



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201406759 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 02 月 16 日

(21)申請案號：102125634

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 07 月 17 日

(51)Int. Cl. : **C07D471/04 (2006.01)**

A61K31/4375(2006.01)

A61P1/16 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2012/07/17 歐洲專利局

12305866.1

2012/07/17 美國

61/672,489

(71)申請人：賽諾菲公司 (法國) SANOFI (FR)

法國

(72)發明人：艾曼 安東尼 ALAM, ANTOINE (FR)；布蘭克 伊莎貝拉 BLANC, ISABELLE

(FR)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：10 項 圖式數：2 共 24 頁

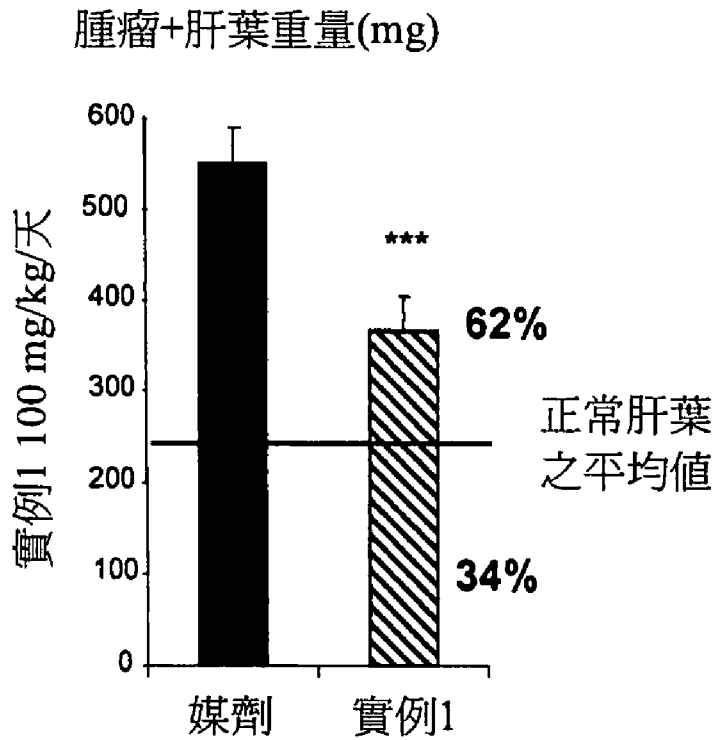
(54)名稱

VEGFR-3 抑制劑於治療肝細胞癌之用途

USE OF VEGFR-3 INHIBITORS FOR TREATING HEPATOCELLULAR CARCINOMA

(57)摘要

本發明係關於一種血管內皮生長因子受體 3 抑制劑於治療肝細胞癌之用途。



平均值 $\pm$ 平均值標準誤差(SEM)

*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ 及 *** $p < 0.001$,

相對於對照組之ANOVA檢驗。基於總體原始資料(腫瘤+肝葉重量)之統計分析

圖 1



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201406759 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 02 月 16 日

(21)申請案號：102125634

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 07 月 17 日

(51)Int. Cl. : **C07D471/04 (2006.01)**

A61K31/4375(2006.01)

A61P1/16 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2012/07/17 歐洲專利局

12305866.1

2012/07/17 美國

61/672,489

(71)申請人：賽諾菲公司 (法國) SANOFI (FR)

法國

(72)發明人：艾曼 安東尼 ALAM, ANTOINE (FR)；布蘭克 伊莎貝拉 BLANC, ISABELLE

(FR)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：10 項 圖式數：2 共 24 頁

(54)名稱

VEGFR-3 抑制劑於治療肝細胞癌之用途

USE OF VEGFR-3 INHIBITORS FOR TREATING HEPATOCELLULAR CARCINOMA

(57)摘要

本發明係關於一種血管內皮生長因子受體 3 抑制劑於治療肝細胞癌之用途。

發明摘要

※ 申請案號： 102125634

※ 申請日： 102.7.17

C07D471/04 (2006.01)

※IPC 分類：A61K 31/4375 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

【發明名稱】

VEGFR-3抑制劑於治療肝細胞癌之用途

USE OF VEGFR-3 INHIBITORS FOR TREATING

HEPATOCELLULAR CARCINOMA

【中文】

本發明係關於一種血管內皮生長因子受體3抑制劑於治療肝細胞癌之用途。

【英文】

This invention is related to the use of inhibitors of vascular endothelial growth factor receptor 3 for treating hepatocellular carcinoma.

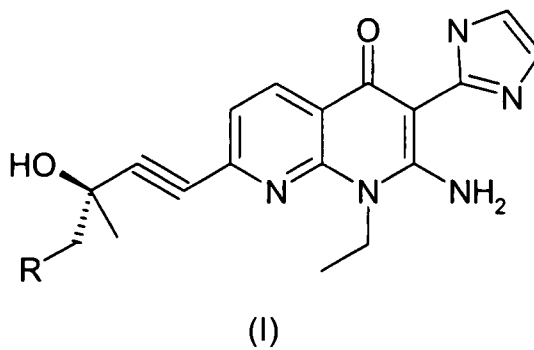
【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：



