

申請日期	91 年 12 月 25 日
案 號	91137339
類 別	A61K 45/16

A4
C4

200301135

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書

一、發明 名稱	中 文	包含多功能性磷酸二酯酶抑制劑及腺苷攝入抑制劑之藥學組成物
	英 文	Pharmaceutical compositions comprising a multifunctional phosphodiesterase inhibitor and an adenosine uptake inhibitor
二、發明 創作人	姓 名	(1) 劉永吉 Liu, Yongge (2) 孫賓 Sun, Bing (3) 吉武康弘 Yoshitake, Masuhiro
	國 籍	(1) 美國馬里蘭州日爾曼鎮維吉尼亞松木巷二一二〇四號 21204 Virginia Pine Terrace, Germantown, MD 20876, U.S.A.
	住、居所	(2) 美國馬里蘭州蓋勒斯堡帕拉姆斯大道一一六一六號 11616 Paramus Drive, Gaithersburg, MD 20878, U.S.A. (3) 美國馬里蘭州波多馬克雪丘廣場八七〇九號 8709 Snowhill Ct., Potomac, MD 20854, U.S.A.
三、申請人	姓 名 (名稱)	(1) 大塚馬里蘭研究機構股份有限公司 Otsuka Maryland Research Institute, Inc.
	國 籍	(1) 美國
	住、居所 (事務所)	(1) 美國馬里蘭州洛克維爾研究大道二四四〇號 2440 Research Boulevard, Rockville, MD 20850, U.S.A.
	代 表 人 姓 名	(1) 上林純一 Kabayashi, Jun-ichi

裝 訂 線

申請日期	91 年 12 月 25 日
案 號	91137339
類 別	

A4
C4

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書
新 型

一、發明 名稱	中 文	
	英 文	
二、發明 創作人	姓 名	(4) 上林純一 Kambayashi, Jun-ichi
	國 籍 住、居所	(4) 美國馬里蘭州波多馬克柏班克大道一〇七〇一號 10701 Burbank Drive, Potomac, MD 20854, U.S.A.
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:	, <input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無主張優先權
美國	2001年12月27日	60/342,367	<input checked="" type="checkbox"/> 有主張優先權
美國	2002年9月23日	60/412,546	<input checked="" type="checkbox"/> 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

五、發明說明 (1)

技術領域

本發明係有關包括至少一種多功能性磷酸二酯酶抑制劑 (MPDEI) 及至少一種腺苷攝入抑制劑之藥學組成物。MPDEI 為一種藥劑，其至少可抑制地 III 型磷酸二酯酶 (PDE3) 和腺苷攝入 (例如西洛他唑)。本發明也有關使用該組成物治療多種徵候和疾病包括與周圍動脈閉塞疾病 (PAOD) 相關聯的肢絕血症和間歇性跛行 (IC)，用以預防和治療中風，及用以預防冠狀動脈血栓形成和再狹窄等之方法。本發明提出使用該組成物以達到比單獨使用 MPDEIs，傳統 PDE3 抑制劑，或腺苷攝取抑制劑更增強的效力和效益及較低的副作用之方法。該等組成物增強抗血小板作用和血管擴張作用及避開的 MPDEIs 或 PDE3 抑制劑所具潛在強心副作用之能力也提供 MPDEIs (例如西洛他唑) 給患有 IC、中風、或冠狀動脈疾病和衝血性心臟衰竭 (CHF) 的病人更擴充的經證實的適應症和用法。

先前技術

PAOD 影響美國 (US) 高達 5% 的老年病人，而 PAOD 患者具有增高六倍因心臟和腦血管肇因致死之危險率。IC 為 PAOD 的經常性殘疾徵候。病人典型地會不舒適，走路時在受感腿部有不定的疼痛、痛苦或疲乏感之特徵。在美國只有兩種經認可的藥物可用來治療 IC。己酮可可豆鹼 (Pentoxifylline) 業經使用有二十年之久，但其指具有邊緣效益。西洛他唑 (Pletal®) ((6-[4-(1-環己烷基-1H-四唑-5-基)丁

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (2)

氧基]-3,4-二氫-2(1H))-喹啉酮)係在 1999 年為美國食品藥物署(FDA)獲准用於治療 IC。於無效對照樣對照試驗中，西洛他啶相較於無效對照樣和己酮可可豆鹼明顯地可改良在踏車上的最大行走距離。

西洛他啶於長久以來即用為環狀核苷酸 PDE3 抑制劑。環狀核苷酸，例如環狀腺苷單磷酸(cAMP)和環狀鳥苷單磷酸(cGMP)，在心血管系統內媒介許多細胞反應中扮有重要角色。環狀核苷酸的細胞內水平係由經平衡的兩族酵素所具活性所控制。腺苷酸環化酶和鳥苷酸環化酶係分別調節 cAMP 和 cGMP 的重新合成。相異者，11 種遺傳上有區別且各具不同生物化學和藥物學特性的 PDE 異形體(isoforms)可調節 cAMP 及 / 或 cGMP。PDE3 異形體在許多不同細胞內表現，包括心肌細胞，血管平滑肌細胞(VSMC)，和血小板。因此，PDE3 會分別影響心臟收縮力，VSMC 張力和增生，及血小板活性。PDE3 的抑制會造成肌肉內 cAMP 的選擇性蓄積，及蛋白質激酶(PKA)-誘導效應的增加。所以，在上述細胞內減低的 PDE3 活性會促成增加的心臟收縮，血管擴張，減少的細胞增生，及減弱的血小板聚集。西洛他啶對 IC 患者的有益效應大部份是歸因於 PDE3 抑制的血管擴張和抗-血小板聚集效應，雖則其他效應也可能有些作用。

PDE3 抑制劑通常對心臟施發增強收縮力(inotropic)和心肌變速(chronotropic)作用(亦即，增高的收縮力和心律)。事實上，PDE3 抑制劑業經證實會使 CHF 患者增加心輸出及減低肺充血。例如，二聯啖酮(milrinone)，一種原型 PDE3

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (3)

抑制劑，目前正在臨床上用於 CHF 的緊急治療。不過，二聯啖酮對於 CHF 患者的長期使用會伴隨著前節律不齊動作(可能因為 Camp-誘導的心臟收縮力過度增加所致(Packer, 1992; Thadani and Roden, 1998))。西洛他啖尚未經在美國的 IC 臨床試驗中證明會增加心肌致死，而在亞洲國家中則經證明有安全長期用途(NDA of Cilostazol, Otsuka America Pharmaceutical, Inc., 1997)。一般而言，在美國內 CHF 病人不會參與西洛他啖 IC 試驗，係因為運動-限制性 CHF 為一項排除準則之故。因此，在美國內只有相當少的 CHF 病人(且沒有嚴重 CHF 者)參與臨床試驗，且該藥物對此組病人的致死率之影響係未知者。不過，根據對於 PDE3 抑制劑例如二聯啖酮的先前臨床經驗，FDA 裁定西洛他啖限制用於任何嚴重度的 CHF 之患者。可惜者，IC 患者的群數可能與 CHF 重疊使得 PDE3 抑制的有益效應全盤不能為此等並所得。因此之故，開發新的藥物學作法以消除或減少西洛他啖和其他 PDE3 抑制劑所具潛在心臟副作用，因而可使西洛他啖治療所具效益能擴展到展現 IC 和心臟障礙的患者即具有其重要性。

發明內容

本發明係經由提出可抑制 PDE3 活性和腺苷攝取的要學組成物來解決此等需求。此等藥學組成物包括至少一種 MPDEI(例如西洛他啖)及至少一種腺苷攝入抑制劑(例如，雙嘧達莫)。於本發明中，該至少一種 MPDEI 及至少一種腺

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (4)

苷攝入抑制劑的組合可以增效方式作用以增加抗血小板效應和血管擴張，同時限制 PDE3 抑制的增強收縮力作用。該至少一種 MPDEI 及至少一種腺苷攝入抑制劑的組合在治療多種徵候和疾病包括 PAOD(例如 IC)，中風，和冠狀動脈血栓形成與再狹窄等之時應該比任一藥劑單獨使用者更為安全且更有效益。

圖式簡單說明

圖 1 闡示腺苷 ($1 \mu M$) 和西洛他啶 ($1 \mu M$) 對於膠原-誘導血小板聚集之增效作用。洗滌過的血小板係使用膠原 (1 微克/微升) 予以活化，如箭號所示者。

圖 2 闡示雙嘧達莫 (1, 3 和 $10 \mu M$) 與西洛他啶 (10 pM 到 $100 \mu M$) 對於洗滌過的血小板之血小板聚集的劑量相關增效作用。

圖 3 闡示雙嘧達莫 (1, 3 和 $10 \mu M$) 在腺苷 ($1 \mu M$) 和西洛他啶 (30 nM 和 100 nM) 存在中對於洗滌過的血小板之血小板聚集的增效作用。

圖 4 闡示西洛他啶 (30 nM 和 100 nM) 在腺苷 ($1 \mu M$) 和雙嘧達莫 (1, 3 和 $10 \mu M$) 存在中對於洗滌過的血小板之血小板聚集的增效作用。

圖 5 闡示雙嘧達莫 ($3 \mu M$) 和西洛他啶 ($3 \mu M$) 在腺苷 ($0.3 \mu M$ 和 $1 \mu M$) 存在中對於 PRP 血小板中細胞內 cAMP 水平增高之增效作用。

圖 6 闡示雙嘧達莫 (0.5、1.5 和 $10 \mu M$) 與西洛他啶 (1μ

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (5)

M)在腺苷($1 \mu\text{M}$)存在或不存在中對於腺苷 A_{2A} 表現性中國倉鼠卵巢(CHO)細胞的細胞內 cAMP 水平增高之增效作用。

圖 7 闡示雙嘧達莫(0.5 、 1.5 和 $10 \mu\text{M}$)與西洛他啉($3 \mu\text{M}$)在腺苷($1 \mu\text{M}$)存在或不存在中對於腺苷 A_{2A} 表現性中國倉鼠卵巢(CHO)細胞的細胞內 cAMP 水平增高之增效作用。

圖 8 闡示西洛他啉與二聯啖酮相比對於在人類血小板和紅血球內的細胞攝入之抑制作用的比較。

圖 9 闡示在全血液內於雙嘧達莫($1 \mu\text{M}$)存在或不存在中在膠原(2 微克/毫升)刺激下血漿內腺苷水平的增加情形。

圖 10 闡示雙嘧達莫(0.1 、 0.3 、 1 和 $3 \mu\text{M}$)和西洛他啉($10 \mu\text{M}$ 和 $30 \mu\text{M}$)對於以 0.5 微克/毫升膠原誘導全血液中血小板聚集之增效作用。

圖 11 闡示雙嘧達莫(1 和 $3 \mu\text{M}$)和低濃度西洛他啉(0.3 、 0.7 、 1 、和 $3 \mu\text{M}$)對於以 0.1 或 0.3 微克/毫升膠原誘導全血液血小板聚集之增效作用。

圖 12 闡示雙嘧達莫($\sim 1 \mu\text{M}$)和西洛他啉($\sim 1 \mu\text{M}$)對於活體外(ex vivo)全血液血小板聚集的抑制之增效作用。

圖 13 闡示研究西洛他啉和雙嘧達莫對於分離出的兔子 Langendorff 心的心臟功能的影響所用實驗方案。

圖 14 闡示西洛他啉(1 、 3 、和 $10 \mu\text{M}$)和雙嘧達莫(0.3 、 1 和 $3 \mu\text{M}$)單獨地或組合地對於收縮力(A)、心律(B)和冠狀動脈流速(C)的影響。

圖 15 闡示試驗低水平西洛他啉和雙嘧達莫的組合對於休息中、運動中(使用電刺激)，及經由閉塞股動脈及再注輸

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (6)

所致絕血中腓腸肌血流的影響所用實驗方案。

圖 16 闡示西洛他啞($1 \mu M$)和雙嘧達莫($1 \mu M$)的組合治療時相對於未處理肌肉，明顯增加運動後腓腸肌內的血流，及在絕血期後改良血流恢復的情形。

實施方式

發明詳細說明

本發明解決技藝中對於諸如 PAOD(例如 IC)、中風、冠狀動脈血栓形成，和再狹窄等狀況所用安全有效性藥學組成物的需要。西洛他啞可用來治療 IC 且經證明可以有效地預防中風(Gotoh, Tohgi, Hirai, Terashi, Fukuuchi, Otomo, Shinohara, Itoh, Matsuda, Sawada, Yamaguchi, Nishimaru, and Ohashi, 2000)，在冠狀動脈經皮轉腔冠狀動脈血管形成術(PYCA)之後的冠狀動脈血栓形成(Park, Lee, Kim, Lee, Park, Hong, Kim, and Park, 1999)與再狹窄(Tsuchikane, Fukuhara, Kobayashi, Kirino, Yamasaki, Izumi, Otsuji, Tateyama, Sakurai, and Awata, 1999)。西洛他啞可抑制 PDE3，且所得抗-血小板和血管擴張效應顯得有助於其治療作用。不過，PDE3 抑制的可能心臟副作用為一項顧慮。事實上，因為先前對於二聯啞酮的臨床經驗，西洛他啞被禁用於任何嚴重度的 CHF。

