

【11】證書號數：I386206

【45】公告日：中華民國 102 (2013) 年 02 月 21 日

【51】Int. Cl. : A61K31/522 (2006.01) C07D473/04 (2006.01)

發明

全 26 頁

【54】名稱：具有抑制肺上皮細胞株表現 Rho - 激酶活性之黃嘌呤類 c G M P 增強化合物

XANTHINE-BASED CYCLIC GMP-ENHANCING RHO-KINASE  
INHIBITOR INHIBITS PHYSIOLOGICAL ACTIVITIES OF LUNG  
EPITHELIAL CELL LINE

【21】申請案號：097127696

【22】申請日：中華民國 97 (2008) 年 07 月 21 日

【11】公開編號：201004624

【43】公開日期：中華民國 99 (2010) 年 02 月 01 日

【72】發明人：陳英俊 (TW) CHEN, ING JUN

【71】申請人：高雄醫學大學

KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY

高雄市三民區十全一路 100 號

【74】代理人：蔡清福

【56】參考文獻：

TW 96150993

Chemical Abstrate, AN 145:465353 AU Wu, Inhibition of proinflammatory tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced inducible nitric-oxide synthase by xanthine-based 7-[2-[4-(2-chlorobenzene)piperazinyl] ethyl]-1,3-dimethylxanthine (KMUP-1) and 7-[2-[4-(4-nitrobenzene)piperazinyl]ethyl]- 1,3-dimethylxanthine (KMUP-3) in rat trachea: the involvement of soluble guanylate cyclase and protein kinase G. Molecular Ph

審查人員：黃文延

## [57]申請專利範圍

1. 一種用於製備 Rho-激酶抑制劑以治療癌細胞遷移或轉移相關疾病的醫藥組合物，其包含：— 7- [2- [4-(2-氯苯) 噻基] 乙基] -1,3 二甲基黃嘌呤之化合物，其中該醫藥組合物具有抑制一肺上皮細胞的一生理活性的效果。
2. 如申請專利範圍第 1 項之醫藥組合物，更包含一藥學上可接受之載體。
3. 如申請專利範圍第 1 項之醫藥組合物，其中該生理活性係選自一增生活性、一遷移活性以及一促發炎活性至少其中之一。
4. 如申請專利範圍第 3 項之醫藥組合物，其中該遷移活性為一癌細胞之一轉移活性。
5. 如申請專利範圍第 1 項之醫藥組合物，其中該生理活性係藉由增加肺上皮細胞中的 cGMP 與抑制 Rho-激酶的活性而達成。
6. 一種化合物 7- [2- [4-(2-氯苯) 噻基] 乙基] -1,3-二甲基黃嘌呤用於製備 Rho-激酶抑制劑以治療癌細胞遷移或轉移相關疾病藥物之用途，其中該化合物係由黃嘌呤合成，且為一 Rho-激酶抑制劑。
7. 如申請專利範圍第 6 項之用途，其中該化合物更包含一藥學上之有效載體。
8. 如申請專利範圍第 6 項之用途，其中該生理活性係選自一增生活性、一遷移活性以及一促發炎活性至少其中之一。

(2)

9. 如申請專利範圍第 8 項之用途，其中該遷移活性為一癌細胞之一轉移活性。
10. 如申請專利範圍第 6 項之用途，其中該化合物係藉由增加該肺上皮細胞中的 cGMP 與抑制 Rho-激酶的活性，而抑制該肺上皮細胞的生理活性。

#### 圖式簡單說明

第一圖(A)及第一圖(B)為曲線圖，其係為本發明之不同濃度(1.0,10 與 100  $\mu$ M)KMUP - 1 在正常(圖 1A)及缺氧(圖 1B)狀態下對於 H441 細胞存活率之抑制作用，其中圓形代表對照組，三角形代表 1.0  $\mu$ M KMUP - 1，空心 三角形代表 10  $\mu$ M KMUP - 1，正方形代表 100  $\mu$ M KMUP - 1。

第二圖係為不同濃度的 KMUP - 1(0.01,0.1,1.0,10 與 100  $\mu$ M)對於細胞週期分佈比例(%)的作用，其中 FCS 代表含有胎牛血清的細胞培養液，vehicle 代表培養液中僅添加 KMUP - 1 的溶劑，而 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>、S 以及 G<sub>2</sub>/M 分別代表細胞週期中的休眠狀態期/成長期、合成期以及有絲分裂準備期/有絲分裂期。

第三圖係為本發明之 KMUP - 1(1.0  $\mu$ M)在 6 小時至 72 小時的作用後，對於細胞週期中各個週期的比例的影響，其中 SF 與 10%FCS 分別代表細胞培養於不含血清及含有 10%胎牛血清的培養液中。

第四圖為以流式細胞儀分析的細胞週期區域圖，其係為本發明之 KMUP - 1(100  $\mu$ M)與對照組及其溶劑對照組比較後，對於細胞週期分佈的作用。

第五圖(A)(B)係顯示在 KMUP - 1(10  $\mu$ M)存在(圖 5B)或不存在(圖 5A)時，在正常及缺氧狀態下處理 H441 細胞 12、24、48 與 72 小時後對其 eNOS 表現的作用，其中 eNOS 的表現量是以  $\beta$  - actin 的表現量標準化的結果，斜線長條表示 eNOS 在 0 小時的表現量，而交叉線長條與白色長條分別表示 eNOS 在正常及缺氧狀態下不同時間的表現量，圖示中的 \* 及 \*\* 符號分別代表與 0 小時比較後  $p < 0.05$  以及  $p < 0.01$ ，而圖示中的 # 及 ## 符號分別代表特定時間下正常與缺氧狀態比較後  $p < 0.05$  以及  $p < 0.01$ 。

第六圖係為不同濃度之 KMUP - 1(0.001,0.01,0.1,1.0,與 10  $\mu$ M)在正常含氧量下處理 48 小時，對於 eNOS 表現量的影響，其中 eNOS 的表現量是以  $\beta$  - actin 的表現量標準化的結果，斜線長條代表對照組，而白色長條代表 KMUP - 1 的實驗組。

第七圖係為細胞預先以市售 NOS 抑制藥物 L - NAME(100  $\mu$ M)處理 30 分鐘後，本發明之 KMUP - 1 在正常及缺氧狀態下對於 eNOS 表現量的作用，其中斜線長條代表不經預先處理的組別，而白色長條代表以 L - NAME 預先處理的組別，第七圖(A)與第七圖(B)分別代表 0.1  $\mu$ M 及 1.0  $\mu$ M KMUP - 1 的結果。

第八圖係為本發明之 KMUP - 1(10,100  $\mu$ M)在正常及缺氧狀態下對於 H441 細胞中 sGC 表現的作用，其中 SF 代表細胞培養於不含血清的培養液中，而斜線長條與白色長條分別代表正常及缺氧狀態。

第九圖係為本發明之 KMUP - 1 在正常及缺氧狀態下對於 H441 細胞中 PKG 表現量的影響，其中 SF 代表細胞培養於不含血清的培養液中，而斜線長條與白色長條分別代表正常及缺氧狀態。

第十圖係為本發明之 KMUP - 1(1  $\mu$ M)在 H441 細胞暴露於缺氧狀態 3 至 72 小時後，對於 HIF - 1 $\alpha$  表現量的影響，其中斜線長條與白色長條分別代表對照組及 KMUP - 1 的實驗組。

第十一圖係為本發明之 KMUP - 1(1  $\mu$ M)在 H441 細胞暴露於缺氧狀態 3 至 72 小時後，對於 VEGF 表現量的影響，其中斜線白色長條與長條分別代表對照組及 KMUP - 1 的實驗組。

第十二圖係為本發明之 KMUP - 1(1  $\mu$ M)在以 L - NAME(100  $\mu$ M)預處理 30 分鐘後，對於 HIF - 1 $\alpha$  以及 VEGF 表現量在 24 小時的抑制作用，其中 N 代表正常狀態，H 代表缺氧狀態。

(3)

第十三圖(A)及(B)係為不同濃度的 KMUP - 1(0.01,0.1,1.0,10 及 100  $\mu$ M)，對於缺氧狀態下之 HIF - 1a(圖 13A)及 VEGF(圖 13B)表現量在 24 小時的作用，其中斜線長條與白色長條分別代表對照組及 KMUP - 1 的實驗組。

第十四圖(A)及(B)係為在缺氧狀態下，H441 細胞以控制組、1.0  $\mu$ M KMUP - 1、1.0  $\mu$ M YC - 1、100  $\mu$ M SNP 以及 100  $\mu$ M IBMX 等不同處理 24 小時後，HIF - 1a(圖 14A)及 VEGF(圖 14B)的表現量。

第十五圖係為本發明之 KMUP - 1(10,100 $\mu$  M)，在正常及缺氧狀態下對於 H441 細胞中的 ROCKII 蛋白質表現的作用，其中 SF 代表細胞培養於不含血清的培養液中，而斜線長條與白色長條分別代表正常及缺氧狀態。

第十六圖係為細胞預先以市售 Rp - 8 - CPT - cGMP(10  $\mu$ M)處理 30 分鐘後，以本發明之 KMUP - 1(10  $\mu$ M)在正常及缺氧狀態下處理 48 小時後，對於 Rho 激酶表現的作用，其中斜線長條與白色長條分別代表正常及缺氧狀態。

第十七圖(A)及(B)係顯示 H441 細胞經過 10%胎牛血清、不含血清的培養液、KMUP - 1(1 - 100  $\mu$ M)以及 ROCK 抑制劑 Y27632(10  $\mu$ M)等不同處理 48 小時後，在正常(圖 17A)及缺氧(圖 17B)狀態下創傷寬度的相對距離。

第十八圖(A)及(B)係為本發明之 KMUP - 1 在正常及缺氧狀態下，對於不經 cGMP 拮抗劑，Rp - 8 - CPT - cGMP 預處理(圖 18 A)以及經過 Rp - 8 - CPT - cGMP(10  $\mu$ M)預處理 30 分鐘後(圖 18 B)之 H441 細胞中 p21 表現量的作用，其中 CTL 代表對照組，SF 代表細胞培養於不含血清的培養液中，而斜線長條與白色長條分別代表正常及缺氧狀態。

