

申請日期	87 年 10 月 23 日
案 號	87117632
類 別	

A4

C4

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書		
一、發明 名稱	中 文	
	英 文	
二、發明 創作人	姓 名	(4) 麗莎·李維 Reeves, Lisa Marie (5) 勞倫斯·瑞特 Reiter, Lawrence Alan (6) 拉斐爾·羅賓森 Robinson, Ralph Pelton
	國 籍	(4) 美國康乃狄格州石寧頓迪斯米路七十五號 75, Deans Mill Road, Stonington, Connecticut 06378, U.S.A.
	住、居所	(5) 美國康乃狄克州米斯堤克西米斯堤克路三二號 32 West Mystic Avenue, Mystic, Connecticut USA (6) 美國康乃狄格州蓋爾斯菲利富萊爾塔克大道三十號 30 Friar Tuck Drive, Gales Ferry, Connecticut 06335, USA
三、申請人	姓 名 (名稱)	
	國 籍	
	住、居所 (事務所)	
	代 表 人 姓 名	

裝

訂

線

申請日期	87 年 10 月 23 日
案 號	87117632
類 別	

A4
C4

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書		
一、發明 名稱	中 文	
	英 文	
二、發明 創作人	姓 名	(7) 蘇·游康 Yocum, Sue Ann
	國 籍	(7) 美國康乃狄格州巴堤派恩克瑞斯十一號 11, Pinecrest Lane, Baltic, Connecticut 06330, U.S.A.
	住、居所	
三、申請人	姓 名 (名稱)	
	國 籍	
	住、居所 (事務所)	
	代 表 人 姓 名	

裝
訂
線

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
IPC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 1997年10月24日 60/062,766 有主張優先權

有關微生物已寄存於： ，寄存日期： ，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(1)

本發明的背景

本發明關於間質金屬蛋白酶抑制劑的用途，此抑制劑顯示出對間質金屬蛋白酶-13較對間質金屬蛋白酶-1具有特定性。這些化合物可用來治療或預防骨關節炎、類風濕性關節炎及癌症。

骨關節炎及類風濕性關節炎是屬於關節疾病，它們的特徵在於軟骨傷害及關節功能的損失，這些問題最後可能造成病人需要置換關節。在這些關節疾病中主要的生化變化之一是對I I型膠原造成傷害並因此失去它，I I型膠原是主要的關節軟骨膠原。I I型膠原對蛋白水解性的分解有絕對的抗性，而只有間質金屬蛋白酶(MMP)一族的膠原酶為唯一有能力分解存於正常軟骨中之天然螺旋狀I I型膠原的哺乳類酶。

目前所知道的I I型膠原降解間質金屬蛋白酶有三種，分別是：MMP-1、MMP-8及MMP-13。這些間質金屬蛋白酶也各被稱為膠原酶1、2、3。間質金屬蛋白酶-1(膠原酶)可經由相當多種的結締組織(包括骨關節軟骨及滑膜)表現在全身。見：“密雪兒”等人所著，“臨床研究期刊，97，761-768(1996)”及“渥夫”等人所著，“風濕性關節炎，36，1540~1547(1993)”。間質金屬蛋白酶-8(膠原酶2)起先被認為是僅由中性白血球所表現出。然而，最近的證據證實低濃度的MMP-8 mRNA及蛋白質存於人類軟骨中並且也有人

(請先閱讀背面之注意事項再為本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(2)

提出此種酶可能參與了“阿利根”(“aggrecan”，此為軟骨基質的成分之一)的降解作用，見：“查賓斯卡雅”等人著，“實驗研究，74，232-240(1993)”及“高爾”等人著，“生物化學期刊，271，11023-11026(1996)”。間質金屬蛋白酶-13(膠原酶3)最先是在乳癌細胞株中發現的，這種酶是此類酶中最後被發現的，見“富利吉”等人著，“生物化學期刊，269，16766~16773(1994)”。本發明之發明者自人類骨關節軟骨中將膠原酶-3獨立地“克隆化”並證實這種新的間質金屬蛋白酶大量表現在人類骨關節軟骨中，見：“密雪兒”等人著，“臨床研究期刊，97，761-768(1996)”。

間質金屬蛋白酶抑制劑，即：可廣泛地抑制MMPs(包括MMP-1、MMP-8及MMP-13)的化合物，早已為人所知並曾被用來證實在玻管中的測試裏，非選擇性MMP抑制劑在軟骨移植系統中會阻斷軟骨膠原的降解作用。見：“尼克森”等人所著，國際組織反應期刊，13，237~243(1991)；“密雪兒”等人著，“紐約科學院年鑑，732，395~397(1994)”，及“馬特”等人著，“間質，13，95~102(1993)”。

在到最近，MMP-1為唯一之已知由軟骨及結締組織所表現的膠原酶且因此，為最多膠原酶研究的主題。如

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(3)

上所述，廣範圍之組織分佈研究中已證實 MMP - 1 可由許多組織表現出來，尤其是那些牽涉到結締組織膠原等穩性的組織，如：皮膚、齒齦、半月板、肌鍵和韌帶。

本發明者已發現：與 MMP - 1 相反、MMP - 13 在這些組織（如：皮膚、齒齦、肌鍵和韌帶）中都不會表現出來，即使是在 MMP - 1 大致上被控制的情況下（如：間白素 - 1 的刺激）。唯一有明顯之 MMP - 13 表現出來的組織是軟骨。

還原，本發明也證實：在玻管中，膠原酶 - 3 對 I I 型膠原的活性較膠原酶 - 1 高出 10 倍，“臨床檢查期刊”。然而，膠原酶在玻管中的活性並不一定表示這些試劑各自的生物機能，因為這二種酶是以前活性型態存在再經由體內尚不清楚之機制轉化成活性型。另外，天然抑制劑（如：金屬蛋白酶或 TIMPs 的組織抑制劑）可區別性地調整 MMP 活性。因此，在沒有數據證實那些對於 MMP - 13 較 MMP - 1 具有選擇性的化合物可排除 I I 型膠原之降解作用的情形下，認為選擇性抑制劑可用來治療或預防骨關節炎及其它間質金屬蛋白酶居間之疾病的結論都只能算做推論而已。