最近的研究指出西洛他啞具有不與二聯啞酮共有的意料外作用機制。事實上，西洛他啞業經證明可抑制在多種細胞包括室肌細胞、冠狀動脈平滑肌細胞、內皮細胞、紅

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (7)

血球，和血小板等的腺苷攝入。西洛他啉可在約 5-10 μ M 的 IC₅₀ 下抑制腺苷攝入。相異者，二聯啟酮在高達 100 μ M 的濃度下仍沒有明顯的抑制作用(Liu et al., 2000)。因為其抑制 PDE3 和腺苷攝入的能力，本案發明人乃視西洛他啉為一種 MPDEI。

腺苷酸射入的抑制具有重要性，因為腺苷酸會誘導廣範圍的生物效應包括血管擴張及血小板聚集的抑制之故。腺苷也會對心臟發出減弱收縮力和心肌變速作用。腺苷酸對於脈管系統和血小板的作用係由腺苷 A₂ 受體的活化所媒介。腺苷 A₂ 受體會促發 G_s 蛋白質而刺激腺苷酸環化酶及，因而，增加細胞內 cAMP 濃度。腺苷酸對於心肌的熟知抗-腺上素能效應係經由腺苷 A₁ 受體的活化所媒介。腺苷 A₁ 受體會促發 G_i 蛋白質而抑制腺苷酸環化酶及，因而，減低細胞內 cAMP 濃度(Dobson and Fenton, 1998; George et al., 1991; Narayan et al., 2000)。腺苷攝入的抑制會增加腺苷的間質水平和循環水平。細胞外腺苷的增加具有增加 PDE3 抑制的抗-血小板(Sun et al., 2001)和血管擴張效應及減弱 PDE3 抑制的增強收縮力效應(Wang et al., 2001)。腺苷對於 PDE3 抑制所引起的增強收縮力作用之潛在拮抗作用係經由西洛他啉所誘導相較於二聯啟酮較小的心收縮力增加(Cone et al., 1999)，及在分離的兔子心臟內腺苷 A₁ 拮抗劑增加西洛他啉的強心效用之能力(Wang, Cone, Fong, Yoshitake, Kambayashi, and Liu, 2001)而獲得證實。此外，腺苷業經指出為一種重要的局部心臟保護媒介劑(Downey et al., 1994)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (8)

，且經證明可以減弱骨骼肌和神經元中因絕血和再注輸所致傷害(Wang et al., 1996; Whetzel et al., 1997)。整體而言，腺苷可能在運動訓練所致跛行距離的增加上具有作用且可能對 IC-相關徵候施發有利的影響(Laghi et al., 1997; Pasini et al., 2000)。

西洛他唑對於腺苷攝入抑制的效力比其對於 PDE3 的抑制較低一數量級以上(5-10 μ M vs. 0.32 μ M)(Liu et al., 2000)。西洛他唑所引起的細胞外腺苷之增加，雖然足以衰減收縮力增強性及增強抗-血小板聚集，不過與強效腺苷攝入抑制劑雙嘧達莫(IC₅₀ 10 nM)所引起者相比則較為微弱。所以，一種增加西洛他唑治療 IC 的效力及減低潛在心臟副作用之治療作法為將 MPDEI 與至少一種腺苷攝入抑制劑(例如雙嘧達莫)相組合。本案申請人發現西洛他唑與一強效腺苷攝入抑制劑的組合所產生的抗-血小板效應大於 PDE3 抑制劑單獨者或腺苷攝入抑制劑單獨者的加成效應。確實，該組合可以產生對血小板功能的增效性抑制，因而肯定獨特作用機制的貢獻。再者，也發現該組合會減低西洛他唑單獨者的增強收縮力效應。此外，低水平西洛他唑和雙嘧達莫的組合可增加運動過的腓腸肌中的血流及在一段絕血期之後改良組織的流動恢復(而，於每一種藥物單獨的情況中，不會明顯地改變血液流動)。因此，所得組合對於涉及血小板聚集和血管收縮的疾病可以提供安全有效的治療。此等疾病包括 PAOD(例如 IC)，中風，和冠狀動脈血栓形成。此組合也可以用來治療因為西洛他唑對於平滑肌增生的

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (9)

抑制所造成的冠狀動脈再狹窄。

除了其對於 IC 的有益作用之外，西洛他啞也經證明可以有效地預防中風復發(Gotoh et al., 2000)。雖然不知道雙嘍達莫單獨時是否有效，不過雙嘍達莫與阿斯匹靈的組合現時正以 Aggrenox® (Boehringer Ingelheim)之名銷售用以預防中風。Aggrenox®的有異效用可歸因於雙嘍達莫與阿斯匹靈的加成性抗-血小板作用。有多種研究證明西洛他啞比其他抗-血小板藥劑例如阿斯匹靈較為優(Igawa et al., 1990; Matsumoto et al., 1999)。因為西洛他啞和雙嘍達莫可以增效地抑制血小板聚集，所以此兩種藥物的組合在對於中風的預防應該至少有同等效益。

西洛他啞業經成功地用來預防冠狀動脈 PTCA 後的血栓形成(Park et al., 1999)，及在有用或沒有使用撐開器(stent)的 PTCA 之後預防再狹窄(Tsuchikane et al., 1999)。西洛他啞和雙嘍達莫的組合應該可以經由減少有害的心臟副作用而至少與西洛他啞單獨者一樣有效且更安全。

於本發明一具體實例中，該組成物包括至少一種 MPDEI 及至少一種腺苷攝入抑制劑，其量能夠提供血小板聚集的增效性抑制。本發明另一具體實例為提出一種包括至少一種 MPDEI 及至少一種腺苷攝入抑制劑的組成物，其量為能夠提供細胞內 cAMP 水平的增效性提高。本發明也提出一種使用該組成物治療 PAOD(例如 IC)，中風，和冠狀動脈血栓形成與再狹窄之方法，以達到比單獨使用 PDE3 抑制劑或腺苷攝入抑制劑任一者治療時可能發生者較為增強的

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (10)

效力和效益及較少的副作用。

“PDE3 抑制劑”如本文中所用者，指的是一種能夠抑制或選擇性減低第 III 型 PDE 的活性之藥劑。本發明 PDE3 抑制劑可為可抑制 PDE3 的任何已知或待發現之化合物。可接受的 PDE3 抑制劑包括下列：聯吡啶類例如二聯吡啶酮和氨力農(氨利酮)(amrinone)；咪唑酮類例如派路西蒙(piroximone)和伊諾西蒙(enoximone)；咪唑琳類例如伊馬佐丹(imazodan)和 5-甲基-伊馬佐丹；二氫洛并酮類例如吲哚林丹(indolidan)和 LY181512；二氫喹啉酮化合物例如西洛他麥(cilostamide)，西洛他唑和 OPC3911；及其他化合物例如亞那貴賴(anagrelide)、本莫拉丹(bemoradan)、伊步狄拉(ibudilast)、異馬唑(isomazole)、利沙秦酮(lixazinone)、莫他皮酮(motapizone)、歐皮酮(olprinone)、酞秦醇(Phthlazinol)、皮莫本丹(pimobendan)、夸秦酮(quazinone)、西古唑丹(siguazodan)、和崔古辛(trequinsin)。

“MPDEI”如本文中所用者係指一種藥劑，其能抑制或選擇性地減低 PDE3 的活性且可以有效地阻斷腺苷傳輸到細胞內。本發明 MPDEI 可為可抑制 PDE3 且減低腺苷攝入的任何已知或待發現之多官能 PDE 抑制劑化合物。可接受的 MPDEI 包括西洛他唑和待發現的其他者。

“腺苷攝入抑制劑”如本文中所用者係指可以有效地阻斷腺苷傳輸到細胞內之任何藥劑。此等腺苷攝入抑制劑包括業經證明可抑制腺苷傳輸的已知化合物，彼等的類似物和衍生物，以及其他待發現的腺苷攝入抑制劑。可接受的腺

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (11)

苷攝入抑制劑包括：雙嘧達莫、波本飛林(propentofylline)；狄拉哲(dilazep)；硝基苯甲硫基肌苷(nitrobenzylthioinosine)；S-(4-硝基苯甲基)-6-硫代鳥嘌呤；S-(4-硝基苯甲基)-6-硫代肌苷；碘基羥基硝基苯甲基硫代肌苷；麥費拉秦(mioflazine)；和彼等的酯類、醯胺類與前體藥物，以及彼等的藥學可接受鹽類。

本發明也有關 PAOD(例如 IC)，中風，冠狀動脈血栓形成，或因過度血小板聚集或動脈閉塞，等所導致的其他徵候或疾病，及因平滑肌增生所致冠狀動脈再狹窄之治療，其包括給用一藥學有效量的至少一種 MPDEI 及至少一種腺苷攝入抑制劑之藥學組成物(亦即，本發明藥學組成物)。如本文所用者，"藥學有效"係指能夠減低上述任何徵候或疾病的復發率或嚴重性的藥劑量。如諳於此技者所知者，上述徵候包括罹病肢體的不舒適或疼痛，及壞疽，等。整體而言，藥學組成物的有效劑量可促成在血小板和其他血液細胞，以及血管平滑肌細胞內的 PDE3 活性與腺苷攝入之減低，其量足以預防，紓解，或以其他方式治療所述徵候和疾病。

諳於此技者都能夠使用技藝中已知的技術定出且最優化個別 MPDEIs 和腺苷攝入抑制劑的劑量。彼等技術係經載於，例如 Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ninth Edition, (1996)的 3-41 頁(其全文以引用方式併於本文)。可以透過使用經建立的檢定，習用的劑量-和時間-反應性研究，與習用的藥物代謝動力學和代謝研

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (12)

究等的使用來確定和最優化該劑量。定出治療所用恰當劑量所需計算的進一步精確化係由諳於此技者例常地進行者且都在彼等所例行實施的工作列中而不必使用過度的實驗。例如，可以使用從細胞培養檢定和動物研究所得數據來調配一病人所用的劑量範圍。該劑量可在此範圍內變異，決定於所採用的劑型與所利用的給藥途徑。對於本發明方法所用的任何組成物，可於初期從細胞培養檢定估計治療有效劑量。可以調配出一劑以達到如細胞培養所定出的循環血液血漿濃度範圍。在給用兩種或更多種化合物，如呈單一調配物或呈分開的調配物，之時，該劑可經調配成該兩種或更多種化合物之間在如細胞培養所定出的循環血液血漿中之莫耳比例範圍。例如，於本發明一具體實例中，一包括西洛他啶和雙嘧達莫的組成物可以產生約 $0.3 \mu\text{M}$ 到約 $10 \mu\text{M}$ 的西洛他啶血液濃度與約 $0.1 \mu\text{M}$ 到約 $3 \mu\text{M}$ 的雙嘧達莫血液濃度。於另一具體實例中，一包括西洛他啶和雙嘧達莫的組成物可以產生約 $0.5 \mu\text{M}$ 到約 $5 \mu\text{M}$ ，或 $1 \mu\text{M}$ 到約 $3 \mu\text{M}$ 的西洛他啶血液濃度與 $1 \mu\text{M}$ 到 $3 \mu\text{M}$ 的雙嘧達莫血液濃度。因此，於本發明一具體實例中，一包括西洛他啶和雙嘧達莫的組成物可以在血液中產生約 $0.1:1$ 到約 $1:0.01$ 的西洛他啶：雙嘧達莫莫耳比例。於本發明另一具體實例中，一包括西洛他啶和雙嘧達莫的組成物可以在血液中產生約 $0.16:1$ 到約 $1:0.2$ ，或 $0.33:1$ 到約 $1:0.33$ 的西洛他啶：雙嘧達莫莫耳比例。在現有的臨床可取得之調配物之下，此等血液濃度水平相當於 20 毫克到 300 毫克

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (13)

的西洛他啞 (Pletal®) 每日劑量與 200 毫克到 600 毫克的雙嘍達莫 (Persantine-Retard®) 每日劑量。於另一具體實例中，此等血液濃度水平相當於 50 毫克到 200 毫克，或 50 毫克到 160 毫克的西洛他啞每日劑量與 200 毫克到 600 毫克的雙嘍達莫每日劑量。因此，一包括西洛他啞和雙嘍達莫的藥學製劑具有約 1 : 0.7 到約 1 : 30 的西洛他啞 : 雙嘍達莫重量比例。於另一具體實例中，一包括西洛他啞和雙嘍達莫的藥學製劑具有約 1 : 1 到約 1 : 12 的西洛他啞 : 雙嘍達莫重量比例。血液中的水平可以用高性能液體層析術或技藝中已知的其他方法予以測量。

此外，於本發明方法中給用的個別 MPDEIs 和腺苷攝入抑制劑之劑量會根據，例如，要治療的特別徵候和疾病，給藥方式，及要治療的病人之年齡、重量和性別等而變異。事實上，因為個別病人在徵候和疾病的嚴重性上可能呈現廣泛的變異，且每一種藥物具有其獨特的治療特性，所以對於每一病人所用的正確給藥方式和劑量都有待執事者的斟酌決定。