第十九圖(A)及(B)係為本發明之 KMUP - 1 在正常及缺氧狀態下，對於不經 cGMP 拮抗劑，Rp - 8 - CPT - cGMP 預處理(圖 19 A)以及經過 Rp - 8 - CPT - cGMP(10  $\mu$ M)預處理 30 分鐘後(圖 19 B)之 H441 細胞中 p27 表現量之作用，其中 CTL 代表對照組，SF 代表細胞培養於不含血清的培養液中，而斜線長條與白色長條分別代表正常及缺氧狀態。

第二十圖(A)及(B)係為本發明之 KMUP - 1(10,100 $\mu$  M)在正常及缺氧狀態下，對於 H441 細胞中 Bax(圖 20A)及 Bcl - 2(圖 20B)表現之作用，其中 SF 代表細胞培養於不含血清的培養液中，而斜線長條與白色長條分別代表正常及缺氧狀態。

第二十一圖係為本發明之 KMUP - 1(10,100 $\mu$  M)在正常及缺氧狀態下，對於 H441 細胞中的比例之作用，其中 SF 代表細胞培養於不含血清的培養液中，而斜線長條與白色長條分別代表正常及缺氧狀態。

第二十二圖係為細胞預先以市售 NOS 抑制藥物 L - NAME(100  $\mu$ M)處理 30 分鐘後，以本發明之 KMUP - 1(100  $\mu$ M)在正常及缺氧狀態下處理 48 小時後，對於 Bax/Bcl - 2 比例的作用，其中斜線長條與白色長條分別代表正常及缺氧狀態。

第二十三圖係為細胞預先以市售之 cGMP 拮抗劑，Rp - 8 - CPT - cGMP(10  $\mu$ M)處理 30 分鐘後，以本發明之 KMUP - 1(100  $\mu$ M)在正常及缺氧狀態下處理 48 小時後，對於 Bax/Bcl - 2 比例的作用，其中斜線長條與白色長條分別代表正常及缺氧狀態。

第二十四圖係為不同濃度的 KMUP - 1(1.0,10 及 100  $\mu$ M)，在正常及缺氧狀態下對於 H441 細胞中之未活化 procaspase - 3/活化 caspase - 3 比例的作用，其中斜線長條與白色長條分別代表對照組及 KMUP - 1 的實驗組。

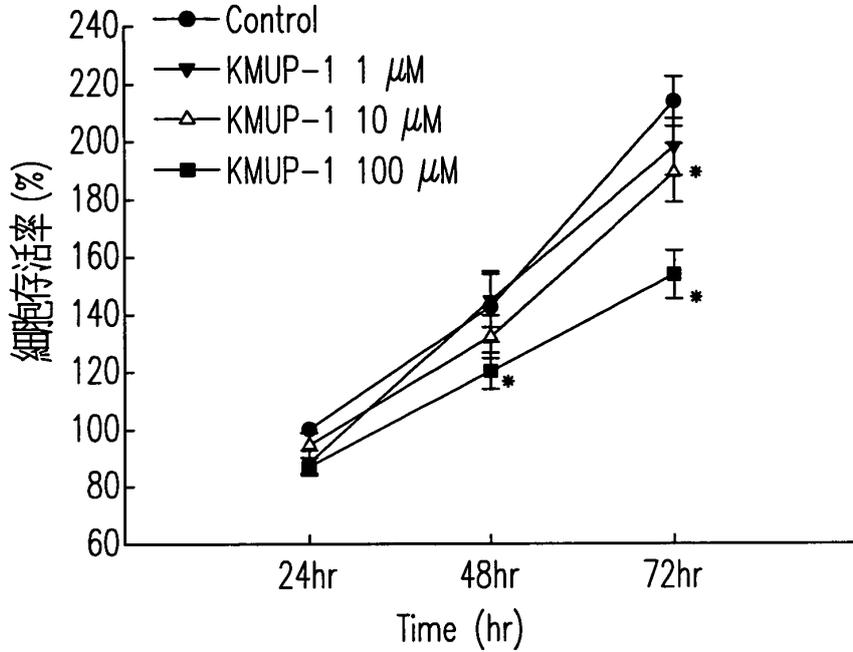
第二十五圖係為本發明之 KMUP - 1 在正常及缺氧狀態下對於 H441 細胞中 PDE5A 表現的作用，其中 SF 代表細胞培養於不含血清的培養液中，而斜線長條與白色長條分別代表正常及缺氧狀態。

第二十六圖係為不同濃度的 KMUP - 1(1.0,10 及 50  $\mu$ M)對於以 PDE5A 促進劑 U46619 誘導後細胞中 PDE5A 表現量的影響，其中斜線長條與白色長條分別代表正常及缺氧狀態。

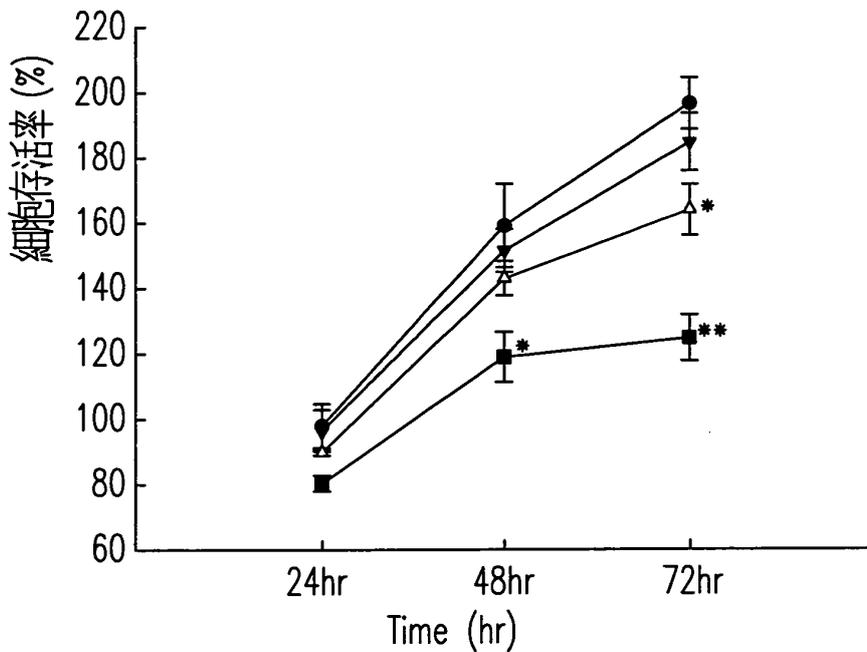
(4)

第二十七圖係為本發明之 KMUP - 1(10,100  $\mu$ M)在正常及缺氧狀態下，對於 H441 細胞中磷酸化 p38/所有 p38 之比例的作用，其中 SF 代表細胞培養於不含血清的培養液中，而斜線長條與白色長條分別代表正常及缺氧狀態。

第二十八圖係為不同濃度的 KMUP - 1(1 - 100  $\mu$ M)在正常及缺氧狀態下對於 TNF -  $\alpha$  誘導的 iNOS 表現之作用，其中斜線長條與白色長條分別代表正常及缺氧狀態。

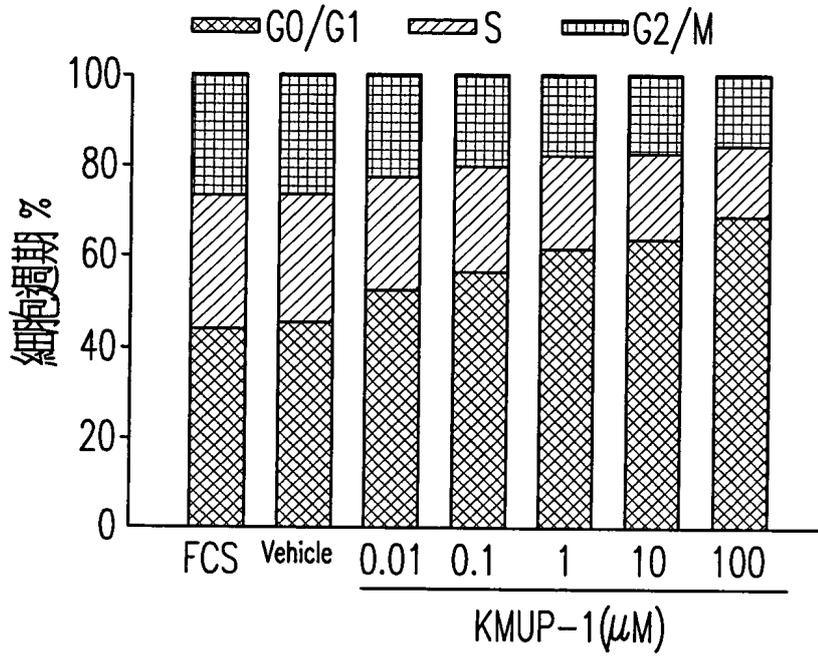


第一圖(A)

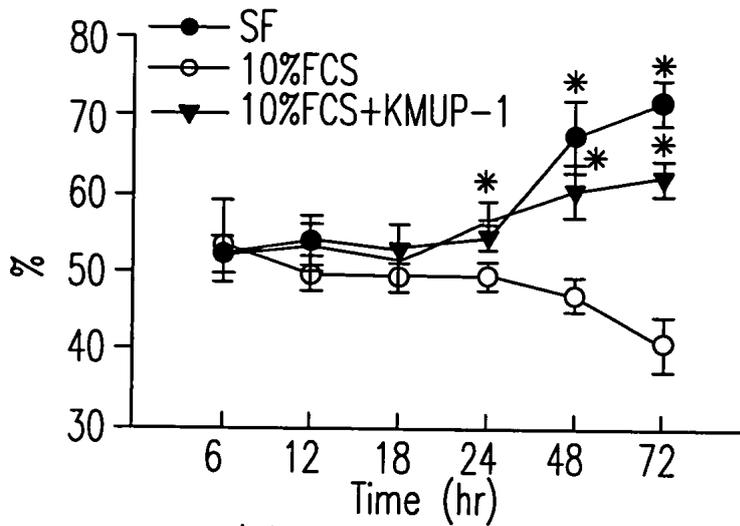


第一圖(B)

