

effective amount of a compound of the formula:

wherein A is H or  $-R_6$ , independently, is phenyl, thienyl, furyl, pyrrolyl, pyridinyl, or pyrimidinyl; each of  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ , and  $R_6$ , independently, is H, alkyl, aryl, heteroaryl, cyclyl, or heterocyclyl; and m is 0, 1, 2, 3, 4, 5, or 6, and n is 0, 1, 2, 3, 4, 5, or 6.

### 七、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：

(二) 本代表圖之元件代表符號簡單說明：

### 八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

### 九、發明說明：

[發明所屬之技術領域]

本發明是有關於抗血管新生的方法，更詳細地，係有關以稠合吡唑基化合物抑制由血管生成因子刺激的細胞增殖、細胞移行以及管狀結構形成。

[先前技術]

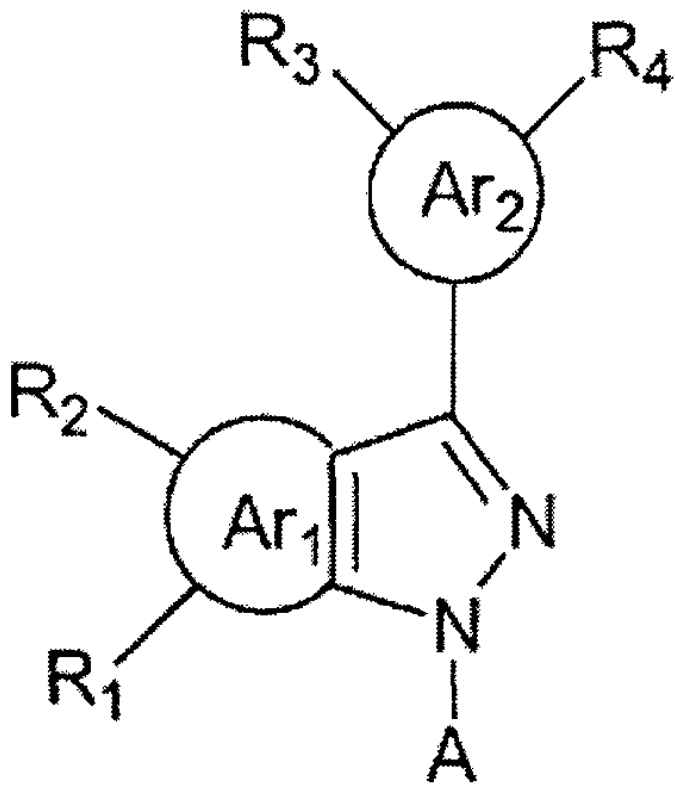
當組織中的細胞被剝奪氧氣時，它們會釋放血管生成因子，如血管內皮生長因子(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)及鹼性成纖維生成因子能吸引附近的內皮細胞，並刺激它們增殖、移行、並形成新的血管。這就是所謂的血管生成過程，其在健康的體內發生，以治癒傷口。控制血管生成的能力。

血管的過度生成可由某些病理狀況所觸發，如癌症、年齡相關性黃斑變性、類風濕性關節炎、以及牛皮癬。血管過度生成的結果是，新的血管細胞能夠脫離進入循環並留存於其他器官中。

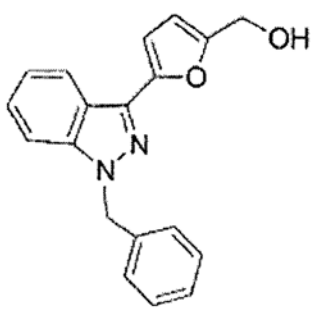
與血管過度生成相關的疾病包括癌症(實體瘤或血液瘤)、心血管疾病(如動脈粥樣硬化)、慢性炎症(如類風濕性關節炎或克隆氏腸炎)、糖尿病、以及癌症。參見例如Pharmacological Reviews 52:237-268, 2001。

[發明內容]