“病人”如本文中所使用者是指有需要治療上述徵候和疾病的任何人或非人類動物，或該治療可能對其有益的任何對象，包括人類和非人類動物。此等要治療的非人類動物包括所有家庭和野生的脊椎動物，較佳者，但不限於：小鼠、大鼠、兔子、魚類、鳥類、倉鼠、狗、貓、豬、綿羊、馬、牛和非人類靈長類。

本發明藥學組成物包括活性成分 (亦即，至少一種

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (14)

MPDEI 或其藥學可接受的鹽及至少一種腺苷攝入抑制劑或其藥學可接受的鹽)與一或更多種藥學可接受載劑或賦形劑和視需要的其他治療劑之調配物。該(等)載劑必須在與組成物的其他成分可相容且對其接受者無害的感覺上為可接受者。當該組合的個別成分係一起或分別地給用時，彼等通常是以藥學調配物形式呈出。

適當的調配物包括適合經口、經直腸、經鼻、局部(包括透皮、經頰和舌下)，經陰道或非經腸(包括皮下、肌肉內、靜脈內和皮內)給用所用者。該等調配物可以經由藥劑學技藝中熟知的任何方法予以製備，例如，使用在 Gennaro et al., Remington's Pharmaceutical Sciences (18th ed., Mack Publishing Company, 1990，參看特別者 Part 8; Pharmaceutical Preparations and their Manufacture)中所述者(其全文以引用方式併於本文)。此等方法包括下述步驟：將該等活性成分與構成一或多種輔助成分的載劑締合在一起。此等輔助成分包括技藝中習用者，例如，填充劑、黏合劑、稀釋劑、崩解劑、潤滑劑、調味劑，和濕潤劑。

適合經口給用的調配物可呈現為分立的單位例如丸、錠劑或膠囊，各含預定量呈粉末或顆粒形式或溶液或懸浮液形式的活性成分。該活性成分也可以呈現為大丸藥或糊劑，或可包含在微脂粒之內。

供經直腸給用的調配物可製備成為栓藥或灌腸劑形式。

供非經腸給藥時，適當的調配物包括水性和非水性無

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (15)

菌注射液。該等調配物可呈現在單劑或多劑容器，例如，密封的管瓶和針藥瓶之內，且可以貯存在冷凍乾燥 (lyophilized) 狀況之下只要在使用之前添加無菌液體載劑，例如，水，即可。

適合經鼻吸入給用的調配物包括係灑粉或霧狀物 (mist)，其可經由利用計量劑壓縮氣霧器，噴霧器或吸入器予以產生。

本發明更包括一種製備藥學組成物之方法，其包括將至少一種 MPDEI (或其藥學可接受的鹽) 及至少一種腺苷攝入抑制劑 (或其藥學可接受的鹽) 的組合與一或更多種用於彼等的藥學可接受載劑締合在一起。

本發明要用下列實施例予以闡明，彼等無意於任何方面具有限制性。

實施例 1

西洛他啶和雙嘍達莫在試管內增效性地抑制人類經洗過的血小板之聚集

經洗過的血小板之製備

從 10 個健康捐血者 (至少 10 天沒有服醫藥者) 經由使用 19G 頭皮針 (butterfly needle) 以兩注射筒技術採集周圍血液樣品。抽血的程序係根據 Helsinki 公約經健全人體試驗委員會 (Institutional Review committee) 認可者。有 9 個捐血者係直接採集到裝有一體積檸檬酸三鈉 (3.8%) 的注射筒之內。在室溫下以 150 x g 離心 15 分鐘後收集到富血小半血漿

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (16)

(PRP)。從加檸檬酸的 PRP 以 Cone et al. (Cone et al., 1999a)(以引用方式併於本文)中所述的檸檬酸洗滌法製備經洗過的血小板(WP)。最後將血小板再懸浮於 Tyrode' s HEPES 緩衝液中(136.7 mM NaCl, 5.5 mM 右旋糖, 2.6 mM KCl, 13.8 mM NaHCO₃, 1 mM MgCl₂, 0.36 mM NaHPO₄, 和 10 mM HEPES; pH 7.4)。將血小板濃度調整到 3.8 x 10⁸ 血小板/毫升。

試驗化合物說明

西洛他唑(OPC-13013): 一種 MPDEI, 可選擇性抑制 PDE3 及經由提高 Camp 水平防止血小板聚集(Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Tokushima, Japan 所提供, Lot#B8E88M)。

雙嘧達莫: 一種抗血小板藥物, 可阻斷腺苷攝入到血管細胞和血細胞之內。(Calbiochem, La Jolla, CA., Cat#322328, Lot#B11755)。

ZM241385: 一種選擇性腺苷 A_{2A} 受體阻斷劑(Tocris, Ballwin, MO, Cat#1036, Batch#2/18074)。

經洗血小板的聚集之偵檢

聚集現象係經由使用 AG-10 聚集分析儀(Kowa, Japan)以透光率的變化予以定量分析。將經洗血小板保持在室溫下並在血液收集後 3 小時之內實施研究。將西洛他唑溶解在 DMSO 內並將腺苷溶解在水中。施以恰當的稀釋以得到

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (17)

合意的操作濃度，同時保持 DMSO 的最後濃度使其不超過 0.2%。將血小板懸浮液(400 微升)吸取到聚集小瓶內並使其於 1,000 rpm 攪拌下在 37° C 保溫 1 分鐘。然後添加藥物或無效對照劑(DMSO)(4 微升)並再保溫 3 分鐘。在檢驗與雙嘧達莫的增效性時，係於添加藥物或 DMSO 後 1 分鐘加入雙嘧達莫(1, 3, 和 10 μ M)與 1 μ M 腺苷使得雙嘧達莫和腺苷的整體保溫時間為 2 分鐘。然後，使用 1-2 微克/毫升的膠原(Chrono-Log Corp., Havertown, PA)刺激該懸浮液。所記錄的整體聚集時間為 15 分鐘。將最後 11 分鐘(自添加膠原之後算起)內的最大透光率值表為對照樣(DMSO + 乙醇 + 腺苷)聚集值的表分比。

西洛他啶和雙嘧達莫增效性地抑制經洗過的血小板之聚集

為研究腺苷和西洛他啶對於經洗過的血小板之聚集的增效性效應，乃對每一個別捐血者在 1 μ M 腺苷存在中滴定膠原的量。使用 1 μ M 腺苷對聚集沒有顯示出效應的最低膠原濃度(1-5 微克/毫升)。西洛他啶(1 μ M)或腺苷(1 μ M)本身對於膠原-誘導血小板聚集具有很小的影響(圖 1a, 1b, 1c)。不過，將兩者組合時即可完全抑制血小板聚集(圖 1d)。

西洛他啶與雙嘧達莫(1, 3 和 10 μ M)的組合對於經洗血小板的膠原誘導聚集所產生的濃度相關性抑制係在腺苷(1 μ M)存在中實施的。如圖 2 中所示者，西洛他啶可用劑量-相關性方式抑制血小板聚集。腺苷的添加會使抑制曲線向左偏移(表 2)。所計算出的 IC₅₀ 會從 2.66 ± 0.41 μ M 減低

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (18)

到 $0.38 \pm 0.05 \mu\text{M}$ ($p < 0.001$ ，兩尾配對 Student t-測驗)。雙嘧達莫可用劑量-相關性方式將西洛他啞與腺苷的抑制曲線進一步向左偏移。於 1, 3 和 $10 \mu\text{M}$ 雙嘧達莫的存在中， IC_{50} 會分別偏移到 $0.17 \pm 0.04 \mu\text{M}$ ($p < 0.05$)， $0.11 \pm 0.66 \mu\text{M}$ ($p < 0.05$)，和 $0.01 \pm 0.01 \mu\text{M}$ ($p < 0.005$) (表 1)。該數據指出雙嘧達莫和西洛他啞的組合對

於血小板聚集的抑制係發出增效效應，而非加成效應。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (19)

表 1

西洛他啶對於血小板聚集的 IC₅₀

西洛他啶	腺苷 (1 μ M)	+ 腺苷 + 雙嘧達莫 (1 μ M)	+ 腺苷 + 雙嘧達莫 (3 μ M)	+ 腺苷 + 雙嘧達莫 (10 μ M)
2.66 ± 0.41 μ M (n=6)	0.38 ± 0.05 μ M (n=5)	0.17 ± 0.04 μ M (n=5)	0.11 ± 0.06 μ M (n=5)	0.01 ± 0.01 μ M (n=5)
	p < 0.001 (vs. w/o Ado)	p < 0.05 (vs. w/ Ado)	p < 0.05 (vs. w/ Ado)	p < 0.005 (vs. w/ Ado)

五、發明說明 (20)

西洛他啞與雙嘍達莫的增效性效應也使用取自另外 5 個捐血者的經洗滌血小板予以確定，不過此次係針對 30 和 100 nM 西洛他啞。圖 3 顯示出在腺苷($1 \mu M$)和雙嘍達莫(1, 3 和 $10 \mu M$)存在中，添加 1 和 $3 \mu M$ 西洛他啞，與對照樣(沒有添加藥物)相比較時的血小板聚集之%抑制率。與對照樣相比之下，雙嘍達莫(1, 3 和 $10 \mu M$)或西洛他啞(30 和 100 nM)單獨者在所試驗的濃度下對於經洗血小板的聚集沒有明顯的抑制作用(圖 3 和 4)。腺苷的添加($1 \mu M$ ，於此濃度之下，腺苷單獨者沒有觀察到有效應)可明顯地增強雙嘍達莫的效應(圖 3)。於添加 100 nM 但非 30 nM 西洛他啞時可觀察到進一步的增強。所以， $10 \mu M$ 雙嘍達莫對於血小板聚集的抑制效應可以使用 $1 \mu M$ 雙嘍達莫與 100 nM 西洛他啞的組合，在腺苷存在中，因為該兩種化合物之間的增效作用而達到。圖 4 顯示出相對於對照樣，在 $1 \mu M$ 腺苷和 30 或 100 nM 西洛他啞的存在中，添加 1, 3 和 $10 \mu M$ 雙嘍達莫所得到的血小板聚集之%抑制率。30 或 100 nM 西洛他啞與 $1 \mu M$ 腺苷的組合顯示出與對照樣有明顯差異但與任一者單獨者沒有差異。於該組合中添加雙嘍達莫，在該兩種西洛他啞濃度(30 和 100 nM)下，於所有三種(雙嘍達莫)濃度下都可明顯地增強抑制效應。再度地，可以闡示出兩種化合物之間的增效效應，其中經由在腺苷存在中，將 30 nM 西洛他啞與 $3 \mu M$ 雙嘍達莫的組合可以達到 100nM 西洛他啞的相等效應。如所預期者，沒有腺苷時西洛他啞與雙嘍達莫的組合對於經洗滌血小板的聚集沒有影響(沒有顯示出

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (21)

數據)，可推測腺苷為西洛他啶與雙嘧達莫之間的增效效應之媒介劑。如此，可促成使用遠較為低的各藥劑濃度組合起來而達到與使用更高濃度單獨使用的各藥劑所得者相同的效力。該增效性效應經認為是因為增高的細胞內 cAMP 水平所致者，如下面要證實者。

實施例 2

西洛他啶和雙嘧達莫增效性地增加細胞內 cAMP 濃度
血小板內 cAMP 之測量

首先將腺苷，西洛他啶，或雙嘧達莫單獨者或組合者等分到個別的聚丙烯試管內。使用 DMSO 和乙醇作為對照樣。將單獨或組合的試驗藥劑與 PRP 經由略為迴轉予以混合。最後樣品體積為 200 微升且每一實驗都以二重複實施。於將樣品在 37° C 下保溫 5 分鐘之後，經由添加 50 微升冰冷的過氯酸 (PCA, 1.25 N)。於凍結與解凍一次之後，使用 50 微升 KHCO₃ (1.25 N) 中和該混合物且在 4° C 下以 20,000 x g 離心 15 分鐘。收集所得上澄液並使用套組所提供的乙酸鹽緩衝液稀釋。使用 cAMP 放射免疫檢定套劑 (NEK-033, NEN Life Science, Boston, MA) 以二重複測量 cAMP 濃度。

表現人類腺苷 A_{2A} 受體的 CHO 細胞之建立

從新鮮人類血小板萃取總 RNA 並使用 5 微克反轉錄到 cDNA 且用為聚合酶鏈型反應 (PCR) 之模板。設計供腺苷 A_{2A}

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (22)

受體所用具有 Kozak 序列(CCCACC)的特異性引子(前向引子 : 5'-CCCACCATGCCCATCATGGGCT -3' , 反向引子 : 5'-TCAGGACACTCCTGACTCC-3') 並以 Life Technologies (Rockville, MD)予以合成。使用此等引子, 以 PCR 擴增完整密碼區並進一步重組到選殖載體, pCR2.1(Invitrogen, Carsbad, CA)。該插入體的 DNA 序列係在插入到哺乳動物表現載體, pcDNA3.1+ (Invitrogen)內之前確定者。在啓動基因區內含有 cAMP-反應性要素(CRE)且可驅動蟲螢光素酶的表現之表現載體(pCRE-Luc)係購自 Stratagene (La Jolla, CA)。