發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

VEGFR-3抑制劑於治療肝細胞癌之用途

USE OF VEGFR-3 INHIBITORS FOR TREATING
HEPATOCELLULAR CARCINOMA

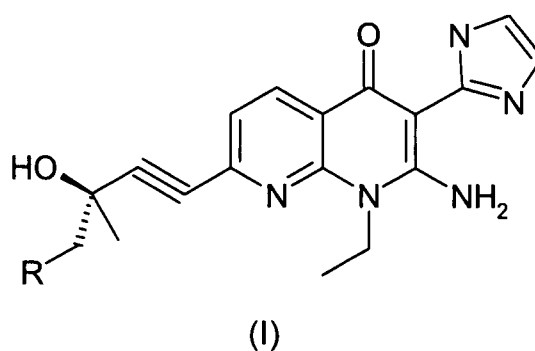
本發明係關於一種血管內皮生長因子受體3抑制劑於治療肝細胞癌(HCC)之用途。

肝細胞癌(HCC)為全球第五位最常見實體瘤及其發病率在過去25年間呈穩步增長趨勢(Thomas等人之Hepatocellular carcinoma: consensus recommendations of the National Cancer Institute Clinical Trials Planning Meeting. *J Clin Oncol.*2010 ; 28(25) : 3994-4005)。HCC為致命疾病，全球每年死亡超過600,000例。未滿足的需求極其高，尤其係在亞太地區(Kudo等人之Asian consensus workshop report: expert consensus guideline for the management of intermediate and advanced hepatocellular carcinoma in Asia. *Oncology.* 2011 , 81 : 158-64)。在中國，每年確診約400,000例新病例。其中大多數係在晚期確診且治療選擇有限。僅20%適合手術治療，但復發率非常高。迄今，僅索拉非尼(Sorafenib，為多激酶抑制劑)已核准用於HCC療法。其可比安慰劑增加2-3個月的OS(總存活期)，而因其高度關聯毒性，故僅小於5%患者適合(Song等人之A single center experience of sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma patients: evaluation of prognostic factors. *Eur. J. Gastroenterol Hepatol.* 2011 , (12) : 1233-8)。

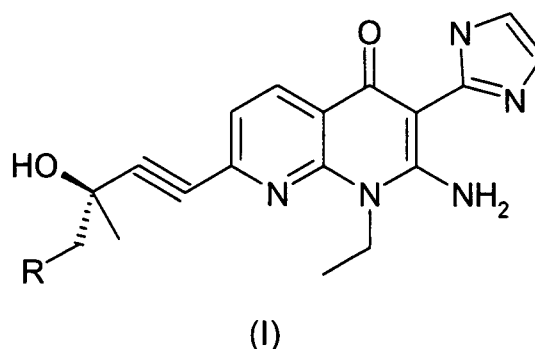
血管內皮生長因子受體3(VEGFR-3)為識別兩種配體 VEGFC及 VEGFD之酪胺酸激酶受體。HCC中與腫瘤相關之淋巴管形成係與不良預後及患者存活期相關聯(Thelen等人之 Tumor-Associated Lymphangiogenesis Correlates with Prognosis after Resection of Human Hepatocellular Carcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* (2009)16 : 1222–1230 ; Thelen等人之 Tumor-associated angiogenesis and lymphangiogenesis correlate with progression of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Am. J. Gastroenterol.* 105(5):1123-32, 2010)。與正常肝臟標本不同，大多數 HCC組織標本顯示對VEGF-D具有強免疫反應性(Thelen等人之 VEGF-D promotes tumor growth and lymphatic spread in a mouse model of hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer.* 122, 2471–2481 2008)。此外，臨床試驗資料顯示基線時之高 VEGF-C 水平與蘇尼替尼(sunitinib)(一種泛-VEGFR抑制劑)治療後之OS延長顯著相關聯(Harmon等人之 Mechanism-related circulating proteins as biomarkers for clinical outcome in patients with unresectable hepatocellular carcinoma receiving sunitinib. *J. Transl. Med.* 2011年7月25日 ; 9:120)。此外，據描述在>75%之肝炎BX抗原(HBxAg)陽性HCC結節中，VEGFR-3之表現上調且VEGFR-3之表現與HCC患者存活期為逆相關(Lian等人之 Hepatitis B x Antigen Up-regulates Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3 in Hepatocarcinogenesis. *HEPATOLOGY*，第45卷，第6號，2007)。此外，可表現VEGFR-3之巨噬細胞浸潤與肝內轉移、腫瘤復發、及不良患者存活期相關聯。(Lin等人之 Macrophage activation increases the invasive properties of hepatoma cells by destabilization of the adherens junction. *FEBS Letters* 580(2006)3042–3050 ; Zhu等人之 High expression of macrophage colony-stimulating factor in peritumoral liver tissue is associated with poor survival after

curative resection of hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 2008年6月1日；26(16)：2707-16；Ju等人之 Peritumoral activated hepatic stellate cells predict poor clinical outcome in hepatocellular carcinoma after curative resection. *Am. J. Clin Pathol.* 2009年4月；131(4)：498-510)。然而，迄今在治療HCC之臨床階段尚未報導特異性VEGFR-3抑制劑。

2012年5月16日申請之國際申請案第PCT/EP2012/059145號('145申請案)揭示一種作為VEGFR-3抑制劑之式(I)之化合物，其中R為甲氧基或羥基。現發現式(I)之化合物亦適用於治療HCC。



