200920354

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：97133649

※ 申請日期：97.9.2

※IPC 分類：~~A61K~~;C07D A61K 31/404 (2006.01) 209/42 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)

一、發明名稱：（中文/英文）

抗粥狀動脈血栓化合物及血管升壓素轉化酶抑制劑之聯結

ASSOCIATION BETWEEN AN ANTI-ATHEROTHROMBOTIC COMPOUND AND AN ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME INHIBITOR

二、申 請 人：（共 1 人）

姓名或名稱：（中文/英文）

法商施維雅藥廠

LES LABORATOIRES SERVIER

代表人：（中文/英文）

奧迪理 歐司特曼

OSTERMANN, ODILE

住居所或營業所地址：（中文/英文）

法國庫貝佛依市防禦區12號

12, PLACE DE LA DEFENSE, 92415 COURBEVOIE CEDEX, FRANCE

國　籍：（中文/英文）

法國　FRANCE

三、發明人：（共 7 人）

姓　名：（中文/英文）

1. 東尼　維伯倫
   VERBEUREN, TONY
2. 派翠西亞　桑希維絲堤-莫瑞
   SANSILVESTRI-MOREL, PATRICIA
3. 艾倫　盧平
   RUPIN, ALAIN
4. 瑪莉-歐迪理　瓦雷
   VALLEZ, MARIE-ODILE
5. 瑪莉-多米尼克　法特奇
   FRATACCI, MARIE-DOMINIQUE
6. 勞倫斯　藍德
   LEROND, LAURENCE
7. 吉伯特　拉維樂
   LAVIELLE, GILBERT

國　籍：（中文/英文）

1. 比利時　BELGIUM
2. 法國　FRANCE
3. 法國　FRANCE
4. 法國　FRANCE
5. 法國　FRANCE
6. 法國　FRANCE
7. 法國　FRANCE

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. 法國；2007年09月11日；07.06345

2.

☐ 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。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於抗粥狀動脈血栓化合物及血管升壓素轉化酶抑制劑(ACEI)之聯結，且亦係關於含有抗粥狀動脈血栓化合物及血管升壓素轉化酶抑制劑之醫藥組合物。

更特定言之，本發明係關於TP受體之特定拮抗劑與ACEI之聯結。令人驚訝的是，吾人已確定此聯結使得可能抑制E-選擇素基因、發炎機構中包含之115 kDa之附著分子之表現，事實上，發炎性組織中E-選擇素被過度表現，其為諸如糖尿病、血管栓塞、高血壓、肥胖症、阿滋海默症(Alzheimer's disease)等各種病理學之特徵。

【先前技術】

更確切地說，E-選擇素促進白血球與內皮細胞之間可逆附著，其構成用於任何發炎性過程之必不可少的先決條件(Frenette P.S. and Wagner D.D., Insights into selectin function from knockout mice, 1997, Thromb. and Haem., 78, 60-64)。此步驟，稱作"滾動"，使來自選擇素族(P-選擇素(或CD62P)及E-選擇素(或CD62E或ELAM，代表"內皮白血球附著分子"))之附著分子之內皮細胞表面處的誘發成為必要，來自選擇素族之附著分子接著與其白血球配位子交互作用("唾液酸化碳水化合物配位子"、"P-選擇素醣蛋白配位子1"或PSGL1)。因此，血管內皮壁上白血球滾動級數被減緩。接著為緊密附著步驟，稱作"黏銃"，此步驟期間白血球將自身固定至血管表面。最終，白血球經由趨化

性因子(TNF-α, IL-1, IL-8)之梯度而穿過血管壁向發炎性組織遷移(血球滲出)。

注意到E-選擇素表現係限於內皮且響應於諸如IL-1、TNF-α或細菌脂多醣(LPS)之發炎性刺激係重要的。刺激作用後E-選擇素在細胞表面之存在水準最大為4至6小時。因為細胞刺激作用後合成重生，所以此週期較長。活化後24小時，E-選擇素之水準返回其基線水準，但在活體內確定情況下，E-選擇素在細胞表面處持續得更長。

存在各種附著分子(包括E-選擇素)之循環形式。此等可溶形式可能由薄膜處緊靠插入點處之酶促分裂產生。此等可溶分子之數量與內皮細胞表面處存在之附著分子水準相關聯(Leeuwenberg JFM, Smeets EF, Neefjes JJ等人，E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by human endothelial cells in vitro, 1992, Immunology, 77, 543-549)。因此，可溶附著分子(更特定言之，E-選擇素)之循環水準之增加指示內皮細胞之活化作用(Smith CW, Potential significance of circulating E-selectin, 1997, Circulation, 95, 1986-1988)。

