

發明專利說明書 200528119

(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：93133554

※申請日期：93.11.4

※IPC 分類：A61K 35/28, A61L 27/35,
C12N 5/22, A61C 31/167,

一、發明名稱：(中文/英文)

eNOS 轉錄增強劑於缺血性心臟疾病之細胞治療的用途

A61P 9/10

USE OF eNOS TRANSCRIPTION ENHANCERS IN THE CELL
THERAPY OF ISCHEMIC HEART DISEASES

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

德國阿凡提斯藥品德意志有限公司

AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMBH

代表人：(中文/英文)

1. 吉瑪斯/DR. JACOBI, MARKUS

2. 費漢根/DR. FISCHER, HANS-JUERGEN

住居所或營業所地址：(中文/英文)

德國法蘭克福城伯洛格街 50 號

BrueningstraBe 50, D-65926 Frankfurt am Main, Germany

國 籍：(中文/英文)

德國/Germany

三、發明人：(共 4 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 芝安德/ZEIHER, ANDREAS

2. 史帝芬/DIMMELER, STEFANIE

3. 希克里/HEESCHEN, CHRISTOPHER

4. 盧哈特/RUETTEN, HARTMUT

國 籍：(中文/英文)

1.-4.皆為德國/Germany

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：

歐洲;西元 2003 年 11 月 6 日;03025512.9

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

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】

本發明係關於某類化合物的用途，用於在進行細胞療法時，對於罹患缺氧性心臟疾病(例如冠心病或缺氧性心肌病變)之患者，使用其處理幹細胞與先驅母細胞(先驅母細胞)以增強內皮細胞的一氧化氮合成酶(eNOS)的轉錄作用；以一種eNOS 轉錄增強劑先處理這類細胞(例如，可自骨髓分離得者)，再投與，以便增進其功能活性與改善心臟的新血管形成及心臟再生。

10

【先前技術】

梗塞心臟衰竭後，在帶有缺氧性心臟病(例如冠心病或缺氧性心肌病變)之患者，仍為其殘留病態及造成死亡的主要原因，雖然被阻塞的動脈之及時再灌流具有明顯減少的死亡率，以愈來愈大的梗塞地區及左心室腔的擴張為特徵的心室再造(ventricular remodeling)過程，常導致存活的急性心肌梗塞患者轉為心力衰竭，扭轉再造的主要目標將是刺激新血管形成以及增加梗塞區域之心肌母細胞(myocytes)之再生。

15

最近的研究結果已建立內皮的幹細胞與先驅母細胞在出生後新血管形成和心臟再生方面的根本角色。在嚴重的缺血狀態後，改善新血管形成是在事件(例如心肌梗塞或肢體局部缺血)發生後極重要的治療選擇，直到最近，成人中缺血組織的新血管形成，被認為是受限於已成熟內皮細胞的遷移與增殖達成，一種被稱之為”血管形成(angiogenesis)”的過程，

20

同時，增加中的證據暗示著循環的內皮細胞祖先驅母胞 (EPCs) 回到局部缺血的位置並貢獻於形成新血管 (C. Kalka et al., Transplantation of ex vivo expanded 內皮細胞的先驅母細胞s for therapeutic neovascularization, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000, 97:3422-7)，類似於血管從原始內皮先驅母細胞 (angioblasts) 的胚胎發展，此過程被歸之為血管形成 (vasculogenesis)。

循環的先驅母細胞之重要性，由它們的新添量 (recruitment) 抑制腫瘤血管形成的基因抑制作用的事實得到證明，EPCs 可藉由血管內皮生長因子 (VEGF) 或基質 (stromal) 細胞-衍生的因子 (SDF)-1，被從骨髓動員進入循環系統，VEGF 和 SDF-1 兩者在缺氧組織內被往上調節，暗示 VEGF 與 SDF-1 構成歸航信號以便在嚴重的局部缺血狀態下，新添循環的先驅母細胞以提升內在的修護機制 (S. H. Lee et al., Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction, N. Engl. J. Med. 2000, 342:626-33)。

最近的實驗性研究，支持得自骨髓或血液的先驅母細胞對梗塞的心肌層的再生和局部缺血心肌層的增進新血管形成有貢獻的論點 (A. A. Kocher et al., neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function, Nat. Med. 2001, 7:430-6; D. Orlic et al., marrow cells regenerate infarcted myocardium, Nature 2001, 410:701-5; S. Fuchs et al.,

Catheter-based autologous marrow myocardial injection in no-option patients with advanced coronary artery disease: a feasibility study, *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003, 41:1721-4), 再者, 靜脈內注入或心肌內注入成人先驅母細胞, 就實驗性誘發的心肌梗塞及具有慢性缺氧性心臟病的患者兩者均有持續改善心臟功能的效果, 臨床上已證明, 於冠狀內注入成人幹細胞與先驅母細胞, 對於急性心肌梗塞患者與帶有慢性局部缺氧的心臟病變患者兩者, 是可行且安全的方法(B. Assmus et al., Transplantation of progenitors and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI), *Circulation* 2002, 106:3009-17; B. E. Strauer et al., Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear marrow cell transplantation in humans, *Circulation* 2002, 106:1913-8), 這樣的細胞療法, 是在患者體內作為自體細胞療法進行, 在局部地帶的與全部的左心室功能伴隨有明顯的改善。

對於帶有局部缺氧的心臟病變患者要成功地進行此種細胞療法的先決條件為歸航(homing)以及接上轉殖的細胞進入心臟的標靶區域, 尤其是被選擇的投與之血管內的路徑, 然而各類型的許多骨髓幹細胞與先驅母細胞, 比如間葉系(mesenchymal)和造血的(造血的)幹細胞與先驅母細胞, 在帶有缺氧性心臟疾病的患者及健康的對照組中是相似的, 不幸地, 得自帶有局部缺氧的心臟病變患者之幹細胞與先驅母細胞的功能活性不足且其歸航能力減少; 此種得自帶有局部缺

5 氧的心臟病變患者之幹細胞與先驅母細胞的功能缺憾限制了以其供臨床的細胞療法之治療潛力，此應用尤其是當使用需先驅母細胞滲出對抗化學牽引劑(chemoattractant) 梯度以便入侵及歸航至區部缺氧的組織之經由血管投藥的方式，此
10 幹細胞與先驅母細胞的功能活性與歸航能力可藉由測定其菌落形成能力或遷移能力予以評估，例如，其回應 VEGF 或 SDF-1 之情形，在進行細胞療法之前監視幹細胞與先驅母細胞的遷移或菌落形成的能力，可作為一種代理試驗以鑑別可自化學療法取得好處的患者，另一方面，最近被揭露，在能力受損的新血管形成化之鼠科模式下，得自健康的捐贈者小鼠之完全功能的骨髓-衍生的 EPCs，可恢復衰老的(senescent) 宿主心臟的血管形成(J. M. Edelberg et al., Young adult marrow-derived endothelial precursor cells restore aging-impaired cardiac angiogenic function, Circ. Res. 2002, 15 90:e89-e93)，於是，經適當的方法，例如，在投藥前，經藥學的或遺傳的操控，從帶有局部缺氧的心臟病變患者得到之官能受損的幹細胞與先驅母細胞之功能，得以被恢復並因此從細胞療法達到提升治療的好處。

20 令人驚奇地，已發現，得自帶有局部缺氧的心臟病變患者之幹細胞與先驅母細胞的受損的可經由與內皮細胞一氧化氮合成酶的轉錄增強劑一起培養而得到相當的改善；內皮細胞一氧化氮合成酶增強的表現，是在體外，先以 eNOS 轉錄增強劑處理患者的細胞，再施用，改善或恢復這些細胞的功能活性，如同試管中使用遷移分析與下述之後肢局部缺血