本發明者意外發現即使膠原酶 - 1 及膠原酶 - 3 都存在活化的軟骨中，對 MMP - 13 較對 MMP - 1 具有特定性的抑制劑在可抑制膠原酶 - 3 而不會抑制膠原酶 - 1 的濃度時可大體上阻斷所有 I I 型膠原的降解作用。這些如此令人驚訝的，因為本領域中的一般技術人員認為

（請先閱讀背面之注意事項再為本頁）

裝

訂

線

五、發明說明(4)

M M P - 1 3 之選擇性抑制劑對膠原之降解作用沒有或是僅有部分的效果。由於 M M P - 1 被認為是軟骨中主要的膠原降酶，因此，沒有被抑制的 M M P - 1 被認為會繼續降解膠原。然而，如下列數據所顯示的，事實並非如此。

還有，最近對於 marimastat 的臨床試驗數據，一種非選擇性的 M M P - 1 及 M M P - 1 3 抑制劑，透露了明顯的與劑量相關之結締組織副作用，這可能是因為由對 M M P - 1 之系統性抑制作用所引起之對正常結締組織膠原更新的抑制作用，A S C O 年報，1 5，4 9 0 (1 9 9 6)。此類結締組織毒性很明顯地限制了此種 M M P - 1 / M M P - 1 3 抑制劑在治療方面的應用。根據組織分佈研究證實：M M P - 1 3 幾乎只表現在軟骨，而 M M P - 1 則在表現在大範圍的組織中，對 M M P - 1 3 的系統性抑制作用不會製造結締組織毒性限制了非選擇性 M M P - 1 / M M P - 1 3 抑制劑的用途。因此，根據上述之膠原抑制數據，本發明者發現對 M M P - 1 3 較對 M M P - 1 具有選擇活性的化合物為優秀之軟骨膠原降解作用抑制劑，因為它們不會在作用時製造系統性的結締組織毒性。

間質金屬蛋白酶抑制劑，即：可廣泛抑制間質金屬蛋白酶 8 和 1 3 的試劑在論文中已有說明。特別是，於 1 9 9 6 年 1 0 月 2 4 日出版之 P C T 公告 W O 9 6 / 3 3 1 7 2 及 1 9 9 6 年 3 月 7 日所出版之 W O 9 6 / 2 7 5 8 3 都提到了其它可抑制間質金屬蛋白酶的氧肟酸。

(請先閱讀背面之注意事項再為本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(5)

下列文獻則提到了其它可抑制間質金屬蛋白酶的氧肟酸、戊二醯胺或次膦酸鹽：①1996年7月12日提出之美國專利申請號60/021；②1996年8月23日提出之美國專利申請號60/024675；③1996年7月18日提出之美國專利申請號60/021,959；④1997年2月11日提出之美國專利申請號60/037,600；⑤1997年2月7日提出之美國專利申請號60/037,402；⑥1997年2月3日提出之美國專利申請號60/036,857；⑦1997年1月6日提出之美國專利申請號60/034,535。

歐洲專利申請606,046(1994年7月13日出版)中提到經茅基磺醯胺基取代之氧肟酸並說明它們是有效之間質金屬蛋白酶抑制劑。

1990年5月31日出版之PCT文WO 90/05719中提及其它氧肟酸並說明它們可做為MMP抑制劑。

歐洲專利文780,386(1997年6月25日出版)中提及新穎之間質金屬蛋白酶抑制劑。該作者說明：根據膠原酶的組織分佈，膠原酶-3是軟骨膠原間質降解作用的主要參考者，因此，對膠原酶-3之選擇性超過膠原酶-1的抑制劑是用來治療與軟骨糜爛相關之疾病(如：關節炎)的較佳試劑。然而，在此篇申請案中，組織分佈的數據很有限並且不包括許多已知之製造MMP-1

(請先閱讀背面之注意事項再為本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(6)

的結締組織。另外，並沒有提出對 MMP - 13 之選擇性超過 MMP - 1 的抑制劑可抑制軟骨膠原降解作用的證據。

德國專利文 19,501,032 (1996年7月18日出版)中提出以將膠原酶 - 3 去活化的方法來治療風濕性疾病的專利申請。此篇作者並沒有提出數據來證實膠原酶 - 3 實際上受到抑制了。

本發明的總論

本發明關於一種治療或預防哺乳動物(以人類較佳)體內之疾病或狀況的方法，此種疾病或狀況可藉著化合物相較於對膠原酶 - 1 而對膠原酶 - 3 有更大之選擇性制作用(以不產生系統結締組織毒素較佳)來進行治療或預防。此種治療或預防的方法包含了給予需要此種治療或預防的哺乳動物一具有膠原酶 - 3 抑制有效量的膠原酶 - 3 選擇性抑制劑，或其藥學上可接受的鹽。

本發明也關於一種在哺乳動物體內(以人類較佳)治療或預防骨關節炎(以不會產生系統性結締組織毒性者較佳)的方法，它包含了給予該需要治療或預防的動物一膠原酶 - 3 抑制有效量的膠原酶選擇性抑制劑或其藥學上可接受的鹽。

本發明也關於一種預防或治療哺乳動物體內(以人類較好)之骨關節炎的方法，它包含了給予該需受此種治療或預防之哺乳動物一抑制有效量的化合物，此化合物係選

(請先閱讀背面之注意事項再為本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(9)