肥胖症中已確定血漿E-選擇素水準之增加且已證實與身體質量指數之正相關(Ferri C, Desideri G, Valenti等人，Early upregulation of endothelial adhesion molecules in obese hypertensive men, 1999, Hypertension, 34, 568-573)。此等患者之心臟血管系統中增加之氧化壓力及/或諸如(例如)與內皮接觸之胰島素之代謝刺激可解釋此等現象。事

實上，E-選擇素水準與血管風險之間的關聯亦存在於罹患I型或II型糖尿病之糖尿病患者中(Bannan S, Mansfield MW, Grant PJ, Soluble vascular cell adhesion molecule-1 and E-selectin levels in relation to vascular risk factor and to E-selectin genotype in the first degree relatives of NIDDM patients and in NIDDM patients, 1998, Diabetologia, 41, 460-466)。此外，E-選擇素之水準被認為是與糖尿病相關聯之血管併發症之標記。胰島素抵抗力、高血糖症及高胰島素血症增加E-選擇素表現，藉此解釋在此等患者中觀察到之動脈粥樣硬化誘因。

在高血脂患者中已廣泛發現循環E-選擇素水準之增加，在降血脂治療後此等水準降低(Hackman A, Abe Y, Insull W等人，Levels of soluble cell adhesion molecules in patients with dyslipemia, 1996, Circulation, 93, 1334-1338)。此暗示膽固醇水準影響可溶E-選擇素水準。事實上嚴重血脂異常確實致使內皮功能異常，且在內皮細胞中E-選擇素表現增加。

許多研究已表明E-選擇素之水準及表現與血膽甾醇過多及動脈粥樣硬化之間的相關性。由於E-選擇素合成係藉由細胞因子誘發之事實，E-選擇素水準之增加可為血管炎症之標記。

許多研究亦證實在罹患慢性靜脈病症之患者中，靜脈高血壓導致內皮細胞之活化且因此附著分子之循環水準增加。(Saharay M, Shields DA, Georgiannos SN等人，Endothelial activation in patients with chronic venous disease, 1998, Eur J Vasc Surg, 15, 342-349;Verbeuren TJ, Bouskela E, Cohen RA等人，

Regulation of adhesion molecules：a new target for the treatment of chronic venous insufficiency, 2000, Microcirculation, 7, S41-S48)。

此外，高血壓患者中亦描述增加之E-選擇素水準(Ferri C, Bellini C, Desideri G等人，Clustering of endothelial markers of vascular damage in human salt-sensitive hypertension. Influence of dietary sodium load and depletion, 1998, Hypertension, 32, 862-868)。

類似地，文獻中許多參考作品描述E-選擇素在腎系統併發症中的角色(Singbartl K, Ley K, Protection from ischemia-reperfusion induced severe acute renal failure by blocking E-selectin, 2000, Crit. Care. Med., 28(7), 2507-2514, Nakatani K, Fujii H, Hasegawa H等人，Endothelial adhesion molecules in glomerular lesions:association with their severity and diversity in lupus models, 2004, Kidney Int., 65(4), 1290-1300)。

亦在罹患阿滋海默症之患者中證實E-選擇素之涉入，在此等患者中已觀察到E-選擇素水準升高(Borroni B, Volpi R, Martini G, Del Bono R, Archetti S, Colciaghi F, Akkawi NM, Di Luca M, Romanelli G, Caimi L, and Padovani A, Peripheral blood abnormalities in Alzheimer Disease:Evidence for early endothelial dysfunction, 2002, Alzheimer's disease and Associated disorders, 16 (3), 150-155)。

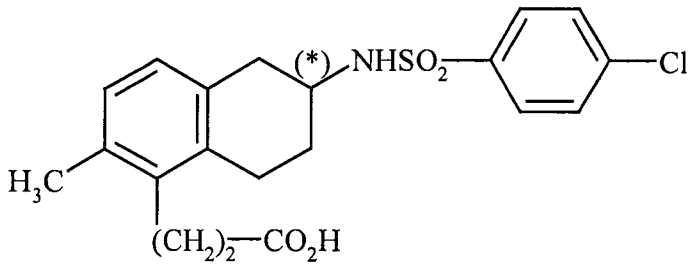
最終，許多公開案證實在轉移過程及因此在癌症中E-選擇素水準之涉入(Kobayashi H, Boelte KC, Lin PC, Endothelial Cell Adhesion Molecules and Cancer Progression, 2007, Current

