

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>6</sup>

A61K 31/195

## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 97192238.1

[43]公开日 1999年3月17日

[11]公开号 CN 1211182A

[22]申请日 97.2.12 [21]申请号 97192238.1

[30]优先权

[32]96.2.15 [33]JP [31]65094/96

[86]国际申请 PCT/JP97/00354 97.2.12

[87]国际公布 WO97/29744 日 97.8.21

[85]进入国家阶段日期 98.8.13

[71]申请人 橘生药品工业株式会社

地址 日本长野县

[72]发明人 伊佐治正幸 宫田广志

味泽幸义

[74]专利代理机构 柳沈知识产权律师事务所

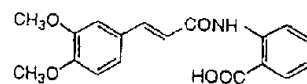
代理人 黄益芬

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图页数 2 页

[54]发明名称 新血管形成抑制剂

[57]摘要

本发明涉及含有化学式(I)所代表的N-(3,4-二甲氧基肉桂酰基)邻氨基苯甲酸或其药学可接受盐作为活性成分的新血管形成抑制剂,其对入微血管内皮细胞增殖和趋化性以及入微血管内皮细胞成管有抑制活性,因此用作预防和入治疗由新血管形成所引起的疾病的药物,所述疾病是例如糖尿病性视网膜病、老年性盘状斑变性、新血管青光眼、和风湿性关节炎。

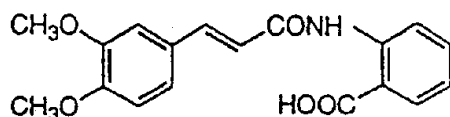


(I)

# 权 利 要 求 书

1. 一种新血管形成抑制剂,其含有作为活性成分的下式所代表的 N-(3,4-二甲氧基肉桂酰基)邻氨基苯甲酸:

5



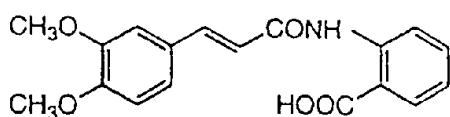
或其药学可接受盐。

2. 权利要求 1 的新血管形成抑制剂,其中要治疗的疾病是糖尿病性视网膜病。

3. 权利要求 1 的新血管形成抑制剂,其中要治疗的疾病是老年性盘状斑变性。

4. 一种预防和治疗与新血管形成相关疾病的方法,包括施用下式所代表的 N-(3,4-二甲氧基肉桂酰基)邻氨基苯甲酸:

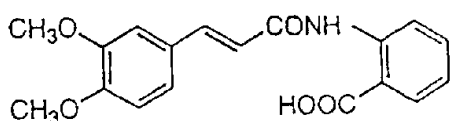
15



或其药学可接受盐。

5. 下式:

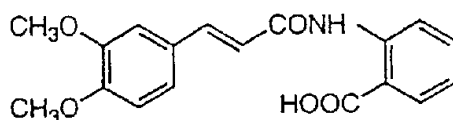
20



所代表的 N-(3,4-二甲氧基肉桂酰基)邻氨基苯甲酸或其药学可接受盐在制备用于预防和治疗新血管形成相关疾病的药物组合物中的用途。

25

6. 下式:



所代表的 N-(3,4-二甲氧基肉桂酰基)邻氨基苯甲酸或其药学可接受盐作为新血管形成抑制剂的用途。

30

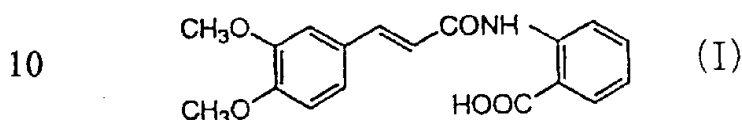
# 说明书

## 新血管形成抑制剂

### 5 技术领域

本发明涉及一种用作新血管形成抑制剂的药物组合物。

更具体地说,本发明涉及预防或治疗与新血管形成相关疾病的药物,其包含化学结构式(I)所代表的 N-(3,4-二甲氧基肉桂酰基)邻氨基苯甲酸:



或其药学可接受盐为活性成分。

在与新血管形成相关的可以列举的各种疾病中,其发病原因之一都是由有新血管形成。这些疾病例如糖尿病性视网膜病、老年性盘状斑变性、早熟性视网膜病、镰状细胞视网膜病、视网膜静脉闭塞、角膜移植或内障摘除后的新血管形成、新血管青光眼、虹膜发红、风湿性关节炎、牛皮癣、硬化症、肿瘤、动脉粥样硬化外膜中毛细血管的异常生长和长期戴接触性眼镜而引起的角膜新血管形成。

15

### 技术背景

20 一般来说,新血管形成的现象是伴随着由蛋白酶降解基膜、内皮细胞趋化性和增殖、血管内皮细胞分化和再生而引起的新生管腔。新血管形成的现象在生理上发生在黄体形成和胎盘形成中,病理上发生在上述疾病中。例如,在视网膜病中,预先存在的基膜周围视网膜血管和玻璃体之间的视网膜组织退化,然后,那些构成先存血管的内皮细胞从退化的视网膜组织的接界处迁移,增殖后的内皮细胞充满了被迁移的内皮细胞之间的空间,迁移至玻璃体视网膜(vitreoretina)的内皮细胞再生新血管,这就导致新血管形成。

25

新血管形成与多种疾病相关,例如在上述疾病的发生和发展中,新血管的形成起着密切相关的作用。因此进一步的研究发现,对新血管形成有抑制活性的化合物能有效促进这些疾病的预防或治疗。新血管形成抑制剂有烟曲霉素类似物(对内皮细胞增殖有抑制作用的微生物代谢产物)、四环抗生素(能抑制胶原酶活性)、和微生物产生的 D-葡萄糖基-半乳聚糖硫酸盐(能干扰结合肝

30

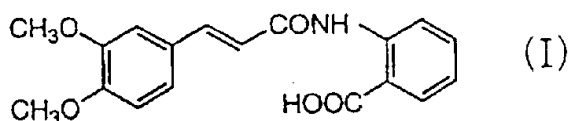
素的血管生成因子与它们的受体的结合), 这些药物虽都是已知的,但临床上都不令人满意。另外,现还没有足以治愈上述疾病的方法。特别是如果糖尿病性视网膜病患者没有进行外科治疗,就不可能发现新产生的血管退化,因而以解决新生血管充血引起的视力衰退问题。因此急切希望开发出对新血管形成的抑制有极好效果的药物。

5 本发明由上式(I)代表的 N-(3,4-二甲氧基肉桂酰基)邻氨基苯甲酸(商品名: 曲尼司特(Tranilast)已经被广泛地用作治疗变应性疾病的药物,所述变应性疾病例如支气管哮喘、变应性鼻炎、变应性皮炎和变应性结膜炎、和皮肤病例如癩痕瘤和疤痕肥大。 Tranilast 对于由变应性反应引起的化学介质释放、在皮肤组织中成纤维细胞引起的过量胶原的积累、和冠状动脉平滑肌的过度增殖都具有抑制活性, 这些都是已知的。

但是没有发现 Tranilast 抑制微血管内皮细胞的增殖和趋化性以及微血管内皮细胞的管腔形成,而且根本不知道 Tranilast 可用作新血管形成抑制剂。

#### 发明的公开

15 本发明涉及一种新血管形成抑制剂,其包含化学结构式(I)所代表的 N-(3,4-二甲氧基肉桂酰基)邻氨基苯甲酸:



20 或其药学可接受盐为活性成分。

本发明涉及一种预防和治疗与新血管形成相关疾病的方法,包括施用上述式(I)所代表的 N-(3,4-二甲氧基肉桂酰基)邻氨基苯甲酸或其药学可接受盐。

25 本发明涉及上述式(I)所代表的 N-(3,4-二甲氧基肉桂酰基)邻氨基苯甲酸或其药学可接受盐在制备用于预防和治疗新血管形成相关疾病的药物组合物中的用途。

再者,本发明涉及上述式(I)所代表的 N-(3,4-二甲氧基肉桂酰基)邻氨基苯甲酸或其药学可接受盐作为新血管形成抑制剂的用途。

#### 附图的简要说明

30 图 1 是说明 Tranilast 对人微血管内皮细胞增殖的抑制作用的示意图。纵轴表示人微血管内皮细胞数( $\times 10^4$  个细胞),横轴表示 Tranilast 的浓度

