



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101123965 B

(45) 授权公告日 2012.08.22

(21) 申请号 200680005542.1

(22) 申请日 2006.01.20

(30) 优先权数据

60/645,778 2005.01.20 US

60/663,006 2005.03.18 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007.08.21

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2006/002008 2006.01.20

(87) PCT申请的公布数据

W02006/078887 EN 2006.07.27

(73) 专利权人 分子药物研究所公司

地址 美国科罗拉多州

(72) 发明人 大卫·巴-奥尔

纳加拉贾·K·R·拉奥

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

11227

代理人 刘晓东 顾晋伟

(51) Int. Cl.

A61K 31/445 (2006.01)

(56) 对比文件

Huw M. L. Davies. synthesis of methylphenidate analogues and their

bindingaffinities at dopamine and serotoni transport sites. Bioorganic and medicinal chemistry 14. 2004, 141799-1802.

Challman et al.. methylpehnidate: its pharmacology and uses. mayo. clin. proc. 75 7 11-721. 2000, 75(711-721), 711-721.

Dunnick et al.. Decreased incidence of spontaneous mammaryglandneoplasm in female F344 rats treated withamphetamine, methylphenidate, or codeine. Cancer Letters 102. 1996, 10277-83.

Rozans et al.. palliative uses of methylphenidate in patients with cancer. j clin. oncology 20 1. 2002, 20(1), 335-339.

审查员 葛嘉

权利要求书 3 页 说明书 23 页 附图 8 页

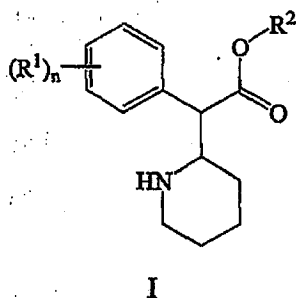
(54) 发明名称

哌甲酯衍生物及其应用

(57) 摘要

本发明提供了使用式 (I) 化合物及其盐和前药的方法, 其中 n、R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>如本文所定义。本发明还提供了某些新的式 I 化合物和包含它们的药物组合物。

1. 式 I 化合物或其盐在制备用于抑制动物中血管发生的药物中的用途：



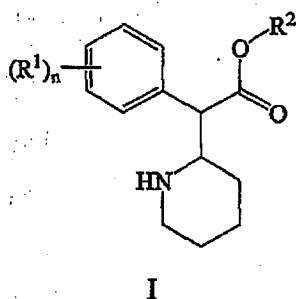
其中：

n 为 1；

R<sup>1</sup> 为苯基或苯氧基；且

R<sup>2</sup> 为甲基。

2. 式 I 化合物或其盐在制备用于治疗动物中血管发生疾病或病况的药物中的用途：



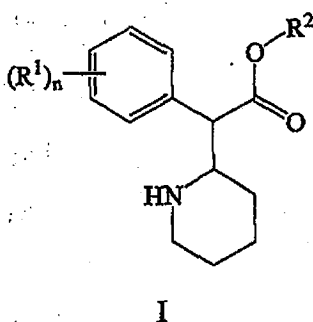
其中：

n 为 1；

R<sup>1</sup> 为苯基或苯氧基；且

R<sup>2</sup> 为甲基。

3. 式 I 化合物或其盐在制备用于治疗动物中眼部血管发生疾病或病况的药物中的用途：



其中：

n 为 1；

R<sup>1</sup> 为苯基或苯氧基；且

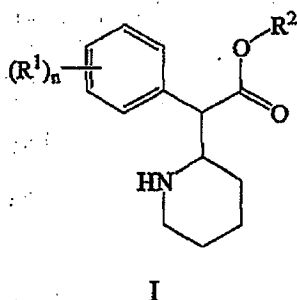
R<sup>2</sup> 为甲基。

4. 权利要求 3 的用途，其中眼部血管发生疾病或病况为糖尿病性视网膜病。

5. 权利要求 3 的用途，其中眼部血管发生疾病或病况为黄斑变性。

6. 权利要求 3 的用途, 其中眼部血管发生疾病或病况为早产儿视网膜病、角膜移植排斥、新生血管性青光眼、晶状体后纤维组织增生症或发红。

7. 式 I 化合物或其盐在制备用于治疗动物中肿瘤性疾病的药物中的用途:



其中:

n 为 1;

R<sup>1</sup> 为苯基或苯氧基; 且

R<sup>2</sup> 为甲基。

8. 权利要求 7 的用途, 其中肿瘤性疾病为肿瘤。

9. 权利要求 8 的用途, 其中肿瘤为恶性肿瘤。

10. 权利要求 9 的用途, 其中肿瘤为膀胱、脑、乳房、宫颈、结肠、直肠、肾、肝、肺、卵巢、胰腺、前列腺、胃或子宫的肿瘤。

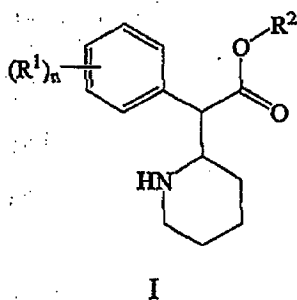
11. 权利要求 10 的用途, 其中肿瘤为脑、乳房、结肠、肝或胰腺的肿瘤。

12. 权利要求 11 的用途, 其中肿瘤为脑的肿瘤。

13. 权利要求 12 的用途, 其中脑肿瘤为胶质母细胞瘤。

14. 权利要求 7 的用途, 其中肿瘤性疾病为肿瘤转移。

15. 式 I 化合物或其盐在制备用于治疗动物中增殖性疾病的药物中的用途:



其中:

n 为 1;

R<sup>1</sup> 为苯基或苯氧基; 且

R<sup>2</sup> 为甲基。

16. 权利要求 15 的用途, 其中增殖性疾病为癌症。

17. 权利要求 16 的用途, 其中癌症为癌瘤、肉瘤、淋巴瘤或白血病。

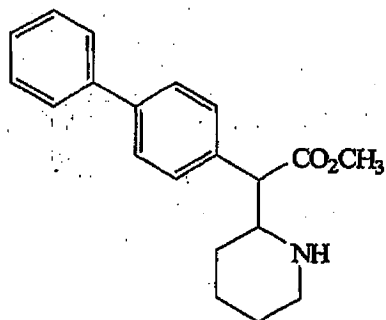
18. 权利要求 15 的用途, 其中增殖性疾病为系膜细胞增殖性疾病。

19. 权利要求 15 的用途, 其中增殖性疾病为纤维变性疾病。

20. 权利要求 15 的用途, 其中增殖性疾病为过度增殖性皮肤疾病。

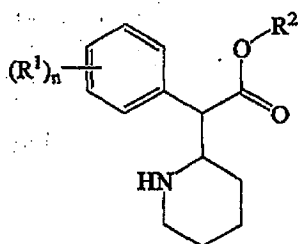
21. 权利要求 20 的用途, 其中过度增殖性皮肤疾病为皮肤癌。

22. 权利要求 1-21 中任意一项的用途,其中所述化合物为:



II

23. 式 I 的化合物:



I

其中:

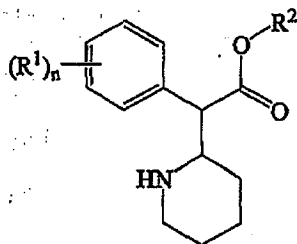
n 为 1;

R<sup>1</sup> 为 -OR<sup>7</sup>;

R<sup>2</sup> 为氢或低级烷基,所述低级烷基是包含 1-4 个碳原子的饱和直链或支链烷基;且

R<sup>7</sup> 为苯基。

24. 药物组合物,其包含药学上可接受的载体和式 I 化合物或其盐:



I

其中:

n 为 1;

R<sup>1</sup> 为 -OR<sup>7</sup>;

R<sup>2</sup> 为氢或低级烷基,所述低级烷基是包含 1-4 个碳原子的饱和直链或支链烷基;且

R<sup>7</sup> 为苯基。

## 哌甲酯衍生物及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及哌甲酯衍生物的应用。这些应用包括抑制血管发生和治疗血管发生疾病和病况。

### 背景技术

[0002] 哌甲酯是用于诊断为注意力缺乏 / 多动症 (ADHD) 包括其不注意亚型 (以前称作注意力缺乏障碍或 ADD) 的儿童和成年人的治疗选择。已经提出哌甲酯的某些衍生物用于治疗 ADD (参见美国专利 US6, 025, 502) 和用于治疗其它神经病症和病况 (参见美国专利 US5, 859, 249、US6, 025, 502 和 US6, 486, 177 和 PCT 申请 W099/36403)。

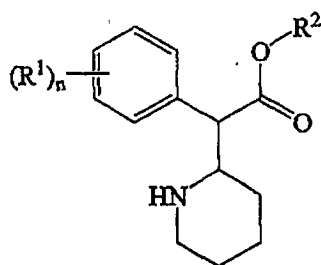
[0003] 哌甲酯为温和的中枢神经系统刺激剂并且还有教导认为它可以治疗癌症患者、AIDS 患者和其他重度疾病患者中的情感淡漠、疲劳、认知减退和抑郁症。参见美国专利 US5, 908, 850、US6, 127, 385、US6, 395, 752 和 US6, 486, 177 ;Challman 和 Lipsky, Mayo Clin. Proc., 75 :711-721(2000) 和 Leonard 等, Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp., 19 : 151-180(2004)。

[0004] 据报导哌甲酯为非致癌性的, 并且在服用哌甲酯的大鼠和人中的癌症发生率低于预期。参见 Dunnick 和 Hailey, Toxicology, 103 :77-84(1995), National Toxicology Program, Natl. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser., 439 :1-299(1995), Dunnick 等, Cancer Lett., 102 :77-83(1996) 和 Teo 等, Mutat. Res., 537 :67-79(2003)。然而, 有证据表明哌甲酯在小鼠中致癌。Dunnick 和 Hailey, Toxicology, 103 :77-84(1995) 和 National Toxicology Program, Natl. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser., 439 : 1-299(1995)。此外, 据报导某些类型的肿瘤减少, 而据报导另一些类型的肿瘤增加。参见 Dunnick 和 Hailey, Toxicology, 103 :77-84(1995), National Toxicology Program, Natl. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser., 439 :1-299(1995) 和 Dunnick 等, Cancer Lett., 102 : 77-83(1996)。

### 发明内容

[0005] 本发明提供了使用式 I 化合物的方法:

[0006]



I

[0007] 其中 n 为 1-5 的整数, 并且 R<sup>1</sup> 各自独立为芳基、杂芳基、烷基、环烷基、烷氧基、芳

氧基、酰基、羧基、羟基、卤素、氨基、硝基、磺基或巯基。烷基可以各自任选被羟基、氨基或巯基取代。 $R^2$  为氢或低级烷基。

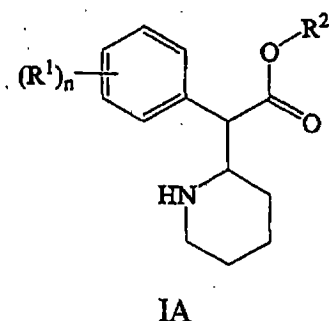
[0008] 本发明在第一个实施方案中提供了抑制动物中血管发生的方法。该方法抑制动物的血管发生。该方法包括对所述动物给予有效量的式 I 化合物或其药学上可接受的盐或前药。

[0009] 本发明在第二个实施方案中提供了治疗动物中血管发生疾病或病况的方法。该方法包括对所述动物给予治疗有效量的式 I 化合物或其药学上可接受的盐或前药。

[0010] 本发明在第三个实施方案中提供了治疗动物中增殖性病症的方法。该方法包括对所述动物给予治疗有效量的式 I 化合物或其药学上可接受的盐或前药。

[0011] 本发明还提供了式 IA 化合物：

[0012]



[0013] 其中：

[0014]  $n$  为 1-5 的整数；

[0015]  $R^1$  各自独立为式  $-C(O)-R^8$ 、 $-OR^7$  或  $-C(O)-O-R^3$  的结构；

[0016]  $R^2$  为氢或低级烷基；

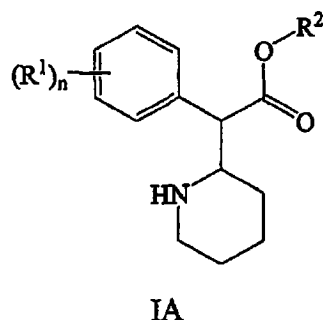
[0017]  $R^3$  为氢、烷基、环烷基或芳基；

[0018]  $R^7$  为芳基；且

[0019]  $R^8$  为环烷基或芳基。

[0020] 本发明进一步提供了药物组合物，其包含药学上可接受的载体和式 IA 化合物或其盐或前药：

[0021]



[0022] 其中：

[0023]  $n$  为 1-5 的整数；

[0024]  $R^1$  各自独立为式  $-C(O)-R^8$ 、 $-OR^7$  或  $-C(O)-O-R^3$  的结构；

[0025]  $R^2$  为氢或低级烷基；

[0026]  $R^3$  为氢、烷基、环烷基或芳基；

[0027]  $R^7$  为芳基 ;且

[0028]  $R^8$  为环烷基或芳基。

### 附图说明

[0029] 附图 1A-C 为各种添加剂对分别用  $2\mu\text{g/ml}$ 、 $5\mu\text{g/ml}$  和  $20\mu\text{g/ml}$  植物凝集素 (PHA) 刺激的外周血淋巴细胞 (PBL) 培养物在 530nm 处 OD 的示意图。

[0030] 附图 2 为各种添加剂对用  $2\mu\text{g/ml}$  PHA 刺激的 PBL 培养物在 530nm 处 OD 的示意图。

[0031] 附图 3 为各种添加剂对用  $2\mu\text{g/ml}$  PHA 刺激的 PBL 培养物中 IL-13 浓度的示意图。

[0032] 附图 4 为各种添加剂对用  $2\mu\text{g/ml}$  PHA 刺激的 PBL 培养物中 IFN  $\gamma$  浓度的示意图。

[0033] 附图 5A-B 为各种添加剂对分别用  $2\mu\text{g/ml}$  和  $5\mu\text{g/ml}$  PHA 刺激的 PBL 培养物中在 530nm 处 OD 的示意图。

[0034] 附图 6 为各种添加剂对用  $5\mu\text{g/ml}$  PHA 刺激的 PBL 培养物中 IL-13 浓度的示意图。

[0035] 附图 7 为各种添加剂对用  $2\mu\text{g/ml}$  PHA 刺激的 PBL 培养物中 TNF  $\alpha$  浓度的示意图。

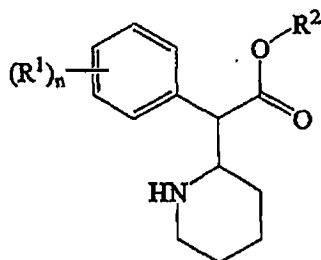
[0036] 附图 8 为各种添加剂对用  $2\mu\text{g/ml}$  PHA 刺激的 PBL 培养物中 IL-8 浓度的示意图。

[0037] 附图 9A-B 为各种添加剂对用脂多糖 (LPS) 刺激的 THP-1 单核细胞培养物中 OD 的示意图。在附图 9B 中,在每种情况中上部深灰色棒条为 c-Jun 且下部浅灰色棒条为 NF  $\kappa$  B。

### 具体实施方式

[0038] 在一个方面中,式 I 化合物可用于实施本发明。

[0039]



I

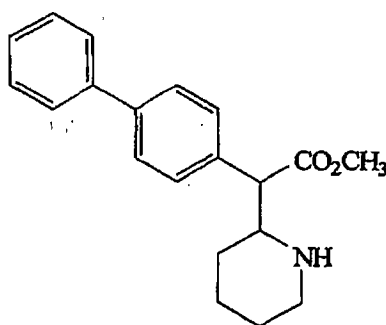
[0040] 在式 I 中, n 为 1-5 的整数。优选 n 为 1 或 2。