Medical Chemistry, 14, 377-386; Kneuer C, Ehrhardt C, Radomski MW, Bakowsky U, Selectins-potential pharmacological targets?, 2006, Drug Discovery Today, Vol.11, N°21/22, 1034-1040)。

【發明內容】

本發明係關於抗粥狀動脈血栓化合物及血管升壓素轉化酶抑制劑(ACEI)之聯結，其中

抗粥狀動脈血栓化合物為式(I)之化合物(A)：



(I)

呈外消旋形式或呈光學純異構體形式，或其醫藥學上可接受之加成鹽形式。描述於專利說明書EP 648741中，此化合物為TP受體之有效拮抗劑，更特定為凝血脂素A2及前列腺素-內過氧化物受體(PGG_2-PGH_2)之特定拮抗劑。而且已展示此化合物在糖尿病動脈粥樣化Apo $E^{-/-}$小鼠中顯著減少附著分子VCAM-1之內皮表現(Zuccollo A, Shi C, Mastroianni R等人，The thromboxane A2 receptor antagonist S 18886 prevents enhanced atherogenesis caused by diabetes mellitus, 2005, Circulation, 112, 3001-3008)。

【實施方式】

血管升壓素轉化酶抑制劑(ACEI)係自以下化合物中(不意味任何限制)選出：培哚普利(視情況以其活性代謝物培

哚普利酸形式)、雷米普利(視情況以其活性代謝物雷米普利酸形式)、依那普利(視情況以其活性代謝物依那普利酸形式)、卡托普利、賴諾普利、地拉普利、福辛普利、喹那普利、螺普利、咪達普利、群多普利(視情況以其活性代謝物群多普利酸形式)、貝那普利、西拉普利、替莫普利、阿拉普利、西羅普利、莫維普利及莫西普利，及其具有醫藥上可接受酸或鹼之加成鹽。可注意到某些ACEI抑制被灌輸血管升壓素II之Apo $E^{-/-}$小鼠之內皮細胞中附著分子表現之誘發(da Cunha V, Tham DM, Martin-McNulty B等人，Enalapril attenuates angiotensin II-induced atherosclerosis and vascular inflammation, 2005, Atherosclerosis, 178, 9-17)。

藉由研究凝血脂素A_2-TP受體與腎素-血管升壓素系統之間的交互作用，吾人已證實關於附著分子表現之此等途徑之實質綜效。

外達成此目的，以對藉由人體內皮細胞中TNF-α誘發之E-選擇素表現無效應之濃度來使用TP受體之拮抗劑。接著在多種ACEI之各種類似減能濃度情況下測試彼相同濃度。接著伴隨兩種化合物聯結，觀察到由人體內皮細胞中TNF-α誘發之E-選擇素表現之顯著降低，證實兩種化合物之間未被預見之綜效。

在大鼠中的血栓症及動脈壓力測試中亦證實此協同效應。在彼測試期間表明，在化合物(B)存在情況下，式(I)之化合物(A)之抗血栓活性被增強且以極實質且完全不可預見之方式增加。此測試亦證實式(I)之化合物(A)之存在使

化合物(B)之抗高血壓效應以實質且不可預見之方式增強。

式(I)之化合物(A)與化合物(B)之聯結亦使得可能明顯且實質地減小糖尿病動脈粥狀硬化小鼠模型中主動脈中血管細胞附著分子1(VCAM-1)及腎臟中纖維聯結蛋白之表現。

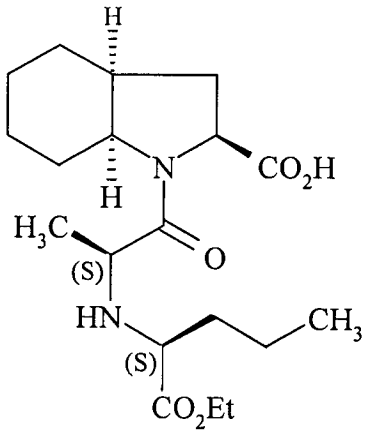
此等結果使得可能展望一種聯結[TP受體拮抗劑/ACEI]在製造用於治療血管併發症，更特別是心臟血管及腦血管併發症，與糖尿病、粥狀動脈血栓症、高血脂症、高血壓、慢性靜脈病症、炎症、與肥胖症相關聯之代謝症候群、或與癌症相關聯之併發症之藥劑的用途。在粥狀動脈血栓症中，根據本發明之組合物在心肌梗塞、心絞痛、腦血管意外、主動脈瘤或下肢動脈炎之治療中尤其有用。此外，與糖尿病、高血壓或炎症相關聯之腎病亦指示[TP受體拮抗劑/ACEI]聯結尤其有用。最終，糖尿病性視網膜病變亦屬於本發明之較佳治療適應症。

