

三、發明人：(共 3 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 許志宏  
SHEU, JYH-HORNG

2. 趙子華  
CHAO, CHIH-HUA

3. 溫志宏  
WEN, ZHI-HONG

國 籍：(中文/英文)

1. 中華民國 R.O.C.

2. 中華民國 R.O.C.

3. 中華民國 R.O.C.

#### 四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項第一款或第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

## 九、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種新穎之含硫化合物。該含硫化合物可抑制誘發型一氧化氮合成酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)及/或第二型環氧合酶(cyclooxygenase-2, COX-2)之作用。

### 【先前技術】

隨著文明進步，人類除延長壽命外，更重視生活品質之提升。然而至今有許多疾病，例如癌症、慢性疼痛與動脈粥狀硬化，仍無專一且有效治療或預防之藥物。

許多研究報告證實發炎性反應於許多疾病之發生上扮演重要角色。這些發炎性相關疾病之發生和許多例如自由基、污染、飲食及壽命之外在壓力環境所誘發之身體慢性且長期發炎密切相關。

動脈粥狀硬化(atherosclerosis)作用造成血管重塑(remolding)，進而導致血管內徑變小。此病變為引起如心肌梗塞(myocardial infarction)、中風(stroke)及週邊血管病變之急性且致命心血管疾病之重要原因。心血管疾病亦為文明進步國家重大死因之一(Libby, Am J Clin Nutr 83:456S-460S, 2006)。研究報告已證實，動脈粥狀硬化為一種慢性發炎性心血管疾病(Ross, N Engl J Med 340: 115-126, 1999)，因早期血管內皮細胞受到壓力或破壞，誘發單核細胞分化為巨噬細胞並大量聚集在受損組織周圍，經由一連串發炎性反應，導致血管內平滑肌細胞增生及相關

發炎性細胞聚集，最後使血管之血流功能受損進而引發心血管疾病 (Lucas與 Greaves, *Exp Rev Mol Med* 5:1-18, 2001; Gordon, *Bioessays* 17:977-986, 1995; Majno與 Joris, *Cells, Tissues and Disease: Principles of General Pathology*, Blackwell Science, Cambridge, MA, USA, 1996)。於動物實驗之研究結果顯示誘發型一氧化氮合成酶及第二型環氧合酶此兩種發炎性反應關鍵蛋白質在動脈粥狀硬化上扮演重要角色 (Cipollone, *Lupus* 14:756-759, 2005; Boyle, *Curr Vasc Pharmacol* 3:63-68, 2005)。此外，從人類粥狀硬化組織中 (包含巨噬細胞、增生之平滑肌細胞) 亦可發現大量誘發型一氧化氮合成酶及第二型環氧合酶之表現及大量巨噬細胞聚集 (Baker等人, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:646-655, 1999; Buttery等人, *Lab Invest* 75:77-85, 1996)。目前亦證實給予誘發型一氧化氮合成酶或第二型環氧合酶選擇性抑制劑可顯著預防粥狀硬化之發生 (Burleigh等人, *Circulation* 105:1816-23, 2002; Hayashi等人, *Atherosclerosis* 187:316-324, 2006; Pratico等人, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:646-655, 2001)。

根據國際疼痛醫學會 (International Association for the Study of Pain, IASP) 之定義，疼痛是一種伴隨著實質或潛在組織傷害所引起之不愉快情緒或感官經驗。尤其現今人類壽命延長，人們遭受各類型疼痛攻擊的機會及時間一再提高。保守估計全球每年止痛藥消費量約為一千億美元，

經由疼痛控制進而提高生活品質為一重要之課題。於各式疼痛中，神經病理性疼痛之起因眾多，如糖尿病所引起之末端循環不良或截肢、外傷所導致之神經受損、病毒感染及起因不明的疼痛。目前臨床上有關止痛藥物可分為具成癮性止痛藥與非成癮性止痛藥。成癮性止痛藥以鴉片類 (opiate) 為主，然而鴉片類藥物對神經病理性疼痛之止痛效果並不好。非成癮性止痛藥可分為類固醇型 (steroid) 及非類固醇型 (non-steroid)。類固醇型止痛藥主要經由抗發炎途徑進而達到止痛的效果，其專一性差、副作用大且無法長期服用；而非成癮性之非類固醇型藥物又可分成單純止痛型 (如普拿疼) 及消炎止痛型 (如阿斯匹靈)。目前非類固醇型消炎止痛藥 (non-steroid anti-inflammatory drug ; NSAID) 是目前咸認副作用較低相對安全之藥物。於各式類固醇型消炎止痛劑中選擇性較高者之藥理機制主要係藉由抑制第二型環氧合酶或誘發型一氧化氮合成酶之訊息路徑，進而達到消炎止痛之作用 (Turini 與 DuBois, Annual Rev Med 53:35, 2002 ; Handy 等人, Br J Pharmacol 123:1119-1126, 1998 ; Osborne 等人, Br J Pharmacol 126:1840-1846, 1999)。目前已有研究報告證實在中樞神經系統及週邊組織中由誘發型一氧化氮合成酶或第二型環氧合酶所催化之產物 NO 或 PGE<sub>2</sub>，對疼痛的產生、維持及敏感化十分重要 (Moalem 及 Tracey, Brain Res Rev 51:240-264, 2006)。有別於神經阻斷劑使用於止痛作用會影響運動功能，給予誘發型一氧化氮合成酶或第二型環氧合酶抑

制劑並不易產生運動功能下降及神經受損之副作用，故為目前止痛藥物開發上一重要之方向。

### 【發明內容】

本發明之一目的在於提供一種新穎之含硫化合物，其可經由化學合成，在離體實驗模式具顯著抑制發炎性蛋白質之作用，於活體實驗亦證明該含硫化合物具有治療與誘發型一氧化氮合成酶及/或第二型環氧合酶作用相關疾病之效果。

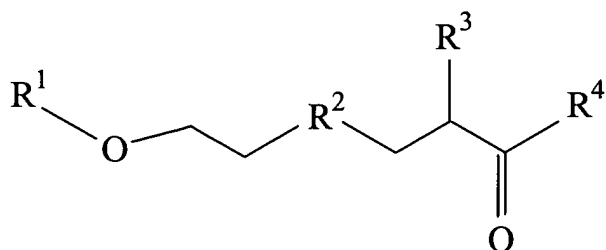
本發明之另一目的在於提供一種新穎之含硫化合物製造方法。

本發明又一目的在於提供一種醫藥組合物，其包含如上述之含硫化合物。

本發明再一目的在於提供一種如上述含硫化合物於製造藥物之用途，該藥物可用於治療與誘發型一氧化氮合成酶及/或第二型環氧合酶作用相關疾病。

### 【實施方式】

本發明含硫化合物具有以下式1之結構，



式 1，

其中：

R<sup>1</sup>係選自由H、R<sup>5</sup>及R<sup>5</sup>C(=O)所組成之群；

R<sup>2</sup>係選自由S及(O=S(=O))所組成之群；

$R^3$  係選自由 H、 $CH_3$  及  $CH_2CH_2C(=O)OR^5$  所組成之群；

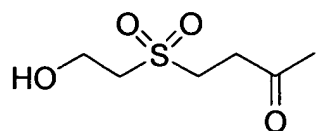
$R^4$  係選自由  $R^5$ 、 $OR^5$ 、 $-NCH_2CH_2OCH_2CH_2$ 、 $N(R^5)_2$ 、 $NH_2$ 、 $NHR^5$  及  $OH$  所組成之群；

$R^5$  係選自由具有一至六個碳之烷基及經取代或未經取代之苯基所組成之群，較佳地， $R^5$  係選自由甲基、乙基及未經取代之苯基所組成之群；

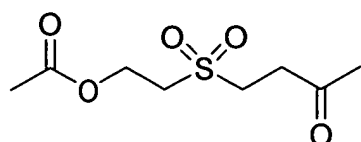
但當  $R^3$  為  $CH_2CH_2C(=O)OR^5$  時， $R^4$  為  $OR^5$ ；及