(5)



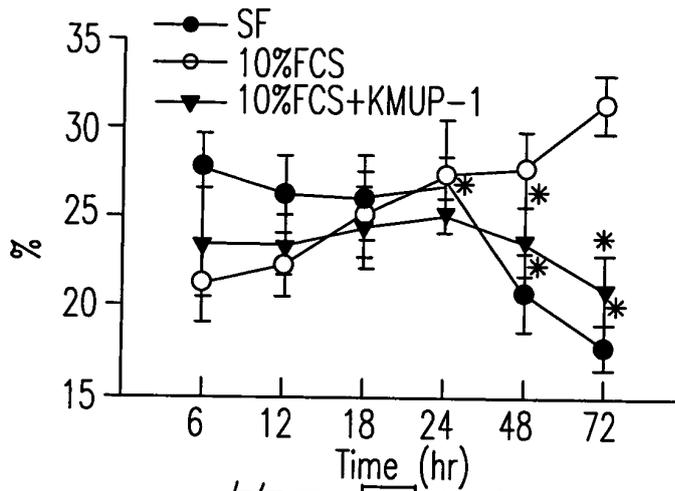
第二圖



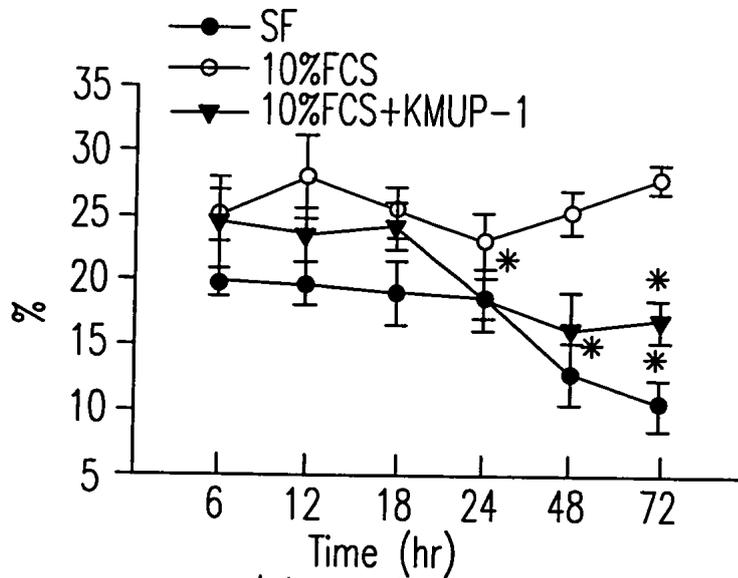
第三圖(A)

—●— SF

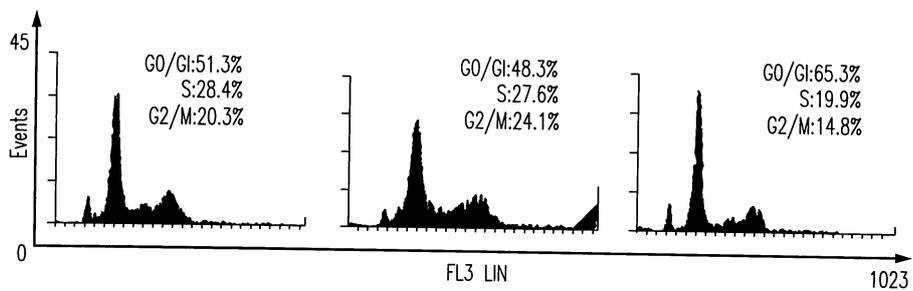
(6)



第三圖(B)

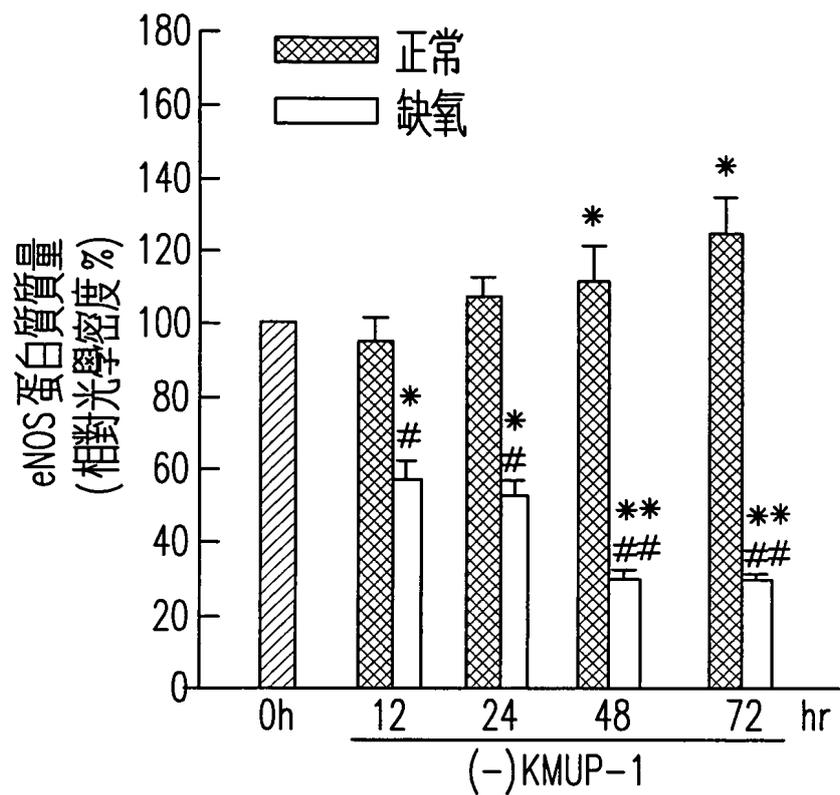


第三圖(C)



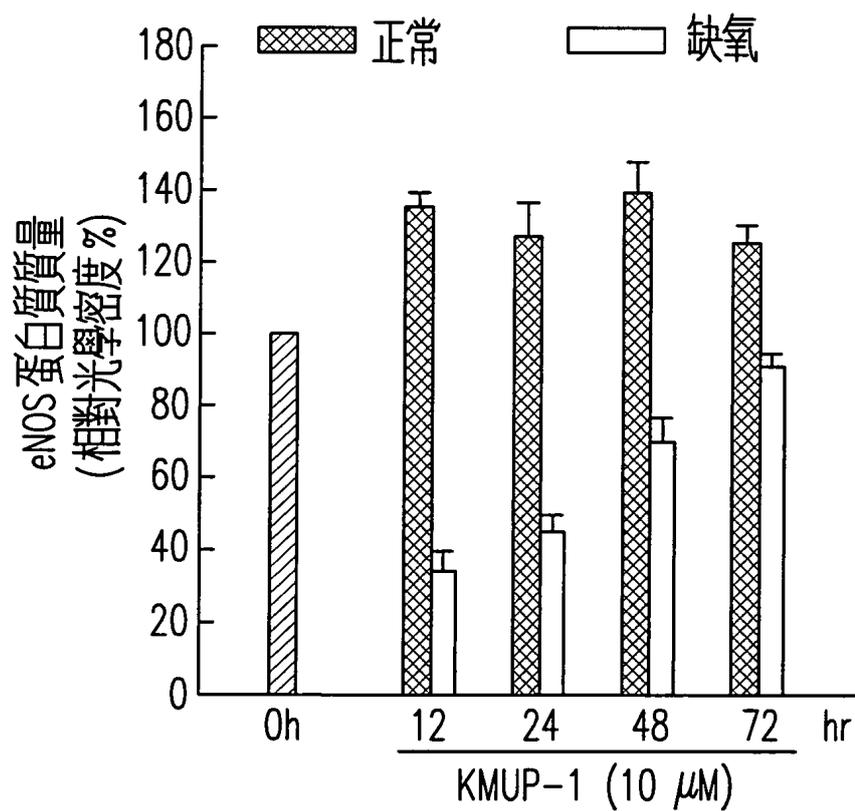
第四圖

(7)



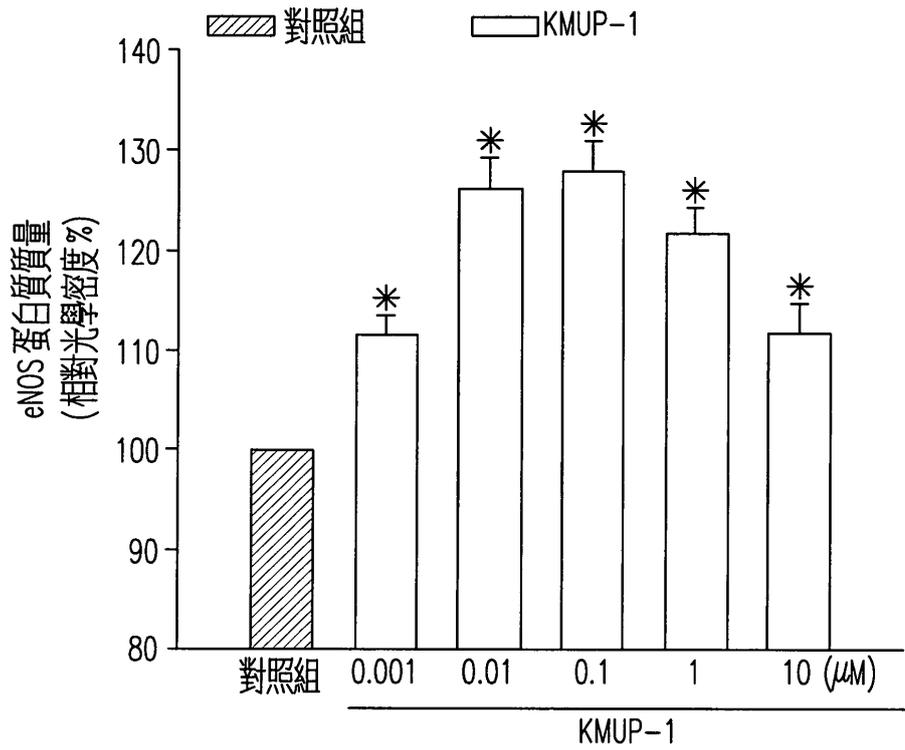
第五圖(A)

