

公告本

86.9.24 修正
年 月 日 補充

321601

申請日期	83.12.19.
案 號	83111851
類 別	Int. Cl ⁶ A61K 31/395

(以下各欄由本局填註)

中文說明書修正頁(86年9月)

A4

C4

321601

發明專利說明書

一、發明 名稱	中 文	抑制凝血酶之醫藥組合物
	英 文	"PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR INHIBITING THROMBIN"
二、發明 創作人	姓 名	1. 丹尼爾·瓊·莎爾 2. 吉拉德·佛洛伊德·史密斯
	國 籍	均美國
	住、居所	1. 美國印第安那州綠林悠閒街376號 2. 美國印第安那州印第安那普利市綠林大道825號
三、申請人	姓 名 (名稱)	美國禮來大藥廠
	國 籍	美國
	住、居所 (事務所)	美國印第安那州印第安那普利市 禮來公司中心
	代 表 人 姓 名	彼得·G·史君格

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

裝

訂

線

321601

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C 分類：

A6

B6

本案已向：

美 國 (地 區) 申 請 專 利 , 申 請 日 期 : 1993.12.21 案 號 : 08/171,394 , ☐ 有 ☐ 無 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)

血液凝固之過程(血栓形成)係由導致凝血酶形成之複雜蛋白質水解階式反應所引起。凝血酶可經蛋白質水解而移除溶於血漿中之纖維蛋白原A α 及B β -鏈之活化作用肽，啟始不溶性纖維蛋白之形成。

目前係藉由施用肝素及香豆素而進行抗凝血作用。非經腸道之藥理控制凝血及血栓形成係基於肝素之使用可抑制凝血酶。肝素係經促進內生性抗凝血酶Ⅲ(其為生理上主要之凝血酶抑制劑)之抑制作用而間接地對凝血酶作用。因為抗凝血酶Ⅲ在血漿中之量不定，且因表面結合性凝血酶對該間接機制有抗性，肝素治療可能無效。由於某些凝血分析被認為和功效及安全有關，一般係以凝血分析(特別是經活化部份凝血激酶時間(APTT)分析)監控肝素之含量。香豆素可經由阻斷凝血原酶合成中之轉譯後 γ -羧基化作用而阻礙凝血酶之生成。香豆素因作用機制之故，作用出現緩慢，係於施用後6-24小時出現。此外，其並非選擇性抗凝血劑。香豆素亦需藉凝血分析(特別是凝血原酶時間分析)監控。

本發明係有關本發明如下文所述之化合物係具口服生物可利用性之凝血酶抑制劑之發現。

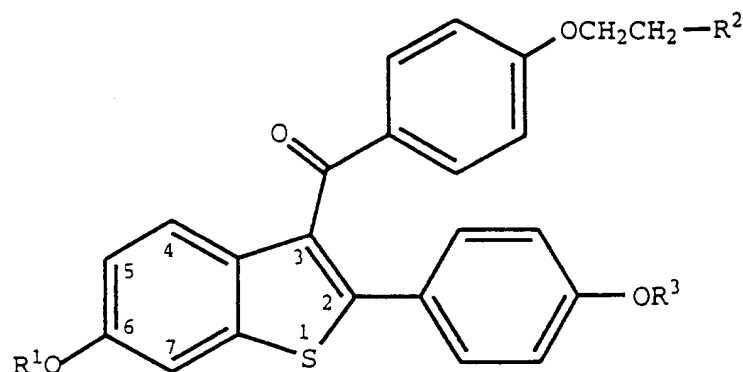
本發明提供一種抑制凝血酶之方法，其包含將有效量之式(I)化合物及其醫藥可接受鹽或溶合物施用於需治療之人

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

張

訂

五、發明說明 (2)



(I)

其中 R^1 及 R^3 各為氫、 $-CH_3$ 、 $-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-(C_1-C_8 \text{ 烷基})$ 或 $-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-Ar$ ，其中 Ar 為視情況經取代之苯基；

R^2 係選自吡咯啉基、六亞甲基亞胺基及六氫吡啶基。

本發明係關於一群選擇性之式 (I) 2-苯基-3-芳醯基苯并噻吩化合物可用於抑制凝血酶之發現。本發明亦包括該等化合物作為預防及治療栓塞性血栓疾病之抗凝血劑之用途，例如靜脈栓塞、肺部血栓、動脈栓塞、特別是心肌缺血、心肌梗塞及腦部栓塞、全身性過凝血病症及局部性過凝血病症，如血管造形術及冠狀動脈迴路手術後出現者、及全身性組織傷害（因其與炎症反應有關）。本發明使用方法係將可有效抑制凝血酶及其有關疾病與病況之劑量之式 (I) 化合物或其醫藥可接受鹽或溶合物施於需要之人或哺乳動物。抑制乙詞涵括其為一般所接受之意義，包括預防性投予人或哺乳動物，控制及 / 或治療與凝血酶有關之疾病與病況中之過量凝血酶。因此，本發明方法包括視需要而為之醫藥治療及 / 或預防性處理。

五、發明說明(3)

羅西芬(Raloxifene)係一種本發明之化合物，為 R^1 及 R^3 為氫且 R^2 為1-六氫吡啶基之式(I)化合物之鹽酸鹽。

一般而言，該化合物係與習用之佐劑，稀釋劑或載劑一起調配，壓縮成錠劑，或製成便於口服之醃劑或溶液劑，或藉肌肉或靜脈注射途徑施用。該化合物可經皮施用，且可調製成延遲釋放劑型等。

