

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-536784

(P2004-536784A)

(43) 公表日 平成16年12月9日(2004.12.9)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/454	A 6 1 K 31/454	4 C O 6 3
A 6 1 P 1/16	A 6 1 P 1/16	4 C O 8 6
A 6 1 P 1/18	A 6 1 P 1/18	
A 6 1 P 3/02	A 6 1 P 3/02 1 O 2	
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 3/10	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 66 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-563880 (P2002-563880)	(71) 出願人	500468711
(86) (22) 出願日	平成13年11月30日 (2001.11.30)		ザ チルドレンズ メディカル センター
(85) 翻訳文提出日	平成15年5月27日 (2003.5.27)		コーポレーション
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/045229		アメリカ合衆国, 02115 マサチュー
(87) 国際公開番号	W02002/064083		セッツ, ボストン, ロングウッド アベニ
(87) 国際公開日	平成14年8月22日 (2002.8.22)		ュー 300番地
(31) 優先権主張番号	60/250, 219	(74) 代理人	100091096
(32) 優先日	平成12年11月30日 (2000.11.30)		弁理士 平木 祐輔
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100112346
			弁理士 内藤 由美

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 3-アミノ-サリドマイドおよびそのエナンチオマーの合成

(57) 【要約】

本発明は3-アミノ-サリドマイドの新規で有用な類似化合物を提供する。これらの類似化合物としてはS(-)-3-アミノ-サリドマイドおよびR(+)-3-アミノ-サリドマイドが含まれる。本発明はまた、これらの類似化合物を作成するプロセスも提供する。さらに、本発明は血管新生を阻害し、癌および黄斑変性を含む血管新生が関与する疾患をこれらの化合物を投与することによって治療する方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

製薬上許容される担体および 3 - アミノ - サリドマイドの立体異性体を含んでなる医薬組成物であって、該立体異性体が本質的に S (-) - 3 - アミノ - サリドマイドまたは R (+) - 3 - アミノ - サリドマイドからなる、上記組成物。

【請求項 2】

該組成物が、錠剤、丸剤、カプセル剤、坐剤、サシエット、顆粒、粉末、クリーム、ローション、軟膏、パッチ、溶液、懸濁液、分散液、乳剤、シロップ剤、リポソーム、微粒子、およびマイクロカプセルの形態である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

ヒトまたは動物体内での望ましくない血管新生を阻害する方法であって、望ましくない血管新生を有するヒトまたは動物に、血管新生を阻害する量の 3 - アミノ - サリドマイドを投与することを含んでなり、該立体異性体の本質的に S (-) - 3 - アミノ - サリドマイドまたは R (+) - 3 - アミノ - サリドマイドからなる、上記方法。

10

【請求項 4】

該投与が経口、非経口、直腸、経膈、局所、経皮、静脈内、筋肉内、腹腔内、または皮下で行われるものである、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

該有効量が、約 0 . 1 から約 3 0 0 m g / k g / 日である、請求項 3 に記載の方法。

20

【請求項 6】

該有効量が、約 0 . 5 から約 5 0 m g / k g / 日である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 7】

該有効量が、約 0 . 1 から約 2 m g / k g / 日である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 8】

望ましくない血管新生が、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、角膜移植拒絶反応、血管新生緑内障、水晶体後部線維増殖症、流行性角結膜炎、ビタミン A 欠乏症、コンタクトレンズの装着のしすぎ、アトピー性角膜炎、上輪部角膜炎、翼状片乾燥角膜炎、シェーグレン症候群、酒さ性座瘡、フィレクテヌローシス (p h y l e c t e n u l o s i s)、梅毒、マイコバクテリア感染、脂質変性、化学火傷、細菌性潰瘍、真菌性潰瘍、単純ヘルペスウイルス感染、帯状ヘルペス感染、原虫感染、カポジ肉腫、モーレン腫瘍、テリエン角膜辺縁変性症、辺縁角膜炎、外傷、関節リウマチ、全身性紅斑、多発動脈炎、ヴェグナー肉芽腫症、強膜炎、スティーブンス・ジョンソン症候群、放射状角膜切開術、角膜移植拒絶反応、糖尿病性網膜症、黄斑変性、鎌状赤血球貧血、サルコイドーシス、梅毒、弾性線維偽黄色腫、ページェット病、静脈閉塞、動脈閉塞、頸動脈閉塞性疾患、慢性ブドウ膜炎 / v i t r i t i s、マイコバクテリア感染、ライム病、全身性エリテマトーデス、未熟児網膜症、イールズ病、ベーチェット病、網膜炎または脈絡膜炎を起こす感染、推定眼ヒストプラズマ症、ベスト病、近視、視神経乳頭の先天性構造欠損 (o p t i c p i t s)、スタルガルト病、扁平部炎、慢性網膜剥離、過粘稠度症候群、トキソプラズマ症、外傷、レーザー照射後合併症、ルベオーシス、線維性血管組織または線維組織の異常な増殖、増殖性の硝子体網膜症、動脈硬化症、固形腫瘍、血液腫瘍、腫瘍の転移、バルトネラ症、血管腫、聴神経腫、神経線維腫、トラコーマ、発熱性肉芽腫 (p y r o g e n i c g r a n u l o m a)、血管機能不全、異常な創傷治癒、炎症性および免疫性障害、ベーチェット病、痛風、痛風性関節炎、関節リウマチ、乾癬、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、黄斑変性、血管新生緑内障、肝臓疾患、オスラー・ウェーバー・ランジュ症候群、遺伝性出血性毛細血管拡張症、後天性免疫不全症候群、関節リウマチ、前立腺癌、乳癌、子宮頸癌、子宮癌、卵巣癌、神経膠腫、血管腫、膵臓癌、網膜芽細胞腫、悪性黒色腫、膀胱癌、横紋筋肉腫、網膜芽腫、ユーイング肉腫、神経芽細胞腫、骨肉腫、白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫、または、種々の急性もしくは悪性の骨髄の新生物疾患から選択された疾患で起こるものである、請求項 3 に記載の方法。

30

40

50

【請求項 9】

該投与が経口、非経口、直腸、経膈、局所、経皮、静脈内、筋肉内、腹腔内、または皮下で行われるものである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

該有効量が、約 0.1 から約 300 mg / kg / 日である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

ヒトまたは動物の癌を治療する方法であって、癌を有しているヒトまたは動物に癌治療に有効な量の 3 - アミノ - サリドマイドの立体異性体を投与することを含んでなり、該立体異性体が本質的に S (-) - 3 - アミノ - サリドマイドまたは R (+) - 3 - アミノ - サリドマイドからなる、上記方法。

10

【請求項 12】

該投与が経口、非経口、直腸、経膈、局所、経皮、静脈内、筋肉内、腹腔内、または皮下で行われるものである、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

該有効量が、約 0.1 から約 300 mg / kg / 日である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

製薬上許容される担体および 3 - アミノ - サリドマイドの立体異性体を含んでなる医薬組成物であって、該立体異性体が本質的に S (-) - 3 - アミノ - サリドマイドからなる、上記組成物。

【請求項 15】

該投与が経口、非経口、直腸、経膈、局所、経皮、静脈内、筋肉内、腹腔内、または皮下で行われるものである、請求項 14 に記載の方法。

20

【請求項 16】

該有効量が、約 0.1 から約 300 mg / kg / 日である、請求項 14 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

技術分野

本発明はヒトまたは動物体内での望ましくない血管新生を防止するための方法と組成物に関する。より特定して述べれば、本発明は、望ましくない血管新生、特に血管新生依存性疾患または関連疾患を 3 - アミノ - サリドマイドのエナンチオマーなどの化合物を投与することによって防止するための方法に関する。

30

【0002】

発明の背景

血管新生は組織または器官への新しい血管の生成である。正常な生理学的条件下では、ヒトおよび動物は非常に特別な、限定された状況でのみ血管新生を行う。例えば、血管新生は通常は創傷治癒、胎児および胚の発達、ならびに黄体、子宮内膜、および胎盤の形成時に観察される。

【0003】

血管新生は血管新生刺激剤と阻害剤の高度に調節された系を介して制御されている。血管新生の制御はある種の疾病状態では変化しており、多くの場合疾患に伴う病理学的な傷害は制御されない血管新生と関連している。血管新生は制御された形のもの、制御されないものとも類似の様式で進むものと考えられている。内皮細胞と外膜細胞は、基底膜に取り囲まれ、毛細血管を形成する。血管新生は、内皮細胞および白血球から放出される酵素による基底膜のびらんで開始される。次いで、血管の内腔を裏打ちしている内皮細胞は基底膜を破って突出する。血管新生刺激剤は内皮細胞がびらんのある基底膜を通過して移動することを誘導する。その移動する細胞は親の血管から「芽を出す」が、そこでは内皮細胞の有糸分裂と増殖が行われている。その内皮細胞の出芽したものはお互いに併合して辺縁血管系蹄網を形成し、新たな血管を作る。

40

【0004】

多くの疾病状態で持続性で制御されない血管新生が起こり、内皮細胞による異常な増殖が

50

起こる。制御されない血管新生のある病的状態は多様であるがそれらは、血管新生依存性、または血管新生関連疾患としてグループ化されている。

【0005】

血管新生によってメディエートされている疾患の1例は眼の新血管形成性疾患である。この疾患は新たな血管が網膜や角膜などの眼球の構造中に侵入してくることを特徴とする。眼の血管新生疾患は失明の最も一般的な原因であり、約20種の眼疾患に関与している。加齢に関連する黄斑変性症では、それに伴う視力の低下は、網膜色素上皮の下の線維血管組織の増殖を伴うブルッフ膜の欠損箇所を通しての脈絡膜毛細血管の内部への成長によって起こる。血管新生による傷害はまた、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、角膜移植拒絶反応、血管新生緑内障、および水晶体後部線維増殖症にも伴う。角膜の新血管形成を伴うその他の疾患としては、限定はされないが、流行性角結膜炎、ビタミンA欠乏症、コンタクトレンズの装着のしすぎ、アトピー性角膜炎、上輪部角膜炎、翼状片乾燥角膜炎、シェーグレン症候群、酒さ性座瘡、フィレクテヌローシス (phyllectenulosis)、梅毒、マイコバクテリア感染、脂質変性、化学火傷、細菌性潰瘍、真菌性潰瘍、単純ヘルペスウイルス感染、帯状ヘルペス感染、原虫感染、カポジ肉腫、モーレン腫瘍、テリエン角膜辺縁変性症、辺縁角膜炎、関節リウマチ、全身性紅斑、多発動脈炎、外傷、ヴェグナー肉芽腫症、強膜炎、スティーブンス・ジョンソン症候群、類天疱瘡、および放射状角膜切開術が含まれる。

10

【0006】

網膜/脈絡膜における新血管形成を伴う疾患としては、限定はされないが、糖尿病性網膜症、黄斑変性、鎌状赤血球貧血、サルコイドーシス、梅毒、弾性線維偽黄色腫、ページェット病、静脈閉塞、動脈閉塞、頸動脈閉塞性疾患、慢性ブドウ膜炎 / vitritis、マイコバクテリア感染、ライム病、全身性エリテマトーデス、未熟児網膜症、イールズ病、ベーチェット病、網膜炎または脈絡膜炎を起こす感染、推定眼ヒストプラズマ症、ベスト病、近視、視神経乳頭の先天的構造欠損 (optic pits)、スタルガルト病、扁平部炎、慢性網膜剥離、過粘稠度症候群、トキソプラズマ症、外傷、およびレーザー照射後合併症が含まれる。その他の眼科関連疾患としては、限定はされないが、ルベオーシスに伴う疾患 (隅角における新血管形成)、および全ての形の増殖性の硝子体網膜症を含む線維性血管組織または線維組織の異常な増殖によって起こる疾患が含まれる。

20

【0007】

血管新生を伴う別の疾患としては関節リウマチがある。関節の滑膜の裏打ちの中の血管は血管新生を起こす。さらに、新しい血管のネットワークを形成し、内皮細胞は、パンヌスの成長と軟骨の崩壊をもたらす因子と活性酸素種を放出する。血管新生はまた、骨関節炎でもある役割を果たしている。血管新生関連因子による軟骨細胞の活性化は関節の破壊に寄与している。後期になると、血管新生因子は新たな骨の成長を促進する。骨の破壊を防ぐための治療を行うと疾患の進行を止め、関節炎に罹患している患者に軽減をもたらす。

30

【0008】

慢性炎症でも病態として血管新生が関与する。潰瘍性大腸炎やクローン病などの疾患では、新たな血管および炎症組織の内部への成長を伴う組織学的変化を示す。バルトネラ症は南米でみられる細菌感染であるが、この疾患は血管内皮細胞の増殖を特徴とする慢性のステージに至る。別の血管新生が病態に役割を果たすものとしては動脈硬化症でそれがみられる。血管の内腔に形成されたプラークに血管新生刺激活性があることが示されている。

40

【0009】

腫瘍増殖が血管新生依存性であるとの仮説は1971年にはじめて提出された (Folkman, New Eng. J. Med., 285: 1182-86 (1971))。最も単純化して述べると、この仮説は、「ひとたび腫瘍の『テイク (take)』が起こると、腫瘍細胞の集団が増加する前には必ずその腫瘍上に集中する新たな毛細血管の増加が行われなければならない」と述べている。腫瘍の「テイク」とは現在では、腫瘍増殖の前血管相を示しているものと理解されており、その相では、腫瘍細胞集団は2-3 mm³の容積を占め、その数は200万から300万個を超えず、宿主に前から存在していた

50

微小血管に依存して生存することができる状態である。この相を超えて腫瘍の容積を拡大するためには、新たな毛細血管の誘導を要する。例えば、初期前血管相にあるマウスの肺微小転移癌では高倍率の顕微鏡で組織切片を調べない限り検出できないであろう。

【0010】

この概念を支持する間接的な証拠としてはつぎのものが含まれる。

【0011】

マウスの皮下の透明チャンパーに移植された腫瘍の増殖速度は新血管形成が起こる前は遅く直線的増加であり、新血管形成後は急速でほぼ対数的に増加する (Algireà, J. Nat. Cancer Inst., 6: 73 - 85 (1945))。

【0012】

単離して灌流させた臓器中では血管は増殖しないが、その臓器中での腫瘍の増殖は1~2 mm³までが限界であるが、それをマウスに移植し新血管形成が起こると、急速に拡大し、この限界容積の>1000倍になる (Folkmanら, Annals of Surgery, 164: 491 - 502 (1966))。

【0013】

血管のない角膜での腫瘍の増殖は緩徐に進行しその増加は直線的であるが、新血管形成後は対数的増殖に転換する (Gimbrone, Jr.ら, J. Nat. Cancer Inst., 52: 421 - 27 (1974))。

【0014】

ウサギの眼球の前眼房の水性液中に懸濁された腫瘍は生存し、血管はなく、その大きさは<1 mm³が限度である。それをひとたび虹彩の血管床上に移植すると腫瘍に新血管が形成され、急速に増殖して2週間以内にそのもとの容積の16,000倍に達する (Gimbrone, Jr.ら, J. Exp. Med., 136: 261 - 76)。

【0015】

腫瘍をニワトリ胚の漿尿膜上に移植すると、腫瘍は>72時間の無血管相では緩徐に増殖するが、平均直径が0.93+0.29 mmを超えない。新血管形成が開始されると24時間以内に急速な腫瘍の拡大が起こり、7日目までにその血管が形成された腫瘍は平均直径が8.0+2.5 mmに達する (Knighton, British J. Cancer, 35: 347 - 56 (1977))。

【0016】

血管からウサギ肝臓中に放された転移癌はサイズの不均一性を示すが、新血管形成が起こるとそのサイズのカットオフ値は比較的均一性を示す。腫瘍は通常は血管が無くその直径は1 mmまでであるが、新血管が形成されるとその値を超える (Lienら, Surgery, 68: 334 - 40 (1970))。

