

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 31/505

A61P 35/00



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 96196609.2

[45] 授权公告日 2003 年 7 月 9 日

[11] 授权公告号 CN 1113652C

[22] 申请日 1996.8.12 [21] 申请号 96196609.2

[30] 优先权

[32] 1995.8.15 [33] IL [31] 114951

[86] 国际申请 PCT/US96/13210 1996.8.12

[87] 国际公布 WO97/06805 英 1997.2.27

[85] 进入国家阶段日期 1998.2.27

[71] 专利权人 以色列农业部农业研究组织

地址 以色列拜特达干

共同专利权人 哈达西特医药研究服务与发展公司

[72] 发明人 A·纳格勒 S·斯拉温

I·夫劳达维斯基 M·皮尼斯

[56] 参考文献

US3320124 1968.01.01 A61K27/00

US3320124 1968.01.01 A61K27/00

审查员 姜 晖

[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

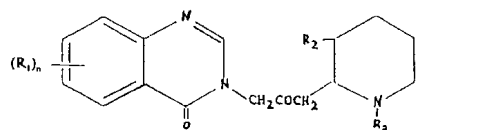
代理人 李华英

权利要求书 1 页 说明书 16 页 附图 6 页

[54] 发明名称 用于预防新血管生成及治疗人类恶性肿瘤的含喹啉酮的药物组合物

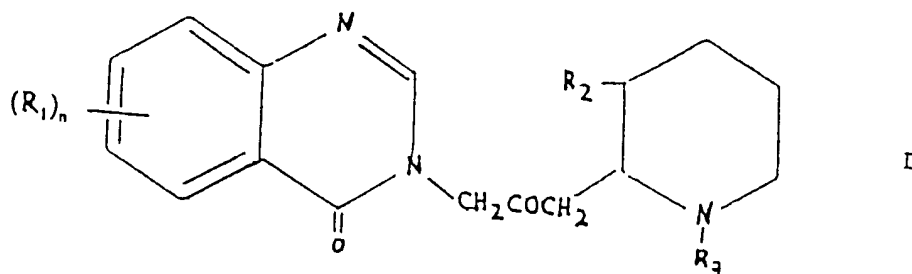
[57] 摘要

本发明提供了一种用缓减新血管生成和治疗人类癌性肿瘤的组合物,其中包括与药学上可接受的载体结合的作为活性组分的药物有效量的式(I)化合物:其中: $n=1$ 或 $2R_1$ 选自氢,卤素,硝基,苯并基,低级烷基,苯基和低级烷氧基; R_2 选自羟基,乙酰氧基和低级烷氧基,以及 R_3 选自氢和低级烯氧羰基。



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

1. 下式 (I) 的化合物及其生理上可接受的盐用于制备缓减新血管生成及治疗人类癌性肿瘤的药物中的用途



其中 $n = 1$ 或 2

R_1 选自氢, 卤素, 硝基, 苯并基, 低级烷基, 苯基和低级烷氧基;

R_2 选自羟基, 乙酰氧基和低级烷氧基, 以及

R_3 选自氢和低级烯氧羰基。

2. 根据权利要求 1 的用途, 其中所述的化合物为卤夫酮。

3. 根据权利要求 1 或 2 中所述的用途, 其中所述药物具有缓减新血管生成活性。

4. 根据权利要求 1 或 2 中所述的用途, 其中所述药物具有抗人类癌性肿瘤细胞增生作用。

用于预防新血管生成及治疗人类 恶性肿瘤的含喹唑啉酮的药物组合物

本发明涉及含喹唑啉酮的药物组合物。更具体地，本发明涉及减缓血管内皮细胞增生和管的形成并由此减缓与血管生成有关的疾病，以及治疗人类恶性肿瘤，即，抑制最初的肿瘤的生长，肿瘤的发展和转移的组合物，其中包括本申请定义的作为活性组分的喹唑啉酮衍生物。

1967年公开的美国专利 3,320,124 描述并要求保护一种用喹唑啉酮衍生物治疗球虫病的方法。卤夫酮，即 7-溴-6-氯-3-[3-(3-羟基-2-吡啶基)-2-氧代丙基]-4(3H)-喹唑啉酮，首先由美国氰胺公司 (American Cyanamid Company) 在该专利中描述并要求保护，它是该专利认定的优选化合物并且是该专利描述并要求保护的衍生物中已商品化的一个。

随后的美国重新公开的专利 26,833 和美国专利 4,824,847; 4,855,299; 4,861,758 和 5,215,993 都涉及到卤夫酮的抗球虫病性质。美国专利 4,340,596 提示卤夫酮也可用于治疗泰累尔氏梨浆虫病。

1991年，一位本发明的发明人发表论文报道以用作抑制球虫剂的推荐量使用卤夫酮时，发现胶原蛋白合成降低并认为是皮肤损伤中的重要诱因，而且被治疗的家禽皮肤强度降低。并且发现卤夫酮在细胞水平上通过鸟皮肤成纤维细胞抑制胶原蛋白的合成 [I. Granot, 等, Poult. Sci., Vol. 70, pp. 1559-1563(1991)]。

但是，那时没有人公开，认识到或推测到美国专利 No.3,320,124 公开的卤夫酮或有关的喹唑啉酮衍生物可有效地用于纤维化病的治疗以及用于再狭窄，肾小球硬化，和血管生成所决定的疾病的治疗。

与初级或次级纤维化有关的临床症状或疾病，如系统性硬化症，移植-对抗-宿主疾病 (GVHD)，肺与肝的纤维化以及各种自身免疫疾病的特征是过量产生结缔组织，这可导致正常组织结构和功能的破坏。这些疾病最好在细胞功能紊乱期被诊断，其主要表现为胶原蛋白过量沉

积。

一般的观点是，由于无法阻止其病理过程，现在大部分对纤维化疾病的治疗是无效的，效果很差的。为了降低细胞外间隙胶原蛋白沉淀，现已作过各种尝试。现已发现，进行性纤维化增生疾病显示结缔组织的过量产生。现已尝试开发药物抑制在纤维化中起重要作用的胶原蛋白的聚集〔K. I. Kivirikki, Annals of Medicine (医学年鉴), Vol. 25. pp. 113-126(1993)]。

这样的药物可通过调节前胶原多肽链的合成，或抑制某些特定的转译后过程而起作用，这既可减少细胞外胶原蛋白纤维形成也可减少变性纤维的聚集。尽管这种蛋白在维持组织完整性中很重要并且它牵连到各种疾病，但仅可获得很少的胶原蛋白合成抑制剂。

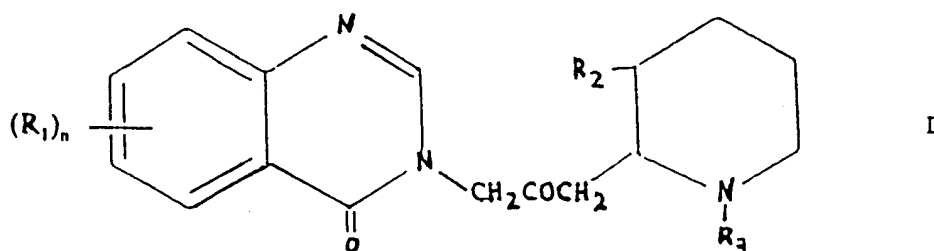
细胞毒性药物已被用于减缓胶原蛋白产生成纤维细胞增生〔J. A. Casas,等, Ann. Rheum. Dis., Vol. 46,p. 763(1987)]其中秋水仙碱可减缓胶原蛋白分泌物进入细胞外基质〔D. Kershenovich, 等, N. Engl. J. Med. (新英格兰医学杂志) Vol. 318, p. 1709(1988), 为重要胶原蛋白代谢酶的抑制剂〔K. Karvonen, 等, J. Biol. Chem., (生化杂志) Vol. 265, p. 8414 (1990); C. J. Cunliffe, 等, J. Med. Chem., (医用化学杂志) Vol. 35, p2652(1992)]。