本發明方法所用化合物可依已知之方法製備，如美國專利第4,133,814, 4,418,068及4,380,635號所詳述者，此等文獻為本文之參考。大體而言，該方法係以具6-羟基及2-(4-羟基苯基)基團之苯并[b]噻吩為起始物。該起始化合物經保護、醃化及去保護而形成式(I)化合物。前述美國專利揭示此等化合物之製備實例。視情況經取代之苯基包括經 $C_1 - C_6$ 烷基、 $C_1 - C_4$ 烷氧基、羟基、硝基、氯、氟或三(氟或氯)甲基單或二取代之苯基。

本發明方法所用之化合物可與廣泛種類之有機及無機酸及鹼形成醫藥可接受酸及鹼加成鹽，其包括常用於藥劑化學之生理可接受鹽。此等鹽類亦構成本發明之一部份。用於形成鹽之典型無機酸包括鹽酸，氫溴酸，氫碘酸，硝酸，硫酸，磷酸及次磷酸等。亦可使用衍生自有機酸之鹽，該有機酸諸如脂族單元及二元羧酸，經苯基取代之烷酸，羧烷酸及羧烷二酸，芳族酸，及脂族及芳族磺酸。因此，醫藥可接受鹽包括乙酸鹽，苯乙酸鹽，三氟乙酸鹽，丙烯酸鹽，抗壞血酸鹽，苯甲酸鹽，氯苯甲酸鹽，二硝基苯甲酸鹽，羟基苯甲酸鹽，甲氧基苯甲酸鹽，甲基苯甲酸鹽，

五、發明說明 (4)

0-乙醯氧基苯甲酸鹽，萘-2-苯甲酸鹽，溴化物，異丁酸鹽，苯丁酸鹽， β -羥基丁酸鹽，丁炔-1,4-二酸鹽，己炔-1,4-二酸鹽，癸酸鹽，辛酸鹽，氯化物，肉桂酸鹽，檸檬酸鹽，甲酸鹽，反丁烯二酸鹽，羥乙酸鹽，庚酸鹽，馬尿酸鹽，乳酸鹽，蘋果酸鹽，順丁烯二酸鹽，羥丁烯二酸鹽，丙二酸鹽，苯乙醇酸鹽，甲磺酸鹽，菸鹼酸鹽，異菸鹼酸鹽，硝酸鹽，草酸鹽，酞酸鹽，對酞酸鹽，磷酸鹽，單氫磷酸鹽，二氫磷酸鹽，偏磷酸鹽，焦磷酸鹽，丙炔酸鹽，丙酸鹽，苯丙酸鹽，水楊酸鹽，癸二酸鹽，琥珀酸鹽，辛二酸鹽，硫酸鹽，硫酸氫鹽，焦硫酸鹽，亞硫酸鹽，亞硫酸氫鹽，磺酸鹽，苯磺酸鹽，對-溴苯磺酸鹽，氯苯磺酸鹽，乙磺酸鹽，2-羥基乙磺酸鹽，甲磺酸鹽，萘-1-磺酸鹽，萘-2-磺酸鹽，對甲-苯磺酸鹽，二甲苯磺酸鹽，及酒石酸鹽等。較佳之鹽為鹽酸鹽。

醫藥可接受之酸加成鹽通常係藉式(I)化合物與等莫耳或過量之酸反應而形成。反應物通常係於相容之溶劑中混合，如乙醚或苯。該鹽通常係於約1小時至10日內由溶液中析出，可藉過濾或習知之方法汽提溶劑而使之分離。

常用於形成鹽之鹼包括氫氧化銨，鹼金屬及鹼土金屬氫氧化物，碳酸鹽，及脂族及一級，二級及三級胺，脂族二胺。特別可用於製備加成鹽之鹼包括氫氧化銨，碳酸鉀，甲胺，二乙胺，乙二胺及環己胺。

醫藥可接受鹽與其母化合物相較，通常具較高之溶解度，因此較易配製成液體或乳劑。

五、發明說明(5)

醫藥組合物可藉此技藝已知之方法製備。例如，可使化合物與常用佐劑，稀釋劑或載劑調製成錠劑，膠囊劑，懸浮液劑及粉劑等。適用於該調配物之佐劑，稀釋劑及載劑包括：填料及增量劑，如澱粉，糖，甘露醇及矽酸衍生物；黏合劑，如羧甲基纖維素及他種纖維素衍生物，藻酸鹽，明膠及聚乙烯吡咯啉酮；濕潤劑，如甘油；崩解劑，如碳酸鈣及碳酸氫鈉；溶離延遲劑，如石蠟；吸收加速劑，如四級銨化合物；界面活性劑，如鯨蠟醇，甘油單硬脂酸酯；吸附載劑，如高嶺土及膨土；及潤滑劑，如滑石粉，硬脂酸鈣及鎂，與固態聚乙二醇。

該化合物亦可製成便於口服之醃劑或溶液劑，或適於非經腸道施用之溶液劑，如用於肌肉，皮下或靜脈注射。此外，該化合物適於製成延遲釋放劑型或類似者。該劑型可製成使活性成份僅於腸道或較佳係於腸道之特定部位釋放，可能的話係於一段時間內釋放。可使用例如聚合性物質及蠟作為包衣，外膜及保護性基質。

於適當疾病或病況中抑制凝血酶所需之本發明式(I)化合物之特定劑量依病症之嚴重性與性質，施用途徑，與相關因素而異，其可由醫師所決定。一般而言，可接受之每日有效劑量介於約0.1至約1000毫克，更典型為介於約50至約200毫克。需治療之個體每日服用該劑量一至約三次，或視需要更多次，以有效抑制凝血酶或其有關疾病或病況。

