

申請日期：89 5 4	案號：89 108 008
類別：XHK3/0	

(以上各欄由本局填註)

公告本

# 發明專利說明書

I225397

一、發明名稱	中文	沙立樸吩相關衍生物之製備及對心臟疾病之應用
	英文	
二、發明人	姓名 (中文)	1. 蘇銘嘉 2. 李水盛
	姓名 (英文)	1. 2.
	國籍	1. 中華民國 2. 中華民國
	住、居所	1. 台北市溫州街16巷12-1號 2. 台北市水源路57號八樓
三、申請人	姓名 (名稱) (中文)	1. 行政院國家科學委員會
	姓名 (名稱) (英文)	1.
	國籍	1. 中華民國
	住、居所 (事務所)	1. 台北市和平東路二段一〇六號十八樓
	代表人姓名 (中文)	1. 黃鎮台
	代表人姓名 (英文)	1.



本案已向

國(地區)申請專利

申請日期

案號

主張優先權

無

有關微生物已寄存於

寄存日期

寄存號碼

無

## 五、發明說明 (1)

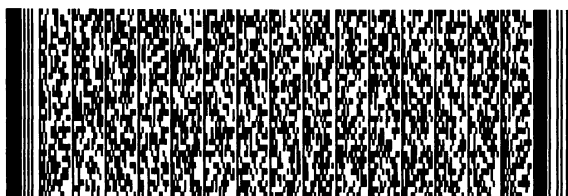
## 發明領域

本發明係有關於製備沙立樸吩 (thaliporphine) 相關衍生物作為活性成分，以治療及/或預防心臟疾病的醫藥組合物。

## 發明背景

隨著工業化進展與生活改善，老年人口不斷增加，伴隨而來的心臟血管疾病之人口亦逐漸增加，每年因心臟相關疾病致死者，均高居十大死因之一，故有關心臟血管疾病之預防與治療，就成為非常重要之研究課題。心臟疾病主要包括心絞痛、急性心肌梗塞及冠狀動脈粥樣硬化，其與血管收縮或栓塞有關，又冠狀動脈栓塞常導致心臟肥厚擴大，引起心衰竭並誘發心律不整。同樣地，長期心律過快亦會造成心臟擴大而引起擴張性心衰竭，嚴重的心衰竭常使心臟輸出功能受阻，導致身體許多器官（例如，腦部及腎臟）功能受損。另外，急性心肌梗塞病變除了在缺血期間會導致心肌壞死之外，在缺血再灌流期間亦可能會產生大量的自由基，而引起心臟損傷並誘發心律不整，而使心臟輸出功能急速減少，導致病患突發性死亡。

對於心衰竭病患之治療藥物包括利尿劑、洋地黃、血管加壓素轉化酶抑制劑、交感神經致活劑以及磷酸雙酯酶抑制劑，其中，洋地黃及交感神經致活劑或磷酸雙酯酶抑制劑雖然對心臟收縮力有明顯增強的效果，但這些藥物可能會誘發心律不整或使心跳變快，故長期使用這些藥物對



## 五、發明說明 (2)

病患的存活率並無改善效果。最近，血管加壓素受體阻斷劑、血管內皮素受體阻斷劑，以及同時具有交感神經甲型與乙型受體阻斷作用之卡菲迪羅 (Carvedilol)，分別證實對心臟衰竭病患的病情及存活率有改善的效果 (Ye TL, et al, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1992, 263:92-98 ; Bristow MR, et al, *Circulation*, 1996, 94:2807-2816 ; Colucci WS, et al, *Circulation*, 1996, 94:2800-2806)。

由於冠狀動脈阻塞、心衰竭與心律不整之間有密切之相關性，傳統上對於心衰竭所使用的藥物為烏巴因 (ouabain)，其可增強心肌收縮，但通常也造成病患的心律不整，對病患的存活率並無增加的效果。因此，如何發展一種藥物以防止冠狀動脈阻塞、減少冠狀動脈阻塞後之心臟壞死，以及減少冠狀動脈缺血及缺血再灌流時之心律不整，並改善病患的病情及存活率，即為本發明之主要目的。

過去曾有研究報導指出，2-苯基-4-酮基氫化喹啉 (Su MJ, et al, *Brit. J. Pharmacol.*, 1993, 110:310-316)、樟科或芸香科植物成分沙立樸吩 (Thaliporphine) (Su MJ, et al, *Eur. J. Pharmacol.*, 1994, 254:141-150)、白葉瓜馥木成分鵝掌楸鹼 (Liriodenine) (Chang GJ, et al, *Brit. J. Pharmacol.*, 1996, 118:503-512)、厚殼桂成分(-)山核桃素 (Caryachine) 以及小蘗鹼衍生物，均有使心臟收縮力增強的作用 (Wu MH, et al,



## 五、發明說明 (3)

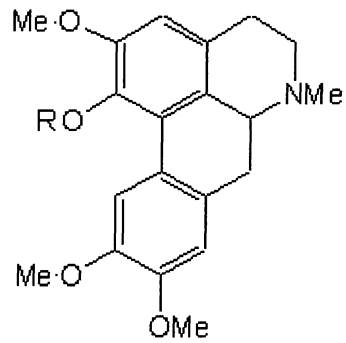
*Brit. J. Pharmacol.*, 1995, 116:3211-3218) ; 其中, Liriodenine、(-)-Caryachine 及小藥鹼衍生物, 均證實同時具有抗心律不整的效果。然而, 過去抗心律不整的效果, 都是以離體大鼠心臟採用30分鐘結紮再灌流, 來誘發心律不整以評估藥效, 但是其他動物心臟組織之外流鉀電流種類與大鼠仍有差異。此外, 有關Su 等人, *Eur. J. Pharmacol.*, 1994, 254:141-150 的研究中, 沙立樸吩 (Thaliporphine) 是具有使心肌收縮、內流鈣電流增加的功能, 由於促進心肌收縮對於缺血性心肌壞死並無益處, 因此理論上具有此功能的藥物, 應不可能有效於治療心肌梗塞及心律不整。但本發明之發明者卻發現, 沙立樸吩及其相關衍生物可應用於對心臟疾病之治療及預防, 更特別地, 沙立樸吩在低劑量濃度的使用之下, 即可具有上述之功能。