的鼠科模式下得到的證明，在後者的模式下，在大腿骨動脈的結紮後，此新血管形成是經由測定血流而決定，且已發現，如果在經 eNOS 轉錄增強劑預處理後實質地增加對帶有局部缺氧的心臟病變患者施用幹細胞與先驅母細胞是很有利的效果，被觀察到的效果確實是由內皮細胞一氧化氮合成酶之提升的活性與 NO 形成所引起，可利用 N^G-單甲基-L-精氨酸(L-NMMA)(一種已知的 eNOS 與一氧化氮形成之抑制劑)之消除作用(abrogating effect)得到證明，將得自帶有局部缺氧性心臟病的患者之幹細胞與先驅母細胞，在 eNOS 轉錄增強劑與 L-NMMA 兩者都存在下一起培養，不會發生改善的功能活性。

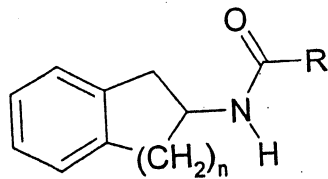
【發明內容】

於是，本發明的目的為，在細胞療法下，使用內皮的一氧化氮合成酶之轉錄增強劑供處理幹細胞及/或先驅母細胞以治療帶有缺氧性心臟疾病的患者的用途，以及使用內皮細胞的一氧化氮合成酶之轉錄增強劑，供產製在細胞療法下，供處理帶有缺氧性心臟疾病的患者的幹細胞及/或先驅母細胞的醫藥品之用途，以及製備一種供處理帶有缺氧性心臟疾病的患者的幹細胞及/或先驅母細胞的醫藥品的方法，包括應用一種內皮的一氧化氮合成酶之轉錄增強劑，以及一種在細胞療法下，供治療帶有缺氧性心臟疾病的患者的幹細胞及/或先驅母細胞的方法，係包括以內皮的一氧化氮合成酶之轉錄增強劑處理細胞。

內皮的一氧化氮合成酶(eNOS, NOS-III)為一組含三種同功酶(isoenzymes)的酵素，其藉由氧化精胺酸產生信使分子一氧化氮(NO)，在許許多多的關鍵心血管作用機制中，內皮層-衍生的 NO 是位於中心的重要性，它具有擴張血管、抑制血小板的聚集、白血球粘附至內皮層與內膜平滑肌細胞的增殖待作用，內皮的 NO 合成酶參與生理和病理生理調節是在轉錄時及轉錄後的兩層面，在內皮細胞內的 eNOS 之往上調節，是治療與預防多種病況的有效方法，包括心血管疾病，例如冠狀心臟疾病和動脈粥樣硬化。可增強 NOS 轉錄的化合物，例如被揭露如下者：WO 02/064146、WO 02/064545、WO 02/064546 和 WO 02/064565，在這些參考資料中，對於帶有缺氧性心臟疾病的患者進行細胞療法下，尚無人揭露對幹細胞和先驅母細胞的功能能力的有利影響是藉由在體外處理發生；eNOS 在從骨髓將幹細胞和先驅母細胞動員進入循環系統中之重要性，已在最近被揭露(A. Aicher et al., Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells, Nat. Med. 2003; 9: 1370-1376)。

本發明的較佳具體例中，所用的 eNOS 轉錄增強劑是被揭露在 WO 02/064146、WO 02/064545、WO 02/064546 和 WO 02/064565 與相關的專利文件，例如美國 2003/0008915、美國 2003/0022935、美國 2003/0022939 及美國 2003/0055093，這些內容均併入於此作為參考，在更多的本發明較佳的具體實例中，係使用具式 I 之 eNOS 轉錄增強

劑



5

其中

n 為1, 2 或 3;

R 為苯基或Hetar基，兩者均為無取代或攜帶一、二、三或
 四個相同或相異的選自包括下列之取代基：F; Cl; Br;
 10 C₁-C₃-烷基; C₁-C₃-烷氧基甲基; 2-胺基-3,3,3-三氟丙基-;
 CF₃; C₃-C₅-烷二基; 苯基; 雜芳基; 苯甲基; 雜芳基-甲
 基-; OH; C₁-C₃-烷氧基; 苯氧基; 三氟甲氧基; 2,2,2-三
 氟乙氧基; (C₁-C₄-烷基)COO; (C₁-C₃-烷基)氫硫基; 苯基
 氫硫基; (C₁-C₃-烷基)磺醯基; 苯基磺醯基; NH₂; (C₁-C₄-
 15 烷基)胺基; 二(C₁-C₄-烷基)胺基; (C₁-C₃-烷基)-CONH-;
 (C₁-C₃-烷基)-SO₂NH-; (C₁-C₃-烷基)-CO; 苯基-CO;
 -OCH₂O-; -OCF₂O-; -CH₂CH₂O-; COO(C₁-C₄-烷基);
 -CONH₂; -CONH(C₁-C₄-烷基); -CON(二(C₁-C₄-烷基));
 20 CN; -SO₂NH₂; -SO₂NH(C₁-C₄-烷基); -SO₂N(二(C₁-C₄-烷
 基)); 吡咯啉基; 六氫吡啶基; 嗎啉基; 與硫嗎啉基; 其
 中所有的雜芳基、苯基、含雜芳基與含苯基的基團，其
 為選擇地存在於上述苯基或上述Hetar基中之所述取代
 基者，為無取代或攜帶一、二、三或四個相同或相異的

選自包括下列之取代基: F, Cl, Br, CN, C₁-C₃-烷基, OH, C₁-C₃-烷氧基, 與CF₃;

雜芳基與Hetar基彼此分別獨立地為5-員至10-員的, 芳族, 單環或雙環雜環, 其含有一、二、三或四個相同或相異的選
5 自包括N、O 與 S 之基;

包括其任一種立體異構物或以任一比例混合之混合物, 或其藥學可接受的鹽。

如果式 I 中的基或取代基, 例如, 苯基、雜芳基、烷基等等, 可能出現多次的話, 它們均為各自獨立地具有所示的
10 含義, 並因此, 在各情況下, 可為相同基或相異基, 舉例而言, 二(C₁-C₄-烷基)胺基中, 其中的烷基取代基可以為相同或相異基。

烷基殘基可以是直線的或分枝的、無環的或環形的, 此也適用於當它們為其他基團之一部分時, 例如, 為烷氧基、
15 烷氧基羰基或胺基之一部分, 或它們為經取代時。

烷基的實例為甲基, 乙基, 丙基, 丁基, 這些殘基的正-異構物, 異丙基, 異丁基, 第二-丁基, 第三-丁基, 這兒的
20 烷基一詞也代表含有至少三個碳原子之環烷基殘基與環烷基-烷基-殘基(經環烷基取代之烷基), 這類環烷基殘基的實例為環丙基與環丁基, 環烷基可經取代一或多個相同或相異的(C₁-C₄)-烷基殘基, 特別是甲基, 此外, 除非另有說明, 這些烷基的名詞也包括無取代的烷基殘基以及經一或多個, 例如一、二、三或四個相同或相異的殘基, 例如苯基, 取代者, 在經取代的烷基殘基中, 例如苯基烷基, 取代基可位於任何

所要的位置。

C₃-C₅-烷二基的實例為-CH₂CH₂CH₂-，-CH₂-CH(CH₃)-，
-CH₂CH₂CH₂CH₂-與-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-基。

如無另外說明，上述的苯基殘基與雜環基殘基，包括雜
5 芳基殘基，可為無取代的或攜帶一、二、三或四個相同或相
異的上述被定義的取代基於任何所要的位置上，以單取代的
苯基殘基而言，取代基可位在 2-位置、3-位置或 4-位置，以
二取代的苯基殘基而言，取代基可位於 2,3-位置、2,4-位置、
2,5-位置、2,6-位置、3,4-位置或 3,5-位置，在三取代的苯基
10 殘基而言，取代基可在 2,3,4-位置、2,3,5-位置、2,3,6-位置、
2,4,5-位置、2,4,6-位置或 3,4,5-位置，於四取代的苯基殘基
上，取代基可位於 2,3,4,5-位置、2,3,4,6-位置、或 2,3,5,6-位
置。