不幸的是，这些抑制剂中没有一种是对胶原蛋白类特异的。而且，它可严重干扰其他重要的胶原蛋白分子如传统的补体途径中的胶原蛋白、神经肌肉连接终板乙酰胆碱酯酶、胶固素和肺表面活性剂脱辅蛋白质的生物合成，带来毒性后果。

其他可抑制胶原蛋白合成的药物，如硝苯吡啶和苯妥英，也拟制其他蛋白的合成，因此非特异性地阻断了胶原蛋白生物合成的途径〔T Salo, 等, J. Oral Pathol. Med., Vol. 19, p. 404 (1990)]。

胶原蛋白交联抑制剂，如 β -氨基-丙腈，也是非特异性的，尽管它们可被用作抗纤维化剂。长期使用这类药物可导致 lathritic 综合症并干扰弹性蛋白基因 (elastogenesis)，因为弹性蛋白，另一种纤维性结缔组织蛋白，也是交联的。另外，胶原蛋白交联抑制剂的作用是次级的，胶原蛋白的过量产生必先于其被胶原蛋白酶分解。

最近我们提交的序号为 08/181, 066 的美国专利申请描述并要求保护一种治疗人类患者纤维化疾病、再狭窄和肾小球硬化症的方法，其中包括对该患者使用含药物有效量的可有效抑制 I 型胶原蛋白合成的式 I 药物活性化合物：



其中： $n=1$ 或 2

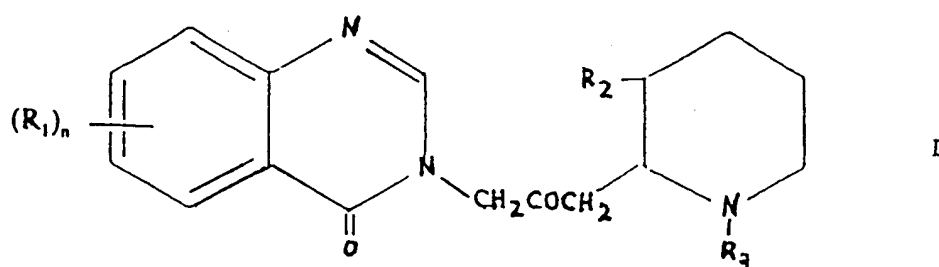
R_1 选自氢，卤素，硝基，苯并基，低级烷基，苯基和低级烷氧基；

R_2 选自羟基，乙酰氧基和低级烷氧基，以及

R_3 选自氢和低级烯氧羰基。

进一步研究和开发后，现已发现卤夫酮可用于缓减新血管生成，以及治疗人癌性肿瘤。因此可以相信，美国专利 3, 320, 124 描述和要求保护的其他喹唑啉酮也具有相似的性质，该文献作为参考收编于此。

因此，根据本发明，现在提供一种用于缓减新血管生成及治疗人类癌性肿瘤的组合物，其中包括与药学上可接受的载体混合的，作为活性组分的，药物有效量的式 I 化合物：



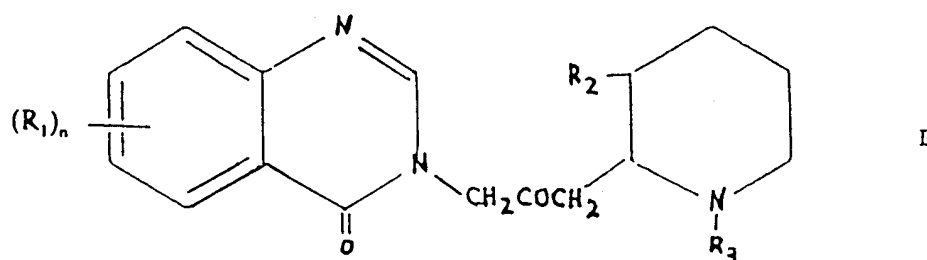
其中： $n=1$ 或 2

R_1 选自氢，卤素，硝基，苯并基，低级烷基，苯基和低级烷氧基；

R_2 选自羟基，乙酰氧基和低级烷氧基，以及

R_3 选自氢和低级烯氧羰基。

本发明还提供了一种治疗人类患者长期血管生成的方法，其中包括对该患者使用药物有效量的可有效缓减新血管生成的式 I 化合物：



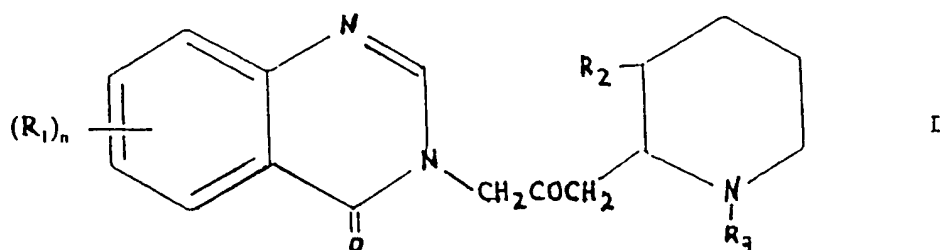
其中: $n=1$ 或 2

R_1 选自氢, 卤素, 硝基, 苯并基, 低级烷基, 苯基和低级烷氧基;

R_2 选自羟基, 乙酰氧基和低级烷氧基, 以及

R_3 选自氢和低级烯氧羰基。

本发明还提供了一种治疗人类患者癌性肿瘤的方法, 其中包括对该患者使用药物有效量的可有效抑制人癌性肿瘤细胞增生的式 I 化合物。



其中: $n=1$ 或 2

R_1 选自氢, 卤素, 硝基, 苯并基, 低级烷基, 苯基和低级烷氧基;

R_2 选自羟基, 乙酰氧基和低级烷氧基, 以及

R_3 选自氢和低级烯氧羰基。

根据本发明, 也提供了式 I 化合物在制备具有如本申请所述的减缓新血管生成活性的药物中的用途。

本发明还提供了式 I 化合物在制备具有如本申请所述的抗人肿瘤细胞增生作用的药物中的用途。

本发明的优选方案中, 该化合物为卤夫酮。

在序号为 08/181, 066 的美国专利申请中, 清楚地显示和说明了本发明化合物可有效地治疗纤维化疾病如硬皮病和 GVHD, 以及再狭窄和肾小球硬化症。该申请排除了任何无根据的推测, 如化合物在作用产生前可能是无活性的; 化合物可能未到达靶区域, 或者其他机能性质可能

使化合物不适用于体内。而且，通过同一化合物在与过量胶原蛋白沉积有关的两种特定的纤维化疾病，即，硬皮病和 GVHD，以及再狭窄和肾小球硬化症的治疗中的确凿事实可完全反驳那些可能性。因此，将上述美国专利申请作为参考文献收编于此。

按照本发明的新发现，血管生成是一个复杂的过程，其中毛细血管按一定的顺序生长〔J. Folkman 和 M. Klagsbrun, “血管生成的因素”，Science（科学），Vol. 235 pp. 442-447(1987); J. Folkman 和 Y. Shing, “血管生成”，J. Biol. Chem.，（生化杂志），Vol. 267 pp.10931-10934(1992)〕。当新的毛细血管新芽从小静脉旁生长时，内皮细胞剥蚀基底膜，迁移至血管生成处，增生，形成一个腔，两个新芽的顶端连接，产生一个毛细血管环，并产生了新的基底膜〔J. Folkman, “弄清血管生成的原因：探索与发现”，Perspectives in Biology and Medicine，（生物学与医学透视），Vol. 29, pp. 1-36 (1985)〕。

ECM（内皮细胞膜）的剥蚀和重建是血管生成的基本过程。另外，由内皮细胞合成的 ECM 组分（即，胶原蛋白，层粘连蛋白，血小板反应蛋白，纤连蛋白和 SPARC）具有调节内皮细胞生长，迁移和成形的功能〔J. Bischoff, “Approaches to Studying Cell Adhesion Molecules in Angiogenesis”，（血管生成中细胞粘合分子的研究），Trends Cell Biol.（细胞生物学动向），No. 5, pp. 69-74(1995)〕。现已报导牛主动脉内皮细胞（BAE）在出芽和形成血管中合成 I 型胶原蛋白和 SPARC。现在提出 I 型胶原蛋白可参与直接迁移和 BAE 细胞装配〔M. L. Jruela-Arispe, 等, Lab, Invest No. 64, pp.174-186(1991)〕。并已发现外源的 I 型胶原蛋白通过融合人类皮肤微血管内皮细胞而加速血管的形成〔C. I. Jackdon 和 K. L. Jenkins, Exp Cell Res.，No. 192, pp. 319-232(1991)〕。血管的腔内含胶原纤维，说明内皮细胞使用原纤维折迭并排列成血管结构。

