; N, 10.07; 实测: C, 68.87; H, 6.52; N, 9.93.

N-[[4-[[[(2-甲基苯基氨基)羰基]氨基]苯基]乙酰基]-L-脯氨酸-3-甲基)-(R)-β-丙氨酸(8: oMePUPA-V) 的制备

在有Pd/C (10%; 2.44g)的情况下在-55 psi下将THF/H₂O (9: 1; 800 rnL)

中的OMePUPA-V-OBn (7; 80.18 g)溶液氢化。25小时后, 将反应混合物通过多孔玻璃漏斗上的Solka Floc® (144g; Fiber Sales & Development Corp.)过滤。然后将滤液通过另一块Solka Floc® (115g)再过滤, 浓缩至约250mL, 慢慢倒入剧烈搅拌的甲苯(3 L)中。将悬浮液搅拌0.5小时, 过滤(2 L多孔玻璃漏斗), 将所得白色粉末首先在漏斗上通过抽吸(约80 mmHg; 0.5小时)然后在真空炉(14小时; 45 °C, 用N₂流将压力调整到25 inHg真空度)干燥。将该白色节块粉碎(研钵和研棒)成细粉, 得到58.3g (产率87%)的oMePUPA-V白色固体。将该产物从丙酮/H₂O (320 mL/75 mL)中重结晶。将晶体收集并首先在多孔玻璃漏斗上通过抽吸(1小时, 80 mmHg)然后在真空炉(25小时; 45 °C; 通过N₂流将压力调整到25 inHg真空度)中干燥, 得到47.0 g (84%, 通过重结晶回收) oMePUPA-V白色固体(HPLC 纯度99.1 %)

mp 153.6 - 154.4 °C;

IR (KBr) 3354, 3307, 1719, 1643, 1590, 1543, 1514, 1449, 1414, 1308, 1237 cm⁻¹;

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): 3:2旋转异构体混合物(主构象峰): δ 12.21 (bs, 1H), 8.99 (s, 1 H), 7.91 (s, 1 H), 7.87 (d, J = 8.2 Hz, 1 H), 7.68 (d, J=7.9 Hz, 1 H), 7.40 (d, J=8.6 Hz, 2H), 7.17 (d, J=5.9 Hz, 2H), 7.15 (d, J=7.7Hz, 1 H), 7.12 (dd, J = 7.9, 8.2Hz. 1 H), 6.94 (dd. J = 7.3, 7.3Hz, 1 H), 4.22 (dd, J=3.3, 8.8Hz, 1 H), 4.06 (m, J = 6.6 Hz, 1 H). 3.47 (dd, 1H), 3.44 (d, J = 15.0 Hz, 1 H), 3.37 (dd, 1 H), 3.29 (d, J = 15.4 Hz, 1 H), 2.46 (dd, 1 H), 2.27 (m. 1 H), 2.25 (s, 3 H), 1.99 (rn, 1 H), 1.80m (rn, 1 H), 1.78 (m, 1 H), 1.76 (m, 1 H), 1.07 (d, J = 6.6 Hz, 3 H)和(次构象峰): δ 12.21 (bs, 1 H). 8.99 (s, 1 H). 7.90 (s, 1 H), 7.87 (d, J = 8.2 Hz, 1 H), 8.12 (d, J = 8.2 Hz, 1 H), 7.40 (d, J = 8.6 Hz. 2 H), 7.16 (d, J = 5.9 Hz. 2 H), 7.15 (d, J = 7.6 Hz, 1 H), 7.12 (dd, J = 7.9, 8.2Hz, 1 H), 6.94 (dd, J = 7.3, 7.3Hz, 1 H), 4.34 (dd, J = 1.8, 8.4 Hz, 1 H), 4.18 (m, J = 6.6Hz, 1 H), 3.60 (m, 2 H), 3.59 (m, 1 H), 3.48 (m. 1 H). 2.47 (dd, J = 6.6, 15.4 Hz, 1 H), 2.40 (dd,

$J = 6.6, 15.4\text{Hz}$. 1 H), 2.25 (s. 3 H), 2.15 (m. 1 H), 1.83 (rn, 1 H), 1.91 (m. 1 H), 1.77 (m, 1 H), 1.12 (d, $J = 6.6\text{ Hz}$, 3 H);

$^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz. DMSO-d_6) (主构象峰): δ 172.4 (C=O), 170.9 (C=O), 169.3 (C=O), 152.6 (C=O), 138.2 (C), 137.5 (C), 130.2 (CH), 129.8 (CH), 129.6 (CH), 128.7 (C), 127.4 (C), 126.1 (CH), 122.6 (CH), 120.9 (CH), 118.0 (CH), 117.9 (CH), 59.7 (CH), 46.6 (CH_2), 41.7 (CH_2), 40.6 (CH_2), 40.2 (CH_2), 29.4 (CH_2), 22.2 (CR_2), 19.9 (CH_3), 17.9 (CH_3) 和(次构象峰): δ 172.5 (C=O), 171.0 (C=O), 160.5 (C=O), 152.7 (C=O), 138.19 (C), 137.5 (C), 130.2 (CH), 129.8 (CH), 129.6 (CH), 128.8 (C), 127.4 (C), 126.1 (CH), 122.6 (CH), 120.9 (CH), 118.0 (CH), 117.9 (CH), 59.9 (CH), 47.1 (CH_2), 42.0 (CH_2), 39.8 (CH_2), 40.3 (CH_2), 31.8 (CH_2), 24.2 (CH_2), 20.2 (CH_3), 17.9 (CH_3);

MS (EI) rn/z 468 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 336, 267, 137;

$\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_5$ 的元素分析、计算: C, 64.36; H, 6.48; N, 12.61; 实测: C, 64.07; H, 6.40; N, 11.85。

实施例2. 在过敏性肺炎的绵羊模型中的活性

使用重量在27-50 kg之间的过敏性绵羊。所有绵羊已提前显示出对吸入的雾化猪蛔虫过敏原产生早期和晚期的支气管反应。这些绵羊是清醒的并将它们以俯卧位绑在经过改装的运货马车中使它们的头不能移动。通过2%利多卡因将其鼻表面麻醉, 首先将球形导管通过鼻孔进入下食道。使用柔性光学纤维支气管镜作为导向装置通过另一鼻孔将成套气管内管插入这些动物内。本研究中所用的所有方案都是得到Mount Sinai Medical Center Animal Research Committee许可的, 它对保证试验动物的人道护理和使用负责。使用食管的球状导管(填充有1mL空气)评价胸膜压力, 该导管位于离胃食管接合处5-10cm。在该位置, 末端呼气胸膜压范围为-2至-5 cmH_2O 。一旦放置该气球, 就保证了它在实验过程中保持在相同位置。用通过并位于气管内管顶端远端的侧孔导管(内径, 2.5 mm)测定气管内的侧压。