$R^1$  為 H、 $R^2$  為 S 及  $R^3$  為 H 時， $R^4$  不為  $CH_3$ 。

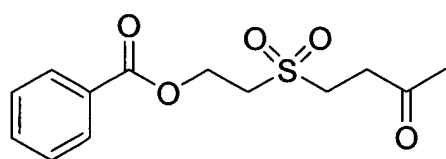
根據本發明之較佳具體實施例，上述式 1 化合物具有如下所示的化學結構式：



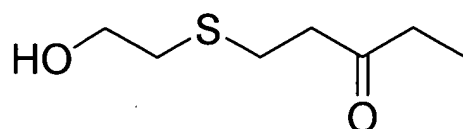
式 3，



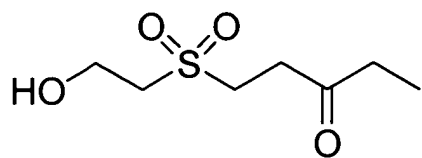
式 4，



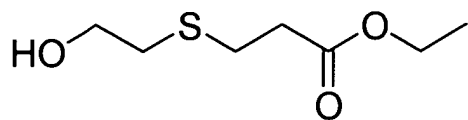
式 5，



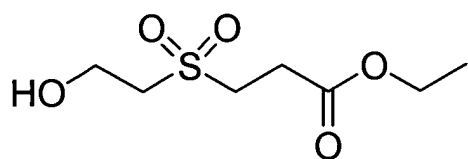
式 6，



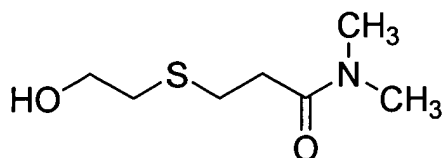
式 7，



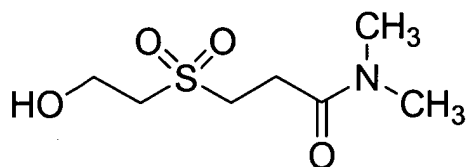
式 8，



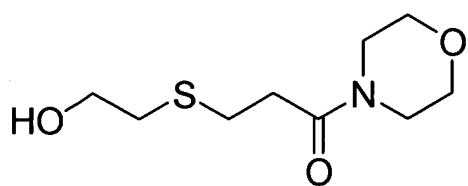
式 9，



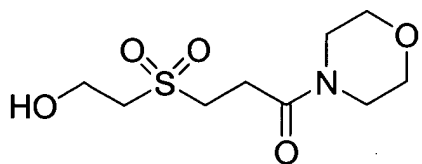
式 10，



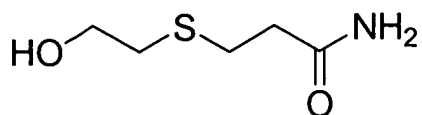
式 11，



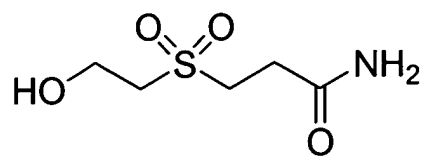
式 12，



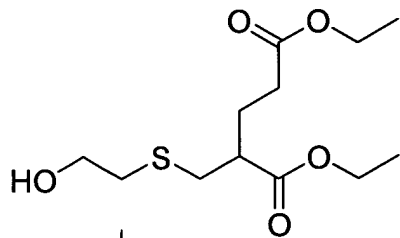
式 13，



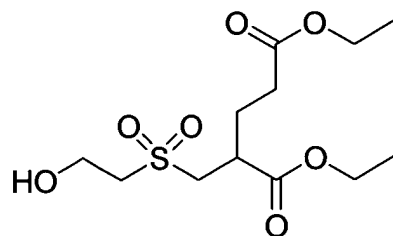
式 14，



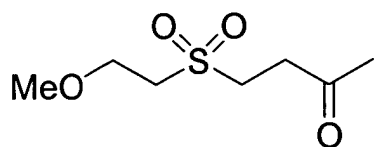
式 15，



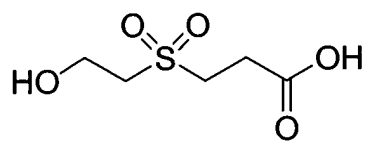
式 16，



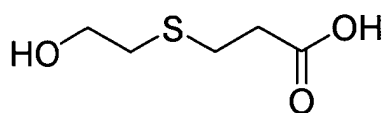
式 17，



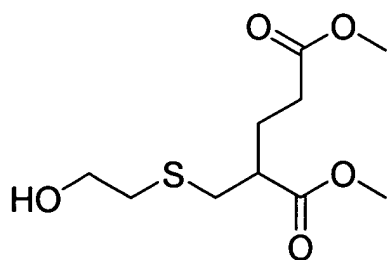
式 18，



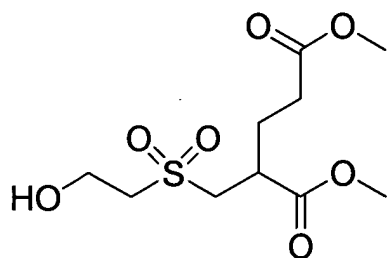
式 19，



式 20，

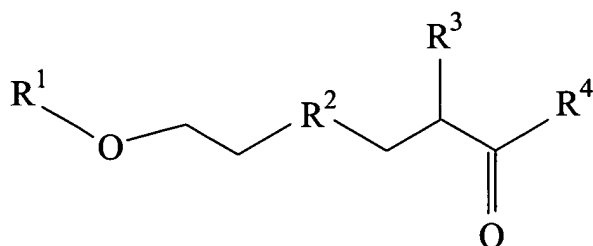


式 21, 或



式 22。

本發明亦提供式 2 化合物之製備方法，



式 2,

其中：

$R^1$  係選自由 H、 $R^5$  及  $R^5C(=O)$  所組成之群；

$R^2$  係選自由 S 及  $(O=)S(=O)$  所組成之群；

$R^3$  係選自由 H、 $CH_3$  及  $CH_2CH_2C(=O)OR^5$  所組成之群；

$R^4$  係選自由  $R^5$ 、 $OR^5$ 、 $-NCH_2CH_2OCH_2CH_2$ 、 $N(R^5)_2$ 、 $NH_2$ 、 $NHR^5$  及  $OH$  所組成之群；

$R^5$  係選自由具有一至六個碳之烷基及經取代或未經取代之苯基所組成之群；

但當  $R^3$  為  $CH_2CH_2C(=O)OR^5$  時， $R^4$  為  $OR^5$ ；

包括：

(I) 當  $R^1$  為 H 及  $R^2$  為 S 時，以如式 23 所示結構之化合物

(II) 當  $R^1$  為  $R^5C(=O)$  時，該方法包含將如式 25 所示結構之化合物進行酯化反應。

較佳地，該反應係於三乙基胺存在下進行。於本發明之一具體實施例中，上述反應物係溶解於二氯甲烷中。

於本發明之一較佳具體實施例中，當  $R^1$  為  $CH_3C(=O)$  時，該方法包含將如式 25 所示結構之化合物與乙酸酐反應；於本發明之另一較佳具體實施例，當  $R^1$  為  $C_6H_5C(=O)$  時，該方法包含將如式 25 所示結構之化合物與苯甲酸醯氯 (benzoyl chloride) 反應。

(III) 當  $R^1$  為  $R^5$  時，該方法包含將如式 25 所示結構之化合物進行烷基化反應；

於本發明之一較佳具體實施例中，當  $R^1$  為  $CH_3$  時，該方法包含將如式 25 所示結構之化合物與  $CH_3I$  反應。

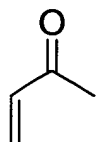
(IV) 當  $R^2$  為  $(O=)S(=O)$  時，該方法包含將如式 25 所示結構之化合物進行氧化反應。

較佳地，氧化反應係以過氧化氫或間氯過氧苯甲酸 (meta-chloroperoxybenzoic acid) 進行。於本發明之一具體實施例中，當使用過氧化氫進行氧化時，該氧化反應係於  $MnSO_4 \cdot H_2O$  催化下進行反應。另一方面，該反應物係溶解於乙腈中；當使用間氯過氧苯甲酸反應時，反應物係溶解於二氯甲烷中。

(V) 當  $R^1$  為  $R^5C(=O)$  及  $R^2$  為  $(O=)S(=O)$  時，該方法包含將如式 25 所示結構之化合物進行如上所述之酯化及氧化反應。

(VI) 當  $R^1$  為  $R^5$  及  $R^2$  為  $(O=)S(=O)$  時，該方法包含將如式 25 所示結構之化合物進行如上所述之烷基化及氧化反應。

(VII) 當  $R^1$  為 H、 $R^2$  為 S、 $R^3$  為 H 且  $R^4$  為  $CH_3$  時，該方法包含以如式 27 所示結構之化合物



式 27

與如式 24 所示結構之 2-巰乙醇於三乙基胺存在下反應而得。

本發明又關於一種醫藥組合物，其包含治療有效量之如上述式 1 所示結構之化合物。由於本發明化合物具有抑制一氧化氮合成酶及/或第二型環氧合酶作用之效果，故可用以治療與誘發型一氧化氮合成酶及/或第二型環氧合酶作用相關之疾病。由於先前文獻已報導許多疾病的發生與一氧化氮合成酶及/或第二型環氧合酶之作用相關，如關節炎 (arthritis) (Cuzzocrea 等人，*Arthritis Rheum.* 52:1929-40, 2005)、多發性硬化症 (multiple sclerosis) (Misko 等人，*J Neuroimmunol.* 61:195-204, 1995)、發炎性疼痛 (inflammatory pain) (Toriyabe 等人，*Anesthesiology* 101, 983-990, 2004) 及脊髓損傷 (spinal cord injury) (Lopez-Vales 等人，*Spine.* 31:1100-6, 2006)，因此較佳地，該疾病係選自由發炎、動脈粥狀硬化、神經病理性疼痛、發炎性血管內膜增生、關節炎、多發性硬化症、發炎性疼痛及脊髓損傷所組成之群。於一活體大白鼠動脈硬化模式中，

證實根據本發明之化合物具抗動脈粥狀硬化之作用。於本發明之另一具體實施例中，從椎管(intrathecal)注射可以有效治療神經病理性疼痛。

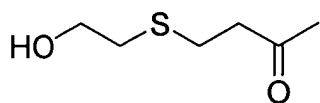
本發明之醫藥組合物可以口服或注射方式給予，較佳地，其係為針劑之劑型。

本發明之另一目的在於提供一種如上述式1所示結構之化合物於製備藥物之用途，該藥物係用於治療與誘發型一氧化氮合成酶及/或第二型環氧合酶作用相關的疾病。

本發明茲以下列實例予以進一步說明，唯不僅侷限於此等實例所揭示之內容。

#### 實例1：化合物之合成一

在單口圓底瓶中加入2-巰乙醇(1.80 g, 98%, 27.14 mmole)以及三乙基胺(0.53 mL, 3.77 mmole)，並以22 mL 丙酮溶解之，於0°C冰浴下攪拌。再將甲基乙烯基酮(methyl vinyl ketone)(2.31 mL, 27.14 mmole)溶於4 mL丙酮中，並將其緩緩滴入上述單口圓底瓶中，待全部加完後，讓整個反應慢慢回升到室溫。反應進行16個小時之後，直接減壓濃縮，再以矽膠管柱分離(以hexane/EtOAc = 2:1沖提)，以得到如式26所示結構之硫醚類化合物(3.35 g, 產率100%)。



式26。

式26所示結構之硫醚類化合物：無色油狀，IR (KBr)

$\nu_{\max}$  3405, 1713, 1416, 1362, 1161, 1045, 1010  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta_{\text{H}}$  3.73 (2H, dt,  $J = 5.6, 5.4$  Hz), 2.75 (4H, br s), 2.72 (2H, t,  $J = 5.4$  Hz), 2.46 (1H, t,  $J = 5.6$  Hz, OH) 2.17 (3H, s);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta_{\text{C}}$  207.0 (qC), 60.6 ( $\text{CH}_2$ ), 43.7 ( $\text{CH}_2$ ), 35.6 ( $\text{CH}_2$ ), 30.2 ( $\text{CH}_3$ ), 25.4 ( $\text{CH}_2$ ); ESIMS  $m/z$  171 [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$ ; HRESIMS  $m/z$  171.0458 [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$  (計算為  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_2\text{SNa}$ , 171.0456)。

### 實例2：化合物之合成二

取上述實例一所製得的如式26所示結構之硫醚類化合物 (1.00 g, 6.76 mmole) 以及  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (23 mg, 0.14 mmole) 於 500 mL 單口圓底瓶中，溶於乙腈 (156 mL)，整個反應置於室溫下劇烈攪拌之 (稱之為 A 瓶)。另準備一個 250 mL 錐形瓶，在  $0^\circ\text{C}$  下於錐形瓶內加入預先製備好的碳酸氫鈉緩衝液 (115 mL, 0.2 M,  $\text{pH} = 8.0$ ) 以及 30% 的過氧化氫水溶液 (3.38 mL)，攪拌均勻後用滴管吸取此溶液分批慢慢加入 A 瓶中，待加完此溶液，經過兩個小時後直接加入乙酸乙酯/異丙醇 (3:1) 混合溶劑萃取 (200 mL  $\times$  6)，合併所有的有機萃取液，經減壓濃縮後，再以矽膠管柱純化 ( $\text{hexane}/\text{EtOAc} = 1:3$ )，最後得到如式3所示結構之化合物 1.03 g，產率 84%。

式3所示結構之化合物：無色結晶； $\text{mp} = 59 - 60^\circ\text{C}$ ；IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3416, 1715, 1416, 1366, 1311, 1120, 1009  $\text{cm}^{-1}$ ； $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta_{\text{H}}$  4.02 (2H, t,  $J = 5.4$  Hz), 3.36 (2H, t,  $J = 7.3$  Hz), 3.21 (2H, t,  $J = 5.4$  Hz), 2.97 (2H,

t,  $J = 7.3$  Hz), 2.20 (3H, s);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta_{\text{C}}$  204.9 (qC), 56.0 ( $\text{CH}_2$ ), 55.7 ( $\text{CH}_2$ ), 48.7 ( $\text{CH}_2$ ), 34.9 ( $\text{CH}_2$ ), 29.7 ( $\text{CH}_3$ ); ESIMS  $m/z$  203  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ; HRESIMS  $m/z$  203.0354  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (計算為  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_4\text{SNa}$ , 203.0354)。

### 實例3：化合物之合成三

取上述實例一所製得的如式26所示結構之硫醚類化合物 (1.00 g, 6.76 mmole) 於 125 mL 單口圓底瓶中並以二氯甲烷 (64 mL) 溶解之，並於室溫下攪拌。接著稱取 2.92g 的間氯過氧苯甲酸 (meta-chloroperoxybenzoic acid, 16.90 mmole) 分批慢慢加入上述單口圓底瓶中，待加完後，以 TLC 追蹤直至反應物完全耗完為止，再將二氯甲烷抽乾，接著加入飽和碳酸氫鈉水溶液 100 mL 劇烈搖晃後以乙酸乙酯萃取 (100 mL  $\times$  10)，合併乙酸乙酯萃取液，經減壓濃縮後，再以矽膠管柱純化 (hexane/EtOAc = 3 : 2 至 1 : 3)，最後得到如式3所示結構之化合物 1.00 g，產率 82%。

### 實例4：化合物之合成四

在 20 mL 樣品瓶中加入如式3所示結構之化合物 (20 mg, 0.114 mmole) 以及三乙基胺 (25  $\mu\text{L}$ )，並以 2 mL 二氯甲烷溶解之，於室溫下攪拌。接著加入乙酸酐 40  $\mu\text{L}$ 。反應進行 16 個小時之後，直接減壓濃縮，再以矽膠管柱分離 (hexane/EtOAc = 2 : 3)，得到如式4所示結構之化合物 25.0 mg，產率 98%。