( $\mu\text{g/ml}$ )。图中的\*和\*\*分别表示  $p < 0.05$  和  $p < 0.01$  的显著性差异。

图 2 是说明 Tranilast 对人微血管内皮细胞趋化性的抑制作用的示意图。纵轴表示迁移的人微血管内皮细胞数(细胞数/目测范围),横轴表示 Tranilast 的浓度( $\mu\text{g/ml}$ )。图中\*\*表示  $p < 0.01$  的显著性差异。

5 图 3 是说明 Tranilast 对人微血管内皮细胞管腔形成的抑制作用的示意图。纵轴表示形成管腔的网络数目(数),横轴表示 Tranilast 的浓度( $\mu\text{g/ml}$ )。图中的\*\*表示  $p < 0.01$  的显著性差异。

图 4 是说明 Tranilast 对人微血管内皮细胞管腔形成的抑制作用的示意图。纵轴表示管腔结构的平均长度(mm),横轴表示 Tranilast 的浓度( $\mu\text{g/ml}$ )。

10 图中的\*和\*\*分别表示  $p < 0.05$  和  $p < 0.01$  的显著性差异。

### 本发明的最佳实施方式

本发明人进行了深入的研究,发现了对新血管形成有抑制活性的化合物。结果是,发现上式(I)代表的 N-(3,4-二甲氧基肉桂酰基)邻氨基苯甲酸(商品名:Tranilast) 对人微血管内皮细胞增殖、人微血管内皮细胞趋化性和人微血管内皮细胞的管腔形成具有显著的抑制作用。因此作为新血管形成抑制剂非常有用,从而形成本发明的基础。

因此,本发明人证明在使用人微血管内皮细胞的体外细胞增殖抑制活性试验中, Tranilast 能显著抑制人微血管内皮细胞的增殖。

20 本发明人还证明在使用人微血管内皮细胞的体外细胞趋化性抑制活性试验中, Tranilast 能显著抑制人微血管内皮细胞的趋化性。

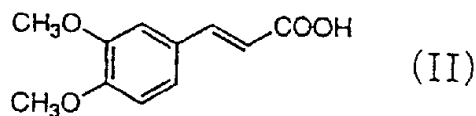
本发明人还进一步证明在使用人微血管内皮细胞的体外细胞管形成抑制活性试验中, Tranilast 能显著抑制人微血管内皮细胞管的形成。

25 结论是 Tranilast 对人微血管内皮细胞的增殖和趋化性具有极好的抑制作用,因此是用作新血管形成抑制剂的化合物。Tranilast 对人微血管内皮细胞的管腔形成具有极好的抑制作用,因此是一种非常有用的用作预防和治疗与新血管形成相关疾病的药物化合物。

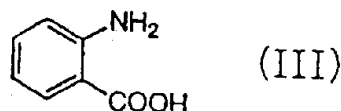
因此,用 Tranilast 或其药学可接受盐作为活性成分可制备用作预防和治疗与新血管形成相关疾病药物的药物组合物。

30 制备 Tranilast 和其药学可接受盐的各种方法是已知的(日本专利申请公开(公开)特公昭 56-40710、57-36905、58-17186、58-48545、58-55138、58-55139、平 01-28013、01-50219、03-37539;等等)。例如 Tranilast 和

其药学可接受盐可以通过使一种反应功能衍生物例如下式代表的 3,4-二甲氧基肉桂酸的酰卤和酸酐



与下式代表的邻氨基苯甲酸



10 以常规方式反应来制备,如果需要,将得到的化合物转化成其盐。

作为 Tranilast 的药学可接受盐可以举出的例子有:与无机碱成的盐,例如钠盐和钾盐;与有机胺类例如吗啉、哌嗪和吡咯烷形成的盐;和与氨基酸成的盐。

15 当在实际治疗中使用本发明药物组合物时,可以根据不同用途使用各种剂型的药物组合物。这样的剂型的例子可以举出的有:粉末剂、颗粒剂、细颗粒剂、干糖浆、片剂、胶囊、软膏剂、注射剂、眼滴液等。