(8)

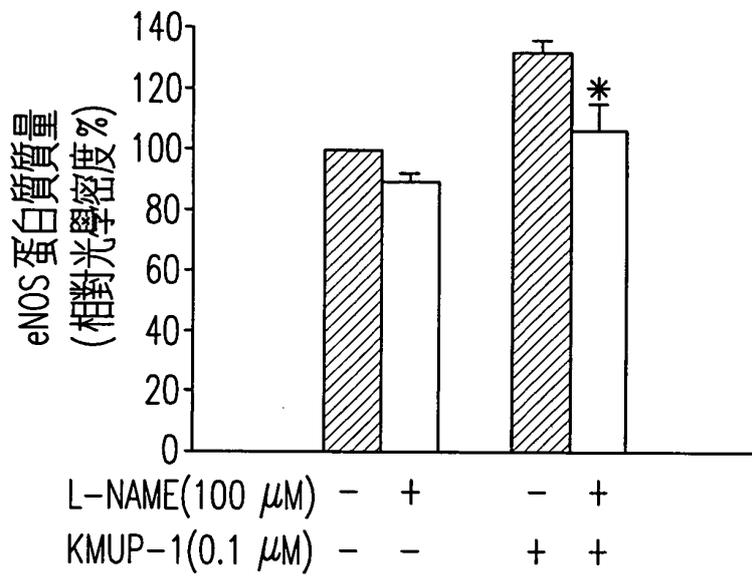


第五圖(B)

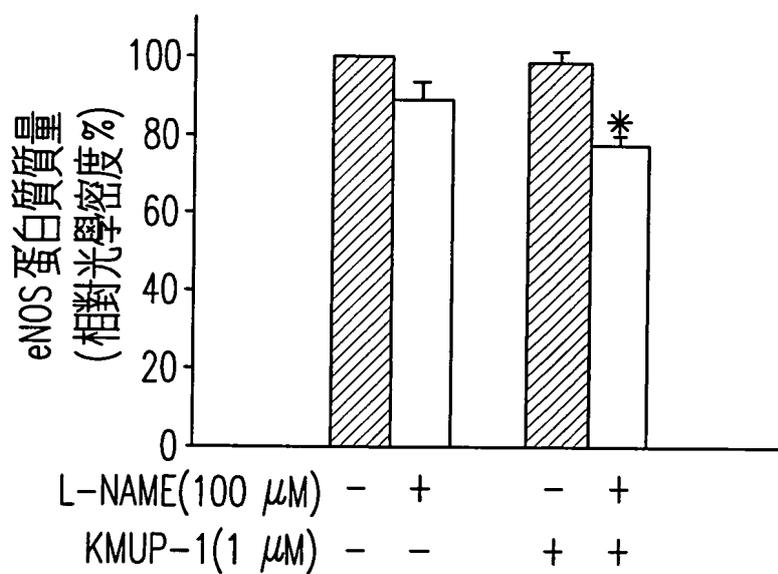
(9)



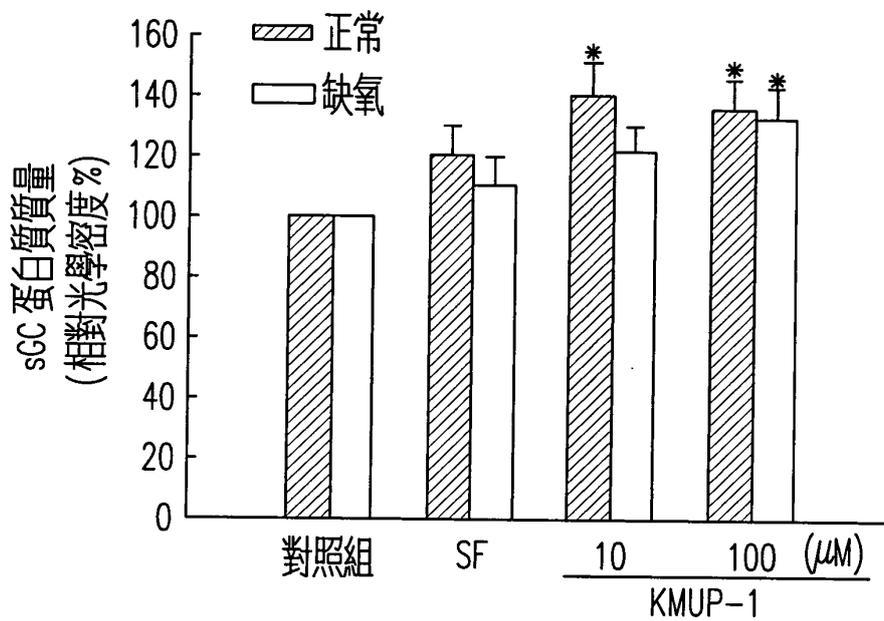
第六圖



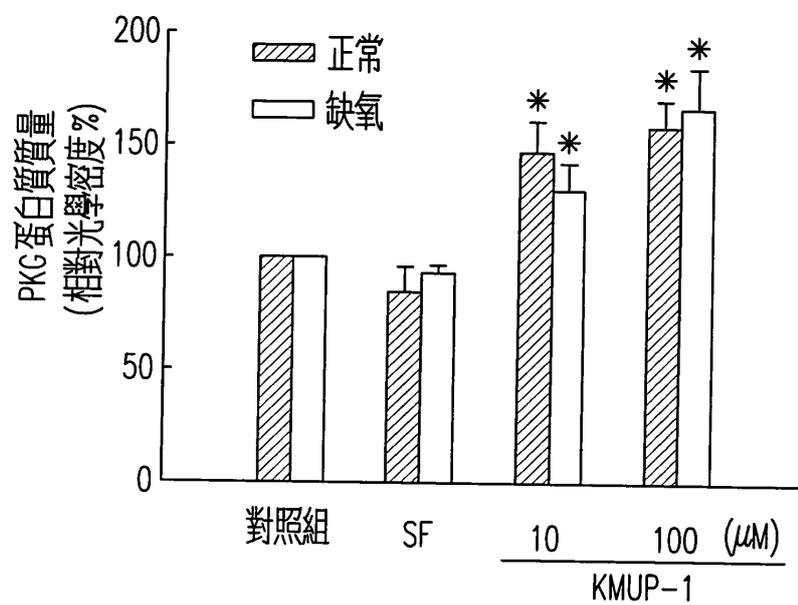
第七圖(A)



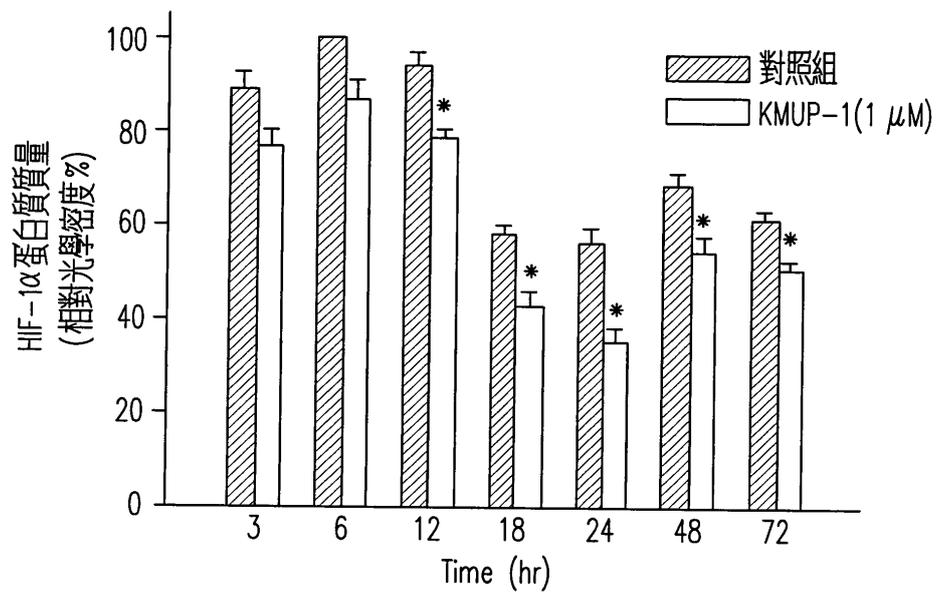
第七圖(B)



