



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.

C07D 407/06 (2006.01)

C07D 407/08 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2006-0130077

(43) 공개일자 2006년12월18일

(21) 출원번호 10-2006-7012422

(22) 출원일자 2006년06월22일

심사청구일자 없음

번역문 제출일자 2006년06월22일

(86) 국제출원번호 PCT/US2004/043586

(87) 국제공개번호 WO 2005/066197

국제출원일자 2004년12월29일

국제공개일자 2005년07월21일

(30) 우선권주장 제 60/533,431 호 2003년12월29일 미국(US)

(71) 출원인 프래시스 파마슈티컬즈 인코포레이티드
미국 매사추세츠 02154 월담 윈터 스트리트 830

(72) 발명자 톰슨 찰스
미국 매사추세츠 01775 스토크 파트리지 레인 22
아리코-윈델 크리스토퍼 시
미국 매사추세츠 02132 웨스트 록스베리 쇼 스트리트 21

(74) 대리인 황광현

전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 메티오닌 아미노펩티다제-2 의 저해제 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 암과 같은 맥관형성 질환, 자가면역 질환 또는 기생충 감염을 포함하는 다수의 증상 중 어느 한 증상을 앓고 있는 피실험자를 치료하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다.

특허청구의 범위

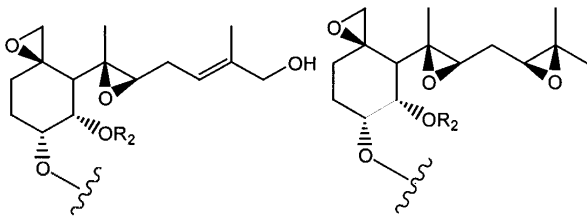
청구항 1.

다음 화학식 A-B 의 화합물 또는 약학적으로 용인가능한 이의 염

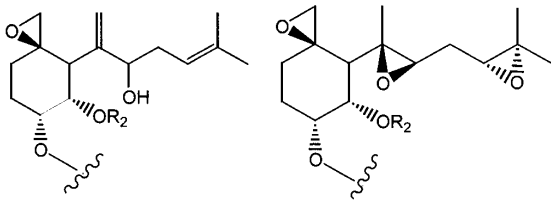
여기에서,

A 는 다음 화학식 중에서 선택한 부분(moiety)이고

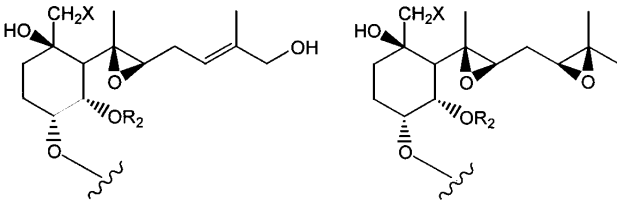
화학식 I 화학식 II



화학식 III 화학식 IV

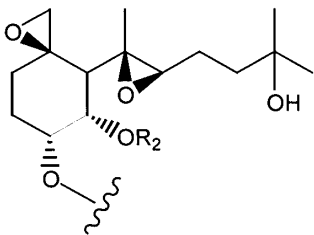


화학식 V 화학식 VI



및

화학식 VII



이 식에서,

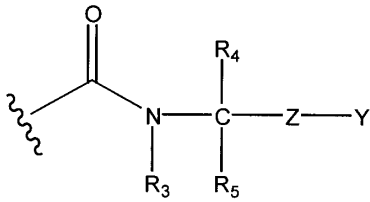
R_2 는 수소 또는 C_1-C_6 -알킬이고, X 는 할로젠, 디알킬설파이드,

티오알콕시 또는 티오아릴옥시이며 ;

B 는 알카노일, 아로일, 카바모일 또는 치환된 카바모일기이다.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, B 는 다음 화학식을 갖는 부분임을 특징으로 하는 화합물



이 식에서,

R_3 는 수소 또는 알킬이고 ;

R_4 및 R_5 는 각각 독립적으로 수소, 치환되거나 또는 치환되지

않은 알킬, 치환되거나 또는 치환되지 않은 아릴, 치환되거나 또는

치환되지 않은 아릴알킬, 치환되거나 또는 치환되지 않은

헤테로아릴, 또는 치환되거나 또는 치환되지 않은 헤테로알킬이며 ;

또는

R_3 과 R_5 는 함께 알킬렌기를 형성하고 ;

Z 는 $-C(O)-$ 또는 $-알킬렌-C(O)-$ 이며 ;

P 는 $-OR_6$ 또는 $-N(R_7)R_8$ 이고, 여기에서 R_6 , R_7 및 R_8 은 각각

독립적으로 수소, 치환되거나 또는 치환되지 않은 알킬,

치환되거나 또는 치환되지 않은 아릴 또는 치환되거나 또는

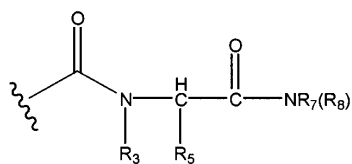
치환되지 않은 아자시클로알킬이거나, 또는 R_7 및 R_8 은

이들이 결합된 질소 원자와 함께 헤테로시클로 고리 구조를

형성한다.

청구항 3.

제 1 항에 있어서, B 는 다음 구조를 갖는 부분임을 특징으로 하는 화합물



이 식에서,

R_5 는 치환되거나 또는 치환되지 않은 선형, 가지난 또는 시클로 C_1-C_6 -알킬, 아릴, 아릴알킬 또는 헤테로아릴이고 ; 또는

R₃ 과 R₅ 는 함께 C₃-C₆-알킬렌기를 형성한다.

청구항 4.

제 3 항에 있어서,

R₅ 는 선형 또는 가지난 C₁-C₆-알킬, 히드록시-치환된 선형 또는

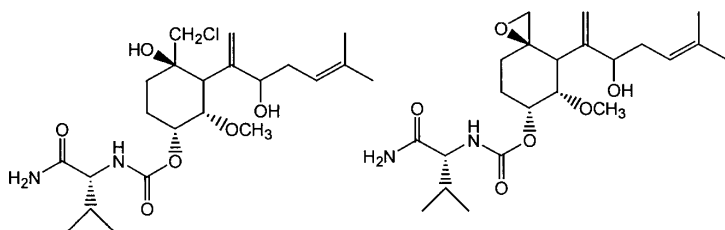
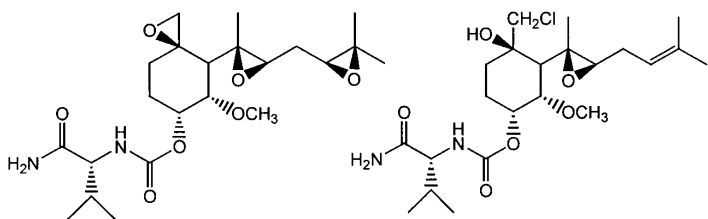
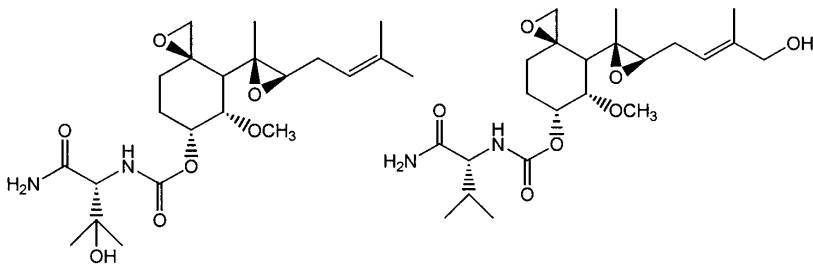
가지난 C₁-C₆-알킬이며 ;

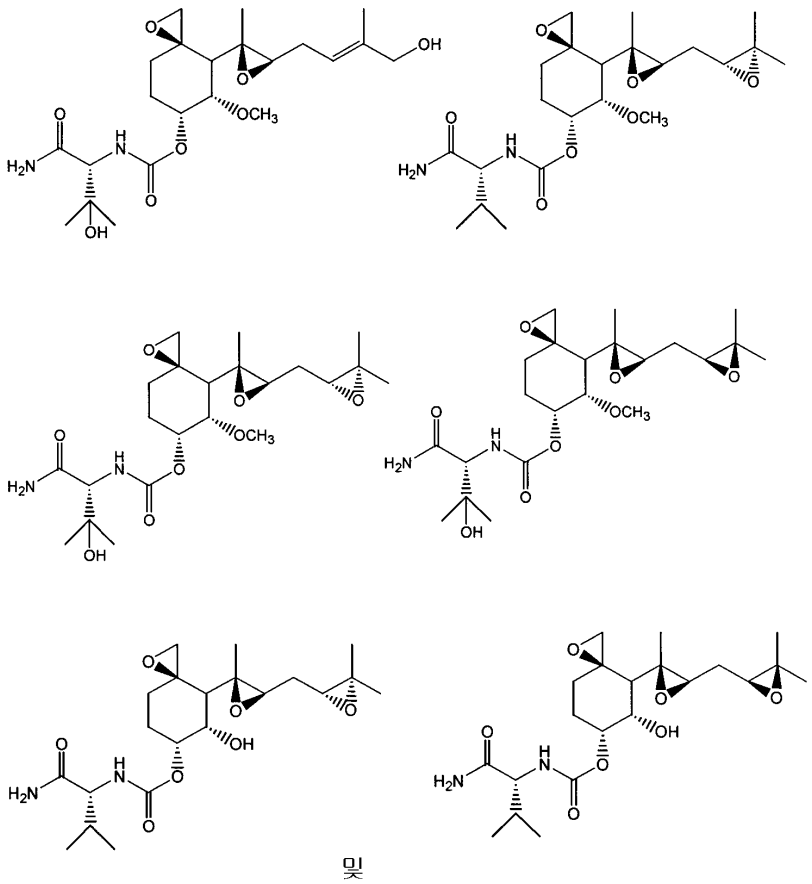
R₃, R₇ 및 R₈ 은 각각 수소

임을 특징으로 하는 화합물.