【0017】

脾島の細胞に癌が発生したトランスジェニックマウスでは、前血管期の過形成の脾島ではそのサイズは<1 mmまでが限界である。6~7週齢では、4~10%の脾島が新血管を形成し、それらの脾島から前血管期の脾島の容積の1000倍を超える大きさの、血管を有する大きな腫瘍が生ずる (Folkmanら, Nature, 339: 58 - 61 (1989))。

【0018】

VEGF (血管内皮増殖因子) に対して特異的な抗体は、微小血管の密度を低下させ、3種類のヒトの腫瘍、それらは血管新生の唯一のメディエーターとしてVEGFに依存している腫瘍であるが、それらの腫瘍の増殖の「顕著な、または劇的な」阻害を起こす (ヌードマウスで)。この抗体は*in vitro*では腫瘍細胞の増殖を阻害しない (Kimら, Nature, 362: 841 - 44 (1993))。

【0019】

抗bFGFモノクローナル抗体は、血管新生の唯一のメディエーターとしてbFGFの分泌に依存しているマウス腫瘍の増殖を70%阻害する。この抗体は*in vitro*では腫瘍細胞の増殖を阻害しない (Horiら, Cancer Res., 51: 6

10

20

30

40

50

180-84(1991))。

【0020】

bFGFの腹腔内注射は一次腫瘍とその転移物の増殖を、その腫瘍中の毛細血管の内皮細胞の増殖を刺激することによって、増大させる。その腫瘍細胞自体は、vFGFのレセプターを有しておらず、bFGFは*in vitro*では腫瘍細胞のマイトジェンではない(Grossら, Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 31:79(1990))。

【0021】

特異的血管新生阻害剤(SGM-1470)は腫瘍増殖と転移を*in vivo*で阻害するが、*in vitro*では腫瘍増殖阻害活性ははるかに低い。この阻害剤の血管内皮細胞増殖を最大の半分に阻害する濃度は、このものが腫瘍増殖を阻害する濃度より4 log低かった(Ingberら, Nature, 48:555-57(1990))。また、腫瘍増殖が血管新生依存性であることを間接的だが臨床的に示す証拠がある。

【0022】

ヒトの網膜芽細胞腫は、硝子体へ転移性で、血管のない楕円体へと発達するが、その大きさはそれが生存でき、³H-チミジンを取り込む(切除した眼球から取り出して*in vitro*で分析すると)にもかかわらず、1mm³未満に限定されている。

【0023】

卵巣癌は腹膜に転移し、血管を持たない小さな白色の種子状のもの(1~3mm³)となる。これらの転移したものがそれらのうちの1個以上のものに新血管形成がみられる前に大きくなることはまれである。

【0024】

乳癌(Weidnerら, New Eng. J. Med., 324:1-8(1991); Weidnerら, J. Nat. Cancer Inst., 84:1875-87(1992))での新血管形成の程度、および前立腺癌(Weidnerら, Am. J. Pathol., 143(2):401-09(1993))での新血管形成の程度は将来的な転移の危険性と高度に相関している。

【0025】

ヒトの皮膚の悪性黒色腫の転移は、新血管形成前にはまれである。新血管形成が起こると病変部の肥厚が起こり、転移の危険性が高まる(Srivastavaら, Am. J. Pathol., 133:419-23(1988))。

【0026】

膀胱癌では、血管新生を促進するタンパク質であるbFGFの尿中レベルは、疾病の状態と程度を示すものとしては細胞診断よりも高感度である(Nguyenら, J. Nat. Cancer Inst., 85:241-42(1993))。

【0027】

このように、血管新生が癌の転移において主要な役割を果たしていることは明らかである。この血管新生活性を抑制またはなくすることができれば、腫瘍は存在はしているとしても増殖しないであろう。病状については、血管新生を防止すれば新たな微細血管系の侵入によって生ずる障害を防ぐことになる。血管新生プロセスを制御することに向けられた治療を行えば、これらの疾患の阻害または軽減をもたらすものとなる。

【0028】

血管新生は多数の異なるタイプの癌に伴っており、そのような癌としては固形腫瘍および血液腫瘍が含まれる。血管新生を伴う固形腫瘍としては、限定はされないが、横紋筋肉腫、網膜芽細胞腫、ユーイング肉腫、神経芽細胞腫、および骨肉腫が含まれる。血管新生はまた、白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫、および種々の急性または慢性の骨髄の悪性疾患などの血液腫瘍にも伴い、そのような疾患では、制御されていない白血球の増殖が起こり、通常それには貧血、血液凝固傷害、およびリンパ節、肝臓、および脾臓の肥大を伴う。白血病、リンパ腫および多発性骨髄腫を起こすものとなっている骨髄における異常には血管新生がある役割を果たしているものと考えられている。

【0029】

小児の血管新生性疾患として最もよく見られるものの1つは血管腫である。血管腫は新たに形成された血管からなる腫瘍である。大多数の症例では、この腫瘍は良性であり、治療を行わなくとも退縮する。より重篤な症例では、腫瘍は大きな空洞性で浸潤性の形態に進行し、臨床的な合併症をもたらす。血管腫の全身的な形態である、血管腫症は死亡率が高い。現在用いられている治療方法では治療し得ない、治療抵抗性の血管腫がある。

【0030】

血管新生はまた、オスラー - ウェーバー - ランジュ病、すなわち遺伝性出血性毛細管拡張症などの遺伝性疾患にみられる傷害の原因ともなっている。この疾患は血管またはリンパ管の腫瘍である、多数の血管腫を特徴としている。血管腫は皮膚と粘膜に認められ、しばしば鼻出血（鼻血）または胃腸管出血を伴い、時には肺フィステルまたは肝臓動静脈フィステルを伴う。

10

【0031】

従って、必要とされるものは、血管新生を阻害することのできる組成物と方法である。また、望ましくない血管、特に腫瘍内の血管の増殖を阻害することのできる組成物と方法も必要である。

【0032】

血管新生はまた、生殖や創傷治癒などの正常な生理学的プロセスにも関与している。血管新生はまた、排卵および受精後の胞胚の着床の重要な1ステップでもある。血管新生の防止は、排卵をブロックし、または胞胚の着床をを防ぐための無月経の誘導に用いうる。

20

【0033】

創傷治癒では、過剰な修復または線維増殖は手術手技の有害な副作用となりうるものであり、血管新生に起因する、または血管新生によって悪化するものである。癒着は手術に高頻度で合併し、小腸閉鎖などの問題を引き起こす。

【0034】

血管新生の阻害にはいくつかの化合物が用いられてきた。Taylorら(Nature, 297:307(1982))は血管新生の阻害にプロタミンを用いてきた。プロタミンには毒性があるため、治療剤としての実使用には限界がある。Folkmanら(Science, 221:719(1983)、ならびに米国特許第5,001,116号および第4,994,443号)は、血管新生を制御するためのヘパリンおよびステロイドの使用について開示している。テトラヒドロコルチゾールなどのステロイドは、糖質コルチコイドと鉱質コルチコイドの活性を欠いているが、血管新生のインヒビターであることが見出されている。

30

【0035】

動物体内で内在性のもとして見出された他の因子、例えば、ウシ硝子体液由来の4kDaの糖タンパク質および軟骨由来の因子などが、血管新生の阻害に用いられてきた。細胞性の因子、例えばインターフェロンなどは血管新生を阻害する。例えば、インターフェロン - またはヒトインターフェロン - は、ヒト腫瘍細胞によって刺激されたマウスの皮膚において腫瘍によって誘発される血管新生を阻害することが示されている。インターフェロン - は同種の脾臓細胞によって誘導される血管新生の強力な阻害剤である(Sidkyら, Cancer Res., 47:5155-61(1987))。ヒト組換えインターフェロン(/ A)は、血管新生が誘発する疾患である肺血管腫症の治療に用いて成功を収めたことが報告されている(Whiteら, New Eng. J. Med., 320:1197-1200(1989))。

40

【0036】

血管新生を阻害するためにこれまでに用いられてきたその他のものとしては、アスコルビン酸エステルおよび関連化合物が含まれる(日本公開特許公報No.58-13(1978))。硫酸化多糖DS4152も血管新生を阻害する(日本公開特許公報No.63-119500)。別の抗血管新生性化合物としては、Angiostatin(登録商標)(米国特許第5,639,725号; 第5,792,845号; 第5,888,79

50

5号；第5,733,876号；第5,776,704号；第5,837,682号；第5,861,372号；および第5,854,221号)およびEndostat in TM (米国特許第5,854,205号)が含まれる。

【0037】

血管新生の阻害を示した別の化合物はサリドマイドである(D'Amatoら, Proc. Natl. Acad. Sci., 90:4082-85(1994))。サリドマイドは催眠鎮静剤であり、多数の血管新生を伴う疾患の治療に用いられて成功を収めており、そのような疾患としては例えば、関節リウマチ(Gutierrez-Rodriguezら, Arthritis Rheum., 27(10):1118-21(1984)；Gutierrez-Rodriguezら, J. Rheumatol., 16(2):158-63(1989)、ベーチェット病(Handleyら, Br. J. Dermatol., 127 Suppl., 40:67-8(1992)；Gunzler, Med. Hypotheses, 30(2):105-9(1989)、移植片対宿主拒絶反応(Fieldら, Nature, 211(55):1308-10(1966)；Heneyら, Br. J. Haematol., 78(1):23-7(1991)、マイコバクテリア疾患(Vicenteら, Arch. Intern. Med., 153(4):534(1993)、単純ヘルペスおよび帯状疱疹感染(Naafsら, Int. J. Dermatol., 24(2):131-4(1985)、慢性炎症、潰瘍性大腸炎(Mezaら, Drug Ther., 23(11):74-80(1993)；Powellら, Br. J. Dermatol., 113 Suppl. 28:141-4(1985)、ハンセン病(Barnesら, Infect. Immun., 60(4):1441-46(1992)、ならびに狼瘡(Burrows, BMJ, 307:939-40(1993))が含まれる。

10

20

30

【0038】

サリドマイドは成人には副作用は非常に軽度だが、強力な催奇形性物質である。従って、この薬剤を子供を産む年代の女性に用いることには懸念がある。副作用は非常に軽度とはいえ、多数あり、それがサリドマイドの治療剤としての好ましさを限定するものとなっている。そのような副作用の1つが嗜眠状態である。多数の治療研究において、患者が傾眠状態となり正常に動作することが困難となるためサリドマイドの初回投与量を下げねばならなかった。サリドマイドの使用を制限する別の副作用としては、末梢神経傷害があり、投与を受けた患者は四肢のシビレと機能障害が起こる。

【0039】

従って、投与が容易で血管新生を阻害することのできる、改良された方法と組成物が必要とされている。

【0040】

発明の要約

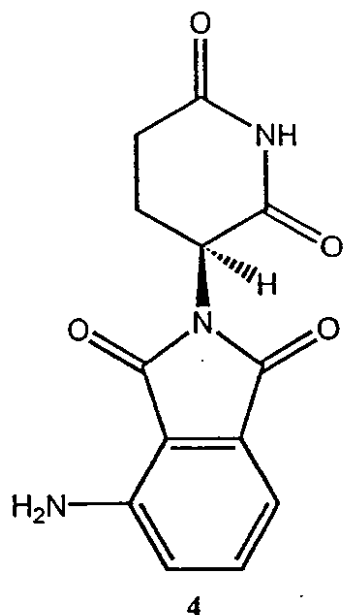
本発明はサリドマイドの類似体である3-アミノ-サリドマイドの新規の誘導体を提供する。特定して述べれば、本発明は3-アミノ-サリドマイドのR(+)およびS(-)エナンチオマーの個々のもの、およびそれらのエナンチオマーを調製するためのプロセスを提供する。

40

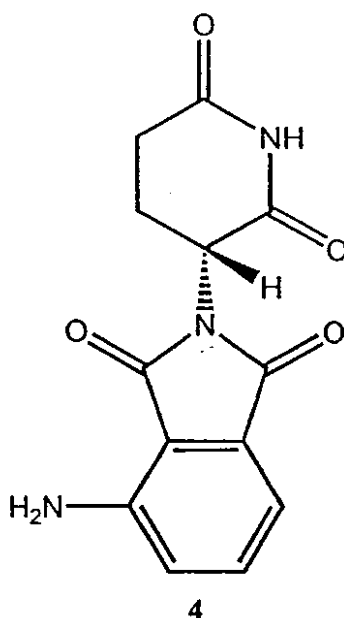
【0041】

本発明のエナンチオマーは次の構造を有する：

【化1】



S(-)-3-アミノ-サリドマイド



R(+)-3-アミノ-サリドマイド

10

本発明の別の1態様においては、異常な有糸分裂および/または望ましくない血管新生の阻害に有効な組成物と方法が提供される。これらの組成物は経口を含む種々の経路で容易に投与でき、安全でかつ体内で有糸分裂および/または血管新生の阻害を提供する投与量を投与することができる。本発明は、望ましくなく制御されない有糸分裂および/または血管新生によってメディエートされる哺乳類の疾患を、抗有糸分裂および/または抗血管新生性の化合物を血管新生を阻害するために十分な投与量で投与することによって治療する方法を提供する。

20

【0042】

本発明のその他の特色および利点は、本発明の好ましい実施形態についての下記の説明から明らかとなる。

【0043】

本発明のこれらおよびその他の目的、特色、および利点は、開示された実施形態の下記の詳細な説明および添付の特許請求の範囲を検討すれば明白なものとなる。

30

【0044】

発明の詳細な説明

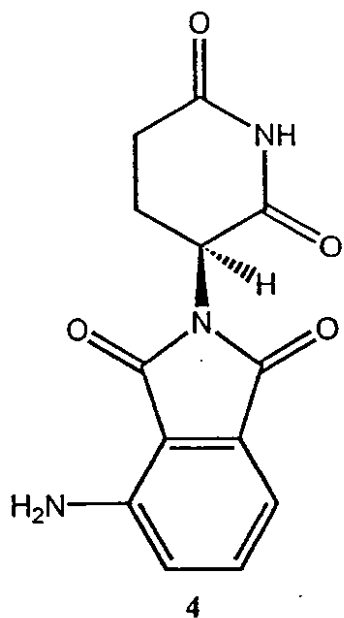
本発明は異常な有糸分裂および/または血管新生によってメディエートされる疾患の治療のための組成物と方法に向けられたものである。下記のとおり、本発明で用いられる化合物は、抗有糸分裂性、抗血管新生性、および/または抗腫瘍性を示す。さらに、本発明では、実質的にエナンチオマーとして純粋なS(-)-3-アミノ-サリドマイドおよびR(+)-3-アミノ-サリドマイドを合成するための方法が提供される。本発明では、3-アミノ-サリドマイドのS(-)およびR(+)-エナンチオマーは抗有糸分裂活性、および血管新生阻害活性を有し、種々の癌および黄斑変性を含む多数の疾患の治療に有用である。S(-)-3-アミノ-サリドマイドは種々の*in vitro*および*in vivo*の腫瘍モデルにおいて強力な抗血管新生および抗腫瘍活性を示した。