由于大范围的血管生成是与胚胎发育相伴的，因此健康成人中现有血管的出芽和再生的非凡能力已大部退化〔J. Folkman and Y. Shing, ibid. (1992)〕。

病理条件下，正常的限制血管生成的控制机制被破坏，血管无控制

地生成。结果是，过量的血管生成产生了一些所谓“血管生成病”〔 J. Folkman, “癌症, 血管病, 类风湿病和其他疾病中的血管生成”, Nature Medicine, (天然药物), Vol. 1, pp. 27-31(1995)〕。一些血管生成疾病, 包括血管过量向视网膜内生长的视网膜病, 导致视觉障碍甚至失明〔 J. Folkman. *ibid.* (1995)〕。

但是, 不正常的血管生成起重要作用的破坏性最强的疾病是实体瘤的发展和蔓延。众所周知, 一旦肿瘤已经出现, 肿瘤细胞数的任何增加前一定都有新的毛细血管的增加, 这些毛细血管集中在肿瘤上并向肿瘤细胞提供氧和营养〔 J. Folkman. *ibid* (1985); J. Folkman, “What Is the Evidence that Tumors Are Angiogenesis Dependent?” (肿瘤依赖于血管生成的证据), J. Natl. Cancer Inst., Vol. 82, pp. 4-6 (1989); N. Weidner, 等, “Tumor Angiogenesis Correlates with Metastasis in Invasive Prostate Carcinoma” (侵入性前列腺癌中肿瘤血管生成与迁移的关系) Amer. J. Pathol., Vol 143, pp. 401-409(1993)〕。因此, 只要伴随的血管生成过程的活化被防止, 肿瘤可以保持无害并固定于它们的原来的组织中。

由于由各种原因引起的实体肿瘤在其肿瘤生长中均有与血管生成有关的步骤, 因此抑制与肿瘤有关的血管生成最有可能克服癌症〔 M. S. O' Reilly, 等, “A Novel Angiogenesis Inhibitor that Mediates the Suppression of Metastases by a Lewis Lung Carcinoma,” (介导路易斯肺恶性肿瘤扩散抑制的新的血管生成抑制剂), Cell, Vol. 79, pp. 316-325(1994)〕。

具体的实验结果支持这样的假设: 肿瘤血管生成是实体肿瘤生长和转移的基础〔 J. Folkman, *ibid.* (1989); N. Weidner, 等, *ibid* (1993); M.S. O' Reilly, 等, *ibid* (1994); N. Weidner, 等 “Tumor Angiogenesis and Metastasis -Correlation in Invasive Breast Carcinoma,” (侵入性乳腺癌中肿瘤血管生成和扩散的关系), N. Eng. J. Med., Vol. 324, pp. 1-8(1991)〕。实际上, 在新血管生成发生之前在临床上大多数实体肿瘤都不能诊断, 新血管的生成在实体肿瘤中的诱导是由一个或多个血管生成因子传递的〔 J. Folkman, *ibid*(1987); J. Folkman and Y. Shing,

ibid.(1992)] .另外, 抑制血管增生和进入指定器官的能力具有治疗其他疾病的可能性, 这是医学的首要问题。

长期的血管生成可见于各种病理状态, 如关节炎, 牛皮癣, 糖尿病性视网膜炎, 慢性炎症, 硬皮病, 血管病, 晶状体后纤维组织形成和血友病关节中非正常毛细血管增生, 延长的月经和失血, 以及其他女性生殖系统的疾病 [J. Folkman, ibid (1995); J W. Miller,等 “ Vascular Endothelial Growth Factor/ Vascular Permeability Factor Is Temporarily and Partially Correlated With Ocular Angiogenesis in a Primate Model ” (血管内皮生长因子/血管渗透因子在灵长目模型的眼血管生成中临时的和部分的联系), J. Pathol. Vol. 145, pp. 574-584(1994); A.P.Adamis ,等, “ Increased Vascular Endothelial Growth Factor Levels in the Vitreous of Eyes with Proliferative Diabetic Retinopathy ” (具有增生性糖尿病视网膜炎的眼玻璃体中升高的血管内皮生长因子水平) Amer. J. Ophthal. ,Vol. 118, pp. 445-450(1994); K. Takahashi,等, “ Cellular Markers that Distinguish the Phases of Hemangioma during Infancy and Childhood,” (区别婴儿期和儿童期血管瘤期的细胞标志) J. Clin. Invest., Vol. 93, pp. 2357-2364(1994); D.J. Peacock, 等 , “ Angiogenesis Inhibition Suppresses Collagen Arthritis , ” (抑制胶原蛋白关节炎的血管生成抑制), J.Exp.Med. Vol.175, pp. 1135-1138(1992); B. J. Nickoloff, 等 , “ Aberrant Production of Interleukin-8 and Thrombospondin-1 by Psoriatic Keratinocytes Mediates Angiogenesis,” Amer J. Pathol. , Vol.44. pp. 820-828(1994); J. Folkman, “ Angiogenesis in Female Reproductive Organs ” (女性生殖器官的血管生成), in: Steroid Hormones and Uterine Bleeding ,N. J. Alexander and C. d' Arcangues ,Eds,American Association for the Advancement of Science Press,Washington, D. C. U. S. A. ,pp. 144-158(1992)] .

在许多上述异常现象中, 无限制的新的毛细血管的生长本身就是疾病的过程。例如, 在关节炎中, 新毛细血管可侵入并破坏关节软骨。在糖尿病中, 眼中新的毛细血管出血并导致失明。某些发展中的疾病, 如

肠闭锁、血管畸形，和单侧筋膜萎缩，也可由不正常的血管生成产生〔J. Folkman, *ibid.*(1995)〕。

正在研究几种血管生成抑制剂；其中包括血小板因子4，烟曲霉素衍生物 AGH 1470，干扰素 α 29，血小板反应蛋白，血管抑制类固醇（angiostatic steroids），和血管抑制素（angiostatin）〔J. Folkman, *ibid.* (1995); M.S.O'Reilly 等, *ibid.*(1994); V. Castle,等, “Antisense-Mediated Reduction in Thrombospondin Reverses the Malignant Phenotype of a Human Squamous Carcinoma,” *J. Clin. Invest.*, Vol. 87, pp. 1883-1888; D. Ingber 等 “Synthetic Analogues of Fumagillin that Inhibit Angiogenesis and Suppress Tumor Growth,”（抑制血管生成和肿瘤生长的烟曲霉素的合成类似物）*Nature*（自然），Vol. 348, pp. 555-557〕。

尽管为了更充分地理解和正确评价本发明，下面将以与某些优选方案有关的附图和实施例描述本发明，但是我们并不打算将本发明限制在这些特定的优选方案中。相反，本发明应覆盖如所附的权利要求书中限定的包括在本发明范围内的所有选择，修改和等同情况。因此，下列包括优选方案的附图和实施例用于说明本发明的具体实施，显然，以实施例的方式显示的特例仅为了说明和讨论本发明的优选方案，提供它们的原因是使大家最实用地、最容易地理解本发明对制剂过程以及原则和概念的描述。

用下面的附图描述实验结果，其中：

图 1A 和 1B 表示剂量反应曲线，显示卤夫酮对无（图 1A）或有（图 1B）1 ng/ml 基本成纤维细胞生长因子存在下，对混入存在于培养物中的牛主动脉内皮细胞中的 ^3H -胸苷的作用。

图 2A 表示呈毛细血管网状结构的牛主动脉内皮细胞的组织。单层细胞上覆盖了胶原蛋白凝胶并暴露于 1 ng/ml b FGF 加 1 ug/ml 肝素中。培养基中存在 2 天后拍摄对照显微照片。该细胞组织再生为毛细血管样血管的分支及交织网状结构。