[0041] 每个  $R^1$  可以相同或不同,其为芳基、杂芳基、烷基、环烷基、烷氧基、芳氧基、酰基、羧基、羟基、卤素、氨基、硝基、磺基或巯基。每个烷基可以任选被羟基、氨基或巯基取代。 $R^1$  优选为芳基、烷基、环烷基、烷氧基、芳氧基或酰基。更优选  $R^1$  为芳基、烷基或环烷基,甚至更优选为芳基,最优选为苯基。

[0042] 在式 I 中,  $R^2$  为氢或低级烷基。优选  $R^2$  为  $-\text{CH}_3$ 。

[0043] 在一个具体实施方案中,式 II 的化合物特别可用于本发明:

[0044]



II

[0045] “酰基”意思是指式  $-C(o)-R^3$  的结构, 其中  $R^3$  为 H、烷基、环烷基或芳基。

[0046] “氨基”意思是指式  $-NR^4R^5$  的结构, 其中  $R^4$  和  $R^5$  各自独立为 H 或低级烷基, 优选低级烷基。

[0047] “烷氧基”意思是指式  $-OR^6$  的结构, 其中  $R^6$  为烷基。烷氧基的实例为甲氧基 ( $-O-CH_3$ )。

[0048] “烷基”意思是指包含 1-8 个碳原子的单价饱和直链或支链烃。每个烷基可以任选地被一个或多个氨基、羟基或巯基取代。

[0049] “芳基”意思是指 6-14 个环碳原子的单价单-、双-或三-环芳族烃结构。优选是苯基。

[0050] “芳氧基”意思是指式  $-OR^7$  的结构, 其中  $R^7$  为芳基。烷氧基的实例为苯氧基。

[0051] “羧基”意思是指式  $-C(o)-OR^3$  的结构, 其中  $R^3$  为 H、烷基、环烷基或芳基。

[0052] “环烷基”意思是指 3-10 个环碳原子的饱和单价单-或双-环烃结构。优选环烷基包含 4-8 个环碳原子。最优选的环烷基为环己基。

[0053] “卤素”意思是指氯、氟、溴或碘。优选为氯或溴。

[0054] “杂芳基”意思是指包含 1, 2 或 3 个环杂原子的 5-12 个环原子的单价单环或双环芳族结构, 其中所述杂原子各自独立地选自 N、O 和 S, 剩余的环原子为 C。

[0055] “羟基”意思是指  $-OH$ 。

[0056] “低级烷基”意思是指包含 1-4 个碳原子的饱和直链或支链烃。

[0057] “硝基”意思是指  $-NO_2$ 。

[0058] “巯基”意思是指  $-SH$ 。

[0059] “磺基”意思是指  $-SO_3H$ 。

[0060] “前药”意思是指当将这类前药施用于哺乳动物对象时在体内释放根据式 I 的活性母体药物的任意化合物。如下制备式 I 化合物的前药: 通过修饰式 I 化合物上存在的一个或多个官能基, 使得所述修饰可以在体内切割而释放母体化合物。前药包括这样的式 I 化合物, 其中式 I 化合物上的羟基、氨基或巯基分别与可在体内切割而生成游离羟基、氨基或巯基的任意基团键合。前药的实例包括但不限于式 I 化合物中羟基官能基的酯 (例如乙酸酯、甲酸酯和苯甲酸酯衍生物)、氨基甲酸酯 (例如 N, N-二甲氨基羰基) 等。

[0061] 本文所用的“抑制”意思是指减少 (完全或部分) 或阻止。

[0062] “治疗 (treat)”疾病或病况包括: (1) 预防疾病或病况, 即导致在接触或易感疾病或病况、但尚未经历或显示该疾病或病况之症状的哺乳动物中不发生该疾病或病况的临床症状; (2) 抑制疾病或病况, 即阻止或降低该疾病或病况或其临床症状的发展; 或 (3) 缓



解疾病或病况,即导致疾病或病况或其临床症状的消退,包括治愈疾病或病况。

[0063] “有效量”意思是指在为治疗疾病或病况或引起作用而向动物施用足量时足以实现所述目的的化合物用量。“有效量”可以并且最可能根据化合物、疾病或病况及其严重程度、或寻求产生的作用、以及待治疗动物的年龄、体重等而改变。

[0064] 合成用于本发明的式 I 化合物的方法为本领域中公知的。例如,参见美国专利 US5,859,249 和 US6,025,502 ;PCT 申请 W099/36403, Pan 等, Eur. J. Pharmacol., 264,177-182(1994) ;Gatley 等, Life Sci., 58,231-239(1996) ;Deutsch 等, J. Med. Chem., 39,1201-1209(1996) ;Thai 等, J. Med. Chem., 41,591-601(1998) ; 和 Wayment 等, J. Neurochem., 72 :1266-1274(1999), Krim, Lori, Thesis(Ph. D. in Chemistry)(2001), University Of Pennsylvania, Chemistry Library Reading Room(Call No. QD001 2001. K92), University Microfilms Order No. 3031684, ISBN0-493-44179-4, 将这些文献与其中引述参考文献的全部公开内容引入本文作为参考。

[0065] 如果本发明的化合物包含一个或多个手性中心,可以通过对映体选择性方式合成这些化合物或者可以制备并分离对映体和 / 或非对映体的混合物。可以通过公知操作拆分本发明化合物、其起始原料和 / 或中间体,例如如下所述 :4 卷本 Optical Resolution Procedures for Chemical Compounds :Optical Resolution Information Center, Manhattan College, Riverdale, N. Y. 和 Enantiomers, Racemates and Resolutions, Jean Jacques, Andre Collet 和 Samuel H. Wilen ;John Wiley & Sons, Inc., New York, 1981, 将这些文献完整地引入本文。化合物拆分主要基于非对映体物理性质的差异,通过以化学或酶促方式结合对映体纯结构,从而产生可通过分级结晶、蒸馏或色谱分离的形式。

[0066] 式 I 化合物的药学可接受的盐也可以用于实施本发明。药学可接受的盐包括常规无毒性盐,诸如来源于无机酸(诸如盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、硝酸等)、有机酸(诸如乙酸、丙酸、琥珀酸、乙醇酸、硬脂酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、谷氨酸、天冬氨酸、苯甲酸、水杨酸、草酸、抗坏血酸等)或碱(诸如药学上可接受的金属阳离子或来源于 N, N- 二苄基乙二胺、D- 葡萄糖胺或乙二胺的有机阳离子的氢氧化物、碳酸盐或碳酸氢盐)的盐。按照常规方式,例如通过使化合物的游离碱形式与酸反应而制备盐。

[0067] 可以理解本发明的范围不仅包括式 I 化合物自身的应用,而且包括其盐和前药的应用。此外,本发明涵盖式 I 化合物的异构体及其盐和前药的应用,其中包括纯的异构体和异构体的各种混合物。

[0068] 式 I 化合物、其药学上可接受的盐或前药可以用于抑制血管发生。血管发生为体内新血管形成的过程。血管发生在本文中意思还表示新血管形成、血管形成、动脉化和血管生成、或者包括这些情况。

[0069] 式 I 化合物、其药学上可接受的盐或前药还可用于治疗血管发生疾病和病况。血管发生疾病或病况为涉及血管发生、由血管发生导致、加剧或依赖于血管发生的疾病或病况。可按照本发明治疗的具体的血管发生疾病和病况包括肿瘤性疾病、肥大(例如因甲状腺激素诱导的心脏肥大)、结缔组织病症(例如类风湿性关节炎和动脉粥样硬化)、银屑病、眼部血管发生疾病、心血管疾病、脑血管疾病、子宫内膜异位、息肉病、肥胖、糖尿病相关疾病和血友病性关节。式 I 化合物、其药学上可接受的盐或前药还可以用于抑制胚胎植入所需的血管形成,由此提供生育控制方法。

[0070] 式 I 化合物、其药学上可接受的盐或前药特别可用于治疗眼部血管发生疾病。眼部血管发生疾病包括糖尿病性视网膜病、早产儿视网膜病、黄斑变性、角膜移植排斥、新生血管性青光眼、晶状体后纤维组织增生症和发红 (rubeosis)。式 I 化合物、其药学上可接受的盐或前药尤其可用于治疗糖尿病性视网膜病和黄斑变性。

[0071] 式 I 化合物、其药学上可接受的盐或前药还特别可用于治疗肿瘤性疾病。可用式 I 化合物、其药学上可接受盐或前药治疗的肿瘤性疾病包括恶性肿瘤 (例如膀胱、脑、乳房、宫颈、结肠、直肠、肾、肝、肺、卵巢、胰腺、前列腺、胃和子宫的肿瘤)、肿瘤转移和良性肿瘤 (例如血管瘤、听神经瘤、神经纤维瘤、沙眼和致热性肉芽肿)。式 I 化合物、其药学上可接受的盐或前药尤其可用于治疗脑、乳房、结肠、肝和胰腺的肿瘤,尤其是脑的肿瘤 (例如胶质母细胞瘤)。

[0072] 除抑制血管发生外,已经发现式 I 化合物、其药学上可接受的盐或前药还能够抑制细胞增殖,减少癌细胞生长,抑制细胞因子产生,抑制 Ras 和 RAP-1,以及抑制 NF  $\kappa$  B 和 AP-1 产生。因此,式 I 化合物、其药学上可接受的盐或前药还特别可用于治疗各种增殖性疾病,包括血管发生疾病和病况,尤其是肿瘤性疾病 (参见上文),以及其它癌症以及其它增殖性疾病。

[0073] 可用式 I 化合物、其药学上可接受的盐或前药治疗的癌症包括癌瘤、肉瘤、淋巴瘤、白血病、实体瘤和血液恶性肿瘤。可用式 I 化合物、其药学上可接受的盐或前药治疗的具体癌症包括脑癌、头颈癌、乳癌、卵巢癌、前列腺癌、胃癌、结肠癌、胰腺癌、膀胱癌、甲状腺癌、肝癌、肺癌、骨癌和皮肤癌。式 I 化合物、其药学上可接受的盐或前药尤其可用于治疗脑癌、乳癌、结肠癌、肝癌、胰腺癌、皮肤癌、淋巴瘤和白血病。

[0074] 其它增殖性疾病包括系膜细胞增殖性疾病、纤维变性疾病和过度增殖性皮肤病。系膜细胞增殖性疾病意思是指因系膜细胞异常增殖而导致的病症。系膜细胞增殖性疾病包括肾病,诸如肾小球肾炎、糖尿病性肾病、恶性肾硬化、血栓形成性微血管病变综合征和肾小球病。纤维变性疾病意思是指细胞外基质异常形成。纤维变性疾病的实例包括肝硬化、肺纤维化和动脉粥样硬化。过度增殖性皮肤病包括银屑病、皮肤癌和表皮过度增殖。

[0075] 为了治疗需要治疗的动物,将式 I 化合物、其药学上可接受的盐或前药施用给该动物。优选所述动物为哺乳动物,诸如兔、山羊、狗、猫、马或人。最优选所述动物为人。

[0076] 可以根据经验确定本发明化合物的有效剂型、给药方式和剂量,并且做出这类决定在本领域技术人员的能力范围内。本领域技术人员可以理解,剂量将根据以下因素变化:所使用的特定化合物、所治疗的疾病或病况、疾病或病况的严重程度、给药途径、化合物的排泄速率、治疗持续时间、给予动物的任意其它活性成分、动物年龄、体型和物种、以及医学和兽医领域已知的类似因素。一般而言,本发明化合物的合适的日剂量为有效产生治疗作用的最低剂量的化合物用量。然而,可以由主治医师或兽医在合理医学判断范围内决定每日剂量。如果需要,可以将有效日剂量作为在全天内经适当间隔分别作为 2、3、4、5、6 次或更多次的亚剂量给药。化合物的给药应持续至实现可接受的反应为止。

[0077] 可以通过任意合适的给药途径对动物患者给予用于本发明的化合物 (即式 I 化合物及其药学上可接受的盐和前药) 用于治疗,包括口服、经鼻、直肠、阴道、胃肠道外 (例如静脉内、脊椎内、腹膜内、皮下或肌内)、池内 (intracisternally)、透皮、颅内、脑内和局部 (topically) (包括口含和舌下)。优选的给药途径为口服和局部。

[0078] 尽管可以单独给予用于本发明的化合物,但是优选将该化合物作为药物制剂(组合物)给药。用于本发明的药物组合物包含一种或多种式 I 化合物或其药学上可接受的盐或前药作为活性成分,其与一种或多种药学上可接受的载体以及任选地一种或多种其它化合物、活性成分或其它物质相混合。每种载体在与制剂中其它成分相容的意义上必须为“可接受的”并且对动物无害。药学上可接受的载体为本领域众所周知的。与选择的给药途径无关,可以通过本领域技术人员公知的常规方法将本发明的化合物配制成药学上可接受的剂型。例如,参见 Remington's Pharmaceutical Sciences。

[0079] 适于口服给药的本发明制剂可以为胶囊、扁囊剂(cachet)、丸剂、片剂、粉末、颗粒的形式,或者作为在含水或非水液体中的溶液或混悬液、或水包油型或油包水型液体乳液或为酞剂或糖浆剂、或作为锭剂(使用惰性基质,诸如明胶和甘油、或蔗糖和阿拉伯胶)等,其各自包含预定量的用于本发明的一种或多种化合物作为活性成分。还可以将用于本发明的化合物作为大丸剂、药糖剂或糊剂给药。

[0080] 在口服给药用固体剂型(胶囊、片剂、丸剂、糖锭剂、粉末、颗粒等)中,将活性成分与一种或多种药学上可接受的载体,诸如柠檬酸钠或磷酸二钙和/或任意下列物质相混合:(1) 填充剂或增量剂,诸如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和/或硅酸;(2) 粘合剂,诸如,例如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯胶;(3) 保湿剂,诸如甘油;(4) 崩解剂,诸如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠;(5) 溶解延缓剂,诸如石蜡;(6) 吸收促进剂,诸如季铵化合物;(7) 润湿剂,诸如,例如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯;(8) 吸收剂,诸如高岭土和膨润粘土;(9) 润滑剂,诸如滑石粉、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇类、十二烷基硫酸钠及其混合物;和(10) 着色剂。就胶囊、片剂和丸剂而言,药物组合物还可以包含缓冲剂。使用诸如乳糖(lactose)或乳糖(milk sugars)以及高分子量聚乙二醇类等的赋形剂,相似类型的固体组合物可以用作软和硬明胶胶囊的填充剂。

[0081] 可以通过任选用一种或多种辅助成分通过压制或模制来制备片剂。可以使用粘合剂(例如明胶或羟丙基甲基纤维素)、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂(例如羟基乙酸淀粉钠或交联羧甲基纤维素钠)、表面活性剂或分散剂制备压制片。可以通过在合适的机器中模制用惰性液体稀释剂湿润的粉状化合物的混合物制备模制片。

[0082] 可以给本发明药物组合物的片剂和其它固体剂型,诸如糖锭剂、胶囊、丸剂和颗粒加刻痕或使用包衣剂和壳来制备,诸如肠溶包衣以及制药领域中众所周知的其它包衣剂。还可以使用例如不同比例以提供期望释放模式的羟丙基甲基纤维素、其它聚合物基质、脂质体和/或微球来配制它们,以提供其中活性成分的缓慢释放或受控释放。可以对它们灭菌,例如通过经截留细菌的滤器过滤。这些组合物还可以任选包含遮光剂并且可以属于这类组合物,即它们仅或优选在胃肠道的某部分任选以延缓方式释放活性成分。可以使用的包埋组合物的实例包括聚合物物质和蜡。活性成分还可以在微囊化形式中。

[0083] 用于本发明化合物口服给药的液体剂型包括药学上可接受的乳液剂、微乳、溶液、混悬液、糖浆剂和酞剂。除活性成分外,液体剂型还可以包含本领域中常用的惰性稀释剂,诸如,例如水或其它溶剂,助溶剂和乳化剂,诸如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苜醇、苯甲酸苜酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油(特别是棉籽油、花生油、玉米油、胚油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢呋喃醇、聚乙二醇类和失水山梨醇的脂肪酸酯类、及其混合物。

