

(由本局填寫)

|           |
|-----------|
| 承辦人代碼：    |
| 大類：       |
| I P C 分類： |

A6

B6

本案已向：

國（地區） 申請專利，申請日期： 案號： ， ☐有 ☐無主張優先權

美國 2001年03月23日 60/277,974 ☒有 ☐無主張優先權

美國 2001年08月29日 60/315,338 ☒有 ☐無主張優先權

有關微生物已寄存於： 寄存日期： ，寄存號碼：

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 1 )

### 發明範圍

本申請案主張2001年3月23日申請之美國臨時專利申請案第60/277,974號及2001年8月29日申請之美國臨時專利申請案第60/315,338號之權利。

本發明係關於化合物及其衍生物，其合成法，及其作為Rho-激酶抑制劑之用途。本發明這些化合物可用以抑制腫瘤生長，治療勃起機能障礙，及治療經由Rho-激酶媒介之其它病徵，例如，冠狀動脈心臟病。

### 背景

許多人類及動物疾病(其包括高血壓，勃起機能障礙，冠狀動脈腦循環損害，神經變性病徵及癌症)之病理學直接與肌動蛋白細胞支架之變化有關聯。這些疾病造成一項嚴重不能令人滿意之醫療需求。該肌動蛋白細胞支架係由肌動蛋白絲網狀體及在全部真核狀態細胞可發現的肌動蛋白結合性蛋白質所組成。在平滑肌細胞內，該肌動蛋白細胞支架之組合及拆解為造成平滑肌收縮及鬆弛之主要運動力。在非肌細胞內，該肌動蛋白細胞支架之動態重排為造成細胞形態調整，細胞游動，肌動蛋白應激纖維形成，細胞黏連及特定細胞機能(例如，神經突退縮，吞噬作用或胞質分裂之主因(Van Aelst等人, Genes Dev 1997, 11, 2295)。

該肌動蛋白細胞支架可受蛋白質科(其係為該GTP酶之Ras超科)控制。該次群目前係由RhoA至E及RhoG(通稱為Rho)，Rac 1與2，Cdc 42Hs及G25K與TC10對碘醯苯甲醚所組成(Mackay, 等人, J. Biol Chem 1998, 273, 20685)。這

## 五、發明說明 ( 2 )

些蛋白質為具有特有GTP酶活性之GTP(鳥嘌呤核苷酸三磷酸鹽)結合性蛋白質。其可作為非活性GDP(鳥嘌呤核苷酸三磷酸鹽)結合態與活性GTP結合態間之分子開關及循環。經由使用生化及遺傳方法，可分配各科成員之功能。一旦經活化時，該Rho蛋白質可控制肌動蛋白應激纖維之形成，肌動蛋白絲之厚束，及局部性黏連複合體之整合素群集。當經活化時，該Rac蛋白質可控制在該細胞表面上之薄片足或膜之形成，且Cdc42可控制絲狀假足形成。該蛋白質科同時在關鍵細胞功能(其包括細胞移動，軸索導引，胞質分裂，及細胞形態，形狀與極性之改變)之控制上扮演重要的角色。

根據該細胞種類及該激活受體，該Rho蛋白質可控制不同生物反應。在平滑肌細胞中，Rho蛋白質為平滑肌收縮作用之該鈣敏化之主因。在非平滑肌細胞內，該Rho GTP酶為該細胞對於促效劑(例如，溶血磷脂酸(LPA)，凝血酶及前列凝素A<sub>2</sub>產生反應之主因(Fukata, 等人, Trends Pharmacol Sci 2001, 22, 32)。促效劑反應係經由異三聚物G蛋白質，G<sub>α12</sub>或G<sub>α13</sub>偶聯(Goetzl, 等人, Cancer Res 1999, 59, 4732; Buhl, 等人, J. Biol Chem 1995, 270, 24631)，但是亦可經由其它受體。一旦經活化時，Rho GTP酶可活化許多下游效應物，其包括PIP5-激酶，Rhothekin，Rhopilin，PKN及Rho-激酶對碘醯苯甲醚ROCK-1/ROK<sub>β</sub>及ROCK-1/ROK<sub>α</sub> (Mackay and Hall J Biol Chem 1998, 273, 20685; Aspenstrom Curr Opin Cell Biol 1999, 11, 95; Amano, 等人,