式4所示結構之化合物：無色油狀；IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  1743, 1720, 1366, 1317, 1234, 1125, 1070, 1036  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR

(CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta_{\text{H}}$  4.52 (2H, t,  $J = 5.8$  Hz), 3.36 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz), 3.34 (2H, t,  $J = 5.8$  Hz), 3.03 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz), 2.25 (3H, s), 2.11 (3H, s); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta_{\text{C}}$  204.0 (qC), 170.2 (qC), 57.5 (CH<sub>2</sub>), 52.8 (CH<sub>2</sub>), 48.5 (CH<sub>2</sub>), 34.9 (CH<sub>2</sub>), 29.8 (CH<sub>3</sub>), 20.7 (CH<sub>3</sub>); ESIMS  $m/z$  245 [M + Na]<sup>+</sup>。

#### 實例5：化合物之合成五

在 20 mL 樣品瓶中加入如式 3 所示結構之化合物 (20 mg, 0.114 mmole) 以及三乙基胺 (25  $\mu\text{L}$ )，並以 2 mL 二氯甲烷溶解之，於室溫下攪拌。接著加入苯甲酸醯氯 50  $\mu\text{L}$ 。反應進行 5 個小時之後，直接減壓濃縮，再以矽膠管柱分離 (hexane/EtOAc = 5 : 1)，得到如式 5 所示結構之化合物 29.8 mg，產率 92%。

如式 5 所示結構之化合物：無色結晶；mp = 79 - 80 °C；IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  1714, 1710, 1315, 1276, 1133, 1119  $\text{cm}^{-1}$ ；<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta_{\text{H}}$  8.04 (2H, d,  $J = 7.5$  Hz), 7.60 (1H, t,  $J = 7.5$  Hz), 7.47 (2H, t,  $J = 7.5$  Hz), 4.78 (2H, t,  $J = 5.7$  Hz), 3.48 (2H, t,  $J = 5.7$  Hz), 3.41 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz), 3.03 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz), 2.21 (3H, s); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta_{\text{C}}$  203.8 (qC), 165.8 (qC), 133.5 (CH), 129.6 (CH  $\times$  2), 129.0 (qC), 128.6 (CH  $\times$  2), 58.0 (CH<sub>2</sub>), 53.0 (CH<sub>2</sub>), 48.6 (CH<sub>2</sub>), 34.9 (CH<sub>2</sub>), 29.7 (CH<sub>3</sub>) ; ESIMS  $m/z$  307 [M + Na]<sup>+</sup>。

#### 實例6：化合物之合成六

如實例一及二之製造方法，分別以共軛不飽和物乙基乙  
 烯基酮(ethyl vinyl ketone)、丙烯酸乙酯、N,N-二甲基丙  
 烯醯胺(N,N-dimethylacrylamide)、4-丙烯醯嗎啉(4-  
 acryloylmorpholine)以及丙烯醯胺(acrylamide)和2-巰乙醇  
 反應，而得到如式6、8、10、12及14所示結構之硫醚類化  
 合物。其中只有在製備如式14所示之化合物時，由於丙烯  
 醯胺溶解度不佳，因此需要在混合溶劑系統(甲醇/丙酮 =  
 1 : 1)下進行。這些反應中間產物再以過氧化氫進行氧化  
 反應，即可分別得到如式7(總產率87%)、9(總產率85%)、  
 11(總產率87%)、13(總產率83%)及15(總產率75%)所示結  
 構之化合物。此外如式16所示之化合物乃是丙烯酸乙酯與  
 2-巰乙醇在完全不使用溶劑的狀態下所產生，在此一反應  
 條件下除了得到如式16所示之化合物(產率22%)之外，也  
 同時得到如式8所示結構之化合物(產率45%)。如式17所示  
 結構之化合物的製備乃是以如式16所示結構之化合物為反  
 應物經過氧化氫氧化所製備(產率84%)。

如式6所示結構之化合物：無色油狀；IR (KBr)  $\nu_{\max}$   
 3418, 1714, 1458, 1411, 1375, 1361, 1113, 1046, 1013  $\text{cm}^{-1}$ ;  
 $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta_{\text{H}}$  3.75 (2H, t,  $J = 6.2$  Hz),  
 2.70-2.80 (6H, m), 2.48 (2H, q,  $J = 7.3$  Hz), 1.06 (3H, t,  $J =$   
 7.3 Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta_{\text{C}}$  209.9 (qC), 60.6  
 ( $\text{CH}_2$ ), 42.0 ( $\text{CH}_2$ ), 35.9 ( $\text{CH}_2$ ), 34.8( $\text{CH}_2$ ), 25.3 ( $\text{CH}_2$ ), 7.3  
 ( $\text{CH}_3$ ); ESIMS  $m/z$  185 [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$ 。

如式7所示結構之化合物：無色針狀；mp = 44 - 45  $^{\circ}\text{C}$ ;

IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3419, 1715, 1312, 1280, 1123  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta_{\text{H}}$  4.01 (2H, t,  $J = 5.2$  Hz), 3.36 (2H, t,  $J = 7.3$  Hz), 3.19 (2H, t,  $J = 5.2$  Hz), 2.93 (2H, t,  $J = 7.3$  Hz), 2.47 (2H, q,  $J = 7.3$  Hz), 1.01 (3H, t,  $J = 7.3$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta_{\text{C}}$  207.6 (qC), 56.0 ( $\text{CH}_2$ ), 55.7 ( $\text{CH}_2$ ), 48.8 ( $\text{CH}_2$ ), 35.8 ( $\text{CH}_2$ ), 33.6 ( $\text{CH}_2$ ), 7.5 ( $\text{CH}_3$ ); ESIMS  $m/z$  217  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ .

如式 8 所示結構之化合物：無色油狀；IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3440, 1732, 1373, 1249, 1185, 1044  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta_{\text{H}}$  4.16 (2H, q,  $J = 7.1$  Hz), 3.74 (2H, t,  $J = 6.1$  Hz), 2.82 (2H, t,  $J = 7.1$  Hz), 2.74 (2H, t,  $J = 6.1$  Hz), 2.62 (2H, t,  $J = 7.1$  Hz), 1.27 (3H, t,  $J = 7.1$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta_{\text{C}}$  172.1 (qC), 60.8 ( $\text{CH}_2 \times 2$ ), 35.1 ( $\text{CH}_2$ ), 34.9 ( $\text{CH}_2$ ), 26.8 ( $\text{CH}_2$ ), 14.2 ( $\text{CH}_3$ ); ESIMS  $m/z$  201  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ .

如式 9 所示結構之化合物：無色油狀；IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3503, 1732, 1313, 1281, 1120, 1065  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta_{\text{H}}$  4.19 (2H, q,  $J = 7.1$  Hz), 4.12 (2H, t,  $J = 5.0$  Hz), 3.46 (2H, t,  $J = 7.4$  Hz), 3.25 (2H, t,  $J = 5.0$  Hz), 2.88 (2H, t,  $J = 7.4$  Hz), 1.28 (3H, t,  $J = 7.1$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta_{\text{C}}$  170.7 (qC), 61.5 ( $\text{CH}_2$ ), 56.2 ( $\text{CH}_2$ ), 55.6 ( $\text{CH}_2$ ), 49.9 ( $\text{CH}_2$ ), 26.8 ( $\text{CH}_2$ ), 14.0 ( $\text{CH}_3$ ); ESIMS  $m/z$  233  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ .

如式 10 所示結構之化合物：無色油狀；IR (KBr)  $\nu_{\max}$

3399, 1630, 1500, 1403, 1143, 1048, 1014  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta_{\text{H}}$  3.77 (2H, t,  $J = 5.9$  Hz), 3.02 (3H, s), 2.96 (3H, s), 2.87 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz), 2.75 (2H, t,  $J = 5.9$  Hz), 2.62 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta_{\text{C}}$  171.1 (qC), 60.8 ( $\text{CH}_2$ ), 37.0 ( $\text{CH}_3$ ), 35.4 ( $\text{CH}_3 \times 1$ ,  $\text{CH}_2 \times 1$ ), 33.5 ( $\text{CH}_2$ ), 26.8 ( $\text{CH}_2$ ); ESIMS  $m/z$  200  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 。

如式 11 所示結構之化合物：無色油狀；IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  3371, 1634, 1503, 1405, 1312, 1278, 1119, 1065  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta_{\text{H}}$  4.06 (2H, t,  $J = 5.2$  Hz), 3.49 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz), 3.25 (2H, t,  $J = 5.2$  Hz), 3.03 (3H, s), 2.94 (3H, s), 2.87 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta_{\text{C}}$  169.4 (qC), 56.2 ( $\text{CH}_2$ ), 56.0 ( $\text{CH}_2$ ), 50.3 ( $\text{CH}_2$ ), 37.1 ( $\text{CH}_3$ ), 35.7 ( $\text{CH}_3$ ), 25.7 ( $\text{CH}_2$ ); ESIMS  $m/z$  232  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 。

如式 12 所示結構之化合物：無色油狀；IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  3418, 1633, 1463, 1437, 1271, 1248, 1115, 1067, 1028  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta_{\text{H}}$  3.76 (2H, t,  $J = 6.0$  Hz), 3.69 (4H, m), 3.63 (2H, m), 3.48 (2H, dd,  $J = 4.5, 4.9$  Hz), 2.87 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz), 2.74 (2H, t,  $J = 6.0$  Hz), 2.63 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta_{\text{C}}$  169.8 (qC), 66.6 ( $\text{CH}_2$ ), 66.3 ( $\text{CH}_2$ ), 60.8 ( $\text{CH}_2$ ), 45.7 ( $\text{CH}_2$ ), 41.9 ( $\text{CH}_2$ ), 35.2 ( $\text{CH}_2$ ), 33.2 ( $\text{CH}_2$ ) 26.8 ( $\text{CH}_2$ ); ESIMS  $m/z$  242  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 。

如式 13 所示結構之化合物：無色針狀；mp = 109-110 $^{\circ}\text{C}$ ；

IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3420, 1637, 1452, 1311, 1275, 1117, 1067, 1028  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta_{\text{H}}$  4.06 (2H, t,  $J = 5.2$  Hz), 3.57-3.67 (6H, m), 3.49 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz), 3.47 (2H, m), 3.25 (2H, t,  $J = 5.2$  Hz), 2.86 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta_{\text{C}}$  168.0 (qC), 66.5 ( $\text{CH}_2$ ), 66.3 ( $\text{CH}_2$ ), 56.2 ( $\text{CH}_2$ ), 56.0 ( $\text{CH}_2$ ), 50.2 ( $\text{CH}_2$ ), 45.7 ( $\text{CH}_2$ ), 42.3 ( $\text{CH}_2$ ) 25.3 ( $\text{CH}_2$ ); ESIMS  $m/z$  274 [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$ 。

如式 14 所示結構之化合物：白色粉末；IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3354, 3196, 1661, 1414  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (pyridine- $d_5$ , 300 MHz)  $\delta_{\text{H}}$  4.02 (2H, t,  $J = 6.7$  Hz), 3.13 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz), 2.93 (2H, t,  $J = 6.7$  Hz), 2.82 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (pyridine- $d_5$ , 75 MHz)  $\delta_{\text{C}}$  174.3 (qC), 61.7 ( $\text{CH}_2$ ), 36.6 ( $\text{CH}_2$ ), 35.2 ( $\text{CH}_2$ ), 28.1 ( $\text{CH}_2$ ) ; ESIMS  $m/z$  172 [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$ 。

如式 15 所示結構之化合物：白色粉末；IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3370, 3200, 1661, 1395  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (pyridine- $d_5$ , 300 MHz)  $\delta_{\text{H}}$  4.35 (2H, t,  $J = 5.6$  Hz), 4.06 (2H, t,  $J = 7.6$  Hz), 3.64 (2H, t,  $J = 5.6$  Hz), 3.25 (2H, t,  $J = 7.6$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (pyridine- $d_5$ , 75 MHz)  $\delta_{\text{C}}$  174.3 (qC), 61.7 ( $\text{CH}_2$ ), 36.6 ( $\text{CH}_2$ ), 35.2 ( $\text{CH}_2$ ), 28.1 ( $\text{CH}_2$ ) ; ESIMS  $m/z$  204 [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$ 。