[0084] 除惰性稀释剂外,口服组合物还可以包括辅料,诸如润湿剂、乳化剂和助悬剂、增甜剂、矫味剂、着色剂、香料和防腐剂。

[0085] 除活性化合物外,混悬液还可以包含助悬剂,例如乙氧基化异硬脂醇类、聚氧乙烯山梨醇和失水山梨醇酯类、微晶纤维素、偏氢氧化铝 (aluminum metahydroxide)、膨润土、琼脂和黄耆胶、及其混合物。

[0086] 用于将本发明的化合物眼内注入眼球的药物制剂包括溶液、乳液、混悬液、颗粒、胶囊、微球、脂质体、基质 (matrices) 等。例如,参见美国专利 US6,060,463、美国专利申请 US2005/0101582 和 PCT 申请 W02004/043480,将这些文献的全部公开内容引入本文作为参考。例如,用于眼内注射的药物制剂可以包含一种或多种本发明的化合物与一种或多种药学上可接受的无菌等渗水或非水溶液、混悬液或乳液的组合,它们可以包含抗氧化剂、缓冲剂、助悬剂、增稠剂或增粘剂 (诸如透明质酸聚合物)。合适的水和非水载体的实例包括水、盐水 (优选 0.9%)、葡萄糖水 (优选 5%)、缓冲液、二甲亚砜、醇类和多元醇类 (诸如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)。这些组合物还可以包含辅料,诸如润湿剂和乳化剂和分散剂。此外,可以通过包括延缓吸收的试剂比如聚合物和明胶使得可注射药物剂型延长吸收。可以通过将药物掺入生物可降解聚合物诸如聚丙交酯-聚乙交酯制成的微囊或微球中来制备可注射的贮库剂型 (depot form)。其它生物可降解聚合物的实例包括聚 (原酸酯)、聚 (乙醇) 酸、聚 (乳) 酸、聚己内酯和聚 (酞)。还可以通过将药物包裹在与眼组织相容的脂质体 (由常用组分诸如二棕榈酰磷脂酰胆碱组成) 或微乳中来制备贮库可注射制剂。根据药物与聚合物或脂质之比,特定聚合物或脂质成分、所用脂质体的类型、以及微囊或微球是否包衣,可以控制药物从微囊、微球和脂质体中的释放速率。

[0087] 还可以通过手术,作为眼植入物来给予本发明的化合物。例如,可以将具有聚乙烯醇或聚乙酸乙烯酯的可扩散壁并且包含本发明化合物的贮器植入巩膜中或其上。作为另一个实例,可以将本发明的一种或多种化合物掺入由聚合物诸如聚己内酯、聚 (乙醇) 酸、聚 (乳) 酸、聚 (酞) 或脂质诸如癸二酸制成的聚合物基质,并且可以将其植入巩膜上或眼内。通常可以通过使动物接受表面或局部麻醉并且使用在角膜后形成的小切口完成这一过程。然后通过切口插入基质并且缝合至巩膜。

[0088] 本发明的一个优选实施方案为将本发明的化合物对眼局部给药,且本发明一个特别优选的实施方案为适于对眼施用的局部药物组合物。适于对眼施用的局部药物组合物包括溶液、混悬液、分散液、滴剂、凝胶、水凝胶和软膏剂。例如,参见美国专利 US5,407,926 和 PCT 申请 W02004/058289、W001/30337 和 W001/68053,将所有这些文献的全部公开内容引入本文作为参考。

[0089] 适于对眼施用以治疗血管发生疾病或病况的局部制剂包括在含水或非水基质中的一种或多种本发明化合物。局部制剂还可以包括吸收促进剂、渗透促进剂、增稠剂、增粘剂、用于调节和 / 或维持 pH 的试剂、调节渗透压的试剂、防腐剂、表面活性剂、缓冲剂、盐 (优选氯化钠)、助悬剂、分散剂、助溶剂、稳定剂和 / 或张力剂 (tonicity agent)。适于对眼施用以治疗血管发生疾病或病况的局部制剂优选包含促进本发明化合物吸收或渗透入眼的吸收或渗透促进剂和 / 或能够增加本发明化合物在眼内保留时间的增稠剂或增粘剂。参见 PCT 申请 W02004/058289、W001/30337 和 W001/68053。示例性吸收 / 渗透促进剂包括单独或与二甲基亚砜组合的甲基磺酰基甲烷、羧酸和表面活性剂。示例性增稠剂和增粘剂

包括葡聚糖、聚乙二醇类、聚乙烯吡咯烷酮、多糖凝胶、**Gelrite®**、纤维素聚合物（诸如羟丙基甲基纤维素）、含羧基的聚合物（诸如丙烯酸的聚合物或共聚物）、聚乙烯醇和透明质酸或其盐。

[0090] 可以制备液体剂型（例如溶液、混悬液、分散液和滴剂），例如，通过将本发明的化合物溶解、分散、悬浮于载体中，诸如，例如水、盐水、葡萄糖水溶液、甘油、乙醇等，而形成溶液、分散液或混悬液。如果需要，所述药物制剂还可以包含少量的无毒性辅助物质，诸如润湿剂或乳化剂、pH 缓冲剂等，例如乙酸钠、失水山梨醇单月桂酸酯、三乙醇胺乙酸钠、油酸三乙醇胺等。

[0091] 除含有本发明的化合物外，水溶液和混悬液还可以包含防腐剂、表面活性剂、缓冲剂、盐（优选氯化钠）、张力剂和水。如果使用混悬液，那么颗粒大小应小于  $10\ \mu\text{m}$  以尽可能降低对眼的刺激。如果使用溶液或混悬液，那么递送至眼的量不应超过  $50\ \mu\text{l}$  以避免从眼中过度溢出。

[0092] 一般由微粒（即微球、纳米球、微囊或纳米囊，其中微球和纳米球一般为聚合物基质的整体颗粒，其中俘获、吸收或包含所述制剂，而使用微囊和纳米囊实际上将制剂包裹于其中）形成胶态混悬液。这些微粒大小的上限约为  $5\ \mu\text{m}$  - 约  $10\ \mu\text{m}$ 。

[0093] 眼用软膏剂包括在合适基质 (base) 中的本发明一或多种化合物，所述基质诸如矿物油、液态羊毛脂、白凡士林、上述两种或所有三种物质的组合、或聚乙烯 - 矿物油凝胶。任选地可以包括防腐剂。

[0094] 眼用凝胶包括悬浮于亲水性基质中的本发明一或多种化合物，所述基质诸如 Carbopol-940 或乙醇、水和丙二醇的组合（例如 40:40:20 的比例）。使用胶凝剂，诸如羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素或氯化甘草酸盐。任选地可以包括防腐剂和 / 或张力剂。

[0095] 可以通过掺入可溶胀的凝胶形成聚合物诸如以上列为增稠剂或增粘剂的那些物质而形成水凝胶，但本领域中称作“水凝胶”的制剂一般比称作“增稠”溶液或混悬液的制剂更高的粘度。与这类预形成的水凝胶相反，还可以制备一种制剂以便在施用于眼后在原位形成水凝胶。这类凝胶在室温下为液体，而在高温下诸如在接触体液时形成凝胶（且由此称作“热可逆性”水凝胶）。赋予这一特性的生物相容性聚合物包括丙烯酸聚合物和共聚物、N-异丙基丙烯酰胺衍生物和环氧乙烷与环氧丙烷的 ABA 嵌段共聚物（常称作“泊洛沙姆”并且可以商品名 **Pluronic®** 购自 BASF-Wayndotte）。

[0096] 优选的分散体为脂质体，在这种情况下所述制剂被包封在脂质体内（由交替的含水隔室和脂双层组成的微观小囊泡）。

[0097] 可以用还包含一种或多种分散剂、助溶剂或助悬剂的含水或非水基质来配制滴眼剂。可以通过简单的滴眼器加盖的瓶或通过适于经专门成形的闭合物逐滴递送液体内含物的塑料瓶来递送滴剂。

[0098] 还可以通过插入眼中的浸药固体载体局部施用本发明的化合物。一般通过聚合物的溶解或生物侵蚀、渗透作用或其组合进行药物释放。可以使用几种基质类型的递送系统。这些系统包括浸渍或浸入期望的本发明化合物的亲水性软接触眼镜、以及在植入眼内后无需取出的生物可降解或可溶性装置。这些可溶性眼用插入物可以由眼可耐受并且与所给予的本发明化合物相容的任意可降解物质组成。这些物质包括，但不限于聚（乙醇醇）、聚丙

烯酰胺、丙烯酸乙酯和乙烯基吡咯烷酮的聚合物和共聚物、以及交联多肽类或多糖类,诸如甲壳素。

[0099] 用于其它类型局部给予或用于透皮给予(即并非对眼)本发明化合物的剂型包括粉末、喷剂、软膏剂、糊剂、乳膏(cream)、洗剂、凝胶、溶液、贴剂、滴剂和吸入剂。可以在无菌条件下将活性成分与药学上可接受的载体、以及与任何缓冲剂或可能需要的抛射剂相混合。除含有活性成分外,软膏剂、糊剂、乳膏和凝胶还可以包含赋形剂,诸如动物和植物脂肪、油、蜡、石蜡、黄耆胶、纤维素衍生物、聚乙二醇类、硅酮、膨润土、硅酸、滑石粉和氧化锌、或其混合物。除含有活性成分外,粉末和喷剂还可以包含赋形剂,诸如乳糖、滑石粉、硅酸、氢氧化铝、硅酸钙和聚酰胺粉末或这些物质的混合物。喷剂还可以包含常用的抛射剂,诸如氯氟烃类和挥发性未被取代的烃类,诸如丁烷和丙烷。透皮贴剂具有对身体提供受控递送的本发明化合物的附加优势。可以通过将本发明的一种或多种化合物溶解、分散或掺入适当介质,诸如弹性基质材料来制备这些剂型。吸收促进剂还可以用于增加化合物通过皮肤的流量。可以通过提供速率控制膜或将化合物分散于聚合物或凝胶中控制这种流量的速率。

[0100] 可以将用于直肠或阴道给药的药物组合物配制成栓剂,其可以通过将本发明的一种或多种化合物与一种或多种合适的非刺激性赋形剂或载体相混合来制备,所述的非刺激性赋形剂或载体包含,例如可可脂、聚乙二醇、栓剂蜡或水杨酸/酯盐,其在室温下为固体而在体温下为液体,且由此在直肠或阴道腔中可以熔化并且释放活性化合物。适于阴道给药的本发明制剂还包括包含比如本领域中已知的合适载体的子宫帽(pessaries)、棉塞(tampon)、乳膏、凝胶、糊剂、泡沫或喷剂。

[0101] 药物制剂包括那些适于通过吸入或吹入或者经鼻或眼内给药的制剂。为了通过吸入对上(鼻)或下呼吸道给药,从吹入器、喷雾器或加压药包或其它递送气溶胶喷剂的便利性装置来方便地递送本发明的化合物。加压药包可以包含合适的抛射剂,诸如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它合适的气体。就加压气溶胶而言,可以通过提供阀以便递送计量的量来确定剂量单位。

[0102] 或者,为了通过吸入或吹入给药,组合物可以采用干粉形式,例如本发明的一种或多种化合物与合适的粉末基质诸如乳糖或淀粉的粉末混合物。可以将粉末组合物制成例如在胶囊或药筒(cartridges)或例如明胶或泡罩包中的单位剂型,可以借助于吸入器、吹入器或计量剂量吸入器来给予粉末。

[0103] 为了鼻内给药,可以通过滴鼻剂或液体喷剂,诸如通过塑料瓶喷雾器或计量剂量吸入器给予用于本发明的化合物。便利地从加压药包中递送液体喷剂。典型的喷雾器为Mistometer(Wintrop)和Medihaler(Riker)。

[0104] 可以使用还包含一种或多种分散剂、助溶剂或助悬剂的含水或非水基质配制滴剂,诸如滴眼剂或滴鼻剂。通过简单的滴眼器加盖的瓶或通过适于经专门成形的闭合物逐滴递送液体内含物的塑料瓶来递送滴剂。

[0105] 适于胃肠道外给药的药物组合物包含一种或多种用于本发明的化合物以及一种或多种药学上可接受的无菌等渗含水或非水溶液、分散液、混悬液或乳液、或可以在使用前重构成无菌注射溶液或分散液的无菌粉末,其可以包含抗氧化剂、缓冲剂、使制剂与指定接受者血液等渗的溶质或助悬剂或增稠剂。

[0106] 可以用于本发明药物组合物的合适的含水和非水载体实例包括水、乙醇、多元醇类（诸如甘油、丙二醇、聚乙二醇等）、及其合适的混合物、植物油诸如橄榄油、和可注射有机酯类，诸如油酸乙酯。例如，可以通过使用包衣材料，诸如卵磷脂，就分散液而言通过维持所需颗粒大小，以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。

[0107] 这些组合物还可以包含辅料，诸如润湿剂、乳化剂和分散剂。组合物中还可以期望包括等渗剂，诸如糖类、氯化钠等。此外，还可以通过包含延长吸收的试剂，诸如单硬脂酸铝和明胶来延长可注射药物剂型的吸收。

[0108] 在某些情况中，为了延长活性成分的作用，需要减缓活性成分从皮下或肌肉注射中吸收。可以通过使用具有较低水溶性的结晶或无定形物质的液体分散体达到这一目的。随后，活性成分的吸收速率依赖于其溶出率，由此其可以取决于结晶大小和晶形。或者，通过将活性成分溶于或悬浮于油载体中延迟胃肠道外给予的活性成分吸收。

[0109] 通过形成活性成分在生物可降解聚合物诸如聚丙交酯-聚乙交酯中的微囊基质来制备可注射的贮库剂型。根据活性成分与聚合物之比和所用特定聚合物自身，活性成分释放速率可以得到控制。其它生物可降解聚合物的实例包括聚（原酸酯）和聚（酐）。还可以通过将活性成分俘获在与身体组织相容的脂质体或微乳中制备可注射的贮库制剂。例如，可以通过经截留细菌的滤器过滤对可注射物质灭菌。

[0110] 可以将所述制剂在单位剂量或多剂量的密封容器例如安瓿和小管中提供，并且可以储存在仅需要在使用前即刻添加无菌液体载体例如注射用水的冻干条件下。可以由上述类型的无菌粉末、颗粒和片剂制备临时注射用溶液和混悬液。

[0111] 通过检验以下其实施例，对本领域技术人员而言，本发明的另外目的、优点和新特征显而易见，这些实施例并非用来起限定作用。

[0112] 实施例

[0113] 实施例 1：

[0114] 将全血从具有已知过敏反应的人志愿者 GR283 中抽入不含抗凝血剂的负压玻璃管 (glass vacutainer tube)。使血液凝结并且通过离心取血清且然后通过将其置于 56°C 水浴中 30 分钟加热灭活。另外将来自 GR283 的全血抽入含肝素的负压玻璃管并且用于如下的外周血淋巴细胞 (PBL) 分离。全血铺在室温 Histopaque1077 溶液上层并且以 2000rpm 离心 15 分钟。然后取出血浆-Histopaque 界面上的细胞并且在 37°C 下用培养基（含 10% 热灭活 GR283 血清 +1% 青霉素 / 链霉素的 IMDM 培养基）洗涤。

[0115] 将在培养基中的式 II 化合物（参见上文）和哌甲酯（均获自 Dr. Jeffrey D. Winkler, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania）加入到 96-孔板的孔中，得到式 II 化合物和哌甲酯的终浓度为 5  $\mu$ g/ml、15  $\mu$ g/ml 和 50  $\mu$ g/ml。将无菌 18M $\Omega$  水、式 II 化合物的溶剂、和地塞米松（获自 Sigma）（终浓度为水中 10  $\mu$ g/ml）用作对照。然后将在培养基中的 GR283 的 PBL 加入到各孔中而得到 150,000 个细胞 / 孔的终浓度，并且将平板在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下孵育 24 小时。在孵育后，加入在培养基中的植物凝集素 (PHA) 而得到 2  $\mu$ g/ml、5  $\mu$ g/ml 或 20  $\mu$ g/ml 的终浓度，200  $\mu$ l / 孔的最终总体积，并且将细胞在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下再孵育 72 小时。所有培养均按一式三份进行。