如帶有像六氫吡啶環等之鹼性基團之藥劑之習用施用法

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

製

訂

五、發明說明(6)

，一般較佳者係施用呈酸加成鹽之式(I)化合物。該化合物亦適於口服施用。下示口服劑型可適用於該目的。

調配物

下文調配物中"活性成份"係指式(I)化合物。

調配物 1: 明膠膠囊

以下示成份製備硬明膠膠囊：

成份	量(毫克/膠囊)
活性成份	0.1-1000
澱粉，NF	0 - 650
澱粉可流動粉末	0 - 650
矽酮液體，350厘沱	0 - 15

將成份摻合，通過美國篩目第45號篩，並將其填充至硬明膠膠囊中。

已製備之羅西芬膠囊調配物之實例如下示：

調配物 2: 羅西芬膠囊

成份	量(毫克/膠囊)
羅西芬	1
澱粉，NF	112
澱粉可流動粉末	225.3
矽酮液體，350厘沱	1.7

調配物 3: 羅西芬膠囊

成份	量(毫克/膠囊)
羅西芬	5
澱粉，NF	108

五、發明說明 (7)

澱粉可流動粉末 225.3

矽酮液體，350厘沱 1.7

調配物 4：羅西芬膠囊

成份 量 (毫克 / 膠囊)

羅西芬 10

澱粉，NF 103

澱粉可流動粉末 225.3

矽酮液體，350厘沱 1.7

調配物 5：羅西芬膠囊

成份 量 (毫克 / 膠囊)

羅西芬 50

澱粉，NF 150

澱粉可流動粉末 397

矽酮液體，350厘沱 3.0

上述特定調配物可依合理差異而改變。

以下示成份製備錠劑調配物：

調配物 6：錠劑

成份 量 (毫克 / 錠)

活性成份 0.1-1000

微晶纖維素 0-650

發煙二氧化矽 0-650

硬脂酸 0-15

混合各成份，將之壓製成錠。

或者，依下示者製備每錠含 0.1-1000 毫克活性成份之錠

五、發明說明 (8)

劑：

調配物 7：錠劑

成份	量 (毫克 / 錠劑)
活性成份	0.1-1000
澱粉	45
微晶纖維素	35
聚乙 烯 吡 咯 啉 酮 (10%水溶液)	4
羧 甲 基 纖 維 素 鈉	4.5
硬 脂 酸 鎂	0.5
滑 石 粉	1

使活性成份，澱粉及纖維素通過美國篩目第45號篩，充分混合。混合聚乙 烯 吡 咯 啉 酮溶液與生成之粉末，然後通過美國篩目第14號篩。於50-60℃下乾燥所得顆粒，通過美國篩目第18號篩。然後將先前通過美國篩目第60號篩之羧 甲 基 纖 維 素 鈉，澱粉，硬脂酸鎂及滑石粉加至顆粒中，混合後，於製錠機上壓製成錠。

依下示者製備每5毫升劑量含0.1-1000毫克藥劑之懸浮液：

調配物 8：懸浮液

成份	量 (毫克 / 5毫升)
活性成份	0.1-1000毫克
羧 甲 基 纖 維 素 鈉	50毫克
糖漿	1.25毫克

五、發明說明(9)

苯甲酸溶液	0.10毫升
香料	足量
色素	足量
純化水	加至5毫升

使藥劑通過美國篩目第45號篩，使其與羧甲基纖維素鈉及糖漿混合，形成均勻糊劑。以些許水稀釋苯甲酸溶液，香料及色素，攪拌中加入。然後加入足量之水至所需體積。

本發明一方面係提供一種抑制哺乳動物凝血酶之方法，其係將(凝血酶抑制)有效量之式(I)化合物施用於需治療之哺乳動物。

本發明抑制凝血酶之方法包括視需要而為之醫藥治療及/或預防性處理。

本發明進一步之具體實施例係關於治療人類或動物體內需抑制凝血酶之病症。預期本發明化合物可用於治療或預防動物(包括人類)體內之栓塞及血液與組織之過度凝血。該化合物潛在可治療及/或預防之疾病包括靜脈栓塞及肺部血栓、動脈栓塞，如心肌缺血、心肌梗塞、不定性心絞痛、栓塞性中風及周邊動脈栓塞。其次，預期該化合物可用於治療或預防動脈粥樣硬化性疾病，如冠狀動脈疾病、腦部動脈疾病及周邊動脈疾病。此外，預期該化合物可與解栓劑併用治療心肌梗塞。再者，預期該化合物可用於預防血栓溶解、皮下經管腔造形術(PTCA)及冠狀迴路手術後之再閉合。再者，預期該化合物可預防微手術後血栓再

五、發明說明 (10)

形成。此外，預期該化合物可用於與人工器官及心臟瓣膜有關之抗凝血治療。此外，預期該化合物可用於血液透析及擴散性血管內凝血之抗凝血處理。另一預期之用途為沖洗用於病患活體內之導管及機械裝備，並作為活體外保存血液、血漿及他種血液製品之抗凝血劑。甚者，預期該化合物於其他血液凝固作用為基礎病程或繼發性病理起源之疾病中有作用，如癌症，包括轉移，炎症性疾病，包括關節炎，及糖尿病。該抗凝血化合物係口服、非經腸道施用，如靜脈輸液(iv)、肌肉注射(im)或皮下注射(sc)。本發明方法亦可與血塊溶解劑併用，如組織胞漿素原活化劑(tPA)，經修飾tPA，鏈激酶(streptokinase)或尿激酶(urokinase)。若已產生血塊且動脈或靜脈被阻塞時(完全或部份)，通常使用血塊溶解劑。本發明可於施用該溶解劑之前或同時使用，或於單獨施用溶解劑後繼之使用、或與溶解劑一起施用，更佳者係與阿斯匹靈一起施用以防止血塊再度形成。