40

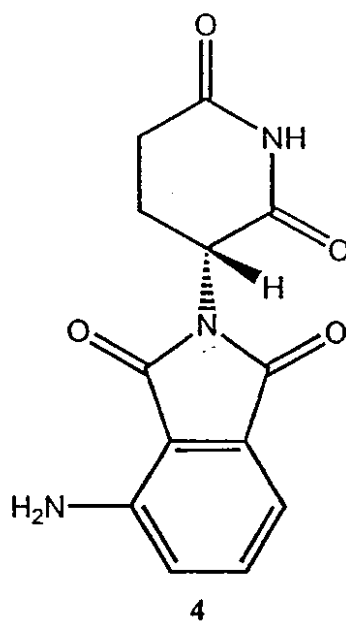
【0045】

本発明のエナンチオマーは次の構造を有する：

【化2】



S(-)-3-アミノ-サリドマイド



R(+)-3-アミノ-サリドマイド

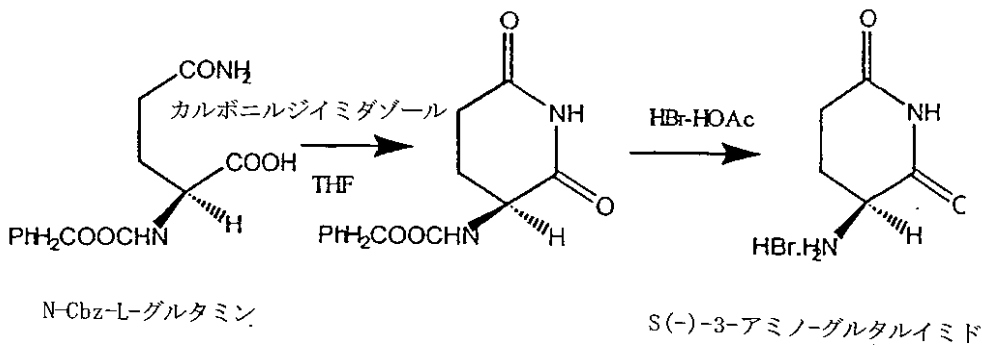
10

本発明の1態様においては、S(-)-3-アミノ-サリドマイドおよびR(+)-3-アミノ-サリドマイドは、3-ニトロ-サリドマイドのS(-)およびR(+)-エナンチオマーからそれぞれ合成することができる。例えば、S(-)-3-アミノ-サリドマイドは下記の反応スキームに従って作成することができる：

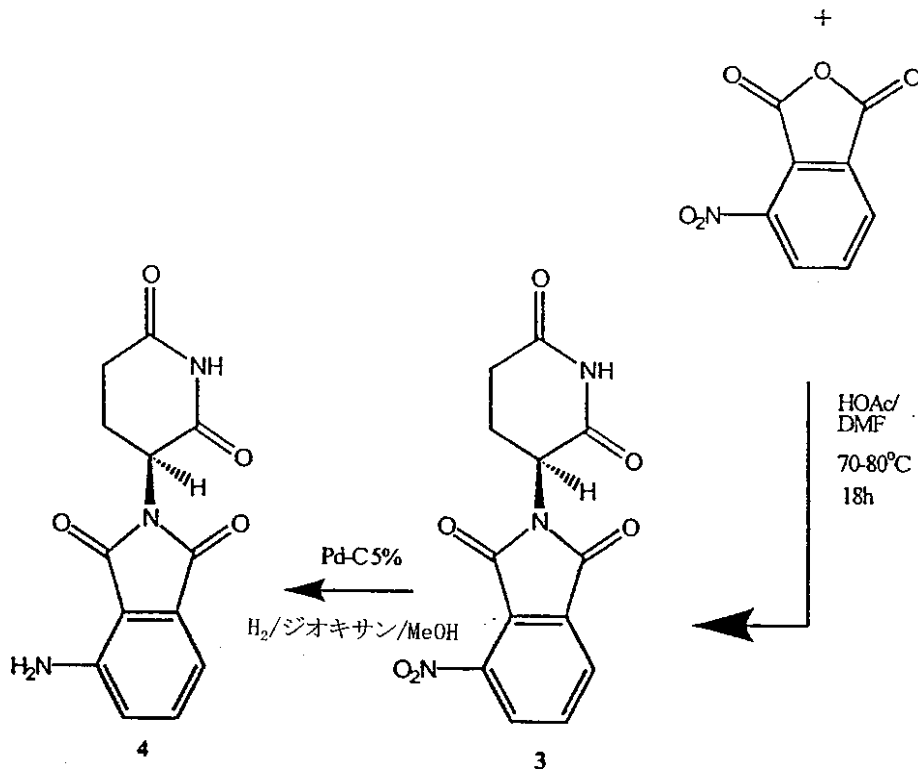
20

【化3】

S(-)-3-アミノ-サリドマイドの合成



10



20

30

S(-)-3-アミノ-サリドマイド

S(-)-3-ニトロ-サリドマイド

3-アミノ-サリドマイドのS(-)およびR(+)エナンチオマーは当業者には既知の方法と技術を用いて製薬上および生理学的に許容しうる製剤として提供することができる。それらの製剤は標準的な投与経路で投与することができる。通常はそれらの化合物は局所、経皮、経口、直腸、または非経口(例えば、静脈内、皮下、または筋肉内)経路で投与することができる。さらにこれらの化合物は、その化合物を徐々に放出することのできる生物崩壊性のポリマー中に取り込ませ、そのポリマーを、その薬剤の送達を所望している場所、例えば腫瘍部位の近傍へ埋め込むことができる。そのような生物崩壊性のポリマーおよびその使用については、例えば、Bremar, J. Neurosurg. 74: 441-446 (1991) に詳細に述べられている。

40

【0046】

該化合物の投与量は、治療しようとする病状、投与に用いる化合物、ならびにその他の臨床的要因、例えば体重およびヒトまたは動物の状態、ならびにその化合物の投与経路の如何による。本発明はヒトおよび動物への用途の双方に応用できることは理解されるべきである。ヒトへの経口投与には、約0.1から300mg/kg/日、好ましくは約0.5

50

から50mg/kg/日の間、最も好ましくは約0.1から2mg/kg/日の間の投与量で通常は十分である。

【0047】

該製剤としては、経口、直腸、経鼻、眼科（硝子体内、または眼房内を含む）、局所（バツカルおよび舌下を含む）、経膈、または非経口（皮下、筋肉内、静脈内、皮内、眼内、気管内、および硬膜外を含む）のために適したものを含む。該製剤はユニット投与量の形態とすることが好都合であり、従来の製薬技術で調製することができる。そのような技法としては、活性成分と製薬上用いられる担体または添加剤を1つの製剤とするステップを含んでいる。通常は、該製剤は、活性成分を液状の担体または細かく粉碎した固体の担体またはその双方と、均一によく混合されたものとし、その後必要に応じて製剤の形に成形することによって調製される。

10

【0048】

経口投与に適した本発明の製剤は、その各々に活性成分のあらかじめ定められた量が含まれているカプセル剤、カシェ剤、または錠剤などの個別のユニットとして；粉末または顆粒として；水性液体または非水性液体中の溶液または懸濁液として；または水中油乳剤または油中水乳剤として；ならびにポーラスとして投与することができる。

【0049】

錠剤は圧縮または型で成形して作成することができ、任意で1種以上の補助的成分を加えることができる。圧縮錠剤は、適切な機械で、活性成分を自由流動する形態、例えば粉末または顆粒などを、任意で結合剤、滑沢剤、不活性希釈剤、保存剤、界面活性剤、または分散剤と混合して、圧縮することによって調製することができる。型で成形する錠剤は、適切な機械で、不活性の液体希釈剤で湿潤化した該化合物の粉末化したものの混合物を、型に入れることで作成することができる。該錠剤には任意でコーティングを施す、または割線を入れることができ、錠剤中に含まれる活性成分が緩徐に、または制御されて放出されるように製剤化することができる。

20

【0050】

口中への局所投与に適した製剤としては、着香した基剤、通常はショ糖およびアラビアゴムまたはトラガカントであるが、その中に成分を含有するものからなるロゼンジ、ゼラチンやグリセリン、またはショ糖とアラビアゴムなどの不活性基剤中に活性成分を含んでいるトローチ、および適切な液状担体中に入れられた活性成分を含んでいる含嗽剤が含まれる。

30

【0051】

皮膚への局所投与に適した製剤は、製薬上許容される担体中に入れて投与されることとなる成分を含んでいる軟膏、クリーム、ゲル、およびペイストの形とすることができる。好ましい局所送達システムは、投与されることとなる成分を含有している経皮パッチである。

【0052】

直腸投与のための製剤は、例えばカカオ脂またはサリチル酸塩を含んでなる適切な基剤を用いて坐剤とすることができる。

【0053】

経鼻投与に適した製剤で担体が固体であるものは、粒子径が例えば、20から500ミクロンの範囲の粗い粉末が含まれ、それは嗅剤が投与される様な様式で投与される、すなわち、鼻に近づけて鼻道を経由して粉末の容器から急速な吸入を行うことによって投与される。担体が液体である場合の経鼻投与に適した製剤は、例えば、鼻内噴霧または点鼻液としての、活性成分の水性または油性溶液が含まれる。

40

【0054】

経膈投与に適した製剤は、活性成分に加えて当業界で適切なものとして既知の担体を含有する、ペッサリー、タンポン、クリーム、ゲル、ペイスト、フォーム、またはスプレー製剤とすることができる。

【0055】

50

非経口投与に適した製剤としては、水性および非水性無菌注射用溶液、それには抗酸化剤、バッファー、静菌剤、および製剤を投与症とするレシピエントの血液と同じ浸透圧とする溶質を含有することができ；ならびに水性および非水性懸濁液、それには懸濁剤および濃厚化剤を含ませることができるが、それらのものが含まれる。該製剤はユニット投与または多数回投与用の容器、例えば密封されたアンプルおよびバイアル瓶中に入れることができ、また、使用直前に無菌の液体担体、例えば注射用水を添加することのみを必要とするような凍結乾燥状態で保存することができる。処方に応じて調製される注射用溶液および懸濁液を、無菌粉末、顆粒、および既に報告されているような種類の錠剤から調製することができる。

【0056】

好ましいユニット投与製剤は、上記で列挙したとおり、活性成分の一日量またはユニット、1日の投与量を分けた量、またはそれらをさらに適切に分けたものである。

【0057】

上述した成分に加えて、本発明の製剤には、対象としている製剤のタイプに関して当業界で従来から用いられているその他の物質を含めることができ、例えば、経口投与に適した製剤では着香剤を含めることができる。

【0058】

本発明は細胞の異常な有糸分裂を特徴とする疾患の治療に用いることができる。さらに、本発明は血管新生を特徴とする全ての疾患の治療に用いることができる。そのような疾患としては、限定はされないが次のものが含まれる：内皮細胞の異常な刺激（例えば、動脈硬化）、固形腫瘍および腫瘍の転移、例えば血管腫、聴神経腫、神経線維腫、トラコーマ、および発熱性肉芽腫（*pyrogenic granuloma*）などの良性腫瘍、血管機能不全、異常な創傷治癒、炎症性および免疫障害、ベーチェット病、痛風または痛風性関節炎、関節リウマチ、乾癬などの皮膚疾患、糖尿病性網膜症、ならびに未熟児網膜症（水晶体後方線維増殖症）、黄斑変性、角膜移植拒絶反応、血管新生緑内障などの眼の血管新生性疾患、肝臓疾患、およびオスラー・ウェーバー症候群（オスラー・ウェーバー・ランジュ症候群）。

【0059】

本発明に従って治療することのできる角膜の新血管形成を伴う疾患としては、限定はされないが、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、角膜移植拒絶反応、血管新生緑内障、および水晶体後部線維増殖症、流行性角結膜炎、ビタミンA欠乏症、コンタクトレンズの装着のしすぎ、アトピー性角膜炎、上輪部角膜炎、翼状片乾燥角膜炎、シェーグレン症候群、酒さ性座瘡、フィレクテヌローシス（*phlyctenulosis*）、梅毒、マイコバクテリア感染、脂質変性、化学火傷、細菌性潰瘍、真菌性潰瘍、単純ヘルペスウイルス感染、帯状ヘルペス感染、原虫感染、カポジ肉腫、モーレン腫瘍、テリエン角膜辺縁変性症、辺縁角膜炎、関節リウマチ、全身性紅斑、多発動脈炎、外傷、ヴェグナー肉芽腫症、強膜炎、スティーブンス・ジョンソン症候群、類天疱瘡、および放射状角膜切開術、および角膜 *graph* 拒絶反応が含まれる。

【0060】

本発明に従って治療することのできる角膜/脈絡膜新血管形成を伴う疾患としては、限定はされないが、糖尿病性網膜症、黄斑変性、鎌状赤血球貧血、サルコイドーシス、梅毒、弾性線維偽黄色腫、ページェット病、静脈閉塞、動脈閉塞、頸動脈閉塞性疾患、慢性ブドウ膜炎/*vitritis*、マイコバクテリア感染、ライム病、全身性エリテマトーデス、未熟児網膜症、イールズ病、ベーチェット病、網膜炎または脈絡膜炎を起こす感染、推定眼ヒストプラズマ症、ベスト病、近視、視神経乳頭の先天的構造欠損（*optic pits*）、スタルガルト病、扁平部炎、慢性網膜剥離、過粘稠度症候群、トキソプラズマ症、外傷、およびレーザー照射後合併症が含まれる。その他の疾患としては、限定はされないが、ルベオーシスに伴う疾患（隅角における新血管形成）、および全ての形の増殖性の硝子体網膜症を含む線維性血管組織または線維組織の異常な増殖によって起こる疾患がそれが糖尿病を伴うものでもそうでなくとも、含まれる。

10

20

30

40

50

【0061】

本発明で治療することのできる別の疾患としては関節リウマチがある。関節の滑膜の裏打ちの中の血管は血管新生を起こすものと考えられている。さらに、新しい血管のネットワークを形成し、内皮細胞は、パンスの成長と軟骨の崩壊をもたらす因子と活性酸素種を放出する。血管新生に關与する因子は関節リウマチの慢性的炎症状態が維持されることに寄与し、およびその維持を助けうる。

【0062】

本発明で治療することのできる別の疾患としては、血管腫、オスター - ウェーバー - ランジュ病、または遺伝性出血性毛細血管拡張症、固形腫瘍または血液腫瘍、および後天性免疫不全症候群が挙げられる。

10

【0063】

3 - アミノ - サリドマイドの S (-) - および R (+) - エナンチオマー、特に S (-) - 3 - アミノ - サリドマイドの研究では、これらの化合物が血管新生関連疾患の治療に有用であることが示されている。上述のとおり、血管新生が関わる疾患群の1つは癌である。多数の癌、それには固形腫瘍および血液腫瘍を含むが、それらは非常に小さなものを超えて成長するには血管新生を必要とする。血管新生の阻害は腫瘍の増殖の阻害をもたらすこととなる。3 - アミノ - サリドマイドの S (-) - および R (+) - エナンチオマーで治療しうる癌の特別なタイプのものの例としては、限定はされないが、前立腺癌、乳癌、子宮頸癌、子宮癌、卵巣癌、神経膠腫、血管腫、カボジ肉腫、膵臓癌、網膜芽細胞腫、悪性黒色腫、膀胱癌、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫、神経芽細胞腫、骨肉腫、白血病、リン

20

【0064】

本発明はさらに、下記の実施例によって説明され、それらはいかなる意味においても本発明の範囲の限定となることは意図していない。これに対して、本発明の他の種々の実施形態、改変、および同等のもの、それらは本明細書の説明を読んだ後であれば、本発明の精神から、および/または添付の特許請求の範囲の示している範囲から乖離しないものであるとそれ自身が当業者に示唆しているものであるが、それらを手段としてとることができるということは明確に理解されるべきである。下記の表は望ましい実施形態を提供するので、一方、実施例は代表的な化合物の合成法を提供する。

30

【0065】

実施例

下記の化合物は Shealy *ら*, *J. Pharm. Sci.*, 1968, 57: 757 - 764; Polonski *ら*, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1988, 639 - 648; Muller *ら*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999, 9: 1625 - 1630; Helm *ら*, *Arzneim-Forsch./Drug Res.*, 1981, 31: 941 - 949; Shah *ら*, *J. Med. Chem.*, 1999, 42: 3014 - 3017; お