本發明係關於一種用於治療肝細胞癌之方法，該方法包括對有此需要的患者投與醫藥有效量之式(I)化合物，



其中R為甲氧基或羥基，
或其醫藥上可接受之鹽。

本發明亦關於上述之式(I)化合物、或其醫藥上可接受之鹽，其用於治療肝細胞癌。

本發明亦關於一種上述式(I)化合物、或其醫藥上可接受之鹽於

製造用於治療肝細胞癌之藥物之用途。

可由結合附圖之以下具體陳述更佳地明瞭本發明之上述及其他態樣、特徵、及優點，其等全部僅以舉例方式提供，而不限制本發明。

如上文及本發明全文所用，除非另作指明，否則以下術語應理解為具有以下含義：

「本發明之化合物」意指式(I)之化合物或其醫藥上可接受之鹽。

「肝細胞癌」為起因於肝細胞之肝癌中之一種類型。表現為硬化(癥痕形成)之肝臟損傷為肝癌之主要危險因子。然而，HCC亦包括不存在肝硬化情況下之實體肝癌。

「患者」包括人及其他哺乳動物。

「醫藥上可接受之鹽」係指式I化合物之相對非毒性無機及有機酸加成鹽、及鹼加成鹽。該等鹽可於式I化合物之最終單離及純化期間在位製得。參見，例如 S.M. Berge 等人之「Pharmaceutical Salts」， J. Pharm. Sci.， 66， 1-19(1977)。

「醫藥有效量」意指可有效產生出所預期治療效果之根據本發明之化合物或組合物的量。

「治療(treating)」或「治療(treatment)」意指減輕症狀、在暫時或永久基礎上消除症狀的起因、或減緩指定病症或病況症狀之出現。

本發明之一特定實施例係關於一種用於治療肝細胞癌之方法，該方法包括對有此需要的患者投與醫藥有效量之2-胺基-1-乙基-7-((3R)-3-羥基-4-甲氧基-3-甲基-丁-1-炔基)-3-(1H-咪唑-2-基)-1H-[1,8]-萘啶-4-酮、或其醫藥上可接受之鹽。

本發明之另一實施例係關於化合物2-胺基-1-乙基-7-((3R)-3-羥基-4-甲氧基-3-甲基-丁-1-炔基)-3-(1H-咪唑-2-基)-1H-[1,8]-萘啶-4-



酮、或其醫藥上可接受之鹽，其用於治療肝細胞癌。

本發明之一特定實施例係關於一種用於治療肝細胞癌之方法，該方法包括對有此需要的患者投與醫藥有效量之2-胺基-1-乙基-7-((3R)-3-羥基-4-甲氧基-3-甲基-丁-1-炔基)-3-(1H-咪唑-2-基)-1H-[1,8]-萘啶-4-酮。

本發明之另一實施例係關於化合物2-胺基-1-乙基-7-((3R)-3-羥基-4-甲氧基-3-甲基-丁-1-炔基)-3-(1H-咪唑-2-基)-1H-[1,8]-萘啶-4-酮，其用於治療肝細胞癌。

本發明之另一特定實施例係關於一種式(I)之化合物，其中R為甲氧基或羥基、或其醫藥上可接受之鹽，其用於製造用於治療肝細胞癌之藥物。

本發明之另一特定實施例係關於2-胺基-1-乙基-7-((3R)-3-羥基-4-甲氧基-3-甲基-丁-1-炔基)-3-(1H-咪唑-2-基)-1H-[1,8]-萘啶-4-酮、或其醫藥上可接受之鹽，其用於製造用於治療肝細胞癌之藥物。

本發明之另一特定實施例係關於2-胺基-1-乙基-7-((3R)-3-羥基-4-甲氧基-3-甲基-丁-1-炔基)-3-(1H-咪唑-2-基)-1H-[1,8]-萘啶-4-酮，其用於製造用於治療肝細胞癌之藥物。

本發明之一特定態樣提供一種欲呈醫藥組合物形式投與之本發明之化合物。根據本發明之醫藥組合物包含本發明之化合物及醫藥上可接受之載劑。

實際上，可以單位投藥形式、或呈與習知醫藥賦形劑之混合物形式，經口服或靜脈內投與，將本發明之化合物投與給人及其他動物。

適於口服之本發明醫藥組合物可作為諸如以下之離散型單位存在：固體劑型，諸如各含預定量活性成分之膠囊、扁囊劑或錠劑、或呈粉末或顆粒；呈液體劑型，諸如含於水性液體或非水性液體中之溶

液或懸浮液、或呈水包油型液體乳液或油包水型液體乳液。

適於靜脈內投與之本發明醫藥組合物可調配呈液體溶液(特別是生理可相容緩衝液，諸如漢克氏溶液(Hank's solution)或林格氏溶液(Ringer's solution))。此外，該等組合物可調配呈固體形式及緊接於使用前所再溶解或懸浮。亦包括凍乾形式。該等調配物係無菌且包括乳液、懸浮液、水性及非水性注射液，其可包含懸浮劑及增稠劑及抗氧化劑、緩衝劑、抑菌劑及致使調配物與預期接受者血液等滲且具有適宜調整之pH之溶質。

可改變本發明組合物中一或多種活性成分之實際劑量水平以獲得可有效使患者獲得特定組合物及投藥方法之所預期治療反應之一或多種活性成分的量。因此，針對任一特定患者所選擇之劑量水平取決於多個因素，其包括所預期治療效果、投藥途徑、所預期的治療持續時間、疾病之病源學及嚴重度、患者健康狀況、體重、性別、飲食及年齡、各活性成分之類型及效能、吸收速率、代謝及/或排泄及其他因素。