本發明方法亦可與血小板糖蛋白IIb-IIIa受體拮抗劑併用，以抑制血小板聚集。本發明化合物可於施用IIb-IIIa受體拮抗劑之前或同時施用，或於其後施用，以預防血塊形成或再度形成。

本發明方法亦可與阿斯匹靈併用。本發明化合物可於施用阿斯匹靈之前或同時施用，或於其後施用，以預防血塊形成及再形成。如前述者，較佳者，本發明化合物係與血塊溶解劑及阿斯匹靈併用。

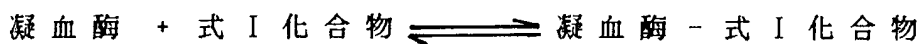
五、發明說明 (11)

以一或多種下文所述試驗評估本發明化合物作為有效凝血酶抑制劑之功效。

本發明化合物 (式 I 化合物) 可抑制哺乳動物體內凝血酶之作用。可使凝血酶水解螢光基質 N-苄醯基-D-苯基丙胺酸-L-纈胺酸-L-精胺酸-對硝基醯苯胺 (N-苄醯基-D-Phe-L-Val-L-Arg-對硝基醯苯胺)，測量凝血酶於活體外對醯胺酶活性之抑制以顯示凝血酶之抑制作用。

該分析法係混合 50 微升緩衝液 (0.03 M Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.4) 與 25 微升人類凝血酶溶液 (得自印第安那州 South Bend 市 Enzyme Research Laboratories 之純化人類凝血酶, 8 NIH 單位 / 毫升) 及 25 微升於溶劑 (50% 水及 50% 甲醇, 體積 / 體積) 中之受試化合物。然後加入 150 微升之螢光基質水溶液 (0.25 毫克 / 毫升), 於 405 nm 監控反應, 測量對硝基醯苯胺之釋出, 為基質之水解速率。以游離態凝血酶濃度對水解速率作圖, 得標準曲線。然後藉標準曲線將受試化合物之水解速率轉化成 " 游離凝血酶 " 值。以每一分析中之游離凝血酶量減已知所用受試化合物之起始量, 得結合凝血酶 (與受試化合物結合) 之量。以結合凝血酶之莫耳數減添加抑制劑 (受試化合物) 之莫耳數, 得每一分析中游離抑制劑之量。

K_{ass} 值為凝血酶與受試化合物 (I) 反應之理論平衡常數。



五、發明說明 (12)

[凝 血 酶 - 式 I 化 合 物]

$$Kass = [(\text{凝 血 酶}) \times (\text{式 I 化 合 物})]$$

Kass係計算受試化合物之濃度範圍，計算其平均值，以每莫耳公升之單位表示。

可實質上依循前述使用人類凝血酶之方法，使用下文所述之他種人類凝血系統絲胺酸蛋白酶和適當之螢光基質，以測定本發明化合物對該凝血因子絲胺酸蛋白酶之選擇性。

由印第安那州 South Bend市之 Enzyme Research Laboratories購買人類因子 Xa, IXa, XIa及 XIIa; 由丹麥 Leo Pharmaceuticals 購買人類尿激酶; 而重組經活化蛋白質 C (aPC) 則係禮來大藥廠依美國專利第 4,981,952 號之方法所製，該專利為本文之參考。螢光基質：N-苄醯基-Ile-Glu-Gly-Arg-對硝基醯苯胺 (用於因子 Xa); N-Cbz-D-Arg-Gly-Arg-對硝基醯苯胺 (用於因子 IXa 分析，作為因子 Xa 基質); 焦穀胺醯基-Pro-Arg-對硝基醯苯胺 (用於因子 XIa 及 aPC); H-D-Pro-Phe-Arg-對硝基醯苯胺 (用於因子 XIIa); 及焦穀胺醯基-Gly-Arg-對硝基醯苯胺 (用於尿激酶) 係購自瑞典斯德哥爾摩之 Kabi Vitrum 公司或印第安那州漁人市之 Midwest Biotech 公司。牛胰蛋白酶係購自紐澤西州 Freehold 市之 Worthington Biochemicals 公司，而人類血漿激肽釋放酶係購自瑞典斯德哥爾摩之 Kabi Vitrum 公司。用於血漿激肽釋放酶之基質為 H-D-Pro-Phe-Arg-對硝基醯苯胺係購自瑞典斯德哥爾

五、發明說明 (13)

摩之 Kabi Vitrum 公司。N-苄醯基-Phe-Val-Arg-對硝基醯苯胺為凝血酶及胰蛋白酶之基質，係使用市售試劑使用已知胜肽偶合法所製。

由印第安那州印第安那普利市之百靈佳殷格瀚購買人類胞漿素；由康乃狄克州格林威治市之 American Diagnostica 公司購買 nt-PA，為單鏈活性參考品；經修飾之 t-PA6 (mt-PA6)係依此技藝已知之方法 (請參閱 Burck, et al., J. Biol. Chem., 265, 5120-5177 (1990))於禮來大藥廠所製備。由瑞典斯德哥爾摩之 Kabi Vitrum 公司購買胞漿素螢光基質 H-D-Val-Leu-Lys-對硝基醯苯胺及組織胞漿素原活化劑 (t-PA)基質 H-D-Ile-Pro-Arg-對硝基醯苯胺。