40

【0066】

実施例 1

S (-) - (3 - ベンジルオキシカルボニルアミノ) - グルタルイミドの合成 :

40 mL の無水 THF (テトラヒドロフラン) 中のカルボキシベンジルオキシ - L - グルタミン (2 . 8 g、 10 ミリモル) の溶液を攪拌しているところへ 1 , 1 - カルボニルジイミダゾール (1 . 92 g、 12 ミリモル) を添加した。その反応混液を還流しつつ 18 時間加熱した。THF を蒸発させ、その産物をクロロホルムで溶解した。クロロホルム層を水と塩水で洗い、無水 CaSO₄ 上で乾燥し、ろ過して蒸発させ白色の固体を得た。

50

この固体産物をエチルエーテルから結晶化して2.4gの結晶性粉末(90%)を得た。(あるいはまた、-70°CのDMF(N,N-ジメチルホルムアミド)中のSOCl₂でカルボキシベンジルオキシ-L-グルタミンを処理して環化させ、0°Cで1時間でS(-)-(3-ベンジルオキシカルボニルアミノ)-グルタルイミドを形成させることができる。この反応混液をCHCl₃で希釈し、5%Na₂CO₃で洗い、無水Na₂SO₄上で乾燥し、ろ過し、蒸発させた2.5g(収率90%)のS(-)-(3-ベンジルオキシカルボニルアミノ)-グルタルイミドが得られる)。

【0067】

CDCl₃中での¹H NMRでこの産物がS(-)-(3-ベンジルオキシカルボニルアミノ)-グルタルイミドであることを確認した。¹H NMR(CDCl₃, PPM) 10
、8.2(1H, s, broad)、7.4(5H, s, aromatic)、5.8(1H, d)、5.15(2H, s)、4.4(1H, dd, J=4.5, 3)、2.95-2.4(3H, m)、1.86(1H, d, t, J=11.5, 6.5)。融点 122-124 (文献値=122-124)。

【0068】

実施例 2

S(-)-3-アミノ-グルタルイミド・HBrの合成:

15mLの氷酢酸中のS(-)-(3-ベンジルオキシカルボニルアミノ)-グルタルイミド(1.2g、4.6ミリモル)中へ、8mLの30% HBr/酢酸溶液を20°Cで添加した。反応混液の温度を室温まで上げ、1時間攪拌した。S(-)-2-アミノグルタルアミド・HBrの白色固形粉末が反応混液中に出現し始めた。その固体をろ過し、5mLの氷酢酸で洗い、次いでエーテルで洗い、1.8g(80%)の産物を得た。旋光計での産物の分析では(-)の旋光、 $[\alpha]_D^{25} (c=1, \text{水}) = -37.5^{\circ}$ を示し、その産物がS(-)-2-アミノグルタルアミドであることを確認した。DMSO-D₆中での¹H NMRで、その産物が2-アミノ-L-グルタルアミド・HBrであることを確認した。¹H NMR(DMSO-D₆, PPM) 20

実施例 3

S(-)-3-ニトロ-サリドマイドの合成:

50mLの無水DMF中の3-アミノグルタルアミド・HBr(4.18g、20ミリモル)の溶液中に3.8g(20ミリモル)の3-ニトロ無水フタル酸を添加した。100mLの氷酢酸を添加した後、その反応混液を約70°Cから約80°Cで約24時間加熱した。その後、溶媒を真空下で蒸発させてわずかに灰色がかった白色の固体を得た。10mLのエチルアルコールをその固体に添加するとわずかに灰色がかった白色の産物が形成された。その産物を分離し、20mLのエチルアルコールで洗った。 30

【0069】

DMSO-D₆中での¹H NMRで、その産物がS(-)-3-ニトロ-サリドマイドであることを確認した。融点 228-229 (文献値=228.5-229.5)。¹H NMR(DMSO-D₆, PPM), 11.25(1H, s, broad), 8.35(1H, d, J=7.2), 8.25(1H, d, J=7.0), 8.15(1H, t, J=8.0), 5.2(1H, dd, J=5.5, 7.2), 3.00-2.85(1H, m), 2.65-2.4(2H, m), 2.15-2.05(1H, m)。 40

【0070】

実施例 4

S(-)-3-アミノ-サリドマイドの合成:

3-ニトロ-サリドマイド(1g、3.3ミリモル)を50mL ジオキサン/メタノール 4:1混合液中に溶解し、Parr水素化装置中でPd/C 5%触媒の存在下で40psiの水素で約4時間水素化した。その反応混液をセライトろ過剤を通過させてろ過した後、溶媒を真空下で蒸発させて黄色の粉末を得た。その産物を酢酸エチル/ジオキサンから再結晶させて800mg(純度85%)のS(-)-3-アミノ-サリドマイドを得 50

た。

【0071】

DMSO-D₆ 中での¹H NMRで、その産物がS(-)-3-アミノ-サリドマイドであることを確認した。融点 318.2 - 319.5。 ¹H NMR (DMSO-D₆, PPM), 11.10 (1H, s broad), 7.45 (1H, t, J = 7.5), 7.05 (1H, d, J = 5.2), 6.95 (1H, d, J = 5, 2), 6.5 (2H, s broad), 5.05 (1H, dd, J = 5.0, 13.42), 2.95 - 2.80 (1H, m), 2.65 - 2.5 (2H, m), 2.05 - 1.95 (1H, m)。絶対配置はR-およびS-3-アミノ-サリドマイドの比旋光度 $[\alpha]^{25}_D$ を類似の化合物であるR(+)-およびS(-)-サリドマイドと比較して定めた。旋光計での産物の分析では(-)の旋光、 $[\alpha]^{25}_D$ (c = 0.5、ジオキサン) = -27.7.0°を示し、その産物がS(-)-3-アミノ-サリドマイドであることを確認した。

10

【0072】

3-アミノ-サリドマイドの2種のエナンチオマーはキラルHPLCカラムWelk-01 (10 mm x 750 mm) で分け、CH₃CN/MeOH/H₂O 1:1:5混合物で溶出した。流速2 mL/分, 240 nmで保持時間はそれぞれ、S(-)エナンチオマーでは33.74分で、R(+)-エナンチオマーでは35.62分であった。

【0073】

実施例 5

R(+)-3-アミノ-サリドマイドの合成:

化合物R(+)-3-アミノ-サリドマイドの合成は、出発物質を市販のカルボキシベンジルオキシ-D-グルタミンとし、それでR(+)-3-ニトロ-サリドマイドを形成させたことを除いては、上述のS(-)-3-アミノ-サリドマイドと同じ方法で行った(実施例1参照)。旋光計での産物の分析では(+)の旋光、 $[\alpha]^{25}_D$ (c = 1、ジオキサンs1) = +37.0°を示し、その産物がR(+)-3-アミノ-サリドマイドであることを確認した。DMSO-D₆ 中での¹H NMRで、その産物が3-アミノ-サリドマイドであることを確認した。

20

【0074】

実施例 6

S(-)-3-アミノ-サリドマイドの合成(推定的実施例):

S(-)-3-アミノ-サリドマイドはS(-)-3-ニトロ-サリドマイドを濃塩酸中に溶解し、次いでその反応混液を顆粒状のスズで処理することによって合成することができる。その反応混液を約70 から約80 で約2時間加熱した後、その反応混液をろ過し、真空下で酸を蒸発させると、黄色の粉末が得られるはずである。その産物を水から、およびその後酢酸エチル/ジオキサンから再結晶させると、S(-)-3-アミノ-サリドマイドが得られるはずである。

30

【0075】

実施例 7

Roche Cell Proliferation Kit II (XTT) は小分子の相対的有効性をスクリーニングするには有用なアッセイ法である。このアッセイ法は細胞増殖のアゴニストおよび/またはアンタゴニストに反応する細胞の増殖を定量的に測定するものである。これは黄色のテトラゾリウム塩(XTT)が、代謝が活発に行われている/生存している細胞によって切断されてオレンジ色のホルマジン色素が形成されることに基づいたものである。可溶性の色素の形成によって、スキャンニングマルチウエル分光光度計を用いて直接的な定量ができる。生細胞の数の増加(増殖の結果として)があれば、ホルマジン色素の産生がより多くなり、それは吸光度の増大と対応する。

40

【0076】

サリドマイドの類似化合物またはその類似体の評価には、我々はHS-Sultan細胞をin vitro XTTアッセイで用いた。96ウエルのマイクロタイタープレートの

50

各ウエルに細胞を処理の約16時間前に正常増殖培地の90 μ Lあたり15,000個の密度で蒔く。培養と処理の間、細胞は高湿度インキュベーター中で37 $^{\circ}$ C、5%CO₂で維持する。処理剤(10X)を10 μ Lのアリコートに添加して処理剤の各ウエル中の最終濃度を1Xとする。各濃度はそれぞれ3回ずつ測定する。72時間の処理期間の最後の4時間の間に各ウエルに50 μ Lのアリコート中のXTT標識混合物を添加する。処理/標識期間の完了時に、吸光度プレートリーダーで、470nmの波長および650nmの参照波長でプレートを読みとる。各実験で、各処理での平均吸光度値(バックグラウンド値を差し引いたもの)を濃度に対してプロットする。吸光度値がより大きければ、より増殖の量が多いことに対応する。陰性対象(非処理細胞)を参照ポイントとして用いる;この対象よりも低い吸光度値は増殖の阻害を反映している。

10

【0077】

ある期間にわたって行った実験を比較する際には、各実験から得られる吸光度値が多数の要因(XTT試薬の経時的分解が最もよく見られる要因である)のために変わりうる。古いXTTキットの試薬を用いるとき、または新しいキットにスイッチする時には、そのときの実験の吸光度値が全体的により高くまたはより低くなる可能性があり、別の実験との直接的な比較が困難になる。従って、多数の実験の結果を比較する際に、吸光度の値を、処理されたものの値を陰性対象の値で割った比(処理対対照の比)に転換することはよく行われている;次いで各実験でのその「処理対対照の比」の値を濃度(μ M)に対してプロットする。図1は3-アミノ-サリドマイドエナンチオマーの比較である。RおよびR,Sプロットは3回の実験から得たデータを示している。Sおよびサリドマイドプロットは12回の実験から得たデータである。図1に示すとおり、S(-)-およびR(+)-3-アミノ-サリドマイドエナンチオマーは双方とも抗細胞増殖活性を示す。

20

【0078】

実施例8

S(-)およびR(+)-3-アミノ-サリドマイドエナンチオマーについて抗腫瘍活性を下記のとおり調べた。HsS細胞系統で、200万個の細胞を8週齢の雌のSCIDマウスの尾静脈に注射する。2週間後に治療を開始し、そのマウスが死亡するか、または後肢の麻痺を示すまで毎日続ける。結果は死亡に至った平均時間を、治療した動物対、対照の動物で示している。ルイス肺癌モデルでは、 2.5×10^5 個の細胞を6-8週齢の雄のC57BL/6マウスの尾静脈中に静脈内注射し、3日目に治療を開始する。治療期間は通常は11-15日間である。CO₂で窒息させて屠殺した後、肺(腫瘍が蒔かれ増殖した場所)を摘出し、水で洗い、軽くたたいて乾燥させ、重量を測定する。年齢をマッチさせた、腫瘍を持っていないマウスの肺の平均重量を、治療した、腫瘍を持ったマウスの肺重量から差し引いて、その結果を治療した動物対対照の動物の肺重量の増加とする。表1は、肺および形質細胞腫転移腫瘍系での*in vivo*の実験のデータを要約したものであり、3-アミノ-サリドマイドの3種類のエナンチオマーの抗腫瘍活性を比較している。このデータはS(-)エナンチオマーが各腫瘍モデルにおいて3-アミノ-サリドマイドの最も活性の高いエナンチオマーであったことを示している。

30

【0079】

【表1】

40

腫瘍モデル	供試薬剤	投与量 (mg/kg/日)	活性
HsSultan B細胞リンパ腫 SCIDマウスで転移	ベヒクル		
	(0.5% メチルセルロース)	—	26日間*
	R, S	50	41日間*
	R (+)	50	37日間*
	S (-)	50	47日間*
HsSultan B細胞リンパ腫 SCIDマウスで転移	ベヒクル		
	(0.5% メチルセルロース)	—	26日間*
	R, S	200	28日間*
	R (+)	200	31日間*
	S (-)	200	47日間*
ルイス肺癌 C57BL/6マウスで転移	ベヒクル		
	(0.5% メチルセルロース)	—	0.40 g #
	R, S	100	0.27 g #
	R (+)	100	0.42 g #
	S (-)	100	0.17 g #

* 死亡までの平均期間

肺の重量増加

実施例 9

角膜微小ポケットアッセイは、Kenyonら、「マウスの角膜における血管新生の1モデル」"A Model of Angiogenesis in the Mouse Cornea", Invest. Ophthalmol. & Vis. Sci., 37: 1625-1632 (1996)に報告されているとおりに行ったが、この文献はその全体を本明細書に組み入れる。80 ngのbFGFまたはヒト組換えVEGF (R&D Systems, Minneapolis, Minn)を含有しているペレットをC57BL/6Jマウス体内に用いた。治療群は5日間(bFGF)または6日間(VEGF)連続して、サリドマイド、S(-)-およびR(+)-3-アミノ-サリドマイド(3APG)、S(-)-3APG、およびR(+)-3APG(50 mg/kg)を0.5%カルボキシメチルセルロース中に懸濁したものの腹腔内投与を受けた。治療はペレットのインプラントの日に開始した; 対照のマウスはカルボキシメチルセルロースのみの腹腔内投与を受けた。血管の応答のみられる領域を術後5日目(bFGF)または6日目(VEGF)に、スリットランプを用いて調べた。結果は図2に示す。図2に示すとおり、bFGFで誘導された新血管形成でのS(-)-3APGと対照との差は有意であり(それぞれn=9、P<0.0001)、S(-)-3APGとサリドマイドの差も有意であった(それぞれn=9、P<0.01)。VEGFで誘導された新血管形成でのS(-)-3APGと対照との差は有意であり(それぞれn=9、P<0.001)、S(-)-3APGとサリドマイドの差も有意であった(それぞれn=9、P<0.01)。

【0080】

「有効量」とは治療上または予防上有効な量を意味する。そのような量は当業者であれば

10

20

30

40

50

治療しようとする条件、投与経路、およびその他の関連要素を考慮して容易に定めることができる。そのような当業者であれば、適切な投与量、投与の形態および頻度を容易に決定することができよう。

【0081】

当然のことながら、上述の事項は本発明の好ましい実施形態に関するものであって、添付の特許請求の範囲に規定している本発明の精神および範囲から乖離することなくそれらに多数の改変または変更を行いうることは理解すべきものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】

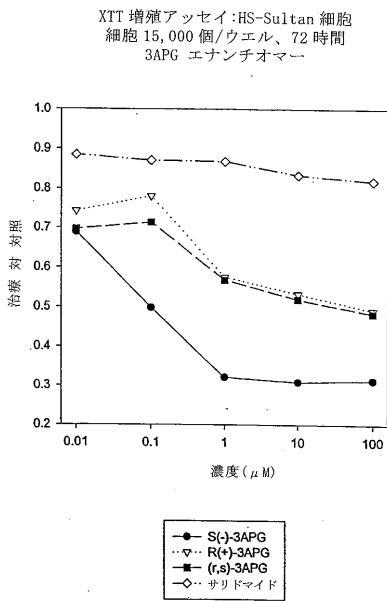
図1はHS-Sultan細胞を用いたXTT増殖の結果を示す。

10

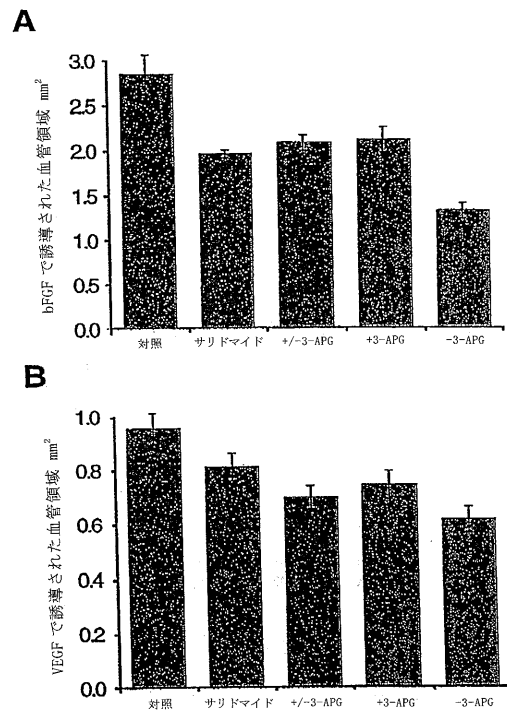
【図2】

図2は本発明の化合物を用いた角膜微小ポケットアッセイの結果を示す。

【図1】



【図2】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
22 August 2002 (22.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/064083 A2

(51) International Patent Classification: A61K
(21) International Application Number: PCT/US01/45229
(22) International Filing Date: 30 November 2001 (30.11.2001)
(25) Filing Language: English
(26) Publication Language: English
(30) Priority Data: 60/250,219 30 November 2000 (30.11.2000) US

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): TRESTON, Anthony [AU/US]; 408 Denham Road, Rockville, MD 20851 (US); SHAH, Jamshed, H. [US/US]; 6443 Pound Apple Court, Columbia, MD 21045 (US); D'AMATO, Robert, J. [US/US]; 4 Patriot's Drive, Lexington, MA 02420 (US); HUNSUCKER, Kimberly, A. [US/US]; 18034 Cottage Garden, Apartment 203, Germantown, MD 20874 (US); ROUGAS, John [US/US]; 12420 Great Park Circle, Apartment 204, Germantown, MD 20876 (US); CONNER, Barry, P. [US/US]; 3526 Laurel View Court, Laurel, MD 20724 (US); PRIBLUDA, Victor [AR/US]; 12608 Arbor View Drive, Silver Spring, MD 20902 (US); SWARTZ, Glenn, M. [US/US]; 6190 Challedon Circle, Mt. Airy, MD 21771 (US).