W O 9 6 / 3 3 1 7 2 (1 9 9 6 年 1 0 月 2 4 日 出 版) 及 W O 9 6 / 2 7 5 8 3 (1 9 9 6 年 3 月 7 日 出 版) ; ② P C T 申 請 號 P C T / U S 9 5 / 0 7 1 6 6 , 1 9 9 5 年 6 月 7 日 提 出 (此 文 對 應 於 1 9 9 6 年 5 月 2 0 日 提 出 之 美 國 專 利 申 請 號 6 0 / 0 1 7 , 8 5 0) ; ③ 1 9 9 5 年 6 月 6 日 提 出 之 P C T 申 請 號 P C T / 1 B 9 5 / 0 0 4 2 7 ; ④ 1 9 9 6 年 7 月 1 2 日 提 出 之 美 國 專 利 申 請 號 6 0 / 0 2 1 , 6 5 2 ; ⑤ 1 9 9 6 年 8 月 2 3 日 提 出 之 美 國 專 利 申 請 號 6 0 / 0 2 4 , 6 7 5 ; ⑥ 1 9 9 6 年 7 月 1 8 日 提 出 之 美 國 專 利 申 請 號 6 0 / 0 2 1 , 9 5 9 ; ⑦ 1 9 9 7 年 2 月 1 1 日 提 出 之 美 國 專 利 申 請 號 6 0 / 0 3 7 , 6 0 0 ; ⑧ 1 9 9 7 年 2 月 7 日 提 出 之 美 國 專 利 申 請 號 6 0 / 0 3 7 , 4 0 2 ; ⑨ 1 9 9 7 年 2 月 3 日 提 出 之 美 國 專 利 申 請 號 6 0 / 0 3 6 , 8 5 7 ; ⑩ 1 9 9 7 年 1 月 6 日 提 出 之 美 國 專 利 申 請 號 6 0 / 0 3 4 , 5 3 5 ; ⑪ 1 9 9 4 年 7 月 1 3 日 出 版 之 歐 洲 專 利 申 請 號 6 0 6 , 0 4 6 ; ⑫ 1 9 9 0 年 5 月 3 1 日 出 版 之 P C T 文 W O 9 0 / 0 5 7 1 9 ; ⑬ 1 9 9 7 年 6 月 2 5 日 出 版 之 歐 洲 專 利 文 7 8 0 , 3 8 6 。 所 有 前 述 之 參 考 資 料 在 此 將 它 們 全 部 列 為 本 文 之 參 考 資 料 。

此處所使用之膠原酶-3(間質金屬蛋白酶-13)選擇性抑制劑是指那些對膠原酶-3之酵素活性的抑制程度至少為對膠原酶-1酵素活性之抑制程度的100倍者

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (10)

，且此試劑由下述之 MMP - 13 / MMP - 1 螢光分析中所得到的 IC₅₀ 值來定義其效力時，濃度是小於 100 nM。膠原酶 - 3 選擇性抑制劑可以依下列步驟來鑑別：

①經由下述之 MMP - 13 / MMP - 1 螢光分析來篩檢膠原酶抑制劑（依上述之專利及文獻所製備者），②選出其 MMP - 13 / MMP - 1 抑制作用之 IC₅₀ 比為 100 或者更高者，③選出其效能少於 100 nM 者。

MMP - 13（膠原酶 - 3）選擇性抑制劑對其它的 MMPs，aggrecanase，ATCE，ADAM - 12，ADAMTS - 1 或膠原酶 - 2 可能具有差別活性本領域中之一般技術人員會知道如何去分析這些不同的金屬蛋白酶。

此處所使用之膠原酶抑制劑是指帶有膠原酶抑制活性之化合物，其中該 MMP - 13 / MMP - 1 的選擇性未知。

膠原酶抑制劑抑制膠原酶活性的能力在本領域中是為人所熟知的。本發明者也是第一個發現膠原酶 - 3（間質金屬蛋白酶 - 13）這些抑制劑之能力的人，在這些抑制劑中以本發明上述之化合物或其藥學上可接受的鹽類（以下也稱為活性化合物）較適合用來抑制 I I 型軟骨膠原的降解作用。下列實驗證實：（1）這些化合物對 MMP - 13 確實較對 MMP - 1 具有選擇性；（2）MMP - 13 選擇性化合物大體上會抑制所有來自由 IL - 1 所刺激之軟骨外植物中所釋出的膠原酶的活性；及（3）

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明 (11)

MM P - 1 3 選擇性化合物大體上會抑制軟骨外植物中所有的 I I 型軟骨膠原之降解作用。

實驗方法 1

對人類膠原酶 (M M P - 1) 的抑制作用

以胰蛋白酶活化人類重組之膠原酶 - 1 。胰蛋白酶的量依各批膠原酶 - 1 決定，但典型反應則使用下列比例：每 1 0 0 微克膠原酶使用 5 微克胰蛋白酶。將胰蛋白酶及膠原酶在室溫下溫育 1 0 分鐘，然後加入 5 倍過量 (5 0 毫克 / 1 0 毫克胰蛋白酶) 之黃豆胰蛋白酶抑制劑。

在二甲基亞碲中配製抑制劑的貯存溶液 (1 0 毫莫耳濃度，即：1 0 m M) 然後依下列圖素將之進行稀釋：

$$10 \text{ m M} \rightarrow 120 \mu \text{ M} \rightarrow 12 \mu \text{ M} \rightarrow 1.2 \mu \text{ M} \rightarrow 0.12 \mu \text{ M}$$

然後，將各濃度各取 2 5 微升加入 - 9 6 凹槽的微量螢光盤中，每種濃度加三個槽。加入酶和受質後，抑制劑的最後濃度為 1 : 4 稀釋倍數。在每一個盤上的陽性 (酶，無抑制劑) 及陰性 (無酶，無抑制劑) 控制組也都各準備三組。

將膠原酶 - 1 稀釋成 2 4 0 毫微克 / 毫升並取 2 5 微升加入該微量螢光盤中之適當的凹槽中。在該分析中，膠原酶的最後濃度為 6 0 毫微克 / 毫升。

在二甲基亞碲中配製濃度為 5 毫莫耳濃度 (5 m M)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (12)

的受質 (D N P - P r o - C h a - G l y - C y s (M e) - H i s - A l a - L y s (N M A) - N H ₂) 貯存溶液。在微量螢光盤的每一凹槽中加入 50 微升的受質以使最後濃度為 10 微莫耳濃度 (10 μ M) 來起動此分析。

