

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680015606.6

[51] Int. Cl.

A61K 31/451 (2006.01)

A61K 31/485 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

[43] 公开日 2008年4月30日

[11] 公开号 CN 101171010A

[22] 申请日 2006.3.7

[21] 申请号 200680015606.6

[30] 优先权

[32] 2005.3.7 [33] US [31] 60/659,193

[32] 2005.10.12 [33] US [31] 60/725,703

[32] 2005.10.28 [33] US [31] 60/731,009

[32] 2006.1.20 [33] US [31] 60/760,851

[86] 国际申请 PCT/US2006/007892 2006.3.7

[87] 国际公布 WO2006/096626 英 2006.9.14

[85] 进入国家阶段日期 2007.11.7

[71] 申请人 芝加哥大学

地址 美国伊利诺斯州

[72] 发明人 J·莫斯 M·林根

P·A·辛格尔顿

J·G·N·加西亚

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 戈泊

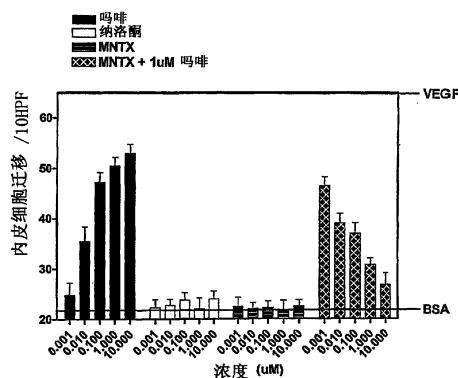
权利要求书 3 页 说明书 43 页 序列表 1 页
附图 22 页

[54] 发明名称

阿片样物质拮抗剂用于减少内皮细胞增殖和迁移的用途

[57] 摘要

本发明提供使用阿片样物质拮抗剂来减少例如抑制或降低细胞增殖和迁移特别是内皮细胞增殖和迁移的方法，所述迁移包括与血管生成相关的，所述阿片样物质拮抗剂包括，但不限于外周受限制的拮抗剂。



1. 一种治疗方法，其包括向受试者给药有效量的阿片样物质拮抗剂，所述受试者患有以不需要的内皮细胞迁移或增殖为特征的疾病。
2. 权利要求 1 的方法，其中所述不需要的内皮细胞迁移或增殖为不需要的血管内皮细胞迁移或增殖。
3. 权利要求 1 的方法，其中所述阿片样物质拮抗剂为外周阿片样物质拮抗剂。
4. 权利要求 2 的方法，其中所述不需要的血管内皮细胞迁移或增殖为不需要的血管生成。
5. 权利要求 4 的方法，其中所述疾病为癌症。
6. 权利要求 5 的方法，其中所述有效量为使所述受试者具有的阿片样物质拮抗剂的有效循环血浆水平持续至少 1 周、至少 2 周、至少 3 周，优选至少 4 周。
7. 权利要求 5 的方法，其进一步向受试者共同给药有效量的抗癌剂。
8. 权利要求 7 的方法，其中所述抗癌剂为抗新血管形成剂。
9. 权利要求 8 的方法，其中所述抗新血管形成剂为抗 VEGF 单克隆抗体。
10. 权利要求 4 的方法，其中所述疾病为糖尿病。
11. 权利要求 4 的方法，其中所述疾病为镰状细胞贫血。

-
12. 权利要求 4 的方法，其中所述疾病为血管损伤。
 13. 权利要求 4 的方法，其中所述疾病的特征在于不需要的眼部新血管形成。
 14. 权利要求 13 的方法，其中所述疾病为增殖性视网膜病。
 15. 权利要求 4 的方法，其中所述阿片样物质拮抗剂为外周阿片样物质拮抗剂。
 16. 权利要求 2 的方法，其中所述受试者同时服用阿片样物质治疗剂。
 17. 权利要求 2 的方法，其中所述受试者没有同时服用阿片样物质治疗剂。
 18. 权利要求 2 的方法，其中所述受试者同时服用长期阿片样物质治疗剂。
 19. 权利要求 2 的方法，其中所述受试者没有同时服用长期阿片样物质治疗剂。
 20. 权利要求 3 的方法，其中所述阿片样物质拮抗剂选自：第四或第三左吗喃衍生物，哌啶-N-烷基羧酸酯或第四苯并吗啡烷。
 21. 权利要求 20 的方法，其中所述外周阿片样物质拮抗剂为甲基纳曲酮。
 22. 权利要求 20 的方法，其中所述外周阿片样物质拮抗剂 alvimopan。

23. 一种抑制内皮细胞中 VEGF 活性的方法，其包括使细胞与有效量的阿片样物质拮抗剂接触。

24. 一种抑制内皮细胞中外源性阿片样物质诱导的细胞迁移或增殖的方法，其包括使细胞与有效量的阿片样物质拮抗剂接触。

25. 一种抑制内皮细胞中 Rho A 活化的方法，其包括使细胞与有效量的阿片样物质拮抗剂接触。

26. 一种减少内皮细胞中不需要的迁移和/或增殖的方法，其包括使细胞与有效量的阿片样物质拮抗剂接触。

27. 权利要求 1 的方法，其中将一定量的阿片样物质拮抗剂给药至人类癌症患者，所述量能有效地减少不需要的迁移和/或增殖。

28. 一种减小癌症或肿瘤在医学介入后复发危险的方法，其包括在介入时向癌症患者共同给药阿片样物质拮抗剂。

阿片样物质拮抗剂用于减少内皮细胞增殖和迁移的用途

关于联邦资助研究或发展的声明

本发明部分得到了国立卫生研究院的资助：DE12322；DE00470；和 DE015830 的支持。美国政府具有本发明的某些权益。

相关申请

本申请要求在 35 U.S. C. 119(e) 下的如下申请的利益：在 2005 年 3 月 7 日申请的 USSN 60/659,193, 2005 年 10 月 12 日申请的 60/725,703, 2005 年 10 月 28 日申请的 60/731,009, 2006 年 1 月 20 日申请的 60/760,851, 将其全部公开内容引入本文作为参考。

技术领域

本发明涉及使用阿片样物质拮抗剂减少内皮细胞迁移和/或增殖的方法，所述内皮细胞特别地与肿瘤相关。

背景技术

细胞增殖是一种所有活体中正常进行的过程，其包括许多因子和信号，所述因子和信号巧妙地平衡以保持有规律的细胞周期。哺乳动物细胞是否生长和分裂是由多种反馈控制机制决定的，其包括细胞可生长间隙的可用度和在直接环境中特定刺激因子和抑制因子的分泌。

血管生成和血管生成相关疾病受细胞增殖的影响。血管生成的过程导致形成新的血管。在正常生理条件下，动物包括人类仅在非常特定有限的情况下进行血管生成。例如，通常在伤口愈合、胎儿和胚胎发育及黄体、子宫内膜和胎盘的生成中观察到血管生成。

在血管生成过程中，内皮细胞，其作为已有血管的一部分通常以静止状态存在，进入迁移、增殖状态。当内皮细胞作为功能性新血管的一部分恢复静止状态时，这种所述细胞的迁移、增殖状态最终被消除。新毛细管的生成包括一个复杂的过程，其需要在空间模式和时间

模式中出现许多细胞和分子事件。这些活性的某些包括初始血管的周围基膜的降解、内皮细胞穿过结缔组织间质的迁移、细胞增殖、管样结构的形成和这些内皮细胞衍生 (endothelial-lined) 管发育成新血管(Cliff, 1963; Schoefl, 1963; Ausprunck and Folkman, 1977)。某些主要的血管生成因子包括成纤维细胞生长因子-基本的, 血管内皮生长因子(VEGF)、血管生成素、细胞因子、细胞外基质蛋白质和基质金属蛋白酶。这些因子是由基质细胞和由活化的白细胞局部生成, 所述白细胞为募集到该区域的 (Risau, W. (1997) *Nature* 386(6626):671-674; Risau and Flamme(1995)*Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 11 :73-91)。与其它血管生成因子不同, 在血管生成期间 VEGF 起内皮细胞特定的促细胞分裂剂作用(Terman 等人, 1992 和 Ferrara, 1993)。

某些新生物(例如肿瘤)可刺激和固定 (harnessed) 血管生成以增加营养吸收。已经发现血管生成对直径超过 2-3 mm 的实体瘤的生长和对瘤转移必不可少(Folkman, 1995; reviewed in Bouck 等人, 1996)。与导致融合(anastomoses)和毛细血管成熟的正常血管生成形成对照, 与瘤形成相关的血管生成成为一个连续过程。附近的赘生细胞活化内皮细胞, 其不仅分泌刺激血管生成的 VEGF, 而且分泌降解周围细胞外基质的基质金属蛋白酶(MMP)。接着, 所述内皮细胞侵入细胞外基质, 其中他们迁移、增殖和组织形成新血管, 其支持新生物生长和存活。

新血管化的新生物继续生长, 导致进一步营养丧失和慢性前血管生成信号。新生物的脉管系统的特征在于出现腔隙和低速率的吻合。该部分功能障碍的脉管系统供应血管生成长期需要的物质。另外, 该不完善的脉管系统使瘤细胞脱落进入全身循环。因此, 新生物的血管生成潜在性与转移潜在性相关(Weidner 等人(1991)*N. Engl. J. Med.* 324(1):1-8; Folkman and Shing (1992) *J. Biol. Chem.* 267(16):10931-10934)。

由于重要比例的新生物取决于持续的血管生成, 血管生成的抑制阻断新生物生长, 其通常导致新生物完全坏死(Weidner 等人, (1991)*N. Engl. J. Med.* 324(1):1-8; Folkman and Shing(1992)*J. Biol. Chem.* 267(16):10931-10934)。

涉及血管生成的任何一个步骤和/或因素的抑制都可抑制新血管形成，因而影响肿瘤生长和转移的产生。实际上，已经估计到消除单个内皮细胞可以抑制 100 个肿瘤细胞生长。(Thorpe 等人, 1995)。也已经发现产生抗血管生成因子 VEGF 的抗体已经显示出抑制体内肿瘤发育(Kim 等人, 1993)。

作为治疗和处理患有癌症和许多医学病症的部分，阿片样物质激动剂比如吗啡被广泛用于相关疼痛。例如，在约一半在美国每年死于癌症的患者的护理末期中使用吗啡。阿片样物质激动剂，比如吗啡，包括一组作用于生物系统中的一系列内源性阿片样物质受体的化合物，所述阿片样物质受体例如 μ -、 κ -和 Δ -受体。通常，这些内源性受体结合内源性阿片样物质。内源性阿片样物质由哺乳动物细胞天然生成。内源性阿片样物质包括 β -内啡肽、脑啡肽和强啡肽。 β -内啡肽显示出对 μ 受体的优先选择，脑啡肽显示出对 Δ 受体的优先选择，强啡肽显示出对 κ 受体的优先选择。根据它们对内源性阿片样物质受体的选择性作用来分类阿片样物质激动剂。通常， μ 受体与疼痛缓解和化学依赖性(例如药物成瘾性和酒精中毒)相关。例如，吗啡为 μ 阿片样物质激动剂。阿片样物质受体不限于脑和中枢神经系统(CNS)，例如中枢受体。在整个身体的其它组织例如胃肠组织中可发现外周性阿片样物质受体。

尽管吗啡及其它阿片样物质药物在疼痛控制中应用很广，其可具有严重的副作用，所述副作用可能由外感受器的激活引起。所述副作用难于处理，且可导致患者拒绝基于阿片样物质的疼痛控制。阿片样物质治疗的副作用包括恶心、便秘、胃肠蠕动的抑制、呼吸抑制和免疫抑制。另外，吗啡及其它阿片样物质受体激动剂以典型的吗啡或吗啡当量的血液浓度可以在体外或体内刺激人微血管内皮细胞增殖和血管生成。该阿片样物质激动剂的预血管生成(pro-angiogenesis)活性，同时缓解了疼痛，可加速肿瘤发展。

类似地，根据它们对阿片样物质受体的作用，例如通过它们抗一种受体比抗另一种受体更有效的能力来分类阿片样物质拮抗剂。例如，阿片样物质拮抗剂纳洛酮在所有阿片样物质受体中起竞争性拮抗剂的作用，但是在 μ 受体中比在 κ 受体中的有效性高约十倍，因此，将其

分类为 μ 阿片样物质拮抗剂。阿片样物质拮抗剂可抗中枢性受体、外周受体或这两者。阿片样物质拮抗剂，特别是外周性阿片样物质拮抗剂，已经被用于减轻外源性给药阿片样物质的副作用，以及减轻过量内源性阿片样物质不需要的效应。阿片样物质拮抗剂也已经被检验它们作为特定类型癌症的抗癌剂的潜在用途，如在美国专利 No. 6, 384, 044 和 6, 136, 780 和在科学文献 Gupta 等人, *Cancer Research*, 62: 4491-98 (2002) 中描述的。阿片样物质拮抗剂的抗癌效果是有所争议的，并没有被很好地理解，但是认为阿片样物质拮抗剂已经显示出达到一定程度的抗癌效果与血管生成无关 (Poonawala T, 等人, *Wound Repair Regen.* 2005 Mar-Apr;13(2):165-74; Popov I. *Acta Chir Jugosl.* 2004;51(2):117-21; Blebea J, 等人, *J Vase Surg.* 2002 Mar;35(3):532-8; Balasubramanian S, 等人, *J Mol Cell Cardiol.* 2001 Dec;33(12):2179-87; Zagon IS, 等人, *Int J Oncol.* 2000 Nov;17(5):1053-61; Blebea J 等人, *J Vase Surg.* 2000 Aug;32(2):364-73; Pasi A, 等人, *Gen Pharmacol.* (991 ;22(6): 1077-9)。事实上，已经报道了在小鼠的异种移植物肿瘤模型中，阿片样物质拮抗剂纳洛酮没有对吗啡诱导的血管生成显示出明显的作用，Gupta 等人, *Cancer Research*, 62: 4491-98 (2002)。因此，出人意外地是现在发现阿片样物质拮抗剂可以抑制与血管生成相关的内皮增殖和迁移。

发明内容

本发明提供了一种使用阿片样物质拮抗剂来减少例如抑制或降低细胞增殖和迁移，特别是内皮细胞增殖和迁移的方法，所述细胞增殖和迁移包括与血管生成相关的，所述阿片样物质拮抗剂包括，但不限于外周受限制的拮抗剂(peripherally restricted antagonists)。

根据本发明的一个方面，提供了一种治疗方法。所述方法包括向受试者给药有效量的阿片样物质拮抗剂，所述受试者患有以不需要的内皮细胞迁移或增殖为特征的疾病。该治疗可抑制迁移和增殖之一或两者。所述不需要的内皮细胞迁移或增殖可以为不需要的血管内皮细胞迁移或增殖，其包括，但不限于不必要的新血管形成或血管生成。

不需要的新血管形成的实例包括，但不限于与癌症相关的新血管形成和眼部新血管形成。所述疾病可以是以不需要的内皮细胞的迁移或增殖为特征的任意疾病。重要的这样的疾病为癌症、镰状细胞贫血、血管损伤、增殖性视网膜病和在肾和肺中不需要的内皮细胞增殖。

在重要的实施方案中，所述阿片样物质拮抗剂为外周阿片样物质拮抗剂(peripheral opioid antagonist)。外周阿片样物质拮抗剂包括，但不限于(第四或第三左吗喃衍生物(quaternary or tertiary morphinan derivatives)、哌啶-N-烷基羧酸酯和第四苯并吗啡烷(quaternary benzomorphans)。一种重要的这种外周阿片样物质拮抗剂为甲基纳曲酮。另一种阿片样物质拮抗剂为 alvimopan。在重要的实施方案中，所述有效量为能使所述受试者具有的阿片样物质拮抗剂的有效循环血浆水平持续至少 1 周、至少 2 周、至少 3 周和优选至少 4 周。

本发明还包括共同给药阿片样物质拮抗剂与非阿片样物质拮抗剂药剂，但是所述非阿片样物质拮抗剂仍然在治疗以不需要的内皮细胞迁移或增殖为特征的疾病中 useful。这种药剂的实例包括抗癌剂、抗新血管形成剂(例如，抗 VEGF 单克隆抗体)、抗糖尿病剂、抗镰状红细胞剂、伤口愈合剂和抗内皮细胞增殖剂。

应当理解所述受试者可以或不可以同时服用阿片样物质治疗剂，取决于所述受试者患有的特定疾病、疾病的严重性和所述患者对于疼痛控制的需要。在某些实施方案中，所述受试者同时服用阿片样物质治疗剂。在某些实施方案中，所述受试者没有同时服用阿片样物质治疗剂。在某些实施方案中，所述受试者同时服用长期阿片样物质治疗剂。在某些实施方案中，所述受试者没有同时服用长期阿片样物质治疗剂。

根据本发明的另一个方案，提供一种抑制内皮细胞中 VEGF 活性的方法。所述方法包括使细胞与有效量的阿片样物质拮抗剂接触。

根据本发明的另一个方案，提供一种抑制内皮细胞中外源性阿片诱导的细胞迁移或增殖的方法。所述方法包括使细胞与有效量的阿片样物质拮抗剂接触。

根据本发明的另一个方案，提供一种抑制内皮细胞中 Rho A 活化

的方法。所述方法包括使细胞与有效量的阿片样物质拮抗剂接触。

根据任一项上述实施方案，所述阿片样物质拮抗剂优选地为外周阿片样物质拮抗剂，最优选为甲基纳曲酮。

本发明提供减少肿瘤或癌症的内皮细胞迁移和/或增殖的方法，其包括使细胞与抗迁移或抗增殖量的阿片样物质拮抗剂接触。在另一个方面，本发明提供减少与癌症相关的血管生成的方法。因此，本发明涉及治疗人类癌症患者，例如通过减少患者的癌组织中血管生成的方法，其包括向患者的癌组织给药有效量的阿片样物质拮抗剂。

本发明还提供一种治疗异常新血管形成的方法，其包括向需要该治疗的患者给药一定量的阿片样物质拮抗剂来抑制血管形成。本发明还包括减少动物组织中肿瘤发展和转移的方法，其包括使肿瘤细胞或组织与生长抑制量的阿片样物质拮抗剂接触，和减少受试者中过度增殖性细胞增殖的方法，其包括向受试者给药至少一种阿片样物质拮抗剂，给药量为有效地减少过度增殖性细胞增殖。

在一个实施方案中，所述阿片样物质拮抗剂为在手术前后使用。“手术前后”指在外科手术或外科过程或内镜程序和尤其是涉及除去肿瘤的外科手术或手术操作之前(例如，做准备)、期间和/或立即之后，所述内镜程序例如结肠镜检查、胃镜检查(gastrolaparoscopy)。阿片样物质拮抗剂起减少肿瘤复发和/或转移的作用，尤其是由与此相关的血管生成产生的。

可以预料阿片样物质拮抗剂将优选地以连续给药方案给药，例如保持最少的和甚至更优选地相对固定的血液水平的方案。进一步涉及的是本发明的方法可在某些与异常血管生成相关的某些疾病中具有预防意义。因此，本发明提供一种预防哺乳动物中疾病出现或再现的方法，所述疾病的特征在于不需要的内皮细胞迁移或增殖，所述迁移或增殖包括异常血管生成，其包括向需要这种治疗的哺乳动物给药有效量的阿片样物质拮抗剂，其中所述疾病为癌症、镰状细胞贫血、眼新血管病、糖尿病、眼视网膜病或其他在肾、眼睛或肺中不需要的内皮增殖。因此，应当理解，如本文使用的治疗患有以不需要的内皮细胞增殖或迁移为特征的疾病的受试者包括治疗患有活化的疾病的受试者以抑制或治愈所述疾病和治疗受试者以抑制疾病复发。例如，所述患

者可能已经摘除了实体瘤，并且所述患者可接受治疗以抑制肿瘤复发。

在减少细胞增殖中，本发明提供一种治疗哺乳动物中表达血管内皮生长因子(VEGF)的细胞的异常细胞增殖的方法，其包括向哺乳动物给药治疗有效量的拮抗剂。本发明还包括一种治疗受试者中癌组织的方法，其包括向所述受试者给药足够抑制癌组织中 VEGF 生成量的阿片样物质拮抗剂，以及一种治疗血管生成疾病的方法，所述方法包括在有效地抑制 VEGF 诱导的血管生成和治疗血管生成疾病的条件下使组织或内皮细胞群与包含一定量的至少一种阿片样物质拮抗剂的组合物接触。

在另一个方面，本发明提供一种抑制或减少例如肿瘤细胞的血管生成，特别是阿片样物质诱导的血管生成的方法，其通过向经历血管生成的细胞给药或提供阿片样物质拮抗剂特别是外周阿片样物质拮抗剂来进行。在进一步的方面，本发明提供治疗接受阿片样物质治疗的患者中阿片样物质诱导的血管生成或其中血管生成为由内源性阿片样物质诱导的患者的方法。前者为典型地基于阿片样物质疼痛控制的癌症患者。所述方法包括向患者给药抗血管生成量的阿片样物质拮抗剂，所述量例如足够抑制或减少阿片样物质诱导的血管生成的量。在接受阿片样物质治疗的那些患者中，所述阿片样物质和外周阿片样物质拮抗剂可以共同给药。因此，外周阿片样物质拮抗剂可以用于抑制或减小阿片样物质对肿瘤细胞的血管生成影响和减少肿瘤生长。适宜的阿片样物质拮抗剂通常包括杂环胺化合物，其属于几种不同类的化合物。例如，一个种类适宜地为左吗南的第三衍生物，特别是 noroxymorphone 的第三衍生物。在一个实施方案中，所述 noroxymorphone 的第三衍生物为例如纳洛酮或纳屈酮。

适宜的外周阿片样物质拮抗剂也通常为杂环胺化合物，其属于几种不同类的化合物。例如，一个种类适宜地为左吗南的第四衍生物，特别是 noroxymorphone 的第四衍生物。在一个实施方案中，noroxymorphone 的第四衍生物为例如 N-甲基纳曲酮(或简单的甲基纳曲酮)。另一种类为 N-取代的哌啶类化合物。在一个实施方案中，所述 N-哌啶为哌啶-N-烷基羰基酯，比如例如 alvimopan。可能在本发明的方法中有价值的另一种类的化合物为苯并吗啡烷的第四衍生物。

在本发明的某些实施方案中，所述阿片样物质拮抗剂可以是 μ 阿片样物质拮抗剂。在其他实施方案中，所述阿片样物质拮抗剂可以是 κ 阿片样物质拮抗剂。本发明也包括给药多于一种阿片样物质拮抗剂，其包括 μ 拮抗剂的组合、 κ 拮抗剂的组合和 μ 和 κ 拮抗剂的组合，例如甲基纳曲酮和 alvimopan 的组合，或纳屈酮和甲基纳曲酮的组合。

在进一步的实施方案中，本发明提供治疗接受阿片样物质的患者中阿片样物质诱导的血管生成的方法，其中向所述患者共同给药外周阿片样物质拮抗剂和至少一种其他非阿片样物质或阿片样物质拮抗剂的治疗剂。适宜的治疗剂包括抗癌剂(包括化疗剂和抗肿瘤剂)以及其他抗血管生成剂。

在另一个方面，本发明提供一种减少医学介入(这样的介入包括但不限于外科手术，例如肺手术、外科过程和内镜程序，例如结肠镜检查、胃镜检查、化疗等)后癌症或肿瘤复发危险的方法，其包括向癌症患者共同给药阿片样物质拮抗剂。因此，本发明涉及例如将患者中例如乳腺癌手术后复发降至最小的方法，其包括向患者给药有效量的阿片样物质拮抗剂。根据本发明的外周阿片样物质拮抗剂，例如 MNTX 也可以抑制内皮细胞中的 VEGF、血小板衍生生长因子(PDGF)或鞘氨醇1-磷酸酯(SIP)-刺激的或诱导的细胞增殖。

附图说明

参照本文给出的具体实施方案的详细说明与附图可以更好地理解和领会本发明，在所述附图中：

图 1 为人微血管内皮细胞(HMVEC)迁移的剂量依赖性抑制的柱状图，其描述了实施例 1 的结果。

图 2 为人微血管内皮细胞迁移的剂量依赖性抑制的柱状图，其描述了实施例 2 的结果。

图 3 为使用 MNTX 和 MNTX+DAMGO 的 HMVEC 迁移的剂量依赖性抑制的柱状图。

图 4 为使用纳洛酮和纳洛酮+ DAMGO 的 HMVEC 迁移的剂量依赖性抑制的柱状图。

图 5 为 M3G 和 M6G 对 HMVEC 迁移的剂量依赖性作用的柱状图。

图 6 为显示在存在 MNTX 和不存在 MNTX 下吗啡诱导的内皮细胞迁移的显微照片。A =对照, B=MS(硫酸吗啡)、培养板 C=MNTX, 培养板 D=MS+MNTX。在培养板 A 中的箭头着重显示了成功迁移跨越膜的一些细胞。