除非另有說明，雜芳基殘基與雜環基殘基，例如 Hetar
15 基宜為衍生自含有一、二或三個相同或相異的雜原子之雜環
類者，更佳為衍生自含有一或二個相同或相異的雜原子之雜
環類者，雜環基的環宜為 5-員環、6-員環或 7-員環，更佳為
5-員環或 6-員環；單環與雙環雜環系，從其殘基出現於式 I
的實例者，可衍生自吡咯，呋喃，噻吩，咪唑，吡唑，1,2,3-
20 三唑，1,2,4-三唑，1,3-二噁茂，1,3-噁唑(=噁唑)，1,2-噁唑(=
異噁唑)，1,3-噻唑(=噻唑)，1,2-噻唑(=異噻唑)，四唑，吡啶，
噻吡啶，嘧啶，吡啶，吡喃，硫吡喃，1,4-二噁吡啶，1,2-噁吡啶，
1,3-噁吡啶，1,4-噁吡啶，1,2-噻吡啶，1,3-噻吡啶，1,4-噻吡啶，1,2,3-
三吡啶，1,2,4-三吡啶，1,3,5-三吡啶，1,2,4,5-四吡啶，吡嗪(azepine)，

1,2-二吡呼，1,3-二吡呼，1,4-二吡呼，1,3-氧雜吡呼，1,3-硫
 雜吡呼，吡啶，苯並噻吩，苯並呋喃，苯並噻唑，苯並咪唑，
 苯並二噻唑，喹啉，異喹啉，噌啉，喹唑啉，喹噁啉，酞吡，
 噻吩並噻吩類，1,8-萘啶與其他的萘啶類，喋啶，或啡噻吡，
 5 其各可為飽和型(全氫型式)，或為部分不飽和型式(例如二氫
 型或或四氫型式)或呈最大不飽和的型式，各情況下分別的型
 式為已知且為安定的型式，且被包含在化合物的定義中，雜
 芳基一詞在這兒的定義包含雙環的殘基，其中兩環可均為芳
 族環，且雙環殘基中僅有一環為芳族環，各自獨立地，同樣
 10 適用於 Hetar 基，適當的雜環類包括，例如飽和的雜環類吡
 咯啶，六氫吡啶，嗎啉與硫嗎啉。不飽和的雜環類可包含，
 例如，一、二或三個雙鍵於環系內，5-員的環與 6-員的環也
 可以為芳族環。

可衍生自這些雜環的取代基可經由任何適當的碳原子附
 15 接，衍生自攜帶一個氫原子之氮雜環類的殘基或位於氮原子
 上的取代基，例如吡咯，咪唑，吡咯啶，嗎啉，六氫吡啶，
 也可經由環氮原子被附接，特別是如果個別的雜環殘基是被
 結合至碳原子時，例如，噻吩基殘基可出現成 2-噻吩基殘基
 或 3-噻吩基殘基，呋喃基殘基可為 2-呋喃基殘基或 3-呋喃基
 20 殘基，吡啶基殘基可為 2-吡啶基殘基、3-吡啶基殘基或 4-吡
 啶基殘基，六氫吡啶殘基可為 1-六氫吡啶殘基(=六氫吡啶並
 殘基)、2-六氫吡啶殘基、3-六氫吡啶殘基或 4-六氫吡啶殘
 基，(硫)嗎啉基殘基可為 2-(硫)嗎啉基殘基、3-(硫)嗎啉基殘
 基或 4-(硫)嗎啉基殘基(=(硫)嗎啉基並殘基)，衍生自經由碳

原子附接之 1,3-噻唑或咪唑，可接在 2-位置、4-位置或 5-位置。

5 如果雜環基是經取代時，其可攜帶一、二、三或四個相同或相異的取代基，雜環類上的取代基可出現於任一所要的位置，例如於 2-噻吩基殘基或 2-呋喃基殘基上，可出現於 3-位置及/或 4-位置及/或 5-位置，在 3-噻吩基殘基或 3-呋喃基殘基時，出現於 2-位置及/或 4-位置及/或 5-位置，在 2-吡啶基殘基時，出現於 3-位置及/或在 4-位置及/或在 5-位置及/或 6-位置，在 3-吡啶基殘基時，出現於 2-位置及/或 4-位置及/或 5-位置及/或 6-位置，在 4-吡啶基殘基時，出現於 2-位置及/或 3-位置及/或 5-位置及/或 6-位置；適當的氮雜環也可呈 N-氧化物或含有衍生自藥學可接受的酸之抗衡離子之季銨鹽的型式存在，例如，吡啶基殘基，可以呈吡啶-N-氧化物之型式。

15 本發明包含式 I 化合物之所有的立體化合物型式，出現於式 I 化合物之所有不對對稱中心可獨立地為具有 S 組態或 R 組態，本發明包含所有可能的鏡像物與非鏡像物及兩種或多種立體異構物的混合物，例如，鏡像物及/或非鏡像物以各種比例所成的混合物，於是，根據本發明使用的化合物存在的型式，可以是鏡像純態物，為左旋的或右旋的對偶物 (antipodes)、為外消旋型式物與由兩種鏡像物以任何比例形成之混合物，如果有順式/反式異構化發生時，本發明包括順式與反式的異構物以及這些型或以各種比例形成之混合物，所有這些型式均被包含在本發明中。有必要時，欲製備

各種個別的立體異構物時，可以藉由以下方法進行：例如層析或結晶、使用立體純態的起始化合物進行合成或採用立體選擇性合成法製之，選擇地，在分離立體異構物前可進行衍化反應，立體異構物的混合物的分離可在式 I 化合物的階段或在合成期間的中間物階段進行，本發明也包括式 I 化合物之所有的互變異構物。

如果根據本發明的化合物含有一或多個酸性或鹼性基，本發明也包括其相關的藥學可接受的或毒理學可接受的鹽類，特別是其藥學可利用的鹽類，於是，含有酸性基之式 I 化合物，可在這些基團上產生下述鹽類而被使用：例如鹼金屬鹽類、鹼土金屬鹽類或銨鹽類，這類鹽類的更明確的實例包括鈉鹽、鉀鹽、鈣鹽、鎂鹽或與氨或有機胺類(例如乙基胺，乙醇胺，三乙醇胺或胺基酸類)形成之鹽類；含有一或多個鹼性基之式 I 化合物，即可被加入質子者，可與無機的或有機酸類形成其酸加成鹽類被使用，適當的酸類之實例包括氯化氫，溴化氫，磷酸，硫酸，硝酸，甲磺酸，對-甲苯磺酸，萘磺酸，草酸，乙酸，酒石酸，乳酸，水楊酸，苯甲酸，甲酸，丙酸，新戊酸，二乙基乙酸，丙二酸，琥珀酸，庚二酸，反丁烯二酸，順丁烯二酸，蘋果酸，胺基磺酸，苯基丙酸，葡萄糖酸，抗壞血酸，異菸鹼酸，檸檬酸，己二酸，及其他精於本技藝者所熟知的酸；如果式 I 的化合物在分子中同時含有酸性與鹼性基團，本發明也包含除了上述的鹽外，內鹽或兩性離子鹽(zwitterions)，此個別的鹽類可採用行家已知的習慣方法由式 I 的化合物製得，例如，於溶劑或分散劑中，以

有機或無機酸或鹼與之接觸，或藉由陰離子交換或陽離子交換由其他的鹽類製之。

5 本發明尚包括式 I 化合物之溶劑化物的用途，例如式 I 化合物之水合物或與醇類之加合物，與式 I 化合物之活性代謝物，以及含生理容許的與可斷裂的基團之式 I 化合物之衍生物與前劑，例如酯類、醯胺類與在式 I 中其中 N-H 基被取代成 N-烷基，例如 N-甲基的化合物，或帶有 N-醯基，例如 N-乙醯基或 N-精胺醯基之化合物，包括出現在 N-醯基由官能基形成的藥學可接受的鹽類，只要當根據本發明的用途，
10 在適於供活體外的條件下處理幹細胞與先驅母細胞時，其呈現有所要的活性即可。

特別適於本發明使用的式 I 化合物為其中的一或多個變數為具有如下述的較佳含義者，併合成本發明的較佳化合物，本發明的較佳的式 I 之化合物也包括使用所有的立體異構物型以及以任何比例所成的混合物，與其藥學可接受的鹽類。
15