蟲螢光素酶表現水平反映出細胞內 cAMP 的濃度。腺苷 A_{2A} 受體係已知會偶合到 G_s 蛋白者(Huttermann et al., 1984)。

所以, 該等受體的活化即由蟲螢光素酶表現所反映出, 其中該表現水平可由蟲螢光素酶活性檢定予以測量出。蟲螢光素酶報導者載體與含有腺苷 A_{2A} 受體的載體之共轉染係經由將磷酸鈣沉澱到中國倉鼠卵巢(CHO)細胞內而進行。使用 1.0 毫克/毫升的 G418 (Life Technologies)選擇適當的轉染株 12 天。可過度表現功能性腺苷 A_{2A} 受體的細胞株係經由在腺苷刺激下由蟲螢光素酶表現予以定出。

蟲螢光素酶檢定

要檢驗西洛他啶和雙嘧達莫在有或沒有腺苷之下對於 cAMP 增高的增效性效應時, 係在具有透明底部的白壁 96-洞板(Corning Costar Co., Cambridge, MA)內將該細胞再次培養到近乎匯聚。於次日, 使用補充 0.5% FCS 的 F12K 培養

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (23)

基洗該細胞一次，然後與 100 微升只有培養基(基底)或有加試驗劑的培養基一起在 37° C 下保溫 4 小時。於平衡到室溫之後，於每一洞內加入 100 微升的偵檢受質(Bright-Glo™ 蟲螢光素酶檢定系統，Promega，Madison, WI)。於 5 分鐘之後，使用 Mediators PhL 螢光板讀取器(1mmTech, New Windsor, MD)測量蟲螢光素酶活性。採用在半秒鐘內偵檢到的螢光值(隨意單位)作為蟲螢光素酶活性。

西洛他啶和雙嘧達莫增效性地增加細胞內 cAMP 濃度

首先在 PRP 內研究雙嘧達莫和西洛他啶對於細胞內 cAMP 濃度的影響。如圖 5A 和 5B 中所示者，於 0.3 或 1 μ M 腺苷存在中，雙嘧達莫(3 μ M)和西洛他啶(3 μ M)的組合，在與任一者單獨時比較之下，可進一步增加血小板內 cAMP 水平(二重複檢定 $n = 2$)。因為在血小板內的低基底 cAMP 水平之故，我們遂建立在可過度表現人類血小板腺苷 A_{2A} 受體的 CHO 細胞內之蟲螢光素酶檢定。蟲螢光素酶活性的量反映出細胞內 cAMP 水平。雙嘧達莫對於腺苷攝入的抑制效應在血小板內與在紅血球內係類似者。圖 6 顯示出在 0.03 μ M 腺苷及/或 1 μ M 西洛他啶存在中，雙嘧達莫對於蟲螢光素酶活性的影響。類似地，圖 7 顯示出在 0.03 μ M 腺苷及/或 3 μ M 西洛他啶存在中，雙嘧達莫對於蟲螢光素酶活性的影響(在至少 3 獨立實驗的三重複樣知代表值)。如圖 6 和 7 中所示者，1 和 3 μ M 西洛他啶，於雙嘧達莫存在中，可增效地提高蟲螢光素酶活性，即使在 3 μ M 西洛他啶情

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

像

五、發明說明 (24)

況中沒有腺苷也一樣。雙嘧達莫可在 0.5 到 10 μ M 範圍內劑量相關地增強西洛他啉的效應，其最高峰出現於約 5 μ M。整體而言，此研究確定西洛他啉與雙嘧達莫可用增效方式作用以增加細胞內 cAMP 濃度，且彼等經由增效地抑制血小板聚集而提供一可能的機制。

實施例 3

西洛他啉抑制腺苷攝入

腺苷攝入到經洗血小板和紅血球內之檢定

按照下述製備經洗過的紅血球。於起始離心移除 PRP 和血沉棕黃層 (buffy coat) 之後，將 100 微升紅色沉丸部份稀釋到 12 毫升含有鈣和鎂的 PBS 內。以 150 x g 旋轉 5 分鐘分離出 RBC。用 PBS 洗一次之後，將沉丸再懸浮於 PBS 內到 1×10^8 RBC/毫升。根據先前所述方法實施腺苷攝入實驗 (Liu, Fong, Cone, Wang, Yoshitake, and Kambayashi, 2000)。取 100 微升 WP 或 RBC 與 50 微升西洛他啉或二聯啟酮在 37° C 下保溫 5 分鐘。然後，加入 50 微升 1 微居禮 (μ Ci) 的 [3 H]-腺苷 (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ)，1 μ M 腺苷，和 25 μ M 的 erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenosine (EHNA，最後濃度，Sigma Chemical)，接著加入 200 微升油 (苯二甲酸二丁酯：苯二甲酸二辛酯 = 1：1，Aldrich)，且之後保溫 1 分鐘。以 16,000 x g 離心 2 分鐘將細胞與水相中的腺苷分開。於移除油相和水相之後，使用 β -液體閃爍計數器 (1209 Rackbeta, LKB, Turku, Finland) 測量細胞丸的放射

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (25)

性。

西洛他啞抑制腺苷攝入

[³H]-腺苷攝入實驗係使用經洗過的血小板和經洗過的紅血球實施的且將其結果顯示於圖 8 之中。西洛他啞可在血小板和紅血球兩者之內抑制腺苷攝入，其 IC₅₀ 為約 7 μM (n = 3)。西洛他啞在攝入抑制上的效力類似於先前對兔子心肌細胞，人類血管平滑肌細胞，和內皮細胞所報導之值 (5~10 μM) (Liu, Fong, Cone, Wang, Yoshitake, and Kambayashi, 2000)。相異者，二聯啞酮對於血小板或紅血球的腺苷攝入幾乎沒有影響。使用可過度表現功能性人類腺苷 A_{2A} 受體的 CHO 細胞進一步確定西洛他啞在抑制腺苷攝入上的作用。西洛他啞可抑制 [³H]-腺苷攝入到此等 CHO 細胞內，其效力類似於對血小板和紅血球，而二聯啞酮則沒有影響 (沒有顯示出數據)。

實施例 4

西洛他啞和雙嘧達莫在試管內增效性地抑制人類全血液中的血小板之聚集

全血液之製備

從 10 個健康捐血者 (至少 10 天沒有服醫藥者) 經由使用裝有 4 微升水蛭素 (250 U/微升)/10 毫升血液的注射筒以兩注射筒技術採集周圍血液樣品。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (26)

全血液血小板聚集研究

將血液樣品用生理食鹽水稀釋 1:1 並使用 Chrono-Log Whole Blood Aggregometer 以 1000 rpm 的攪拌速率進行檢驗。於起始處，將攪拌棒浸入到一塑膠管瓶內接著添加 1 毫升經稀釋的血液樣品。然後將電極放置到該管瓶內並將樣品置於 37°C 下保溫同時校準儀器。將西洛他唑和 ZM241385 溶解在 DMSO 內到 100 mM 的儲液濃度。將雙嘧達莫稀釋在乙醇 (EtOH) 內到 100 mM 的儲液濃度。進一步稀釋以在添加到 1 毫升全血液內之時得到恰當的西洛他唑 (10 μ M 和 30 μ M，因為西洛他唑對蛋白質的結合性質之故)，雙嘧達莫 (0.1, 0.3, 1 或 3 μ M)，和 ZM241385 (0.1 μ M) 檢驗濃度。藥物和媒劑係以 1 微升的體積添加使得 DMSO 的最後濃度不超過 0.2%。於添加膠原之前，將懸浮液保溫 3 分鐘。此研究中所使用的膠原濃度為 0.5 微克/毫升，係由預備篩選所定出者。要檢驗西洛他唑和雙嘧達莫之間的增效性之時，係添加西洛他唑之後 1 分鐘才添加雙嘧達莫 (1 微升儲液)。要觀察此等藥物的逆反效應時，係在添加諸藥物之 1 分鐘前添加 0.1 μ M 的 ZM241385 (1 微升)。在添加諸藥物之後 3 分鐘添加膠原，使得 ZM241385 有總共 4 分鐘，西洛他唑或 DMSO 有 3 分鐘，且雙嘧達莫有 2 分鐘之保溫時間。於刺激之後，觀察大小值 11 分鐘，採用其最大值作為數據呈現。要檢驗更低的西洛他唑濃度是否也可以與雙嘧達莫以起增效化以抑制全血液中的血小板聚集，我們乃使用稍微較低，產生較不強的聚集但與病人的狀況

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (27)

更相關的膠原濃度(0.1 或 0.3 μ M)。以西洛他啶(0.3、0.7、1 和 3 μ M)與雙嘧達莫(1 和 3 μ M)的不銅組合進行研究。將數據表為相對於在沒有任何抑制下所偵檢到的值之百分比。

血漿中腺苷濃度的測量

抽取血樣並與重組人類水蛭素(100 U/毫升)混合。使用對血小板聚集所用的相同程序以膠原(2 微克/毫升)刺激此等血小板。於 5 分鐘保溫之後，將 500 微升 WB 與 500 微升冰冷食鹽水迅速混合。在 4° C 下以 20,000 x g 將細胞旋轉 4 分鐘。將上澄液(600 微升)先與 300 微升 PCA (2.5N)混合，然後使用 300 微升 KHCO₃ (2.5N)予以中和。最後，在 4° C 下以 20,000 x g 將混合物離心 15 分鐘。以逆相高性能液體層析術(HPLC, Waters Alliance 2690)使用 Hypersil 3 μ C₁₈ 管柱(150 毫米 x 4.6 毫米)及從 5 到 20%甲醇/20 mM KH₂PO₃ 的梯度測量上澄液中的腺苷濃度。腺苷係使用二極體陣列偵檢器(Water 996)於 258 奈米的吸光度變化予以偵檢並與已知的外標準比對滯留時間與峰高度進行定量分析。定量分析係使用 Waters Millennium 32 Client/Server 軟體實施的。

於血小板活化過程中在全血液內產生大量的腺苷

使用 HPLC，在用 2 微克/毫升膠原刺激 5 分鐘之後，測量全血液細胞外培養基內的腺苷濃度。如圖 9 中所示者，在膠原刺激之後於全血液內產生大量的腺苷(3152 \pm 428 nM

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (28)

，相對於基底的 240 ± 53 nM, $n = 5$), 可能是因為從經活化的血小板所釋出的 ATP 和 ADP 發生降解之故。於雙嘧達莫 ($1 \mu\text{M}$) 存在中, 血小板聚集不受影響, 但腺苷水平明顯地進一步增高到 5916 ± 641 ($n = 3$)。

西洛他啶和雙嘧達莫增效性地抑制全血液中的血小板聚集

如上面所觀察到者, 因為在血小板活化過程中可能產生大量的腺苷, 所以不需要添加任何外源腺苷。於全血液中, 實驗證明西洛他啶 (10 或 $30 \mu\text{M}$) 或雙嘧達莫 (0.1 , 0.3 , 1 或 $3 \mu\text{M}$) 單獨者對於血小板聚集沒有明顯的影響 (圖 10)。不過, $10 \mu\text{M}$ 西洛他啶和 $3 \mu\text{M}$ 雙嘧達莫的組合會明顯地抑制血小板聚集 (從 $10 \mu\text{M}$ 西洛他啶單獨者的 $98.9 \pm 2.0\%$, $n=8$, 和 $3 \mu\text{M}$ 雙嘧達莫單獨者的 $97.9 \pm 0.7\%$ 變成 $74.8 \pm 6.2\%$, $n=8$, $p < 0.005$, 圖 10A)。使用 $30 \mu\text{M}$ 西洛他啶與甚至更低濃度的雙嘧達莫之組合可看到更清晰的證明 ($n=5$ 到 14 , 圖 10B)。該增效性效應對於西洛他啶和雙嘧達莫兩者都是劑量相關者。此外, 於 ZM241385 ($0.1 \mu\text{M}$) --- 一種選擇性腺苷 A_{2A} 受體拮抗劑 --- 的存在中, 雙嘧達莫和西洛他啶的增效性效應會逆返回到西洛他啶單獨時所得基底水平 ($n=8$), 可以推測該增效性效應係由血漿中的腺苷蓄積所媒介者。

在使用 0.1 或 0.3 微克/毫升膠原誘導全血液聚集之時, 我們發現西洛他啶 ($0.3 \mu\text{M}$ 與 $3 \mu\text{M}$ 之間) 和雙嘧達莫 (1 或 $3 \mu\text{M}$) 的組合可明顯地抑制血小板聚集 (圖 11)。例如, $0.7 \mu\text{M}$ 西洛他啶和 $3 \mu\text{M}$ 雙嘧達莫的組合可抑制 $57 \pm 11\%$ 的血

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (29)

血小板聚集，且 $1 \mu\text{M}$ 西洛他啶和 $3 \mu\text{M}$ 雙嘧達莫的組合可抑制 $72 \pm 11\%$ 的血小板聚集 ($p < 0.001$)。在此等濃度之下，西洛他啶或雙嘧達莫單獨者都不會引起任何明顯的抑制作用。

