



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：92107143

※ 申請日期：92.2.11

※IPC 分類：

A61K 31/47 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

壹、發明名稱：(中文/英文)

第10號染色體同源丢失性磷酸酶-張力蛋白基因(PTEN)抑制劑或最大-鉀離子(MAXI-K)通道開啟劑

PTEN INHIBITOR OR MAXI-K CHANNELS OPENER

貳、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

大塚製藥股份有限公司 / OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

代表人：(中文/英文) 樋口達夫 / HIGUCHI, TATSUO

住居所或營業所地址：(中文/英文)

日本國東京都千代田區神田司町2丁目9番地

9, Kandatsukasa-cho 2-chome, Chiyoda-ku, Tokyo-to, Japan

國籍：(中文/英文) 日本國 / JAPAN

參、發明人：(共 1 人)

姓名：(中文/英文)

1. 洪起煥 / HONG, KI WHAN

住居所地址：(中文/英文)

1. 大韓民國釜山市延提區芥提1棟現代村 210-1102

210-1102, Hyundai Hometown, Gaeje-1 Dong, Yunje-Gu, Busan,

Republic of Korea

國籍：(中文/英文) 韓國 / KR

肆、聲明事項：

☐ 本案係符合專利法第二十條第一項 ☐ 第一款但書或 ☐ 第二款但書規定之期間，其日期為： 年 月 日。

◎本案申請前已向下列國家（地區）申請專利 ☒ V 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 美國 2003 年 02 月 25 日 60/449,435 （主張優先權）
2. 美國 2003 年 02 月 26 日 60/449,589 （主張優先權）
- 3.
- 4.
- 5.

☐ 主張國內優先權（專利法第二十五條之一）：

【格式請依：申請日；申請案號數 順序註記】

- 1.
- 2.

☐ 主張專利法第二十六條微生物：

☐ 國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

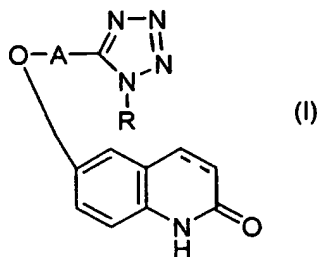
☐ 國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

玖、發明說明

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種新穎之第 10 號染色體同源丟失性磷酸酶-張力蛋白基因 (PTEN) 抑制劑或一種新穎之最大-鉀離子 (Maxi-K) 通道開啟劑。詳言之，係關於一種 PTEN 抑制劑或一種新穎之 Maxi-K 通道開啟劑，其包括以式 (I) 之四唑基烷氧基-二氫 2-羥基喹啉 (carbostyryl) 化合物或其鹽作為活性成分：



其中 R 係環烷基，A 係低碳數伸烷基，以及位於 2-羥基喹啉核之 3-及 4-位置間之鍵結係單鍵或雙鍵。

【先前技術】

於 1997 年，將 PTEN (第 10 號染色體同源丟失性磷酸酶-張力蛋白基因) 分離為腫瘤抑制基因，且之後由各種觀點分析其生理功能。於 1998 年之報告中指出，PTEN 基因產物展現一種新穎之磷酸酶活性，亦即，該基因產物可使磷脂醯肌醇 3,4,5-三磷酸酯 (PIP3) 受質 (其為脂質之二次訊息者 (second messenger)) 之 D3 位置去磷酸化 (參照 Beitner-Johnson D, Millhorn DE, J.Biol. Chem., 273:pp.13375-13378, 1998)。

由 PTEN 之功能的觀點，認為當抑制 PTEN 時，可

有效促進正常細胞、腦細胞、心臟細胞、以及皮膚之存活，且亦可有效抑制格蘭氏陰性菌(Gram-negative)之腐敗作用以及細胞移動與細胞侵略。

此外，已知鉀通道之開啟會引起細胞內之鉀離子流出細胞，造成負的細胞內電位，以及該鉀通道係與電壓相關且由細胞內之鈣的濃度與細胞內 ATP 控制。Maxi-K 通道係一種高傳導鈣敏感性鉀通道，以及該 Maxi-K 通道之活性係由細胞內之鈣濃度與細胞膜電位等所控制。該 Maxi-K 通道廣泛地分布於活體中例如神經元、心臟細胞、平滑肌細胞，且 Maxi-K 通道之開啟會引起細胞之高度極化作用。亦已知 Maxi-K 通道之開啟可用於治療神經元失調，例如作為藥劑，如(1)抗痙攣藥物、(2)神經保護之藥物，用於治療局部小腦水腫以及神經運動損傷、認知失調、創傷性的腦損害、帕金森氏症、癲癇、偏頭痛以及阿滋海默症、(3)控制疼痛之藥物、(4)治療急迫性尿失禁、腸過度運動(hypermotility)、子宮收縮、焦慮以及沮喪之藥物。

【發明內容】

於研究 PTEN 之期間，本案之發明人發現上述式(I)所示之四唑基烷氧基-二氫 2-羥基喹啉化合物或其鹽，尤其係 6-[4-(1-環己基-1H-四唑-5-基)丁氧基]-3,4-二氫-2-羥基喹啉或其鹽(已知該化合物具有血小板凝集抑制活性以及血管擴張活性)，展現出抑制 PTEN 之活性，因此，將其作為 PTEN 抑制劑而完成本發明。

再者，於研究 Maxi-K 通道之功能性分析期間，本案之發明人發現上述式(I)所示之四唑基烷氧基-二氫 2-羥基喹啉化合物或其鹽，尤其係 6-[4-(1-環己基-1H-四唑-5-基)丁氧基]-3,4-二氫-2-羥基喹啉或其鹽(已知該化合物具有血小板凝集抑制活性以及血管擴張活性)，展現出開啟 Maxi-K 通道之活性，因此，將其作為 Maxi-K 通道開啟劑而完成本發明。

本發明提供一種新穎之 PTEN 抑制劑或一種新穎之 Maxi-K 通道開啟劑，其包括式(I)之四唑基烷氧基-2-羥基喹啉化合物或其鹽作為活性成分。本發明進一步提供一種抑制 PTEN 之方法及開啟 Maxi-K 通道之方法，該方法包括對需要此種治療之病患投予該四唑基烷氧基-2-羥基喹啉化合物(I)或其鹽，以及本發明進一步提供以該四唑基烷氧基-2-羥基喹啉化合物(I)或其鹽抑制 PTEN 以及開啟 Maxi-K 通道之用途。