图 2B 显示用 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 卤夫酮培养后图 2A 的内皮细胞培养物。这些细胞保持非重叠，单层排列，未形成典型的分支及交织毛细血管样管。

图 3A 表示从植入 I 型胶原蛋白凝胶的从鼠主动脉环分支的新形成的 (10 天) 微血管, 引起环和结网的增长。

图 3B 显示用 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 卤夫酮培养后的图 3A 的鼠主动脉环, 培养液隔天置换。单细胞从主动脉环向外周迁移, 但未排列成微血管。

图 4 为使用植入图 3 测定的兔主动脉环的 I 型胶原蛋白的, 显示与卤夫酮对微血管形成抑制效果有关的时间与剂量的曲线图。

图 5 为显示第 2 天 (1) 或第 6 天 (2) 时除去卤夫酮导致微血管形成 (在第 14 天评估) 的特征条形图, 它与未处理过的主动脉环 (未处理) 相似。经 14 天的培养期后, 卤夫酮对微血管的形成出现完全的抑制。

图 6 为表示卤夫酮对硫酸盐混入内皮下的 ECM 的作用的特征曲线。将牛角膜内皮细胞以融合细胞密度接种并暴露于存在 $\text{Na}_2 [^{35}\text{S}] \text{O}_4$ 的 1 $\mu\text{g/ml}$ 卤夫酮中 ($\square$)。对照细胞 ($\blacksquare$) 保持无卤夫酮。在不同的时间点, 将细胞层溶解, 暴露其下面的 ECM, 用胰蛋白酶消化, 并将溶解了的物质在 β - 闪烁计数器中计数。

图 7A 为显示卤夫酮对混入自动生长的, 亚融合的, 人平滑肌肉瘤细胞的 ^3H -胸苷的作用的特征曲线。

图 7B 比较了有无 10 ng/ml 卤夫酮时 10 % FCS ($\blacksquare$) 或 10 ng/ml HB-EGF ($\boxtimes$) 对刺激平滑肌肉瘤细胞增生的抑制。

实施例

实验步骤

细胞

如前所述 [D. Gospodarowicz, 等, “ Clonal Growth of Bovine Endothelial Cells : Fibroblast Growth Factor as a Survival Agent ” (牛血管内皮细胞的无性生长: 作为存活剂的成纤维细胞生长因子) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Vol. 73, p. 4120(1979)] , 由牛主动脉制备血管内皮细胞培养物。37 $^{\circ}\text{C}$ 下在该培养物贮存在 10 % CO_2 湿润的培养器中的用 10 % 小牛血清, 50U/ml 青霉素, 和 50 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素补充的 DMEM (每升 1g 葡萄糖) 中。细胞自动生长期隔天加入特别纯化的脑衍生的 bFGF (100 ng/ml) [D. Gospodarowicz, 等, *ibid.*(1979); I. Vlodavsky, 等, “ Vascular Endothelial Cells Maintained in the Absence

of Fibroblast Growth Factor Undergo Structural and Functional Alterations that Are Incompatible with Their in Vivo Differentiated Properties,” J. Cell Bio. Vol. 83 ,pp. 468-486(1979)】。

细胞增生：混入 ^3H - 胸苷

将牛主动脉内皮细胞点于 (4×10^4 细胞/16mm 孔) 用 10 % 小牛血清补充的 DMEM 中。接种后四天，在有或无 1 ng/ml bFGF 存在下，将该细胞暴露于增加浓度的卤夫酮 (100 - 500ng/ml)。过 48 小时，加入 ^3H -胸苷 (1 μCi /孔)，通过测量混入三氯乙酸不溶物的放射性测定 DNA 合成 [M. Benezra, 等, “ Reversal of bFGF Autocrine Celd Transformation by Aromatic Anionic Compounds,” Cancer Res., Vol. 52, pp. 5656-5662(1992); I. Voldavsky, 等, “ Endothelial Cell-Derived Basic Fibroblast Factor :Synthesis and Deposition into Subendothelial Extracellular Matrix,” Proc,Natl. Acad. Sci.U. S. A., Vol. 84,pp. 2292-2296(1987)】。

通过培养的内皮细胞的 ECM 沉积

用小牛眼睛制备角膜内皮细胞培养物并按前述保存 [D. Gospodarowicz, 等, “ Stimulation of Corneal Endothelial Cell Proliferation in Vitro by Fibroblast and Epidermal Growth Factors,” Exp. Eye Rse., No. 25,pp. 75-89(1977)】。将细胞在 37℃ 在 10 % CO_2 湿润的培养器中培养，用早期(3 - 8)细胞传代完成实验。

为了制备硫酸盐标记 ECM，在融合密度下，在 4 - 6 小时内将角膜内皮细胞接种在 4 - 孔盘中，形成接触抑制的紧密排列组成的且生长被抑制的单层细胞。在这些条件下，细胞维持存活并保持它们正常的单层构型和形态直到卤夫酮的浓度为 2ug/ml。接种后一和五天加入 Na_2 [^{35}S] O_4 (540-590mCi/mmol)，培养介质无变化。在接种后的不同间隔，通过用含 0.5 % Tritonx-100 和 20mM NH_4OH 的 PBS 溶解 (5 分钟，室温) 细胞层而暴露亚内皮细胞 ECM，接着在 PBS 中洗涤四次 [I. Vlodavsky, 等, “ Lymphoma Cell Mediated Degradation of Sulfated Proteoglycans in the Subendothelial Extracellular Matrix Relationship to Tumor Cell Metastasis ,” Cancer Res .Vol. 43, pp.

2704-2711(1983);I. Vlodavsky,等 “ Endothelial Cell - Derived Basic Fibroblast Growth Factor: Synthesis and Deposition into Subendothelial Extracellular Matrix , ” Proc. Natl. Acad. Sci. USA , Vol. 84, pp. 2292-2296(1987)] 。为了测定硫酸盐标记的物质的总量,用胰蛋白酶消化 ECM (25 μ g/ml, 24 小时, 37 $^{\circ}$ C)在 β -计数器中对溶解物质计数。

I型胶原蛋白的三维凝胶中的体外血管生成

由成年 Sprague-Dawley 鼠尾腱制备 I 型胶原蛋白。简单地说,通过在 4 $^{\circ}$ C, 在无菌的 1/1000 (v/v) 乙酸溶液 (lg 胶原蛋白 300ml) 中搅拌 48 小时来溶解胶原蛋白纤维。将所得溶液用无菌三层网过滤,在 4 $^{\circ}$ C 下以 16,000g 的速度离心 1 小时。然后将上清液用 1/10 DMEM 充分透析并在 4 $^{\circ}$ C 保存。通过同时升高胶原蛋白溶液 pH 值和离子强度而得到胶原蛋白基质凝胶。为了这个目的,将 7 体积胶原蛋白溶液与 1 体积的 10xMinimum Essential Medium (最低限度培养基) 和 2 体积碳酸氢钠 (0.15M) 快速混合。

从通过断头处死的 1 - 到 2 - 月龄 SD 鼠得到胸主动脉 [R. F. Nicosia 和 A. Ottinetti, “ Growth of Microvessels in Serum-free Matrix Culture of Rat Aorta ” Lab. Invest. Vol.63, pp. 115-122(1990)] 。将主动脉立即用 PBS 移至培养皿。解剖显微镜下仔细地除去主动脉周围的纤维脂肪组织,将 1mm 长的主动脉环切开并在 PBS 中充分冲洗。

将胶原蛋白溶液 (0.2ml) 加入各个 16mm 孔中并在 37 $^{\circ}$ C 胶化 15 分钟。将各主动脉环移至凝胶的中心定位并将另外的 0.4ml 胶原蛋白溶液仔细地倒入环的顶部。凝胶形成后,加入无血清的内皮生长介质,加入或不加入 0.1 μ g/ml 卤夫酮,并隔天换介质。

内皮细胞在体外构成毛细血管样网状结构

将牛主动脉内皮细胞在 24 - 孔板的 16mm 孔内接种并使其生长 24 小时,得到次融合单层。然后除去培养液介质,将 0.4ml 上述冷却的胶原蛋白混合物倒在单层细胞上,并使其在 37 $^{\circ}$ C 聚合 10 分钟。胶原蛋白胶化后,加入含有或不含有各种浓度的卤夫酮的新鲜介质 (0.6ml) 。用 Zeiss 反相对照摄影显微镜监测并拍摄内皮细胞单层的重组 [R.