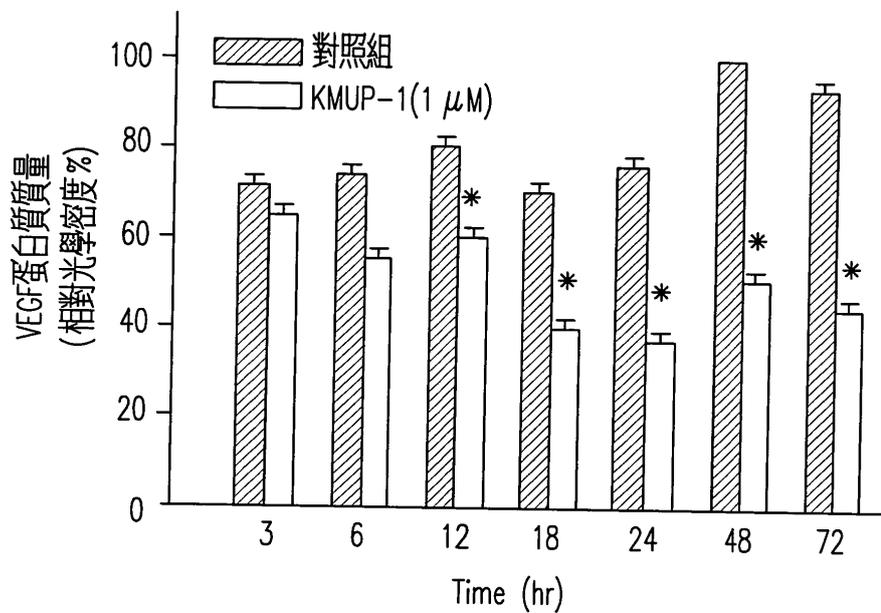
第八圖



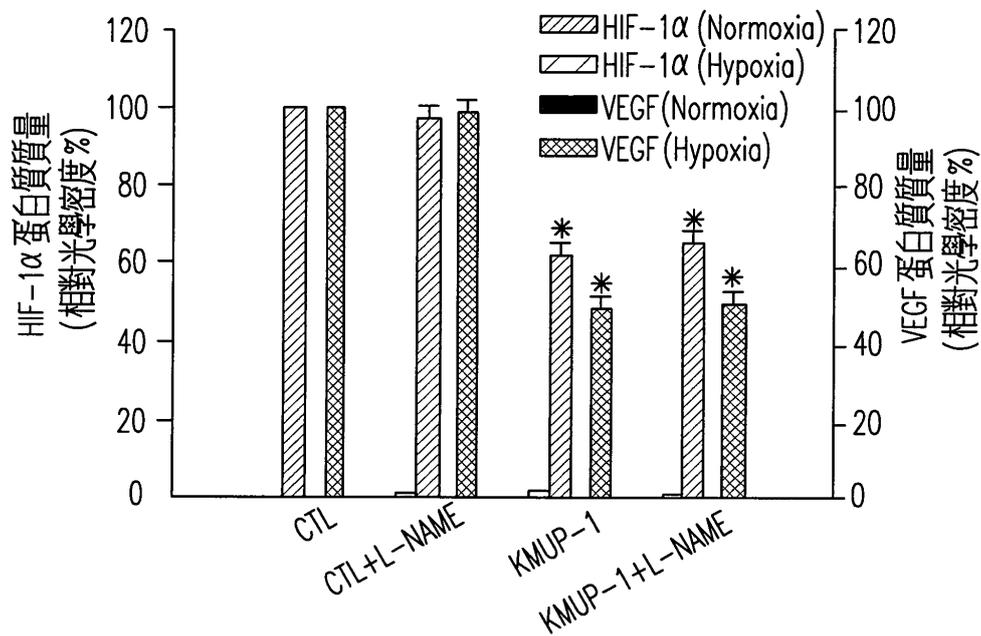
第九圖



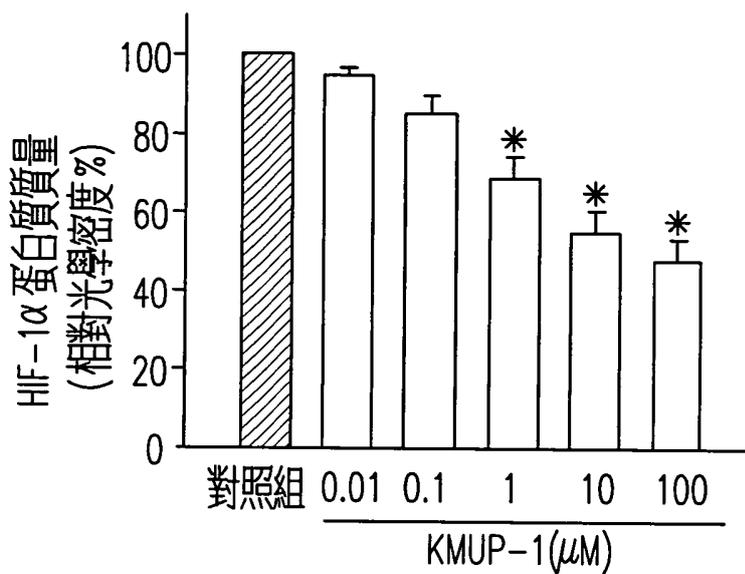
第十圖



第十一圖

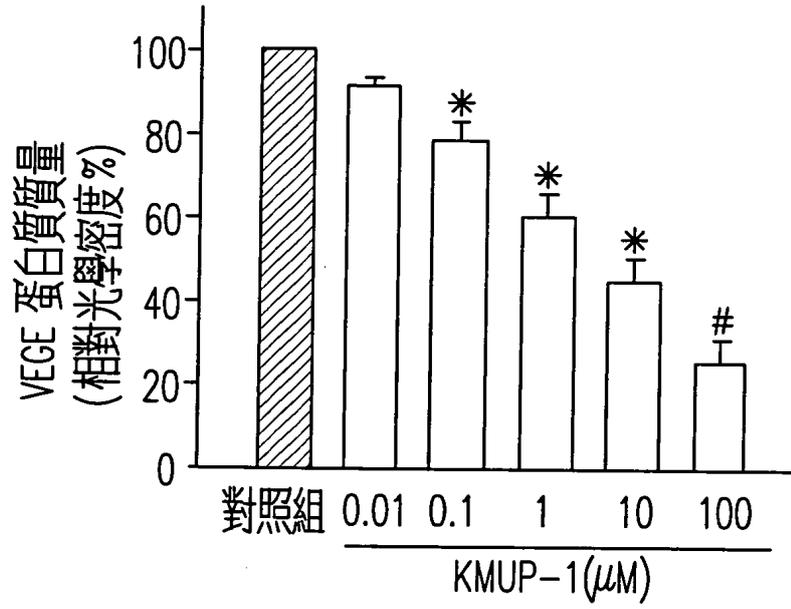


第十二圖

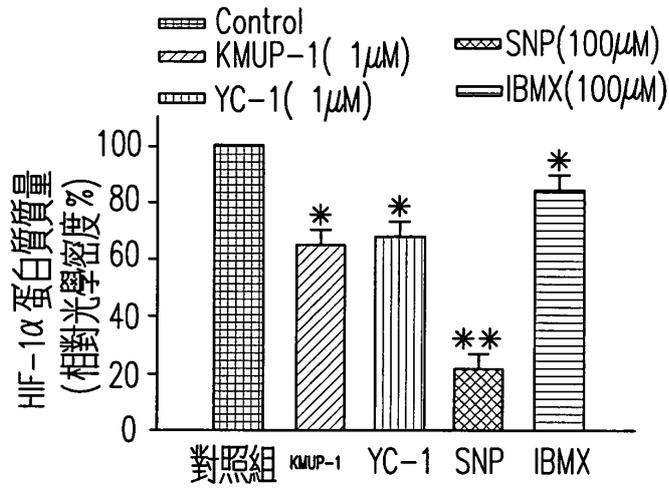


第十三圖(A)

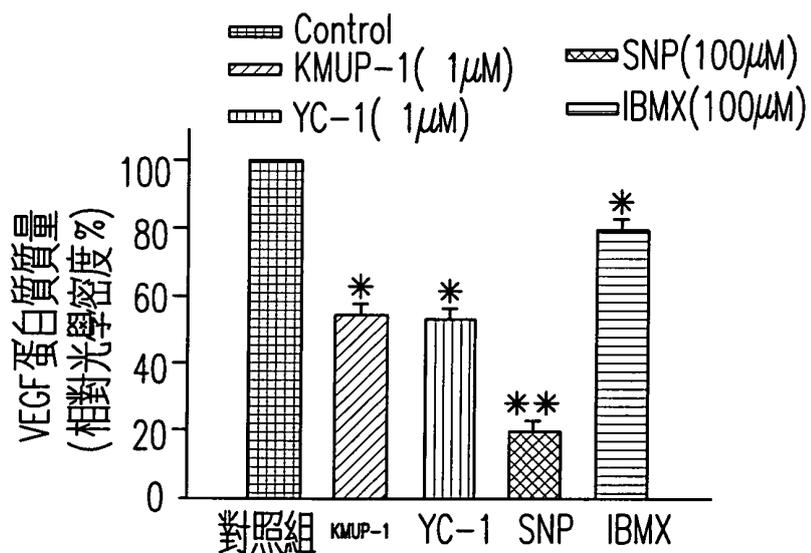
(14)



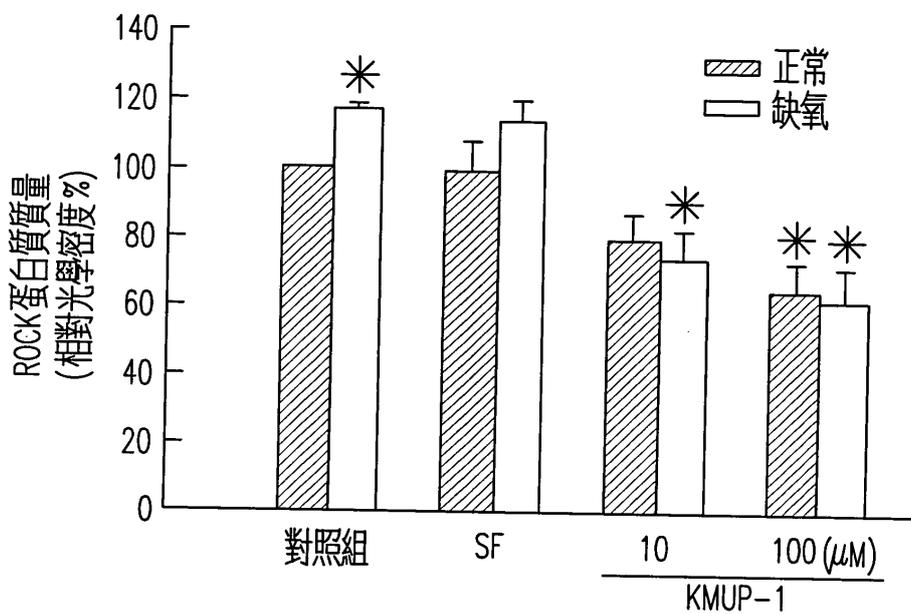
第十三圖(B)