式(I)之化合物或其鹽具有優異之 PTEN 抑制作用，因此含有以式(I)之化合物或其鹽作為活性成分之本發明之 PTEN 抑制劑係作為促進正常細胞、腦細胞、心臟細胞、以及皮膚存活之藥劑，且進一步抑制格蘭氏陰性菌之腐敗作用以及細胞移動與細胞侵略而無因抑制 PTEN 所造成之副作用。

再者，式(I)之化合物或其鹽具有優異之開啟高傳導鈣-活化之 K^+ 通道(Maxi-K 通道)的作用，因此含有以式(I)之化合物或其鹽作為活性成分之本發明之 Maxi-K 通

道開啟劑係作為治療神經元失調之藥劑，例如抗痙攣藥物、神經保護之藥物、用於治療局部小腦水腫以及神經運動損傷、認知失調、創傷性的腦損害、帕金森氏症、癲癇、偏頭痛以及阿滋海默症、疼痛、治療急迫性尿失禁、腸過度運動、子宮收縮、焦慮以及沮喪之藥物。

式(I)之四唑基烷氧基-二氫 2-羥基喹啉化合物及其製備方法係揭示於 JP-63-20235。

式(I)中，該「環烷基」包含 C_{3-8} 環烷基例如環丙基、環丁基、環戊基、環己基、環庚基、環辛基等，但是以環己基較佳。「低碳數伸烷基」包含 C_{1-6} 伸烷基例如亞甲基、伸乙基、伸丙基、伸丁基等，但是以伸丁基較佳。

特佳之化合物係 6-[4-(1-環己基-1H-四唑-5-基)丁氧基]-3,4-二氫-2-羥基喹啉，該化合物已經以西洛他唑(cilostazol)之商品名販售。

本發明之式(I)化合物可大量使用或較佳係與習知之醫藥載體或稀釋劑呈現醫藥製劑之方式使用。並不限於特定劑量形式，可為任一種習知之劑量形式，例如，經口投予之製劑，例如錠劑、膠囊、粒劑、各種適合經口投予之液體製劑、或非口服投予之製劑，例如注射、栓劑。劑量不限於特定範圍，但是通常係成人(體重為 50kg)每日 100 至 400mg，可一次投予或分成數次投予。該製劑中，較佳為每單位劑量含有 50 至 100mg 之活性化合物。

注射製劑通常係以液體製劑、乳劑、或懸浮劑之形

式製備，其係經過滅菌且進一步較佳係製備成與血液呈等滲透壓之形式。呈液體、乳劑、或懸浮劑之製劑通常係利用習知之醫藥稀釋劑製備，例如，水、乙醇、丙二醇、乙氧化之異硬脂基醇、聚氧化之異硬脂基醇、聚氧乙烯山梨醇脂肪酸酯。此等製劑可與等張劑(例如氯化鈉、葡萄糖、甘油)合併，該等張劑之用量係足以使製劑達到等滲透壓，且該製劑可進一步與習知之溶解劑、緩衝液、麻醉劑，以及視需要之著色劑、防腐劑、香料、調味劑、甜味劑、以及其他藥劑合併。

經口投予之製劑(例如錠劑、膠囊、液劑)可經由習知方法製備。錠劑可經由混合習知醫藥載體，例如明膠、澱粉、乳糖、硬脂酸鎂、滑石、阿拉伯膠等而製備。膠囊可經由混合惰性的醫藥填充劑或稀釋劑且填充於硬明膠膠囊或軟膠囊而製備。口服液體製劑例如糖漿或萬能藥係經由混合活性化合物與甜味劑(例如蔗糖)、防腐劑(例如對羥苯甲酸甲酯、對羥苯甲酸丙酯)、著色劑、調味劑等而製備。非口服投予之製劑亦可經由習知方法製備，例如經由將本發明之化合物(I)溶解於無菌水溶液載體，較佳為水或鹽水。適合非口服投予之較佳的液體製劑係經由將約 50 至 100mg 之活性化合物(I)溶解於水及有機溶劑或者具有分子量為 300 至 5000 之聚乙二醇，其較佳與潤滑劑合併，例如羧酸鈉-甲基纖維素、甲基纖維素、聚乙烯吡咯烷酮、以及聚乙醇醇。上述液體製劑進一步較佳可與消毒劑(例如苯甲醇、酚、局部抗菌劑)、

殺真菌劑、以及進一步視需要與等張劑(例如蔗糖、氯化鈉)、局部麻醉劑、安定劑、緩衝劑等合併。於保存安定性之觀點，非口服投予之液體製劑可經由以習知冷凍乾燥之技術移除水性媒介，接著填充於膠囊，以及當使用時藉由溶解於水性媒介予以復原成液體製劑。

【實施方式】

藉由下列製備例以及以該化合物對增加之 PTEN 磷酸化(該 PTEN 磷酸化作用係由 TNF- α 所刺激)或 Maxi-K⁺通道開啟之抑制效果之實驗說明本發明，但是不應以此等實施例限制本發明之範圍。

製備例 1

製備注射製劑：

成分	量
6-[4-(1-環己基-1H-四唑-5-基)丁氧基]-3,4-二氫 2-羥基喹啉	5g
聚乙二醇(分子量：4000)	0.3g
氯化鈉	0.9g
聚氧乙烯山梨醇單油酸酯	0.4g
偏亞硫酸鈉	0.1 g
對羥苯甲酸甲酯	0.18g
對羥苯甲酸丙酯	0.02g
注射用蒸餾水	10.0ml

上述對羥苯甲酸酯、偏亞硫酸鈉以及氯化鈉係於 80℃ 攪拌下溶解於一半量之上述蒸餾水中。將混合物冷卻至 40℃，且於其中溶解該活性化合物，以及進一步溶解聚乙二醇與聚氧乙烯山梨醇單油酸酯。將剩餘的注射用蒸餾水加入混合物中，藉由濾紙過濾而滅菌，得到所欲

之注射製劑。

製備例 2

製備錠劑：

<u>成分</u>	<u>量</u>
6-[4-(1-環己基-1H-四唑-5-基)丁氧基]-3,4-二氫 2-羥基喹啉	100g
乳糖 (Japanese Pharmacopeia)	40g
玉米澱粉 (Japanese Pharmacopeia)	40g
結晶纖維素 (Japanese Pharmacopeia)	20g
羥丙基纖維素 (Japanese Pharmacopeia)	4g
硬脂酸鎂 (Japanese Pharmacopeia)	2g