在聚亞甲基鏈 $(CH_2)_n$ 中之 n ，即 CH_2 基團的數目，宜為 1 或 3，本發明的一具體實例中，被使用的式 I 化合物，其 n 為 1，即，式 R-COOH 的酸之節滿-2-基醯胺，本發明的另一具體實例中，被使用的式 I 化合物其 $n=3$ ，即，6,7,8,9-四氫-5H-苯並環庚烯-6-基醯胺之式 R-COOH 之酸。
20

R 宜為選自 4-氟苯基，4-氯苯基，4-溴苯基，4-(C_1 - C_3 -烷氧基)苯基，4-三氟甲氧基苯基，2-溴-4-氟苯基，2-氯-4-氟苯基，3,4-二甲基苯基，2,4-二甲基苯基，4-氯-2-甲基苯基，

2-羥基-4-甲基苯基，2-羥基-4-乙氧基苯基，2-甲氧基-4-甲基
 苯基，4-苯氧基苯基，3-氟-4-甲基苯基，苯並[1,3]二噁茂-5-
 基，2,2-二氟苯並[1,3]二噁茂-5-基，2,3-二氫苯並呋喃-5-基，
 5 1-(4-氟苯基)-5-三氟甲基-1H-吡唑-4-基，1-(4-氟苯基)-3,5-二
 甲基-1H-吡唑-4-基，1H-苯並三唑-5-基，1H-吡啶-4-基，1H-
 吡啶-6-基，1-異丙基-2-二三氟甲基-1H-苯並咪唑-5-基，1-甲
 基-3-酮基-1,2,3,4-四氫-喹啉-6-基，1-苯基-5-三氟甲基-1H-
 吡唑-4-基，2-(2-羥基吡啶-4-基)-1H-苯並咪唑-5-基，2-(4-氟
 10 基苯基)-1H-苯並咪唑-5-基，2,4-二甲基噁唑-5-基，2,4-二甲
 基嘧啶-5-基，2,4-二甲基噻唑-5-基，2,5-二甲基-1H-吡咯-3-
 基，2,5-二甲基-1-苯基-1H-吡咯-3-基，2,5-二甲基-1-吡啶-4-
 基甲基-1H-吡咯基，2,5-二甲基-2H-唑-3-基，2,6-二氟吡啶-3-
 基，2,6-二甲氧基吡啶-3-基，2,6-二甲基吡啶-3-基，2-胺基-4,6-
 二甲基吡啶-3-基，2-胺基-6-氟吡啶-3-基，2-胺基-吡啶-3-基，
 15 2-氟-6-甲基吡啶-3-基，2-氟吡啶-4-基，2-環丙基-4-甲基-噁
 唑-5-基，2-二甲基胺基-4-甲基-噁唑-5-基，2-二甲基胺基吡
 啶-4-基，2-乙基-5-甲基-2H-吡唑-3-基，2-羥基-6-甲基吡啶-3-
 基，2-甲基-1H-苯並噁唑-5-基，2-甲基-3H-苯並咪唑-5-基，
 2-甲基吡啶-3-基，2-甲基-6-三氟甲基吡啶-3-基，2-甲基噻唑
 20 -5-基，2-(嗎啉-4-基)吡啶-4-基，2-(嗎啉-4-基)嘧啶-5-基，2-(吡
 咯啶-1-基)吡啶-4-基，3,5-二甲基-1H-吡唑-4-基，3-胺基-5,6-
 二甲基吡啶-2-基，3-胺基-5-甲基吡啶-2-基，3-胺基吡啶-2-
 基，3-二甲基胺基-4-甲基苯基，3-二甲基胺基苯基，3H-苯
 並咪唑-5-基，1H-苯並咪唑-5-基，3-甲磺醯基胺基-2-甲基苯

基，3-甲磺醯基胺基苯基，3-甲基-異噁唑-4-基，3-(嗎啉-4-基)苯基，3-(六氫吡啶-1-基)苯基，3-(吡咯啶-1-基)苯基，4-(2,2,2-三氟乙氧基)苯基，4,6-二甲基吡啶-3-基，4-胺基-2-乙基賈烷基嘧啶-5-基，4-胺基-2-甲基嘧啶-5-基，4-氯-3-甲磺醯基胺基-苯基，4-氯-3-胺基磺醯基苯基，4-甲基-3-甲基胺基苯基，4-甲基噻唑-5-基，吡啶-2-基，5,6,7,8-四氫喹啉-3-基，5-胺基-1-苯基-1H-吡唑-4-基，5-甲磺醯基-2-甲基苯基，5-甲基-1-苯基-1H-吡唑-4-基，5-甲基異噁唑-3-基，5-甲基吡啶-3-基，5-甲基吡啶-2-基，6-氯吡啶-3-基，6-氟基吡啶-3-基，6-二甲基胺基吡啶-3-基，6-乙炔基吡啶-3-基，6-甲氧基甲基吡啶-3-基，6-甲氧基吡啶-3-基，6-甲基-2-甲基胺基吡啶-3-基，6-甲基胺基吡啶-2-基，6-甲基吡啶-3-基，6-(嗎啉-4-基)吡啶-3-基，6-(吡咯啶-1-基)吡啶-3-基，咪唑並[1,2-a]吡啶-2-基，6-三氟甲基吡啶-3-基，與嘧啶-4-基。

15 雜芳基宜為 5-員至 10-員的，含有一、二、三個，或較佳地含一或二個選自包括 N、O 與硫之雜原子的芳族、單環或雙環的雜環；最佳的雜芳基係選自包括下列基：呋喃基，吡咯基，噻吩基，噻唑基，異噻唑基，噁唑基，異噁唑基，吡唑基，咪唑基，噻吡基，吡吡基，吡啶基，嘧啶基，苯並二噁唑基，苯並咪唑基，苯並噻唑基，苯並噁唑基，喹啉基，異喹噁啉基，喹噁啉基，喹唑啉基，吲哚基，苯並呋喃基，20 苯並硫苯基，與吲唑基。

Hetar 宜為 5-員至 10-員的，含有一、二、三個，或較佳地含一或二個選自包括 N、O 與硫之相同或相異的雜原子的

芳族、單環或雙環的雜環；最佳的 Hetar 係選自包括下列基：
呋喃基，吡咯基，噻吩基，噻唑基，異噻唑基，噁唑基，異噁
5 噁基，吡唑基，咪唑基，噻吡基，吡吡基，吡啶基，嘧啶
基，苯並二噁烷基，苯並咪唑基，苯並噻唑基，苯並噁唑基，
喹啉基，異喹噁啉基，喹噁啉基，喹唑啉基，吲哚基，苯並
呋喃基，苯並硫苯基，與吲唑基。

本發明的尤其佳的具體實例中，所用的式 I 化合物，其
中 n 為 1 且 R 基具有上述的含義，其中 R 宜被選自，其任何
10 的立體異構物或以任意比例混合的混合物，或其藥學可接受的
的鹽類，另一較佳的具體實例中，所用的式 I 化合物其中的
n 為 3，且 R 基具有上述的含義，其中 R 宜被選自，其任何
的立體異構物或以任意比例混合的混合物，或其藥學可接受的
的鹽類，這樣的尤其佳的式 I 化合物為 4-氟-N-(節滿-2-基)
15 苯甲醯胺與 2,2-二氟苯並[1,3]二噁茂-5-羧酸節滿-2-基醯胺。

根據本發明所用的化合物，明確地說，式 I 之化合物，
及其前驅物，可根據文獻中所述的方法或行家從文獻所知的
類似方法被合成，式 I 的化合物的合成方法可以是，例如，
從個別的式 R-COOH 的酸或其衍生物與個別的胺經形成醯
20 胺鍵以製之，為此，個別的胺可被溶解於惰性溶劑，例如，
水，異丙醇，二氯甲烷，四氫呋喃，甲苯或二噁烷，並在鹼
(例如三乙基胺或氫氧化鈉)存在下，被與適當的羧酸衍生物
(例如羧酸氯化物)在室溫下反應；根據式 I 的化合物也可藉
由偶合反應，將個別的胺與個別的酸，在鹼(例如三異丙基
胺)、適當的偶合劑(例如二環己基碳二醯胺或 TOTU)存在