## 五、發明說明 ( 3 )

Exp Cell Res 2000, 261, 44)。

已確認 Rho-激酶為可自牛腦離析之 RhoA 交互作用蛋白質 (Matsui, 等人, Embo J 1996, 15, 2208)。其係為蛋白質激酶之該肌強直性營養不良之一員，且其含絲胺酸/蘇胺酸特殊結構部份於該胺基末端，卷曲的螺旋特殊結構部份在該中央區內，及 Rho 交互作用特殊結構部份於該羧基末端 (Amano, 等人, Exp Cell Res 2000, 261, 44)。一旦與 GTP-束縛 RhoA 結合時，可增強其激酶活性，且當導入細胞內時，其可再生許多該已活化 RhoA 之活性。在平滑肌細胞內，Rho-激酶可媒介鈣敏化作用及平滑肌收縮作用，並抑制 Rho-激酶對於 5-HT 之阻斷及抑制苯基腎上腺素促效劑所誘發之肌肉收縮作用。當導至非平滑肌細胞內時，Rho-激酶可誘發激應纖維形成，且經由 RhoA 所媒介之該細胞轉化需要該 Rho-激酶 (Sahai, 等人, Curr Biol 1999, 9, 136)。Rho-激酶可經由磷酸化作用調整許多下游蛋白質，其包括肌凝蛋白輕鏈 (Somlyo, 等人, J Physiol (Lond) 2000, 522 Pt 2, 177)，該肌凝蛋白輕鏈磷酸酶結合亞單元體 (Fukata, 等人, J Cell Biol 1998, 141, 409) 及 LIM-激酶 2 (Sumi, 等人, J Bio Chem 2001, 276, 670)。

動物模式中之 Rho-激酶活性之抑制作用已證明許多 Rho-激酶抑制劑可用以治療人類疾病。許多患者已公開宣稱在動物模式中，(+)-反式-4-(1-胺基乙基)-1-(吡啶-4-基胺基羰基)環己烷二鹽酸鹽單水合物 (WO-00078351, WO-00057913) 及經取代之異喹啉磺醯基化合物 (歐洲專利-

## 五、發明說明 ( 4 )

00187371)可作為有效之Rho-激酶抑制劑。這些模式包括心血管疾病，例如，高血壓(Uehatas,等人, Nature 1997, 389, 990)，動脈粥瘤硬化(Retzer,等人, FEBS Lett 2000, 466, 70)，再狹窄(Eto,等人, Am J Physiol Heart Circ Physiol 2000, 278, H1744；Negoro,等人, Biochem Biophys Res Commun 1999, 262, 211)，大腦局部缺血(Uehata,等人, Nature 1997, 389, 990；Seasholtz,等人, Circ Res 1999, 84, 1186；Hitomi,等人, Life Sci 2000, 67, 1929；Yamamoto,等人, J Cardiovasc Pharmacol 2000, 35, 203)，大腦血管痙攣(Sato,等人, Circ Res 2000, 87, 195；Kim,等人, Neurosurgery 2000, 46, 440)；陰莖勃起機能障礙(Chitaley,等人, Nat Med 2001, 7, 119)；中樞神經系病症，例如，神經單位變性及脊髓傷害(Hara,等人, J Neurosurg 2000, 93, 94；Toshima,等人, Stroke 2000, 31, 2245)；在腫瘤形成中，Rho-激酶之抑制作用已證明可抑制腫瘤細胞生長及轉移(Itoh,等人, Nat, Med 1999, 5, 221；Somlyo,等人, Biochem Biophys Res Commun 2000, 269, 652)；血管生成(Uchida,等人, Biochem Biophys Res Commun 2000, 269, 633；Gingras,等人, Biochem J 2000, 348 Pt 2, 273)；動脈栓塞病症，例如，血小板聚集(Klages,等人, J Cell Biol 1999, 144, 745；Retzer,等人, Cell Signal 2000, 12, 645)及白血球聚集(Kawaguchi,等人, Eur J Pharmacol 2000, 403, 203；Sanchez-Madrid,等人, Embo J 1999, 18, 501)；氣喘(Setoguchi,等人, Br J Pharmacol 2001, 132, 111；Nakahara,