將上述之本發明化合物、乳糖、玉米澱粉與結晶纖維素混合均勻以及將該混合物與 5% 羥丙基纖維素之水溶液一起造粒，以及將粒狀之混合物以 200 網眼之篩子篩選俾小心地乾燥該顆粒，然後經由習知方法將顆粒打錠，得到錠劑 (1000 錠)。

藥理實驗

測試本發明之代表性化合物：西洛他唑，於抑制由 TNF- α 刺激而增加之 PTEN 磷酸化程度的作用。

再者，測試本發明之代表性化合物：西洛他唑以及某些市售之 Maxi-K 通道開啟劑或阻斷劑，於開啟 Maxi-K 通道的作用。

實驗例 1

西洛他唑對由 TNF- α 刺激而增加之 PTEN 磷酸化程度的作用：

材料：

細胞培養：將 SK-N-SH (KCLB 30011, 人類腦神經母細胞瘤) 細胞培養於含有 2mM L-麩醯胺酸及 1.0mM 丙酮酸鈉且補充 10% 經加熱去活性化之胎牛血清的 Eagle's 最低必需培養基 (MEM)。使細胞生長於 37°C、5% CO₂ 的環境中至高緻密度 (confluency) 以及用於實驗之細胞不超過 20 個繼代。

TNF- α 溶液之製備：將 TNF- α (Upstate Biotechnology, Inc., Lake Placid, NY) 溶解於磷酸緩衝鹽水製成 10 μ g/ml 之儲備溶液。

方法：

西方點墨分析：以 TNF- α 刺激前，高緻密度的細胞先經含有 1% FBS 之 MEM 培養基與西洛他唑處理 3 小時，然後暴露於 TNF- α 下 1 小時。

將細胞於含有 50mM Tris-Cl (pH8.0)、150mM NaCl、0.02% 疊氮鈉、100 μ g/ml 苯甲基磺醯氟、1 μ g/ml 抑肽酶 (aprotinin) 以及 1% Triton X-100 之溶解 (lysis) 緩衝液中溶解。接著於 12,000rpm 離心，將 50 μ g 之總蛋白質裝載至 8 或 10% SDS-PAGE 凝膠，以及轉移至硝化纖維素膜 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)。然後將經阻隔處理之膜與經指示之抗體培養，使用由 Supersignal West Dura Extended Duration Substrate Kit (Pierce, Rockford, IL) 建議之化學冷光試劑觀察具有免疫活性之帶 (band)。該帶之訊號以 GS-710 Calibrated imaging Densitometer (Bio-Rad Laboratories, Hercules,

CA)定量。以相對密度表示結果。抗 PTEN，磷酸-PTEN (Ser380/Thr382/383 之多株抗體)係得自 Cell Signaling Technology (Beverly, MA)。

統計分析：以平均值 $\pm$ SEM 表示結果。經由 Student's t-試驗決定組別間的統計差異。p<0.05 係認為具有顯著性。

結果：

西方點墨及密度分析之結果顯示於隨附的第 1 圖。如第 1 圖所示，西洛他唑(1、10、及 100 μ M)對抑制經由 TNF- α (50ng/ml)刺激而增加之 PTEN 磷酸化程度係呈濃度-相依性。

由上述實驗結果，可清楚地顯示西洛他唑具有抑制 PTEN 磷酸化之有效活性。

實驗例 2

材料：

細胞培養：將 SK-N-SH (KCLB 30011，人類腦神經母細胞瘤)細胞培養於含有 2mM L-麩醯胺酸及 1.0mM 丙酮酸鈉且補充 10%經加熱去活性化之胎牛血清的 Eagle's 最低必需培養基(MEM)。使細胞生長於 37°C、5% CO₂ 的環境中至高緻密度以及用於實驗之細胞不超過 20 個繼代。

試驗藥物：

(1)西洛他唑(本發明之化合物，商品名為 6-[4-(1-環己基-1H-四唑-5-基)丁氧基]-3,4-二氫-2-羥基喹啉)。

(2) 格列本 (glibenclamide, 簡稱為「GBC」, 一般名稱為：格列班脲 (glyburide), 化學名稱為：5-氯-N-[2-[4-[[[(環己基-胺基)羰基]胺基]磺醯基]苯基]乙基]-2-甲氧基-苯甲醯胺。其為市售可得之抗糖尿病藥劑，為 ATP-敏感性 K^+ 通道之阻斷劑)。

(3) 艾貝瑞爾托可辛 (iberiotoxin, 簡稱為「Ibtx」, 其係已知之 Maxi- K^+ 通道阻斷劑)。

方法：

紀錄整個細胞之 K^+ 電流：該實驗係於固定在倒立顯微鏡 (Inverted Microscope, Nikon 型號 TE300, Tokyo, Japan) 之鏡臺上連續以 1ml/min 之流速注入的小型浴 (0.5ml) 中進行。利用膜片鉗技術 (patch clamp) 之整個細胞構型，於室溫 (20 至 22°C) 下以 Axopatch-200B 膜片鉗放大器 (Axon Instruments, Foster City, CA) 紀錄 K^+ 電流。於 0.5 至 5 kHz 去假頻濾波 (anti-alias filtering) 後，於 1 至 10 kHz 進行電流抽樣。數據之取得及之控制之電位係由 pClamp 6.0.3 軟體 (Axon Instruments, Foster City, CA) 控制。為了確保電壓鉗之品質，電極之電阻保持在低於 $3M\Omega$ 下。於標準浴溶液中將電極之接界電位 Junction potential 歸零。巨歐姆阻抗封接形成 (gigaohm seal formation) 係由吸入，然後建立整個細胞構型而達成，於 50 kHz 紀錄由 -80 mV 階段性對稱的 10mV 電壓鉗所引起之瞬間電容，以計算細胞電流容量。整個細胞紀錄用之正常的浴溶液係：NaCl 130mM、KCl 5mM、

MgCl₂ 1.2mM、CaCl₂ 1.8mM、HEPES 10mM、葡萄糖 5.2mM 以及 pH 以 NaOH 調整為 7.4。於移液管中填充 KCl 140mM、MgCl₂ 0.5mM、CaCl₂ 0.1mM、乙撐雙(氧代氮川)四-乙酸(EGTA) 0.09mM、HEPES 10mM、葡萄糖 10mM 以及 pH 以 NaOH 調整為 7.4。