下，於惰性溶劑內(例如四氫呋喃，二噁烷或二甲基甲醯胺)，例如，於室溫下反應，有必要時，所得的醯基胺可再被官能化以得到其他的化合物，所有的合成式 I 化合物的反應為行家所知的反應且可在文獻所知的標準條件下或類似程序製備者，例如在 Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie (有機化學的方法), Thieme-Verlag, Stuttgart, 或有機反應(Organic Reactions), John Wiley & Sons, New York 之參考書，視個別的狀況，在合成式 I 化合物時，為避免副反應，有必要或較好藉引入保護基暫時地保護官能基，再於合成的較後期階段將保護基移除，或引入成先驅物之官能基，例如硝基(其為胺基之先驅物)，於稍後的步驟再將其轉變成所要的官能基，這樣的適於個別情況之合成策略與保護基與先驅物基為行家所知者，有必要時，式 I 的化合物可採用習用的純化方法加以純化，例如再結晶或層析法；製備式 I 化合物的起始化合物為可購得或可根據或依照文獻中所述的類似方法製得者。

根據本發明，將被 eNOS 轉錄增強劑處理之成年幹細胞與先驅母細胞，其分離與進一步處理可根據揭露於文獻中的標準方法或類似方法處理，這些為從事本業的行家熟知者，所應用的細胞可得自患者的骨髓，由通常的抽取方式取得，且可作為骨髓幹細胞與先驅母細胞或骨髓-衍生的幹細胞與先驅母細胞，利用一般程序處理此骨髓，包括使用密度梯度離心方式劃分以分離單核細胞，經洗滌後，將細胞懸浮於常用的細胞培養基內，例如，置於可購得的 X-Vivo 培養基中

(Cambrex, East Rutherford, New Jersey, USA), 其為一種無白蛋白的培養基且適於供人類應用；至於另種細胞培養基，細胞可被懸浮著供進一步處理，適於供實驗的研究，可提及者為可購得之 RPMI 1640 培養基(Sigma, St. Louis, Missouri, USA)。通常，取得的細胞懸浮液包含不同源的細胞族群，包括造血的先驅母細胞；取得的細胞懸浮液可被區別，例如，造血的與間葉系幹細胞與先驅母細胞，由標準技術鑑別，例如使用習用的抗體藉由流動細胞計數分析(flow cytometry analysis)，細胞的功能活性可被評估，例如，菌落形成單位分析或藉由測定其回應 VEGF 或 SDF-1 之遷移能力，如上所述及更被詳述如後的方法；細胞懸浮液含有將要或可發展成內皮的先驅母細胞之細胞，其可再發展進入內皮的細胞並引出形成新的血管，即，促進缺血區域的新血管形成，除了來自骨髓，根據本發明所用的先驅母細胞也可取自，例如，患者的脂肪組織或循環的血液，利用類似的程序，分別地取得脂肪組織-衍生的先驅母細胞或循環的血液-衍生的先驅母細胞，從血液取得的細胞族群通常會在體外被培養數天後再投與，由於出現在全身循環系統中之內皮的先驅母細胞係衍生自骨髓細胞，以“骨髓衍生的”之詞可恰當地代表得自患者骨髓以及得自收集的血液之細胞。

為了增進其不良的功能活性與歸航能力並因此在重新投與後得以形成新血管形成而在體外處理得自患有缺血性心臟疾病的患者之幹細胞與先驅母細胞的懸浮液的進行方法可以利用供細胞培養的標準狀況下進行，可將細胞懸浮於適

當的介質(例如 X-Vivo, 其為一種完全配方且無需再添加任何其他物質), 懸浮液中的細胞濃度可在介於約 100000/毫升至約 50000/毫升的範圍間, 例如約 1000000/毫升, 供 eNOS 表現增強劑處理之所用的培養基之 pH 範圍通常為介於約 6.5 至約 7.5, 特別是, 約 6.8 至約 7.3, 就如同處理細胞時之 pH, 將細胞懸浮液混入在適當的、藥學可接受的溶劑(例如水或像是乙醇之醇類, 或像是聚乙二醇的聚甘醇類或 DMSO 或這類溶劑之混合物)中之 eNOS 轉錄增強劑之溶液, 此 eNOS 轉錄增強劑之溶液也可含有藥學可接受的輔助劑, 例如緩衝物質或助溶劑類; eNOS 轉錄增強劑在所得的混合物中的濃度通常為自約 1 奈莫耳濃度(nM)至約 1 毫莫耳濃度(mM), 特別是自約 0.1 微莫耳濃度(μM)至約 100 微莫耳濃度(μM), 例如自約 1 μM 至約 10 μM , 例如約 5 μM ; 其後將混合物在無菌狀態、通常為約 37°C 的溫度下、可含有約 5%二氧化碳之潮濕空氣下培養, 培養的期間視個別的狀況而定, 例如所用的 eNOS 轉錄增強劑的效力; 通常為自約 6 小時至約 48 小時, 例如自約 12 小時至約 24 小時, 例如約 18 小時, 如果根據本發明是使用得自循環的血液之先驅母細胞時, 與 eNOS 轉錄增強劑的培養可在上述的培養條件下與這類細胞進行, 所得的混合物可直接被投與給患者而不再處理, 係由於所得的 eNOS 轉錄增強劑為一種在體內也呈現有利效果之藥物物質; 或者, 可先將經處理的細胞從所得的混合物中藉由離心分離, 被洗滌(例如以緩衝溶液洗滌), 再次懸浮, 例如被懸浮於像是 X-Vivo 之培養基中, 再將此懸浮液投與給患者。

本發明的另一目的為先前被描述的製法，係以 eNOS 轉錄增強劑處理以生產具有改進功能活性之幹細胞及/或先驅母細胞，即一種供生產具有改進功能活性之幹細胞及/或先驅母細胞之方法，係包括以內皮的一氧化氮合成酶之轉錄增強劑處理得自帶有缺血性心臟疾病的患者之幹細胞及/或先驅母細胞，本發明的對象也為一種醫藥品(或藥學組成物或藥學製劑)，其係包含一種 eNOS 轉錄增強劑，例如式 I 的化合物及/或其藥學可接受的鹽，與選擇地一種或多種輔助劑，例如鹽類或緩衝物質或助溶劑，用於在細胞療法下供處理帶有缺血性心臟疾病的患者之幹細胞及/或先驅母細胞，以及一個套組或包裝供使用於這樣的治療，其係含有這樣的藥劑與其他供此用途使用之物品，例如，供溶解固態的 eNOS 轉錄增強劑之適當的溶劑或介質，以及使用說明書；此醫藥品可以，例如，包含在瓶、安瓿瓶或小玻璃瓶中之固體 eNOS 轉錄增強劑，在使用前再被溶解至細胞懸浮液，或可被直接加至細胞懸浮液中之 eNOS 轉錄增強劑之溶液。

經以 eNOS 轉錄增強劑處理之幹細胞及/或先驅母細胞的懸浮液可利用靜脈內注射或注入至患者全身或藉由心肌內注射或冠狀的注射或注入，直接進入接近心臟之血管，直接進入梗塞心肌或進入冠狀血管的投與法可在外科手術時進行或經由下面將更詳細說明之心導管(catheterization)方式進行，適當的施用方法已在本技藝中被建立且為行家所熟知者。

本說明書中所稱缺血性心臟病是指包括任何種心臟病其

5 係因不足的血液供應至一或多處心肌所發生或已發生或經
醫生判定需以新血管生成以改善之地帶且包括的疾病為，例
如，冠心病、冠狀動脈疾病、陀性冠狀徵候群、心絞痛、心
肌梗塞、缺血性心臟病變與充血性心衰竭，其中後者疾病可
由於缺血引起；根據本發明可被治療的缺血性心臟病可以是
急性的或慢性的疾病。

【實施方式】

實例

10 eNOS 轉錄增強劑的合成

4-氟-N-(莖滿-2-基)苯甲醯胺

15 將 43.70 克(258 毫莫耳)的 2-胺基莖滿鹽酸鹽與 53.43 克
(528 毫莫耳)的三乙基胺加至 250 毫升的四氫呋喃，然後加
入 42.89 克(270 毫莫耳)的 4-氟苯醯基氯，在室溫下將混合
物攪拌 2 小時，將所得混合物再倒至冰/HCl 之混合物中，濾
下所得沈澱，以 NaHCO₃ 溶液與水洗滌，置於真空下乾燥，
粗製品自甲醇中析出結晶，收量：47.8 克(73%)，為白色晶體
產物。