将气管和胸膜压力导管连接到不同压力传感器(MP45, Validyne, Northridge, CA), 用于测定定义为气管和胸膜之间压差的跨肺压。通过

将气管内管的邻近端与呼吸速度描记器 (Fleisch, Dyna Sciences, Inc., Blue Bell, PA) 相连测定气流。在与 80-386 DOC 个人计算机相连的多波道生理记录器上记录跨肺压和流动信号, 以联机计算跨肺压的变化除以中潮体积流动的变化 (通过数位积分获得) 的平均肺流阻 (R_L)。将至少 5 次没有人为吞咽现象的呼吸的平均值用于获得 R_L (以 $\text{cmH}_2\text{O}/\text{L}/\text{sec}$ 计)。测定 R_L 之后即刻在恒定体积壳体体积描记器中测定胸的气体体积 (V_{t8}), 从而获得特异性肺阻力 (specific lung resistance) ($SR_L=R_L \times V_{t8}$) (以 $\text{L} \times \text{cmH}_2\text{O}/\text{L}/\text{sec}$ 计)。

使用一次性药用空气喷射雾化器 (Raindrop®, Puritan Bennett, Lenexa, KS) 产生所有液体剂量气溶胶, 该雾化器赋予气溶胶 $3.2\mu\text{m}$ 的质量平均空气动力直径 (由 Andersen 阶式碰撞取样器测定)。该雾化器与放射剂量计体系相连, 该体系由电磁阀和压缩气源 (20psi) 组成。将雾化器出口导入塑料 T 接头, 该接头一端与活塞呼吸罩 (Harvard Apparatus, S. Natick, MA) 的吸气端口相连。在开始呼吸罩吸气循环时将该电磁阀打开一半。以 500mL 的潮流气量和 20 次/分钟的呼吸速度输送气溶胶。为了评价支气管反应性, 通过吸入缓冲剂后即刻和每次连续给药 10 次呼吸递增浓度的卡巴胆碱 (以 0.25、0.5、1.0、2.0 和 4.0%w/v 于缓冲生理盐水中) 之后测定 SR_L 来完成卡巴胆碱的累积浓度反应曲线。当 SR_L 增加超过给予生理盐水后的值 400% 或在给予最高卡巴胆碱浓度之后停止该激发试验。通过测定 SR_L 增加到由剂量反应曲线内推的给予生理盐水后的值的 400% (PC_{400}) 的累积卡巴胆碱浓度 (以呼吸单位计) 评价支气管反应性。1 呼吸单位 (BU) 定义为一次呼吸 1%w/v 卡巴胆碱雾化溶液。

将 oMePUPA-V 剂量溶于 1:2 乙醇:生理盐水、1:5 乙醇:200mM 磷酸钠或 Tris 缓冲剂中。当使用 Tris 时, 使用生理盐水进行任意所需稀释。以总体积 3-5mL 制备剂量。

在所有研究中, 在开始研究之前 3-4 天测定基线呼吸道反应性 (即 PC_{400})。在单剂量预处理研究中, 测定 SR_L 并用该化合物或载体处理动物。在处理 2 小时 (就在攻击之前) 再测定 SR_L , 然后用过敏原攻击动物。在多剂量研究中, 在过敏原攻击之前头 4 天, 一天一次对动物处理 4 天并在最后剂量之后 24 小时用过敏原攻击。在化合物最后剂量或载体处理之

前或之后测定 SR_L 。在所有研究中，在过敏原攻击之后即刻、攻击后 1-6 小时每小时、过敏原攻击后 6.5-8 小时中每半小时再测定 SR_L 。在过敏原攻击后 24 小时进行呼吸道反应性的后攻击测定 (PC_{400})。

值以平均值±平均值的标准误差来表示。以与攻击前的基线 SR_L 的差计算每只绵羊的 SR_L 的变化。攻击后 SR_L 的变化以早期呼吸道反应 (EAR) 来表征，该反应约进行 0-4 小时。接着进行后期呼吸道反应 (LAR)，该反应在过敏原攻击之后约 4-8 小时进行。使用梯形规则计算每个动物的 EAR 和 LAR 曲线的面积。与安慰剂对照相比该 EAR 或 LAR 曲线面积的大大降低显示出对过敏原诱导的 SR_L 变化的治疗效果。在过敏原攻击之前和攻击之后 24 小时评价的卡巴胆碱的呼吸道反应性 (PC_{400}) 是以每只绵羊的 PC_{400} 比 (攻击前/攻击后的 PC_{400} 值) 表示的。与安慰剂对照相比，该 PC_{400} 比大大增加，说明有治疗效果。使用遵循与对照的多重对比的 Dunnett 试验的单向方差分析 (单尾) 进行与安慰剂对照的对比。产生 $p < 0.05$ 的比较呈现出统计学上是有效的。

图1显示了给药2小时后在对猪蛔虫过敏的绵羊中气溶胶化 oMePUPA-V 的抑制剂量反应。左方格显示了特异性肺阻力 SR_L (以 $cm H_2O/sec$ 计) 的变化。右方格显示了攻击后 24 小时测定对吸入的卡巴胆碱的呼吸道反应性 (PC_{400} 比, 攻击前/攻击后)。oMePUPA-V 以剂量 0.01-0.03mg 不能抑制早期或后期呼吸道反应或改变过敏原攻击后 24 小时对卡巴胆碱的过反应性。剂量 0.1、1 和 3 抑制早期呼吸道反应并最大地抑制后期呼吸道反应。这些剂量还抑制过敏原攻击后 24 小时对卡巴胆碱的过反应性。将这些数据的统计分析示于表 2 中。

表 2

处理	剂量 (mg)	载体	n	EAR ($\Delta SLR \times h$)	LAR ($\Delta SLR \times h$)	PC_{400} (后/前)
在过敏原攻击之前 2 小时给药						
PBS			12	5.85±0.62	4.85±0.69	0.49±0.03
oMePUPA-V	0.01	EtOH: NS	2	6.87±0.05	5.11±1.46	0.44±0.04
	0.03	EtOH: NS	2	10.62±3.91	3.98±0.23	0.43±0.00

0.10	EtOH: NS	4	2.54±0.74*	0.67±0.17*	1.18±0.11*
1.00	EtOH: PBS	2	2.14±0.70	0.27±0.34*	1.05±0.11*
3.00	EtOH: PBS	2	2.47±0.62	0.68±0.07*	1.07±0.08*

绵羊，天性对猪蛔虫过敏，在以指定剂量给予oMePUPA-V气溶胶或等量载体之后2小时或者重复每天给药阈下剂量oMePUPA-V或等量BPS 4天后24小时用猪蛔虫过敏原气溶胶攻击。肺力学，基于研究前基线值的特异性呼吸道阻力的变化报道，在过敏原攻击后测定了8个小时。早期呼吸道反应(0-4小时, EAR)和后期呼吸道反应(4-8小时, LAR)以 Δ 特异性肺阻力曲线 x 时间的平均面积 \pm 标准误差表示。在研究开始之前和过敏原攻击后24小时测定对吸入的卡巴胆碱的呼吸道阻力。呼吸道反应性以攻击前和攻击后的PC₄₀₀值(阻力增加到400%所需的卡巴胆碱的量)之比报道。

根据与对照组的多重比较的Dunnett试验，与PBS对照相比，单向方差分析 $^*p < 0.05$ 。这显示经统计EAR或LAR大大降低，或者与PBS对照组相比PC₄₀₀比大大增加。

