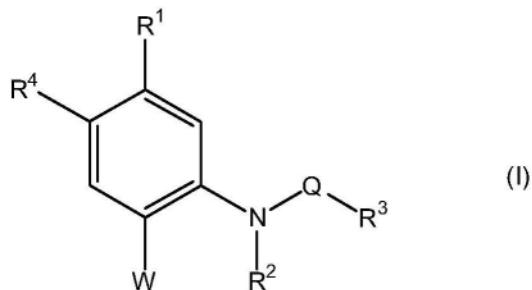


1. 式(I)的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于眼部新生血管形成的剂量依赖性治疗或预防的药物中的用途，



其中：

R¹表示三氟甲基基团；

R²表示氢原子；

R³表示任选地被选自以下的取代基取代的呋喃基：C₁₋₆烷基、氰基、或者2-吡啶基或3-吡啶基或4-吡啶基；

R⁴表示氢原子；

Q表示-C(O)-；

W表示4-吗啉基、或任选地具有一个或多个取代基的1-哌嗪基，其中，所述一个或多个取代基可以选自以下中的一个或多个：氰基，羧基，氧化或C₁₋₆烷基；并且

所述眼部新生血管形成的治疗或预防选自年龄相关性黄斑变性、非炎性眼部疼痛、眼部血管疾病、恶性和良性眼部肿瘤生长和转移、眼部炎性疾病、糖尿病性视网膜病变、沙眼、晶状体后增生、新生血管性青光眼、植入角膜组织的免疫排斥、增殖性视网膜病变、水肿和黄斑营养不良的治疗或预防。

2. 如权利要求1所述的化合物的用途，其中所述药物用于眼部新生血管形成的局部治疗或预防。

3. 如权利要求2所述的化合物的用途，其中所述眼部新生血管形成的局部治疗或预防是剂量依赖性治疗或预防。

4. 如权利要求1所述的化合物的用途，其中所述眼部新生血管形成的治疗或预防是年龄相关性黄斑变性的治疗或预防。

5. 如权利要求1、2或3所述的化合物的用途，其中所述眼部新生血管形成的治疗或预防是糖尿病性视网膜病变的治疗或预防。

6. 包含权利要求1所限定的式(I)的化合物、任选存在的一种或多种其它活性成分以及药学上可接受的载体的药物组合物在制备用于治疗眼部新生血管形成的药物中的用途，其中所述药物为适于眼内注射的形式，并且所述眼部新生血管形成的治疗如权利要求1中所定义。

7. 包含权利要求1所限定的式(I)的化合物、任选存在的一种或多种其它活性成分以及药学上可接受的载体的药物组合物在制备用于治疗眼部新生血管形成的药物中的用途，其中所述药物为适于向眼部局部给药的形式，并且所述眼部新生血管形成的治疗如权利要求1中所定义。

8. 如权利要求1所述的化合物的用途或者如权利要求6或7所述的药物组合物的用途，

其中W表示1-哌嗪基或4-甲基-1-哌嗪基或(4-(二甲基氨基)乙基)-1-哌嗪基或(4-(二甲基氨基)丙基)-1-哌嗪基。

9. 如权利要求8所述的化合物的用途或者药物组合物的用途,其中R³表示被3-吡啶基或4-吡啶基取代的呋喃基。

10. 如权利要求1所限定的式(I)的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于哺乳动物个体的抗血管生成治疗的药物中的用途,其中所述抗血管生成治疗是癌症治疗。

11. 如权利要求10所述的化合物的用途,其中W表示1-哌嗪基或4-甲基-1-哌嗪基或(4-(二甲基氨基)乙基)-1-哌嗪基或(4-(二甲基氨基)丙基)-1-哌嗪基。

12. 如权利要求11所述的化合物的用途,其中R³表示被3-吡啶基或4-吡啶基取代的呋喃基。

13. 如权利要求10所述的化合物的用途,其中所述癌症是前列腺癌。

用于治疗眼部新生血管形成的化合物

发明领域

[0001] 本发明涉及抗血管生成治疗以及用于抗血管生成治疗的化合物,所述化合物特别用于以诸如年龄相关性黄斑变性的新生血管形成(neovascularisation)为特征的病况的抗血管生成治疗。

[0002] 本发明还涉及通透性过高(hyperpermeability)病症的治疗以及用于治疗通透性过高病症的化合物。

[0003] 本发明还涉及神经性病症和神经变性病症的治疗以及用于治疗神经性病症和神经变性病症如阿尔茨海默病的化合物。

[0004] 本发明还涉及疼痛治疗以及用于治疗疼痛的化合物。

[0005] 本发明还涉及降低先兆子痫的风险的方法以及用于此类方法的化合物。

发明背景

[0007] 年龄相关性黄斑变性(AMD)是一种影响黄斑中间区域的导致视力丧失的疾病,其是年龄超过50岁的人群失明的主要原因(Bressler, 2004)。渗出性AMD是AMD的最严重的形式(Ferris等人,1984),其主要由黄斑下方的脉络膜循环产生并且以脉络膜新生血管化(CNV)为特征。CNV是新血管由脉络膜到视网膜色素上皮(RPE)的异常生长(Patz等人,1977),其被认为由于在RPE下方的血液和浆液的渗漏而导致视力丧失,所述渗漏最终导致光感受器丧失、视网膜脱落和密集的黄斑瘢痕(Fine等人, 2000; Campochiaro等人, 2006)。血管内皮生长因子(VEGF)是血管生成和血管渗漏的关键因子(Dvorak等人,1995),其在CNV进展中被上调(D' Amore, 1994; Spilsbury等人,2000; Anderson等人,2002; Das等人, 2003),并已成为治疗渗出性AMD的主要治疗靶标。

[0008] VEGF是被选择性剪接以形成多种亚型的家族的复合体基因(Leung等人,1989; Jingjing等人,1999),每一亚型在生物性质、活性和功能方面不同(Houck等人,1991)。大部分细胞通常表达 $VEGF_{121}$ 、 $VEGF_{165}$ 和 $VEGF_{189}$ 亚型,而 $VEGF_{145}$ 和 $VEGF_{206}$ 是相对罕见的。大部分VEGF亚型包含外显子1-5(除了 $VEGF_{111}$ 外(Mineur等人,2007)),但与编码硫酸肝素(HS)结合域的外显子6和7的部分不同。这些外显子用途的改变使选择性剪接的亚型的生物性质发生改变,所述生物性质例如它们与细胞表面硫酸肝素蛋白聚糖结合以及释放血管生成因子的能力(Tischer等人, 1991; Neufeld等人,1999)。

[0009] 在2002年,从近端剪接位点(PSS)到远端剪接位点(DSS)的66个碱基下游显示出第八外显子的差异剪接(Bates等人,2002; Woolard等人, 2004)。该区域中的选择性剪接产生了第二亚型家族($VEGF_{xxx}$ b),以其抗血管生成性质而闻名(Perrin等人,2005)。WO 03/102105(其内容全部援引加入本文)描述了选择性剪接的亚型及其治疗意义。

[0010] 在病理学血管生成过程中,促血管生成亚型被选择性上调(Bates等人,2002; Varey等人,2008; Pritchard-Jones等人,2007),表明 $VEGF_{xxx}$ 和 $VEGF_{xxx}$ b可以具有单独的调节途径。已表明在眼内注射之后,这些抗血管生成亚型如 $VEGF_{165}$ b和 $VEGF_{121}$ b在视网膜和脉络膜的新生血管形成的动物模型中有效地抗血管生成(Hua等人,2008),并且导致内皮和视网膜上皮细胞的细胞保护作用(Magnussen等人,2010)。

[0011] FDA在2004年12月批准的治疗血管生成AMD的第一种疗法是 VEGF₁₆₅、VEGF₁₈₉和 VEGF₂₀₆特异性适体培加尼布钠(Macugen)。在临 床试验期间,培加尼布剂量依赖性降低严 重视敏度下降的风险,并减缓 新生血管AMD的进展(Gragoudas等人,2004),但未导致视力的显著改 善。在2006年,雷珠单抗(Ranibizumab) (Lucentis) (一种新的人源化抗 VEGF抗体片段) 被FDA批准用于新生血管AMD的治疗。该批准是基于 三个临床试验的结果,其中在1 年时,约95%的每月用0.5mg Lucentis 治疗的患者维持视敏度(定义为降低<15个字母),并且≤40%的患者改善 了视力(定义为增加≥15个字母),与其相比,在假对照治疗组中为 11% (Rosenfeld等人,2006;Brown等人,2006;Brown等人,2009)。当前的 治疗方案需要每 月通过眼内注射给药Lucentis (Brown等人,2009; Schmidt-Erfuth等人,2011)。此类眼内 注射导致眼内压增加(Good等人,2010) 以及眼内炎和其他严重副作用的风险(虽然很小) (Jager等人, 2004)。此外,证明bevacizumab(阿瓦斯汀(Avastin)) (一种Lucentis衍生 于其的抗VEGF抗体) 与VEGF₁₆₅等效力地结合VEGF₁₆₅b,由此靶向促 血管生成VEGF亚型和抗血 管生成VEGF亚型(Varey等人,2008)。

[0012] 因为VEGF的抗血管生成亚型和血管生成亚型源自相同的基因,所 以对亚型家族 的控制取决于对选择性剪接的控制。我们最近已经确定 了一些控制VEGF在近端剪接位点 处的剪接的途径,涉及RNA结合蛋白 质SRSF1 (Nowak等人,2008;Amin等人,2011) 及其激酶 SRPK1 (Sanford 等人,2005) 作为细胞使用近端剪接位点并因此产生VEGF的促血管生成 亚型的决定的关键需求 (Nowak等人,2008;Nowak等人,2010)。SRPK1 的敲减(Knockdown) 有效 地降低了肿瘤中VEGF介导的体内血管生成, 并且SRPK1和SRPK2的抑制降低了体内血管生 成(Amin等人,2011)。

[0013] WO 2008/11077、WO 2009/106855、WO 2010/058227、WO 2011/036429和WO 2011/ 148200(其公开内容援引加入本文) 描述了引导 有利于VEGF_{xxx}b亚型的表达的药剂的治疗 及其他生理学用途。SRPK抑 制剂在基本上可以构成此类药剂。

[0014] WO 2005/063293描述了一类SRPK抑制剂,包括SRPIN340及其衍 生物和类似物。

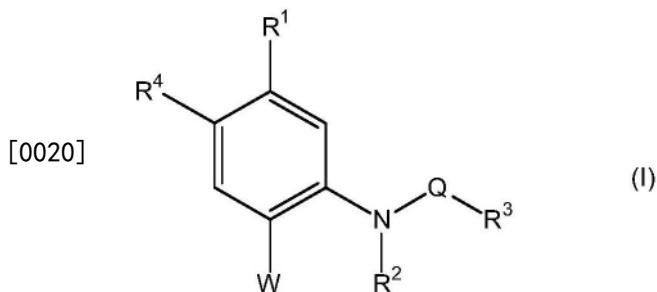
[0015] 用于引导VEGF_{xxx}b亚型的表达的新药剂的开发在治疗例如新生血 管性AMD方面以 及在涉及VEGF_{xxx}b的所有其他疾病方面均代表了新纪 元。

[0016] 本发明部分地基于靶向SRPK1的新的小分子抑制剂,其特别用作抗 血管生成剂、 神经保护剂、用于治疗或预防通透性过高病症的药剂、用 作用于治疗疼痛的药剂、以及用 作用于降低先兆子痫的风险或治疗先兆 子痫的药剂。

[0017] 本发明还至少部分地基于下述令人惊讶的发现,即,已知抑制 SRPK1(例如 SRPIN340及其衍生物和类似物)的低分子量化合物可局部 地或以剂量依赖性方式用于抑 制CNV进展。

[0018] 发明概述

[0019] 在第一方面,本发明提供了式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、溶剂合物、水 合物或前药,其用于眼部新生血管形成的剂量依赖性治疗 或预防,



[0021] 其中：

[0022] R^1 表示氢原子、可具有一个或多个取代基的 C_{1-6} 烷基、可具有一个或多个取代基的 C_{2-6} 烯基、可具有一个或多个取代基的 C_{2-6} 炔基、可具有一个或多个取代基的 C_{6-10} 芳基、卤原子、硝基、氰基、叠氮基、羟基、可具有一个或多个取代基的 C_{1-6} 烷氧基、可具有一个或多个取代基的 C_{1-6} 烷硫基、可具有一个或多个取代基的 C_{1-6} 烷基磺酰基、羧基、甲酰基、可具有一个或多个取代基的 C_{1-6} 烷氧羰基、酰基、酰氨基或氨基磺酰基；

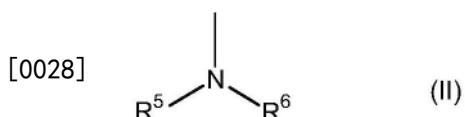
[0023] R^2 表示氢原子、可具有一个或多个取代基的 C_{1-6} 烷基、或可具有一个或多个取代基的芳基；

[0024] R^3 表示可具有一个或多个取代基的 C_{1-6} 烷基、可具有一个或多个取代基的 C_{2-6} 烯基、可具有一个或多个取代基的 C_{6-10} 芳基、可具有一个或多个取代基的含氮杂环、可具有一个或多个取代基的含氧杂环、或可具有一个或多个取代基的稠合芳族杂环；

[0025] R^4 表示氢原子或卤原子；

[0026] Q 表示 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-C(S)NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHC(O)-$ 或 $C(O)NHC(S)-$ ；和

[0027] W 表示氢原子、氨基、可具有一个或多个取代基的 C_{1-6} 烷基、可具有一个或多个取代基的 C_{6-10} 芳基、卤原子、羟基、可具有一个或多个取代基的 C_{1-6} 烷氧基、可具有一个或多个取代基的 C_{1-6} 烷硫基、可具有一个或多个取代基的含氮杂环、可具有一个或多个取代基的稠合芳族杂环、或由下式 (II) 表示的基团：



[0029] 其中 R^5 和 R^6 相同或不同，并且各自表示氢原子、可具有一个或多个取代基的 C_{1-6} 烷基、可具有一个或多个取代基的含氮杂环、可具有一个或多个取代基的稠合芳族杂环基、酰基或酰氨基；

[0030] 或上述 R^5 和 R^6 连同相邻的氮原子可以形成可具有一个或多个取代基的杂环，并且所述杂环可以是可具有一个或多个取代基的稠合芳族杂环；

[0031] 或上述 R^5 和 R^6 可以是可具有一个或多个取代基的亚环烷基氨基、或可具有一个或多个取代基的芳族稠合亚环烷基。

[0032] 所述剂量依赖性优选是例如附图的图4 (左图) 所示类型的S型效力/剂量关系。表述“眼部新生血管形成”在其范围内包括以眼部新生血管形成特征的疾病和病症，包括例如脉络膜新生血管化如年龄相关性黄斑变性。术语“眼部新生血管形成”在其范围内还包括以视网膜新生血管化为特征的疾病和病症。

[0033] 在第二方面，本发明提供了用于局部治疗或预防眼部新生血管形成式的 (I) 的化合物或其药学上可接受的盐、溶剂合物、水合物或前药。

[0034] 本发明的第一和第二方面还提供了通过向需要此类治疗的个体给药 式(I)的化合物来治疗或预防眼部新生血管形成的各方法,以及式(I)的化 合物作为剂量依赖性治疗和/或作为局部治疗在制备用于治疗或预防眼 部新生血管形成的药物中的各用途。

[0035] 令人惊讶且基于现有技术预料不到的是,在本发明中使用的化合物 能够剂量依 赖性治疗或预防眼部新生血管形成或局部地治疗或预防眼部 新生血管形成。剂量依赖性治疗不是固有可预测的,但对于有效治疗是 高度期望且有益的。

[0036] 可以特别提及在WO 2005/063293中所描述的式(I)的具体化合物和 式(I)的化合物的优选或例示的子集以及它们的药学上可接受的盐、溶剂 合物、水合物和前药,以用于本发明。

[0037] 可以提及用于本发明的方法的式(I)的化合物的其他实例是其中R³为可具有一个或多个取代基的含氧杂环、或可具有一个或多个取代基的2-或3-或4-吡啶基的化合物。优选的化合物包括其中R³为被苯基或者 2-或3-或4-吡啶基取代的含氧杂环的化合物,其本身可以如本文所述的 那样被进一步取代。式(I)的这些化合物以及它们的药学上可接受的盐、溶剂合物、水合物或前药是新的,并且作为化合物本身(以及它们剂量依 赖性治疗或预防眼部新生血管形成和/或局部治疗或预防眼部新生血管 形成的用途),它们构成本发明的又一方面。

[0038] 包含所述新化合物的药物组合物以及所述新化合物和包含其的药物 组合物在抗 血管生成治疗(包括治疗和预防以异常或过度血管生成为特 征的病症和疾病)、通透性过高病症的治疗、神经性病症和神经变性病症 的治疗、非炎性疼痛的治疗及降低先兆子痫 的风险的方法中的用途构成 本发明的其他方面。

[0039] 在其中R³为可具有一个或多个取代基的含氧杂环的式(I)的新化 合 物中,R³基团可以是例如:任选地被诸如甲基的C₁₋₆烷基取代的呋喃基, 例如5-甲基-呋喃-2-基;或任选地被各自可具有一个或多个取代基的氰 基、卤素、硝基、甲酰基、2-或3-或4-吡啶基或者苯 基取代的呋喃基。

[0040] 在其中R³为可具有一个或多个取代基的2-或3-或4-吡啶基的式(I) 的新化合物 中,所述可具有一个或多个取代基的2-或3-或4-吡啶基可以 是例如未取代的3-吡啶基 (即,其中吡啶基的氮杂原子与Q基团呈间位)。

[0041] 作为式(I)的新化合物的优选实例,可以提及这样的化合物:其中W 为氨基;或可 具有一个或多个取代基的吗啉基,更特别为未取代的吗啉 -4-基;或可具有一个或多个取代基(例如4-甲基取代基或烷基氨基取代 基)的1-哌嗪基,更特别为4- (二甲基氨基)乙基或4- (二甲基氨基)丙基取 代基。此外,在该组中,可以特别提及这样的化合物:其中R¹为三 氟甲 基,R²和R⁴均为H。

[0042] 为了用于本发明的第一和第二方面,可以提及的特别优选的是: (a) 上述式(I) 的化合物,其中R³为可具有一个或多个取代基的含氧杂环,所 述取代基例如苯基取代基或者 2-或3-或4-吡啶基取代基,或者可具有一个或多个取代基的苯基取代基或者2-或3-或4- 吡啶基, (b) SRPIN340, 其式在附图的图1中示出,以及 (c) 它们的药学上可接受的盐、溶剂合 物、水合物或前药。其中R³为可具有一个或多个取代基的含氧杂环或可 具有一个或多个取代基的2-或3-或4-吡啶基的式(I)的化合物的实例包 括: MVRL09和MVRL10, 其式在附图的图1中示出;以及MVRL16、 MVRL17、SPHINX9、SPHINX10、SPHINX12、SPHINX13和

SPHINX14, 其式在表1中示出。为了避免疑问, 化合物MVRL10、MVRL16和 MVRL17还被分别描述为SPHINX、SPHINX6和SPHINX7。

[0043] 式(I)的化合物以及它们的药学可接受的盐、溶剂合物、水合物和前药还可以下列特征中的一个或多个(无论是单独的或任意组合形式的, 其可与本文所述或W0 2005/063293所述的任意实例和优选项相结合以用于化合物)为特征:

- [0044] 1. R^1 可以表示三氟甲基;
- [0045] 2. R^3 可以表示含氧杂环或者2-或3-或4-吡啶基;
- [0046] 3. R^3 可以表示被苯基或者2-或3-或4-吡啶基取代的含氧杂环;
- [0047] 4. W 可以表示可具有一个或多个取代基的4-吗啉基、或可具有一个或多个取代基的1-哌嗪基;
- [0048] 5. W 可以表示1-哌嗪基或4-甲基-1-哌嗪基或4-(2-(二甲基氨基)乙基)-1-哌嗪基或4-(2-(二甲基氨基)丙基)-1-哌嗪基;
- [0049] 6. 当 R^1 为三氟甲基、 $R^2=R^4=H$ 、 R^3 为4-(3-吡啶基)-呋喃-2-基且 Q 为-C(0)-时, 则 W 不是其中 R^5 或 R^6 为被氨基或取代氨基取代的 C_{1-6} 烷基的由式(II)表示的基团; 和
- [0050] 7. 当 $R^2=R^4=H$ 、 R^3 为4-吡啶基且 W 为N-哌啶基且 Q 为-C(0)-时, 则 R^1 不是氢。
- [0051] 由式(I)表示的化合物包括例如:
 - [0052] (1) 其中上述 R^1 为氢原子、 C_{1-6} 烷基、卤化 C_{1-6} 烷基或卤原子的此类化合物;
 - [0053] (2) 其中上述 R^1 为三氟甲基的此类化合物;
 - [0054] (3) 其中上述 R^2 为氢原子或 C_{1-6} 烷基的此类化合物;
 - [0055] (4) 其中上述 R^2 为氢原子的此类化合物;
 - [0056] (5) 其中上述 R^3 为具有一个或多个取代基的含氮的5-元至10-元杂芳基环或可具有取代基的含氧的5-元至10-元杂芳基环的此类化合物;
 - [0057] (6) 其中上述 R^3 为可具有一个或多个取代基的吡啶环或呋喃环的此类化合物;
 - [0058] (7) 其中上述 R^3 为2-或3-或4-吡啶环的此类化合物;
 - [0059] (8) 其中上述 R^3 为可具有一个或多个取代基的呋喃环的此类化合物;
 - [0060] (9) 其中上述 R^3 为被苯环或吡啶环取代的呋喃环的此类化合物;
 - [0061] (10) 其中上述 R^4 为氢原子的此类化合物;
 - [0062] (11) 其中上述 Q 为-C(0)-或-C(0)NHC(S)-的此类化合物, 其中C(0)表示氧原子与碳原子通过双键连接, 并且C(S)表示硫原子与碳原子通过双键连接;
 - [0063] (12) 其中上述 Q 为-C(0)-的此类化合物;
 - [0064] (13) 其中上述 W 由式(II)表示的此类化合物, 其中 R^5 和 R^6 连同邻近的氮原子形成可具有取代基的杂环基;
 - [0065] (14) 其中上述 W 为可具有 C_{1-6} 烷基作为取代基的具有一个氮原子的4-元至8-元杂环基、可具有 C_{1-6} 烷基作为取代基的包含一个氮原子和一个氧原子的4-元至8-元杂环基、或可具有 C_{1-6} 烷基作为取代基的包含两个氮原子的4-元至8-元杂环基的此类化合物;
 - [0066] (15) 其中上述 W 为可具有 C_{1-6} 烷基作为取代基的包含一个或两个氮原子的4-元至8-元杂环基的此类化合物;
 - [0067] (16) 其中上述 W 为可具有 C_{1-6} 烷基作为取代基的吗啉基的此类化合物;
 - [0068] (17) 其中上述 W 为可具有 C_{1-6} 烷基作为取代基的哌啶基或哌嗪基的此类化合物;

和

[0069] (18) 其中上述W为具有C₁₋₆烷基作为取代基的哌嗪基的此类化合物。

[0070] 在上述化合物中, R¹按次序优选为(1)至(2), 并且(2)是更优选的。R²按次序优选为(3)至(4), 并且(4)是更优选的。R³按次序优选为(5)至(9), 并且(9)是更优选的。Q按次序优选为(11)至(12), 并且(12)是更优选的。W按次序优选为(13)至(18), 并且(18)是更优选的。

[0071] 更优选的化合物由上述式(I)表示, 并且包含取代基类型的任意组合, 对于R¹, 取代基类型各自选自(1)至(2); 对于R², 取代基类型各自为(3)至(4); 对于R³, 取代基类型各自为(5)至(9); 对于R⁴, 取代基类型各自选自(10); 对于Q, 取代基类型各自选自(11)至(12); 或对于W, 取代基类型各自选自(13)至(18)。

[0072] 因此, 特别提及的化合物是式(I)的化合物, 其中:

[0073] R¹为三氟甲基;

[0074] R²和R⁴各自为氢原子;

[0075] R³为各自可具有一个或多个取代基的吡啶环或呋喃环;

[0076] Q为-C(0)-; 和

[0077] W为可具有一个或多个取代基的具有一个氮原子的4-元至8-元杂环基、可具有一个或多个取代基的包含一个氮原子和一个氧原子的4-元至8-元杂环基、或可具有一个或多个取代基的包含两个氮原子的4-元至8-元杂环基。

[0078] 在此类化合物中, 更优选的化合物是式(I)的化合物, 其中:

[0079] R¹为三氟甲基;

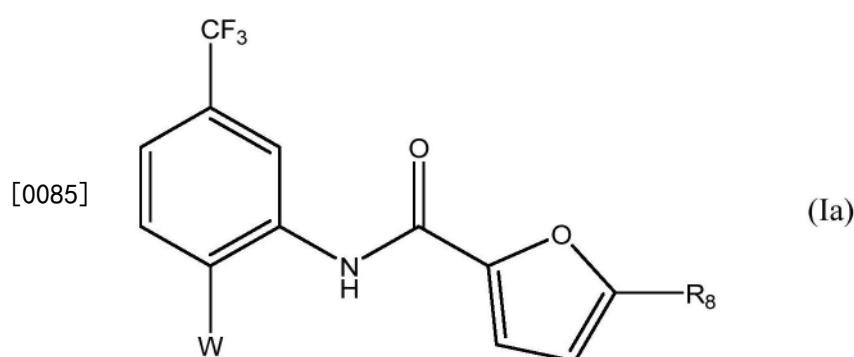
[0080] R²和R⁴各自为氢原子;

[0081] R³为各自可具有一个或多个取代基的吡啶环或呋喃环;

[0082] Q为-C(0)-; 和

[0083] W为各自可具有一个或多个取代基的吗啉基、哌啶基或哌嗪基。

[0084] 特别提及的化合物是式(Ia)的化合物:



[0086] 其中W为可具有一个或多个取代基的具有一个氮原子的4-元至8-元杂环基、可具有一个或多个取代基的包含一个氮原子和一个氧原子的4-元至8-元杂环基、或可具有一个或多个取代基的包含两个氮原子的4-元至8-元杂环基, 并且R₈为氢、氰基、C₁₋₆烷基、苯基或2-、3-或4-吡啶环。由W定义的4-元至8-元杂环基上的取代基可以是别处关于式(I)的化合物所定义的那些取代基。

[0087] 发明详述

[0088] 抗血管生成治疗

[0089] 抗血管生成治疗优选包括对与异常血管生成或促血管生成VEGF_{xxx}型(VEGF_{xxx})的异常过量产生相关的任何疾病或病症的治疗或预防。此类疾病或病症包括例如:血管疾病(例如,血管收缩和以血管收缩为特征的病症,以及心血管疾病)、恶性和良性瘤形成(例如,血管生成依赖性癌症,例如肿瘤癌症)、肿瘤转移、炎性疾病、糖尿病、糖尿病性视网膜病变和糖尿病的其他并发症(例如糖尿病性新生血管形成)、沙眼、晶状体后增生、新生血管性青光眼、年龄相关性黄斑变性、血管瘤、植入角膜组织的免疫排斥、与眼损伤或感染相关的角膜血管生成、奥斯勒-韦伯综合征(Osler-Webber Syndrome)、心肌血管生成、伤口肉芽形成(wound granulation)、毛细血管扩张、血友病关节(hemophiliac joints)、血管纤维瘤、毛细血管扩张、银屑病、硬皮症、脓性肉芽肿、冠状动脉侧枝、缺血性肢体血管生成、潮红、肥胖、关节炎(例如类风湿性关节炎)、血细胞生成、血管发生、齿龈炎、动脉粥样硬化、子宫内膜异位症、血管内皮内细胞过渡增生、银屑病、多毛症和增殖性视网膜病变。本发明的抗血管生成治疗还可以包括对健康个体进行的非治疗性治疗,例如出于美容目的来抑制血管发育。对于与异常血管生成相关的疾病和病症以及抗血管生成治疗的其他细节参见WO 2008/110777,其内容援引加入本文。

[0090] 微血管通透性过高病症、上皮细胞存活的病症和上皮滤过膜窗孔(fenestrations)的病症

[0091] 作为SRPK1抑制剂的本发明化合物还可以用作治疗其中涉及选择性剪接的VEGF_{xxx}b亚型的其他病症的治疗剂。例如,在WO 2010/058227(其内容援引加入本文)中已表明VEGF_{xxx}b对多种微血管通透性过高病症、上皮细胞存活的病症和上皮滤过膜窗孔的病症是有活性的。

[0092] 微血管通透性过高病症、调节VEGF_{xxx}亚型的促血管生成促通透性的病症、上皮细胞存活和通透性的病症和/或上皮滤过膜窗孔的性质方面(例如密度数和/或尺寸)的病症是多种严重的医学病况的基础。

[0093] 此类病况的实例包括例如蛋白尿、尿毒症、微量白蛋白尿、低白蛋白血症、肾超滤(renal hyperfiltration)、肾病综合征、肾衰竭、肺性高血压、毛细血管通透性过高、微动脉瘤、水肿和糖尿病的血管并发症。

[0094] 此类糖尿病的血管并发症的实例包括例如糖尿病性视网膜病变(增殖和非增殖的)和糖尿病性肾病。糖尿病的血管并发症可与I期糖尿病和II期糖尿病相关。

[0095] 蛋白质从血液中损失可能导致其他并发症,例如血栓形成尤其是脑部中的血栓形成,以及对感染的易感性。天然蛋白质从血液中损失可能严重削弱癌症治疗的效力。

[0096] 微血管通透性过高病症可以特别是肾病症,例如GFB的通透性病症,例如足细胞的通透性病症。

[0097] 其中支持上皮细胞存活的治疗会是有效的疾病的实例如下:

[0098] 急性肺纤维化疾病、成人呼吸窘迫综合征、成人呼吸窘迫综合征、晚期癌症、过敏性呼吸道疾病、肺泡损伤、血管生成、关节炎、腹水、哮喘、烧伤后的哮喘或水肿、动脉粥样硬化、自身免疫性疾病、骨质吸收、与表皮下水疱形成相关的大疱性病症(包括大疱性类天疱疮)、心血管病况、与肾小球或肾小球系膜细胞的增殖相关的某些肾疾病、慢性和过敏性炎症、慢性肺疾病、慢性阻塞性肺疾病、硬化、角膜血管生成、角膜疾病、冠状和脑侧枝血

管形成、冠状动脉再狭窄、心脏病后的损伤、疱疹样皮炎、糖尿病、糖尿病性肾病、糖尿病性视网膜病变、内毒素性 休克、多形性红斑、纤维化、肾小球肾炎、血管球性肾炎 (glomerulonephritis)、移植排斥、革兰氏阴性脓毒症、血管瘤、肝硬化、肝功能衰竭、带状疱疹、宿主抗移植植物反应(肾脏、肝脏、心脏和皮肤的 局部缺血再灌注损伤和同种异体移植排斥)、感染的受损伤口愈合、单纯 疱疹感染、来自人免疫缺陷病毒 (HIV) 的感染、炎症、癌症、炎性肠炎(克 罗恩病和溃疡性结肠炎)、炎性病况、支架内再狭窄、支架内狭窄、局部缺血、局部缺血性视网膜静脉闭塞、局部缺血性视网膜病变、卡波济氏 肉瘤、瘢痕疙瘩、在急性炎症期间的肝脏疾病、肺同种异体移植植物排斥(闭 塞性支气管炎)、淋巴样恶性肿瘤、早产儿黄斑变性视网膜病变、骨髓增 生异常综合征、心肌血管生成、新生血管性青光眼、非胰岛素依赖型糖 尿病 (NIDDM)、闭塞性细支气管炎、眼部病况或疾病、与视网膜血管增 生相关的眼疾病、奥斯勒-韦伯-朗迪病 (Osier-Weber-Rendu disease)、骨关节炎、卵巢过度刺激综合征、佩吉特氏病、胰腺炎、类天疱疮、多囊性 肾病、息肉、绝经后骨质疏松症、先兆子痫、银屑病、肺水肿、肺纤维 化、肺结节病、再狭窄、再狭窄、视网膜病变(包括糖尿病性视网膜病变)、早产儿视网膜病变和年龄相关性黄斑变性;类风湿关节炎、类风湿关节 炎、潮红、结节病、脓毒症、中风、滑膜炎、系统性红斑狼疮、甲状腺 炎 (thyroiditis)、血栓性微血管综合征 (thrombocytopenic purpura syndromes)、移植排斥、创伤、肿瘤相关的血管生成、血管移植再狭窄、血管移植 物再狭窄、von Hippel Lindau病、伤口愈合。

[0099] 本发明可以用于治疗黄斑营养不良。其包括:斯特格病/眼底黄色斑 点症;斯特格样 (Stargardt-like) 黄斑营养不良;斯特格样黄斑营养不良; 常染色体显性“牛眼”黄斑营养不良;Best黄斑营养不良;成人卵黄状变 性;Pattern营养不良;Doyne蜂窝状视网膜营养不良;北卡罗莱纳州黄 斑营养不良;类似MCDR1的常染色体显性黄斑营养不良;与耳聋有关的北卡罗莱纳州样黄斑营养不良;渐进性双焦脉络膜视网膜萎缩;索斯 比眼底营养不良;中央晕轮状脉络膜营养不良;显性囊样黄斑营养不良; 青少年视网膜劈裂症;隐性黄斑营养障碍;非家族隐性黄斑营养障碍。

[0100] 所述病症特别可以是视网膜上皮的病症,例如地图样萎缩 (geographic atrophy) 或年龄相关性黄斑变性。

[0101] 对于微血管通透性过高病症、上皮细胞存活的病症和上皮滤过膜窗 孔的病症及其治疗的其他细节参见WO 2010/058227,其内容援引加入本 文。

[0102] 神经性病症和神经变性病症

[0103] 作为SRPK1抑制剂的本发明化合物还可以用作治疗其中涉及选择 性剪接的 VEGF_{xxx}b 亚型的其他病症的治疗剂。例如,在WO 2009/106855 (其内容援引加入本文) 中已表明 VEGF_{xxx}b 具有神经保护和神经再生作 用。

[0104] 本发明所要治疗或预防的神经性病症包括神经性疼痛以及糖尿病性 和其他神经病。

[0105] 本发明所要治疗或预防的神经变性病症包括认知型和非认知型神经 变性、神经肌肉变性、运动感觉神经变性、眼神经变性。

[0106] 预期 VEGF_{xxx}b 家族的蛋白质的活性主动地预防且主动地逆转病况 和病症。

[0107] 此外,因为轻度认知功能障碍通常与某类健康人群(例如老年人、处 于压力下的人、疲劳或疲惫的人)的正常状态相关,因此本发明还适用于 健康人群的非治疗性治疗以

调节或正常化他们的认知功能和行为,包括 思考、记忆、学习、集中和推理。

[0108] 此外,因为神经再生可以有助于正常化具有精神病学或行为学异常 的个体的脑神经网络(无论这些是否可被诊断为一种或多种确定的精神 病学病况),所以本发明还适用于具有神经病学病症的人的治疗性治疗以 及身体健康的人的非治疗性治疗以将他们的认知和行为调节到正常状态。

[0109] 例如,本发明提供了对下述病况的治疗或预防:疼痛(例如,神经性 疼痛)、痴呆、年龄相关性认知损伤、阿尔茨海默病、阿尔茨海默型老年 性痴呆(SDAT)、Lewy体痴呆、血管性痴呆、帕金森氏病、脑炎后帕金 森症、抑郁症、精神分裂症、肌营养不良(包括面肩膀型肌营养不良(FSH)、杜氏肌营养不良、贝克肌营养不良和布鲁斯肌营养不良)、富克斯营养不良、强直性肌营养不良、角膜营养不良、反射性交感神经营养不良综合 征(RSDSA)、神经血管营养不良、重症肌无力、兰伯特伊顿病、亨廷顿 氏病、运动神经元疾病(包括肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、多发性硬化、位置性低血压、创伤性神经病或神经变性如中风后或意外事故后(例如, 创伤性头部损伤或脊髓损伤))、Batten病、科凯恩综合征、唐氏综合征、皮质基底神经节变性、多系统萎缩症、大脑萎缩、橄榄体脑桥小脑萎缩、齿状核红核萎缩、苍白球丘脑下部核萎缩、脊髓延髓萎缩、视神经炎、硬化性全脑炎(SSPE)、注意力缺陷紊乱、病毒感染后脑炎、脊髓灰质炎 后综合征、华氏综合征、朱伯特综合征、格林-巴利综合征、无脑回畸形、烟雾病、神经元移行异常、自闭症综合征(autistic syndrome)、多聚谷氨 酰胺疾病、尼曼-皮克病、进行性多灶性白质脑病、假性脑瘤、雷弗苏姆 病、Zellweger综合征、核上性麻痹、弗里德赖希共济失调、2型脊髓小 脑性共济失调、Rhett综合征、Shy-Drager综合征、结节性硬化症、匹克 氏病、慢性疲劳综合征、神经病(包括遗传性神经病、糖尿病性神经病和 有丝分裂性神经病)、基于朊病毒的神经变性(包括克雅氏病(CJD)、变异 型CJD、新变异型CJD)、牛海绵状脑病(BSE)、GSS、FFI、库鲁病和阿 尔佩斯综合症、约瑟夫病、急性播散性脑脊髓炎、蛛网膜炎、中枢神经 系统血管病变、肢体神经元功能(extremity neuronal function) 丧失、夏科- 马里-图思病、球形细胞脑白质营养不良、脑白质营养不良、心衰易感性、哮喘、癫痫、听觉神经变性、黄斑变性、色素性视网膜炎和青光眼诱导 的视神经变性。

[0110] 一般而言,精神障碍不被诊断为“精神病学病症”,除非相关的行为 或思想使个体产生显著的痛苦或破坏他或她的日常机能。因此,在可诊 断的病症与类似但不那么严重或 不那么有破坏性的心理功能之间存在着 边界线,对其的治疗应认为是非治疗性的(参见下文)。

[0111] 本发明所关注的精神病学病症的实例包括但不限于:焦虑症(例如, 急性应激障 碍、惊恐病、广场恐怖症、社交恐怖症、特异恐怖症、强迫 性障碍、性焦虑症、创伤后应激障 碍、躯体变形障碍和广泛性焦虑症)、儿童期病症(例如,注意力缺陷多动障碍(ADHD)、 Asperger障碍、孤独 症障碍、行为障碍、对立违抗性障碍、分离焦虑障碍和图雷特氏障碍)、进食障碍(例如,神经性厌食症和神经性贪食症)、情绪障碍(例如,抑郁 症、严重抑郁障碍、双相型障碍(躁狂抑郁症)、季节性情感障碍(SAD)、循环情感性障碍和心境恶劣障碍)、睡眠障碍、认知精神病症(例如,谵 妄、遗忘症)、人格障碍(例如,偏执型人格障碍、分裂样人格障碍、精 神分裂型人格障碍、反社会型人格障碍、边缘型人格障碍、表演型人格 障碍、自恋型人格障碍、回避型人格障碍、依赖型人格障碍和强迫型人 格障碍)、精神病症(例如,精

神分裂症、妄想症、短时精神障碍、精神 分裂症样精神障碍、情感性分裂症和感应性精神病症)、以及物质相关性 障碍(例如,酒精依赖、安非他明依赖、大麻依赖、可卡因依赖、致幻剂依赖、吸入剂依赖、尼古丁依赖、阿片类药物依赖、苯环利定依赖和镇 静剂依赖)。

[0112] 对于神经性和神经变性病症及其治疗的其他细节参见WO 2009/106855,其内容援引加入本文。

[0113] 疼痛治疗

[0114] 作为SRPK1抑制剂的本发明化合物还可以用作治疗其中涉及选择 性剪接的 VEGF_{xxx}b亚型的其他病症的治疗剂。例如,在WO 2011/148200 (其内容援引加入本文) 中已表明VEGF_{xxx}b在哺乳动物中具有对 VEGFR2-介导的非炎性疼痛的镇痛作用。