[0116] 在该孵育结束时，通过用固定在倒置显微镜上的数字照相机拍摄代表性孔检验细胞团簇。式 II 化合物以剂量依赖性方式减少 5  $\mu$ g/ml PHA 诱导的细胞团簇的量。式 II 化

合物减弱了细胞团簇,推定其为细胞表面上细胞粘附分子表达降低的结果。

[0117] 通过将 20  $\mu$  l Promega 细胞滴定溶液加入到各孔中并且将平板再孵育 4 小时检测细胞增殖。Promega 细胞滴定溶液为包含四氮唑染料的溶液,所述染料由活细胞还原成甲贍 (formazan) 染料,并且这种还原与存在于孔中的活细胞的数量成正比。在 4- 小时孵育后,测定各孔在 530nm 处的光密度 (OD)。从实验孔的 OD 中扣除不含细胞的 530nm 处空白孔的 OD。增殖测定结果如附图 1A-C 中所示。正如从附图 1A-C 中可以观察到的,式 II 化合物 (Cpd. II) 和地塞米松 (Dex) 以剂量依赖性方式显著抑制用 PHA 刺激的 PBL 增殖。哌甲酯 (MP) 在其最高剂量和最低 PHA 剂量表现出显著性作用。然而哌甲酯没有显著减少 PHA- 刺激的 PBL 增殖。

[0118] 实施例 2:

[0119] 从具有已知过敏反应的人志愿者 GR467 中抽取全血并且如实施例 1 中所述处理而得到热灭活的血清和 PBL。将在培养基 (使用热灭活的 GR467 血清制备) 中的式 II 化合物和哌甲酯加入到 96- 孔平板各孔中,得到终浓度 5  $\mu$  g/ml、15  $\mu$  g/ml 和 25  $\mu$  g/ml 的式 II 化合物和 15  $\mu$  g/ml 的哌甲酯。将水和地塞米松 (终浓度为 10  $\mu$  M) 用作对照。然后将培养基中的 GR467 的 PBL 加入到各孔中,得到 150,000 个细胞 / 孔的终浓度并且将平板在 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 下孵育 24 小时。在该孵育后,加入 PHA 而得到 2  $\mu$  g/ml 的终浓度,200  $\mu$  l/ 孔的最终总体积,并且将细胞在 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 下再孵育 72 小时。所有培养均按照一式三份进行。

[0120] 在该孵育结束时,如实施例 1 中所述测定细胞增殖。结果如附图 2 中所示。正如从附图 2 中观察到的,式 II 化合物 (Cpd II) 和地塞米松 (Dex) 显著抑制不使用和使用 PHA 刺激的 PBL 增殖,而哌甲酯则不。

[0121] 还通过在 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 下在 1ml 试管中将 PBL 以 1.3x10<sup>6</sup> 个细胞 /ml 与 15  $\mu$  g/ml 式 II 化合物、15  $\mu$  g/ml 哌甲酯或 10  $\mu$  M 地塞米松一起培养 24 小时来测定 PBL 的细胞因子释放。在该孵育后,加入 PHA 而得到 2  $\mu$  g/ml 的终浓度,并且将细胞在 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 下再孵育 96 小时。所有培养均按照一式三份进行。然后通过以 1000rpm 离心 10 分钟除去细胞并且收集培养基。

[0122] IL-13 由活化的 T<sub>H</sub>2 细胞生成,并且 IL-13 的主要靶标为 B- 细胞和单核细胞。IL-13 刺激体液免疫应答,并且被认为与哮喘发病有关。IL-13 由淋巴瘤细胞系分泌并且可以为自分泌生长因子。IL-13 还在胰腺癌中表达。然而,还报导了 IL-13 可抑制其它类型的肿瘤生长,诸如神经胶质瘤和肾细胞癌。

[0123] IFN  $\gamma$  为由活化的 T- 细胞和其它细胞生成的促炎细胞因子。IFN  $\gamma$  可以活化嗜中性细胞、内皮细胞和巨噬细胞,并且导致 MHC 分子表达增加。IFN  $\gamma$  驱动细胞介导的免疫应答。IFN  $\gamma$  在已建立肿瘤的免疫介导排斥中起重要作用。IFN  $\gamma$  对某些肿瘤具有抗增殖作用,可以对另一些肿瘤具有细胞凋亡作用,可以诱导血管抑制性 (angiostatic) 趋化因子的生成并且增强肿瘤细胞的免疫原性。

[0124] 通过 ELISA 测定释放放入培养基的 IL-13 和干扰素  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ )。为了进行 ELISA,分别从 Pierce Biotechnology 和 Biosource 购得抗人 IL-13 和 IFN  $\gamma$  的配对的抗体。在室温下用 10  $\mu$  g/ml 抗 IL-13 抗体 (在磷酸盐缓冲液 (PBS) 中) 和 4  $\mu$  g/ml 抗 IFN  $\gamma$  抗体 (在 PBS 中) 将 ELISA 条孔板包被过夜。然后使用在 PBS 中的 4% BSA 溶液封闭板子 1 小时,随后添加 50  $\mu$  l 试验培养基 / 孔,按照一式两份进行。在室温下孵育平板 1 小时,然后用含 0.1%



Tween20的50mM Tris pH8.0洗涤。然后在封闭缓冲液中制备400ng/ml生物素标记的IL-13第二抗体和500ng/ml生物素标记的IFN $\gamma$ 第二抗体的溶液,并且每孔加入100 $\mu$ l。将平板孵育1小时并且再次洗涤。在封闭缓冲液中制备链亲合素HRP(PierceBiotechnology)偶联物的1:8000稀释液并且将100 $\mu$ l加入各孔中,继续孵育30分钟。进行最终的洗涤步骤,此后向每孔中加入100 $\mu$ l PierceBiotechnology TMB底物。显色30分钟并且通过添加100 $\mu$ l 0.18NH $_2$ SO $_4$ 终止。使用带450nm滤光片的微板读出器测定OD。

[0125] IL-13的结果如附图3中所示。正如可以观察到的,式II化合物(Cpd. II)和地塞米松(Dex)显著抑制了PHA诱导的IL-13释放。哌甲酯(MP)没有抑制IL-13的释放。实际上,哌甲酯增加了由PHA-刺激细胞的IL-13释放。

[0126] IFN $\gamma$ 的结果如附图4中所示。正如可以观察到的,式II化合物(Cpd. II)和地塞米松(Dex)显著抑制了未刺激细胞和用PHA刺激细胞中的IFN $\gamma$ 释放。哌甲酯(MP)对未刺激细胞释放IFN $\gamma$ 具有一定作用,但没有显著抑制从用PHA刺激细胞中释放IFN $\gamma$ 。实际上,哌甲酯增加了由PHA-刺激细胞的IFN $\gamma$ 释放。

### [0127] 实施例3:

[0128] 从正常人志愿者GR191中抽取全血并且如实施例1中所述处理而得到热灭活的血清和PBL。将在培养基(使用热灭活的GR191血清制备)中的式II化合物和哌甲酯加入96-孔平板各孔中,得到终浓度5 $\mu$ g/ml、15 $\mu$ g/ml、25 $\mu$ g/ml和50 $\mu$ g/ml的式II化合物和50 $\mu$ g/ml的哌甲酯。将水、小鼠神经生长因子(Upstate Biotechnology, Inc)(NGF)(终浓度为250ng/ml)和地塞米松(终浓度为10 $\mu$ M)用作对照。然后将在培养基中的GR191的PBL加入各孔中,得到150,000个细胞/孔的终浓度并且将平板在37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 下孵育24小时。在该孵育后,加入PHA而得到2 $\mu$ g/ml和5 $\mu$ g/ml的终浓度,200 $\mu$ l/孔的最终总体积,并且将细胞在37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 下再孵育72小时。所有培养均按照一式三份进行。

[0129] 在该孵育结束时,如实施例1中所述测定细胞增殖。结果如附图5A-B中所示。正如从附图5A-B中观察到的,式II化合物(Cpd. II)和地塞米松(Dex)显著抑制了不刺激和使用PHA刺激的PBL增殖,而哌甲酯(MP)则不。

[0130] 还通过在37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 下在1ml试管中将PBL以1 $\times$ 10 $^6$ 个细胞/ml与15 $\mu$ g/ml和50 $\mu$ g/ml式II化合物或10 $\mu$ M地塞米松一起培养24小时来测定PBL的细胞因子释放。在该孵育后,加入PHA而得到5 $\mu$ g/ml的终浓度并且将细胞在37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 下再孵育72小时。所有培养均按照一式三份进行。然后通过以1000rpm离心10分钟除去细胞。

[0131] 收集上清液并且通过ELISA测定上清液中IL-13和肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF $\alpha$ )的浓度。如实施例2中所述进行IL-13ELISA。结果如附图6中所示。正如可以从附图6中观察到的,式II化合物(Cpd. II)和地塞米松(Dex)显著抑制从PHA刺激的PBL中释放IL-13。

[0132] TNF $\alpha$ 为由活化的T-细胞和其它细胞生成的促炎细胞因子。TNF $\alpha$ 导致内皮细胞表达粘附分子并且可在募集免疫细胞至炎症部位中起作用。已经在多种实体和血液恶性肿瘤中检测到了TNF $\alpha$ 。许多不同的细胞内信号被TNF $\alpha$ 诱导,包括通过NF $\kappa$ B和AP-1的细胞存活和通过caspase活化的细胞死亡的信号。NF $\kappa$ B为细胞存活的关键调节因子和多种肿瘤类型中癌发生的促进因子。

[0133] 如实施例2中所述使用来自Pierce Endogen的配对抗体(2 $\mu$ g/ml包被抗体和250ng/ml第二抗体)进行TNF $\alpha$  ELISA。结果如附图7中所示。正如可以从附图7中观察

到的,式 II 化合物 (Cpd. II) 和地塞米松 (Dex) 显著抑制从 PHA 刺激的 PBL 中释放  $\text{TNF } \alpha$ 。

[0134] 进一步通过流式细胞术分析细胞。膜联蛋白用于确定死亡或垂死细胞的群体。抗-CD69 抗体用于确立细胞活化水平。还使用了 T- 细胞受体  $\alpha \beta$  (TCR) 的抗体。重组膜联蛋白 5 (PE 和 FITC 缀合物) 和抗体均购自 Caltag (Burlingham, CA) 并且按照制造商的建议使用。观察到如下结果。

[0135] 细胞死亡:

[0136] 使用  $50 \mu\text{g/ml}$  和  $15 \mu\text{g/ml}$  式 II 化合物使 TCR- 阳性细胞的膜联蛋白染色分别从 7.3% (背景) 增加至 45% 和 23%, 表明 T- 细胞群体中的细胞死亡显著增加。以  $5 \mu\text{g/ml}$  PHA 刺激使 TCR- 阳性细胞的膜联蛋白染色增加至 67%。这表明 PHA 也可以诱导 T- 细胞群中的细胞死亡。作为用 PHA+ $15 \mu\text{g/ml}$  式 II 化合物处理的结果, 细胞死亡稍微减少 (用 PHA 和 IMM0001 对膜联蛋白染色的 TCR- 阳性细胞的 62% 对比单独用 PHA 的 67%)。如膜联蛋白染色所见, PHA+ $50 \mu\text{g/ml}$  式 II 化合物导致 TCR- 阳性细胞亚群中 87% 的细胞死亡。这些结果表明式 II 化合物较高的  $50 \mu\text{g/ml}$  浓度导致明显的 T- 细胞死亡, 而较低的  $15 \mu\text{g/ml}$  浓度没有。地塞米松拯救了 PHA- 诱导的 TCR- 阳性细胞之膜联蛋白染色增加 (从 84% 降至 48%), 表明对照化合物正常起作用。

[0137] T- 细胞的活化:

[0138] 在任意对照组 (nil (无), 单独式 II 化合物和单独地塞米松) 中未检测到 CD69+TCR 染色 (活化的 T 细胞)。PHA 将 CD69+TCR 染色增加至 84%。仅 PHA 导致可通过 CD69 染色增加而检测到的 T- 细胞活化。使用  $50 \mu\text{g/ml}$  式 II 化合物使 PHA- 刺激细胞的 CD69+TCR 染色从 84% 降至 54%, 而使用  $15 \mu\text{g/ml}$  式 II 化合物降至 64%。在减少 PHA- 刺激细胞的 CD69+TCR 染色方面, 地塞米松的有效性低于式 II 化合物。因此, 式 II 化合物在减少 T- 活化方面比强抗炎性的地塞米松更为有效。

[0139] 实施例 4:

[0140] 从正常人志愿者 GR-192 中抽取全血并且如实施例 1 中所述处理而得到热灭活的血清和 PBL。然后在 1ml 试管中将 GR-192 的 PBL 以  $1.3 \times 10^6$  个细胞 /ml 与  $15 \mu\text{g/ml}$  式 II 化合物 (在用 10% 热灭活 GR-192 血清制备的培养基中) 或  $10 \mu\text{M}$  地塞米松一起在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  下一起培养 24 小时。在该孵育后, 加入 PHA 而得到  $2 \mu\text{g/ml}$  的终浓度并且将细胞在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  下再孵育 96 小时。所有培养均按照一式三份进行。然后通过以 1000rpm 离心 10 分钟除去细胞并且收集培养基。

[0141] 通过 ELISA 测定释放入培养基的 IL-8。IL-8 为促炎细胞因子和中性粒细胞的趋化剂和活化剂。还已经报导其为 T- 淋巴细胞和嗜酸性粒细胞的趋化剂和活化剂。IL-8 由免疫细胞 (包括淋巴细胞、中性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞)、成纤维细胞和上皮细胞产生。IL-8 具有强效的血管发生活性。

[0142] 为了进行 ELISA, 分别从 Pierce Biotechnology 和 Biosource 购得抗人 IL-8 的配对抗体。在室温下用  $2 \mu\text{g/ml}$  抗 IL-8 抗体 (在磷酸盐缓冲液 (PBS) 中) 将 ELISA 条孔板包被过夜。然后使用在 PBS 中的 4% BSA 溶液中封闭平板 1 小时, 随后添加  $50 \mu\text{l}$  试验培养基 / 孔, 按照一式两份进行。在室温下孵育板子 1 小时, 然后用含 0.1% Tween20 的 50mM Tris pH8.0 洗涤。然后在封闭缓冲液中制备 100ng/ml 生物素标记的抗 IL-8 第二抗体的溶液, 并且每孔加入  $100 \mu\text{l}$ 。将板子孵育 1 小时并且再次洗涤。在封闭缓冲液中制备链亲合素

HRP (Pierce Biotechnology) 缀合物的 1:8000 稀释液, 并且将 100  $\mu$  l 加入各孔中, 继续孵育 30 分钟。进行最终的洗涤步骤, 此后向每孔中加入 100  $\mu$  l Pierce Biotechnology TMB 底物。显色 30 分钟并且通过添加 100  $\mu$  l 10.18N  $H_2SO_4$  终止。使用带 450nm 滤光片的微板读出器测定 OD。

[0143] 结果如附图 8 中所示。正如可以观察到的, 式 II 化合物 (Cpd. II) 和地塞米松 (Dex) 显著抑制 PHA 诱导的 IL-8 释放。