建立整個細胞之紀錄與收集控制紀錄後約 5 分鐘直到由去極化所引起之電流穩定，將西洛他唑施用至浴中。實驗組中，使用格列本或艾貝瑞爾托可辛，於施用格列本或艾貝瑞爾托可辛 20 分鐘後，於浴中施用西洛他唑。

結果：

試驗結果顯示於隨附的第 2 圖，其中第 2A 圖顯示西洛他唑之作用，第 2B 圖顯示西洛他唑及/或格列本(「GBC」，提示其可開啟 Maxi-K⁺通道)之作用，以及第 2C 圖顯示西洛他唑及/或艾貝瑞爾托可辛(「Ibtx」，Maxi-K⁺通道阻斷劑)之作用。

如第 2 圖所示，西洛他唑顯著地使電流增加，但是另一方面，藉由於浴中添加艾貝瑞爾托可辛(100nM)而可逆地阻斷電流，格列本(10μM)則否。甚至於與格列本共同存在下，西洛他唑仍可增加由 Maxi-K 通道調節之電流，然而單獨只有格列本則無法增加 Maxi-K 通道調節之電流。當西洛他唑與艾貝瑞爾托可辛(Maxi-K 通道阻斷劑)一起添加至細胞中時，增加之電流比單獨添加艾貝瑞爾托可辛時來的少。

實驗例 3

1. 化合物之製備

載劑對照組；0.5% 羧甲基纖維素。一天兩次(n=10)

西洛他唑；100mg/kg。一天兩次(n=10)

藉由瑪瑙研鉢磨碎小量之粉末(西洛他唑)。加入二或三滴 0.5% 羧甲基纖維素(CMC)且仔細磨碎。加入 4 至 5ml 之 0.5% CMC 以及回收懸浮之西洛他唑至不透光之玻璃瓶。

試驗化合物製劑之濃度為 1000mg/50ml，且貯存於 4℃ 不透光之環境中。

化合物投予

投予前，以超音波震盪機震盪試驗化合物之貯存瓶以及使之混合均勻。

每組一天兩次經口胃管餵食化合物。

載劑對照組(0.5% 羧甲基纖維素：CMC；1kg/5ml)一天胃管餵食兩次。試驗化合物(西洛他唑、100mg/kg/5ml)一天胃管餵食兩次。

2. 觀察、檢驗及測量之方法

- a. 隨機將動物(8週齡，半合基因轉殖小鼠，表現突變的人類 APP_{K670N,M671L}/株 Tg2576)分成兩組雙重基因轉殖 APP/PS1 小鼠(對照組及西洛他唑組，共 20 隻小鼠)。如下表所示，各老鼠每天胃管餵食兩次投予持續 6 週，

實驗設計			
處理方法	起始年齡	小鼠之數目	實驗結束時之年齡
對照組(載劑)	8 週齡	10	14 週齡
試驗化合物	8 週齡	10	14 週齡
共 20 隻小鼠			

b. 小鼠於研究開始及結束時基因型化。

c. 於完成存活相 in-life phase 前將小鼠進行 Y-迷宮行為範例(Y-maze behavior paradigm)。

d. 於 14 週齡時將小鼠殺死。

e. 將小鼠殺死時收集 1ml 的血液，以測定血液中西洛他唑的濃度，且將 APP/PS1 小鼠以鹽水灌注。腦切成兩半，將一半固定以及另一半冷凍。

f. 將冷凍的腦半球均質化且經由 ELISA 分析總澱粉樣蛋白- β (amyloid- β)之濃度。

檢測對照組與經西洛他唑處理組之小鼠腦中的 A- β 40 及 A- β 42 之總濃度。結果顯示於隨附的第 3 圖。

3. 程序

下列程序係概述進行「Y-迷宮中之自發性交替作用」之步驟。小鼠天生具有探索其所處環境之天性。成功的探索係取決於避開最近已探訪過之地區的能力，該地區的食物已經耗盡或者已無食物(「自發性交替作用」)。Y-迷宮係一種動物行為為主之試驗，其不涉及報償投遞。具有經折衷的「工作記憶」官能之小鼠無法於其工作記憶中保有關於已探訪之地區的資訊；因此該等小鼠顯示出降低之自發性交替作用

由公開的結果顯示出降低之自發性交替作用以及於某些基因轉殖株小鼠(例如 APP/PS1 小鼠)中增加之探索。

西洛他唑具有抗-血小板以及血管舒張之作用，其適用於 ASO 以及預防二次腦梗塞。

西洛他唑的這些作用可有助於降低澱粉樣蛋白- β 的沉積，以及改善阿滋海默症之行為。

i. 將欲進行試驗之小鼠攜帶至試驗場所。避免同時攜帶太多小鼠(超過 3 籠)至試驗區，這會影響小鼠的行為。(若試驗動物未做其他記號，可視需要藉由訊號發射器或清晰可見的花紋在試驗動物做記號。)依下列順序，以非毒性的顏色標記在試驗動物的尾部上做記號：

1：紅色

2：綠色

3：藍色

4：黑色

ii. 以錄影機紀錄實驗。如此可提供永久性的紀錄以及若有任何疑問，研究人員可反覆觀看該實驗紀錄。

iii. 由小鼠的尾根部將欲進行試驗之第一隻小鼠自鼠籠中取出，以及秤重。將重量紀錄在 Y-迷宮工作表格。將小鼠放回籠中。(或者，可於實驗開始前先將小鼠秤重，例如實驗前一日)

iv. 試驗開始前 1 小時勿使小鼠受驚嚇，使其適應環境。需特別注意勿將籠子置於特定的臂狀物鄰近處，例

如，嗅覺，可能會影響小鼠進入單一臂狀物。因此，籠子放置處應與儀器保持一段距離或確保籠子平均地分布在試驗場所。(例如可同時攜帶3籠小鼠？各置於臂狀物附近)。技術人員可出現在試驗場所，但是不可以使小鼠受驚嚇。

