

公 告 本

發明專利說明書

101年2月14日修正替換頁

中文說明書替換頁(101年2月)

(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：097138351

※ 申請日期：97.10.3

※IPC 分類：A61K

31/422 (2006.01)

A61P25/28 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

以(-)-尼代地平(NILVADIPINE)對映異構物減低類澱粉沉積、類澱粉神經毒性及微神經膠細胞增生之方法

METHOD FOR REDUCING AMYLOID DEPOSITION, AMYLOID NEUROTOXICITY, AND MICROGLIOSIS WITH (-)-NILVADIPINE ENANTIOMER

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

美商美國阿茲海默症協會公司

ALZHEIMER'S INSTITUTE OF AMERICA, INC.

代表人：(中文/英文)

瑪喬伊 伊 卡倫 CURREN, MARJORIE E..

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國堪薩斯州堪薩斯市平行公園大道7837號

7837 PARALLEL PARKWAY, KANSAS CITY, KANSAS 66112, U.S.A.

國 籍：(中文/英文)

美國 U.S.A.

三、發明人：(共 3 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 麥可 J 慕蘭

MULLAN, MICHAEL J.

2. 丹尼爾 帕里斯

PARIS, DANIEL

3. 羅伯 A 艾維三世

IVEY, ROBERT A. III.

國 籍：(中文/英文)

1. 英國 U.K.

2. 法國 FRANCE

3. 美國 U.S.A.

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. 美國；2007年10月05日；60/977,953

2. 美國；2008年04月18日；61/046,109

☐ 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。

五、中文發明摘要：

本發明提供一種藉由向患有大腦類澱粉蛋白源性疾病(例如阿茲海默氏病(AD))之動物或人投與治療有效量之二氫吡啶類化合物尼代地平(nilvadipine)之(S)-對映異構物(亦稱為(-)-尼代地平)，以減低該動物或人中之A β 沈積、A β 神經毒性及微神經膠細胞增生之方法。本發明進一步提供在動物或人受到外傷性大腦損傷後藉由向該動物或人投與(-)-尼代地平且之後繼續進行一段規定時期之治療，以減低該受到外傷性腦損傷之動物或人發生A β 沈積、A β 神經毒性及微神經膠細胞增生風險之方法。

六、英文發明摘要：

The present invention provides methods for reducing A β deposition, A β neurotoxicity and microgliosis in an animal or human afflicted with a cerebral amyloidogenic disease, such as Alzheimer's disease (AD), by administering therapeutically effective amounts of the (S)-enantiomer of the dihydropyridine compound nilvadipine, also known as (-)-nilvadipine, to the animal or human. Further provided are methods for reducing the risk of A β deposition, A β neurotoxicity and microgliosis in animals or humans suffering from traumatic brain injury by administering (-)-nilvadipine after the traumatic brain injury and continuing treatment for a prescribed period of time thereafter.

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：

(無)

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於治療大腦類澱粉蛋白源性疾病(例如阿茲海默氏病(Alzheimer's disease))之病理生理學作用的方法。更具體而言,該方法係關於投與尼代地平(nilvadipine)(-)對映異構物以抵抗患有大腦類澱粉變性病相關疾病(例如阿茲海默氏病)的動物或人之大腦中之病理生理學作用,其與尼代地平之外消旋混合物相比,高血壓副作用減低。

本公開案主張2007年10月5日申請之美國臨時專利申請案第60/977,953號及2008年4月18日申請之美國臨時專利申請案第61/049,109號之優先權,且每一申請案之全部內容以引用方式併入本文中。

【先前技術】

阿茲海默氏病(AD)係老年人最常見之神經退化性疾病,在年齡超過65歲之人群中約有1%遭受其折磨。該疾病之典型特點包含胞內神經纖維纏結、胞外實質性老年斑及腦血管沈積物在大腦內之進行性累積。老年斑及腦血管沈積物之主要組份係由39至43個胺基酸構成之 β 類澱粉肽(A β),其以蛋白酶解方式衍生自一種跨膜糖蛋白即類澱粉前驅物蛋白(APP)。

APP係具有含590至680個胺基酸之胞外胺基端結構域及含約55個胺基酸之胞質尾區之單跨膜蛋白。來自21號染色體上APP基因之信使RNA經受交替拼接以生成8種可能同

型異構體，其中3種(695、751及770胺基酸同型異構體)在大腦中佔優勢。APP藉由3種稱為 α -、 β -及 γ -分泌酶之酵素活動經受蛋白酶解處理。 α -分泌酶可解離A β 結構域胺基酸17處之APP，由此釋放可供分泌的可溶性胺基端大片段 α -APP。因 α -分泌酶在該A β 結構域內實施解離，故該解離可預防A β 形成。另一選擇為，APP可藉由 β -分泌酶解離以界定A β 之胺基端且產生可溶性胺基端片段 β -APP。 γ 分泌酶對APP之胞內羧基端結構域之隨後解離可引起多種肽之生成，該等肽中最常見的兩種係40-胺基酸A β (A β 40)及42-胺基酸A β (A β 42)。A β 40佔所分泌A β 之90-95%，且係可自腦脊液回收之主要物質(Seubert等人，Nature, 359:325-7, 1992)。相比而言，在所分泌A β 中僅有不到10%之A β 42。儘管A β 42產生量相對較少，但A β 42係發現於斑塊中之主要物質且其最先沈積，此可能係由於其較A β 40能更快形成不可溶性類澱粉聚集物之故(Jarrett等人，Biochemistry, 32:4693-7, 1993)。大腦中A β 之異常累積據信係由於APP之過度表現或經改變的處理所致。

由此，據信A β 肽類在AD之病理生物學中發揮關鍵作用，乃因所有與家族型AD相關之突變皆會導致該等來自APP之肽類之經改變的處理。實際上，無論個體之遺傳傾向性如何，大腦中A β 之不可溶或所聚集纖維之沈積物係所有類型AD之突出神經病理學特點。

伴隨A β 沈積，AD大腦中存在炎症路徑之強烈活化，包含在A β 沈積物內或周圍產生之促炎症細胞因子及急性期反

應物 (McGeer 等人, J Leukocyte Biol., 65:409-15, 1999)。據認為, 大腦之常駐性先天免疫細胞(微神經膠細胞)之活化密切參與該炎症級聯。人們已證明反應性微神經膠細胞可產生促炎症細胞因子, 例如炎症蛋白及急性期反應物, 諸如 α -1-抗糜蛋白酶、轉化生長因子 β 、載脂蛋白E、及補體因子, 已顯示, 該等所有炎症蛋白及急性期反應物皆位於A β 斑塊中且可促使A β 斑塊"凝結"或成熟 (Nilsson 等人, J. Neurosci. 21:1444-5, 2001), 且其於較高含量時可促進神經變性。流行病學研究已顯示使用非類固醇消炎藥 (NSAIDS) 之患者患AD之風險可降低高達50%(Rogers等人, Neurobiol. Aging 17:681-6, 1996), 且對接受NSAID治療之AD患者之死後屍檢評估表明此風險降低與經活化微神經膠細胞之較少數量相關 (Mackenzie等人, Neurology 50:986-90, 1998)。另外, 當給Tg APP_{sw}小鼠(一種阿茲海默氏病之小鼠模型)投以NSAID(布洛芬 (ibuprofen))時, 該等動物顯示出與降低的微神經膠細胞活化相關聯之A β 沈積物、星形細胞增生、及營養不良性神經炎之減低 (Lim等人, J. Neurosci. 20:5709-14, 2000)。

因此, AD大腦中之炎症過程產物可能會加重AD病症。此外, 有證據表明AD大腦中經活化之微神經膠細胞是致病原因, 乃因其可促使A β 微纖維生成且隨後沈積為老年斑而不是清除A β (Wegiel等人, Acta Neuropathol. (Berl.) 100:356-64, 2000)。

亦已表明AD發病機理係由於A β 之神經毒性性質所致。

人們於取自齧齒類動物大腦之原代細胞培養物以及人類細胞培養物中首先確立A β 之細胞毒性。Mattson等人之著作(J. Neurosci., 12:376-389, 1992)指出，存在興奮性神經遞質麩胺酸鹽時，A β 可引起細胞內鈣素之即時病理性增高，據信此鈣素藉由其大大增加的第二信使活動而對細胞具有非常大的毒性。

美國專利申請案第2005/0009885號(2005年1月13日)(Mullan等人)揭示一使用尼代地平減低A β 沈積之方法，亦揭示使用尼代地平診斷大腦類澱粉蛋白源性疾病之方法。然而，美國專利第4,338,322號闡釋尼代地平之抗高血壓作用。尼代地平(NIVADILTM)在愛爾蘭已獲規章性批准可以8 mg/天之劑量用於高血壓治療，或若8 mg/天未達到足夠抗高壓作用則以16 mg/天之劑量進行治療。亦參見美國專利第5,508,413號，其揭示尼代地平之(+)-對映異構物之抗高血壓作用。Hanyu等人報導外消旋尼代地平及其對人類個體之區域性大腦血流之作用。(Nuclear Medicine Communications, 第28卷，第4期，第281-287頁，2007年4月)。

儘管已有上述報導，但人們仍需要預防作為AD特徵之大腦退化不斷加劇，其中該預防係藉由副作用(例如不期望的血壓或血壓過度降低)極低的治療有效治療來解決AD患者中之A β 沈積、A β 神經毒性、經神經膠細胞激活之炎症、及APP之改變或過度表現。

【發明內容】

為滿足此需要，本發明提供藉由向患有大腦類澱粉蛋白源性疾病(例如阿茲海默氏病(Alzheimer's disease)(AD))之動物或人投與治療有效量之富集對映異構性的(-)-尼代地平以減低該動物或人之 $A\beta$ 沈積、 $A\beta$ 神經毒性及微神經膠細胞增生之方法。具體而言，本發明提供富集對映異構性的(-)-尼代地平之投與，與等量之外消旋尼代地平相比，其具有減低的降血壓作用。另外，與外消旋尼代地平或(+)-尼代地平之投與相比，富集對映異構性的(-)-尼代地平之投與可容許較高劑量，乃因其降血壓作用減低。舉例而言，本文所述之數據表明，對於(-)-對映異構物，當用FPL64176攻擊時出現基線主動脈收縮，此與(-)-對映異構物具有較低血管活性相關，相比之下，外消旋混合物或(+)-對映異構物則表現出血管活性(即，對所誘導血管收縮之拮抗作用)。在較佳實施例中，(-)-對映異構物超量存在於所投與組合物中，且該對映異構物超量較佳為90%或更高、95%或更高、且更佳為98%或更高(包含100%)、至高達可檢測純度極限值。

本發明進一步提供在動物或人受到頭部損傷後藉由向該動物或人投與治療有效量之富集對映異構性的(-)-尼代地平且之後繼續以富集對映異構性的(-)-尼代地平實施規定時期之治療以減低該受到外傷性腦損傷之動物或人發生 $A\beta$ 沈積、 $A\beta$ 神經毒性及微神經膠細胞增生風險之方法。具體而言，本發明提供富集對映異構性之(-)-尼代地平之投與，與等量之外消旋尼代地平相比，其具有減低的降血壓

作用。另外，與外消旋尼代地平之投與相比，經富集對映異構性之(-)-尼代地平之投與可容許較高劑量，乃因其降血壓作用減低。在較佳實施例中，(-)-對映異構物係超量存在於所投與組合物中，且對映異構物超量較佳為90%或更高、95%或更高、且更佳為98%或更高、包含100%、高達可檢測純度極限值。

本發明亦提供用於在經診斷具有發生大腦類澱粉蛋白源性疾病或病況風險之動物或人中減低發生大腦類澱粉蛋白源性疾病或病況風險、或延緩該疾病或病況之發作或加劇、或穩定該疾病或病況之症狀之方法，其包括向該動物或人投與治療有效量之富集對映異構性的(-)-尼代地平，其中，富集對映異構性的(-)-尼代地平係在診斷出具有發生大腦類澱粉蛋白源性疾病或病況風險之後開始投與。具體而言，本發明提供富集對映異構性的(-)-尼代地平之投與，與等量之外消旋尼代地平相比，其具減低的降血壓作用。另外，與外消旋尼代地平之投與相比，富集對映異構性的(-)-尼代地平之投與可容許較高劑量，乃因其降血壓作用減低。在較佳實施例中，該(-)-對映異構物係超量存在於所投與組合物中，且該對映異構物超量較佳為90%或更高、95%或更高、且更佳為98%或更高(包含100%)、至高達可檢測純度極限值。

本發明提供對大腦類澱粉蛋白源性疾病之臨床總體表現之治療，該總體表現包括與大腦類澱粉蛋白源性疾病相關之一個或多個或所有認知及行為特徵。舉例而言，就AD

而言，此等特徵可包含多種症狀之非限制性列表，其中包括諸如深度記憶喪失、執行熟悉任務困難、語言問題、不辨方向、判斷力下降、抽象思維損傷、性格、情緒或行為改變，及/或一組認知測試中之特徵性評分。此等認知測試包含韋克斯勒(Wechsler)記憶量表(修訂版)(WMS-R)、臨床癡呆分級量表(CDR)、簡易精神狀態檢查(MMSE)、及/或阿茲海默氏病評價量表－認知部分(ADAS)。

本發明提供以富集對映異構性的(-)-尼代地平實施治療，其可產生特定的臨床結果。治療之一端點係彼等受大腦類澱粉蛋白源性疾病影響個體中之一個或多個疾病症狀之可量測改良。該改良可達成患者症狀消除，或可反映與一個或多個治療前症狀相比在能力上之改良。另一選擇為，治療之一端點可係維持基線症狀程度。換言之，該端點表示該疾病或該疾病之一個或多個症狀之永久性或一段時期之穩定化。另外，治療之一端點可係疾病加劇速率比未治療對照降低。此外，治療可包含對據認為存在發生大腦類澱粉蛋白源性疾病風險但尚未出現一個或多個症狀臨床表現之個體的預治療。當提及疾病治療時亦涵蓋對一個或多個症狀之姑息性而非治癒性治療。

本發明亦提供處理可移植神經幹細胞之方法，其包括：於患有大腦類澱粉蛋白源性疾病(例如AD)之動物或人之中樞神經系統之幹細胞移植前，向該等神經幹細胞投與一定量的富集對映異構性的(-)-尼代地平。所投與量係可達到期望細胞保護作用之量。在較佳實施例中，該(-)-對映異

構物係超量存在於所投與組合物中，且該對映異構物超量較佳為90%或更高、95%或更高、且更佳為98%或更高(包含100%)、至高達可檢測純度極限值。

【實施方式】

本發明提供藉由投與富集對映異構性的(-)-尼代地平(異丙基-3-甲基-2-氰基-1,4-二氫-6-甲基-4-(間-硝基苯基)-3,5-吡啶-二甲酸；MW 385.4)解決動物及人中作為某些大腦類澱粉蛋白源性疾病(例如阿茲海默氏病(AD))之特徵之大腦退化不斷加劇的預防方法及治療方法。本發明所述之方法涵蓋症狀之治療、預防、及改善。

除非另有說明，否則，本文所用術語尼代地平指外消旋混合物。本文所用術語"富集對映異構性"所指化合物係對映異構物之混合物，其中(-)-對映異構物係超量存在，且較佳存量程度為90%或更高、95%或更高、且更佳為98%或更高(包含100%)、至高達可檢測純度極限值。舉例而言，純度可藉由對掌性HPLC法檢測法確定。在一實施例中，對映異構性超量之計算法係由自主要組份減去微量組份。舉例而言，包括98%(-)-對映異構物及2%(+)-對映異構物之對映異構物混合物將計算為對映異構性超量為96%之(-)-對映異構物。

