

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07K 5/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480039391.2

[43] 公开日 2007 年 1 月 24 日

[11] 公开号 CN 1902215A

[22] 申请日 2004.12.29

[21] 申请号 200480039391.2

[30] 优先权

[32] 2003.12.29 [33] US [31] 60/533,431

[86] 国际申请 PCT/US2004/043586 2004.12.29

[87] 国际公布 WO2005/066197 英 2005.7.21

[85] 进入国家阶段日期 2006.6.29

[71] 申请人 普雷西斯药品公司

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 查尔斯·汤普森

克里斯托弗·C·阿里科·马恩德尔

[74] 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
代理人 陈文平

权利要求书 5 页 说明书 21 页

[54] 发明名称

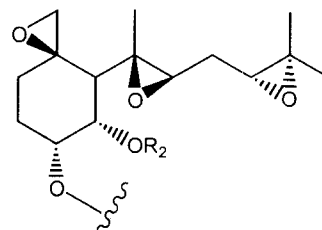
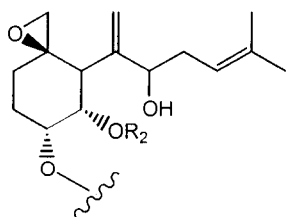
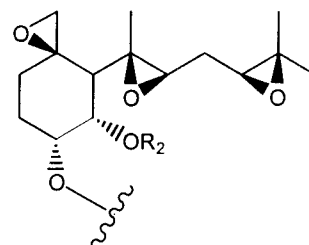
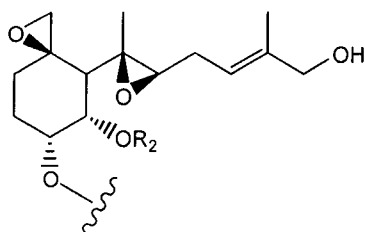
甲硫氨酸氨肽酶-2 的抑制剂及其用途

[57] 摘要

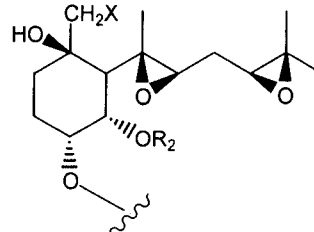
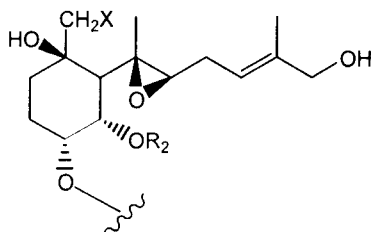
本发明提供用于治疗患有多种疾病之一的患者的组合物和方法，该疾病包括血管生成性疾病，如癌症、自身免疫病或寄生虫感染。

1. 一种式A-B的化合物或其药物可接受的盐，其中
A是选自下组的基团

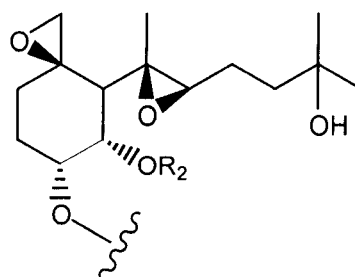
5



10



和

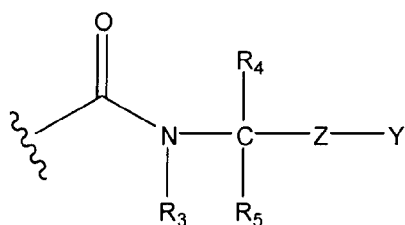


15

其中 R_2 是氢或 C_1 - C_6 -烷基, X是卤素、二烷基硫鎓、硫代烷氧基或硫代芳氧基, 且

B是烷基、芳基、氨基甲酰基或取代的氨基甲酰基。

2. 权利要求1的化合物, 其中B是下式的基团



其中

R_3 是氢或烷基;

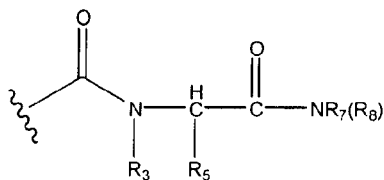
R_4 和 R_5 各自独立地是氢、取代的或未取代的烷基、取代的或未取代的芳基、取代的或未取代的芳烷基、取代的或未取代的杂芳基、或取代的或未取代的杂烷基; 或

R_3 和 R_5 一起形成亚烷基;

Z是 $-C(O)-$ 或 $-$ 亚烷基 $-C(O)-$; 且

P是 $-OR_6$ 或 $-N(R_7)R_8$, 其中 R_6 、 R_7 和 R_8 各自独立地是氢、取代的或未取代的烷基、取代的或未取代的芳基、或取代的或未取代的氮杂环烷基, 或者 R_7 和 R_8 与它们所连接的氮原子一起形成杂环结构。

3. 权利要求1的化合物, 其中B是以下结构的基团



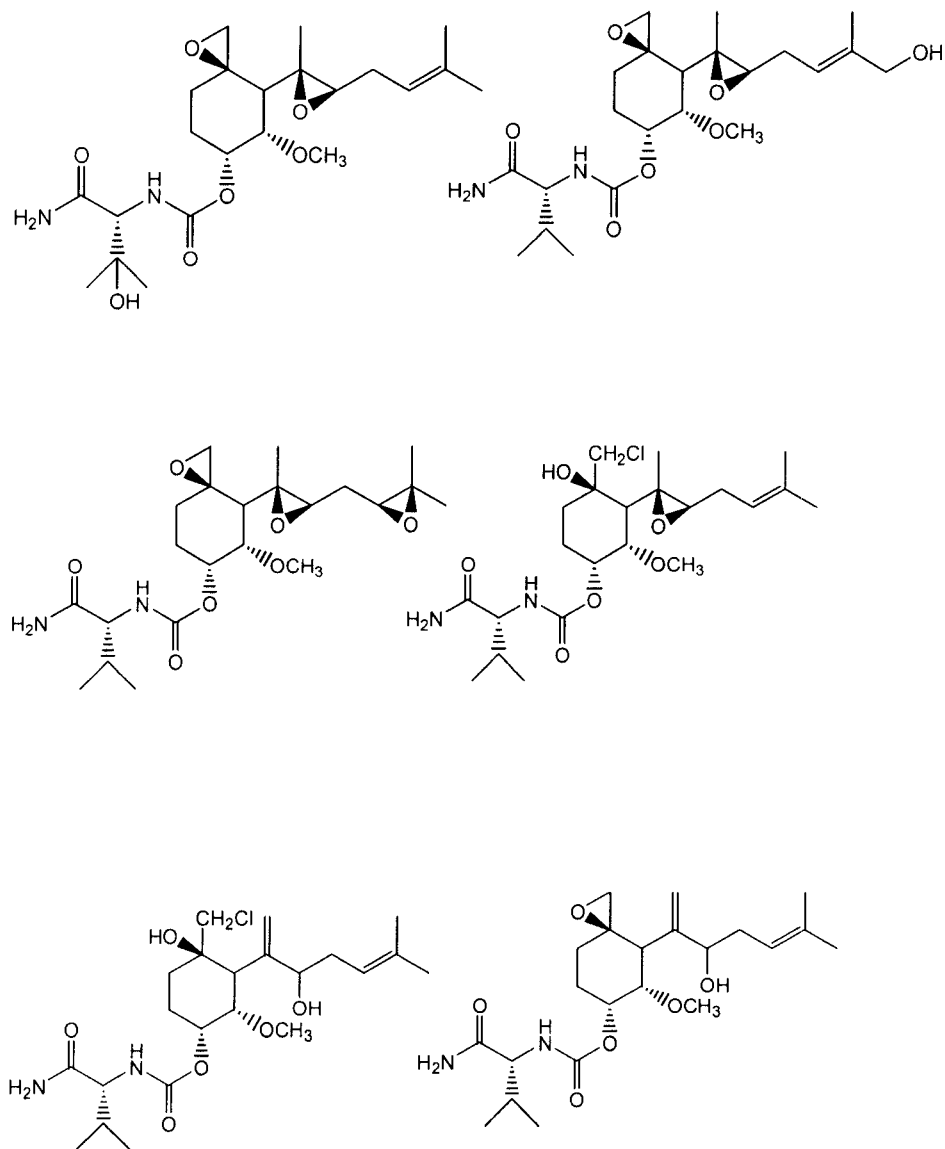
其中 R_5 是取代的或未取代的直链、支链或环状 C_1 - C_6 -烷基、芳基、芳烷基或杂芳基; 或者 R_3 和 R_5 一起形成 C_3 - C_6 -亚烷基。