Montesano,等, “In Vitro Rapid Organization of Endothelial Cells into Capillary-like Networks Is Promoted by Collagen Matrices,” J. Cell Biol., Vol. 97, pp. 1648-1652(1983)】.

卤夫酮对人平滑肌肉瘤肿瘤细胞增生的作用

按〔R. S. Mangrulkar,等, *ibid*〕所述,从女性子宫切除手术中得到人平滑肌肉瘤样品。将粉碎的组织置于20ml冷的均化缓冲液: 1M NaCl, 10mM Tris (pH7.4), 1mM EDTA, 1mM 苯甲脒, 0.1%CHAPS, 0.01%Aprotinin(抑蛋白酶肽)(Sigma), 10μg/ml亮肽素, 1mM AEBSF〔R. S. Mangrulkar,等, *ibid*.〕。将样品均化2分钟并在4℃下以12000xg的转速离心60分钟。将上清液用10mM Tris(pH7.4)稀释(1:5)至最终产体积为100ml,用0.45μm尼龙滤器过滤。将细胞固定并保存在DMEM加10%小牛血清中。几代后细胞仍能存活,但使用2或3代的细胞。对于增生测定,将细胞以10,000细胞/孔的量接种在含200μl介质(含有4.5g/L葡萄糖,10%小牛血清,1%谷氨酰胺,1%青霉素/链霉素的DMEM)的96孔培养皿中,并培养2天直到融合。将介质变为含有0.5%小牛血清,1mM胰岛素和5μM运铁蛋白的DMEM。24小时后加入样品(5-10μl),过24小时后,在每孔中加入〔³H〕胸苷(1μCi/孔)。培养36-48小时后,用甲醇凝固细胞,并用5%三氯乙酸沉淀DNA。用150μl/孔0.3N NaOH溶解细胞,将其移至闪烁瓶中,用β-计数器计数。

实验结果

卤夫酮对血管内皮细胞的抗增生作用

将亚融合的牛主动脉内皮细胞保存在含10%小牛血清,含或不含1ng/ml bFGF,含或不含增加浓度的卤夫酮的介质中。接种4天后加入³H-胸苷(1μCi/孔),此后48小时测量DNA合成。如图1所示,卤夫酮含量为100ng/ml时得到混入的³胸苷50%抑制,与是否在培养介质中加入bFGF(1ug/ml)无关(图1)。

卤夫酮对通过培养的内皮细胞的ECM的沉积的作用

亚内皮ECM已显示可促进血管内皮细胞的迁移和增生〔D. Gospodarowicz,等, “The Extracellular Matrix and the Control of

Proliferation of Vascular Endothelial and Vascular Smooth Muscle Cells,” *J. Supramol. struc.*, No. 13, pp. 339-372(1980)]。这种活性归因于 ECM 的大分子组分，归因于肝素结合生长因子如 bFGF，它与 ECM 中乙酰肝素硫酸酯蛋白多糖的 GAG 侧链有关 [I. Vlodavsky] 等，

“ **Endothelial Cell-Derived Basic Fibroblast Factor: Synthesis and Deposition into Subendothelial Extracellular Matrix,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 84, pp. 2292-2296(1987)**。为了评定卤夫酮对 ECM 沉积的影响，接种后 24 小时，将标记的硫酸盐 ($\text{Na}_2 [^{35}\text{S}] \text{O}_4$) 和卤夫酮加入融合的细胞单层。在不同的时间 (5, 10 和 14 天)，溶解细胞层以暴露下面的 ECM。然后将 ECM 进行胰蛋白酶消化，并用 β -闪烁计数器计数，卤夫酮的浓度为 $1\mu\text{g/ml}$ 时，观察到混入的硫酸盐几乎完全的抑制，而药物浓度为 $0.2\mu\text{g/ml}$ 时得到 50 % 的抑制。

内皮细胞构成毛细血管样网状结构

将牛主动脉细胞接种在 24 孔培养皿的 16mm 孔中并使其在凝胶表面生长 24 小时，得到亚融合的单层。然后除去培养基质，将 0.4ml 冷的胶原蛋白倒在细胞单层的上面，使其聚合。胶原蛋白胶化后，加入含 bFGF (1ng/ml) 和肝素 (1ng/ml)，含 (图 2B) 或不含 (图 2A) $0.1\mu\text{g/ml}$ 卤夫酮的新鲜介质 [R. F. Nicosia 和 A. Ottinetti, “ **Growth of Microvessels in Serum Free Matrix Culture of Rat Aorta,” *Lab. Invest.*, Vol. 63, pp. 115-122(1990)]**。如图 2B 所示，卤夫酮完全抑制了内皮细胞侵入胶原蛋白凝胶及其随后分支并交织合的毛细血管样管的网状结构的构成。

微血管的形成

通过断头处死，由 1 到 2 月龄 SD 鼠得到胸主动脉 [R. F. Nicosia, 等, *ibid*, (1990)]。将主动脉移至培养皿中，将其切成 1mm 长的主动脉环并在 PBS 中充分漂洗。将 I 型胶原蛋白溶液加入各个 16mm 孔中，并在 37°C 胶化 15 分钟。在环的上部再倾倒 0.4ml 胶原蛋白溶液凝胶形成后，加入含或不含 $0.1\mu\text{g/ml}$ 卤夫酮的无血清的内皮生长介质并隔天换介质。图 3A 显示 10 天时的培养物，从主动脉切割端长出了新形成的分支微血管，引起环和结网的增长。图 3B 显示用隔天置换的 $0.1\mu\text{g/ml}$ 卤

夫酮处理的相同的培养物。在这些条件下，单细胞向主动脉环向外周迁移，但未排成微血管。图4为定量反应这种作用的剂量。

当卤夫酮的浓度为100ng/ml时，几乎完全抑制了微血管的形成(图4)。卤夫酮的浓度为250ng/ml时，观察到了完全的抑制，但在第2或6天除去药物时，导致了微血管的形成，与未处理的主动脉环中所见相似(图5)。

卤夫酮对人平滑肌肉瘤肿瘤细胞的抗增生作用

本实验研究卤夫酮对人类平滑肌肉瘤肿瘤细胞增生的作用。平滑肌肉瘤具有充分的细胞基质，也被充分地血管化〔A. Ferenczy,等, “A Comparative Ultrastructural Study of Leiomyosarcoma, Cellular Leiomyoma, and Leiomoma of the Uterus,” Cancer, No. 28, pp. 1004-1018 (1971)〕。人们认为，它们的生长依赖于由一般的和恶性的子宫肌细胞产生的生长因子(即, bFGF, HB-EGF)〔A. Zhang, 等, “Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-Like Growth Factor is Differentially Regulated by Progesterone and Estradiol in Rat Uterine Epithelial and Stromal Cells,” Endocrinology, No. 134, pp. 1089-1094 (1994); R. S. Mangrulkar, 等, “Isolation and Characterization of Heparin-Binding Growth Factors in Human Leiomyomas and Normal Myometrium,” Biology of Reproduction, No. 53, pp. 636-646 (1995)〕并就地嵌入周围的ECM〔J. Vlodavsky, 等, “Extracellular Matrix-Bound Growth Factors, Enzymes and Plasma Proteins,” in; Basement Membranes : Cellular and Molecular Aspects, D. H. Rohrbach and R. Timpl., Eds., Academic Press, Inc., Orlando, Florida, U. S. A., pp. 327-343 (1993)〕。

将亚融合的人类平滑肌肉瘤细胞接种在含10%胎牛血清〔FCS〕的介质中。接种后24小时，加入增加浓度的卤夫酮(10 - 100ng/ml)，24小时后将该细胞暴露于³H - 胸苷(1μCi/孔)。此后48小时测量DNA合成。如图7A所示，卤夫酮的浓度为2.5ng/ml时，得到60 - 70% ³H - 胸苷混入抑制率。