## 發明摘述

本發明的第一種形態, 是提供一種用於在哺乳動物中, 治療及/或預防心臟疾病的醫藥組合物, 包括一有效量之式I化合物:



## 五、發明說明 (4)



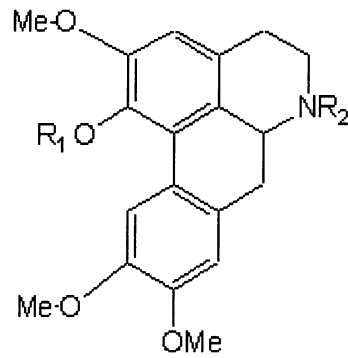
I

及其酯類衍生物，其中，R是氫、乙醯、丙醯或丁醯，或其藥學上可接受的鹽類；以及一藥學上可接受的載體或賦形劑。

本發明的第二種形態，是提供一種式II化合物，以及以式II化合物為活性成分的醫藥組合物，用於在哺乳動物中治療及/或預防心臟疾病，其中，此醫藥組合物包括一有效量之式II化合物及其酯類衍生物，其中， $R_1$ 是氫、乙醯、丙醯或丁醯， $R_2$ 是乙基、烯丙基、丙基、丁基、異丁基或環丙基甲基，或其藥學上可接受的鹽類；以及一藥學上可接受的載體或賦形劑。

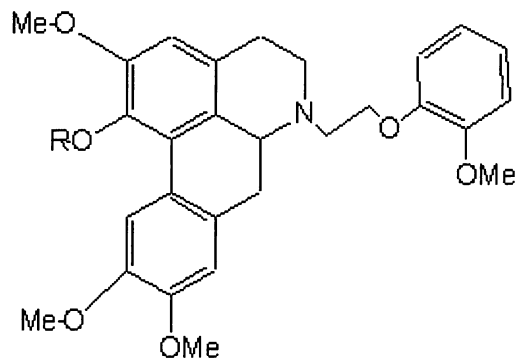


## 五、發明說明 (5)



II

本發明的第三種形態，是提供一種式III化合物，以及以式III化合物為活性成分的醫藥組合物，用於在哺乳動物中治療及/或預防心臟疾病，其中，此醫藥組合物包括一有效量之式III化合物及其酯類衍生物，其中，R是氫、乙醯、丙醯或丁醯，或其藥學上可接受的鹽類；以及一藥學上可接受的載體或賦形劑。



III

為了讓本發明之上述和其他目的、特徵，及優點能更



## 五、發明說明 (6)

明顯易懂，下文特舉較佳實施例並配合所附圖示，做詳細說明如下：

## 圖示之簡單說明

第1圖係顯示 $10\ \mu\text{M}$ 的奎寧丁在房室結傳導上的效果之心電圖，右心房之刺激電極以每380毫秒刺激1次之頻率，放置於右心房上腔靜脈交接處之心房表面做刺激，其中，A：心房去極化訊號，H：喜氏束極化訊號，S：電刺激訊號，V：心室去極化訊號；

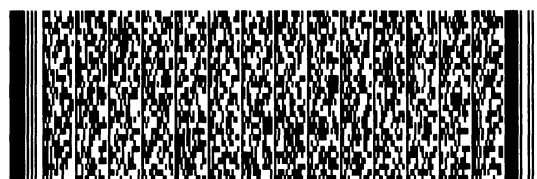
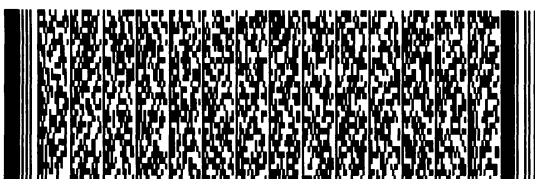
第2圖係顯示 $10\ \mu\text{M}$ 的沙立樸吩對房室結傳導上影響之心電圖，右心房之刺激電極以300毫秒刺激1次之頻率，放置於右心房上腔靜脈交接處之心房表面做刺激，其中，代號如同第1圖之說明；

第3圖係顯示沙立樸吩對於由銅離子所引起的人類LDL之脂質過氧化作用的抑制效果，數據以平均值士標準差表示， $n=4$ ，其中，\*  $p < 0.05$ ，\*\*  $p < 0.01$ ，\*\*\*  $p < 0.001$ ，相較於賦形劑；

第4圖係顯示沙立樸吩對於清除DPPH自由基的劑量反應曲線，數據以平均值士標準差表示， $n=4$ ；

第5(A)圖係顯示由 $10\ \mu\text{M}$ 的沙立樸吩而將心律不整回復成正常靜脈竇跳動，上半圖是心室心電圖，下半圖是右下心房之心電圖，其中，A：心房去極化，V：心室去極化；5(B)圖係顯示沙立樸吩之抗心律不整的功效；