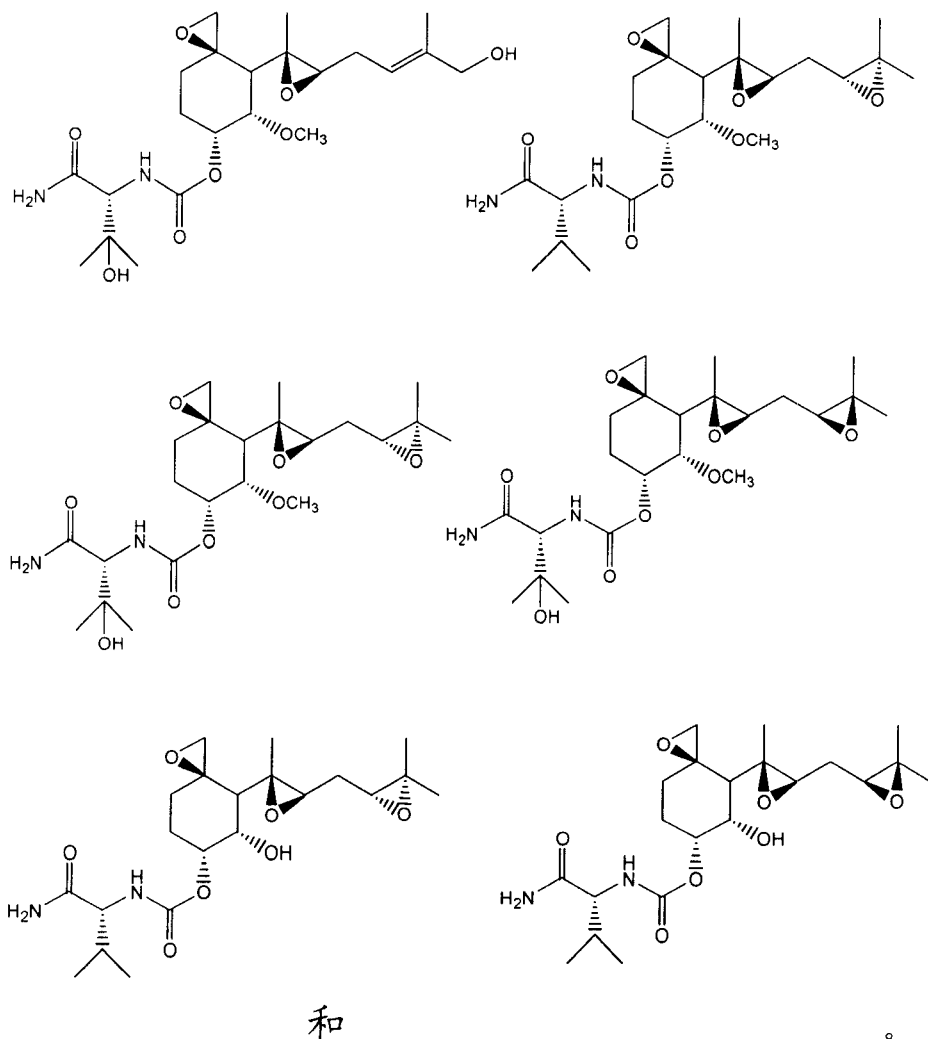
4. 权利要求3的化合物, 其中

R_5 是直链或支链的 C_1 - C_6 -烷基、羟基取代的直链或支链 C_1 - C_6 -烷基；且

R_3 、 R_7 和 R_8 各自为氢。

5. 一种选自下组的化合物





6. 含有权利要求1或2的化合物和药物可接受的载体的药物组合物。

7. 一种治疗患者的血管生成性疾病的方法，包括向该患者施用治疗有效量的权利要求1或2的化合物的步骤。

8. 权利要求7的方法，其中所述血管生成性疾病是癌症。

9. 权利要求8的方法，其中所述血管生成性疾病是淋巴瘤。

10. 一种治疗患者的自身免疫病的方法，包括向该患者施用治疗有效量的权利要求1或2的化合物的步骤。

11. 权利要求10的方法，其中所述自身免疫病是类风湿性关节炎、牛皮癣或多发性硬化症。

12. 一种治疗患者的寄生虫感染的方法，包括向该患者施用治疗有效量的权利要求1或2的化合物的步骤。

13. 权利要求12的方法，其中所述感染是由选自疟原虫属的种和利什曼原虫属的种的寄生虫引起的。

甲硫氨酸氨肽酶-2 的抑制剂及其用途

相关申请

本申请要求 2003 年 12 月 29 日提交的美国临时申请系列号 60/533,431 的优先权, 该临时申请的全部内容在此引用作为参考。

发明背景

血管生成是形成新血管的基本过程, 并且对于多种正常机体活动(例如生殖、发育和创伤修复)是必不可少的。虽然对于该过程并未完全了解, 但认为它涉及刺激以及抑制内皮细胞—毛细血管的原代细胞—生长的多种分子的复杂的相互作用。在正常条件下, 这些分子似乎在较长时期内维持静息状态(即无毛细管生长的状态)的微血管系统, 所述时期可以持续长达数周, 或者在某些情况下长达数十年。然而, 必要时(例如在创伤修复期间), 这些细胞可以在5天的时期内经历快速增殖和更新(Folkman, J. 和 Shing, Y., *Journal of Biological Chemistry*, 267(16): 10931-10934, 以及 Folkman, J. 和 Klagsbrun, M. (1987) *Science*, 235: 442-447)。

虽然血管生成在正常条件下是一种受高度调控的过程, 但许多疾病(鉴定为“血管生成性疾病”)由持续不受调控的血管生成而引起, 或者以此为特征。换句话说, 不受调控的血管生成可能或者直接引起特定疾病, 或者使已有的病理病症恶化。例如, 已有提示眼新血管形成为失明的最常见的病因, 引起大约20种眼病。在某些已有的病症例如关节炎中, 新形成的毛细血管侵入关节并破坏软骨。在糖尿病中, 在视网膜中新形成的毛细管侵入玻璃体、出血并且致盲。实体瘤的生长和转移也依赖于血管生成(Folkman, J. (1986) *Cancer Research* 46: 467-473, 以及 Folkman, J. (1989) *Journal of the National Cancer Institute* 82: 4-6)。例如已经表明, 生长至超过2毫米大小的肿瘤必须获得其自

身的血液供应，它是通过诱导新毛细血管生长而达到这一点的。一旦这些新血管包埋入肿瘤中，则它们为肿瘤细胞提供营养，并且可以作为肿瘤细胞进入循环以及转移至较远部位例如肝、肺或骨的工具 (Weidner, N.等(1991) *The New England Journal of Medicine* 324(1):1-8)。