[0115] 本发明所要治疗或预防的VEGFR2-介导的非炎性疼痛包括其中 VEGFR2受体涉及疼痛的诱因或传递的非炎性神经性和伤害性疼痛。例 如,本发明的化合物对非炎性异常性疼痛和疼痛有活性(抗异常性疼痛和 镇痛活性)。该类型的疼痛状态包括无论是间歇形式或持久形式的慢性疼 痛。此类疼痛状态可以包括例如腰痛,神经痛,非典型疼痛如非典型性 面痛,术后、损伤后(例如,手术后或引起神经损伤的外伤后)、或与癌 症相关或与癌症治疗如细胞毒性治疗或放射治疗相关的疼痛,或与糖尿 病(糖尿病性神经病、胰岛素神经炎)或其他全身性或自身免疫性疾病或 病理或其治疗、酒精中毒或HIV感染相关的神经病, 老化相关的神经病, 或原因不明的神经病。

[0116] 预测VEGFR2激动剂(例如VEGF_{xxx}b家族)的蛋白质的活性主动地预 防且主动地逆转VEGFR2-介导的非炎性疼痛。

[0117] 然而,鉴于VEGF_{xxx}b家族的蛋白质的抗血管生成活性,本发明的 化合物的用途会被限于在血管生成的可能的抑制不会对患者有害的情形 中的疼痛。鉴于全VEGFR2激动剂的可能的促血管生成活性,全VEGFR2 激动剂的用途会被限于在血管生成的可能的刺激不会对患者有害的情形 中的疼痛。

[0118] 在本发明中使用的化合物可以与一种或多种不同的疼痛治疗剂一起 使用,从而使得使用所述一种或多种不同的疼痛治疗剂治疗(或共同治疗) 的个体对疼痛的敏感性正常化。术语“正常化”意指使个体的疼痛敏感性 移向正常水平,并且可以包括敏感性增强, 条件是该一种或多种不同的 疼痛治疗剂导致感觉方面或对疼痛的敏感性方面的过度降低。该一种或 多种不同的疼痛治疗剂可以选自当前已知的或尚未设计出的疼痛治疗 剂。此类选择会完全在本领域普通技术人员的范围内。此类联合治疗可 以精细控制个体的疼痛敏感性并且使个体的特定病况和需求的总体副作 用最小化。

[0119] 对于疼痛及其治疗的其他细节参见WO 2011/148200,其内容援引加 入本文。

[0120] 先兆子痫风险的降低

[0121] 作为SRPK1抑制剂的本发明化合物还可以用作治疗其中涉及选择 性剪接的 VEGF_{xxx}b亚型的其他病症的治疗剂。例如,在WO 2011/036429 (其内容援引加入本文) 中已表明,怀孕的雌性哺乳动物中降低的 VEGF_{xxx}b水平增加雌性哺乳动物出现先兆子痫的风险。因此,本发明的 化合物可以用于增加怀孕的雌性哺乳动物中的VEGF_{xxx}b水平,从而降低雌性哺乳动物出现先兆子痫或与其相关的并发症的风险,或降低雌性 哺乳动物的胎儿出现与母体先兆子痫相关的胎儿或新生儿缺陷的风险。

[0122] 人类中的先兆子痫可以早至怀孕20周出现。在怀孕约34周之前出 现的先兆子痫

通常称为“早期先兆子痫”或“早发型先兆子痫”。在怀孕约 34周之后出现的先兆子痫通常称为“晚期先兆子痫”或“晚发型先兆子 痫”。

[0123] 此外,根据英国皇家妇产科医师学会(United Kingdom Royal College of Obstetricians and Gynaecologists)建立的标准,先兆子痫可以分类为“重 度先兆子痫”。在这些标准下,患有“重度先兆子痫”的患者会具有大于 169mmHg的收缩期血压(BP)或大于109mmHg的舒张期BP和大于1 g/24h的蛋白尿;或会表现出HELLP综合征(溶血、升高的肝酶以及低血 小板计数)的出现。

[0124] 对于先兆子痫以及降低怀孕的雌性哺乳动物出现先兆子痫或与其相 关的并发症的风险、或降低雌性哺乳动物的胎儿出现与母体先兆子痫相 关的胎儿或新生儿缺陷的风险的方法的其他细节参见WO 2011/036429, 其内容援引加入本文。

[0125] 活性化合物

[0126] 本发明的化合物可以由式(I)来定义,并且已经证明为激酶SRPK1 和SRPK2中的一种或二者的抑制剂,由此可用于本文所述的治疗。

[0127] WO 2005/063293(整体援引加入本文,特别参考具体例示的化合物 和优选位置)描述了作为抗病毒剂的已知SRPK抑制剂SRPIN-1(在本文 也称为SRPIN340) 及其类似物。

[0128] 可以通过任何已知的方法合成本发明的化合物。可以根据需要来调 整WO 2005/063293所公开的合适的方法。

[0129] 联合给药

[0130] 若需要,本发明的化合物可以与一种或多种其他的活性剂联合给药, 所述其他活性剂例如选自但不限于以下的一种或多种药剂:胆碱酯酶抑 制剂、多巴胺激动剂(例如L-多巴)、COMT抑制剂、MAO-B抑制剂、抗 胆碱能药物、乙酰胆碱激动剂、血清素激动剂、AMPA受体激动剂、GABA 受体激动剂、NMDA受体激动剂、 β -肾上腺素受体激动剂、地高辛、多 巴酚丁胺、抗炎药、神经营养因子、他汀类药物、腺苷A2a受体拮抗剂、醛糖还原酶抑制剂、免疫调节剂、大麻素激动剂、干扰素或三环抗抑郁 药。

[0131] 定义

[0132] 在本文的式(I)的定义中:

[0133] “ C_{1-6} 烷基”是指包含1个至6个碳原子的直链或支链烷基,其可以 是通过从由1至6个碳组成的脂族烃去除任意的氢原子而衍生的单价基 团。具体地, C_{1-6} 烷基包括例如甲基、乙基、1-丙基、2-丙基、2-甲基-1- 丙基、2-甲基-2-丙基、1-丁基、2-丁基、1-戊基、2-戊基、3-戊基、2-甲 基-1-丁基、3-甲基-1-丁基、2-甲基-2-丁基、3-甲基-2-丁基、2,2-二甲基 -1-丙基、1-己基、2-己基、3-己基、2-甲基-1-戊基、3-甲基-1-戊基、4- 甲基-1-戊基、2-甲 基-2-戊基、3-甲基-2-戊基、4-甲基-2-戊基、2-甲基-3- 戊基、3-甲基-3-戊基、2,3-二甲基-1-丁基、3,3-二甲基-1-丁基、2,2-二甲 基-1-丁基、2-乙基-1-丁基、3,3-二甲基-2-丁基和2,3-二甲基-2-丁基;

[0134] “ C_{2-6} 烯基”是指包含2至6个碳的直链或支链烯基。具体地, C_{2-6} 烯 基包括例如乙烯基、烯丙基、1-丙烯基、2-丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、3-丁烯基、戊烯基和己烯基;

[0135] “ C_{2-6} 炔基”是指包含2至6个碳的直链或支链炔基。具体地, C_{2-6} 炔 基包括例如乙炔基、1-丙炔基、2-丙炔基、丁炔基、戊炔基和己炔基。

[0136] “ C_{1-6} 烷氧基”是指与上文定义的“ C_{1-6} 烷基”连接的氧基。具体地, C_{1-6} 烷氧基包括例

如甲氧基、乙氧基、1-丙氧基、2-丙氧基、2-甲基-1-丙氧基、2-甲基-2-丙氧基、1-丁氧基、2-丁氧基、1-戊氧基、2-戊氧基、3-戊氧基、2-甲基-1-丁氧基、3-甲基-1-丁氧基、2-甲基-2-丁氧基、3-甲基-2-丁氧基、2,2-二甲基-1-丙氧基、1-己氧基、2-己氧基、3-己氧基、2-甲基-1-戊氧基、3-甲基-1-戊氧基、4-甲基-1-戊氧基、2-甲基-2-戊氧基、3-甲基-2-戊氧基、4-甲基-2-戊氧基、2-甲基-3-戊氧基、3-甲基-3-戊氧基、2,3-二甲基-1-丁氧基、3,3-二甲基-1-丁氧基、2,2-二甲基-1-丁氧基、2-乙基-1-丁氧基、3,3-二甲基-2-丁氧基和2,3-二甲基-2-丁氧基；

[0137] “C₁₋₆烷硫基”是指与上文定义的“C₁₋₆烷基”连接的硫基。具体地，“C₁₋₆烷硫基”包括例如甲硫基、乙硫基、1-丙硫基、2-丙硫基、丁硫基和戊硫基；

[0138] “C₁₋₆烷氧羰基”是指与上文定义的“C₁₋₆烷氧基”连接的羰基。具体地，C₁₋₆烷氧羰基包括例如甲氧基羰基、乙氧基羰基、1-丙氧基羰基和2-丙氧基羰基；

[0139] “C₁₋₆烷基磺酰基”是指与上文定义的“C₁₋₆烷基”连接的磺酰基。具体地，C₁₋₆烷基磺酰基包括例如甲基磺酰基、乙基磺酰基、1-丙基磺酰基和2-丙基磺酰基。

[0140] “卤原子”是指氟原子、氯原子、溴原子或碘原子；

[0141] “C₆₋₁₀芳基”是指包含6至10个碳原子的芳族环烃基。具体地，C₆₋₁₀芳基包括例如苯基、1-萘基和2-萘基。

[0142] “杂环”是指在环内可包含双键的芳族或非芳族环，其中构成该环的原子中的至少一个(例如一个或两个)是杂原子；

[0143] “含氮杂环”是指在环内可包含双键的芳族或非芳族环，其中构成该环的原子中的至少一个(例如一个或两个)是氮原子；

[0144] “含氧杂环”是指在环内可包含双键的芳族或非芳族环，其中构成该环的原子中的至少一个(例如一个或两个)是氧原子；

[0145] “杂原子”是指硫原子、氧原子或氮原子；

[0146] “含氮的5-元至10元杂芳基环”是指其中5至10个原子构成该环的芳族环，其中构成该环的原子中的至少一个是氮原子，并且还可以包含一个或多个除了氮原子之外的杂原子。具体地，含氮的5-元至10-元杂芳基环包括例如吡啶环、吡咯环、噁唑环、异噁唑环、噻唑环、异噻唑环、吲哚环、异吲哚环、咪唑环、三唑环、吡唑环、哒嗪环、嘧啶环、吡嗪环、喹啉环、异喹啉环和苯并咪唑环。“5-元至10-元杂芳基环”优选包括吡啶环、吡咯环和咪唑环，并且最优选包括吡啶环。

[0147] “含氮的5-元和10-元杂芳基”是指通过从上文定义的“5-元和10-元杂芳基环”去除一个或两个任意的氢原子而衍生的单价或二价基团。具体地，含氮的5-元和10-元杂芳基包括例如吡啶基、吡咯基、噁唑基、异噁唑基、噻唑基、异噻唑基、吲哚基、异吲哚基、咪唑基、三唑基、吡唑基、哒嗪基、嘧啶基、吡嗪基、喹啉基、异喹啉基和苯并咪唑基；

[0148] “含氧的5-元至10元杂芳基环”是指其中5至10个原子构成该环的芳族环，其中构成该环的原子中的至少一个是氧原子，并且还可以包含一个或多个除了氧原子之外的杂原子。

[0149] “4-元至8-元杂环”是指满足下列定义的非芳族环：

[0150] 1.4至8个原子构成该环；

[0151] 2.构成该环的原子中的一个或两个是杂原子；

- [0152] 3. 在该环中可以包含一个或两个双键；
- [0153] 4. 在该环中可以包含一个至三个羰基；以及
- [0154] 5. 该环是单环。
- [0155] 4-元至8-元杂环优选是包含作为杂原子的氮原子的4-元至8-元杂环。
- [0156] 具体地，4-元至8-元杂环包括例如吖丁啶环、吡咯烷环、哌啶环、氮杂环庚烷环、吖辛因环、呋喃环、四氢吡喃环、吗啉环、硫代吗啉环、哌嗪环、噻唑烷环、二噁烷环、咪唑啉环和噻唑啉环。“4-元至8-元杂环”优选包括吡咯烷环、哌啶环、吗啉环和哌嗪环；
- [0157] “4-元至8-元杂环基”是指通过从上文定义的“4-元至8-元杂环”去除一个或两个任意的氢原子而衍生的单价或二价基团。具体地，4-元至8-元杂环基包括例如吖丁啶基、吡咯烷基、哌啶基、氮杂环庚烷基、吖辛因基、呋喃基、四氢吡喃基、吗啉基、硫代吗啉基、哌嗪基、噻唑烷基、二噁烷基、咪唑基和噻唑基；
- [0158] “稠合芳族杂环”是指其中杂环部分与诸如苯环的芳族环稠合(例如邻位稠合)的环结构。杂环部分是上文定义的杂环。
- [0159] “稠合芳族杂环基”是指其中杂环部分与诸如苯环的芳族环稠合(例如邻位稠合)的环结构。杂环部分是上文定义的杂环基。
- [0160] 稠合芳族杂环基包括例如二氢吲哚基、异二氢吲哚基和1,2,3,4-四氢喹啉。
- [0161] 在本文中，“卤化C₁₋₆烷基”是指其中在上文定义的“C₁₋₆烷基”中的至少一个任意的氢原子被上文定义的“卤原子”取代的基团。卤化C₁₋₆烷基包括例如三氟甲基、二氟甲基和单氟甲基。
- [0162] 在本文中，短语“可具有一个或多个取代基”表示某一基团或化合物可以任选地在可取代位置处具有一个或多个取代基的任意选择或组合。具体地，取代基可以包括例如选自以下中的一个或多个的原子或基团：卤素、羟基、巯基、硝基、氰基、甲酰基、羧基、三氟甲基、三氟甲氧基、氨基、氧代、亚氨基、C₁₋₆烷基(例如甲基)、C₁₋₆烷氧基(例如甲氧基)、杂芳基、苯基，或被卤素、羟基、巯基、硝基、氰基、甲酰基、羧基、三氟甲基、三氟甲氧基、氨基、氧代、亚氨基、C₁₋₆烷基(例如甲基)或C₁₋₆烷氧基(例如甲氧基)中的一个或多个取代的苯基或杂芳基。
- [0163] “盐”不受特别的限制，只要其是由本发明的化合物形成的药学上可接受的盐。此类盐包括例如无机酸盐、有机盐、无机碱盐、有机碱盐以及酸性或碱性氨基酸盐。优选的无机酸盐的实例包括：盐酸盐、氢溴酸盐、硫酸盐、硝酸盐和磷酸盐。优选的有机盐的实例包括：乙酸盐、琥珀酸盐、延胡索酸盐、马来酸盐、酒石酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐、硬脂酸盐、苯甲酸盐、甲磺酸盐和对甲苯磺酸盐。
- [0164] 优选的无机碱盐的实例包括：碱金属盐，例如钠盐和钾盐；碱土金属盐，例如钙盐和镁盐；铝盐；以及铵盐。优选的有机碱盐的实例包括：二乙胺盐、二乙醇胺盐、葡甲胺盐以及N,N'-二苄基乙二胺盐。
- [0165] 优选的酸性氨基酸盐的实例包括：天冬氨酸盐和谷氨酸盐。优选的碱性氨基酸盐的实例包括：精氨酸盐、赖氨酸盐和鸟氨酸盐。
- [0166] 当在空气中放置时，本发明的化合物有时吸收水份，并且有时与吸收的水结合或转化成水合物。本发明也包括此类水合物。
- [0167] 此外，本发明的化合物有时吸收一些其他溶剂而转化成溶剂合物。本发明也包括

此类溶剂合物。

[0168] 任何有机溶剂原则上均可以用于制备本发明的化合物的溶剂合物。

[0169] 溶剂合物可以还包含水与一种或多种有机溶剂。

[0170] 因此,例如,溶剂可以选自酮、醇、醚、酯、芳族溶剂,以及若可能的话选自它们彼此的混合物、它们与其他有机溶剂和/或与水的混合物。

[0171] 式(I)的化合物的药学上可接受的前药形式可用于本发明。“药学上可接受的前药”表示化合物的下述前药,其在合理的医学和兽医判断的范围内适用于与人类和低等动物的组织接触而没有过度的毒性、刺激、过敏反应等,与合理的受益/风险比相称、并且对于它们的期望用途是有效的,以及若可能的话是化合物的两性离子形式。术语“前药”表示例如通过在血液中水解而在体内迅速转变以产生上述式的母体化合物的化合物。可以迅速转变的官能团通过代谢分裂而在体内形成一类可与羧基反应的基团。由于化合物的可代谢分裂的基团体内分裂的容易性,因此携带此类基团的化合物用作前药。对前药的深入探讨在以下文献中提供:Design of Prodrugs, H. Bundgaard, ed., Elsevier, 1985; Methods in Enzymology, K. Widder等人, Ed., Academic Press, 42, p. 309-396, 1985; A Textbook of Drug Design and Development, Krogsgaard-Larsen and H. Bundgaard, ed., Chapter 5; Design and Applications of Prodrugs p. 113-191, 1991; Advanced Drug Delivery Reviews, H. Bundgaard, 8, p. 1-38, 1992; Journal of Pharmaceutical Sciences, 77, p. 285, 1988; Chem. Pharm. Bull., N. Nakaya 等人, 32, p. 692, 1984; Pro-drugs as Novel Delivery Systems, T. Higuchi and V. Stella, Vol. 14 of the A.C.S. Symposium Series, and Bioreversible Carriers in Drug Design, Edward B. Roche, ed., American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987, 其援引加入本文。

[0172] 组合物及给药

[0173] 本发明的化合物可以以包含所述活性剂和任意合适的其他组分的组合物形式给药。组合物可以例如是适用于局部给药(例如滴眼剂或乳膏剂或洗剂)或肠胃外给药(例如注射、植入或输注)的药物组合物(药物)。或者,组合物可以例如为食品、食品补充剂、饮料或饮料补充剂。

[0174] 在本发明的上下文中的术语“药物组合物”或“药物”意指包含活性剂并额外地包含一种或多种药学上可接受的载体的组合物。根据给药方式和剂型的性质,组合物还可以包含选自例如稀释剂、辅剂、赋形剂、载剂、防腐剂、填充剂、崩解剂、湿润剂、乳化剂、助悬剂、甜味剂、调味剂、芳香剂、抗菌剂、抗真菌剂、润滑剂和分散剂的成分。组合物可以采用例如以下的形式:片剂、糖锭剂、散剂、酏剂、糖浆剂、包括混悬剂在内的液体制剂、喷雾剂、吸入剂、片剂、锭剂、乳剂、溶液剂、扁囊剂、颗粒剂、胶囊剂和栓剂、以及用于注射的液体制剂(包括脂质体制剂)。技术和配方通常在最新版Remington, The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Co., Easton, PA中得到。

[0175] 液体形式制剂包括溶液剂、混悬剂和乳剂。作为实例可以提及用于肠胃外注射或局部给药的水溶液剂或水-丙二醇溶液剂。液体制剂还可以在聚乙二醇水溶液中配制为溶液剂。

[0176] 本发明还包括固体形式制剂,其旨在使用前即刻转化成用于局部给药、口服给药或肠胃外给药的液体形式制剂。此类液体形式包括溶液剂、混悬剂和乳剂。这些特定的固

体形式制剂最适宜地以单位剂量形式提供，并且由此用于提供单一的液体剂量单位。或者，可以提供足够的固体，从而在转化成液体形式之后，可以通过例如使用注射器、茶匙或其他测定体积的容器或装置来测量预定体积的液体形式制剂，从而获得多个单独的液体剂量。旨在转化成液体形式的固体形式制剂除了包含活性物质之外，还可以包含调味剂、着色剂、稳定剂、缓冲剂、人造和天然甜味剂、分散剂、增稠剂、增溶剂等。用于制备液体形式制剂的液体可以是水、等渗水、乙醇、甘油、丙二醇等及其混合物。理所当然地，根据给药途径来选择所用的液体，例如包含大量的乙醇的液体制剂不适于局部用途或肠胃外用途。