在時間點 0 處進行螢光判讀 (360 毫微莫耳濃度激發, 460 毫微莫耳濃度發射), 然後每隔 20 分鐘判讀一次。在室溫下進行此分析, 典型的分析時間為 3 小時。

將空白組及各個含膠原酶的樣本 (將三組判讀數據加以平均) 以螢光對時間製成圖表。選擇可提供好訊號 (至少 5 倍高於空白組) 且在曲線之直線部分 (通常在約 120 分處) 的時間點決定 I C ₅₀ 值。將時間點 " 0 " 的數值做為各化合物在各濃度時的空白組並將這些數值自 120 分處的數據中減去。以抑制劑濃度對 % 控制力 (以膠原酶單獨之螢光值除抑制劑螢光值 \times 100) 的數據製成圖表。由抑制劑的濃度來決定 I C ₅₀ 值, 此值為可其有 50 % 控制之訊號處。

如果所得之 I C ₅₀ 值小於 0.03 微莫耳濃度 (μ M) , 則將這些抑制劑在 0.3 μ M 、 0.03 μ M 及 0.003 μ M 等濃度進行分析。

對 M M P - 13 的抑制作用

在 37 $^{\circ}$ C 下以 2 m M A P M A (對 - 胺苯基醋酸汞) 活化人類重組的 M M P - 13 1.5 小時, 然後, 在

(請先閱讀背面之注意事項再為本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (13)

分析緩衝液 (5 0 m M 三羥甲基甲胺 , p H 值為 7 . 5 , 2 0 0 m M 氯化鈉、 5 m M 氯化鈣、 2 0 μ M 氯化鋅、 0 . 2 % “ 布里吉 ” 3 5) 中將其稀釋成 2 4 0 毫克 / 毫升。在一個 9 6 凹槽的微量螢光盤的各凹槽中加入 2 5 微升的稀釋酶。然後, 將抑制劑及受質加入其中以將酶依 1 : 4 比例進行稀釋, 所得之最後濃度為 6 0 毫微克 / 毫升)。

在二甲基亞砷中配製抑制劑的貯存溶液 (1 0 m M) , 然後將它們以分析緩衝液依各抑制劑之稀釋圖表進行稀釋以用來抑制人類膠原酶 - 1 。自稀釋好之各濃度中取 2 5 微升加入微量螢光盤中, 每個濃度各三組。分析中之最後濃度各為 3 0 μ M、 3 μ M、 0 . 3 μ M 及 0 . 0 3 μ M。

配製如人類膠原酶 (M M P - 1) 之抑制作用分析中的受質 (D n p - P r o - C h a - G l y - C y s (M e) - H i s - A l a - L y s (N M A) - N H ₂) 並各取 5 0 毫升加入各凹槽中以使分析中之最後分析濃度為 1 0 “ μ M ” (微莫耳濃度) 。在時間 0 點處進行螢光判讀 (3 6 0 n M 激發 ; 4 5 0 n M 發射) 並且每隔 5 分鐘, 進行判讀持續約 1 小時。

依 M M P - 1 分析的方法設立陽性及陰性控制組各三組。

I C ₅₀ 值是以人類膠原酶 (M M P - 1) 每次的受抑制情形來決定的。如果 I C ₅₀ 值是少於 0 . 0 3 m M 則以

(請先閱讀背面之注意事項再為本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(14)

0.3 μ M、0.03 μ M、0.003 μ M 及
0.0003 μ M 為最後濃度來進行分析。

間質金屬蛋白酶-13 選擇性抑制劑是那些在上述之
MMP-13 分析中得證其 IC₅₀ 值小於 100 nM 的試
劑。還有，對 MMP-13 / MMP-1 抑制情形的
IC₅₀ 比必須大於 100 倍。

將上述之參考計劃應用至廣範圍的抑制劑上，實施例
1 (依由 1986 年 7 月 8 日發出之美國專利號
4,599,361 中所提出的實施例 2 中所使用的方法
來製備)，及二種 MMP-13 選擇性化合物，實施例 2
和 3 (依下列資料製備：①由 1995 年 6 月 6 日提出之
世界專利申請序號 PCT / IC 95 / 00427 而來
之實施例 2，及②由 1997 年 7 月 14 日提出之美國專
利申請號 09 / 892,417 而來之實施例 11，此篇
專利提出由美國專利申請號 60 / 021,959 (
1996 年 7 月 18 日提出) 而來之優先專利) 所產生的
數據列於表 1 中。

(請先閱讀背面之注意事項再為本頁)

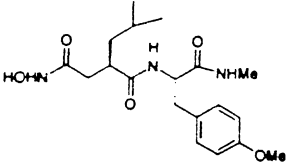
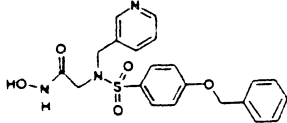
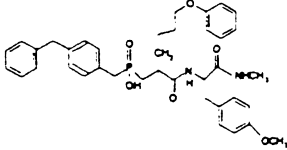
裝

訂

線

五、發明說明 (15)

表 1

實施例	化學式	MMP-1 IC ₅₀ (Nm)	MMP-13 IC ₅₀ (nM)
1		2.5	1.5
2		17700	5.4
3		21700	70

實驗方法 2

膠原膜 MMP - 13 的分析方法

此第 2 個實驗的目的是：(1) 證實活性試劑抑制膠原的降解作用及 (2) 決定從軟骨外植物被吸收之過程中所產生的介質內所存在的是那些活性膠原酶。只有膠原酶可降解螺旋形膠原，然而肽類（如：上述之實驗方法 1 中所描述的受質）可以被許多種蛋白酶所降解。下述之方法可用來驗證與抑制劑對 MMP - 13 和 MMP - 1 之選擇性相關的螢光分析數據。與螢光分析相比，此分析最主要的優點是使用天然受質（即：膠原）而不使用人工合成之受質（如：螢光肽受質）。另外，由於膠原為受質且只有

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明 (16)