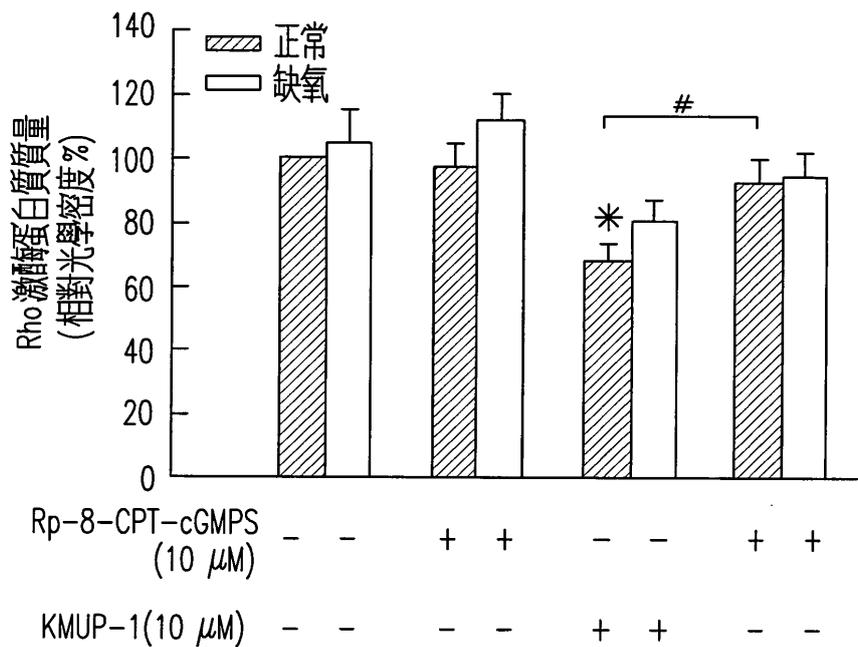
第十四圖(A)



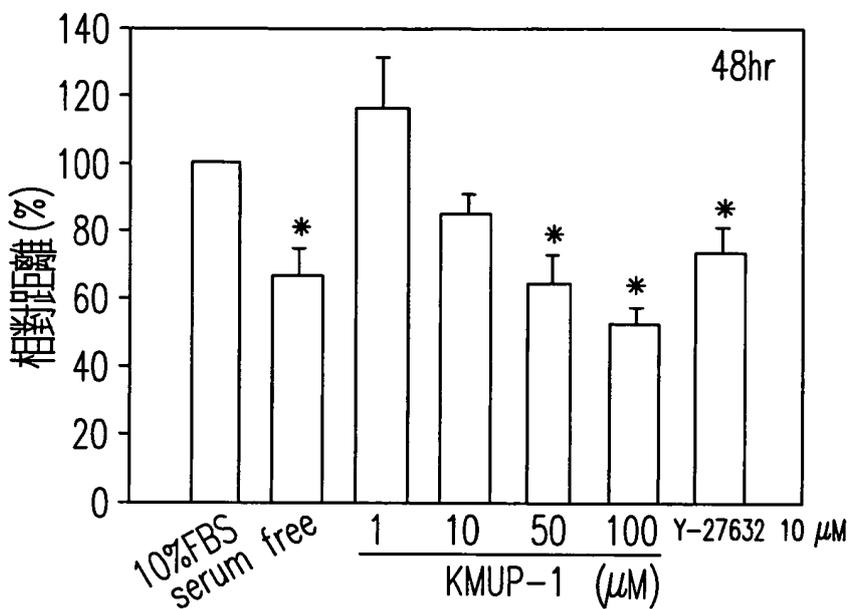
第十四圖(B)



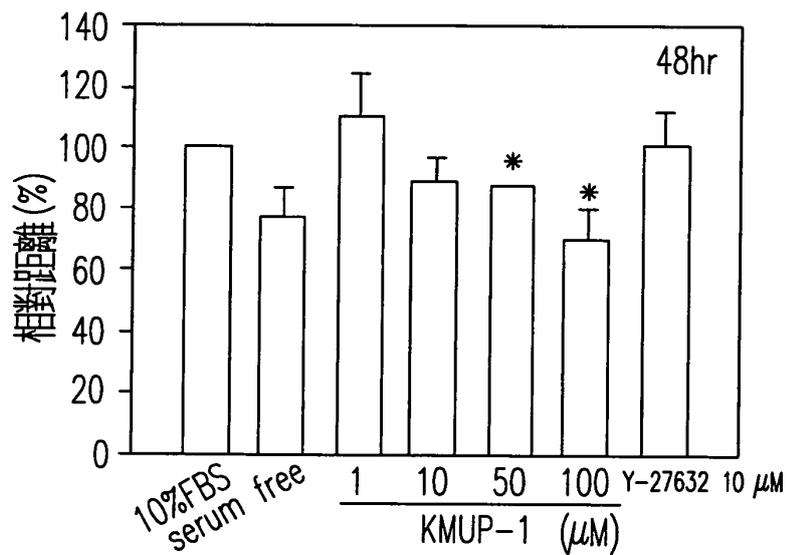
第十五圖



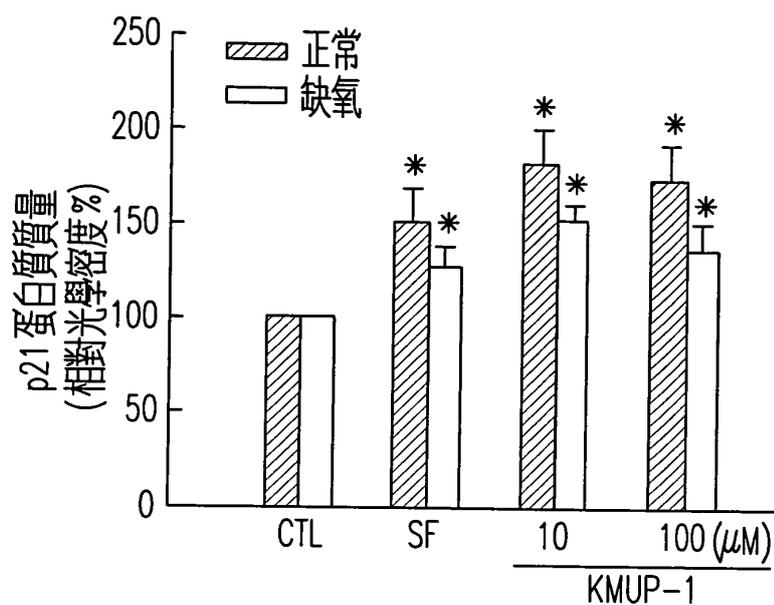
第十六圖



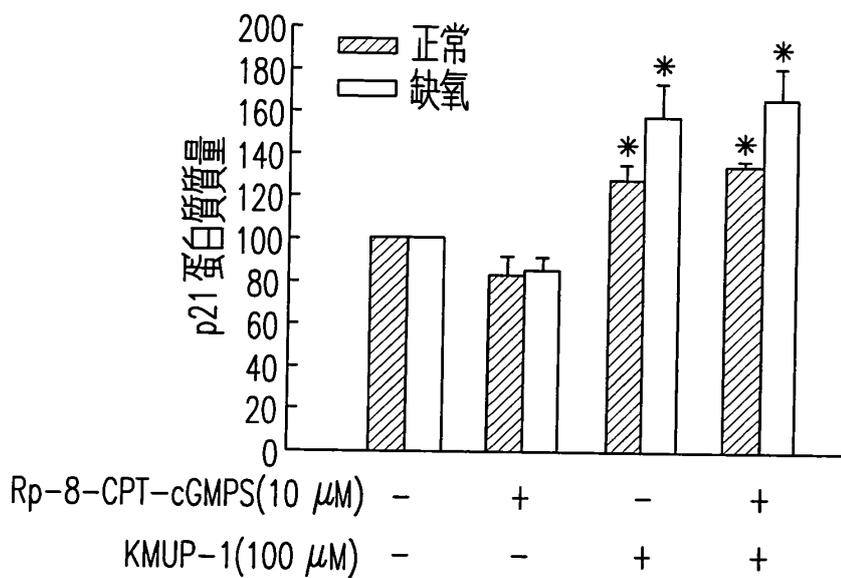
第十七圖 (A)



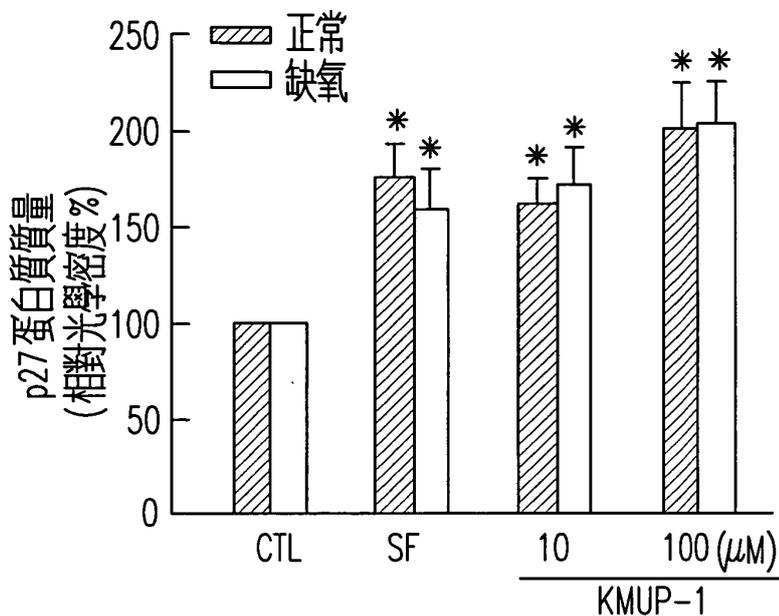
第十七圖 (B)



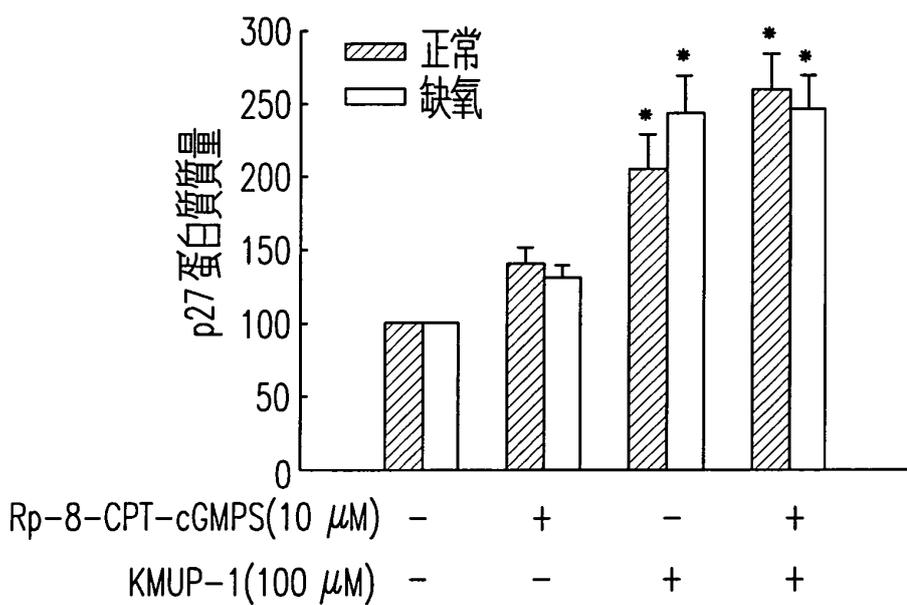
第十八圖 (A)