如式 16 所示結構之化合物：無色油狀；IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3438, 1731, 1377, 1299, 1206, 1162, 1043  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta_{\text{H}}$  4.10 (2H, q,  $J = 7.0$  Hz), 4.05 (2H, q,

載之方式，於雄性 Wistar 大白老鼠枕骨大孔附近打開硬腦膜後，植入長 8.5 公分之 PE 管 (外徑 0.014 英吋，內徑 0.008 英吋)，藥物作用部位為脊髓腰薦 (lumbar) 附近，而注射藥物端則固定在頭部。手術後出現運動功能不全或椎管內有血液之動物捨去不用。

#### 神經病理性疼痛動物模式

仿自於 1988 年 Bennett 及 Xie (Pain 33:87-107) 所建立之坐骨神經慢性壓迫 (sciatic nerve chronic constriction injury; CCI) 誘發神經病理性疼痛模式，使用 4-0 羊腸線於大白老鼠坐骨神經上綁四個結，一週後即可順利誘發對溫度之疼痛過敏 (thermal hyperalgesia) 行為。溫度疼痛過敏行為分析仿 Hargreaves 等人於 1988 年 (Pain 32:77-88) 所建立方式，並利用腳掌疼痛刺激記錄儀 (analgesimeter; IITC Inc., Woodland Hills, CA, USA)，評估如式 3 所示結構之化合物對於神經病理性疼痛之止痛作用。

每一隻實驗動物之數據以最大影響作用 (maximum percent effect, MPE) 呈現，並進行統計分析。

$$\text{MPE (\%)} = \frac{\text{給藥後反應時間} - \text{基礎反應時間}}{30 \text{秒} - \text{基礎反應時間}} \times 100\%$$

MPE 值越大代表止痛效用越好，但最大值為 100。

#### 大白鼠動脈粥狀硬化模式

完全仿自 Berger 等人 (Atherosclerosis 175:229-234, 2004) 及 Chen 等人 (Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol

368:127-133, 2003) 文獻, 實驗動物以 2.5% 活寧 (isoflurane, 空氣和氧氣以 1:1 混合), 利用 2F 氣球擴張導管。首先將導管預先以沙林溶液注滿, 再把導管由右側頸部之外頸動脈 (external carotid artery) 進入右側頸總動脈 (right common carotid artery), 進入右側頸總動脈約 1.5 公分後, 隨即將氣球脹起並來回三次磨擦, 再把導管抽出, 並迅速把外頸動脈結紮並傷口縫合。三週後犧牲動物, 取下左右兩側頸總動脈, 並利用 4% 多聚甲醛 (paraformaldehyde) 固定一天後, 進行組織切片 (3  $\mu$ m) 及病理染色 (H & E), 最後以光學顯微鏡觀察並照相, 計算血管內膜增生之厚度。每一隻老鼠之右側定為實驗組, 對側 (即左側) 為控制組。

治療組在手術後第十天開始給藥則為實驗初步結果發現, 給予藥物每一天一針具有明顯改善血管內壁增生之作用。

抗動脈粥狀硬化之作用結果示於圖 2, 利用氣球擴張手術 (balloon induced angioplasty) 誘發大白鼠動脈粥狀硬化, 在手術完第二十四天, 從頸動脈病理切片可以發現其頸動脈血管壁增厚。式 3 所示結構之化合物治療組從手術完成後第十天至第二十四天, 每天皮下注射給予 3 mg/kg 後可改善因氣球擴張手術所誘發之血管內膜增生之現象。利用血管內膜/血管中層數值化分析後發現, 式 3 所示結構之化合物具顯著改善動脈粥狀硬化之作用。

神經病理性疼痛之鎮痛作用之結果示於圖 3。大白老鼠

坐骨神經破壞後第七天開始會產生溫度異常過敏之神經病理理性之疼痛行為 (thermal hyperalgesia)，腳掌反應時間 (paw withdrawal latency) 從 30 秒降至 14 秒左右，從椎管 (intrathecal) 注射式 3 所示結構之化合物 0.1、0.5、1 或 5 g 皆具有顯著抑制溫度疼痛過敏行為，利用最大影響作用 (MPE) 計算後，其百分之五十有效止痛劑量 (ED50) 為  $0.75 \pm 0.05$  g。

統計分析方法：

所有數據都以平均值  $\pm$  標準偏差 S.E.M. 呈現。數據資料以單向 ANOVA 分析後再以 Dunnett's test 比較差異， $P < 0.05$  表示具有統計上之差異。在離體抗發炎活性方面，以單獨給予 LPS 組當作 100%。而在動物實驗方面，每組重覆四至八次。

上述實施例僅為說明本發明之原理及其功效，而非限制本發明。習於此技術之人士對上述實施例所做之修改及變化仍不違背本發明之精神。本發明之權利範圍應如後述之申請專利範圍所列。

### 【圖式簡單說明】

圖 1 為不同濃度如式 3 所示結構之化合物對 LPS 刺激巨噬細胞表現發炎性蛋白質誘發型一氧化氮合成酶及第二型環氧合酶之影響。A 為西方墨點法之結果。B 為不同濃度如式 3 所示結構之化合物對誘發型一氧化氮合成酶表現影響之統計分析結果。C 為不同濃度如式 3 所示結構之化合物對第二型環氧合酶蛋白質表現影響之統計分析結果。每組重

覆6次。

圖2為如式3所示結構之化合物對於氣球擴張誘發頸動脈內膜增生之作用。A為控制組，B為受損組，C為如式3所示結構之化合物治療組；DEF分別為ABC圖的放大。G為利用血管內膜/血管中層數值化分析之統計結果。

圖3為如式3所示結構之化合物對坐骨神經慢性壓迫誘發神經病理性疼痛之止痛作用。A為椎管注射不同劑量之如式3所示結構之化合物對於腳掌反應時間之作用，給予如式3所示結構之化合物後可以延長因坐骨神經慢性壓迫所誘發之溫度疼痛過敏之作用。B為椎管注射如式3所示結構之化合物後產生最大影響作用數值(MPE%)。C為以最大影響作用數值計算如式3所示結構之化合物之劑量效應曲線(dose-response curve)及其百分之五十止痛劑量。每點樣品數至少6。

## 五、中文發明摘要：

本發明係關於一種含硫化合物及其製造方法。本發明另關於該含硫化合物於抑制誘發型一氧化氮合成酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)及/或第二型環氧合酶(cyclooxygenase-2, COX-2)之作用與用以治療與其相關疾病之應用。

## 六、英文發明摘要：

The invention relates to a sulfur-containing compound and the preparation thereof. The invention also relates to the uses of the sulfur-containing compound for inhibiting the effect of inducible nitric oxide synthase and/or cyclooxygenase-2 and for treating the diseases associated with the effect of inducible nitric oxide synthase and/or cyclooxygenase-2.



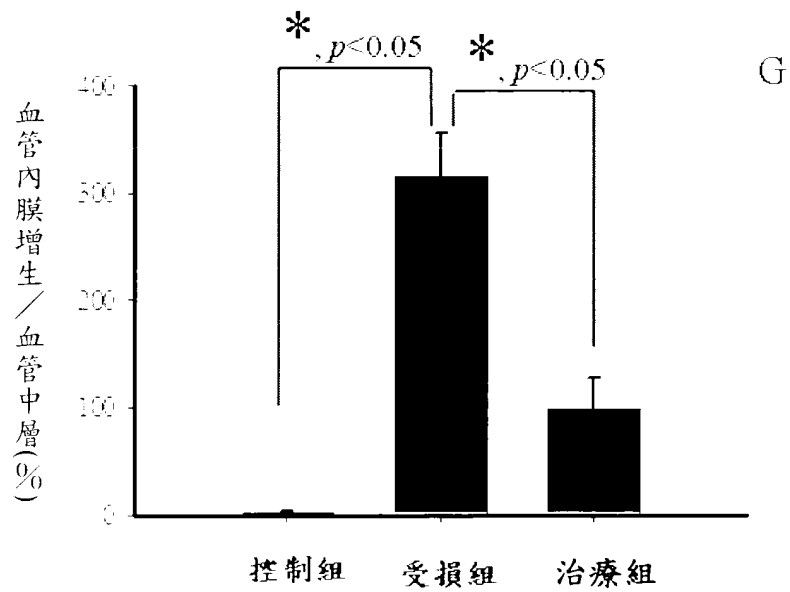
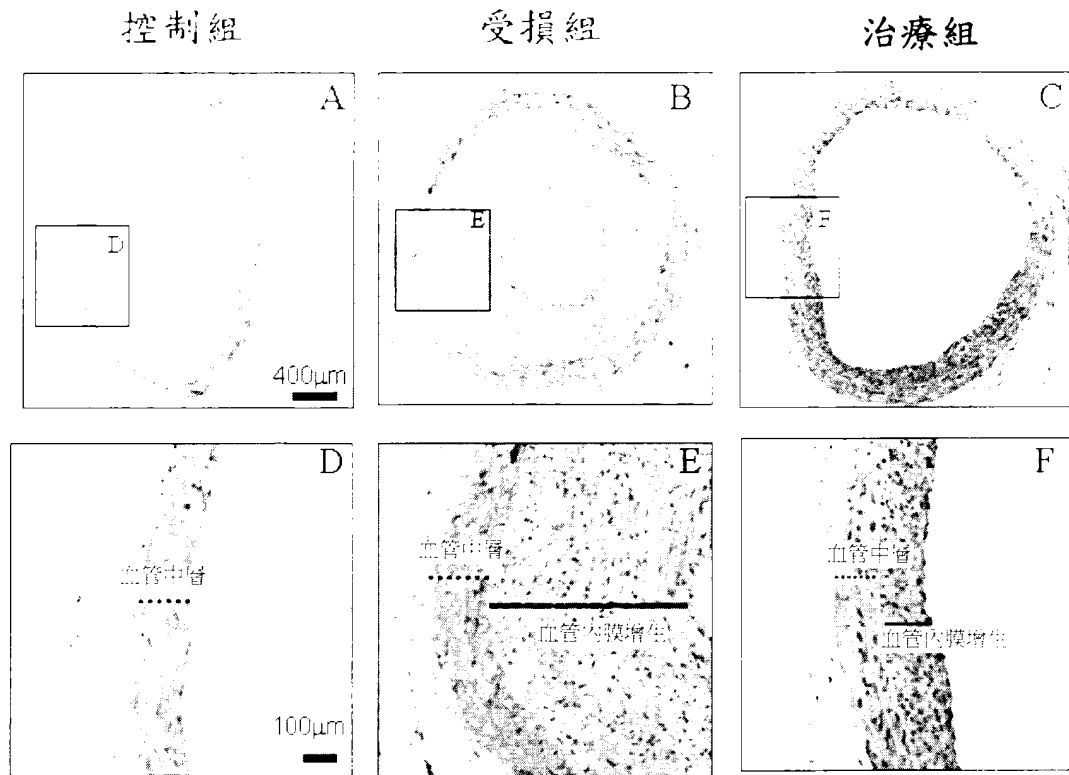