20 这些药物组合物的配制可以是与合适的药物添加剂按常规方法进行混合、稀释或溶解,该添加剂例如赋形剂、崩解剂、粘合剂、润滑剂、稀释剂、缓冲剂、等渗剂、防腐剂、湿润剂、乳化剂、分散剂、稳定剂和增溶剂,并且根据不同剂型所采用的方法来配制。

例如,粉剂的配制往往是通过将式(I)代表的 Tranilast 或其药学可接受盐与合适的赋形剂、润滑剂等充分混合。

片剂往往是通过将 Tranilast 或其药学可接受盐与合适的赋形剂、崩解剂、粘合剂、润滑剂等混合,并用常规方法将混合物压片来配制。

25 胶囊是通过充分混合合适的赋形剂、崩解剂、润滑剂等,并将混合物装在胶囊中而制成。也可以以常规方法形成颗粒或细颗粒,然后将颗粒或细颗粒装在胶囊中而制成。

软膏剂可以是眼用软膏剂。

30 注射剂可以使用细针管直接对发病组织例如角膜和玻璃体或它们的邻接组织注射,也可以用作眼内滴注液。

本发明药物组合物可以作为缓释制剂给药。例如,Tranilast 制剂可以掺入

到缓释聚合物的小丸或微胶囊中作为缓释制剂,这样的小丸或微胶囊被手术埋植到要治疗的组织中。作为缓释聚合物的例子,可以举出的有乙烯-乙酸乙烯酯共聚物、聚氢甲基丙烯酸酯、聚丙烯酰胺,聚乙烯吡咯烷酮、甲基纤维素、乳酸聚合物、乳酸-乙醇酸共聚物等,优选可生物降解聚合物,例如乳酸聚合物和乳酸-乙醇酸共聚物。

当在实际治疗中使用本发明药物组合物时,根据要治疗的各患者的体重、年龄、性别、症状严重程度等适当确定作为活性成分的 Tranilast 或其药学可接受盐的剂量。口服给药情况下,大约是在 100-1000mg/天/成年人;肠胃外给药情况下,大约是在 20 $\mu$ g-300mg/天/成年人。

10 根据要治疗的各患者的疾病类型、症状严重程度和治疗程度,可适当地增加和减少 Tranilast 或其药学可接受盐的剂量。

### 实施例

通过下面的实施例更详细地说明本发明。

### 研究证明对新血管形成的抑制作用

#### 15 实施例 1

抑制人微血管内皮细胞的增殖

#### 1. 培养人微血管内皮细胞

将正常人的皮肤微血管内皮细胞(Cell Systems Corporation) 在内皮细胞培养的培养基(MVE 培养基,Cell Systems Corporation)中做了传代培养,用于研究。在对数生长期,吸出培养基,细胞用小心加入的磷酸盐缓冲盐水(PBS(-))冲洗。然后吸出 PBS(-),向培养板上加一等份含有 0.02%EDTA 的 0.25%胰蛋白酶溶液,用相差显微术观察细胞的形态学特征。当细胞呈圆形时,向胰蛋白酶溶液加等值的 MVE 培养基以中止胰蛋白酶的作用。用细长的巴氏吸管吸取培养基而从平板收集并连细胞。将细胞悬浮液转移到锥形管中,然后向该锥形管中加入培养基,并且通过用巴氏吸管吸取,将细胞悬浮液充分混合大约 20 次,并且以 100-110xg 离心 1 分钟。弃除上清液后,向沉淀中加入新鲜的培养基,用巴氏吸管吸取来制备细胞悬浮液。使用血细胞计用相差显微术计数一等份悬浮液中存活的细胞数。调节细胞浓度至  $2 \times 10^4$  个细胞/ml。

#### 2. 制备试验药物

30 向 1%碳酸氢钠水溶液中加入 Tranilast 来制备 0.55%溶液,并在 70 $^{\circ}$ C 加热溶解。用微孔滤膜将溶液灭菌,并且用 MVE 培养基稀释到最终设计的浓度。