以單次或分次劑量投與給患者之本發明化合物之總日劑量可為例如約0.001至約100 mg/kg體重/天(及特別是0.01至10 mg/kg/天)之量。儘管組合物中之活性成分之百分比可改變，但其應構成使得會獲得適宜劑量之比例。劑量單位組合物可包含其可用於構成日劑量之其該等約數之該等量。明顯地，可在約同一時間投與若干單位劑型。可視需要頻繁地投與一劑量以獲得所預期的治療效果。有些患者可能快速回應於更高或更低劑量及可找到足夠的弱許多的維持劑量。就其他患者而言，根據各特定患者之生理需求，可能需要以每天給藥1至4次之頻率進行長期治療。毋庸贅言，就其他患者而言，將有需要開立每天不超過一或兩次給藥。

藉由參考以下為本發明例示之非限制性實例可更佳地明瞭本發

明。然而，其當然不以任何方式解釋為限制本發明之廣泛範疇。

實例1：

2-胺基-1-乙基-7-((3R)-3-羥基-4-甲氧基-3-甲基-丁-1-炔基)-3-(1H-咪唑-2-基)-1H-[1,8]-萘啶-4-酮

步驟1：6-氯-2-乙基胺基-菸鹼酸

於環境溫度下攪拌含18.0 g(84.4毫莫耳)2,6-二氯菸鹼酸之180 ml 乙胺溶液(70%水溶液)之溶液72小時。接著於減壓下蒸發除去過量胺，及添加10%乙酸水溶液直到產物沉澱。米白色固體經過旋轉過濾乾燥，利用冷水沖洗然後於烘箱中乾燥。獲得10.5 g預期產物。

熔點=158-160°C

產率=62%。

步驟2：6-氯-2-乙基胺基-菸鹼醯氟

將2 ml(24.8毫莫耳)吡啶及4.2 ml(49.8毫莫耳)2,4,6-三氟三嗪添加至含5.0 g(24.8毫莫耳)6-氯-2-乙基胺基-菸鹼酸之125 ml二氯甲烷懸浮液。於環境溫度下攪拌該混合物3小時且接著過濾。以50 ml二氯甲烷沖洗固體及以60 ml冰冷水洗滌濾液兩次。有機相經Na₂SO₄乾燥及於減壓下蒸發除去溶劑。獲得呈有機油狀物形式之5.01 g產物，其無需進一步純化地予以使用。

產率=99%。

步驟3：1-(2-三甲基矽烷基-乙氧基甲基)-1H-咪唑-2-碳醛

藉由以己烷攪拌無礦物油地洗滌含20.8 g氫化鈉之礦物油(50%，0.52莫耳)油性懸浮液3次繼而懸浮於400 ml DMF中。於環境溫度攪拌下將50.0 g(0.520莫耳)咪唑-2-碳醛添加至該懸浮液。於1.5小時後，添加101 ml(0.572莫耳)2-(三甲基矽烷基)乙氧基氯代甲烷及再攪拌該反應1小時。接著添加過量水至該懸浮液及以乙酸乙酯萃取該反應混合物三次。有機相經Na₂SO₄乾燥及於減壓下蒸發除去溶劑。然後藉由管

柱層析(DCM)純化原始產物，獲得85.0 g(0.376莫耳)經SEM保護之咪唑-2-碳醛。

產率=72%

$MH^+ = 227.1 (C_{10}H_{18}N_2O_2Si, Mr = 226.35)$

1H NMR(DMSO- d_6 , 500MHz): δ 9.83 (s, 1H); 7.86 (s, 1H); 7.39 (s, 1H); 5.75 (s, 2H); 3.58 (t, 2H); 0.95 (t, 2H); 0.02 (s, 9H)

步驟4：[1-(2-三甲基矽烷基-乙氧基甲基)-1H-咪唑-2-基]-乙腈

將1.73 g(8.84毫莫耳)對甲苯磺醯甲基異腈溶解於10 ml DME中且冷卻降至-60℃。於該溫度下先添加1.98 g第三丁醇鉀，接著慢慢添加含2.00 g(8.84毫莫耳)1-(2-三甲基矽烷基-乙氧基甲基)-1H-咪唑-2-碳醛之5 ml DME溶液。在-60℃下攪拌2小時之後，容許該反應達到0℃及添加5 ml甲醇(123.60毫莫耳)至該溶液。於環境溫度下再攪拌該反應24小時及於40℃下攪拌2小時。添加過量水及利用二氯甲烷萃取該溶液3次。有機相經 Na_2SO_4 乾燥，於減壓下蒸發溶劑之後，藉由逆相管柱層析(水0.1%TFA/乙腈=80/20)純化原始產物，獲得0.87 g(0.367莫耳)經SEM保護之咪唑乙腈。

產率=41%

$MH^+ = 238.1 (C_{11}H_{19}N_3OSi, Mr = 237.38)$

1H NMR(DMSO- d_6 , 500MHz): δ 7.66 (s, 1H); 7.39 (s, 1H); 5.53 (s, 2H); 4.52 (s, 2H); 3.55 (t, 2H); 0.92 (t, 2H); 0.02 (s, 9H)

步驟5：3-(6-氯-2-乙基胺基-吡啶-3-基)-3-羥基-2-[1-(2-(三甲基矽烷基-乙氧基甲基)-1H-咪唑-2-基)]-丙烯腈

分批以小量將0.283 g(2.53毫莫耳)第三丁醇鉀添加至含0.600 g(2.53毫莫耳)[1-(2-三甲基矽烷基-乙氧基甲基)-1H-咪唑-2-基]-乙腈之10 ml無水THF之0℃溶液。於環境溫度下攪拌該混合物45分鐘，且接著再次冷卻至0℃。接著添加含0.512 g(2.53毫莫耳)6-氯-2-乙基胺基-