圖 2

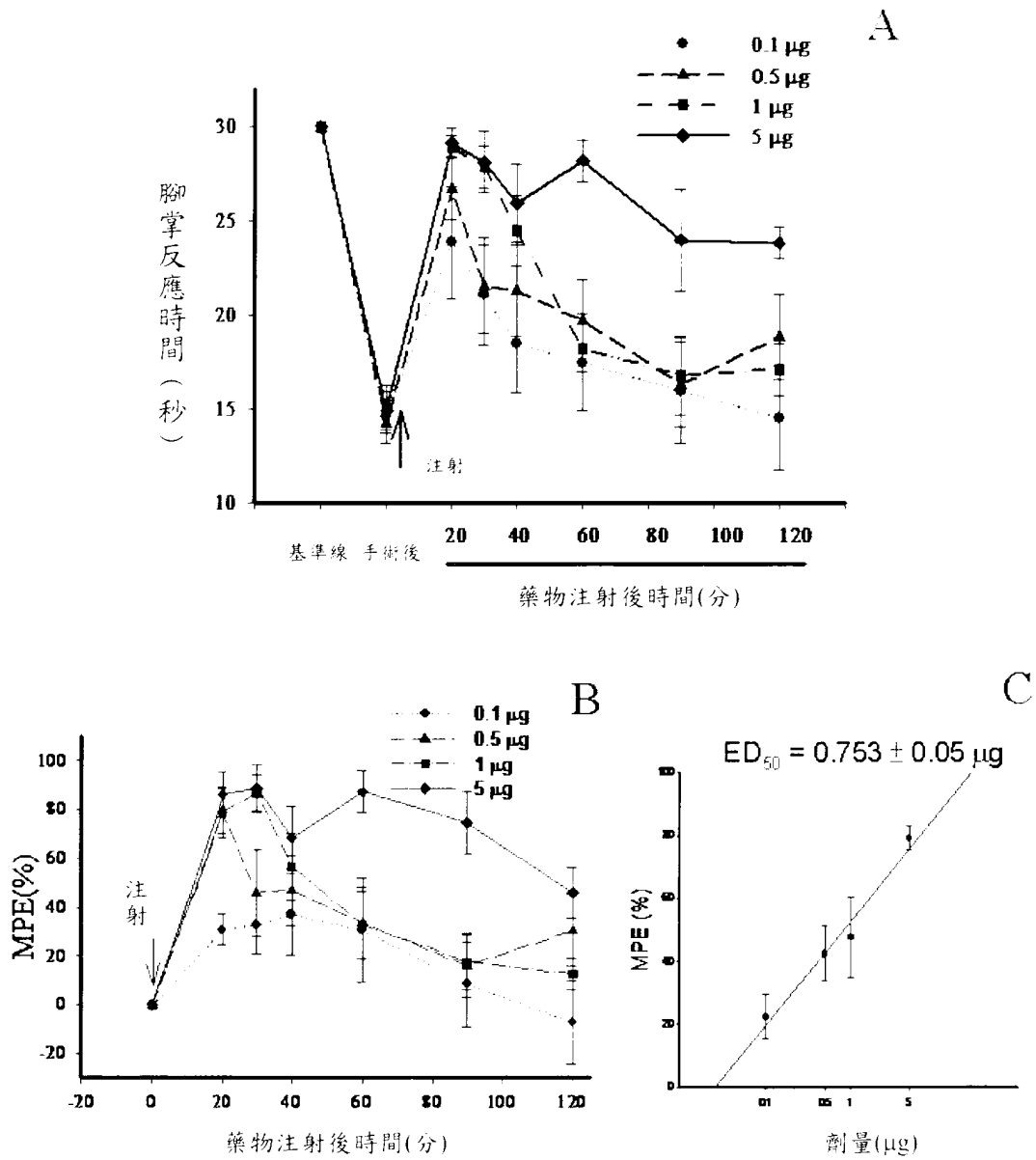


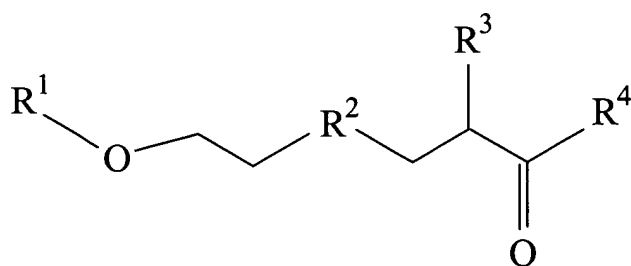
圖 3

**七、指定代表圖：**

(一)本案指定代表圖為：第 ( 1 ) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

**八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：**

第 096132313 號專利申請案  
中文說明書替換頁(99 年 8 月)

公告本

99年8月14日  
修正  
補充頁

## 發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：96132313

COTC 323/22, 317/24, 317/28

※ 申請日期：96.8.30

COTD 265/30

※IPC 分類：A61K 31/00

### 一、發明名稱：(中文/英文)

含硫化合物、其製造方法及其於醫藥上之應用

SULFUR-CONTAINING COMPOUND, METHOD OF PREPARATION  
AND PHARMACEUTICAL USES THEREOF

### 二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

國立中山大學

NATIONAL SUN YAT-SEN UNIVERSITY

代表人：(中文/英文)

楊弘敦

YANG, HUNG-DUEN

住居所或營業所地址：(中文/英文)

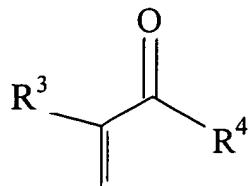
高雄市西子灣蓮海路70號

NATIONAL SUN YAT-SEN UNIVERSITY, NO.70 LIEN-HAI RD.,  
KAOHSIUNG, 80424, TAIWAN.

國 籍：(中文/英文)

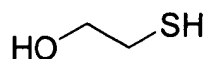
中華民國 R.O.C.

第 096132313 號專利申請案  
中文說明書替換頁 (99 年 7 月)



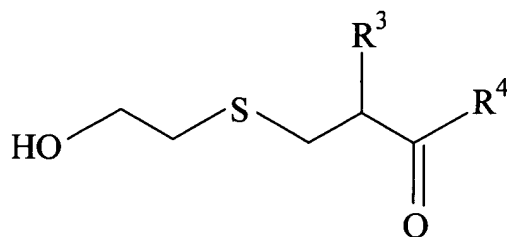
式 23

與如式 24 所示結構之 2-巰乙醇 (2-mercaptoethanol)



式 24

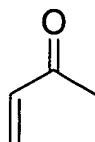
反應，以得到如式 25 所示結構之化合物



式 25；

- (II) 當  $R^1$  為  $R^5C(=O)$  時，將如式 25 所示結構之化合物進行酯化反應；
- (III) 當  $R^1$  為  $R^5$  時，將如式 25 所示結構之化合物進行烷基化反應；
- (IV) 當  $R^2$  為  $(O=)S(=O)$  時，將如式 25 所示結構之化合物進行氧化反應；
- (V) 當  $R^1$  為  $R^5C(=O)$  及  $R^2$  為  $(O=)S(=O)$  時，將如式 25 所示結構之化合物進行酯化及氧化反應；
- (VI) 當  $R^1$  為  $R^5$  及  $R^2$  為  $(O=)S(=O)$  時，將如式 25 所示結構之化合物進行烷基化及氧化反應；及
- (VII) 當  $R^1$  為 H、 $R^2$  為 S、 $R^3$  為 H 且  $R^4$  為  $CH_3$  時，以如式 27 所示結構之化合物

第 096132313 號專利申請案  
中文說明書替換頁 (99 年 7 月)

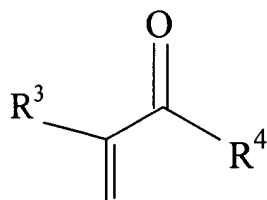


式 27

與如式 24 所示結構之 2-巰乙醇於三乙基胺存在下反應而得。

具體言之，本發明之製備方法包括：

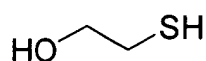
- (I) 當  $R^1$  為 H 及  $R^2$  為 S 時，該方法包含以如式 23 所示結構之化合物



式 23

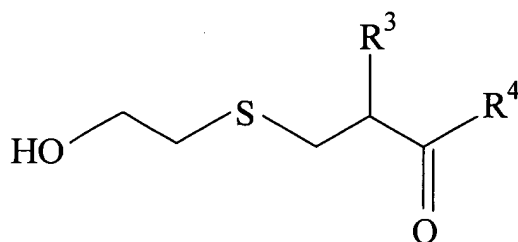
(其中  $R^3$  較佳係為 H)，

與如式 24 所示結構之 2-巰乙醇 (2-mercaptoethanol)



式 24

反應，以得到如式 25 所示結構之化合物；



式 25。

較佳地，該反應係於三乙基胺存在下進行。於本發明之一具體實施例中，上述反應物係溶解於丙酮中，並於冰浴中反應。

另一方面，當  $R^3$  為  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OR}^5$  時，較佳地，反應係於不使用溶劑之狀態下進行。

第 096132313 號專利申請案  
中文說明書替換頁 (99 年 7 月)

$J = 7.0$  Hz), 3.65 (2H, t,  $J = 6.0$  Hz), 2.54-2.74 (5H, m), 2.28 (2H, m), 1.91 (2H, m), 1.20 (3H, t,  $J = 7.0$  Hz), 1.18 (3H, t,  $J = 7.0$ Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta_{\text{C}}$  174.1 (qC), 172.8 (qC), 60.89 ( $\text{CH}_2$ ), 60.86 ( $\text{CH}_2$ ), 60.6 ( $\text{CH}_2$ ), 45.3 (CH), 35.5 ( $\text{CH}_2$ ), 33.6 ( $\text{CH}_2$ ), 31.7 ( $\text{CH}_2$ ) 26.7 ( $\text{CH}_2$ ), 14.22 ( $\text{CH}_3$ ), 14.18 ( $\text{CH}_3$ ); ESIMS  $m/z$  301 [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$ 。

如式 17 所示結構之化合物：無色油狀；IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  3439, 1732, 1380, 1312, 1290, 1206, 1120  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta_{\text{H}}$  4.21 (2H, q,  $J = 7.1$  Hz), 4.15 (2H, q,  $J = 7.1$  Hz), 4.11 (2H, t,  $J = 5.3$  Hz), 3.72 (1H, dd,  $J = 14.2, 9.3$  Hz), 3.25 (2H, t,  $J = 5.3$  Hz), 3.21 (1H, dd,  $J = 14.2, 4.9$  Hz), 3.13 (1H, m), 2.39 (2H, t,  $J = 7.4$  Hz), 2.04 (2H, t,  $J = 7.4$  Hz), 1.30 (3H, t,  $J = 7.1$  Hz), 1.27 (3H, t,  $J = 7.1$ Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta_{\text{C}}$  173.0 (qC), 172.4 (qC), 61.6 ( $\text{CH}_2$ ), 60.8 ( $\text{CH}_2$ ), 56.4 ( $\text{CH}_2$ ), 55.1 ( $\text{CH}_2$ ), 55.8 ( $\text{CH}_2$ ), 38.7 (CH), 31.1 ( $\text{CH}_2$ ) 27.2 ( $\text{CH}_2$ ), 14.1 ( $\text{CH}_3$ ), 14.0 ( $\text{CH}_3$ ); ESIMS  $m/z$  333 [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$ 。

#### 實例 7：離體抗發炎活性測試

選用小老鼠巨噬細胞 (mouse macrophage cell line, RAW 264.7) 為離體外細胞模式，購自於 American Type Culture Collection (ATCC, No TIB-71)。細胞培養於 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle medium) 培養基中，含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)，並於培養基中加入盤尼西林 G (100 U/ml) 及鏈黴素 (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 抗生素，置於

第 096132313 號專利申請案  
中文說明書替換頁 (99 年 7 月)

37°C，5% CO<sub>2</sub> 二氧化碳培養箱，當細胞長到八分滿時利用胰蛋白酶進行繼代培養 (subculture)。繼代培養 36 小時後，進行藥物之抗發炎測試。3 x 10<sup>6</sup> 個細胞數 RAW264.7 細胞於 10 公分培養皿 (culture dish) 中，給予脂多醣 (LPS，0.01 μg/ml；sigma L2654) 16 小時後收集細胞；抗發炎實驗組，則為加入如式 3 所示結構之化合物於培養皿後十分鐘再加入 LPS。