诱使其余的人平滑肌肉瘤肿瘤细胞进行与FCS或肝素结合表皮细

胞生长因子 (HB - EGF) 有关的增生。通过在含 0.5 % FCS 的介质中培养而使平滑肌肉瘤细胞的生长抑制。然后将该细胞暴露于含或不含 10ng/ml 卤夫酮的 10 % FCS 或 10ng/ml HB - EGF。然后加入 ^3H - 胸苷, 36 小时后测量 DNA 合成。存在卤夫酮时, 观察到由血清或 HB - EGF 诱导的细胞增生的完全抑制 (图 7B)。

结论

本发明在其最优选方案中使用了高效, 低价, 无毒, 可抑制数种参与新血管生成的组分的化合物。例如, 卤夫酮既可抑制血管内皮细胞增生, 也可抑制平滑肌细胞的增生 [E. F. Choi, 等, “Halofuginone, A Specific Collagen Type I Inhibitor Reduces Anastomotic Intimal Hyperplasia,” *Arch. surg.*, Vol. 130, pp. 257-261 (1995)] ,并能抑制胶原蛋白的合成 [I. Granot, 等, “Halofuginone; An Inhibitor of Collagen Type I Synthesis,” *Biochem. Biophys. Acta*, Vol. 1156, pp. 107-112 (1993)] 以及亚内皮 ECM 的排列, 这对微血管的形成都是必要的 [J. Folkman 和 M. Klagsbrun, *ibid.* (1987); J. Folkman 和 Y. Shing, *ibid.* (1992); J. Folkman, *ibid.* (1985)]。某些抑制血管生成的近期研究使用了如抗整联蛋白的抗体或信号传导抑制剂, 它们很可能具有广谱的效果 [J. Folkman, *ibid.* (1995); P. C. Brooks, 等, “Integrin $\alpha\text{V}\beta 3$ Antagonists Promote Tumor Regression by Inducing Apoptosis of Angiogenic Blood Vessels,” *Cell*, Vol. 79, pp. 1157-1164 (1994)] 因而也具有很强的副作用。另一方面, 卤夫酮具有相对窄和更特异的作用模式。另外, 目前被评价为抗血管生成剂的很多化合物为蛋白质, 例如, 抗体, 血小板反应蛋白, angiostatin, 血小板因子 IV [J. Folkman, *ibid.* (1995); M. S. O'Reilly, 等, *ibid.* (1994); V. Castle, 等, *ibid.*; P. C. Brooks, 等, *ibid.* (1994)] , 它们很容易在体内降解, 因此应以大剂量高频率给药。

本发明的方法使用了高效, 低价, 无毒的化合物。而且, 卤夫酮是低分子量的化合物, 极有可能可被口服。该化合物已由 F. D. A. 通过, 用于家畜的治疗。这些特点使卤夫酮最有希望成为用于临床的抑制新血管生成和肿瘤血管生成的药物。

如上所述，使用可有效抑制血管形成的无毒化合物卤夫酮可望提供一种抑制肿瘤生长和扩散，以及治疗各种临床疾病的有效对策。

从上述也可说明卤夫酮在极低的浓度（2.5ng/ml）就可几乎完全抑制人类平滑肌肉瘤细胞中的DNA合成，无论该细胞是由血清还是由有效的生长促进因子如HB-EGF刺激的。卤夫酮的浓度比抑制正常血管内皮细胞增生所需的浓度低40倍，说明卤夫酮对平滑肌肉瘤肿瘤细胞具有直接的，高效的抗增生作用。

本领域技术人员可以理解，本发明不限于前述实施例的细节，本发明可体现在不脱离其基本特征的其他特定形式中，因此希望将该优选方案和实施例以说明而不是以限制看待，应参照所附的权利要求，而不是上面的描述，来自权利要求的意图和等同物的范围的所有变化均在本发明的范围内。