## 五、發明說明 ( 5 )

等人, Eur J Pharmacol 2000, 389, 103) ; 眼內壓之調節 (Honjo, 等人, Invest Ophthalmol Vis Sci 2001, 42, 137) 及骨吸收 (Chellaiah, 等人, J Biol Chem 2000, 275, 11993 ; Zhang, 等人, J Cell Sci 1995, 108, 2285) 。

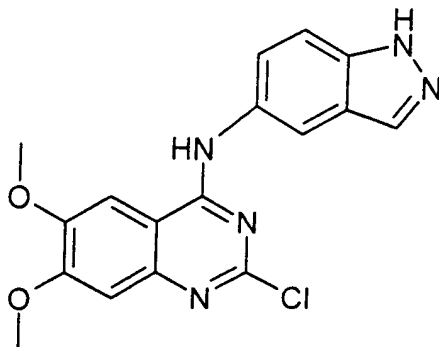
對於患者身上之 Rho- 激酶之抑制作用可控制大腦血管痙攣及蛛網膜下出血後之局部缺血 (Pharma Japan 1995, 1470, 16) 。

## 發明簡述

本發明所提供之化合物及其衍生物可作為 Rho- 激酶抑制劑，因此可使用以治療高血壓，動脈粥瘤硬化，再狹窄，大腦局部缺血，大腦血管痙攣，神經單位變性，脊椎傷害，乳癌，大腸癌，攝護腺癌，卵巢癌，腦癌與肺癌及其轉移生成物，栓塞病症，氣喘，青光眼及骨質疏鬆症。

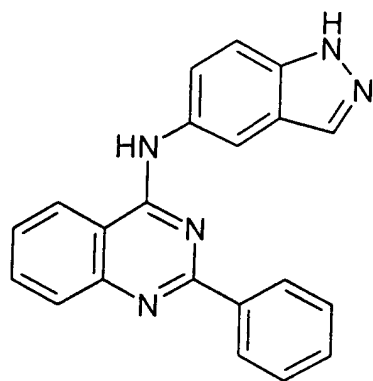
此外，本發明化合物亦可使用以治療勃起機能障礙，亦即，經由 Rho- 激酶媒介的勃起機能障礙。勃起機能障礙可定義為進行性交時，不能獲得或持續適當之勃起 (WO 94/28902, U.S.P. 6,103,765 及 U.S.P. 6,124,461) 。

本發明提供下式化合物

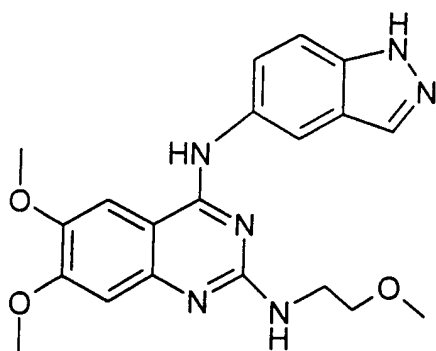


(I)

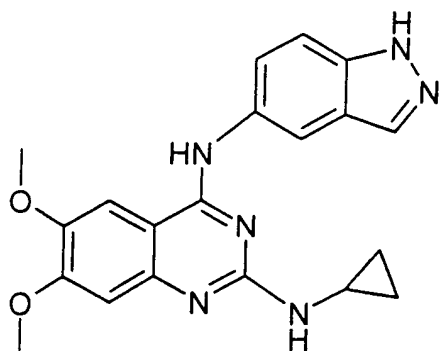
五、發明說明 ( 6 )