膠原酶可將此受質進行降解，所以還可決定在酶之複合混合物中的膠原酶活性（酶之複合混合物如：由軟骨外植入而來的狀況介質）。本領域中之一般技術人員可了解本分析（說明於下）可在許多方面進行調整以得到一個實驗工作者所需之特定需要。

將大鼠之 I 型膠原以 ^{14}C 醋酸酐（T. E 卡斯頓及 A.J. 貝瑞特，生化年鑑，99，340~345（1979））做放射標示並用來製備含放射標示薄膜的 96 凹槽盤（芭芭拉 強生 - 溫特，生化年鑑，104，175~181（1980））。當把一種含膠原酶的溶液加入凹槽中時，此酶會分解原本不可溶之解開的膠原而使其成為可溶。膠原酶的活性與溶解的膠原量直接成比例，這是利用一種標準的閃爍計數器來測量在上清液中的放射活性比例而決定出來的。因此，膠原酶抑制劑為那些可以降低放射活性計數的化合物，而溶液中之放射活性是否有降低則需參考不含抑制劑之控制組來決定。下述為此分析的一種特殊體系。

利用下列步驟，以膠原為受質來決定化合物對 MMP - 13 之相對於 MMP - 1 的選擇性。依實驗方法 1 的步驟來活化人類重組之 pro MMP - 13 或 pro MMP - 1。將活化之 MMP - 13 或 MMP - 1 以緩衝液（50 mM 三羥甲基甲胺，pH 7.5，150 μ M NaCl，10 mM CaCl₂，1 μ M MgCl₂，0.05% 布里吉（Brij）- 35，0.02% 疊氮

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明 (17)

化鈉) 稀釋成 $0.6 \mu g / ml$ 。

製備含測試化合物之二甲基亞砷貯存溶液 (10 mM) 在三羥甲基甲胺緩衝液中將上述測試化合物加以稀釋製成 0.2 、 2.0 、 20 、 200 、 2000 及 20000 nM 。

將 100 微升之適當的藥物稀釋液及 100 微升之稀釋酶以吸管加入含膠原薄膜 (以 ^{14}C - 膠原標示) 的 96 凹槽盤中。最後的酶濃度為 $0.3 \mu g / ml$ ，而最後的藥物濃度為 0.1 、 1.0 、 10 、 100 、 1000 nM 。將各藥物濃度及控制組各準備三組來分析。不含酶者以及含酶不含化合物者也同時準備三組。

將盤置於 37°C 中溫育一段時間以使約 $30 \sim 50\%$ 可用的膠原溶解 (可經由在不同的時間點計算附加的控制槽來決定)。大部分的情況下約需 9 小時的溫育時間。當此分析已充分進行後，自各凹槽中移除上清液並於一閃爍計數器中計數。自各樣本中減去背景計數 (由不含酶之凹槽的計數來決定)，而釋出百分比是由僅含酶而不含抑制劑的凹槽的相關數值計算出的。將各時間點的三組數值加以平均並將數據以釋出百分率對藥物濃度來作圖。 IC_{50} 值是在以放射標示之膠原的釋出有 50% 受到抑制時的時間點處取得的。本分析 (I 型膠原) 之實施例 1 - 3 的 IC_{50} 值列於表 2 中。

爲了決定軟骨狀況介質中之活性膠原酶的特性必須利用做爲受質的膠原、含膠原活性的軟骨狀況介質及不同選

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(18)

擇性的抑制劑來進行分析。軟骨狀況介質是在發生軟骨降解時所收集的且因此可做為膠原酶負責膠原分解的代表。依上述方法進行分析但是以軟骨狀況介質來做為酶的來源以取代重組之 MMP-13 或重組的 MMP-1。將相同的抑制劑進行分析並將它們的 IC₅₀ 值列於表 2 中。就如所預期的，實施例 1 之等效的 MMP-1 / MMP-13 抑制劑為一種軟骨膠原酶狀況介質活性的有效抑制劑。既然該化合物為此二種膠原酶的等效抑制劑，要確知在狀況介質中的這一種或二種酶是否是以活性種類存在是不可能的。然而，令人驚訝的是：二種構造上相異的 MMP-13 選擇性化合物（實施例 2 及 3）也都是軟骨狀況介質中之膠原酶活性的強力抑制劑，其 IC₅₀ 值表示 MMP-13 才是最主要的活性膠原酶而非 MMP-1。

表 2

實 施 例	MMP-1 螢 光 IC ₅₀ (nM)	MMP-1 I 型膠原 IC ₅₀ (毫微莫 耳濃度)	MMP-13 螢光 IC ₅₀ (nM)	MMP-13 I 型膠原 IC ₅₀ (nM)	軟骨狀況 介質 IC ₅₀ (nM)
1	2.5	3.5	1.5	1.5	10
2	17700	22000	5.4	52	220
3	21700	40000	70	40	400

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(19)

實施例 3

自牛鼻軟骨而來之由 I L - 1 所誘發的軟骨膠原降解作用

第三個實驗證實：帶 M M P - 1 3 / M M P - 1 選擇性的試劑大體上會抑制所有在軟骨外植物中之膠原軟骨的降解作用。此分析利用牛的鼻軟骨外植物，此外植物常用來測試不同化合物在抑制由 I L - 1 所誘發之蛋白聚糖的降解作用或由 I L - 1 所誘發之膠原降解作用方面的有效性。牛鼻軟骨是一種非常類似關節軟骨的組織，亦即：由間質包圍的軟骨細胞，它主要是 I I 型膠原及 aggrecan。使用此種組織是由於它：(1) 非常類似關節軟骨，(2) 相當穩定，(3) 相當均勻，及 (4) 在經由 I L - 1 刺激後會依可預期之動力學狀態進行降解。另外，本發明者發現：在牛鼻軟骨中，就如在人類關節軟骨中，I L - 1 刺激 M M P - 1 及 M M P - 1 3 二者及蛋白質之向上調整。