諸如高血壓、肥胖症、糖尿病、心臟病、腦血管病及高血脂以及動脈粥狀硬化之血管風險因素及血管病涉及諸如阿滋海默症及血管性癡呆之癡呆起源(Qiu C., De Ronchi D. and Fratiglioni L., The epidemiology of the dementias: an update, 2007, Current Opinion in Psychiatry, 20, 380-385)。此外，在諸如阿滋海默症之神經退化疾病中，已觀察到異構前列腺素(isoprostane)之量增加。此等異構前列腺素為氧化壓力之標記及介體，氧化壓力可能為疾病之起源點(Montuschi P., Barnes PJ. and Jackson Roberts II L., Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress, 2004, The FASEB Journal, 18, 1791-

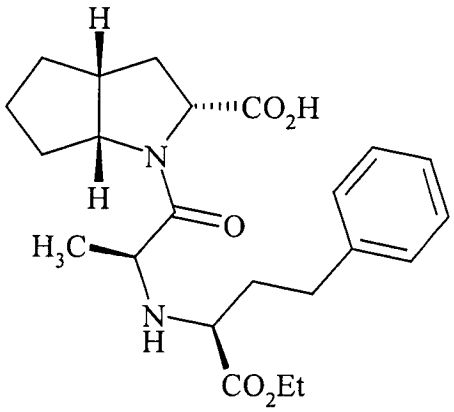
1800)。異構前列腺素係藉由刺激TP受體來發揮其至少部分活性(Montuschi P., Barnes PJ. and Jackson Roberts II L., Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress, 2004, The FASEB Journal, 18, 1791- 1800)，因此其活性可被本發明之聯結阻斷。

如本專利申請案中所描述之研究證實，本發明之聯結作用於血管疾病，其為癡呆之風險因素。

較佳之ACEI為式(B)之培哚普利及式(C)雷米普利，以及其鹽，更特別是式(B)之培哚普利及其鹽。



(B)



(C)

在培哚普利之加成鹽中，可提及(不意味限於)諸如第三丁胺、精胺酸、鈉、鉀等之鹽的具有醫藥上可接受之鹼之加成鹽。

培哚普利較佳為第三丁胺鹽或精胺酸鹽之形式。

在根據本發明之聯結中，化合物(A)較佳為3-[(6R)-6-[[(4-氯苯基)磺醯基]胺基]-2-甲基-5,6,7,8-四氫萘-1-基]丙酸，亦稱為特魯曲班(terutroban)。亦可展望涉及諸如伊非

曲班或雷馬曲班之其他TP受體拮抗劑之類似聯結。

在化合物(A)之加成鹽中，可提及(不意味限於)諸如鈉、鉀、第三丁胺、二乙胺等之鹽的具有醫藥上可接受之鹼之加成鹽。特魯曲班之鈉鹽更加尤其較佳。

在根據本發明之醫藥組合物中，ACEI之含量及TP受體拮抗劑之含量與此等活性成份之本性匹配，且因此其相對比例作為活性成份之函數而可變化。

當化合物(A)為鈉鹽形式之特魯曲班且ACEI為第三丁胺或精胺酸鹽形式之培哚普利時，此等比例關於培哚普利為活性成份之總重量之10%至40%且關於特魯曲班為活性成份之總重量之60%至90%。

關於聯結之較佳百分比為15%至25%第三丁胺鹽形式之培哚普利比75%至85%鈉鹽形式之特魯曲班，及20%至30%精胺酸鹽形式之培哚普利比70%至80%鈉鹽形式之特魯曲班。

本發明亦係關於包含化合物(A)與ACEI聯結之醫藥組合物，化合物(A)與ACEI之一者或兩者視情況為醫藥上可接受鹽之形式，具有一或多個適當、惰性、非毒素載劑或賦形劑。