图 7 为在存在 VEGF、吗啡和 DAMGO 且有或没有 MNTX 下人肺微血管内皮细胞的增殖(A)和迁移(B)百分比的柱状图。

图 8 为显示在存在 VEGF、吗啡和 DAMGO 且有或者没有 MNTX 下, 在人肺微血管内皮细胞中使用免疫沉淀的 VEGF R. 1 或 2 和抗磷酸酪氨酸的酪氨酸磷酸化(活化)抗 VEGF R. 1(FI_t-1)和 2(FI_k-1)免疫印迹 (A), 和在存在 VEGF、吗啡和 DAMGO 且有或者没有 VEGF R. 抑制剂下人肺微血管内皮细胞的增殖和迁移百分比的柱状图(B)。

图 9 为显示在存在 VEGF、吗啡和 DAMGO 且有或者没有 MNTX(A)或 VEGF R. 抑制剂(B)下, 在人肺微血管内皮细胞中使用抗 RhoA 的 RhoA 活化的免疫印迹。

图 10 为在存在加扰 siRNA(scramble siRNA)(靶向未知的人类 mRNA 序列) 或 RhoA siRNA 的人肺微血管内皮细胞的抗 Rho A 免疫印迹(A)和在存在 VEGF、吗啡和 DAMGO 且有或者没有加扰 siRNA(靶向未知的人 mRNA 序列) 或 RhoA siRNA 下人肺微血管内皮细胞的增殖(B)和迁移(C)百分比的柱状图。

图 11 为概述 MNTX 对血管生成作用机制的示意图。

图 12 为在存在 S1P、VEGF、PDGF、吗啡和 DAMGO 且有或没有 MNTX 下肺微血管内皮细胞的增殖高于对照的百分比的柱状图。

图 13 为在存在 S1P、VEGF、PDGF、吗啡和 DAMGO 且有或没有 MNTX 下肺微血管内皮细胞的迁移高于对照的百分比的柱状图。

图 14 为在存在 S1P、VEGF、PDGF、吗啡和 DAMGO 与加扰(对照) siRNA 或与 μ 阿片样物质受体 siRNA 下肺微血管内皮细胞的增殖高于对照的百分比的柱状图。

图 15 为在存在 S1P、VEGF、PDGF、吗啡和 DAMGO 与加扰(对照) siRNA 或与 μ 阿片样物质受体 siRNA 下肺微血管内皮细胞的迁移高于对照的百分比的柱状图。

图 16 为显示在存在吗啡、DAMGO、S1P、VEGF、PDGF 且有 MNTX(C、

D) 或没有 MNTX(A, B) 下使用人肺微血管内皮细胞的免疫沉淀的 μ 阿片样物质受体和(A, C) 抗磷酸丝氨酸、(B, D) 抗磷酸苏氨酸的 μ 阿片样物质受体的磷酸化(活化)的免疫印迹, (E) 是抗 μ 阿片样物质受体的免疫印记。

图 17 为在存在吗啡、DAMGO、S1P、VEGF、PDGF 且有 MNTX(B) 和没有 MNTX(A) 下人肺微血管内皮细胞的(A, B) 活化的 RhoA 和(C) 总 RhoA 的抗 RhoA 免疫印迹。

图 18 为在存在吗啡、DAMGO、VEGF(顶图) 或 PDGF(底图) 且有 MNTX(B, 在各个图中) 或没有 MNTX(A, 在每个图中) 下人肺微血管内皮细胞的顶图: (A, B) 抗磷酸酪氨酸, (C) 抗 VEGF R 和底图: (A, B) 抗磷酸酪氨酸, (C) 抗 PDGF R 的免疫印迹。

图 19 为显示在存在吗啡、DAMGO 和 S1P 且有 MNTX(B) 或没有 MNTX(A) 下使用人肺微血管内皮细胞的免疫沉淀的 $S1P_3$ 受体和(A, B) 抗磷酸酪氨酸, (C) 抗 $S1P_3$ R 的酪氨酸磷酸化(活化) $S1P_3$ 受体的免疫印迹。

图 20 为在存在 S1P、VEGF、PDGF、吗啡和 DAMGO 与加扰(对照) siRNA 或与 RhoA siRNA 下肺微血管内皮细胞的增殖高于对照的百分比的柱状图。

图 21 为在存在 S1P、VEGF、PDGF、吗啡和 DAMGO 与加扰(对照) siRNA 或与 RhoA siRNA 下肺微血管内皮细胞的迁移高于对照的百分比的柱状图。

图 22 为概述 MNTX 对 RhoA 活化和血管生成作用机制的示意图。

具体实施方式

本发明提供减少异常或不想要的内皮细胞迁移和/或增殖的方法。因而, 本发明提供通过使用阿片样物质拮抗剂减少受试者的组织或器官中血管生成的方法, 和治疗哺乳动物中血管生成相关的疾病和其它过度增生疾病的新方法。例如, 如上所述, 实体瘤依靠新血管的生成使营养到达肿瘤内的细胞。血管生成需要的生长因子可以通过肿瘤细胞或可替换的外源性因子产生, 比如阿片样物质可以刺激新血管生长。本发明提供了一种通过使用阿片样物质拮抗剂治疗这样的肿瘤的新治疗方法, 其中肿瘤内生成的新血管, 而不是肿瘤细胞自身是靶点。该

治疗不易于导致耐药性肿瘤细胞的发育。

本文描述的为阿片样物质拮抗剂，其抑制由内源性或外源性阿片样物质和生长因子诱导的增殖和迁移，所述生长因子比如 VEGF、PDGF、S1P 等。特别地，外周阿片样物质拮抗剂显示出抑制阿片样物质和生长因子诱导的内皮细胞增殖和迁移的基本功效。外周阿片样物质拮抗剂甲基纳曲酮 (MNTX) 以浓度依赖性方式抑制阿片样物质和生长因子诱导的增殖和迁移两者。而且，纳洛酮还抑制阿片样物质诱导的内皮迁移。然而，应当指出在比较高的摩尔浓度（微摩尔）的纳洛酮下出现纳洛酮抑制 DAMGO 诱导的内皮细胞迁移。而且，现在已经发现阿片样物质拮抗剂和外周阿片样物质拮抗剂，特别是 MNTX，经由抑制受体磷酸化和/或转活化及随后抑制 RhoA 活化来抑制激动剂诱导的内皮细胞 (EC) 增殖和迁移。所述激动剂可以为外源性和/或内源性的阿片样物质、血管生成因子 (VEGF) 及其它增殖和/或迁移刺激因子 (PDGF、S1P、S1P₃ 受体、RhoA 等)。这些结果表明通过阿片样物质拮抗剂抑制血管生成可以作为一种用于其它疾病与癌症的有用的治疗介入。

在详细说明本发明的任一实施方案前，应当理解本发明不限于其在下述说明书中阐述的或在图画的附图中图解的本发明的结构和功能的详细应用。本发明能够有其它实施方式和以多种方式进行实施或进行。还应当理解本文使用的术语和专有名词是用于说明的目的，不应当认为是限制。本文使用的术语比如“包括 (including、comprising)”或“具有”及其变化指包括其后列出项和其同等物以及附加项。

除非另有说明，根据常规用法使用术语。然而，如本文使用的下述定义可用于帮助有经验的实施者理解本发明。

“受试者”指人、狗、猫和马。

“长期阿片样物质应用”指其特征在于需要基本上较高水平的阿片样物质以产生作为本领域众所周知的现有阿片样物质应用结果的治疗益处。如本文使用的长期阿片样物质应用包括每日阿片样物质治疗一周或更长或间歇性阿片样物质应用至少两周。

“烷基”指脂肪族烃，其是饱和的，并且其可以是在链中具有从 1 至约 10 个碳原子的直链、支链或环，及其中链的所有组合或亚组合。示例性的烷基包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲

丁基、叔丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基和癸基。

“低级烷基”指具有 1 至约 6 个碳原子的烷基。

“烯基”指在链中包含至少一个碳-碳双键和具有从 2 至约 10 个碳原子的脂肪族烃基，及其中链的所有组合和亚组合。示例性的烯基包括乙烯基、丙烯基、丁烯基、戊烯基、己烯基、庚烯基、辛烯基、壬烯基和癸烯基。

“炔基”指在链中包含至少一个碳-碳三键和具有从 2 至约 10 个碳原子的脂肪族烃基，及其中链的所有组合和亚组合。示例性的炔基包括乙炔基、丙炔基、丁炔基、戊炔基、己炔基、庚炔基、辛炔基、壬炔基和癸炔基。

“亚烷基”指具有从 1 至约 6 个碳原子的二价脂肪族烃基，及其中链的所有组合和亚组合。所述亚烷基可以是直链的、支链的或环状的。可以任选地在亚烷基中插入一个或多个氧、硫或任选地取代的氮原子，其中所述氮取代基为如前述的烷基。

“亚烯基”指包含至少一个碳-碳双键的亚烷基。示例性的亚烯基包括亚乙烯基(-CH=CH-)和亚丙烯基(CH=CHCH₂-)。

“环烷基”指具有约 3 至约 10 个碳的任意稳定的单环或双环，及其中环的所有组合和亚组合。所述环烷基可以任选地用一个或多个环烷基取代基取代。示例性的环烷基包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基和环辛基。

“环烷基取代的烷基”指用环烷基，优选 C₃-C₈ 环烷基在末端碳原子上取代的直链烷基，优选低级烷基。示例性的环烷基取代的烷基包括环己基甲基、环己基乙基、环戊基乙基、环戊基丙基、环丙基甲基等。

“环烯基”指具有约 4 至约 10 个碳的烯烃不饱和环脂族基团，及其中环的所有组合和亚组合。

“烷氧基”指其中烷基为如前述的烷基-O-基。示例性的烷氧基包括，例如甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基和庚氧基。

“烷氧基-烷基”指其中烷基为如前所述的烷基-O-烷基。

“酰基”指其中烷基为如前所述的烷基-CO 基团。示例性的酰基包括乙酰基、丙酰基、2-甲基丙酰基、丁酰基和棕榈酰基。

“芳基”指包含从约 6 至约 10 个碳的芳香碳环基团，及其中环的所有组合和亚组合。所述芳基可以任选地用一个或两个或多个芳基取代基取代。示例性的芳基包括苯基和萘基。

“芳基取代的烷基”指用任选地取代的芳基，优选任选地取代的苯基环在末端碳原子上取代的直链烷基，优选低级烷基。示例性的芳基取代的烷基包括，例如苯甲基、苯乙基和 3-(4-甲基)丙基。

“杂环”指包含从约 4 至约 10 个成员的单环或多环环状系统碳环基，及其中环的所有组合和亚组合，其中一个或多个所述环成员为不同于碳的成员，例如氮、氧或硫。所述杂环基可以为芳香的或非芳香的。示例性的杂环基包括例如吡咯和哌啶。

“卤素”指氟、氯、溴或碘。

与阿片样物质拮抗剂有关的“外周”指主要对中枢神经系统之外的生理学系统和组分起作用的阿片样物质拮抗剂，例如，他们不易于以有效量穿过血脑屏障而抑制阿片样物质中枢效果。换句话说，当外周给药时，外周阿片样物质拮抗剂不会有效地抑制阿片样物质的止痛效果，例如它们不会降低阿片样物质的止痛效果。例如，在本发明中使用的外周阿片样物质拮抗剂化合物显示出与胃肠组织相关的高水平的活性，而显示出降低的或基本上没有的中枢神经系统(CNS)活性。在本发明方法中使用的外周阿片样物质拮抗剂化合物在适当地显示出在 CNS 中少约 5-15%的其药理学活性，约 0%(例如没有 CNS 活性)为最适宜的。外周阿片样物质拮抗剂的非中枢作用特征通常与分子的电性、极性和/或大小相关。例如，当作用于中枢的叔胺阿片样物质拮抗剂为中性分子时，作用于外周的季胺阿片样物质拮抗剂为带正电荷的。在本发明中有用的外周阿片样物质拮抗剂典型地为 μ 和/或 κ 阿片样物质拮抗剂。

一般而言，如本文使用的“血管生成抑制”或“抗血管生成”指分子/化合物减少，例如抑制、降低或调节新血管增殖的能力，及例如，在存在某些生长因子下在培养基中降低或抑制人微血管内皮细胞的迁移和增殖的能力。如上所述，内皮细胞形成新血管包括细胞的迁移、增殖和分化。

在下述本发明的方法的说明中，除非另有说明，制备步骤为在室

温和大气压力下进行。还特别地理解本文叙述的任意数值范围包括从下限值至上限值的所有值，例如，在穷举的最低值和最高值之间的所有可能的数值组合将被认为是在本申请中明确标明的。例如，如果标明浓度范围或有益效果范围为如 1%至 50%，其是指比如 2%至 40%、10%至 30%、或 1%至 3%等的值为在本说明书中明确列举的。这些仅仅为特别指出的实例。

在一个方面，本发明涉及减少受试者的组织或器官中异常或不想要的细胞特别是内皮细胞迁移和/或增殖和血管生成的方法。所述方法包括向患者的组织或器官的内皮细胞提供或给药一种或多种有效量的阿片样物质拮抗剂以抑制内皮细胞迁移和增殖及血管生成。所述血管生成可部分为特别地用于癌症患者中疼痛控制而接受阿片样物质治疗或具有高水平内源性阿片样物质的结果。

可以看出吗啡和 μ 激动剂脑啡肽 DAMGO ([D-Ala²、N-McPhe¹、Gly⁵-醇]脑啡肽) 每个都引起内皮细胞迁移的剂量-依赖性增加，其类似于血管内皮生长因子 (VEGF) 的剂量-依赖性增加，如通过趋药性测定(如下述实施例中详细描述)或其他类似的用于测定肿瘤血管生成中因子和作用于其的药物的测定。按临床适当浓度的吗啡，效果的大小为通过 VEGF 获得的约 70%。该基于吗啡的内皮细胞迁移为通过 μ 阿片样物质拮抗剂甲基纳曲酮 (MNTX) 以剂量依赖性方式减少。例如，用 10^{-7} M 的低浓度的吗啡诱导的内皮细胞迁移显著地被 10^{-7} M MNTX 阻断(图 2)。该减弱作用强烈地表明内皮细胞迁移为通过吗啡对 μ 阿片样物质受体 (MOR) 作用介导的。如下述实施例中描述的，通过显示出高选择性合成脑啡肽 μ 激动剂 DAMGO 也诱导迁移的实验证实了经由 MOR 而不是其他阿片样物质受体的效果。DAMGO 诱导的迁移作用也被 MNTX 阻断(图 3)。

在一个全面考查中 (Neumann 等人, Pain 1982; 13:247-52), 癌症患者中的痛觉缺失与大量稳态浓度的吗啡和从 6 至 364 ng/mL 的血浆浓度相关。观察到吗啡以临床上剂量范围内的 100 ng/ml 每孔引起内皮细胞迁移的效果。因此，本申请的发明人相信将保持 MNTX 的血浆水平在血浆 MNTX 为约 25 至 150 ng/mL 的最低水平的 MNTX 剂量为适宜的。这样的剂量是可达到的和良好耐受的 (Yuan 等人, J Clin Pharmacol

2005;45:538-46)。

Alvimopan, 另一种口服的选择性外周阿片样物质拮抗剂, 为后期研发的用于预防手术后肠梗阻和治疗阿片样物质诱导的便秘的药物 (Moss 等人, Pain relief without side effects: peripheral opioid antagonists. In Schwartz, A.J., editor. 33rd ASA Refresher Course in Anesthesiology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins(in press))。存在某些 **alvimopan** 跨膜转运(J. Foss, 等人, Clin. Pharm. & Ther. 2005, PII-90, p.74)。因此, 其可具有逆转某些阿片样物质的全身效应而没有影响痛觉缺失的能力, 即使当口服给药时。

不受任何特定理论的束缚, μ 阿片样物质对内皮细胞迁移的作用机制存在于膜水平, 因为与纳洛酮不同, MNTX 在生理学 pH 下为带电分子。吗啡经由 G-蛋白质偶合受体起作用, 而 VEGF 通过受体酪氨酸激酶起作用。虽然 μ 激动剂和 VEGF 的作用可能是独立的, 存在增加的受体转活化作为机制的证据。现有的研究证实百日咳毒素依赖性 GPCRs 转活化 VEGF 受体 -2/F1 K1(Zeng, H. 等人, J. Biol. Chem. 2003;278:20738-45)。按该方式, 吗啡可以转活化 F11c-1, 且促进其中可出现内皮细胞增殖和肿瘤生长的环境。用 T241 纤维肉瘤细胞感染的 MOR 敲除(knockout)的小鼠的最新研究证实在吗啡处理的小鼠和对照组中肿瘤生长的发病率有显著的不同, 与对照组相比, 在吗啡处理的小鼠中 F1 1C-1 表达增加 10 倍, 相比在吗啡处理的 KO 小鼠中没有增加(K. Gupta, personal communication)。这进一步提供了吗啡刺激内皮细胞增殖和促进肿瘤生长可能是由转活化 FLK1 磷酸化的证据。因而, 本发明提供了使用 MNTX 以及其它外周阿片样物质拮抗剂与目前靶向 VEGF 的治疗剂组合的潜在临床策略。尽管受体转活化的直接作用是可能的, 涉及肿瘤增殖的潜在附加的因子可能起作为疼痛和炎症的累积器(integrators)的趋化因子的作用。在这个问题上的最近综述(White 等人, Nature Rev. Drug Discovery 2005;4:834-44)也提出了白细胞在活化阿片样物质受体中可能的作用。

而且, 可以看出吗啡、DAMGO 和 VEGF 刺激 RhoA 活化, 所述活化被阿片样物质拮抗剂比如 MNTX 抑制。RhoA 为一种参与血管生成的重要的

信号分子(Aepfelbacher 等人, 1997; Cascone 等人, 2003; Hoang 等人, 2004; Liu 和 Sanger, 2004)。VEGF 受体转活化对于麻醉剂诱导的 RhoA 活化很重要。沉默(Silencing)RhoA 表达阻断阿片样物质和 VEGF 诱导的 EC 增殖和迁移, 其证实了 RhoA 活化在激动剂诱导的 EC 血管生成活性中的作用。RhoA 活化的 MNTX 介导的减弱可能对于 MNTX 对阿片样物质和 VEGF 诱导的血管生成的抑制作用很重要。

因为吗啡及其它阿片样物质以临床剂量增加内皮细胞迁移, 本发明在阿片样物质拮抗剂治疗服用重要剂量和缓释剂量的阿片样物质的患者中可能有治疗价值, 所述患者患有依赖于血管生成过程的肿瘤。进一步地, 虽然本发明人临床观察集中在吗啡上, 其为外源给药的內源性阿片样物质, 其由应激或疼痛释放, 也可在内皮细胞迁移中起作用。基于在下述实施例中详细描述的内皮细胞迁移实验, MNTX 和阿片样物质拮抗剂通常具有如抗血管生成治疗剂的治疗价值, 即使不存在给药外源性阿片样物质(如本文详细描述的)。预想到本发明的方法将抑制或减少肿瘤内或周围的血管生长。抑制肿瘤内血管生长防止了营养和氧被提供给肿瘤以支持载体生长超过某一大小。最小化血管或其他肿瘤的数量也减少了肿瘤将转移的概率。

本发明可能在阿片样物质拮抗剂治疗患者中有治疗价值, 所述患者患有依靠血管生成过程的肿瘤。依靠血管生成过程的肿瘤为实体瘤、白血病和骨髓瘤。实体瘤包括, 但不限于肾上腺皮质细胞癌、膀胱癌: 鳞状细胞癌、膀胱上皮癌; 骨瘤: 釉质瘤、动脉瘤样骨囊肿、成软骨细胞瘤、软骨瘤、软骨粘液样纤维瘤、软骨粘液样纤维瘤、软骨肉瘤、骨纤维性结构不良、巨细胞瘤、骨软骨瘤、骨肉瘤; 乳腺肿瘤: 分泌性导管癌、脊索瘤; 结肠肿瘤: 结肠直肠腺癌; 眼瘤; 葡萄膜黑色素瘤 (posterior uveal melanoma)、不完全性骨纤维生成、头颈鳞状细胞癌、肾肿瘤: 不染色的肾细胞癌、透明细胞肾细胞癌、肾胚细胞瘤(肾母细胞瘤)、肾: 乳头肾细胞癌、原发性肾 ASPSCR1-TFE3 肿瘤、肾细胞癌; 肝肿瘤: 肝胚细胞瘤、肝细胞癌; 肺肿瘤: 非小细胞癌、小细胞癌; 软器官的恶性黑色素瘤; 神经系统肿瘤: 髓母细胞瘤、脑膜瘤、成神经细胞瘤、星形细胞瘤、室管膜瘤、周围神经鞘瘤、嗜铬细胞瘤; 卵巢肿瘤: 上皮细胞瘤、生殖细胞瘤、性索间质细胞瘤、周皮细胞瘤;

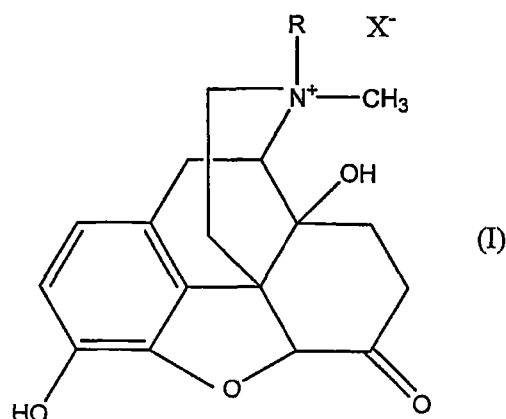
垂体腺瘤；棒状肿瘤(rhabdoid tumor)；皮肤瘤：表皮良性纤维组织细胞瘤；平滑肌肿瘤：静脉平滑肌瘤；软组织肿瘤：脂肪肉瘤、粘液样脂肪肉瘤、低度纤维粘液样肉瘤、平滑肌肉瘤、软组织腺泡状肉瘤、血管瘤样纤维组织细胞瘤(AFH)、明细胞肉瘤、结缔组织增生性小圆细胞肿瘤、弹力纤维瘤、尤因氏瘤、骨路外粘液样软骨肉瘤、炎性成肌纤维瘤肿瘤、成脂细胞瘤、脂肪瘤/良性脂肪瘤、脂肪肉瘤/恶性脂肪瘤、恶性肌上皮瘤、横纹肌肉瘤、滑膜肉瘤、扁平细胞癌；睾丸肿瘤：生殖细胞瘤、精母细胞精原细胞瘤；甲状腺瘤：退行发育的(未分化的)癌、嗜酸瘤细胞瘤、乳头状癌；子宫肿瘤：子宫颈癌、子宫内膜癌、平滑肌瘤等。

在本发明的一个实施方案中，所述肿瘤为前列腺癌、胃肠肿瘤比如结肠癌或胰癌，本发明的化合物与如本文所述的其他抗癌剂共同给药。

根据本发明的阿片样物质拮抗剂包括中枢和外周作用的阿片样物质拮抗剂。预期到特别有用的那些拮抗剂适宜地为外周阿片样物质拮抗剂。特别适宜的为 μ 阿片样物质拮抗剂，特别是 μ 外周阿片样物质拮抗剂。阿片样物质拮抗剂形成一类可以在结构方面改变同时保持外周受限性质的化合物。这些化合物包括第三和第四左吗南，特别是noroxymorphone 衍生物、N-取代的哌啶，并且特别是哌啶-N-羧酸酯和20 第三和第四苯并吗啡烷(20 tertiary and quaternary benzomorphans)。外周受限制的拮抗剂，同时其在结构方面改变，典型地为带电的，极化的和/或高分子量，其中的每点都阻止了他们跨过血脑屏障。