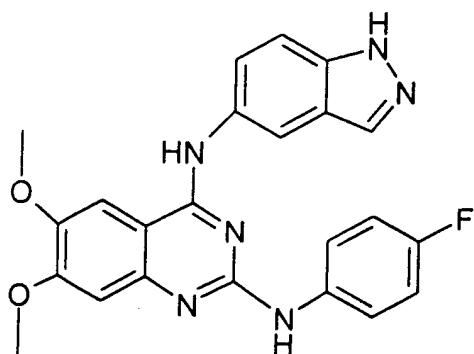
(II)



(III)

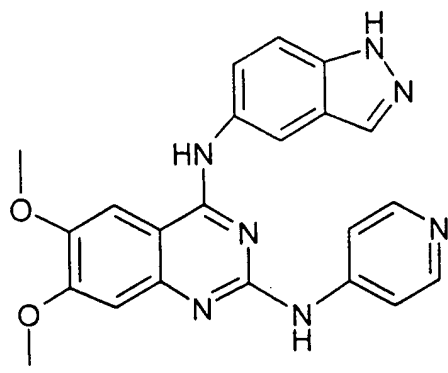


(IV)



(V)

# 五、發明說明 ( 7 )



(VI)

本發明亦係關於式I-VI之醫藥上可接受鹽。適合之醫藥上可接受鹽為此等熟悉本技藝者所熟知，且其包括下列無機及有機酸之鹼式鹽：例如，鹽酸，氫溴酸，硫酸，磷酸，甲基磺酸，磺酸，醋酸，三氟醋酸，蘋果酸，酒石酸，檸檬酸，乳酸，草酸，琥珀酸，反丁烯二酸，順丁烯二酸，苯甲酸，柳酸，苯基醋酸，及扁桃酸。此外，醫藥上可接受鹽包括無機鹼之酸式鹽，例如，含鹼性陽離子(例如， $\text{Li}^+$ ， $\text{Na}^+$ 或 $\text{K}^+$ )之鹽，含鹼土陽離子(例如， $\text{Mg}^+$ ， $\text{Ca}^+$ 或 $\text{Ba}^+$ )之鹽，含該銨陽離子之鹽，以及下列有機鹼之酸式鹽，其包括經脂肪族及芳香族取代之銨，及第四銨陽離子，例如，此等自三乙胺，N,N-二乙胺，N,N-二環己胺，吡啶，N,N-二甲基胺基吡啶(DMAP)，1,4-重氮雙環[2.2.2]辛烷(DABCO)，1,5-重氮雙環[4.3.0]壬-5-烯(DBN)及1,8-重氮雙環[5.4.0]十一-7-烯(DBU)之質子化反應及金烷化反應所產生之化合物。

許多該式I-VI化合物具有不對稱碳，因此可以呈外消旋及旋光活性之型式存在。鏡像異構性及非鏡像異構性混合物之分離方法為熟悉本技藝者所熟知。本發明包括具有Rho-激酶抑制活性之式I-VI中所述任何已離析外消旋或旋

## 五、發明說明( 8 )

光活性型式之化合物。

本發明亦包括醫藥組合物(其包括式I-VI化合物)及生理上可接受載劑。

本發明更係包括經由投予式I-VI化合物或含式I-VI化合物之醫藥組合物治療經由Rho-激酶媒介之病徵。因此，本發明包括，例如，經由對需要治療之患者投予有效量之式I-VI化合物以治療心血管疾病，例如，高血壓，動脈粥瘤硬化，再狹窄及大腦局部缺血；或血管痙攣中樞神經系病症，例如，神經單位變化及脊椎傷害；勃起機能障礙，例如，對於PDE-5抑制劑未具有滿意反應之患者；及經由Rho-激酶媒介之癌症(例如，腫瘤生長)。經由Rho-激酶媒介之癌症及腫瘤包括乳癌，大腸癌，攝護腺癌，卵巢癌，腦癌，肺癌及其轉移生長物。