第6-7圖係顯示天竺鼠心室標本中，由烏巴因所引起





#### 五、發明說明 (7)

的心律不整，再給予沙立樸吩及其相關衍生物，所量測之心臟收縮圖；

第8圖係顯示沙立樸吩所處理的大鼠之收縮壓（實心符號）及舒張壓（空心符號），其中，對照組及藥物組之差異並無統計上的意義（ANOVA）；以及

第9圖係顯示沙立樸吩所處理的大鼠之心跳反應，其中，對照組及藥物組之差異並無統計上的意義（ANOVA）。

#### 發明詳述

沙立樸吩（Thaliporphine；THP）是一種存在於樟科或芸香科植物中的天然化合物，具有使心肌收縮的功能（Su, et al, 1994）。但這種具有使心肌收縮、內流鈣電流增加的功能，一般並不認為會有效於治療心肌梗塞及心律不整。在以下的具體實施例中，本發明以天竺鼠離體心臟，利用整體性缺血（global ischemia）再灌流，來評估THP及其相關衍生物之抗心律不整效果，用於比較傳統上以大鼠結紮再灌流的模式。本發明更利用0.6 ~ 0.8  $\mu\text{M}$ 的烏巴因（ouabain），來抑制鈉/鉀幫浦（ $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pump），以增加天竺鼠心收縮力並誘發心律不整，再給予THP及其相關衍生物，觀察其對烏巴因之抗心律不整效果。此外，本發明更進一步進行活體試驗，以靜脈注射方式給藥THP，觀察其在活體中（*in vivo*）對缺血及缺血再灌流期間之心律不整發生率，以及缺血期間心肌壞死範圍



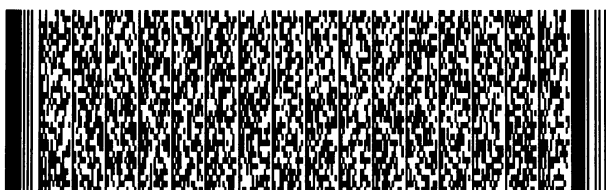
## 五、發明說明 (8)

是否有減小的效果，並評估動物存活率是否增加。再者，本發明比較THP與現有的抗心律不整藥物，對大鼠及天竺鼠之電生理學作用，並評估這些衍生物之自由基清除作用，在活體試驗中除了評估其治療效果外，並測定動物血液中乳酸脫氫酶 (LDH) 的濃度變化，以作為心肌損傷程度的指標。另外，本發明亦發現THP對正常動物血液中的一氧化氮 (NO) 的產量並無影響，但對缺血及缺血再灌流的動物之NO產量則有選擇性的增加，而達到保護心臟的效果。

根據本發明的一種形態，這些THP及相關衍生物及其酯類或其藥學上可接受之鹽類，可以口服或注射的方式給藥，或是在藥學上可接受的載體或賦形劑之存在下投藥予病患。

此處所指的藥學上可接受的鹽類，包括無機酸，例如：鹽酸、氫溴酸、硫酸和磷酸之鹽類；有機酸，例如：醋酸、順丁烯二酸、酒石酸、甲磺酸之鹽類；胺基酸，例如：精胺酸、天門冬酸和麩胺酸之鹽類。適當的劑型包括滅菌水溶液或懸浮液、滅菌粉末、錠劑、糖衣錠、丸劑、膠囊劑等，同時，這些THP及其衍生物也可併入持續釋放製劑或配方中。藥學上可接受的載體或賦形劑包括任何和所有的溶媒、崩散劑、結合劑、潤滑劑、吸收延遲劑等。

以下將舉出本發明之較佳具體實施例，作更詳細的說明，但這些實施例僅為本發明之舉例說明，而並非用以限定本發明之範圍。



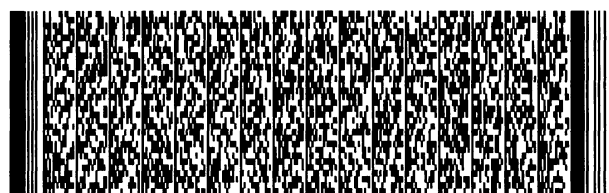
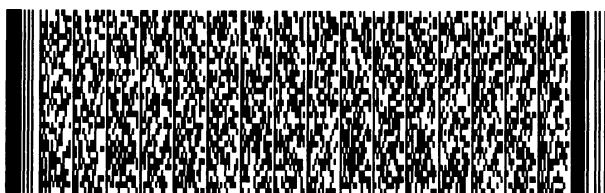
## 五、發明說明 (9)

實施例1：沙立樸吩 (THP) 之製備1. 原海罌粟鹼 (Norglaucine) 之製備

將台灣雅楠的莖部以2%乙酸浸泡抽取(60°C, 三次), 得到之抽提物富含(+)-月桂六駁鹼(laurolitsine), 將此月桂六駁鹼粗製品(50克)、N,N-二甲基甲醯胺(DMF; 250毫升)以及甲酸乙酯(40毫升)置於500毫升圓底瓶中, 在90°C下反應60小時, 減壓濃縮, 再以甲醇再結晶, 得到7.5克的N-甲醯基月桂六駁鹼

(N-formyllaurolitsine)。物理數據如下: 熔點 275-277°C;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CH}_3\text{OD}$ , 400 MHz)  $\delta$  8.61, 8.44 (1H, s, N-CHO), 8.45, 8.40 (1H, s, H-11), 7.21, 7.16 (1H, s, H-8), 6.61 (1H, s, H-3), 3.89 (3H, s, 10-OMe), 3.58 (3H, s, 1-OMe); EIMS (70 eV)  $m/z$  (rel. int. %) 341 (90), 296 (40), 283 (100), 240 (30), 58 (70)。

將N-甲醯基月桂六駁鹼(10.3克, 29.4毫莫耳)、甲醇(100毫升)、碳酸鉀(12.3克)以及碘化甲烷(13毫升)置於可栓緊密閉之圓底瓶中, 減壓抽離空氣2分鐘後再密閉反應瓶, 於60°C下攪拌24小時, 減壓濃縮後, 以氯仿(300毫升)及水(150毫升x 2)分配, 氯仿層經無水碳酸鈉去水後濃縮, 所得殘留物以甲醇再結晶, 得針狀物N-甲醯基原海罌粟鹼(N-formylnorglaucine)(9.5克, 87%)。物理數據如下: 熔點151-152°C;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,



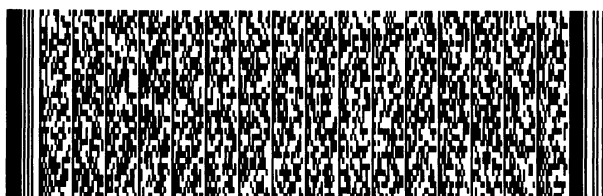
## 五、發明說明 (10)