菸鹼醯氟之10 ml THF溶液及於環境溫度下攪拌該介質過夜，再次冷卻降至0℃並添加第二當量之第三丁醇鉀(0.283 g，2.53毫莫耳)。於環境溫度下攪拌2小時之後添加50 ml飽和氯化銨水溶液，利用2N HCl將pH調整至7，接著以乙酸乙酯萃取三次。已合併之有機相經MgSO₄乾燥及於減壓下蒸發溶劑。進一步藉由管柱層析(DCM/甲醇=90:10)純化原始產物，獲得418 mg(產率=38%)標題化合物。



¹H NMR(DMSO-d₆, 500MHz): δ 13.35 (s, 1H); 7.70 (d, 1H); 7.46 (s, 1H); 7.23 (s, 1H); 7.08 (t, 1H); 6.58 (d, 1H); 5.59 (s, 2H); 3.58 (t, 2H); 3.34 (dq, 2H); 1.13 (t, 3H); -0.03 (3s, 9H)。

步驟6：2-胺基-7-氯-1-乙基-3-[1-(2-三甲基矽烷基-乙氧基甲基)-1H-咪唑-2-基]-1H-[1,8]萘啶-4-酮

分批以小量將0.112 g(1毫莫耳)第三丁醇鉀添加至含418 mg(1毫莫耳)之於1.53-(6-氯-2-乙基胺基-吡啶-3-基)-3-羥基-2-[1-(2-(三甲基矽烷基-乙氧基甲基)-1H-咪唑-2-基]-丙烯腈下製得之中間物之5 ml無水THF之0℃冷溶液。於環境溫度下攪拌該混合物48小時，於此之後添加50 ml飽和氯化銨水溶液，利用2N HCl將pH調整至7及以乙酸乙酯萃取反應混合物三次。已合併之有機相經MgSO₄乾燥及於減壓下蒸發溶劑，獲得400 mg標題化合物。

產率=38%



¹H NMR (DMSO-d₆, 500MHz): δ 8.50 (d, 1H); 8.03 (s, 1H); 7.98 (s, 1H); 7.78 (s, 2H); 7.60 (s, 1H); 5.49 (s, 2H); 4.58 (q, 2H); 3.57 (t, 2H); 1.42 (t, 3H); 0.85 (t, 2H); -0.03 (3s, 9H)。

步驟7：(±)-2-甲基-丁-3-炔-1,2-二醇

以200 ml四氫呋喃稀釋市售的0.5 M乙炔基氯化鎂之四氫呋喃溶

液且冷卻至0℃。接著添加含羥丙酮之200 ml四氫呋喃溶液及於環境溫度下攪拌該混合物3小時。使反應混合物冷卻，及添加NH₄Cl水溶液。以乙酸乙酯萃取該混合物3次並合併有機相，經硫酸鈉乾燥，過濾，然後於真空(約200毫巴)下濃縮。最終，獲得呈棕色油狀物形式之20 g所預期產物，該產物係以外消旋形式隨後無需純化(定量粗產率)地予以使用或可藉由製備型HPLC於對掌性HPLC管柱上分離為純對映異構體。爲了獲得光學純對映異構體，使對應的外消旋混合物經歷於對掌性固定相(Chiralpak AD-H管柱，250×21 mm，5 mm)上之製備型層析，其使用以下中任一者作為流動相：於60 ml/min之流速，100巴之壓力下，CO₂/2-丙醇(70%/30%)或具有0.3% TFA之異己烷/乙醇(70/30)混合物及流速爲120 ml/min。

於洗脫及蒸發之後，單離出各對映異構體，及依熟習本技藝者所熟知的分析法測定各自的化學純度及對映異構純度。

步驟8：2-胺基-1-乙基-7-((3R)-3-羥基-4-甲氧基-3-甲基-丁-1-炔基)-3-[1-(2-三甲基矽烷基-乙氧基甲基)-1H-咪唑-2-基]-1H-[1,8]萘啶-4-酮

於填充氬氣之微波反應燒瓶中提供500 mg(1.2毫莫耳)2-胺基-7-氯-1-乙基-3-[1-(2-三甲基矽烷基-乙氧基甲基)-1H-咪唑-2-基]-1H-[1,8]萘啶-4-酮、204 mg(1.8毫莫耳)(3R)-1-甲氧基-2-甲基-丁-3-炔-2-醇、84 mg(0.120毫莫耳)雙(三苯基膦)二氯化鈮(II)、30 mg(0.16毫莫耳)碘化銅(I)、2 ml DMF(脫氣)、2 ml三乙胺(脫氣)且以使反應混合物保持於120℃下之方式於微波中照射24小時。蒸發溶劑及將固體再懸浮於3 ml DMF中然後過濾。接著藉由HPLC純化濾液獲得430 mg(0.702毫莫耳)標題化合物之TFA鹽。

產率=59%。

MH⁺=498.2(C₂₅H₃₅N₅O₄Si，Mr=497.67)。

^1H NMR(DMSO- d_6 , 500MHz) : δ 8.39 (d, 1H); 7.95 (s, 1H); 7.88 (s, 1H); 7.60 (s, 2H); 7.48 (d, 1H); 5.25 (s, 2H); 4.50 (寬信號峰, 2H); 3.52 – 3.40 (寬信號峰, 水峰+4H); 1.48 (s, 3H); 1.25 (t, 3H); -0.12 (3s, 9H)。