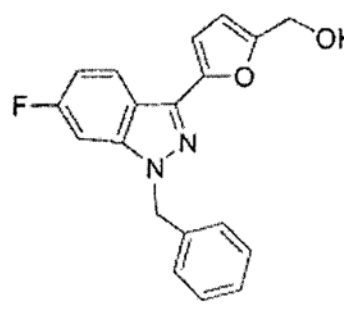
本發明基於出人意料的發現，即一組稠合的吡唑基化合物能有效地抑制由血管生成因子刺激的細胞增殖、細胞移行以及管狀結構形成(tube formation)。因此，本發明之一型態涉及一種抑制血管生成因子誘導的細胞增殖、血管生成因子誘導的細胞移行、或血管生成因子誘導的管狀結構形成的方法。



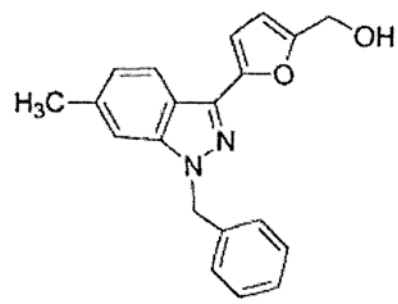
物：其中A是H或 $-C_nH_{2n}$ ，其中n是0、1、2或3；Ar<sub>1</sub>、Ar<sub>2</sub>及Ar<sub>3</sub>各自為芳基；並且R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>及R<sub>6</sub>各自獨立地為R、硝基、鹵素、C(O)OR、C(O)SR、C(O)NRR'、(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>OR、(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>SR、(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>RR'、(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>Cl和R<sub>4</sub>一同或R<sub>5</sub>和R<sub>6</sub>一同為O(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>O，其中R和R'各自獨立地為H、烷基、芳基、雜芳基、環基(cyclyl)或雜環基；並且m是0、1、2、3、4、5或部分時，該R或(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>部分可以相同或不同。上述血管生成因子可以是VEGF或bFGF。  
 參考上式，該化合物的子集特徵為Ar<sub>1</sub>是苯基或噻吩基、Ar<sub>2</sub>是5'-咪喃基、或者Ar<sub>3</sub>是苯基。而且，當Ar<sub>2</sub>是5'-咪喃基時，R<sub>3</sub>與R<sub>4</sub>之一可為基的2位進行取代。



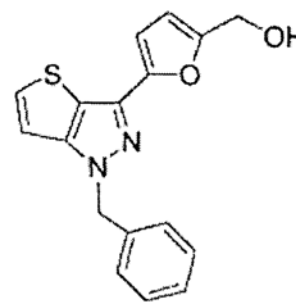
化合物 1



化合物 2

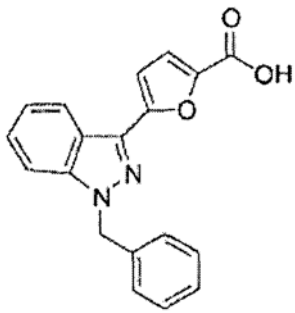


化合物 3

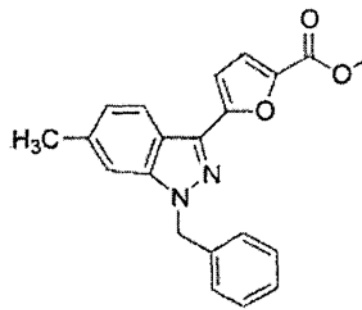


化合物 4

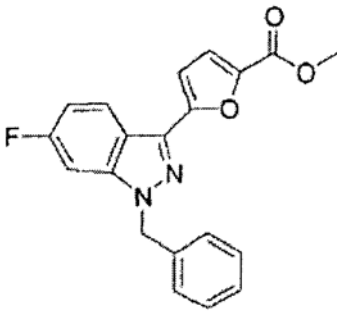
下列所示為用以實施上述方法之例示性化合物：



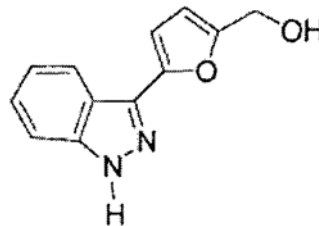
化合物 5



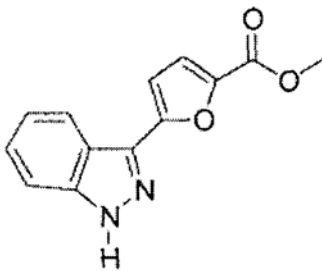
化合物 6



化合物 7



化合物 8



化合物 9

術語“烷基”是指含有1-10個碳原子的直鏈或支鏈的烴。烷基的實例包括，但不限於，甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、異丁基以及