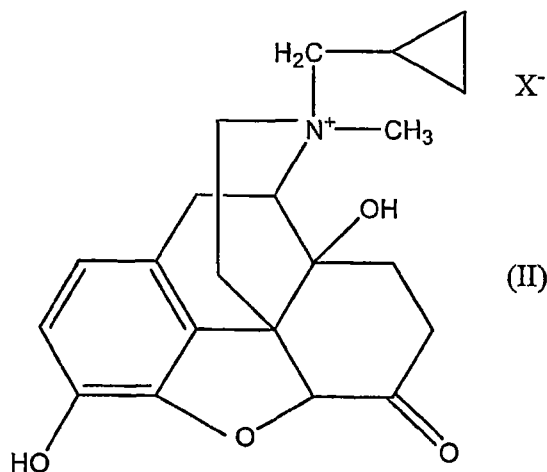
阿片样物质拮抗剂的实例，其穿过血脑屏障且具有中枢(和外周)活性，包括例如纳洛酮、纳屈酮(其中的每种都为从 Baxter Pharmaceutical Products, Inc 市售获得)和纳美芬(例如可从 DuPont Pharma 获得)。这些可在减少中枢神经系统中或在没有用于疼痛控制治疗的或其他阿片样物质治疗的患者中的血管生成中价值。

本发明所用的外周阿片样物质可以是第四左吗南衍生物的化合物，特别是式(I)的第四 noroxymorphone:



其中 R 为烷基、烯基、炔基、芳基、环烷基取代的烷基或芳基取代的烷基，且 X' 为阴离子，特别是氯、溴、碘或甲基硫酸根阴离子。式 (I) 的 noroxymorphone 衍生物可以例如通过在美国专利 No. 4, 176, 186 中的步骤制备，将其引入本文作为参考；也可参见美国专利 Nos. 4, 719, 215; 4, 861, 781; 5, 102, 887; 5, 972, 954 和 6, 274, 591、美国专利申请 Nos. 2002/0028825 和 2003/0022909；和 PCT 公布 Nos. WO 99/22737 和 WO 98/25613，将所有这些都引入本文作为参考。

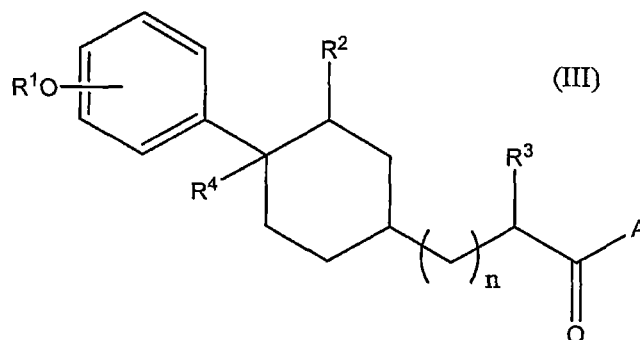
特别有用的式 (I) 的化合物为如在式 (II) 中表示的 N-甲基纳曲酮 (或仅仅为甲基纳曲酮)，其中 R 为环丙基甲基：



其中 X' 如上所述。甲基纳曲酮为一种阿片样物质拮抗剂纳屈酮的第四衍生物。甲基纳曲酮以盐存在，因此，如本文使用的“甲基纳曲酮”或“MNTX”包括盐。“甲基纳曲酮”或“MNTX”特别地包括但不限于甲基纳曲酮的溴化物盐、氯化物盐、碘化物盐、碳酸盐和硫酸盐。在文献中使用的 MNTX 的溴化盐的名称包括：甲基纳曲酮溴化物；N-甲基纳曲酮溴化物；纳屈酮甲溴化物；纳屈酮甲基溴化物；SC-37359、

MRZ-2663-BR 和 N-cyclopropylmethylnoroxymorphine-甲溴化物。甲基纳曲酮为从例如 Mallinckrodt 药物, St. Louis, Mo 市售获得。提供的甲基纳曲酮呈白色晶体粉末, 其易溶解在水中, 典型地呈溴化物盐。通过反相 HPLC 测得提供的化合物为 99.4% 纯, 其包括少于 0.011% 的通过同样的方法测得的未第四化 (unquatemized) 的纳屈酮。甲基纳曲酮可按例如约 5 mg/mL 的浓度呈无菌溶液提供。

其他适宜的外周阿片样物质拮抗剂可包括 N-取代的哌啶, 特别是如式 (III) 表示的哌啶-N-烷基羧酸盐:



其中

R^1 为氢或烷基;

R^2 为氢、烷基或烯基;

R^3 为氢、烷基、烯基、芳基、环烷基、环烯基、环烷基取代的烷基、环烯基取代的烷基或芳基取代的烷基;

R^4 为氢、烷基或烯基;

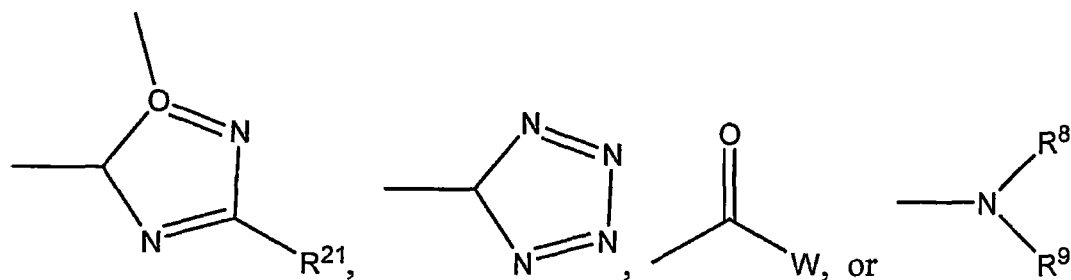
A 为 OR^5 或 NR^6R^7 ; 其中

R^5 为氢、烷基、烯基、环烷基、环烯基、环烷基取代的烷基、环烯基取代的烷基或芳基取代的烷基;

R^6 为氢或烷基;

R^7 为氢、烷基、烯基、芳基、环烷基、环烯基、环烷基-取代的烷基、环烯基-取代的烷基或芳基取代的烷基, 或亚烷基-取代的 B 或与它们连接的氮原子连接在一起, R^6 和 R^7 形成选自吡咯和哌啶的杂环;

B 为



其中 R⁸ 为氢或烷基；

R⁹ 为氢、烷基、烯基、芳基、环烷基、环烯基、环烷基-取代的烷基、环烯基-取代的烷基或芳基取代的烷基，或与它们连接的氮原子连接在一起，R⁸ 和 R⁹ 形成选自吡咯和哌啶的杂环；

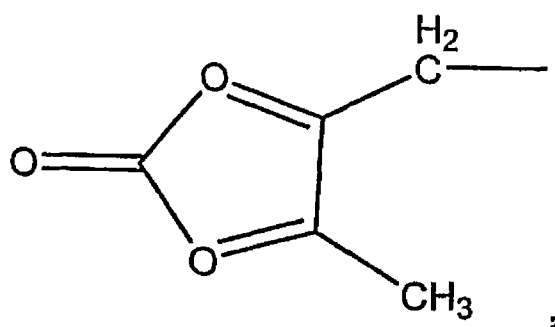
W 为 OR¹⁰、NR¹¹R¹² 或 OE；其中

R¹⁰ 为氢、烷基、烯基、环烷基、环烯基、环烷基取代的烷基、环烯基取代的烯基或芳基取代的烷基；

R¹¹ 为氢或烷基；

R¹² 为氢、烷基、烯基、芳基、环烷基、环烯基、环烷基-取代的烷基、环烯基-取代的烷基、芳基取代的烷基或亚烷基-取代的 C(=O)Y 或与它们连接的氮原子连接在一起，R¹¹ 和 R¹² 形成选自吡咯和哌啶的杂环；

E 是：



亚烷基-取代的 (C=O)D 或 -R¹³OC(=O)R¹⁴；其中

R¹³ 为烷基取代的亚烷基；

R¹⁴ 为烷基；

D 为 OR¹⁵ 或 NR¹⁶R¹⁷；其中

R¹⁵ 为氢、烷基、烯基、环烷基、环烯基、环烷基取代的烷基、环烯基取代的烷基或芳基取代的烷基；

R¹⁶ 为氢、烷基、烯基、芳基、芳基取代的烷基、环烷基、环烯基、

环烷基取代的烷基或环烯基取代的烷基；

R^{17} 为氢或烷基，或与它们连接的氮原子连接在一起， R^{16} 和 R^{17} 形成选自吡咯或哌啶的杂环；

Y 为 OR^{18} 或 $NR^{19}R^{20}$ ；其中

R^{18} 为氢、烷基、烯基、环烷基、环烯基、环烷基取代的烷基、环烯基取代的烷基或芳基取代的烷基；

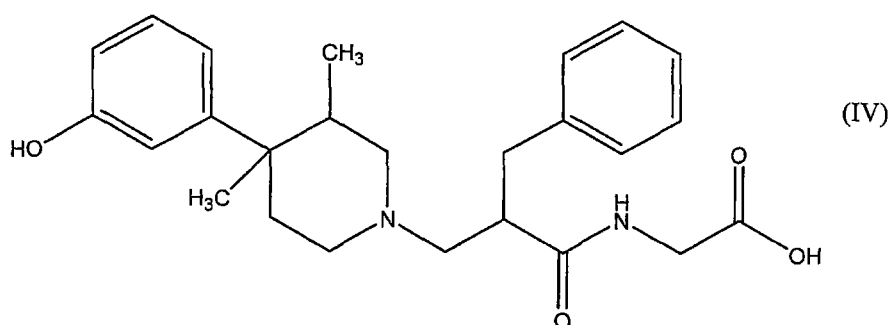
R^{19} 为氢或烷基；

R^{20} 为氢、烷基、烯基、芳基、环烷基、环烯基、环烷基-取代的烷基、环烯基-取代的烷基或芳基取代的烷基，或与它们连接的氮原子连接在一起， R^{19} 和 R^{20} 形成选自吡咯和哌啶的杂环；

R^{21} 为氢或烷基；

和 n 为 0 至 4。

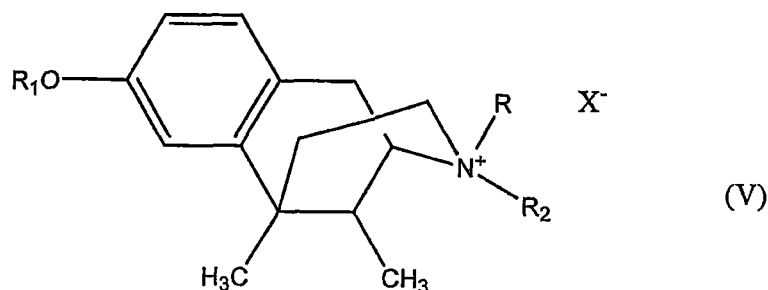
可能有价值的特定的哌啶-N-烷基羧基酯为 N-烷基氨基-3,4,4 取代的哌啶，比如如下式(IV)表示的 alvimopan：



适宜的 N-取代的哌啶可以如在美国专利 Nos. 5,270,328；6,451,806；6,469,030 中描述的来制备，将所有这些引入本文作为参考。Alvimopan 购自 Adolor Corp., Exton, PA. 这种化合物具有中等分子量，两性离子形式和极性，这些防止其穿透血脑屏障。

其他还适宜的外周阿片样物质拮抗剂化合物可包括第四苯并吗啡烷化合物。在本发明的方法中应用的第四苯并吗啡烷化合物显示出高水平的吗啡拮抗作用，而显示出减小的，优选基本上没有的激动剂活性。

可在本发明的方法中应用的第四苯并吗啡烷化合物具有下式(V)：



其中：

R^1 为氢、酰基或乙酰氧基；和

R^2 为烷基或烯基；

R 为烷基、烯基或炔基，和

X^- 为阴离子，特别是氯、溴、碘或甲基硫酸根阴离子。可在本发明的方法中应用的苯并吗啡烷化合物的具体的第四衍生物包括下式(V)的化合物：2'-羟基-5,9-二甲基-2,2-二烯丙基-6,7-benzomorphanium-溴化物；2'-羟基-5,9-二甲基-2-正丙基-2-烯丙基-6,7-benzomorphanium-溴化物；2-羟基-5,9-二甲基-2-正丙基-2-炔丙基-6,7-benzomorphanium-溴化物；和2-乙酰氧基-5,9-二甲基-2-正丙基-2-烯丙基-6,7-benzomorphanium-溴化物。

可在本发明的方法中应用的其他第四苯并吗啡烷化合物描述在，例如美国专利 No. 3,723,440 中，将其全部公开内容引入本文作为参考。在本发明的方法中应用的化合物可按前药形式存在。如本文使用的“前药”指包括任意共价键合的载体，当将这种前药给药予哺乳动物受试者时，其在体内释放根据式(I)至(V)或其他式的活性母体化合物或在本发明的方法中应用的化合物。因为已知前药增加了许多期望的药物性质(例如溶解性、生物利用度、制备等)，如果期望，在本方法中应用的化合物可以按前药形式递送。因此，本发明涉及递送前药的方法。在本发明中应用的化合物的前药可以通过以裂解修饰，在常规操作或在体内改性所述化合物中存在的官能团成为母体化合物。

因此，前药包括例如本文描述的化合物，其中羟基、氨基或羧基键合至任意基团，当将前药给药予哺乳动物受试者时，其分别裂解形成游离的羟基、游离的氨基或羧酸。

实例包括但不限于醇和胺官能团的乙酸酯、甲酸盐和苯甲酸酯衍

生物；和烷基、碳环、芳基和烷芳基酯，比如甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、环丙基、苯基、苯甲基和苯乙基的酯等。

如指出的，在本发明的方法中应用的化合物可以按本领域技术人员熟知的许多方法制备。公开的与本发明相关的所有制剂涉及以任意尺度实施，包括毫克、克、multigram、千克、multikilogram 或市售药物尺度。

在本发明的方法中应用的化合物可包含一种或多种不对称地取代的碳原子，并可以按光学活性或外消旋形式分离。因此，包括所有结构的手性的、非对映的、外消旋形式、差向异构体和所有几何异构体形式，除非特定地指出具体的立体化学或同分异构形式。本领域众所周知如何制备和分离这种旋光形式。例如，立体异构体的混合物可以通过标准技术分离，所述技术包括，但不限于外消旋形式的拆分、常规、反相和手性色谱法、优选的盐形成 (preferential salt formation)、重结晶等，或通过从手性初始物质的手性合成或者通过靶向手性中心的有意合成 (deliberate synthesis)。

在本发明的某些实施方案中，所述阿片样物质拮抗剂可以是 μ 阿片样物质拮抗剂。在另一种实施方案中，所述阿片样物质拮抗剂可以是 κ 阿片样物质拮抗剂。本发明也包括给药多于一种阿片样物质拮抗剂，包括 μ 拮抗剂的组合、 κ 拮抗剂的组合及 μ 和 κ 拮抗剂的组合，例如甲基纳曲酮和 alvimopan 的组合。

本发明的方法包括提供在基于内皮的疾病中的治疗或预防作用，例如，在各种血管生成和/或增殖相关肿瘤和非肿瘤疾病中，例如镰刀形红细胞病、眼睛的新血管疾病 (比如糖尿病性视网膜病、新生血管性青光眼、早产儿视网膜病、年龄相关性黄斑变性)、在肾或肺中的内皮增殖和银屑病。接受治疗的非肿瘤性病征，包括类风湿性关节炎、银屑病、动脉粥样硬化、糖尿病及其它增殖性视网膜病，包括早产儿视网膜病、晶体后纤维组织增生症、新生血管性青光眼、年龄相关性黄斑变性、甲状腺增生 (包括 Grave's 疾病)、角膜及其它组织移植、慢性炎症、肺炎、肾病综合征、先兆子痫、腹水、心包积液 (比如与心包炎相关的) 和胸膜积液。例如，已经显示出在镰刀形红细胞病中吗啡诱

导的增殖性视网膜病(Gupta 等人, personal communication)。可以预料到用阿片样物质拮抗剂治疗可显著地抑制视网膜病,特别是在镰状红细胞患者中阿片样物质诱导的视网膜病,所述患者服用活性阿片样物质治疗剂和接受阿片样物质一段时间,包括长期治疗几周、数月或甚至几年。

还可以预期到本发明的方法在减少用其他治疗模式治疗后,例如外科手术后恶性肿瘤或赘生物复发的危险中价值。例如,本发明提供一种减少手术后癌症复发的危险的方法。所述癌症可包括,例如乳腺癌或前列腺癌,和减少可通过向患有这种癌症的患者提供有效量的阿片样物质拮抗剂特别是外周阿片样物质拮抗剂获得的危险。例如,如上所述,经历乳腺癌外科手术的患者在 2-4 年在复发的发病率方面具有显著性差异(四倍),取决于所述患者在他们最初的外科手术期间是否接受用吗啡的局部或全身麻醉。共同给药根据本发明的所述阿片样物质拮抗剂特别是外周拮抗剂和外科治疗可对减少癌症复发的发病率有价值。

还涉及本发明提供一种抑制 VEGF 活性的方法,其通过在足够抑制 VEGF 诱导的血管生成的情况下,向受影响的细胞或受试者提供有效量的阿片样物质拮抗剂来实现。换句话说,本发明的化合物具有 VEGF 抑制或拮抗活性。

如还在下述实施例中显示的,进一步发现外周阿片样物质拮抗剂 MNTX 不仅减少了 VEGF 诱导的内皮细胞迁移,还通过其他前迁移/前增殖因子诱导内皮迁移和/或增殖,所述前迁移/前增殖因子比如血小板衍生生长因子(PDGF)或鞘氨醇-1-磷酸酯(S1P)。这样的减小范围为从约 10%至 60%,且提供了本发明的方法在抑制前迁移、前血管生成因子中具有价值的进一步的证据。

本发明的方法也包括治疗患者,例如癌症患者,其正经受用阿片样物质激动剂治疗。阿片样物质激动剂包括,但不限于吗啡、美沙酮、可待因、派替啶、fentidine、芬太尼、舒芬太尼、阿芬太尼等。如上所述,通过他们处理(agonize)一种类型的受体比另一种的数量级更有效的能力分类阿片样物质激动剂。例如,吗啡对于 μ 受体的相对亲和性为比对于 κ 受体大 200 倍,因此,将其分类为 μ 阿片样物质激动剂。

某些阿片样物质激动剂可对一种受体起激动剂的作用，而对另一种受体起拮抗剂的作用，将其分类为激动剂/拮抗剂(也称为混合激动剂或部分激动剂)。在本文中可交替使用“激动剂/拮抗剂”、“部分激动剂”和“混合激动剂”。这些阿片样物质包括，但不限于镇痛新、布托啡诺、纳洛芬、nalbupine、丁丙诺啡、布马佐辛和 bezocine。许多激动剂/拮抗剂组的阿片样物质为对 κ 受体为激动剂而对 μ 受体为拮抗剂。进一步地，设想阿片样物质激动剂的活性代谢物也可具有如血管生成诱导剂的活性。例如，吗啡的代谢物、吗啡 3-葡糖苷酸(M3G)和吗啡 6-葡糖苷酸(M6G)可以为前血管生成因子。

通常，根据本发明的外周阿片样物质拮抗剂可以按有效量给药，以使得患者的外周阿片样物质拮抗剂的血浆水平为从 10^{-6}M 至 10^{-9}M 。可以使用本领域熟知的常规 HPLC 方法测定患者的药物血浆水平。

如在下述实施例中描述的，脑啡肽类似物 DAMGO 诱导内皮的迁移。因此，本发明的方法可能对患有血管生成相关的或增殖过度疾病例如癌症的患者有价值，更不用说用阿片样物质激动剂治疗。

当然，给药选择的阿片样物质拮抗剂的特定方法将取决于选择的药物的特定组合、在癌症患者中受治疗的肿瘤发展的严重性、患者的一般健康状况和用于治疗功效需要的剂量。一般而言，本发明的方法可使用任意医学上可接受的给药方式进行，例如任意能产生活性化合物的有效水平而不引起临床不能接受的副作用的方式。这样的给药方式包括口服、直肠、局部(如通过散剂、软膏剂、滴剂、透皮贴剂或离子电渗装置)、透皮、舌下、肌内、输注、静脉、肌内、腔内如气雾剂、耳(例如经由耳坠)、鼻内、吸入、眼内或皮下给药。也可使用直接注射来局部递送。口服皮下给药可适于预防或长期治疗，因为方便患者以及给药方案。对于眼病，眼科制剂可以是直接注射的或直接滴注的。

另外，所述阿片样物质拮抗剂可以作为肠溶包衣片或胶囊给药。在某些实施方案中，所述阿片样物质拮抗剂通过缓慢的输注法或通过定时释放或控释释放法或作为冻干粉剂给药。

当给药时，本发明的化合物以药学可接受的量和在药学可接受的组合物或制剂中给予。这样的制剂通常可包含盐、缓冲剂、防腐剂和任选地其它治疗成分。当在医学上使用时，所述盐应当是药学可接受

的，但是非药学区接受的盐可方便地用于制备其药学区接受的盐，且没有从本发明的范围中排除。这样的药理学和药学区接受的盐包括，但不限于从下述酸制备的：盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、马来酸、乙酸、水杨酸、对甲苯磺酸、酒石酸、柠檬酸、甲磺酸、甲酸、琥珀酸、萘-2-磺酸、扑酸、3-羟基萘-羧酸和苯磺酸。适宜的缓冲剂包括，但不限于乙酸及其盐(1-2% WN)；柠檬酸及其盐(1-3% WN)；硼酸和及其盐(0.5-2.5% WN)；及磷酸及其盐(0.8-2% WN)。

适宜的防腐剂包括，但不限于苯扎氯铵(0.003-0.03% WN)；氯代丁醇(0.3-0.9% WN)；对羟基苯甲酸(0.01-0.25% WN)和硫柳汞(0.004-0.02% WN)。

对于每次给药，外周性阿片样物质拮抗剂的药物组合物也可包含一个或多个药学区接受的赋形剂，比如润滑剂、稀释剂、粘合剂、载体和崩解剂。其他助剂可包括，例如稳定剂、润湿剂、乳化剂、影响渗透压的盐类、着色剂、芳香剂和/或芳香活性化合物。

药学区接受的载体或赋形剂指无毒的固体、半固体或液体填充剂、稀释剂、包封物质或任意类型的制剂助剂。例如，适宜的药学区接受的载体、稀释剂、溶剂或赋形剂包括，但不限于水、盐(缓冲剂)溶液、醇、阿拉伯胶、无机油和植物油、苯甲醇、聚乙二醇、明胶、碳水化合物比如乳糖、直链淀粉或淀粉、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘性石蜡、植物油、脂肪酸单酸甘油酯和甘油二酯、第四戊四醇脂肪酸酯、羟基甲基纤维素、聚乙烯基吡咯烷酮等。可保持特定的流动性，例如，通过使用包衣材料比如卵磷脂，在分散体的情况下通过保持需要的粒径和通过利用表面活性剂。微生物作用的预防可通过包含多种抗菌剂和抗真菌剂比如对羟基苯甲酸、氯代丁醇、苯酚、山梨酸等来确保。

如果使用药学区接受的固体载体，类似物的剂型可以是片剂、胶囊、散剂、栓剂或锭剂。如果使用液体载体，剂型可以是软明胶胶囊、透皮贴剂、喷雾剂、局部乳膏剂、糖浆或液体混悬剂、乳剂或溶液剂。

对于非肠道应用，特别适宜的为可注射的无菌溶液，优选非水溶液或水溶液，以及分散液、混悬剂、乳剂或植入物，包括栓剂。安瓿通常为方便的单位剂型。可注射的储存形式也可以是适宜的，并可通过在可生物降解的聚合物比如聚交酯-聚乙醇酸交酯、聚(原酸酯)和聚

(酸酐)中形成药物的微胶囊基质来制备。根据药物与聚合物的比例和使用的特定聚合物的性质，可以控制药物释放的速率。

储存可注射的制剂也可通过将药物俘获在于身体组织相容的脂质体或微乳剂中制备。所述可注射的制剂可以例如通过过滤穿过保留细菌的过滤器或通过加入杀菌剂灭菌，其可以为无菌固体组合物形式，仅仅在使用前将其溶解或分散在无菌水或其他无菌可注射的介质中。

对于肠道应用，特别适宜的为片剂、锭剂、液体剂、滴剂、栓剂或胶囊比如软明胶胶囊。可以使用其中应用增甜赋形剂的糖浆、酞剂等。

如指出的，其他递送系统可包括定时释放、延迟释放或缓释释放递送系统。这样的系统可以避免重复给药本发明的化合物，给患者和医师增加了方便性，并保持化合物的缓释血浆水平。许多类型的控释释放递送系统是有效的，其为本领域普通技术人员已知的。缓释或控释组合物可以制剂成例如脂质体或其中用不同的可降解包衣比如通过微囊化、多层包衣等保护活性化合物的那些。