該化合物可以以劑量單位調配物型式口服，局部投予，非經腸方式投予，吸入用藥或噴霧用藥，陰道用藥，直腸投予或舌下用藥。該名辭"注射用藥"包括靜脈注射，注射，肌肉注射，皮下注射及腸道外注射，以及輸液方法之使用。皮膚用藥可包括局部塗敷或經皮用藥。一或多種化合物可以併用一或多種非毒性醫藥上可接受載劑，且若需要可併用其它活性成份。

可根據該項製造醫藥組合物之技藝已知之任何適合方法製備計劃作為口服用之組合物。此種組合物可包含一或多種選自包括稀釋劑，甜味劑，調味劑，著色劑及防腐劑之藥劑以得到可口的製劑。錠劑包含該活性成份及適於用以

## 五、發明說明( 9 )

製造錠劑之非毒性醫藥上可接受賦形劑。這些賦形劑可以是，例如，惰性稀釋劑，例如，碳酸鈣，碳酸鈉，乳酸，磷酸鈣或磷酸鈉；粒化劑及分解劑，例如，玉米澱粉，或藻酸；及結合劑，例如，硬脂酸鎂，硬脂酸或滑石。該錠劑可以未經覆膜，或可以經由已知方法覆膜以遲緩在該胃腸道內之分解及吸附作用，藉以提供較長時期之持續作用。例如，可以使用延時物質，例如，單硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。這些化合物亦可製成呈固體，快速釋放型式。

適於口服之調配物亦可以呈硬明膠膠囊型式存在，其中該活性成份係與惰性固體稀釋劑(例如，碳酸鈣，磷酸鈣或高嶺土)混合；或可以呈軟明膠膠囊型式存在，其中該活性成份係與水或油介質(例如，花生油，液體石蠟或橄欖油)混合。

亦可以使用含該活性物質及適於製造該水性懸浮液之賦形劑之水性懸浮液。此種賦形劑為懸浮劑，例如，羧甲基纖維素鈉，甲基纖維素，羥基丙基-甲基纖維素，藻酸鈉，聚乙烯吡咯酮，黃耆膠及阿拉伯樹膠；分散或濕潤劑可以是天然產生之磷脂，例如，卵磷脂；或烯化氧與脂肪酸之縮合產物，例如，聚氧乙烯硬脂酸酯，或環氧乙烷與長鏈脂肪醇之縮合產物，例如，十七碳乙烯氧化十六醇，或環氧乙烷與衍生自脂肪酸及己糖醇之部份酯之縮合產物，例如，聚氧化乙烯山梨糖醇單油酸酯，或環氧乙烷與衍生自脂肪酸及己糖醇酐之部份酯之縮合產物，例如，聚乙烯山

## 五、發明說明 ( 10 )

梨糖醇酐單油酸酯。該水性懸浮液亦可含一或多種防腐劑，例如，對-羥基苯甲酸乙酯，或對-羥基苯甲酸正-丙酯；一或多種著色劑；一或多種調味劑；及一或多種甜味劑，例如，蔗糖或糖精。

經由添加水可製備水性懸浮液之可分散劑及顆粒可提供能夠與分散或濕潤劑，懸浮劑及一或多種防腐劑混合之該活性成份。適合之分散或濕潤劑實例如上述。亦可以有額外賦形劑，例如，甜味劑，調味劑及著色劑。

該化合物亦可以呈非水性液體調配物之型式，例如，可經由使該活性成份懸浮在蔬菜油(例如，花生油，橄欖油，芝麻油或花生油)或礦物油(例如，液體石蠟)內以調製油狀懸浮液。該油狀懸浮液可含有增稠劑，例如，蜂蠟，硬石蠟或鯨蠟醇。可添加如上述之甜味劑，及調味劑以得到可口之口服製劑。可經由添加抗氧化劑(例如，抗壞血酸)以保存這些組合物。