前述螢光基質中，所用三字母代號 Ile、Glu、Gly、Pro、Arg、Phe、Val、Leu及Lys係分別代表異白胺酸、穀胺酸、甘胺酸、脯胺酸、精胺酸、苯丙胺酸、纈胺酸、白胺酸及離胺酸。

凝血酶抑制劑較佳者可免除由尿激酶、組織胞漿素原活化劑 (t-PA)及鏈激酶所引起之纖維蛋白溶解。其對於使用該等製劑作為鏈激酶、t-PA或尿激酶解栓治療之輔助，及使用該等製劑作為內因性免除纖維蛋白溶解 (有關於 t-PA及尿激酶)之抗栓塞劑極重要。除不干擾纖維蛋白水解蛋白酶之醯胺酶活性之外，可使用人類血漿凝塊及其以相當之纖維蛋白水解胞漿素原活化劑之溶解研究該免除纖維蛋白水解系統。

五、發明說明 (14)

材 料

以靜脈穿刺由知覺混種獵犬 (購自美國密西根州卡拉梅茲市 Hazelton-LRE 之兩性犬) 採取犬血漿，置入 3.8% 檸檬酸鹽。由新鮮犬血製得纖維蛋白原，人類纖維蛋白原係依已知方法 (Smith, Bioch. J., 185, 1-11 (1980); 及 Smith, et al., Biochemistry, 11, 2958-2967, (1972)) 由 in-date ACD 人血所製，為 I-2 部份。人類纖維蛋白原 (純度 98%，不含胞漿素) 係購自康乃狄克州格林威治市之 American Diagnostics 公司。依已知方法 (Smith, et al., Biochemistry, 11, 2958-2967, (1972)) 放射性標記纖維蛋白原 I-2 準備液。尿激酶係購自丹麥 Leo Pharmaceuticals 公司，2200 Ploug 單位 / 瓶。鏈激酶係購自紐澤西州 Somerville 市之 Hoechst-Roussel Pharmaceuticals 公司。

方 法 -- t-PA 對人類血漿凝血塊溶解之作用

於微試管中，將 50 微升凝血酶 (73 NIH 單位 / 毫升) 加至 100 微升含 0.0229 μ Ci 125-碘標記纖維蛋白原之人類血漿中，形成人類血漿凝血塊。以 50 微升尿激酶或鏈激酶 (50, 100 或 1000 單位 / 毫升) 覆蓋該凝血塊，於室溫下恆溫培養 20 小時，進行凝血塊溶解研究。培養後，將試管置於 Beckman Microfuge 中離心。將 25 微升上清液加至 1.0 毫升體積之 0.03 M Tris / 0.15 M NaCl 緩衝液中，進行 γ 計數。對照組不含凝血酶 (並取代緩衝液)，100% 溶解。將化合物置於濃度為 1, 5, 及 10 微克 / 毫升之覆蓋溶

五、發明說明 (15)

液中，評估凝血酶抑制劑可能對纖維蛋白溶解產生之干擾。以線性內差法由數據估算 IC_{50} ，其為特定蛋白纖維溶解劑濃度時50%溶解之值。

抗凝血活性材料

靜脈穿刺由知覺混種獵犬（購自美國密西根州卡拉梅茲市 Hazelton-LRE 之兩性犬）或經麻醉雄性 Sprague-Dawley 大老鼠（購自美國印第安那州印第安那普利市之 Harlan Sprague-Dawley, Inc. 公司）採取犬及老鼠血漿，加入 3.8% 檸檬酸鹽。人類纖維蛋白原係依已知方法（Smith, Bioch. J., 185, 1-11 (1980); 及 Smith, et al., Biochemistry, 11, 2958-2967, (1972)）由 in-date ACD 人血所製，為 I-2 部份。亦由康乃狄克州格林威治市之 American Diagnostics 公司購買人類纖維蛋白原，純度 98%，不含胞漿素。凝血試劑 ACTIN，凝血激酶，及人類血漿由佛羅里達州邁阿密市 Baxter Healthcare Corp., Dade Division，購買。使用 Parke-Davis（密西根州底特律市）所購之牛凝血酶進行血漿凝血分析。

方法抗凝血之測定

使用已知之抗凝血方法（Smith, et al., Thrombosis Research, 50, 163-174 (1988)）。以 CoAScreener 凝血儀（American LABOR, Inc.）進行所有凝血分析之測量。添加 0.05 毫升生理鹽水及 0.05 毫升凝血激酶-C 試劑至

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

五、發明說明 (16)

0.05毫升試驗血漿中，測量凝血原酶時間(PT)。使0.05毫升受試血漿與0.05毫升肌動蛋白試劑培養120秒，接著與0.05毫升CaCl₂(0.02M)培養，測量經活化部份凝血激酶時間(APTT)。將0.05毫升生理鹽水及0.05毫升凝血酶(10 NIH單位/毫升)加至0.05毫升受試血漿中，測量凝血酶時間。將廣範圍濃度之式(I)化合物加入人或動物血漿中，測定對APTT，PT及TT分析之延長作用。使用線性內差法估計延長各分析一倍時間所需之濃度。

動物

以賽樂仙(xylazine, 20毫克/公斤皮下注射)及給特敏(ketamine, 120毫克/公斤皮下注射)麻醉雄性Sprague Dawley大老鼠(350至425克，購自印第安那州印第安那普利市Harlan Sprague Dawley, Inc.)，以熱水袋(37℃)覆蓋。於頸靜脈加套管，便於輸液。