術語“芳基”是指6-碳單環、10-碳二環、14-碳三環的芳環體系。芳基的實例包括，但不限於，苯基、萘基以及蒽基。

術語“雜芳基”是指芳香性的具有1-3個雜原子的5-8員單環，具有1-6個雜原子的8-12員二環，或具有1-9個雜原子的11-14員三環體系(具有1-3、1-6或1-9個N、O或S雜原子)。雜芳基的實例包括，但不限於，吡啶基、呋喃基(furyl或furanyl)、咪唑基、苯並咪唑基、噻唑基等。

術語“環基”是指具有3至12個碳原子、優選為3至8個碳原子、更優選為3至6個碳原子的飽和或部分未飽和的環烴基。環基的實例包括但不限於環丙基及環辛基。

術語“雜環基”是指非芳香性的具有1-3個雜原子的5-8員單環、具有1-6個雜原子的8-12員二環，或具有1-9個雜原子的11-14員三環體系(具有1-3、1-6或1-9個N、O或S雜原子)。雜環基的實例包括哌嗪基、吡咯烷基、二氧雜環己基(dioxanyl)、嗎啉基、四氫呋喃等。

本文所提到的烷基、芳基、雜芳基、環基及雜環基同時包括被取代及未被取代的部分。取代基的實例包括，但不限於，鹵代、羥基、氨基、鎘基、烷基羰基、脲基、氨基甲酰基、羧基(carboxyl)、硫脲基、氰硫基、亞磺酰氨基、烷基、烯基、炔基、烷氧基、芳基、雜芳基、環基以及雜環基可進一步被取代。

上述的稠合吡唑基化合物可為化合物其自身，以及其可應用的鹽和前驅藥物(prodrug)。例如，該鹽可通過稠合吡唑基化合物上的荷負電的取代基，鈉離子、鉀離子、鎂離子、鈣離子以及銨陽離子如四甲基銨離子。同樣地，荷正電的取代基(如氨基)可與荷負電的抗衡離子成鹽。適宜的抗衡離子包括氯離子、磷酸根或乙酸根離子。前驅藥物的實例包括酯類和其他藥物學可接受的衍生物，其在向個體給藥時能夠提供上述稠合吡唑基化合物。本發明的其他特徵、目的及優點將經由實施例及申請專利範圍加以清楚地說明。

#### [實施方式]

本發明特徵在於一種用於抑制血管生成因子誘導的細胞增殖、血管生成因子誘導的細胞移行、或血管生成因子誘導的管狀結構形成的方法。該“有效量”被定義為在向有此需要的個體給藥時要為該個體帶來上述效果所需要的稠合吡唑基化合物的量。如本領域技術人員所知，該有效量可根據個體、疾病、治療的可能性而變化。

稠合吡唑基化合物可口服給藥、非胃腸道給藥、通過吸入噴霧給藥或植入型儲庫製劑(implanted reserivior)給藥以實現本發明的方法。此處給藥途徑包括皮下、動脈內、滑膜內、胸骨內、鞘內、病灶內及顱內注射或輸液技術。

口服給藥組合物可為任何口服可接受的劑型，包括，但不限於，片劑、膠囊、乳劑及水性懸浮液、分散劑及溶液。片劑通常使用的載體包括乳糖、澱粉、糖、糖醇、纖維素、硬脂酸鎂、硬脂酸、聚乙二醇、羧甲基澱粉、羧甲基纖維素、羧甲基澱粉、羧甲基纖維素、羧甲基澱粉、羧甲基纖維素、羧甲基澱粉、羧甲基纖維素。當口服給藥水性懸浮液或乳劑時，活性成分可混懸或溶解於與乳化劑或助懸劑。