#### 誘發型一氧化氮合成酶及第二型環氧合酶蛋白質表現量分析

RAW264.7 細胞收集下來後，加入 4°C 之溶解緩衝液 200 μL (50 mM Tris [pH 7.5]、150 mM NaCl、1% Triton X-100、0.1 mM EDTA、0.1 mM EGTA、10 μg PMSF、1 μg/mL 纖溶酶 (aprotinin)、20 mM NaF 及 0.2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>)。樣本經處理後於 4°C 以 25,000 g 離心 30 分鐘，以去除不溶解的部分，取出上清液部分以 Bio-Rad DC 蛋白質檢測套組 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 及酶測讀儀 (ELISA reader, Thermo Electron Corporation, USA) 分析吸光值，並測定各樣本之蛋白質量。將經校正後取等體積加入等量之樣本緩衝液 (2% SDS、10% 甘油、0.1% 溴酚藍、10% 2-巰乙醇及 50 mM Tris)。利用 10% 之聚丙烯醯胺 SDS-PAGE 分離蛋白質。再將 SDS-PAGE 上之蛋白質轉印到 PVDF 膜 (0.45 mm, Immobilon-P, Millipore, Bedford, MA, USA) 上 (1.5 安培，4°C，2.5 小時)。轉印後的 PVDF 膜以含 5% 脫脂奶粉之 TTBS (Tris-HCl 20 mM、

NaCl 137 mM, pH 7.4及 0.1 % Tween 20) 在室溫下處理一小時, 再與抗誘發型一氧化氮合成酶一級抗體(多株, Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA)或抗第二型環氧合酶一級抗體(多株, Cayman, Ann Arbor, MI, USA)於室溫反應3小時, 隨後以TTBS清洗三次, 再與HRP連結之抗兔IgG抗體(1:2000)在室溫中反應一小時, 以TTBS清洗三次, 最後利用促進化學螢光檢測套組與PVDF膜反應, 並以X光底片曝光(Kodak X-OMAT LS, Kodak, Rochester, NY, USA)以偵測蛋白質的表現量, 並以電腦軟體((Image-Pro plus 4.5 software, Media Cybernetics, Silver Spring, USA)計算相對量, 且以單獨加入LPS組別為100%。本實例以 $\beta$ -肌動蛋白(單株, Sigma, St Louis, MO, USA)作為內部控制組。

其結果示於圖1, 濃度為1至30 $\mu$ M之如式3所示結構之化合物可顯著抑制LPS(0.01 $\mu$ g/ml)刺激巨噬細胞之誘發型一氧化氮合成酶蛋白質作用, 其百分之五十抑制濃度(IC50)為 $3.64\pm 0.28\mu$ M。而濃度從5至30 $\mu$ M之如式3所示結構之化合物亦具有顯著抑制LPS所誘發巨噬細胞第二型環氧合酶表現之作用, 其IC50為 $32.1\pm 8.1\mu$ M。但於50 $\mu$ M下, 如式3所示結構之化合物則具抑制 $\beta$ -肌動蛋白之作用。

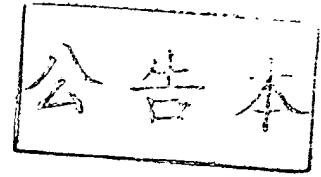
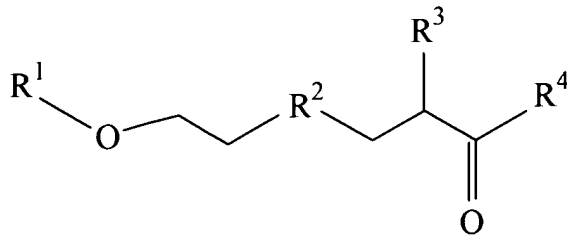
### 實例8：動物實驗

#### 脊椎給藥管之植入手術

手術方法仿照Wen等人於Brain Res 963:1-7, 2003所記

## 十、申請專利範圍：

1. 一種具有式 1 結構之化合物，



式 1，

$R^1$  係選自由 H、 $R^5$  及  $R^5C(=O)$  所組成之群；

$R^2$  係選自由 S 及  $(O=)S(=O)$  所組成之群；

$R^3$  係選自由 H、 $CH_3$  及  $CH_2CH_2C(=O)OR^5$  所組成之群；

$R^4$  係選自由  $R^5$ 、 $OR^5$ 、 $-NCH_2CH_2OCH_2CH_2$ 、 $N(R^5)_2$ 、 $NH_2$ 、 $NHR^5$  及  $OH$  所組成之群；

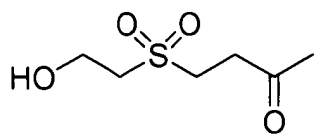
$R^5$  係選自由具有一至六個碳之烷基及苯基所組成之群；

但當  $R^3$  為  $CH_2CH_2C(=O)OR^5$  時， $R^4$  為  $OR^5$ ；及

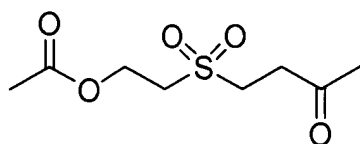
$R^1$  為 H、 $R^2$  為 S 及  $R^3$  為 H 時， $R^4$  不為  $CH_3$ ；

且該化合物具有選自由式 3、4、5、7、8、9、11、12、

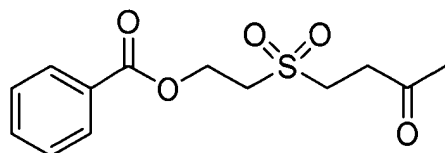
13、16、17、18、19、21 及 22 組成之群之化學結構式：



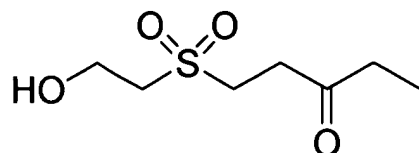
式 3



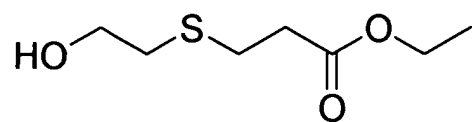
式 4



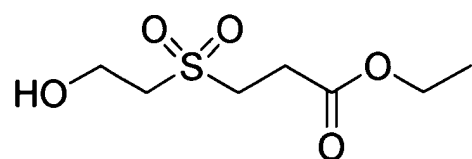
式 5



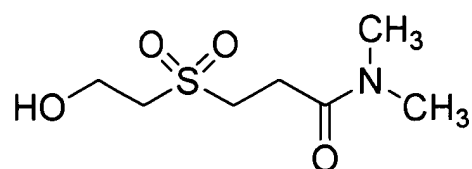
式 7



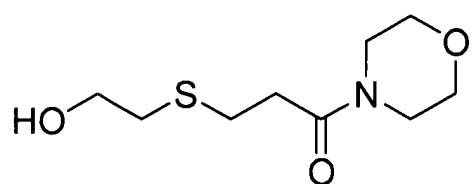
式 8



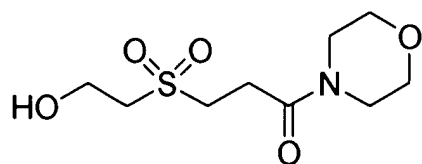
式 9



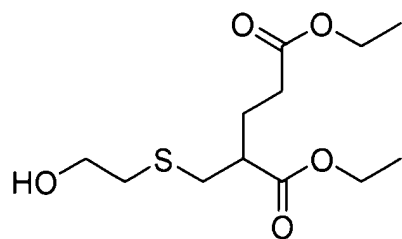
式 11



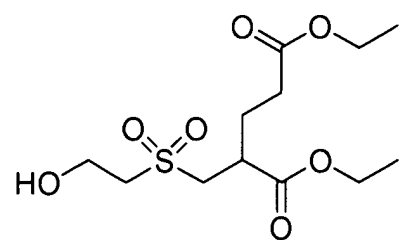
式 12



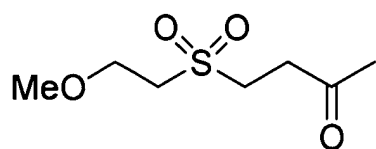
式 13



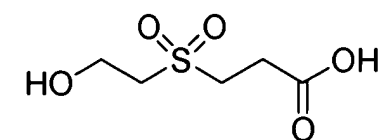
式 16



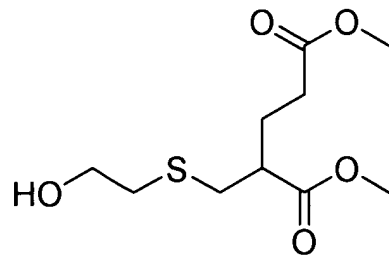
式 17



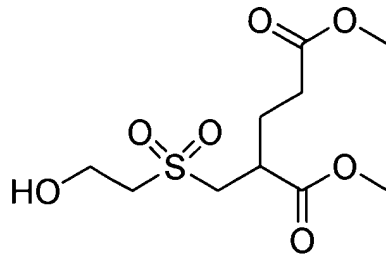
式 18



式 19

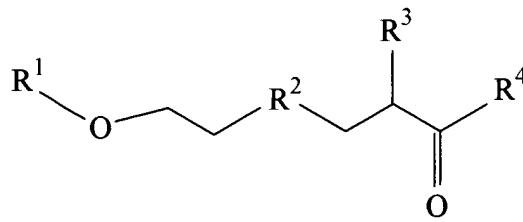


式 21



式 22。

2. 一種製造具有式 2 結構之化合物之方法，



式 2，

其中：

$R^1$  係選自由 H、 $R^5$  及  $R^5C(=O)$  所組成之群；

$R^2$  係選自由 S 及  $(O=)S(=O)$  所組成之群；

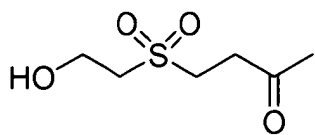
$R^3$  係選自由 H、 $CH_3$  及  $CH_2CH_2C(=O)OR^5$  所組成之群；

$R^4$  係選自由  $R^5$ 、 $OR^5$ 、 $-NCH_2CH_2OCH_2CH_2$ 、 $N(R^5)_2$ 、 $NH_2$ 、 $NHR^5$  及  $OH$  所組成之群；

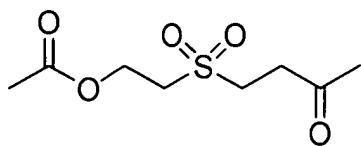
$R^5$  係選自由具有一至六個碳之烷基及經取代或未經取代之苯環所組成之群；

但當  $R^3$  為  $CH_2CH_2C(=O)OR^5$  時， $R^4$  為  $OR^5$ ；

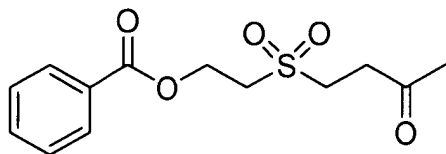
且該化合物具有選自由式 3、4、5、7、8、9、11、12、13、16、17、18、19、21 及 22 組成之群之化學結構式：