變化 1

在一個 2 4 凹槽培養盤的各凹槽中放入 3 塊牛鼻軟骨 (約 2 m m 直徑 × 1 . 5 m m 長) 。然後，在各凹槽中加入 1 毫升的不含血清的介質。將化合物在 D M S O 中製備成 1 0 m M 的貯存溶液，然後在不含血清的介質中適當地稀釋成最後濃度，如：5 0 、 5 0 0 及 5 0 0 0 n M 。將各濃度進行分析，每個濃度製備三組進行測試。

將人類重組之 I L - 1 α (5 n g / ml) (I L - 1

(請先閱讀背面之注意事項再
為本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (20)

) 加入三個控制組之凹槽以及各個含藥物的凹槽中。另外設立不含藥物以及 I L - 1 的控制組三份。移除介質並在第 6、12、18 及 24 天加入含 I L - 1 及適當之藥物濃度的新鮮介質，如需要時每 3 到 4 天更換一次介質。將從每個時間點移出之介質先貯存在 - 20 °C 下以供稍後的分析。當在僅有含 I L - 1 的凹槽中的軟骨幾乎完全被吸收時（約第 21 天），此實驗便終止了。將介質移出並貯存起來。將於各時間點自各凹槽中取出的溶液（100 微升）合併在一起以木瓜蛋白酶消化之並分析羥基脯氨酸的含量。自各數據點減去背景羥基脯氨酸（不含 I L - 1 及藥物之凹槽的平均值）並計算各濃度之三組樣本的平均值。將數據以 I L - 1 單獨之平均值的百分比表示出並製成圖形。I C₅₀ 值可由此圖形計算出。

變化 2

依上述變化 1 的步驟設立實驗直至第 12 天。在第 12 天，自各凹槽中移除狀況介質並冷凍之。然後，在各凹槽中加入 1 毫升含 0.5 μg / ml 胰蛋白酶的磷酸緩衝生理食鹽水（P B S）並在 37 °C 下繼續溫育 48 小時。在胰蛋白酶中溫育 48 小時後移除 P B S 溶液。將此 P B S / 胰蛋白酶溶液（50 μl）與前二次時間點（第 6 及 12 天）取的溶液一起收集、水解並決定羥基脯氨酸的含量。將背景羥基脯氨酸（不含 I L - 1 及藥物之凹槽的平均值）自各數據點減掉並計算各濃度之三組樣本的平均值。

（請先閱讀背面之注意事項再
 裝
 訂
 線

五、發明說明 (21)

均值。然後，將數據以 I L - 1 單獨的平均值百分比表示出來再製成圖形。I C₅₀可自此圖形中決定出來。在此變化中，實驗的時間長度縮短很多。在以 I L - 1 刺激後的第 1 2 天加入胰蛋白酶作用 4 8 小時很可能會釋出任何已被膠原酶活性損害但還沒自軟骨間質釋出的 I I 型膠原。沒有 I L - 1 刺激時，以胰蛋白酶處理僅會產生軟骨外植物中之低背景濃度的膠原降解作用。

在軟骨外植物分析中之實施例 1 - 3 的數據摘要表 3 中。爲了比較之用也將它們對 I 型膠原的 I C₅₀ 值包含在其中。由表 3 中可見到對 I I 型軟骨膠原之降解作用的抑制情形與 M M P - 1 3 受抑制的情形有很好的相關性但與 M M P - 1 受抑制的情形則沒有關聯。因此，並不只是在狀況介質中的活性膠原酶的抑制側面圖與 M M P - 1 3 受抑制的情況相關，由 I L - 1 所誘發之 I I 型軟骨膠原之降解作用受抑制的情況也與 M M P - 1 3 之受抑制的情況相關。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(22)

表 3

實施例	MMP-1 I 型膠原 IC ₅₀ (nM)	MMP-13 I 型膠原 IC ₅₀ (nM)	軟骨狀況 介質 IC ₅₀ (nM)	軟骨外植 物分析 IC ₅₀ (nM)	軟骨外植 物分析 IC ₅₀ (nM)
				變化 1	變化 2
1	3.5	1.5	10	60*	150
2	22000	52	220	900**	550
3	40000	40	400		830

*平均 IC₅₀ (變化 1 和 2) 實施例 1 = 90 ± 35 nM

**平均 IC₅₀ (變化 1 和 2) 實施例 2 =

725 ± 400 nM

許多傳統的給藥途徑都可用來給予哺乳動物(包括人類)本發明之藥物以抑制間質金屬蛋白酶,這些途徑包括:口服的、腸胃道外的(如:血管內、肌肉內或皮下的)、口頰的及局部的途徑。一般而言,活性化合物的給藥劑量約是治療主體每天每公斤體重 0.01 至 25 毫克間,以約 0.3 至 5 毫克/公斤較佳。該活性化合物以口服的或腸胃道外的途徑給予較佳。然而,某些劑量的改變需根據被治療之主體的狀況來改變。在任何情況下負責給藥的人必需決定適合於單獨個體之劑量。

此種活性化合物可以很多種不同的劑型來給予,一般而言,本發明之治療上有效的化合物是以濃度約為 5.0% 至 70% 重量的劑型存在。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (23)

在口服給藥方面，含不同賦形劑（如：微結晶纖維素、檸檬酸鈉、碳酸鈣、磷酸二鈣及甘油）的錠片可與不同的分解劑，如：澱粉（且以玉米、馬鈴薯或樹薯澱粉較佳），藻朊酸及某些複合的矽酸鹽，再加上顆粒化接合劑（如：聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖、凝膠、阿拉伯橡膠）一起使用。另外，潤滑劑（如：硬脂酸鎂、月桂基硫酸鈉及滑石粉）在製作錠片時也很有用。一種類似型態的固體組成物也可以做為膠束內的填充劑；與此類口服劑型相關之較佳物質也包括乳糖或牛奶糖以及高分子量的聚乙二醇。當口服懸浮液及／或，弛劑需要口服給藥時，活性成分可與不同的甜味劑或調味劑、染色劑、調色劑或塗料合併使用，而且，如需要時還可使用乳化劑、甘油及其不同之類似組合。在動物給藥方面，藥物以含於動物飼料或飲水中來給予動物較為方便，其濃度在 5 ~ 5 0 0 p p m 之間，以 2 5 至 5 0 0 p p m 較佳。