熔點：167°C

20 質譜：256.1 [M+H⁺]

¹H-NMR 光譜(300 MHz, d₆-DMSO): 2.96 (dd, 2H, H1/3),
3.25 (dd, 2H, H3/1), 4.70 (sextett, 1H, H2), 7.12-7.19 (m, 2H,
H4, 7/5,6), 7.20-7.28 (m, 2H, H5, 6/4,7), 7.30 (t, 2H, H3', 5'),
7.95 (dd, 2H, H2', 6'), 8.68 (d, 1H, NH)。

式 I 的其他化合物係根據如下面舉例之一般程序 A, B 與 C 被合成。

5 **程序 A**

將 0.5 毫莫耳(96 毫克)的 1-乙基-3-(3-(二甲基胺基)丙基)碳二醯胺鹽酸鹽與 0.5 毫莫耳(87 微升)的二異丙基乙基胺(DIPEA)溶解於 2.5 毫升的二氯甲烷(DCM), 加入溶解於 2.5 毫升 DCM 中的 0.5 毫莫耳的個別的酸之溶液, 在室溫下攪拌 10 分鐘, 然後加入 0.7 毫莫耳的個別的胺, 繼續攪拌過夜, 所得溶液經 2N 鹽酸洗滌二遍, 再以飽和的碳酸氫鉀溶液洗滌一遍, 以硫酸鎂弄乾並被過濾, 所得殘留物經蒸發至幾乎乾後, 置於乙酸乙酯己烷或甲醇/二乙醚混合物中析出結晶或經 HPLC 純化。

15

程序 B

對溶解於 5 毫升四氫呋喃之 0.75 毫莫耳的個別的酸與 271 微升(1.575 毫莫耳)的 DIPEA 之溶液, 加入 271 毫克(0.825 毫莫耳)的 O-[(氰基-乙氧基羰基-亞甲基)胺基]-N,N,N',N'-四甲基鎩四氟硼酸鹽(TOTU) (溶解於 1 毫升的二甲基甲醯胺(DMF)), 在室溫下攪拌 15 分鐘後, 加入在 1 毫升 DMF 中之 0.9 毫莫耳的個別的胺鹽酸鹽與 172 微升(1 毫莫耳)的 DIPEA 混合物, 攪拌 6 小時後, 將混合物過濾並濃縮, 殘留物被置入乙酸乙酯, 相繼以 20 毫升的 1N 鹽酸與 20 毫升的 5%的碳

20

酸氫鈉洗滌，所得的有機層經濃縮後，以製備性 HPLC 純化 (RP 18，乙腈/水)。

程序 C

5 將 2.5 毫莫耳的個別的胺，與 550 毫克的三乙基胺及 5 毫升的二噁烷混合，再加入 2.5 毫莫耳的個別的羧酸氯化物，在室溫下攪拌 2 小時，將所產生的混合物倒入至冰/HCl 之混合物中，所得沈澱經乙酸乙酯萃取，以硫酸鈉弄乾並被濃縮，所得殘留物經製備性 HPLC 分劃。

10

至於製備的化合物之實例，可提及者為下者。

2,2-二氟苯並[1,3]二氧基-5-羧酸節滿-2-基醯胺

熔點: 147.5°C

質譜: 318.2 [M+H⁺]

15

¹H-NMR 光譜 (400 MHz, d₆-DMSO): 2.91-2.99 (m, 2H, H-1/H-3), 3.22-3.30 (m, 2H, H-3/H-1), 4.69 (sext, 1H, H-2), 7.13-7.19 (m, 2H, H-4,H-7 或 H-5, H-6), 7.21-7.28 (m, 2H, H-4.H-7 或 H-5, H-6), 7.50 (d, 1H, H-6'/H7'), 7.80 (d, 1H, H-7'/H6), 7.88 (s, 1H, H4'), 8.71 (d, 1H, NH)

20

測量 eNOS 轉錄作用的活化作用

eNOS 轉錄作用的活化作用是根據詳述於 Li et al., Activation of protein kinase C alpha and/or epsilon enhances transcription of the human endothelial nitric oxide synthase

gene, Mol. Pharmacol. 1998, 53:630-637中的方法進行，簡單地說，是將eNOS基因的起始密碼子5'端的一段3.5Kb長斷片進行克隆化(cloned)、序列化及克隆進入螢火蟲螢光素酶表現質粒，以便監測被通訊基因活性引發之eNOS啟動子之活性，
5 使用經穩定被轉殖及表現此啟動-及通訊子結構物之人類內皮細胞株供化合物的測試；細胞被與試驗的化合物一起培養18小時，所有的化合物先被溶解於無菌的DMSO，在完全培養基內的最後濃度允許達0.5%的DMSO，在這些細胞中受通訊基因誘導表現是使用標準的螢光素酶分析系統(Promega,
10 Madison, Wisconsin, USA; Cat. No E150)，根據製造者之指示進行，比較與化合物一起培養及僅與溶劑一起培養之細胞中之螢光素酶誘發反應，兩者活性的比例(轉錄作用誘導比例, TIR)相對於化合物的濃度被繪成圖表，典型地，TIR值在低濃度下開始時比例為1，顯示無化合物的影響，發展至最大的TIR值TIR(max)時，顯示eNOS轉錄作用的增加，隨化合物
15 濃度而變的轉錄作用誘導比例的EC₅₀值由圖表測定。

骨髓細胞的分離

骨髓抽出物是收集自年齡介於18與75間，9名健康的對照組與25名個帶穩定的冠心病及具有心肌梗塞病史的患者，患者必須有區部心臟牆壁動作反常性、可利用的原生血管、冠狀動脈接枝、或側枝的動脈，由於心肌局部缺血為人所知會動員骨髓-衍生的先驅母細胞；排除在過去4個星期有可誘導的或靜止跡象的心肌局部缺血之患者，另外的排除標準是出
20

現活躍的或慢性的感染、在前二個月內動過手術或有創傷、有惡性疾病跡象者、胃腸流血者、高於160/100 毫米汞柱之無法控制的高血壓、最近二年之內罹患過中風者、AV-動脈瘤、腎臟或肝功能不足、血小板計數 < 100000 /微升之血小板減少症、血紅蛋白 < 8.5 g/dl之貧血症、精神退化症、正進行另外的臨床試驗者、或不情願參與者；也被排除的是孕婦與更年期前(premenopausal)婦女。經德國法蘭克福的Johann Wolfgang Goethe大學的附設醫院的倫理審查委員會批准此實驗計劃，並且此研究是配合赫爾辛基的聲明(Declaration of Helsinki)進行，從各個患者取得書面同意書。

自每一參與者抽取總共為50毫升的骨髓抽取液，藉由密度梯度離心將骨髓幹細胞與先驅母細胞分離，經二次洗滌步驟後，將細胞重新懸浮至10毫升的X-vivo 10 培養基(不含慶大黴素(gentamicin)與酚紅；Cambrex, East Rutherford, New Jersey, USA)，此細胞懸浮液包含不同源的細胞族群，包括造血的先驅母細胞。

此骨髓幹細胞與先驅母細胞是利用流動細胞計數法分析，為鑑定造血的與間葉系幹細胞與先驅母細胞族群，直接地使用對抗人類CD45 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA)、CD34 (FITC-labeled; BD Pharmingen, San Diego, California, USA)、CD133 (APC-labeled; BD Pharmingen)、CD14 (FITC-labeled; BD Pharmingen)、CXCR4 (APC-labeled, BD Pharmingen)、與CD49d (APC-labeled; BD Pharmingen)的共軛結合的抗體，血統對照簿(lineage panel)

是得自BD Pharmingen (含有FITC-標示的CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, 與CD56) 且經額外直接使用對抗CD15與血型糖蛋白A(glycophorin A) (兩者均得自BD Pharmingen)之FITC-共軛結合的抗體以完成。