单剂量刺激

在用猪蛔虫过敏原攻击之后，通过与基线阻力相比的呼吸道阻力没有变化反映出，上面研究中所用的 oMePUPA-V 剂量没有一种具有刺激效果。这显示在图 2 中。

重复剂量研究

图 3 描述了当以单剂量用于急性预处理时显示无效的 0.03mg 剂量的 oMePUPA-V，如果一天一次给药 4 天，当在最后剂量后 24 小时给以抗原攻击时，却有保护性。上下左手方格显示出，使用两种不同配方可以看出这种效果。由图 3 的上下右手方格可以看出，在另外 24 小时后对卡巴胆碱的过敏反应性还被最大抑制。oMePUPA-V 抗 EAR 和 LAR 及抗对卡巴胆碱的过反应性的这种保护性效果很大，这种定量分析显示在表 3 中。

该研究的结果说明，通过气溶胶用小分子抑制剂 VLA-4、oMePUPA-V 的单个预处理能够预防过敏绵羊模型中过敏原诱导的早期和后期呼吸道反应和后过敏原诱导的 AHR。以单个预处理，用任意剂量 oMePUPA-V 看不出呼吸道的刺激效果。结果还显示出，用多次处理可以降低 oMePUPA-V 的有效剂量。这些数据共同地提供了 VLA-4 粘着途径在过敏原刺激之后

从过敏绵羊的呼吸道开始的长时间炎症事件的病理生理指示剂 (LAR 和 AHR) 中起关键作用的有力证据。

表 3

处理	剂量 (mg)	载体	n	EAR (Δ SLR x h)	LAR (Δ SLR x h)	PC ₄₀₀ (后/前)
一天一次给药 4 天, 在最后剂量之后 24 小时进行攻击						
PBS			8	4.33±0.81	4.96±0.40	0.38±0.03
oMePUPA-V	0.03	EtOH: NS	4	1.53±0.34*	0.59±0.16*	1.06±0.04*
	0.03	Tris: NS	4	1.40±0.35*	0.02±0.06*	1.04±0.04*

绵羊, 天性对猪蛔虫过敏, 在重复每天给药阈下剂量 oMePUPA-V 或等量 BPS 4 天后 24 小时用猪蛔虫过敏原气溶胶攻击。肺力学, 基于研究前基线值的特异性呼吸道阻力的变化报道, 在过敏原攻击后测定了 8 个小时。早期呼吸道反应 (0-4 小时, EAR) 和后期呼吸道反应 (4-8 小时, LAR) 以特异性肺阻力曲线 x 时间的平均面积±标准误差表示。在研究开始之前和过敏原攻击后 24 小时测定对吸入的卡巴胆碱的呼吸道阻力。呼吸道反应性以攻击前和攻击后的 PC₄₀₀ 值 (阻力增加到 400% 所需的卡巴胆碱的量) 之比报道。

根据与对照组的多重比较的 Dunnett 试验, 与 PBS 对照相比, 单向方差分析 * = p < 0.05。这显示经统计 EAR 或 LAR 大大降低, 或者与 PBS 对照组相比 PC₄₀₀ 比大大增加。

实施例 3: 在延迟型高过敏性模型中的活性绵羊红细胞研究

将来自 Jackson 实验室的 8-19 周龄的特定无病原体的雌性 Balb/c 小鼠用于所有试验。随意给这些动物喂食和水。每周从 Charles River Pharm. Services (Southbridge, MA) 获得来自相同绵羊的在 Alsever 溶液中的绵羊红细胞 (sRBC)。在 4℃ 下将该 sRBC 在 1000g 下离心造粒, 除去任意可见血沉棕黄层。然后将这些细胞在生理盐水中冲洗。将这些细胞粒再悬浮于生理盐水中并用血细胞计数器计数。将这些细胞稀释于磷酸盐缓冲生理盐水 (PBS) 至 2×10^8 sRBC/mL。在第 0 天, 通过皮下注射在 100μL

PBS 中的 2×10^7 sRBC 使小鼠致敏。在第 5 天，如上制备 sRBC，但稀释在 PBS 中至最终浓度 4×10^9 sRBC/mL。在该制备中，将 25 μ L 皮下注射到右背足板中。

为了肠内给药化合物，将 oMePUPA-V (Lot# 2770-029) 配制到在 0.02M TRIS 中的 60% PEG 400 的载体中至原料浓度为 5mg/mL。在 PEG/TRIS 载体中制备适宜稀释液并通过肠道给药 100 μ L。将抗-VLA-4 抗体 (PS/2) 以浓度 4.3mg/kg 稀释到生理盐水中并通过腹膜内给药 100 μ L。在用 sRBC 攻击之后立即给予所有处理。

在足背攻击 20 小时后使用来自 Mitutoyo (Model# 304-196, Dyer, Lancaster, PA) 的张力测径规测定未被攻击的对照(左)和经过攻击的(右)背足板的膨胀。数据以足背厚度的变化表示，它是通过左后爪厚度减去右后爪厚度得到的。使用双尾 Student's-t-实验比较足背厚度的变化。

抗-VLA-4 抗体 PS/2 以 4.3mg/kg 剂量腹膜内抑制膨胀约 30%，而以 20mg/kg 剂量的肠内给药的 oMePUPA-V 在该模型中没有影响(未显示数据)。通过肠内途径以 20mg/kg 剂量给药 oMePUPA-V 到小鼠中 sRBC 诱导的 DTH 模型中的功效经研究，没有观察到功效。

实施例 4: 延迟型过敏性模型中的活性

接触过敏性模型

将四个一笼放入 Biogen 无病毒动物家族中的微隔离器笼中并随意收到鼠食和自来水的 20g 雌性无病毒 Balb/c 小鼠 (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) 用于所有研究中。将这些小鼠用氯胺酮: 赛拉嗪 (90:10mg/kg, 腹膜内) 麻醉。通过紧紧地刮屑皮毛露出一块 3cm² 的腹部皮肤、剑状耻骨，将该皮肤用 70% 乙醇冲洗干净。将体积为 25 μ L 在 4:1v/v 丙酮: 橄榄油载体中的 0.5% DNFB 均匀地涂覆到该裸露的腹部皮肤上。用涂敷移液管尖轻轻抓破该皮肤以使其轻微发炎。将小鼠仰卧躺在其笼中，让其从麻醉中苏醒。开始致敏后 24 小时，再用 25 μ L 在载体中的 0.5% DNFB 在相同腹部皮肤位置致敏，然后再用移液管尖轻轻抓破。在束缚未被麻醉的小鼠的同时进行第二次致敏。在第 5 天(开始致敏后约 120 小时)，使用低于刺激剂量的致敏物(在 4:1v/v 丙酮: 橄榄油载体中的 0.2% DNFB) 攻击该免疫反应。用 90:10mg/kg 氯胺酮: 赛拉嗪腹膜内注

射将小鼠麻醉，将 10 μ L 0.2% DNFB 涂覆到左耳背面。右耳接受 4:1v/v 丙酮:橄榄油载体的相似涂覆。在接下来的 24 小时内，进行二相性耳肿胀反应，如图 4 所示。攻击后 24 小时，再用氯胺酮:赛拉嗪将小鼠麻醉，用工程测微计测定两耳的厚度并精确到 10⁻⁴ 英寸。