例如，本发明的化合物可以与药学可接受的缓释释放基质比如可生物降解的聚合物混合形成治疗组合物。如本文使用的缓释释放基质为由通常为聚合物的材料制备的基质，其为酶或酸碱水解或通过溶解可降解的。一旦其进入身体，酶和体液对所述基质作用。缓释释放基质可以期望地选自生物相容性物质，比如脂质体、聚合物基系统比如聚交酯(聚乳酸)、聚乙醇酸交酯(乙醇酸的聚合物)、聚交酯共乙交酯(乳酸和乙醇酸的共聚物)、聚酞类、聚(邻)酯类、多糖类、聚氨基酸类、透明质酸、胶原、硫酸软骨素、多核苷酸、聚乙烯丙烯、聚乙烯基吡咯烷酮和硅氧烷；非聚合物系统，比如羧酸类、脂肪酸类、磷脂类、氨基酸类、脂质类比如甾醇类、水凝胶释放系统；硅橡胶系统；肽基系统；植入物等。具体的实例包括，但不限于：(a)侵蚀系统(erosional system)，其中多糖包含在基质内的形式，参见美国专利Nos. 4,452,775、4,675,189和5,736,152(本文将其全部引入作为参考)，和(b)扩散系统，其中活性组分以控制的速率从聚合物中渗透，比如在专利Nos. 3,854,480、5,133,974和5,407,686(本文将其全部引入作为参考)中描述的。而且，可使用基于泵硬件(pump-based

hard-wired) 递送系统, 其中的某些适于植入。适宜的肠溶衣为在 PCT 公布 No. WO 98/25613 和美国专利 No. 6, 274, 591 中描述的, 将其都引入本文作为参考。

长期缓释释放植入物的使用可特别适于治疗慢性病症。如本文使用的“长期释放”指构建植入物和安排递送治疗水平的活性成分至少 7 天, 适宜地为 30 至 60 天。长期缓释释放植入物是本领域普通技术人员众所周知的, 其包括如上所述的释放系统中的一些。

对于局部施用, 存在使用如不可喷雾的形式, 粘性的半固体或固体形式, 其包括与局部施用相容的载体且具有优选大于水的动态粘度。适宜的制剂包括, 但不限于溶液剂、混悬剂、乳剂、乳膏剂、软膏剂、散剂、搽剂、药膏剂、气雾剂等, 如果期望, 可将其灭菌或与助剂例如防腐剂等混合。

透皮或离子渗透递送外周性阿片样物质拮抗剂的药物组合物也是可能的。

鉴于特定的 MNTX, 水性制剂可包括螯合剂、缓冲剂、抗氧化剂和, 任选的等渗剂, 其优选调节 pH 至 3.0 至 3.5 之间。优选的对高压灭菌和长期储存稳定的这样的制剂描述于序列号为 no. 10/821811 的神情中, 新公布的如 20040266806, 名称为“药物制剂”, 将其公开的内容引入本文作为参考。

在一个实施方案中, 本发明的化合物以向受试者提供化合物的连续配药方案的配药方案给药, 例如, 保持最小阿片样物质拮抗剂的血浆水平的方案, 优选消除了常规方案具有的药物水平的峰和谷。适宜地, 连续剂量可以通过使用本文公开的任意递送方法每日向受试者给药所述化合物获得。在一个实施方案中, 所述连续剂量可以通过使用连续输注至受试者或经由易于使化合物随时间释放的机理例如透皮贴剂或缓释释放制剂来获得。适宜地, 本发明的化合物为连续释放至受试者, 总量足以保持所述化合物在受试者血浆中有效地抑制或减少阿片样物质诱导的血管生成; 或在癌症患者中缓解肿瘤生长的浓度。根据本发明的化合物, 是否单独或与其他治疗剂组合提供, 以抗血管生成有效量提供。然而, 应当理解, 本发明的化合物和组合物的总的每日用量应当由主治医师在充分的医学判断的范围内确定。对于任意特

定患者的具体治疗有效量水平将取决于多种因素，包括受治疗的病症和所述病症的严重性；使用的具体化合物的活性；使用的具体组合物；患者的年龄、提供、一般健康状况、性别和饮食；给药时间；给药途径；使用的具体化合物的排泄速率；治疗的持续时间；在与使用的特定药物组合或同时使用的药物及医学领域熟知的因素。例如，在本领域普通技术人员水平内已知化合物的开始剂量水平低于获得期望治疗效果需要的水平，逐渐增加所述剂量直至获得预期效果。

如果期望，为了给药的目的，有效的日剂量可以分成多剂量。因此，单剂量组合物可包含组成日剂量的这样的量或其约数量。如证实的，本领域普通技术人员将易于最佳化有效的剂量和共同给药方案(如本文描述的)，如通过良好的医学实践和个体患者的临床病症来测定。

通常，阿片样物质拮抗剂特别是外周性拮抗剂的口服剂量将从约 0.01 至约 80 mg/kg 体重每日变化。预期在 1 至 20 mg/kg 体重变化的口服剂量将获得期望的结果。通常，非肠道给药，包括静脉内和皮下给药将从约 0.001 至 5 mg/kg 体重变化。预期从 0.05 至 0.5 mg/kg 体重变化的剂量将获得期望的结果。可适当地调节剂量以获得期望的局部或全身药物水平，取决于给药方式。例如，预期口服给药在肠溶包衣制剂中的阿片样物质拮抗剂的剂量将为非包衣的口服剂量的 10 至 30%。在患者的反应对这样的剂量不足的情况下，可使用甚至更高的剂量(或通过不同的更局部的递送途径给药有效地高于 30 的剂量)以达到患者耐受性许可得程度。每日多剂量预期会获得化合物的适当全身性水平。适当的系统水平可通过例如使用本领域人员已知的常规 HPLC 方法测定患者血浆的药物水平来确定。

在本发明的某些实施方案中，所述阿片样物质拮抗剂与阿片样物质共同给药。术语“共同给药”意味着指通过任意给药途经组合治疗，其中将两种或多种药物给药至患者或受试者。共同给药药剂也可被认为是组合疗法或组合治疗。所述药剂可以在相同的剂型中或单独的剂型中。对于用多于一种活性剂的组合治疗，其中活性剂处在单独的剂型中，可以同时给药活性剂或者他们各自可以在分别交错的时间给药。所述药剂可以同时给药或顺次给药(例如，一种药剂可以在给药另一种药剂之后立即给药或着插入式(episodically)地给药，例如可在一个

时间给药一种，在稍后的时间给药另一种，例如一周之内)，只要以足够使两种药物在体内获得有效浓度的方式给药它们就行。所述药剂也可以按不同的途径给药，例如一种药剂可以静脉内给药，而另一种药剂以肌内、静脉内或口服给药。换言之，共同给药根据本发明的阿片样物质拮抗剂化合物与阿片样物质被认为适宜于包含阿片样物质拮抗剂和阿片样物质药剂的组合药物制剂，所述药剂适于每日或间断式给药外周性阿片样物质和每日或间断式给药阿片样物质药剂。因此，所述阿片样物质拮抗剂可以在给药阿片样物质之前、同时或给药其之后给药。也可将共同给药药剂制剂成如混合物，如例如在单个制剂中或单个片剂中。这些制剂可以是非肠道的或口服的，比如在美国专利 Nos. 6, 277, 384; 6, 261, 599; 5, 958, 452 和 PCT 公布 No. WO 98/25613 中描述的制剂，在此将其引入作为参考。

进一步期望的是本发明的方法可单独或与其他治疗一起使用，以控制与如上所述各种病症相关的内皮细胞的生长或迁移。外周性阿片样物质拮抗剂可以与另一种非阿片样物质或阿片样物质拮抗剂的治疗剂共同给药。适宜的这样的治疗剂包括抗癌剂，例如化疗剂、放疗剂或其他抗血管生成药剂比如苏拉明或抗 VEGF mab、内皮他丁或放疗剂。预想当与抑制 VEGF 活性的药剂例如抗 VEGF mab 共同给药时，根据本发明的阿片样物质拮抗剂具有特殊的价值。抗 VEGF 抗体用于治疗多种肿瘤和非肿瘤疾病和病症，包括子宫内膜增生、子宫内膜异位、与斑痣性错构瘤病相关的异常血管增生、水肿(比如与脑肿瘤相关的那些和 Meigs' 综合症。一种抗 VEGF mab 的实例为描述在美国专利 No 6, 884, 879 和 W094/10202 中的贝伐单抗(Avastin, Genentech)，在此将其全部引入。在本发明的某些实施方案中，MNTX 与 Avastin 共同给药。

换言之，当单独使用或与一种或多种其他抗癌剂组合使用时，本发明的化合物也可用于治疗患者中的癌症，如上所述，所述其它抗癌剂例如放疗剂和/或其他化疗剂，包括抗血管生成剂，通常给药患者用于治疗癌症的治疗剂。这样的药物的主要种类和实例在本文中列出，其包括，但不限于金属蛋白酶抑制剂、内皮细胞增殖/迁移抑制剂、血管生成生长因子的拮抗剂、整联蛋白/存活信号的抑制剂及铜的螯合

剂。

在某些实施方案中，本发明的化合物可以与已知的抗癌剂的组合混合。本发明的化合物可以与抗血管生成剂和化疗剂混合，并给药至患者。例如，MNTX 可以与 Avastin 和 5-氟尿嘧啶组合给药至癌症患者。

预期阿片样物质拮抗剂与各种抗癌药、放疗药或其他抗血管生成药物共同给药可导致对癌细胞的抗增殖效果显著地增加，因此，提供了增加的治疗效果，例如，向某些肿瘤使用外周性阿片样物质拮抗剂可以增强它们对其他治疗方案的应答。特别地，显著增加的抗血管生成效果为由上述公开的共同给药组合获得，与其中药物或放射剂为单独使用的治疗方案相比，所述共同给药组合利用了较低浓度的抗癌药、较低剂量的放疗药或其他抗血管生成药物，与大剂量单独使用抗癌药或其他抗血管生成药物或放疗通常观察到的相比，存在提供其中与抗癌药或其他抗血管生成药物或放疗相关的不良副作用相当大降低的潜在性。例如，共同给药根据本发明的阿片样物质拮抗剂与抗 VEGF 药剂，例如抗 VEGF mab 可减少抗 VEGF 药剂的剂量或增加效力或功效或两者。进一步地，如本文描述的，共同给药根据本发明的阿片样物质拮抗剂与其他抗癌剂形式可具有预防价值。

当用于治疗增殖过度性疾病时，本发明的化合物可以与金属蛋白酶抑制剂共同给药，所述金属蛋白酶抑制剂比如例如：马立马司他，合成的基质金属蛋白酶抑制剂 (MMPI)，British Biotech; Bay 12-9566，合成 MMPI 和抑制剂肿瘤生长，Bayer; AG3340，合成的 MMPI，Agouron/Warner-Lambert; CGS 27023A，合成的 MMPI，Novartis; CGS 27023A，合成的 MMPI; COL-3，合成的 MMPI，四环素衍生物，Collagenex; AE-941 (Neovastat)，天然存在的 MMPI，AEterna，BMS-275291，合成的 MMPI，Bristol-Myers Squibb; 青霉胺，尿激酶抑制剂，NCI-NABTT。

当在治疗增殖过度性疾病中使用时，本发明的化合物可以与内皮细胞增殖/迁移的直接抑制剂共同给药，所述抑制剂比如：TNP-470 (烟曲霉素衍生物)，抑制内皮细胞生长，TAP Pharmaceuticals; 角鲨胺，抑制钠氢离子交换，NIHE3，Magainin; 考布他汀，诱导增殖内皮细胞中的细胞凋亡，Oxigene; 内皮他汀，抑制内皮细胞。EntreMed; 青霉胺，阻断内皮细胞迁移和增殖，NCI-NABTT; 法尼基转移酶抑制剂 (FTI)，

阻断内皮细胞迁移和增殖, NCI-NABTT, -L-778, 123 Merck, -SCH66336 Schering-Plough, -R1 15777 Janssen。

当在治疗增殖过度性疾病中使用时, 本发明的化合物可以与血管生成生长因子的拮抗剂共同给药, 所述拮抗剂比如: 抗 VEGF 抗体, 失活 VEGF 的单克隆抗体, Genentech; 沙立度胺, 阻断血管生成生长因子(bFGF、VEGF、TNF- α)的活性, Celgene; SU5416, 阻断 VEGF 受体(F1k-1/KDR)信号(酪氨酸激酶), Sugen-NCI; 核酶(Angiozyme), 减少 VEGF 受体的 mRNA, Ribozyme Pharmaceuticals, Inc; SU6668, 阻断 VEGF、bFGF 和 PDGF 受体信号, Sugen; PTK787/ZK22584, 阻断 VEGF 受体信号, Novartis; 干扰素- α , 抑制 bFGF 和 VEGF 生成; 苏拉明, 阻断生长因子结合其受体, NCI-NABTT。

当在治疗增殖过度性疾病中使用时, 本发明的化合物可以与抑制内皮特异性整联蛋白/存活信号的下述药物共同给药: Vitaxin, 存在于内皮细胞表面上的 α -v- β 3 整联蛋白抗体, Ixsys; EMD121974, 存在于内皮细胞表面上的小分子整联蛋白阻滞药, Merck KGaA。

当在治疗增殖过度性疾病中使用时, 本发明的化合物可以与铜的螯合剂共同给药, 所述铜的螯合剂比如: 青霉胺, 巯基结合铜; 通过泌尿排泄的净铜(clears copper), NCI-NABTT; 四硫钼酸盐, 硫醇基紧密地结合铜, 对肿瘤有意义的灭活的铜, University of Michigan Cancer Center; 卡托普利, 螯合铜和锌; 及 MMP 和血管紧张素转换酶的抑制剂, Northwestern University。

当在治疗增殖过度性疾病中使用时, 本发明的化合物可以与具有不同机理的血管生成拮抗剂共同给药: CAI, 钙内流的抑制剂, NCI; ABT-627, 内皮素受体拮抗剂, Abbott/NCI; CM101/ZD0101, B 组链球菌毒素, 其通过与(CM201)受体相互作用选择性破坏增殖中的内皮, CarboMed/Zeneca; 白细胞间介素-12, 诱导干扰素- γ , 下调 IL-10, 诱导 IP-10, M. D. Anderson Cancer Center/Temple University, Temple University, Genetics Institute, Hoffman LaRoche; IM862, 阻断 VEGF 和 bFGF 的生成; 增加抑制剂 IL-12 的生成, Cytran; PNU-145156E, 通过 Tat 蛋白质阻断诱导的血管生成, Pharmacia 和 Upjohn。

当在治疗增殖过度性疾病中使用时, 本发明的化合物可以与化疗

剂共同给药，所述化疗剂比如例如 α 干扰素、COMP（环磷酰胺、长春新碱、甲氨蝶呤和泼尼松）、依托泊苷、mBACOD（methotrexate、博来霉素、阿霉素、环磷酰胺、长春新碱和地塞米松）、PRO-MACE/MOPP（泼尼松、甲氨蝶呤(w/leucovorin rescue)、阿霉素；环磷酰胺、紫杉醇、docetaxol、依托泊苷/氮芥、长春新碱、泼尼松和丙卡巴肼)、长春新碱、长春花碱、angioinhibins、TNP-470、多硫酸戊聚糖酯、血小板因子4、血管他丁、LM-609、SU-101、CM-101、Techgalan、沙立度胺、SP-PG等。

其可以与本发明的化合物共同给药的抗癌剂还适宜地包括抗代谢物(例如5-氟尿嘧啶、甲氨蝶呤、氟达拉滨)、抗微管剂(例如长春新碱、长春花碱、紫杉烷类比如紫杉醇、多西他赛)、烷基化剂(例如环磷酰胺、苯丙氨酸氮芥、生物氯乙基硝基脲(biochloroethylnitrosourea)、羟基脲)、氮芥类(例如氧氮芥、melphan、苯丁酸氮芥、环磷酰胺和异环磷酰胺)；亚硝基脲类(例如卡氮芥、环己亚硝脲、司莫司汀和链脲霉素)，铂剂(例如顺铂、卡铂、奥沙利铂、JM-216、C1-973)、蒽环类抗生素(例如doxorubicin、柔红霉素)、抗生素类(例如丝裂霉素、伊达比星、阿霉素、道诺霉素)、拓扑异构酶抑制剂(例如依托泊苷、喜树碱)、烷基磺酸盐包括白消安；三嗪类(例如达卡巴嗪)；ethylenimines(例如塞替派和六甲蜜胺)；叶酸类似物(例如甲氨蝶呤)；嘧啶类似物(例如5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷)；嘌呤类似物(例如6-巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤)；抗肿瘤抗生素(例如放线菌素D；博来霉素、丝裂霉素C和methramycin)；激素和激素拮抗剂(例如他莫昔芬、corticosteroids)及任意其他细胞毒素剂(例如雌氮芥磷酸酯、泼尼莫司汀)。

应当理解可以与本发明的化合物组合用于抑制、治疗或预防血管生成和/或癌症的药剂不限于上列的那些，但基本上包括用于治疗阿片样物质诱导的血管生成疾病和肿瘤生长的任意药剂。

本发明进一步通过下述实施例来说明，其不应当被解释为限制本发明的范围。

实施例

实施例1：内皮细胞迁移测定

在使用改进的 Boyden 室测定拮抗剂抑制或调节毛细血管内皮细胞迁移能力的实验中评价根据本发明的外周性阿片样物质拮抗剂的抗血管生成活性。

如由 Lingen, M. W. 在 *Methods in Molecular Medicine*, 78 : 337-347 (2003) 中描述的进行内皮细胞迁移测定, 将其公开内容引入作为参考。简略地, 在包含 0.1% 牛血清清蛋白 (BSA) 的内皮生长培养基 (EGM) 中使人微血管内皮细胞 (HMVEC) (Cell Systems, Kirkland, WA.) 饥饿过夜。接着, 将细胞用胰蛋白酶消化并以 1×10^6 细胞/ mL 的浓度再悬浮在 Dulbecco's 改进的 Eagle 培养基 (DME) 中, 所述培养基含有 0.1 % BSA。将细胞加入到 48 孔改进的 Boyden 室 (NeuroPore Corporation, Pleasanton, CA.) 的底部。装配并倒置所述室, 在 37 °C 使细胞附着在聚碳酸酯趋药性膜 (5 μ m 孔径) (NeuroProbe) 上 2 小时, 所述膜已经在 0.1% 明胶中浸泡过夜并干燥。接着, 将所述室再倒置, 在四个重复的不同浓度下测定化合物, 将血管内皮生长因子 (VEGF) (作为阳性对照) 或赋形剂 (vehicle) 加入到上室的孔中 (至总体积 50 mL); 然后, 在 37 °C 下培养该装置 4 小时。回收膜, 固定并染色 (DiffQuick, Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa.), 计算迁移到上室每 10 个高倍视野中的细胞数。减去 DME+0.1 % BSA 的背景迁移, 以每 10 个高倍视野 (400 倍) 迁移的细胞数报道数据。在各个实验中每种物质一式四份测定, 所有的试验重复至少两次。VEGF (R & D System, Minneapolis, MN) 以 200 pg/mL 的浓度用作阳性对照。之前, 通过剂量-反应实验确定对于 VEGF 最适宜的浓度 (数据没有显示)。如上所述测定的化合物为吗啡、纳洛酮、甲基纳屈酮和甲基纳屈酮与吗啡的组合。每种测定的物质的浓度范围为 0.001 至 10.0 μ M。吗啡的浓度恒定为 0.1 μ M。结果显示在图 1 中。

图 1 显示了吗啡以浓度依赖性方式增加迁移。然而, 甲基纳屈酮和吗啡的共同加入以浓度依赖性方式降减少了迁移。无论甲基纳屈酮还是纳洛酮单独都不影响迁移。

实施例 2: 内皮细胞迁移测定

根据在实施例 1 中描述的步骤进行另一组试验。在该组试验中,

再次测定甲基纳屈酮和甲基纳屈酮与吗啡的组合抑制内皮细胞迁移的能力。当单独测定时，甲基纳屈酮的浓度从 0.001 至 10.0 μM 改变。在组合中，甲基纳屈酮的浓度从 0.001 至 10.0 μM 改变，而吗啡浓度保持恒定为 0.1 μM ，如在实施例 1 中描述的。结果显示在图 2 中。

图 2 显示了甲基纳屈酮和吗啡的组合以浓度依赖性方式减少迁移，而甲基纳屈酮单独不会影响迁移。

实施例 3: DAMGO 诱导的内皮细胞迁移

在该研究中使用的药物为 [D A1a 2, N-McPhe4, Gly5-ol] 脑啡肽或 DAMGO (Sigma, St. Louis, MO); 纳洛酮 (Sigma, St. Louis, MO); N-甲基纳屈酮溴化物或甲基纳屈酮 (Mallinckrodt Specialty Chemicals, Phillipsburg, NJ)。如前所述进行内皮细胞迁移测定 (9)。使人皮肤微血管内皮细胞 (Cell Systems, Kirkland, WA) 在包含 0.1% 牛血清清蛋白 (BSA) 的培养基中饥饿过夜，收获，再悬浮在具有 0.1% BSA 的 Dulbecco's 改进的伊格尔培养基 (DME) 中，放置在改进的 Boyden 室 (Nucleopore Corporation, Pleasanton, CA) 中半多孔的明胶化薄膜上。然后，将测定物质加入到上室的孔中，使细胞在 37°C 下迁移四小时。

回收膜、固定并染色，由盲观察者计算每十高倍视野中迁移至上室的细胞数。减去 DME+0.1% BSA 的背景迁移，以每 10 高倍视野 (400X) 迁移的细胞数报道数据。在每次试验中每种物质测定一式四份，所有的试验重复至少两次。DAMGO 的浓度为 1 μM ，VEGF (R&D Systems, Minneapolis, MN) 以 200 pg/mL 的浓度用作阳性对照。之前用剂量-反应实验确定对于 VEGF 最适宜的浓度 (数据没有显示)。

结果显示在图 3 中，其表明甲基纳屈酮和 DAMGO 以浓度依赖性方式减少了迁移。图 4 图解了使用纳洛酮和 DAMGO 的类似结果。非活性的吗啡代谢物 M3G 不起血管生成活性作用，而已知对 μ 受体作用的 M6G 显示出以浓度依赖性作用于血管生成 (图 5)。

实施例 4: 用甲基纳屈酮治疗人和哺乳动物受试者

在第一组试验中，通过转化、近交或移植肿瘤细胞对小鼠诱导发

展肿瘤。将每只有至少 60 mm³ 体积的肿瘤三十六只小鼠随机分成三组。第一组接受既不包含阿片样物质也不包含阿片样物质拮抗剂的对照物质。第二组接受阿片样物质，例如以 0.5 mg/kg/天剂量口服给药吗啡。第三组接受阿片样物质，例如以 0.5 mg/kg/天的剂量口服给药吗啡，并且以 5 mg/kg/天的剂量口服给药外周性阿片样物质拮抗剂甲基纳屈酮。

每日给药该化合物八周时间。报道每组间小鼠的肿瘤生长率、肿瘤尺寸、肿瘤中血管生成减少和死亡率的差异。结果证实与对照或吗啡单独给药相比，肿瘤生长和血管生成减少了。

在第二组试验中，人类癌症患者参与研究。在该研究中的参与者受到年龄、疾病期、治疗类型及遗传和家庭因素的控制。根据他们是否接受阿片样物质例如吗啡将参与者分成两组。将接受阿片样物质的组进一步随机分成两个亚组。接受阿片样物质的两个亚组中的一组接受外周性阿片样物质拮抗剂，例如以 5 mg/kg/天的剂量口服给药甲基纳屈酮八周时间。另外的第二个亚组接受安慰剂同样的时间。报道每组中参与者的肿瘤生长速率、肿瘤尺寸、肿瘤中血管生成的减少和死亡率的差异。

实施例 5：用 Alvimopan 治疗人和哺乳动物受试者

对已经诱导发展为肿瘤的小鼠进行如在实施例 3 中描述的实验设计，不同在于外周性阿片样物质拮抗剂为 alvimopan。结果证实与对照或者阿片样物质单独给药相比，肿瘤生长和血管生成减少了。