[0177] 组合物可以是旨在局部施用的制剂。制剂可以是凝胶化制剂以在局部施用之后控制活性剂的释放并因此控制活性剂的利用度。制剂可以包含一种或多种胶凝剂，例如羟丙基甲基纤维素。制剂可以包含一种或多种表面活性剂，例如非离子液体聚合物，其实例包括泰罗沙伯(Tyloxapol)和来自BASF的**Pluronics®**泊洛沙姆。制剂可以包含一种或多种增溶剂，例如右旋糖或山梨醇。制剂可以包含一种或多种抗微生物剂或防腐剂，例如苯扎氯铵。前述指定的胶凝剂、表面活性剂、增溶剂和抗微生物剂仅以实例形式列出，并且会认识到实现这些功能的其他药剂是已知的。

[0178] 剂量可以根据患者需求、治疗的病况的严重性和采用的化合物而变化。用于特定情况的合适剂量的确定在本领域技术人员的范围内。通常以小于化合物的最佳剂量的较小剂量来开始治疗。此后，通过小幅增加来提高剂量，直至达到所处环境的最佳效果。为简便起见，若需要，可将总的日剂量分开并在一天中分批给药。

[0179] 给药活性剂的剂量方案可以例如包括在例如1天至14天的给药时段内至多1 μ g、例如至多500ng、例如至多50ng、例如小于20ng的活性剂的总剂量。例如，可以给药小于18ng、17ng、16ng、15ng、14ng、13ng、12ng、11ng或10ng的总剂量。

[0180] 可以以治疗有效量来给药式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、溶剂合物、水合物或前药。用于治疗CNV的局部给药的式(I)的化合物的治疗有效量可以为至少约5 μ g/10 μ l递送载剂。或者，治疗有效量可以为至少约100 μ g/mL，例如至少约200 μ g/mL、至少约300 μ g/mL、至少约400 μ g/mL、至少约500 μ g/mL、至少约600 μ g/mL、至少约700 μ g/mL、至少约800 μ g/mL、至少约900 μ g/mL或至少约1000 μ g/mL。或者，治疗有效量可以为至少约1mg/mL，例如至少约2mg/mL、至少约3mg/mL、至少约4mg/mL、至少约5mg/mL。或者，治疗有效量可以小于约5mg/mL，例如小于约4mg/mL、小于约3mg/mL、小于约2mg/mL、小于约1mg/mL。可以每天给药治疗有效量，持续例如1天至14天的给药时段。治疗有效量可以是可被分开并在一天内分批给药(例如每天两次)的总的日剂量。

[0181] 用于哺乳动物个体的抗血管生成治疗、或用于治疗或预防微血管通透性过高病症、或用于调节VEGF_{xxx}亚型的促血管生成促通透性、或用于在不增加通透性的情况下支持上皮细胞存活、或用于降低上皮滤过膜窗孔的性质(例如密度数和/或尺寸)、或用于治疗或预防神经性病症和神经变性病症、或用作体内或体外神经保护剂或神经再生剂、或用于治疗或预防VEGFR2-介导的非炎性疼痛、或用于降低雌性哺乳动物出现先兆子痫或与其相关的并发症的风险、或降低雌性哺乳动物的胎儿出现与母体先兆子痫相关的胎儿或新生儿缺陷的风险的式(I)的化合物的治疗有效量可以根据要治疗的个体的体重来计算，并且可以为至少约20mg/kg，例如至少约30mg/kg、至少约40mg/kg、至少约50mg/kg、至少约60

mg/kg、至少约70mg/kg、至少约80mg/kg、至少约90mg/kg、至少约 100mg/kg。或者,治疗有效量可以小于约100mg/kg,例如小于约90 mg/kg、小于约80mg/kg、小于约70mg/kg、小于约60mg/kg、小于约 50mg/kg、小于约40mg/kg、小于约30mg/kg、或小于约20mg/kg,例如小于约10mg/kg、小于约5mg/kg。

[0182] “治疗或预防”

[0183] 本文所用的表述“治疗或预防”以及类似术语是指旨在去除或避免病 症或缓解其症状的健康护理的所有形式,包括预防性、治愈性和缓解性 护理,如根据普遍的医学和精神病学实践可得的任何测试所判断的。表述“治疗或预防”包括具有实现特定结果的合理预期但通常不总如此进行 的介入。表述“治疗或预防”包括在减缓或制止病症进展方面成功的介入。

[0184] 某些神经学和精神病学病症被认为是“谱群 (spectrum)”病况,其中个 体可能表现出一系列可能的症状中的一些或全部,或可能仅表现出病症 的轻微形式。此外,许多神经学和精神病学病症是进行性的,以相对轻 微的异常症状开始并进展至更严重的异常症 状。本发明包括无论哪种类 型和阶段的所有神经学和精神病学病况的治疗和预防。

[0185] “易感性”

[0186] 本文所用的表述“易感性”以及类似术语特别是指高于正常的出现医 学或精神病学病症或人格改变的风险的个体,如使用个体或病状的已知 风险因子所评估的。此类个体可以例如分类为具有出现一种或多种特定 症状或人格改变的实质风险,达到会被开处方药和/或会对该个体进行特 殊的饮食、生活方式或类似建议的程度。

[0187] “非治疗性方法”

[0188] 本文所用的表述“非治疗性方法”特别是指对在神经或心理方面处于 正常范围内的个体进行的介入,以正常化或增强或改善神经或心理类型 的功能。可以适当地非治疗性治疗的神经系统功能可以包括例如认知(包 括思考、推理、记忆、回忆、想象和学习)、集中和注意,特别针对较轻 微的病况级别终点 (end of the scale of conditions) 以及轻微的异常行为或 人格特质。可以适当地非治疗性治疗的心理学功能可包括例如人类行为、情绪、人格和社会功能,例如悲痛、焦虑、抑郁、情绪化、阴郁、青春 期情绪、中断睡眠模式、非常逼真的梦 (vivid dream)、梦魇和梦游。

[0189] 在可诊断的神经学和精神病学病症与正常范围内的(不可诊断的)神 经学和精神病学功能之间存在一条界线。因此,除了上文给出的可根据 本发明的非治疗性方法治疗的神经学和精神病学功能的实例之外,由于 相关行为或思想对个体不产生显著的痛苦或不破坏他或她的日常机能而 不可诊断的神经学和精神病学病症的轻微形式也被认为是根据 本发明可 非治疗性治疗的病况。

[0190] “正常化”

[0191] 本文所用的表述“正常化”及类似术语特别是指向特征为一般正常神 经学或精神 病学健康的情况的生理调节,无论是否实际达到了表征为正 常的情况。

[0192] 哺乳动物

[0193] 除了用于人类治疗,本发明还可用于一系列哺乳动物。此类哺乳动 物包括例如在动物园中的非人灵长目动物(例如类人猿、猴和狐猴),伴 侣动物如猫或狗,役用和竞技动物如狗、马和矮种马,农畜如猪、绵羊、山羊、鹿、公牛和牛,以及实验室动物如啮齿目动物

(例如、兔、大鼠、小鼠、仓鼠、沙鼠或豚鼠)。

[0194] 当要治疗的病症或功能专指人类时，则会理解要治疗的哺乳动物是 人类。相容内容分别适用于任何其他哺乳动物纲物种，条件是要治疗的 症状或功能专指该物种。

[0195] 附图简述

[0196] 现仅通过例示方式来描述本发明的实施方案，并参考附图，其中：

[0197] 图1A示出针对SRPK1和SRPK2表现出活性的三种化合物的结构；

[0198] 图1B和1C示出图1A的化合物分别针对SRPK1和SRPK2的活性；

[0199] 图2A示出在ARPE-19细胞中，与微管蛋白对照相比，图1A的化 合物对SRSF1表达的作用；

[0200] 图2B示出在初代RPE细胞中，相对于GAPDH，图1A的化合物对 VEGF165mRNA亚型的表达的作用；

[0201] 图2C示出相对于总蛋白质，图1A的化合物对VEGF表达的作用；

[0202] 图2D示出图1A的化合物对VEGF_{xxx_b}/总VEGF表达之比的作用；

[0203] 图3A示出图1A的化合物在激光诱导的小鼠CNV模型中的作用；

[0204] 图3B示出与VEGF抗体G6-31相比，SRPIN340在激光诱导的大鼠 CNV模型中对VEGF表达的作用；

[0205] 图3C示出SRPIN340对来自用SRPIN340治疗的眼部的视网膜蛋白 质中VEGF表达的作用；

[0206] 图4A示出SRPIN340抑制激光诱导的CNV的剂量依赖性性质；

[0207] 图4B示出在玻璃体内注射之后的眼中SRPIN340的半衰期曲线；

[0208] 图5A示出对CNV病变区域局部给药SRPIN340滴剂的作用；

[0209] 图5B示出局部给药SRPIN340对视网膜内 VEGF₁₆₅mRNA表达的 作用；

[0210] 图5C示出在局部给药之后的全眼中SRPIN340的半衰期曲线；

[0211] 图5D示出在局部给药之后的眼部的后房中SRPIN340的半衰期曲 线；

[0212] 图6示出在SRPIN340治疗之后视网膜蛋白质中促VEGF亚型与抗 VEGF亚型之比；

[0213] 图7示出在体外测定中式 (Ia) 和表1所定义的化合物SPHINX、SPHINX6、SPHINX7和SPHINX8的SRPK1抑制水平；

[0214] 图8示出在体外激酶测定中式 (Ia) 和表1所定义的化合物SPHINX、SPHINX12、SPHINX13和SPHINX14的SRPK1抑制水平；

[0215] 图9A示出SPHINX6和SPHINX7对VEGF₁₆₅b RNA转录的作用；

[0216] 图9B示出SPHINX6和SPHINX7对VEGF₁₆₅b蛋白质表达的作用；

[0217] 图10A和10B表明SPHINX7抑制由EGF活化诱导的SRSF1磷酸 化；

[0218] 图11表明SPHINX7以滴眼剂形式抑制眼部中的血管生成。SRPIN340和SPHINX7显著抑制CNV形成。SPHINX7的IC₅₀为225 ng/ml；

[0219] 图12示出证明SPHINX7以滴眼剂形式抑制眼中的血管生成的其他 数据；和

[0220] 图13证明通过靶向SRPK1来抑制前列腺癌生长。

[0221] 方法

[0222] 细胞培养

[0223] 对从Bristol Eye 储库 (Bristol Eye Hospital (BEH)) 的死后24小时内获 得的人

类捐赠者眼球进行初次人RPE分离。将具有脉络膜-RPE片的视网膜转移至petri培养皿,在37°C下历时15分钟在补充有0.3mg/ml胶原酶的杜氏改良伊格尔培养基(DMEM):F12(1:1)+GlutaMax(Gibco)中切碎并消化。将消化的脉络膜-RPE片悬浮在补充有10%胎牛血清(FBS)、0.5%PenStrep(Invitrogen)的培养基(DMEM:F12+GlutaMax)中,并以1500 rpm(251g)旋转10分钟以使细胞成团块。将团块再悬浮于补充有25% FBS(Gibco)的培养基中,在细胞培养瓶(Greiner)中生长,并且在80%融合时分裂。将ARPE-19(ATCC)细胞在DMEM:F12加10%FBS中培养,并在80%融合时分裂。

[0224] 体外激酶测定

[0225] 通过Kinase-Glo测定(Promega;Koresawa and Okabe,2004)来筛选包括MVRL09、MVRL10(SPHINX)、MVRL16(SPHINX6)、MVRL17(SPHINX7)、SPHINX8、SPHINX9、SPHINX10、SPHINX12、SPHINX13、SPHINX14和SRPIN340的候选化合物,其结果示于表1中。向10μM SRSF1 RS肽(NH₂-RSPSYGRSRSRSRSRSRSNSRSRSY-OH(SEQ ID NO:1))和0.1μg纯化SRPK1激酶中添加包含9.6mM MOPS pH7和0.2nM EDTA pH8的反应缓冲液。将候选化合物从10μM系列稀释至0.5nM,并添加到反应混合物中,还增添不含SRPK1激酶和不含化合物的孔作为对照。所有孔包含1%DMSO。添加1微摩尔ATP,孔减去ATP用作背景对照。然后,将板在30°C孵育10分钟。向每个孔添加等体积的Kinase-Glo(Promega,25μl),并使用ARVO 5x(Perkin Elmer)读取板的荧光。

[0226] 药理学抑制剂治疗-SRPIN340、MVRL09和MVRL10

[0227] 使用SR蛋白磷酸化抑制剂SRPIN340(N-[2-(1-哌啶基)-5-(三氟甲基)苯基]异烟酰胺;Ascent Scientific,Cambridge)、MVRL09(N-[2-(吗啉-4-基)-5-(三氟甲基)苯基]吡啶-3-甲酰胺)、MVRL10(5-甲基-N-[2-(吗啉-4-基)-5-(三氟甲基)苯基]呋喃-2-甲酰胺)。将约60%融合的细胞血清饥饿至少12小时,并用5μM或10μM化合物抑制剂处理。24小时后,提取mRNA,并且48小时后,提取蛋白质,以用于进一步分析。

[0228] 半定量:VEGF的逆转录酶(RT)-PCR

[0229] 常规PCR用于检测VEGF₁₆₅和VEGF₁₆₅b mRNA。向反应混合物中添加5%至10%的cDNA,所述反应混合物包含:2x PCR Master Mix (Promega)、与外显子7b(5'-GGC AGC TTG AGT TAA ACG AAC-3' (SEQ ID NO:2))和外显子8b的3' UTR(5'-ATG GAT CCG TAT CAG TCT TTC CTG G-3' (SEQ ID NO:3))互补的引物(各自为1μM)以及不含DNase/RNase的水。所有样品与阴性对照(水和不含逆转录酶(-RT)的cDNA)和阳性对照(质粒表达载体(pcDNA)中的VEGF₁₆₅以及VEGF₁₆₅b pcDNA)平行运行。使反应混合物热循环(PCR Express, Thermo Electron Corporation, Basingstoke)30次至35次,在95°C变性60秒,在55°C复性(anneal)50秒,并在72°C扩充(extend)60秒。将PCR产物在包含0.5μg/ml溴乙啶的2.5%琼脂糖凝胶(BioRad)上分离,并在紫外透射仪(BioRad)下观察。

[0230] 通过具有GAPDH引物(正向:5'-CAC CCA CTC CTC CAC CTT TGA C-3' (SEQ ID NO:4);反向:5'-GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA G-3' (SEQ ID NO:5))的PCR来测定相等的cDNA载量。在热循环30次、在94°C变性45秒、在65°C复性45秒并在72°C扩充60秒之后,引物产生约112bp的一个扩增子。

[0231] 泛VEGF和VEGF_{xxx}b酶联免疫吸附测定(ELISA)

[0232] 在室温下,将1μg/ml泛-VEGF捕捉抗体(DuoSet VEGF ELISA DY-293;R&D体系)孵

育过夜。将板封闭 (Superblock; Thermo Scientific) 并添加重组人 (rh) VEGF₁₆₅ 或 rhVEGF₁₆₅b 标准物的系列稀释物 (范围为 4 ng/ml 至 16.25 pg/ml), 与样品溶解产物并存孵育, 通常以 1:10 稀释。将该板在振荡的情况下于 37°C 孵育 1 小时, 洗涤, 并与 100 μl/孔的生物素化山羊抗人 VEGF (0.1 μg/ml; R&D 体系) 或小鼠抗人 VEGF₁₆₅b (0.25 μg/ml) 一起在 37°C 下再孵育 1 小时。在洗涤之后, 添加 100 μl/孔的辣根过氧化物酶 (HRP) 结合的抗生蛋白链菌素 (1:200; R&D 体系), 并将该板在室温下静置 20 分钟。

[0233] 洗涤该板, 并在光保护下用底物 A 和 B (DY-999; R&D 体系) 诱导颜色变化 20 分钟。通过添加 100 μl/孔的 1M H₂SO₄ 来停止反应, 并且立即在 450 nm 下于 ELISA 酶标仪 (Dynex Technologies Opsys MR 系统酶标仪) 中读取吸光度, 对照读数处于 570 nm。Revelation Quicklink 4.25 也用于从标准物的平均吸光度值计算标准曲线, 从而能够估算每一样品的 VEGF 浓度。

[0234] 蛋白质印迹法 (Western Blotting)

[0235] 将蛋白质样品 (30-50 μg) 与 1× 月桂基硫酸钠 (SDS) 加样缓冲液 (100 mM Tris-HCl, 4% SDS, 20% 甘油, 0.2% (w/v) 溴酚蓝 和 5% 最终浓度的 2-巯基乙醇, pH 6.8) 混合。为了使蛋白质变性, 将样品在 100°C 煮沸 5 分钟。

[0236] 使样品在冰冷的电泳缓冲液 (25 mM Tris-HCl, 250 mM 甘氨酸, 0.1% SDS, pH 8.3) 中于 90V 下在 12% SDS-PAGE 凝胶上经历聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE), 历时约 2.5 小时。然后在转移缓冲液 (50 mM Tris-HCl, 38 mM 甘氨酸, 20% 甲醇, pH 8.3) 中于 90V 下通过湿式转移将分离的蛋白质电泳转印至甲醇活化的聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜 (Fisher Scientific)。在室温下, 在搅拌的情况下将膜在封闭液 (含 2.5% 脱脂奶粉的 PBS/T 或 5% BSA) 中孵育 30 分钟, 然后在 4°C 用第一抗体探测过夜: 在 2.5% 脱脂奶粉 PBS/T 中以 1:1000-1:200 稀释的兔多克隆抗-VEGF-A (A20; sc-152, Santa Cruz), 在 5% BSA PBS/T 中以 1:1000 稀释的 VEGF_{xxx}b 特异性小鼠单克隆 56/1 (R&D 体系), 在 2.5% 脱脂奶粉 PBS/T 中以 1:1000 稀释的小鼠单克隆 SRSF1 (SF2/ASF) (96; sc-33652, Santa Cruz), 以及在 5% BSA PBS/T 中以 1:1000 稀释的小鼠单克隆抗-SRPK1 (BD Biosciences, 611072)。然后将膜每次用 TBS/0.3% T 洗涤四次, 历时 10 分钟, 然后在室温下, 在搅拌的情况下与第二 HRP-结合抗体一起孵育 45 分钟: 山羊 α 小鼠免疫球蛋白 G (IgG), 在 5% BSA PBS/T 或 2.5% 脱脂奶粉 PBS/T 中以 1:10000 稀释的山羊 α 兔 IgG 或 兔 α 山羊 IgG (Pierce)。重复洗涤并且使用 Enhanced Chemoluminescence (ECL) SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate 试剂盒 (Pierce) 检测带。

[0237] 药理学抑制剂治疗-SPHINX6 和 SPHINX7

[0238] 如所述的那样用递增浓度的 SPHINX 处理初代人 RPE 细胞 24 小时 (Gammons 等人, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 54 (9) 6052-6062), 然后进行 RNA 提取, 并且如前所述的那样使用检测 VEGF₁₆₅ (200 bp) 或 VEGF₁₆₅b (130 bp) 的引物进行 RT-PCR (Bates 等人, 2002)。用 SPHINX6 和 SPHINX7 处理细胞, 并重复 PCR。

[0239] 从用 SPHINX 处理 48 小时的 RPE 细胞提取蛋白质, 并如前所述的那样经历使用抗-VEGF₁₆₅b 抗体的用于 VEGF₁₆₅b 的蛋白质印迹法 (Gammons 等人, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 54 (9) 6052-6062)。

[0240] 由 EGF 活化诱导的 SRSF1 磷酸化的抑制

[0241] 在 10 μM 的 DMSO (载剂)、SPHINX、SRPIN340 或 SPHINX7 的存在下, 用 10 nM EGF 处理

PC3前列腺癌细胞1小时。将细胞溶解，并经历使用针对磷酸化SR蛋白质(MAB104)的抗体和针对微管蛋白的抗体（作为内参照(loading control)）的免疫印迹。使用ImageJ Intensity测量 SRSF1带和SRSF5带的强度。磷酸化计算为相对于具有载剂的EGF，高于未治疗时的强度的带强度的增加。