動脈 - 靜脈支路模式

以20公分長之聚乙烯PE 60管環套左頸靜脈及右頸動脈。將管內具有棉線(5公分)之6公分較大管(PE 190)為中段管，嵌合較長之管，構成動脈 - 靜脈支路。使血液在支路中循環15分鐘後，仔細移開棉線，秤重。將溼棉線重減掉棉線及血栓之總重(請參閱J. R. Smith, Br J Pharmacol, 77:29, 1982)。

動脈損傷之FeCl₃模式

以中線腹面頸部切開術取出頸動脈。將熱電偶置於每一動脈下方，以條狀圖形記錄器連續記錄血管溫度。縱切套

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

表

訂

五、發明說明 (17)

管袖 (0.058 ID x 0.077 OD x 4 mm, 購自 Baxter Med. 矽酮製), 環圈住每一動脈, 在熱電偶正上方。將 FeCl_3 六水合物溶於水中, 以實際 FeCl_3 單獨之重量表示濃度 (20%)。取 2.85 微升滴入套管袖中, 使動脈浸浮於熱電偶探針之上, 造成動脈傷害並引發栓塞。迅速之溫度下降表示人工閉合產生。以分鐘記錄產生閉合之時間, 為施用 FeCl_3 至溫度迅速下降之時間 (請參閱 K.D. Kurz, Thromb. Res., 60: 269, 1990)。

自發性溶血模式

活體外數據顯示, 胜肽凝血酶抑制劑可抑制凝血酶及他種絲胺酸蛋白酶, 如胞漿素與組織胞漿素原活化劑。將經標記之全血凝血塊植入肺循環中, 測量自發性溶血之速率, 以評估化合物是否可抑制活體內纖維蛋白溶解。將大老鼠血 (1 毫升) 迅速地與牛凝血酶 (4 IU, 購自 Parke Davis) 及 ^{125}I 人類纖維蛋白原 (5 μCi , ICN) 混合, 立即裝入矽橡膠製管中, 於 37°C 下恆溫培養一小時。由管中挑出老化之血栓, 切成 1 公分段, 以一般生理鹽水沖洗三次, 於 γ 計數器上判讀各段。將已知計數之段充於導管中, 接著植入頸靜脈中。導管端接近右心房附近, 使凝血塊流進肺循環中。植入一小時後, 摘取心臟及肺, 分別計數。以下示百分比表示溶血:

$$(\text{注入之 cpm} - \text{肺中 cpm}) \times 100$$

$$\text{溶血 \%} = \frac{\text{注入之 cpm}}{\text{}}$$

植入之凝血塊之纖維溶解係時間依賴性的 (請參閱

五、發明說明 (18)

J.P. Clozel, Cardiovas. Pharmacol., 12:520, 1988)。

凝血參數

以纖維蛋白計器測量血漿凝血酶時間(TT)及經活化部份凝血激酶時間(APTT)。由頸部導管採血，裝入含檸檬酸鈉(3.8%，1至9份之血)之針筒中。使大老鼠血漿(0.1毫升)與生理鹽水(0.1毫升)及牛凝血酶(0.1毫升，30U/毫升TRIS緩衝液；購自Parke Davis)於37℃下混合，進行TT之測量。使血漿(0.1毫升)與APTT溶液(0.2毫升，Organon Teknike)恆溫培養(37℃)五分鐘，加入CaCl₂(0.025M)，啟始凝血，進行APTT測量。分析進行二重覆，取平均值。

生物可利用性指數

可以生物可利用性，血漿凝血酶時間(TT)之量測推翻TT之上升係單純由母化合物對凝血酶之抑制之假設。於靜脈注射血塊至麻醉大老鼠及於口服投予經禁食之知覺大老鼠後，測量凝血酶抑制劑對TT之作用之時間變化。由於血液量之限制以及係測量由處理之時至其反應性恢復處理前之值時之時間變化，係使用兩群之大老鼠。每一採樣群代表不同之續列時間點。以時間變化之平均TT值計算曲線下面積(AUC)。以下式計算生物可利用性，以相對活性百分比表示。

計算血漿TT時間變化之曲線下面積，依劑量調整之。依下式計算生物可利用性指數，為“相對活性%”。

五、發明說明 (19)

口服 AUC 靜脈注射劑量

相對活性 % = 靜脈注射 AUC X 口服劑量 X 100
化合物

每日製備含於一般生理鹽水之新鮮化合物溶液，隨血塊注射，或於開始前 15 分鐘輸液投予，持續整個實驗過程。血塊靜脈注射體積為 1 毫升 / 公斤，口服為 5 毫升 / 公斤，而輸液量為 3 毫升 / 小時。

統計

以平均值 ± SEM 表示結果。使用單相分析變異測統計學顯著性差異，然後使用 Dunnett's 試驗測量何者有異。等量平均值之顯著性程度排除假設為 $P < 0.05$ 。

動物

使公狗 (小獵犬 ; 18 月齡至兩歲 ; 12 - 13 公斤 , 購自紐約 14516, North Rose 之 Marshall Farms) 禁食一夜 , 用藥後 240 分鐘 , 餵以 Purina 牌認可之處方食品 (密蘇里州聖路易市之 Purina Mills) 。可自由飲水。室溫維持於 66-74°F , 相對溼度 45-50% , 光照為 0600-1800 。