如实施例 4 中的描述对参与该研究的人类癌症患者进行试验，不同在于外周性阿片样物质拮抗剂为 alvimopan。

实施例 6：包括共同给药外周性阿片样物质拮抗剂甲基纳屈酮和第二种治疗剂的治疗

在第一组实验中，通过转化、近交或移植肿瘤细胞诱导小鼠发展肿瘤。将每只有至少 60 mm³ 体积的四十八只小鼠随机分成六组。第一组接受不包括阿片样物质、阿片样物质拮抗剂或抗癌剂的对照物质。第二组接受阿片样物质，例如以 0.5 mg/kg/天剂量口服给药吗啡。第

三组接受阿片样物质，例如以 0.5 mg/kg/天的剂量口服给药吗啡，并且以 5 mg/kg/天的剂量口服给药外周性阿片样物质拮抗剂甲基纳屈酮。第四组接受阿片样物质，例如以 0.5 mg/kg/天的剂量口服给药吗啡和以 5 mg/kg/天的剂量口服给药外周性阿片样物质拮抗剂甲基纳屈酮和抗癌治疗剂，例如以 5 mg/kg 每 14 天剂量的贝伐单抗(Avastin)。第六组接受阿片样物质，例如以 0.5 mg/kg/天剂量的吗啡和抗癌治疗剂，例如以 5 mg/kg 每 14 天剂量的贝伐单抗(Avastin)。

每日给药该化合物八周时间。报道每组中小鼠的肿瘤生长率、肿瘤尺寸、肿瘤中血管生成减少和死亡率的差异。结果证实给药阿片样物质组合、阿片样物质拮抗剂和抗癌剂的组比其他组的结果提高了(例如血管生成和肿瘤生长减少了)。

在第二组试验中，接受阿片样物质例如吗啡、抗癌治疗剂例如贝伐单抗(Avastin)或两者的人类癌症患者参与该研究。在该研究中的参与者受到年龄、疾病期和疾病类型、治疗类型及遗传和家庭因素的控制。将接受阿片样物质的参与者随机分成第一和第二组；将接受抗癌治疗剂例如贝伐单抗(Avastin)的参与者随机分成第三和第四组；将接受阿片样物质加抗癌治疗抗癌剂例如贝伐单抗(Avastin)的参与者随机分成第五和第六组。第一，第三和第五组每人接受外周性阿片样物质拮抗剂，例如以 5 mg/kg/天的剂量口服给药甲基纳屈酮八周时间。第二、第四和第六组接受安慰剂同样的时间。报道每组中参与者的肿瘤生长率、肿瘤尺寸、肿瘤中血管生成减少和死亡率的差异。结果证实给药阿片样物质、阿片样物质拮抗剂和抗癌剂的组合的组比其他组的结果提高了(例如血管生成和肿瘤生长减少了)。

实施例 7: 包括共同给药外周性阿片样物质拮抗剂 Alvimopan 和第二种治疗剂的治疗

对已经诱导发展为肿瘤的小鼠进行如在实施例 5 中描述的实验设计，不同在于外周性阿片样物质拮抗剂为 alvimopan。结果证实给药阿片样物质、阿片样物质拮抗剂和抗癌剂的组合的组比其他组的结果提高了(例如血管生成和肿瘤生长减少了)。

如实施例 6 中的描述对参与该研究的人类癌症患者进行试验，不

同在于外周性阿片样物质拮抗剂为 alvimopan。结果证实给药阿片样物质、阿片样物质拮抗剂和抗癌剂的组合的组比其他组的结果提高了(例如血管生成和肿瘤生长减少了)。

实施例 8：阿片样物质拮抗剂对内皮细胞迁移/增殖的影响

细胞培养物和试剂-如前所述, 在 37°C 和湿润的大气: 5% CO₂、95% 空气下, 在 EBM-2 完全培养基 (Clonetics) 中培养人类皮肤微血管内皮细胞 (Cell Systems, Kirkland, WA) 和人类肺微血管内皮细胞 (Clonetics, Walkersville, MD), 传代 6-10 次用于实验 (Garcia 等人 2001)。除非另有说明, 试剂购自 Sigma (St. Louis, MO)。用于 SDS-PAGE 电泳的试剂购自 Bio-Rad (Richmond, CA), 稳定素-P 转移膜购自 Millipore (Millipore Corp., Bedford, MA)。在该研究中使用的药物为 [D-Ala², N-MePhe⁴, Gly⁵-ol] 脑啡肽或 DAMGO (Sigma, St. Louis, MO); 纳洛酮, 吗啡-3-葡萄糖苷酸 (M3G) 和吗啡-6-葡萄糖苷酸 (M6G) (Sigma, St. Louis, MO); N-甲基纳屈酮溴化物或甲基纳屈酮 (Mallinckrodt Specialty Chemicals, Phillipsburg, NJ), 吗啡 (Baxter, Deerfield, Illinois)。VEGF 受体酪氨酸激酶抑制剂购自 Calbiochem (San Diego, CA)。小鼠抗 RhoA 抗体, 小鼠抗磷酸酪氨酸抗体和 ρ 结合域 (RBD)-共轭的珠粒购自 Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY)。兔子抗 VEGF 受体 1 (Flt-1) 和抗 VEGF 受体 2 (Flk-1) 抗体购自 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)。小鼠抗 β 肌动蛋白抗体购自 Sigma (St. Louis, MO)。二抗辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗体购自 Amersham Biosciences (Piscataway, NJ)。

免疫沉淀法和免疫印迹-用 IP 缓冲剂 (50 mM HEPES (pH 7.5)、150 mM NaCl、20 mM MgCl₂、1% Triton X-100、0.1% SDS、0.4 mM Na₃VO₄、40 mM NaF、50 μ M 冈田酸、0.2 mM 苯甲基磺酰氟化物、1:250 稀释的 Calbiochem 蛋白酶抑制剂混合物 3) 培养细胞物质。然后, 先用抗 VEGF 受体 1 或抗 VEGF 受体 2 IgG 免疫沉淀样品, 接着在 4-15% 聚丙烯酰胺凝胶中进行 SDS-PAGE, 转移到 Immobilon™ 膜上, 用特定的一抗和二抗显影。使用增强型化学发光 (Amersham Biosciences) 获得免疫活性带的显影。

先用兔抗 VEGF 受体 1 或者兔抗 VEGF 受体 2 抗体在 IP 缓冲剂(参见上述)中免疫沉淀,接着在 4-15%聚丙烯酰胺凝胶中进行 SDS-PAGE,并将其转移到 Immobilon™ 膜(Millipore Corp., Bedford, MA)上确定 VEGF 受体 1 和 2 溶解蛋白质的酪氨酸磷酸化。在用 5%牛血清清蛋白阻断非特异性部位后,先用兔抗 VEGF 受体 1 抗体、兔抗 VEGF 受体 2 抗体或小鼠抗磷酸化酪氨酸抗体孵育印迹,再用辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔或者山羊抗小鼠 IgG 孵育。使用增强型化学发光(Amersham Biosciences)获得免疫活性带的显影。

抗 RhoA 的 siRNA 构建和转染-使用来自 Genbank™ (gi:33876092) 的 mRNA 序列产生靶向抗人类 RhoA 的 siRNA 序列。对于每种 mRNA (或加扰), 确定两个靶点。特别地, 使用 RhoA 靶向序列 1 (5'-AAGAACTGGTGATTGTTGGT-3') (SEQ ID NO: 1), RhoA 靶向序列 2 (5'-AAAGACATGCTTGCTCATAGT-3') (SEQ ID NO:2), 加扰序列 1 (5'-AAGAGAAATCGAAACCGAAAA-3') (SEQ ID NO:3), 和加扰序列 2 (5'-AAGAACCCAATTAAGCGCAAG-3') (SEQ ID NO:4)。正义和反义寡核苷酸购自 Integrated DNA Technologies (Coralville, IA)。对于 siRNA 的构建, 使用来自 Ambion 的基于转录试剂盒(Silencer™ siRNA 构建试剂盒)。然后, 根据 Ambion 提供的实验方法, 使用 siPORTamine™ 作为转染试剂(Ambion, TX)用 siRNA 转染人类肺微血管 EC。使细胞(~40%融合)血清饥饿 1 小时,接着在无血清培养基中用 3 μM (每种 siRNA 1.5 μM) 的靶向 siRNA (或加扰 siRNA 或没有 siRNA) 培养 6 小时。然后, 在进行生物化学试验和/或功能测定之前加入包含血清的培养基(1%血清最终浓度)42 h。

RhoA 活化测定-在激动剂和/或抑制剂处理后, 将 EC 在增溶缓冲剂中溶解, 在 4℃, 用 ρ 结合域(RBD)共轭的珠粒孵育 30 分钟。除去上层清液, 广泛地洗涤具有 RhoA 结合的 GTP 结合形式的 RBD 珠粒。在 SDS-PAGE 样品缓冲剂中煮沸 RBD 珠粒, 在 SDS-PAGE 上运行结合的 RhoA 物质, 转移到 Immobilon™, 并用抗 RhoA 抗体免疫印迹化(Garcia 等, 2001)。

人类皮肤微血管 EC 迁移测定-如前所述进行内皮细胞迁移测定(Lingen 2002)。使人皮肤微血管内皮细胞(Cell Systems, Kirkland,

WA) 在包含 0.1% 牛血清清蛋白 (BSA) 的培养基中饥饿过夜, 收获, 再悬浮在具有 0.1% BSA 的 Dulbecco 's 改进的伊格尔培养基 (DME) 中, 放置在改进的 Boyden 室 (Nucleopore Corporation, Pleasanton, CA) 中半多孔的明胶化薄膜上。然后, 将测定物质加入到上室的孔中, 使细胞在 37°C 下迁移 4 小时。回收膜、固定并染色, 由盲观察者计算每 10 个高倍放大视野中迁移至上室的细胞数。减去对 DME+0.1 % BSA 的背景迁移, 以每 10 个高倍放大视野 (400x) 迁移的细胞数报道数据。在每个试验中每种物质测定一式四份, 重复所有试验至少两次。以 200 pg/mL 的浓度使用血管内皮生长因子 (VEGF, R & D Systems, Minneapolis, MN) 作为阳性对照。之前通过剂量-反应试验确定对于 VEGF 最适宜的浓度 (数据没有显示)。

人类肺微血管 EC 迁移测定-使用具有 8 M 孔径的 Twenty-four Transwell™ 装置监测体外细胞迁移。将 HPMVEC (~1 x 10⁴ 细胞/孔) 与多种治疗剂 (100 nM MNTX, 10 μM VEGF 受体酪氨酸激酶抑制剂或 siRNA) 放置到上室中, 向下室中加入多种激动剂 (100 nM MS, DAMGO 或 VEGF)。使细胞迁移 18 小时。使用 CellTiter96™ MTS 测定 (Promega, San Luis Obispo, CA) 定量来自上和下室的细胞, 在 492 nm 读数。% 迁移定义为在下室的细胞在上室和下室中细胞数的 % #。每次测定进行一式三份, 重复至少五次, 通过 t 检验统计分析 (统计显著性设定为 P < 0.05)。

人类肺微血管 EC 增殖测定-用于测定细胞生长, 在 37°C 在 5% CO₂/95% 空气中, 在 96 孔培养皿中用 0.2 mL 包含多种激动剂 (100 nM MS, DAMGO 或 VEGF) 的无血清培养基培养用多种药剂 (100 nM MNTX, 10 μM VEGF 受体酪氨酸激酶抑制剂或 siRNA) 预处理的 HPMVEC 5 x 10³ 细胞/孔。通过使用 CellTiter96™ MTS 方法 (Promega, San Luis Obispo, CA) 在 492 nm 读数测定细胞数增加来分析体外细胞增殖测定。每个测定进行一式三份, 重复至少五次, 用 t 检验统计分析 (统计显著性设定在 P < 0.05)。

使用内皮细胞迁移测定, 发现 MS 引起内皮迁移的浓度依赖性增加。纳洛酮和 MNTX 单独在很宽的浓度范围内对内皮细胞迁移没有影响。这被代表性显微照片中和定量证实 (分别为图 6 和图 1)。以临床适当浓度

的吗啡，效果大小为通过 VEGF 获得的约 70%。内皮细胞迁移由以低至 10^{-7} M 浓度的吗啡诱导(图 2)。基于吗啡内皮细胞迁移由 μ 阿片样物质拮抗剂纳洛酮和 MNTX (剂量低至 10^{-8} μ M) 以浓度依赖性方式减弱，有力地表明内皮细胞迁移为由吗啡对 μ 阿片样物质受体(MOR)作用介导。通过我们的观察：高度选择性合成的脑啡肽 μ 激动剂 DAMGO 也以浓度依赖性方式诱导迁移证实了所述效果是经由 MOR 而不是其他阿片样物质受体。DAMGO 的效果也被 MNTX 阻断(图 3)。非活性的吗啡代谢物 M3G 不发挥血管生成活性，而已知对 μ 受体起作用的 M6G 显示出对血管生成的浓度依赖性作用，证实了我们的假设：吗啡对内皮的作用是由 μ 受体介导的(McQuay 等, 1997)(图 5)。

为了评价阿片样物质和 MNTX 对血管生成的诱致效应的机理，使用良好表征的 EC 细胞，人肺微血管内皮细胞(HPMVEC)。与对人类皮肤微血管 EC 的作用一致，可以看出 MS、DAMGO 和 VEGF 诱导 HPMVEC 迁移，其被 MNTX 抑制(图 7B)。已经表明 MS、DAMGO 和 VEGF 也刺激 HPMVEC 增殖，其被 MNTX 减弱(图 7A)。

考虑到 MNTX 对 VEGF 诱导的 EC 增殖和迁移的抑制效果，MNTX 为一种 μ 阿片样物质受体拮抗剂，研究阿片样物质对 VEGF 受体转活化的作用。图 8 A 表明 MS 和 DAMGO 诱导 VEGF 受体 1 (Flt-1)和 2 (Flk-1) 两者的酪氨酸磷酸化，这两种受体可用 MNTX 阻断。进一步地，MNTX 减弱 VEGF 诱导的 VEGF 受体 1 和 2 的酪氨酸磷酸化。这些结果表明阿片样物质诱导 VEGF 受体转活化。

为了证实是否需要 VEGF 受体酪氨酸激酶活性用于阿片样物质诱导的血管生成，用 VEGF 受体 1 和 2 酪氨酸激酶抑制剂预处理 EC，并测定阿片样物质诱导的 EC 增殖和迁移(图 8B)。所述结果显示 VEGF 受体的酪氨酸激酶活性在阿片样物质诱导的 EC 血管生成功能中很重要。

一种参与血管生成的重要的信号分子为小的 G-蛋白，RhoA (Aepfelbacher 等, 1997; Cascone 等, 2003; Hoang 等, 2004; Liu 和 Senger 2004)。可以看出 MS、DAMGO 和 VEGF 刺激 RhoA 活化，其被 MNTX 抑制(图 9A)。进一步，VEGF 受体转活化对于阿片样物质诱导的 RhoA 活化很重要(图 9B)。沉默 RhoA 表达阻断阿片样物质和 VEGF 诱导的 EC 增殖和迁移(图 10)。这些结果显示 RhoA 活化对激动剂诱导的

EC 血管生成活性的关键性作用。

作为一个整体来看，这些发现建议了一种模型，其中外周性 μ 阿片样物质受体拮抗剂 MNTX 减弱阿片样物质和 VEGF 诱导的 VEGF 受体和 RhoA 活化。该减弱作用对于 MNTX 对阿片样物质和 VEGF 介导的血管生成的抑制作用很重要(图 11)。

实施例 9：甲基纳屈酮抑制 SIP、VEGF 和 PDGF 诱导的血管生成：受体转活化作用

根据类似于在实施例 1-3 中描述的过程进行测定。可以看出 SIP、VEGF、PDGF、吗啡和 DAMGO 诱导 EC 的增殖(图 12) (如用比色 CellTiter™ (Promega) MTS 测定来测定)和迁移(图 13 (如用 Transwell™ (Costar) 渗透膜过滤器测定(8 μ m 孔径))，EC 被 MNTX 预处理(0.1 μ M, 1 小时)抑制。沉默 μ 阿片样物质表达(siRNA)阻断吗啡和 DAMGO 诱导的 EC 增殖(图 14)和迁移(图 15)，同时也显著地抑制 SIP、VEGF 和 PDGF 诱导的 EC 增殖(图 14)和迁移(图 15)。在免疫印迹分析之后的免测沉淀显示出 EC 的 SIP、VEGF 和 PDGF 处理诱导 μ 阿片样物质受体的丝氨酸/苏氨酸磷酸化(图 16) (表明受体转活化)和细胞骨架调节性小的 G-蛋白 RhoA 的活化(图 17)。进一步,EC 的吗啡和 DAMGO 处理诱导 VEGF 受体(图 18)、PDGF 受体(图 18)和 S1 P3 受体(图 19)的酪氨酸磷酸化与 RhoA 活化。EC 的 MNTX 预处理减弱了吗啡、DAMGO、SIP、VEGF 和 PDGF 诱导的受体磷酸化事件和 RhoA 活化。最后，抑制 RhoA 表达(siRNA)阻断激动剂诱导的 EC 增殖(图 20)和迁移(图 21)。总体而言，这些结果显示 MNTX 经由抑制受体磷酸化/转活化和随后抑制 RhoA 活化来抑制激动剂诱导的 EC 增殖和迁移(图 22)。这些结果建议血管生成的 MNTX 抑制可能是用于癌症治疗的有用的治疗介入。

总之，本发明提供通过向患者给药一种或多种有效量的阿片样物质拮抗剂尤其是外周性阿片样物质拮抗剂来减弱需要其的受试者的组织或器官中与血管生成相关的内皮细胞迁移和/或增殖和/或增加内皮细胞的屏障功能，所述有效量为抑制血管生成迁移和/或增殖和/或改善屏障功能的量。本发明的方法也可包括向接受阿片样物质治疗的患者(patient)给药外周性阿片样物质拮抗剂。特别适宜的可以是 μ 外周

性阿片样物质拮抗剂。因此，本发明还提供向需要其的受试者共同给药阿片样物质和外周性阿片样物质拮抗剂。所述外周性阿片样物质拮抗剂也可与抗癌剂共同给药，如可以将阿片样物质和外周性阿片样物质拮抗剂的组合与抗癌剂共同给药。

虽然现在已经描述了本发明并用某些特征举例说明，本领域技术人员应当理解可在已经描述的之中进行各种修饰，包括变化、添加和省略。因此，意味着本发明也包括这些修饰，并且本发明的范围仅仅由与附加的权利要求一致的合理的最宽解释来限定。

在此将本文引用的所有专利、出版物和参考全部引入作为参考。在本文公开的内容与引入的专利、出版物和参考冲突的情况下，应当对照本文公开的内容。

<110> 芝加哥大学
 <120> 阿片样物质拮抗剂用于减少内皮细胞增殖和迁移的用途
 <130> 092234-9035-W000
 <150> 60/659,193
 <151> 2005-03-07
 <150> 60/725,703
 <151> 2005-10-12
 <150> 60/731,009
 <151> 2005-10-28
 <150> 60/760,851
 <151> 2006-01-20
 <160> 4
 <170> PatentIn version 3.2
 <210> 1
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人
 <400> 1
 aagaaactgg tgattgttgg t 21
 <210> 2
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人
 <400> 2
 aaagacatgc ttgctcatag t 21
 <210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人
 <400> 3
 aagagaaatc gaaaccgaaa a 21
 <210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人
 <400> 4
 aagaacccaa ttaagcgcaa g 21