具體而言，本發明之一實施例提供一種藉由向患有大腦類澱粉蛋白源性疾病或病況之動物或人投與治療有效量之富集對映異構性的(-)-尼代地平，以減低該動物或人之A β 沈積、A β 神經毒性及微神經膠細胞增生的方法。由於大多

數大腦類澱粉蛋白源性疾病(例如AD)係慢性、進行性、難治的腦癡呆，故預期富集對映異構性的(-)-尼代地平治療持續時間將會延續長達該動物或人之一生。大腦類澱粉蛋白源性疾病或病況包含但不限於阿茲海默氏病、外傷性腦損傷、及大腦類澱粉血管病。

在另一實施例中，本發明提供一種治療傳染性海綿狀腦病、癩癢病、或傑茨曼-斯脫司勒-史茵克(Gerstmann-Straussler-Scheinker)症候群之方法。

本發明之另一實施例提供在動物或人受到外傷性大腦損傷(TBI)後藉由向該動物或人投與治療有效量之富集對映異構性的(-)-尼代地平且之後繼續以富集對映異構性的(-)-尼代地平實施規定時期之治療以減低該遭受TBI之動物或人發生A β 沈積、A β 神經毒性及微神經膠細胞增生風險之方法。預期彼等遭受TBI之動物或人之富集對映異構性的(-)-尼代地平治療之持續時間可延續介於約1小時至5年之間，較佳介於約2週至3年之間，且最佳介於約6個月至12個月之間。

在另一實施例中，提供治療大腦類澱粉蛋白源性疾病之臨床總體表現之方法，該總體表現包括與該疾病相關之一個或多個或所有認知及行為特徵。舉例而言，就AD而言，此等特徵可包含多個症狀之非限制性列表，該等症狀可包括諸如深度記憶喪失、執行熟悉任務困難、語言問題、不辨方向、判斷力下降、抽象思維損傷、性格、情緒或行為改變，及/或一組認知測試中之特徵性評分。該等

認知測試包括韋克斯勒(Wechsler)記憶量表(修訂版)(WMS-R)、臨床癡呆分級量表(CDR)、簡易精神狀態檢查(MMSE)、及/或阿茲海默氏病評價量表－認知部分(ADAS)。

在一個或多個實施例中，採用富集對映異構性的(-)-尼代地平之治療可產生特定臨床結果。治療之一端點係對彼等受大腦類澱粉蛋白源性疾病影響之一個或多個疾病症狀之可量測改良。該改良可達成患者症狀消除，或可反映與一個或多個治療前症狀相比在能力上之改良。另一選擇為，治療之一端點可能維持基線症狀程度。換言之，該端點表示該疾病或該疾病之一個或多個症狀之永久性或一段時期之穩定化。另外，治療之一端點可係疾病加劇速率比未治療對照降低。此外，治療可包含對據認為存在發生大腦類澱粉蛋白源性疾病風險但尚未出現一個或多個症狀臨床表現之個體的預治療。當提及疾病治療時亦涵蓋對一個或多個症狀之姑息性而非治癒性治療。

根據本發明之方法，視需要以單位劑型投與患有大腦類澱粉蛋白源性疾病或遭受外傷性腦損傷之動物或人、或出於確定動物或人發生大腦類澱粉蛋白源性疾病風險、及/或診斷其是否患有該疾病之目的所投與的富集對映異構性的(-)-尼代地平之治療有效量可介於自約0.05 mg至20 mg/天之間，較佳介於自約2 mg至15 mg/天之間，更佳介於自約4 mg至12 mg/天之間，且最佳為約8 mg/天。日劑量可每日以單一單位劑量或分成2、3或4個單位劑量投與。在另

一實施例中，富集對映異構性的(-)-尼代地平之治療有效量大於16 mg/天至高達最大耐受劑量極限值。舉例而言，富集對映異構性的(-)-尼代地平之治療有效量範圍可介於自16 mg/天至約20 mg/天。另一選擇為，富集對映異構性的(-)-尼代地平之治療有效量可係約20 mg/天、約30 mg/天、約40 mg/天、約50 mg/天、約75 mg/天、約100 mg/天、約125 mg/天、約150 mg/天、約175 mg/天、約200 mg/天、約225 mg/天、約250 mg/天、約275 mg/天、約300 mg/天、約325 mg/天、約350 mg/天、約375 mg/天、約400 mg/天、約425 mg/天、約450 mg/天、約475 mg/天、約500 mg/天、或高達最大耐受劑量/天、及上述量間之任一量(整數或其他數值)。上述範圍可變化。舉例而言，非限制性範圍包含20、40、60、80、或100 mg/天之較低端點，及50、100、150、200、250、300、及500 mg/天之較高端點，且上述量內之任一量(整數或其他數值)皆可作為端點。

雖然不欲受理論限制，但據信抗高血壓作用可限制外消旋尼代地平之最大耐受量。在本發明之一實施例中，在投與治療有效量之富集對映異構性的(-)-尼代地平後該富集對映異構性的(-)-尼代地平可將血壓降低選自由下述組成之群的量：低於治療前血壓之約30%、低於治療前血壓之約20%、低於治療前血壓之約10%、低於治療前血壓之約5%、及低於治療前血壓之約1%。可以多種方式量測血壓。舉例而言，可將血壓量測為收縮壓或舒張壓毫米汞柱

數。另一選擇為，可根據公式 $2/3$ 舒張壓 + $1/3$ 收縮壓讀數計算血壓。在一實施例中，不斷監控血壓且隨時間進行積分得出曲線下面積(AUC)之單一值。血壓變化可與正常人群比較，或可與所治療患者之治療前血壓比較。在一實施例中，於一段治療期後量測治療後血壓，以便確立血壓穩態變化。舉例而言，治療後血壓係量測於約1週治療後、約4週治療後、約12週治療後、約6個月治療後、及諸如此類。在一實施例中，將富集對映異構性的(-)-尼代地平投與具有正常血壓或低血壓之人或動物。在一實施例中，將富集對映異構性的(-)-尼代地平投與患高血壓之人或動物。在人類中，認為正常血壓介於約90/50 mm Hg至約135/90 mm Hg之間。人類中低於正常範圍之血壓視為低血壓。

在另一實施例中，本發明之治療係投與高血壓患者或不論其血壓高低程度之患者。高血壓患者可接受抗高血壓藥同步治療。人類中超出正常範圍之血壓視為高血壓。

各種動物之正常範圍可參見標準獸醫手冊。在一實施例中，血壓係由於自然的原因或醫療介入(例如投與額外抗高血壓藥劑)而處於正常範圍。

本發明之又一實施例係藉由在可能患有大腦類澱粉蛋白源性疾病(例如AD)之動物或人的中樞神經系統中進行可移植人類或異源神經幹細胞移植前向該等神經幹細胞投與治療有效量之富集對映異構性的(-)-尼代地平來預處理該等幹細胞之方法。據推測，神經幹細胞本身不具有顯著A β 沈

積。然而，若意欲將神經細胞移植物用於載有 $A\beta$ 之環境，則對神經幹細胞之預處理應藉由減低其新環境中之 $A\beta$ 濃度且由此減低 $A\beta$ 毒性以增強所移植神經細胞在其新環境中之存活能力。所投與用於預處理神經幹細胞之富集對映異構性的(-)-尼代地平之治療有效量範圍可介於自約1 nM至3 μ M、較佳介於自約10 nM至2 μ M、且最佳介於自約100 nM至1 μ M。已知，當定向於分化為特定細胞類型(例如神經細胞)時，幹細胞可提供替代細胞及組織之可更新來源之可能性以治療諸如阿茲海默氏病、帕金森(Parkinson)病或脊髓損傷等疾病及病況。當將此等細胞移植/植入患者中時，建議不僅以富集對映異構性的(-)-尼代地平預處理該等細胞，且亦於植入後開始以富集對映異構性的(-)-尼代地平對該患者採取治療性治療。

本發明涵蓋，可在測試治療、預防及/或抑制人之中樞神經系統中與類澱粉沈積、 $A\beta$ 神經毒性及微神經膠細胞增生相關之病況之功效前，在已知AD轉基因小鼠模型(例如PDAPP及TgAPP_{sw}小鼠模型)中對本發明方法進行測試。此等AD轉基因動物模型係使用業內已知之標準方法及(例如)美國專利第5,487,992號、第5,464,764號、第5,387,742號、第5,360,735號、第5,347,075號、第5,298,422號、第5,288,846號、第5,221,778號、第5,175,385號、第5,175,384號、第5,175,383號、及第4,736,866號所述之方法構建。

富集對映異構性的(-)-尼代地平可藉由各種途徑(包含非

經腸、經口或經腹膜內途徑)投與患者。非經腸投藥包含以下途徑：靜脈內；肌內；間質；動脈內；皮下；眼內；顱內；鞘內；心室內；滑膜內；`穿過上皮(包含穿皮、藉由吸入經肺部、眼部、舌下及頰內)；局部(包含眼部、皮膚、眼、直腸、或藉由吹入法或噴霧法之鼻吸入)。

經口投與之富集對映異構性的(-)-尼代地平可包裹於硬或軟殼明膠膠囊中，或可壓縮成錠劑。亦可將富集對映異構性的(-)-尼代地平與賦形劑混合且以可吞服錠劑、口含錠、糖錠、膠囊、藥囊、菱形錠劑、酏劑、懸浮液、糖漿劑、糯米紙囊劑、及諸如此類等形式使用。此外，富集對映異構性的(-)-尼代地平可呈粉劑或顆粒劑、存於水性液體或非水性液體中或存於水包油型或油包水型乳液中之溶液或懸浮液等形式。

錠劑、糖錠、丸劑、膠囊等等亦可包含例如諸如黃耆膠、阿拉伯膠、玉米澱粉等黏結劑；諸如磷酸二鈣等膠凝賦形劑；諸如玉米澱粉、馬鈴薯澱粉、海藻酸及諸如此類等崩解劑；諸如硬脂酸鎂等潤滑劑；諸如蔗糖、乳糖或糖精等甜味劑；或矯味劑。活性成份可以單位劑型或非單位劑型調配或投與。當劑量單元係膠囊形式時，其除含有上述材料外亦可含有液體載劑。可存在多種其它材料作為包衣或以其他方式改進劑量單元之物理形式。舉例而言，錠劑、丸劑、或膠囊可以蟲膠、糖或二者塗佈。糖漿劑或酏劑可含有尼代地平、蔗糖(作為甜味劑)、對羥基苯甲酸甲酯及丙酯(作為防腐劑)、染料及矯味劑。另外，可將富集

100年9月20日 修正頁 補充

第 097138351 號專利申請案
中文說明書替換頁(100 年 9 月)

對映異構性的(-)-尼代地平納入緩釋製劑及調配物中。

富集對映異構性的(-)-尼代地平可以非經腸或經腹膜內方式投與 CNS。可在混有適宜表面活性劑(例如羥丙纖維素)之水中製備呈游離鹼或醫藥上可接受的鹽形式之尼代地平之溶液。亦可在甘油、液態聚乙二醇、及其混合物、及油中製備分散液。在一般儲存及使用條件下，該等製劑可含有防腐劑及/或抗氧化劑以防止微生物生長或化學變性。

期望的(-)-尼代地平對映異構物在其對掌中心處具有(S)構型。本文所提供的化合物可係對映異構純的化合物，或係與若干量之(+)(R)-尼代地平混合之立體異構混合物。應瞭解，本文關於富集對映異構性的(-)-尼代地平之揭示內容涵蓋任一光學活性、多態、或立體異構形式、或其混合物，其較佳具有本文所述之有用特性，此項技術中已熟知如何製備各種光學活性形式以及如何使用本文所述之標準測試或使用此項技術中熟知之其他類似測試來測定活性。本文所用術語"富集對映異構性的"指作為對映異構物之混合物之化合物，其中(-)-對映異構物係超量存在，且較佳存在程度為90%或更高、95%或更高、且更佳為98%或更高(包含100%)、至高達可檢測純度極限值。舉例而言，純度可藉由對掌性HPLC法檢測加以測定。

可用於獲得該等化合物之光學異構物之方法實例包含如下：

i)結晶的物理分離--其係用於人工分離個別對映異構物之

宏觀結晶的一種技術。若存在單獨對映異構物之結晶，則可應用此技術進行分離，例如，材料係聚集物，且結晶係視覺上明顯不同的；

ii) 同步結晶作用--其係僅當外消旋物係呈固態存在之聚集物時可用於將個別對映異構物自外消旋物溶液中分離結晶的技術；

iii) 酶拆分--其係用於藉由對映異構物與酶的差異反應速率來部分或完全分離外消旋物的一種技術；

iv) 酶不對稱合成--在該合成技術中，至少一個合成步驟使用酶促反應以獲得對映異構純的或富集的期望對映異構物之合成前驅物；

v) 化學不對稱合成--在該合成技術中，係在可於產物中產生不對稱性(即，對掌性)之條件下自非對掌前驅物合成期望的對映異構物，其可使用對掌催化劑或對掌助劑達成；

vi) 非對映異構物分離--該技術用以使外消旋化合物、前驅物、或半合成中間物與對映異構純的試劑(對掌助劑)反應從而將個別對映異構物轉化為非對映異構物。然後，可借助其當前較顯著之結構差異，藉由層析法或結晶作用分離所得對映異構物，且隨後除去對掌助劑以獲得期望的對映異構物(參見，例如，讓予Fujisawa Pharmaceutical有限公司之美國專利第5,508,413號)；

vii) 一級及二級不對稱轉換--藉由該種技術來自外消旋物之非對映異構物保持平衡以自期望的對映異構物產生佔優勢的非對映異構物溶液或其中來自期望的對映異構物之非對

映異構物之優先結晶將擾亂該平衡以致最終大體上所有材料皆自期望的對映異構物轉化為晶體狀非對映異構物。然後，期望的對映異構物自非對映異構物中釋放；

viii)動力學拆分--此技術指在動力學條件下藉由對映異構物與對掌的、非外消旋試劑或催化劑之不等反應速率達成外消旋物之部分或完全拆分(或部分拆分的化合物之進一步拆分)；

ix)自非外消旋前驅物專一性合成對映異構物--藉由該種合成技術可自非對掌原料獲得期望的對映異構物且在合成過程中立體化學完整性未受影響或僅受極低程度之影響；

x)對掌液相層析法--該種技術用於藉由對映異構物與固定相的差異相互作用而在液態流動相中分離外消旋物之對映異構物。固定相可由對掌材料製得或流動相可含有額外對掌材料以促進差異相互作用；

xi)對掌氣相層析法--該技術用於使外消旋物揮發且對映異構物可借助其在氣態流動相中與管柱之差異相互作用而分離，該管柱中含有固定的非外消旋對掌吸附相；

xii)以對掌溶劑提取--藉由該種技術可使一種對映異構物優先溶解入特定對掌溶劑中來分離各對映異構物；及

xiii)跨對掌膜轉運--藉由該種技術可將外消旋物置於與薄膜屏障接觸之處。該屏障通常分隔兩種互溶流體，其中一種含有外消旋物，且驅動力(例如濃度或壓力差)引起跨膜屏障的優先轉運。由於該膜具有非外消旋對掌性質，因而其僅容許外消旋物之一種對映異構物通過，由此而達成分