實施例 5

西洛他啶和雙嘧達莫在活體外增效性地抑制人類全血液中的血小板之聚集

臨床研究之設計

設計一期，開放標記，序列性，互換研究以檢驗是否可以在健康捐血者體內以臨床相關劑量觀察到西洛他啶和雙嘧達莫對於血小板聚集抑制之增效性效應。於研究的第一天，6 個對象接受 1 粒 100 毫克西洛他啶錠 (Pletal®)。於研究的第 4 天，諸對象接受 1 粒 200 毫雙嘧達莫錠。於研究的第 6 天，給此等對象接受西洛他啶和雙嘧達莫的組合。

全血液血小板聚集

於投藥之前，與投藥 2 和 4 小時之後，抽取 5 毫升的血液到一裝有 10U/毫升經部份分離的肝素之注射筒內。然後用生理食鹽水稀釋血液樣品並使用 Chrono-Log Whole Blood Aggregometer 以 1000 rpm 的攪拌速率測量血小板聚集。經由添加膠原 (最後濃度為 0.3 微克/毫升，Nycomed Arzneimittel, Munchen, Germany) 誘導血小板聚集。於每一時點記錄聚集百分比。為了比較諸藥物處理的效應，將在 2-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (30)

時和 4-時的聚集歸一化到投藥前的值之百分比。

西洛他啞和雙嘍達莫的組合在活體外增效性地抑制全血液血小板聚集

單一 100 毫克投劑後的 2-和 4-小時所得血液中西洛他啞濃度為約 $2 \mu M$ 。根據先前的藥物代謝動力學數據，單一 200 毫克投劑後的 2-和 4-小時所得血液中西洛他啞濃度也在 $2 \mu M$ 範圍內。因為根據 Aggregometer 製造商指示中對於用食鹽水對血液的 1:1 稀釋之要求，所以在活體外血小板聚集檢定中的有效藥物濃度經估計對於西洛他啞為 $1 \mu M$ 而對於雙嘍達莫為 $1 \mu M$ 。如預期者，在此等濃度之下，西洛他啞或雙嘍達莫單獨者都不會抑制血小板聚集(圖 12)。不過，在對象接受西洛他啞和雙嘍達莫的組合處理之後的第 4-小時，可抑制血小板聚集達 45%($p < 0.001$ 相對於投藥之前)。此等結果非常類似於實施例 4 中所述試管內全血液聚集研究中所得數據。

實施例 6

雙嘍達莫抵消西洛他啞對於心臟功能的潛在有害效應

手術準備

此研究係根據 the National Research Council, 1996, Washington DC 出版的 "Guide for the Care And Use of Laboratory Animals", 且由 the Institutional Animal Care and Use Committee of Otsuke Maryland Research Institute, LLC

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (31)

所准許而進行的。將體重為 2-2.5 公斤的雄兔子 (New Zealand White) 經由穿過邊緣耳靜脈施以靜脈內注射戊巴比妥 (pentobarbital) (30 毫克/公斤) 予以麻醉。實施氣管切開術並在動物喉頭插管。使用補充 100% O₂ 的室內空氣透過 Harvard 小動物換氣器予以換氣。調整呼吸速率以將動脈血液 PO₂, PCO₂ 和 pH 保持在生理範圍之內。使用加熱毯將體溫保持在近乎 38° C。透過中線開胸暴露出心臟，且經由在心臟底部切開迅速切取出並放置在冰冷的 Krebs-Henseleit 碳酸氫鹽緩衝液中。然後將心臟經由主動脈根接到 Langendorff 設備，並用不循環的 Krebs-Henseleit 緩衝液以 75 mmHg 的固定壓力予以灌注。使用 95% O₂ 和 5% CO₂ 氣體混合物泡通灌注液，且調整泡通速率以維持生理 pH (7.35-7.45)。灌注液溫度係經由包圍緩衝液儲器的循環水套管予以維持在 38° C。心臟也經由包圍心臟懸掛處的循環水套管予以維持在 38° C。將該套管的開放頂部以一片石蠟膜覆蓋以維持溼度和溫度。將包住主動脈根部右側的肺動脈插管以收集冠狀動脈流出液及用於使用量筒進行冠狀動脈流速之測量。於左心室內插置一填充著食鹽水的乳膠氣球，將該氣球透過一導管連接到一壓力轉導器並予以充氣以產生 0-5 mmHg 的末端疏張壓。該壓力轉導器係經接到一 Grass Chart Recorder (Model 7) 以記錄左心室壓及其第一導數 (dp/dt)，與心博數。在 15-分鐘平衡期結束具有低於 85 mmHg 的左心室發展壓的心臟不包括在本研究之內。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (32)

心臟功能的測量

所測量的心臟功能指數為 LVDP(左心室發展壓)， dp/dt (LVDP 第一導數的最大值)，心博數，和冠狀動脈流。實驗方案為圖 13 中所示者。於 15-分鐘平衡之後，用西洛他唑處理心臟 5 分鐘，接著用西洛他唑和雙嘍達莫處理 5 分鐘。於 10 分鐘的無藥物灌注之後，用雙嘍達莫處理心臟 5 分鐘。於每一 5-分鐘藥物處理結束時，進行心臟功能測量。將藥物處理的效應表為每一次藥物之前與之後的數值變化百分比：

相對於基線的改變 %

$$= [(投藥之後的值 - 投藥之前的值) / 投藥之前的值] \times 100$$

統計分析

將數據表為平均值 \pm SEM。使用配對 t-測驗來偵檢意義值 ($p < 0.05$)。(Sigma Stat 2.0, Jandel Corporation, San Rafael, CA)

雙嘍達莫抵消西洛他唑-誘導的心臟收縮力和心博數之增加

先前研究揭曉出西洛他唑在低於 $1 \mu M$ 的濃度下對於心臟功能具有最小的影響。也證明出雙嘍達莫在 0.3 到 $1 \mu M$ 的濃度下為一種非常強力且有效的腺苷攝入抑制劑。所以，本實驗係採用 1、3 和 $10 \mu M$ 的西洛他唑濃度，與 0.3、1 和 $3 \mu M$ 的雙嘍達莫濃度來實施。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (33)

如所預期者，濃度 0.3, 1 或 3 μ M 的雙嘧達莫單獨者對於心臟功能沒有明顯的影響。不過，濃度 3 或 10 μ M 的西洛他啶可明顯地增加心臟收縮力、心博數和冠狀動脈流。濃度 0.3, 1 或 3 μ M 的雙嘧達莫可以明顯地減低西洛他啶-誘導的心臟收縮力(圖 14A)、和心博數(圖 14B)。濃度 1 和 3 μ M 的雙嘧達莫也可以增強西洛他啶(10 μ M)-誘導的冠狀動脈流之增加(圖 14C)。總結言之、此研究推斷出雙嘧達莫可抵消西洛他啶對心臟功能的有害影響。

實施例 7

低水平西洛他啶和雙嘧達莫的組合增加運動中的腓腸肌內血液流動且可改善絕血後的血液流動恢復

此實驗證明給用西洛他啶和雙嘧達莫的組合可增加對於運動後骨骼肌的血液供給及改善活體內絕血期後的流動恢復。按上述準備兔子的後肢進行藥物輸液，刺激肢體以模擬運動及血流測量。

手術準備

將體重為 2.5-3.5 公斤的雄兔子(New Zealand White)經由穿過邊緣耳靜脈施以靜脈內注射戊巴比妥(30 毫克/公斤)予以麻醉。實施氣管切開術並在動物喉頭插管。使用補充 100% O₂ 的室內空氣透過 Harvard 小動物換氣器予以換氣。使用加熱毯將體溫保持在近乎 38° C。將頸靜脈插管供追加麻醉和藥物給用所用。於左主動脈內插置具有內腔(4F)的

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (34)

Millar 壓力轉導器 (Millar Instruments, Houston) 並使其進入到左心室用以測量左心室壓 (LVP) 及注輸螢光性微球體。在右主動脈插管用以測量動脈血壓。透過在中大腿部從鼠蹊部韌帶延伸到後膝關節的縱向皮膚切開以暴露出兩後肢的股動脈。使用動脈夾子完成動脈閉塞，並經由移除夾子實施再灌流。爲了刺激肌肉收縮，將一對電極左後肢的坐骨神經並連接到一 Grass SD9 刺激器。刺激係在 1 Hz 以超最大 10V 的 8 ms 方形脈衝產生的。將後肢放置成與大腿呈 90°。使用對側的後肢作爲對照樣而不予以刺激。

局部血流測定

使用螢光微球體根據 "Manual for Using Fluorescent Microspheres to Measure Organ Perfusion" 測量血流 (Fluorescent Microsphere Resource Center, University of Washington, Seattle, WA)。藍-綠、黃-綠、橘色、紅色和深紅色的螢光標記聚苯乙烯微球體 (直徑 15 微米) 係購自 Molecular Probes (Eugene, OR)。將每一種顏色的微球體以五十萬每公斤體重之量於 20 秒期間透過導管注射到左心室內。同時，自注射微球體之 30 秒鐘前開始的 2 分鐘期間，從右主動脈以 2.5 毫升/分鐘抽取血樣。於結束之時，使用致死劑量的戊巴比妥鈉 (100 毫克/公斤) 使兔子安樂死。從左心室自由壁，腎臟、和兩後肢的腓腸肌採取組織樣品 (每樣約 1 克)。稱取樣品的重量，放置在管子內並於以處理供消化和螢光測定所用。使用光譜螢光計 (Fluomax-2,

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (35)

Instruments S.A., Inc., Edison, New York)測量螢光。以標準參比流動技術計算局部血流，並表為毫升/分/100克。

實驗方案

實驗的時程為圖 5 中所示者。手術準備 60 分鐘之後，將動物分成 4 組且使彼等接受媒劑(對照樣)或接受西洛他啞(0.226 毫克/公斤大丸劑接著 0.0175 毫克/公斤/分靜脈內注輸)與雙嘧達莫(20 微克/公斤/分鐘靜脈內)之組合(Cil + Dip)。藥物注輸方泛係事先決定者且產生約 $1\mu\text{M}$ 西洛他啞和約 $1\mu\text{M}$ 雙嘧達莫的血液中濃度。手術後 60 分鐘，起始媒劑或藥物組合的注射。於 20 分鐘之後，於實驗的剩餘期間都刺激左後肢的腓腸肌。刺激 20 分鐘之後(圖 15 中的 40 分鐘時點)，將左股動脈夾 20 分鐘以誘導絕血，然後釋放使其再灌流。經由在 0, 20, 40, 60, 和 80 分鐘處分別注射藍-綠、黃-綠、橘色、紅色和深紅色的螢光微球體以測定局部血流。

統計分析

將數據表為平均值 \pm SEM。採 $p < 0.05$ 作為統計學意義的水平(Sigma Stat 2.0, Jandel Corporation, San Rafael, CA)。重複測量之後接著後續 Student-Newman-Keuls 測驗以雙向(以組別和時間作為變異數)ANOVA(變異分析)分析數據。

低水平西洛他啞和雙嘧達莫的組合增加運動後肌肉內血液

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (36)

流動且改善絕血後的血液流動恢復

西洛他啞和雙嘍達莫的組合之給用不會明顯變更休息中的腓腸肌內之血液流動。雖然在兩組中，刺激都可明顯地增加對腓腸肌之血液流動，不過在組合藥物處理肌肉中的血流相對於媒劑處理肌肉明顯較為高(從媒劑處理肌肉內的 35 ± 7 毫升/分/100 克到組合藥物處理肌肉中的 56 ± 11 毫升/分/100 克， $p < 0.05$)(圖 16)。在左股動脈的 20-分鐘完全連接之後組合藥物處理肌肉也具有明顯較高的血流(51 ± 9 毫升/分/100 克相對於媒劑處理肌肉中的 29 ± 6 毫升/分/100 克， $p < 0.05$)。此等結果推斷西洛他啞和雙嘍達莫的組合可增加對運動骨骼肌的血液供給且改善絕血期後的血液流動恢復。

上述諸實驗證實腺苷攝入抑制劑可以檢低 PED3 抑制劑的收縮增強和心肌變速作用。再者，該等實施例展示出 MPDEI 和腺苷攝入抑制劑的組合可以導致血小板聚集的增效性減低，因而可以在比單獨使用任一藥劑者較低的濃度下使用，而不會不良地影響心臟收縮力。該等實施例也證實低水平 MPDEI 和腺苷攝入抑制劑，於單獨使用時不預期可增加肌肉血流，但於組合時可明顯地增加運動後肌肉內的血流且改善絕血期後的血流恢復。例如，血液濃度為 0.3 到 $10 \mu M$ 的西洛他啞與血液濃度為 0.1 到 $10 \mu M$ 的雙嘍達莫之組合可以產生最優的血小板聚集和可忽略的心臟副作用。因此，至少一種 MPDEI 和至少一種腺苷攝入抑制劑的組合，例如西洛他啞與雙嘍達莫，可以提供對於諸如 IC 和

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (37)

中風等狀況的有效力性且較少心臟副作用之治療。

本說明書可從本說明書中所引述的參可文獻之敘述內容獲得最徹底的了解，所有彼等文獻都以全文以引用方式併於本文。本說明書內的具體實例係提出作為對本發明諸具體實例的示範說明而不可視為係用以限制本發明的範圍者。諳於此技者都可明察出本發明涵蓋許多其他具體實例且要將本說明書和實施例視為只作為範例，本發明的真正範圍和旨意係由下面的申請專利範圍所指定。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (38)