청구항 5.

다음 중에서 선택한 화합물





청구항 6.

제 1 항 또는 제 2 항의 화합물 및 약학적으로 용인가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 7.

치료학적 유효량의 제 1 항 또는 제 2 항의 화합물을 피실험자에게 투여하는 단계를 포함하는, 상기 피실험자의 맥관형성 질환을 치료하는 방법.

청구항 8.

제 7 항에 있어서, 맥관형성 질환은 암임을 특징으로 하는 방법.

청구항 9.

제 8 항에 있어서, 맥관형성 질환은 림프종임을 특징으로 하는 방법.

청구항 10.

치료학적 유효량의 제 1 항 또는 제 2 항의 화합물을 피실험자에게 투여하는 단계를 포함하는, 상기 피실험자의 자가면역 질환을 치료하는 방법.

청구항 11.

제 10 항에 있어서, 자가면역 질환은 류마티스성 관절염, 건선 또는 다발성 경화증임을 특징으로 하는 방법.

청구항 12.

치료학적 유효량의 제 1 항 또는 제 2 항의 화합물을 피실험자에게 투여하는 단계를 포함하는, 상기 피실험자의 기생충 감염을 치료하는 방법.

청구항 13.

제 12 항에 있어서, 감염은 말라리아원충 종(*Plasmodium species*) 및 레슈마니아 종(*Leishmania species*) 중에서 선택한 기생충에 의한 것임을 특징으로 하는 방법.

명세서

배경기술

혈관형성은 새로운 혈관이 형성되는 기본적인 과정이며 일반적인 다양한 신체 활동(예를 들어, 재생, 발생 및 상처 수복)에 필수적이다. 이러한 과정이 완벽하게 이해된 것은 아니지만, 내피세포의 성장, 모세혈관의 1 차 세포를 자극하고 저해하는 분자들과 상호작용하는 복합체를 함유하는 것으로 여겨진다. 정상적인 조건 하에서, 이러한 분자들은 몇주일 만큼 긴 시간 동안 또는 몇몇 경우에 있어서는 10 년 동안 지속될 수 있는 연장된 기간 동안 휴지 상태(즉, 모세혈관의 성장이 없음)에서 미세맥관구조를 유지하는 것 같다. 그러나, 필요한 경우(예를 들어, 상처 수복 기간)에, 이러한 동일한 세포는 급속하게 증식할 수 있고 5 일 기간 이내에 전환(turnover)된다[Folkman, J. 및 Shing, Y., *Journal of Biological Chemistry*, 267(16): 10931-10934, 및 Folkman, J. 및 Klagsbrun, M. (1987) *Science*, 235: 442-447 참조].

정상적인 조건 하에서, 혈관형성은 고도로 조절되는 과정이지만, 많은 질환("맥관형성 질환"으로 특정됨)들은 지속적인 비조절된 혈관형성에 의해 발생되거나 또는 이것으로 특정된다. 다른 방법으로 진술하면, 비조절된 혈관형성은 특정 질환을 직접적으로 유발시키거나 또는 이미 존재하는 병리학적 증상을 가속화시킬 것이다. 예를 들어, 안구의 혈관신생은 실명을 유발하는 가장 일반적인 이유와 연관되어 있으며 약 20 개의 안 질환을 나타낸다. 관절염과 같은 이미 존재하고 있는 특정 증상에서, 새로이 형성된 모세혈관은 관절을 침범하고 연골을 파괴시킨다. 당뇨병에서, 망막에 새로이 형성된 모세혈관은 유리체를 침습하고 출혈을 일으켜 실명을 유발한다. 충실성 종양의 성장 및 전이 또한 혈관형성에 의존한다[Folkman, J. (1986) *Cancer Research* 46: 467-473 및 Folkman, J. (1989) *Journal of the National Cancer Institute* 82: 4-6]. 예를 들어, 2 밀리미터 보다 크기가 더 크게 성장한 종양들은 그들 자신의 혈액 공급을 획득해야 하고 새로운 모세혈관의 성장을 유도함으로써 혈액공급을 하게 된다. 이러한 새로 형성된 혈관이 종양 내로 매몰되게 되면, 이러한 혈관들은 종양으로 영양분을 공급하고, 종양세포를 위해 혈행 내로 들어가고 간, 폐 또는 뼈와 같은 먼 부위까지에도 전이되는 수단으로 작용할 수 있다[Weidner, N., 등의 (1991) *The New England Journal of Medicine* 324(1): 1-8].

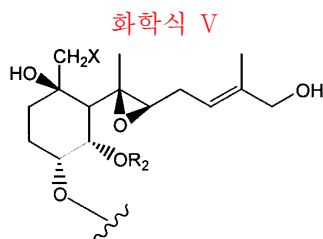
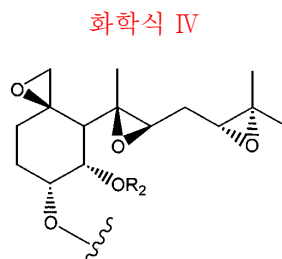
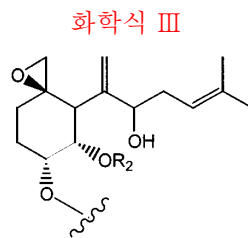
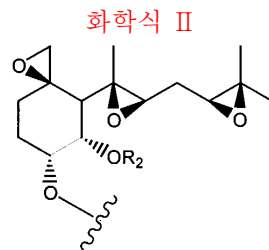
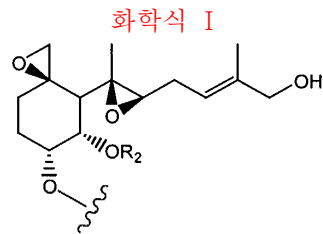
푸마길린(Fumagillin)은 공지된 화합물로서 항균제 및 항원충제로 사용되어 왔다. 이의 물리화학적 특성 및 생산 방법은 공지되어 있다[미국 특허 번호 제 2,803,586 호 및 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*(1962) 48: 733-735]. 푸마길린과 특정 유형의 푸마길린 유사체 또한 항 혈관형성 활성을 나타내는 것으로 밝혀졌다. 그러나, 이러한 저해제(예를 들어, TNP-470)의 사용은 이들의 급속한 대사 분해, 불규칙한 혈중농도 및 중추 신경계(CNS) 부작용을 제한하는 투여량에 의해 제한될 것이다.

따라서, 좀 더 효능있고, 신경독성을 덜 나타내며, 좀 더 안정하고/하거나 더 긴 혈청 반감기를 갖는 혈관형성 저해제가 여전히 필요하다.

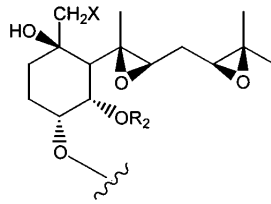
발명의 요약

본 발명은 암과 같은 맥관형성 질환, 자가면역 질환 또는 기생충 감염을 포함하는 다수의 증상 중 어느 한 증상을 앓고 있는 피실험자를 치료하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

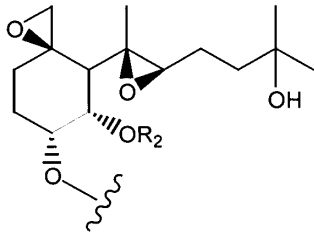
하나의 실시형태에서, 본 발명은 다음 화학식 A-B 의 화합물을 제공하며, 여기에서, A 는 하기의 화학식 I-VII 중 하나에 기재되어 있는 구조를 갖는 기이다 :



화학식 VI



화학식 VII



각각의 화학식 I 내지 VI 에서, 시클로헥산 고리의 일부분에 존재하는 산소 원자[즉, 화학식 I, II < III, IV 및 VII 에서 스피로에폭시화물(spiroepoxide)과 상대적인 위치 4, 또는 화학식 V 및 VI 에서 -CH₂X 기와 상대적인 위치 4 에서]는 B 와 결합하는 지점이고 R₂ 는 수소 또는 C₁-C₆-알킬, 바람직하게는 메틸이다. 화학식 VI 에서, X 는 할로젠 원자, 디알킬설파늄기(dialkylsulfonium group), 티오알콕시기, 티오아릴옥시기 또는 또다른 적절한 이탈기이다. 바람직하게, X 는 브롬, 염소 또는 요드이다. 더 바람직하게, X 는 염소이다.

B 는 알카노일기, 아로일기, 알콕시카르보닐기, 카바모일기, 또는 N-치환된 카바모일기이다.