100年9月30日 修正頁
補充

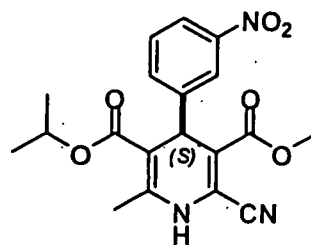
離。

xiv)液相層析法--藉由該種技術，可在正常相溶劑系統中藉由對映異構物與對掌固定相之分配係數差異來分離對映異構物。該技術係用於生成本文所述之(-)-尼代地平及(+)-尼代地平之光學活性製劑(參見圖8)。

尼代地平之對映異構物分離如下：

尼代地平 1

(-)-尼代地平

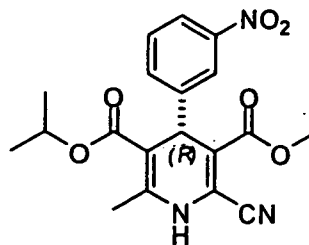


文獻值： $[\alpha]_D^{20} -219.6^\circ$ ($c = 1.0$, MeOH)

實驗值： $[\alpha]_D^{25} -99.0^\circ$ ($c = 0.057$, MeOH)

尼代地平 2

(+)-尼代地平



文獻值： $[\alpha]_D^{20} +222.4^\circ$ ($c = 1.0$, MeOH)

實驗值： $[\alpha]_D^{25} +170.1^\circ$ ($c = 0.05$, MeOH)

尼代地平之對映異構物的旋光性文獻值報導於 Satoh, Y.; Okumura, K.; Shiokawa, Y. *Chem. Pharm. Bull.* 42(4) 950-952 (1994) 中。關於所分離化合物之對映異構物純度數據

參見圖 5。

詞語"約"意指在所述量的 $\pm 10\%$ 內，或在量測技術之實驗誤差內。片語"基本上由...組成之組合物"意欲涵蓋其中活性醫藥成份如所指明之組合物。在一實施例中，片語"基本上由...組成"排除未列出的活性醫藥成份，但不排除醫藥上可接受之媒劑、載劑、或稀釋劑、或調配活性醫藥成份之方式。在一實施例中，例如在治療方法中，片語"基本上由...組成"可涵蓋投與一種或多種活性醫藥成份作為用於特定適應症之專用治療劑，但不排除因其他原因或適應症而投與之治療劑。

實例

在下列非限制性實例中將詳細闡釋用於在患有與類澱粉變性病相關之疾病(例如 AD)之動物或人中減低 A β 病理學作用的本發明方法。實例 1 至 5 提供外消旋尼代地平之數據以供進行比較。

尼代地平對映異構物之層析純化

尼代地平的兩種對映異構物之層析純化係藉由使用變性纖維素固定相之高效液相層析法(HPLC) (Chiral Technologies, West Chester, PA)達成。層析條件如下：管柱內徑，10 mm；管柱長度，250 mm；流動相，體積比為 95:5 之己烷/乙醇；流速，2.5 ml/min；管柱溫度，7°C。反覆注射外消旋尼代地平，使用基於信號之餾份收集獲得用於本文所述實例之純化對映異構物。參見圖 8。

實例 1

針對A β 沈積(類澱粉負荷量)長期投與尼代地平

使用4G8抗-A β 單株抗體免疫染色技術檢測尼代地平之長期投與對TgAPP_{sw}小鼠腦部之不同區域中A β 沈積(類澱粉負荷量)的作用。之所以選擇4G8免疫染色技術來測定A β 負荷量係因為其對A β 沈積定量分析產生強健信號及最佳結果。簡言之，使石蠟切片接受過去文獻曾說明之免疫組織化學分析(Nakagawa, Y等人, Exp. Neurol., 163:244-252, 2000)。在對A β 進行免疫組織化學分析之前，使切片在二甲苯中脫去石蠟，在一系列乙醇及去離子水中水合化，且藉由將切片浸入88%甲酸達60 min進行抗原回收步驟。用水洗滌切片，並使用新鮮配製之由甲醇(150 ml)與過氧化氫(33%，30 ml)形成之混合物終止內源性過氧化物酶作用。根據供應商說明書(Vector Laboratories, Burlingame, Calif.)，使用抗生物素蛋白-生物素複合體方法。類澱粉負荷量係藉由確定腦部區域之A β 染色呈陽性的百分比評估。陰性對照包含對切片應用同樣的免疫組織化學分析方案，但改施加免疫前血清代替初級抗體。將TgAPP_{sw}小鼠分成接受有效量的尼代地平之實驗組(n=7)及接受媒劑之對照組(n=5)。

如圖1所示，用尼代地平治療可使視皮質中之A β 負荷量比對照組減低約62%，使頂葉皮質中之A β 負荷量比對照組減低約65%，使運動皮質中之A β 負荷量比對照組減低約58%，使梨狀皮質中之A β 負荷量比對照組減低約58%，使海馬回CA1區域中之A β 負荷量比對照組減低約52%，且使

海馬回 CA2 至 CA3 區域中之 A β 負荷量比對照組減低約 50%。

實例 2

針對微神經膠細胞活化長期投與尼代地平

使用 CD45 免疫染色技術檢測在 TgAPP_{sw} 小鼠腦部之 3 個區域中長期投與尼代地平對微神經膠細胞活化的作用，其中確定 CD45+ 微神經膠細胞之數量。

簡言之，對恒溫冷凍腦切片實施 CD45 (微神經膠細胞之特異性標記物) 免疫組織化學分析。CD45-陽性微神經膠細胞係藉由在 4℃ 下與小鼠單株抗 CD45 抗體 (Chemicon International) 培養過夜並隨後施加生物素化的兔抗小鼠二級抗體達 30 分鐘進行免疫定位。CD45 之檢測係用可在 CD45-陽性微神經膠細胞上產生褐色細胞表面之二胺基聯苯胺色原體受質完成。

如圖 2 所示，與對照相比，以有效劑量投與之尼代地平治療可使海馬回中之微神經膠細胞活化作用減低約 33%、使頂葉皮層中之該活化作用減低約 43%、使運動皮層中之該活化作用減低約 27%。

實例 3

尼代地平投與對微神經膠細胞活化的作用

在以脂多糖 (LPS) 活體外活化 24 小時之 N9 鼠類微神經膠細胞中檢測尼代地平對微神經膠細胞活化的作用。N9 鼠類微神經膠細胞係得自胚胎小鼠大腦的經良好定性的清道夫鼠類微神經膠細胞純系。微神經膠細胞活化程度係藉由

ELISA所量測之TNF- α 產量(pg/ml)確定。如圖3所示，未用LPS活化之微神經膠細胞(對照細胞)產生約40 pg/ml TNF- α 。存在50 nM尼代地平時，微神經膠細胞產生約40 pg/ml TNF- α 。將尼代地平投與量提高10倍(500 nM)未改變TNF- α 產量。存在1 μ g/ml LPS時，微神經膠細胞產生約820 pg/ml TNF- α ，與對照細胞及投與尼代地平的細胞相比，TNF- α 產量提高約95%。存在1 μ g/ml LPS及50 nM尼代地平兩者時，微神經膠細胞產生約670 pg/ml TNF- α 。LPS加500 nM尼代地平之投與將TNF- α 產量降低至約610 pg/ml。因此，尼代地平可抵消約20-25%之LPS誘導的微神經膠細胞活化作用。

實例4

尼代地平投與對A β 神經毒性的作用

使用經30 μ M預聚集A β 1-40 (AgA β)處理3天之人類神經祖細胞(HNPC)檢測尼代地平投與(10 nM及100 nM)對A β 神經毒性的作用。經環AMP處理後，HNPC細胞迅速地分化為神經細胞。將環AMP(1 mM) (Sigma)加入培養基中，且在無血清條件下於37°C培養HNPC細胞達48小時或更長時間。該培養基容許祖細胞分化為神經譜系細胞，其已藉由以抗微管相關蛋白MAP-2之抗體對大多數該等細胞之染色予以證實。神經毒性係藉由量測釋放自該等細胞之乳酸脫氫酶(LDH，發現於所有細胞中之胞內酶)之數量加以評估。

如圖4所示，經AgA β 處理的細胞之LDH釋放比經尼代地

平處理的細胞提高約44%。當10 nM尼代地平與AgA β 一起添加時，LDH釋放未改變。然而，當尼代地平劑量提高10倍至100 nM時，LDH釋放量降低約44%。

實例 5

尼代地平投與對APP處理的作用

使用經APP_{sw}轉染之人類膠質母細胞瘤細胞檢測尼代地平對APP處理的作用。使用50 nM及250 nM尼代地平處理該等細胞達24小時及48小時，並藉由使用市售人A β 1-40 ELISA (Biosource, CA)量測培養基中之A β 1-40產量。

如圖5A所示，經24小時處理後，50 nM尼代地平使A β 1-40產量降低約9%，且250 nM尼代地平使A β 1-40產量降低約15%。經48小時處理後(圖5B)，50 nM尼代地平使A β 1-40產量降低約18%，且250 nM尼代地平使A β 1-40產量降低約5%。

實例 6

尼代地平之外消旋的及分離的對映異構物之不同劑量對A β 量的作用

使用經24小時處理之7W WT APP751中國倉鼠卵巢細胞檢測純對映異構形式的尼代地平即(-)-尼代地平(尼代地平1)及(+)-尼代地平(尼代地平2)(圖8)以及該2種對映異構物之混合物(以相同比例混合)對A β 1-40及A β 1-42產量的作用。培養基中A β 1-40及A β 1-42之產量係藉由分別使用市售人A β 1-40 ELISA (Biosource, CA)及市售人A β 1-42 ELISA (Biosource, CA)量測。

如圖 6 所示，兩種對映異構物似乎可以類似方式劑量依賴性地抑制 $A\beta 1-40$ 產生。然而，在低劑量時，(+)-尼代地平(尼代地平 2)及尼代地平外消旋混合物(N1+N2)可輕微刺激 $A\beta 1-42$ ，而(-)-尼代地平(尼代地平 1)則未顯示此作用(圖 7)。

實例 7

尼代地平之分離的對映異構物對大鼠主動脈中血管收縮的作用

檢測純對映異構形式的尼代地平即(-)-尼代地平(尼代地平 1)及(+)-尼代地平(尼代地平 2)(圖 8)對大鼠主動脈中 FPL64176 誘導之血管收縮的作用。對正常雄性斯普拉-道來氏(Sprague-Dawley)大鼠(7至8個月齡)實施人道的無痛致死術，且將新解剖的大鼠主動脈分為 3 mm 環段且在脈管浴裝置中將其掛之鉤子上懸浮於Kreb氏緩衝液中。將該等鉤子連接至與MacLab系統相連之等容感測器。在組織浴系統中用Kreb氏緩衝液對主動脈環實施 2 h 平衡，每 30 min 更換一次該緩衝液。在每一主動脈環上施加 2 g 基線張力。在添加 1 μ M FPL64176(2,5-二甲基-4[2-(苯基甲基)苯甲醯基]-1H-吡咯-3-甲酸甲酯)(L型鈣通道之強效選擇性激動劑)之前，用 100 nM(-)-尼代地平(尼代地平 1)、100 nM(+)-尼代地平(尼代地平 2)預處理主動脈環 2 min 或不加處理。以 FPL64176 壓縮主動脈環 30 分鐘。測定較之於基線的收縮量(以 g 表示)且計算所有此等值之平均值及標準偏差。

如圖9所示，(+)-尼代地平可完全拮抗FPL64176誘導的血管收縮而(-)-尼代地平未能產生L型鈣通道激動劑之血管活性作用，此表明(+)-尼代地平係L型鈣通道阻滯劑而(-)-尼代地平則無此作用。本文所述之數據表明，對於(-)-對映異構物，當用FPL64176攻擊時出現基線主動脈收縮，此與(-)-對映異構物具有較低血管活性相關，相比之下，外消旋混合物或(+)-對映異構物則表現出血管活性(即，對所誘導血管收縮之拮抗作用)。

實例8

(-)-尼代地平對大腦A β 含量的作用

檢測(-)-尼代地平對大腦A β 1-40及A β 1-42含量的作用。每天以10 mg溶於DMSO中之(-)-尼代地平/Kg體重(n=4)或以相同體積(n=4)之媒劑(100 μ L)對93週齡雄性轉基因APP_{sw}小鼠(Tg APP_{sw}品系2576)進行腹膜內注射。經4天處理後，於最後一次注射後1小時對動物實施人道的無痛致死術，收集其大腦且將其於液氮中速凍。於4°C下在含有1X蛋白酶抑制劑混合劑IV(Calbiochem, CA)之蒸餾水中將大腦均質化且於4°C及14,000 rpm下離心30 min。將沉澱物重新懸浮在溶於Tris HCl緩衝液(pH=8)之同體積胍5M中且於室溫下培養1小時。在經胍處理的試樣中，用BCA法(Biorad, CA)測定蛋白質濃度。A β 1-40及A β 1-42含量係藉由ELISA (Biosource, CA)評價且結果以pg(A β 1-40或A β 1-42)/mg蛋白質報告。

如圖10所示，與對照動物相比，以10 mg/kg體重/天之劑

量將(-)-尼代地平投與至TgAPP_{sw}小鼠達4天可引起大腦A β 1-42含量(pg/ml)下降26%，及大腦A β 1-40含量下降43%。

實例9

(-)-尼代地平之緩慢釋放對大腦A β 含量的作用

檢測(-)-尼代地平緩慢釋放對大腦A β 1-42含量的作用。經皮下向66週齡Tg APP_{sw} (Tg APP_{sw}品系2576)植入可確保持續緩慢釋放30 mg (-)-尼代地平/Kg體重/天(n=5)之生物可降解(-)-尼代地平顆粒、可確保釋放56 mg/Kg/天(n=6)之生物可降解(-)-尼代地平顆粒、或可釋放為期30天安慰劑(n=6)之顆粒。在顆粒植入後26天，對動物實施人道的無痛致死術，收集其大腦且將其於液氮中速凍。於4℃下在含有1X蛋白酶抑制劑混合劑IV(Calbiochem, CA)之蒸餾水中將大腦均質化且於4℃及14,000 rpm下離心30 min。將上清液重新懸浮在溶於Tris HCl緩衝液(pH=8)之同體積胍5M中且於室溫下培養1小時。在經胍處理的試樣中，用BCA法(Biorad, CA)測定蛋白質濃度。A β 1-42含量係藉由ELISA (Biosource, CA)評價且結果以pg (A β 1-42)/mg蛋白質報告。

如圖11所示，與植入安慰劑顆粒的小鼠相比，以30 mg/Kg/天之劑量將緩慢釋放之(-)-尼代地平投與至TgAPP_{sw}小鼠可引起大腦A β 1-42含量降低到原來的二分之一，而於以56 mg/Kg/天劑量之緩慢釋放顆粒處理之動物中則觀察到大腦A β 1-42含量降低為原來的2.5分之一。