無菌可注射組合物(如含水的或含油的混懸劑)可應用適宜的分散劑或潤濕劑(如吐溫80)及助懸劑，根據本領域技術人員所知的技術配製。無菌可注射溶液或混懸液，例如為在1,3-丁二醇中的溶液。能夠應用的可接受的載體及溶劑為甘露醇、水、林格氏溶液以及氯化鈉等滲溶液。

單酸甘油酯或甘油二酯)。如同天然的藥物學可接受的油類如橄欖油或蓖麻油，脂肪酸如油酸及其甘油酯衍生物，特別是其聚氧乙基化的形式劑或分散劑、或羧甲基纖維素或類似的分散劑。

吸入劑組合物可根據藥物製劑領域所熟知的技術製備，並可應用苯甲醇或其他適宜的防腐劑、用於提高生物利用度的吸收促進劑、碳氟化合物的溶液。

就可與組合物中的活性成分相容而言，藥物組合物中的載體必須是“可接受的”(並且優選地，可以穩定活性成分)，並且對被治療的患者無害的、更易溶的複合物)可應用為藥物賦形劑以傳遞稠合吡啶基化合物。其他載體的實例包括膠態二氧化矽、硬脂酸鎂、纖維素、十二烷基硫酸用以實現本發明方法的稠合吡啶基化合物可通過本領域技術人員所熟知的工藝製備(見如第5,574,168號美國專利)。它們包括下列合成途徑：先製備芳基芳基酮。每個芳基化合物可被單或多取代。然後該酮與其芳基也可被單或多取代的芳基烷基肼反應以形成含三個芳基的脞。該脞基4-C及5-C稠合，以及第三個芳基直接連接至吡啶基核的3-C處。稠合吡啶基化合物的衍生物可通過修飾任意芳環基上的取代基獲得。

在此處特別描述的步驟之前或之後，上述的合成路徑可包括其他步驟以添加或除去適宜的用於最終合成稠合吡啶基化合物的保護基。並且，稠合吡啶基化合物的合成化學轉變及保護基方法學(保護和去保護)為本領域技術人員熟知，例如那些記載於下列文獻中的：R.Larock, *Comprehensive Organic Synthesis* (1989)；T.W.Green和P.G.M.Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2d. Ed., John Wiley和Sons(1991)；L.Fieser和M.Synthesis, John Wiley和Sons(1994)；以及L.Paquette, ed., *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley和Sons(1999)。由此合成的稠合吡啶基化合物可通過如管柱色層分析法、高效液相色譜法或重結晶的方法進一步純化。

一種適宜的體外分析方法可用於初步評價稠合吡啶基化合物抑制血管生成因子如bFGF或VEGF誘導的細胞增殖、細胞移行以及管狀結構形成的效下的實例5。

雖未作進一步的詳細說明，但相信上述內容足以說明本發明。下面特定的具體實施例僅用作說明，而無論如何不能被認為是對公開的剩餘部分美國臨時申請號60/368,892，都在此全文併入作為參考。

實例1：1-苄基-3-(5'-羥甲基-2, -吡喃基)吡啶(化合物1)的合成

首先通過在無水THF(20mL)中攪拌無水氯化鈣(88.8mg, 0.8毫莫耳)與硼氫化鈉(60mg, 1.6毫莫耳)4小時製得硼氫化鈣。然後於30±2°C逐滴加入(88.0mg, 0.27毫莫耳)的THF溶液至硼氫化鈣溶液中。將混合物加熱回流6小時、冷卻、在碎冰中淬滅(quenched into crushed ice)、減壓除取物濃縮至50mL，並於加入石油醚後出現沉澱的固體。收集該固體沉澱物並通過管柱色層分析法(矽膠-苯)純化獲得70.0mg的1-苄基-3-(5'-羥甲基-2, -吡喃基)吡啶(化合物1) (熔點：108-109°C)。