亦可使用熟悉本技藝者已知之方法經皮投予本發明化合物(見，例如：Chien；"Transdermal Controlled Systemic Medications"；Marcel Dekker, Inc.；1987。Lipp等人，WO 94/04157 3 Mar 94)。例如，視需要含滲透增強劑之式I化合物之適合揮發性溶劑之溶液或懸浮液可以併用熟悉本技藝者所知之其它添加物，例如，基質及殺菌劑。消毒後，可遵照已知程序將所形成混合物製成劑量型式。此外，一旦經乳化劑及水處理時，可以將式I化合物之溶液或懸浮液製成洗劑或軟膏。

## 五、發明說明 ( 11 )

用於處理經皮傳遞系統之適合溶劑為此等本技藝者所知，且包括低碳醇，例如，乙醇或異丙醇；低碳酮，例如，丙酮；低碳羧酸酯，例如，醋酸乙酯；極性醚，例如，四氫呋喃；低碳烴，例如，己烷，環己烷或苯；或鹵化烴，例如，二氯甲烷，氯仿，三氯三氟乙烷，或三氯氟乙烷。適合之溶劑亦可包括一或多種選自低碳醇，低碳酮，低碳羧酸酯，極性醚，低碳烴，鹵化烴之物質之混合物。

用於經皮傳遞系統之適合滲透增強物質為熟悉本技藝者所知，且包括，例如，單羥基或多羥基醇，例如，乙醇，丙二醇或苄醇；飽和或不飽和  $C_8-C_{18}$  脂肪醇，例如，月桂醇或鯨蠟醇；飽和或不飽和  $C_8-C_{18}$  脂肪酸，例如，硬脂酸；含至高24個碳之飽和或不飽和脂肪酸，例如，酸酸，己酸，月桂酸，肉豆蔻酸，硬脂酸，或棕櫚酸之甲酯，乙酯，丙酯，異丙酯，正-丁酯，第二-丁酯，異丁酯，第三-丁酯或單甘油酯；或含總數至高24個碳之飽和或不飽和二羧酸二酯，例如，己二酸二異丙酯，己二酸二異丁酯，癸二酸二異丙酯，順丁烯二酸異丙酯，或反丁烯二酸二異丙酯。其它滲透增強物質包括磷脂鹽衍生物(例如，卵磷脂或腦磷脂)，萜烯，鹽胺，酮，尿素及其衍生物；及醚，例如，二甲基異山梨糖醇酐及二乙二醇單乙基醚。適合之滲透增強調配物亦可包括一或多種選自以下各物之物質之混合物：單羥基或多羥基醇，飽和或不飽和  $C_8-C_{18}$  脂肪醇，飽和或不飽和  $C_8-C_{18}$  脂肪酸，含至高24個碳之飽和或不飽

## 五、發明說明 ( 12 )

和脂肪酯，含總數至高24個碳之飽和或不飽和二羧酸之二酯，磷脂鹽衍生物，萜烯，醯胺，酮，尿素及其衍生物，與醚。

用於經皮傳遞系統之適合結合物質為熟悉本技藝者所知，且包括聚丙烯酸酯，矽酮，聚胺基甲酸酯，嵌段聚合物，苯乙烯丁二烯共聚物，及天然與合成橡膠。亦可以使用纖維素醚，衍化聚乙烯，矽酸鹽作為基質組份。可添加其它添加物(例如，黏性樹脂或油)以增加該基質黏度。

本發明醫藥組合物亦可以呈水包油乳液型式。該油相可以是蔬菜油，例如，橄欖油或花生油；或礦物油，例如，液體石蠟或這些油之混合物。適合之乳化劑可以是天然產生之樹膠，例如，阿拉伯樹膠或黃耆膠；天然產生之磷脂，例如，大豆，卵磷脂；及衍生自脂肪酸及己糖醇酐之酯或部份酯，例如，山梨糖醇酐單油酸酯；及該部份酯與環氧乙烷之縮合產物，例如，聚氧化乙烯山梨糖醇酐單油酸酯。該乳化液可含甜味劑及調味劑。