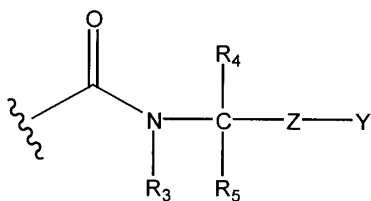
본 발명은 또한 화학식 A-B 의 하나 또는 그 이상의 화합물 및 약학적으로 용인가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물, 및 맥관형성 증상(예를 들어, 다양한 암, 림프종 및 부적절한 혈관형성으로 특징되는 질환) 및 자가면역 질환(예를 들어, 관절염 및 건선)을 포함하는 다양한 질환 및 증상들을 치료하기 위한 약학적 조성물과 이러한 화합물을 이용한 방법을 제공한다.

본 발명의 다른 특징 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명 부분과 청구의 범위로부터 명백해질 것이다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 효소 메티오닌 아미노펩티다제-2(MetAP-2)의 저해제인 화합물, 하나 또는 그 이상의 이러한 화합물을 포함하는 약학적 조성물 및 맥관형성 증상 및 MetAP-2 의 저해에 반응하는 그밖의 다른 증상(예를 들어, 충실성 종양과 림프구 양 악성종양을 포함하는 암, 기생충 감염 및 자가면역 질환)을 포함하는 다수의 증상 중 어느 한 증상을 앓고 있는 피실험자를 치료하는 방법을 제공한다.

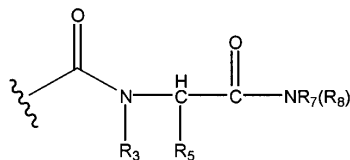
특정 실시형태에서, 본 발명의 화합물은 화학식 A-B 의 화합물을 포함하고, 여기에서, A 는 상기 화학식 I -VI 에 기재된 구조 중에서 선택한 것이고, B 는 다음의 화학식을 가지며



이 식에서, R³ 은 수소 또는 알킬, 바람직하게 C₁-C₄-알킬이다. R₄ 및 R₅ 는 각각 독립적으로 수소, 치환되거나 또는 치환되지 않은 알킬, 치환되거나 또는 치환되지 않은 아릴, 치환되거나 또는 치환되지 않은 아릴알킬, 치환되거나 또는 치환되지 않은 헤테로아릴, 또는 치환되거나 또는 치환되지 않은 헤테로아릴알킬이다. 바람직하게, R₄ 는 수소이고 R₅ 는 수소가 아니다. Z 는 -C(O)- 또는 알킬렌-C(O)- 이고 ; Y 는 -OR₆ 또는 -N(R₇)R₈ 이며, 여기

에서 R_6 , R_7 및 R_8 은 각각 독립적으로 수소, 치환되거나 또는 치환되지 않은 알킬, 치환되거나 또는 치환되지 않은 아릴, 또는 치환되거나 또는 치환되지 않은 아자시클로알킬이다. R_7 및 R_8 은 또한, 이들이 결합된 질소 원자와 함께 헤테로시클로 고리 구조를 형성한다.

바람직한 실시형태에서, B 는 다음의 화학식을 갖는다 :



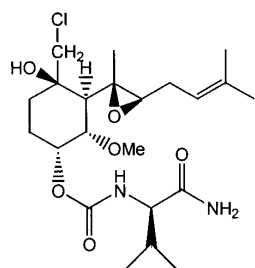
이 식에서, R_3 , R_5 , R_7 및 R_8 은 상기에 기재한 의미를 갖는다. 이러한 실시형태에서, R_5 는 바람직하게 치환되거나 또는 치환되지 않은 선형, 가지난 또는 시클로 C_1 - C_6 -알킬, 아릴, 아릴알킬 또는 헤테로아릴이다. 적절한 치환기로는 히드록시기 및 아미노기를 포함한다. 또다른 실시형태에서, R_5 는 20 개의 자연적으로 발생한 아미노산 중 하나의 결사슬, 예를 들어, 아스파라긴산, 글루탐산, 알라닌, 루이신, 발린, 아스파라긴, 글루타민, 트립토판, 트레오닌, 아르기닌, 시스테인, 메티오닌, 티로신, 페닐알라닌, 리신, 히스티딘, 이소루이신, 또는 세린의 결사슬이다. R_5 에 해당하는 바람직한 동등성(identity)은 발린, 루이신, 이소루이신, 알라닌, 페닐알라닌, 메티오닌 및 트립토판과 같은 소수성의 아미노산 결사슬을 포함하며, 이들은 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 및 티로신과 같이 극성이지만 비하전된 것이다. 다른 실시형태에서, R_3 과 R_5 는 함께 C_3 - C_6 -알킬렌기를 형성한다. R_5 와 결합된 탄소 원자는 비대칭 탄소 원자이며 2 가지의 가능한 입체화학 중 어느 하나의 형태로 존재할 수 있다. 예를 들어, 단위 $-N(R_3)-CH(R_5)-C(O)-$ 는 α -아미노산의 D- 또는 L-입체배치와 동등한 입체배치를 가질 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 이러한 기는 α -아미노산의 D-입체배치와 동등한 입체배치를 갖는다.

본 발명의 화합물에서, R_1 - R_8 중 어느 하나가 알킬기일 때, 바람직한 알킬기는 치환되거나 또는 치환되지 않은 곧은, 가지난 또는 시클로 C_1 - C_6 알킬기이다. 특히, 바람직한 알킬기는 곧은 또는 가지난 C_1 - C_4 알킬기이다. 치환된 알킬기는 아미노기, 알킬아미노기 또는 디알킬아미노기와 같은 적어도 하나의 비-수소 치환기(non-hydrogen substituent) ; 플루오르, 클로로, 브로모 또는 요드 치환기와 같은 할로겐 ; 또는 히드록시기를 포함한다.

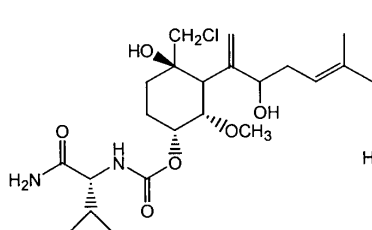
R_4 와 R_5 중 적어도 하나가 치환되거나 또는 치환되지 않은 아릴 또는 헤테로아릴기일 때, 바람직한 기는 치환 및 비치환된 페닐, 나프틸, 인돌일, 이미다졸일 및 피리딜을 포함한다. R_4 와 R_5 중 적어도 하나가 치환되거나 또는 치환되지 않은 아릴알킬 또는 헤테로아릴알킬일 때, 바람직한 기는 치환 및 비치환된 벤질, 나프틸메틸, 인돌일메틸, 이미다졸일메틸 및 피리딜메틸기를 포함한다. 아릴, 헤테로아릴, 아릴알킬 및 헤테로아릴알킬 상의 바람직한 치환기는 다음 중에서 독립적으로 선택한 것이다 : 아미노, 알킬-치환된 아미노, 할로겐(예를 들어, 플루오르, 클로로, 브로모 및 요드), 히드록시기 및 알킬기. 바람직하게는 곧은 또는 가지난 C_1 - C_6 -알킬기, 가장 바람직하게는 메틸기이다.

R_7 및 R_8 은 또한 알킬, 치환된 알킬이나 또는 수소 이외에도, 각각 독립적으로 치환되거나 또는 치환되지 않은 아자시클로알킬기이거나 또는 치환되거나 또는 치환되지 않은 아자시클로알킬알킬기이다. 적절한 치환된 아자시클로알킬기는 N-알킬 치환기(바람직하게는 C_1 - C_4 -알킬 치환기 및 더욱 바람직하게는 N-메틸 치환기)를 갖는 아자시클로알킬기를 포함한다. R_7 및 R_8 은 또한 이들이 결합된 질소 원자와 함께, 치환되거나 또는 치환되지 않은 5 개 또는 6 개의 원자로 이루어진 아자- 또는 디아자시클로알킬기와 같은 헤테로시클로 고리계를 형성한다. 바람직하게, 디아자시클로알킬기는 C_1 - C_4 -알킬 치환기 또는 더욱 바람직하게, 메틸 치환기와 같은 N-알킬 치환기를 포함한다.

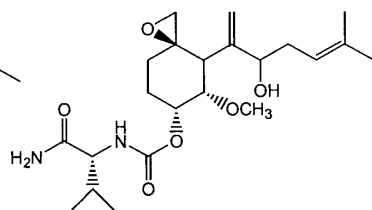
본 발명의 특정 화합물들은 하기에 기재한 구조의 화합물을 포함한다 :