MS(%), m/z : 304(M<sup>+</sup>) IR(KBr)  $\nu_{\max}$  : 3350cm<sup>-1</sup>(-OH)。

<sup>1</sup>H-NMR(DMSO-d<sub>6</sub>, 200MHz)  $\delta$  : 4.51(2H, d, J=5.5Hz, -CH<sub>2</sub>O-), 5.31(1H, t, J=5.5Hz, -OH), 5.70(2H, s, =NCH<sub>2</sub>-), 6.48(1H, d, J=3.4Hz, 苄基), 7.45(1H, t, J=8.2Hz, H-6), 7.75(1H, dd, J=8.2, 1.8Hz, H-7), 8.12(1H, dd, J=8.2, 1.0Hz, C4-H)。

實例2：對細胞增殖的抑制

將人類臍靜脈內皮細胞(HUVEC)在化合物1不存在的條件下(基礎和對照)、或者在化合物1存在的條件下(多種濃度，即0.01、0.03、0.1、0.3%)噤啶去氧核苷的併入而被檢測的DNA合成。

結果顯示，化合物1以濃度依存性方式抑制VEGF及bFGF誘導的HUVEC細胞增殖。出乎意料地，化合物1對VEGF及bFGF表現出的IC<sub>50</sub>值非常低，因此還測試了其他的稠合吡啶基化合物。所有經測試的化合物都能抑制VEGF誘導的HUVEC細胞增殖。其中某些與化合物1同樣有效或甚至比化合物1更強。

實例3：對細胞移行的抑制

依照Pan等在(2003)J. Urol. 69 : 724-72中所述的方法用透孔(transwell)移行裝置測定HUVEC的趨化移行。簡而言之，用M199及0.1%的牛血清白蛋白(BSA) (transwell)小室的下室。將HUVEC(0.2ml中2×10<sup>5</sup>個細胞)加至透孔(transwell)小室的上室中並以化合物1(3-30  $\mu$  M)處理1小時。過濾器係

時。溫育結束時，從裝置上除去過濾器，固定細胞並用蘇木精染色。去除過濾器頂部未移行的細胞。將過濾器置於載片上，將附著至過濾器的細胞用經化合物1處理的及對照組中的移行細胞數間的差異計算細胞移行。結果顯示，化合物1(3-30  $\mu$  m)以劑量依存性方式顯著地抑制VEGF及bFGF誘導的細胞移行。

實例4：對管狀結構形成的抑制

將HUVEC在預先塗覆有基底膜(Matrigel)(10mg/mL)的小室載玻片上溫育。以化合物1(10  $\mu$  M)或不加入化合物1(對照)處理該細胞。加入VEGF及bFGF後，在顯微鏡下攝影。結果顯示化合物1可有效地抑制VEGF及bFGF誘導的細長內皮細胞網(network of elongated endothelial cell)的形成。

其他具體實施例

所有在這說明書中公開的特徵可以任何方式相結合。在此說明書中公開的每個特徵可被作用為相同、相當或相似目的的供選擇的特徵代替。且本發明可應用於同類系列的實例。

從上述說明可以看出，本領域技術人員可輕鬆地確定本發明的本質特徵，並且不脫離其精神和範圍即可對本發明進行多種變化和修飾以使其適應不同的用途。也可用於實現本發明。因此，其他具體實施例也包括在申請專利範圍之範疇內。