藥理動力學模式

於施藥前 , 將化合物溶於滅菌 0.9% 生理鹽水中 , 製成 5 毫克 / 毫升準備液。口服灌予犬隻單一 2 毫克 / 公斤劑量之受試化合物。於施藥後 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4 及 6 小時 , 由頭部靜脈採血 (4.5 毫升) 。血液裝於含檸檬酸鹽之 Vacutainer 管中 , 在離心取血漿之前 , 置於冰上。將二硝基苯基肼加至血漿中 , 以 HPLC (Zorbax SB-C8

五、發明說明(20)

管柱)分析，溶析液為甲醇 / 500 mM 乙酸鈉，其 pH 經磷酸 (60:40, v/v) 調整至 7。記錄受試化合物於血漿中之濃度，用以計算藥理動力學參數：排除速率常數， K_e ；完全擴清， Cl_t ；分佈體積， V_d ；受試化合物達最大血漿濃度之時間， T_{max} ；受試化合物於 T_{max} 時之最大濃度， C_{max} ；血漿半衰期， $t_{0.5}$ ；及曲線下面積，AUC；受試化合物吸收部份， F 。

犬隻冠狀動脈栓塞模式

所用犬隻手術準備液及儀器如 Jackson, et al., Circulation, 82, 930-940 (1990) 所述者。以戊基巴比妥鈉 (30 毫克 / 公斤靜脈注射) 麻醉混種獵犬 (6 至 7 月齡，兩性，購自密蘇里州 Kalamazoo 市之 Lazwlton-LRE)，插入喉管，供以室溫空氣。調整潮流氣及呼吸速率，保持血中 PO_2 ， PCO_2 及 pH 於正常量。插入真皮下針電極，記錄鉛 II 心電圖。

經左邊中側頸部切開，移出左頸靜脈及一般頸動脈。以預調刻度之 Millar transducer (德州休斯頓市之 Millar Instruments 所購之 MPC-500 型) 插入頸動脈中，連續量測動脈血壓 (ABP)。將套管裝於頸靜脈，以於實驗中採血。此外，將套管裝於兩後腿之股骨靜脈，以施用受試化合物。

在第五肋間腔處進行左胸切開術，將心臟懸浮於心邊籃中。將冠狀動脈左旋 (LCX) 1 至 2 公分之一節分離，拉近第一大節心房彎處。將長 3-4 mm 之 26 刻度針端金屬陽

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (21)

極 (鐵氟龍包覆，30-刻度銀鍍銅線) 插入 LCX，使其與動脈血管表面接觸 (於實驗末確認)。將陰極置於皮下，完成刺激迴路。將可調整式塑膠製閉合器環繞 LCX，在電極區上方。將預經刻度之電磁流探針 (北卡洛萊納州 King 之 Carolina Medical Electronics) 置於 LCX 靠近陽極處，以量測冠狀動脈血流 (CBF)。調整閉合器，於機械性閉合 LCX 10 秒後，產生 40-50% 之主動性血流反應之抑制作用。記錄所有血液動力及心電圖測量值，以數據獲取系統 (賓州 Malvern 市 Modular Instruments 所購之 M3000 型) 分析之。

血栓形成及化合物施用計劃

將 100- μ A 之直流電 (DC) 接於陽極，造成 LCX 血管之電解損傷。維持該電流 60 分鐘，然後不論血管是否閉合，均終止電流。血栓自發性地形成，至 LCX 已完全閉合為止 (此時 CBF 為零，S-T 分節增加)。於閉合血栓老化一小時後，施用化合物。隨血栓形成劑 (例如組織胞漿素原活化劑，鏈激酶，APSAC) 之輸液，同時施用劑量為 0.5 及 1 毫克 / 公斤 / 小時之本發明化合物兩小時。於施用本發明化合物後，重灌注 3 小時。CBF 為零若持續 ≥ 30 分鐘，表示於成功溶血後冠狀動脈再閉合。

血液學及齒齦流血時間測定

以血液學分析儀 (加州 Mount View 之 Sequoia-Turner 所購之 Cell-Dyn 900) 測量 40 微升加有檸檬酸鹽 (3.8%) 之檢體之全血細胞計數，血球蛋白，及血容積比。以

(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)

Simplat II 出血裝置 (北卡洛萊納州之 Organon Teknika Durhan) 測量齒齦出血時間。使用該裝置於犬隻左顎上下齒齦劃出兩個平行切口。每一切口為 3 mm 寬 x 2 mm 深。切開後，以馬錶測量出血時間。當血液由切口湧出時，使用棉花棒吸取。切割至流血停止之時間為齒齦出血時間。記錄臨施用受試化合物時 (0 分鐘)，輸液後 60 分鐘，最終施用受試化合物 (120 分鐘) 及實驗末之出血時間。

以單相差異分析 (ANOVA) 分析所有數據，然後進行 Student-Neuman-Kuels post hoc t 試驗，測量顯著性。使用重複之 ANOVA 測量實驗中時間點之顯著性差異。統計學差異至少為 $p < 0.05$ 時表示具統計學差異。所有值以平均值 $\pm$ SEM 表示。所有試驗依美國生理學會 (American Physiological Society) 之準則進行。該試驗進一步之詳細步驟見於 Jackson, et al., J. Cardiovasc. Pharmacol. 21, 587-599 (1993)。

亦評估本發明式 (I) 化合物於 0.25, 0.50 及 1.0 毫克 / 公斤 · 小時劑量時之齒齦出血時間分析。

本發明化合物可於任何前述分析法中對凝血酶或其所顯現之特徵產生正面之影響。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