在第 5 天攻击该免疫反应之后 4 小时通过管饲法经口服给予化合物 (100 μ L) 或适宜载体 (在等渗磷酸盐缓冲盐水 [PBS] 中的二甲亚砜 [DMSO], 100 μ L)。将每组 8 只小鼠的组用于每种试验处理。通过添加 pH 为 8.8 的 0.5% 磷酸钠缓冲液和 3% DMSO 将 oMePUPA-V (Batch Number 2044-076) 溶于蒸馏水中。以攻击后 24 小时其载体攻击的耳厚度和 DNFB-攻击的耳厚度之差计算每只小鼠的耳肿胀反应。典型地 DNFB 诱导的耳肿胀为 65-75 x 10⁻⁴ 英寸。通过将处理组与其载体对照组对比测定耳朵肿胀反应的抑制。使用遵循用于与对照组 (Systat, SPSS Inc.) 的多次对比的 Dunnett 试验的单向方差分析使用 p<0.05 评价处理组之间差异的统计显著性。值以平均值 \pm 平均值的标准误差 (SEM) 表示。

图 4 比较了在接受载体 (DMSO, PBS)、正对照化合物 (给以 0.03 μ g/kg 或 0.03 或 0.3mg/kg oMePUPA-V (DNFB 攻击后 4 小时肠内给药 (上方格)) 的小鼠中 DNFB 攻击后 24 小时测定的耳朵肿胀反应。在下方格中显示了处理诱导的抑制百分比。两种剂量的 oMePUPA-V 都显著地将耳朵肿胀反应抑制到通过正对照化合物显示的相似程度。

在 DNFB 攻击后 4 小时给的肠内 0.03 或 0.3mg/kg 单剂量的 oMePUPA-V 显著地抑制了小鼠接触过敏性模型中的耳朵肿胀反应。

实施例 5: 生物化学

5.1 在 VCAM-Ig 直接结合测定 (DBA) 中使用 VCAM-Ig 碱性磷酸酶共轭物测定 oMePUPA-V 的受体亲和性。

如所公开的构建并提纯 VCAM-Ig (Jakubowski, A. 等人, 《细胞粘着和传染》 3: 131-142, 1995)。为了裂解产生色底物, 如所公开的共轭到小牛肠内碱性磷酸酶上 (Lobb, R. R. 等人, 《细胞粘着和传染》 3: 385-397, 1995)。在人 T 细胞系 Jurkat (α 4 β 1) 上评价 VLA-4 的结合。在有 1mM Mn⁺² 的情况下在这些细胞的表面上 VCAM-Ig-AP 和 oMePUPA-V 竞争结合到 α 4 β 1 上。

在 VCAM-Ig 直接结合测定中, 在有 1mM $MnCl_2$ 的情况下 oMePUPA-V 与 VCAM-Ig-AP 浓度依赖性地以 8 ± 1 nM ($n=9$) 的 IC_{50} 竞争结合到 Jurkat 细胞上。

5.2 在纯化 VLA-4 蛋白质/蛋白质测定中使用 VCAM-Ig 碱性磷酸酶共轭物测定 oMePUPA-V 的受体亲和性。

从 $\alpha 4$ -转染的 K562 细胞的高表达亚克隆的洗涤剂提取物中通过抗体亲和性色谱法提纯 VLA-4 并将其固定在微量滴定孔上建立蛋白质/蛋白质竞争性结合测定。在没有或有 oMePUPA-V (Lot #2) 和 1mM $MnCl_2$ 的情况下将 VCAM-Ig-AP 结合到提纯的 VLA-4-涂布板上。在 405nm 下读板并使用 SoftMax v. 2.32 软件分析该数据。

VCAM-Ig 共轭物与提纯 VLA-4 的结合完全被特异性中和抗- $\alpha 4$ 单克隆抗体 (HP1/2) 阻断。在 VLA-4 蛋白质/蛋白质测定中由 oMePUPA-V 获得的两个 IC_{50} 值列于表 4 中, 它是由 VCAM-Ig-AP 竞争性结合测定和 CS1 细胞粘着测定在 Jurkat 细胞上获得的 IC_{50} 's。

5.3 在 CS1 细胞粘着测定中评价 oMePUPA-V 的受体亲和性

a. Jurkat 细胞粘着在 CS1/BSA 共轭物上

合成肽 NH_2 -半胱氨酸-酪氨酸-CS-1 并以 CS1/BSA 比为 10:1 将其偶合到 BSA-SMCC (SMCC 是与 BSA 和合成肽的单独半胱氨酸上的游离氨基反应的异型双功能交联剂) 上。用稀释至最终浓度为 $1\mu g/ml$ 的 $100\mu L$ 共轭物将孔涂布一夜。第二天用 PBS 中的 BSA 将这些孔阻塞 1 小时, 然后将其冲洗 3 次。

将人 T 细胞系 Jurkat 用 $2\mu M$ BCECF-AM 标记, 该 BCECF-AM 为一种荧光染料 (2', 7', 二-(2-羧乙基)-5 和 -6) 羧基荧光黄乙酰氧基甲酯 (Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon; catalog #B-1150), 其经内在化和去酯化将该染料捕获在肝细胞中。将含 $1mM Mn^{2+}$ 的缓冲剂中的 Jurkat 细胞 (1×10^5 个细胞/孔) 加入含有三倍系列抑制剂稀释液的涂布板中。一式两份测定每一浓度。室温下 30 分钟后, 将这些板颠倒并冲洗 3 次或者直到没有细胞粘着在仅用 BSA 涂布的对照孔中。在 Cytofluor 荧光板读数仪中使用 485nm 的兴奋波长和 530nm 的发射波长将 CS-1 粘着细胞定量。

在没有化合物的情况下粘着在 CS1/BSA 的细胞用作 0%抑制对照,同时将仅粘着在 BSA 上的细胞用作 100%抑制对照。使用 Deltagraph 软件第 5 版计算 IC50's。

在有 Mn^{2+} 的情况下标记 Jurkat 细胞的粘着被 EDTA 和中和抗- $\alpha 4\beta 1$ mAb, HP1/2, 完全阻断,这说明结合是特异性的。表 4 给出了 oMePUPA-V 在 CS1/BSA 粘着测定中的活性以及结合测定结果。

oMePUPA-V 是含 Mn^{2+} 的缓冲剂中 VLA-4 的有效拮抗物。当在有 Mn^{2+} 的情况下将其在分离 VLA-4 上测定时比在结合测定中在 Jurkat 细胞上测定的有效性高出 80 倍。通过其剂量依赖性地并完全阻断 Jurkat 粘着在 CS1 上的能力证实, oMePUPA-V 为功能性拮抗物。在粘着测定中的绝对值大于在结合测定中观察到的。这可能是由于粘着的多价性能。在所有测定形式中, EDTA 和 HP1/2 的结合抑制证明特异性地结合到 VLA-4 上。

表 4: 在有 1mM $MnCl_2$ 的情况下在 VCAM-Ig 竞争性结合测定、CS1 细胞粘着测定和提纯 VLA-4 蛋白质/蛋白质测定中测定的 oMePUPA-V 的受体亲和性

	IC50±SD [nM]
测定	oMePUPA-V
Jurkat 细胞 VCAM-Ig 结合	8±1 (n=9)
Jurkat 细胞 CS1 粘着	22±2 (n=4)
提纯的 VLA-4 VCAM-Ig 结合	0.1 (n=9) (0.1, 0.1)