實例 10

(-)-尼代地平對清除穿過血腦屏障之大腦A β 含量的作用

活體外模型

使用活體外及活體內兩種模型檢測(-)-尼代地平對清除穿過血腦屏障(BBB)之大腦A β 含量的作用。活體外模型係如圖12所示。將含有2 μ M螢光素- β -類澱粉(1-42) (3)之內皮細胞培養基(ECM, ScienCell Research Laboratories)置於基底側部(供給體)隔間內。使膜之頂部(接受體)側暴露於ECM (2)內之各二氫吡啶(DHP)化合物(1、5、及10 μ M)。在時刻0時對供給體隔間取樣以確立每一組中螢光素- β -類澱粉(1-42)之初始濃度。在使嵌入物暴露於含螢光素類澱粉之孔後，於各時間點直至90分鐘(1)自頂部隔間收集試樣以評估螢光素- β -類澱粉(1-42)跨越人大腦微血管內皮細胞(HBMEC)單層(4)之移動(基底側部至頂部)。使用BioTek Synergy HT多功能檢測微量板讀數計(Winooski, VT)分析(λ_{ex} =485 nm及 λ_{em} =516 nm)試樣之螢光素- β -類澱粉(1-42)。使用公式 $P_{app}=1/AC_0*(dQ/dt)$ (其中A代表膜表面積， C_0 係螢光素- β -類澱粉(1-42)在基底側部供給體隔間之初始濃度，且 dQ/dt 係在給定時期($polli$)內出現於頂部接受體隔間內之螢光素- β -類澱粉(1-42)量)確定螢光素- β -類澱粉(1-42)之表觀滲透率(P_{app})。比較存在(-)-尼代地平時螢光素- β -類澱粉(1-42)之 P_{app} 與對照孔之螢光素- β -類澱粉(1-42)之 P_{app} 且以百分比表示。

如圖13所示，在血腦屏障之活體外模型中，(-)-尼代地

平可劑量依賴性地刺激A β 自大腦側(B)至外周側(A)之轉運。

活體外模型亦用於檢測(-)-尼代地平及尼代地平外消旋混合物對清除穿過血腦屏障(BBB)之大腦A β 的活體外作用。使用與上述之一種方案類似的方案進行此等實驗，其主要區別係添加外消旋混合物以供進行比較。如圖14所示，在活體外模型中，(-)-尼代地平及尼代地平外消旋混合物兩者皆劑量依賴性地刺激A β 自大腦(B)至外周(A)跨越血腦屏障之轉運。

活體內模型

使用活體內模型檢測(-)-尼代地平對清除穿過血腦屏障(BBB)之大腦A β 含量的作用。使用3%異氟烷/氧氣混合物經吸入麻醉野生型雌性B6/SJL小鼠。當麻醉時，經腹膜內對小鼠注射媒劑(DMSO)或(-)-尼代地平。腹膜內注射後5分鐘，在小鼠大腦腦室內區域(前囟後面3 mm及側面1.0 mm及大腦表面下4 mm)立體定位注射3 μ l人 β -類澱粉(1-42)(1 mM，存於DMSO中)。注射人 β -類澱粉(1-42)後10分鐘，對小鼠實施無痛致死術。收集血漿試樣，且使用用於人 β -類澱粉(1-42)的三明治ELISA分析人 β -類澱粉(1-42)。將自經(-)尼代地平處理小鼠收集的血漿試樣中之 β -類澱粉(1-42)含量與彼等僅接受媒劑處理者之 β -類澱粉(1-42)含量進行比較。另外，可使用經皮下植入生物可降解(-)-尼代地平顆粒或安慰劑且於顆粒植入後13天接受A β 1-42腦內注射之動物實施類似實驗。所有使用動物的實

驗皆係在實驗動物管理及使用委員會(Institutional Animal Care and Use Committee)核准之方案下實施。

如圖 15 所示，尼代地平外消旋混合物及(-)-尼代地平二者皆可增進A β 活體內跨血腦屏障之轉運。在2 mg/Kg體重劑量下，(-)-尼代地平可使A β 自大腦至血液之清除量增加2倍且在5 mg/Kg體重劑量下可使A β 清除量增加4倍而尼代地平外消旋混合物在2 mg/Kg體重劑量下可使A β 清除量增加4倍。

圖 16 係使用經皮下植入生物可降解(-)-尼代地平顆粒或安慰劑且於顆粒植入後13天接受A β 1-42腦內注射之動物繪示(-)-尼代地平對清除穿過血腦屏障(BBB)之大腦A β 含量之作用的條形圖。如圖 16 所示，與植入安慰劑顆粒之對照小鼠相比，由生物可降解顆粒確保以30 mg/Kg體重/天劑量緩慢釋放之(-)-尼代地平可使大腦內A β 清除量增加3倍。

(-)-尼代地平對清除穿過血腦屏障(BBB)之大腦A β 含量之作用的此等活體外及活體內研究揭示潛在的治療相關結果。數據表明，(-)-尼代地平的清除作用係在於增進大腦A β 跨越血腦屏障(BBB)遷移。此源自投與(-)-尼代地平後觀察到的血清A β 含量之增加。

如圖 17A 及 B 所示，在血管收縮之FPL64176大鼠主動脈模型中，在表現血管活性特性前，(-)-尼代地平可以遠遠高於(+)-尼代地平之劑量投與。

一般結論

在尼代地平之不同對映構物的作用方面，兩種對映異構

物似乎皆可以類似方式劑量依賴性地抑制A β 1-40產生，但在低劑量時，(+)-尼代地平及外消旋尼代地平可輕微刺激A β 1-42。(-)-尼代地平對於A β 1-42之作用較低且無統計學顯著性。參見例如圖6及7。亦已驚奇地發現，(+)-尼代地平可完全拮抗FPL64176誘導的血管收縮而(-)-尼代地平不能拮抗FPL64176誘導的L型鈣通道激動劑之血管收縮。本文所述之數據表明，對於(-)-對映異構物，當用FPL64176攻擊時出現基線主動脈收縮，此與(-)-對映異構物具有較低血管活性相關，相比之下，外消旋混合物或(+)-對映異構物則表現出血管活性(即，對所誘導血管收縮之拮抗作用)。(-)-尼代地平對大腦A β 含量的影響評估表明，將(-)-尼代地平(10 mg/kg體重/天)投與至TgAPP_{sw}小鼠僅4天治療後會引起大腦A β 1-42含量(pg/ml)下降26%，且大腦A β 1-40含量下降43%。如圖11所示，與植入安慰劑顆粒的小鼠相比，以30 mg/Kg/天之劑量將緩慢釋放之(-)-尼代地平投與至TgAPP_{sw}小鼠26天後可引起大腦A β 1-42含量降低到原來的二分之一，而於以56 mg/Kg/天劑量之緩慢釋放顆粒處理之動物中則觀察到大腦A β 1-42含量降低為原來的2.5分之一。

(-)-尼代地平對清除穿過血腦屏障(BBB)之大腦A β 含量之作用的此等活體外及活體內研究亦產生意外的鼓舞人心之結果。數據表明，(-)-尼代地平之該清除作用係在於增進大腦A β 跨越血腦屏障(BBB)之遷移。此源自投與(-)-尼代地平後觀察到的血清A β 含量之增加。

鑒於上述數據，可推斷將富集對映異構性的(-)-尼代地平投與至患有大腦類澱粉蛋白源性疾病(例如AD)之動物或人可顯著減低A β 在特徵性表明大量存在此等病理沈積物之大腦關鍵區域的沈積量，亦可減低已沈積於大腦中之A β 量且不會不必要地影響血壓或其他可能之副作用。另外，投與富集對映異構性的(-)-尼代地平可抵抗A β 之神經毒性作用、抵抗據信可造成在AD中出現之廣泛的毀壞性神經細胞破壞之作用、以及減低在AD患者大腦中出現的可引起特徵性炎症反應之微神經膠細胞活化作用同時僅會造成較低的副作用。最後，富集對映異構性的(-)-尼代地平治療可減低業已沈積於患有大腦類澱粉蛋白源性疾病(例如AD)之動物或人之大腦中的A β 濃度，且不會引起不欲之副作用。

熟悉此項技術者將瞭解，可對本發明進行各種修改及改變，此並不脫離本發明之精神或範圍。因此，本發明意欲包含在隨附申請專利範圍及其等效內容範圍內之修改及改變。本文引用之所有文獻皆以引用方式併入本文中。

【圖式簡單說明】

圖1係繪示使用4G8免疫染色技術長期投與尼代地平對TgAPP_{sw}小鼠大腦不同區域中A β 沈積(A β 負荷量)之作用的條形圖。

圖2係繪示使用可確定CD45+微神經膠細胞數量之CD45免疫染色技術長期投與尼代地平對TgAPP_{sw}小鼠大腦三個區域中微神經膠細胞活化之作用的條形圖。

圖3係繪示在經脂多糖(LPS)活體外活化24小時之N9鼠類微神經膠細胞中尼代地平對微神經膠細胞活化作用的條形圖。微神經膠細胞活化係藉由ELISA量測之TNF- α 產生(pg/ml)確定。

圖4係使用經30 μ M預聚集A β 1-40 (AgA β)處理3天之HPNC細胞繪示投與尼代地平對A β 神經毒性之作用的條形圖。神經毒性係藉由量測自細胞釋放之乳酸脫氫酶(LDH)之量加以評估。

圖5A及5B係使用經APP_{sw}轉染之人類膠質母細胞瘤細胞繪示尼代地平對APP處理之作用的條形圖。該等細胞係經50 nM及250 nM 尼代地平處理24小時(圖5A)及48小時(圖5B)。培養基中A β 1-40之產生係藉由ELISA量測。

圖6係顯示純對映異構形式尼代地平(尼代地平1及尼代地平2)及該2種對映異構物之同等比例混合物(N1+N2)對經24小時處理之7W WT APP751中國倉鼠卵巢細胞之A β 1-40產生之作用的劑量反應曲線。兩種對映異構物似乎可以類似方式劑量依賴性地抑制A β 1-40產生。

圖7係顯示尼代地平(尼代地平1及尼代地平2)純的對映異構型及該2種對映異構物之同等比例混合物(N1+N2)對經24小時處理之7W WT APP751中國倉鼠卵巢細胞之A β 1-42產生之作用的劑量反應曲線。應注意，在低劑量時，純對映異構物尼代地平2及尼代地平外消旋混合物(N1+N2)可輕微刺激A β 1-42，而對映異構物尼代地平1則無此作用。

圖8係顯示尼代地平對映異構物之分離的對掌性層析

圖。尼代地平_峰_1對應(-)-尼代地平(尼代地平1)；尼代地平_峰_2對應(+)-尼代地平(尼代地平2)。為闡釋之目的納入尼代地平_10，其係指尼代地平初始外消旋混合物。

圖9顯示(-)-尼代地平(尼代地平1)及(+)-尼代地平(尼代地平2)對大鼠主動脈中經FPL64176誘導之血管收縮的作用。數據顯示(+)-尼代地平可完全拮抗經FPL64176誘導之血管收縮而(-)-尼代地平則不能影響L型鈣通道激動劑之血管活性作用，表明(+)-尼代地平係L型鈣通道阻斷劑而(-)-尼代地平則無此作用。

圖10係繪示(-)-尼代地平對93週齡Tg APP_{sw}小鼠之大腦A β 1-40及A β 1-42含量之作用的條形圖。每日以(-)-尼代地平(10 mg/kg體重)經腹膜內處理各動物4天。

圖11係繪示(-)-尼代地平之緩慢釋放對70週齡Tg APP_{sw}小鼠之大腦A β 1-42含量之作用的條形圖。使用經皮下植入之生物可降解顆粒處理各動物26天。

圖12使用含人腦微血管內皮細胞之24孔半透明0.4 μ m膜嵌入物闡明血腦屏障之活體外模型(HBMEC)。在各時間點評估螢光素 β 類澱粉1-42向頂部隔間之遷移。

圖13係顯示(-)-尼代地平對清除穿過血腦屏障之大腦A β 之活體外作用的條形圖。A=頂部，B=基底。

圖14係顯示(-)-尼代地平與尼代地平外消旋混合物對清除穿過血腦屏障之大腦A β 之活體外作用對比的條形圖。A=頂部，B=基底。

圖15係顯示藉由小鼠中血漿A β 含量所量測之(-)-尼代地

平對清除穿過血腦屏障之大腦A β 之活體內作用的條形圖。

圖 16 係顯示生物可降解(-)-尼代地平顆粒對清除穿過血腦屏障之大腦A β 之活體內作用的條形圖。

圖 17A 及 17B 顯示在一藥物劑量範圍內(+)-尼代地平與(-)-尼代地平之血管活性特性對比。

十、申請專利範圍：

1. 一種治療有效量之富集對映異構性的(-)-尼代地平(nilvadipine)之用途，其用於製造供減低患有大腦類澱粉蛋白源性疾病或病況之動物或人中之 $A\beta$ 沈積、 $A\beta$ 神經毒性及微神經膠細胞增生之藥劑。
2. 一種治療有效量之富集對映異構性的(-)-尼代地平之用途，其用於製造供減低遭受外傷性腦損傷之動物或人中因 $A\beta$ 沈積、 $A\beta$ 神經毒性及微神經膠細胞增生所致之大腦類澱粉蛋白源性疾病或病況風險的藥劑，其中於該急性頭部損傷之後開始投與該富集對映異構性的(-)-尼代地平。
3. 一種治療有效量之富集對映異構性的(-)-尼代地平之用途，其用於製造供減低經診斷具有發生大腦類澱粉蛋白源性疾病或病況風險之動物或人發生大腦類澱粉蛋白源性疾病或病況風險之藥劑。
4. 如請求項1至3中任一項之用途，其中該大腦類澱粉蛋白源性疾病或病況係選自由阿茲海默氏(Alzheimer)病、外傷性腦損傷、及大腦類澱粉血管病組成之群。
5. 如請求項1至3中任一項之用途，其中該富集對映異構性的(-)-尼代地平之治療有效量係介於約0.05-20 mg/天之間。
6. 如請求項5之用途，其中該富集對映異構性的(-)-尼代地平之治療有效量係介於約2-15 mg/天之間。
7. 如請求項5之用途，其中該富集對映異構性的(-)-尼代地

平之治療有效量係介於約4-12 mg/天之間。

8. 如請求項5之用途，其中該富集對映異構性的(-)-尼代地平之治療有效量係約8 mg/天。
9. 如請求項1至3中任一項之用途，其中該藥劑之劑量係介於16 mg/天至最大耐受劑量之間。
10. 如請求項9之用途，其中該藥劑之劑量係16至50 mg/天。
11. 如請求項9之用途，其中該藥劑之劑量係約16 mg/天。
12. 如請求項9之用途，其中該藥劑之劑量係約20 mg/天。
13. 如請求項9之用途，其中該藥劑之劑量係約30 mg/天。
14. 如請求項9之用途，其中該藥劑之劑量係約40 mg/天。
15. 如請求項9之用途，其中該藥劑之劑量係約50 mg/天。
16. 如請求項9之用途，其中該藥劑之劑量係約100 mg/天。
17. 如請求項9之用途，其中該藥劑之劑量係約300 mg/天。
18. 如請求項9之用途，其中該藥劑之劑量係約500 mg/天。
19. 如請求項1至3中任一項之用途，其中在投與該藥劑後，該藥劑可降低之血壓量係低於治療前血壓之約20%，其中藉由不斷監控並隨時間積分曲線下面積來計算血壓，且其中係於一段充分治療期後測定治療後血壓，以便達成穩態結果。
20. 如請求項19之用途，其中在投與該藥劑後，該藥劑可降低之血壓量係低於治療前血壓之約10%。
21. 如請求項19之用途，其中在投與該藥劑後，該藥劑可降低之血壓量係低於治療前血壓之約5%。
22. 如請求項19之用途，其中在投與該藥劑後，該藥劑可降