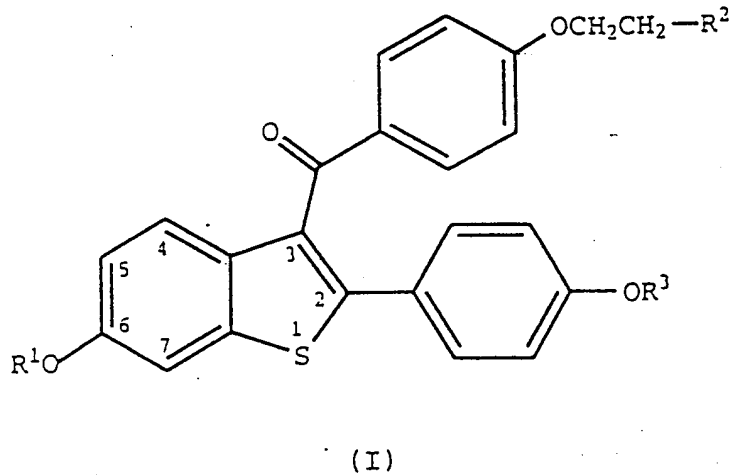
裝

訂

線

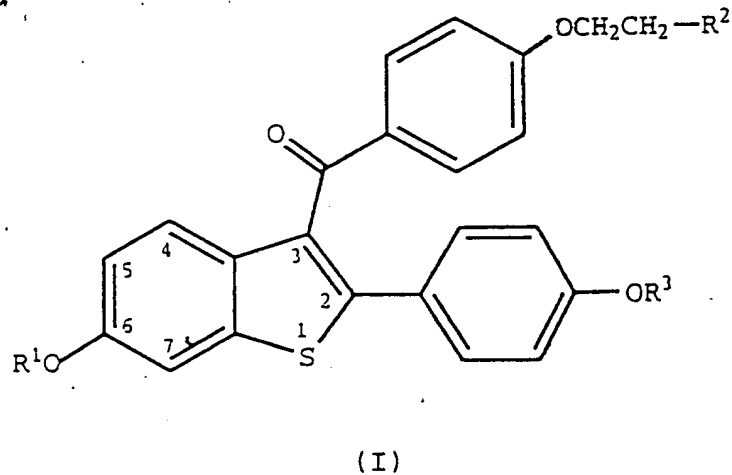
四、中文發明摘要 (發明之名稱： 抑制凝血酶之醫藥組合物)

本發明揭示一種抑制凝血酶及與其有關疾病與病症之方法，其包含將有效量之式(I)化合物或其醫藥可接受鹽或溶合物施用於需治療之人



英文發明摘要 (發明之名稱： "PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR)
INHIBITING THROMBIN"

A method of inhibiting thrombin and its attending diseases and conditions comprising administering to a human in need of treatment an effective amount of a compound having the formula



四、中文發明摘要(發明之名稱:)

其中 R_1 及 R_3 各為氫;

R_2 係選自吡咯啉基、六亞甲基胺基及六氫吡啉基。

英文發明摘要(發明之名稱:)

wherein R^1 and R^3 are independently hydrogen;

R^2 is selected from the group consisting of pyrrolidino, hexamethyleneamino, and piperidino; or a pharmaceutically acceptable salt of solvate thereof.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

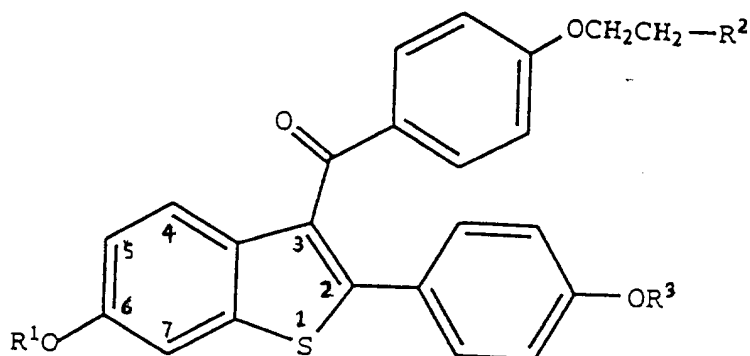
裝

訂

線

六、申請專利範圍

1. 一種用於抑制凝血酶之醫藥組合物，其含有下式化合物



(I)

其中

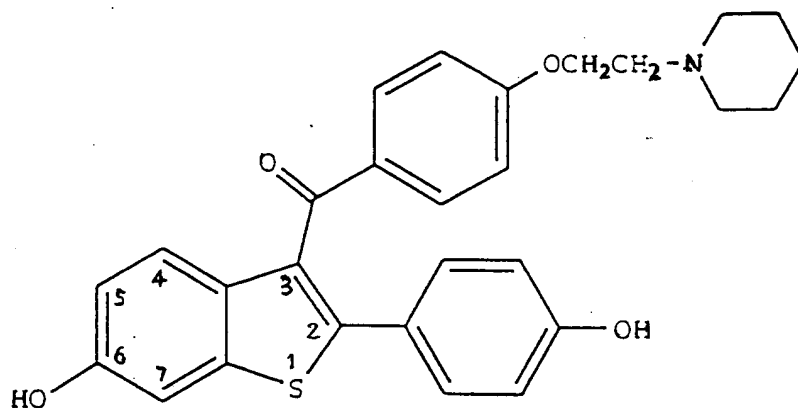
R^1 及 R^3 各為氫；

R^2 係選自吡咯啉基及六氫吡啶基；

或其醫藥可接受鹽或溶合物為活性成份。

2. 根據申請專利範圍第 1 項之醫藥組合物，其中該化合物係

六、申請專利範圍



或其鹽酸鹽。