5

以eNOS 轉錄增強劑處理骨髓細胞

為與eNOS 轉錄增強劑 4-氟-N-(節滿-2-基)苯甲醯胺進行培養，將1毫升懸浮在1毫升的X-Vivo 10之細胞培養基中之1000000個幹細胞與先驅母細胞的懸浮液，混合1微升，溶在DMSO之 4-氟-N-(節滿-2-基)苯甲醯胺溶液，其係由1.275毫克的 4-氟-N-(節滿-2-基)苯甲醯胺被溶解在1毫升的DMSO中預先製備；4-氟-N-(節滿-2-基)苯甲醯胺在所得的混合物中之濃度為5 μ M；為與eNOS 轉錄增強劑 4-氟-N-(節滿-2-基)苯甲醯胺及eNOS抑制劑 N^G -單甲基-L-精胺酸(L-NMMA)一起培育，除了4-氟-N-(節滿-2-基)苯甲醯胺之外，另加入L-NMMA (Sigma, St. Louis, Missouri, USA)至細胞懸浮液中，產生具有4-氟-N-(節滿-2-基)苯甲醯胺的濃度為5 mM且L-NMMA的濃度為1 mM之混合物，培養是在37°C下，含5%二氧化碳的空氣中進行18小時，離心收集細胞，以PBS洗滌二遍，再懸浮於X-Vivo 10。

骨髓細胞的功能活性之測定

為評估族群(colony)形成能力，將骨髓幹細胞與先驅母細胞(1×10^5 /碟)播種在甲基纖維素板子上(Methocult GF H4535

包含幹細胞因子、顆粒球菌落-刺激因子、顆粒球巨噬細胞菌落-刺激因子、介白素-3、介白素-6; CellSystems, St. Katharinen, Germany), 板子置於相對比式顯微鏡下被研究, 培養14天後, 計數菌落形成單位顆粒球-巨噬細胞(CFU-GM; 菌落 > 50個細胞)。

為評估骨髓幹細胞與先驅母細胞的遷移的能力, 將總數為 1×10^6 的骨髓幹細胞與先驅母細胞再懸浮於250微升的 X-Vivo 10培養基中並置於充填著matrigel (BioCoat invasion assay, 8 urn pore size, Becton Dickinson Labware, Two Oak Park, Bedford, Massachusetts, USA)的經改造的Boyden盒的上層盒上, 然後, 將盒子置於24-槽培養碟中其中含有500微升, 補充有磷酸緩衝的鹽液(PBS), 50奈克/毫升之VEGF, 或100奈克/毫升之SDF-1的內皮的基本的培養基(EBM), 在37°C下培養24小時後, 計數轉遷移的細胞。

小鼠體內後肢局部缺血模式

骨髓幹細胞與先驅母細胞的新血管形成作用能力是以鼠科動物之後肢缺血模式進行探討, 使用重量為18至22克, 8至10星期大的無胸腺的(athymic)NMRI裸鼠(The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA), 以7-0絲縫線結紮大腿動脈的靠近身體部位, 包括淺層與深層分枝的以及隱動脈(saphenous artery)的遠端, 所有介於結紮點間的動脈分枝使用電燒結器將其閉止, 重疊的皮膚使用三手術夾被封閉, 24小時後, 經由靜脈內注射入懸浮於X-Vivo 10培養基之骨髓幹

細胞與先驅母細胞(5×10^4 , 5×10^5 , 或 5×10^6 細胞/老鼠; $n = 5$ /每組), 兩星期後, 測量後肢的灌流情形, 明確地說, 係使用一種雷射都普樂血流測量計 (Laser Doppler Perfusion Imager System, MoorLDI-Mark 2, Moor Instruments, Wilmington, Delaware, USA) 測量缺血的(右)肢/正常的(左)肢之血液流動比例, 在開始掃瞄前, 老鼠被置於 37°C 的熱板上以弱化溫度的變量, 兩次記錄雷射Doppler顏色影像後, 根據著色的分佈圖像素計算缺血的與非-缺血的肢之平均的灌流情形, 儘量減少變數, 包括周遭的光線與溫度, 計算得的灌流以缺血的相對於非-缺血的後肢灌流的比例表示。

為組織學的檢視, 組織的血管形成是於取自缺血的與非-缺血的後肢之內收肌與半膜狀的肌肉之5微米冷凍切片測定, 內皮細胞是以FITC-標示的針對於對抗CD146 (Chemicon, Temecula, California, USA)之單株抗體染色, 毛細管的密度是以毛細管的數目/肌母細胞表示, 人類骨髓幹細胞與先驅母細胞是使用以HLA-DR-APC-標示的抗體類(BD Pharmingen, San Diego, California, USA) 及CD146-FITC-標示的抗體類進行共-染色而辨認。

20 對患者投與骨髓細胞

對患者投與經eNOS 轉錄增強劑處理的骨髓細胞可使用下述的心導管法供先驅母細胞的轉殖, 將尺碼大0.5毫米的導線氣球導管(over-the-wire balloon catheter)推進入早先被種入的支架內, 考慮到被灌輸的細胞經由內皮層之黏附與細胞

5 潛在的轉移作用，氣球以低壓被膨脹以完全地阻攔血流經3分鐘，而3.3毫升的先驅母細胞懸浮液被從遠端經由氣球導管的中央口岸送至堵塞的氣球，此程序重覆三遍以達成輸送總共為10毫升的先驅母細胞懸浮液，在中斷的3分鐘逆流時，將氣球放氣以減少過度的區部缺血，在冠狀內的細胞移植完成後，冠狀血管被重覆與對照的材料比較，以確認血管的通暢性與未受阻礙的流動。

10 統計分析是藉由標準的方法執行，如無另外聲明，對連續的變數是以平均值±標準差表示，各組間的比較是藉由t 試驗(兩面的(two-sided))或差異分析(ANOVA)，在多於兩個次群組的實驗加以分析；Post hoc範圍測試與pair wise多重比較是藉由t 試驗(兩面的)以Bonferroni進行調整；分類別的變數的比較是由Pearson X^2 試驗產生，骨髓幹細胞與先驅母細胞的試管特徵的儀器評價後，其試驗結果併入得自體內的研究結果，為辨認骨髓幹細胞與先驅母細胞之體內新血管形成能力的體外決定因子，進行多維分佈的線性回歸分析， $P < 0.05$ ，被認為在統計上是有意義的，所有的分析係使用SPSS 11.5進行(SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA)。

20 得到如下的結果：

eNOS 轉錄作用的活化作用的測量

於供eNOS 轉錄作用的活化作用之螢光素酶分析中，化合物4-氟-N-(茛滿-2-基)苯甲醯胺呈現的 EC_{50} 值為 $0.8 \mu M$ 與TIR(max)值為4.10。

於供eNOS 轉錄作用的活化作用之螢光素酶分析中，化合物2,2-二氟苯並[1,3]二噁茂-5-羧酸苄滿-2-基醯胺呈現的 EC_{50} 值為 $0.8 \mu\text{M}$ 與TIR(max)值為2.7。

5 骨髓細胞的功能活性的測量

得自患者的骨髓幹細胞與先驅母細胞之菌落形成活性為 37.3 ± 25.0 CFU-GM/碟，相對地，得自健康的對照組者為 113.8 ± 70.4 CFU-GM/碟($P = 0.009$)。

10 得自患者的骨髓幹細胞與先驅母細胞回應VEGF的遷移反應為 $34.0 \pm 24.2 \times 1000$ 遷移的細胞，相較於得自健康的對照組者為 $54.8 \pm 29.3 \times 1000$ 遷移的細胞($P = 0.027$)。

得自患者的骨髓幹細胞與先驅母細胞回應SDF-1的遷移反應為 $46.3 \pm 26.2 \times 1000$ 遷移的細胞，相較於得自健康的對照組者為 $108.6 \pm 40.4 \times 1000$ 遷移的細胞($P < 0.001$)。