400 MHz)  $\delta$  8.37, 8.23 (1H, s, N-CHO), 8.12, 8.11 (1H, s, H-11), 6.78, 6.74 (1H, s, H-8), 6.63, 6.60 (1H, s, H-3), 4.46 (dd,  $J=14.4, 4.3$  Hz), 4.89 (1H, dd,  $J=13.9, 4.2$  H-6a), 3.90 (9H, s, 3xOMe), 3.65 (3H, s, 1-OMe); EIMS (70 eV)  $m/z$  (rel. int. %)  $[M]^+$  365 (5), 355 (100), 340 (40)。

將N-甲醯基原海罌粟鹼 (2.00克, 5.42毫莫耳)、氫氧化鉀 (2.30克, 41.5毫莫耳) 以及乙醇 (50毫升) 置於圓底瓶 (100毫升) 中, 加熱迴流3小時 (Chastanet J, et al, *Heterocycles*, 1992, 34:1565-1572), 減壓濃縮, 所得殘留物以水 (100毫升) 及氯仿 (300毫升x 3) 分配, 氯仿層經脫水 (無水硫酸鈉) 後濃縮, 再以矽膠管柱層析分離, 以0.2% 甲醇之氯仿液沖提, 得到(+)-原海罌粟鹼 (1.75克, 95%)。物理數據如下: 非結晶固體;  $[\alpha]_D^{24} +77.1^\circ$  ( $c=0.35, CHCl_3$ );  $^1H$  NMR ( $CDCl_3, 400$  MHz)  $\delta$  8.09 (1H, s, H-11), 6.73 (1H, s, H-8), 6.58 (1H, s, H-3), 3.90 (3H, s, 9-OMe), 3.88 (3H, s, 10-OMe), 3.86 (3H, s, 2-OMe), 3.65 (3H, s, 1-OMe), 3.81 (1H, dd,  $J=13.9, 4.2$  H-6a); HR LC/MS  $m/z$   $[M+H]^+$  342.1682 ( $C_{20}H_{24}NO_4$  理論值342.1705)。

## 2. (+)-沙立樸吩 (THP) 之製備

將原海罌粟鹼 (1.90克, 5.2毫莫耳)、甲醇 (50毫升) 以及35.5% 甲醛 (6.0毫升), 依序置於250毫升的圓底瓶中, 於室溫攪拌下分批加入  $NaBH_4$  (共2.0克, 52毫莫

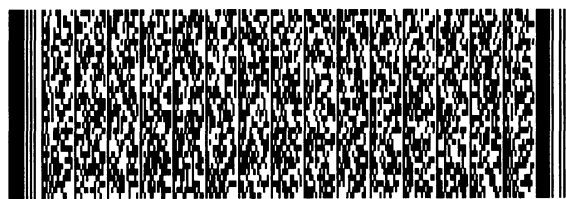


## 五、發明說明 (11)

耳)，反應6小時，減壓濃縮，所得殘留物以水（150毫升）及氯仿（150毫升x 3）分配，氯仿層以飽和食鹽水洗滌後，再以無水硫酸鈉脫水，濃縮所得殘留物經矽膠管柱層析分離，以氯仿沖提而得到半固體之產物海罌粟鹼

（glaucine）（1.78克，90%）。物理數據如下：熔點112-114°C（二乙醚）； $[\alpha]_D^{24} +120.0^\circ$ （ $c=0.30$ ，MeOH）； $^1\text{H NMR}$ （ $\text{CDCl}_3$ ，400 MHz） $\delta$  8.06（1H，s，H-11），6.75（1H，s，H-8），6.56（1H，s，H-3），3.91（3H，s，9-OMe），3.88（3H，s，10-OMe），3.86（3H，s，2-OMe），3.64（3H，s，1-OMe），2.53（3H，s，N-Me）。

將海罌粟鹼（3.02克，8.45毫莫耳）置於可密閉之圓底瓶（100毫升）中，於冰浴下加入6.0毫升之90%硫酸（Castedo L, et al, *Heterocycles*, 1980, 14:1135-1138），減壓抽離空氣2分鐘，再密閉反應瓶，於室溫避光下攪拌13天後，將反應液緩慢倒入含100毫升冰水之三角瓶內並攪拌，以氨水將pH調至8.0，再以氯仿抽取（80毫升x 3）。氯仿層經脫水（無水硫酸鈉）後，濃縮得殘留物3.48克，再經矽膠管柱層析分離，以1~3%甲醇之氯仿液沖提，得沙立樸吩（THP）（1.82克，產率62%）。物理數據如下：熔點185-187°C（MeOH）； $[\alpha]_D^{24} +66.7^\circ$ （ $c=0.31$ ，MeOH）； $^1\text{H NMR}$ （ $\text{CDCl}_3$ ，400 MHz） $\delta$  8.03（1H，s，H-11），6.76（1H，s，H-8），6.52（1H，s，H-3），3.90（6H，s，2-OMe及9-OMe），3.88（3H，s，10-OMe），2.53（3H，s，N-Me）；EIMS（70 eV）



## 五、發明說明 (12)

$m/z$  (rel. int. %)  $[M]^+$  341 (100), 326 (34), 298 (24), 267 (28)。

實施例2：

(+)-N-丙基原沙立樸吩 (propylnorthaliporphine) 之製備

1. (+)-N-丙基原海罌粟鹼 (propylnorglaucine) 之製備

依實施例1中製備N-甲醯基月桂六駁鹼的方法，將月桂六駁鹼粗製品 (30.0克) 溶於二甲基甲醯胺 (75毫升) 及丙酸酐 (6毫升) 中，於室溫下反應24小時，以甲醇再結晶，得8.02克的產物N-丙醯基月桂六駁鹼