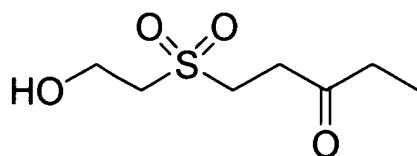
式 3



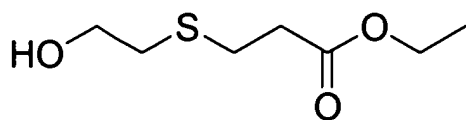
式 4



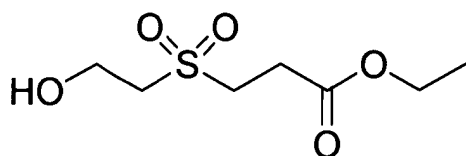
式 5



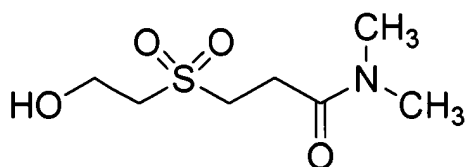
式 7



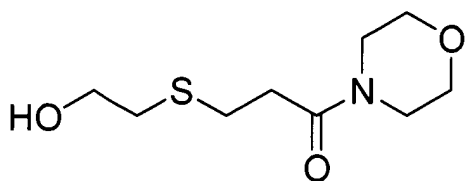
式 8



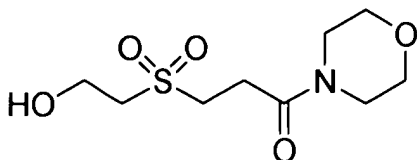
式 9



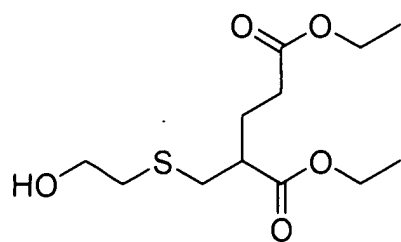
式 11



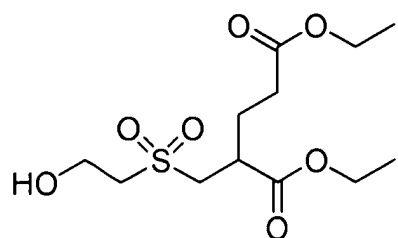
式 12



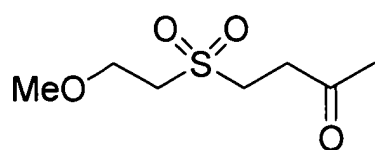
式 13



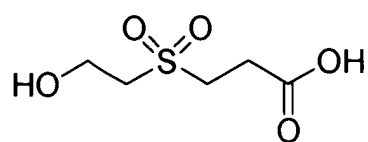
式 16



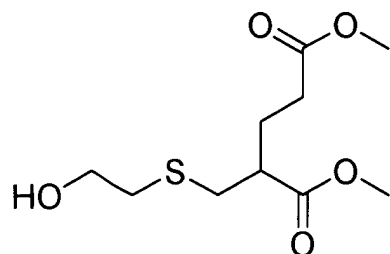
式 17



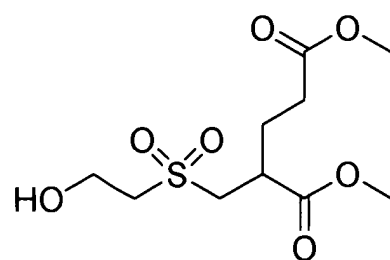
式 18



式 19



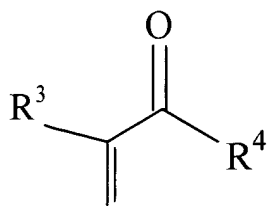
式 21



式 22

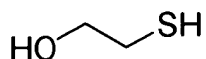
該方法包含：

- (I) 當  $R^1$  為 H 及  $R^2$  為 S 時，該方法包含以如式 23 所示結構之化合物



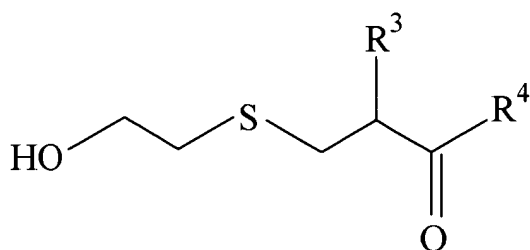
式 23

與如式 24 所示結構之 2-巰乙醇 (2-mercaptoethanol)



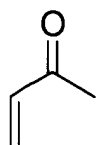
式 24

反應，以得到如式 25 所示結構之化合物



式 25；

- (II) 當  $R^1$  為  $R^5C(=O)$  時，將如式 25 所示結構之化合物進行酯化反應；
- (III) 當  $R^1$  為  $R^5$  時，將如式 25 所示結構之化合物進行烷基化反應；
- (IV) 當  $R^2$  為  $(O=)S(=O)$  時，將如式 25 所示結構之化合物進行氧化反應；
- (V) 當  $R^1$  為  $R^5C(=O)$  及  $R^2$  為  $(O=)S(=O)$  時，將如式 25 所示結構之化合物進行酯化及氧化反應；
- (VI) 當  $R^1$  為  $R^5$  及  $R^2$  為  $(O=)S(=O)$  時，將如式 25 所示結構之化合物進行烷基化及氧化反應；及
- (VII) 當  $R^1$  為 H、 $R^2$  為 S、 $R^3$  為 H 且  $R^4$  為  $CH_3$  時，以如式 27 所示結構之化合物



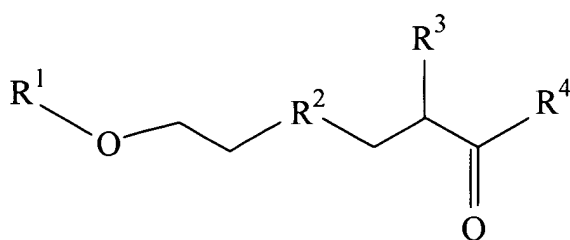
式 27

與如式24所示結構之2-巯乙醇於三乙基胺存在下反應而得。

3. 根據請求項2之方法，其中 $R^3$ 為H。
4. 根據請求項2之方法，其中如式23所示結構之化合物與如式24所示結構之化合物係於三乙基胺存在下進行。
5. 根據請求項2之方法，其中如式23所示結構之化合物與如式24所示結構之化合物係溶解於丙酮中。
6. 根據請求項2之方法，其中當 $R^3$ 為 $CH_2CH_2C(=O)OR^5$ 時，如式23所示結構之化合物與如式24所示結構之化合物反應係於不使用溶劑之狀態下進行。
7. 根據請求項2之方法，其中酯化反應係於三乙基胺存在下進行。
8. 根據請求項2之方法，其中酯化反應之反應物係溶解於二氯甲烷中。
9. 根據請求項2之方法，其中當 $R^1$ 為 $CH_3C(=O)$ 時，該酯化反應包含將如式25所示結構之化合物與乙酸酐反應。
10. 根據請求項2之方法，其中當 $R^1$ 為 $C_6H_5C(=O)$ 時，該酯化反應包含將如式25所示結構之化合物與苯甲酸醯氯(benzoyl chloride)反應。
11. 根據請求項2之方法，其中當 $R^1$ 為 $CH_3$ 時，該烷基化反應包含將如式25所示結構之化合物與 $CH_3I$ 反應。
12. 根據請求項2之方法，其中該氧化反應係以過氧化氫進行。
13. 根據請求項12之方法，其中該氧化反應係於 $MnSO_4 \cdot$

H<sub>2</sub>O催化下進行。

14. 根據請求項12之方法，其中該氧化反應之反應物係溶解於乙腈中。
15. 根據請求項12之方法，其中該氧化反應係以間氯過氧苯甲酸(meta-chloroperoxybenzoic acid)進行。
16. 根據請求項15之方法，其中該氧化反應之反應物係溶解於二氯甲烷中。
17. 一種醫藥組合物，其係用以治療與誘發型一氧化氮合成酶及/或第二型環氧合酶作用相關之疾病，其中該疾病係選自由發炎、動脈粥狀硬化、神經病理性疼痛、發炎性血管內膜增生、關節炎、多發性硬化症、發炎性疼痛及脊髓損傷所組成之群，其包含具有式1結構之化合物，



式1，

R<sup>1</sup>係選自由H、R<sup>5</sup>及R<sup>5</sup>C(=O)所組成之群；

R<sup>2</sup>係選自由S及(O=)S(=O)所組成之群；

R<sup>3</sup>係選自由H、CH<sub>3</sub>及CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=O)OR<sup>5</sup>所組成之群；

R<sup>4</sup>係選自由R<sup>5</sup>、OR<sup>5</sup>、 $\text{---}\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{---}$ 、N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>、NH<sub>2</sub>、NHR<sup>5</sup>及OH所組成之群；

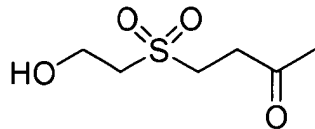
R<sup>5</sup>係選自由具有一至六個碳之烷基及苯基所組成之群；

但當R<sup>3</sup>為CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=O)OR<sup>5</sup>時，R<sup>4</sup>為OR<sup>5</sup>；及

R<sup>1</sup>為H、R<sup>2</sup>為S及R<sup>3</sup>為H時，R<sup>4</sup>不為CH<sub>3</sub>。

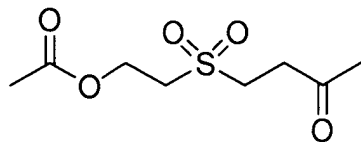
18. 根據請求項 17 之醫藥組合物，其中  $R^5$  係選自由甲基、乙基及未經取代之苯基所組成之群。