低之血壓量係低於治療前血壓之約1%。

23. 如請求項1至3中任一項之用途，其中該藥劑係用於投與血壓在正常或低血壓範圍內之人或動物。
24. 如請求項1至3中任一項之用途，其中該藥劑係用於投與血壓在高血壓範圍內之人或動物。
25. 如請求項1至3中任一項之用途，其中該對映異構富集量係大於約95%至高達檢測極限值。
26. 如請求項25之用途，其中該對映異構富集量係大於約98%至高達檢測極限值。
27. 如請求項25之用途，其中該對映異構富集量係約100%至高達檢測極限值。
28. 如請求項1至3中任一項之用途，其中以該藥劑治療之持續時間係長達該動物或人之一生。
29. 如請求項28之用途，其中以該藥劑治療之持續時間係介於1小時與5年之間。
30. 如請求項28之用途，其中以該藥劑治療之持續時間係介於1天與12個月之間。
31. 如請求項28之用途，其中以該藥劑治療之持續時間係介於1週與6個月之間。
32. 如請求項28之用途，其中以該藥劑治療之持續時間係介於2週與4週之間。
33. 如請求項28之用途，其中以該藥劑治療之持續時間係介於2週與3年之間。
34. 如請求項28之用途，其中以該藥劑治療之持續時間係介

於6個月與12個月之間。

35. 如請求項1至3中任一項之用途，其中該藥劑係用於以選自下列各物所組成群中之單位劑型投與：硬式或軟式明膠囊、錠劑、藥囊、酏劑、懸浮液、糖漿劑、糯米紙囊劑、粉劑、顆粒劑、溶液及乳液。
36. 如請求項35之用途，其中該錠劑包括糖錠和菱形錠劑。
- 37..如請求項1至3中任一項之用途，其中該投藥法係藉由非經腸、經口、或腹膜內投藥。
38. 如請求項37用途，其中該非經腸投藥途徑係選自經由靜脈內；肌內；間質；動脈內；皮下；眼內；顱內；鞘內；心室內；滑膜內；穿過上皮；及局部組成之群。
39. 如請求項38之用途，其中穿過上皮包括穿皮、藉由吸入經肺部、經眼部、舌下及頰內。
40. 如請求項38之用途，其中局部包含經皮膚、眼、直腸、及藉由吹入法或噴霧法之鼻吸入法。
41. 如請求項40之用途，其中鼻吸入法係選自由氣溶膠、噴霧器及霧化器組成之群。
42. 一種治療有效量之富集對映異構性的(-)-尼代地平之用途，其用於製造供治療患有大腦類澱粉蛋白源性疾病或病況之動物或人之大腦類澱粉蛋白源性疾病或病況之組合物，其中該組合物進一步包括醫藥上可接受之載劑。
43. 一種醫藥組合物，其包含具光學活性之尼代地平及醫藥上可接受之載劑，該醫藥組合物包含相對於(+)-尼代地平超量的(-)-尼代地平，其中該醫藥組合物係包裹於硬

或軟殼明膠膠囊中、或可壓縮成錠劑之單位劑型。

44. 如請求項43之醫藥組合物，其中該醫藥組合物具有相對於(+)-尼代地平至少90%對映異構物超量的(-)-尼代地平。
45. 如請求項43之醫藥組合物，其中該醫藥組合物具有相對於(+)-尼代地平至少95%對映異構物超量的(-)-尼代地平。
46. 如請求項43之醫藥組合物，其中該醫藥組合物具有相對於(+)-尼代地平至少98%對映異構物超量的(-)-尼代地平。
47. 如請求項43之醫藥組合物，其中該醫藥組合物包含不可檢測出之(+)-尼代地平。
48. 如請求項43至47中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物係單位劑型。
49. 如請求項43至47中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物係適於以非經腸、經口或經腹膜內投藥之單位劑型。