步驟9：2-胺基-1-乙基-7-((3R)-3-羥基-4-甲氧基-3-甲基-丁-1-炔基)-3-(1H-咪唑-2-基)-1H-[1,8]萘啶-4-酮

於0°C下，將240 mg(0.4毫莫耳)經SEM保護之萘啶酮1.8溶解於1.2 ml TFA及1.2 ml DCM中。該溶液保持於3-5°C過夜直到HPLC分析顯示萘啶酮之完全去保護。藉由添加過量的 NaHCO_3 水溶液來中和該溶液。接著以乙酸乙酯萃取該混合物三次。已合併之有機相經 MgSO_4 乾燥及於減壓下蒸發除去溶劑。於矽膠(DCM:MeOH=4:1)上純化如此獲得的原始產物，獲得143 mg(定量產率)未受保護之標題化合物。

$\text{MH}^+ = 368.2 (\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_3, \text{Mr} = 367.41)$

^1H NMR(DMSO- d_6 , 500MHz) : δ 13.15 (s, 1H); 11.55 (b s, 1H); 8.59 (d, 1H); 8.10 (b s, 1H); 7.47 (d, 1H); 7.25 (s, 1H); 7.02 (s, 1H); 5.85 (s, 1H); 4.58 (寬信號峰, 2H); 3.51 – 3.370 (寬信號峰, 水峰+4H); 1.48 (s, 3H); 1.25 (t, 3H)

Rt(分析型HPLC) : 4.806 min

實例2：

2-胺基-7-((3R)3,4-二羥基-3-甲基-丁-1-炔基)-1-乙基-3-(1H-咪唑-2-基)-1,8-萘啶-4(1H)-酮

步驟1：2-胺基-1-乙基-7-(3,4-二羥基-3-甲基-丁-1-炔基)-1-乙基-3-[1-(2-三甲基矽烷基-乙氧基甲基)-1H-咪唑-2-基]-1,8-萘啶-4(1H)-酮

遵循根據實例1步驟8之程序，利用於實例1步驟6下所述之中間物(2-胺基-7-氯-1-乙基-3-[1-(2-三甲基矽烷基-乙氧基甲基)-1H-咪唑-2-基]-1,8-萘啶-4(1H)-酮)及實例1步驟7之((±)-2-甲基-丁-3-炔-1,2-二

醇)，獲得標題化合物。

$MH^+ = 354.16 (C_{18}H_{19}N_5O_3, Mr = 353.38)$

Rt(分析型HPLC)：4.48 min

步驟2：2-胺基-1-乙基-7-((3R)3,4-二羥基-3-甲基-丁-1-炔基)-1-乙基-3-[1-(2-三甲基矽烷基-乙氧基甲基)-1H-咪唑-2-基]-1,8-萘啶-4(1H)-酮

使步驟1處所獲得的外消旋化合物經歷製備型對掌性SFC純化，採用Berger製備型SFC，230 nm下之UV檢測，固定相Chiralpak IC 20×250nm 5 μm，流動相65%/35% CO₂/(MeOH+0.5%異丙胺)，50 ml/min，100巴)之方法，導致R及S對映異構體之分離。

採用對掌性SFC法(Berger SFC，於210 nm下之UV檢測，固定相Chiralpak AD-H(250 mm×4.6) 5 μm，流動相65/35% CO₂/(異丙醇+0.5%異丙胺)，2.4 ml/min，100巴)控制對掌性純度。

R對映異構體(Rt=6.9 min，對映異構純度=97.9%)

步驟3：2-胺基-7-((3R)3,4-二羥基-3-甲基-丁-1-炔基)-1-乙基-3-(1H-咪唑-2-基)-1,8-萘啶-4(1H)-酮

遵循根據實例1步驟9之程序，單離出呈黃色粉末之實例2化合物。

$MH^+ = 354.16 (C_{18}H_{19}N_5O_3, Mr = 353.38)$

Rt=0.77 min

¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz)：δ 13.15 (s, 1H); 11.55 (bs, 1H); 8.55 (d, 1H, J= 6.4Hz); 8.10 (bs, 1H); 7.47 (d, 1H, J= 6.4Hz); 7.15 (s, 1H); 7.02 (s, 1H); 5.6 (s, 1H); 5.1 (t, 1H, J= 6.4Hz) 4.53 (bd, 2H); 3.49 (dd, 1H, J= 6.4; 10.4 Hz); 3.41 (dd, 1H, J= 6.4; 10.4 Hz) 1.48 (s, 3H); 1.27 (t, 3H, J= 7.2Hz)。

採用對掌性SFC法(Berger SFC，於230 nm下之UV檢測，固定相

Chiralpak AD-H (250 mm×4.6) 5 μ m，流動相60/40% CO₂/(異丙醇+0.5%異丙胺)，2.4 ml/min，100巴)控制對掌性純度。

R對映異構體(R_t=8.37 min，對映異構純度=99.2%)

分析法LC/UV/MS滯留時間(R_t)檢測

管柱：Merk Chromolith性能RP18e，100×4.6 mm，3.5 μ m

溶劑A：H₂O/TFA(99.9/0.1)

溶劑B：ACN/TFA(99.9/0.1)

流速：2 ml/min

梯度(A/B)：98/2(0 min)至0/100(8 min)至98/2(10 min)