在根據本發明之醫藥組合物中，活性成份之重量比例(與組合物總重量相比的活性成份重量)為自5%至50%。

關於醫藥上可接受賦形劑，可提及(不意味限於)黏合劑、稀釋劑、崩解劑、穩定劑、防腐劑、潤滑劑、芳香劑、香味劑或甜味劑。

在根據本發明之醫藥組合物中，將更特別地選擇彼等適

用於口服、非經腸且尤其靜脈內、經皮或由皮膚、鼻、直腸、經舌、眼睛或呼吸道途徑而投藥之醫藥組合物，更特定地說，錠劑或糖衣藥丸、舌下錠、硬膠囊、直腸投藥劑型、膠囊、口含劑、注射製劑、氣溶膠、滴眼劑、滴鼻劑、栓劑、乳霜、軟膏劑、皮凝膠等。

較佳投藥途徑為口服途徑且相應醫藥組合物可允許活性成份之瞬時或延緩釋放。

較佳醫藥組合物為錠劑。

可根據病症之本性及嚴重性、投藥途徑以及患者年齡及體重來改變單位劑量。在根據本發明之組合物中化合物(A)在自1 mg至100 mg之範圍內且在根據每24小時一或多次投藥中之ACEI之本性之組合物中化合物(A)在自0.5 mg至100 mg之範圍內。當ACEI為培哚普利時，在一或多次投藥中施用之日劑量在自0.5 mg至20 mg之範圍內。

下文非限制性地給出組合物實例。

特魯曲班/培哚普利錠劑：

實例1：

組成	含量 (mg)
特魯曲班鈉鹽	30
培哚普利第三丁胺鹽	8
疏水性矽膠	0.4
澱粉	6
硬脂酸鎂	2
微晶纖維素	50
乳糖	103.6
錠劑總量	200

實例2：

組成	含量(mg)
特魯曲班鈉鹽	30
培哚普利精胺酸鹽	10
疏水性矽膠	0.4
澱粉	6
硬脂酸鎂	2
微晶纖維素	50
乳糖	101.6
錠劑總量	200

藥理結果

關於E-選擇素表現之活體外抑制

1) 細胞培養

研究係在人體內皮細胞HUVEC(人臍靜脈內皮細胞，Clonetics Co)上進行。在補充有2% FCS(胎牛血清)及EGM2(內皮生長培養基，Clonetics Co)之EBM2培養基(內皮基本培養基，Clonetics Co)中培養細胞。

2) E-選擇素啟動子選殖

a) 藉由PCR擴增啟動子

在-800至+50位置處(入藏登記號M64485；Tamaru等人，E-selectin gene expression is induced synergistically with the coexistence of activated classic protein kinase C and signals elicited by interleukin-1β but not tumor necrosis factor-α, 1999, J. Biol. Chem, 274, 3753-3763)之核苷酸擴展之850bp片段(對應於人類E-選擇素啟動子)藉由PCR擴增且次選殖。在100 μl之最終反應容量中，在1 μg人類染色

體組DNA(Clontech)、200 μM dNTP(脫氧核苷酸三磷酸)(Clontech)及200 ng引子存在之情況下將5單位原生嗜熱菌(Pyrococcus furiosus) (Pfu) DNA聚合酶(Stratagene)置放入含有對酶有特效之緩衝液之培養基中。所使用之引子集合如下：

5'-GGATCCGGTACCGAGATGGCGTTTCTCCATGT (SEQ ID No. 1)及

5'-GAGCTTAAGCTTCTGTCTCAGGTCAGTATAGG (SEQ ID NO. 2)

PCR程式(在Gene Amp PCR系統9700裝置上)包含在94℃下引發1分鐘且接著擴增35個循環(94℃下1分鐘、55℃下1分鐘、72℃下3分鐘)。接著在pH 5.2之0.3M乙酸鈉及乙醇存在之情況下將PCR產物在-20℃下沈澱隔夜。在4℃、14000 rpm下離心後，將沈降物在70%乙醇中再懸浮且再次在4℃、14000 rpm下離心。接著將所獲得之沈降物乾燥且隨後溶解於水中。

b) 啟動子序列之消化

接著藉由限制酶Kpn I及Hind III在兩個步驟中消化經擴增之序列。在30單位酶及100 μg/ml的BSA(牛血清白蛋白)存在情況下於37℃下消化經擴增之序列1小時30分鐘。在每一消化過程後，在Micro Bio-Spin®層析管柱(Bio-Rad)上系統地純化所獲得之產物以移除緩衝鹽。

c) PGL3/E-選擇素質體之構建

根據與用於插入物相同之協定藉由限制酶Kpn I及Hind