### 3. 试验方法

向胶原包被的 6 孔板(Toyobo Engineering Co.,Ltd.)加入细胞悬浮液(1ml),并在 37 °C 5%CO<sub>2</sub> 空气湿化的气氛下培养。1 天后,吸出培养基,用 PBS(-) 冲洗细胞,并向板中加入 1ml 新鲜培养基和 0.1ml 各种浓度的 Tranilast 溶液,将平板再温育两天。温育后吸出培养基,用 PBS(-)冲洗细胞,然后向板中加入 1ml 含有 0.02%EDTA 的 0.25%胰蛋白酶溶液。用巴氏吸管吸取从平板中收集细胞后,使用血细胞计计数存活的细胞数。

### 4. 测试效果

计算各组的平均值和标准偏差。通过一元配置的方差分析进行显著性的统计学分析,并确定统计学显著性。然后通过 Dunnett's 多项试验进行各组之间的显著性分析。

### 5. 结论

如图 1 所示,Tranilast 以浓度依赖方式显著抑制人微血管内皮细胞的增殖。

## 15 实施例 2

抑制人微血管内皮细胞的趋化性

### 1. 培养人微血管内皮细胞

根据实施例 1-1 的方法培养人微血管内皮细胞以制备细胞悬浮液。使用血细胞计用相差显微术计数存活的细胞数。调节细胞浓度至  $2 \times 10^4$  个细胞/ml。

### 2. 制备试验药物

向 1%碳酸氢钠水溶液中加入 Tranilast 来制备 0.55%溶液,并在 70 °C 加热溶解。用微孔滤膜将溶液灭菌,并且用 DMEM + Ham(1:1)培养基稀释到规定的最终浓度。

## 25 3. 试验方法

用 96 孔微趋化性室(Neuro Probe Inc.)研究人皮肤微血管内皮细胞(实施例 2-1 中制备)向血管内皮生长因子(VEGF)的趋化性。向趋化性室的下腔加入一等份(32 $\mu$ l)含有 100ng./mlVEGF、0.1%牛血清和各种浓度的 Tranilast 的 DMEM + Ham(1:1)培养基。向室的上腔加入一等份(50 $\mu$ l)含有细胞悬浮液和 Tranilast 的培养基。对于趋化性膜使用包被 1-型胶原的聚碳酸酯滤器(10 $\mu$ m 厚,8 $\mu$ m 孔大小,Neuro Probe Inc.)。趋化性室在 37 °C 5%CO<sub>2</sub> 空气湿化的气



氛下培养 5 小时。用 90%乙醇固定向滤器低处迁移的细胞,并且用 Diff-Quick(Baxter Diagnostics Inc.)染色。用相差显微术以  $\times 400$  放大倍数在 5 个随机范围计数迁移的细胞数,并计算平均趋化性细胞数。

#### 4. 测试效果

- 5 计算各组的平均值和标准偏差。通过一元配置的方差分析进行统计学显著性分析,并确定统计学显著性。然后通过 Dunnett's 多项试验进行各组之间的显著性分析。

#### 5. 结论

10 如图 2 所示,Tranilast 以浓度依赖方式显著抑制人微血管内皮细胞的趋化性。

#### 实施例 3

##### 人微血管内皮细胞的管形成

#### 1. 培养人微血管内皮细胞

15 根据实施例 1-1 的方法培养人微血管内皮细胞以制备细胞悬浮液。使用血细胞计用相差显微术计数存活的细胞数。调节细胞浓度至  $4 \times 10^4$  个细胞/ml。

#### 2. 制备试验药物

向 1%碳酸氢钠水溶液中加入 Tranilast 来制备 0.5%溶液,并在 70 °C 加热溶解。用微孔滤膜将溶液灭菌,并且用 MVE 培养基稀释到规定的最终浓度。

#### 20 3. 试验方法

向 24 孔培养板(Corning)加入一等份(0.25ml)matrigel(10mg/ml,Becton Dickinson Labware),然后在 37 °C 保温 1 小时使其固化。向凝胶上加入人微血管内皮细胞( $4 \times 10^4$  个细胞)的悬浮液(0.25ml)和含有各种浓度的 Tranilast 的 MVE 培养基(0.25ml)。在 37 °C 保温 18 小时后,用相差显微术以  $\times 100$  放大  
25 倍数在一个孔 5 个随机范围观察,计数形成的网络数目。