十一、圖式：

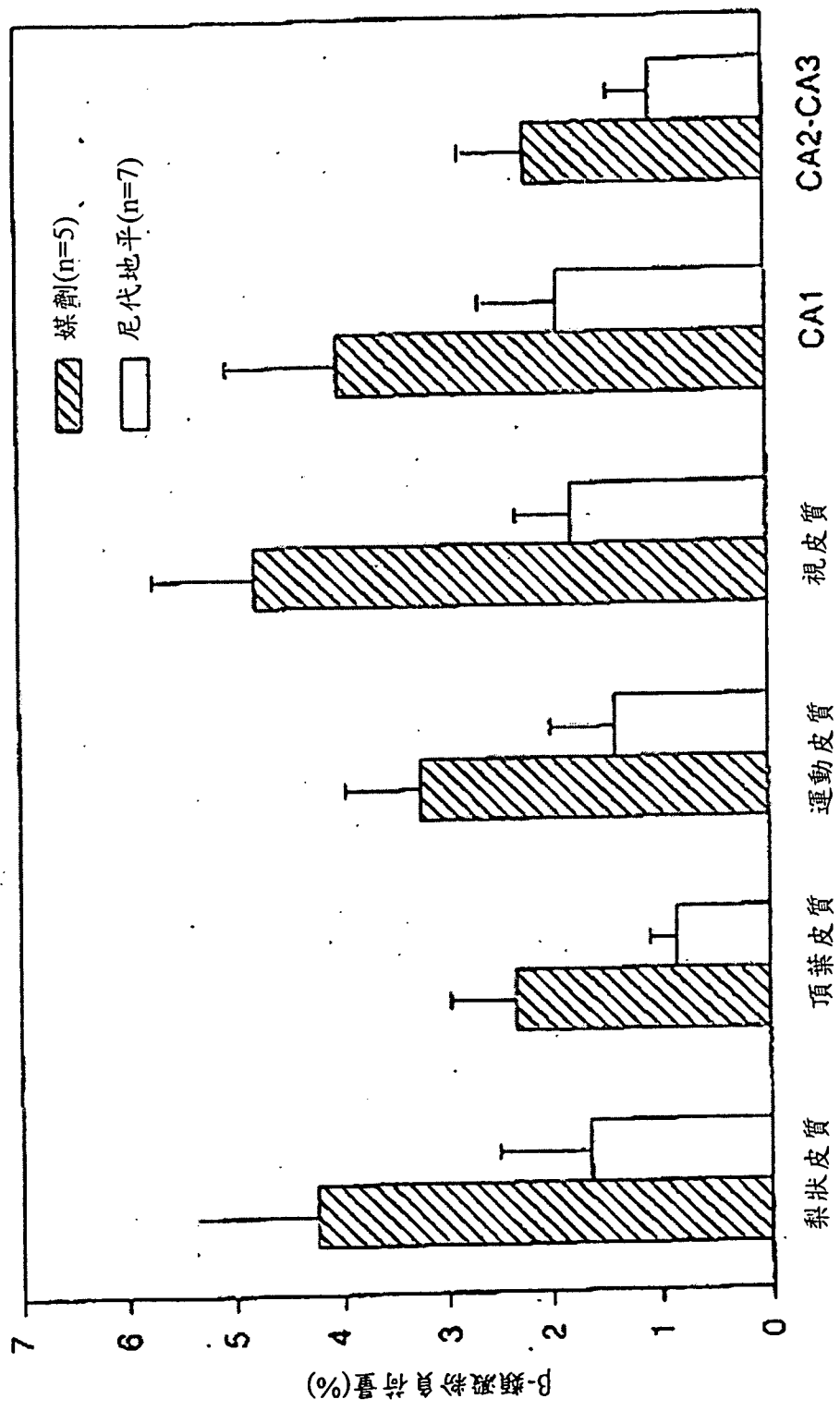


圖 1

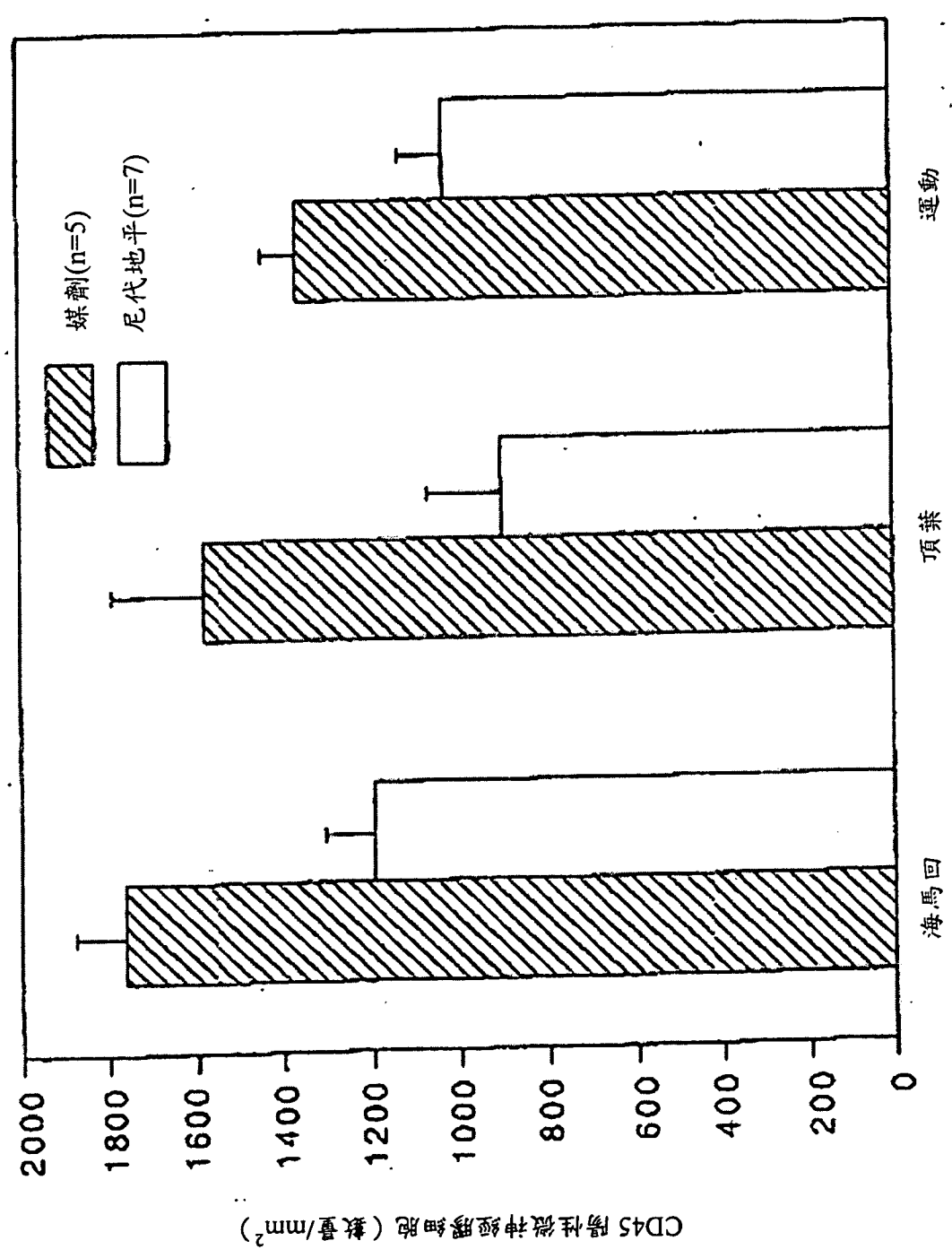


圖 2

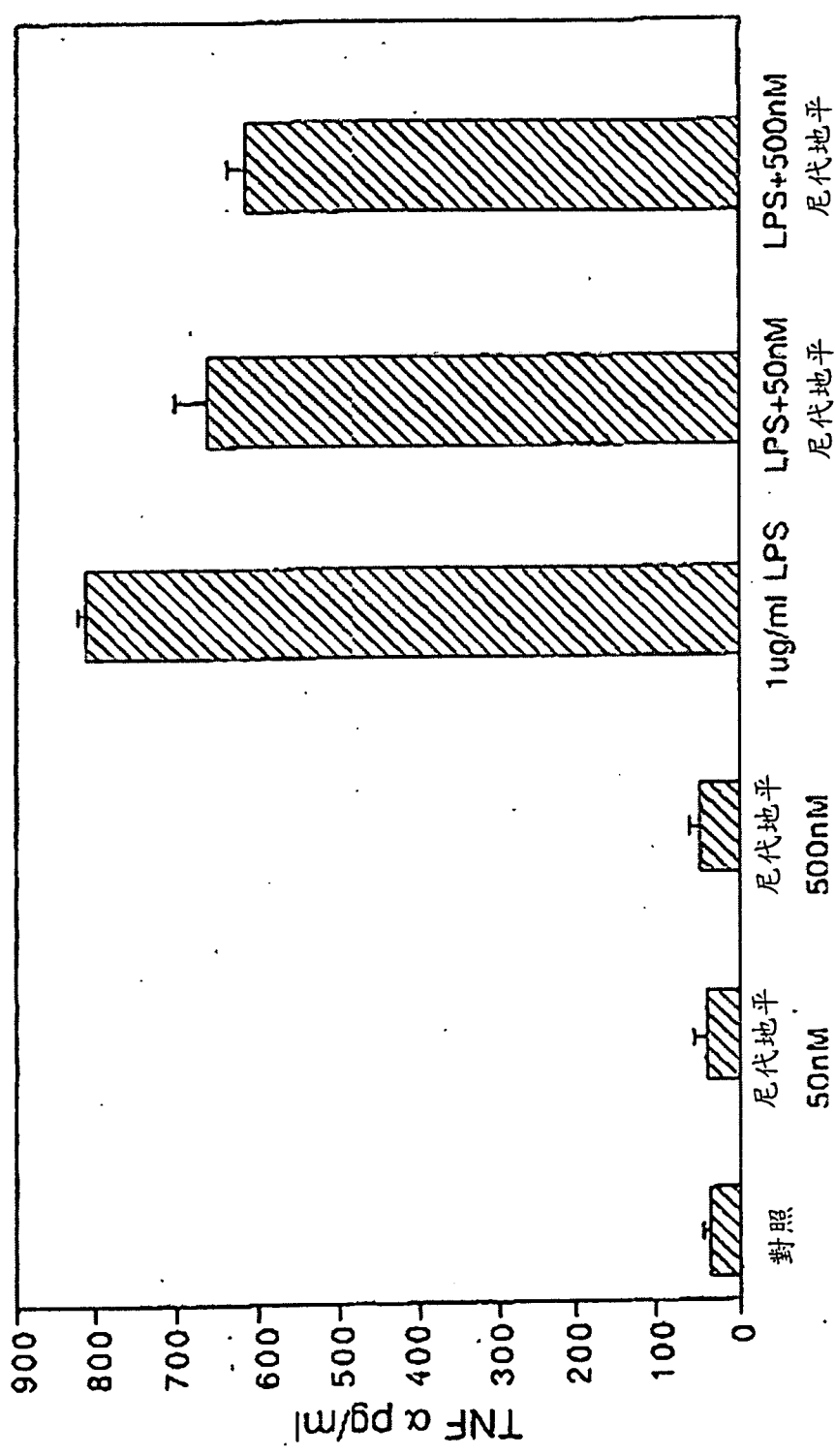


圖 3

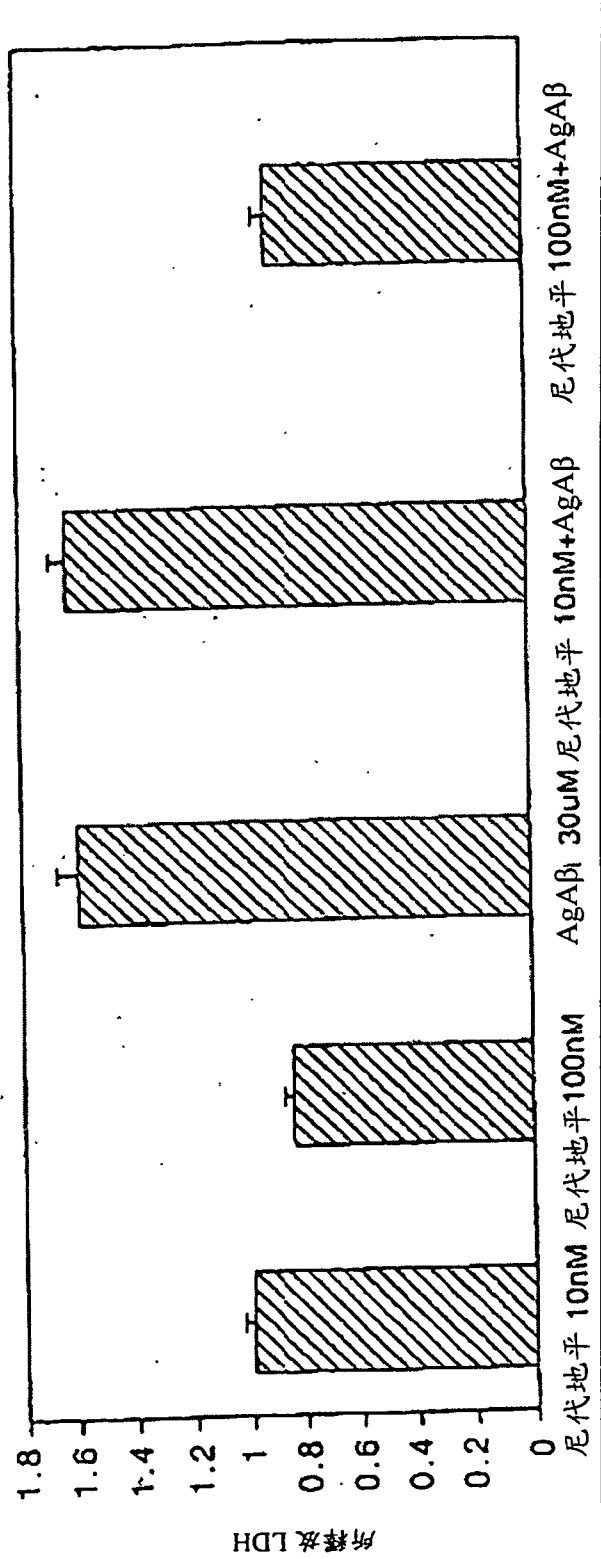


圖 4

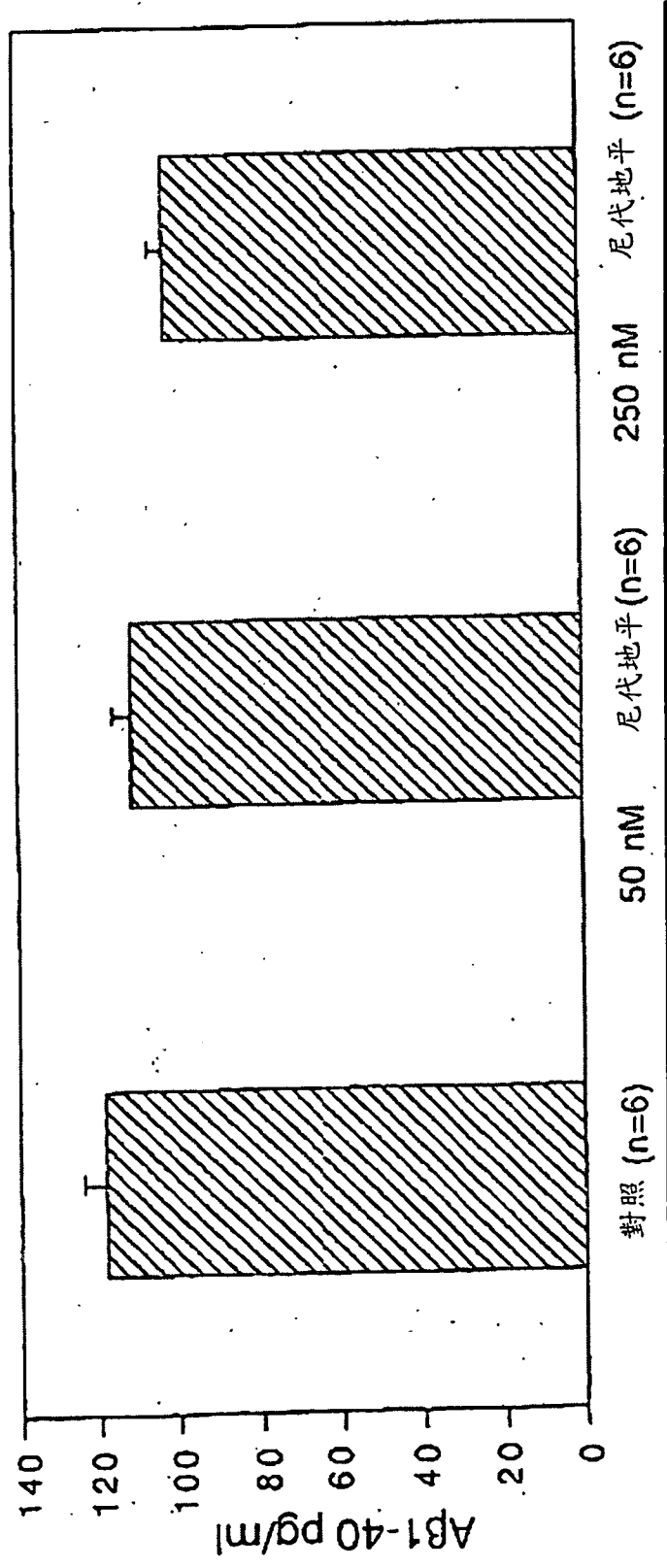


圖 5A

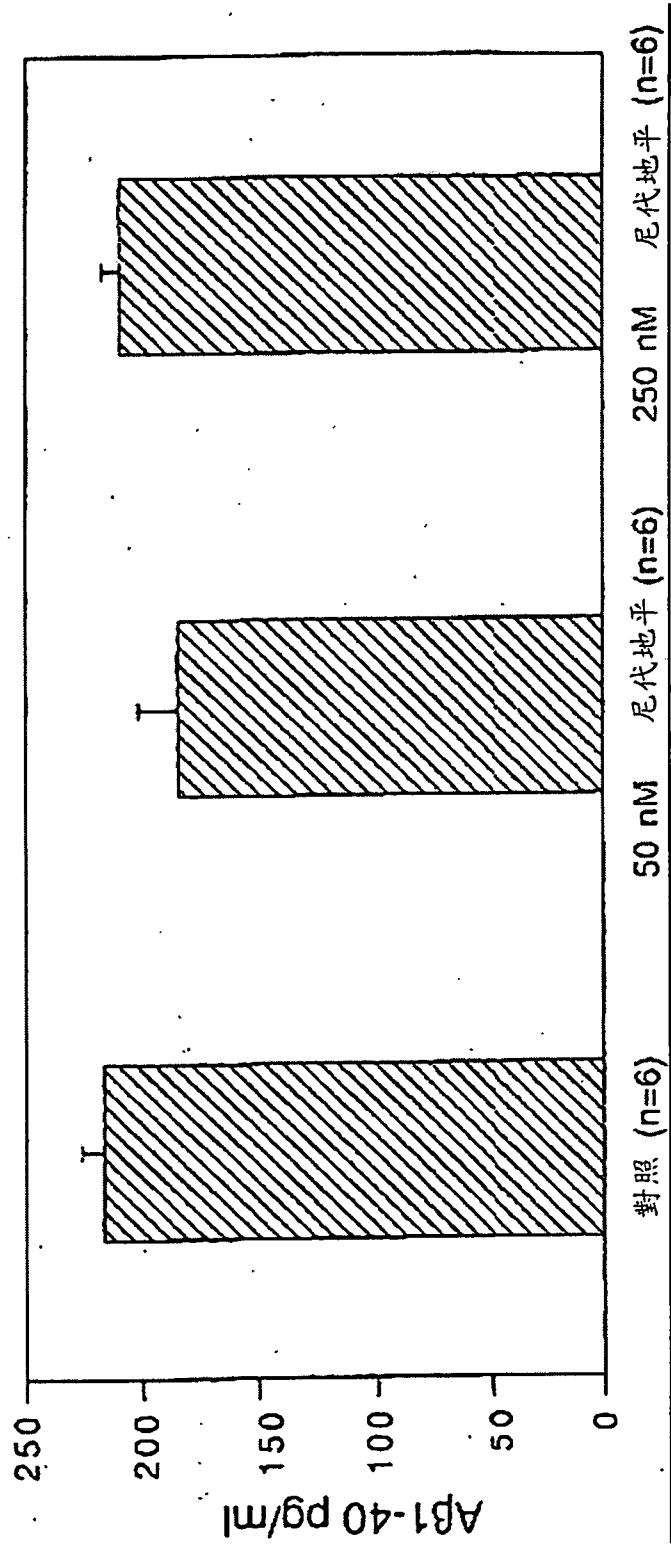


圖 5B