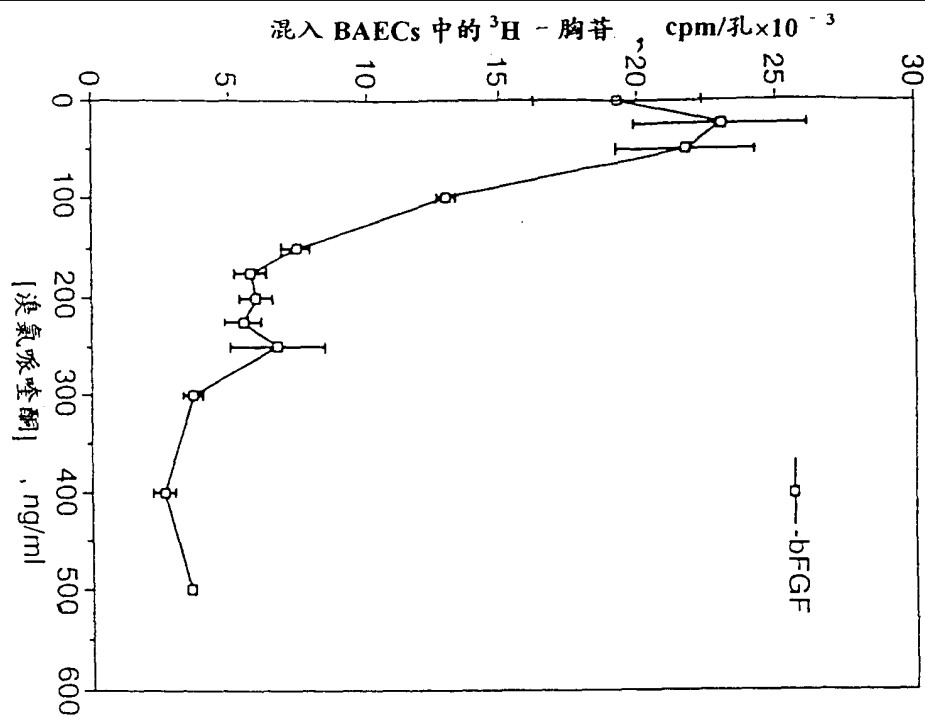


图 1A

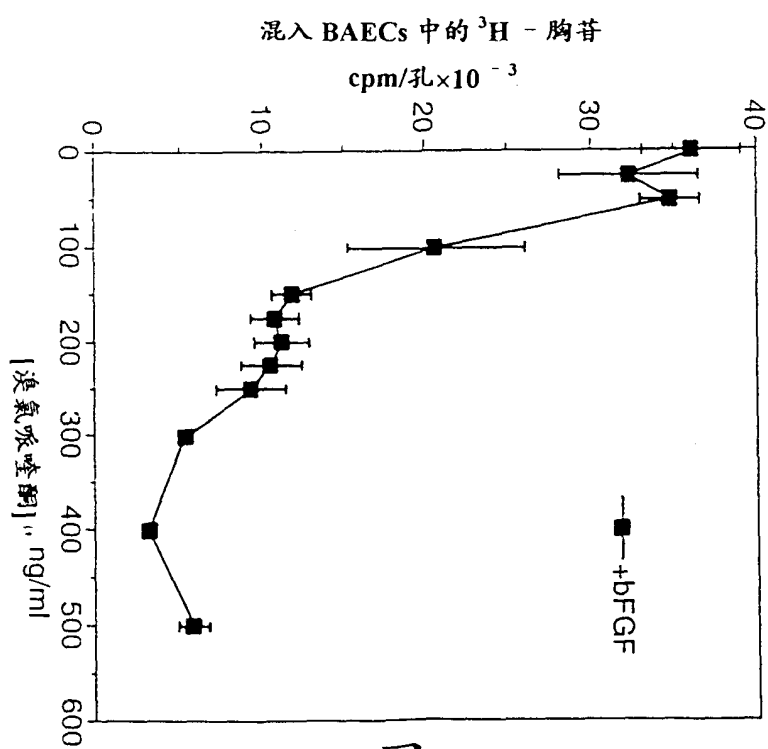


图 1B

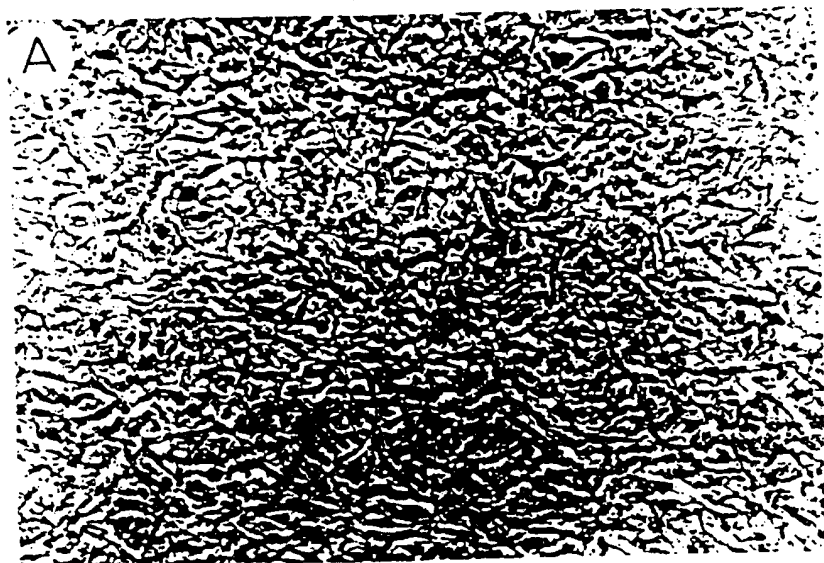


图 2A

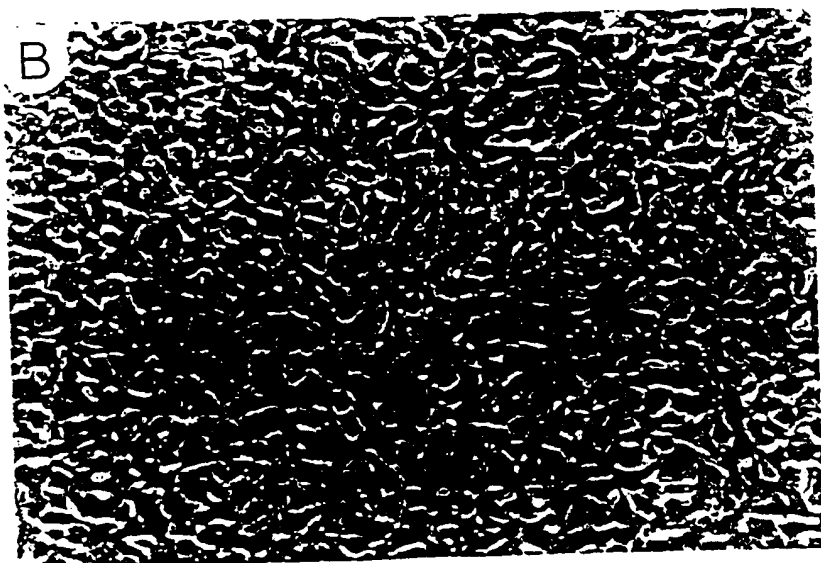


图 2B

A

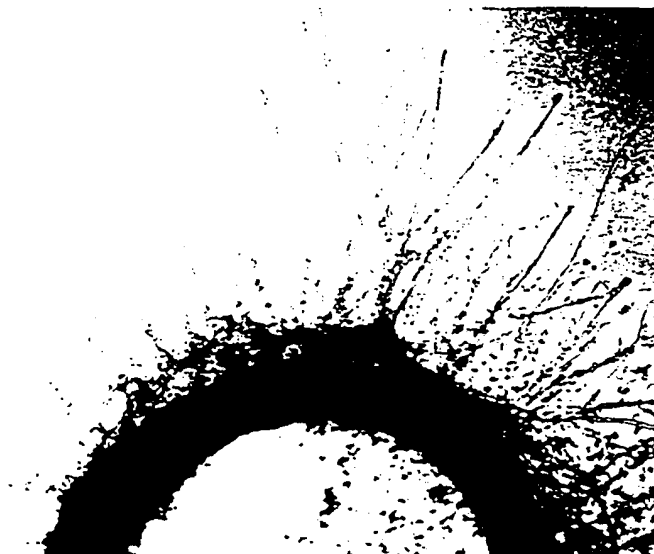
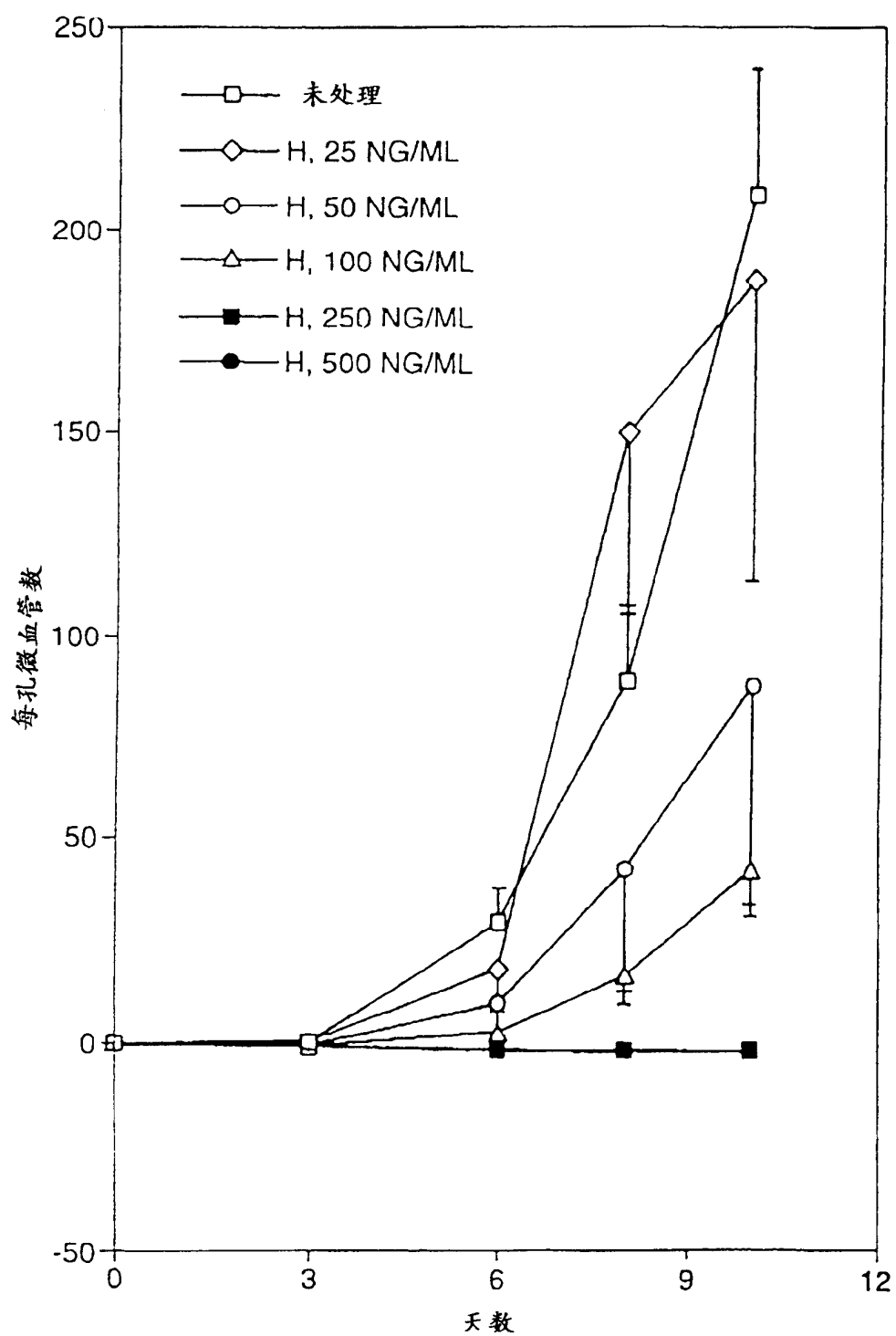