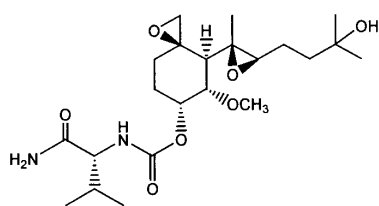
화합물 2



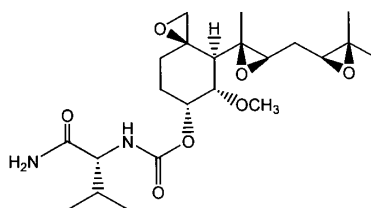
화합물 3



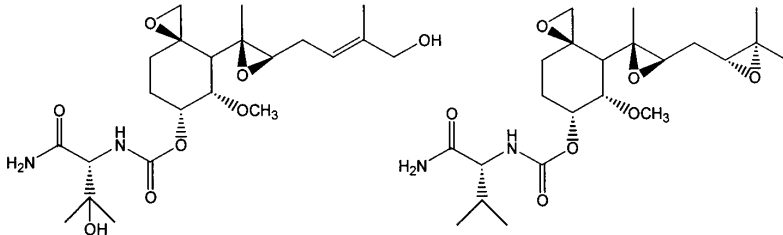
화합물 4



화합물 5

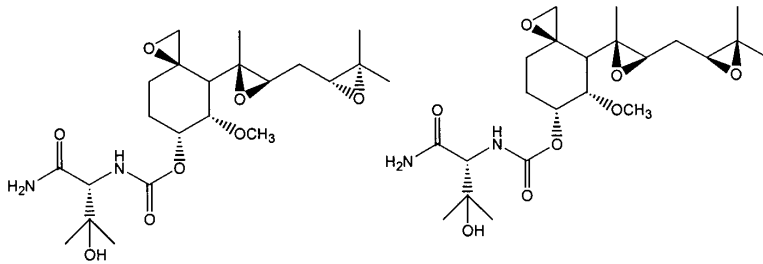


화합물 6



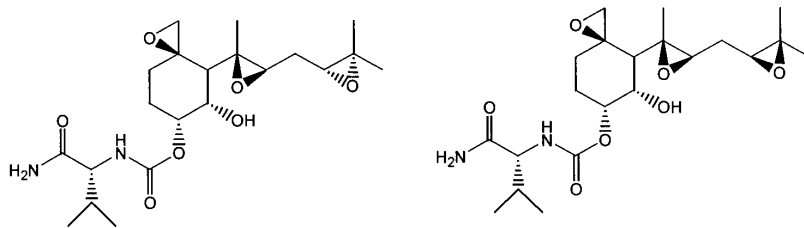
화합물 7

화합물 8



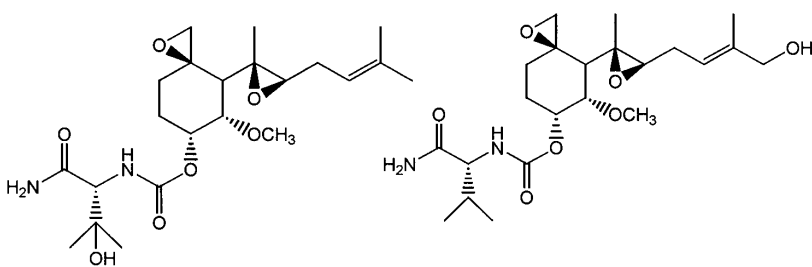
화합물 9

화합물 10



화합물 11

화합물 12

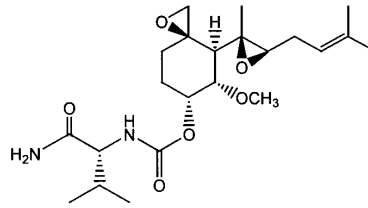


화합물 13

화합물 14

본 발명은 또한 본 발명의 화합물의 염을 포함한다. 바람직한 염은 약학적으로 용인가능한 염이다. "약학적으로 용인가능한 염"은 모화합물의 바람직한 생물학적 활성도를 유지하며 바람직하지 않은 모든 독성 효과를 부여하지 않는 염을 포함한다. 이러한 염의 예로는 다음을 포함한다: 염산, 브롬화수소산, 황산, 인산, 질산 등과 같은 무기산염; 및 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 숙신산, 말산, 벤조산, 파모익산(pamoic acid), 알긴산, 메탄술폰산, 나프탈렌술폰산 등과 같은 유기산염. 나트륨, 칼륨, 리튬, 아연, 구리, 바륨, 비스무트, 칼슘 등을 포함하는 알칼리 및 알칼리 토금속과 같은 양이온염; 암모늄 및 알킬암모늄, 디알킬암모늄, 트리알킬암모늄 및 테트라알킬암모늄과 같은 유기 양이온(organic cations)염 또한 포함된다. 상기 염들 중 둘 또는 그 이상의 조합물 또한 본 발명의 범주내에 포함된다.

본 발명의 화합물은 본 분야에 공지된 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 실시예에 기재된 바와 같이, 하기 화합물 1은 본 발명의 특정 화합물의 합성에서 출발 물질로 사용될 수 있다. 화합물 1의 합성은 본원에서 내용 전부를 참고문헌으로 인



화합물 1

용한 미국 특허 번호 제 6,548,477 호에 기재되어 있다.

본 발명의 화합물은 효소 메티오닌 아미노펩티다제-2(MetAP-2)의 저해제이므로, 상기 화합물은 본원에 참고문헌으로 인용하고 있는 미국 특허 번호 제 6,548,477 호 및 공개된 PCT 출원 제 WO 03/092608 호에 기재되어 있는 질환 및 증상을 포함하는, 상기 효소의 치료학적 표적이 되는 다양한 질환 및 증상을 치료하는데 사용할 수 있다.

하나의 실시예에 따라, MetAP-2의 저해제는 내피 세포 증식을 저해하여 항-혈관형성 활성을 나타낸다. 따라서, 본 발명의 화합물은 피실험자가 앓고 있는 맥관형성 질환을 치료하는 방법에 사용할 수 있다. 상기 방법은 치료학적 유효량의 본 발명의 화합물을 피실험자에게 투여하여 상기 피실험자의 맥관형성 질환을 치료하는 것을 포함한다.

본원에 사용한 바와 같이, 용어 "맥관형성 질환(angiogenic disease)"은 변형되거나 바람직하지 않은 혈관의 형성(혈관형성; angiogenesis), 예를 들어, 자극되거나 억제된 혈관형성을 특징으로 하거나 또는 이로 인해 발생하는 질환, 장애 또는 증상을 포함한다. 변형되거나 바람직하지 않은 혈관형성은 직접적으로 특정 질환을 발병시키거나 존재하는 병리학적인 증상을 악화시킨다. 맥관형성 질환의 예는 다음을 포함한다: 당뇨병성 망막증, 미숙아망막증, 각막 이식 거부, 수정체후방섬유 증식증, 혈관신생성 녹내장, 홍색증, 감염이나 또는 외과적인 정맥내주사와 관련된 눈의 황반변성, 저산소증 또는 혈관형성에 의한 망막 혈관신생, 안 종양 및 트라코마와 같은 안 장애, 및 눈의 비정상적인 혈관신생 증상(여기에서, 혈관신생은 실명을 유발한다); 건선 및 화농성 육아종과 같은, 피부에 영향을 미치는 장애; 암, 예를 들어, 암종 및 육종(이러한 종양 세포에 의한 혈관형성의 연속적인 유도에 의존하여 진행적으로 성장함), 폐암, 뇌암, 신장암, 결장암, 간암, 췌장암, 위암, 전립선암, 유방암, 난소암, 경부암, 흑색종 및 상기 모든 암들의 전이성 유형; 소아과학 질환, 예를 들어, 맥관섬유증 및 혈 유병관절증; 혈관종과 같은 혈관 질환 및 죽상동맥경화증 플라크 내에서의 모세관 증식; 외과수술과 관련된 장애, 예를 들어, 비후성반흔, 좌상 과립형성 및 맥관 유착; 및 자가면역 질환, 예를 들어, 류마티스성, 면역성 및 변성 관절염(여기에서, 관절의 새로운 혈관은 관절연골을 파괴할 수 있다), 및 공피증.

용어 맥관형성 질환은 또한 다음의 질환을 포함한다: 장관 유착, 크론병, 죽상동맥경화증, 공피증 및 비후성반흔(즉, 켈로이드)을 포함하나 이에 한정되지 않는 내피 세포의 과도하거나 비정상적인 자극에 의해 특정되는 질환; 고양이할퀴기병(로셀 니나리아 킨토사; *Rochele ninalia quintosa*) 및 케양(헬리코박터 파이로리)과 같은 병적 결과로서 혈관형성을 갖는 질환. 또한 본 발명의 화합물은 분만 조절 제제(혈관형성 의존성 배란 및 태반의 확립을 저해하는 능력에 의해 조절됨)로 유용하며, 또한 외과수술 전에 피실험자에게 투여하여 출혈을 감소시키는데 사용할 수 있다.

본 발명의 화합물은 또한 흉선종을 앓고 있는 피실험자를 치료하는데 사용할 수 있다. 따라서, 본 발명은 환자에게 본 발명의 치료학적 유효량의 화합물을 투여하는 단계를 포함하는, 환자의 흉선종을 치료하는 방법을 제공한다.

본 발명의 화합물은 또한 면역계의 저해가 요구되는 임상 프로토콜에서 면역억제제로 사용할 수 있다. 따라서, 본 발명은 피실험자에게 면역억제시킬 수 있는 양의 본 발명의 화합물을 투여하는 단계를 포함하는, 상기 피실험자에게서 면역억제 증상을 유도하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 발명의 화합물은 공여자로부터 기관, 조직 또는 세포 이식을 받고 있거나 또는 받은 피실험자의 면역 기능을 억제시키는데 사용할 수 있다. 하나의 실시형태에서, 이식된 조직, 기관 또는 세포는 골수, 줄기세포, 도섬 세포와 같은 췌장 세포 또는 각막이다. 또다른 실시형태에서, 이식된 기관은 고형 기관, 예를 들어, 간, 신장, 심장 또는 폐이다.

본 발명의 화합물은 또한 림프구양 악성종양을 앓고 있는 피실험자(인간과 같은 포유동물)를 치료하는데 사용할 수 있다. 상기 방법은 유효량의 MetAP-2 저해제를 피실험자에게 투여하여 림프구양 악성종양을 앓고 있는 피실험자를 치료하는 것을 포함한다.