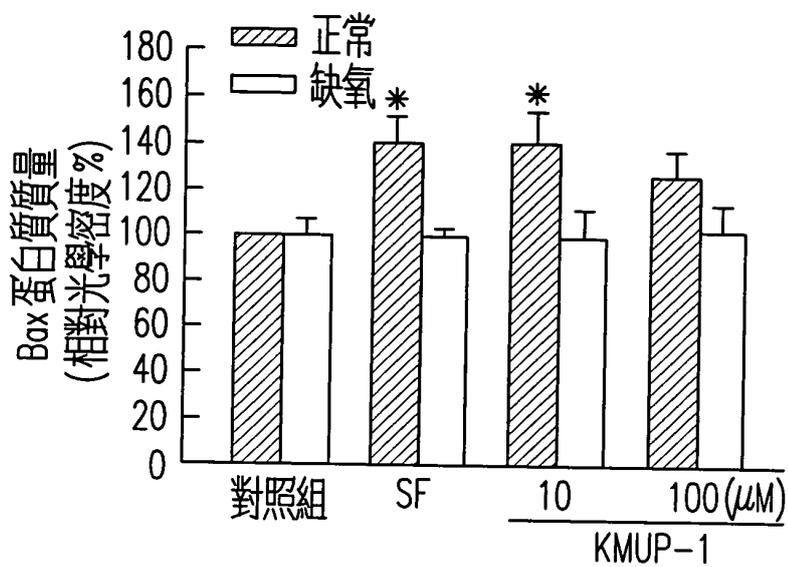
第十八圖(B)



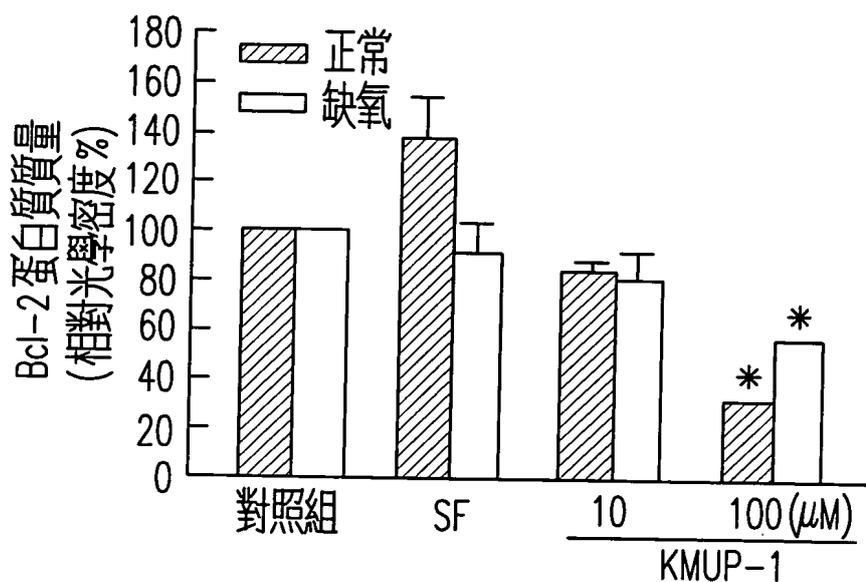
第十九圖(A)



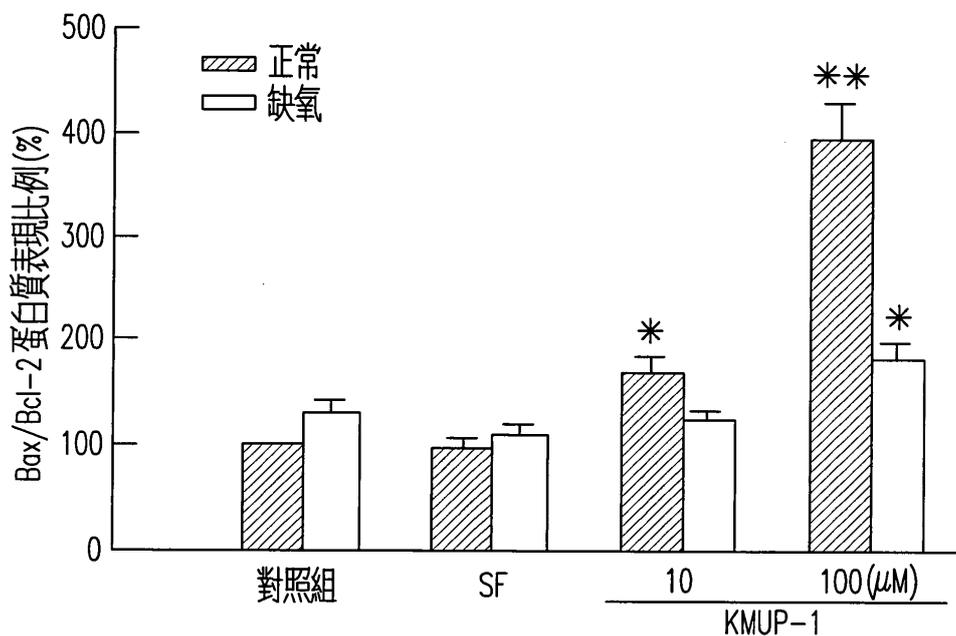
第十九圖(B)



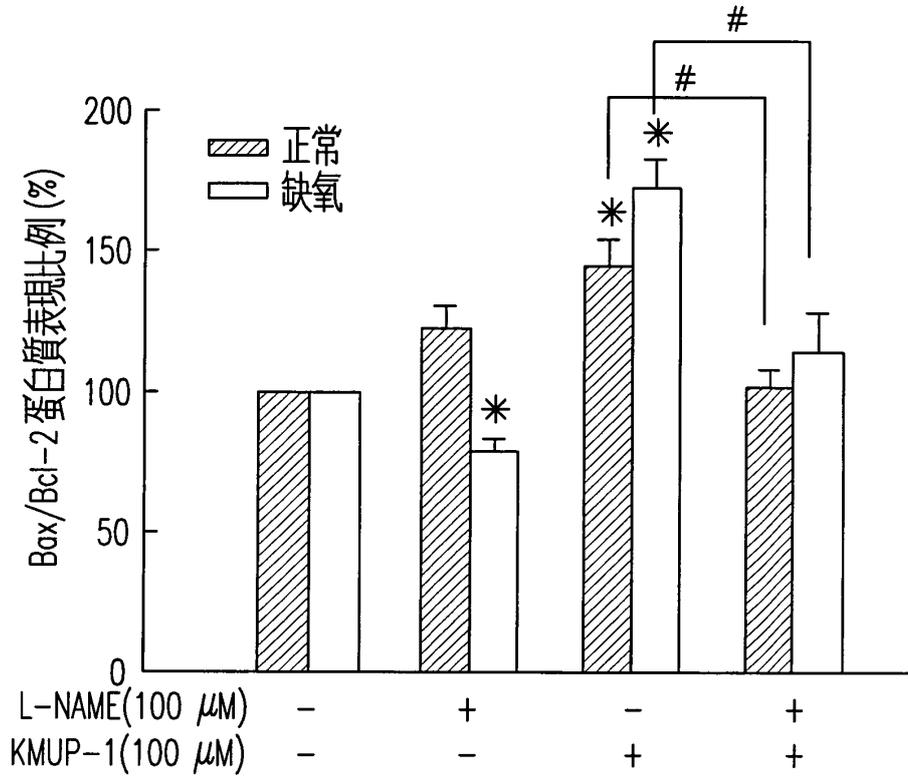
第二十圖(A)



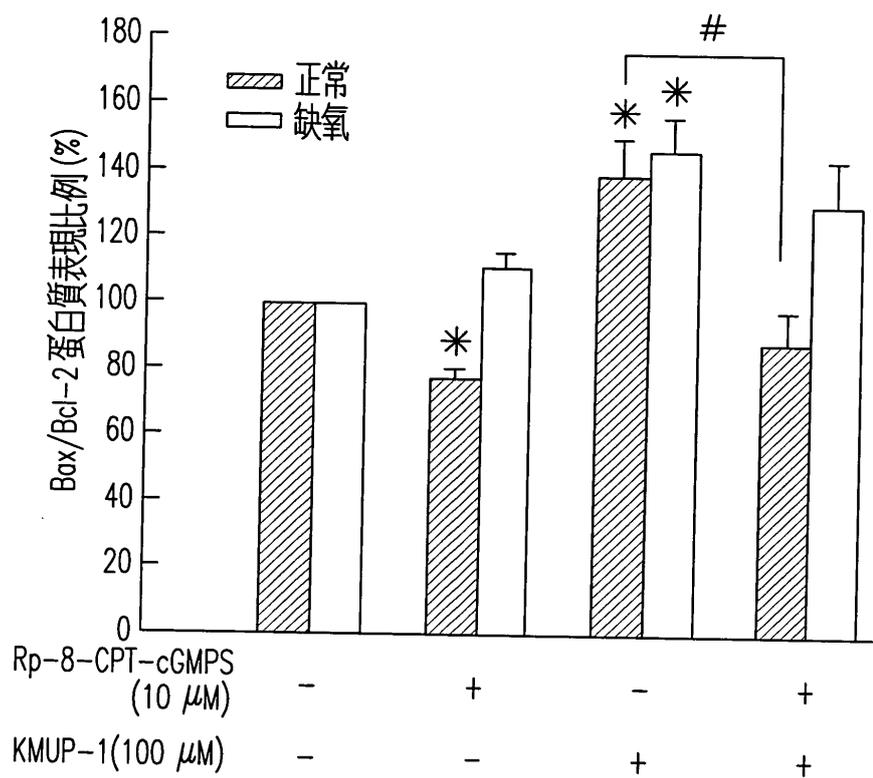
第二十圖(B)