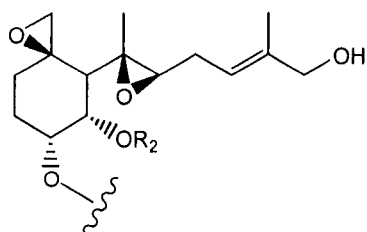
烟曲霉素是一种已经用作抗微生物剂和抗原生动物剂的已知化合物。其理化特性和生产方法是众所周知的(美国专利2,803,586号和 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (1962) 48:733-735)。已有报道烟曲霉素和某些类型的烟曲霉素类似物表现出抗血管生成活性。然而，这类抑制剂(例如，TNP-470)的应用可能由于其快速代谢降解、不稳定的血液浓度和剂量限制性中枢神经系统(CNS)副作用而受到限制。

因此，仍需要更有效、神经毒性更低、更稳定和/或血清半寿期更长的血管生成抑制剂。

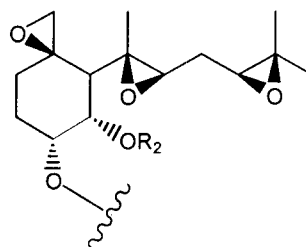
发明概述

本发明提供用于治疗患有多种疾病之一的患者的组合物和方法，该疾病包括血管生成性疾病，如癌症、自身免疫病或寄生虫感染。

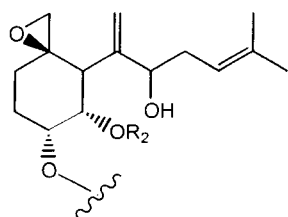
在一个实施方案中，本发明提供通式A-B的化合物，其中A是具有如下式 I-VII 之一所示的结构基团：



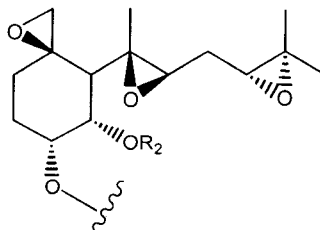
I



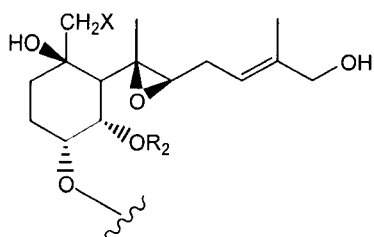
II



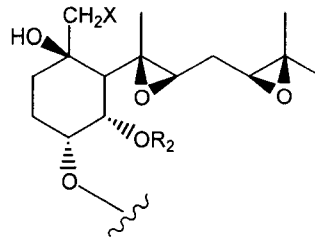
III



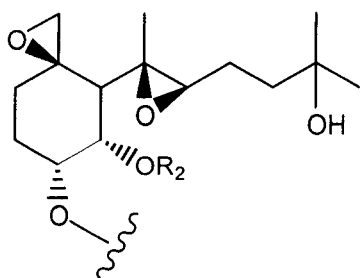
IV



V



VI



VII

在式I至VI的每一个中，处于环己烷环底部（即I、II、III、IV和VII中相对于螺环环氧基团的4位，或V和VI中相对于-CH₂X基团的4位）的氧原子是对于B的连接点，R₂是氢或C₁-C₆-烷基，优选甲基。在式VI中，X是卤素原子、二烷基硫鎓基、硫代烷氧基、硫代芳氧基或其他合适的离去基团。优选地，X是溴、氯或碘。更优选地，X是氯。

B是烷酰基、芳酰基、烷氧羰基、氨基甲酰基或N-取代的氨基甲酰基。

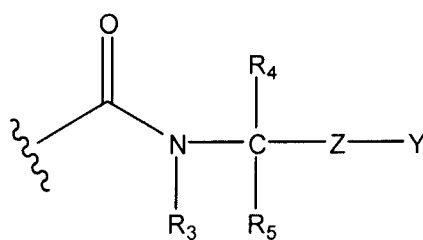
本发明也提供含有一种或多种式A-B的化合物和药物可接受的载体的药物组合物，应用这些化合物和药物组合物治疗多种疾病和病症的方法，这些疾病包括血管生成性疾病，如各种癌症、淋巴瘤和特征为不适当的血管形成的疾病，和自身免疫病，如类风湿性关节炎和牛皮癣。

根据以下详细描述和权利要求书来看，本发明的其他特征和优点将是显而易见的。

发明详述

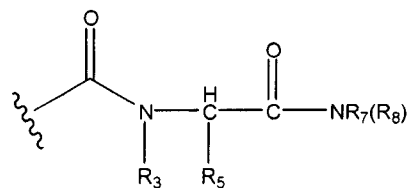
本发明提供作为甲硫氨酸氨肽酶-2 (MetAP-2)的抑制剂的化合物，含有一种或多种这样的化合物的药物组合物，和治疗患有多种疾病之一的患者的方法，该疾病包括血管生成性疾病和其他对MetAP-2的抑制有反应的疾病，如癌症，包括实体瘤和淋巴恶性肿瘤，寄生虫感染和自身免疫病。

在一个实施方案中，本发明的化合物包括式A-B的化合物，其中A选自上文中式I-VI所示的结构，B是式：



其中R₃是氢或烷基，优选C₁-C₄-烷基。R₄和R₅各自独立地是氢、取代的或未取代的烷基、取代的或未取代的芳基、取代的或未取代的芳烷基、取代的或未取代的杂芳基、或取代的或未取代的杂芳烷基。优选地，R₄是氢，而R₅不是氢。Z是-C(O)-或-亚烷基-C(O)-；且Y是-OR₆或-N(R₇)R₈，其中R₆、R₇和R₈各自独立地是氢、取代的或未取代的烷基、取代的或未取代的芳基、或取代的或未取代的氮杂环烷基。R₇和R₈也可以与它们所连接的氮原子一起形成杂环结构。

在一个优选实施方案中，B是结构：



其中 R_3 、 R_5 、 R_7 和 R_8 具有以上给出的含义。在该实施方案中， R_5 优选地是取代的或未取代的直链、支链或环状 C_1 - C_6 -烷基、芳基、芳烷基或杂芳基。合适的取代基包括羟基和氨基。在另一实施方案中， R_5 是20种天然存在的氨基酸之一的侧链，例如天冬氨酸、谷氨酸、丙氨酸、亮氨酸、缬氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、色氨酸、苏氨酸、精氨酸、半胱氨酸、甲硫氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、组氨酸、异亮氨酸或丝氨酸的侧链。 R_5 的优选身份包括疏水性的氨基酸侧链，如缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸和色氨酸的侧链，和极性但是不带电荷的氨基酸侧链，如天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸的侧链。在另一个实施方案， R_3 和 R_5 一起形成 C_3 - C_6 -亚烷基。与 R_5 连接的碳原子是手性的，可以以两种可能的立体化学形式中的任一种存在。例如， $-N(R_3)-CH(R_5)-C(O)-$ 单位可能具有相当于 α -氨基酸的D-或L-构型的构型。在一个优选实施方案中，该基团具有相当于 α -氨基酸的D-构型的构型。

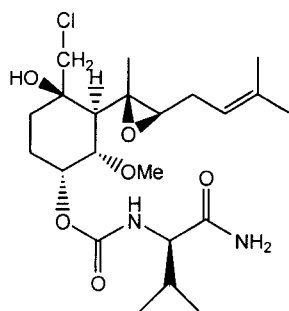
在本发明的化合物中，当 R_1 - R_8 中的任一个是烷基时，优选的烷基是取代的或未取代的直链、支链或环状 C_1 - C_6 烷基。特别优选的烷基是直链或支链 C_1 - C_4 烷基。取代的烷基包括至少一个非氢取代基，如氨基、烷基氨基或二烷基氨基；卤素，如氟、氯、溴或碘取代基；或羟基。