可以使用甜味劑(例如，甘油，丙二醇，山梨糖醇或蔗糖)調製糖漿及酞劑。此種調配物亦可含潤劑，防腐劑，調味劑，著色劑。

該化合物亦可以以適合直腸或陰道用藥之型式投予。這些組合物之製法為混合該藥與適合之非刺激性賦形劑，該賦形劑於常溫下為固體，但是於該直腸溫度或陰道溫度下係為液體，因此可在該直腸或陰道內溶化以釋放該藥物。此種物質包括可可脂及聚乙二醇。

## 五、發明說明 ( 13 )

再者，就勃起機能障礙之治療而言，本發明該醫藥組合物可以呈任何型式，其適於經由注射入該海綿體或經尿道用藥投予至該陰莖，或局部塗敷至該尿道口。就注射入該海綿體而言，該醫藥組合物適於呈鹽水溶液之型式。該醫藥組合物較佳呈適於經尿道用藥型式，且在此種情況下，一般而言，該組合物呈溶液，油膏或塞劑型式。一般而言，在從事性交前1至50分鐘(較佳10至20分鐘)投予該醫藥組合物。

就文中所述該式I化合物之全部用法而言，該每日口服劑量規定較佳為總體重(公斤)之0.01至200毫克。該注射(其包括靜脈注射，肌肉注射，皮下注射及腸道外注射)用藥之每日劑量及該輸液方法之使用較佳為總體重(公斤)之0.01至200毫克。該每日陰道劑量規定較佳為總體重(公斤)之0.01至200毫克。該每日局部塗敷之劑量規定較佳為0.01至200毫克，每天分1至4次投予。維持每日劑量之該經皮濃度較佳為每公斤0.1至200毫克。該每日吸入劑量規定較佳為總體重(公斤)之0.01至10毫克。

熟悉本技藝者可知該特定用藥方法取決於各種因素，當使用治療法時，需例行考慮這些因素。然而，亦必需明瞭任何特定患者之該特定劑量大小取決於各種因素，其包括，所使用該特定化合物之活性，該患者年齡，該患者體重，該患者一般健康狀況，該患者性別，該患者之飲食，用藥時間，用藥方法，排泄速率，藥物組合物，及進行治療之該病症嚴重性。熟悉本技藝者進一步知道該治療之最

## 五、發明說明 ( 14 )

佳過程(亦即，治療方法及限定日數之每日式I化合物或其醫藥上可接受鹽之劑量數)可以經熟悉本技藝者使用習用治療試驗確認。

本發明化合物及組合物具有Rho-激酶抑制活性，因此可治療上述各種病徵，例如，經由Rho-激酶媒介之病徵。經由Rho-激酶媒介之病徵係意指疾病或病症之轉變過程係經由該Rho路徑(至少局部)進行。

Rho-激酶抑制活性(例如，ROCK-1抑制作用)之評估步驟如下：

自Sf9昆蟲細胞離析出人類ROCK-1(胺基酸27-530)之該激酶特殊結構部份以作為麩胱甘肽S-轉移酶融和蛋白質。經由麩胱甘肽Sepharose 4B(Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)親和性純化反應局部純化該蛋白質。在96井平板內以含50毫莫耳濃度N-[2-羥基乙基]哌啶-N'-[2-乙基磺酸] pH 7.5，5毫莫耳濃度MgCl<sub>2</sub>，1毫莫耳濃度二硫代蘇糖醇，6微莫耳濃度ATP，0.2微Ci[<sup>33</sup>P] ATP(NEN, Boston, MA)，1微克骨髓磷脂鹼性蛋白質及0.1微克ROCK-1之100微升總體積進行反應。使試驗化合物溶解在100%二甲基亞砷內，並稀釋至適合濃度，然後添加至該反應內。二甲基亞砷之最終濃度並不超過0.5%。於室溫下進行該反應一小時。經由添加7毫升1當量濃度HCl以停止該反應，轉移至P30膜，在BetaPlate讀數器(Packard Instrument Co., Meriden, CT.)內讀取該[<sup>33</sup>P]ATP之數值，其係以併至該基質(骨髓磷脂鹼性蛋白質)內之每分鐘計數(c.p.m)表示除非另有列出，