[0242] 激光病变诱导方案

[0243] 通过腹膜内注射50mg/kg氯胺酮和0.5mg/kg美托咪啶的混合物来麻醉6至8周龄的C57/B6小鼠(B&K Laboratories)和成年Norway-Brown大鼠(Harlan Laboratories)。用2.5%盐酸去氧肾上腺素和1%托吡卡胺使瞳孔扩大。使用氪红光激光器(小鼠:250mW, 0.01s, 75μm, 大鼠:200mW, 0.01s, 75μm, IRIS Medical 810nm Oculight Slx激光器)在每只眼中的视网膜血管之间以距离为1-2视盘直径的视乳头周围分布形式递送四个光凝固病变。在研究中仅包括在治疗时具有视网膜下肿泡的激光病变。在激光光凝固之后即刻使动物的双眼接受玻璃体内注射(第0天和第7天)，或在一只眼中每天两次给药100μg/mL SRPIN340或不同剂量的SPHINX7(10μl体积)的局部滴眼剂并在另一只眼中给药对照载剂。在第4天或第14天拣选动物，并且对于视网膜解剖和蛋白质提取而言，不固定眼部，或对于同工凝集素B4而言，固定眼部并摘除细胞核和脉络膜染色，并进行检查。

[0244] 在局部给药期间，SRPIN340或SPHINX7组成基于凝胶的药物递送载剂，以辅助药物暴露于眼部的持续时间(Doukas等人, 2008), 0.05% DMSO用于溶解SRPIN340并添加到对照载剂中。

[0245] 体内前列腺瘤研究

[0246] 在裸鼠的前列腺以外科手术方式注射 1×10^6 PC-3 RFP(红色荧光蛋白)细胞。使用IVIS Lumina成像系统每周两次测量肿瘤体积(表示为总流量:光子数/秒)。一旦肿瘤达到平均 2×10^9 个光子/秒，则通过IP注射20μg SPHINX或载剂每周三次治疗小鼠。在31天后，拣选小鼠并提取肿瘤以供进一步分析。N=9, p<0.01, 双因子ANOVA。

[0247] 质谱分析

[0248] 采用基于质谱分析的策略来测定SRPIN340体内药代动力学。最初将SRPIN340和分子衍生物MVRL09在水中(溶解在DMSO中的初始原料)从100μg/ml连续稀释至0μg/ml，并进行分析。色谱图在SRPIN340(349.1Da)和MVRL09(351Da)的预期分子量处产生明显的峰。对峰下面积分，并针对浓度绘图，以确定观察到的线性响应。在20ng玻璃体内注射之后在眼组织中研究SRPIN340，并在单次局部施用5μg之后在眼组织中研究SRPIN340。在单次给药之后，在时点1小时、4小时、8小时、24小时和48小时时对小鼠实施安乐死。将样品(SRPIN340(分析物)和处理的对照)均质化，并且用等体积(100μl)的乙腈或丙酮从样品析出蛋白质。

[0249] 向样品中添加100μg/ml MVRL09的内标以说明样品在制备期间的任何损失。在4℃，将50%样品和50%乙腈的溶液以及100μg/ml MVRL09离心15分钟以使蛋白质成块并采集上清液以进行分析。将溶液在37℃蒸发8小时，并且再悬浮于30μl乙腈中以准备用于注射和MALDI-TOF质谱分析仪(Abscix)。每一样品运行5分钟并产生色谱图。在两种人血浆水基质中产生标准曲线以测定浓度。通过使用对数曲线对1小时至48小时的样品浓度拟合一阶指数衰减，使用Prism来计算半衰期。

[0250] 统计学分析

[0251] 如果未另外指出,则数据以平均值±SEM的形式示出。所有数据、图表和统计学分析用Microsoft Excel (Microsoft Office Software)、GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.) 和Image J计算。在p<0.05 (*)、p<0.01 (**) 和p<0.001 (***) 时,认为所有结果是统计学显著的。

[0252] 结果

[0253] 新SRPK1抑制剂的鉴定

[0254] 为了鉴定新的SRPK1抑制剂和高度相关的SRPK2抑制剂,在体外 激酶测定中筛选多种抑制剂 (Promega;Koresawa and Okabe, 2004)。先前 鉴定的SRPK抑制剂SRPIN340 (Fukuhara等人,2006) 用作阳性对照,以 用于鉴定新候选化合物MVRL10 (5-甲基-N-[2- (吗啉-4-基) -5- (三氟甲基) 苯基] 吖喃-2-甲酰胺) 和MVRL09 (N-[2- (吗啉-4-基) -5- (三氟甲基) 苯基] 吡 呋 呋-3-甲酰胺)。结构衍生物SRPIN349用作阴性对照(图1)。除了用氢原 子替代三氟甲基部分之外,SRPIN349具有与SRPIN340相同的结构。所 有这三种抑制剂表现出抑制SRPK1激酶的些许能力,MVRL09是最不 有效的,IC₅₀大于10μM。SRPIN340和MVRL10有效地抑制SRPK1活 性,IC₅₀值分别为0.96μM和0.85μM(图1B)。在该测定中获得的结果 与公开的SRPIN340的IC₅₀ (0.89μM;Fukuhara等人,2006) 相符。使用相 同的体外激酶测定还鉴定了新候选化合物MVRL16 (SPHINX6) 、MVRL17 (SPHINX7) ,表现出SRPK1抑制,IC₅₀值分别为173nM和 54 nM(图7)。其中不存在哌嗪结构的MVRL18 (SPHINX8) 、SPHINX9和 SPHINX10在体外测定中 未表现出活性。

[0255] 随后,研究这些化合物抑制SRPK2活性的能力。SRPIN340抑制 SRPK2活性,IC₅₀为 7.4μM。MVRL09未表现出SRPK2抑制,并且 MVRL10在10μM仅表现出10% 激酶抑制(图1C)。所有这三种化合物相 对于SRPK2优先靶向SRPK1,但MVRL10是最有特异性的,表现出对 SRPK1 大于10倍的优先性。使用微量量热法筛选58种激酶组,并且在 10μM下,仅对SRPK1 (9.82°) 、MSSK1A (7.93°C) 和SRPK2 (3.5°C) 观察 到大于2°C的温度变化。所有55种其他激酶具有<2°C 的变化,并且其 中52种具有<1°C的变化。

[0256] 在一系列体外测定中检测SRPK抑制剂以测定对VEGF亚型表达的 治疗效果。最初,检测化合物治疗对SRPK1和SRSF1表达的效果。先 前出版物已表明SRPK1的SRSF1磷酸化导致SRSF1的核定位,使其能 够与VEGF前mRNA (其可以促进剪接) 结合 (Nowak等人,2008; Nowak 等人,2010;Amin等人,2011)。我们观察到SRPIN340和MVRL09的 10μM治疗未能影响 SRPK1表达,甚至在ARPE-19细胞中治疗6天之 后。MVRL10表现出降低SRPK1表达,表明其可以改变激酶的稳定性(图 2A)。在72小时治疗时间之后,用SRPIN340、MVRL09和MVRL10治 疗 ARPE-19细胞相对于微管蛋白对照降低了SRSF1的表达,并且延伸 至长达6天(图2A)。

[0257] 在初代RPE细胞中,相对于GAPDH,在5μM下24小时的抑制剂 治疗改变了 VEGF₁₆₅mRNA亚型的表达。所有这三种抑制剂降低了 VEGF₁₆₅的表达,并且MVRL09诱导 VEGF₁₆₅b的明显表达(图2B)。我 们继续研究SRPK1抑制对VEGF蛋白质表达的作用。与总蛋白 质相比, SRPIN340和MVRL09显著降低了VEGF表达,但MVRL10未能引起任 何作用(图2C)。为了确定MVRL10是否改变VEGF促血管生成亚型和 VEGF抗血管生成亚型的比例,我们进行泛 VEGF和VEGF_{xxx}b特异性 ELISA。所有这三种抑制剂降低了VEGF_{xxx}b/总VEGF的比例,并且 MVRL09和MVRL10是高度显著的 (p<0.01) ,表明SRPK1抑制降低了促 血管生成VEGF的表达, 促进了抗血管生成VEGF的表达,或二者的组 合(图2D)。

[0258] 因此, MVRL10 表现为 SRPK1 的相对特异性抑制剂。为了确定 SRPK1 抑制在动物模型中是否能够抑制 CNV, 我们在激光诱导的小鼠 CNV 模型中测试了彼此并存的这些化合物。与以相似程度向眼部注射的 对照相比, 10ng SRPIN340 和 MVRL10 的两种玻璃体内注射各自显著地 减小了新生血管面积 ($p < 0.05$, 图3A)。为了确定 SRPIN340 在其中降低 CNV 的视网膜中是否会改变 VEGF 表达, 使用激光诱导的 CNV 的大鼠 模型, 因为对 VEGF 亚型的小鼠单克隆抗体不能容易地用于小鼠组织中, 这归因于潜在地检测到小鼠 IgG (其与 VEGF 相似地运行)。SRPIN340 与 VEGF 抗体 G6-31 (Roche) 一起检测。与盐水注射对照相比, SRPIN340 注射 (25ng) 再次显著地减小了 CNV 面积 ($p < 0.05$)。VEGF 抗体 G6-31 在 该大鼠模型中对 CNV 面积产生非显著的作用 (图3B), 但其在小鼠 CNV 模型中导致 CNV 面积减小 (Renne1 等人, 2011)。

[0259] 在初始治疗之后 4 天, 通过蛋白质印记评价来自 SRPIN340 和 盐水 处理的眼部的视网膜蛋白质的 VEGF 表达。在 SRPIN340 治疗的眼中 观察到 VEGF 的表达的降低 (图3C)。使用小鼠单克隆 56/1 抗体 (R&D 体系) 研究 VEGF_{xxx}b 亚型的表达。在该时点, 在 SRPIN340 治疗之后于 视网膜 蛋白质中未观察到促 VEGF 亚型与抗 VEGF 亚型的比例的差异 (图6)。

[0260] 为测定 SRPIN340 的 SRPK1 抑制在小鼠中对抑制激光诱导的 CNV 的效能, 进行剂量递增研究。将 SRPIN340 剂量依赖性降低的 CNV 面积 与对照注射的眼部进行比较, EC₅₀ 为 1.28ng 总注射剂量 (图4A)。我们 继续测定在玻璃体内注射之后 SRPIN340 在眼中的药代动力学。在 2 天 时段内, 在眼部中, 20ng 的注射产生相对长且持久的 $> 10\text{ng/ml}$ 的浓度。对在 1 小时、4 小时、8 小时、24 小时和 48 小时测量的浓度进行拟合的 曲线给出 22 小时的估计的持续半衰期 (图4B)。

[0261] 基于其低分子量和有利的药物品质 (MW349, LogP 3.68, 并且满足里 宾斯基五规则 (Lipinski's rule of 5)), 我们假定 SRPIN340 和相关化合物 当以滴眼剂形式局部给药 时能够预防 VEGF 介导的 CNV。我们进行了研 究 SRPIN340 局部滴眼剂的剂量反应试验。将 SRPIN340 溶解在先前描 述的药物递送载体 (Doukas 等人, 2008) 中, 并且每天两次给药。在激光 损伤 (laser insult) 后 14 天, 将脉络膜固定并且平面放置以用于同工凝集 素染色, 并且提取视网膜以供 RNA 分析。

[0262] 局部 SRPIN340 滴剂剂量依赖性减小 CNV 病变面积, 并且 EC₅₀ 为 640ng 总剂量, 是在 SRPIN340 玻璃体内注射之后实现相同的作用所需 的浓度的 500 倍 (图5A)。此外, 在 SRPIN340 治疗之后降低了视网膜中 的 VEGF₁₆₅mRNA 表达 ($p = 0.058$) (图5B)。为了确认 SRPIN340 在局部给 药之后于 眼中是可检测的, 进行质谱分析。向 CD-1 小鼠的一只眼给药 10 μl 载剂 SRPIN340 中的一滴 (5 μg), 并且向另一只眼给药对照载体。在 1 小时、4 小时、8 小时、24 小时和 48 小时之后, 拣选小鼠, 并且单 独分析来自眼部的前房和后房的眼组织的 SRPIN340 表达。在全眼中 以及 特别地在后房中 均检测到 SRPIN340。在 1 小时后, 在眼中检测到总 施用剂量的 3.5% (图5C)。在由视网膜、巩膜脉络膜复合物和残留的玻 璃体构成的后房中, 在 12 小时之后检测到施用剂量的 0.15% (图5D)。使用 prism 软件的指数衰减分析产生 35 分钟的后室中的初始半衰期。

[0263] 讨论

[0264] 我们已经使用 SRPK1 的小分子化合物抑制剂来降低促血管生成 VEGF 亚型 VEGF₁₆₅ 的表达并体内抑制 CNV。我们鉴定了体外预防 SRSF1 RS 域丝氨酸残基的 SRPK1 磷酸化的抑制剂。SRSF1 与 SRPK1 的相互作用在文献 (Aubol 等人, 2003; Velazquez-Dones 等人, 2005;

Ngo 等人,2005) 中充分描述。SRSF1是调节多种基因(包括VEGF)的选择性 剪接的原癌基因SR蛋白质(Sanford等人,2005)。此处,我们已经表明 SRPK1向ARPE-19细胞的重复给药降低了SRSF1的表达而与SRPK1表 达无关,表明SRSF1的磷酸化对于其细胞质稳定性而言会是必要的。此 外,SRPK1抑制剂SRPIN340和MVRL09在RNA水平降低了表达 VEGF₁₆₅,并且在蛋白质水平显著降低了总VEGF表达。MVRL10未能 影响VEGF蛋白质水平,然而,对促血管生成VEGF 亚型和抗血管生成 VEGF亚型的表达比的进一步研究表明MVRL10显著地切换该比例,以 有 利于抗血管生成VEGF亚型的表达。已表明100nM的SPHINX7在 RNA水平降低了VEGF₁₆₅的量(图9A),在蛋白质水平增加了VEGF₁₆₅b (图9B),并且在10μM下抑制SRSF1磷酸化(图10A和10B)。当在小鼠 激光诱导的CNV模型中体内检测时,所有这三种抑制剂减小了新生血 管病 变面积,并且SPHINX7、SRPIN340和MVRL10 (SPHINX) 实现了显 著性。

[0265] 尽管在人初代RPE和ARPE-19细胞系中SRPK1抑制期间观察到 VEGF剪接向抗血管生成VEGF亚型的变换,但是仍有待于在小鼠组织 中明确显示VEGF_{xxx}b亚型的检测。已经在小鼠中描述了mRNA(由qPCR 检测(Xu等人,2011,Zhao等人,exp eye res,Caires等人,Endocrinology) 和蛋白质(由蛋白质印记鉴定(Zhao等人))二者,但对于这两种方法,应急控制(不包括IgG污染或交叉扩增)的缺失会使VEGF₁₆₅b表达不成立 (Harris等人)。已表明VEGF转录物的选择性剪接在进化期间增加,并且 在正常小鼠中的VEGF₁₆₅b表达是非常低的,经兔和猪增加至在灵长目 动物中的最高表达(Xu等人,2011)。因此在小鼠模型中,SRPK1抑制剂 可以通过阻止使用近端剪接位点、导致成熟RNA减少或通过间接改变 转录调节或翻译调节来降低促血管生成VEGF的表达,从而预防CNV。目前,没有研究鉴定小鼠中的 VEGF选择性剪接的调节物。当在激光诱 导的大鼠CNV模型中测试时,SRPIN340 (Fukuhara等人,2006) 减小了 CNV面积和总VEGF蛋白质表达。在大鼠视网膜中研究VEGF_{xxx}b表达,VEGF_{xxx}b被表达,但与该时点的盐水对照相比,在SRPIN340治疗期间 未观察到VEGF_{xxx}b亚型的表达的变化表明在啮齿目动物模型中,SRPK1 抑制可以通过降低促血管生成VEGF表达而成为抗血管生成的。

[0266] 我们继续测定SRPIN340在小鼠模型中对CNV面积的EC₅₀。SRPIN340产生1.28ng的EC₅₀,并且使用的SRPIN340的剂量范围 (0.2-10 ng/眼) 与先前用于抑制CNV的rhVEGF₁₆₅b的剂量相似 (Hua等人,2010)。Hua和同事们确定了在人类中有效rhVEGF₁₆₅b剂量为3μg/眼,比雷珠 单抗或贝伐单抗低1000倍至10倍 (Brown等人,2006)。难以直接将人 特异性雷珠单抗与小鼠中的SRPIN340效力数据进行比较,与 rhVEGF-A₁₆₅b相比,SRPIN340效力低160倍 (Hua等人,2010),但在啮 齿目动物中需要比培加尼布小125倍的剂量。这些数据表明SRPIN340 具有在玻璃体内注射之后于更低的剂量下实现与目前治疗雷珠单抗相似 的CNV减小的能力。

[0267] 雷珠单抗治疗的缺点之一是需要每月眼内注射,因此我们研究了 SRPIN340和 SPHINX7在局部给药之后是否会有效地抑制CNV。局部 SRPIN340在小鼠中显著地抑制CNV,并且EC₅₀为3.187μg/ml,比注射 的SRPIN340大500倍。药代动力学分析表明在1小时之后于 眼中检测 到3.5%的局部施用剂量,反映了先前的估计,即,由于不良的眼部生物 利用度,仅5%的局部施用的药物会进入眼中 (Geroski和Edelhauser, 2000)。此外,在单次局部给药之后48小时,SRPIN340在眼中仍是可检 测到的,但在全身是未检测到的。尽管仅仅约5%的施用的SRPIN340可 能渗透眼部,但是使用局部SRPIN340实现50%CNV抑制所需的剂量与

其他局部疗法相比是有利的。

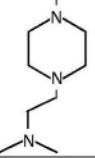
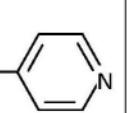
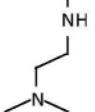
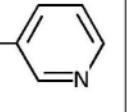
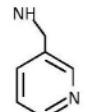
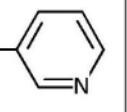
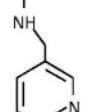
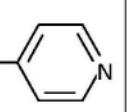
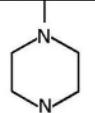
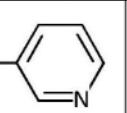
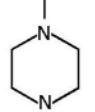
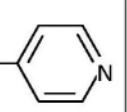
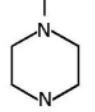
[0268] 在2008年中,Doukas及同事们鉴定了TG100801,即一种通过脱脂 作用产生TG100572的惰性前药。TG100801靶向Src激酶并且选择酪氨酸受体激酶(包括VEGFR-1和VEGFR-2),每日两次局部施用1% (而非0.6%) TG100801显著降低了CNV病变面积(Doukas等人,2008),然而,0.01% SRPIN340溶液在相同药物递送载体中产生CNV面积的显著抑制。据我们所知,SRPIN340和SPHINX7是改变促血管生成VEGF亚型的表达的首选局部化合物。在局部SRPIN340治疗之后,对小鼠视网膜的VEGF₁₆₅表达的评价表明VEGF₁₆₅的近似显著的降低($p=0.058$; $n=3$)。VEGF₁₆₅(一种更有效的促有丝分裂VEGF亚型(Keyt等人,1996))对视网膜发育期间的生理学新生血管形成而言是足够的(Stalmans等人,2002)。该研究已集中于研究SRPK1抑制后的VEGF₁₆₅表达,然而,我们预期在SRPK1抑制之后其他促血管生成VEGF亚型如VEGF₁₂₁也会降低。实际上,已经表明,SRSF1与人VEGF前mRNA在VEGF外显子8PSS之前的35nt区域(跨越物种并通过所有促血管生成VEGF亚型来保全剪接位点)中结合(Amin等人,2011)。

[0269] 与对照盐水注射相比,通过持续30天的每周三次IP注射20 μ g SPHINX在裸鼠中治疗诱导的前列腺癌导致肿瘤体积的显著降低(以总流量:光子数/秒测量),证明所要求保护的化合物在抑制血管生成方面也是有效的,因此可以用于哺乳动物个体的抗血管生成治疗,例如在哺乳动物个体中的癌症治疗。

[0270] 在该研究中提供的数据表明在降低与AMD相关的促血管生成VEGF介导的CNV方面,SRPK1成为小分子量化合物抑制剂的新的靶标。此外,我们已经证明本发明的化合物在小鼠中局部给药之后降低CNV方面是有效的,并且当注射时对于降低肿瘤生长是有效的。

[0271]

名称	W	R ₈	SRPK1 的 IC ₅₀ (nM)
SPHINX (MVRL10)		CH ₃	440
SPHINX6 (MVRL16)			177

[0272]	SPHINX7 (MVRL17)			54.7
	SPHINX8 (MVRL18)			9307
	SPHINX9			>10000
	SPHINX10			>10000
	SPHINX12			367
	SPHINX13			162
	SPHINX14		CN	1268

[0273] 表1.在SRPK1抑制测定中检测的式(Ia)的化合物的IC₅₀数据

[0274] 参考文献

[0275] Bressler,S.,Bressler,N.M.,Clemons,T.,Ferris,F.L.,Milton,R.C., Klien, R.,Klien,B.和Age-Related Eye Disease Study,G. (2004) 'Ocular risk factors for developing neovascular AMD in the fellow eyes of patients with unilateral neovascular AMD', *Investigative Ophthalmology&Visual Science*, 45,U924-U924.