6.4 oMePUPA-V 抑制的特异性

a. 使用 JY 细胞在 VCAM-Ig 直接结合和 CS1 粘着测定中评价 oMePUPA-V 的特异性

在有 Mn^{2+} 的情况下在 JY 细胞上测定与 $\alpha 4\beta 1$ 的结合。在结合测定中, 在 JY 细胞上 VCAM-Ig 和 oMePUPA-V 竞争结合到 $\alpha 4\beta 1$ 上(参见测定方案的段 4.1.1)。在该细胞粘着测定中, 试验 oMePUPA-V 阻断 JY($\alpha 4\beta 1$) 细胞结合到 CS1/BSA 共轭物上的能力。

oMePUPA-V 不阻断 $\alpha 4\beta 1$ 结合到 VCAM-Ig 或 CS1/BSA 上。抗- $\beta 7$ Mab、Fib27 (Pharminen) 完全抑制这些相互作用, 这说明结合上 $\alpha 4\beta 1$ 特异性的。因此 oMePUPA-V 为 VLA-4 特异性抑制剂。结果列于表 5 中。

b. 使用 K562 细胞粘着到涂布有 Fn-120 的孔上评价 oMePUPA-V 的特异性

将未处理的 96 孔聚苯乙烯平底板用 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ Fn-120 在 4°C 下涂布一夜。将这些板用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 冲洗 2 次, 并在室温下用 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 堵塞 1 小时。将这些板用含 1mM MnCl_2 的 TBS 缓冲液 (测定缓冲液) 冲洗 2 次。K562 细胞用 $2\mu\text{M}$ 荧光染料 BCECF-AM 标记 (参见段 4.1.3), 并将其在室温下经过 30 分钟结合到板上。将这些板颠倒并冲洗 3 次, 在 Cytofluor 荧光板读数仪中使用 485nm 的兴奋波长和 530nm 的发射波长将粘着细胞定量。

K562 与 Fn-120 的粘着完全被中和抗- $\alpha 5$ 抗体 IIA1 (Pheamingen) 阻断, 这说明通过 VLA-5 的特异性结合。oMePUPA-V 的剂量高至 $100\mu\text{M}$ 也没有抑制 K562 细胞结合到 Fn120K 上。参见下表 5。

c. 进行聚集测定评价 oMePUPA-A 的特异性

方法

使用富含血小板的血浆通过标准血小板聚集评价抗 gpIIbIIIa 的活性。使用 ADP 在血浆中开始聚集, 其中 Ca^{+2} 和 Mg^{+2} 为主要二价阳离子。将 GRGDSP @ $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 用作正对照。

结果

以三个剂量 1、10 和 $100\mu\text{M}$ 测定 oMePUPA-A。在选择剂量下通过 ADP 诱导没有抑制血小板聚集。结果列于表 5 中。oMePUPA-A 对 VLA-4 高度特异性 (>10000 倍)。它没有抗相关整联蛋白 $\alpha 4\beta 7$ 和 VLA-5 或抗 $\beta 3$ 整联蛋白 gpIIbIIIa 的可测量活性 ($>100\mu\text{M}$)。

表 5: 在 $\alpha 4\beta 7$ VCAM-Ig 竞争性结合测定、 $\alpha 4\beta 7$ 和 VLA-5 粘着测定、以及血小板聚集研究中测定的 oMePUPA-V 的抑制活性

细胞系	配体	二价阳离子	oMePUPA-V IC50 \pm SD [nM]
JY	VCAM-Ig	Mn^{+2}	3%抑制

($\alpha 4\beta 7$)	DBA		@ 100 μM (n=3)
JY ($\alpha 4\beta 7$)	CS1/BSA 粘着	Mn^{+2}	没有抑制 @ 100 μM (n=4)
K562 (VLA-5)	Fn-120 粘着	Mn^{+2}	没有抑制 @ 100 μM (n=3)
血小板 (IIbIIIa)	纤维蛋白原 聚集	$\text{Ca}^{+2}/\text{Mn}^{+2}$	没有抑制 @ 100 μM (n=1)

实施例 6: LIBS 诱导的 oMePUPA-V 测定

6.1 使用 LIBS 抗体 9EG7 在 Jurkat 上测定

a. 在体外通过 FACS 分析测定 $\alpha 4\beta 1$ 拮抗物的 LIBS 诱导。在 37°C 下用仅含 2mM MgCl_2 (Mg^{+2} -TBS) 的 TRIS 缓冲盐水或试验化合物的系列稀释液将 Jurkat 细胞 (2×10^5 /孔) 预培养 20 分钟。将这些样品转移到冰浴中并以 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的最终浓度补充 LIBS 抗体 9EG7。将这些细胞用 Mg^{+2} -TBS 冲洗 2 次并将其再悬浮于在 Mg^{+2} -TBS 中的 1:200 稀释的 FITC 共轭羊抗大鼠 IgG 中并在 4°C 下培养 30 分钟。将这些细胞冲洗 2 次并再悬浮于 Mg^{+2} -TBS 中。通过 FACS 分析 (Becton Dickinson FACScan) 测定平均荧光强度 (MFI)。结果以 MFI 表达。通过 Microsoft Excel 5.0 版和 Deltagraph 4.0 版软件分析数据。

图 5 显示了与 2mM Mg^{+2} 缓冲液 (方格 B) 相比的 oMePUPA-V 诱导的 LIBS 表位的暴露。该诱导为浓度依赖型并与用 1mM Mg^{+2} (方格 A) 观察到的诱导非常相似。省略 LIBS 抗体和检测抗体, 或者仅省略抗体消除了贴标签 (方格 B)。该反应的 ED50 为 20nM。

结论

这些数据说明, oMePUPA-A 诱导 VLA-4 中与用天然配体观察的相同构象改变。LIBS 值一般落入 oMePUPA-V 结合和粘着测定所定义的范围 (分别为 8nM 和 22nM) 内。

6.2 多种类受体筛选

a. 在 VCAM-Ig 直接结合测定中使用 VCAM-Ig 碱性磷酸酶共轭物和来自不同种的周围血液淋巴细胞或脾细胞测定 oMePUPA-V 的受体亲和性。

PBL, 使用绵羊 PBL (Abraham, W. M. 等人 J. Clin. Invest. 93: 776-787, 1994) 中所述的方法从人、绵羊和狗的外周血液中分离出来。使用 VCAM-Ig-AP 竞争性结合测定比较 oMePUPA-V 在这些不同细胞类型上的结合。

由 oMePUPA-V 在有 Mn^{+2} 的情况下在来自不同种的外周血液淋巴细胞或脾细胞上获得的 IC_{50} 's 示于表 6 中。在有 Mn^{+2} 的情况下, 具有相似 IC_{50} 的 oMePUPA-V 抑制 VCAM-Ig 结合到从人、大鼠、狗、绵羊和小鼠中获得的淋巴细胞上。没有证据表明种特异性。这与在种中观察到的 VLA-4 和其天然配体、CS-1 和 VCAM 的序列保守高度一致。

表 6: 在使用 VCAM-Ig 碱性磷酸酶共轭物和来自不同种的处周血液淋巴细胞或脾细胞在 VCAM-Ig 竞争性结合测定中测定的 oMePUPA-V 的受体亲和性

种	源	二价阳离子	IC_{50} [nM]
人	PBL	Mn^{+2}	6 ± 1 (n=3)
绵羊	PBL	Mn^{+2}	3 ± 1 (n=3)
狗	PBL	Mn^{+2}	13 ± 2 (n=3)
小鼠	脾细胞	Mn^{+2}	4 ± 2 (n=4)
大鼠	脾细胞	Mn^{+2}	5 ± 1 (n=3)