第二十一圖

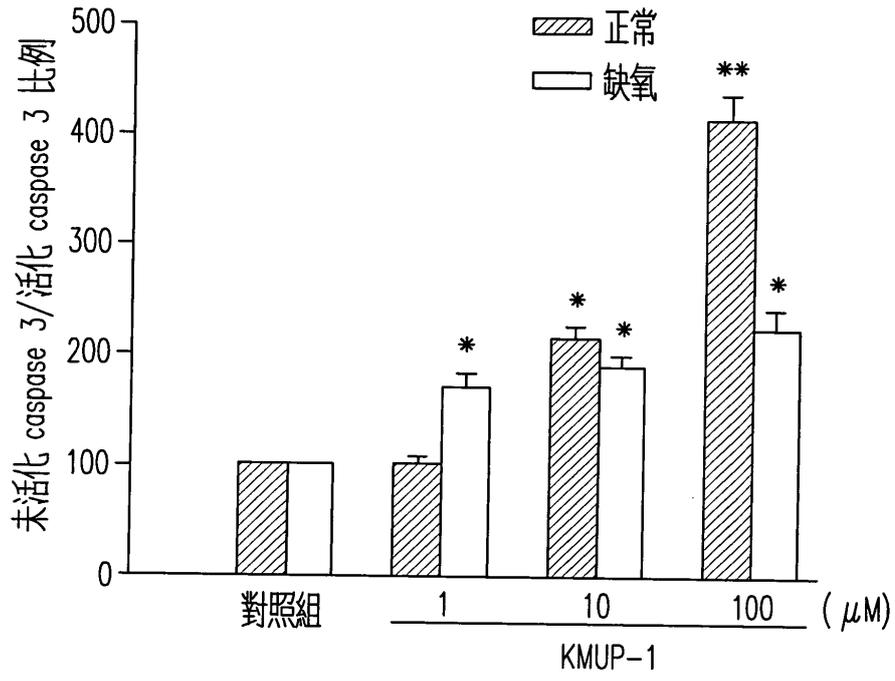


第二十二圖

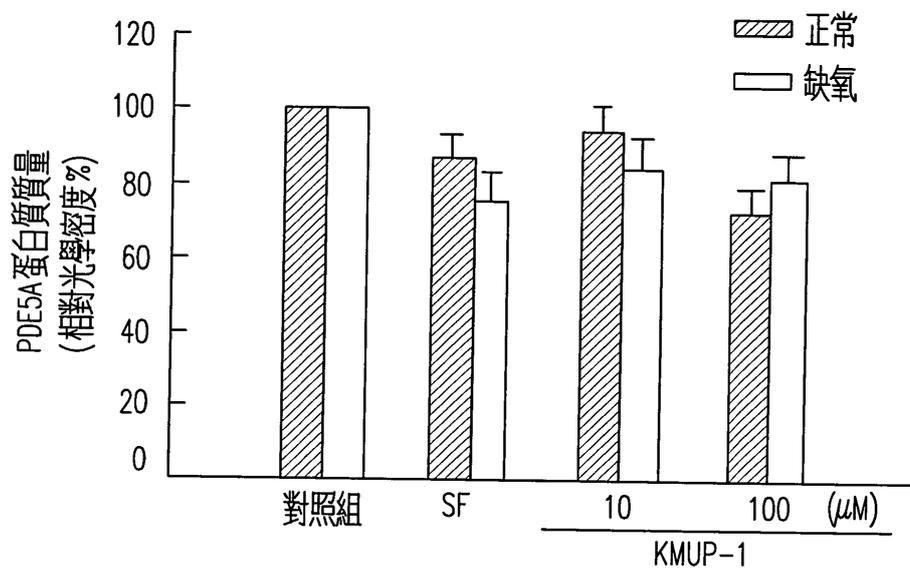


第二十三圖

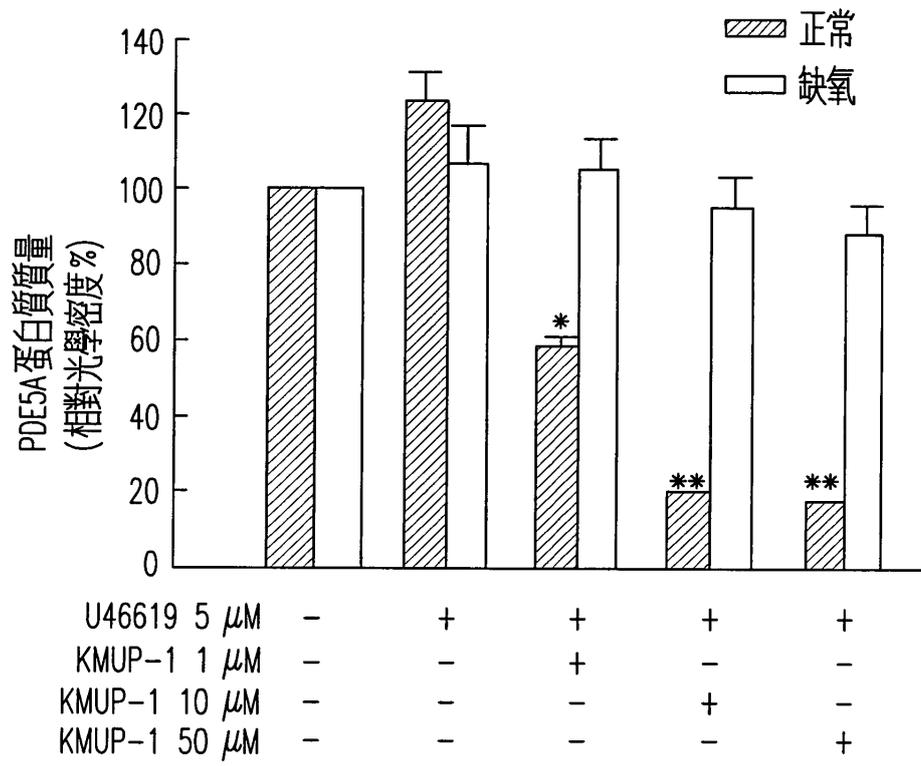
(23)



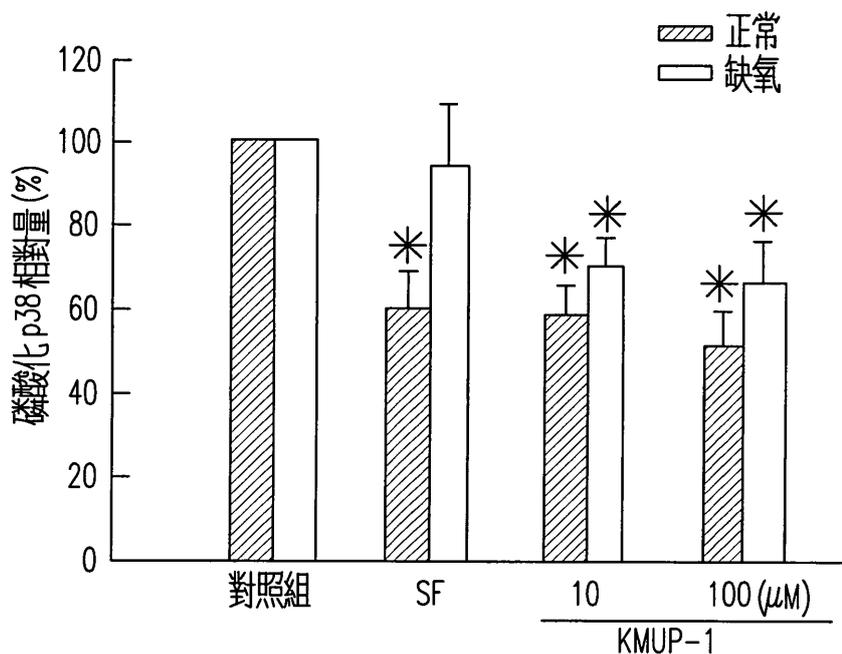
第二十四圖



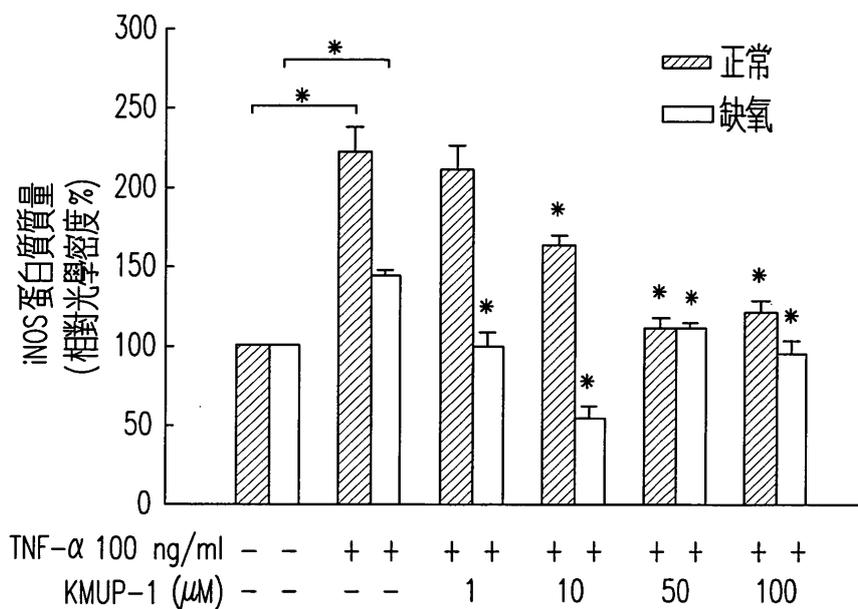
第二十五圖



第二十六圖



第二十七圖



第二十八圖