v.試驗開始前，以異丙醇擦拭Y-迷宮的內部。

vi.溫和地由尾部抓住小鼠以及使其於臂狀物上休息，小心勿使小鼠跳入迷宮。分別將小鼠置於Y迷宮的中央，所有3隻臂狀物(臂狀物A、臂狀物B、以及臂狀物C)皆可供小鼠進行探索，時間為8分鐘。

vii.於列印出之Y-迷宮資料表上紀錄所有入口。若小鼠完全進入臂狀物A，則於臂狀物進入區鍵入「A」等。

若小鼠探索至臂狀物終點，則於同一列之OBSERVATIONS中鍵入「end」，「R」係表示每次小鼠坐下(坐在其後腿上而前腳可自由活動)或若小鼠的身體傾斜(「探索迷宮的牆壁」係以前腳觸碰牆壁)則紀錄「L」，以及若小鼠停滯不動(5秒或更久的時間內很少移動)則紀錄「F」。若小鼠在臂狀物A中來來回回，則於同一列之OBSERVATIONS中鍵入「bf」。於表中鍵入任何所觀察到之現象。若無足夠的時間鍵入觀察到之現象，則可略過。若小鼠回到中心，則以新的一列重新紀錄。若小鼠回到臂狀物A，則於新的一列中鍵入「A」，回到臂狀物B則鍵入「B」，或回到臂狀物C則鍵入「C」。

viii. 8 分鐘後，抓住小鼠的尾部將其移出迷宮且放回籠子中。在 Y-迷宮工作表格上紀錄 boli 數以及小鼠是否在迷宮中排尿。以異丙醇擦拭 Y-迷宮的內部。使用刷子清理迷宮轉角處之牆壁與地板。由於先前進行試驗之小鼠可能會將墊料或食物帶進迷宮，故需確定 Y-迷宮係乾淨的且無任何氣味。以醇類清理後，確認 Y-迷宮係乾燥的。確認迷宮中未留下清理物(例如紙巾)。

ix. 將所有欲試驗之小鼠重複上述步驟。

x. 試驗後，將數據鍵入 Excel 工作表格。

Y-迷宮行為範例所得之結果摘述於隨附之第 4 圖。

xi. 數據分析：交替係定義為在無重複-進入下探訪所有三個臂狀物(ABC、ACB、BAC、BCA、CAB 或、CBA)。各別分析各臂狀物進入以及決定是否完成交替。序列 ABCABC 具有四次交替，第一次之終點為 C，接著為 A，然後為 B，然後為 C。序列 ABCBAC 僅具有三次交替，第一次之終點為 C，第二次為 A，然後第三次為 C。%

交替係(觀察到之交替數)/(可能的交替數)。若探訪 n 個臂狀物，可能的交替數最高為 n-2。若動物係自由移動，可預估 22%之交替($3*2*1/3*3*3$)。總體活動力係反應於探訪不同臂狀物之總數。因此，活動力係(臂狀物之進入總數)/(觀察時間)。

因此，本發明之四唑基烷氧基-二氫 2-羥基喹啉化合物(I)或其鹽可有效開啟 Maxi-K 通道以及用於治療神經

元失調，特別係治療阿滋海默症。

產業利用性

本發明提供一種包括以四唑基烷氧基-二氫 2-羥基喹啉化合物(I)或其鹽作為活性成分之組成物，其具有優異之 PTEN 抑制效果以及作為促進正常細胞、腦細胞、心臟細胞、以及皮膚存活之藥劑，且亦可抑制格蘭氏陰性菌之腐敗作用以及細胞移動與細胞侵略而無因抑制 PTEN 所造成之副作用。本發明組成物亦可作為高傳導鈣-活化之 K^+ 通道(Maxi-K 通道)的開啟劑，因此可作為治療神經元失調之藥劑，例如，抗痙攣藥物、神經保護劑、治療局部小腦水腫以及神經運動損傷、認知失調、創傷性的腦損害、帕金森氏症、癲癇、偏頭痛以及阿滋海默症等之藥劑。

【圖式簡單說明】

第 1 圖顯示藉由西洛他唑(cilostazol, 6-[4-(1-環己基-1H-四唑-5-基)丁氧基]-3,4-二氫-2-羥基喹啉之商品名)抑制經由 $TNF-\alpha$ (50ng/ml)刺激而增加之 PTEN 磷酸化程度。

第 2 圖顯示於 SK-N-SH 細胞中藥物對開啟鈣-活化之 K^+ 電流的作用，以及第 2A 圖顯示西洛他唑(6-[4-(1-環己基-1H-四唑-5-基)丁氧基]-3,4-二氫-2-羥基喹啉之商品名)之作用，第 2B 圖顯示西洛他唑及/或格列本(glibenclamide, 簡稱為「GBC」，其係市售可得之抗糖尿病藥物，提示其不具有開啟 ATP-敏感性 K^+ 通道之能

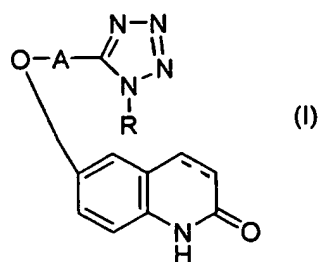
力)之作用，以及第 2C 圖顯示西洛他唑及/或艾貝瑞爾托可辛(iberiotoxin，簡稱為「Ibtx」，鉀離子通道阻斷劑，其係已知之 Maxi-K⁺通道阻斷劑，提示其可開啟 Maxi-K⁺通道)之作用。

第 3 圖顯示對照組及西洛他唑處理組之小鼠腦中澱粉樣蛋白- β (amyloid- β)之總濃度(A- β 40 及 A- β 42 之濃度)，該濃度係藉由 ELISA 測定。

第 4 圖顯示得自將 Y-迷宮行為範例用於測試本發明化合物對阿滋海默症之效果之實驗結果摘要。

伍、中文發明摘要：

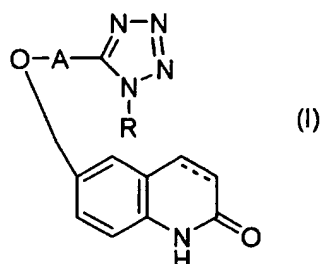
本發明係關於一種第 10 號染色體同源丟失性磷酸酶-張力蛋白基因 (PTEN) 抑制劑或一種最大-鉀離子 (MAXI-K) 通道開啟劑，其係以式 (I) 之四唑基烷氧基-二氫 2-羥基喹啉 (carbostyryl) 化合物或其鹽作為活性成分：