在腸胃道外之給藥方面（如：肌肉內、腹膜的皮下及血管內的用途），通常是製備一種活性成分的無菌注射溶液。也可以使用含於芝麻或花生油或水溶性丙二醇中之本發明的治療性化合物溶液。如需要時，這些水溶液應該先經過適當地調整及緩衝，其 p H 值以高於 8 較佳，而且，液體稀釋液需先經過等張處理才能使用。這些水溶液適合用於血管內注射。油性溶液適合用於關節內的肌肉內及皮下注射用途。這些溶液的製備過程都必須在無菌的狀況下並可以內行人士所熟知的標準藥學技術很容易地完成。在

（請先閱讀背面之注意事項再
寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明(24)

動物給藥方面，化合物可以肌肉內或皮下的途徑給予，其劑量約為0.1至50毫克/公斤/天，以0.2至10毫克/公斤/天之單一劑量給予或至多分成三次劑量給予較方便。

活性化合物也可製成直腸組成用的配方(如：栓劑或灌腸劑)，如：含傳統之栓劑基質，如：椰子油或其他甘油酯。

在鼻內給藥或以吸入方式給藥的方面，活性化合物以溶液或懸浮液的形式從一個唧筒噴霧容器遞送出來較方便，遞送藥物時可由病人將容器擠壓或打氣或者是利用一種合適的推進劑(如：二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它適合的氣體)將化合物自一個壓力化的容器或噴霧器中以氣溶膠噴霧的形式呈現。在壓力化氣溶膠的形式中，劑量單位為可以提供一片活瓣來決定遞送的劑量。壓力化的容器或噴霧器中可以含有一種活性化合物溶液或懸浮液。用於吸入器或吹藥器的膠束及藥筒(如：從凝膠製備而來者)可以製成含本發明化合物及適合之粉末基質(如：乳糖或澱粉)的粉末混合物配方。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

四、中文發明摘要 (發明之名稱：用來治療或預防骨關節炎的藥學組成物)

本發明關於間質金屬蛋白酶 - 13 選擇性試劑在治療或預防骨關節炎及其它以間質金屬蛋白酶居間之病症上的用途。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

英文發明摘要 (發明之名稱：)

PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATING OR PREVENTING
OSTEOARTHRITIS

The present invention relates to the use of matrix metalloproteinase-13 selective agents for the treatment or prevention of osteoarthritis and other matrix metalloproteinase-mediated disorders.

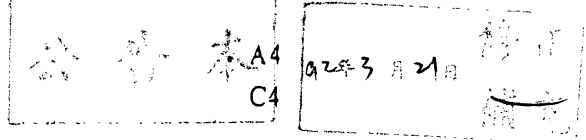
訂

線

附件二 A: 第 87117632 號專利申請案修正後無劃線之
中文說明書替換頁

民國 92 年 3 月 21 日修正

申請日期	87 年 10 月 23 日
案 號	87117632
類 別	A61k 31/44



(以上各欄由本局填註)

541176

發 明 專 利 說 明 書

一、發明 名稱	中 文	用來治療或預防骨關節炎的藥學組成物
	英 文	Pharmaceutical composition for treating or preventing osteoarthritis
二、發明 創作人	姓 名	(1) 金·麥克露爾 McClure, Kim Francis (2) 羅理·駱培斯地-莫羅 Lopresti-Morrow, Lori Lynn (3) 彼德·米其爾 Mitchell, Peter Geoffrey
	國 籍	(1) 美國康乃狄格州·密士提克·學校街第四公寓 6 School Street, Apartment #4, Mystic, CT 06355, U.S.A.
	住、居所	(2) 美國康乃狄格州沙倫仙女湖路二十六號 26, Fairy Lake Road, Salem, Connecticut 06420, U.S.A. (3) 美國康乃狄格州米斯提克格德飛路五號 5, Godfrey Street, Mystic, Connecticut 06355, U.S.A.
三、申請人	姓 名 (名稱)	(1) 輝瑞製品股份有限公司 Pfizer Products Inc.
	國 籍	(1) 美國
	住、居所 (事務所)	(1) 美國康乃狄克州格洛頓艾斯頓波因特路 Eastern Point Road, Groton, CT 06340, U.S.A.
	代 表 人 姓 名	(1) 艾倫·史匹戈爾 Spiegel, Allen J.

裝 訂 線

五、發明說明(7)

自如下之群體：

- 1 - { [4 - (4 - 氟苯氧基) 苯磺醯基] - 吡啶 - 3 - 基甲基 - 胺基 } - 環戊烷羧酸，
- 2 - { [4 - (4 - 氟苯氧基) 苯磺醯基] - 吡啶 - 3 - 基甲基 - 胺基 } - N - 羥基 - 2 - 甲基 - 丙醯胺，
(4 - 苄基 - 苄基) - [2 - (2, 2 - 二甲基 - 1 - 甲基胺甲醯基 - 丙基胺甲醯基) - 6 - 苯氧基 - 己基] 次磷酸，
- 2 - 胺基 - 3 - [4 - (4 - 氟苯氧基) 苯磺醯基] - N - 羥基 - 丙醯胺，
- N - 羥基 - 2 - [(4 - 苄氧基 - 苯磺醯基) - 吡啶 - 3 - 基甲基 - 胺基] - 乙醯胺，
- N - 羥基 - 2 - [(4 - 苯氧基 - 苯磺醯基) - 吡啶 - 3 - 基甲基 - 胺基] - 乙醯胺，
(4 - 苄基 - 苄基) - { 2 - [2 - (4 - 甲氧基 - 苯基) - 1 - 甲基胺甲醯基 - 乙基胺甲醯基] - 6 - 苯氧基 - 己基 } - 次磷酸，
- 3 - [4 - (4 - 氟苯氧基) 苯磺醯基] - 2, N - 二羥基 - 丙醯胺，
- 2 - { 1 - [4 - (4 - 氟苯氧基) 苯磺醯基] - 環丁基 } - 2, N - 二羥基 - 乙醯胺，
- 3 - (4 - 苯氧基苯磺醯基) - 7 - 氧雜雙環 [2 . 2 . 1] 庚烷 - 2 - 羧酸羥醯胺，
- 2 - [4 - (4 - 氟苯氧基) 苯磺醯基 - 胺基] - N - 羥基 - 2 - 甲基 - 丙醯胺，