본 발명의 화합물은 또한 류마티스성 관절염, 루푸스, 강직성 척추염, 건선성 관절염, 공피증 및 가와사키 증후군과 같은 류마티스 질환 및 Primer on the Rheumatic Diseases, 11th Edition[John H. Klippel, MD, editor ; Arthritis Foundation ; Atlanta GA(1997)] 에 기재되어 있는 다른 류마티스 질환을 치료하는데 사용할 수 있다.

본원에 사용한 바와 같이, 용어 "림프구양 악성종양" 은 림프 세포의 모든 악성종양을 포함한다. 림프구양 악성종양의 예는 다음을 포함한다 : 만성 림프성 백혈구 및 급성 림프성 백혈구와 같은 림프성 백혈구, 및 호지킨병 및 비-호지킨 림프종과 같은 림프종. 용어 "비-호지킨 림프종" 은 다음을 포함한다 : T-세포 림프종, 예를 들어, 전구물질(말초) T-세포 림프아구성 림프종, 성숙한 T-세포 림프종, 외부결절성(extranodal) 천연 킬러/T-세포 림프종, 코 유형의 림프종, 장질환 유형의 T-세포 림프종, 간비장(hepatosplenic) T-세포 림프종, 피하 지방층염 유사 T-세포 림프종, 피부(피부; cutaneous) 림프종, 퇴행성 거대 세포 말초 T-세포 림프종 및 혈관면역아세포성 T-세포 림프종 ; 및 B 세포 림프종, 예를 들어, 전구물질 B 림프아구성 림프종, 소형 림프구성 림프종, B 세포 전림프구성 림프종, 림프형질세포(lymphoplasmacytic) 림프종, 비성 변연대 림프종, 외부결절성 변연대 MALT 림프종, 결절성 변연대 림프종, 소포 림프종, 외투세포 림프종, 미만성 거대 B-세포 림프종, 1 차 종격동(mediastinal) 거대 B-세포 림프종, 1 차 삼출 림프종 및 버키트 림프종. 비-호지킨 림프종은 또한 AIDS-관련 림프종 및 증추신경계 림프종을 포함한다.

또다른 양상에서, 본 발명은 열대열원충과 같은 말라리아원충 중에 의한 감염 및 도노반 레슈마니아와 같은 레슈마니아 종에 의한 감염과 같은 기생충 감염을 앓고 있는 피실험자를 치료하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 치료학적 유효량의 본 발명의 화합물을 피실험자에게 투여하는 단계를 포함한다.

추가적인 양상에서, 본 발명은 자가면역 질환을 앓고 있는 피실험자를 치료하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 치료학적 유효량의 본 발명의 화합물을 피실험자에게 투여하는 것을 포함한다.

본원에 사용한 바와 같이, 용어 "자가면역 질환" 은 자신의 신체를 공격하는 자신의 면역계에 의해 발병되거나 또는 이와 관련된 장애, 질환 또는 증상을 포함한다. 상기 면역계는 자기 자신의 조직에 대한 항체를 생성한다. 사실상 신체의 모든 부분에서 자가면역 질환이 발병할 수 있다. 자가면역 질환의 예는 다음을 포함하나 이에 한정되지 않는다 : 면역계가 자신의 적혈구를 파괴하는 자가면역성 용혈성 빈혈 ; 간의 염증을 유발하는 자가면역성 간염 ; 신장 손상을 유발하는, IgA 신장병증으로 알려진 베르게르병 ; 권태감을 느끼게 하거나 막연한 병을 느끼게 하는 만성 피로 증후군 ; 장에 염증을 유발하는 크론병 ; 피부 및 근육에 영향을 미치는 피부근염 ; 근육에 만성 동통 및 경직을 유발하는 섬유근육통(fibromyalgia) ; 갑상선에 영향을 미치는 그레이브스병 ; 갑상선의 만성 염증을 유발하는 하시모토갑상선염 ; 혈소판 수를 감소시키고 정상 혈액 응고를 저해하는 특발성 혈소판감소성 자반병 ; 피부, 눈, 및 입 및 생식기의 이장(lining)에 영향을 미치는 편평태선 ; 신체가 신경계의 부분을 공격하는 다발성 경화증 ; 심각한 근육 약화를 유발하는 중증근무력증 ; 피부 병변 및 양진(itching)을 유발하는 건선 ; 연쇄상(strep) 감염 이후에 심장을 포함하는 신체 기관을 손상시키는 류마티스열 ; 신체가 관절을 공격하는 류마티스성 관절염 ; 피부, 장 및 다른 구조와 관련된 공피증 ; 눈과 입을 건조시키는 쇼그렌 증후군 ; 신체가 관절 및 신장의 결합조직을 공격하는 전신성 홍반성 루푸스 ; 개체가 충분한 인슐린을 생성하지 못하는 증상을 나타내는 제 1 형 당뇨병 ; 장에 염증을 유발하는 궤양성 대장염 ; 및 피부 색소를 감소시키는 백반. 바람직한 실시형태에서, 자가면역 질환은 류마티스성 관절염이 아니다.

본원에 사용한 바와 같이, 용어 "기생충 감염" 은 모든 기생충에 의해 유발되는 감염을 포함한다. 기생충 감염의 예는 예를 들어, 열대열원충과 같은 말라리아원충 중 또는 도노반 레슈마니아와 같은 레슈마니아 종에 의해 유발되는 감염을 포함한다. 기생충 감염의 또다른 예는 예를 들어, 다음의 기생충들에 의해 유발되는 감염을 포함한다 : 바베시아, 톡소플라스마, 말라리아원충, 에이메리아, 아이소스포라, 아톡소플라스마(Atoxoplasma), 시스토이소스포라(Cystoisospora), 하몬디아(Hammondia), 베스노이티아, 사르코시스티스, 프렌켈리아(Frenkelia), 헤모프로테우스, 류코사이토준, 타일레리아, 펠킨서스(Perkinsus) 및 그레가리나(Gregarina) 종 ; 뉴모시스티스 카리니(Pneumocystis carinii) ; 예를 들어, 노세마, 엔테로사이토준(Enterocytozoon), 엔세팔리토준, 셉타타(Septata), 브라젤리아(Mrazelia), 암블리오스포라, 아메손(Ameson), 글루제아, 플라이스토포라 및 마이크로포리듐(Microporidium) 종과 같은 마이크로스포라문의 구성요소 ; 및 예를 들어, 하플로스포리듐과 같은 아세토스포라문의 구성요소.

본원에 사용한 바와 같이, 용어 "피실험자" 는 온혈동물, 바람직하게 인간을 포함하는 포유동물을 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 피실험자는 영장류이다. 좀 더 바람직한 실시형태에서, 피실험자는 인간이다.

본원에 사용한 바와 같이, 용어 피실험자에게 "투여하는" 은 비경구 또는 경구 경로에 의한 수술, 근육내 주사, 피하/피내 주사, 정맥내 주사, 협측 투여, 경피성 수술, 및 직장, 결장, 질, 비강내 또는 기도 경로에 의한 투여를 포함하는, 피실험자 내의 바람직한 위치에 상기 화합물을 수술시키기에 적합한 모든 경로에 의해 피실험자에게 혈관형성 저해 화합물, 예를 들어, 약학적 제형(본원에 기재되어 있음) 내의 혈관형성 저해 화합물을 투여, 수술 또는 사용하는 것을 포함한다.

본원에 사용한 바와 같이, 용어 "유효량" 은 바람직한 결과, 예를 들어, 피실험자의 맥관형성 질환을 치료하기에 충분한 바람직한 결과를 수득하기 위한 투여량 및 필요한 기간 동안의 유효량을 포함한다. 본원에 정의되어 있는 바와 같은 혈관형성 저해 화합물의 유효량은 피실험자의 질환 상태, 연령, 체중, 및 피실험자에게서 바람직한 반응을 유발해내는 혈관형성 저해 화합물의 능력과 같은 인자에 따라 다르다. 투여 섭생은 최적의 치료학적 반응을 제공하도록 조절할 수 있다. 유효량은 또한 혈관형성 저해 화합물의 모든 독성 또는 해로운 작용(예를 들어, 부작용)이 치료학적으로 유용한 효과에 의해 무시될 수 있는 양이다.

본 발명의 화합물의 치료학적 유효량(즉, 유효 투여량)은 약 0.001 내지 30 mg/kg 체중 의 범위 바람직하게 약 0.01 내지 25 mg/kg 체중, 좀 더 바람직하게 약 0.1 내지 20 mg/kg 체중, 더욱 더 바람직하게 약 1 내지 10 mg/kg, 2 내지 9 mg/kg, 3 내지 8 mg/kg, 4 내지 7 mg/kg 또는 5 내지 6 mg/kg 체중이다. 본 분야의 숙련자들은 질환이나 증상의 심각성, 예비 처리, 피실험자의 일반적인 건강 및/또는 연령, 및 존재한다면 존재하는 다른 질환을 포함하나 이에 한정되지 않는 특정 인자들이 피실험자를 효과적으로 치료하는데 요구되는 투여량에 영향을 미칠 수 있다는 것을 명백히 알 수 있다. 더욱이, 본 발명의 치료학적 유효량의 화합물로 피실험자를 치료하는 것은 단일 치료를 포함할 수 있으며, 바람직하게 일련의 치료를 포함할 수 있다. 하나의 실시예에서, 피실험자는 약 1 내지 10 주 동안, 바람직하게 2 내지 8 주, 더 바람직하게 약 3 내지 7 주, 좀 더 바람직하게 약 4, 5 또는 6 주 동안, 1 주 당 1 회로 약 0.1 과 20 mg/kg 체중 사이의 양의 본 발명의 화합물로 치료한다. 또한 치료하기 위해 사용되는 화합물의 유효 투여량은 특정 치료 기간 중에 증가시키거나 감소시킬 수 있다는 것이 명백하다.