其中 R 係環烷基，A 係低碳數伸烷基，以及位於 2-羥基喹啉核之 3-及 4-位置間之鍵結係單鍵或雙鍵，該化合物係作為促進正常細胞、腦細胞、心臟細胞、以及皮膚存活之藥劑，且亦可抑制格蘭氏陰性菌 (Gram-negative) 之腐敗作用以及由於 PTEN 之抑制所造成之細胞移動與細胞侵略以及亦可作為治療神經元失調之藥劑，例如，抗痙攣藥物 (anticonvulsant)、神經保護劑、治療局部小腦水腫以及神經運動損傷、認知失調、創傷性的腦損害、帕金森氏症 (Parkinson's disease)、癲癇、偏頭痛以及阿滋海默症 (Alzheimer's disease) 等之藥劑。

陸、英文發明摘要：

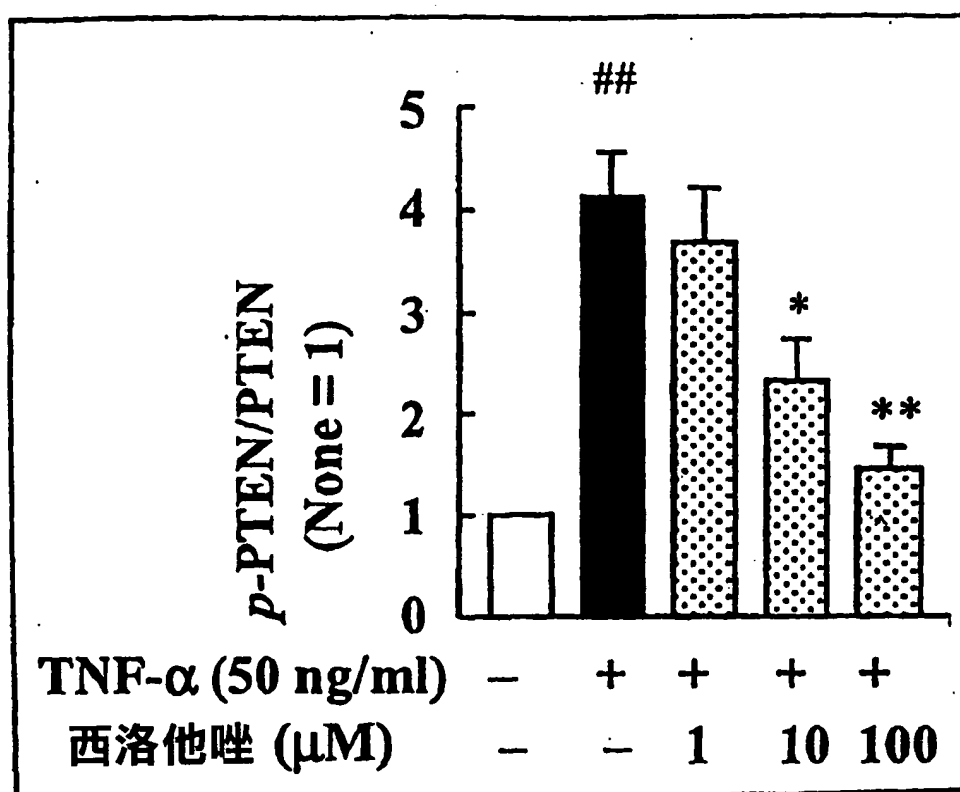
A new PTEN opener or a new opener of a large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel (Maxi-K channel) which comprises as an active ingredient a tetrazolylalkoxy-dihydrocarbostyryl compound of the formula (I):



wherein R is cycloalkyl, A is lower alkylene, and the bond between 3- and 4-positions of the carbostyryl nucleus is single bond or double bond, or a salt thereof, which is useful as a medicament for promotion of the survival of normal cells, brain cells, heart cells, and skin, and further for inhibiting of Gram negative sepsis and cell migration and cell invasion due to inhibition of PTEN and is further useful as a medicament for the treatment of neuronal disorders, for example, an anticonvulsant, a neuroprotecting agent, a medicament for treatment of regional cerebral edema and neurologic motor impairment, cognitive disorders, traumatic brain injury, Parkinson's disease, epilepsy, migraine, and Alzheimer's disease, etc.