[0144] 在先前刺激后 18-20 天时使用约  $4 \times 10^5$  个细胞刺激 CD4<sup>+</sup> 阳性人 T- 淋巴细胞细胞系 (TRiPS) 以传代, 所述细胞系分离自流感免疫的供体并且对血凝素肽 307-319 具有特异性。用冷的 Iscove 改良 Dulbecco 极限最低基本培养基 (IMDM, Sigma) + 10% 胎牛血清 (FBS; 美国典型培养物保藏中心 (ATCC)) 将细胞洗涤一次并且重新悬浮于含抗 -CD3 单克隆抗体 OKT3 (由小鼠腹水制备) 1:500 稀释液的 1.0ml 冷 IMDM 培养基中。将细胞与抗体一起在冰上孵育 30 分钟, 然后用不含 FBS 的冷培养基洗涤并且与作为饲养细胞的约  $2 \times 10^6$  CD4<sup>+</sup> 照射的正常人供体外周血白细胞 (PBL) 在培养基 + 50U/ml 人 IL-2 (Xenometrix) 中合并。通过第 3 天时添加含 FBS + IL-2 的新鲜 IMDM 培养基扩增培养物。从使用 OKT3 刺激之日开始测量培养天数。从第 7 天 (最大增殖) 开始将细胞用于试验, 一般在第 14 天 (对再刺激最敏感) 并且直到第 21 天 (静息细胞接近衰老)。

[0145] 通过取小份细胞并且用温 (37 $^{\circ}$ C) IMDM 洗涤两次进行活化实验。就每一具体的试验而言, 在含 15  $\mu$  g/ml 式 II 化合物或 10  $\mu$  M 地塞米松的总体积为 0.9ml 的温 IMDM 培养基中将  $2 \times 10^5$  个活细胞在 37 $^{\circ}$ C 预孵育 15 分钟。然后加入在 0.1ml 温 IMDM 中的  $2 \times 10^6$  CD3/CD28 Dynabeads (Dyna1) 的小份作为活化刺激物, 并且将培养物在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 24 小时。在通过离心沉淀细胞后收集细胞培养物上清液。

[0146] 如上所述通过特异性 IL-8 ELISA 检测细胞因子含量。发现式 II 化合物对 TriPS 细胞系的 IL-8 生成无作用。

[0147] 实施例 5:

[0148] THP-1 为获自美国典型培养物保藏中心 (ATCC) (目录号 TIB-202) 的单核细胞细胞系。将 THP-1 细胞以 250,000 个细胞 /ml 的浓度置于培养基 (含 10% FCS 和 8ng/ml 单硫代甘油的 RPMI (获自 Sigma)) 中并且与 15  $\mu$  g/ml 式 II 化合物或 10  $\mu$  M 地塞米松一起在 37 $^{\circ}$ C 和 5%  $CO_2$  下孵育 1 小时。1 小时后, 将脂多糖 (LPS) (获自 Sigma) 加入到培养物中而得到 200ng/ml 的终浓度, 然后将细胞再孵育 4 小时或再孵育 24 小时。在孵育后, 离心细胞并且收集上清液。通过 ELISA 测定上清液中 IL-8 和 TNF  $\alpha$  浓度。

[0149] 通过如实施例 4 中所述进行的 ELISA 测定上清液中 IL-8 的浓度。结果如下表 1 中所示。正如可以从表 1 中看出的, 式 II 化合物 (Cpd. II) 和地塞米松 (Dex) 显著抑制了 IL-8 从 LPS- 刺激单核细胞中的释放。

[0150] 如实施例 2 中所述进行 TNF  $\alpha$  ELISA。结果如下表 2 中所示。正如可以从表 2 中看出的, 式 II 化合物 (Cpd. II) 和地塞米松 (Dex) 显著抑制了 TNF  $\alpha$  从 LPS- 刺激单核细胞中的释放。

[0151] 表 1

[0152]

样品	孵育时间	平均 IL-8 浓度 (pg/ml)	%抑制
对照 (无添加剂)	4 小时	75.96 ± 12.73	N/A
LPS	4 小时	2844.60 ± 180.55	N/A
LPS+CpdII	4 小时	2185.00 ± 78.30	23%
LPS+Dex	4 小时	2102.18 ± 52.20	26%
对照 (无添加剂)	24 小时	46.09 ± 22.42	N/A
LPS	24 小时	6653.20 ± 193.18	N/A
LPS+CpdII	24 小时	4490.20 ± 264.46	33%
LPS+Dex	24 小时	2300.00 ± 283.41	66%

[0153] 表 2

[0154]

样品	孵育时间	平均 TNF α 浓度 (pg/ml)	%抑制
对照 (无添加剂)	24 小时	1.415 ± 1.464	N/A
LPS	24 小时	138.655 ± 0.601	N/A
LPS+CpdII	24 小时	65.370 ± 0.891	53%
LPS+Dex	24 小时	94.759 ± 8.755	32%

[0155] 实施例 6:

[0156] Jurkat T-淋巴细胞白血病细胞系获自美国典型培养物保藏中心 (ATCC), Rockville, MD (目录号 TIB-152)。在含 10% FCS 的 IMDM 培养基 (ATCC) 中将 Jurkat 细胞以  $1 \times 10^5$  个细胞/ml 与  $7.5 \mu\text{g/ml}$  或  $15 \mu\text{g/ml}$  的式 II 化合物 (Cpd II) 一起在 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 下培养 72 小时。在孵育后,用 HEPES 缓冲盐水洗涤细胞,分成三等份的体积,然后与  $5 \mu\text{M}$  溴化乙锭二聚体-1 (ETH-D1) (获自 Molecular Probes) 和  $5 \mu\text{M}$  calcein AM 溶液 (获自 Promega) 一起在 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 下在 96-孔培养板中孵育 1 小时,以检测细胞存活率。使用读板仪在 485/530nm 和 530/645nm 激发/发射光下测定各孔中的荧光。通过用 ETH-D1 荧光除以 calcein AM 荧光计算死与活细胞的相对百分比。结果如下表 3 中所示。

[0157] 表 3

[0158]

样品	相对百分比死/活
对照 (无添加剂)	20.85% ± 1.42%
$7.5 \mu\text{g/ml}$ CpdII	16.74% ± 2.15%
$15 \mu\text{g/ml}$ CpdII	40.79% ± 1.81%

[0159] 实施例 7:

[0160] 将在 1ml 内皮细胞生长培养基-2 (EGM-2) (获自 Cambrex) 中的人来源批号 9713 (获自 ATCC) 的传代 4 次 (即 4 次细胞群体倍增) 人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 与在内皮细胞基础培养基-2 (EBM-2) (Cambrex) 中的  $30 \mu\text{g}$  式 II 化合物 (Cpd II) 或者在 EBM-2 中的  $30 \mu\text{g}$  哌甲酯 (MP) 混合。将水 (用于两种测试化合物的载体) 用作对照,并且包括  $50 \mu\text{M}$  PI3 激酶抑制剂 LY294002 (Sigma) 作为阳性对照。然后将细胞以 10,000 个细胞/孔接种入板子的孔中,所述板子包含在获自 BD Biosciences, Rockville, MD 的管形成检测试剂盒中。所述板的孔中包含细胞外基质蛋白凝胶。加入胎牛血清 (FCS) (ATCC) 至终浓度为 5% 以便启动管形成。然后将板在 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 下孵育 18 小时。在孵育后,用连接至倒置显微镜的数字照相机 (相差 (PC) 为 10 的 Olympus IMT-2 套装) 对板子拍照。

[0161] 当在血管发生信号存在下在细胞外基质蛋白凝胶中培养内皮细胞时,它们自身松散地排列成类似于毛细血管的结构。为了确立对于本试验的基础管形成,用存在于 Cpd II

和 MP 溶液中相同量的水处理细胞。该处理产生具有多分支点的格状内皮细胞结构。用 Cpd II 和 LY294002 处理减少了孔中分支和细胞相互作用的量,使细胞仍处于分离的簇中。没有观察到 MP 对内皮细胞组织成类似于毛细血管的结构的能力有影响。这些数据表明 Cpd II, 而非 MP 干扰这一血管发生步骤。

[0162] **实施例 8:**

[0163] 将在 EGM-2+50ng/ml 血管内皮生长因子 (VEGF) (获自 Sigma) 或在 EGM-2 完全培养基 (含 2% FCS、氢化可的松、人成纤维细胞生长因子 B、VEGF、重组胰岛素样生长因子 -1、抗坏血酸、人表皮生长因子、庆大霉素和肝素) (获自 Cambrex) 中的批号 9713 的传代 4 次的 HUVEC 以 5,000 个细胞 / 孔放入 96- 孔组织培养板的各孔中。向细胞中添加下列添加剂: 水 (载体对照); 5  $\mu$ g/ml 式 II 化合物 (Cpd II); 15  $\mu$ g/ml Cpd II; 或 30  $\mu$ g/ml Cpd II。在 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 下培养 48 小时后, 如实施例 1 中所述通过 Promega 细胞滴定试验评价细胞增殖, 但仅在添加 Promega 细胞滴定试剂后孵育板子 2 小时。

[0164] 结果如下表 4 中所示。正如可以从表 4 中看出的, Cpd II 以剂量依赖性方式减少孔中检测到的细胞数。用 15  $\mu$ g/ml Cpd II 和 30  $\mu$ g/ml Cpd II 观察到的减少具有统计学显著性。因为未包括不含生长因子的孔, 所以不可能确定使用 Cpd II 所观察到的细胞数减少是否由于增殖抑制或细胞毒性作用所致。

[0165] 表 4

[0166]

样品	培养基	530nm 平均 OD	p 值 (比载体对照)
对照 (无添加剂)	EGM-2+VEGF	0.141 $\pm$ 0.004	N/A
载体对照 (加水)	EGM-2+VEGF	0.224 $\pm$ 0.011	N/A
5 $\mu$ g/ml CpdII	EGM-2+VEGF	0.189 $\pm$ 0.014	0.0324
15 $\mu$ g/ml CpdII	EGM-2+VEGF	0.132 $\pm$ 0.022	0.0069
30 $\mu$ g/ml CpdII	EGM-2+VEGF	0.046 $\pm$ 0.012	0.0003
对照 (无添加剂)	EGM-2+ 生长因子	0.243 $\pm$ 0.002	N/A
载体对照 (加水)	EGM-2+ 生长因子	0.299 $\pm$ 0.011	N/A
5 $\mu$ g/ml CpdII	EGM-2+ 生长因子	0.271 $\pm$ 0.022	0.1131
15 $\mu$ g/ml CpdII	EGM-2+ 生长因子	0.239 $\pm$ 0.019	0.0283
30 $\mu$ g/ml CpdII	EGM-2+ 生长因子	0.066 $\pm$ 0.003	0.0001

[0167] **实施例 9:**

[0168] HepG2 为人肝癌细胞系, 其获自 ATCC。使 HepG2 细胞在 25cm<sup>2</sup> 瓶中含 10% FCS 的 IMDM 培养基中生长至汇合。然后如下用胰蛋白酶处理细胞。吸出各瓶中的培养基, 用 5ml 0.025% 胰蛋白酶 / EDTA (Cambrex) 替换。用显微镜监测细胞, 直到它们不再与培养瓶粘着。然后向各瓶中加入 5ml 胰蛋白酶中和溶液 (TNS) (Cambrex) 以终止反应。以 1000rpm 将细胞悬液离心 10 分钟并且吸出上清液。用新鲜培养基重构细胞并计数。然后将含 1.22x10<sup>6</sup> 个细胞 / ml 的培养基中的 4ml 细胞悬液再与 1ml 培养基混合。接下来将 0.5ml / 孔的所得细胞悬液加入 24- 孔培养板的各孔中 (约 500,000 个细胞 / 孔)。如下表 5 中所示处理细胞并在 37°C 下有或无 5% CO<sub>2</sub> 下孵育 24 小时。从孔中取出上清液并且离心以除去碎片。接下来分析上清液中的红细胞生成素 (EPO) 产生。通过 ELISA, 使用获自 R&D Systems, Minneapolis, MN (目录号 DE900) 的试剂盒, 按照制造商说明测定 EPO。

[0169] 结果如下表 5 中所示。正如可以从表 5 中看出的, Cpd II 显著抑制 EPO 从 HepG2 细胞中的释放。EPO 的减少对血管发生具有抑制作用。未进行存活试验, 但基于显微镜分析显示细胞形态正常。

[0170] 表 5

[0171]

处理	平均单位 /mlEPO	p 值比单独缺氧
对照 (未处理)	74.90±2.65	N/A
缺氧 (5% CO <sub>2</sub> )	108.39±2.81	N/A
缺氧 +15 μg/mlCpdII	71.60±2.01	0.005
缺氧 +25 μ MLY294002	52.99±1.04	0.016

[0172] 实施例 10:

[0173] 将批号 9713 的第 4 代 HUVEC 以 20,000 个细胞 / 孔放入 48- 孔组织培养板各孔中补充 ITSS (胰岛素、转铁蛋白和亚硒酸钠) 的 500 μ l EGM-2 完全培养基 (但不含血清或抗坏血酸) (获自 Sigma) 中。此外, 将人来源的批号 7016 (获自 ATCC) 的第 4 代 HUVEC 以 20,000 个细胞 / 孔放入 48- 孔组织培养板各孔中补充 ITSS 的 500 μ l EGM-2 完全培养基 (但不含血清或抗坏血酸) 中。向细胞中添加下列添加剂: 水 (载体对照) 和 15 μg/ml 式 II 化合物 (Cpd II)。在 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 下孵育 1 小时后, 加入 LPS 至终浓度为 200ng/ml, 并在 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 下将细胞孵育过夜。在该孵育后, 收集上清液并且如实施例 4 中所述通过 ELISA 测定上清液中 IL-8 的量。

[0174] 结果如下表 6 中所示。正如可以从表 6 中看出的, Cpd II 完全消除 7016HUVEC 的 IL-8 释放并且将 9713HUVEC 中 IL-8 的释放减少了 90%。

[0175] 表 6

[0176]

细胞	处理	IL-8 (pg/ml)
7016HUVECs	对照 (仅 LPS)	53.3
7016HUVECs	LPS+15 μg/ml CpdII	低于检测限
9713HUVECs	对照 (仅 LPS)	485.0
9713HUVECs	LPS+15 μg/mlCpdII	49.8

[0177] 实施例 11:

[0178] 将人来源的批号 8710 (获自 ATCC) 的第 4 代 HUVEC 以 5,000 个细胞 / 孔放入 24- 孔组织培养板各孔中的 EGM-2 培养基中并在 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 下孵育 72 小时。然后替换为新鲜培养基, 向细胞中添加下列添加剂: 水 (载体对照); 1 μg/ml、5 μg/ml、10 μg/ml、15 μg/ml 或 30 μg/ml 式 II 化合物 (Cpd II); 15 μg/ml 哌甲酯 (MP); 10 μM LY294002; 或 10 μM 地塞米松 (Dex)。在 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 下孵育 1 小时后, 加入 TNF α (Pierce) 至终浓度为 10ng/ml 并且在 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 下将细胞再孵育 18 小时。在该孵育后, 收集上清液并且如实施例 4 中所述通过 ELISA 测定上清液中 IL-8 的量。

[0179] 结果如下表 7 中所示。正如可以从表 7 中看出的, Cpd II 以剂量依赖性方式减少了 TNF α 刺激的 IL-8 释放, 不过看上去确实在最高剂量 (30 μg/ml) 引起一些细胞死亡。Dex 和 MP 稍微减少了 IL-8 释放, 而 LY294002 显著减少了 IL-8 释放。

[0180] 表 7

[0181]

处理	平均 IL-8 (pg/ml)	p 值	%抑制
无添加剂	207.15±66.17		
30 μg/ml CpdII	0		
15 μg/ml CpdII	400.35		
10ng/ml TNF α	34695±301.9		
10ng/ml TNF α + 水	35572±967.74		
10ng/ml TNF α + 30 μg/ml CpdII	4829.8±214.13		86.93%
10ng/ml TNF α + 15 μg/ml CpdII	20817±674.63	0.002	41.72%
10ng/ml TNF α + 10 μg/ml CpdII	22050±727.27	0.003	38.24%
10ng/ml TNF α + 5 μg/ml CpdII	34482±2127.22	0.124	3.08%
10ng/ml TNF α + 1 μg/ml CpdII	53657±3935.18	0.011	(-51.1%)
10ng/ml TNF α + 15 μg/ml MP	30183±3448.01	0.051	15.24%
10ng/ml TNF α + 10 μg/ml LY294002	9196.1±150.97		74.58%
10ng/ml TNF α + 10 μg/ml MDex	35952±2197.14	0.072	6.88%