当 R_4 和 R_5 中的至少一个是取代的或未取代的芳基或杂芳基时，优选的基团包括取代的和未取代的苯基、萘基、吲哚基、咪唑基和吡啶基。当 R_4 和 R_5 中的至少一个是取代的或未取代的芳烷基或杂芳烷基时，优选的基团包括取代的和未取代的苄基、萘甲基、吲哚甲基、咪

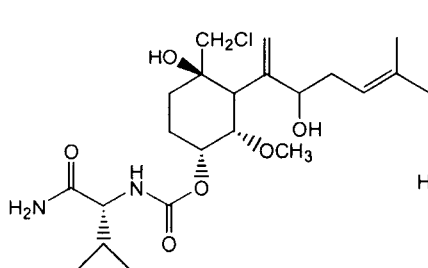
唑甲基和吡啶甲基。芳基、杂芳基、芳烷基和杂芳烷基上的优选取代基独立地选自氨基、烷基取代的氨基、卤素如氟、氯、溴和碘；羟基和烷基，优选直链或支链C₁-C₆-烷基，最优选甲基。

R₇和R₈除了烷基、取代的烷基或卤素以外，还可能各自独立地是取代的或未取代的氮杂环烷基或取代的或未取代的氮杂环烷基烷基。合适的取代的氮杂环烷基包括具有N-烷基取代基、优选C₁-C₄-烷基取代基、更优选N-甲基取代基的氮杂环烷基。R₇和R₈也可以与它们所连接的氮原子一起构成杂环系统，如取代的或未取代的五元或六元氮杂或二氮杂环烷基。优选地，二氮杂环烷基包括N-烷基取代基，如C₁-C₄-烷基取代基或者更优选甲基取代基。

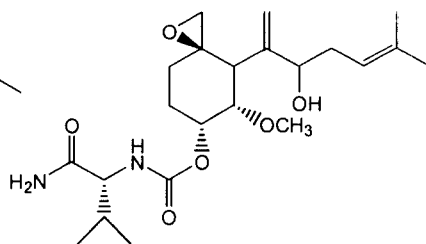
本发明的具体化合物包括其结构如下所示的化合物：



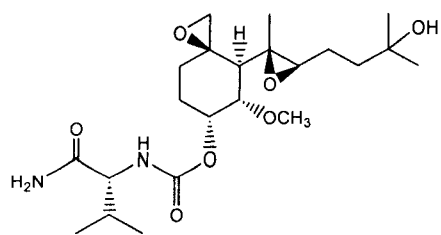
化合物2



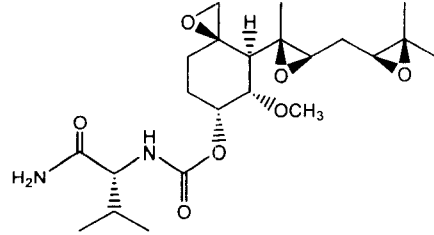
化合物3



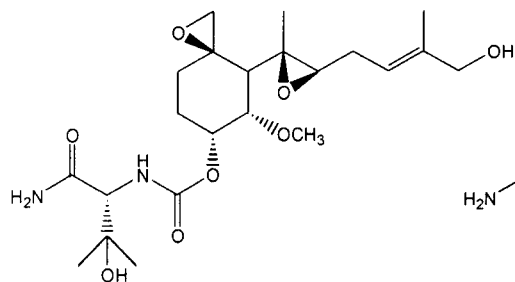
化合物4



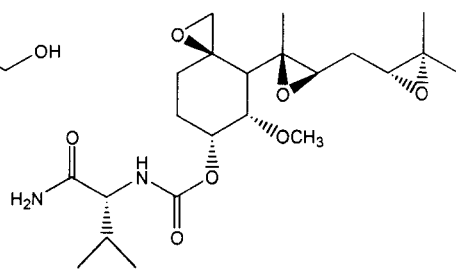
化合物5



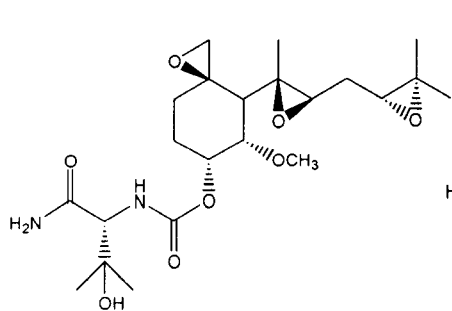
化合物6



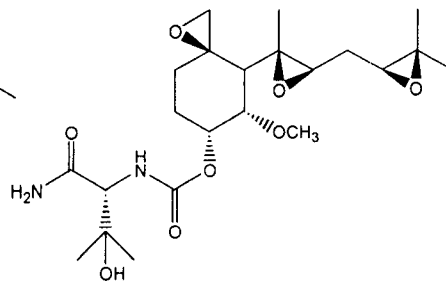
化合物7



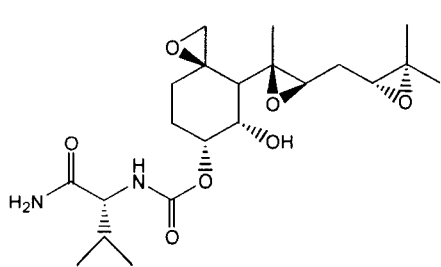
化合物8



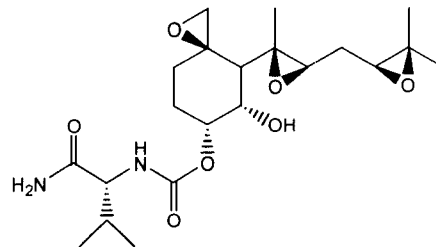
化合物9



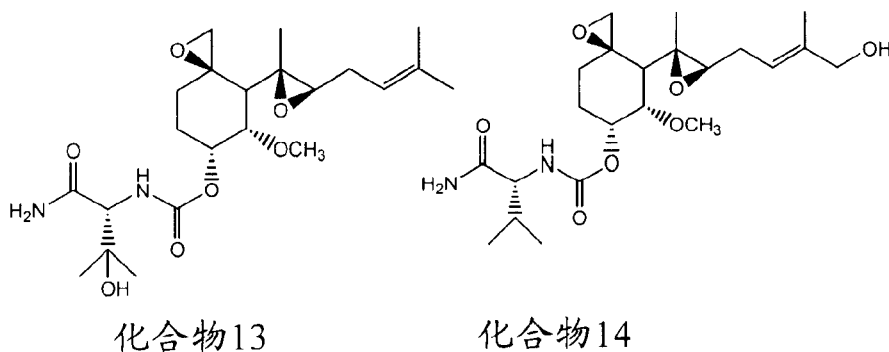
化合物10



化合物11

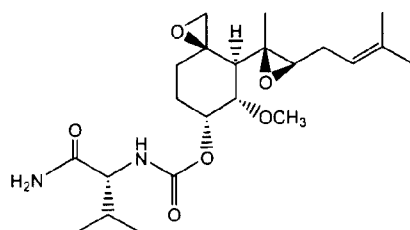


化合物12



本发明也包括本发明的化合物的盐。优选的盐是药物可接受的盐。“药物可接受的盐”包括保留母体化合物的所需生物活性、但并未带来任何不想要的毒性作用的盐。这类盐的实例是诸如以下酸的盐：无机酸，如，盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、硝酸等；有机酸，如，乙酸、草酸、酒石酸、琥珀酸、苹果酸、苯甲酸、扑酸、藻酸、甲磺酸、萘磺酸等。也包括诸如以下阳离子的盐：碱金属和碱土金属，包括钠、钾、锂、锌、铜、钡、铋、钙等；铵，和有机阳离子，如烷基铵、二烷基铵、三烷基铵和四烷基铵。两种或多种上述盐的组合也在本发明的范围内。