五、發明說明(8)

1 - [4 - (4 - 氟苄氧基) - 苯磺醯基] - 2 - 羥基胺甲醯基 - 哌啶 - 4 - 羧酸，

4 - (4 ' - 氯聯苯 - 4 - 基) - 2 - [2 - (1 , 3 - 二酮基 - 1 , 3 - 二氫 - 異吡啶 - 2 - 基) 乙基] - 4 - 酮基丁酸，

4 - [4 - (4 - 氯苄氧基) 苯磺醯基甲基] - 四氫吡喃 - 4 - 羧酸羥醯胺，

(S) - α - [2 - (4 ' - 氯基 [1 , 1 ' - 聯苯] - 4 - 基) - 2 - 酮乙基] - 1 , 3 - 二氫 - 1 , 3 - 二酮基 - 2 H - 異吡啶 - 2 - 丁酸；

4 - [4 - (4 - 氯苄氧基) 苯磺醯基甲基] - 四氫吡喃 - 4 - (N - 羥基羧醯胺) ， 及

3 (S) - N - 羥基 - 4 - (4 - ((吡啶 - 4 - 基) 氧基) 苯磺醯基) - 2 , 2 - 二甲基 - 四氫 - 2 H - 1 , 4 - 噁嗪 - 3 - 羧醯胺，

或其藥學上可接受的鹽。

本發明也關於一種用來治療或預防上述疾病的藥學組成物，它包含了一種膠原酶 - 3 抑制有效量之膠原酶 - 3 選擇性抑制劑或其藥學上可接受的鹽。

本發明的詳細說明

膠原酶抑制劑，其中之 MMP - 13 / MMP - 1 選擇性比例未知，可依本領域中一般技術人士所熟知之方法來製備。特別是，帶有廣活性的膠原酶抑制劑及它們的製備方法在下列文獻中所有說明：① P C T 文

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

附件二 B： 第 87117632 號專利申請案修正後無畫線之
中文申請專利範圍替換本

民國 92 年 4 月 30 號修正

1. 一種用來治療或預防哺乳動物骨關節炎的藥學組成物，包括含量足以抑制膠原酶 - 3 的膠原酶 - 3 選擇性抑制劑，其中該抑制劑為選自如下群體的化合物：

1 - { [4 - (4 - 氟苯氧基) 苯磺醯基] - 吡啶 - 3 - 基甲基 - 胺基 } - 環戊烷羧酸，

2 - { [4 - (4 - 氟苯氧基) 苯磺醯基] - 吡啶 - 3 - 基甲基 - 胺基 } - N - 羥基 - 2 - 甲基 - 丙醯胺，

(4 - 苄基 - 苄基) - { 2 - (2 , 2 - 二甲基 - 1 - 甲基胺甲醯基 - 丙基胺甲醯基) - 6 - 苯氧基 - 己基 } 次膦酸，

2 - 胺基 - 3 - [4 - (4 - 氟苯氧基) 苯磺醯基] - N - 羥基 - 丙醯胺，

N - 羥基 - 2 - [(4 - 苄氧基 - 苯磺醯基) - 吡啶 - 3 - 基甲基 - 胺基] - 乙醯胺，

N - 羥基 - 2 - [(4 - 苯氧基 - 苯磺醯基) - 吡啶 - 3 - 基甲基 - 胺基] - 乙醯胺，

(4 - 苄基 - 苄基) - { 2 - [2 - (4 - 甲氧基 - 苄基) - 1 - 甲基胺甲醯基 - 乙基胺甲醯基] - 6 - 苯氧基 - 己基 } - 次膦酸，

3 - [4 - (4 - 氟苯氧基) 苯磺醯基] - 2 , N - 二羥基 - 丙醯胺，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

六、申請專利範圍

2 - { 1 - [4 - (4 - 氟苯氧基) 苯磺醯基] - 環丁基 } - 2 , N - 二羥基 - 乙醯胺 ,

3 - (4 - 苯氧基苯磺醯基) - 7 - 氧雜雙環 [2 . 2 . 1] 庚烷 - 2 - 羧酸羥醯胺 ,

2 - [4 - (4 - 氟苯氧基) 苯磺醯基 - 胺基] - N - 羥基 - 2 - 甲基 - 丙醯胺 ,

1 - [4 - (4 - 氟苄氧基) - 苯磺醯基] - 2 - 羥基胺甲醯基 - 哌啶 - 4 - 羧酸 ,

4 - (4 - 氯聯苯 - 4 - 基) - 2 - [2 - (1 , 3 - 二酮基 - 1 , 3 - 二氫 - 異吡啶 - 2 - 基) 乙基] - 4 酮 - 基丁酸 ,

4 - [4 - (4 - 氯苯氧基) 苯磺醯基甲基] - 四氫吡喃 - 4 - 羧酸羥醯胺 ,

(S) - α - { 2 - (4 - 氯基 [1 , 1 - 聯苯] - 4 - 基) - 2 - 酮乙基 } - 1 , 3 - 二氫 - 1 , 3 - 二酮基 - 2 H - 異吡啶 - 2 - 丁酸 ;

4 - [4 - (4 - 氯苯氧基) 苯磺醯基甲基] - 四氫吡喃 - 4 - (N - 羥基羧醯胺) , 及

3 (S) - N - 羥基 - 4 - (4 - ((吡啶 - 4 - 基) 氧基) 苯磺醯基) - 2 , 2 - 二甲基 - 四氫 - 2 H - 1 , 4 - 噁嗪 - 3 - 羧醯胺 ,

或其藥學上可接受的鹽。

2 . 如申請專利範圍第 1 項之藥學組成物 , 其中該哺乳動物為人類。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