본 발명의 방법은 맥관형성 질환을 치료하기 위해 공지된 또다른 약학적으로 활성인 화합물, 예를 들어, 탁솔, 파클리탁셀 또는 악티노마이신 D 와 같은 화학요법제, 또는 톨부타미드와 같은 당뇨병치료제 ; 또는 헤파린 또는 황산화 시클로텍스트린과 같은, 본 발명의 화합물의 활성도를 강화시킬 수 있는 화합물과 조합하여 치료학적 유효량의 혈관형성 저해 화합물을 피실험자에게 투여함을 추가로 포함한다. 사용할 수 있는 다른 약학적으로 활성인 화합물은 본원에 참고문헌으로 인용되어 있는 Harrison's Principles of Internal Medicine, Thirteenth Edition, Eds. T.R. Harrison 등의 McGraw-Hill : N.Y., NY ; 및 the Physicians Desk Reference 50th Edition 1997, Oradell, New Jersey, Medical Economics Co. 에 기재되어 있다. 본 발명의 화합물 및 이외의 약학적으로 활성인 화합물은 동일한 약학적 조성물 또는 상이한 약학적 조성물(동시에 또는 상이한 시간에)로 피실험자에게 투여할 수 있다.

약학적 조성물

본 발명은 또한 하나 또는 그 이상의 본 발명의 화합물을 함유하는 약학적으로 용인가능한 제형을 제공한다. 이러한 약학적으로 용인가능한 제형은 일반적으로 하나 또는 그 이상의 본 발명의 화합물 뿐만 아니라 약학적으로 용인가능한 담체 및/또는 부형제를 함유한다. 본원에 사용한 바와 같이, "약학적으로 용인가능한 담체" 는 모든 용매, 분산매, 코팅제, 향균제 및 향진균약, 등장 제제 및 흡수 지연제, 및 생리적으로 적합한 다른 물질들을 포함한다. 약학적으로 활성인 물질에 대한 배지 및 제제의 사용은 본 분야에 널리 공지되어 있다. 본 발명의 화합물에 부합되지 않는 특정 통상적인 배지 또는 제제를 제외하면, 약학적 조성물 내에 상기 물질들을 사용할 수 있다.

맥관형성 질환을 치료하기 위한 공지되어 있는 추가적인 약학적으로 활성인 화합물, 예를 들어, 탁솔, 파클리탁셀 또는 악티노마이신 D 와 같은 화학요법제, 또는 톨부타미드와 같은 당뇨병치료제 ; 또는 헤파린 또는 황산화 시클로텍스트린과 같은, 혈관형성 저해 화합물의 혈관형성 저해 활성도를 강화시킬 수 있는 화합물도 본 발명의 조성물과 혼합시킬 수 있다. 사용할 수 있는 적합한 약학적으로 활성인 화합물은 Harrison's Principles of Internal Medicine(상기 문헌)에 기재되어 있다.

본 발명의 약학적 조성물은 의도된 투여 경로에 적합하도록 제형화시킨다. 투여 경로의 예는 비경구 투여, 예를 들어, 정맥내, 피내, 피하, 경구(예를 들어, 흡입), 경피성(국소적), 점막 및 직장 투여를 포함한다. 비경구, 피내 또는 피하 투여하기 위해 사용되는 액제 또는 현탁제는 다음의 성분을 포함한다 : 주사용 물, 염류 용액, 지방유, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 다른 합성 용매와 같은 멸균 희석제 ; 벤질 알콜 또는 메틸 파라벤과 같은 향균제 ; 아스코르브산 또는 이황산수소나트륨과 같은 항산화제 ; 에틸렌디아민테트라아세트산과 같은 킬레이트제 ; 아세테이트, 시트레이트 또는

포스페이트와 같은 완충용액 ; 및 염화나트륨 또는 텍스트로스와 같은 장성(tonicity)을 조절하기 위한 제제. pH는 염산 또는 수산화나트륨과 같은 산 또는 염기로 조절할 수 있다. 비경구 제제는 앰플, 일회용 주사기 또는 유리 또는 플라스틱으로 제조한 다중 투여 작은 병에 보관할 수 있다.

주사하기에 적합한 약학적 조성물은 멸균 수성 용액(물에 용해가능함), 또는 주사용 멸균 용액이나 분산제로 즉석 제조하기 위한 분산제 및 멸균 분말을 포함한다. 정맥내 투여하기 위해, 적합한 담체는 생리 식염수, 정균수, Cremophor EL™ (뉴저지 파시페니에 소재하는 BASF 에서 입수) 또는 인산완충식염수(PBS)를 포함한다. 모든 경우에 있어서, 약학적 조성물은 멸균시켜야 하며 용이한 주사가가능성이 존재하는 범위 내의 유동성을 가져야 한다. 상기 조성물은 제조 및 저장 조건 하에서 안정해야 하며 박테리아 및 곰팡이와 같은 미생물의 오염 작용에 대하여 보호되어야 한다. 상기 담체는 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액상 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 상기 물질의 적합한 혼합물을 포함하는 용매 또는 분산매이다. 적절한 유동성은 레시틴과 같은 코팅제를 사용하거나 분산시키는 경우 요구되는 입자 크기를 유지시키거나 계면활성제를 사용하여 유지할 수 있다. 미생물의 작용은 다양한 항균제 및 항진균약, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산 및 티메로살에 의해 억제시킬 수 있다. 많은 경우에 있어서, 조성물은 등장성 제제, 예를 들어, 설탕, 만니톨이나 소르비톨과 같은 폴리알콜 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직하다. 주사가가능한 조성물의 서방성은 조성물 내에 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어, 모노스테아르산알루미늄 및 젤라틴을 포함시킴으로써 획득할 수 있다.

주사가가능한 멸균 용액은 단독 또는 상기한 성분들과 조합하여 적합한 용매 내로 요구되는 양의 본 발명의 화합물을 혼합시킨 다음 여과 멸균시켜 제조할 수 있다. 일반적으로, 분산제는 기본 분산매 및 상기한 성분들 중 필요한 다른 성분을 포함하는 멸균 부형제 내로 혈관형성 저해 화합물을 혼합시켜 제조한다. 멸균 주사가가능한 용액을 제조하기 위한 멸균 분말의 경우에, 바람직한 제조방법은 미리 멸균-여과시킨 이의 용액으로부터 모든 부가적인 바람직한 성분에 더하여 혈관형성 저해 화합물의 분말을 수득하는 진공 건조 및 동결-건조 방법이다.

경구용 조성물은 일반적으로 불활성 희석제 또는 식용 담체를 포함한다. 이러한 경구용 조성물을 젤라틴 캡슐 내에 넣거나 정제 내에 압축시켰다. 경구용 치료학적 투여의 목적을 위해, 혈관형성 저해 화합물을 부형제와 함께 혼입할 수 있으며 정제, 구내정 또는 캡슐의 형태로 사용할 수 있다. 경구용 조성물은 또한 장용코팅(enteric coating)을 포함한다. 경구용 조성물은 또한 함수제로서 사용하기 위해 액체의 담체를 사용하여 제조할 수 있으며, 상기 액체의 담체에 용해시킨 혈관형성 저해 화합물을 경구적으로 적용하고 입안을 헹구고 뱉거나 삼킬 수 있다.

약학적으로 양립가능한 결합제 및/또는 아췌반트 물질을 조성물의 일부로서 포함할 수 있다. 정제, 환제, 캡슐, 구내정 및 그밖의 제제는 다음의 성분 또는 유사한 성질의 화합물을 포함할 수 있다 : 미정질 셀룰로스, 트라가칸드 고무 또는 젤라틴과 같은 결합제 ; 녹말 또는 락토스와 같은 부형제 ; 알긴산, 프리모젤(Primogel) 또는 옥수수 전분과 같은 붕해제 ; 스테아르산마그네슘 또는 스테로츠(Sterotes)와 같은 윤활제 ; 콜로이드성 이산화규소와 같은 활택제 ; 수크로스 또는 사카린과 같은 감미제 ; 박하, 살리실산메틸 또는 오렌지 향미와 같은 향미료. 흡입에 의한 투여에서, 혈관형성 저해 화합물을 적절한 분사제, 예를 들어 이산화탄소와 같은 가스 또는 분무기를 함유하는 가압시킨 용기 또는 혼합장치로부터 에어로졸 분무의 형태로 수송할 수 있다.

경점막(transmucosal) 또는 경피적인 방법에 의해 또한 전신 투여할 수 있다. 경점막 또는 경피 투여를 위해, 장벽을 침투하기에 적합한 침투제를 제형에서 사용하였다. 이러한 침투제는 일반적으로 본 분야에서 공지되어 있으며, 예를 들어, 경점막 투여용 세정제, 담즙산염 및 푸시딘산 유도체를 포함한다. 경점막 투여는 비내 분무(nasal spray) 또는 좌제의 사용을 통하여 수행할 수 있다. 경피 투여를 위해, 혈관형성 저해 화합물을 일반적으로 본 분야에서 공지된 바와 같은 연고, 납고(salve), 겔 또는 크림으로 제형화시켰다.