參考文獻表

- Cone J, Wang S, Tandon N, Fong M, Sun B, Sakurai K, Yoshitake M, Kambayashi J, and Liu Y (1999) Comparison of the effects of cilostazol and milrinone on intracellular cAMP levels and cellular function in platelets and cardiac cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 34:497-504.
- Dobson JGJ and Fenton RA (1998) Cardiac physiology of adenosine, in *Cardiovascular Biology of Purines* (Burnstock G, Dobson JGJ, Liang BT, and Linden J eds) pp 21-39, Kluwer Academic Publishers, Boston, MA.
- Downey JM, Cohen MV, Ytrehus K, and Liu Y (1994) Cellular mechanisms in ischemic preconditioning: the role of adenosine and protein kinase C, in *Cellular, Biochemical, and Molecular Aspects of Reperfusion Injury* (Das DK ed) pp 82-98, Ann N Y Acad Sci. Vol 723., New York.
- George EE, Romano FD, and Dobson JG, Jr. (1991) Adenosine and acetylcholine reduce isoproterenol-induced protein phosphorylation of rat myocytes. *J.Mol.Cell Cardiol.* 23:749-764.
- Gotoh F, Tohgi H, Hirai S, Terashi A, Fukuuchi Y, Otomo E, Shinohara Y, Itoh E, Matsuda T, Sawada T, Yamaguchi T, Nishimaru K, and Ohashi Y (2000) Cilostazol stroke prevention study: A placebo-controlled double-blind trial for secondary prevention of cerebral infarction. *J.Stroke and Cerebrovasc.Dis.* 9:147-157.
- Huttemann E, Ukena D, Lenschow V, and Schwabe U (1984) Ra adenosine receptors in human platelets. Characterization by 5'-N-ethylcarboxamido[3H]adenosine binding in relation to adenylate cyclase activity. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol* 325:226-233.
- Igawa T, Tani T, Chijiwa T, Shiragiku T, Shimidzu S, Kawamura K, Kato S, Unemi F, and Kimura Y (1990) Potentiation of anti-platelet aggregating activity of cilostazol with vascular endothelial cells. *Thromb.Res* 57:617-623.
- Laghi PF, Capecchi PL, Acciavatti A, Petri S, de Lalla A, Cati G, Colafati M, and Di Perri T (1997) Pharmacological preconditioning of ischaemia. *Clin Hemorheol.Microcirc.* 17:73-84.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (39)

Liu Y, Fong M, Cone J, Wang S, Yoshitake M, and Kambayashi J (2000) Inhibition of adenosine uptake and augmentation of ischemia-induced increase of interstitial adenosine by cilostazol, an agent to treat intermittent claudication.

J.Cardiovasc.Pharmacol. 36:351-360.

Matsumoto Y, Marukawa K, Okumura H, Adachi T, Tani T, and Kimura Y (1999) Comparative study of antiplatelet drugs in vitro: distinct effects of cAMP-elevating drugs and GPIIb/IIIa antagonists on thrombin-induced platelet responses. *Thromb.Res* 95:19-29.

Narayan P, Mentzer RM, Jr., and Lasley RD (2000) Phosphatase inhibitor cantharidin blocks adenosine A(1) receptor anti-adrenergic effect in rat cardiac myocytes.

Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol 278:H1-H7.

Packer M (1992) Treatment of chronic heart failure. *Lancet* 340:92-95.

Park SW, Lee CW, Kim HS, Lee HJ, Park HK, Hong MK, Kim JJ, and Park SJ (1999) Comparison of cilostazol versus ticlopidine therapy after stent implantation.

Am.J.Cardiol. 84:511-514.

Pasini FL, Capecchi PL, and Perri TD (2000) Adenosine and chronic ischemia of the lower limbs. *Vasc.Med.* 5:243-250.

Sun, B., Le, S., Fong, M., Guertin, M., Liu, Y., Yoshitake, M., Kambayashi, J., and Tandon, N. Interplay between adenosine and cilostazol in antiplatelet activation. *Thrombosis and Haemostasis Suppl.* 2001.

Thadani U and Roden DM (1998) FDA Panel report: January 1998. *Circulation* 97:2295-2296.

Tsuchikane E, Fukuhara A, Kobayashi T, Kirino M, Yamasaki K, Izumi M, Otsuji S, Tateyama H, Sakurai M, and Awata N (1999) Impact of cilostazol on restenosis after percutaneous coronary balloon angioplasty. *Circulation* 100:21-26.

Wang S, Cone J, Fong M, Yoshitake M, Kambayashi J, and Liu Y (2001) Interplay between inhibition of adenosine uptake and phosphodiesterase type 3 on cardiac function by cilostazol, an agent to treat intermittent claudication. *J Cardiovasc Pharmacol* 38:775-783.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (40)

Wang WZ, Anderson G, Maldonado C, and Barker J (1996) Attenuation of vasospasm and capillary no-reflow by ischemic preconditioning in skeletal muscle. *Microsurgery*. 17:324-329.

Whetzel TP, Stevenson TR, Sharman RB, and Carlsen RC (1997) The effect of ischemic preconditioning on the recovery of skeletal muscle following tourniquet ischemia. *Plast.Reconstr.Surg* 100:1767-1775.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

四、中文發明摘要(發明之名稱：包含多功能性磷酸二酯酶抑制劑及腺苷攝入抑制劑之藥學組成物)

本發明係有關包括至少一種多功能性磷酸二酯酶抑制劑(MPDEI)及至少一種腺苷攝入抑制劑之藥學組成物。本發明也有關包括西洛他唑(cilostazol)和雙嘧達莫(dipyridamole)的組成物及彼等的用途。

英文發明摘要(發明之名稱：Pharmaceutical compositions comprising a multifunctional phosphodiesterase inhibitor and an adenosine uptake inhibitor)

The present invention relates to pharmaceutical compositions comprising at least one multifunctional phosphodiesterase inhibitor (MPDEI) and at least one adenosine uptake inhibitor. The present invention also relates to compositions comprising cilostazol and dipyridamole and their uses.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

六、申請專利範圍 1

1. 一種包括至少一種多功能性磷酸二酯酶抑制劑 (MPDEI) 或其藥學可接受鹽和至少一種腺苷攝入抑制劑或其藥學可接受鹽的組成物。

2. 如申請專利範圍第 1 項之組成物，其中該至少一種 MPDEI 為西洛他唑 (cilostazol)。

3. 如申請專利範圍第 1 項之組成物，其中該至少一種腺苷攝入抑制劑為選自下列之中者：雙嘧達莫 (dipyridamole)，波本飛林 (propentofylline)；狄拉哲 (dilazep)；硝基苯甲硫基肌苷 (nitrobenzylthioinosine)；S-(4-硝基苯甲基)-6-硫代鳥嘌呤；S-(4-硝基苯甲基)-6-硫代肌苷；碘基羥基硝基苯甲基硫代肌苷；麥費拉秦 (mioflazine)；和彼等的酯類、醯胺類與前體藥物，以及彼等的藥學可接受鹽類。

4. 如申請專利範圍第 1 項之組成物，其包括西洛他唑與雙嘧達莫。

5. 一種基本上由西洛他唑與雙嘧達莫，或彼等的鹽所構成的組成物。

6. 如申請專利範圍第 4 或 5 項之組成物，其中該組成物產生約 $0.3 \mu\text{M}$ 到約 $10 \mu\text{M}$ 的西洛他唑血液濃度與約 $0.1 \mu\text{M}$ 到約 $3 \mu\text{M}$ 的雙嘧達莫血液濃度。

7. 如申請專利範圍第 4 或 5 項之組成物，其中該組成物產生約 $0.5 \mu\text{M}$ 到約 $5 \mu\text{M}$ 的西洛他唑血液濃度與 $1 \mu\text{M}$ 到 $3 \mu\text{M}$ 的雙嘧達莫血液濃度。

8. 如申請專利範圍第 4 或 5 項之組成物，其中該組成物產生約 $1 \mu\text{M}$ 到約 $3 \mu\text{M}$ 的西洛他唑血液濃度與 $1 \mu\text{M}$ 到 3

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍 2

μ M 的雙嘧達莫血液濃度。

9.如申請專利範圍第 4 或 5 項之組成物，其中該組成物在血液中產生約 0.1 : 1 到約 1 : 0.01 的西洛他啶：雙嘧達莫莫耳比例。

10.如申請專利範圍第 4 或 5 項之組成物，其中該組成物在血液中產生約 0.16 : 1 到約 1 : 0.2 的西洛他啶：雙嘧達莫莫耳比例。

11.如申請專利範圍第 4 或 5 項之組成物，其中該組成物在血液中產生約 0.33 : 1 到約 1 : 0.33 的西洛他啶：雙嘧達莫莫耳比例。

12.如申請專利範圍第 4 或 5 項之組成物，其中該組成物具有約 1 : 0.7 到約 1 : 30 的西洛他啶：雙嘧達莫重量比例。

13.如申請專利範圍第 4 或 5 項之組成物，其中該組成物具有約 1 : 1 到約 1 : 12 的西洛他啶：雙嘧達莫重量比例。

14.如申請專利範圍第 4 或 5 項之組成物，其中該組成物具有約 1 : 1.25 到約 1 : 12 的西洛他啶：雙嘧達莫重量比例。

15.一種用於

- (a) 治療周圍動脈閉塞疾病 (PAOD) 或中風；
- (b) 誘導血管擴張及/或血小板聚集的阻斷；
- (c) 治療冠狀動脈再狹窄；或
- (d) 減少平滑肌增生

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍 3

之藥學組成物，其包含申請專利範圍第 1-14 項中任一項之組成物，及一或多種藥學上可接受之載劑。

16.如申請專利範圍第 15 項之藥學組成物，其中該藥學組成物係用於製備治療病患用之醫藥品，且係以治療有效量投服予病患。

17.如申請專利範圍第 16 項之藥學組成物，其中該藥學組成物係以約 20 毫克/天到約 300 毫克/天的西洛他唑與約 200 毫克/天到約 600 毫克/天的雙嘍達莫給用。

18.如申請專利範圍第 16 項之藥學組成物，其中該藥學組成物係以約 50 毫克/天到約 200 毫克/天的西洛他唑與約 200 毫克/天到約 600 毫克/天的雙嘍達莫給用。

19.如申請專利範圍第 16 項之藥學組成物，其中該藥學組成物係以約 50 毫克/天到約 160 毫克/天的西洛他唑與約 200 毫克/天到約 600 毫克/天的雙嘍達莫給用。