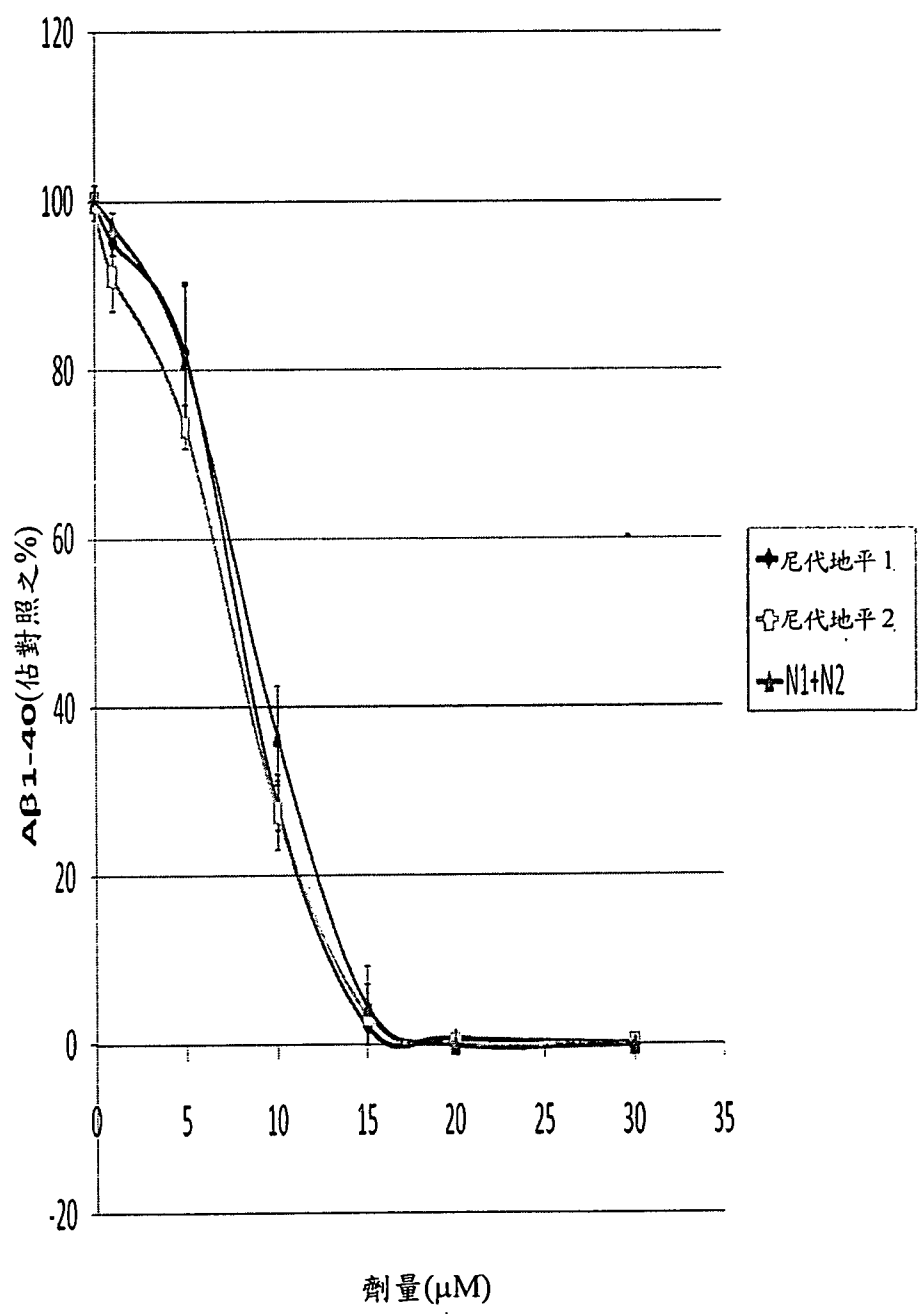


圖 6

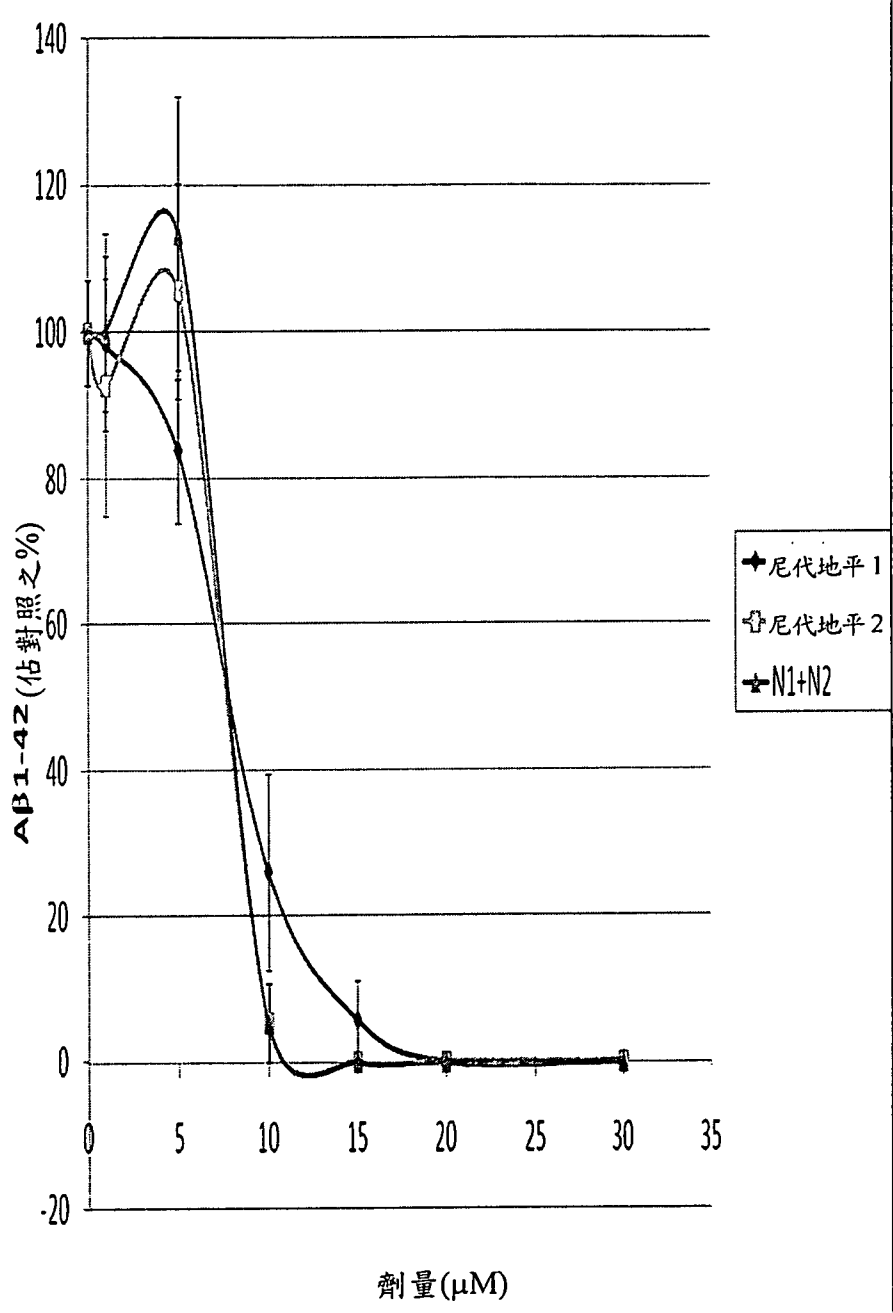


圖 7

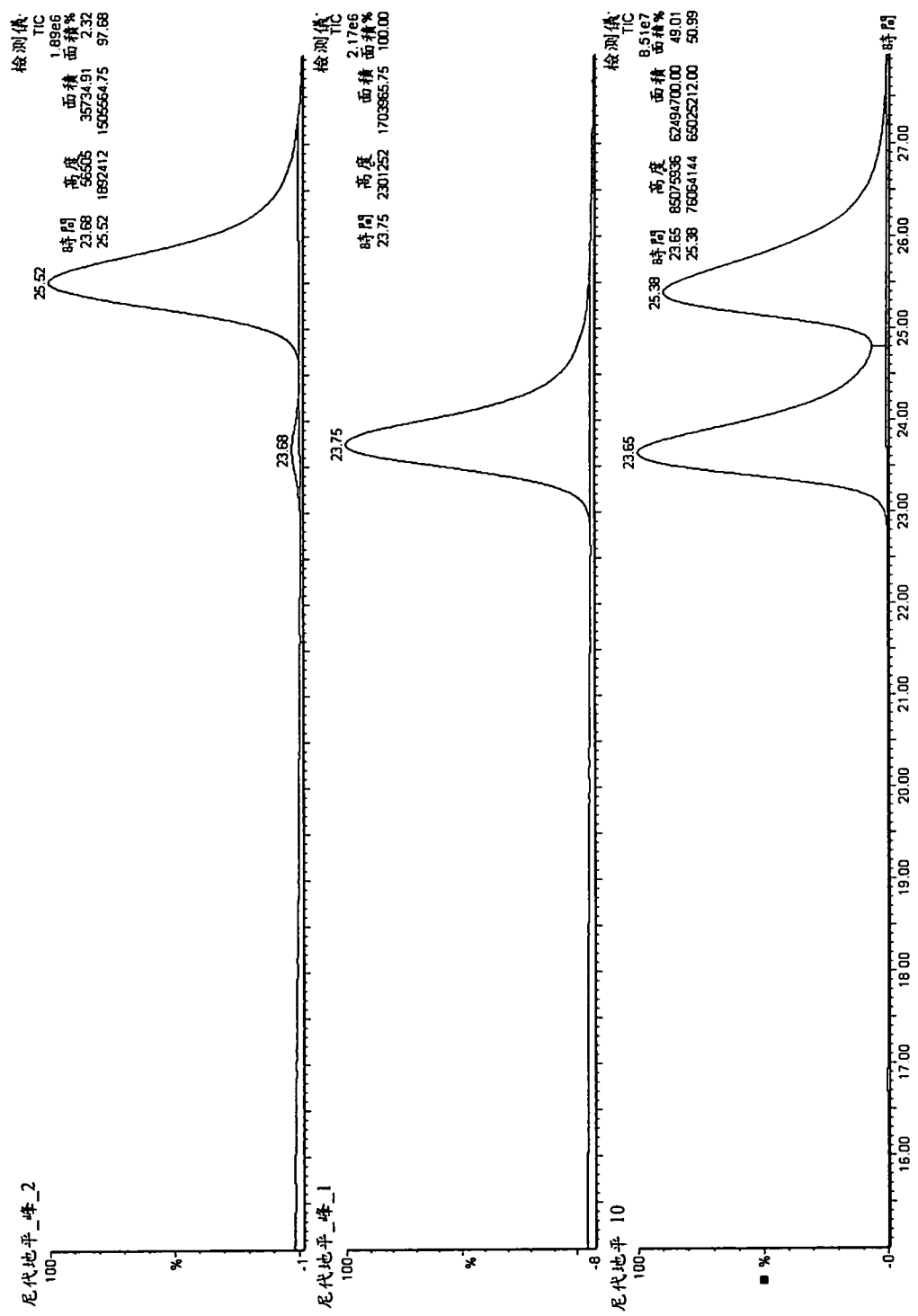


圖 8

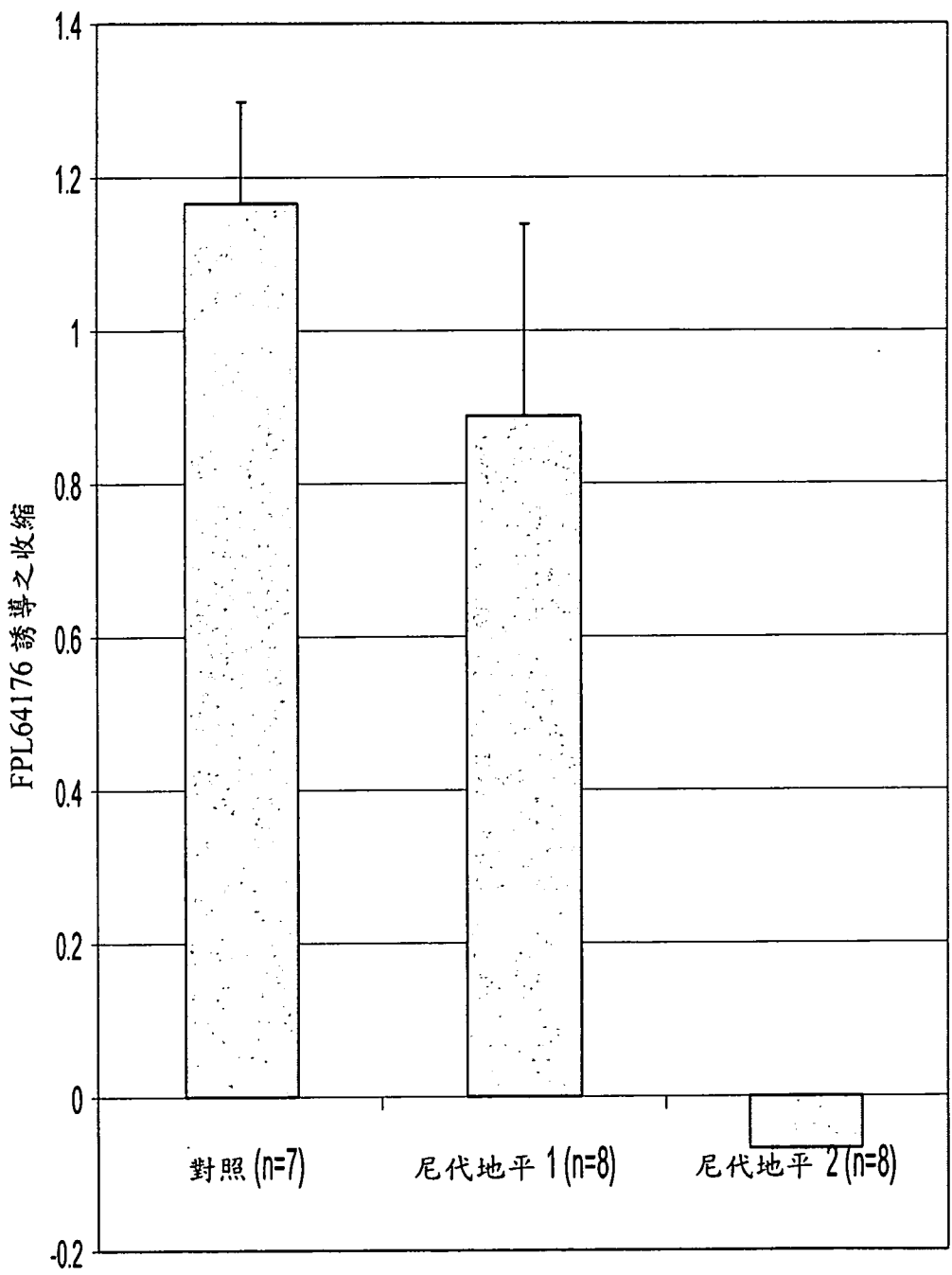


圖 9

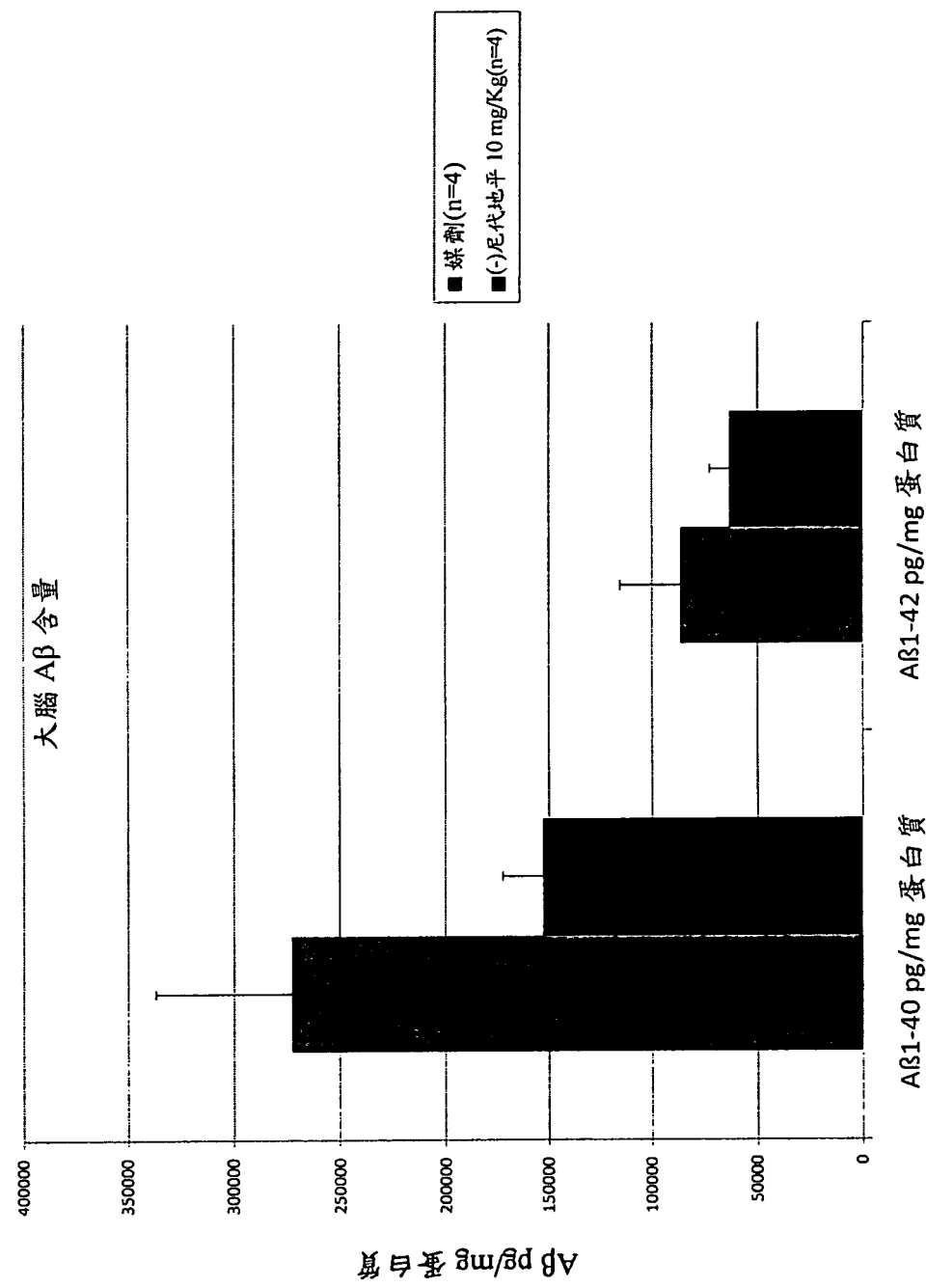


圖 10

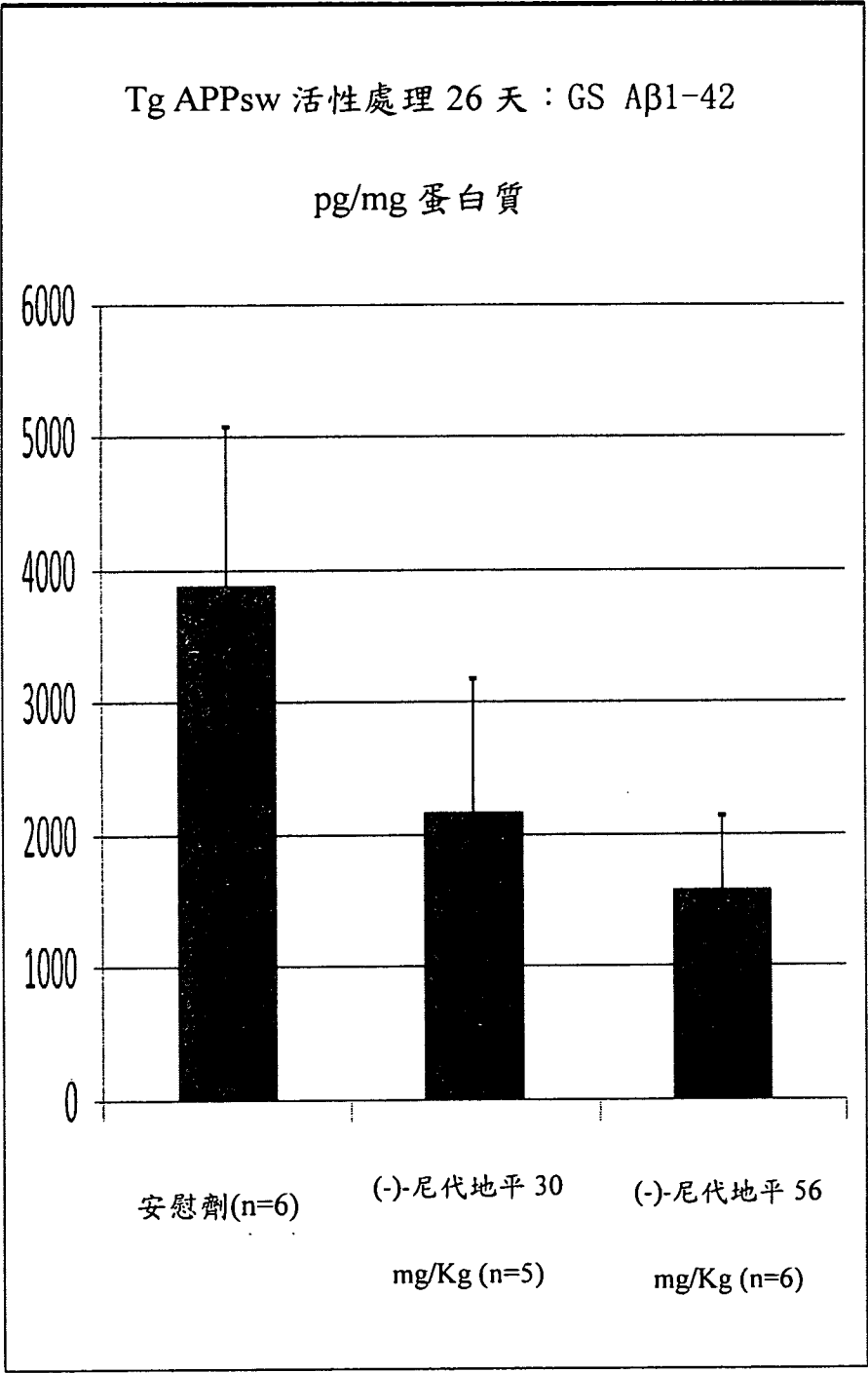


圖 11

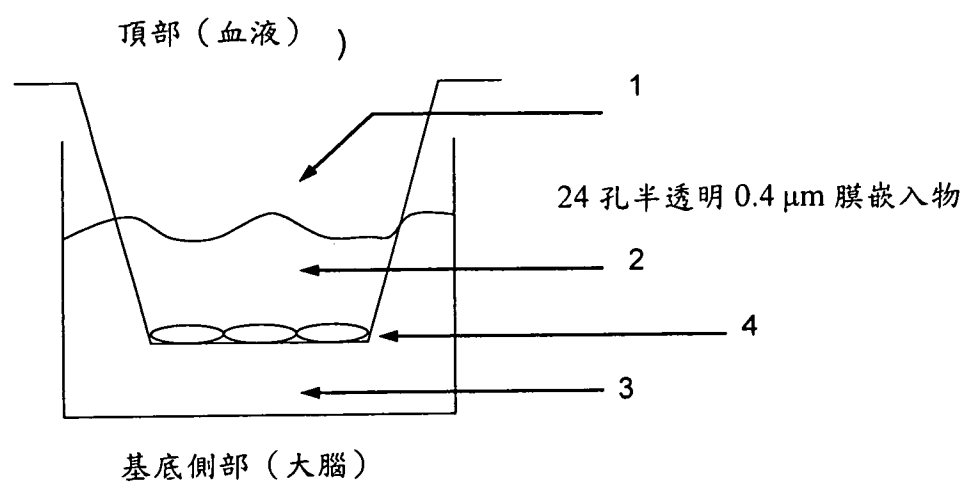