19. 根據請求項 17 之醫藥組合物，其具有如式 3 所示的化學結構式：



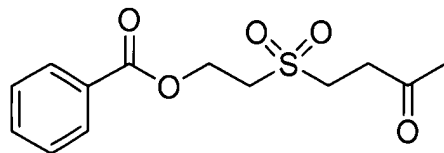
式 3。

20. 根據請求項 17 之醫藥組合物，其具有如式 4 所示的化學結構式：



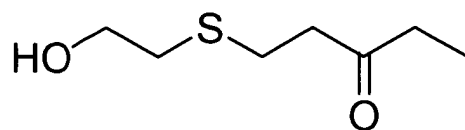
式 4。

21. 根據請求項 17 之醫藥組合物，其具有如式 5 所示的化學結構式：



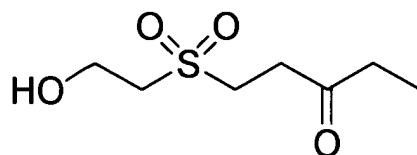
式 5。

22. 根據請求項 17 之醫藥組合物，其具有如式 6 所示的化學結構式：



式 6。

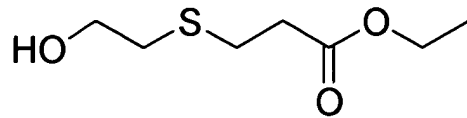
23. 根據請求項 17 之醫藥組合物，其具有如式 7 所示的化學結構式：



式 7。

24. 根據請求項 17 之醫藥組合物，其具有如式 8 所示的化學

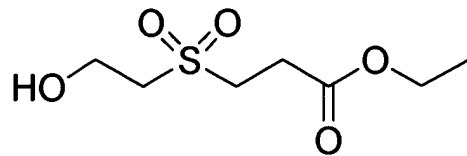
結構式：



式 8。

25. 根據請求項 17 之醫藥組合物，其具有如式 9 所示的化學

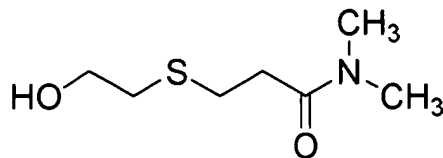
結構式：



式 9。

26. 根據請求項 17 之醫藥組合物，其具有如式 10 所示的化學

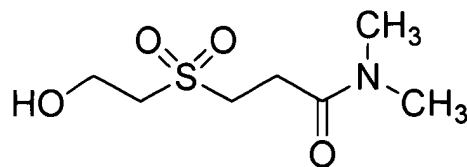
結構式：



式 10。

27. 根據請求項 17 之醫藥組合物，其具有如式 11 所示的化學

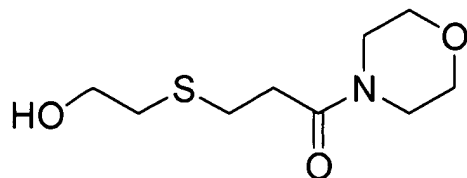
結構式：



式 11。

28. 根據請求項 17 之醫藥組合物，其具有如式 12 所示的化學

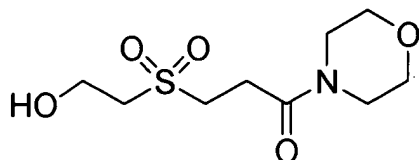
結構式：



式 12。

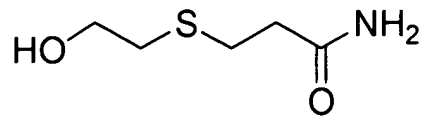
29. 根據請求項 17 之醫藥組合物，其具有如式 13 所示的化學

結構式：



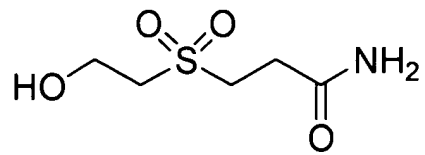
式 13。

30. 根據請求項 17 之醫藥組合物，其具有如式 14 所示的化學結構式：



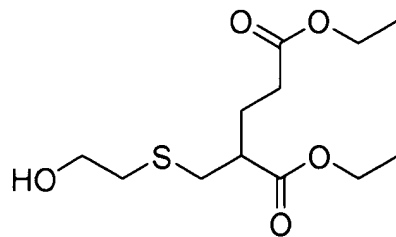
式 14。

31. 根據請求項 17 之醫藥組合物，其具有如式 15 所示的化學結構式：



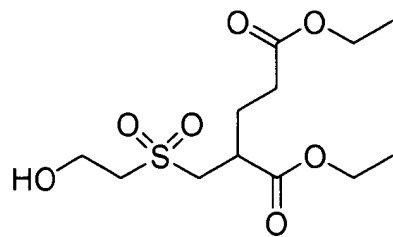
式 15。

32. 根據請求項 17 之醫藥組合物，其具有如式 16 所示的化學結構式：



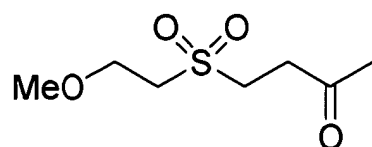
式 16。

33. 根據請求項 17 之醫藥組合物，其具有如式 17 所示的化學結構式：



式 17。

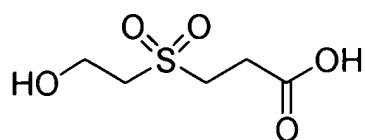
34. 根據請求項 17 之醫藥組合物，其具有如式 18 所示的化學結構式：



式 18。

35. 根據請求項 17 之醫藥組合物，其具有如式 19 所示的化學

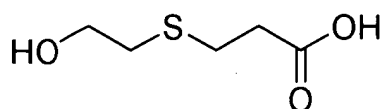
結構式：



式 19。

36. 根據請求項 17 之醫藥組合物，其具有如式 20 所示的化學

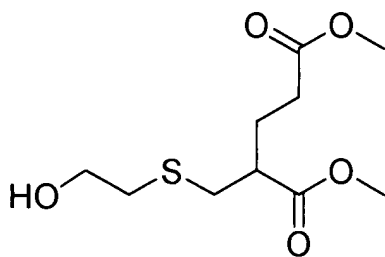
結構式：



式 20。

37. 根據請求項 17 之醫藥組合物，其具有如式 21 所示的化學

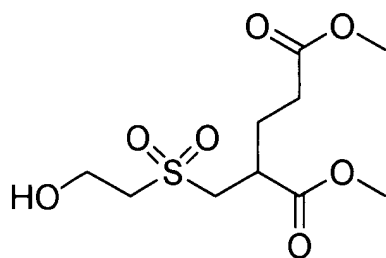
結構式：



式 21。

38. 根據請求項 17 之醫藥組合物，其具有如式 22 所示的化學

結構式：

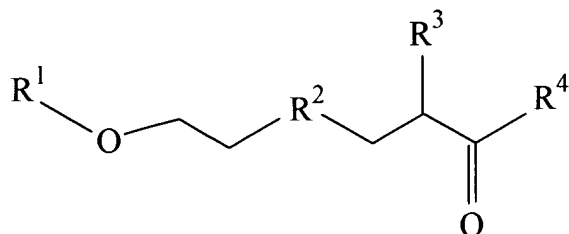


式 22。

39. 根據請求項 17 之醫藥組合物，其劑型係為針劑。

40. 一種化合物之用途，其係用以製造治療與誘發型一氧化氮合成酶及/或第二型環氧合酶作用相關疾病之藥物，其中該疾病係選自由發炎、動脈粥狀硬化、神經病理性疼

痛、發炎性血管內膜增生、關節炎、多發性硬化症、發炎性疼痛及脊髓損傷所組成之群，其中該化合物包含具有式1結構之化合物，



式1，

$R^1$  係選自由 H、 $R^5$  及  $R^5C(=O)$  所組成之群；

$R^2$  係選自由 S 及  $(O=)S(=O)$  所組成之群；

$R^3$  係選自由 H、 $CH_3$  及  $CH_2CH_2C(=O)OR^5$  所組成之群；

$R^4$  係選自由  $R^5$ 、 $OR^5$ 、 $\underbrace{-NCH_2CH_2OCH_2CH_2-}_{}$ 、 $N(R^5)_2$ 、 $NH_2$ 、 $NHR^5$  及  $OH$  所組成之群；

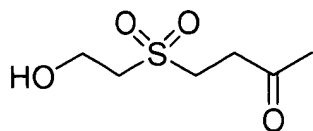
$R^5$  係選自由具有一至六個碳之烷基及苯基所組成之群；

但當  $R^3$  為  $CH_2CH_2C(=O)OR^5$  時， $R^4$  為  $OR^5$ ；及

$R^1$  為 H、 $R^2$  為 S 及  $R^3$  為 H 時， $R^4$  不為  $CH_3$ 。

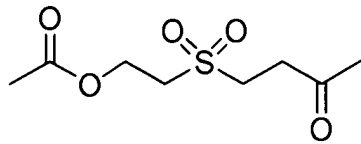
41. 根據請求項 40 之用途，其中  $R^5$  係選自由甲基、乙基及未經取代之苯基所組成之群。

42. 根據請求項 40 之用途，其具有如式 3 所示的化學結構式：



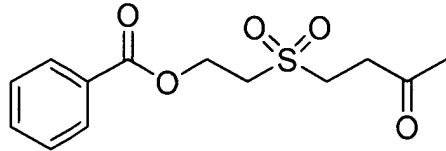
式3。

43. 根據請求項 40 之用途，其具有如式 4 所示的化學結構式：



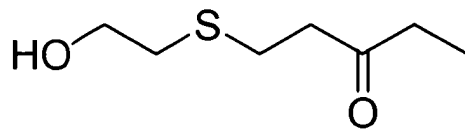
式 4。

44. 根據請求項 40 之用途，其具有如式 5 所示的化學結構式：



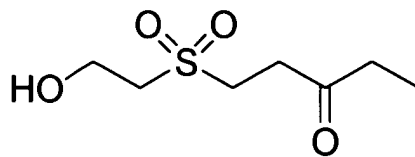
式 5。

45. 根據請求項 40 之用途，其具有如式 6 所示的化學結構式：



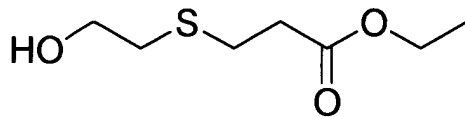
式 6。

46. 根據請求項 40 之用途，其具有如式 7 所示的化學結構式：



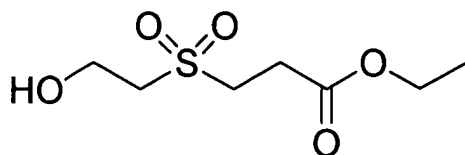
式 7。

47. 根據請求項 40 之用途，其具有如式 8 所示的化學結構式：



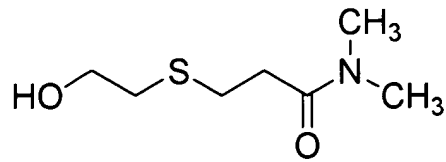
式 8。

48. 根據請求項 40 之用途，其具有如式 9 所示的化學結構式：



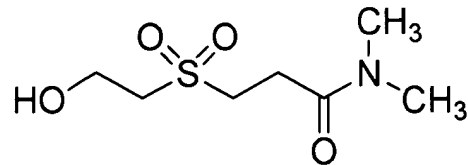
式 9。

49. 根據請求項 40 之用途，其具有如式 10 所示的化學結構式：



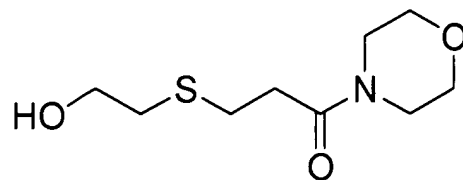
式 10。

50. 根據請求項 40 之用途，其具有如式 11 所示的化學結構式：



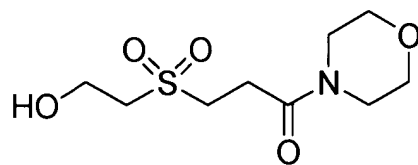
式 11。

51. 根據請求項 40 之用途，其具有如式 12 所示的化學結構式：



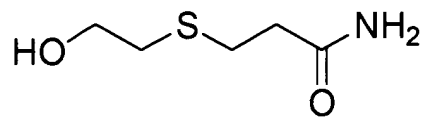
式 12。

52. 根據請求項 40 之用途，其具有如式 13 所示的化學結構式：



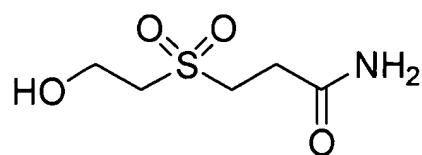
式 13。

53. 根據請求項 40 之用途，其具有如式 14 所示的化學結構式：



式 14。

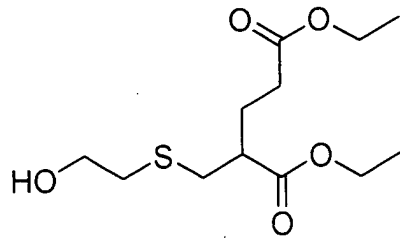
54. 根據請求項 40 之用途，其具有如式 15 所示的化學結構式：



式 15。

55. 根據請求項 40 之用途，其具有如式 16 所示的化學結構

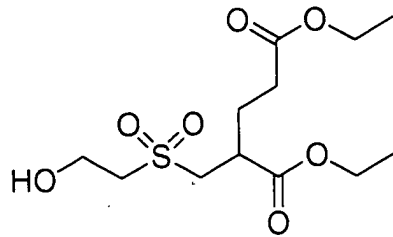
式：



式 16。

56. 根據請求項 40 之用途，其具有如式 17 所示的化學結構

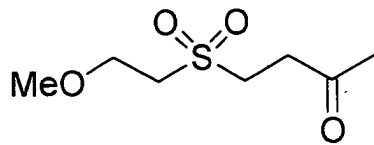
式：



式 17。

57. 根據請求項 40 之用途，其具有如式 18 所示的化學結構

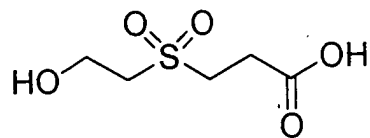
式：



式 18。

58. 根據請求項 40 之用途，其具有如式 19 所示的化學結構

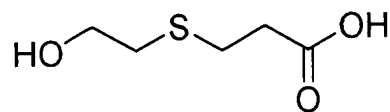
式：



式 19。

59. 根據請求項 40 之用途，其具有如式 20 所示的化學結構

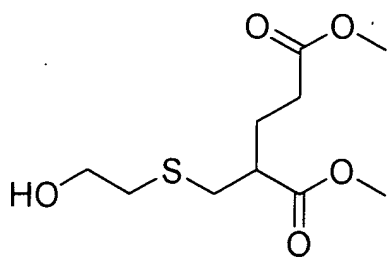
式：



式 20。

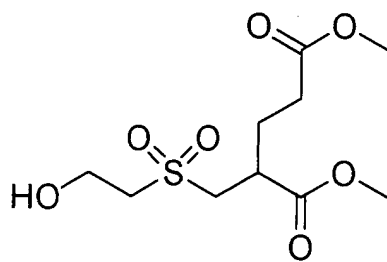
60. 根據請求項 40 之用途，其具有如式 21 所示的化學結構

式：



式 21。

61. 根據請求項 40 之用途，其具有如式 22 所示的化學結構式：



式 22。

62. 根據請求項 40 之用途，其中該藥物係為針劑。