(71) Applicant (for all designated States except US): THE CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION [US/US]; 300 Longwood Avenue, Boston, MA 02115 (US).

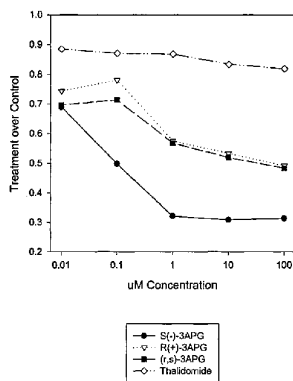
(74) Agents: PRATT, John, S. et al.; Kilpatrick Stockton LLP, Suite 2800, 1100 Peachtree Street, Atlanta, GA 30309 (US).

[Continued on next page]

(54) Title: SYNTHESIS OF 3-AMINO-THALIDOMIDE AND ITS ENANTIOMERS

WO 02/064083 A2

XTT Proliferation Assay: HS-Sultan cells
15,000 cells/well for 72 hours
3APG enantiomers



(57) Abstract: The invention provides new and useful analogs of 3-amino-thalidomide. These analogs include S(-)-3-amino-thalidomide and R(+)-3-amino-thalidomide. The invention also provides processes for making these analogs. Further, the invention provides methods for inhibiting angiogenesis and treating angiogenesis-associated diseases, including cancer and macular degeneration, by administering these compounds.

WO 02/064083 A2 

(81) **Designated States (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

(84) **Designated States (regional):** ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/064083

PCT/US01/45229

5

SYNTHESIS OF 3-AMINO-THALIDOMIDE AND ITS ENANTIOMERS10 **TECHNICAL FIELD**

The present invention relates to methods and compositions for preventing unwanted angiogenesis in a human or animal. More particularly, the present invention relates to a method for preventing unwanted angiogenesis, particularly in angiogenesis dependent or associated diseases, by administration of compounds
15 such as enantiomers of 3-amino-thalidomide.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Angiogenesis is the generation of new blood vessels into a tissue or organ. Under normal physiological conditions, humans
20 and animals undergo angiogenesis only in very specific, restricted situations. For example, angiogenesis is normally observed in wound

healing, fetal and embryonal development, and formation of the corpus luteum, endometrium and placenta.

Angiogenesis is controlled through a highly regulated system of angiogenic stimulators and inhibitors. The control of
5 angiogenesis has been found to be altered in certain disease states and, in many cases, pathological damage associated with the diseases is related to uncontrolled angiogenesis. Both controlled and uncontrolled angiogenesis are thought to proceed in a similar manner. Endothelial cells and pericytes, surrounded by a basement membrane,
10 form capillary blood vessels. Angiogenesis begins with the erosion of the basement membrane by enzymes released by endothelial cells and leukocytes. Endothelial cells, lining the lumen of blood vessels, then protrude through the basement membrane. Angiogenic stimulants induce the endothelial cells to migrate through the eroded
15 basement membrane. The migrating cells form a "sprout" off the parent blood vessel where the endothelial cells undergo mitosis and proliferate. The endothelial sprouts merge with each other to form capillary loops, creating a new blood vessel.

Persistent, unregulated angiogenesis occurs in many
20 disease states, tumor metastases, and abnormal growth by endothelial cells. The diverse pathological disease states in which unregulated angiogenesis is present have been grouped together as angiogenic-dependent or angiogenic-associated diseases.

One example of a disease mediated by angiogenesis is
25 ocular neovascular disease. This disease is characterized by invasion of new blood vessels into the structures of the eye, such as the retina

WO 02/064083

PCT/US01/45229

or cornea. It is the most common cause of blindness and is involved in approximately twenty eye diseases. In age-related macular degeneration, the associated visual problems are caused by an ingrowth of choroidal capillaries through defects in Bruch's membrane with proliferation of fibrovascular tissue beneath the retinal pigment epithelium. Angiogenic damage is also associated with diabetic retinopathy, retinopathy of prematurity, corneal graft rejection, neovascular glaucoma, and retrolental fibroplasia. Other diseases associated with corneal neovascularization include, but are not limited to, epidemic keratoconjunctivitis, Vitamin A deficiency, contact lens overwear, atopic keratitis, superior limbic keratitis, pterygium keratitis sicca, sjogrens disease, acne rosacea, phlyctenulosis, syphilis, *Mycobacteria* infections, lipid degeneration, chemical burns, bacterial ulcers, fungal ulcers, *Herpes simplex* infection, *Herpes zoster* infections, protozoan infections, Kaposi's sarcoma, Mooren's ulcer, Terrien's marginal degeneration, marginal keratolysis, rheumatoid arthritis, systemic lupus, polyarteritis, trauma, Wegener's sarcoidosis, scleritis, Stevens-Johnson's disease, pemphigoid, and radial keratotomy.

Diseases associated with retinal/choroidal neovascularization include, but are not limited to, diabetic retinopathy, macular degeneration, sickle cell anemia, sarcoidosis, syphilis, pseudoxanthoma elasticum, Paget's disease, vein occlusion, artery occlusion, carotid obstructive disease, chronic uveitis/vitritis, *Mycobacteria* infections, lyme's disease, systemic lupus erythematosus, retinopathy of prematurity, Eales' disease, Behcet's

WO 02/064083

PCT/US01/45229

disease, infections causing retinitis or choroiditis, presumed ocular histoplasmosis, Best's disease, myopia, optic pits, Stargardt's disease, pars planitis, chronic retinal detachment, hyperviscosity syndromes, toxoplasmosis, trauma and post-laser complications. Other eye-
5 related diseases include, but are not limited to, diseases associated with rubeosis (neovascularization of the angle) and diseases caused by the abnormal proliferation of fibrovascular or fibrous tissue, including all forms of proliferative vitreoretinopathy.

Another angiogenesis associated disease is rheumatoid
10 arthritis. The blood vessels in the synovial lining of the joints undergo angiogenesis. In addition to forming new vascular networks, the endothelial cells release factors and reactive oxygen species that lead to pannus growth and cartilage destruction. Angiogenesis may also play a role in osteoarthritis. The activation of the chondrocytes
15 by angiogenic-related factors contributes to the destruction of the joint. At a later stage, the angiogenic factors promote new bone growth. Therapeutic intervention that prevents the bone destruction could halt the progress of the disease and provide relief for persons suffering with arthritis.

20 Chronic inflammation may also involve pathological angiogenesis. Such diseases as ulcerative colitis and Crohn's disease show histological changes with the ingrowth of new blood vessels and the inflamed tissues. Bartonellosis, a bacterial infection found in South America, can result in a chronic stage that is characterized by
25 proliferation of vascular endothelial cells. Another pathological role associated with angiogenesis is found in atherosclerosis. The plaques

formed within the lumen of blood vessels have been shown to have angiogenic stimulatory activity.

The hypothesis that tumor growth is angiogenesis-dependent was first proposed in 1971. (Folkman, *New Eng. J. Med.*, 5 285:1182-86 (1971)). In its simplest terms, this hypothesis states: "Once tumor 'take' has occurred, every increase in tumor cell population must be preceded by an increase in new capillaries converging on the tumor." Tumor 'take' is currently understood to indicate a prevascular phase of tumor growth in which a population of 10 tumor cells occupying a few cubic millimeters volume, and not exceeding a few million cells, can survive on existing host microvessels. Expansion of tumor volume beyond this phase requires the induction of new capillary blood vessels. For example, pulmonary micrometastases in the early prevascular phase in mice would be 15 undetectable except by high power microscopy on histological sections.

Examples of the indirect evidence which support this concept include:

The growth rate of tumors implanted in subcutaneous 20 transparent chambers in mice is slow and linear before neovascularization, and rapid and nearly exponential after neovascularization. (Algire, *et al.*, *J. Nat. Cancer Inst.*, 6:73-85 (1945)).

Tumors grown in isolated perfused organs where blood 25 vessels do not proliferate are limited to 1-2 mm³ but expand rapidly to >1000 times this volume when they are transplanted to mice and

WO 02/064083

PCT/US01/45229

become neovascularized. (Folkman, *et al.*, *Annals of Surgery*, 164:491-502 (1966)).

Tumor growth in the avascular cornea proceeds slowly and at a linear rate, but switches to exponential growth after
5 neovascularization. (Gimbrone, Jr., *et al.*, *J. Nat. Cancer Inst.*, 52:421-27 (1974)).

Tumors suspended in the aqueous fluid of the anterior chamber of the rabbit eye remain viable, avascular, and limited in size to $< 1 \text{ mm}^3$. Once they are implanted on the iris vascular bed, they
10 become neovascularized and grow rapidly, reaching 16,000 times their original volume within 2 weeks. (Gimbrone, Jr., *et al.*, *J. Exp. Med.*, 136:261-76).

When tumors are implanted on the chick embryo chorioallantoic membrane, they grow slowly during an avascular
15 phase of >72 hours, but do not exceed a mean diameter of $0.93 + 0.29$ mm. Rapid tumor expansion occurs within 24 hours after the onset of neovascularization, and by day 7 these vascularized tumors reach a mean diameter of $8.0 + 2.5$ mm. (Knighton, *British J. Cancer*, 35:347-56 (1977)).

Vascular casts of metastases in the rabbit liver reveal
20 heterogeneity in size of the metastases, but show a relatively uniform cut-off point for the size at which vascularization is present. Tumors are generally avascular up to 1 mm in diameter, but are neovascularized beyond that diameter. (Lien, *et al.*, *Surgery*, 68:334-40 (1970)).

WO 02/064083

PCT/US01/45229

In transgenic mice which develop carcinomas in the beta cells of the pancreatic islets, pre-vascular hyperplastic islets are limited in size to < 1 mm. At 6-7 weeks of age, 4-10% of the islets become neovascularized, and from these islets arise large vascularized tumors of more than 1000 times the volume of the pre-vascular islets. (Folkman, *et al.*, *Nature*, 339:58-61 (1989)).

A specific antibody against VEGF (vascular endothelial growth factor) reduces microvessel density and causes "significant or dramatic" inhibition of growth of three human tumors which rely on VEGF as their sole mediator of angiogenesis (in nude mice). The antibody does not inhibit growth of the tumor cells *in vitro*. (Kim, *et al.*, *Nature*, 362:841-44 (1993)).

Anti-bFGF monoclonal antibody causes 70% inhibition of growth of a mouse tumor which is dependent upon secretion of bFGF as its only mediator of angiogenesis. The antibody does not inhibit growth of the tumor cells *in vitro*. (Hori, *et al.*, *Cancer Res.*, 51:6180-84 (1991)).

Intraperitoneal injection of bFGF enhances growth of a primary tumor and its metastases by stimulating growth of capillary endothelial cells in the tumor. The tumor cells themselves lack receptors for bFGF, and bFGF is not a mitogen for the tumors cells *in vitro*. (Gross, *et al.*, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 31:79 (1990)).

A specific angiogenesis inhibitor (AGM-1470) inhibits tumor growth and metastases *in vivo*, but is much less active in inhibiting tumor cell proliferation *in vitro*. It inhibits vascular endothelial cell proliferation half-maximally at 4 logs lower

WO 02/064083

PCT/US01/45229

concentration than it inhibits tumor cell proliferation. (Ingber, *et al.*, *Nature*, 48:555-57 (1990)). There is also indirect clinical evidence that tumor growth is angiogenesis dependent.

Human retinoblastomas that are metastatic to the
5 vitreous develop into avascular spheroids which are restricted to less than 1 mm³ despite the fact that they are viable and incorporate ³H-thymidine (when removed from an enucleated eye and analyzed *in vitro*).

Carcinoma of the ovary metastasizes to the peritoneal
10 membrane as tiny avascular white seeds (1-3 mm³). These implants rarely grow larger until one or more of them becomes neovascularized.

Intensity of neovascularization in breast cancer
(Weidner, *et al.*, *New Eng. J. Med.*, 324:1-8 (1991); Weidner, *et al.*, *J*
15 *Nat. Cancer Inst.*, 84:1875-87 (1992)) and in prostate cancer (Weidner, *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 143(2):401-09 (1993)) correlates highly with risk of future metastasis.

Metastasis from human cutaneous melanoma is rare prior
to neovascularization. The onset of neovascularization leads to
20 increased thickness of the lesion and an increased risk of metastasis. (Srivastava, *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 133:419-23 (1988)).

In bladder cancer, the urinary level of an angiogenic
protein, bFGF, is a more sensitive indicator of status and extent of
disease than is cytology. (Nguyen, *et al.*, *J. Nat. Cancer Inst.*,
25 85:241-42 (1993)).

WO 02/064083

PCT/US01/45229

Thus, it is clear that angiogenesis plays a major role in the metastasis of cancer. If this angiogenic activity could be repressed or eliminated, then the tumor, although present, would not grow. In the disease state, prevention of angiogenesis could avert the damage caused by the invasion of the new microvascular system. Therapies directed at control of the angiogenic processes could lead to the abrogation or mitigation of these diseases.

Angiogenesis has been associated with a number of different types of cancer, including solid tumors and blood-borne tumors. Solid tumors with which angiogenesis has been associated include, but are not limited to, rhabdomyosarcomas, retinoblastoma, Ewing's sarcoma, neuroblastoma, and osteosarcoma. Angiogenesis is also associated with blood-borne tumors, such as leukemias, lymphomas, multiple myeloma, and any of various acute or chronic neoplastic diseases of the bone marrow in which unrestrained proliferation of white blood cells occurs, usually accompanied by anemia, impaired blood clotting, and enlargement of the lymph nodes, liver and spleen. It is believed to that angiogenesis plays a role in the abnormalities in the bone marrow that give rise to leukemia and lymphoma tumors and multiple myeloma diseases.