## 五、發明說明 ( 15 )

全部試劑係購自Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)。經由比較在該試驗化合物存在下與無該試驗化合物之情況下，該放射性合併之數值以測定抑制作用百分比。

本質上亦可經由如Ridley, A.J., 及 A. Hall, Cell 70:389-399 (1992)所述，測定壓力纖維形成以進行抑制活性評估。將人的纖維肉瘤HT1080(CCL-121, American Type Culture Collection, Manassas, VA)細胞以在德伯可氏(Delbeco's)改良伊格爾氏(Eagle's)培養基(DMEM, Gibco)(其已補充10%牛之胎兒血清)內每井 $2.5 \times 10^4$ 個細胞接種在6井組織培養物平皿(Costar)內之 $22 \times 22$ 毫米粉1玻璃蓋片上。於 $37^\circ\text{C}$ 下使細胞維持在潮濕之5%  $\text{CO}_2$ 大氣中。24小時後，移除該培養基，並經不含10%牛胎兒血清之培養基取代，然後再培養該細胞48小時。使試驗化合物溶解在100%二甲基亞砷中，稀釋至適合濃度，並在誘發壓力纖維形成前60分鐘添加至該培養基內。該二甲基亞砷之最終濃度不超過0.25%。於 $37^\circ\text{C}$ 下經由添加溶血磷脂酸(1-油醯基-2-羥基-順式-甘油-3-磷酸鹽, Avanti Polar-Lipids, Alabaster, Al)至含0.1%脂肪酸游離牛血清白蛋白之德伯可氏改良之伊格爾氏培養基內使其達至10微莫耳濃度最終濃度以誘發壓力纖維形成。在磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)內使細胞經4%多聚甲醛(Poly Scientific, Bay Shore, NJ)固化，費時15分鐘。然後在PBS內洗滌細胞3次，接著於室溫下，使用含40毫莫耳濃度哌吡-N-N'雙[2-乙基磺酸]，50毫莫耳濃度N-[2-羥基乙基]哌吡-N'-[2-乙基磺酸]，0.1% Triton

## 五、發明說明 ( 16 )

X-100，75毫莫耳濃度NaCl，毫莫耳濃度MgCl<sub>2</sub>，0.5毫莫耳濃度EGTA(pH 7.2)之溶液使其滲透，費時2分鐘。各在PBS內費時5分鐘洗滌該細胞3次，然後於室溫下，在PBS內使用10單位/毫升之若丹明(rhodamine)鬼筆環肽(phalloidin)(Molecular Probes, Eugene, OR)進行肌動蛋白壓力纖維之染色，費時60分鐘。以PBS洗滌該細胞3次，並將該蓋條安裝在玻璃顯微鏡載玻片上。使用Nikon Labphoto-2顯微鏡以目視方法測定各載玻片上之應力纖維正細胞之百分比。可算出每一片載玻片至少有100個細胞，並一次兩份完成試驗。經由比較在該試驗化合物存在下及無該試驗化合物之情況下所計算出的該壓力纖維正細胞數以測定抑制作用百分比。

使用上述方法，可知如文中揭示全部該化合物皆具有Rho-激酶抑制活性。

可根據一般習用化學方法製備本發明化合物，及/或如下述，自購自公司或根據一般習用化學方法製成之原料製備本發明化合物。下文提供製備該化合物之通用方法，且代表性化合物之製法明確描述在各該實例中。

縮寫及頭字語

當文中使用以下縮寫時，其具有下述意義：

|                   |       |
|-------------------|-------|
| Ac <sub>2</sub> O | 乙酸酐   |
| anhy              | 無水    |
| n-BuOH            | 正-丁醇  |
| t-BuOH            | 第三-丁醇 |