#### 4. 结论

如图 3 所示,以浓度依赖方式显著减少了形成的网络数。

#### 实施例 4

##### 人微血管内皮细胞的管形成

#### 30 1. 培养人微血管内皮细胞

根据实施例 1-1 的方法培养人微血管内皮细胞以制备细胞悬浮液。使用

血细胞计用相差显微术计数存活的细胞数。调节细胞浓度至  $4 \times 10^4$  个细胞/ml。

## 2. 制备试验药物

向 1% 碳酸氢钠水溶液中加入 Tranilast 来制备 1.0% 溶液,并在 70 °C 加热溶解。用微孔滤膜将溶液灭菌,并且用 MVE 培养基稀释到规定的最终浓度。

## 3. 试验方法

向 24 孔培养板(Corning)加入一等份(0.25ml)matrigel(10mg/ml,Becton Dickinson Labware),然后在 37 °C 保温 1 小时使其固化。向凝胶上加入人微血管内皮细胞( $4 \times 10^4$  个细胞)的悬浮液(0.25ml)和含有各种浓度的 Tranilast 的 MVE 培养基(0.25ml)。在 37 °C 保温 18 小时后,用相差显微术以  $\times 40$  放大倍数在一个孔 5 个随机范围照相,测定管结构的长度,并且计算平均值。

## 4. 结论

如图 4 所示,以浓度依赖方式显著减小了管结构的长度。

## 工业实用性

含有活性成分 Tranilast 的药物组合物对人微血管内皮细胞的增殖和趋化性以及对人微血管内皮细胞的管腔形成具有显著的抑制作用,因此,作为新血管形成抑制剂非常有效。