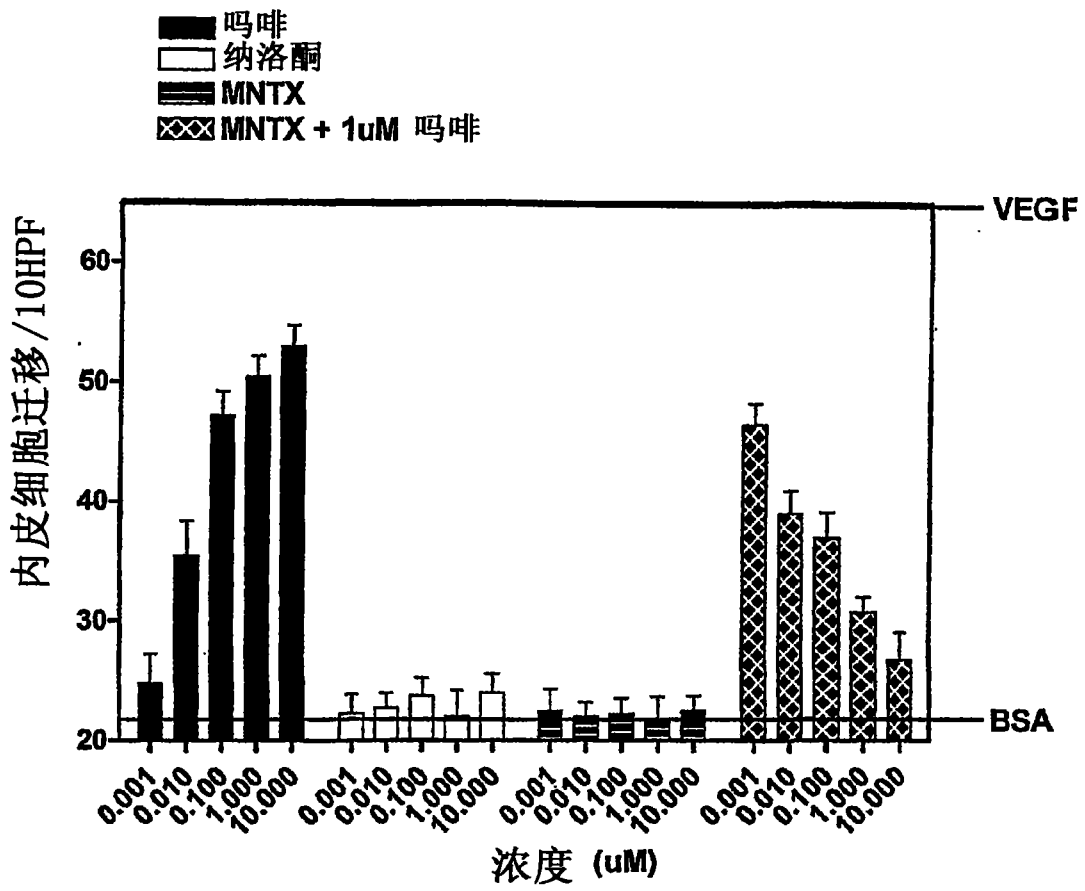


图 1

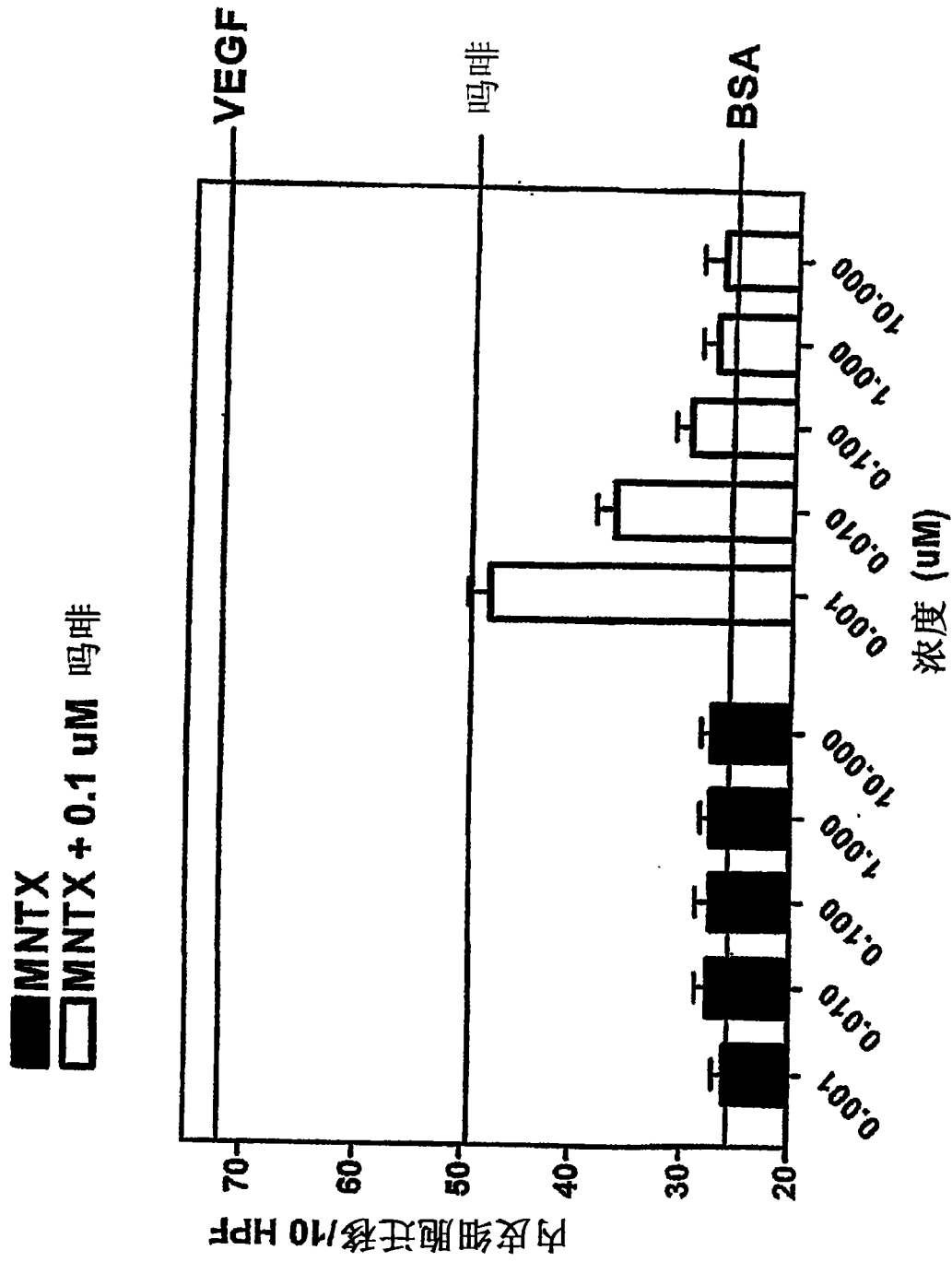


图 2

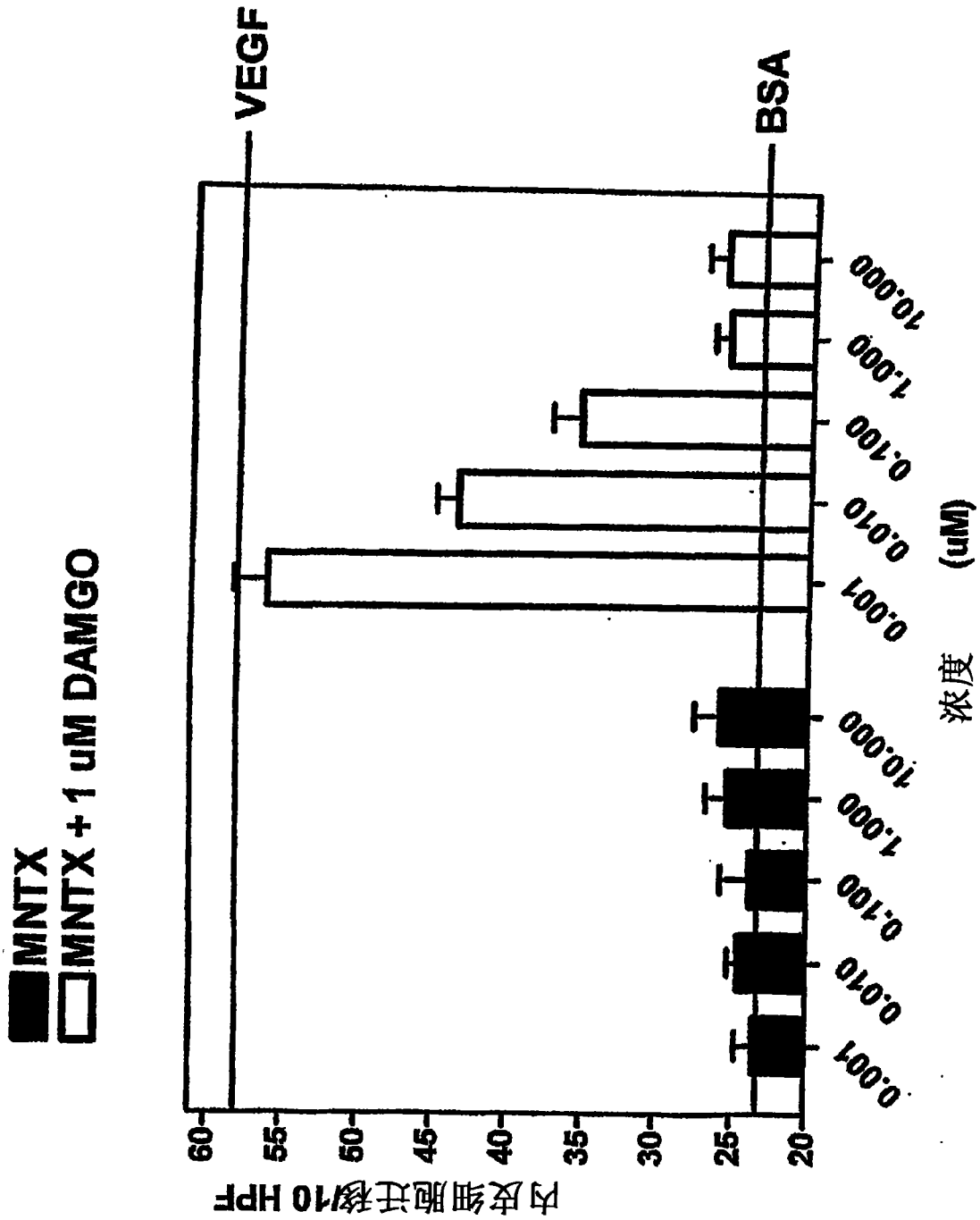


图 3

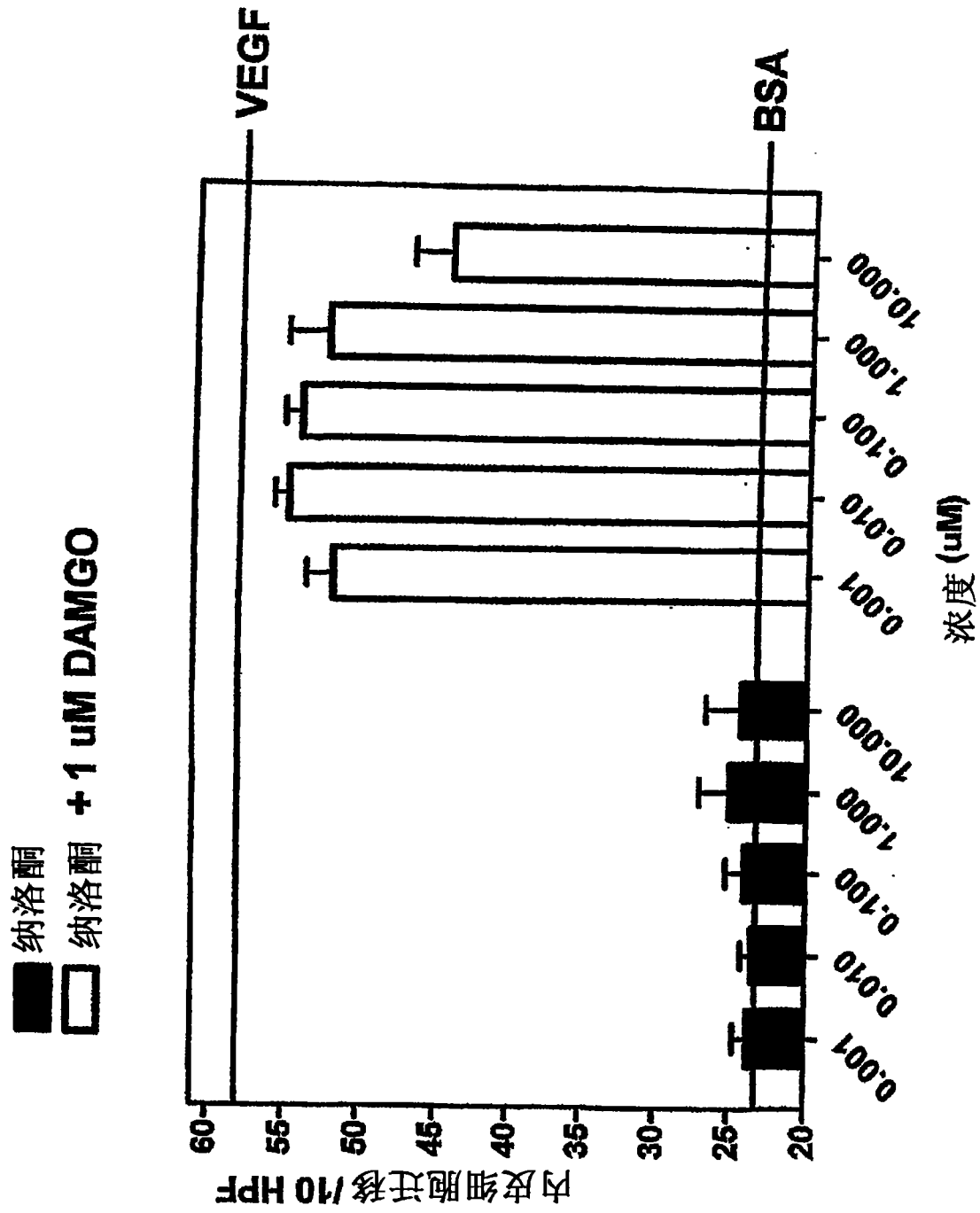


图 4

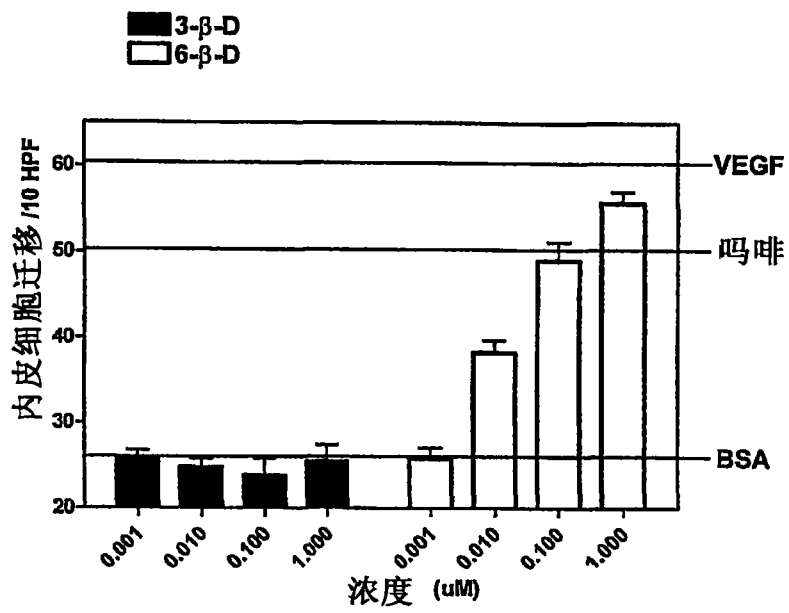


图 5

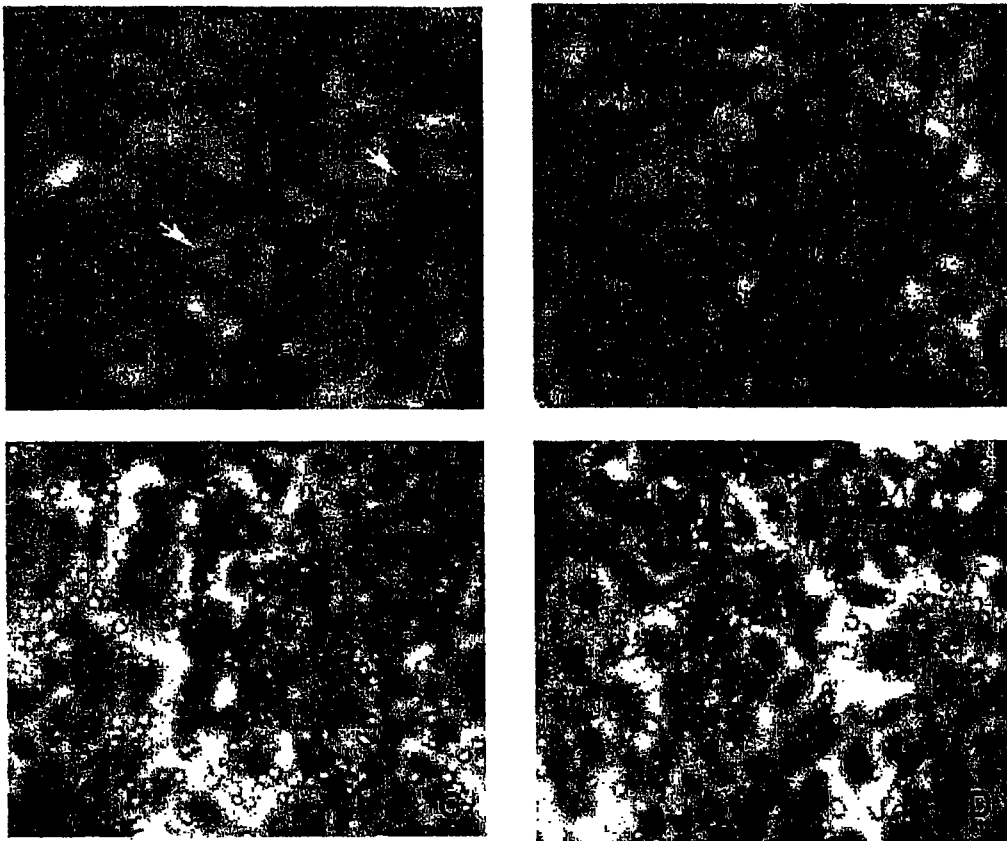


图 6

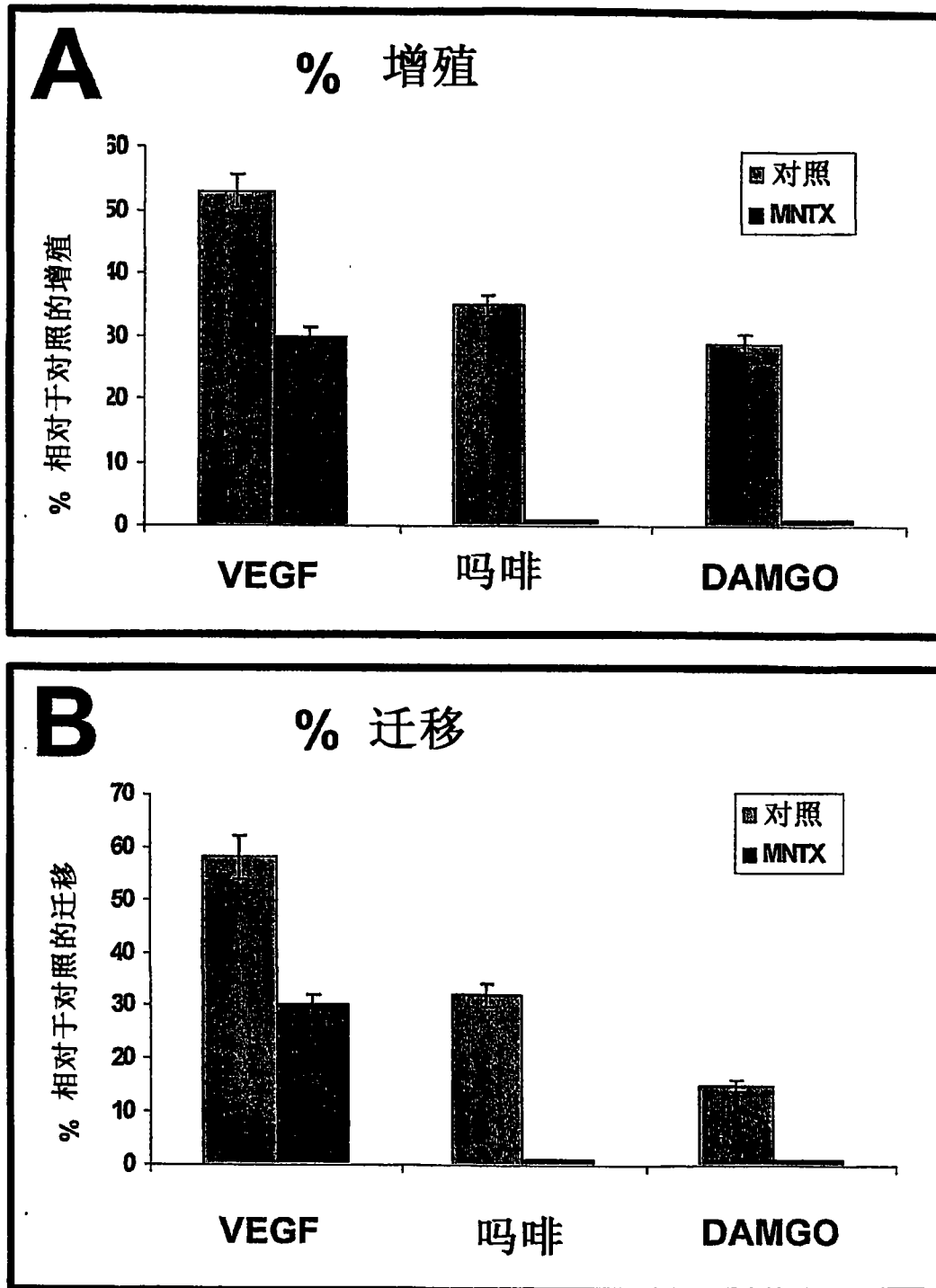


图 7

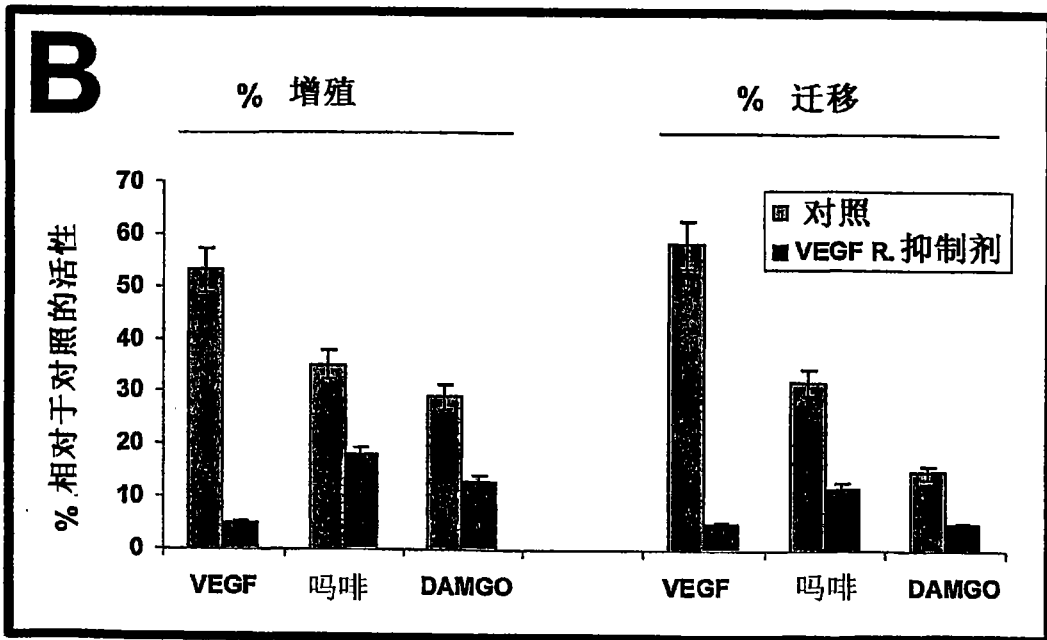
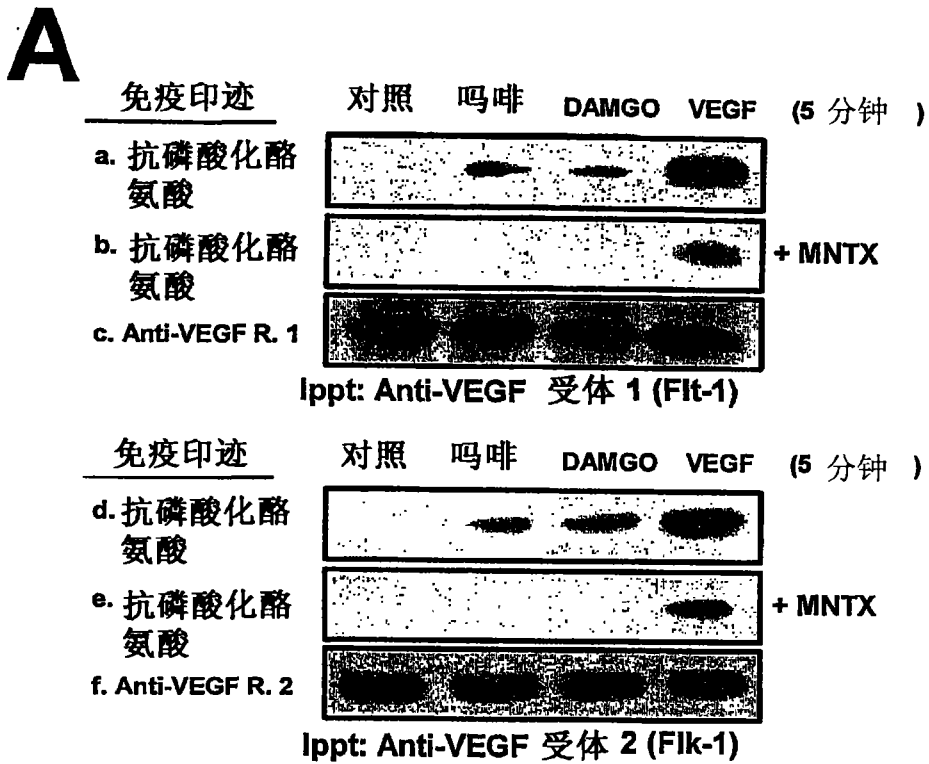


图 8

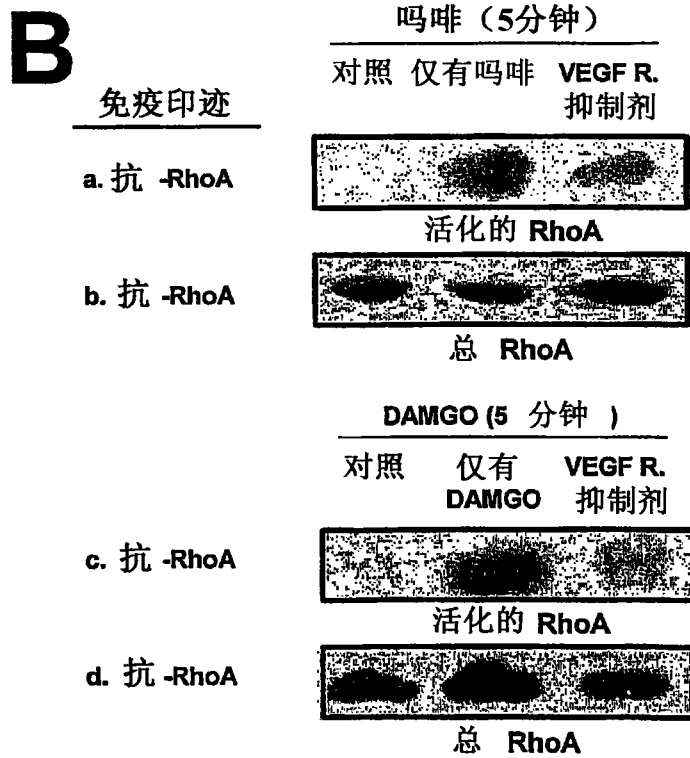
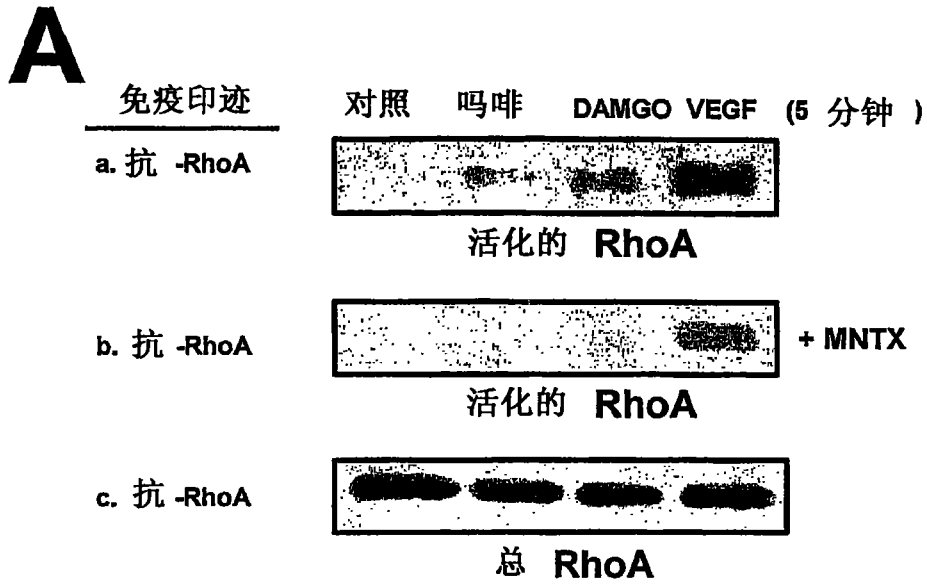