20.如申請專利範圍第 16 項之藥學組成物，其中該藥學組成物係用以治療病患的 PAOD 或中風。

21.如申請專利範圍第 20 項之藥學組成物，其中該 PAOD 為間歇性跛行。

22.如申請專利範圍第 16 項之藥學組成物，其中該藥學組成物係用以在病患體內誘導血管擴張及/或血小板聚集的阻斷。

23.如申請專利範圍第 16 項之藥學組成物，其中該藥學組成物係用以治療病患的冠狀動脈再狹窄。

24.如申請專利範圍第 16 項之藥學組成物，其中該藥學

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

表

訂

六、申請專利範圍 4

組成物係用以在病患體內減少平滑肌增生。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

圖 1

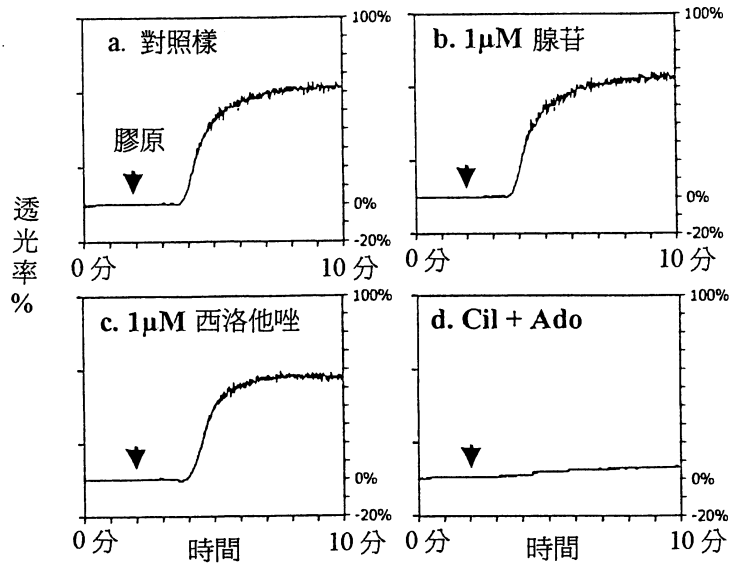


圖 2

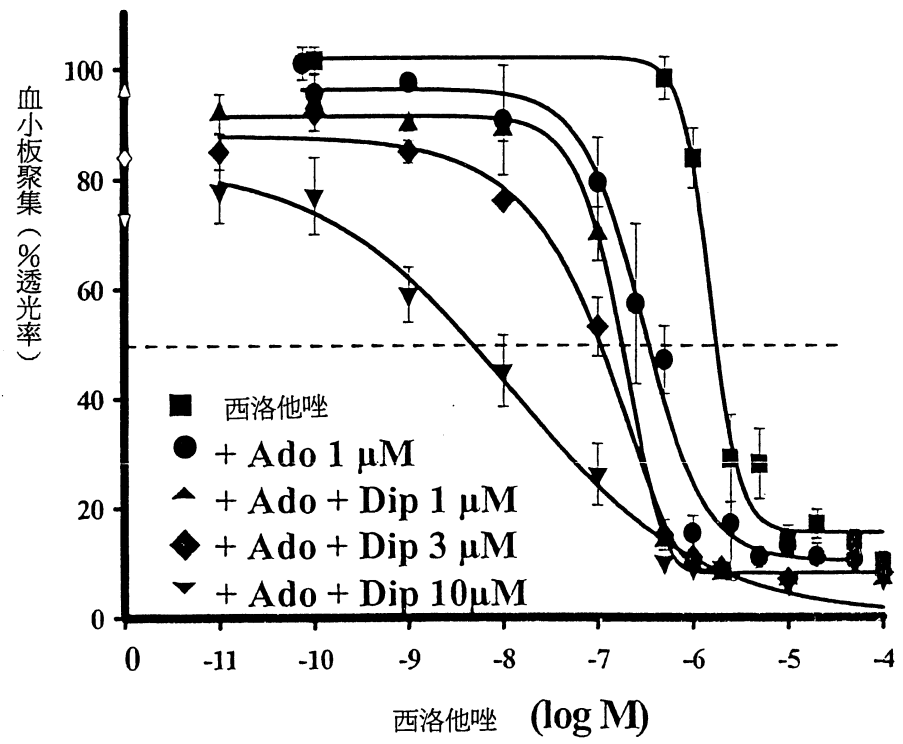


圖 3

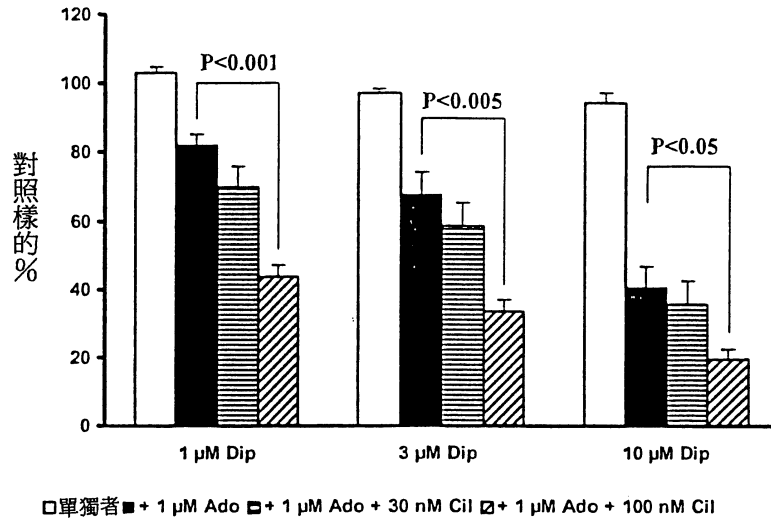


圖 4

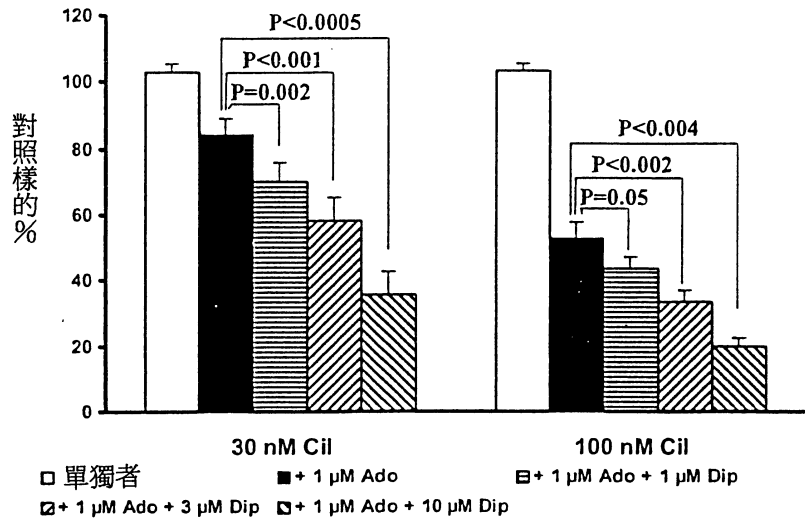


圖 5

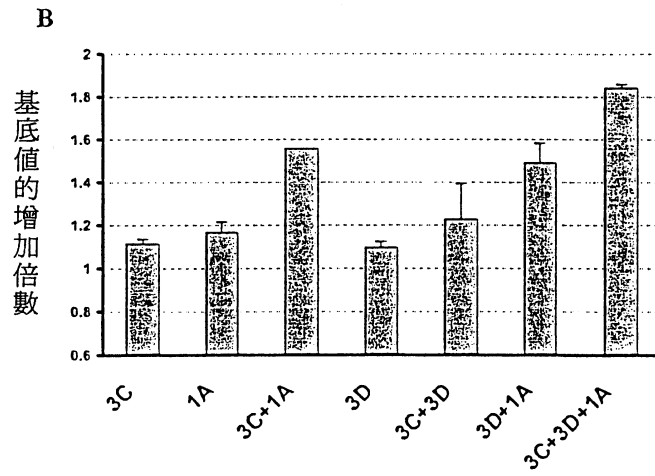
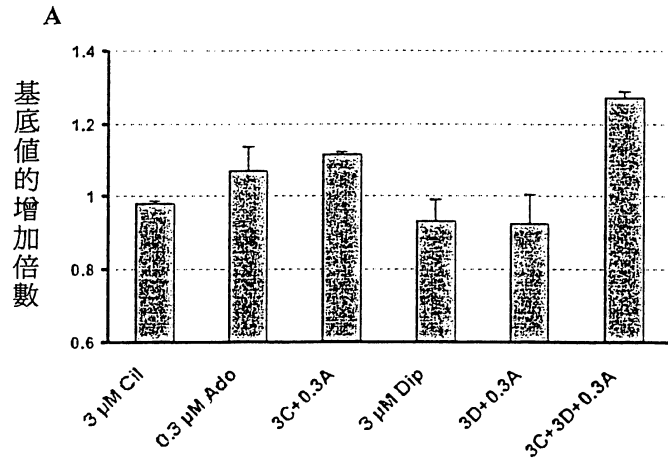