[0276] Ferris,F.L.,Fine,S.L.和Hyman,L. (1984) 'Age-related macular degeneration and blindness due to neovascular maculopathy', *Archives of Ophthalmology*,102(11),1640-1642.

[0277] Patz,A.,Fine,S.L.,Finkelstein,D.和Yassur,Y. (1977) 'Diseases of macula-diagnosis and management of choroidal neovascularization', *Transactions American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology*, 83(3),468-475.

[0278] Fine,S.L.,Berger,J.W.,Maguire,M.G.和Ho,A.C. (2000) 'Drug therapy:Age-related macular degeneration', *New England Journal of Medicine*,342(7),483-492.

[0279] Campochiaro,P.A.,Nguyen,Q.D.,Shah,S.M.,Klein,M.L.,Holz,E., Frank, R.N.,Saperstein,D.A.,Gupta,A.,Stout,J.T.,Macko,J., DiBartolomeo,R.和Wei,L.L. (2006) 'Adenoviral vector-delivered pigment epithelium-derived factor for

neovascular age-related macular degeneration: Results of a phase I clinical trial', Human Gene Therapy, 17 (2) , 167-176.

[0280] Dvorak, H.F. , Brown, L.F. , Detmar, M. 和 Dvorak, A.M. (1995) 'Vascular-permeability factor vascular endothelial growth-factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis', American Journal of Pathology, 146 (5) , 1029-1039.

[0281] D' Amore, P.A. , Shima, D.T. , Adamis, A.P. , Yeo, K.T. , Yeo, T.K. , Allende, R. 和 Folkman, J. (1994) 'differential regulation of VEGF/VPF and basic FGF by hypoxia', Faseb Journal, 8 (4) , A116-A116.

[0282] Spilsbury, K. , Garrett, K.L. , Shen, W.Y. , Constable, I.J. 和 Rakoczy, P. E. (2000) 'Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the retinal pigment epithelium leads to the development of choroidal neovascularization', American Journal of Pathology, 157 (1) , 135-144.

[0283] Anderson, D.H. , Mullins, R.F. , Hageman, G.S. 和 Johnson, L.V. (2002) 'Perspective-A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye', American Journal of Ophthalmology, 134 (3) , 411-431.

[0284] Das, A. , Fanslow, W. , Cerretti, D. , Warren, E. , Talarico, N. 和 McGuire, P. (2003) 'Angiopoietin/Tek interactions regulate MMP-9 expression and retinal neovascularization', Laboratory Investigation, 83 (11) , 1637-1645.

[0285] Leung, D.W. , Cachianes, G. , Kuang, W.J. , Goeddel, D.V. 和 Ferrara, N. (1989) 'Vascular endothelial growth-factor is a secreted angiogenic mitogen', Science, 246 (4935) , 1306-1309.

[0286] Jingjing, L. , Xue, Y. , Agarwal, N. 和 Roque, R.S. (1999) 'Human Muller cells express VEGF183, a novel spliced variant of vascular endothelial growth factor', Iovs, 40 (3) , 752-759.

[0287] Houck, K.A. , Ferrara, N. , Winer, J. , Cachianes, G. , Li, B. 和 Leung, D. W. (1991) 'The vascular endothelial growth-factor family-identification of a 4th molecular-species and characterization of alternative splicing of rna', Molecular Endocrinology, 5 (12) , 1806-1814.

[0288] Mineur, P. , Colige, A.C. , Deroanne, C.F. , Dubail, J. , Kesteloot, F. , Habraken, Y. , Noel, A. , Voo, S. , Waltenberger, J. , Lapiere, C.M. , Nusgens, B. V. 和 Lambert, C.A. (2007) 'Newly identified biologically active and proteolysis-resistant VEGF-A isoform VEGF111 is induced by genotoxic agents', Journal of Cell Biology, 179 (6) , 1261-1273.

[0289] Tischer, E. , Gospodarowicz, D. , Mitchell, R. , Silva, M. , Schilling, J. , Lau, K. , Crisp, T. , Fiddes, J.C. 和 Abraham, J.A. (1989) 'Vascular endothelial growth-factor-a new member of the platelet-derived growth-factor gene family', Biochemical and Biophysical Research Communications, 165 (3) , 1198-1206.

[0290] Neufeld, G. , Cohen, T. , Gengrinovitch, S. 和 Poltorak, Z. (1999) 'Vascular

- endothelial growth factor (VEGF) and its receptors', *Faseb Journal*, 13(1), 9-22.
- [0291] Bates, D.O., Cui, T.G., Doughty, J.M., Winkler, M., Sugiono, M., Shields, J.D., Peat, D., Gillatt, D. 和 Harper, S.J. (2002) 'VEGF(165)b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma', *Cancer Research*, 62(14), 4123-4131.
- [0292] Woolard, J., Wang, W.Y., Bevan, H.S., Qiu, Y., Morbidelli, L., Pritchard-Jones, R.O., Cui, T.G., Sugiono, M., Waine, E., Perrin, R., Foster, R., Digby-Bell, J., Shields, J.D., Whittles, C.E., Mushens, R.E., Gillatt, D. A., Ziche, M., Harper, S.J. 和 Bates, D.O. (2004) 'VEGF(165)b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: Mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression', *Cancer Research*, 64(21), 7822-7835.
- [0293] Perrin, R.M., Konopatskaya, O., Qiu, Y., Harper, S., Bates, D.O. 和 Churchill, A.J. (2005) 'Diabetic retinopathy is associated with a switch in splicing from anti-to pro-angiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor', *Diabetologia*, 48(11), 2422-2427.
- [0294] Varey, A.H.R., Rennel, E.S., Qiu, Y., Bevan, H.S., Perrin, R.M., Raffy, S., Dixon, A.R., Paraskeva, C., Zacheo, O., Hassan, A.B., Harper, S. J. 和 Bates, D.O. (2008) 'VEGF(165)b, an antiangiogenic VEGF-A isoform, binds and inhibits bevacizumab treatment in experimental colorectal carcinoma: balance of pro-and antiangiogenic VEGF-A isoforms has implications for therapy', *British Journal of Cancer*, 98(8), 1366-1379.
- [0295] Pritchard-Jones, R.O., Dunn, D.B.A., Qiu, Y., Varey, A.H.R., Orlando, A., Rigby, H., Harper, S.J. 和 Bates, D.O. (2007) 'Expression of VEGF(xxx)b, the inhibitory isoforms of VEGF, in malignant melanoma', *British Journal of Cancer*, 97(2), 223-230.
- [0296] Hua, J., Spee, C., Kase, S., Rennel, E.S., Magnussen, A.L., Qiu, Y., Varey, A., Dhayade, S., Churchill, A.J., Harper, S.J., Bates, D.O. 和 Hinton, D.R. (2010) 'Recombinant Human VEGF(165)b Inhibits Experimental Choroidal Neovascularization', *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51(8), 4282-4288.
- [0297] Magnussen, A.L., Rennel, E.S., Hua, J., Bevan, H.S., Long, N.B., Lehrling, C., Gammons, M., Floege, J., Harper, S.J., Agostini, H.T., Bates, D.O. 和 Churchill, A.J. (2010) 'VEGF-A(165)b Is Cytoprotective and Antiangiogenic in the Retina', *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51(8), 4273-4281.
- [0298] Gragoudas, E.S. (2004) 'VEGF inhibition study in ocular neovascularization-1 (VISION-1): Efficacy results from phase II/III Macugen(TM) (Pegaptanib sodium) clinical trials', *Iovs*, 45(Suppl.1), U924.
- [0299] Rosenfeld, P.J., Rich, R.M. 和 Lalwani, G.A. (2006) 'Ranibizumab: Phase III clinical trial results', *Ophthalmology Clinics of North America*, 19(3), 361-72.

- [0300] Brown,D.M.,Kaiser,P.K.,Michels,M.,Soubbrane,G.,Heier,J.S., Kim,R.Y., Sy,J.P.,Schneider,S.和Grp,A.S. (2006) 'Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration', New England Journal of Medicine, 355 (14) ,1432-1444.
- [0301] Brown,D.M.,Michels,M.,Kaiser,P.K.,Heier,J.S.,Sy,J.P.和 Ianchulev,T. (2009) 'Ranibizumab versus Verteporfin Photodynamic Therapy for Neovascular Age-Related Macular Degeneration:Two-Year Results of the ANCHOR Study', Ophthalmology, 116 (1) ,57-65.
- [0302] Schmidt-Erfurth,U.,Eldem,B.,Guymer,R.,Korobelnik,J.-F., Schlingemann, R.O.,Ayer-Siegel,R.,Wiedemann,P.,Simader,C., Gekkieva,M.,Weichselberger,A.和 Grp,E.S. (2011) 'Efficacy and Safety of Monthly versus Quarterly Ranibizumab Treatment in Neovascular Age-related Macular Degeneration:The EXCITE Study', Ophthalmology, 118 (5) .
- [0303] Good,T.J.和Kahook,M.Y. (2010) 'The role of endothelin in the pathophysiology of glaucoma', Expert Opinion on Therapeutic Targets, 14 (6) , 647-654.
- [0304] Jager,R.D.,Aiello,L.P.,Patel,S.C.和Cunningham,E.T. (2004) 'Risks of intravitreous injection:A comprehensive review', Retina-the Journal of Retinal and Vitreous Diseases, 24 (5) ,676-698.
- [0305] Nowak,D.G.,Amin,E.M.,Rennel,E.S.,Hoareau-Aveilla,C., Gammons,M., Damodoran,G.,Hagiwara,M.,Harper,S.J.,Woolard,J., Lademery,M.R.和Bates,D.O. (2010) 'Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Splicing from Pro-angiogenic to Anti-angiogenic Isoforms a novel therapeutic strategy for angiogenesis', Journal of Biological Chemistry, 285 (8) ,5532-5540.
- [0306] Amin,E.M.,Oltean,S.,Hua,J.,Gammons,M.V.R., Hamdollah-Zadeh,M.,Welsh, G.I.,Cheung,M.-K.,Ni,L.,Kase,S.,Renne, E.S.,Symonds,K.E.,Nowak,D.G.,Royer-Pokora,B.,Saleem,M.A., Hagiwara,M.,Schumacher,V.A.,Harper,S.J.,Hinton,D.R., Bates,D.O. 和Lademery,M.R. (2011) 'WT1 Mutants Reveal SRPK1 to Be a Downstream Angiogenesis Target by Altering VEGF Splicing', Cancer Cell, 20 (6) ,768-780.
- [0307] Sanford,J.R.,Ellis,J.D.,Cazalla,D.和Caceres,J.F. (2005a) 'Reversible phosphorylation differentially affects nuclear and cytoplasmic functons of splicing factor 2/alternative splicing factor', Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102 (42) , 15042-15047.
- [0308] Nowak,D.G.,Woolard,J.,Amin,E.M.,Konopatskaya,O.,Saleem,M. A., Churchill,A.J.,Lademery,M.R.,Harper,S.J.和Bates,D.O. (2008) 'Expression of pro-and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors', Journal of Cell Science, 121 (20) , 3487-3495.
- [0309] Doukas,J.,Mahesh,S.,Umeda,N.,Kachi,S.,Akiyama,H.,Yokoi,K., Cao,J., Chen,Z.,Dellamary,L.,Tam,B.,Racanelli-Layton,A.,Hood,J., Martin,M.,Noronha,

- G., Soll, R. 和 Campochiaro, P.A. (2008) 'Topical administration of a multi-targeted kinase inhibitor suppresses choroidal neovascularization and retinal edema', *Journal of Cellular Physiology*, 216(1), 29-37.
- [0310] Fukuhara, T., Hosoya, T., Shimizu, S., Sumi, K., Oshiro, T., Yoshinaka, Y., Suzuki, M., Yamamoto, N., Herzenberg, L.A. 和 Hagiwara, M. (2006) 'Utilization of host SR protein kinases and RNA-splicing machinery during viral replication', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(30), 11329-11333.
- [0311] Rennel, E.S., Regula, J.T., Harper, S.J., Thomas, M., Klein, C. 和 Bates, D.O. (2011) 'A Human Neutralizing Antibody Specific to Ang-2 Inhibits Ocular Angiogenesis', *Microcirculation*, 18(7).
- [0312] Aubol, B.E., Chakrabarti, S., Ngo, J., Shaffer, J., Nolen, B., Fu, X.D., Ghosh, G. 和 Adams, J.A. (2003) 'Processive phosphorylation of alternative splicing factor/splicing factor 2', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(22), 12601-12606.
- [0313] Velazquez-Dones, A., Hagopian, J.C., Ma, C.T., Zhong, X.Y., Zhou, H. L., Ghosh, G., Fu, X.D. 和 Adams, J.A. (2005) 'Mass spectrometric and kinetic analysis of ASF/SF2 phosphorylation by SRPK1 and Cdk/Sty', *Journal of Biological Chemistry*, 280(50), 41761-41768.
- [0314] Ngo, J.C.K., Chakrabarti, S., Ding, J.H., Velazquez-Dones, A., Nolen, B., Aubol, B.E., Adams, J.A., Fu, X.D. 和 Ghosh, G. (2005) 'Interplay between SRPK and Cdk/Sty kinases in phosphorylation of the splicing factor ASF/SF2 is regulated by a docking motif in ASF/SF2', *Molecular Cell*, 20(1), 77-89.
- [0315] Xu, J., Dou, T., Liu, C., Fu, M., Huang, Y., Gu, S., Zhou, Y. 和 Xie, Y. (2011) 'The evolution of alternative splicing exons in vascular endothelial growth factor A', *Gene*, 487(2).
- [0316] Caires, K.C., de Avila, J.M., Cupp, A.S. 和 McLean, D.J. (2012) 'VEGFA Family Isoforms Regulate Spermatogonial Stem Cell Homeostasis in Vivo', *Endocrinology*, 153(2).
- [0317] Zhao, M., Shi, X., Liang, J., Miao, Y., Xie, W., Zhang, Y. 和 Li, X. (2011) 'Expression of pro-and anti-angiogenic isoforms of VEGF in the mouse model of oxygen-induced retinopathy', *Experimental Eye Research*, 93(6), 921-926.
- [0318] Harris, S., Craze, M., Newton, J., Fisher, M., Shima, D.T., Tozer, G.M. 和 Kanthou, C. (2012) 'Do Anti-Angiogenic VEGF (VEGF_{xxx}b) Isoforms Exist? A Cautionary Tale', *Plos One*, 7(5).
- [0319] McFee, R.M., Rozell, T.G. 和 Cupp, A.S. (2012) 'The balance of proangiogenic and antiangiogenic VEGFA isoforms regulate follicle development', *Cell and Tissue Research*, 349(3).
- [0320] Ishida, S., Usui, T., Yamashiro, K., Kaji, Y., Amano, S., Ogura, Y., Hida, T.,

Oguchi, Y., Ambati, J., Miller, J.W., Gragoudas, E.S., Ng, Y.S., D'Amore, P.A., Shima, D.T. 和 Adamis, A.P. (2003) 'VEGF(₁₆₄) -mediated inflammation is required for pathological, but not physiological, ischemia-induced retinal neovascularization', *Journal of Experimental Medicine*, 198(3), 483-489.

[0321] Geroski, D.H. 和 Edelhauser, H.F. (2000) 'Drug delivery for posterior segment eye disease', *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41(5), 961-964.

[0322] Keyt, B.A., Nguyen, H.V., Berleau, L.T., Duarte, C.M., Park, J., Chen, H. 和 Ferrara, N. (1996) 'Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors-Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis', *Journal of Biological Chemistry*, 271(10), 5638-5646.

[0323] Stalmans, I., Ng, Y.S., Rohan, R., Fruttiger, M., Bouche, A., Yuce, A., Fujisawa, H., Hermans, B., Shani, M., Jansen, S., Hicklin, D., Anderson, D. J., Gardiner, T., Hammes, H.P., Moons, L., Dewerchin, M., Collen, D., Carmeliet, P. 和 D'Amore, P.A. (2002) 'Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms', *Journal of Clinical Investigation*, 109(3).

[0324] Gammons, M.V., Dick, A.D., Harper, S.J., Bates, D.O. (2013) SRPK1 Inhibition Modulates VEGF Splicing to Reduce Pathological Neovascularization in a Rat Model of Retinopathy of Prematurity *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* vol. 54(8) 5797-5806.

[0325] Gammons, M.V., Fedorov, O., Ivison, D., Du, C., Clark, T., Hopkins, C., Hagiwara, M., Dick, A.D., Cox, R., Harper, S.J., Hancox, J.C. 和 Bates, D.O. (2013) Topical Antiangiogenic SRPK1 Inhibitors Reduce Choroidal Neovascularization in Rodent Models of Exudative AMD *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54(9) 6052-6062.