## 十、申請專利範圍：



1. 一種抑制由血管生成因子誘導的細胞增殖的方法，其包括向有此需要的個體給藥有效量的如下式所示的化合物：  
或  $\text{C}(\text{O})\text{NRR}'$ 、 $(\text{CH}_2)_m\text{OR}$ 、 $(\text{CH}_2)_m\text{SR}$ 、 $(\text{CH}_2)_m\text{NRR}'$ 、 $(\text{CH}_2)_m\text{CN}$ 、 $(\text{CH}_2)_m\text{C}(\text{O})\text{OR}$ 、 $(\text{CH}_2)_m\text{CHO}$ 、 $(\text{CH}_2)_m\text{CH}=\text{NOR}$ ，或者  $\text{R}_1$  和  $\text{R}_2$  一同、 $\text{R}_3$  和  $\text{R}_4$  一同或  $\text{R}_5$  和  $\text{R}_6$  一同，其中  $n$  是 0、1、2 或 3； $\text{Ar}_1$ 、 $\text{Ar}_2$  及  $\text{Ar}_3$  各自獨立地為苯基、噻吩基、呋喃基、吡咯基、吡啶基或嘧啶基； $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$ 、 $\text{R}_3$ 、 $\text{R}_4$ 、 $\text{R}_5$  及  $\text{R}_6$  各自獨立地為氫、烷基、芳基、雜環基、環基或雜環基；以及  $m$  是 0、1、2、3、4、5 或 6。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述的方法，其中該血管生成因子是血管內皮生長因子。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述的方法，其中該血管生成因子是鹼性成纖維細胞生長因子。
4. 如申請專利範圍第 1 項所述的方法，其中  $\text{Ar}_3$  是苯基。
5. 如申請專利範圍第 4 項所述的方法，其中  $\text{Ar}_2$  是 5'-呋喃基。
6. 如申請專利範圍第 5 項所述的方法，其中  $\text{R}_3$  是 H， $\text{R}_4$  是  $\text{CH}_2\text{OH}$  且在呋喃基 2 位處被取代。
7. 如申請專利範圍第 6 項所述的方法，其中  $\text{Ar}_1$  是苯基。
8. 如申請專利範圍第 7 項所述的方法，其中所有  $\text{R}_1$  都是烷基或鹵素，並且所有  $\text{R}_2$ 、 $\text{R}_5$  及  $\text{R}_6$  都是 H。
9. 如申請專利範圍第 6 項所述的方法，其中  $\text{Ar}_1$  是噻吩基。
10. 如申請專利範圍第 6 項所述的方法，其中該血管生成因子是血管內皮生長因子或鹼性成纖維細胞生長因子。
11. 如申請專利範圍第 1 項所述的方法，其中  $\text{Ar}_2$  是 5'-呋喃基。
12. 如申請專利範圍第 11 項所述的方法，其中  $\text{R}_3$  是 H， $\text{R}_4$  是  $\text{CH}_2\text{OH}$  且在呋喃基 2 位處被取代。
13. 如申請專利範圍第 12 項所述的方法，其中該血管生成因子是血管內皮生長因子或鹼性成纖維細胞生長因子。



14. 一種抑制由血管生成因子誘導的細胞移行的方法，其包括向有此需要的個體給藥有效量的如下式所示的化合物：  
 或  $\text{Ar}_1$ ，其中n是0、1、2或3； $\text{Ar}_1$ 、 $\text{Ar}_2$ 及 $\text{Ar}_3$ 各自獨立地為苯基、噻吩基、呋喃基、吡咯基、吡啶基或嘧啶基； $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$ 、 $\text{R}_3$ 、 $\text{R}_4$ 、 $\text{R}_5$ 及 $\text{R}_6$ 各自獨立地為H、 $\text{C}(\text{O})\text{NRR}'$ 、 $(\text{CH}_2)_m\text{OR}$ 、 $(\text{CH}_2)_m\text{SR}$ 、 $(\text{CH}_2)_m\text{NRR}'$ 、 $(\text{CH}_2)_m\text{CN}$ 、 $(\text{CH}_2)_m\text{C}(\text{O})\text{OR}$ 、 $(\text{CH}_2)_m\text{CHO}$ 、 $(\text{CH}_2)_m\text{CH}=\text{NOR}$ ，或者 $\text{R}_1$ 和 $\text{R}_2$ 一同、 $\text{R}_3$ 和 $\text{R}_4$ 一同或 $\text{R}_5$ 和 $\text{R}_6$ 一同為H、烷基、環基或雜環基；以及m是0、1、2、3、4、5或6。