[0182] 实施例 12:

[0183] 转录因子 NF κ B (核因子 κ B) 涉及调节编码免疫、急性期和炎症应答介质的很多基因的表达。NF κ B 为细胞存活的关键调节因子和癌发生的促进因子。哺乳动物中 NF κ B 家族有 5 种亚基: p50、p65 (RelA)、c-Rel、p52 和 RelB。p50/p65 异二聚体和 p50 同二聚体为 NF κ B 信号传导途径中发现的最常见的二聚体。NF κ B 可以被许多刺激物活化, 包括细菌细胞壁成分比如脂多糖, 或炎症细胞因子, 比如 TNF α 或 IL-1 β。

[0184] 活化蛋白 -1 (AP-1) 为在细胞周期期间被活化而促进细胞存活、分化和适应反应的转录因子。AP-1 蛋白在涉及增殖和细胞周期进程的许多基因的表达中起作用。例如, 在生长因子信号转导途径中起作用的癌基因比如 ras、rasF 和 mek 将细胞转化导致 AP-1 成分蛋白表达的高度增加。因此, AP-1 调节基因支持在恶化和转移过程中观察到的侵入过程。AP-1 属于结构相关的转录因子的大家族, 包括 ATF1-4、c-Fos、c-Jun、c-Myc 和 C/EBP。AP-1 由来源于 Fos 和 Jun 家族的蛋白质的异二聚体复合物的混合物组成, 包括 c-Fos、FosB、Fra-1、Fra-2、c-Jun、JunB 和 JunD。AP-1 二聚体主要在 TPA- 应答元件 (TRE) 上结合至 DNA。AP-1 表达被多种刺激物诱导, 诸如血清、生长因子、佛波醇酯、癌基因、TGF-β、TNF 和干扰素家族的细胞因子、神经元去极化和细胞应激。

[0185] 使人来源的批号 8750 的第 5 代 HUVEC 在 25cm<sup>2</sup> 瓶中的 EGM-2 培养基中生长至汇合。将下列添加剂添加到瓶中含 2% FCS、GA1000 (庆大霉素)、肝素和抗坏血酸 (均来自 Cambrex) 的 EGM-2 培养基中 (总体积 5ml/瓶): 1 μg/ml 的式 II 化合物 (Cpd II); 5 μg/ml Cpd II; 15 μg/ml 的 Cpd II; 15 μg/ml 哌甲酯 (MP); 或 10 μM LY294002。将瓶在 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 下孵育过夜。在该孵育后, 加入 VEGF 至终浓度为 10ng/ml 并且将培养瓶再孵育 30 分钟。

[0186] 然后使用来自 Active Motif North America, Carlsbad, CA 的 TransAM™ NF κ B p65/NF κ B p50 转录因子测定试剂盒和核提取试剂盒, 按照制造商的说明测定 NF κ B 的量。简言之, 使用核提取试剂盒制备细胞的核提取物。然后将核提取物加入到 TransAM™ 试剂盒的 96-孔板的孔中。在孔中固定含 NF κ B 共有结合位点的寡核苷酸并且使含核提取物所含的活化 NF κ B 结合至寡核苷酸。然后加入抗 NF κ B p65 或 p50 亚基的抗体, 并检测与寡核苷酸结合的 NF κ B 复合物。接下来加入与辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合的第二抗体, 以提供可通过分光光度法定量的比色读数 (在 450nm 处测量)。

[0187] 使用来自 Active Motif North America, Carlsbad, CA 的 TransAM™ AP-1 家族转录因子测定试剂盒和核提取试剂盒,按照制造商的说明测定 c-Jun 的量。简言之,使用核提取试剂盒制备细胞的核提取物。然后将核提取物加入到其中固定了含 TPA- 应答元件 (TRE) 的寡核苷酸的 96- 孔板的孔中。使核提取物中所含的活化蛋白 -1 (AP-1) 二聚体结合至该寡核苷酸并且使用 c-Jun 特异性抗体检测。接下来加入与辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合的第二抗体以提供可通过分光光度法定量的比色读数 (在 450nm 处测量)。

[0188] 结果如下表 8 和 9 中所示。正如可以从表 8 中看出的,VEGF 处理 HUVEC 几乎导致如通过 TransAM 测定所检测的活化 NF κ B 的倍增。15 μ g/ml 和 5 μ g/ml 的 Cpd II 将活化 NF κ B 的量减少回基础水平。正如可以从表 9 中看出的,VEGF 处理 HUVEC 导致 c-Jun 增加。15 μ g/ml 和 5 μ g/ml 的 Cpd II 完全消除了 c-Jun 量的增加。

[0189] 表 8

[0190]

样品	平均 OD450nm (NF κ B)
对照 (无添加剂)	0.070 ± 0.002
仅 VEGF	0.111 ± 0.007
VEGF+15 μ g/ml CpdII	0.060 ± 0.008
VEGF+5 μ g/ml CpdII	0.065 ± 0.010
VEGF+1 μ g/ml CpdII	0.097 ± 0.013
VEGF+15 μ g/ml MP	0.093 ± 0.011
VEGF+10 μ MLY294002	0.138 ± 0.008

[0191] 表 9

[0192]

样品	平均 OD450nm (c-Jun)
对照 (无添加剂)	0.204 ± 0.016
仅 VEGF	0.261 ± 0.013
VEGF+15 μ g/ml CpdII	0.204 ± 0.010
VEGF+5 μ g/ml CpdII	0.185 ± 0.025
VEGF+1 μ g/ml CpdII	0.221 ± 0.008
VEGF+15 μ g/ml MP	0.230 ± 0.016
VEGF+10 μ MLY294002	0.340 ± 0.020

[0193] 实施例 13:

[0194] 使第 8 代 (人髂动脉内皮细胞 (HIAEC) (获自 ATCC ; 目录号 CC-2545) 在 25cm<sup>2</sup> 瓶中的 EGM-2 培养基中生长至汇合。试验前 18 小时,用含 0.1% FCS+ 肝素、GA1000 (庆大霉素) 和牛垂体提取物 (均来自 Cambrex) 的 EGM-2 培养基更换培养基,以使细胞处于静息状态。为了进行所述试验,从瓶中吸出培养基,并向瓶中的新鲜培养基中加入下列添加剂 (总体积 5ml/ 烧瓶):15 μ g/ml 的式 II 化合物 (Cpd II) 或 10 μ M LY294002。将培养瓶在 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 下孵育 2 小时。在该孵育后,加入 VEGF 或 TNF α 至终浓度为 10ng/ml,并将培养瓶再孵育 30 分钟。然后如实施例 12 中所述使用来自 Active Motif North America, Carlsbad, CA 的 TransAM™ NF κ B p65/NF κ B p50 转录因子测定试剂盒和核提取试剂盒测定 NF κ B 的量。

[0195] 结果如下表 10 中所示。正如可以从表 10 中看出的,TNF α 处理 HUVEC 导致经



TransAM 测定检测的活化 NF  $\kappa$  B 量的极大增加。15  $\mu$  g/ml 的 Cpd II 将活化 NF  $\kappa$  B 的量减少约 82%。用 VEGF 处理 HUVEC 不导致与使用 TNF  $\alpha$  所实现的活化 NF  $\kappa$  B 的同样大的增加，而 Cpd. II 将增加量减少了 70%。

[0196] 表 10

[0197]

样品	平均 OD450nm (NF $\kappa$ B)	抑制百分率
对照 (无添加剂)	0.174 $\pm$ 0.004	
仅 TNF $\alpha$	0.881 $\pm$ 0.021	
TNF $\alpha$ +15 $\mu$ g/ml CpdII	0.302 $\pm$ 0.003	81.89%
TNF $\alpha$ +10 $\mu$ M LY294002	0.810 $\pm$ 0.007	10.04%
仅 VEGF	0.220 $\pm$ 0.007	
VEGF+15 $\mu$ g/ml CpdII	0.066 $\pm$ 0.005	70.00%

[0198] 实施例 14:

[0199] 在第 18 天时,将  $1 \times 10^6$  的 TriPS 细胞与不添加任何物质 (" Ni1 ")、与 1  $\mu$  l CD3/CD28 Dynabeads (Dyna1, Oslo, Norway) (" CD3/CD28 珠 ") /100,000 个细胞、或与 CD3/CD28 珠和 15  $\mu$  g/ml 的式 II 化合物 (Cpd II) 一起在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 30 分钟。在孵育后,在 Cell-Lytic 哺乳动物细胞提取试剂 (Sigma) 中裂解细胞。在离心沉淀细胞碎片后,获得上清液 (细胞提取物)。

[0200] 使用由 Hypromatrix Inc., Worcester, MA 制造的定制 AntibodyArray<sup>TM</sup>, 按照制造商说明分析细胞提取物 (上清液)。定制 AntibodyArray<sup>TM</sup> 为用抗下列蛋白质的抗体印迹的尼龙膜。简言之,在室温和缓慢振摇下将细胞提取物与一式两份的定制 AntibodyArray<sup>TM</sup> 一起孵育 2 小时,随后用 Tris 缓冲液 (150mM NaCl, 25mM Tris, 0.05% Tween-20, pH7.5) 洗涤 3 次。加入在 Tris 缓冲液中的对磷酸化 - 酪氨酸、磷酸化 - 丝氨酸和磷酸化 - 苏氨酸具有特异性的 HRP- 标记抗体并且将阵列孵育 2 小时。在用 Tris 缓冲液再洗涤三次后,加入过氧化物酶 - 反应性发光底物。通过对 X 光片曝光显现出阵列。通过扫描和计算机分析测定 X 光片光密度。将结果总结在下表 11 中。

[0201] 表 11

[0202]

蛋白质	在 CD3/CD28 刺激的 TRiPS 细胞中 Cpd II 对蛋白质的作用
RAP1	活化的
RAP2	活化的
JAK2	活化的
STAT4	活化的
STAT5b	活化的
PI3 激酶 P85	活化的
MEK1	水平降低至低于基础水平 (Ni1 对照)
JNK1	水平降回到基础水平 (Ni1 对照)
JNK2	水平降回到基础水平 (Ni1 对照)
JNK3	水平降回到基础水平 (Ni1 对照)
MEKK1	水平降回到基础水平 (Ni1 对照)
I $\kappa$ B- $\beta$	水平降回到基础水平 (Ni1 对照)

IκB- $\gamma$	水平降回到基础水平 (Ni1 对照)
IL-2	水平降回到基础水平 (Ni1 对照)
IL-4	水平降回到基础水平 (Ni1 对照)
IL-7 $\gamma$	水平降回到基础水平 (Ni1 对照)
I4-3-3	水平稍微降低
STAT6	水平稍微降低
IκB- $\epsilon$	水平稍微降低
IκB- $\alpha$	水平稍微降低
VAV	无作用
STAT2	无作用

## [0203] 实施例 15:

[0204] 将 MC/9 鼠成纤维细胞细胞系的细胞 (获自 ATCC, 目录号 CRL-8305) 以 25,000 个细胞 / 孔放入 96-孔组织培养板的孔中。培养基为含 10% FCS 的 Delbecco 改良 Eagle 培养基 (DMEM) (获自 Cambrex)。Ni1 对照孔不含添加剂。其余孔含 25ng/ml 鼠神经生长因子 (NGF) (获自 Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) 或 25ng/ml NGF 和 5% TSTIM (获自 BD Biosciences 的由大鼠制备并且含伴刀豆球蛋白 A 的培养物补充剂)。此外,向细胞中加入下列添加剂:水 (载体对照); 5  $\mu$ g/ml 的式 II 化合物 (Cpd II); 15  $\mu$ g/ml Cpd II; 或 30  $\mu$ g/ml 的 Cpd II。在 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 下将培养物孵育 72 小时后,如实施例 1 中所述通过 Promega 细胞滴定试验评价细胞增殖。结果如下表 12 中所示。

## [0205] 表 12

## [0206]

添加剂	平均 OD530nm
无添加剂	0.058 $\pm$ 0.008
NGF	0.116 $\pm$ 0.029
NGF+ 水	0.101 $\pm$ 0.022
NGF+1 $\mu$ g/ml CpdII	0.117 $\pm$ 0.015
NGF+5 $\mu$ g/ml CpdII	0.108 $\pm$ 0.012
NGF+15 $\mu$ g/ml CpdII	0.049 $\pm$ 0.016
NGF+TSTIM	0.490 $\pm$ 0.047
NGF+TSTIM+ 水	0.365 $\pm$ 0.026
NGF+TSTIM+1 $\mu$ g/ml CpdII	0.428 $\pm$ 0.027
NGF+TSTIM+5 $\mu$ g/ml CpdII	0.373 $\pm$ 0.016
NGF+TSTIM+15 $\mu$ g/ml CpdII	0.326 $\pm$ 0.024

## [0207] 实施例 16:

[0208] 将 THP-1 细胞以 250,000 个细胞 /ml 的浓度放入培养基 (含 10% FCS 和 8ng/ml 单硫代甘油的 RPMI) 中,并与 5  $\mu$ g/ml 式 II 化合物 (CpdII) 或 15  $\mu$ g/ml 的 Cpd II 一起在 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 下孵育 1 小时。1 小时后,向培养物中加入脂多糖 (LPS) 而得到 200ng/ml 的终浓度,然后将细胞再孵育 24 小时。孵育后,如实施例 12 中所述测定 NF $\kappa$ B 和 c-Jun 的量。此外,使用来自 Active Motif North America, Carlsbad, CA 的 Trans AM<sup>TM</sup> AP-1 家族转录因子测定试剂盒和核提取试剂盒,按照制造商说明测定 c-Fos 的量。简言之,使用核提取试剂盒制备细胞的核提取物。然后将核提取物加入到其中固定了含 TPA- 应答元件 (TRE) 的寡核苷酸的 96-孔板的孔中。使核提取物中所含活化蛋白 -1 (AP-1) 二聚体结合至该寡核

苷酸,并使用对 c-Fos 具有特异性的抗体检测。接下来加入与辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合的第二抗体以便提供可通过分光光度法定量的比色读数 (在 450nm 处测量)。结果如附图 9A-B 中所示。

[0209] 实施例 17:

[0210] 在第 10 天时,将  $1 \times 10^6$  的 TriPS 细胞与  $15 \mu\text{g/ml}$  的式 II 化合物 (Cpd II) 一起在  $37^\circ\text{C}$  下孵育 1 小时。然后将细胞与 CD3/CD28 珠 ( $1 \mu\text{l}/100,000$  个细胞) (获自 Dynal) 在  $37^\circ\text{C}$  下孵育 10 分钟。然后用温和缓冲液 (与下述 Pierce EZ-Detect 活化试剂盒一起提供) 裂解细胞以产生细胞提取物。通过二辛可宁酸 (bicinchoninic acid) (BCA) 分析 (Pierce) 测定所得提取物的蛋白质浓度并且置于冰上以便即刻使用。

[0211] 使用 Pierce EZ-Detection 活化试剂盒,按照制造商说明,对 Ras 和 RAP-1 分别用 GST-RAF-1-RBD 和 GST-RalGDS-RBD 进行 Pulldown 分析。简言之,将来自每种提取物的  $400 \mu\text{g}$  总蛋白质与重组蛋白和谷胱甘肽树脂合并并在  $4^\circ\text{C}$  和缓慢振摇下孵育 1 小时。然后洗涤树脂以便除去未结合的蛋白质,并且通过在含还原剂的 SDS-PAGE 上样染料存在下煮沸取出活化的 Ras 和 RAP-1。进行 Ras 和 RAP-1 Western 印迹以便使用试剂盒提供的抗体使蛋白质显现。通过扫描和计算机分析对 X 光片进行光密度测定。