说明书附图

图 1

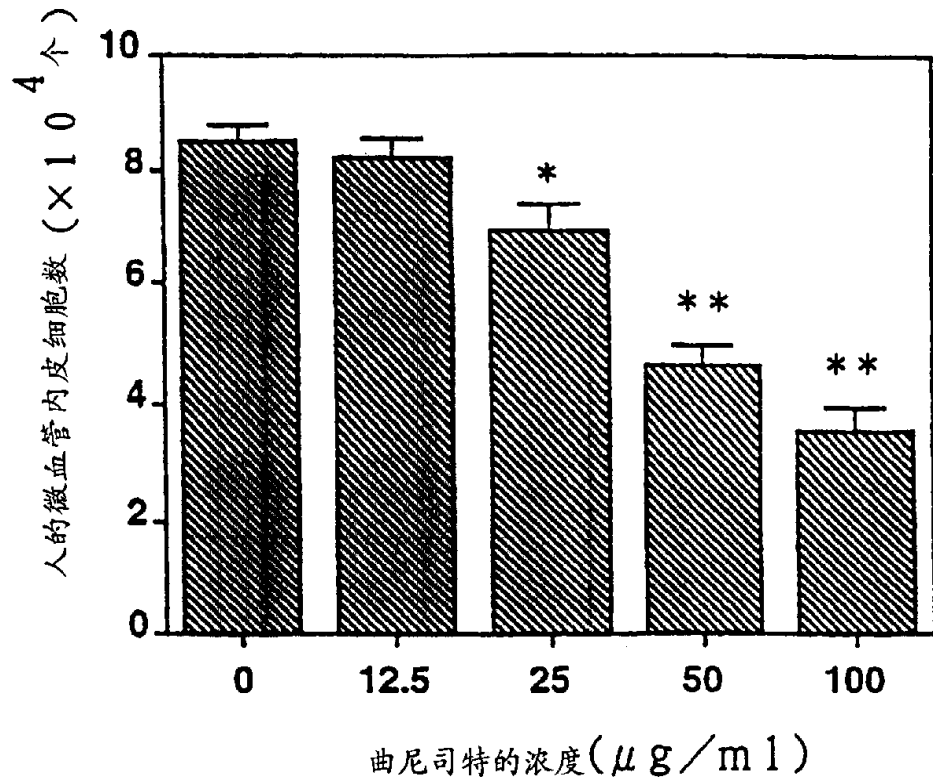


图 2

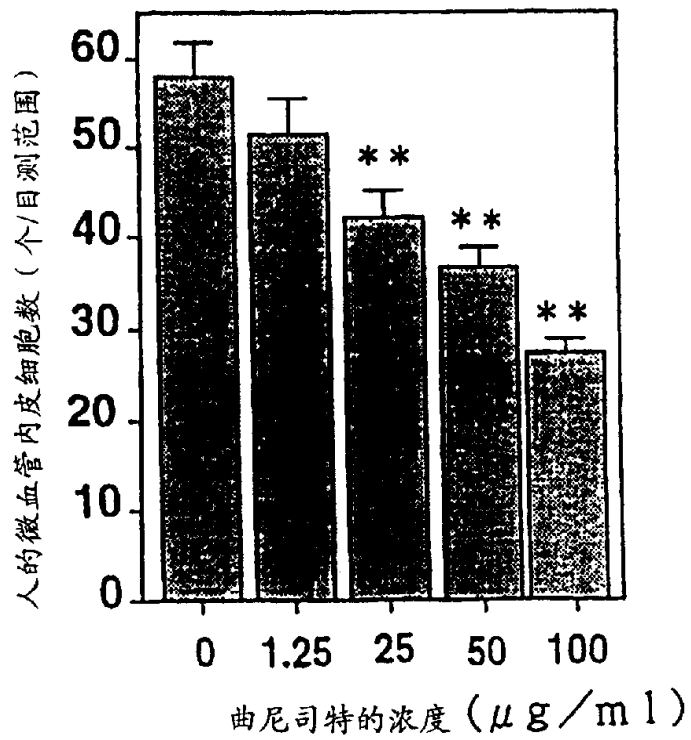


图 3

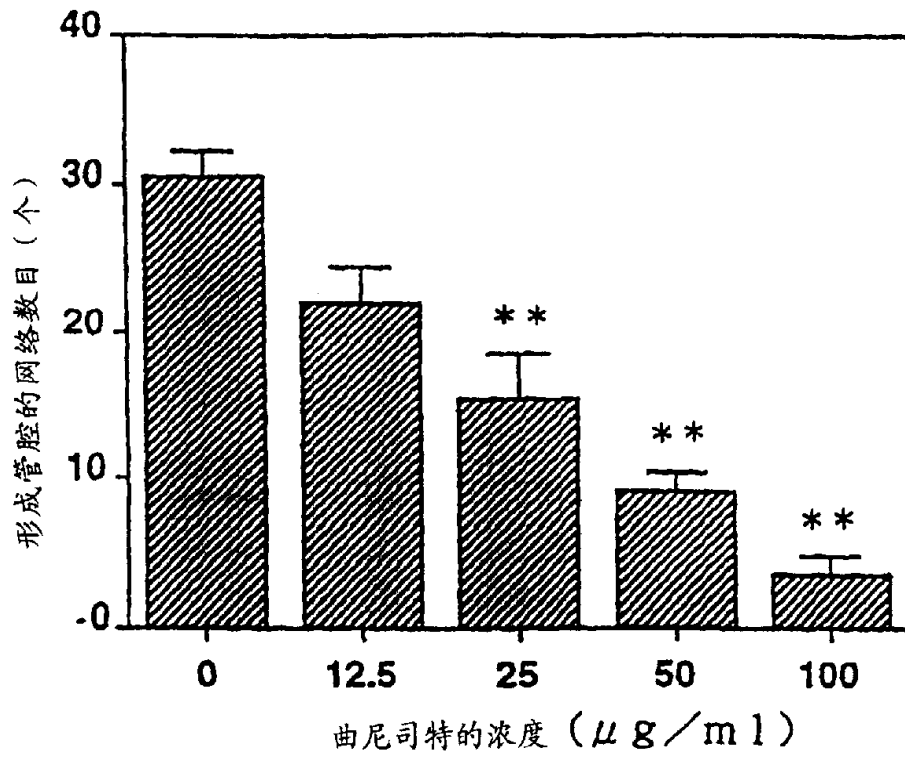


图 4