实施例 7: oMePUPA-V 的受体动力学

7.1 使用 3H -已知的抑制剂作探针的竞争性测定

在组织培养保温箱中在 $37^{\circ}C$ 下将 Jurkat 保持在 PRMI-1640 培养基 +10%胎牛血清中。为了结合研究, 通过离心将这些细胞造粒, 用 TBS (50mM Tris HCl, 150mM NaCl, 0.1%牛血清白蛋白, 2mM 葡萄糖, 10mM HEPES pH7.4) 冲洗 2 次, 以约 2×10^6 个细胞/ml 悬浮于 TBS 中, 并使用 Neubauer 血细胞计数器计数。在指定缓冲液中将这些细胞进一步稀释至 1.5×10^6 /ml, 并经受每个试验所定义的特处理。然后通过离心将这些细胞造粒, 将其再悬浮于 $100\mu l$ 试验缓冲液中, 并转移到含 2.9ml

ScintiVerse II (Fisher Scientific) 的闪烁小瓶中。通过闪烁计数计量细胞相关的放射性。在这些条件下结合的计数测定未被试验化合物占领并因此没有结合到该 ^3H -已知的抑制剂的整联蛋白。在硅化处理的 1.5ml 微量离心管中用标准 1ml 样品进行所有研究。 ^3H -已知的抑制剂在细胞(本底物)上的非特异性结合通过测定在没有金属离子的情况下结合的抑制剂来定义。通过结合总计数减去非特异性计数计算结合的特异性计数。

进行一系列竞争性研究以验证 oMePUPA-V 和已知抑制剂对 VLA-4 上的相同位置的竞争。首先, 将 ^3H -已知的抑制剂与等摩尔量的 oMePUPA-V、10 倍量和 100 倍量混合, 用 Jurkat 细胞培养并评价冷抑制剂竞争结合已知抑制剂的能力。oMePUPA-V 处理产生 ^3H -已知的抑制剂结合的剂量依赖性抑制。竞争 ^3H -已知的抑制剂结合所需的 oMePUPA-V 的浓度比将冷却用作竞争剂时的大 10 倍, 与 Mn^{+2} -激活的 VLA-4 的较低亲和性一致。其次, Mn^{+2} -激活的 Jurkat 细胞用 ^3H -已知的抑制剂处理, 以便首先占领带有放射性探针的 VLA-4, 然后加入过量冷 oMePUPA-V。接下来用过量冷 oMePUPA-V 或已知抑制剂的处理不能辨别出其替换放射性探针的能力。第三, Mn^{+2} -激活的 Jurkat 细胞用饱和量的 oMePUPA-V 处理, 并且测定该 oMePUPA-V 分离的速度, 与用于 Mn^{+2} -激活的 VLA-4 的已知抑制剂的延长半衰期不同, oMePUPA-V 以不到 10 分钟的 $t_{1/2}$ 很快从 oMePUPA-V-VLA-4 释放。oMePUPA-V 和已知抑制剂的 $t_{1/2}$ 的很大差异暗示, oMePUPA-V 对 VLA-4 的较低亲和性结果导致其更快的分离速度。

分离数据证实, oMePUPA-V 与 VLA-4 的结合特别依赖于 VLA-4 的活化状态, 并且它呈现用已知抑制剂看到的相同的活化选择性。至于 Mn^{+2} -激活的 VLA-4, oMePUPA-V 从 Mn^{+2} -激活的 VLA-4 分离的 $t_{1/2}$ 比在竞争形式中能够测定的最短时间点少 10 分钟。另一方面, 在有 Mn^{+2} 和活化抗体 TS2/16 的情况下, $t_{1/2}$ 延长 (20 分钟)。还没有详细评价所有可能的活化状态, 然而可以设计快速高亮度差别的简单筛选。在该试验中, 将固定浓度的 oMePUPA-V (10nM) 与 5nM ^3H -已知的抑制剂混合, 并在这些条件下以不同活化状态进行结合。如果 oMePUPA-V 对 VLA-4 具有异常高或低的亲和力, 那么人们将通过 ^3H -已知的抑制剂的量的区别检测它。在不同活化条件下结合的 ^3H -已知的抑制剂的百分比的差异近似地可以该抑制剂的已知性

能为基础预测。

结合研究证实 oMePUPA-V 以其亲和性一致的浓度与已知抑制剂竞争结合到 VLA-4 上，并证实这两种化合物竞争整联蛋白的相同位置。在不同 VLA-4 活化状态下 oMePUPA-V 和已知抑制剂结合的相似性暗示结合机理相似。

7.2 在 Panlabs 和 Cerep 筛选中测定 oMePUPA-V

在 Panlabs 轮廓筛、发现筛和放射性配体、酶和功能性测定的免疫筛板中以及 Cerep 膜受体板中试验 oMePUPA-V。在包括 NK1 受体测定的所有测定中 10 μ M 的 oMePUPA-V 观察不到显著活性，相反已知抑制剂显示一些活性。Cerep 还报道 oMePUPA-V 没有显示出抑制人 ACE 蛋白酶活性。ACE 蛋白酶源为人内皮细胞 (HUVEC)。³H-HGG，将其添加到 HUVEC 中，被 ACE 转变成 ³H-马尿酸和双甘氨酸。卡托普利，一种有效的 ACE 抑制剂，以 990pM 的 IC₅₀ 阻断该转化，然而 10 μ M 的 oMePUPA-V 不能。

药物性质：

oMePUPA-V 为白色至黄白色结晶粉末。溶于 DMSO 并具有 0.120mg/mL 的水溶性。通过 DSC、TGA 和热阶段显微镜检查研究的 oMePUPA-V 热行为显示，该物质在约 160 $^{\circ}$ C 下融化。在约 136 $^{\circ}$ C，DSC 和 TGA 分析暗示，oMePUPA-V 失去可能与水合物脱水一致的挥发性杂质。

制剂

雾化制剂

100mL 5mg/mL 的 oMePUPA-V 雾化制剂的生产说明如下。

如下制备 200mL 缓冲原液：

- 1、称重 0.286g USP 级氨丁三醇，加入适宜容器中。
- 2、称重 1.676g USP 级氯化钠，加入相同容器中。
- 3、加入 200mL USP 级注射用水。

混合直到均匀。

- 1、称重 0.500g oMePUPA-V 并加入适宜容器。
- 2、加入步骤 1 中制备的 100mL 缓冲液。
- 3、混合直到均匀。
- 4、无菌过滤到适宜容器中。

5、用适宜封口措施密封。

典型制剂性质：

pH: 7.4, 渗重量摩尔浓度: 290 mOsm

实施例 9: 稳定性指示 HPLC 步骤

柱: Zorbax® SB-C18, 3 μ m 颗粒, 4.6 \times 150mm

保护柱: Zorbax® SB-C18, 5 μ m 颗粒, 4.6 \times 12.5mm

流速: 1mL/分钟

柱温: 40 $^{\circ}$ C

流动相 A: 0.1% (w/v) 水中的三氟乙酸 (TFA)

B: 0.1% (w/v) 在 90% (v/v) 乙腈、10% (v/v) 水中的 TFA

组分:

<u>时间(分钟)</u>	<u>%B</u>
0-3	15
3-18	15-100
18-21	100
21-28	15

注射: 10 μ L 在 Tris/NaCl/水(散装中间体)中或在 0.1% TFA/45%乙腈(最终产物)中的 0.2mg/mL 溶液。

检测: UV 254nm(开始)和 215nm

对照: oMePUPA-V, 在沸水中加热 20 分钟。

完成开始方法的定量。

药物稳定性

在以下贮藏条件下贮藏 2 周后在散装中间体中没有观察到降解: 在密封小瓶中 40 $^{\circ}$ C; 在密封小瓶中 50 $^{\circ}$ C; 在 25 $^{\circ}$ C、RH60%下; 和在 40 $^{\circ}$ C、RH75%下。在 4 周后, 在 40 $^{\circ}$ C 或 50 $^{\circ}$ C 下可以检测出一个或者两个降解峰, 但是每个杂质峰的水平仍然低于 0.02%。

水溶性

a) 雾化制剂, 在 Tris/NaCl 中 5mg/mL, 在室温下贮藏 2 个月, 早期显示出总水平 1% (254nm) 和 2-3% (215nm) 的洗脱降解峰。

b) 在沸水中将雾化制剂加热 20 分钟, 在 254nm 纯度由 99.9% 降到

98.7%，在 215nm 纯度由 100%降到 93.6%。

c) 在 Tris/NaCl/水中的 0.2mg/mL 溶液在中性 pH 下在 2-8℃下至少稳定 1 周。

显而易见，本领域技术人员在不背离本发明的宗旨或范围的情况下可以对本发明进行各种改进和变化。因此，本发明覆盖了附加权利要求书及其等价范围内的本发明提供的这些改进和变化。