[0212] 将结果总结在下表 13 中。正如可以从表 13 中看出的,将 TriPS 细胞与 Cpd II 一起孵育导致对 Ras 蛋白的极强的抑制。用 CD3/CD28 珠刺激细胞没有如预期增加 RAP-1 蛋白的量,但 Cpd II 也表现出抑制 RAP-1。

[0213] 表 13

[0214]

处理	RAS 分析的 积分光密度	RAP-1 分析的 积分光密度
未处理	66.83	259.27
仅 CD3/CD28 珠	245.91	213.66
CD3/CD28 珠 + $15 \mu\text{g/ml}$ CpdII	84.98	87.26

[0215] 已经为举例说明和描述目的提供了本发明的上述讨论。上述内容并非将本发明限于本文所披露的形式。在理解本文所公开内容后,尽管本发明的描述已经包括了对一种或多种实施方案以及某些变化形式和改进的描述,但是其它变化形式和改进也属于本发明的范围,例如可以在本领域技术人员的技能和知识范围内。本发明意图获得包括允许程度的替代性实施方案,包括所请求保护的替代、可互换和 / 或等同的结构、功能、范围或步骤,无论这类替代、可互换和 / 或等同的结构、功能、范围或步骤是否由本文披露,并且并不意图向公众贡献任何可获得专利权的主题。