(N-propionyl-laurolicsine)。物理數據如下：熔點 185-189 °C； $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz)  $\delta$  8.06 (1H, s, H-11), 6.71 (1H, s, H-8), 6.61 (1H, s, H-3), 3.88 (3H, s, 10-OMe), 3.59 (3H, s, 1-OMe), 2.52 (2H, q,  $J=7.2$  Hz,  $\text{NCOCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.16 (3H, t,  $J=7.2$  Hz,  $\text{NCOCH}_2\text{CH}_3$ )；EIMS (70 eV)  $m/z$  (rel. int. %)  $[M]^+$  369 (100), 296 (87), 283 (85), 269 (44), 240 (16), 57 (34)。

將N-丙醯基月桂六駁鹼 (2.50克，6.78毫莫耳) 溶於甲醇 (25毫升) 以及碳酸鉀 (2.60克) 中，依實施例1中製備原海罌粟鹼的方法，與碘化甲烷 (3.5毫升，56.2毫莫耳) 反應，最後以甲醇再結晶，得到產物N-丙醯基原海



## 五、發明說明 (13)

罌粟鹼 (N-propionynorglaucine) (2.21 克, 82.4%)。物理數據如下: 熔點 150-152 °C;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  8.13 (1H, s, H-11), 6.76 (1H, s, H-8), 6.60 (1H, s, H-3), 3.89 (3H, s, 9-OMe), 3.87 (6H, s, 2-OMe 及 10-OMe), 3.59 (3H, s, 1-OMe), 2.45 (2H, q,  $J=7.2$  Hz,  $\text{NCOCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.18 (3H, t,  $J=7.2$  Hz,  $\text{NCOCH}_2\text{CH}_3$ ); EIMS (70 eV)  $m/z$  (rel. int. %)  $[\text{M}]^+$  397 (79), 324 (58), 311 (100), 265 (16), 57 (20)。

將無水四氫呋喃 (THF; 15 毫升) 先置於乾燥的二頸瓶中, 再加入  $\text{LiAlH}_4$  (380 毫克, 10 毫莫耳) 攪拌 10 分鐘, 然後使用添加管逐滴滴入溶於無水四氫呋喃 (5 毫升) 之 N-丙醯基原海罌粟鹼 (4.01 克, 10.1 毫莫耳), 攪拌加熱迴流 2 小時後冷卻, 冰浴下攪拌加入含結晶水之硫酸鈉, 以破壞過量之  $\text{LiAlH}_4$ , 再以矽藻土過濾, 並以氯仿清洗殘留物, 濃縮所得的產物後再以乙醚再結晶, 得到 N-丙基海罌粟鹼 (N-propylnorglaucine) (3.36 克, 86%)。物理數據如下: 熔點 95-97 °C;  $[\alpha]_D^{24} +106.7^\circ$  ( $c=0.33$ , MeOH);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  8.03 (1H, s, H-11), 6.75 (1H, s, H-8), 6.54 (1H, s, H-3), 3.86 (3H, s, 9-OMe), 3.83 (6H, s, 2-OMe 及 10-OMe), 3.60 (3H, s, 1-OMe), 2.88 及 2.43 (2H, m,  $\text{N-CH}_2\text{C}_2\text{H}_5$ ), 1.50 (2H, m,  $\text{N-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 0.93 (3H, t,  $J=7.2$  Hz,  $\text{N-C}_2\text{H}_4\text{CH}_3$ ); EIMS (70 eV)  $m/z$  (rel. int. %)  $[\text{M}]^+$  383 (100), 368 (82), 354 (45), 352 (36), 281 (19)。



## 五、發明說明 (14)

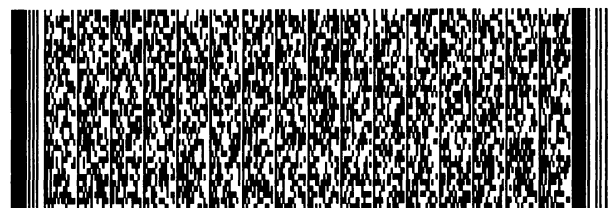
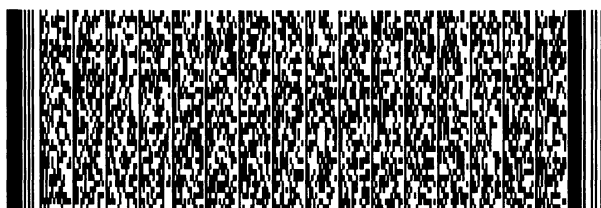
## 2. (+)-丙基原沙立撲吩 (THP) 之製備

依實施例1中製備(+)-沙立撲吩的方法，由N-丙基海罌粟鹼 (1.20克，10.3毫莫耳) 與90%硫酸 (3毫升) 反應，可分離得到N-丙基原沙立撲吩 (346毫克，產率30%)。物理數據如下：熔點66-70°C (MeOH)； $[\alpha]_D^{24} +60.2^\circ$  (c=0.33, MeOH)； $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  8.00 (1H, s, H-11), 6.75 (1H, s, H-8), 6.51 (1H, s, H-3), 3.90 (6H, s, 2-OMe及9-OMe), 3.89 (3H, s, 10-OMe), 2.60 (1H, m)及2.43 (1H, m) (N- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.57 (2H, m, N- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 0.95 (3H, t, J=7.2 Hz, N- $\text{C}_2\text{H}_4\text{CH}_3$ )；EIMS (70 eV)  $m/z$  (rel. int. %)  $[\text{M}]^+$  369 (100), 354 (22), 340 (36), 298 (20)。