图 9

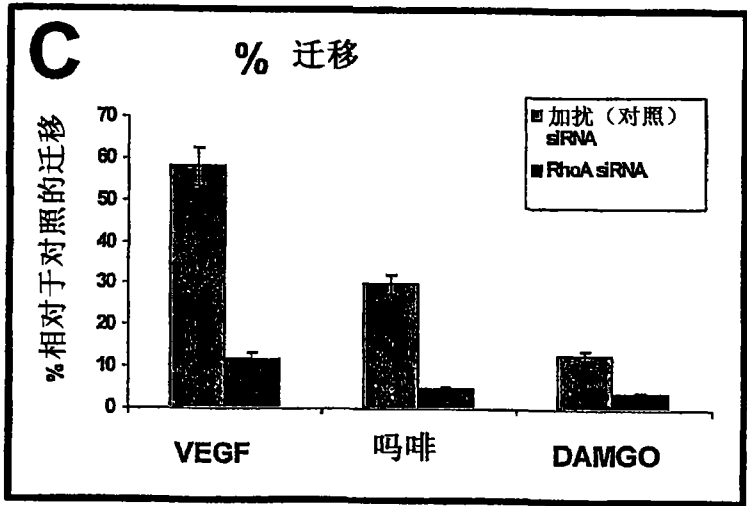
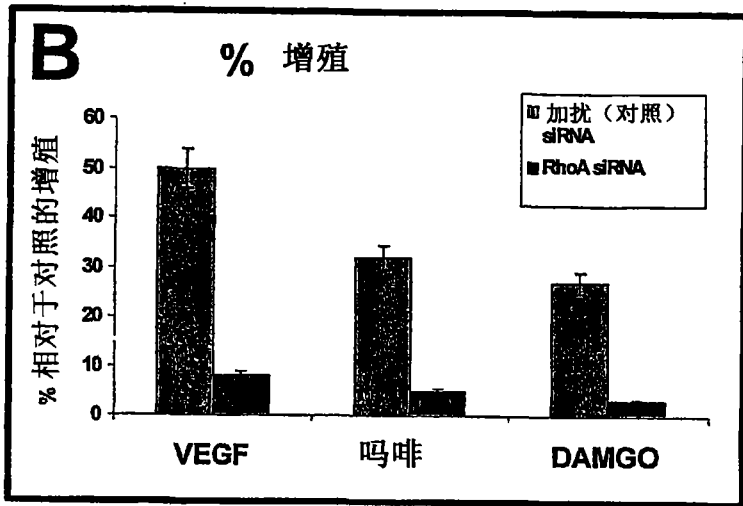
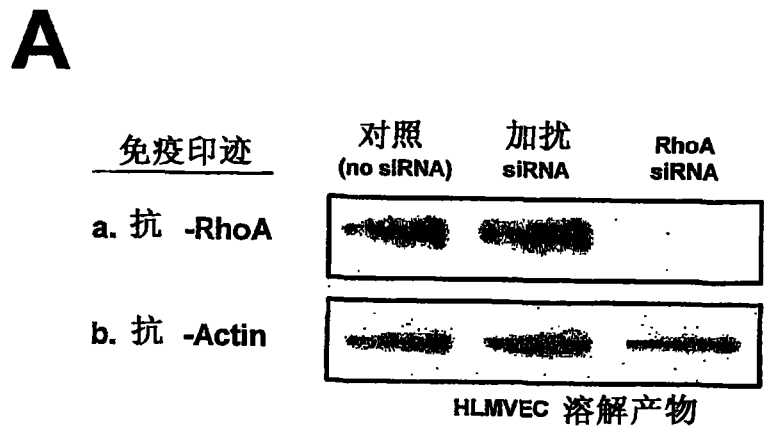


图 10

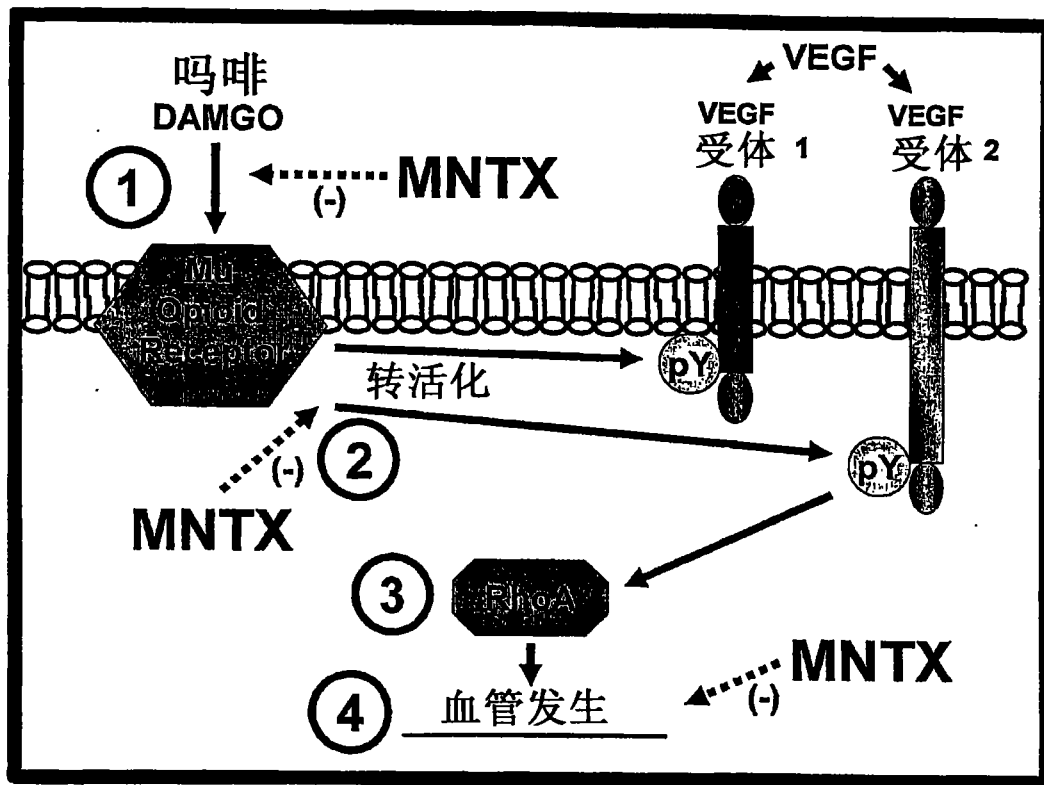
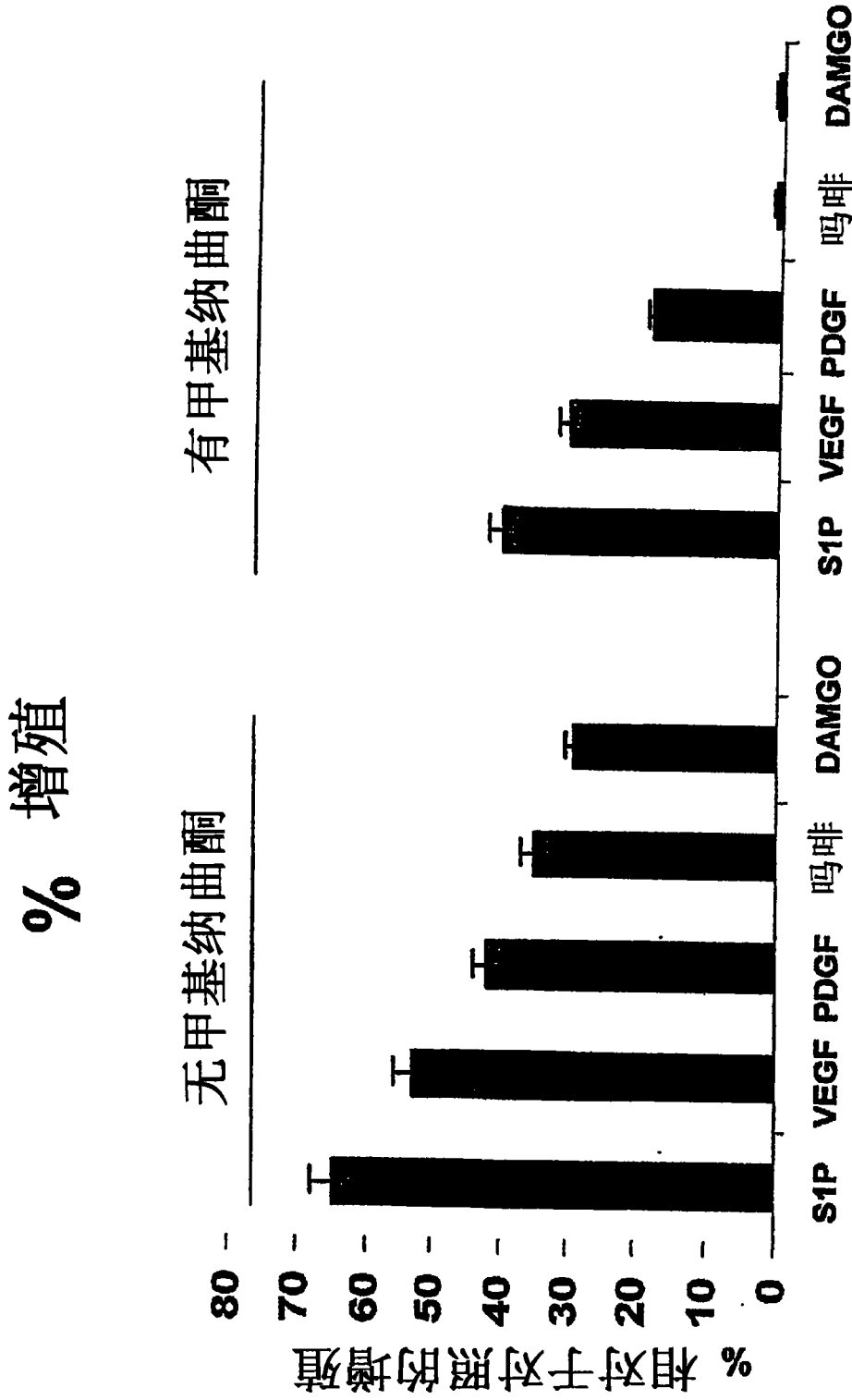