One of the most frequent angiogenic diseases of childhood is the hemangioma. A hemangioma is a tumor composed of newly-formed blood vessels. In most cases the tumors are benign and regress without intervention. In more severe cases, the tumors progress to large cavernous and infiltrative forms and create clinical complications. Systemic forms of hemangiomas, hemangiomatoses,

WO 02/064083

PCT/US01/45229

have a high mortality rate. Therapy-resistant hemangiomas exist that cannot be treated with therapeutics currently in use.

Angiogenesis is also responsible for damage found in heredity diseases such as Osler-Weber-Rendu disease, or heredity
5 hemorrhagic telangiectasia. This is an inherited disease characterized by multiple small angiomas, tumors of blood or lymph vessels. The angiomas are found in the skin and mucous membranes, often accompanied by epistaxis (nose bleeds) or gastrointestinal bleeding and sometimes with pulmonary or hepatic arteriovenous fistula.

10 What is needed, therefore, is a composition and method which can inhibit angiogenesis. What is also needed is a composition and method which can inhibit the unwanted growth of blood vessels, especially in tumors.

Angiogenesis is also involved in normal physiological
15 processes, such as reproduction and wound healing. Angiogenesis is an important step in ovulation and also in implantation of the blastula after fertilization. Prevention of angiogenesis could be used to induce amenorrhea, to block ovulation, or to prevent implantation by the blastula.

20 In wound healing, excessive repair or fibroplasia can be a detrimental side effect of surgical procedures and may be caused or exacerbated by angiogenesis. Adhesions are a frequent complication of surgery and lead to problems such as small bowel obstruction.

Several compounds have been used to inhibit
25 angiogenesis. Taylor, *et al.* (*Nature*, 297:307 (1982)) have used protamine to inhibit angiogenesis. The toxicity of protamine limits its

WO 02/064083

PCT/US01/45229

practical use as a therapeutic. Folkman, *et al.* (*Science*, 221:719 (1983), and U.S. Pat. Nos. 5,001,116 and 4,994,443) have disclosed the use of heparin and steroids to control angiogenesis. Steroids, such as tetrahydrocortisol, which lack glucocorticoid and mineralocorticoid activity, have been found to be angiogenic inhibitors.

Other factors found endogenously in animals, such as a 4 kDa glycoprotein from bovine vitreous humor and a cartilage derived factor, have been used to inhibit angiogenesis. Cellular factors, such as interferon, inhibit angiogenesis. For example, interferon alpha or human interferon beta have been shown to inhibit tumor-induced angiogenesis in mouse dermis stimulated by human neoplastic cells. Interferon beta is also a potent inhibitor of angiogenesis induced by allogeneic spleen cells. (Sidky, *et al.*, *Cancer Res.*, 47:5155-61(1987)). Human recombinant interferon (alpha/A) was reported to be successfully used in the treatment of pulmonary hemangiomas, an angiogenesis-induced disease. (White, *et al.*, *New Eng. J. Med.*, 320:1197-1200 (1989)).

Other agents which have been used to inhibit angiogenesis include ascorbic acid ethers and related compounds. (Japanese Kokai Tokkyo Koho No.58-13 (1978)). Sulfated polysaccharide DS 4152 also inhibits angiogenesis. (Japanese Kokai Tokkyo Koho No. 63-119500). Additional anti-angiogenic compounds include Angiostatin® (U.S. Patent Nos. 5,639,725; 5,792,845; 5,885,795; 5,733,876; 5,776,704; 5,837,682; 5,861,372, and 5,854,221) and Endostatin™ (U.S. Patent No. 5,854,205).

Another compound which has been shown to inhibit angiogenesis is thalidomide. (D'Amato, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:4082-85 (1994)). Thalidomide is a hypnotic that has been successfully used to treat a number of angiogenesis-associated diseases, such as rheumatoid arthritis (Gutierrez-Rodriguez, *Arthritis Rheum.*, 27 (10):1118-21 (1984); Gutierrez-Rodriguez, *et al.*, *J. Rheumatol.*, 16(2):158-63 (1989)), Behcet's disease (Handley, *et al.*, *Br. J. Dermatol.*, 127 Suppl, 40:67-8 (1992); Gunzler, *Med. Hypotheses*, 30(2):105-9 (1989)), graft versus host rejection (Field, *et al.*, *Nature*, 211(55): 1308-10 (1966); Heney, *et al.*, *Br. J. Haematol.*, 78 (1):23-7 (1991)), *Mycobacteria* diseases (Vicente, *et al.*, *Arch. Intern. Med.*, 153(4):534 (1993)), *Herpes simplex* and *Herpes zoster* infections (Naafs, *et al.*, *Int. J. Dermatol.*, 24(2):131-4 (1985)), chronic inflammation, ulcerative colitis (Meza, *et al.*, *Drug Ther*, 23 (11): 74-80, 83 (1993); Powell, *et al.*, *Br. J. Dermatol.*, 113 Suppl 28: 141-4 (1985)), leprosy (Barnes, *et al.*, *Infect. Immun.*, 60(4):1441-46 (1992)) and lupus (Burrows, *BMJ*, 307: 939-40 (1993)).

Although thalidomide has minimal side effects in adults, it is a potent teratogen. Thus, there are concerns regarding its use in women of child-bearing age. Although minimal, there are a number of side effects which limit the desirability of thalidomide as a treatment. One such side effect is drowsiness. In a number of therapeutic studies, the initial dosage of thalidomide had to be reduced because patients became lethargic and had difficulty functioning normally. Another side effect limiting the use of

WO 02/064083

PCT/US01/45229

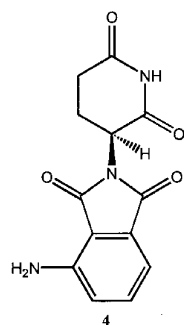
thalidomide is peripheral neuropathy, in which individuals suffer from numbness and disfunction in their extremities.

Thus, improved methods and compositions are needed that are easily administered and capable of inhibiting angiogenesis.

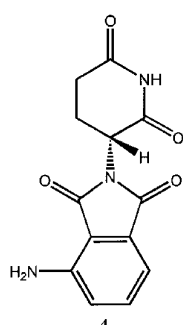
5 SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides new derivatives to 3-amino-thalidomide, which are analogs of thalidomide. Specifically, the present invention provides for the individual R(+) and S(-) enantiomers of 3-amino-thalidomide and processes for preparing
10 these enantiomers.

The enantiomers of the present invention have the following structures:



S(-)-3-amino-thalidomide



R(+)-3-amino-thalidomide

15 In another aspect of the present invention, compositions and methods are provided that are effective in inhibiting abnormal

mitosis and/or unwanted angiogenesis. These compositions are easily administered by different routes including oral and can be given in dosages that are safe and provide mitotic and/or angiogenic inhibition at internal sites. The present invention provides a method of treating
5 mammalian diseases mediated by undesired and uncontrolled mitosis and/or angiogenesis by administering a composition comprising an anti-mitotic and/or anti-angiogenic compound in a dosage sufficient to inhibit angiogenesis.

Other features and advantages of the invention will be
10 apparent from the following description of preferred embodiments thereof.

These and other objects, features and advantages of the present invention will become apparent after a review of the following detailed description of the disclosed embodiments and the
15 appended claims.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURE

Figure 1 illustrates the results of XTT proliferation with HS-Sultan cells.

Figure 2 illustrates the results of corneal micropocket
20 assays employing the compounds of the present invention.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention is directed to compositions and methods for the treatment of diseases that are mediated by abnormal mitosis and/or angiogenesis. As described below, compounds
25 employed in the present invention exhibit anti-mitotic, anti-

WO 02/064083

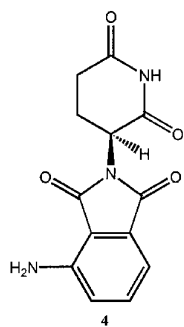
PCT/US01/45229

angiogenic, and/or anti-tumor properties. Further, in accordance with the present invention, a method is provided to synthesize substantially enantiomerically pure S(-)-3-amino-thalidomide and R(+)-3-amino-thalidomide. In accordance with the present invention, S(-) and R(+)

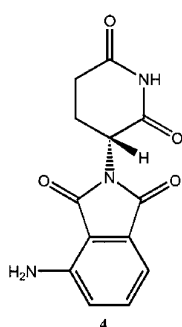
5 enantiomers of 3-amino-thalidomide have anti-mitotic and angiogenesis inhibitory activities and are useful for the treatment of a number of diseases, including various cancers and macular degeneration. S(-)-3-amino-thalidomide showed potent anti-angiogenic and anti-tumor activity in various *in-vitro* and *in-vivo*

10 tumor models.

The enantiomers of the present invention have the following structures:



15 S(-)-3-amino-thalidomide



R(+)-3-amino-thalidomide

WO 02/064083

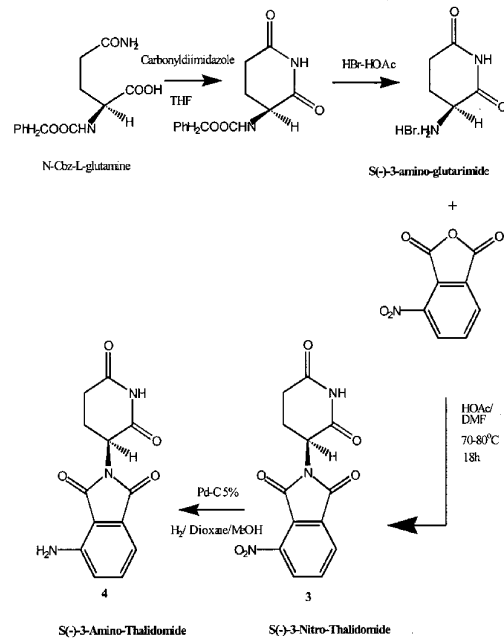
PCT/US01/45229

In one aspect of the present invention, S(-)-3-amino-thalidomide and R(+)-3-amino-thalidomide may be synthesized from S(-) and R(+) enantiomers of 3-nitro-thalidomide, respectively. For example, S(-)-3-amino-thalidomide may be produce in accordance
5 with the following reaction scheme:

WO 02/064083

PCT/US01/45229

Synthesis of S(-)-3-amino-thalidomide



The S(-)- and R(+) enantiomers of 3-amino-thalidomide
 can be provided as pharmaceutically and physiologically acceptable
 formulations using methods and techniques known to those of
 ordinary skill in the art. These formulations can be administered by

standard routes. In general, the combinations may be administered by the topical, transdermal, oral, rectal or parenteral (e.g., intravenous, subcutaneous, or intramuscular) route. In addition, the combinations may be incorporated into biodegradable polymers allowing for sustained release of the compound, the polymers being implanted in the vicinity of where drug delivery is desired, for example, at the site of a tumor. The biodegradable polymers and their use are described, for example, in detail in Brem et al., *J. Neurosurg.* 74:441-446 (1991).

The dosage of the compound will depend on the condition being treated, the particular compound, and other clinical factors such as weight and condition of the human or animal and the route of administration of the compound. It is to be understood that the present invention has application for both human and veterinary use. For oral administration to humans, a dosage of between approximately 0.1 to 300 mg/kg/day, preferably between approximately 0.5 and 50 mg/kg/day, and most preferably between approximately 0.1 to 2 mg/kg/day, is generally sufficient.

The formulations include those suitable for oral, rectal, nasal, ophthalmic (including intravitreal or intracameral), topical (including buccal and sublingual), vaginal or parenteral (including subcutaneous, intramuscular, intravenous, intradermal, intraocular, intratracheal, and epidural) administration. The formulations may conveniently be presented in unit dosage form and may be prepared by conventional pharmaceutical techniques. Such techniques include the step of bringing into association the active ingredient and the

pharmaceutical carrier(s) or excipient(s). In general, the formulations are prepared by uniformly and intimately bringing into associate the active ingredient with liquid carriers or finely divided solid carriers or both, and then, if necessary, shaping the product.

5 Formulations of the present invention suitable for oral administration may be presented as discrete units such as capsules, cachets, or tablets each containing a predetermined amount of the active ingredient; as a powder or granules; as a solution or a suspension in an aqueous liquid or a non-aqueous liquid; or as an oil-
10 in-water liquid emulsion or a water-in-oil emulsion and as a bolus, etc.

A tablet may be made by compression or molding, optionally with one or more accessory ingredients. Compressed tablets may be prepared by compressing, in a suitable machine, the
15 active ingredient in a free-flowing form such as a powder or granules, optionally mixed with a binder, lubricant, inert diluent, preservative, surface-active or dispersing agent. Molded tablets may be made by molding, in a suitable machine, a mixture of the powdered compound moistened with an inert liquid diluent. The tablets may be optionally
20 coated or scored and may be formulated so as to provide a slow or controlled release of the active ingredient therein.

Formulations suitable for topical administration in the mouth include lozenges comprising the ingredients in a flavored basis, usually sucrose and acacia or tragacanth; pastilles comprising
25 the active ingredient in an inert basis such as gelatin and glycerin, or

WO 02/064083

PCT/US01/45229

sucrose and acacia; and mouthwashes comprising the ingredient to be administered in a suitable liquid carrier.

Formulations suitable for topical administration to the skin may be presented as ointments, creams, gels and pastes comprising the ingredient to be administered in a pharmaceutical acceptable carrier. A preferred topical delivery system is a transdermal patch containing the ingredient to be administered.

Formulations for rectal administration may be presented as a suppository with a suitable base comprising, for example, cocoa butter or a salicylate.

Formulations suitable for nasal administration, wherein the carrier is a solid, include a coarse powder having a particle size, for example, in the range of 20 to 500 microns which is administered in the manner in which snuff is administered, i.e., by rapid inhalation through the nasal passage from a container of the powder held close up to the nose. Suitable formulations, wherein the carrier is a liquid, for administration, as for example, a nasal spray or as nasal drops, include aqueous or oily solutions of the active ingredient.

Formulations suitable for vaginal administration may be presented as pessaries, tampons, creams, gels, pastes, foams, or spray formulations containing in addition to the active ingredient such carriers as are known in the art to be appropriate.

Formulations suitable for parenteral administration include aqueous and non-aqueous sterile injection solutions which may contain anti-oxidants, buffers, bacteriostats, and solutes which render the formulation isotonic with the blood of the intended

recipient; and aqueous and non-aqueous sterile suspensions which may include suspending agents and thickening agents. The formulations may be presented in unit-dose or multi-dose containers, for example, sealed ampules and vials, and may be stored in a freeze-dried (lyophilized) conditions requiring only the addition of the sterile liquid carrier, for example, water for injections, immediately prior to use. Extemporaneous injection solutions and suspensions may be prepared from sterile powders, granules and tablets of the kind previously described.

10 Preferred unit dosage formulations are those containing a daily dose or unit, daily sub-dose, as herein above recited, or an appropriate fraction thereof, of the administered ingredient.

It should be understood that in addition to the ingredients, particularly mentioned above, the formulations of the present invention may include other agents conventional in the art having regard to the type of formulation in question, for example, those suitable for oral administration may include flavoring agents.

The present invention can be used to treat diseases characterized by abnormal cell mitosis. Further, the present invention may be employed to treat any disease characterized by angiogenesis. Such diseases include, but are not limited to: abnormal stimulation of endothelial cells (e.g., atherosclerosis), solid tumors and tumor metastasis, benign tumors, for example, hemangiomas, acoustic neuromas, neurofibromas, trachomas, and pyrogenic granulomas, vascular malfunctions, abnormal wound healing, inflammatory and immune disorders, Bechet's disease, gout or gouty arthritis, abnormal

angiogenesis accompanying: rheumatoid arthritis, skin diseases, such as psoriasis, diabetic retinopathy, and other ocular angiogenic diseases such as retinopathy of prematurity (retrolental fibroplastic), macular degeneration, corneal graft rejection, neurovascular glaucoma, 5 liver diseases and Oster Webber syndrome (Osler-Weber Rendu disease).