序列表

<110> 布里斯托大学

<120> 化合物

<130> P120369PC00

<150> GB1218676.3

<151> 2012-10-17

<150> GB1218758.9

<151> 2012-10-18

<150> GB1304694.1

<151> 2013-03-15

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

[0001] <210> 1

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SRSF1 RS PEPTIDE

<400> 1

Arg Ser Pro Ser Tyr Gly Arg Ser Arg Ser Arg Ser Arg Ser

1 5 10 15

Arg Ser Arg Ser Arg Ser Asn Ser Arg Ser Arg Ser Tyr

20 25

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PRIMER

<400> 2

ggcagcttga gttaaacgaa c

21

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PRIMER

<400> 3

atggatccgt atcagtcttt cctgg

25

<210> 4

[0002] <211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PRIMER

<400> 4

caccctactcc tccacacctt ac

22

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

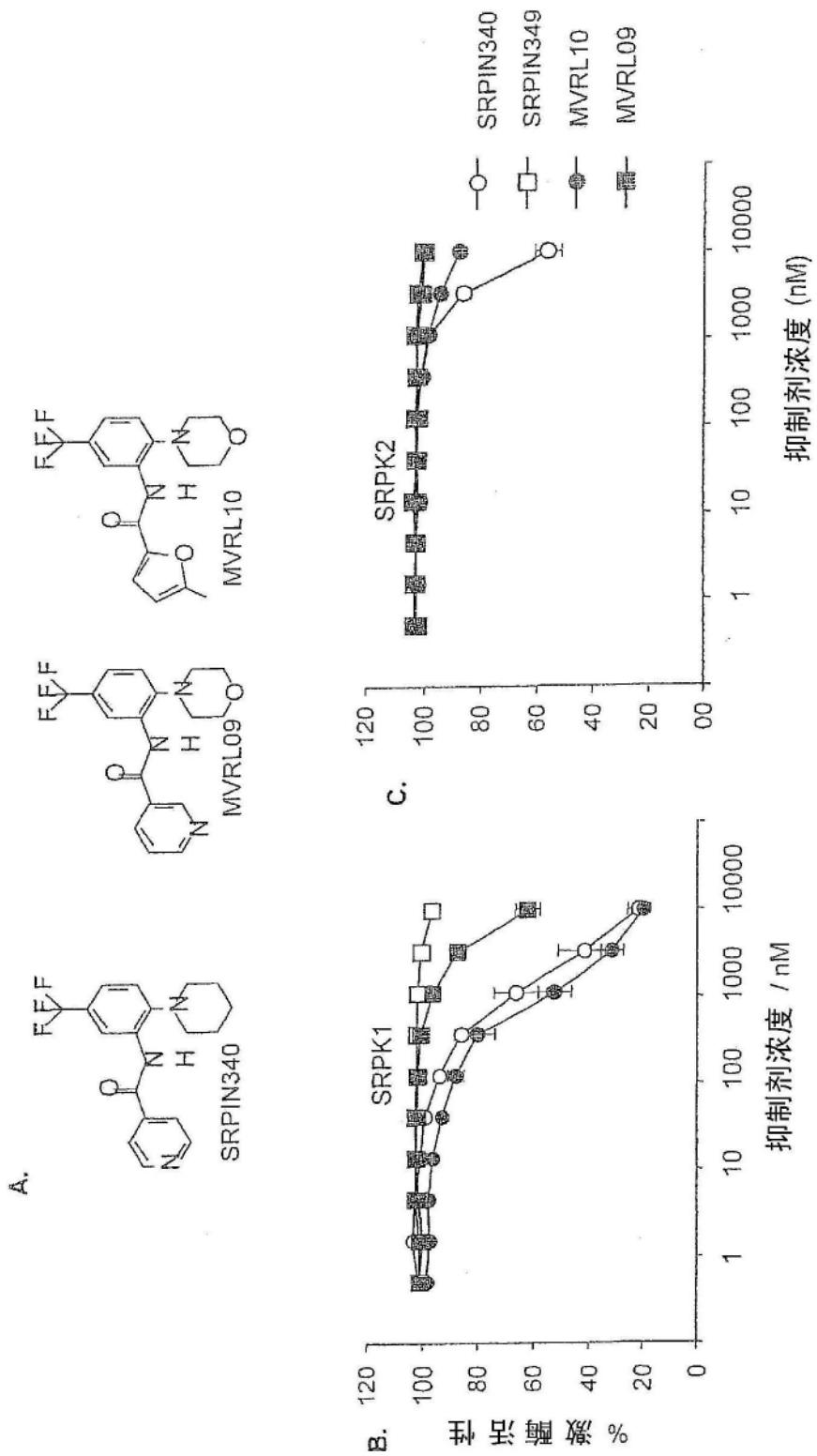
<220>

<223> PRIMER

<400> 5

gtccaccacc ctgttgctgt ag

22



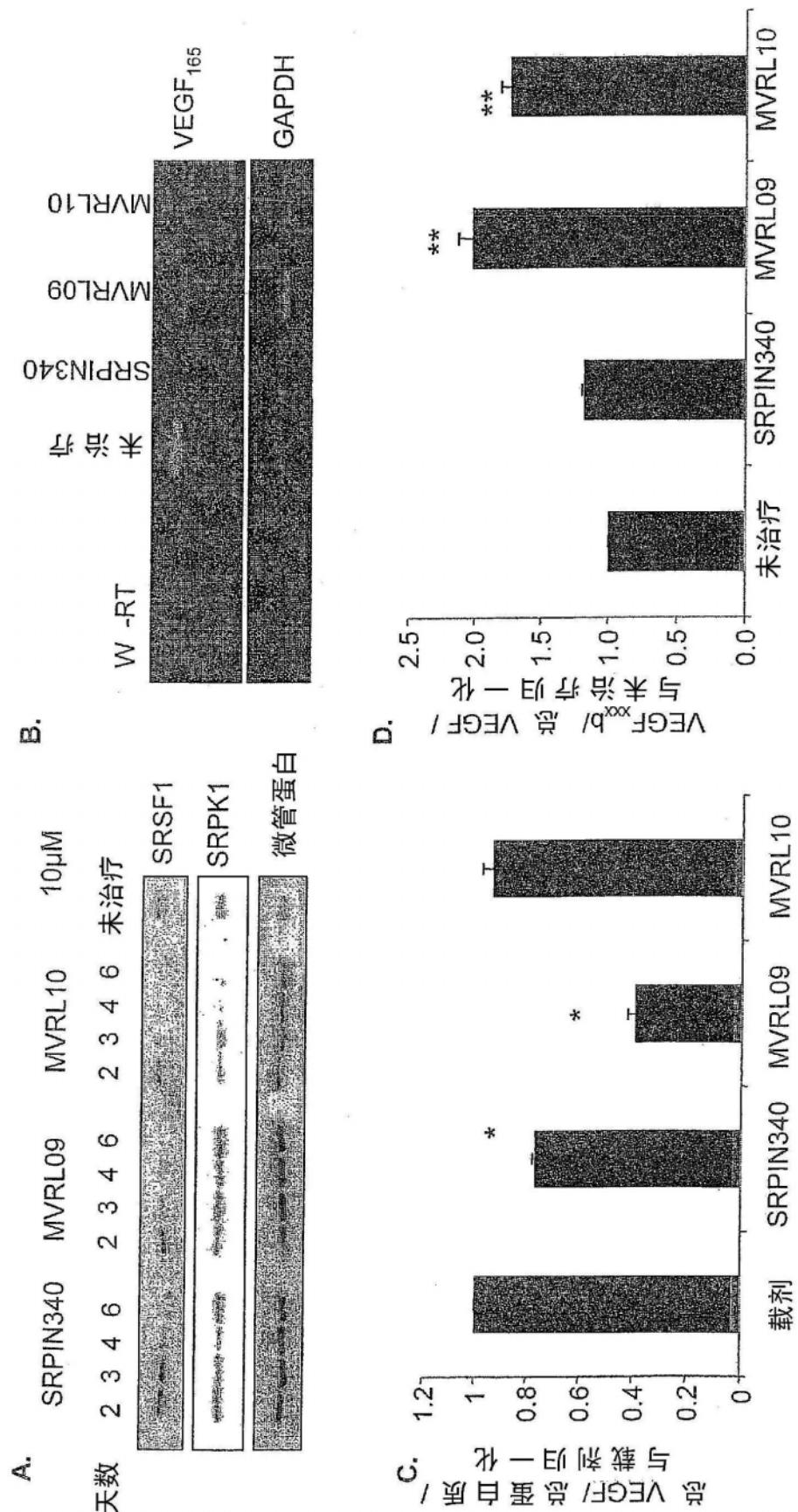


图2

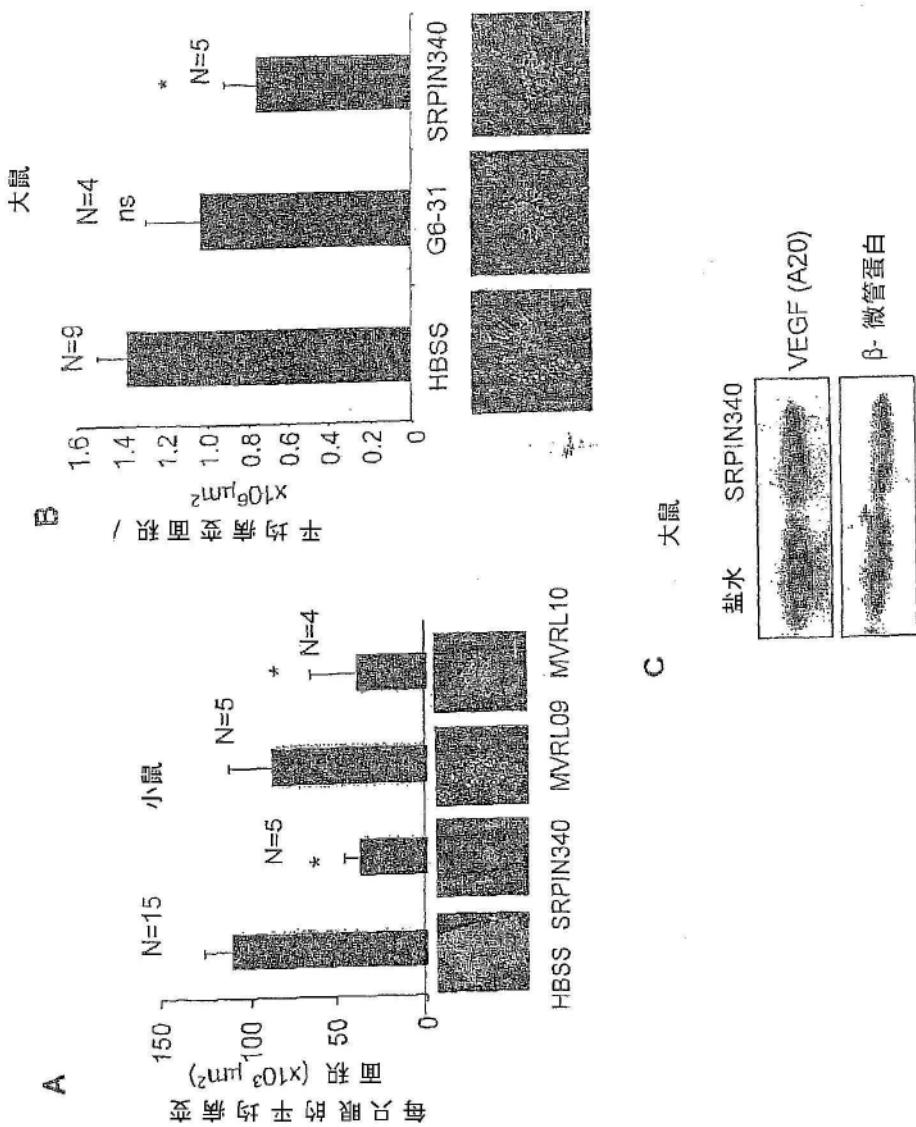


图3

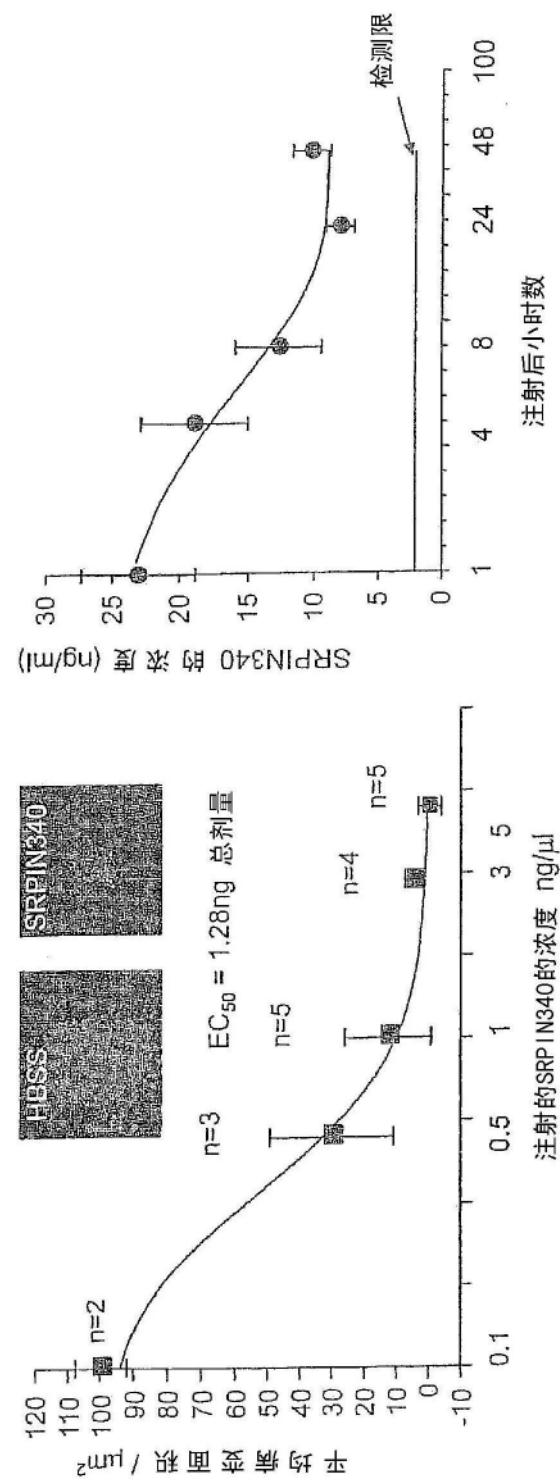


图4

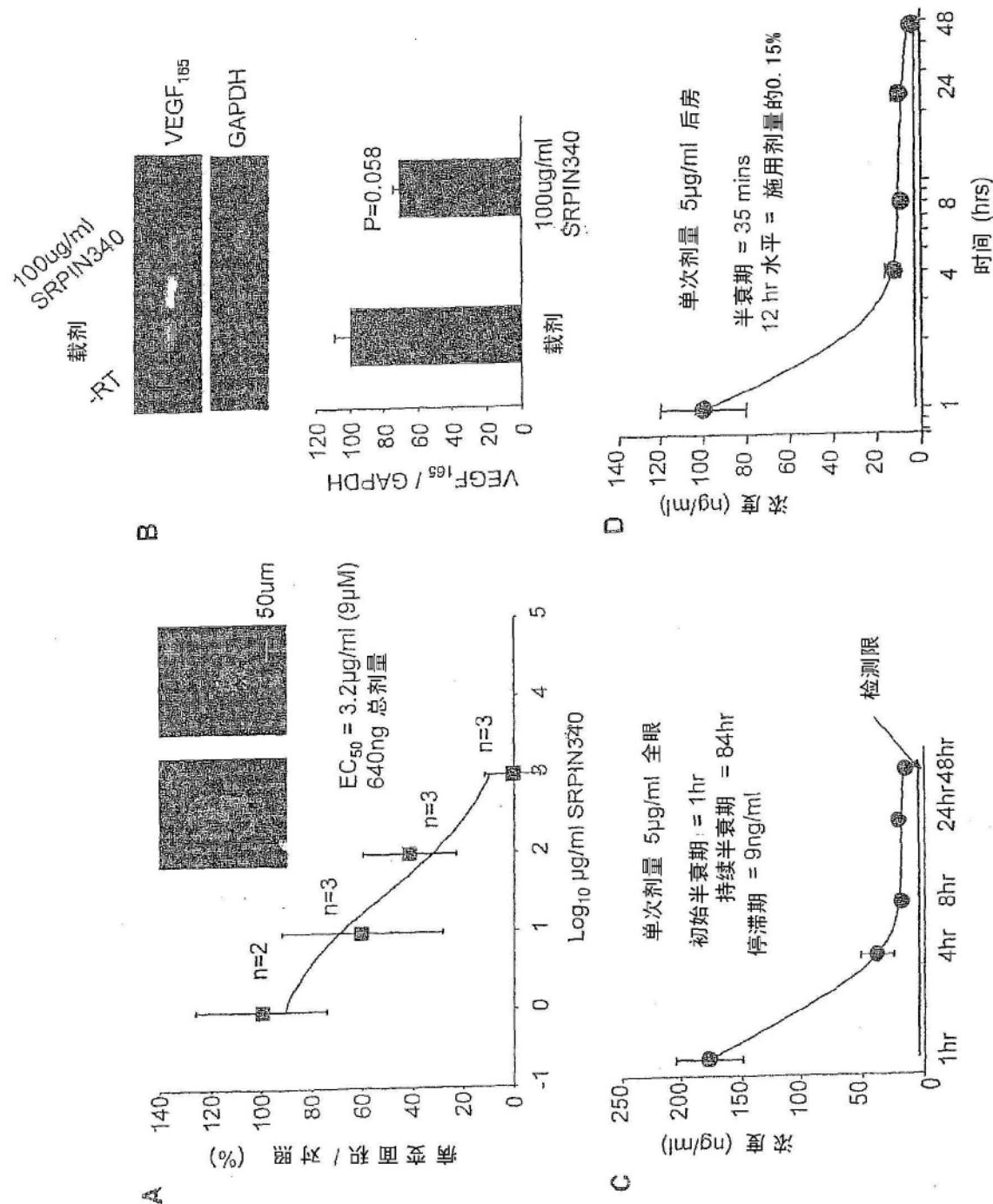


图5

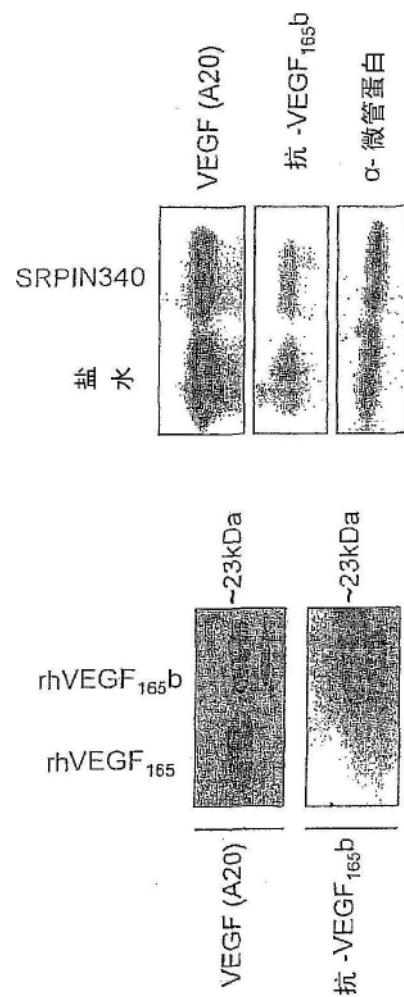


图6

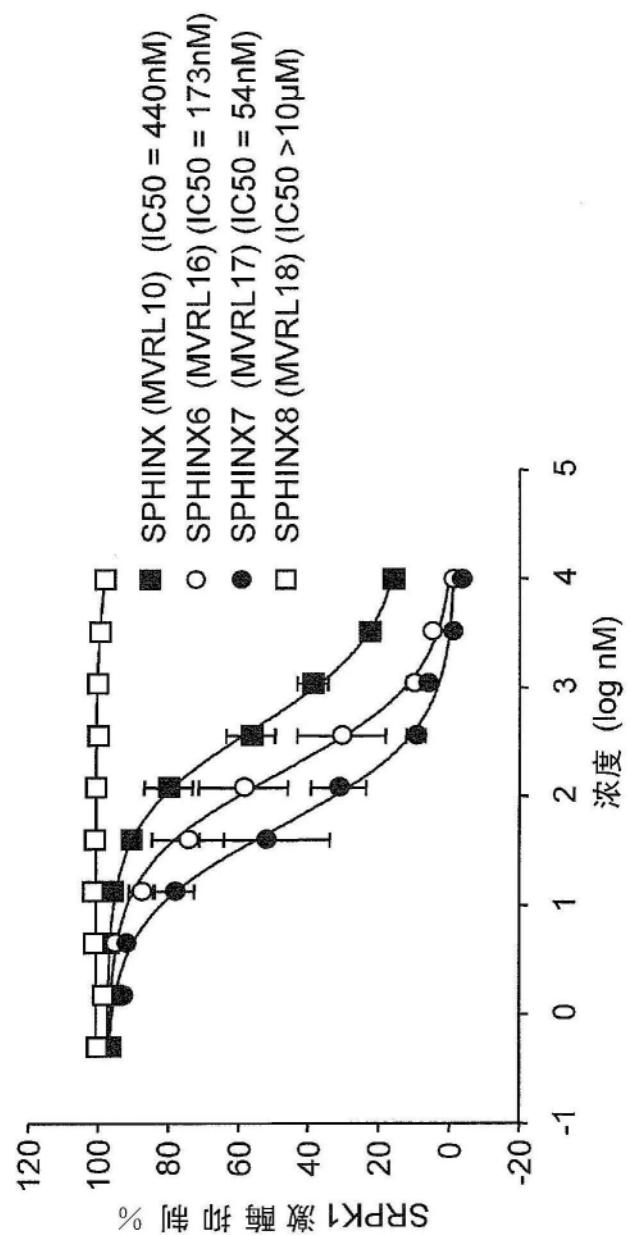


图7

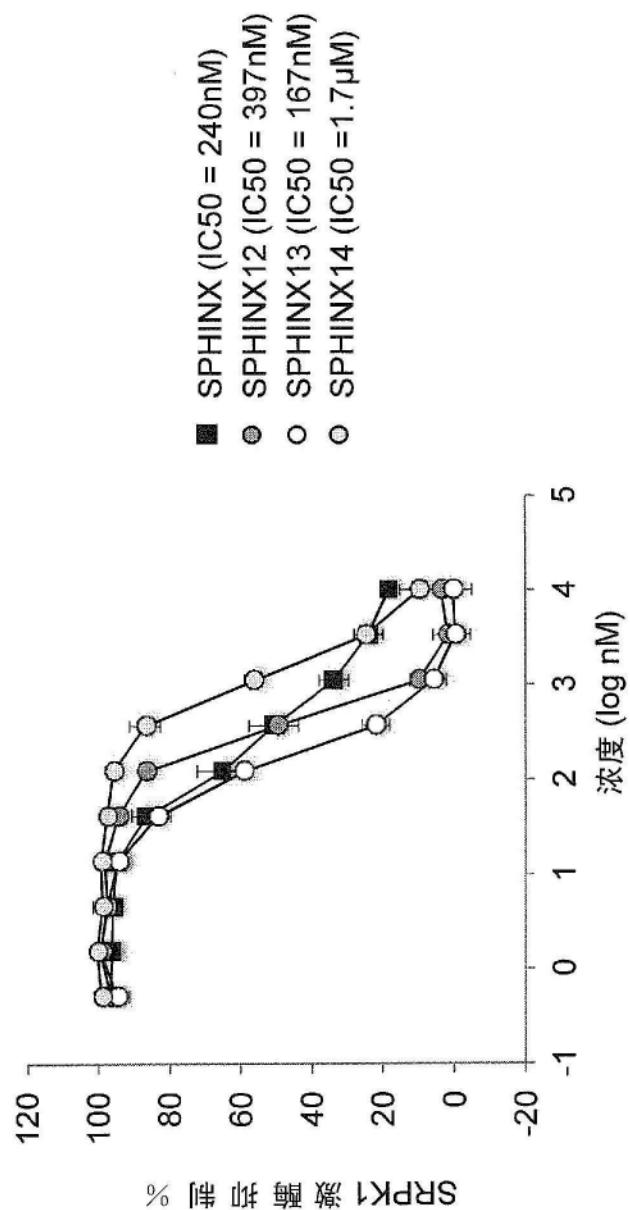


图8

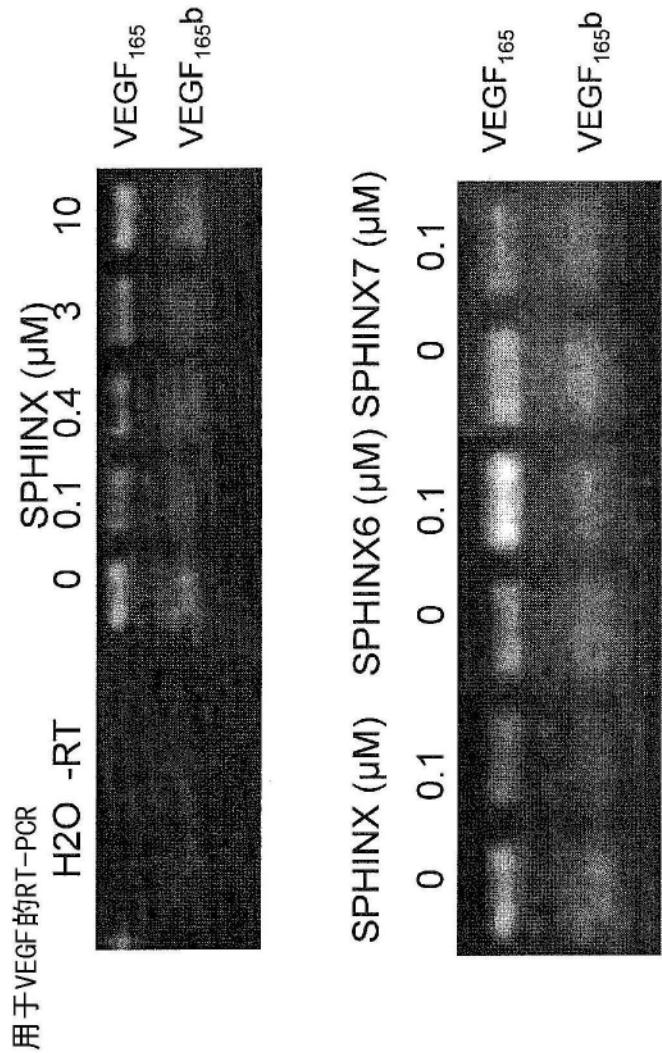


图9A

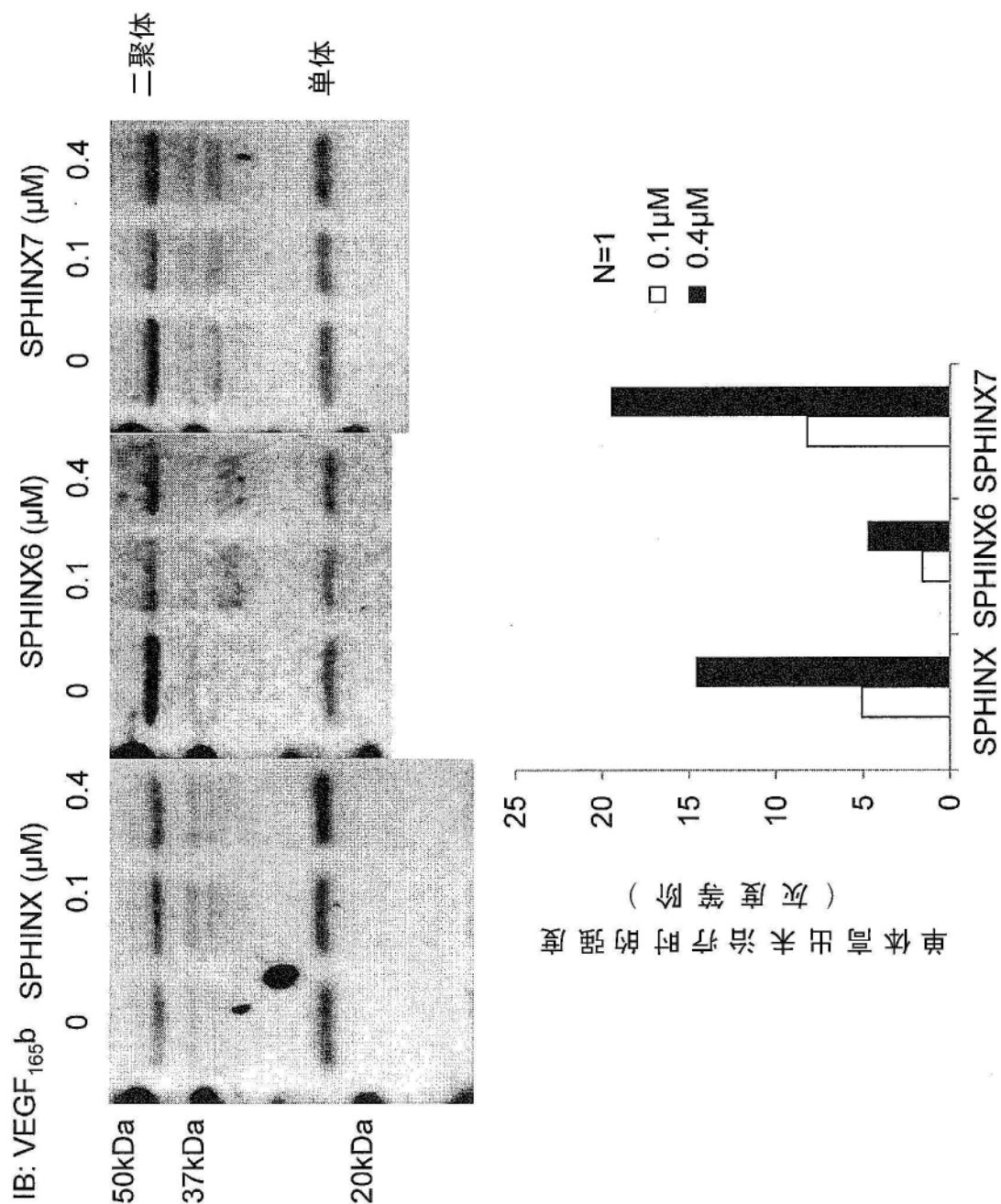


图9B

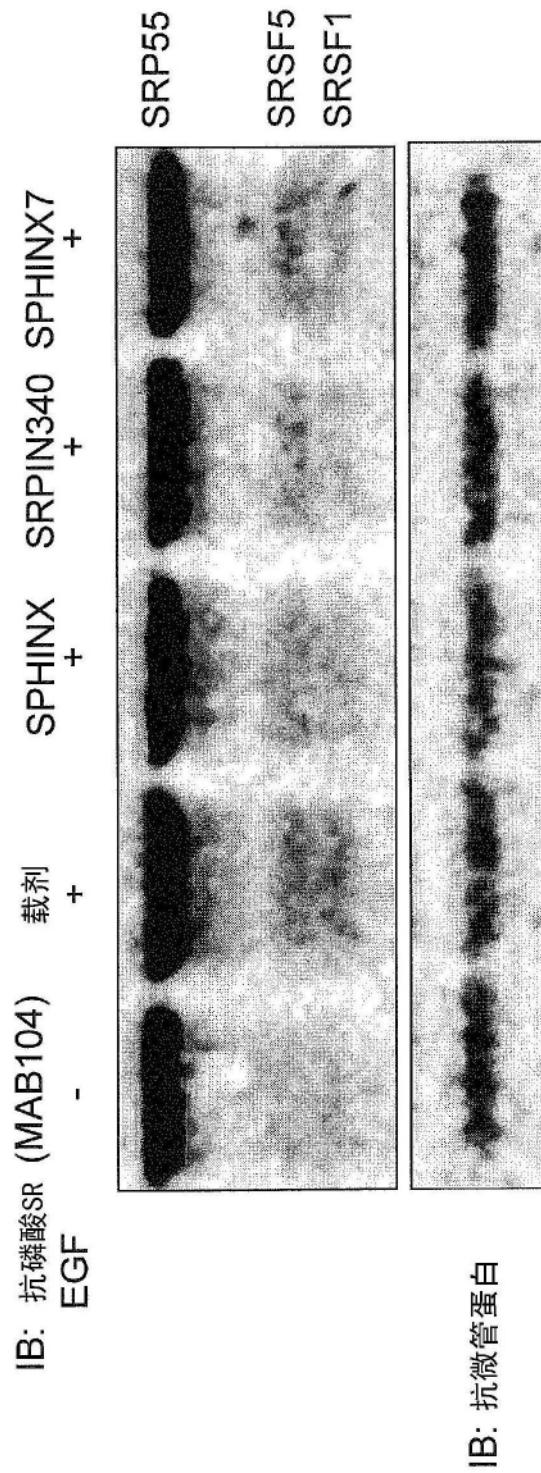


图10A

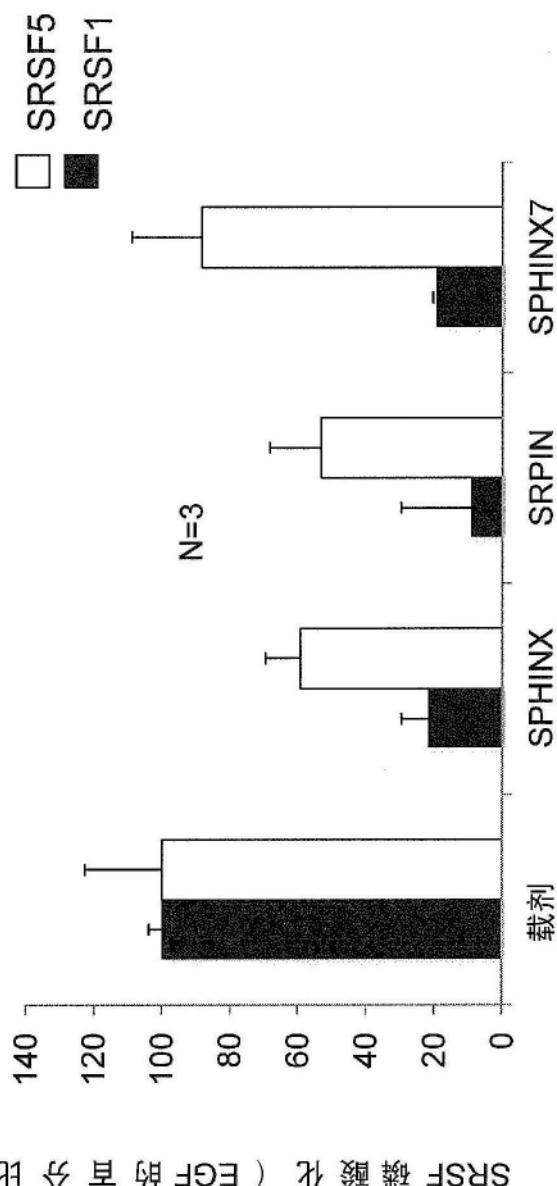


图10B

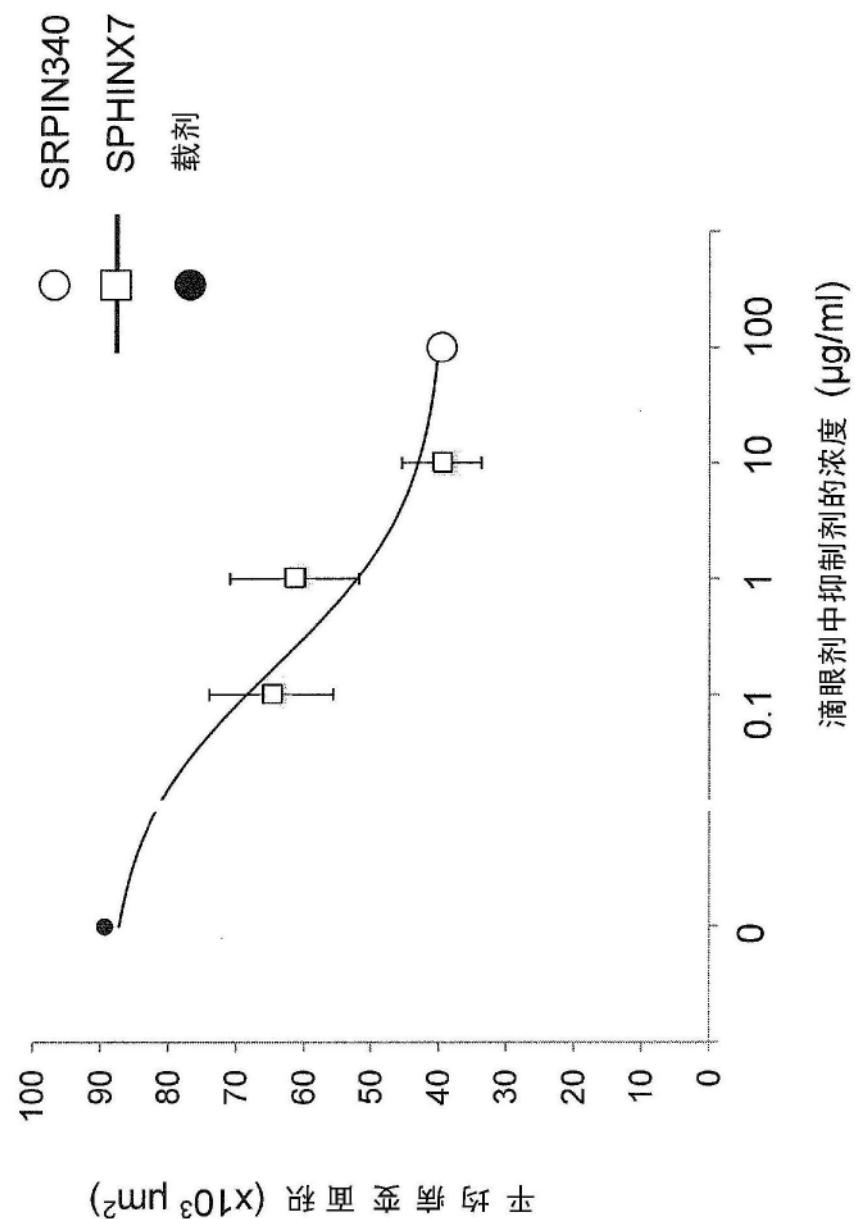


图11

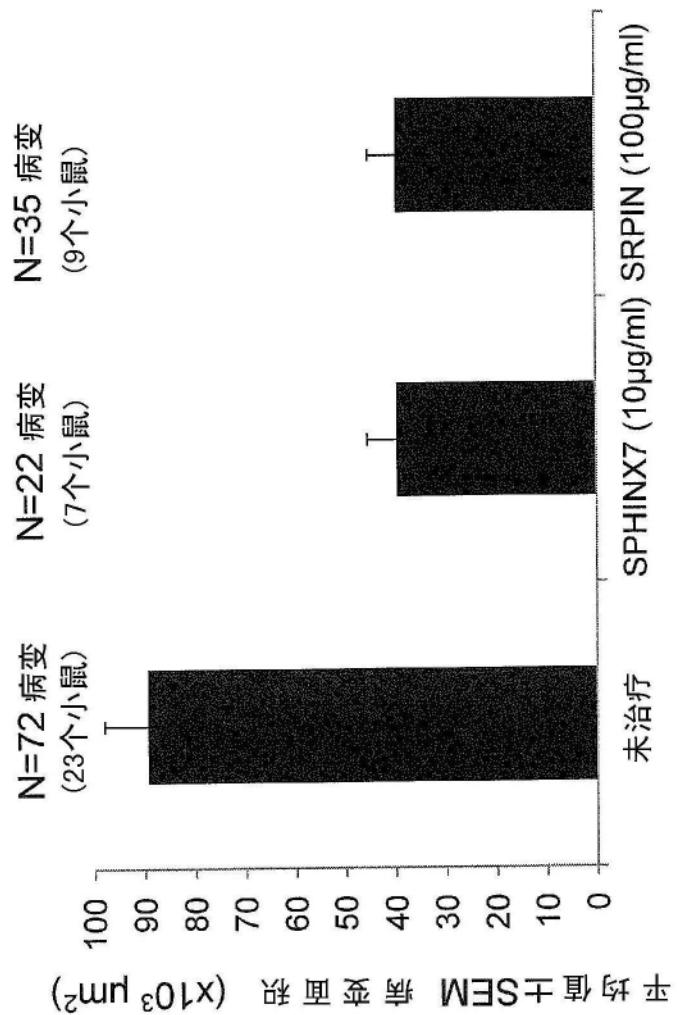


图12

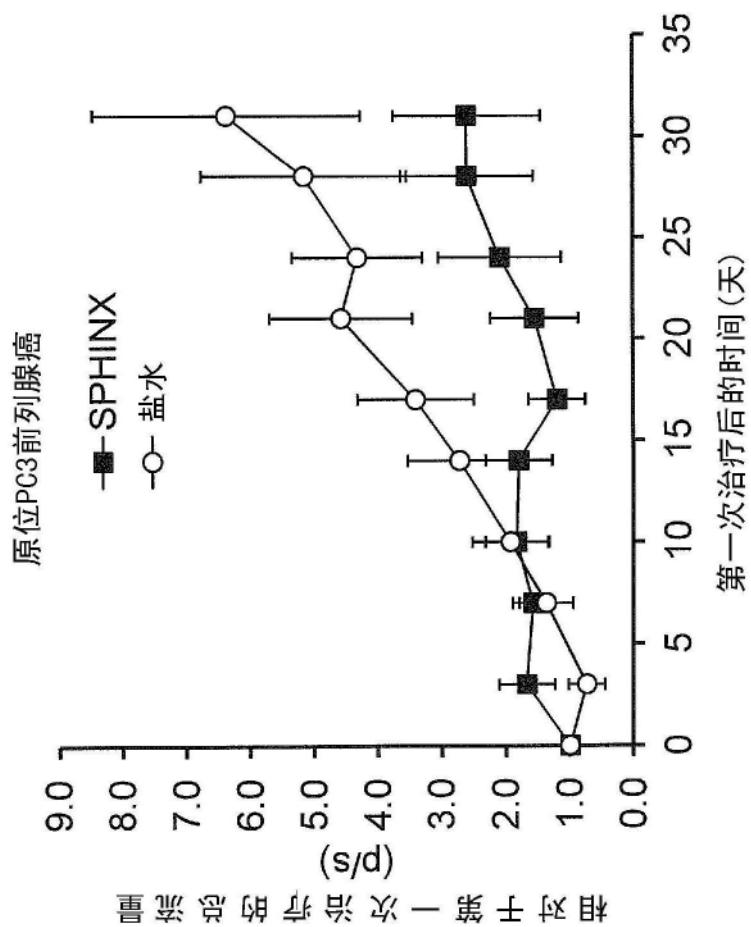


图13