92103143

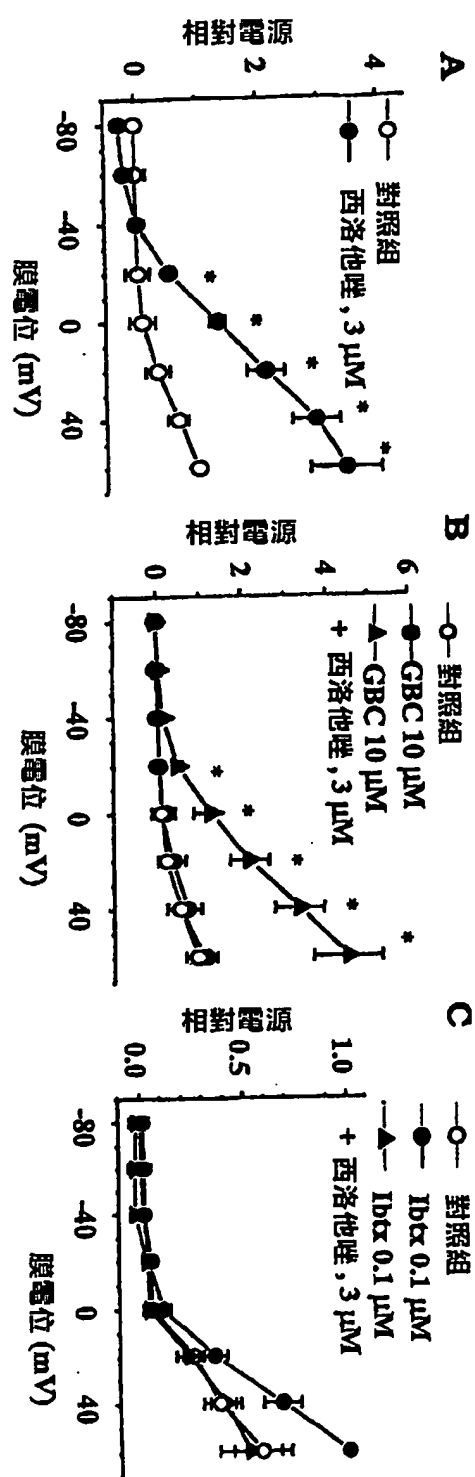


$P < 0.01$ vs. 無TNF- α 及西洛他唑

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs. 僅有TNF- α

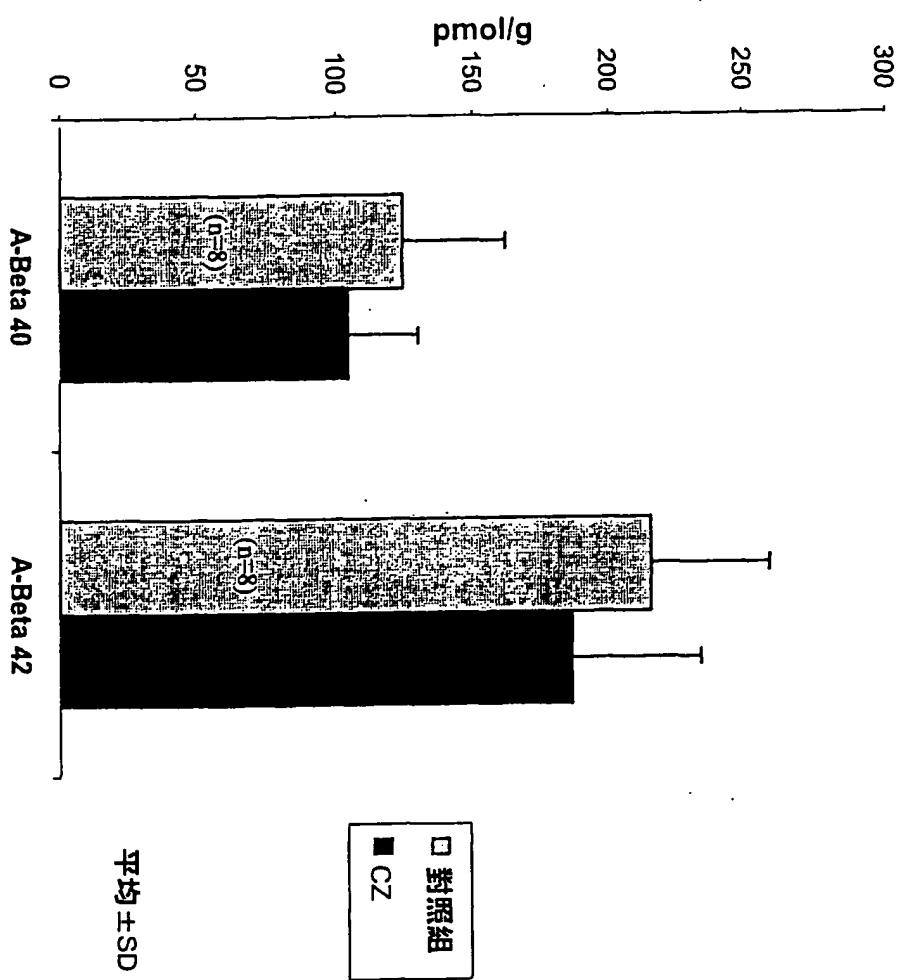
† $P < 0.05$ vs. 僅有西洛他唑(10 μ M)