15. 如申請專利範圍第14項所述的方法，其中該血管生成因子是血管內皮生長因子。

16. 如申請專利範圍第14項所述的方法，其中該血管生成因子是鹼性成纖維細胞生長因子。

17. 如申請專利範圍第14項所述的方法，其中 $\text{Ar}_3$ 是苯基。

18. 如申請專利範圍第17項所述的方法，其中 $\text{Ar}_2$ 是5'-呋喃基。

19. 如申請專利範圍第18項所述的方法，其中 $\text{R}_3$ 是H， $\text{R}_4$ 是 $\text{CH}_2\text{OH}$ 且在呋喃基2位處被取代。

20. 如申請專利範圍第19項所述的方法，其中 $\text{Ar}_1$ 是苯基。

21. 如申請專利範圍第20項所述的方法，其中所有 $\text{R}_1$ 都是烷基或鹵素，並且所有 $\text{R}_2$ 、 $\text{R}_5$ 及 $\text{R}_6$ 都是H。

22. 如申請專利範圍第19項所述的方法，其中 $\text{Ar}_1$ 是噻吩基。

23. 如申請專利範圍第19項所述的方法，其中該血管生成因子是血管內皮生長因子或鹼性成纖維細胞生長因子。


24. 如申請專利範圍第14項所述的方法，其中 $\text{Ar}_2$ 是5'-呋喃基。

25. 如申請專利範圍第24項所述的方法，其中 $\text{R}_3$ 是H， $\text{R}_4$ 是 $\text{CH}_2\text{OH}$ 且在呋喃基2位處被取代。

26. 如申請專利範圍第25項所述的方法，其中該血管生成因子是血管內皮生長因子或鹼性成纖維細胞生長因子。

R<sub>2</sub>

R

27. 一種抑制由血管生成因子誘導的管狀結構形成的方法，其包括向有此需要的個體給藥有效量的如下結構所示的化合物：  
其中A是H或，其中n是0、1、2或3；Ar<sub>1</sub>、Ar<sub>2</sub>及Ar<sub>3</sub>各自獨立地為苯基、噻吩基、呋喃基、吡咯基、吡啶基或嘧啶基；R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>及R<sub>6</sub>各自獨立地為H、烷基、環基或雜環基；並且m是0、1、2、3、4、5或6。

- 28. 如申請專利範圍第27項所述的方法，其中該血管生成因子是血管內皮生長因子。
- 29. 如申請專利範圍第27項所述的方法，其中該血管生成因子是鹼性成纖維細胞生長因子。
- 30. 如申請專利範圍第27項所述的方法，其中Ar<sub>3</sub>是苯基。
- 31. 如申請專利範圍第30項所述的方法，其中Ar<sub>2</sub>是5'-呋喃基。
- 32. 如申請專利範圍第31項所述的方法，其中R<sub>3</sub>是H，R<sub>4</sub>是CH<sub>2</sub>OH且在呋喃基2位處被取代。
- 33. 如申請專利範圍第32項所述的方法，其中Ar<sub>1</sub>是苯基。
- 34. 如申請專利範圍第33項所述的方法，其中所有R<sub>1</sub>都是烷基或鹵素，並且所有R<sub>2</sub>、R<sub>5</sub>及R<sub>6</sub>都是H。
- 35. 如申請專利範圍第32項所述的方法，其中Ar<sub>1</sub>是噻吩基。
- 36. 如申請專利範圍第32項所述的方法，其中該血管生成因子是血管內皮生長因子或鹼性成纖維細胞生長因子。
- 37. 如申請專利範圍第27項所述的方法，其中Ar<sub>2</sub>是5'-呋喃基。
- 38. 如申請專利範圍第37項所述的方法，其中R<sub>3</sub>是H，R<sub>4</sub>是CH<sub>2</sub>OH且在呋喃基2位處被取代。
- 39. 如申請專利範圍第38項所述的方法，其中該血管生成因子是血管內皮生長因子或鹼性成纖維細胞生長因子。

十一、圖式：