## 實施例3：沙立撲吩對大鼠及天竺鼠的電生理作用

## 心臟心電圖記錄

將大鼠與天竺鼠的心臟分離之後，以蘭氏灌流 (Langendorff perfusion) 之方法，經由主動脈以定壓灌流的方式灌流，然後以接有銀線之兩極電極 (bipolar electrode)，置於科氏三角 (Triangle of Koch) 之尖端，以記錄喜氏束 (His bundle) 之心電圖。此外，以另一對接有銀線之兩極電極置於右心室之表側以記錄T wave。在心臟右心房之刺激電極則放置於右心房上腔靜脈 (superior vena cava) 交接處之心房表面，而心室刺激電極則放置於右心室心尖表面。心電圖分別量測QT間隔





#### 五、發明說明 (15)

(QT interval)、穿過竇房 (sinoatrial)、房室結 (atrioventricular node) 及喜氏系統 (His-purkinje system) 的傳導時間，分別是SA、AH及HV interval。同時也記錄喜氏系統之回復曲線 (即 $H_2V_2$ 與 $V_1H_2$ 之關係圖)，另外亦記錄心房、心室以及房室結的反應期 (refractory period)。以 $10 \mu\text{M}$ 的奎寧丁 (Quinidine) 及沙立樸吩灌流，其結果顯示於第1圖及第2圖。

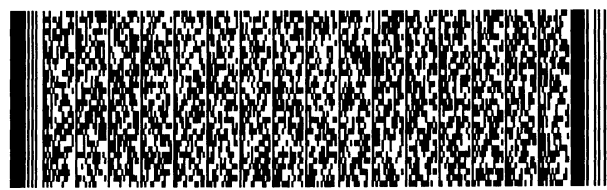
#### 實施例4：

##### 沙立樸吩及其相關衍生物之抗氧化作用及自由基清除作用

將人類低密度脂蛋白 (LDL; 100 微克/毫升) 與0.1% 二甲基亞砷 (DMSO) (基底組及對照組)，或各種濃度的沙立樸吩 ( $1 \sim 100 \mu\text{M}$ )，在 $37^\circ\text{C}$ 中預先培養10分鐘，然後加入 $5 \mu\text{M}$ 的硫酸銅，除了基底組之外，其餘各組再培養12小時，以測試沙立樸吩對於由銅所引起的人類LDL之脂質過氧化作用的抑制效果。結果如第3圖所示。

將各種濃度的沙立樸吩 ( $1 \sim 100 \mu\text{M}$ )，與 $100 \mu\text{M}$ 的1,1-二苯基-2-間三硝基苯基肼 (DPPH)，在室溫 ( $25^\circ\text{C}$ ) 中培養30分鐘後，測量DPPH在517 nm吸光值的降低，以測定沙立樸吩對於清除DPPH自由基的劑量反應曲線。結果如第4圖所示。

##### 實施例5：沙立樸吩及其相關衍生物抗心律不整作用的評估



## 五、發明說明 (16)

1. 對離體大鼠心臟冠狀動脈結紮再灌流心律不整的作用：

將離體的大鼠心臟冠狀動脈結紮再灌流，使其產生心律不整，然後給予 $10 \mu\text{M}$ 的沙立樸吩，記錄其心室及心房的心電圖，並計算心律不整回復成正常靜脈竇跳動的比例。結果如第5圖所示。

2. 對離體天竺鼠心臟整體性缺血後再灌流心律不整的作用：

將離體的天竺鼠心臟進行整體性缺血後再灌流，使其產生心律不整，然後給予不同濃度的沙立樸吩，記錄心室纖維性跳動 (VF) 的情形，結果如表1所示：

表 1

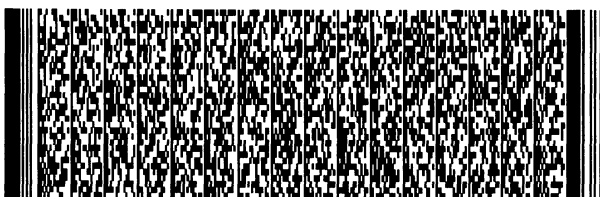
處理	$n^a$	VF	% VF
0.1% DMSO	8	8	100
$3 \mu\text{M}$ THP	8	2	25*
$10 \mu\text{M}$ THP	6	0	0*

a:  $n$  表示實驗的心臟個數；

\*: 相對於賦形劑的值具有統計上的顯著不同 ( $p < 0.05$ )。

3. 對於以烏巴因誘發之離體天竺鼠心臟之心律不整的作用：

將天竺鼠心室標本給予 $0.6 \sim 0.8 \mu\text{M}$ 的烏巴因

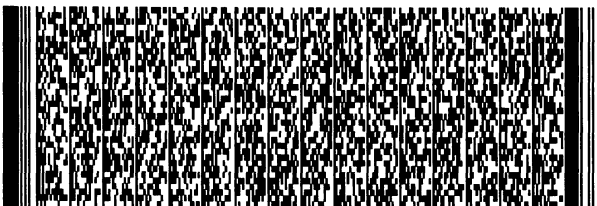


#### 五、發明說明 (17)

(Ouabain) 之後，觀察到其心收縮力逐漸增加，再經5 ~ 10分鐘之後即引起心律不整；此時給予10 ~ 20  $\mu$ M的沙立樸吩及其相關衍生物，測量其心臟收縮程度，結果如第6圖及第7圖所示。

#### 4. 沙立樸吩在大鼠之臨床療效評估：

將麻醉的大鼠之冠狀動脈結紮30分鐘，然後以靜脈注射 $3.5 \times 10^{-6}$ 及 $3.5 \times 10^{-5}$ 克/公斤劑量之沙立樸吩，並記錄其血壓及心跳的改變，其結果如第8圖及第9圖所示。在缺血期間及再灌流期間，注射投予各種劑量之沙立樸吩，分別記錄心室心動快速(VT)及心室纖維性跳動(VF)的發生率、持續時間及死亡率，結果如表2及表3所示。