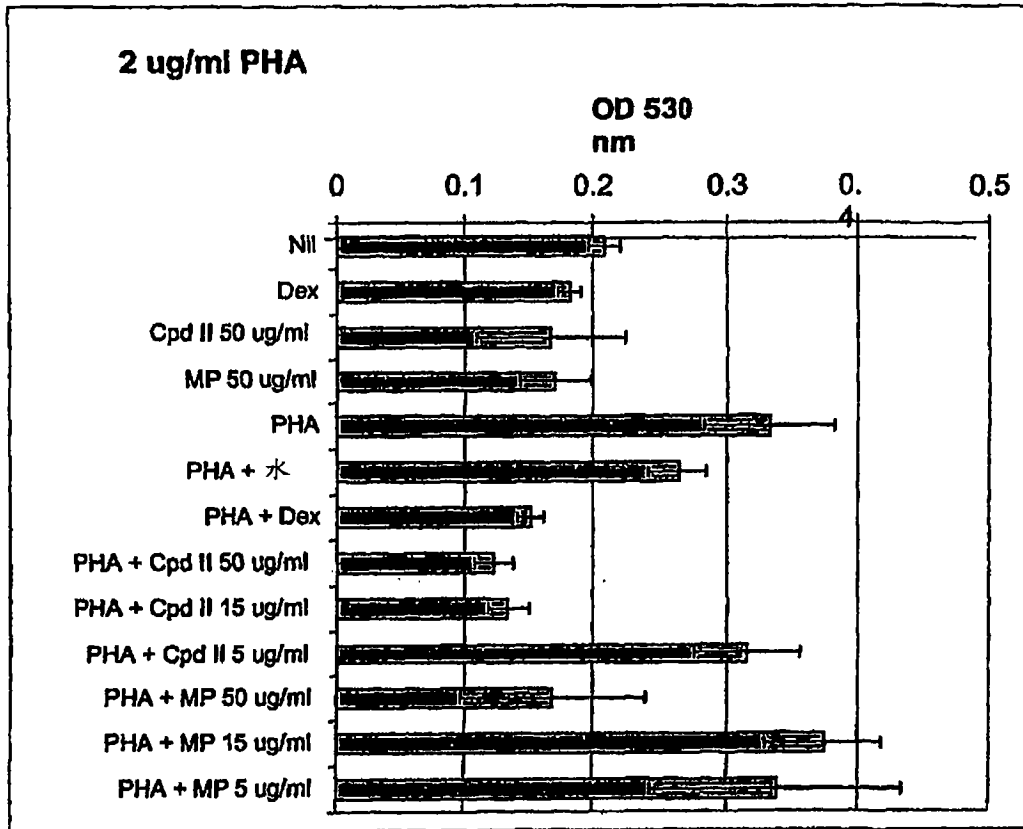


图 1A

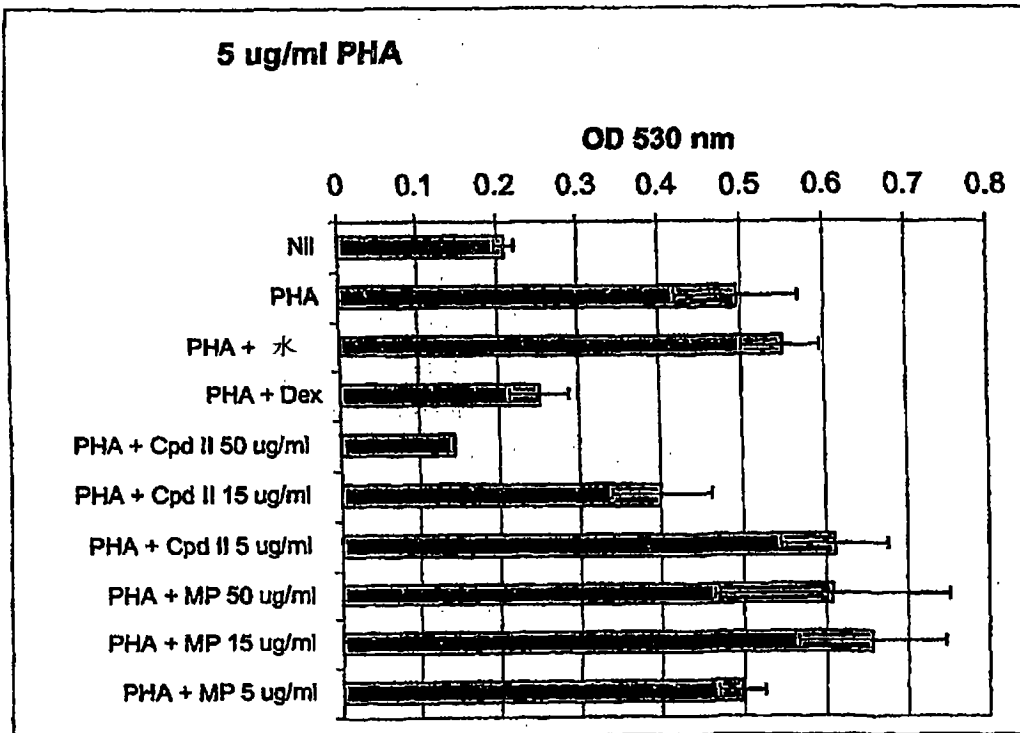


图 1B

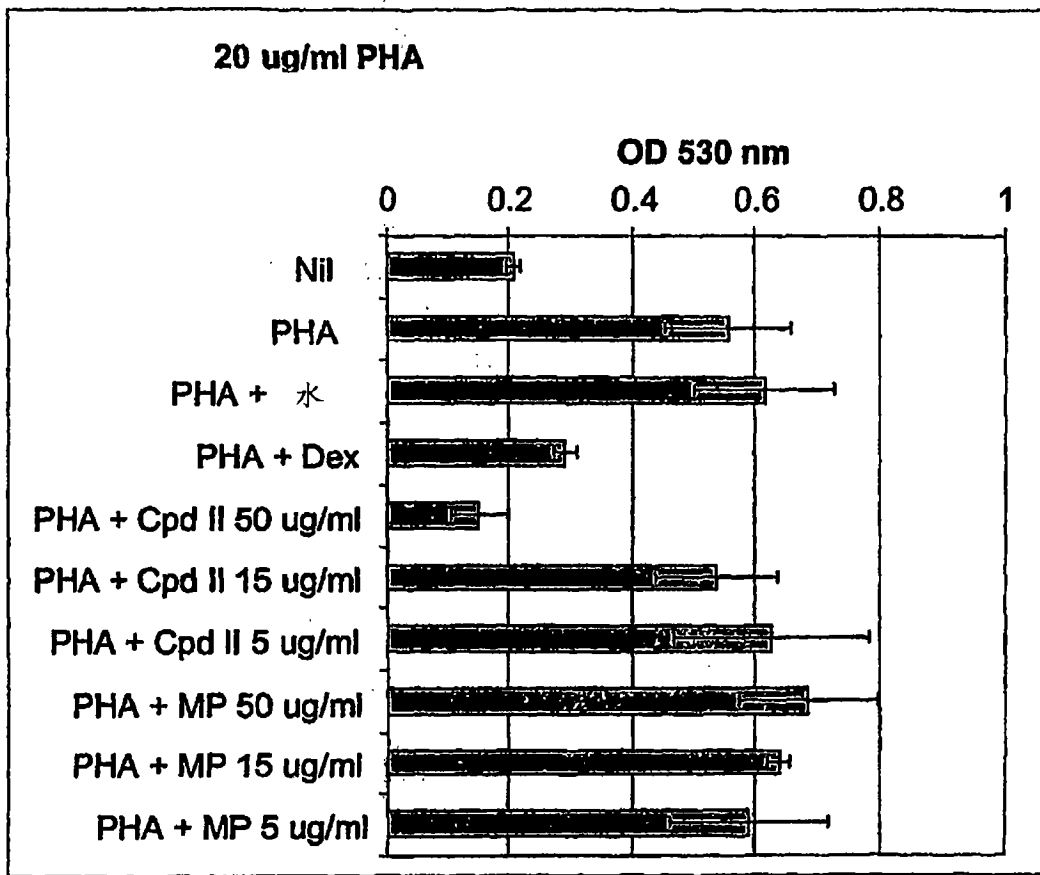


图 1C

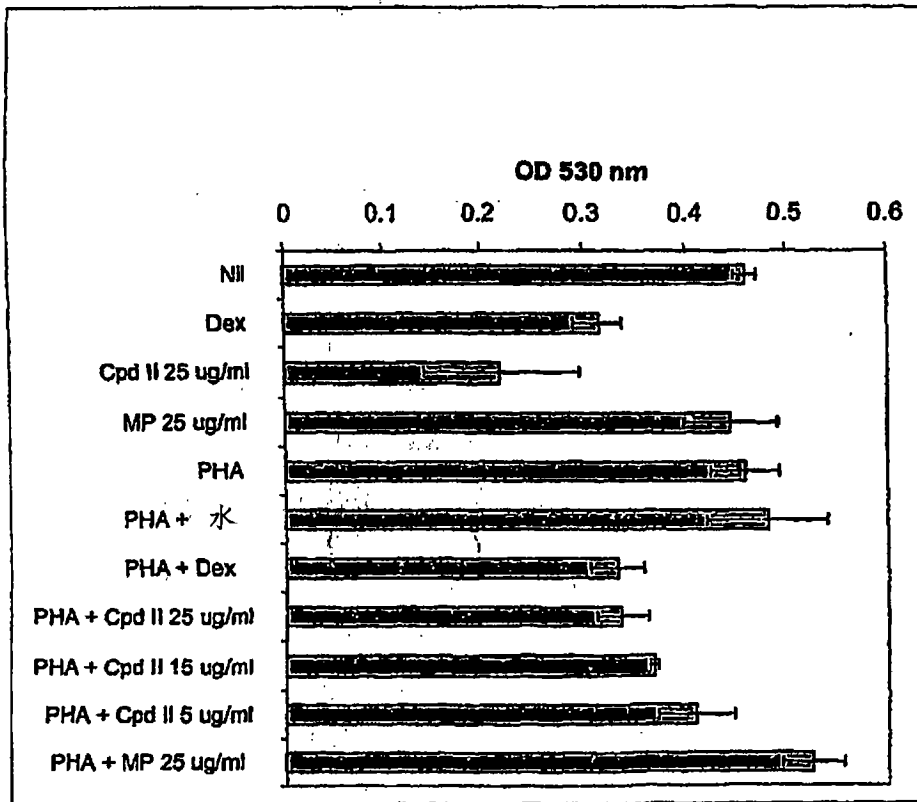


图 2

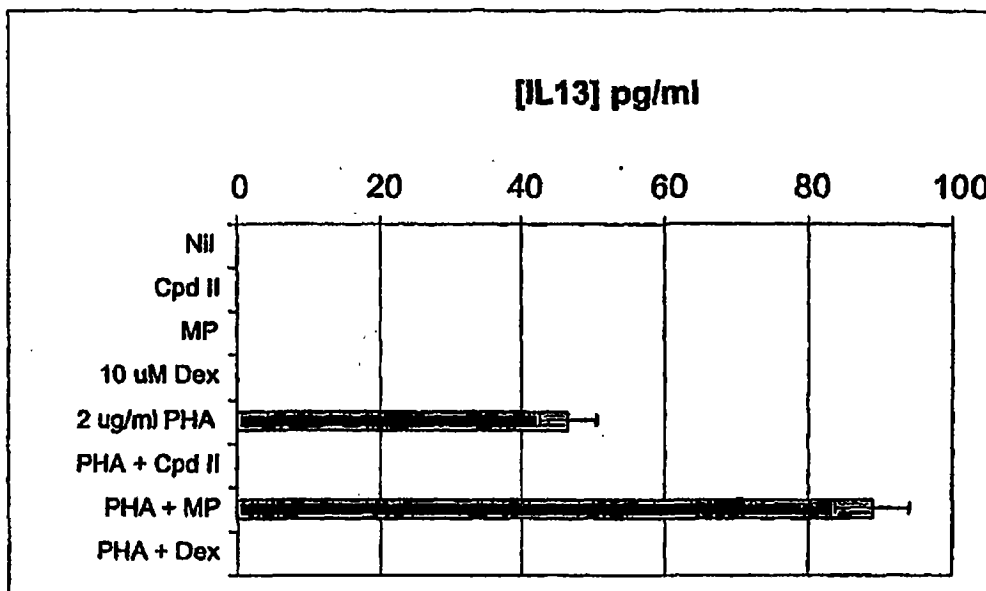


图 3

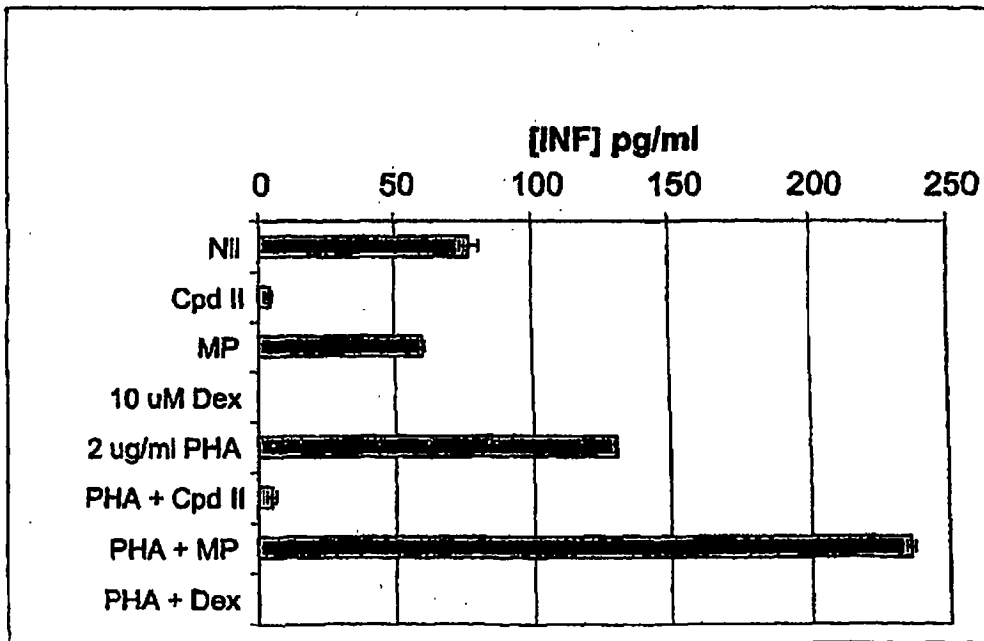


图 4

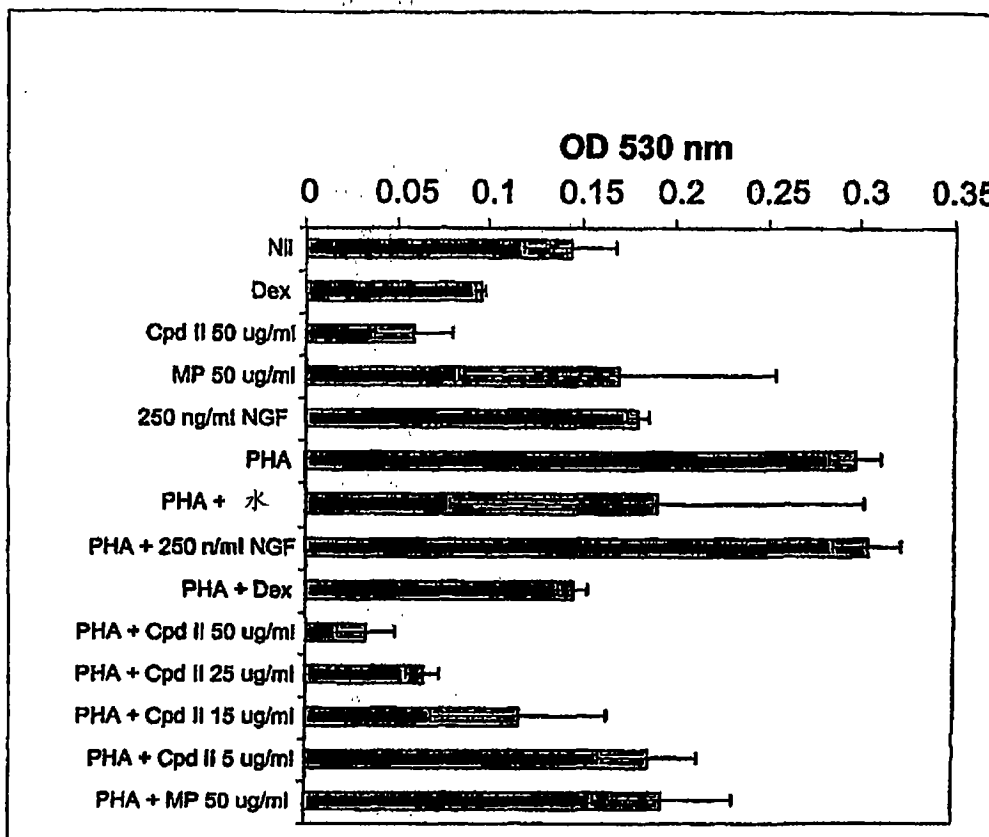


图 5A



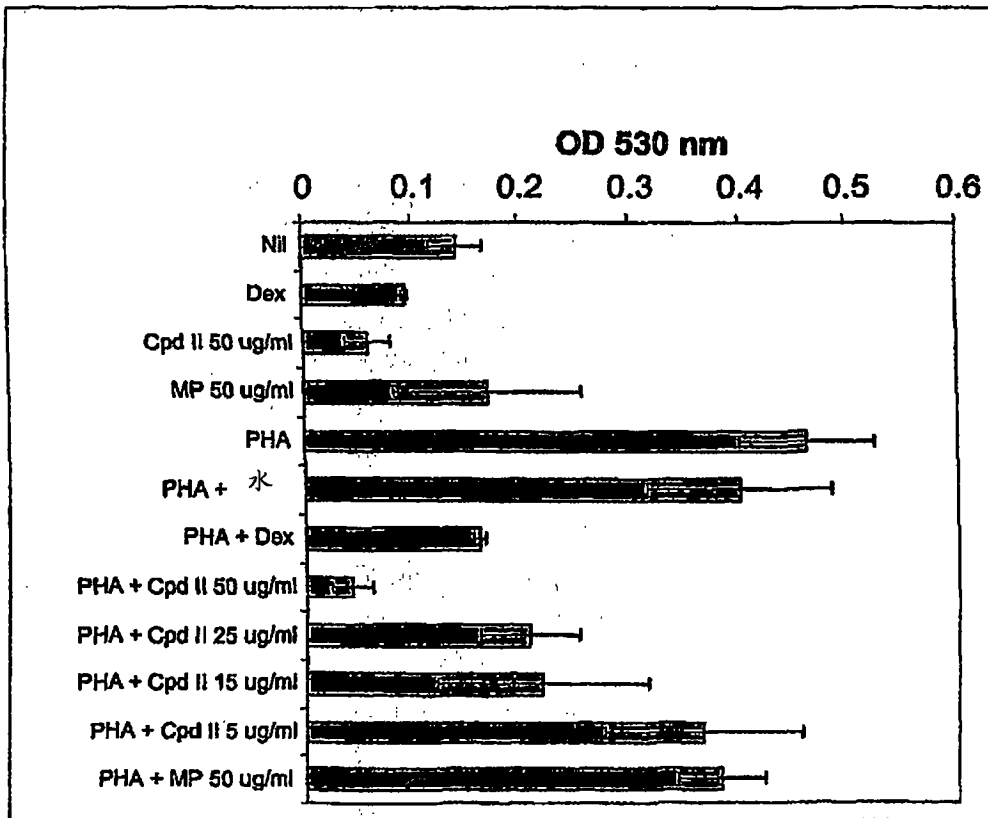


图 5B

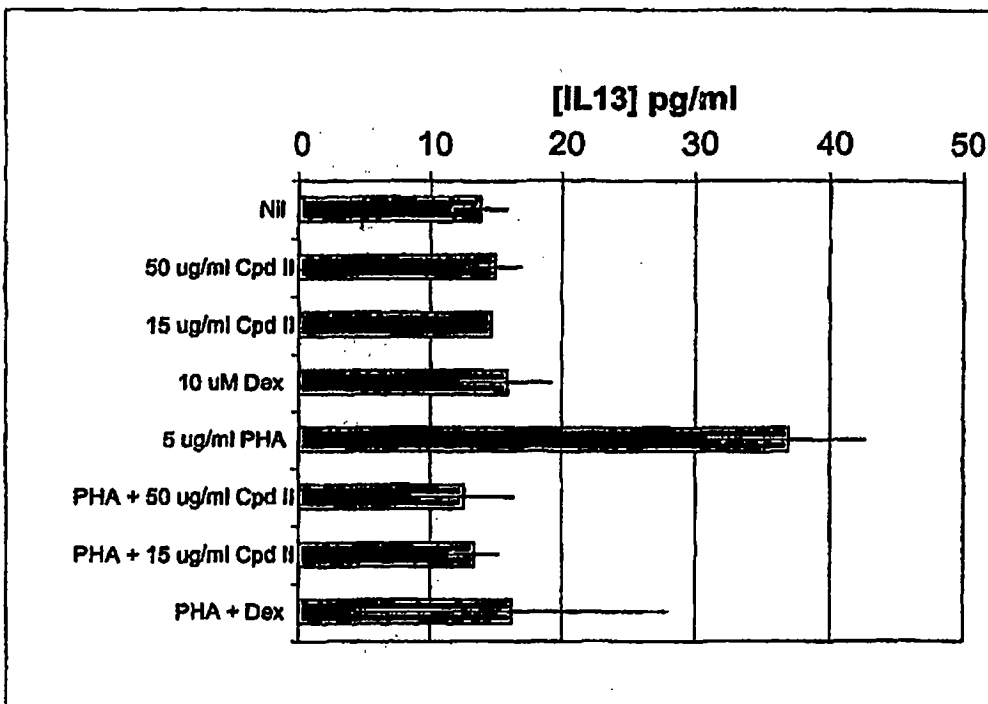


图 6

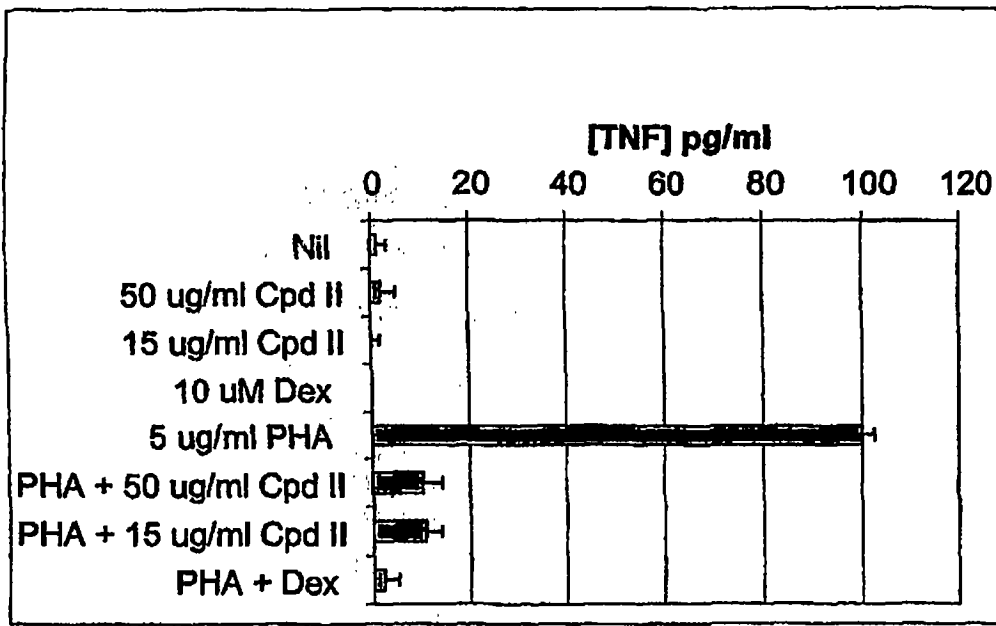


图 7

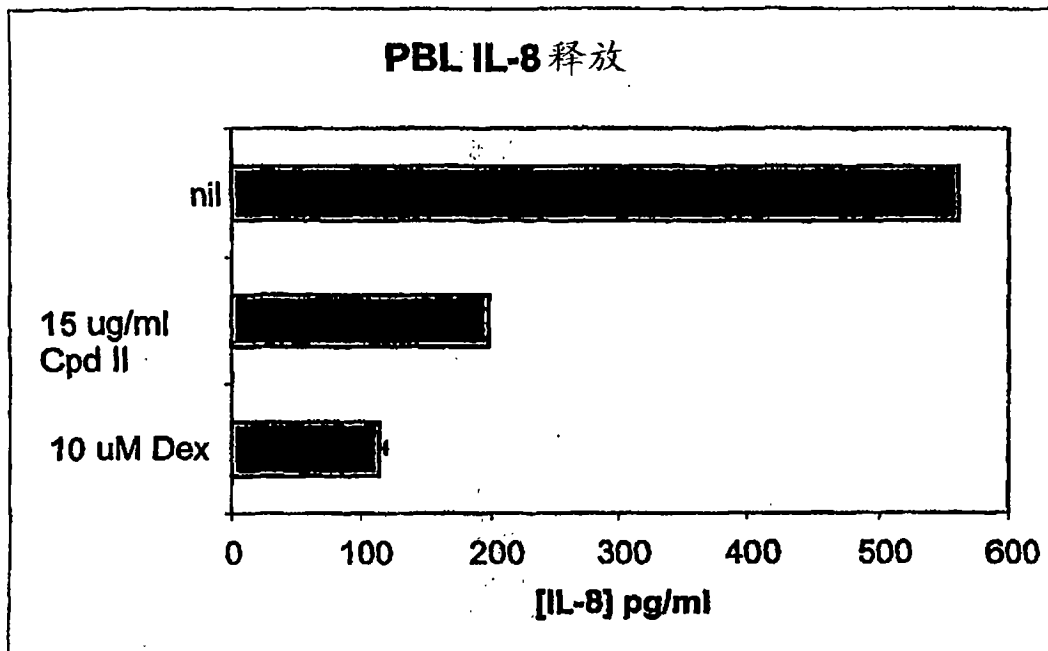


图 8

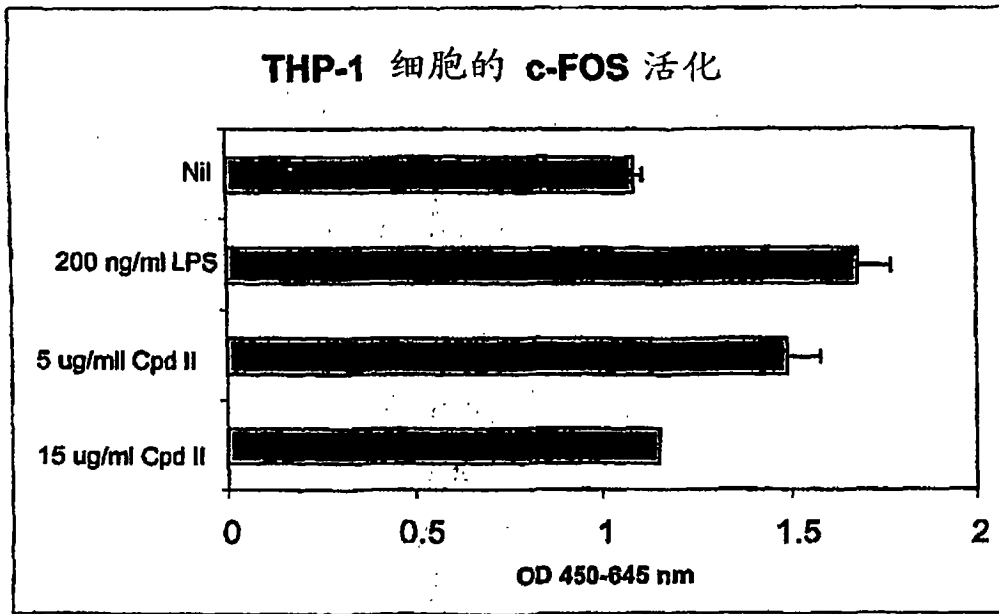


图 9A

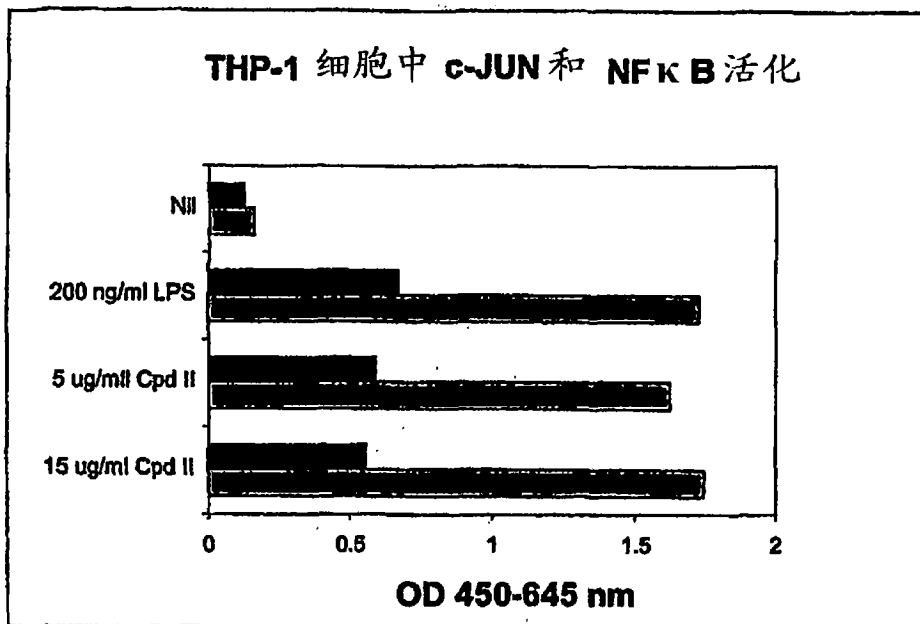


图 9B