图 3A

B



图 3B



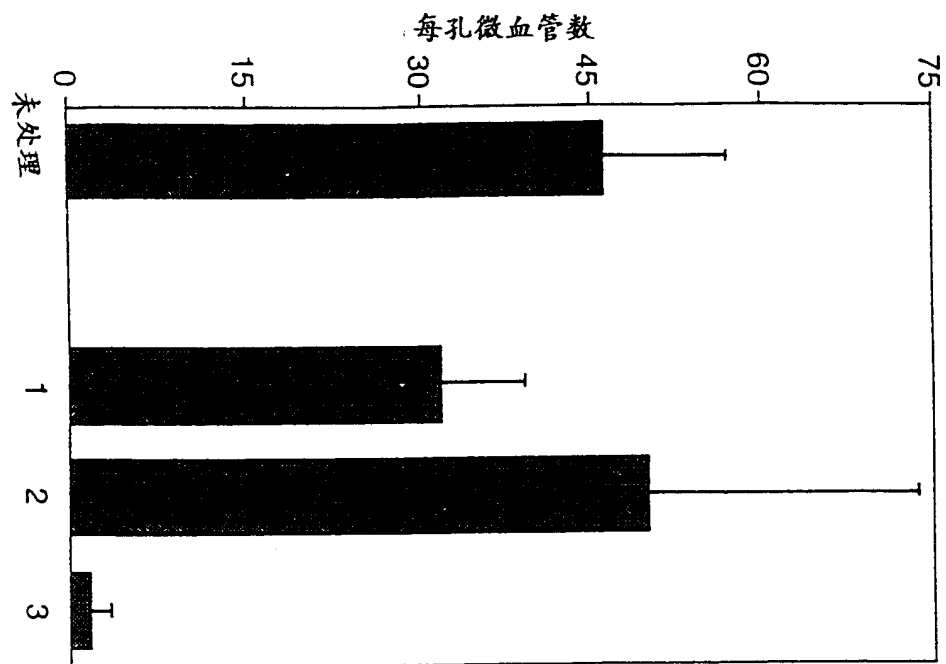


图 5

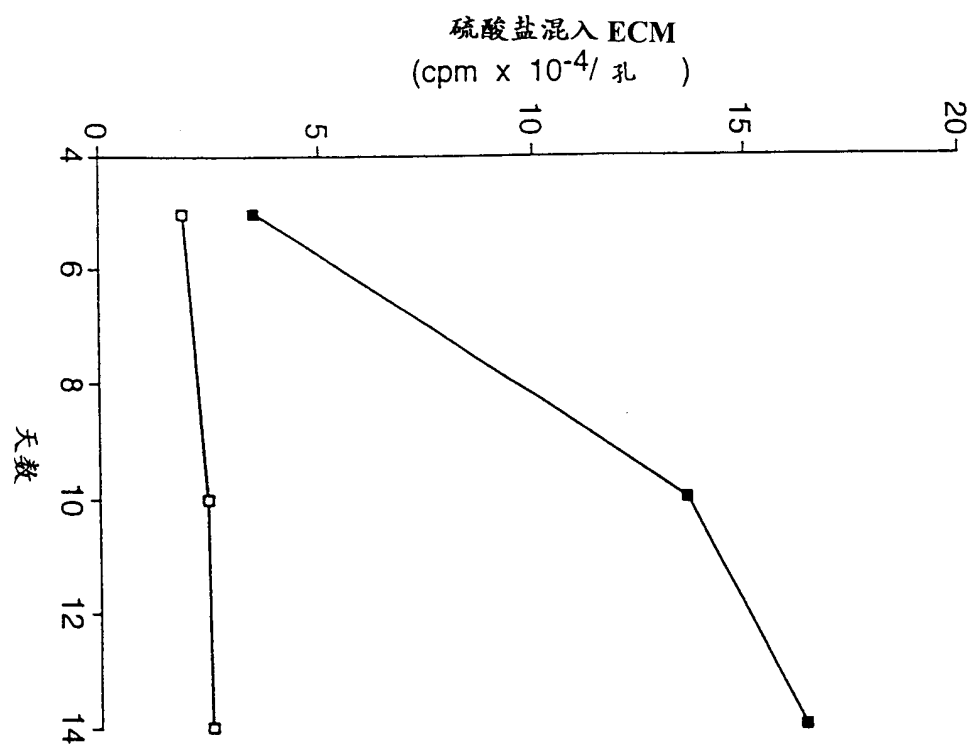


图 6

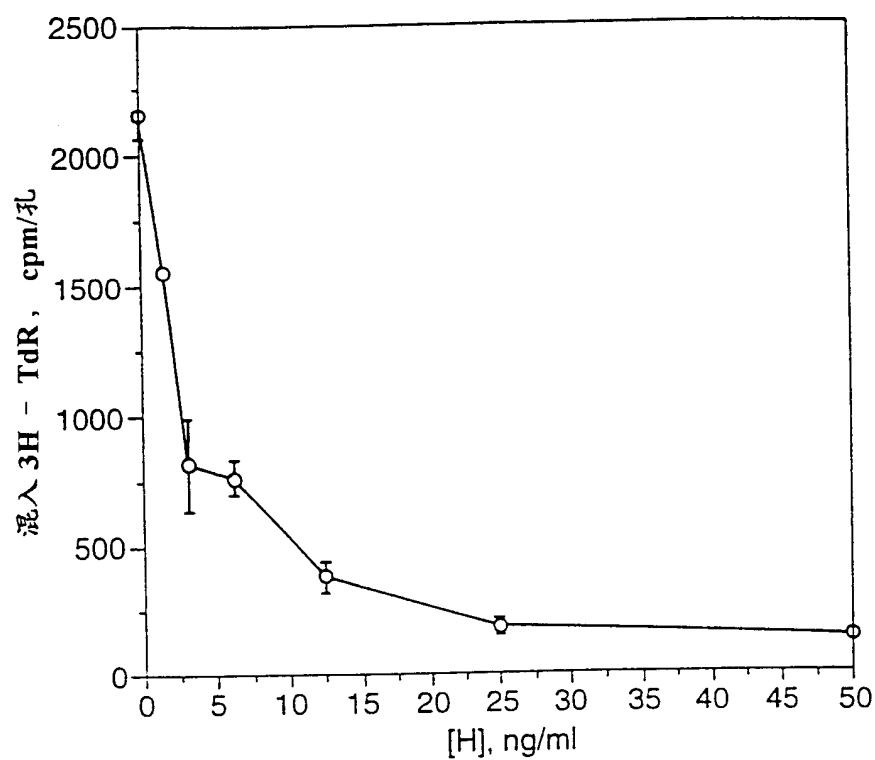


图 7A

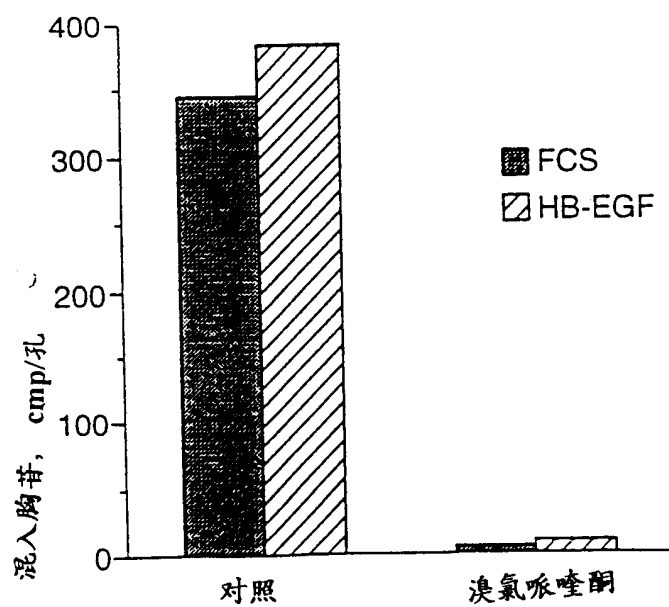


图 7B