## 五、發明說明 (18)

表 2

在活體內沙立模吩對麻醉的大鼠因缺血誘發之心律不整的作用

沙立模吩 (克/公斤)	心室心動快速(VT)		心室纖維性跳動(VF)		死亡率 (%)
	發生率(%)	持續時間(秒) <sup>a</sup>	發生率(%)	持續時間(秒) <sup>a</sup>	
0 (賦形劑) <sup>b</sup>	100	32.4±7.3	50	14.1±5.5	25
3.5×10 <sup>-7</sup>	60	16.1±7.4	20	6.7±4.9	0
3.5×10 <sup>-6</sup>	50*	5.7±3.3*	10	0.5±0.5*	0
3.5×10 <sup>-5</sup>	10*	0.3±0.3*	0*	0.0±0.0*	0

a: VT 及 VF 的持續時間是以平均值±標準差表示；

b: 賦形劑是 0.01%DMSO 溶於生理食鹽水中；

\*:  $p < 0.05$  之統計上的差異；

$n=10 \sim 12$ 。



## 五、發明說明 (19)

表 3

在活體內沙立樸吩對麻醉的大鼠因再灌流誘發之心律不整的作用

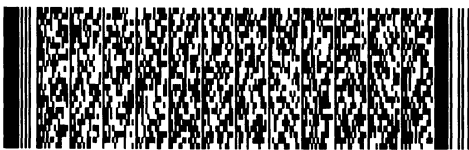
沙立樸吩 (克/公斤)	心室心動快速(VT)		心室纖維性跳動(VF)		死亡率 (%)
	發生率(%)	持續時間(秒) <sup>a</sup>	發生率(%)	持續時間(秒) <sup>a</sup>	
0 (賦形劑) <sup>b</sup>	100	19.1±6.2	86	104.1±19.4	86
3.5×10 <sup>-7</sup>	86	28.6±10.4	86	75.5±15.6	43
3.5×10 <sup>-6</sup>	57	14.6±9.1	29*	9.2±8.3*	0*
3.5×10 <sup>-5</sup>	71	7.6±3.2*	14*	1.3±1.3*	0*

a: VT 及 VF 的持續時間是以平均值±標準差表示, n=7;

b: 賦形劑是 0.01% DMSO 溶於生理食鹽水中;

\*: p<0.05 之統計上的差異。

將大鼠左下降支冠狀動脈結紮 (其心室重量約 1.13 ± 0.03 公克), 然後注射投予各種劑量之沙立樸吩。將心室組織染色及切片, 觀察心臟壞死的程度, 結果如表 4 所示。



## 五、發明說明 (20)

表 4

處理 (克/公斤)	n	危險區域 (心室百分比) <sup>a</sup>	壞死 (心室百分比) <sup>a</sup>	壞死/危險區域 (百分比) <sup>a</sup>
0 (賦形劑) <sup>b</sup>	10	45.2±1.0	19.8±2.2	43.9±5.1
THP 3.5x10 <sup>-7</sup>	9	47.0±0.6	17.9±2.3	38.1±5.0
THP 3.5x10 <sup>-6</sup>	8	46.5±0.9	13.4±1.2*	29.0±2.5*
THP 3.5x10 <sup>-5</sup>	11	46.9±0.5	5.0±0.9***	10.7±1.8***
L-NAME 1x10 <sup>-3</sup>	9	47.5±0.2	21.4±3.5	45.1±7.2
THP 3.5x10 <sup>-5</sup> + L-NAME 1x10 <sup>-3</sup>	8	47.0±0.4	21.8±4.0	46.5±6.6

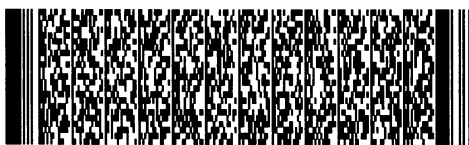
a: 數據以平均值±標準差表示;

b: 賦形劑是 0.01% DMSO 溶於生理食鹽水中;

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , 相較於賦形劑;

L-NAME 表示 N- $\omega$ -硝基-L-精胺酸甲基酯; THP 表示沙立樸吩。

由動物血液中乳酸脫氫酶 (LDH) 及一氧化氮 (NO) 的含量測定, 以評估沙立樸吩與在缺血期間或缺血再灌流期間, LDH 及 NO 釋出量的關係, 結果如表 5 及表 6 所示。



## 五、發明說明 (21)

表 5

沙立撲吩對乳酸脫氫酶 (U/L) 釋放之作用

處理(克/公斤)	無缺血 <sup>a</sup>	缺血 <sup>a</sup>	再灌流 <sup>a</sup>
假性手術組			
賦形劑 <sup>b</sup>	123.6±20.6		
THP, 3.5x10 <sup>-5</sup>	92.6±7.5		
手術組			
賦形劑 <sup>b</sup>		500.5±81.4***	273.7±29.2***
THP, 3.5x10 <sup>-7</sup>		349.5±55.0	202.2±30.4
THP, 3.5x10 <sup>-6</sup>		171.7±52.9***	219.6±31.0
THP, 3.5x10 <sup>-5</sup>		132.2±33.2***	143.8±11.7***

a: 數據以平均值±標準差表示, n=6;

b: 賦形劑是 0.01% DMSO 溶於生理食鹽水中;

\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, 相較於賦形劑。



## 五、發明說明 (22)

表 6

沙立樸吩對一氧化氮 ( $\mu\text{mol/L}$ ) 釋放之作用

處理(克/公斤)	無缺血 <sup>a</sup>	缺血 <sup>a</sup>	再灌流 <sup>a</sup>
假性手術組			
賦形劑 <sup>b</sup>	9.6±2.3		
THP, $3.5 \times 10^{-5}$	7.6±0.9		
手術組			
賦形劑 <sup>b</sup>		8.3±0.6	8.6±1.6
THP, $3.5 \times 10^{-7}$		6.6±0.6	8.0±1.7
THP, $3.5 \times 10^{-6}$		19.4±4.7*	28.4±4.3***
THP, $3.5 \times 10^{-5}$		19.1±5.2*	30.4±1.9***

a: 數據以平均值±標準差表示,  $n=6$ ;

b: 賦形劑是 0.01% DMSO 溶於生理食鹽水中;