本发明的化合物可以用本领域公知的方法制备。如实施例所述，下面的化合物1可以用作合成本发明某些化合物的起始材料。化合物1的合成公开在美国专利号6,548,477中，该专利在此全文引用作为参考。



化合物1

本发明的化合物是甲硫氨酸氨肽酶-2 (MetAP-2)的抑制剂，因此能够用来治疗其中以该酶为治疗靶标的多种疾病和病症，包括美国专

利6,548,477和公开的PCT申请WO03/092608中所述的那些, 这些专利在此全文引用作为参考。

作为一个实例, MetAP-2 的抑制剂抑制内皮细胞增殖, 并且因此表现出抗血管生成活性。因此, 本发明的化合物可以在治疗患者的血管生成性疾病的方法中使用。所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的本发明的化合物, 从而治疗该患者的血管生成性疾病。

当用于本文时, 术语“血管生成性疾病”包括特征为异常或不想要的血管形成(血管生成)例如血管形成受刺激或受抑制或者由此引起的疾病、失调或病症。异常或不想要的血管生成可能或者直接引起特定疾病, 或者加重已有的病理病症。血管生成性疾病的实例包括: 眼病, 例如糖尿病性视网膜病、早熟性视网膜病、角膜移植排斥、晶状体后纤维组织形成、新生血管性青光眼、红变、由于黄斑变性引起的视网膜新血管形成、低氧症、与感染或外科手术相关的眼部血管生成、眼部肿瘤和沙眼、以及新血管形成可能致盲的其他眼部异常新血管形成病症: 影响皮肤的疾病, 例如银屑病和化脓性肉芽肿; 其中进行性生长依赖于这些肿瘤细胞对血管生成的连续诱导的癌症, 例如癌和肉瘤, 肺癌、脑癌、肾癌、结肠癌、肝癌、胰腺癌、胃癌、前列腺癌、乳癌、卵巢癌、宫颈癌、黑素瘤和任何上述癌的转移形式; 儿科疾病, 例如血管纤维瘤和血友病性关节炎; 血管疾病, 例如血管瘤和动脉粥样硬化斑内的毛细血管增生; 与手术相关的疾病, 例如肥厚性疤痕、伤口肉芽发生和血管粘连; 以及自身免疫病, 例如其中关节中的新血管可能破坏关节软骨的类风湿性、免疫性和变性关节炎以及硬皮病。

术语血管生成性疾病还包括特征为内皮细胞过度或异常刺激的疾病, 包括但不限于肠粘连、克罗恩病、动脉粥样硬化、硬皮病和肥厚性疤痕即疤痕疙瘩; 作为病理结果而有血管生成的疾病, 例如猫抓病(Rochela ninalia quintosa)和溃疡(幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*))。另外, 本发明的化合物可用作避孕药(基于其抑制血管生成依赖性排卵和

胎盘建立的能力), 并且也可以用来通过在手术前施用于患者而减少出血。

本发明的化合物也能够用来治疗胸腺瘤患者。因此本发明提供一种治疗患者中胸腺瘤的方法, 包括向该患者施用治疗有效量的本发明的化合物的步骤。

本发明的化合物也可以在需要抑制免疫系统的临床方案中用作免疫抑制剂。因此, 本发明提供一种在患者中诱导免疫抑制条件的方法, 包括向该患者施用免疫抑制量的本发明化合物的步骤。例如, 本发明的化合物能够用来抑制正在接受或者已经接受来自供者的器官、组织或细胞移植的患者的免疫功能。在一个实施方案中, 移植的组织、器官或细胞是骨髓、干细胞、胰细胞如胰岛细胞、或角膜。在另一实施方案中, 移植的器官是实质器官, 如肝脏、肾脏、心脏或肺。

本发明的化合物也可以用来治疗淋巴类恶性肿瘤患者(例如哺乳动物, 如人类)。该方法包括向该患者施用有效量的MetAP-2抑制剂, 从而治疗淋巴类恶性肿瘤患者。

本发明的化合物还可以用来治疗风湿性疾病, 如类风湿性关节炎、狼疮、强直性脊椎炎、银屑病关节炎、硬皮病、川崎综合征和如 Primer on the Rheumatic Diseases, 第11版 (John H. Klippel, MD编; Arthritis Foundation: Atlanta GA (1997))所述的其他风湿性疾病。

当用于本文时, 术语“淋巴类恶性肿瘤”包括淋巴样细胞的任何恶性肿瘤。淋巴类恶性肿瘤的例子包括淋巴样白血病, 如慢性淋巴样白血病和急性淋巴样白血病, 和淋巴瘤, 如何杰金氏病和非何杰金淋巴瘤。术语“非何杰金淋巴瘤”包括T细胞淋巴瘤, 如前(外周)T淋巴母细胞性、成熟T细胞、结外自然杀伤细胞/T细胞、鼻型、肠病型T细胞、肝脾T细胞、皮下脂膜炎样T细胞、皮肤(表皮)淋巴瘤、间变性大细胞外周T细胞和血管免疫母细胞性T-细胞淋巴瘤; 和B细胞淋巴瘤, 如前B淋巴母细胞性、小淋巴细胞性、B-细胞前淋巴细胞性、淋巴浆细胞性、脾边缘区、结外边缘区MALT、结节边缘区、滤泡性、外套细胞、弥漫性大B细胞、原发性纵隔大B细胞、原发性渗出性和伯基特

淋巴瘤。非何杰金淋巴瘤还包括AIDS-相关性淋巴瘤和中枢神经系统淋巴瘤。

另一方面，本发明提供一种治疗寄生虫感染患者的方法，如疟原虫属（*Plasmodium*）的种如恶性疟原虫（*Plasmodium falciparum*）或利什曼原虫属（*Leishmania*）的种如杜氏利什曼原虫（*Leishmania donovani*）所致的感染。该方法包括向该患者施用治疗有效量的本发明的化合物的步骤。

在另一方面，本发明提供治疗自身免疫病患者的方法。该方法包括向该患者施用治疗有效量的本发明的化合物。

当用于本文时，术语“自身免疫病”包括与个人免疫系统攻击其自身机体有关或由其引起的失调、疾病或病症。免疫系统产生针对其自身组织的抗体。实际上身体的每一部分都可患自身免疫病。自身免疫病的实例包括但不限于：自身免疫性溶血性贫血，其中免疫系统破坏个体的红细胞；自身免疫性肝炎，其引起肝脏炎症；贝格尔氏病，也称作IgA肾病，其引起肾脏损伤；慢性疲乏综合征，其引起不适的感觉或模糊的疾病感觉；克罗恩病，其引起肠的炎症；皮炎，其影响皮肤和肌肉；纤维肌痛，其引起肌肉的慢性疼痛和强直；格雷夫斯病，其影响甲状腺；桥本甲状腺炎，它是甲状腺的慢性炎症；特发性血小板减少性紫癜，其引起低血小板计数并干扰正常凝血；扁平苔癣，其影响皮肤、眼睛和口腔及生殖器的内层；多发性硬化，其中机体攻击神经系统部分；重症肌无力，它引起严重的肌无力；牛皮癣，它引起皮肤损伤和瘙痒；风湿热，它在链球菌感染后引起包括心脏在内的身体器官的损伤；类风湿性关节炎，其中机体攻击关节；硬皮病，它累及皮肤、肠和其他结构；舍格伦综合征，它引起干眼和口干；系统性红斑狼疮，其中机体攻击关节以及肾脏中的结缔组织；I型糖尿病，它是个体不能产生足够胰岛素的疾病；溃疡性结肠炎，它也引起肠的炎症；和白癜风，它引起皮肤色素减少。在一个优选实施方案中，该自身免疫病不是类风湿性关节炎。