Diseases associated with corneal neovascularization that can be treated according to the present invention include but are not limited to, diabetic retinopathy, retinopathy of prematurity, corneal 10 graft rejection, neovascular glaucoma and retrolental fibroplasias, epidemic keratoconjunctivitis, Vitamin A deficiency, contact lens overwear, atopic keratitis, superior limbic keratitis, pterygium keratitis sicca, sjogrens, acne rosacea, phlyctenulosis, syphilis, *Mycobacteria* infections, lipid degeneration, chemical burns, bacterial 15 ulcers, fungal ulcers, *Herpes simplex* infections, *Herpes zoster* infections, protozoan infections, Kaposi's sarcoma, Mooren's ulcer, Terrien's marginal degeneration, marginal keratolysis, trauma, rheumatoid arthritis, systemic lupus, polyarteritis, Wegener's sarcoidosis, scleritis, Steven-Johnson disease, pemphigoid radial 20 keratotomy, and corneal graft rejection.

Diseases associated with retinal/choroidal neovascularization that can be treated according to the present invention include, but are not limited to, diabetic retinopathy, macular 25 degeneration, sickle cell anemia, sarcoid, syphilis, pseudoxanthoma elasticum, Paget's disease, vein occlusion, artery occlusion, carotid obstructive disease, chronic uveitis/vitritis, mycobacterial infections,

Lyme's disease, systemic lupus erythematosus, retinopathy of prematurity, Eales' disease, Behcet's disease, infections causing a retinitis or choroiditis, presumed ocular histoplasmosis, Best's disease, myopia, optic pits, Stargart's disease, pars planitis, chronic
5 retinal detachment, hyperviscosity syndromes, toxoplasmosis, trauma and post-laser complications. Other diseases include, but are not limited to, diseases associated with rubeosis (neovasculariation of the angle) and diseases caused by the abnormal proliferation of fibrovascular or fibrous tissue including all forms of proliferative
10 vitreoretinopathy, whether or not associated with diabetes.

Another disease which can be treated according to the present invention is rheumatoid arthritis. It is believed that the blood vessels in the synovial lining of the joints undergo angiogenesis. In addition to forming new vascular networks, the endothelial cells
15 release factors and reactive oxygen species that lead to pannus growth and cartilage destruction. The factors involved in angiogenesis may actively contribute to, and help maintain, the chronically inflamed state of rheumatoid arthritis.

Another disease that can be treated according to the present invention are hemangiomas, Osler-Weber-Rendu disease, or hereditary hemorrhagic telangiectasia, solid or blood borne tumors and acquired immune deficiency syndrome.
20

Studies of the S(-)- and R(+) enantiomers of 3-amino-thalidomide, particularly S(-)-3-amino-thalidomide, show that these
25 compounds are as potent as inhibitors of angiogenesis. These studies indicate that these compounds are useful for the treatment of

WO 02/064083

PCT/US01/45229

angiogenesis-associated diseases. As indicated above, one angiogenesis-associated group of diseases is cancer. Numerous tumors, including solid tumors and blood-borne tumors, require angiogenesis to grow beyond a very small size. Inhibition of angiogenesis will result in inhibition of growth of the tumor. Examples of specific types of cancer which can be treated with the S(-) and R(+) enantiomers of 3-amino-thalidomide include, but are not limited to, prostate cancer, breast cancer, cervical cancer, uterine cancer, ovarian cancer, gliomas, hemangiomas, Kaposi's sarcoma, pancreatic cancer, retinoblastomas, melanomas, bladder cancer, rhabdomyosarcomas, retinoblastomas, Ewing's sarcoma, neuroblastomas, osteosarcoma, leukemias, lymphomas, multiple myeloma, and various acute and chronic neoplastic diseases of the bone marrow. The S(-) and R(+) enantiomers of 3-amino-thalidomide also inhibit metastases of existing tumors. Examples of metastases which can be inhibited include, but are not limited to, bone metastases, lung metastases, liver metastases, and peritoneal metastases.

This invention is further illustrated by the following examples, which are not to be construed in any way as imposing limitations upon the scope thereof. On the contrary, it is to be clearly understood that resort may be had to various other embodiments, modifications, and equivalents thereof which, after reading the description herein, may suggest themselves to those skilled in the art without departing from the spirit of the present invention and/or the scope of the appended claims. The table below provides desired

embodiments, while the Examples provide the synthesis of representative compounds.

EXAMPLES

5 The following compounds were synthesized by modification in methods described in Shealy, et al. *J. Pharm. Sci.*, **1968**, *57*, 757-764; Polonski, et al. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1988**, 639-648; Muller, et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1999**, *9*, 1625-1630; Helm, et al. *Arzneim-Forsch./ Drug Res.*, **1981**, *31*, 941-
10 949; Shah, et al., *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 3014-3017; and Menard, et al., *Can. J. Che.*, **1963**, *41*, 1722-1725.

Example 1

Synthesis of S(-)-(3-benzyloxycarbonylamino)-glutarimide:

15 Into a stirring solution of carboxybenzyloxy-L-glutamine (2.8 g, 10 mmols) in 40mL anhydrous THF (tetrahydrofuran), 1,1-carbonyldiimidazole (1.92 g, 12 mmols) were added. The reaction mixture was heated under reflux for 18 hours. The THF was evaporated and the product was dissolved in chloroform. The chloroform layer was washed with water and brine and dried over
20 anhydrous CaSO₄, filtered and evaporated to give white solid. The solid product was crystallized from ethyl ether to give 2.4 grams crystalline powder (90%). (Alternatively, carboxybenzyloxy-L-glutamine can be cyclized by treating with SOCl₂ in DMF (*N,N*-dimethylformamide) at -70 °C to 0 °C for 1 hour to form S(-)-(3-
25 benzyloxycarbonylamino)-glutarimide. The reaction mixture was diluted with CHCl₃ and washed with 5 % Na₂CO₃, dried over

anhydrous Na_2SO_4 , filtered, and evaporated to give 2.5 g (90 % yield) S(-)-(3-benzyloxycarbonylamino)-glutarimide).

1H NMR in CDCl_3 confirmed the product as S(-)-(3-benzyloxycarbonylamino)-glutarimide). 1H NMR (CDCl_3 , PPM),
5 8.2 (1H, s broad), 7.4 (5H, s, aromatic), 5.8 (1H, d), 5.15 (2H, s), 4.4 (1H, dd, J= 4.5, 3), 2.95-2.4 (3H, m), 1.86 (1H, d, t, J= 11.5, 6.5). m. p. 122-124 °C (lit = 122-124 °C).

Example 2

Synthesis of S(-)-3-Amino-glutarimide.HBr:

10 Into a solution of S(-)-(3-benzyloxycarbonylamino)-glutarimide (1.2 g, 4.6 mmols) in 15 mL acetic acid glacial, 8 mL of 30% HBr/ acetic acid solution was added at 20 °C. The temperature of reaction mixture was raised to RT and stirred for 1 hour. White solid powder of S(-)-2-Amino-gluteramide.HBr started appearing in
15 reaction mixture. The solid was filtered and washed with 5 mL acetic acid glacial and then with ether to give 1.8 g (80%) product. Analysis on polarimeter of product showed (-) rotation, $[\alpha]_{25D}$ (c= 1, water) = -37.5 ° and confirmed the product as S(-)-2-amino-gluteramide. 1H NMR in DMSO-D_6 confirmed the product as 2-amino-L-
20 glutaramide.HBr. 1H NMR (DMSO-D_6 , PPM).

Example 3

Synthesis of S(-)-3-Nitro-thalidomide:

Into a solution of (4.18 g, 20 mmols) 3-amino-gluteramide-HBr in 50 mL of anhydrous DMF, 3.8g (20 mmols) of
25 3-nitrophthalic anhydride was added. After adding 100 mL acetic acid (glacial), the reaction mixture was heated at about 70 °C to about

WO 02/064083

PCT/US01/45229

80 °C for about 24 hours. Thereafter, the solvents were evaporated under vacuum to yield an off-white solid. On adding 10 mL ethyl alcohol to the solid, an off-white powder product was formed. The product was separated and washed with 20mL ethyl alcohol.

5 1H NMR in DMSO-D₆ confirmed the product as S(-)-3-nitro-thalidomide. m. p. 228-229 °C (lit = 228.5-229.5 °C). 1H NMR (DMSO-D₆, PPM), 11.25 (1H, s broad), 8.35 (1H, d, J= 7.2), 8.25 (1H, d, J= 7.0), 8.15 (1H, t, J= 8.0), 5.2 (1H, dd, J= 5.5, 7.2), 3.00-2.85 (1H, m), 2.65-2.4 (2H, m), 2.15-2.05 (1H, m).

10 **Example 4**

Synthesis of S(-)- 3-Amino-thalidomide:

3-nitro-thalidomide (1g, 3.3 mmols) was dissolved in 50 mL dioxane/methanol 4:1 mixture and hydrogenated in a Parr hydrogenator at 40 psi of hydrogen in the presence of a Pd/C 5% catalyst for about 4 hours. After filtering the reaction mixture through a Celite filtering agent, the solvents were evaporated under vacuum to yield a yellow powder. The product was recrystallized from ethyl acetate/dioxane to yield 800 mg (85% purity) of S(-)-3-amino-thalidomide.

20 1H NMR in DMSO-D₆ confirmed the product as S(-)-3-amino-thalidomide. m. p. 318.2-319.5 °C. 1H NMR (DMSO-D₆, PPM), 11.10 (1H, s broad), 7.45 (1H, t, J= 7.5), 7.05 (1H, d, J= 5.2), 6.95 (1H, d, J= 5.2), 6.5 (2H, s broad), 5.05 (1H, dd, J= 5.0, 13.42), 2.95-2.80 (1H, m), 2.65-2.5 (2H, m), 2.05-1.95 (1H, m). Absolute configuration was determined by comparison of specific rotation [α]_D²⁵ of R- and S-3-amino-thalidomide to the analogous compounds

R(+)- and S(-)-thalidomide. Analysis on polarimeter of product showed (-) rotation, $[\alpha]_D^{25}$ (C=0.5, dioxane) = -27.7.0° and confirmed the product as S(-)-3-amino-thalidomide.

The two enantiomers of 3-amino-thalidomide were resolved by chiral HPLC column Welk-01 (10 mm x 750 mm) and eluted with CH₃CN/ MeOH/ H₂O 1:1:5 mixture. The retention time for the S(-) enantiomer was 33.74 minutes and for the R (+) enantiomer 35.62 minutes at a flow rate of 2mL/min at 240 nm, respectively.

Example 5

Synthesis of R(+)- 3-amino-thalidomide:

Compound R(+)-3-amino-thalidomide was synthesized by the same procedure as for S(-)-3-amino-thalidomide above, except the synthesis was started with commercially available carboxybenzyloxy-D-glutamine, which formed R(+)-3-nitro-thalidomide (See Example 1). Analysis on polarimeter of product showed (+) rotation $[\alpha]_D^{25}$ (c= 1, dioxanes) = +37.0° and confirmed the product as R(+)-3-amino-thalidomide. ¹H NMR in DMSO-D₆ confirmed the product as 3-amino-thalidomide.

Example 6

Synthesis of S(-)- 3-Amino-thalidomide (constructive example):

S(-)-3-amino-thalidomide may be synthesized by dissolving S(-)-3-nitro-thalidomide in concentrated HCl and then treating the reaction mixture with granulatead tin. After heating the reaction mixture at about 70 °C to about 80 °C for about 2 hours, the reaction mixture should be filtered and the acid evaporated under

WO 02/064083

PCT/US01/45229

vacuum to yield a yellow powder. The product should be recrystallized from water and then ethyl acetate/dioxane to yield S(-)-3-amino-thalidomide.

Example 7

5 The Roche Cell Proliferation Kit II (XTT) is an useful assay for screening the relative efficacy of small molecules. The assay quantitatively determines cellular proliferation in response to agonists and/or antagonists of proliferation. It is based on the cleavage of the yellow tetrazolium salt (XTT) by metabolically
10 active/viable cells to form an orange formazan dye. The formation of the soluble dye allows direct quantification using a scanning multwell spectrophotometer. An increase in the number of living cells (resulting from proliferation) results in a greater production of formazan dye which corresponds to an increase in the absorbance
15 value.

When evaluating analogs of thalidomide, or the like, we have employed HS-Sultan cells in an *in vitro* XTT assay. In each well of a 96-well microtiter plate, cells are seeded at a density of 15,000 cells per 90 μ L of normal growth media approximately 16
20 hours prior to treatments. During culture and treatments, cells are maintained at 37°C with 5% CO₂ in a high humidity incubator. Treatments (10X) are added in 10 μ L aliquots to achieve a 1X final treatment concentration in each well. Each concentration is done in triplicate. The XTT labeling mixture is added in 50 μ L aliquots to
25 each well during the final four hours of the 72 hour treatment period. When the treatment/labeling period is complete, the plate is read on a

WO 02/064083

PCT/US01/45229

spectrophotometric plate reader at a wavelength of 470 nm and a 650 nm reference wavelength. For individual experiments, the average absorbance values (with background subtracted) for each treatment are plotted against the concentration. A larger absorbance value corresponds to a greater amount of proliferation. A negative control (untreated cells) is used as a point of reference; an absorbance value less than the control reflects inhibition of proliferation.

When comparing experiments conducted over a period of time, absorbance values from each experiment may vary due to a number of factors (degradation of the XTT reagents over time is the most common factor). When using reagents from an older XTT kit or switching to a new kit, the **overall** absorbance values for that individual experiment may be higher or lower, making a direct comparison to another experiment difficult. Therefore, it is common practice to convert the absorbance values to a ratio of the treated values divided by the negative control value (treatment over control) when comparing the results from multiple experiments; the "treatment over control" values for each treatment are then plotted against the μM concentration. Figure 1 compares the 3-amino-thalidomide enantiomers. The R and the R,S plots represent data pooled from 3 experiments. The S and thalidomide plots represent data pooled from about 12 experiments. As illustrated in Figure 1, both the S(-) and the R(+)-3-amino-thalidomide enantiomers show anti-cellular proliferation activity.

25

Example 8

Antitumor activity has been evaluated for the S(-) and the R(+) 3-amino-thalidomide enantiomers as follows. For the HsS cell line, 2 million cells are injected into the tail vein of 8 week old, female, SCID mice. Treatment is initiated after two weeks and continued daily until the mice die or show hind limb paralysis. Results are expressed as mean time to death in treated versus control animals. For the Lewis lung model, 2.5×10^5 cells are injected intravenously into the tail vein of 6-8 week old, male, C57BL/6 mice and treatment is initiated on day three. The time period of treatment is usually 11-15 days in duration. After sacrifice by CO₂ asphyxiation, lungs (where tumors seed and grow) are removed, rinsed in water, patted dry, and weighed. Mean lung weights of age-matched, non-tumor bearing mice are subtracted from the weight of treated, tumor-bearing mice with results expressed as lung weight gain in treated versus control animals. Table I summarizes data from *in vivo* experiments in lung and plasma cell tumor metastatic tumor systems, comparing the antitumor activity of the three enantiomeric preparations of 3-amino thalidomide. These data demonstrate that the S(-) enantiomer was the most active enantiomer of 3-amino thalidomide in each tumor model.