圖 6

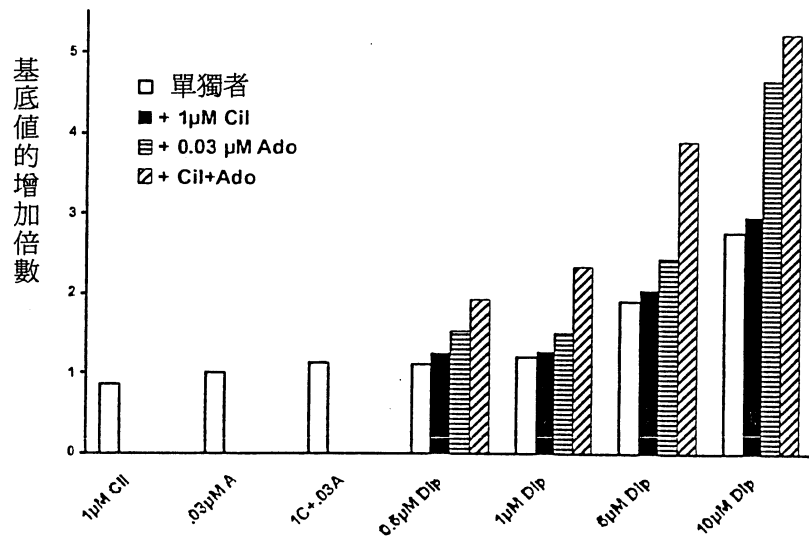


圖 7

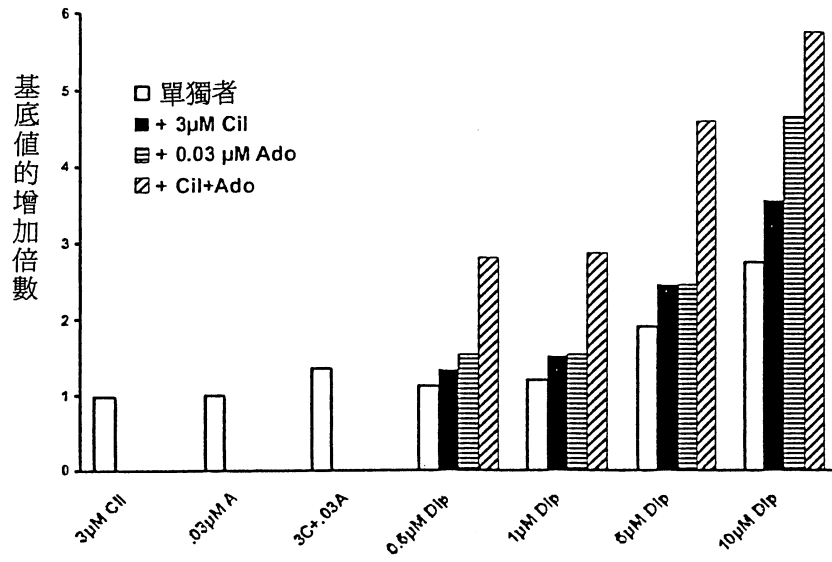


圖 8

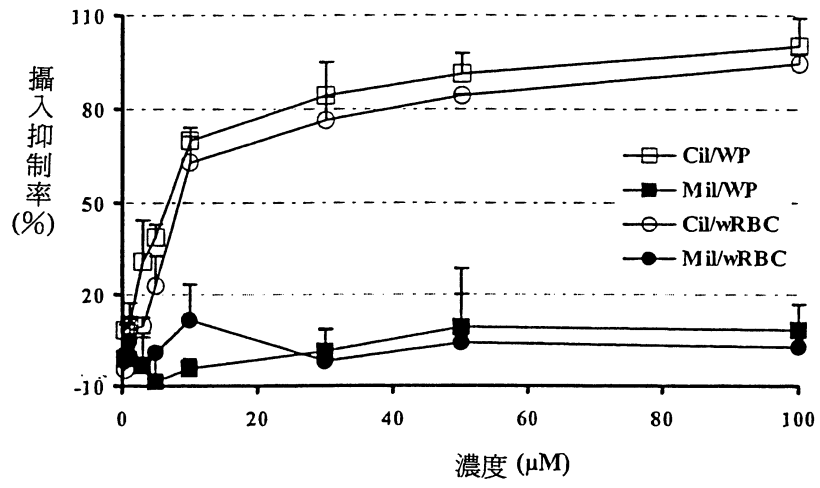


圖 9

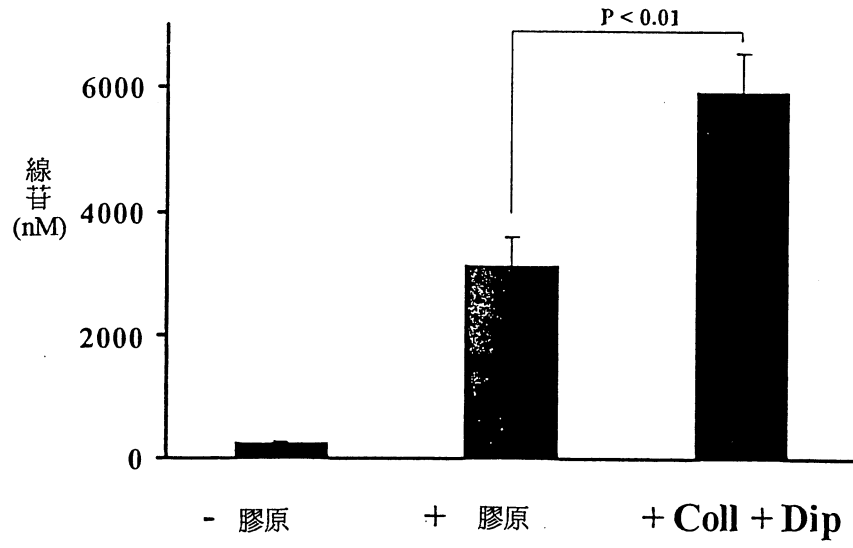


圖 10

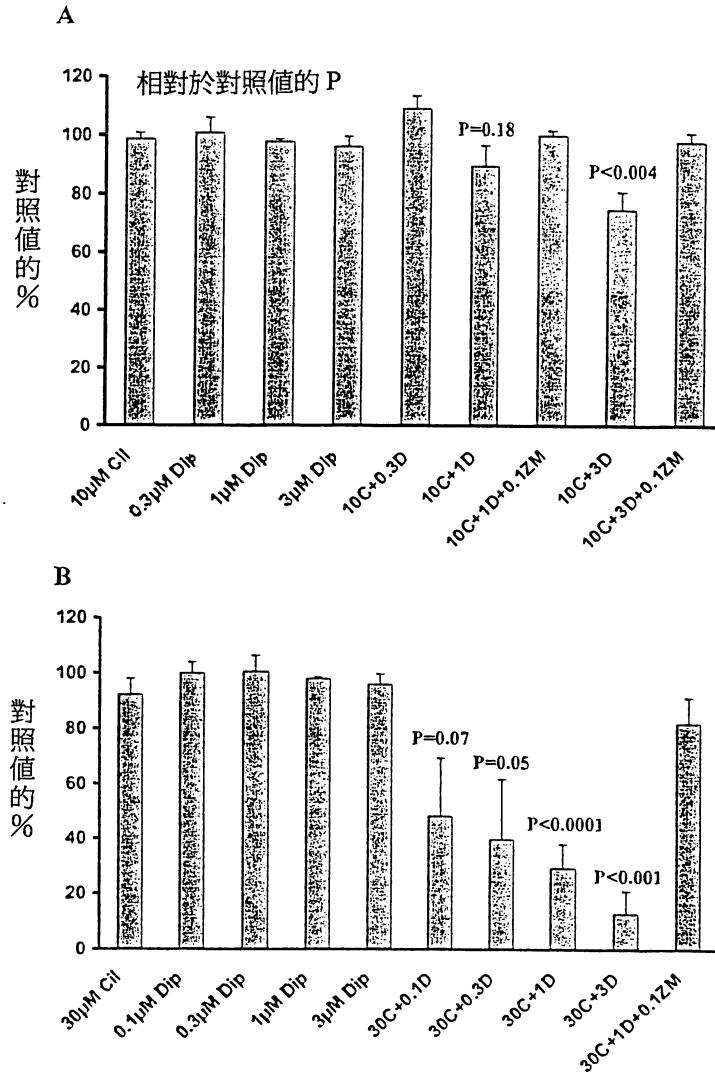


圖 11

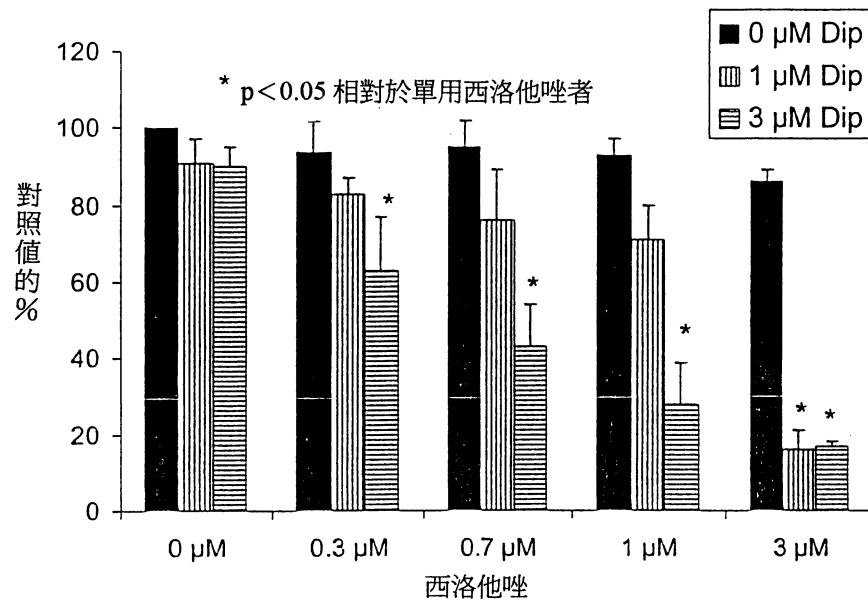


圖 12

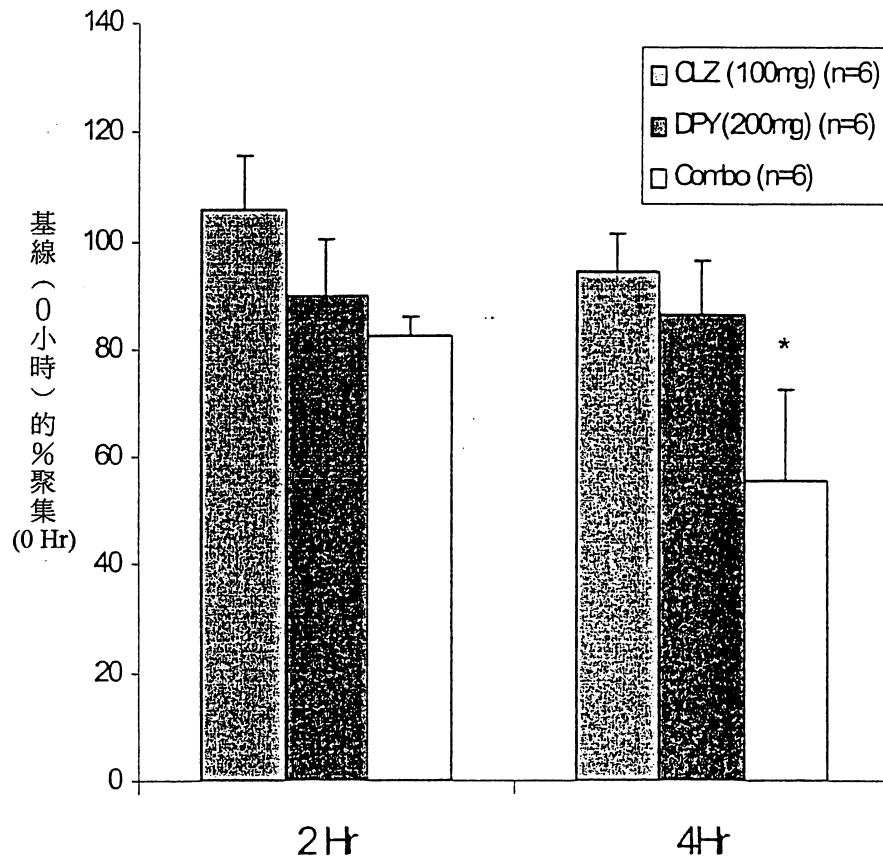
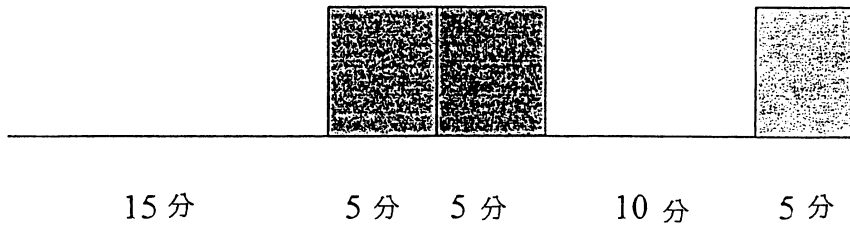


圖 13

分離出的兔子心臟方案



西洛他唑



西洛他唑+雙嘍達莫



雙嘍達莫

圖 14

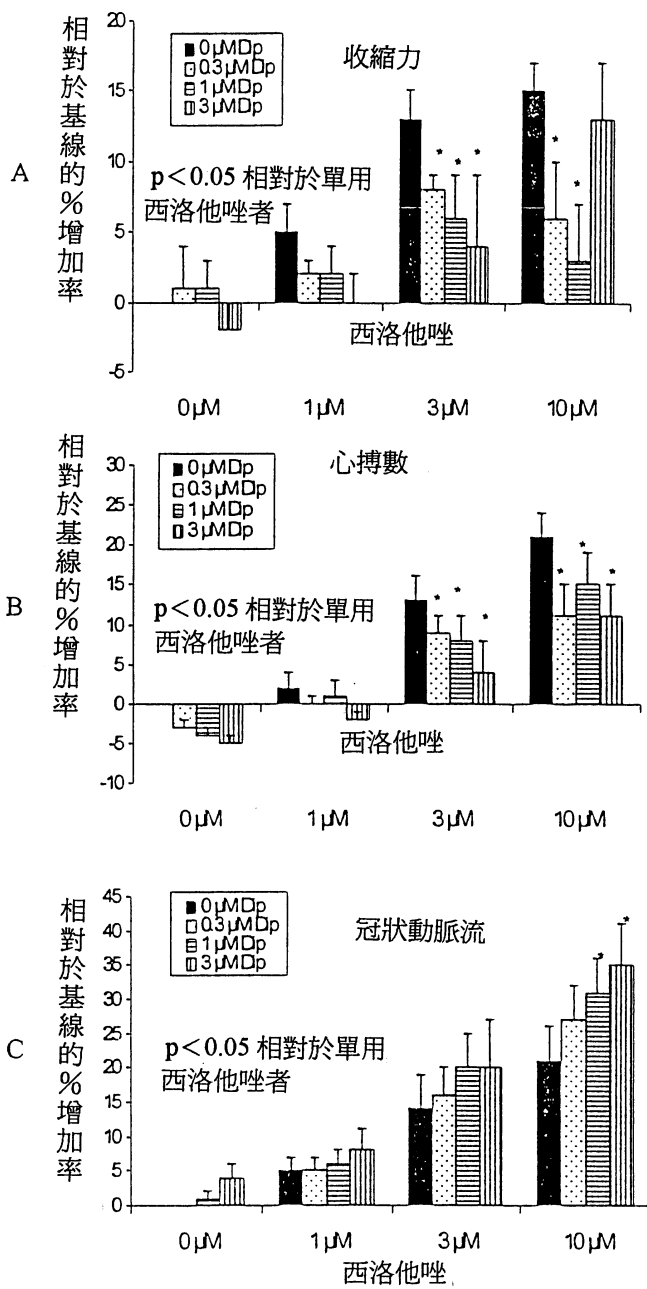
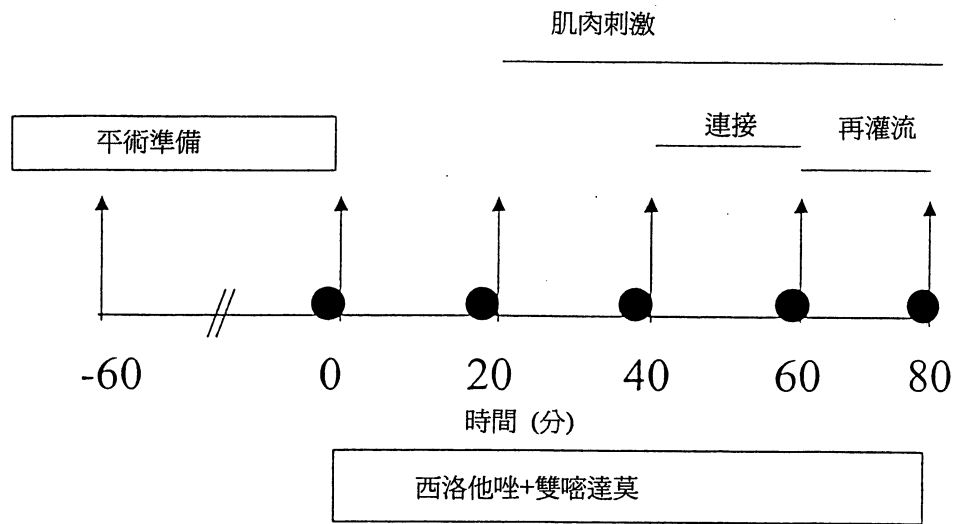
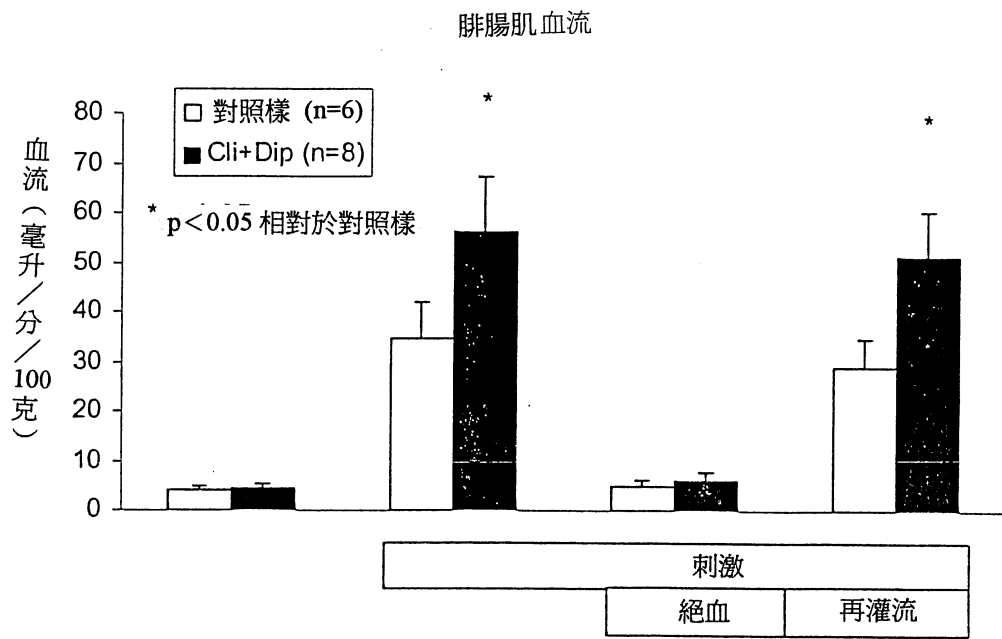


圖 15



● 以螢光微球體測定局部血流

圖 16



- (一)、本案指定代表圖為：第 3 圖
- (二)、本代表圖之元件代表符號簡單說明：無