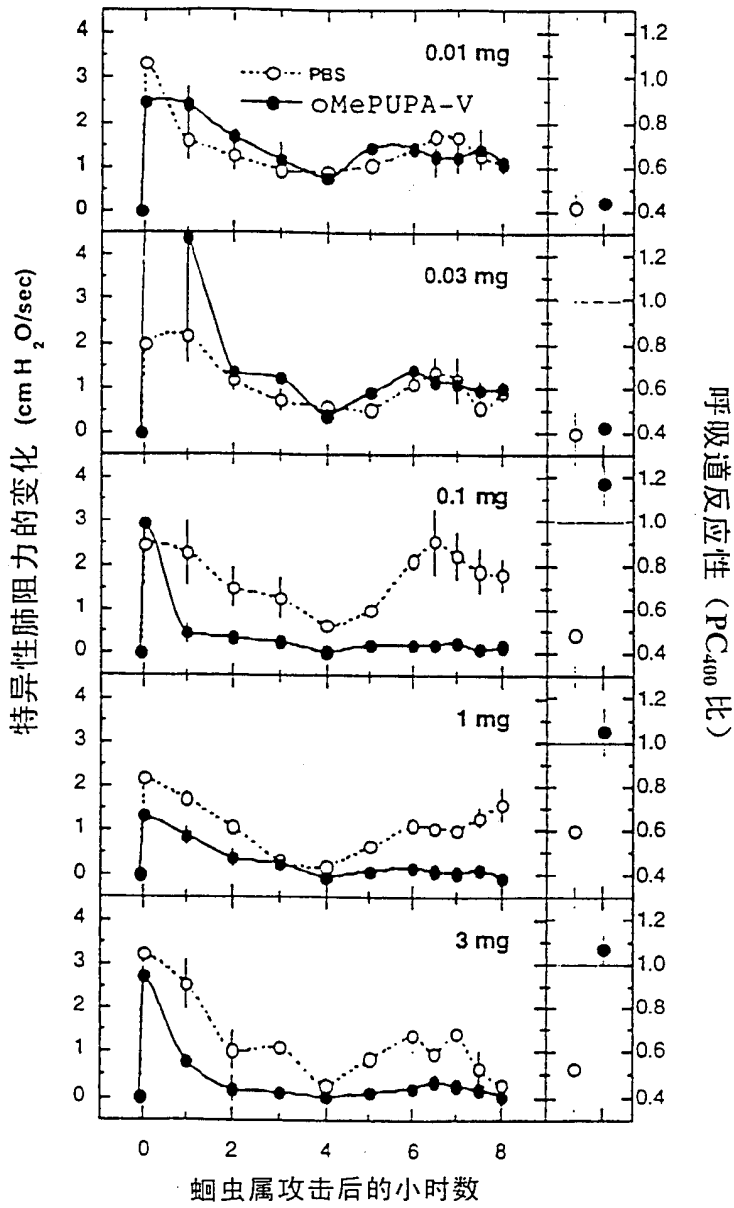


图 1

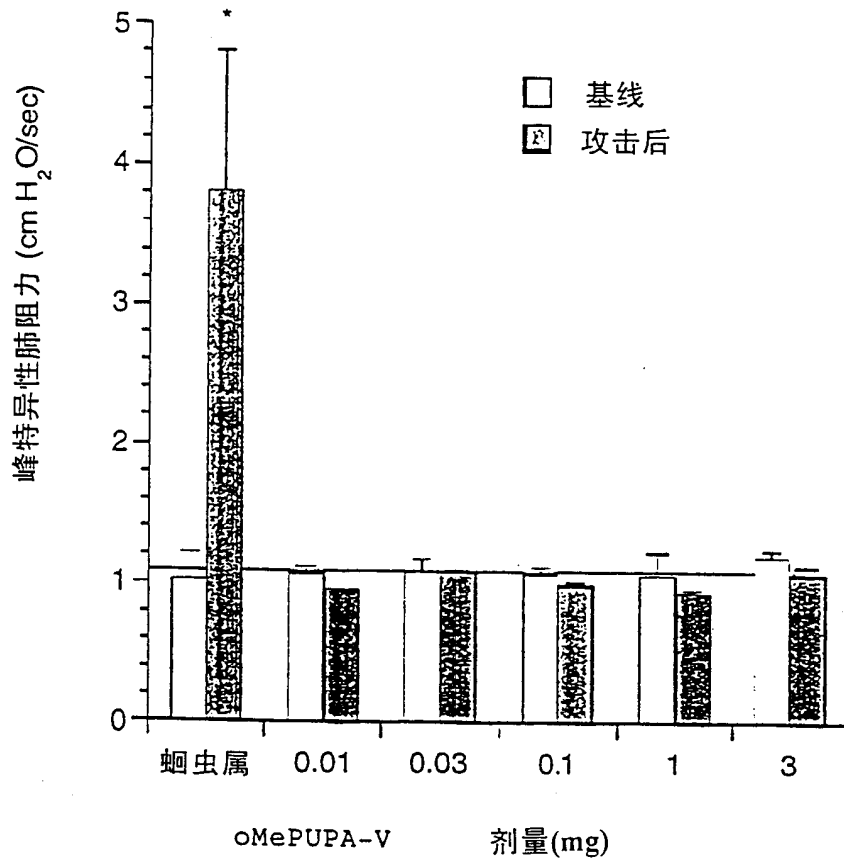


图 2

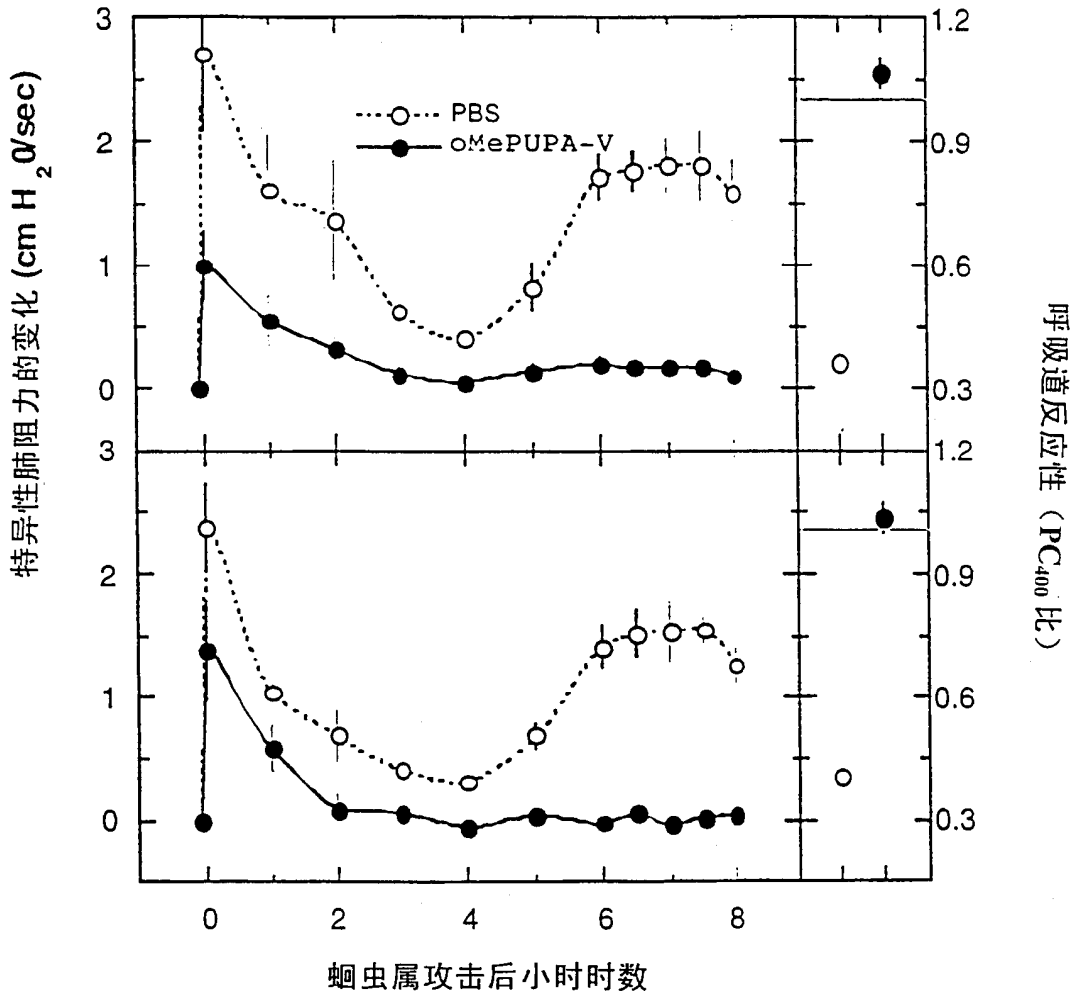


图 3

图 4A

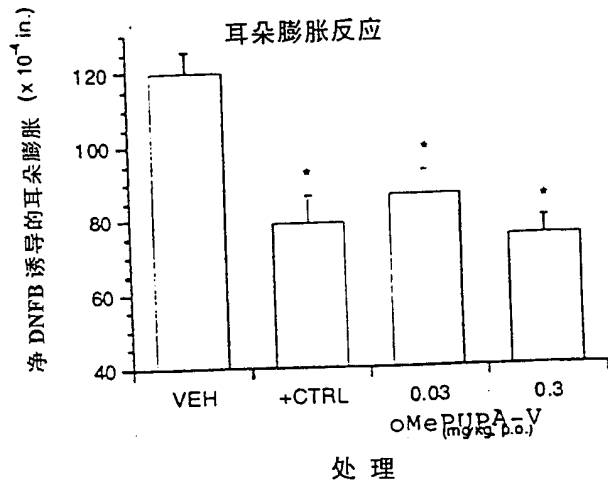


图 4B

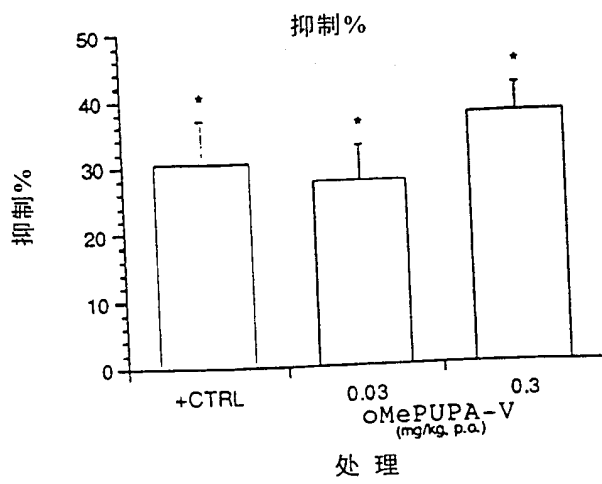


图 4

图 5A

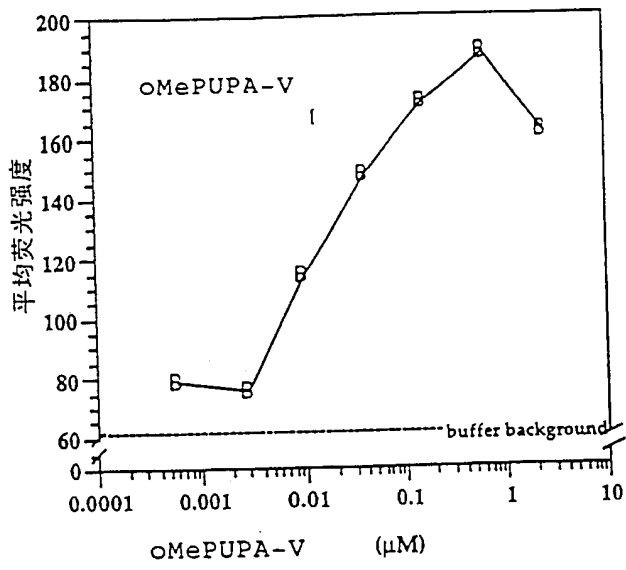


图 5B

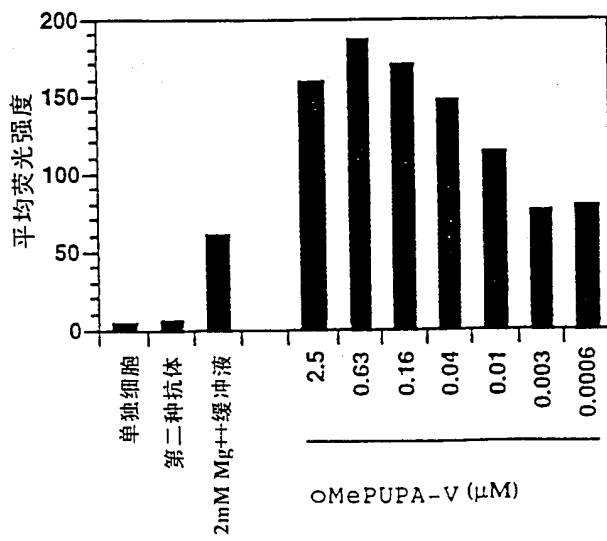


图 5