Table 1

Tumor Model	Test Agent	Dose mg/kg/day	Activity
HsSultan B-cell lymphoma metastatic in SCID mice	Vehicle (0.5% methyl cellulose)	-	26 days*
	R,S	50	41 days*
	R(+)	50	37 days*
	S(-)	50	47 days*
HsSultan B-cell lymphoma metastatic in SCID mice	Vehicle (0.5% methyl cellulose)	-	26 days*
	R,S	200	28 days*
	R(+)	200	31 days*
	S(-)	200	47 days*
Lewis lung carcinoma metastatic in C57BL/6 mice	Vehicle (0.5% methyl cellulose)	-	0.40 g #
	R,S	100	0.27 g #
	R(+)	100	0.42 g #
	S(-)	100	0.17 g #

* mean time to death
weight gain of lung

5

Example 9

A corneal micropocket assay was performed as described in Kenyon, et al., A Model of Angiogenesis in the Mouse Cornea, *Invest. Ophthalmol. & Vis. Sci.*, 37, 1625-1632 (1996), which is incorporated herein in its entirety. Pellets were used containing 80 ng of bFGF or human recombinant VEGF (R&D Systems, Minneapolis, Minn) in C57BL/6J mice. The treated groups received daily administration for five (bFGF) or six (VEGF consecutive days of thalidomide, S(-)- and R(+)-3-amino-thalidomide (3APG), S(-)-3APG, and R(+)-3APG (50 mg/kg) suspended in 0.5% carboxymethylcellulose i.p. Treatment was started on the day of pellet implantation; control mice received only carboxymethylcellulose i.p. The area of vascular response was assessed on the fifth (bFGF) or sixth (VEGF) postoperative day using a slit lamp. The results are reported in Figure 2. As indicated in

10

15

Figure 2, differences in bFGF induced neovascularization between S(-)-3APG and control were significant (n = 9 each, P<0.0001) as were differences between S(-)-3APG and thalidomide (n = 9 each, P<0.01). Differences in VEGF induced neovascularization between S(-)-3APG and control were significant (n = 9 each, P<0.001), as were differences between S(-)-3APG and thalidomide (n = 9 each, P<0.01).

By "an effective amount" is meant a therapeutically or prophylactically effective amount. Such amounts can be readily determined by an appropriately skilled person, taking into account the condition to be treated, the route of administration and other relevant factors. Such a person will readily be able to determine a suitable dose, mode and frequency of administration.

It should be understood, of course, that the foregoing relates only to preferred embodiments of the present invention and that numerous modifications or alterations may be made therein without departing from the spirit and the scope of the invention as set forth in the appended claims.

What is claimed is:

1. A pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and a stereoisomer of 3-amino-thalidomide, wherein the stereoisomer consists essentially of S(-)-3-amino-thalidomide or R(+)-3-amino-thalidomide.
5
2. The composition of Claim 1, wherein the composition is in the form of tablets, pills, capsules, suppositories, sachets, granules, powders, creams, lotions, ointments, patches, liquid solutions, suspensions, dispersions, emulsions, syrups, liposomes, microparticles, and microcapsules.
10
3. A method of inhibiting undesired angiogenesis in a human or animal comprising administering to the human or animal with undesired angiogenesis an angiogenesis inhibiting amount of 3-amino-thalidomide, wherein the stereoisomer consists essentially of S(-)-3-amino-thalidomide or R(+)-3-amino-thalidomide.
15
20
4. The method of Claim 3, wherein the administration is oral, parenteral, rectal, vaginal, topical, transdermal, intravenous, intramuscular, intraperitoneal, or subcutaneous.
25
5. The method of Claim 3, wherein the effective amount is from about 0.1 to about 300 mg/kg/day.

6. The method of Claim 3, wherein the effective amount is from about 0.5 and about 50 mg/kg/day.

5 7. The method of Claim 3, wherein the effective amount is from about 0.1 and about 2 mg/kg/day.

8. The method of Claim 3, wherein the undesired angiogenesis occurs in a disease selected from diabetic retinopathy, retinopathy of prematurity, corneal graft rejection, neovascular glaucoma, retrolental fibroplasia, epidemic keratoconjunctivitis, Vitamin A deficiency, contact lens overwear, atopic keratitis, superior limbic keratitis, pterygium keratitis sicca, Sjorgren's syndrom, acne rosacea, phlyctenulosis, syphilis, *Mycobacteria* infections, lipid degeneration, chemical burns, bacterial ulcers, fungal ulcers, *Herpes simplex* infections, *Herpes zoster* infections, protozoan infections, Kaposi's sarcoma, Mooren's ulcer, Terrien's marginal degeneration, marginal keratolysis, trauma, 10 rheumatoid arthritis, systemic lupus, polyarteritis, Wegener's sarcoidosis, scleritis, Steven-Johnson disease, radial keratotomy, corneal graft rejection, diabetic retinopathy, macular degeneration, sickle cell anemia, sarcoid, syphilis, pseudoxanthoma elasticum, Paget's disease, vein occlusion, 15 artery occlusion, carotid obstructive disease, chronic uveitis/vitritis, Lyme disease, systemic lupus erythematosus, 20 25

retinopathy of prematurity, Eales' disease, Behcet's disease, infections causing a retinitis or choroiditis, presumed ocular histoplasmosis, Best's disease, myopia, optic pits, Stargart's disease, pars planitis, chronic retinal detachment, 5 hyperviscosity syndromes, toxoplasmosis, trauma, post-laser complications, rubeosis, abnormal proliferation of fibrovascular or fibrous tissue, proliferative vitreoretinopathy, atherosclerosis, solid tumors, blood borne tumors, tumor metastasis, Bartonellosis, hemangiomas, acoustic neuromas, 10 neurofibromas, trachomas, pyrogenic granulomas, vascular malfunctions, abnormal wound healing, inflammatory and immune disorders, Bechet's disease, gout, gouty arthritis, rheumatoid arthritis, psoriasis, diabetic retinopathy, retinopathy of prematurity, macular degeneration, neuroscular glaucoma, 15 liver diseases, Osler-Weber Rendu disease, hereditary hemorrhagic telangiectasia, acquired immune deficiency syndrome, rheumatoid arthritis, prostate cancer, breast cancer, cervical cancer, uterine cancer, ovarian cancer, gliomas, hemangiomas, pancreatic cancer, retinoblastomas, melanomas, 20 bladder cancer, rhabdomyosarcomas, retinoblastomas, Ewing's sarcoma, neuroblastomas, osteosarcoma, leukemia, lymphoma, multiple myeloma, or various acute and chronic neoplastic diseases of the bone marrow.

WO 02/064083

PCT/US01/45229

9. The method of Claim 8, wherein the administration is oral, parenteral, rectal, vaginal, topical, transdermal, intravenous, intramuscular, intraperitoneal, or subcutaneous.
- 5 10. The method of Claim 8, wherein the effective amount is from about 0.1 to about 300 mg/kg/day.
11. A method of treating cancer in a human or animal comprising administering to the human or animal having cancer a cancer treatment effective amount of a stereoisomer of 3-amino-thalidomide, wherein the stereoisomer consists essentially of S(-)-3-amino-thalidomide or R(+)-3-amino-thalidomide.
- 10
12. The method of Claim 11, wherein the administration is oral, parenteral, rectal, vaginal, topical, transdermal, intravenous, intramuscular, intraperitoneal, or subcutaneous.
- 15
13. The method of Claim 11, wherein the effective amount is from about 0.1 to about 300 mg/kg/day.
- 20
14. A pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and a stereoisomer of 3-amino-thalidomide, wherein the stereoisomer consists essentially of S(-)-3-amino-thalidomide.
- 25

WO 02/064083

PCT/US01/45229

15. The method of Claim 14, wherein the administration is oral, parenteral, rectal, vaginal, topical, transdermal, intravenous, intramuscular, intraperitoneal, or subcutaneous.

5 16. The method of Claim 14, wherein the effective amount is from about 0.1 to about 300 mg/kg/day.

10

1/2

XTT Proliferation Assay: HS-Sultan cells
15,000 cells/well for 72 hours
3APG enantiomers

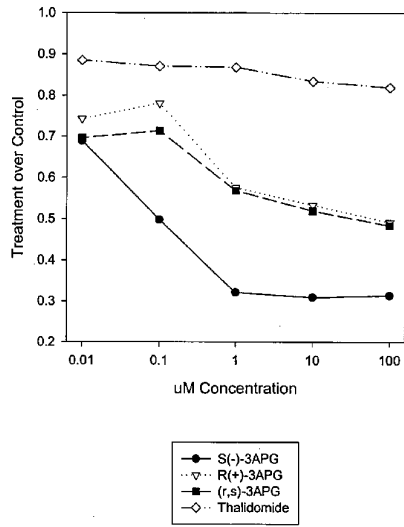


FIGURE 1

WO 02/064083

PCT/US01/45229

2/2

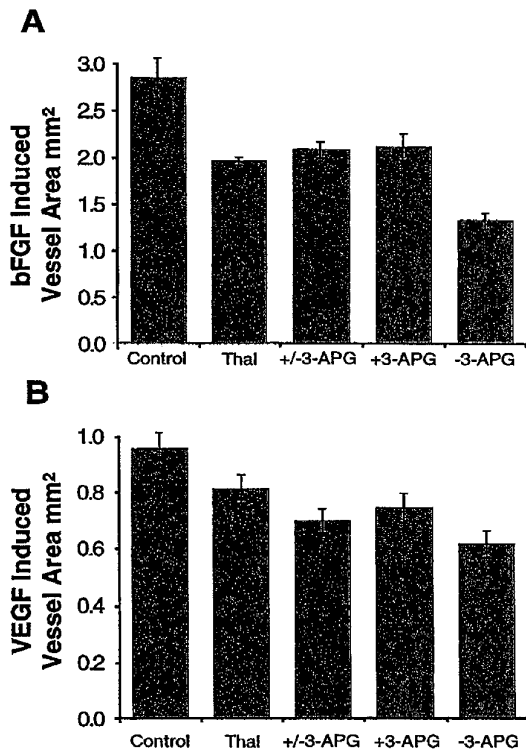


FIGURE 2

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
22 August 2002 (22.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/064083 A3

- (51) International Patent Classification: A61K 31/445 SWARTZ, Glenn, M. [US/US]; 6190 Chilledon Circle, Mt. Airy, MD 21771 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/45229
- (22) International Filing Date: 30 November 2001 (30.11.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/250,219 30 November 2000 (30.11.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): THE CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION [US/US]; 300 Longwood Avenue, Boston, MA 02115 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): TRESTON, Anthony [AU/US]; 408 Denham Road, Rockville, MD 20851 (US). SHAH, Jamsheed, H. [US/US]; 6443 Pound Apple Court, Columbia, MD 21045 (US). D'AMATO, Robert, J. [US/US]; 4 Patriot's Drive, Lexington, MA 02420 (US). HUNSUCKER, Kimberly, A. [US/US]; 18034 Cottage Garden, Apartment 203, Germantown, MD 20874 (US). ROUGAS, John [US/US]; 12420 Great Park Circle, Apartment 204, Germantown, MD 20876 (US). CONNER, Barry, P. [US/US]; 3526 Laurel View Court, Laurel, MD 20724 (US). PRIBLUDA, Victor [AR/US]; 12608 Arbor View Drive, Silver Spring, MD 20902 (US).
- (74) Agents: PRATT, John, S. et al.; Kilpatrick Stockton LLP, Suite 2800, 1100 Peachtree Street, Atlanta, GA 30309 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GR, HU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PI, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 14 August 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/064083 A3

(54) Title: SYNTHESIS OF 3-AMINO-THALIDOMIDE AND ITS ENANTIOMERS

(57) Abstract: The invention provides new and useful analogs of 3-amino-thalidomide. These analogs include S(-)-3-amino-thalidomide and R(+)-3-amino-thalidomide. The invention also provides processes for making these analogs. Further, the invention provides methods for inhibiting angiogenesis and treating angiogenesis-associated diseases, including cancer and macular degeneration, by administering these compounds.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/45229		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
IPC(7) : A61K 31/445 US CL : 514/323 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/323				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched none				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
Y, P	US 6,316,471 B1 (MULLER et al.) 13 November 2001 (13.11.01), see entire document, especially column 7, line 56 to column 8, line 5.	1-16		
Y	US 5,955,476 A (MULLER et al.) 21 September 1999 (21.09.99), see entire document, especially column 4, line 13-30; column 8, lines 45-60.	1-16		
Y	US 5,798,368 A (MULLER et al.) 25 August 1998 (25.08.98), see entire document, especially column 5, line 63 to column 6, line 12.	1-16		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
* Special categories of cited documents: <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%;"> *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 50%;"> *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention. *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone. *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family </td> </tr> </table>			*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention. *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone. *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention. *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone. *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 19 September 2002 (19.09.2002)		Date of publishing of the international search report 03 DEC 2002		
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Cybille Delacroix-Muirheid Telephone No. 703-308-1235		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US01/45229

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
STN: reg uspatfull
structure search, angiogenesis, cancer, tumor, arthritis, neoplasms, retinopathy, neoplasia

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 5/00	A 6 1 P 5/00	
A 6 1 P 7/00	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 7/06	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 13/08	A 6 1 P 13/08	
A 6 1 P 15/00	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 17/02	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 17/06	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 19/04	A 6 1 P 19/04	
A 6 1 P 19/06	A 6 1 P 19/06	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 27/02	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 27/06	A 6 1 P 27/06	
A 6 1 P 27/10	A 6 1 P 27/10	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 31/10	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/10	
A 6 1 P 31/22	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 33/00	A 6 1 P 31/22	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 33/00	
A 6 1 P 35/02	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/04	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 35/04	
C 0 7 D 401/04	A 6 1 P 37/02	
// C 0 7 M 7:00	C 0 7 D 401/04	
	C 0 7 M 7:00	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, P T, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 トレストン, アンソニー

アメリカ合衆国 2 0 8 5 1 メリーランド州, ロックヴィル, デナム ロード 4 0 8

(72) 発明者 シャー, ジャムシエド, エイチ.

アメリカ合衆国 2 1 0 4 5 メリーランド州, コロンビア, パウンド アップル コート 6 4 4 3

(72) 発明者 ドゥアメート, ロバート, ジェー.

アメリカ合衆国 0 2 4 2 0 マサチューセッツ州, レキシントン, パトリオッツ ドライブ 4

(72) 発明者 ハンサッカー, キムバーリー, エー.

アメリカ合衆国 2 0 8 7 4 メリーランド州, ジャーマンタウン, コテージ ガーデン 1 8 0 3 4, アpartment 2 0 3

- (72)発明者 ロウガス, ジョン
 アメリカ合衆国 20876 メリーランド州, ジャーマンタウン, グレート パーク サークル
 12420, アpartment 204
- (72)発明者 コンナー, バリー, ピー.
 アメリカ合衆国 20724 メリーランド州, ローレル, ローレル ヴュー コート 3526
- (72)発明者 プライブルーダ, ヴィクター
 アメリカ合衆国 20902 メリーランド州, シルバー スプリング, アーバー ヴュー ドラ
 イブ 12608
- (72)発明者 スワーツ, グレン, エム.
 アメリカ合衆国 21771 メリーランド州, マウント エアリー, チャレドン サークル 6
 190

F ターム(参考) 4C063 AA01 BB02 CC10 DD06 EE01
 4C086 AA01 AA02 GA07 GA16 MA01 MA04 MA16 MA21 MA22 MA23
 MA24 MA28 MA31 MA32 MA34 MA35 MA37 MA38 MA41 MA43
 MA52 MA55 MA56 MA60 MA63 MA66 NA14 ZA02 ZA33 ZA36
 ZA45 ZA55 ZA66 ZA75 ZA81 ZA89 ZA94 ZA96 ZB07 ZB15
 ZB26 ZB27 ZB33 ZB35 ZB38 ZC02 ZC22 ZC31 ZC35 ZC55