15 得自健康者的骨髓幹細胞與先驅母細胞，經PBS處理18小時後，回應SDF-1的遷移反應為 $126.5.3 \pm 41.7 \times 1000$ 遷移的細胞，相較於得自健康的對照組，經4-氟-N-(苄滿-2-基)苯甲醯胺($5 \mu\text{M}$)處理18小時後者為 $111.2 \pm 38.5 \times 1000$ 遷移的細胞($P < 0.001$)。

20 得自患者的骨髓幹細胞與先驅母細胞，經PBS處理18小時後，回應SDF-1的遷移反應為 $38.0 \pm 13.7 \times 1000$ 遷移的細胞，相較於得自患者的，經4-氟-N-(苄滿-2-基)苯甲醯胺($5 \mu\text{M}$)處理18小時後者為 $74.0 \pm 20.7 \times 1000$ 遷移的細胞($P < 0.001$)。

得自患者的骨髓幹細胞與先驅母細胞，經4-氟-N-(節滿-2-基)苯甲醯胺(5 μ M)與N^G-單甲基-L-精胺酸(L-NMMA)(1 mM)處理18小時後，回應SDF-1的遷移反應為 $23.9 \pm 7.4 \times 1000$ 遷移的細胞，相較於得自健康的對照組者，經4-氟-N-(節滿-2-基)苯甲醯胺(5 μ M)處理18小時後，為者為 $74.3 \pm 21.5 \times 1000$ 遷移的細胞(P < 0.001)。

老鼠的活體後肢缺血模式

幹細胞與先驅母細胞的效果的比較是在 5×10^5 細胞/小鼠的細胞濃度下進行，在此濃度下，可達到以得自健康的控制組之骨髓幹細胞與先驅母細胞進行的最大治療效果。

在各式各樣的試驗族群中，在經投與如指定的骨髓幹細胞與先驅母細胞後，測量下述的雷射Doppler-衍生的相對血流值(缺血的(右)肢/正常的(左)肢之血液流動百分比例)。

無細胞	$21.9 \pm 10.8\%$ n=11
來自健康者的細胞(對照組)	$72.7 \pm 18.7\%$ n = 24
來自患者的細胞(未處理者)	$40.7 \pm 12.2\%$ n = 24
來自患者的細胞(以5 μ M的4-氟-N-(節滿-2-基)苯甲醯胺處理18小時者)	$59.1 \pm 11.6\%$ * n = 24
來自患者的細胞(以5 μ M的4-氟-N-(節滿-2-基)苯甲醯胺與1 mM的L-NMMA處理18小時者)	$39.7 \pm 10.3\%$ n = 18

* P < 0.001 相對於來自患者，未處理者。

五、中文發明摘要：

本發明係關於某類化合物的用途，對罹患缺氧性心臟疾病(例如冠心病或缺氧性心肌病變)之患者，進行細胞療法時，使用此類化合物處理幹細胞與先驅母細胞(先驅母細胞)以增強內皮細胞的一氧化氮合成酶(eNOS)的轉錄作用；以
5 eNOS 轉錄增強劑先處理這類細胞(例如，可自骨髓分離得者)，再投與，以便增進其功能活性與改善心臟的新血管形成及心臟再生。

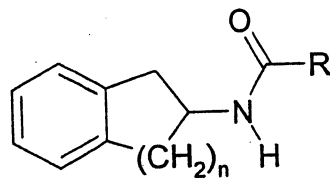
10

六、英文發明摘要：

The present invention relates to the use of compounds which enhance the transcription of endothelial nitric oxide
15 synthase (eNOS) for treating stem and progenitor cells in the cell therapy of patients with ischemic heart diseases such as coronary heart disease or ischemic cardiomyopathy. Treatment of such cells which are isolated from bone marrow, for example, with an eNOS transcription enhancer
20 prior to their administration improves their functional activity and ameliorates neovascularization of the heart and cardiac regeneration.

十、申請專利範圍：

1. 使用內皮的一氧化氮合成酶的轉錄增強劑用於生產一種醫藥品之用途，此醫藥品是被用於在細胞療法中，供處理患有缺血性心臟疾病之病人的幹細胞(stem)及/或先驅母細胞(progenitor cell)。
2. 根據申請專利範圍第 1 項的用途，其中內皮的一氧化氮合成酶的轉錄增強劑是具式 I 之化合物



其中

n 為 1, 2 或 3;

R 為苯基或Hetar基，兩者均為無取代或攜帶一、二、三或四個相同或相異的選自包括下列之取代基：F; Cl; Br; C₁-C₃-烷基; C₁-C₃-烷氧基甲基; 2-胺基-3,3,3-三氟丙基-; CF₃; C₃-C₅-烷二基; 苯基; 雜芳基; 苯甲基; 雜芳基-甲基-; OH; C₁-C₃-烷氧基; 苯氧基; 三氟甲氧基; 2,2,2-三氟乙氧基; (C₁-C₄-烷基)COO; (C₁-C₃-烷基)氫硫基; 苯基氫硫基; (C₁-C₃-烷基)磺醯基; 苯基磺醯基; NH₂; (C₁-C₄-烷基)胺基; 二(C₁-C₄-烷基)胺基; (C₁-C₃-烷基)-CONH-; (C₁-C₃-烷基)-SO₂NH-; (C₁-C₃-烷基)-CO; 苯基-CO; -OCH₂O-; -OCF₂O-; -CH₂CH₂O-; COO(C₁-C₄-烷基); -CONH₂;

-CONH(C₁-C₄-烷基); -CON(二(C₁-C₄-烷基)); CN;
 -SO₂NH₂; -SO₂NH(C₁-C₄-烷基); -SO₂N(二(C₁-C₄-烷
 基)); 吡咯啉基; 六氫吡啶基; 嗎啉基; 與硫嗎啉基;
 其中所有的雜芳基、苯基、含雜芳基與含苯基的基
 團, 其為選擇地存在於上述苯基或上述Hetar基中之
 5 所述取代基者, 為無取代或攜帶一、二、三或四個
 相同或相異的選自包括下列之取代基: F, Cl, Br,
 CN, C₁-C₃-烷基, OH, C₁-C₃-烷氧基, 與CF₃;

10 雜芳基與 Hetar 基彼此分別獨立地為 5-員至 10-員的,
 芳族, 單環或雙環雜環, 其含有一、二、三或四個相同
 或相異的選自包括 N、O 與 S 之基;

包括其任一種立體異構物或以任一比例混合之混合
 物, 或其藥學可接受的鹽。

- 15 3. 根據申請專利範圍第 1 及/或 2 項的用途, 其中內皮的一
 氧化氮合成酶的轉錄增強劑是選自 4-氟-N-(茚滿-2-基)
 苯甲醯胺與 2,2-二氟苯並[1,3]二噁茂-5-羧酸茚滿-2-基
 醯胺。
4. 根據申請專利範圍第 1 至 3 項中之一或多項的用途, 其
 中幹細胞及/或先驅母細胞係取自病人的骨髓。
- 20 5. 根據申請專利範圍第 1 至 4 項中之一或多項的用途, 其
 中幹細胞及/或先驅母細胞係被與內皮的一氧化氮合成
 酶的轉錄增強劑一起培養經過 6 小時至 48 小時。
6. 根據申請專利範圍第 1 至 5 項中之一或多項的用途, 其
 中缺血性心臟病是冠心病、冠狀動脈疾病、急性冠狀微

候群、心絞痛、心肌梗塞、缺血性心肌病變或充血性心衰竭。

7. 根據申請專利範圍第 1 至 6 項中之一或多項的用途，其中被處理的幹細胞及/或先驅母細胞係藉由靜脈內、冠狀內或心肌內的注射或灌流的方式被投與給患者。
8. 一種製備對於患有缺血性心臟病的病人的細胞療法下，供處理幹細胞及/或先驅母細胞的醫藥品之方法，包括運用一氧化氮合成酶的轉錄增強劑。
9. 一種供製備具有增進的功能活性的幹細胞及/或先驅母細胞的方法，係包括以一氧化氮合成酶的轉錄增強劑處理得自患有缺血性心臟病的病人的幹細胞及/或先驅母細胞。
10. 一種供處理細胞療法下之患有缺血性心臟病的病人的幹細胞及/或先驅母細胞之醫藥品，其係包含一氧化氮合成酶的轉錄增強劑。

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 () 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無