图 11



所有激动剂和抑制剂为100nM

图 12

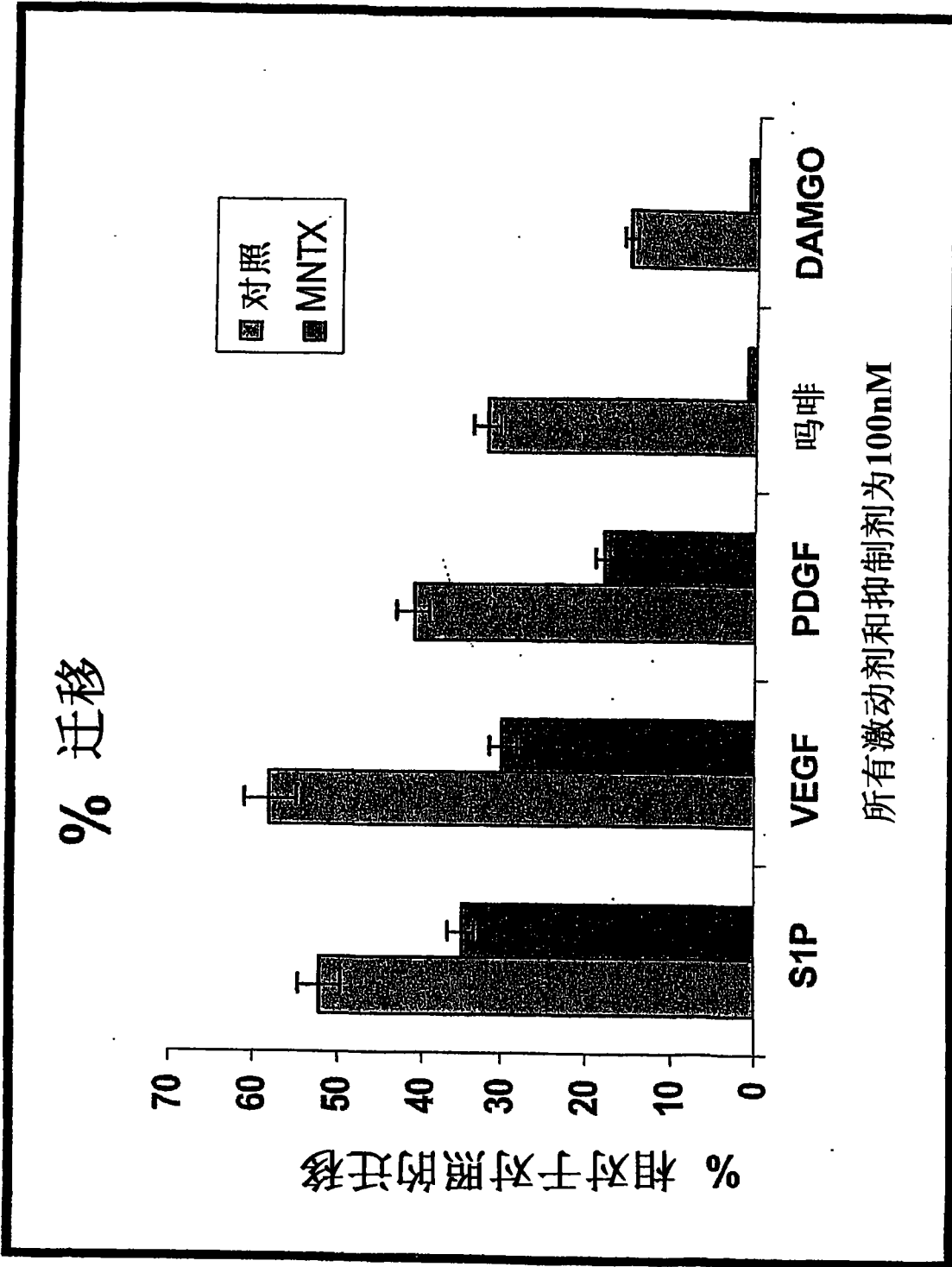


图 13

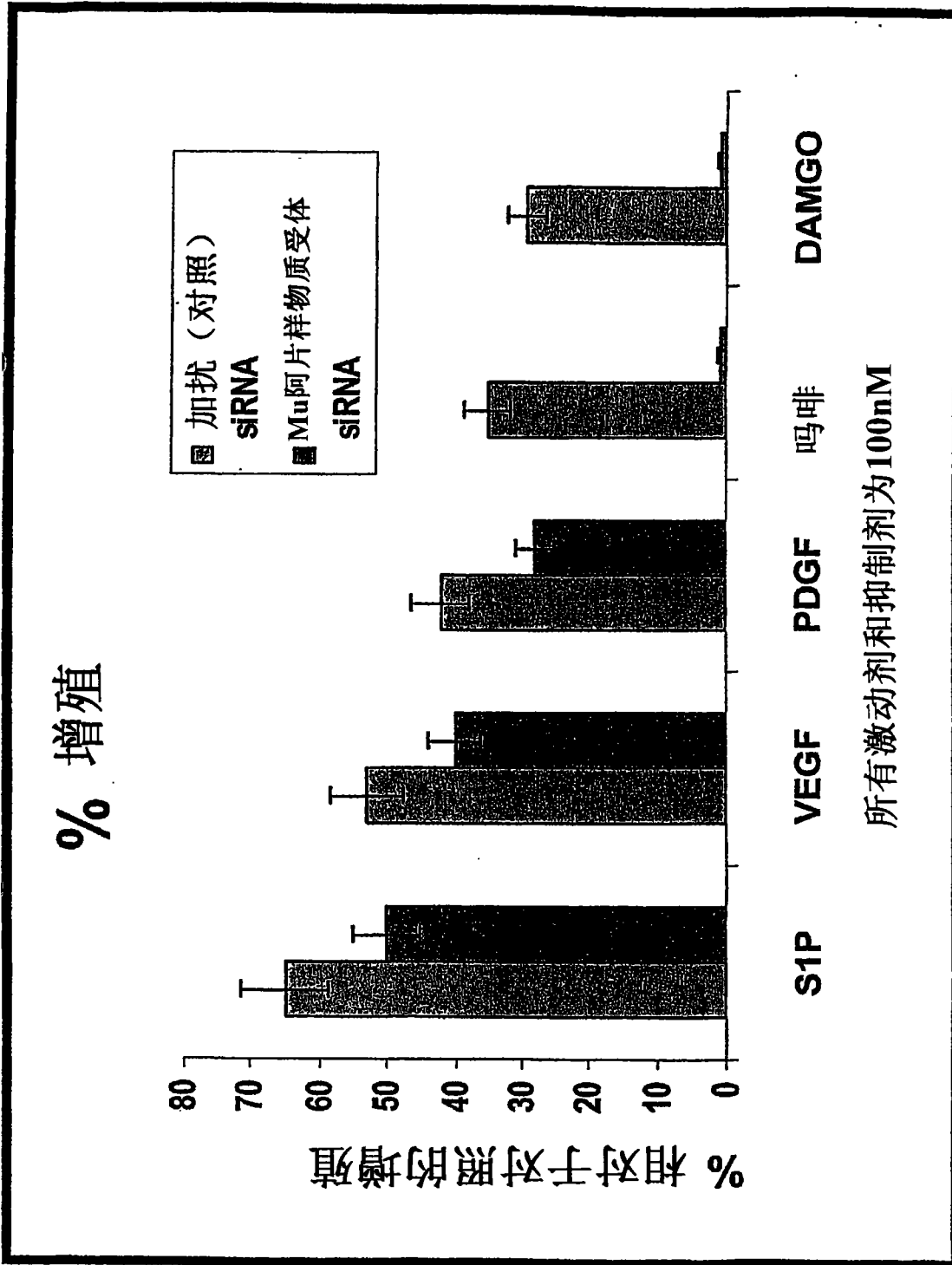


图 14

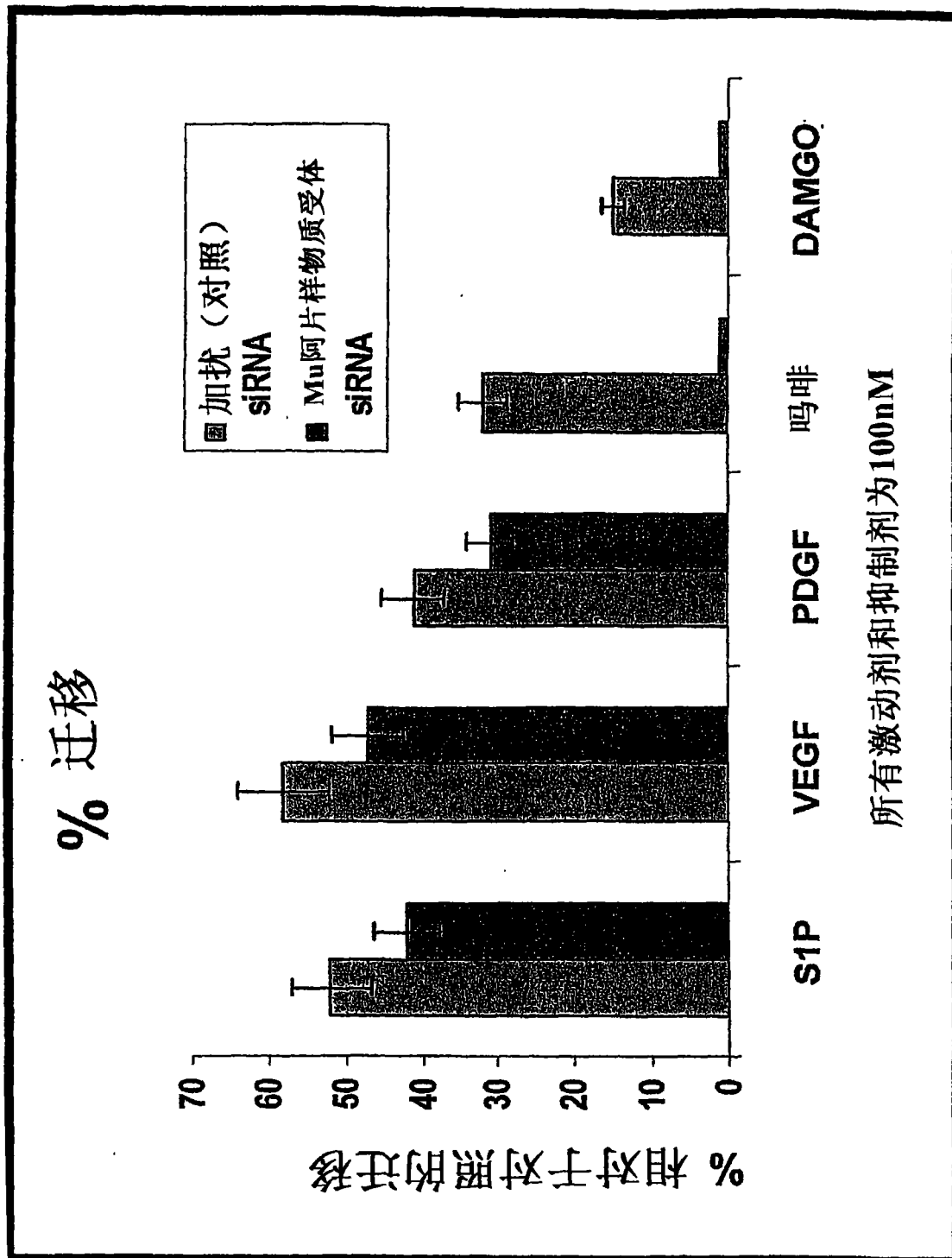


图 15

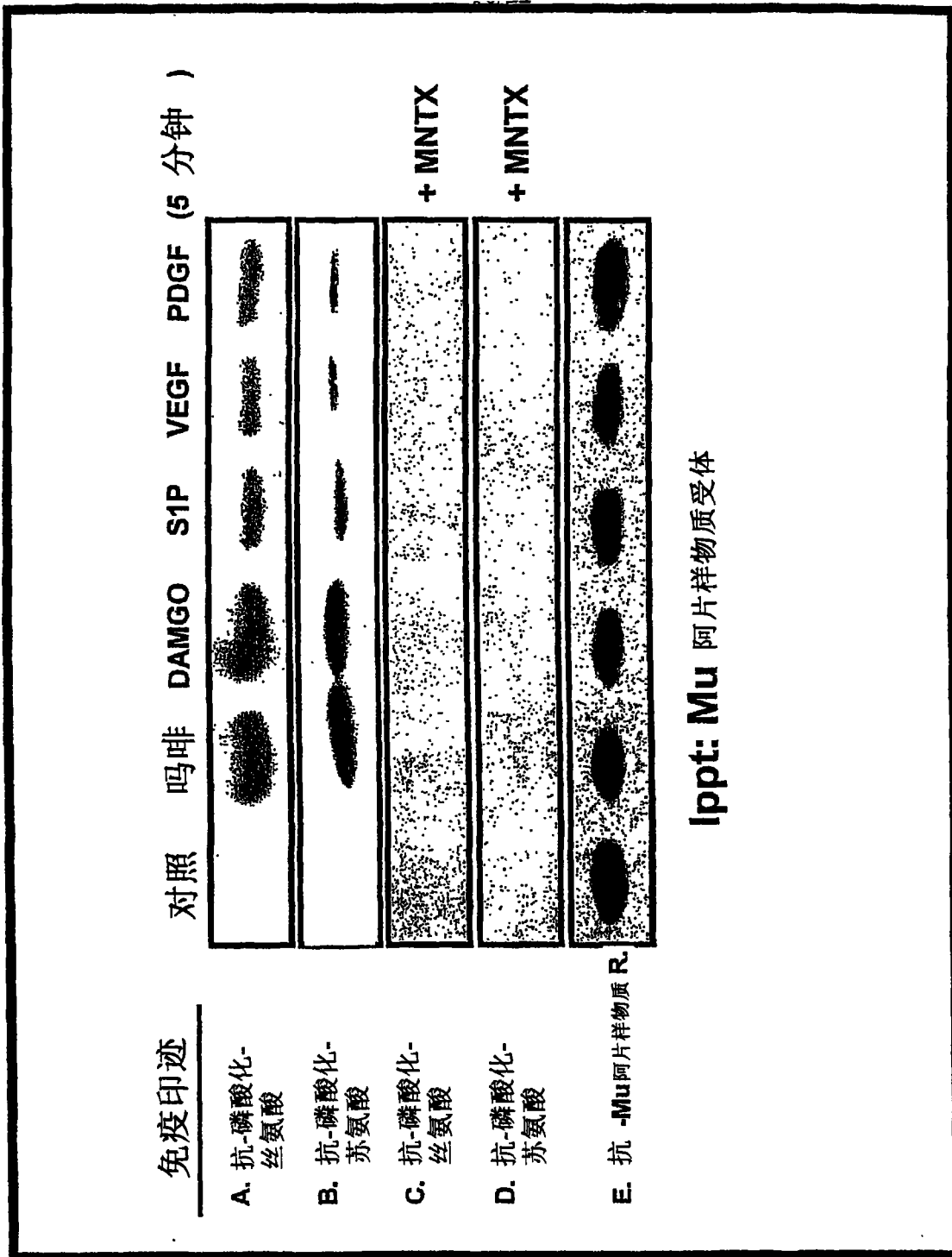


图 16

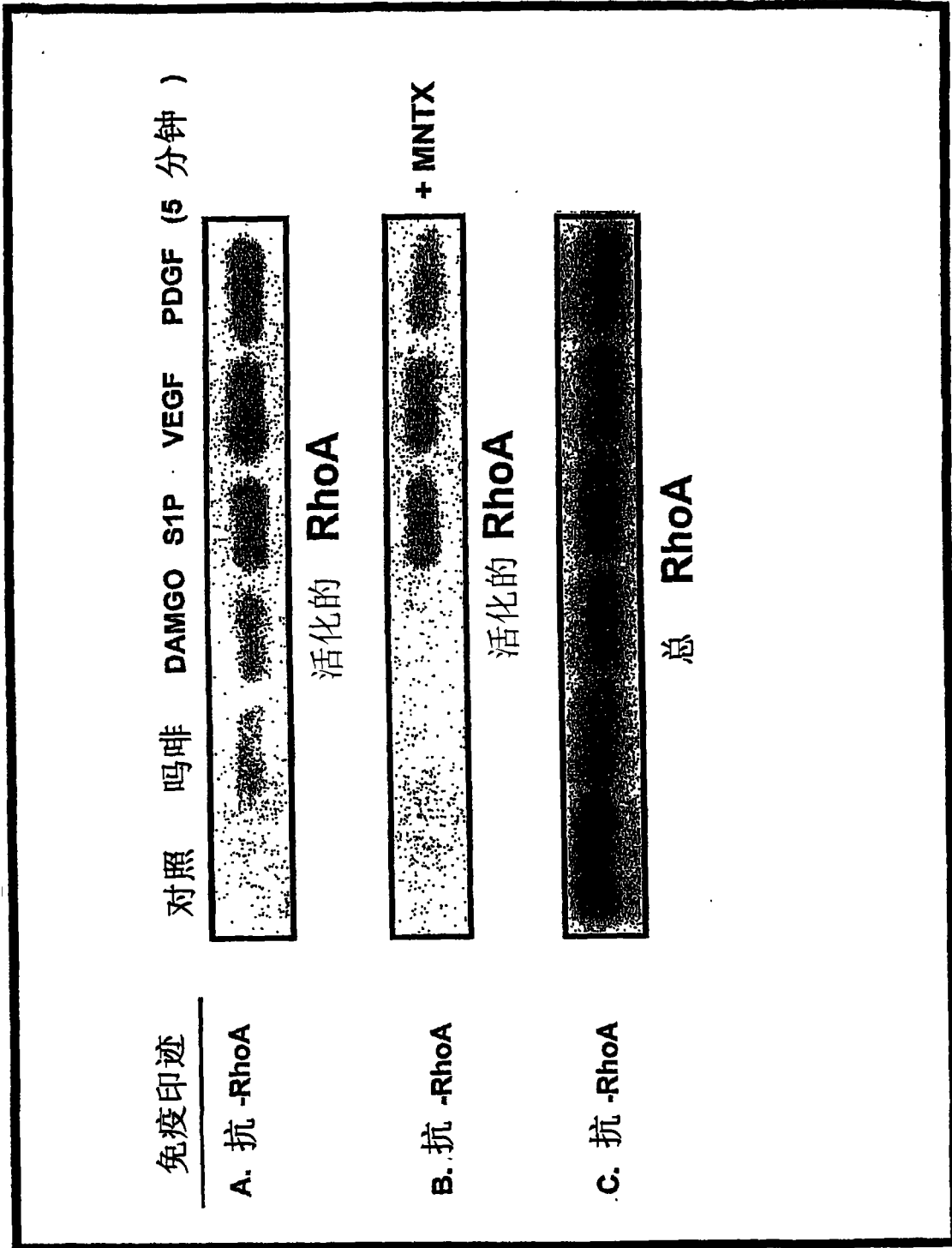


图 17

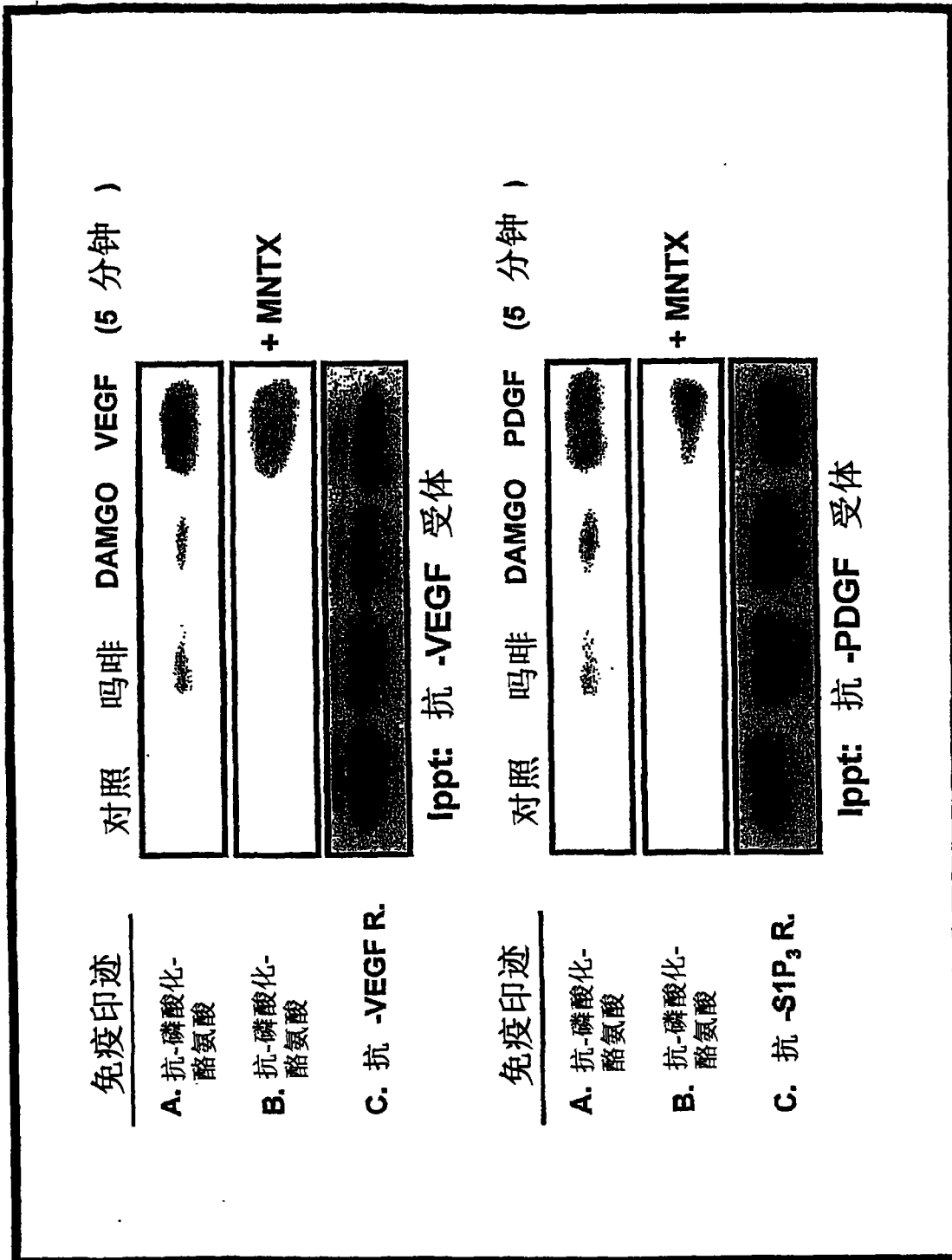


图 18

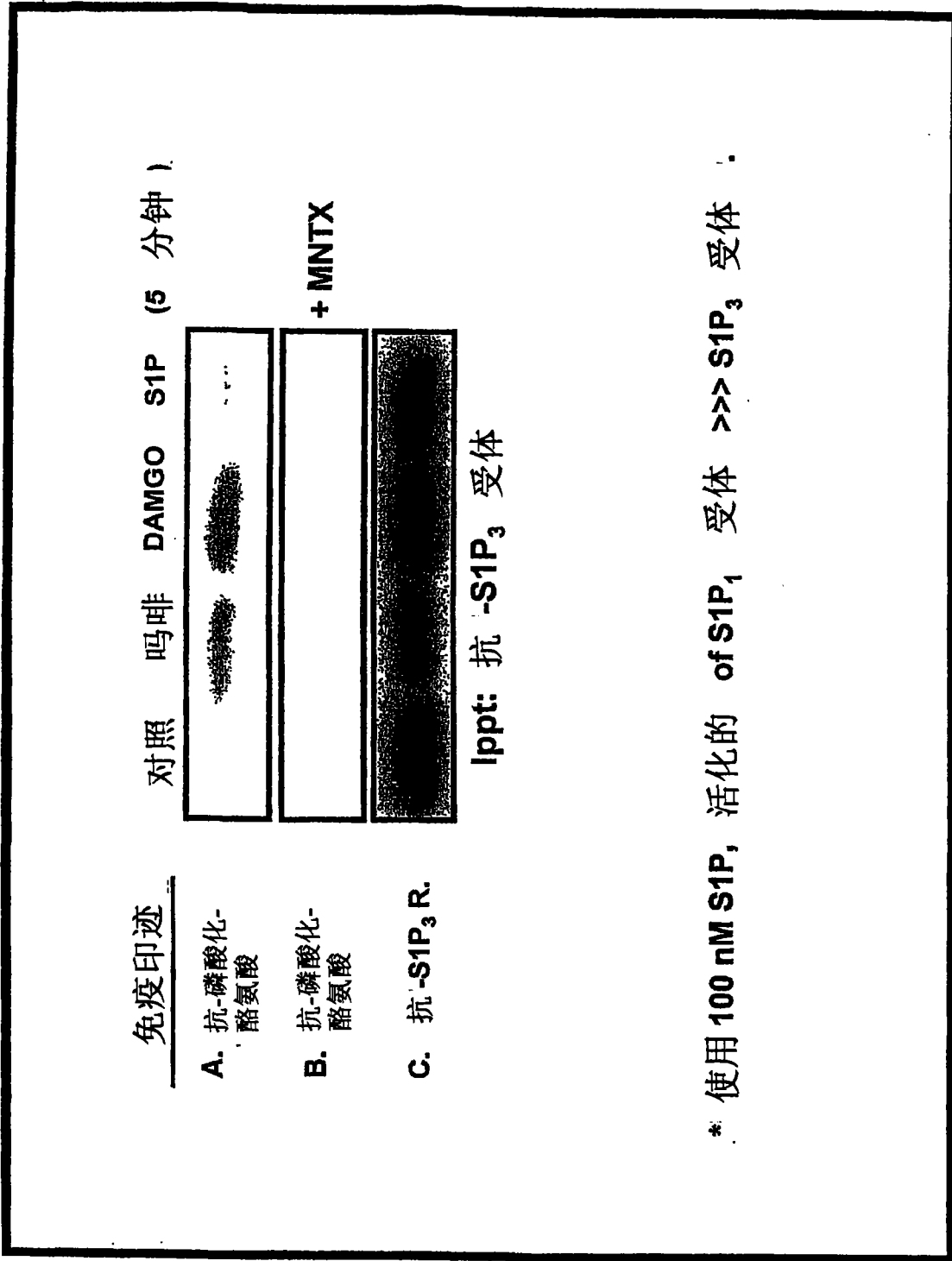


图 19

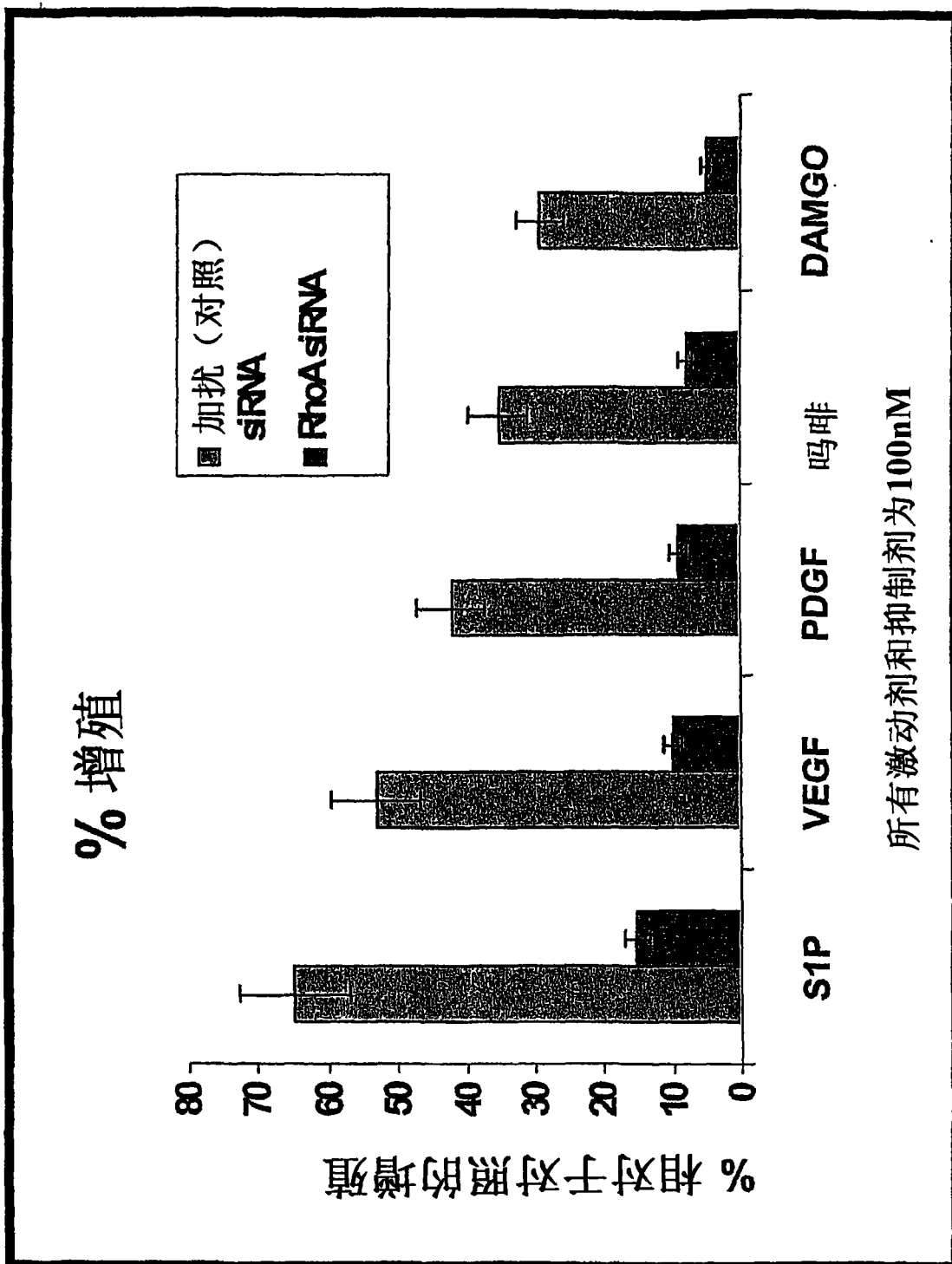


图 20

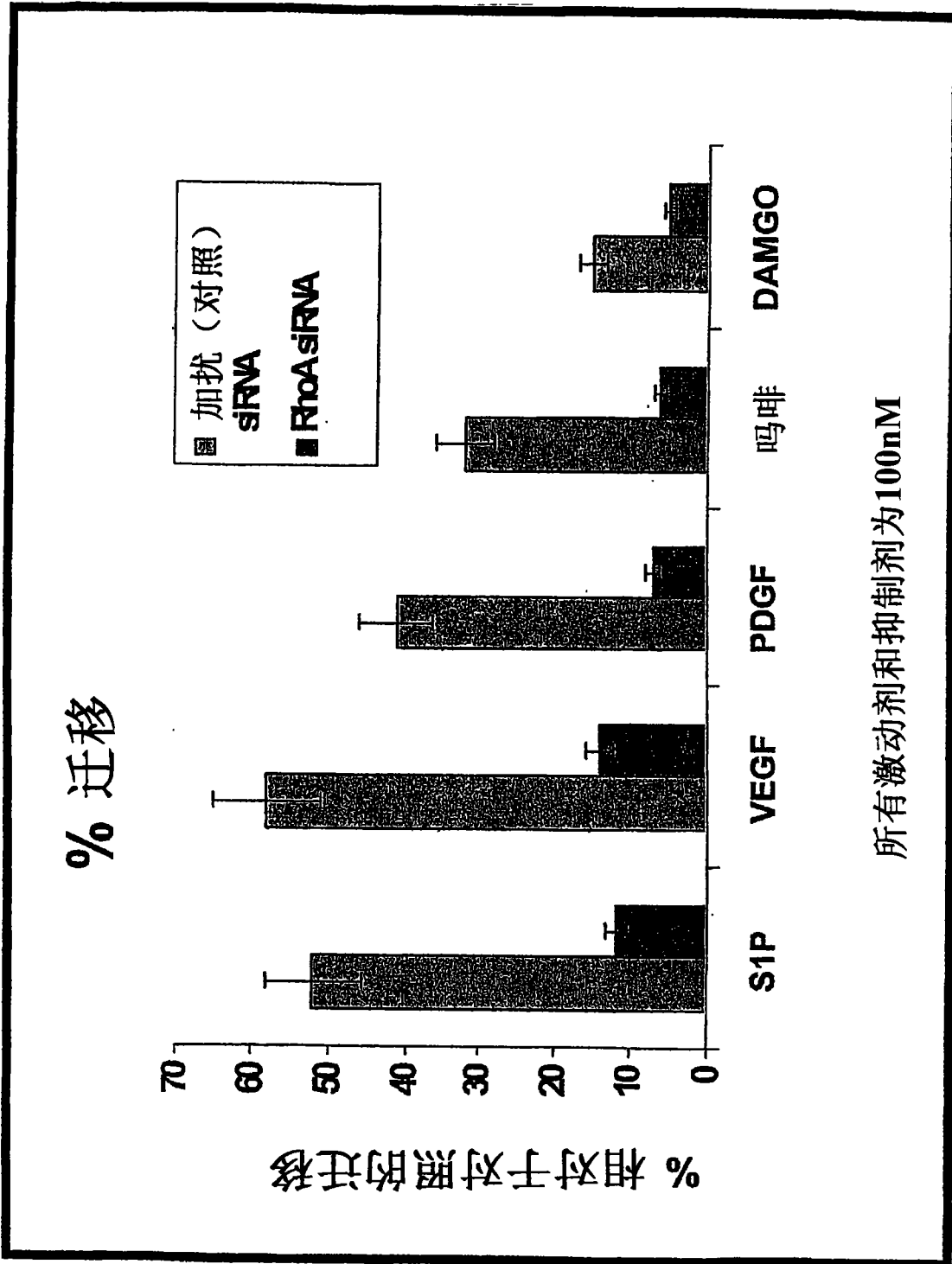


图 21

所有激动剂和抑制剂为100nM

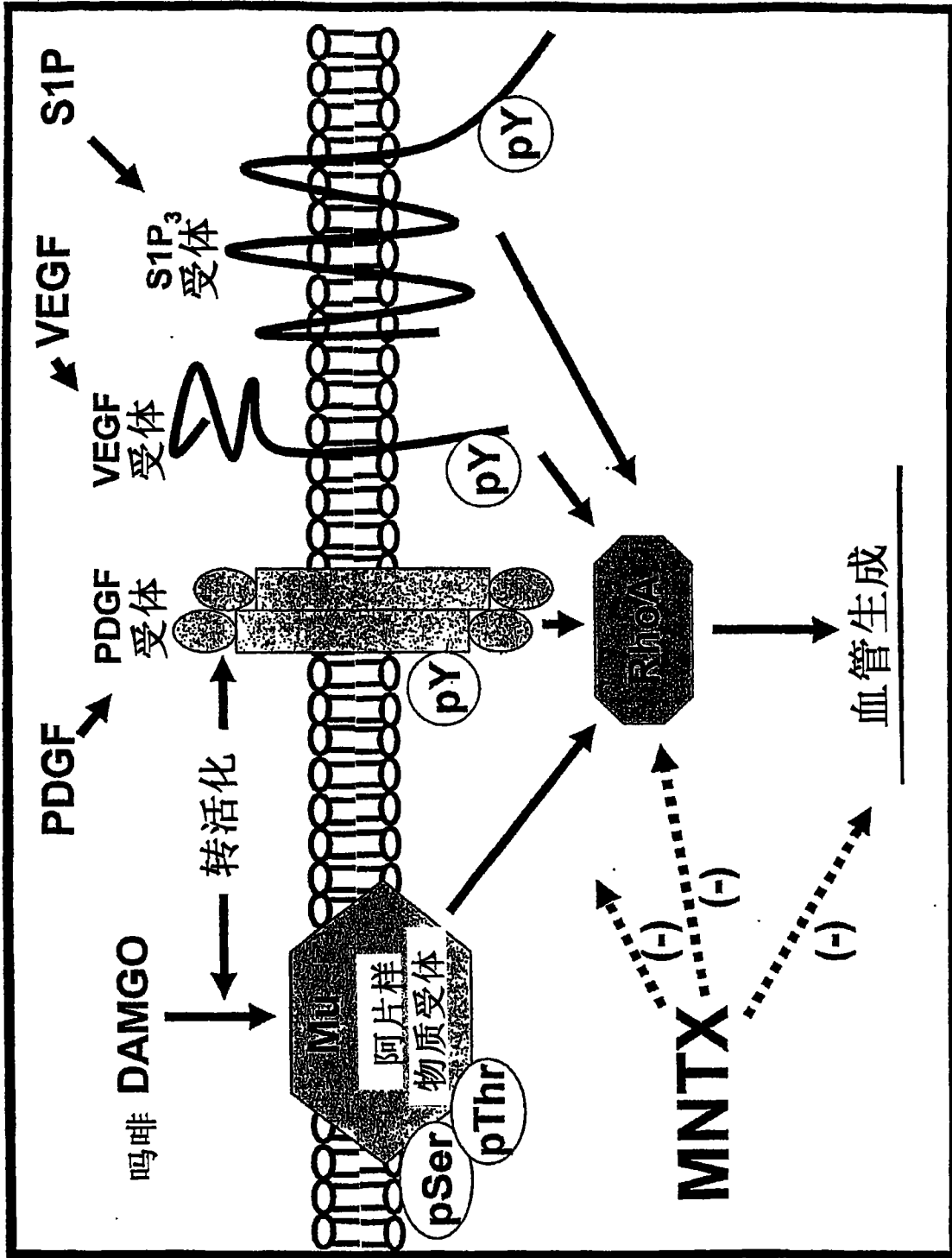


图 22