본 발명의 약학적 조성물을 또한 직장 수송을 위해 좌제(예를 들어, 코코아 버터 및 그밖의 글리세리드와 같은 일반적인 좌제 기제와 함께) 또는 정제 관장제(retention enemas)의 형태로 제조할 수 있다.

하나의 실시형태에서, 혈관형성 저해 화합물을 삼입물 및 마이크로캡슐화시킨 수송 시스템을 포함하는 서방성 제형과 같이 신체로부터의 화합물이 빠르게 제거되는 것에 대비하여 화합물을 보호할 수 있는 담체와 함께 제조하였다. 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산과 같은 생물분해성 및 생체적합성 중합체를 사용할 수 있다. 이러한 제형의 제조방법은 본 분야에서 숙련자에게 명백할 것이다. 이러한 물질은 또한 Alza Corporation 및 Nova Pharmaceuticals, Inc로부터 상업적으로 입수할 수 있다. 리포솜 현탁액을 또한 약학적으로 용인 가능한 담체로서 사용할 수 있다. 이러한 물질을 본 분야의 숙련자에게 공지된 방법, 예를 들어, 이의 내용이 본원의 참고 문헌으로 인용된 미국 특허 번호 제 4,522,811 호, 미국 특허 번호 제 5,455,044 호, 미국 특허 번호 제 5,576,018 호 및 미국 특허 번호 제 4,883,666 호에 따라 제조할 수 있다.

본 발명의 화합물을 또한 적어도 몇 주 내지 한 달 또는 그 이상의 기간 동안 피실험자에서 혈관형성 저해 화합물의 서방성 방출을 가능하게 하는 약학적 조성물 내에 혼입시킬 수 있다. 이러한 제형은 이의 내용이 본원에 참고문헌으로 인용된 미국 특허 번호 제 5,968,895 호에 기재되어 있다.

이는 투여의 용이함 및 투여량의 균일성을 위해 단위 약제학적 제형으로 경구용 또는 비경구용 조성물을 제형화시키는데 특히 유리하다. 본원에서 사용된 바와 같은 단위 약제학적 제형은 피실험자를 치료하기 위한 단일 투여량으로서 적합한 물리적으로 분리된 단위를 의미하며; 본 발명의 하나 또는 그 이상의 화합물의 예비측정된 양을 함유하는 각각의 단위는 요구되는 약학적 담체와 관련된 바람직한 치료학적 효과를 나타내기 위해 계산되었다. 본 발명의 단위 약제학적 제형의 규격화는 치료학적 화합물 및 성취될 수 있는 특정 치료학적 효과의 유일한 특성 및 각각의 질병의 치료에 대한 이러한 화합물의 조합의 본 분야에서의 고유한 한정에 의해 규정되며 이들에 따라 좌우된다.

이러한 화합물의 독성 및 치료학적 효능을 예를 들어, LD50(50 %의 집단에 대한 치사 투여량) 및 ED50(50 %의 집단에서 치료학적으로 유효한 투여량)을 측정하기 위해 세포 배양 또는 실험 동물에서 표준 약학적인 방법으로 측정할 수 있다. 독성 및 치료학적 효과 사이의 투여량비는 치료 계수이고 이는 LD50/ED50의 비율로서 표현할 수 있다. 높은 치료 계수를 나타내는 본 발명의 화합물이 바람직하다. 독성 부작용을 나타내는 화합물을 사용할 수 있지만, 감염되지 않은 세포에 대한 잠재적인 손상을 최소화하기 위해 이러한 화합물이 감염된 조직의 부위를 표적으로 하는 수송 시스템을 설계하기 위해 주의해야 하며, 이에 의해 부작용을 감소시킬 수 있다.

세포 배양 검정 및 동물 연구로부터 수득한 데이터를 인체에서 사용하기 위한 투여량의 범위를 제형화하기 위해 사용할 수 있다. 본 발명의 화합물의 투여량은 약간의 독성을 갖거나 독성이 없는 ED50을 포함하는 순환 농도의 범위 내에서 바람직하게 존재한다. 투여량은 사용된 약제학적 제형 및 이용된 투여경로에 따라 이러한 범위 내에서 다양하다. 본 발명의 방법에서 사용된 모든 화합물에 대해, 치료학적으로 유효한 투여량을 세포 배양 검정으로부터 초기에 측정할 수 있다. 세포 배양에서 측정된 바와 같이 IC50(즉, 증상의 반-최대 저해를 성취하는 화합물의 농도)을 포함하는 순환 혈장 농도 범위를 획득하기 위해 동물 모델에서 투여량을 제형화시킬 수 있다.

인체에서 유용한 투여량을 보다 정확하게 측정하기 위해 이러한 정보를 사용할 수 있다.

혈장에서의 수준을 예를 들어, 고성능 액체 크로마토그래피로 측정할 수 있다.

본 발명의 화합물의 활성도를 측정하기 위한 검정

본 발명의 화합물을 공지된 다양한 검정, 예를 들어 랫 대동맥환 혈관형성 저해 검정 또는 용모막(CAM) 검정으로 혈관형성을 조절(예를 들어, 저해 또는 자극)하기 위한 본 발명의 화합물의 능력을 측정하기 위해 시험하였다. CAM 검정을 이의 내용이 본원의 참고문헌으로 인용된 Liekens S. 등의 (1997) Oncology Research 9 : 173-181에 기재된 바와 같이 필수적으로 실시할 수 있다. 간단하게, 막 낀 수정시킨 달걀을 3일 동안 37 °C에서 배양하였다. 3일째되는 날에, 껍질을 깨뜨리고 달걀을 조직 배양 플레이트에 두고 38 °C에서 배양하였다. 검정을 위해, 시험할 혈관형성 저해 화합물을 나일론 메쉬(nylon mesh)에서 콜라겐의 매트릭스에 부착시켰다. 그리고 난 다음에 용모막을 떼기 위해 메쉬를 사용하였고 달걀을 37 °C에서 배양하였다. 만약 혈관형성이 발생하였다면, 새로운 모세관이 형성되고 메쉬를 통하여 24시간 내에 성장한다. 그리고 난 다음에, 혈관형성(예를 들어, FGF-유도 혈관형성)을 조절(예를 들어, 저해)하기 위해 (다양한 농도에서의) 혈관형성 저해 화합물의 능력을 측정할 수 있다.

본 발명의 화합물을 인체 내피세포 성장을 조절(예를 들어, 저해 또는 자극)하기 위한 화합물의 능력을 측정하기 위해 또한 시험하였다. 인체 태줄정맥 내피세포(HUVEC)를 트립신-함유 배지에서 태줄정맥의 관류에 의해 분리하였다. 그리고 난 다음에, 2.5 %의 우태아 혈청 및 2.0 ng/ml의 재조합 인체 기저 섬유아세포 증식인자(rbFGF, 일본 오사카 다케다에 소재하는 Biotechnology Research Laboratories에서 입수)로 보충한 GIT 배지(일본에 소재하는 Diago Eiyuu Kagaku, Co.에서 입수)에서 5 % CO₂ 및 7 % O₂ 하에서 HUVEC를 37 °C에서 배양하였다. 그리고 난 다음에 HUVEC를

2×10³/100 μl의 세포 밀도로 이루어진 배지에서 96 웰 마이크로플레이트(Nunc에서 입수, 제 1-67008호)에 도말하였다. 다음 날에, rbFGF(최종의 농도에서 2 ng/ml) 및 다양한 농도의 각각의 혈관형성 저해 화합물을 함유하는 100 μl의 배지를 각각의 웰에 첨가하였다. 혈관형성 저해 화합물을 디메틸설폭사이드(DMSO)에 용해시키고 난 다음에 최종의 DMSO 농도가 0.25 %를 초과하지 않게 하기 위해 배양 배지로 희석하였다.

5 일 동안 배양시킨 후에, 배지를 제거하고 100 μ l 의 1 mg/ml 의 MTT(3-(4,5-디메틸-2-티아졸일)-2,5-디페닐-2H-테트라졸리움 브로마이드)용액을 웰에 첨가하고 마이크로플레이트를 4 시간 동안 37 °C 에서 두었다. 그리고 난 다음에, 100 μ l 의 10 % 도데실황산 나트륨(SDS) 용액을 웰에 첨가하고 마이크로플레이트를 5 시간 내지 6 시간 동안 37 °C 에서 두었다. 세포의 수에서 혈관형성 저해 화합물의 효과를 측정하기 위해, 590 nm 에서 각각의 웰의 광학 밀도를 광학 밀도계를 사용하여 측정하였다.