檢測：254.16 nM

NMR

使用NMR光譜分析儀Bruker 250、300、400、或600 MHz，於DMSO-d₆中，利用DMSO-d₅之峰作為內部參照，獲得¹H NMR光譜。化學位移 δ 表示為份/1百萬份(ppm)。

所觀察到信號表示如下：s=單峰；d=雙峰；t=三重峰；q=四重峰；m=多重峰或大單峰；br=寬峰；H=質子。

熔點

利用科夫勒實驗臺(Kofler bench)測量熔點。

藥理學試驗

I. 實例1之化合物之活體外評估

'145申請案揭示實例1及2之化合物抑制HEK細胞中之重組型VEGFR-3 TK活性及自體磷酸化，其中IC₅₀分別為約25 nM及47 nM。於相同試驗中，實例1之化合物於VEGFR-2(90 nM-140 nM)及VEGFR-1(>1 μ M)上展現較小的活性。利用初級淋巴細胞，吾人證實針對VEGFR-3具高活性，因為其抑制VEGFC-及VEGFD-誘導之增殖，其中IC₅₀為約10-15 nM。此外，吾人證實實例1之化合物相較所有其他

試驗激酶(85種不同激酶)及107種受體、酶及離子通道，對VEGFR-3具高度選擇性。

II. 實例1之化合物於鼠肝細胞癌異種移植模型中之活體內評估

評估實例1之化合物於HepG2細胞系原位異種移植模型中之活體內抗腫瘤效能。將HepG2細胞注入SCID小鼠(自ATCC獲得)肝臟中及在細胞注射14天後將小鼠隨機分成2組：經媒劑處理之對照組及經實例1化合物處理之組。每天以100 mg/kg於作為媒劑之甲基纖維素吐溫(tween)中進行處理一次。

藉由在第28天稱取左葉與腫瘤的重量，來測量腫瘤大小。藉由實例1化合物之處理在細胞注射後第28天導致負載腫瘤肝葉之平均重量顯著減少34%($p=0.001$ ，學生t檢驗)。亦測量正常肝葉及由負載腫瘤小鼠之肝葉導出。於此情況中，實例1之化合物使腫瘤重量減少62%。(參見圖1)。

III. 實例1之化合物於小鼠之化學誘導之肝細胞癌上之活體內評估

DEN(N-二乙基亞硝酸胺)誘導之小鼠模型已被確認為人HCC之代表性模型，Wu等人之*J. Cancer Res. Clin. Oncol.* (2009) 135: 969-981；Chuang等人之*Carcinogenesis*(2000) 21: 331-335)。

藉由於5週齡的C3H雄性小鼠(查爾斯河(Charles river)實驗室(法國))中單次腹膜內注射10 mg/kg N-二乙基亞硝酸胺(DEN)，達成腫瘤引發。

自DEN投與後第7個月，小鼠在肝臟中發展出腫瘤但是在第12個月發病率達到100%。於DEN投與後第10至第12個月期間，於懸浮於甲基纖維素吐溫中之後，每天P.O.(經口)投與實例1化合物。

於處理期間每週及第12個月評估體重。藉由過劑量的戊巴比妥鈉將小鼠殺死，及取出肝臟並稱重。計數得每個肝臟之腫瘤數量及利用測徑規測量腫瘤體積。利用公式 $V=0.52 \times a^2 \times b$ 計算得腫瘤體積V，

其中「a」表示最小腫瘤直徑及「b」表示最大腫瘤直徑。

相較於第10個月之相同參數，以實例1之化合物進行後期處理可防止新位點形成及完全阻斷腫瘤發展。較媒劑組言之，實例1之化合物致使腫瘤數量/肝臟減少50%及總腫瘤體積減少85%。其亦減少及幾乎標準化總肝臟重量。(參見圖2)。

【圖式簡單說明】

圖1顯示實例1之化合物於鼠肝細胞癌異種移植模型中之活體內評估結果。

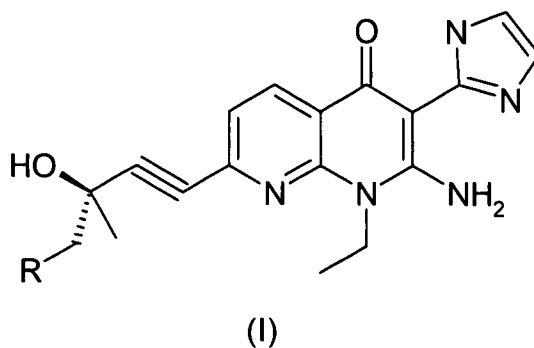
圖2顯示實例1之化合物對化學誘導肝細胞癌之活體內評估結果。

【符號說明】

無

申請專利範圍

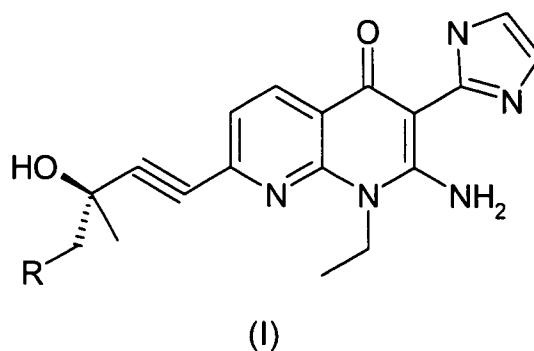
1. 一種式(I)之化合物，



其中R為甲氧基或羥基，

或其醫藥上可接受之鹽，於製造用於治療肝細胞癌之藥物之用途。

2. 如請求項1之用途，其中R為甲氧基。
3. 如請求項1之用途，其中R為羥基。
4. 如請求項1或2之用途，該化合物為2-胺基-1-乙基-7-((3R)-3-羥基-4-甲氧基-3-甲基-丁-1-炔基)-3-(1H-咪唑-2-基)-1H-[1,8]-萘啶-4-酮。
5. 如請求項1或3之用途，該化合物為2-胺基-7-((3R)-3,4-二羥基-3-甲基-丁-1-炔基)-1-乙基-3-(1H-咪唑-2-基)-1,8-萘啶-4(1H)-酮。
6. 一種式(I)之化合物，