圖 12

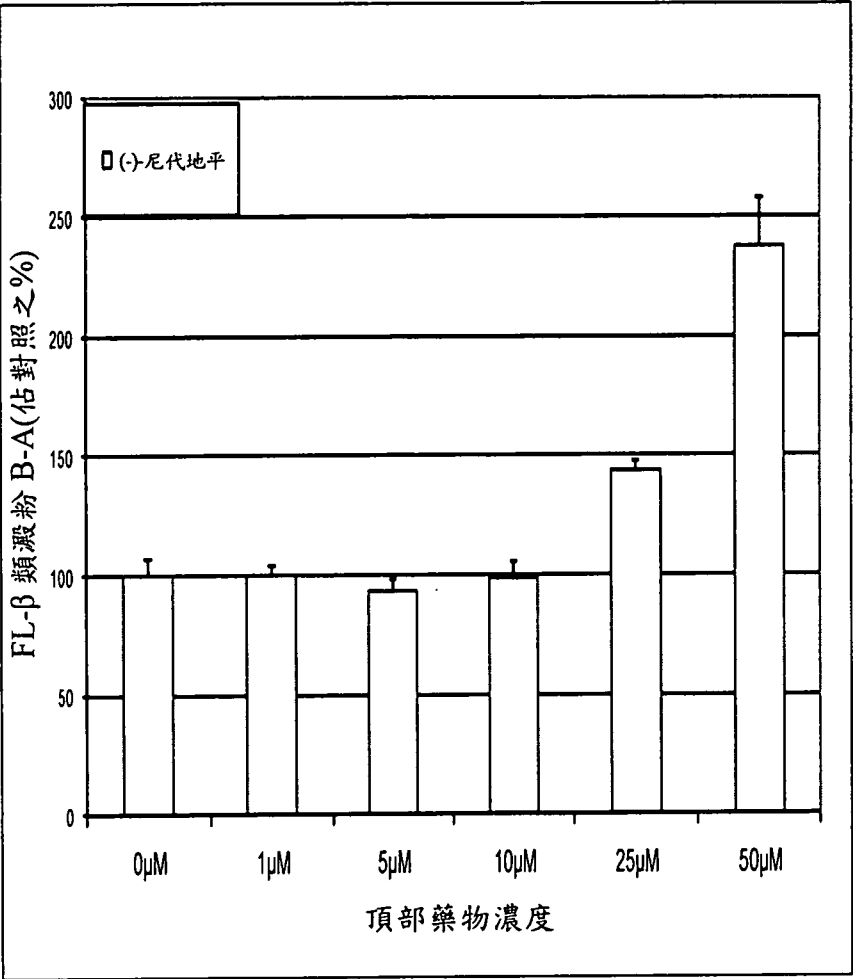


圖 13

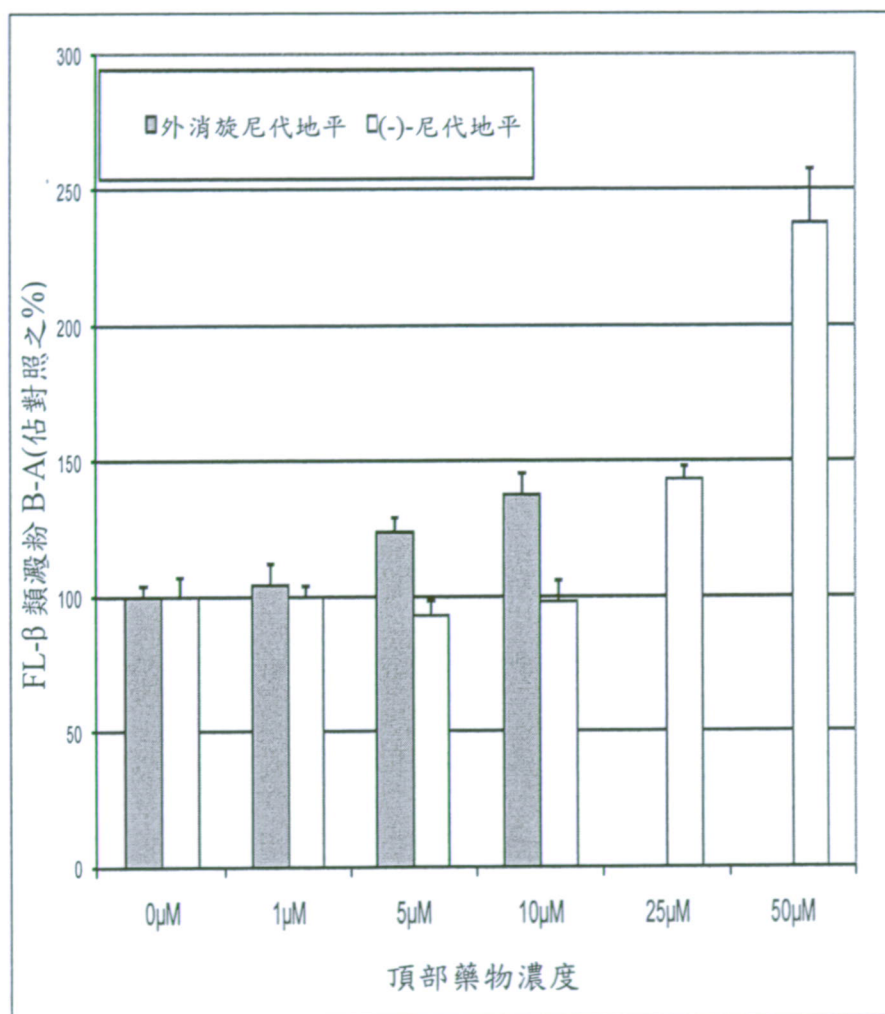


圖 14

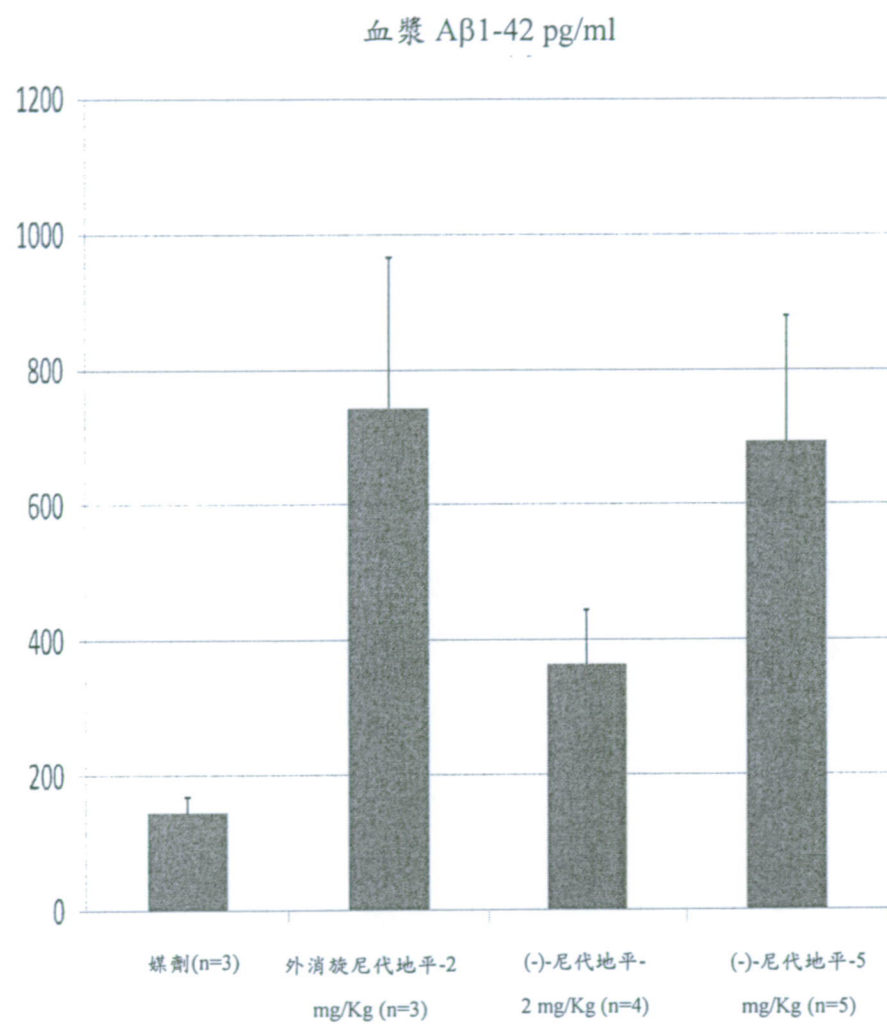


圖 15

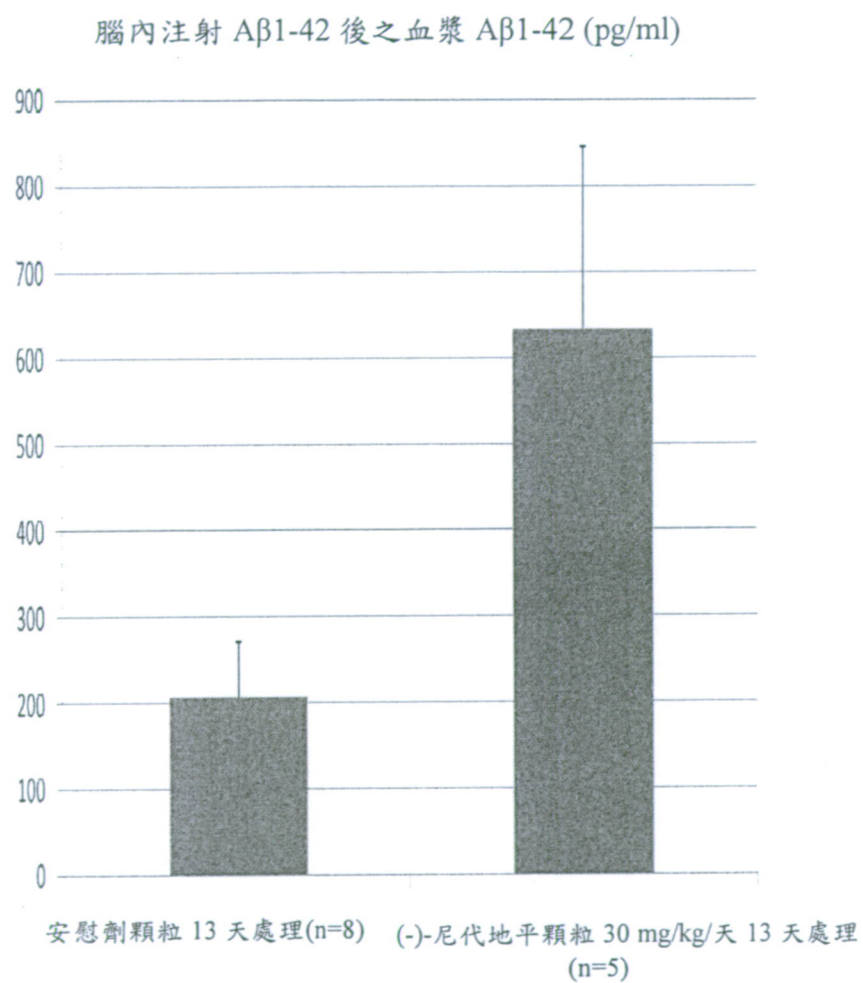


圖 16

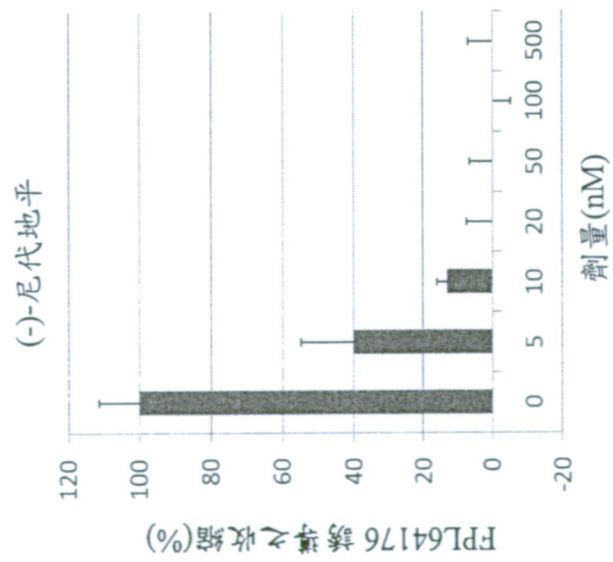


圖 17A

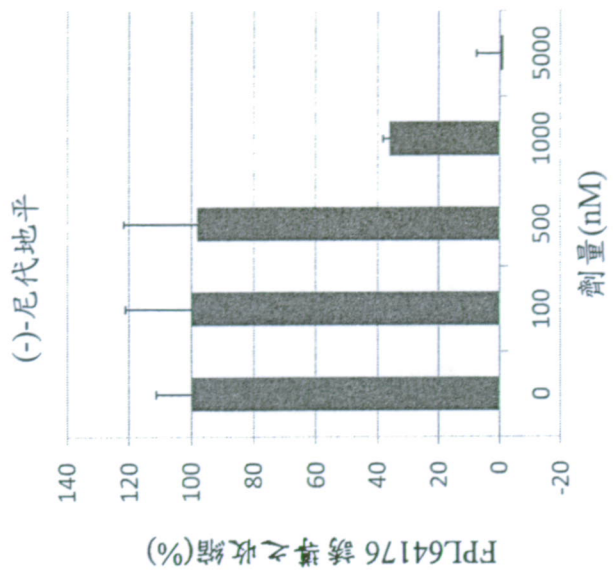


圖 17B