当用于本文时，术语“寄生虫感染”包括任何寄生虫引起的感染。寄生虫感染的实例包括由例如疟原虫属的种如恶性疟原虫，或利什曼原虫属的种如杜氏利什曼原虫引起的感染。寄生虫感染的其他实例包括由例如以下寄生虫引起的感染：巴贝虫属（*Babesia*）、弓形体属（*Toxoplasma*）、疟原虫属、艾美球虫属（*Eimeria*）、等孢子球虫属（*Isospora*）、*Atoxoplasma*、囊等孢虫属（*Cystoisospora*）、哈蒙德虫属（*Hammondia*）、贝诺孢子虫属（*Besnoitia*）、肉孢子虫属（*Sarcocystis*）、弗伦克虫属（*Frenkelia*）、变形血原虫属（*Haemoproteus*）、住白虫属（*Leucocytozoon*）、泰勒虫属（*Theileria*）、伯金斯虫属（*Perkinsus*）和簇虫属（*Gregarina*）的种；卡氏肺囊虫（*Pneumocystis carinii*）；微孢子门（*Microspora*）的成员，如微孢子虫属（*Nosema*）、肠胞虫属（*Enterocytozoon*）、脑类微孢子虫属（*Encephalitozoon*）、*Septata*、*Mrazelia*、钝孢子属（*Amblyospora*）、*Ameson*、格留虫属（*Glugea*）、具褶孢虫属（*Pleistophora*）和*Microporidium*的种；和囊孢子（*Ascetospora*）门的成员，如单孢子虫属（*Haplosporidium*）。

当用于本文时，术语“患者”包括温血动物，优选哺乳动物，包括人类。在一个优选实施方案中，所述患者为灵长类动物。在一个甚至更优选的实施方案中，所述灵长类动物为人类。

当用于本文时，术语向患者“施用”包括通过将所述化合物给予患者的所需部位的任何给药途径，包括通过胃肠外途径或口服途径、肌肉注射、皮下/皮内注射、静脉注射、口腔含化给药、透皮递药以及通过直肠、结肠、阴道、鼻内或呼吸道途径给药，给患者分配、递送或应用血管生成抑制剂化合物，例如药物制剂中的血管生成抑制剂化合物(如本文所述的)。

当用于本文时，术语“有效量”包括在必需的剂量和时期内有效达到所需结果、例如足以治疗患者的血管生成性疾病的量。本文限定的血管生成抑制剂化合物的有效量可以根据如下的因素而有所变化，如患者的疾病状况、年龄和体重，以及所述血管生成抑制剂化合物在患

者体内诱发所需反应的能力。可以调节给药方案，以提供最佳治疗反应。有效量也是所述血管生成抑制剂化合物的治疗有益效应超过任何毒性效应或有害效应(例如副作用)的量。

本发明的化合物的治疗有效量(即有效剂量)的范围可以为大约0.001-30 mg/kg体重，优选大约0.01-25 mg/kg体重，更优选大约0.1-20 mg/kg体重，甚至更优选大约1-10 mg/kg、2-9 mg/kg、3-8 mg/kg、4-7 mg/kg或5-6 mg/kg体重。本领域技术人员会认识到某些因素可能影响有效治疗患者所需的剂量，包括但不限于患者的疾病或失调的严重程度、先前的治疗、一般健康状况和/或年龄、以及存在的其他疾病(如果有的话)。此外，用治疗有效量的血管生成抑制剂化合物治疗患者，可以包括单次治疗，或优选可以包括一系列的治疗。在一个实施例中，用大约0.1-20 mg/kg体重的血管生成抑制剂化合物治疗患者，每周1次，共约1-10周，优选2-8周，更优选大约3-7周，甚至更优选大约4、5或6周。人们也将认识到，在特定的疗程中，用于治疗的化合物的有效剂量可以增加或减少。

本发明的方法还包括与已知治疗血管生成性疾病的另一种药物活性化合物联合，向患者施用治疗有效量的血管生成抑制剂化合物，所述另一种药物活性化合物例如为化疗药如紫杉醇(Taxol)、紫杉醇(Paclitaxel)或放线菌素D，或者抗糖尿病药如甲苯磺丁脲；或者可以增强本发明化合物的活性的化合物，如肝素或硫酸化环糊精。可以使用的其他药物活性化合物可以在以下文献中找到：Harrison's Principles of Internal Medicine，第十三版，T.R. Harrison等编著。McGraw-Hill: N.Y., NY; 和the Physicians Desk Reference 第50版 1997, Oradell, New Jersey, Medical Economics Co., 所述文献的全部内容在此引用作为参考。本发明的化合物和所述另一种药物活性化合物可以在同一种药物组合物中或者在不同的药物组合物中(同时或者不同时)向患者施用。

药物组合物

本发明也提供包含一种或多种本发明化合物的药物可接受的制剂。这类药物可接受的制剂通常包含一种或多种本发明的化合物以及药物可接受的载体和/或赋形剂。当用于本文时,“药物可接受的载体”包括生理学上相容的任何或所有的溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。这类介质和药剂在药物活性物质方面的应用是本领域众所周知的。除了在任何常规介质或药剂与本发明的化合物不配伍时之外,考虑了它们在所述药物组合物中的应用。

也可以向本发明的组合物中加入已知治疗血管生成性疾病的补充的药物活性化合物,例如化疗药如紫杉醇(Taxol)、紫杉醇(Pachtaxel)或放线菌素 D,或者抗糖尿病药如甲苯磺丁脲;或者可以增强所述血管生成抑制剂化合物的血管生成抑制活性的化合物,如肝素或硫酸化环糊精。可以使用的合适的药物活性化合物可以在 Harrison's Principles of Internal Medicine(参见上文)中找到。

将本发明的药物组合物配制为适合于预期的给药途径。给药途径的实例包括胃肠外给药,例如静脉内、皮内、皮下、经口(例如吸入)、透皮(局部)、经粘膜和直肠给药。供胃肠外、皮内或皮下应用的溶液或悬浮液可以包括以下成分:无菌稀释剂,例如注射用水、盐水溶液、固定油类、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂;抗细菌剂,例如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,例如乙二胺四乙酸;缓冲剂,例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐,以及用于调节张力的药剂,例如氯化钠或葡萄糖。可以用酸或碱例如盐酸或氢氧化钠调节 pH。胃肠外制剂可以包封在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量瓶中。

适合于注射用的药物组合物包括无菌水溶液(为水溶性时)或分散体以及用于即时制备无菌注射液或分散体的无菌粉末。对于静脉内给药,合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, NJ)或磷酸缓冲盐溶液(PBS)。在所有情况下,所述药物组合物都必须是无菌的,并且应该是流体,使得具有易注射性。它必须

在生产和贮存的情况下是稳定的，必须防止微生物如细菌和真菌的污染作用。所述载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液态聚乙二醇等)及其合适的混合物的溶剂或分散介质。例如通过应用包衣例如卵磷脂，在分散体的情况下通过保持所需的粒径，以及通过使用表面活性剂，可以维持适当的流动性。可以用各种抗细菌剂和抗真菌剂，例如对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等，来达到防止微生物的作用。在许多情况下，优选在所述组合物中包含等渗剂，例如糖类、多元醇如甘露醇或山梨醇、或氯化钠。注射用组合物的延长吸收可以通过在所述组合物中包括延迟吸收的药剂例如一硬脂酸铝和明胶来达到。