생체외에서 모세관 내피세포 이동을 조절하기 위해 본 발명의 혈관형성 저해 화합물의 능력을 보이덴 상자(Boyden chamber) 검정을 사용하여 또한 시험하였다[이의 내용이 본원의 참고문헌으로 인용된 Falk 등의 (1980) J Immunol. Meth. 33:239-247 에 기재되어 있음]. 간단하게, 피브로넥틴(7.3 μ g 피브로넥틴/ml PBS)으로 예비-코팅시킨 핵공 필터(nucleopore filter)의 한 면에서 혈청-유리 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)에 웰 당 1.5×10^4 세포로 소 모세관 내피세포를 도말하였다. 혈관형성 저해 화합물을 에탄올에 용해시키고 에탄올의 최종 농도가 0.01 % 를 초과하지 않게 하기 위해 DMEM 에서 희석하였다. 혈청-유리 DMEM 에서 200 μ g/ml 의 내피의 마이토젠(Biomedical Technologies, Mass. 에서 입수) 및 상이한 농도의 혈관형성 저해 화합물에 세포를 4 시간 동안 37 °C 에서 노출시켰다. 배양이 종결된 시점에서, 필터에서 8 마이크론 기공을 따라 이동한 세포의 수를 100 x 에서 접안렌즈 그리드(ocular grid)로 세포를 4 번 계수하여 측정하였다.

종양 성장을 조절하기 위한 본 발명의 화합물의 능력을 생체 내에서 시험하였다. 동물 모델, 예를 들어 마우스 세망세포 육종(M 5076)을 복강 내에 이식시킨 C57BL/6N 마우스를 사용하였다. 복수에서의 종양세포를 원심분리하여 수집하고 생리 식염수에서 현탁시켰다. 세포 현탁액(2×10^6 세포/100 μ l/마우스)을 마우스의 오른쪽 옆구리에 접종하였다. 종양 접종 후에 첫 날부터 시작하여 12 일 동안 종양을 가지고 있는 마우스에게 시험 화합물(1 % 에탄올을 함유하는 5 % 아라비아 고무 용액에서 다양한 농도로 현탁시킴)을 피하적으로 투여하였다.

종양 성장을 몇 일 간격으로 캘리퍼(caliper)를 가지고 두 방향에서 종양의 크기를 측정하였다.

최종적으로, MetAP2 의 활성도를 조절하는 본 발명의 화합물의 능력을 다음과 같이 시험하였다. 재조합 인체 MetAP2 를 Li 및 Chang, (1996) Biochem. Biophys. Res Commun. 227:152 에 기재되어 있는 바와 같이 발현시키고 곤충 세포로부터 정제하였다. 그리고 난 다음에, 다양한 양의 시험 화합물을 1 nM 의 정제된 재조합 인체 MetAP2 를 함유하는 완충액 H(10 mM Hepes, pH 7.35, 100 mM KCl, 10 % 글리세롤 및 0.1 M Co^{2+})에 첨가하고 37 °C 에서 30 분 동안 배양하였다. 효소 반응을 시작하기 위해, 메티오닌 잔기(예를 들어, Met-Gly-Met)를 함유하는 펩티드를 반응 혼합물(1 mM 의 농도)에 첨가하였다. 방출된 메티오닌을 Zou 등의 (1995) Mol. Gen. Genetics 246:247-253 의 방법을 사용하여 상이한 시점(예를 들어, 0, 2, 3 및 5 분)에서 순차적으로 정량하였다.

본 발명을 다음의 실시예로 추가로 설명하였으나 이로 인하여 본 발명을 제한하는 것으로 이해하지는 말아야 한다. 도면 뿐만 아니라 본 출원서에서 인용된 모든 참고문헌, 특허 및 공개된 특허 명세서의 내용은 본원의 참고문헌으로 포함한다.

본 발명의 다양한 양상을 다음의 세분된 실시예에서 추가로 상세히 기재하였다.

실시예

실시예 1 : 화합물 2 의 합성

본원에서 특허 문헌의 전체 내용을 참고문헌으로 인용하고 있는 미국 특허 번호 제 6,548,477 호의 실시예 5 에 설명한 바와 같이 화합물 1 을 합성하였다. 화합물 1(1.0 g, 2.36 mmole)을 20 mL 의 1,4 디옥산에 용해시켰다. 디옥산에 용해시킨 4.0 M HCl(0.65 mL, 2.59 mmole, 1.1 equiv.)을 교반시킨 용액에 첨가하였고 반응물을 진공에서 농축시킨 후에 추가로 15 분 동안 교반시켰다. 물에 용해시킨 20 % 아세트오니트릴로부터 이를 동결건조시키고 아세트오니트릴-물 기울기를 이용한 역상 예비 HPLC 하여 정제하였다.

실시예 2 : 화합물 3 의 합성

화합물 1(502 mg, 1.2 mmole)을 질소로 가득찬 50 mL 둥근바닥 플라스크에서 10 mL 의 1,4 디옥산에 용해시켰다. 디옥산에 용해시킨 4.0 M HCl(0.73 mL, 2.92 mmole, 2.5 equiv.)을 교반시킨 용액에 첨가하고, LC-MS 가 출발 물질이 완전

히 소실됨을 보여주는 시점에서 반응물을 추가로 2 시간 동안 교반시켰다. 반응 혼합물을 진공에서 농축시켜 화합물 3 으로 변환시키기 위해 충분히 순수한(pure) 농축된 백색의 오일을 수득하였다. 선택적으로, 반응 혼합물을 아세토니트릴-물 기울기를 이용한 역상, 예비 HPLC 하여 정제할 수 있다.

실시예 3 : 화합물 4 의 합성

화합물 3(500 mg, 1.2 mmole)을 질소로 가득찬 50 mL 둥근바닥 플라스크에서 8.0 mL 의 건조 THF 에 용해시켰다. 칼륨 t-부톡사이드(251 mg, 2.3 mmole)를 첨가하고, LC-MS 가 출발 물질이 완전히 소실됨을 보여주는 시점에서 반응 혼합물을 1 시간 동안 교반시켰다. 반응 혼합물을 환산 압력에서 농축시키고 디클로로메탄에서 재현탁시켰다. 유기층을 2 x 포화된 탄산수소나트륨, 2 x 물 및 2 x 염수로 세척하고 난 다음에 황산나트륨 상에서 건조시키고 농축시켜 투명한 농축된 오일을 수득하였다. 반응 혼합물을 아세토니트릴-물 기울기를 이용한 역상, 예비 HPLC 하여 정제하였다.

실시예 4 : 화합물 5 의 합성

아세트산 수은(II)(319 mg, 1.0 mmole)을 1 mL 의 물에 용해시켰다. THF(1 mL)를 첨가하여 주황색 현탁액이 형성되었다. 실온에서 5 분 동안 교반시킨 후에, 화합물 1(424 mg, 1.0 mmole)을 일부분에 첨가하였다. 용액은 즉시 맑아졌다. 한 시간 동안 실온에서 교반시킨 후에, 반응물을 얼음 욕조에서 냉각시키고 3 N NaOH(1 mL)를 첨가한 다음 1 mL 의 3 N NaOH 에 용해시킨 수소화붕소 나트륨(19 mg, 0.5 mmole, 2 equiv.)을 첨가하였다. 또다른 시간 동안 교반시킨 후에, 침전된 수은의 제거를 용이하게 하기 위해 반응 혼합물을 분별 깔때기에 밤새 두었다. 염수를 에테르로 두 번 추출한 수성층에 첨가하였다. 결합된 유기 추출물을 염수로 세척한 다음에 $MgSO_4$ 상에서 건조시키고 농축시켜 백색의 폼(foam)을 수득하였다. 산물을 아세토니트릴-물 기울기를 이용한 역상, 예비 HPLC 하여 정제하였다.

실시예 5 : 내피세포의 증식 저해

본 발명의 일련의 화합물을 인체 내피세포의 성장을 조절하기 위한 본 발명의 화합물의 능력을 측정하기 위해 시험하였다. 이러한 검정에 대해, 37 °C 의 축축한 배양기에서 인체 태줄정맥 내피세포(HUVEC)를 Clonetics 내피 성장 배지(EGM)에서 유지하였다. 세포를 트립신으로 분리하고 실온에서 5 분 동안 300 xg 로 원심분리하여 펠렛화시켰다. HUVEC 를 5,000 세포/웰로 96 웰 플레이트에 첨가하였다. 6 시간 동안 배양한 후에, 0.5 nM bFGF 로 보충한 0.2 ml 의 새로운 EGM 및 요구되는 농도의 시험 화합물로 배지를 교체하였다. 시험 화합물을 10 mM 또는 0.1 mM 의 스톱 농도로 에탄올에 처음 용해시키고, 연속적으로 1 pM 내지 10 μ M 의 농도를 수득하기 위해 EGM 에 희석하였다. 37 °C 에서 48 시간 후에, 배지를 새로운 bFGF-보충된 EGM 및 시험 화합물로 교체하였다. 37 °C 에서 추가적인 48 시간 동안 배양한 후에, MTT(3-[4,5-디메틸티아졸일]-2,5-디페닐-테트라졸리움 브로마이드)를 1 mg/ml 로 첨가하였다. 37 °C 에서 2-4 시간 후에, 배지를 0.1 ml/웰 이소프로판올로 교체하였다. 플레이트를 실온에서 진탕기에 15 분 동안 두고 광학 밀도를 측정하기 위해 570 nm 에서 Labsystems Multiskan 플레이트 분광광도측정법으로 분석하였다.

도 1 에서 설명한 검정의 결과는 본 발명의 화합물이 나노몰 농도에서 내피세포 성장을 저해할 수 있음을 증명한다.

등가물

본 발명의 숙련자는 본원에 기재된 본 발명의 특정 실시형태에 대한 많은 등가물을 인지할 수 있으며 단지 일반적인 실험을 사용하여 확인할 수 있다. 이러한 등가물은 다음의 청구의 범위에 의해 포함함을 의도하였다.