第1圖



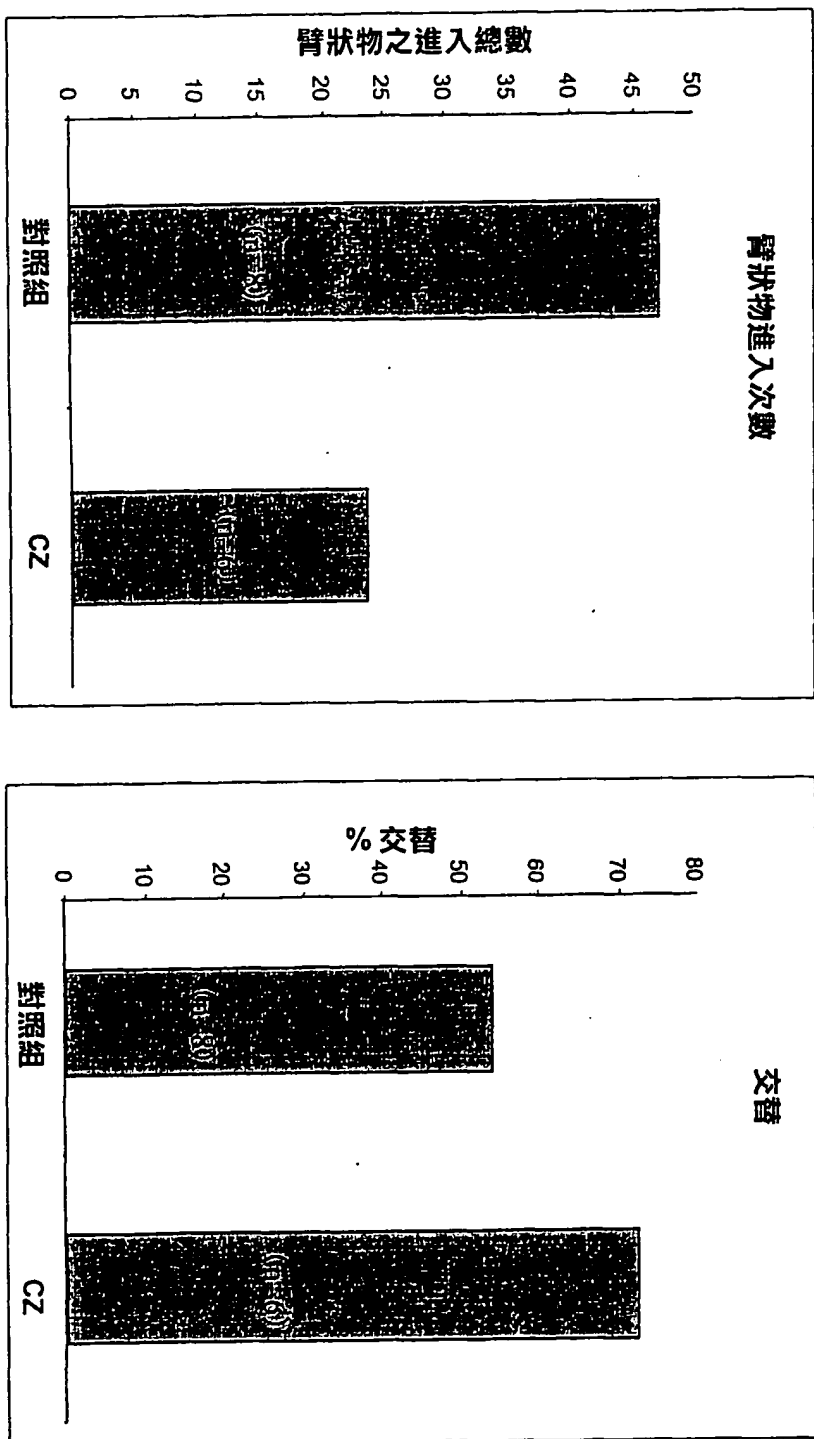
第2圖

總A-β之ELISA的結果



第3圖

Y-迷宫



第4圖

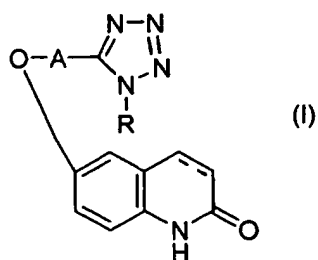
柒、指定代表圖：

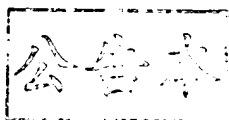
(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件代表符號簡單說明：

(該代表圖無元件符號及其所代表之意義)

捌、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



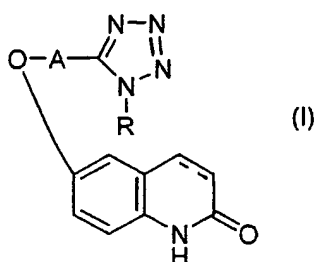


99年1月6日修(受)正本

第 93103143 號專利申請案
(99 年 1 月 6 日)

拾、申請專利範圍：

1. 一種 PTEN 抑制劑，其係包括以式(I)之四唑基烷氧基-二氫 2-羥基喹啉化合物或其鹽作為活性成分：

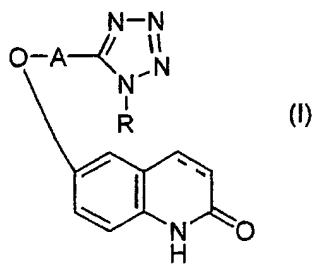


其中 R 係 C_{3-8} 環烷基，A 係 C_{1-6} 伸烷基，以及位於 2-羥基喹啉核之 3-及 4-位置間之鍵結係單鍵或雙鍵。

2. 如申請專利範圍第 1 項之 PTEN 抑制劑，其中，該活性成分為 6-[4-(1-環己基-1H-四唑-5-基)丁氧基]-3,4-二氫 2-羥基喹啉或其鹽。
3. 一種抑制 PTEN 之醫藥組成物，其係以如申請專利範圍第 1 項之式(I)所述之四唑基烷氧基-二氫 2-羥基喹啉化合物或其鹽作為活性成分而與習知醫藥上可接受之載體或稀釋劑混合。
4. 如申請專利範圍第 3 項之醫藥組成物，其中，該活性成分為 6-[4-(1-環己基-1H-四唑-5-基)丁氧基]-3,4-二氫 2-羥基喹啉或其鹽。
5. 一種如申請專利範圍第 1 項所定義之式(I)之四唑基烷氧基-二氫 2-羥基喹啉化合物或其鹽之用途，係用於製造抑制 PTEN 之藥劑。
6. 如申請專利範圍第 5 項之用途，其中，該活性成分為

6-[4-(1-環己基-1H-四唑-5-基)丁氧基]-3,4-二氫 2-羥基喹啉或其鹽。

7. 一種 Maxi-K 通道開啟劑，其係包括以式(I)之四唑基烷氧基-二氫 2-羥基喹啉化合物或其鹽作為活性成分：



其中 R 係 C₃₋₈ 環烷基，A 係 C₁₋₆ 伸烷基，以及位於 2-羥基喹啉核之 3-及 4-位置間之鍵結係單鍵或雙鍵。

8. 如申請專利範圍第 7 項之 Maxi-K 通道開啟劑，其中，該活性成分為 6-[4-(1-環己基-1H-四唑-5-基)丁氧基]-3,4-二氫 2-羥基喹啉或其鹽。
9. 一種開啟 Maxi-K 通道之醫藥組成物，其係以如申請專利範圍第 7 項所定義之式(I)之四唑基烷氧基-二氫 2-羥基喹啉化合物或其鹽作為活性成分而與習知醫藥上可接受之載體或稀釋劑混合。
10. 如申請專利範圍第 9 項之醫藥組成物，其中，該活性成分為 6-[4-(1-環己基-1H-四唑-5-基)丁氧基]-3,4-二氫 2-羥基喹啉或其鹽。
11. 如申請專利範圍第 9 或 10 項之醫藥組成物，其係用於治療神經元失調。
12. 如申請專利範圍第 11 項之醫藥組成物，其中，該神經

元失調係阿滋海默症。

13. 如申請專利範圍第 11 項之醫藥組成物，其中，該神經元失調係選自痙攣、局部小腦水腫、神經運動損傷、認知失調、創傷性腦損傷、帕金森氏症、癲癇、偏頭痛、疼痛、急迫性尿失禁、腸過度運動、子宮收縮、焦慮及憂鬱。
14. 一種如申請專利範圍第 7 項所定義之式(I)之四唑基烷氧基-二氫 2-羥基喹啉化合物或其鹽之用途，係用於製造開啟 Maxi-K 通道之藥劑。
15. 如申請專利範圍第 14 項之用途，其中，該活性成分為 6-[4-(1-環己基-1H-四唑-5-基)丁氧基]-3,4-二氫 2-羥基喹啉或其鹽。
16. 如申請專利範圍第 14 或 15 項之用途，係用於製造治療神經元失調之藥劑。
17. 如申請專利範圍第 16 項之用途，其中，該神經元失調係阿滋海默症。
18. 如申請專利範圍第 16 項之用途，其中，該神經元失調係選自痙攣、局部小腦水腫、神經運動損傷、認知失調、創傷性腦損傷、帕金森氏症、癲癇、偏頭痛、疼痛、急迫性尿失禁、腸過度運動、子宮收縮、焦慮及憂鬱。