通过将所需量的本发明的化合物加入到根据需要含有一种上述成分或者上述成分的组合的合适溶剂中，然后过滤除菌，可以制备无菌注射液。一般而言，通过将所述血管生成抑制剂化合物加入到含有一种基本分散介质和选自以上所述的所需其他成分的无菌溶媒中，制备分散体。至于制备无菌注射液的无菌粉末，优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥，由其先前除菌过滤的溶液得到所述血管生成抑制剂化合物加上任何额外的所需成分的粉剂。

口服组合物一般包含惰性稀释剂或食用载体。可以将它们包封在明胶胶囊中，或者压制成片剂。对于口服治疗给药的目的，可以在所述血管生成抑制剂化合物中加入赋形剂，并且以片剂、锭剂或胶囊的形式使用。口服组合物也可以包括肠溶包衣。口服组合物也可以用流体载体来制备，以供作为漱口水使用，其中所述流体载体中的血管生成抑制剂化合物应用于口腔，漱口，然后将其吐出或吞下。

药学上相容的粘合剂和/或辅料可以作为所述组合物的部分包括在内。片剂、丸剂、胶囊、锭剂等可以含有以下成分或者相似性质的化合物：粘合剂，例如微晶纤维素、西黄蓍胶或明胶；赋形剂，例如淀粉或乳糖；崩解剂，例如藻酸、Primogel 或玉米淀粉；润滑剂，例如硬脂酸镁或 Sterotes；助流剂，例如胶态二氧化硅；甜味剂，例如蔗糖或糖精；或者调味剂，例如薄荷、水杨酸甲酯或橙味调味剂。

对于吸入给药,所述血管生成抑制剂化合物以气雾剂形式从含有适当喷射剂例如气体如二氧化碳的加压容器或分配器或者喷雾器给药。

也可以通过经粘膜或透皮方式进行系统给药。对于经粘膜或透皮给药,在制剂中使用适合于所要透过的屏障的渗透剂。这类渗透剂是本领域众所周知的,对于经粘膜给药,包括例如去污剂、胆汁盐和夫西地酸衍生物。经粘膜给药可以通过应用喷鼻剂或栓剂来达到。对于透皮给药,将所述血管生成抑制剂化合物配制为本领域众所周知的软膏、油膏、凝胶或乳膏。

对于直肠给药,本发明的药物组合物也可以配制为栓剂(例如周常规栓剂基质如可可脂和其他甘油酯配制)或滞留型灌肠剂的形式。

在一个实施方案中,所述血管生成抑制剂化合物用保护所述化合物不被机体快速清除的载体来制备,诸如控释制剂,包括植入体和微型胶囊的递药系统。可以使用生物可降解性、生物相容性聚合物,例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。制备这类制剂的方法对于本领域技术人员而言是显而易见的。这些材料在市场上也可以从 Alza Corporation 和 Nova Pharmaceuticals, Inc. 获得。脂质体悬浮液也可以用作药物可接受的载体。这些可以按照本领域技术人员已知的方法制备,例如在美国专利 4,522,811、5,455,044、5,576,018 和 4,883,666 号中所述,所有这些专利的内容都在此引用作为参考。

本发明的化合物也可以配制到这样的药物组合物中:使所述血管生成抑制剂化合物在至少数周至一个月或更长的时间内持续递送给患者。这类制剂描述于美国专利 5,968,895 号中,其内容在此引用作为参考。

为了易于给药和剂量的均一性,尤其有利的是配制单位剂量形式的口服组合物或胃肠外组合物。当用于本文时,单位剂量形式是指适合作为用于待治疗患者的单位剂量的物理上分离的单位;每个单位含有与所需药物载体结合的预定量的一种或多种本发明的化合物,其量计算为产生所需的疗效。本发明的单位剂量形式的规格由下述因素决

定并且直接取决于下述因素：治疗化合物的独特性质和待达到的特定疗效、以及在配制用于治疗个体的这类化合物的技术中固有的限制。

这类化合物的毒性和疗效可以通过标准药学方法，在细胞培养物或实验动物中来测定，例如用于测定 LD₅₀(使群体的 50 % 致死的剂量)和 ED₅₀(在群体的 50 % 中治疗有效的剂量)。毒性效应和治疗效果的相应剂量之比是治疗指数，它可以用 LD₅₀/ED₅₀ 之比来表示。优选表现出高治疗指数的本发明的化合物。虽然可以使用表现出毒副作用的化合物，但应该设计将这类化合物靶向累及组织的部位的递送系统，以便将对未累及的细胞的潜在损害减至最小，从而减小副作用。

从细胞培养物测定和动物研究获得的数据，可以用来制订用于人类的剂量范围。本发明的化合物的剂量优选在具有很小毒性或无毒性 ED₅₀ 的循环浓度范围内。所述剂量可以在该范围内变动，取决于所用的剂型和所用的给药途径。对于本发明方法中使用的任何化合物而言，最初可以根据细胞培养物测定来估计治疗有效量。可以用动物模型制订剂量，以便获得包括用细胞培养物测定的 IC₅₀ (即所述化合物达到症状的半数最大抑制的浓度)的循环血浆浓度范围。

这类信息可以用来更准确地确定人类的有用剂量。

血浆中的水平可以例如通过高效液相色谱来测定。

检测本发明化合物活性的方法

可以在各种各样熟知的测定方法中，例如在大鼠主动脉环血管生成抑制测定法或者在绒毛尿囊膜(CAM)测定法中，测试本发明的化合物调节(例如抑制或刺激)血管生成的能力。CAM 测定可以基本上按照 Liekens S.等(1997) *Oncology Research* 9: 173-181 中所述进行，其内容在此引用作为参考。简而言之，将新鲜消毒的蛋于 37℃ 孵育 3 天。第三天，剥去蛋壳，将蛋置于组织培养板中，于 38℃ 孵育。对于该测定，将待测试的血管生成抑制剂化合物附着于尼龙网上的胶原基质上。然后用该网覆盖绒毛尿囊膜，将蛋于 37℃ 孵育。如果发生血管生成，则新的毛细血管在 24 小时内形成并生长通过该网。然后可以测

定所述血管生成抑制剂化合物(在各种浓度下)调节(例如抑制)血管生成(例如 FGF 诱导的血管生成)的能力。

也可以测试本发明的化合物调节(例如抑制或刺激)人内皮细胞生长的能力。通过用含胰蛋白酶的培养基灌注脐静脉,可以分离出人脐静脉内皮细胞(HUVEC)。然后将 HUVEC 在补充 2.5%胎牛血清和 2.0 ng/ml 重组人碱性成纤维细胞生长因子(rbFGF, Biotechnology Research Laboratories, Takeda, Osaka, Japan)的 GIT 培养基(Diago Eiyou Kagaku, Co., Japan)中于 37℃、5% CO₂ 和 7% O₂ 下培养。然后将 HUVEC 以 2×10^3 /100μl 培养基的细胞密度接种到 96 孔微量滴定板(Nunc, 1-67008)上。第二天,可以向各孔中加入 100μl 含 rbFGF (终浓度 2 ng/ml)和不同浓度的各种血管生成抑制剂化合物的培养基。将所述血管生成抑制剂化合物溶于二甲基亚砷(DMSO)中,然后用培养基稀释,使得 DMSO 的终浓度不超过 0.25%。