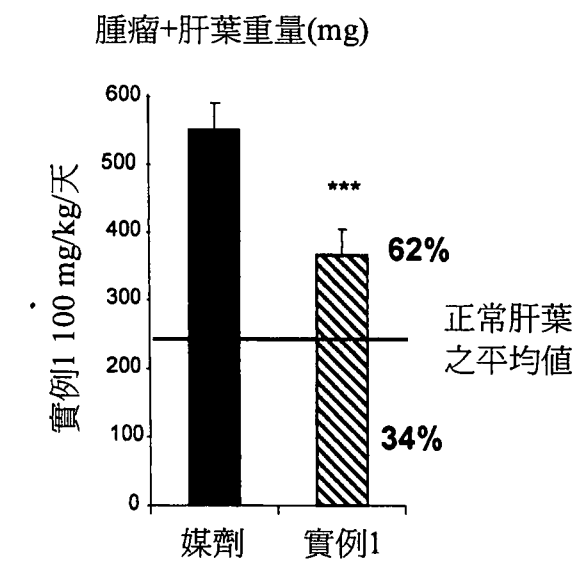
其中R為甲氧基或羥基，

或其醫藥上可接受之鹽，其用於治療肝細胞癌。

7. 如請求項6使用之化合物，其中R為甲氧基。

8. 如請求項6使用之化合物，其中R爲羥基。
9. 如請求項6或7使用之化合物，該化合物爲2-胺基-1-乙基-7-((3R)-3-羥基-4-甲氧基-3-甲基-丁-1-炔基)-3-(1H-咪唑-2-基)-1H-[1,8]-萘啶-4-酮。
10. 如請求項6或8使用之化合物，該化合物爲2-胺基-7-((3R)3,4-二羥基-3-甲基-丁-1-炔基)-1-乙基-3-(1H-咪唑-2-基)-1,8-萘啶-4(1H)-酮。

圖式



平均值+/-平均值標準誤差(SEM)
*:p< 0.05; **: p<0.01 及 *** p<0.001,
相對於對照組之ANOVA檢驗。基
於總體原始資料(腫瘤+肝葉重
量)之統計分析

圖 1

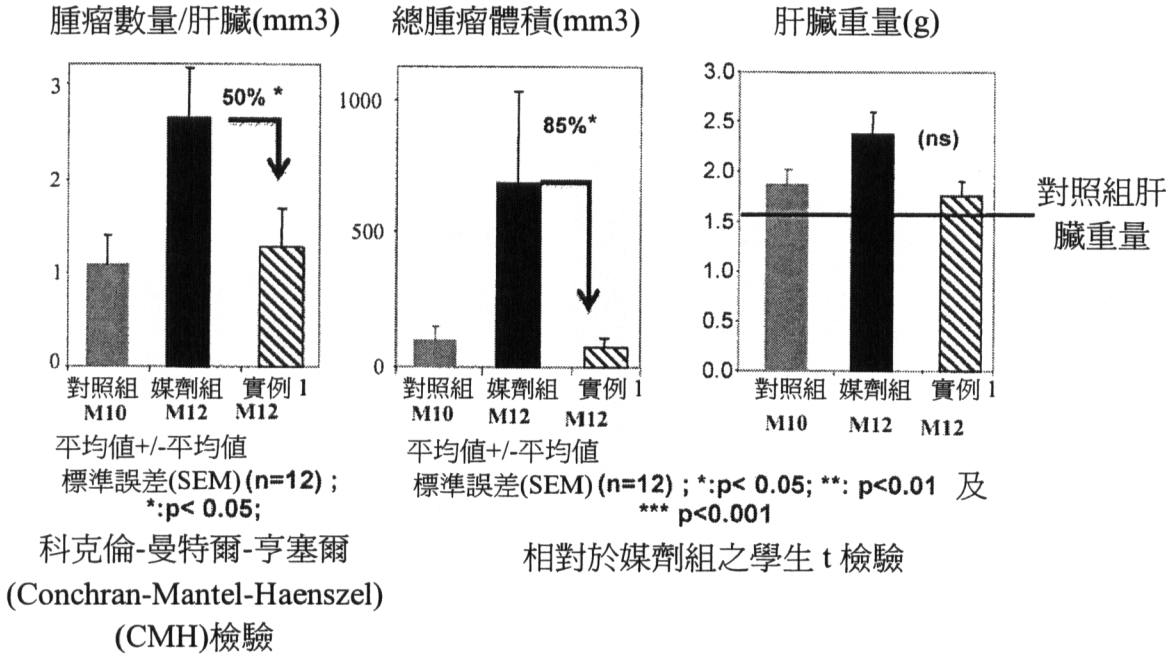


圖 2