培养 5 天后,除去培养基,向各孔中加入 100μl 1 mg/ml MTT (溴化 3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯基-2H-四唑)溶液,将微量滴定板于 37℃保持 4 小时。然后向各孔中加入 100μl 10%十二烷基硫酸钠(SDS)溶液,将微量滴定板于 37℃保持 5-6 小时。为了测定所述血管生成抑制剂化合物对细胞数的影响,用光密度计在 590nm 下测量各孔的光密度。

本发明的血管生成抑制剂化合物在体外调节毛细管内皮细胞迁移的能力也可以用博伊登室测定法(Boyden chamber assay)(如 Falk 等(1980) *J Immunol. Meth.* 33:239-247 中所述,其内容在此引用作为参考)来测试。简而言之,将牛毛细管内皮细胞以 1.5×10^4 细胞/孔接种到预先包被纤连蛋白(7.3μg 纤连蛋白/ml PBS)的核孔滤膜一侧的无血清 DMEM (Dulbecco 氏改良 Eagle 培养基)中。将血管生成抑制剂化合物溶于乙醇中,并且在 DMEM 中稀释,使乙醇的终浓度不超过 0.01%。使细胞在无血清 DMEM 中于 37℃暴露于 200μg/ml 内皮促细胞分裂剂(Biomedical Technologies, Mass.)和不同浓度的所述血管生成抑制剂化合物达 4 小时。孵育结束时,通过用 100 倍的目镜格栅

(ocular grid)以四份重复计数细胞，测定通过滤膜中 8 微米孔迁移的细胞数。

可以在体内测试本发明的化合物调节肿瘤生长的能力。可以使用动物模型，例如带有腹膜内移植的小鼠网状细胞肉瘤(M 5076)的 C57BL/6N 小鼠。可以通过离心收集腹水中的肿瘤细胞，将其悬浮于盐水中。将细胞悬浮液(2×10^6 细胞/100 μ l/小鼠)接种到小鼠的右肋腹。然后，荷瘤小鼠从肿瘤接种后的第 1 天开始，用测试化合物(以各种浓度，悬浮于含 1%乙醇的 5%阿拉伯胶溶液中)皮下处理 12 天。

通过以数天的间隔，用卡尺测量两个方向的肿瘤大小，可以测定肿瘤生长。

最后，可以如下测试本发明的化合物调节 MetAP2 活性的能力。如 Li 和 Chang, (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 227:152 中所述，可以在昆虫细胞中表达并从中纯化重组人 MetAP2。然后，向含有 1nM 纯化重组人 MetAP2 的缓冲液 H (10 mM Hepes, pH 7.35、100 mM KCl、10%甘油和 0.1 M Co^{2+})中加入各种量的测试化合物，于 37°C 孵育 30 分钟。为了开始酶促反应，向反应混合物中加入含甲硫氨酸残基的肽，例如 Met-Gly-Met (至浓度为 1 mM)。随后，用 Zou 等(1995) *Mol. Gen. Genetics* 246:247-253)的方法，在不同的时间点(例如在 0、2、3 和 5 分钟时)定量测定所释放的甲硫氨酸。

通过以下实施例进一步说明本发明，但所述实施例不应解释为是限制性的。在本申请中引用的所有参考文献、专利和公开的专利申请的内容以及附图都在此引用作为参考。

本发明的各个方面在下面的部分中进一步详细描述。

实施例

实施例 1 化合物 2 的合成

化合物 1 如美国专利 6,548,477 的实施例 5 所述合成，该专利的教导在此全文引用作为参考。将化合物 1 (1.0 g, 2.36 mmol)溶解于 20 mL 1,4-二 烷中。向该搅拌溶液中加入 4.0 M 二 烷中的 HCl (0.65

mL, 2.59 mmol, 1.1 当量), 再搅拌反应液 15 分钟, 之后真空浓缩。然后由 20%乙腈水溶液冻干, 使用乙腈-水梯度通过反相制备型 HPLC 纯化。

实施例 2 化合物 3 的合成

将化合物 1 (502 mg, 1.2 mmol)在氮气冲洗的 50 mL 圆底瓶中溶解于 10 mL 1,4-二 烷中。向该搅拌溶液中加入 4.0 M 二 烷中的 HCl (0.73 mL, 2.92 mmol, 2.5 当量), 再搅拌反应液 2 小时, 此时 LC-MS 显示起始物质完全消失。将反应混合物真空浓缩为粘稠、白色的油状物, 其纯度足以转化为化合物 3。或者, 可以使用乙腈-水梯度通过反相制备型 HPLC 纯化。

实施例 3 化合物 4 的合成

将化合物 3 (500 mg, 1.2 mmol)在氮气冲洗的 50 mL 圆底瓶中溶解于 8.0 mL 无水 THF 中。加入叔丁醇钾(251 mg, 2.3 mmol), 将反应混合物搅拌 1 小时, 此时 LC-MS 显示起始物质完全消失。将反应混合物在低压下浓缩, 并重悬浮在二氯甲烷中。有机层用 2×饱和碳酸氢钠、2×水和 2×盐水洗涤, 然后在硫酸钠上干燥, 并且浓缩为澄清、粘稠的油状物。使用乙腈-水梯度通过反相制备型 HPLC 纯化。

实施例 4 化合物 5 的合成

将乙酸汞(II) (319 mg, 1.0 mmol)溶解于 1 mL 水中。加入 THF (1 mL), 形成橙黄色悬浮液。在室温下搅拌 5 分钟后, 一次性加入化合物 1 (424 mg, 1.0 mmol)。该溶液立即变为澄清。在室温下搅拌 1 小时后, 将反应液在冰浴中冷却, 向其中加入 3 N NaOH (1 mL), 接着加入溶解于 1 mL 3 N NaOH 中的硼氢化钠(19 mg, 0.5 mmol, 2 当量)。再搅拌一小时后, 使反应混合物在分液漏斗中静置过夜, 以利于除去沉淀的汞。向水层中加入盐水, 用醚抽提该水层两次。合并的有机提取

物然后用盐水洗涤，在 MgSO_4 上干燥，并浓缩为白色泡沫。使用乙腈-水梯度通过反相制备型 HPLC 纯化该产物。

实施例5 内皮细胞的增殖的抑制

检测一组本发明的化合物调节人内皮细胞生长的能力。对于该测定，将人脐静脉内皮细胞(HUVEC)于37°C湿润培养箱中保持于Clonetics内皮细胞培养基(EGM)中。用胰蛋白酶使细胞分离，然后于室温下通过以300×g离心5分钟沉淀细胞。将HUVEC以5,000细胞/孔加到96孔板中。孵育6小时后，将所述培养基更换为补充0.5 nM bFGF和所需浓度的测试化合物的0.2 ml新鲜EGM。最初将测试化合物溶于乙醇中，储液浓度或者为10 mM或者为0.1 mM，随后在EGM中稀释，获得1 pM至10 μ M的浓度。于37°C下48小时后，将所述培养基更换为补充bFGF和测试化合物的新鲜EGM。于37°C再孵育48小时后，加入MTT (溴化3-[4,5-二甲基噻唑基]-2,5-二苯基-四唑)至1 mg/ml。于37°C下2-4小时后，将所述培养基更换为0.1ml/孔的异丙醇。将板置于摇床上室温下达15分钟，然后用Labsystems Multiskan平板分光光度计分析，确定570 nm的光密度。

图1中显示的测定结果证明本发明的化合物在纳摩尔浓度下能够抑制内皮细胞的生长。

等同方案

本领域技术人员应当认识到，或者仅应用常规实验就能够确定此处所述的本发明的特定实施方案的许多等同方案。这些等同方案包括在下面的权利要求书之内。