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , 相較於賦形劑。

參考第1圖及第2圖, 比較對照組及藥物組 ( $10 \mu\text{M}$  的奎寧丁或  $10 \mu\text{M}$  的沙立樸吩), 以奎寧丁處理的心室 (第1圖), 其SA、AH、HV interval及T wave均延長, 相較於以沙立樸吩處理的心室 (第2圖), 其S-A-H interval不受影響, HV interval的延長亦不似奎寧丁組嚴重, 顯示奎寧丁具有較差的選擇性。此外, 沙立樸吩在3、10及  $30 \mu\text{M}$  時, 能使心房不反應期 (AERP) 由60毫秒分別延長為90、100及120毫秒; 心室不反應期則由160毫秒變為160、170及190毫秒; 房室結 (AV node) 之不反應期則由170毫秒變為170、200及240毫秒。若與奎寧丁3、10及  $30 \mu\text{M}$  之



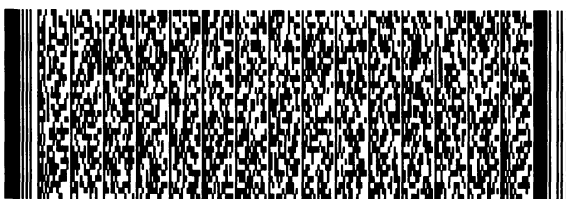


## 五、發明說明 (23)

作用比較，則奎寧丁使心房不反應期由40毫秒延長為60、80及130毫秒；心室不反應期則由180毫秒變為170、180及190毫秒；房室結之不反應期則由130毫秒變為150、200及245毫秒。對於心臟下垂週期長度 (Wenckbach Cycle Length; WCL)，則沙立樸吩3、10及30  $\mu\text{M}$  可使其由200毫秒變為210、230及280毫秒，而奎寧丁則使WCL由150毫秒變為170、210及300毫秒。雖然沙立樸吩及奎寧丁均會使心房、心室及房室結之不反應期延長，但僅奎寧丁會抑制房室結之傳導速率 (使AH interval延長)；相對而言，沙立樸吩在濃度增加到10  $\mu\text{M}$  時，對房室結之傳導仍不會有抑制作用。

此外，對大鼠及天竺鼠的心房或心室細胞，沙立樸吩在3 ~ 10  $\mu\text{M}$  的濃度下，均會使動作電位持續時間延長 (數據為顯示)，膜電位鉗定實驗證實，沙立樸吩對大鼠之瞬間外流鉀電流 ( $I_{to}$ ) 及天竺鼠之遲延外流鉀電流 ( $I_k$ ) 均有明顯的抑制。另外，沙立樸吩亦被發現對內流鈉電流有抑制作用，但對內流鈣電流則有增強作用 (Su, et al, 1994)，由於其對外流鉀電流之抑制及內流鈣電流之增強作用，使得沙立樸吩具有動作電位延長、心收縮力增強及心跳頻率減慢的作用。

沙立樸吩在濃度為10 ~ 100  $\mu\text{M}$  時，能抑制低密度脂蛋白 (LDL) 之氧化作用 (參考第3圖)，其半抑制濃度  $IC_{50}$  為15.7  $\mu\text{M}$ 。沙立樸吩除了能防止LDL的氧化作用之外，對於黃嘌呤素(xanthine)/黃嘌呤素氧化酶系統所產



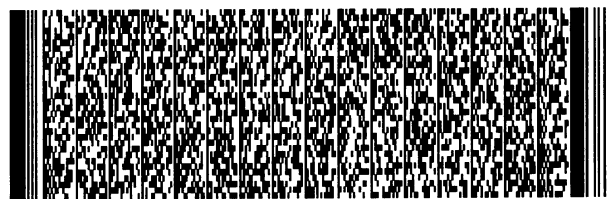
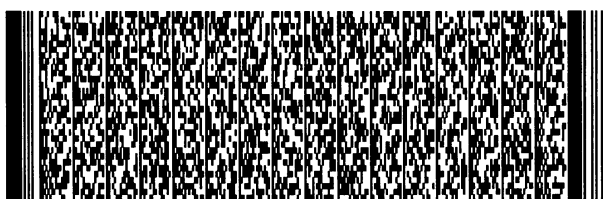
## 五、發明說明 (24)

生之超氧化物陰離子 (superoxide anion) , 亦有清除的作用 , 其 $EC_{50}$  為 $12.6 \mu M$  , 在1,1-二苯基-2-間三硝基苯基肼 (DPPH) 分析系統中 , 亦發現沙立樸吩具有清除的活性 , 其 $IC_{0.200}$  為 $12.4 \mu M$  (參考第4圖) 。

沙立樸吩在濃度為 $3 \sim 30 \mu M$ 時 , 能有效地使離體大鼠心臟冠狀動脈結紮再灌流所引起的心律不整恢復正常 , 其 $IC_{50}$  為 $13.9 \mu M$  (參考第5圖) ; 相似地 , 沙立樸吩在濃度為 $10 \mu M$ 時 , 能完全抑制離體天竺鼠心臟整體性缺血後再灌流時心律不整之發生 (表1) 。雖然大鼠及天竺鼠兩者冠狀動脈的結構不甚相同 , 但沙立樸吩對於離體心臟缺血再灌流所引發的心律不整 , 卻同樣地都具有抑制的功能 。

參考第6圖及第7圖 , 將天竺鼠心室標本給予 $0.6 \sim 0.8 \mu M$ 的烏巴因 (Ouabain) 之後 , 觀察到其心收縮力逐漸增加 , 再經 $5 \sim 10$ 分鐘之後就會引起心律不整 ; 在給予 $10 \sim 20 \mu M$ 的沙立樸吩及其相關衍生物之後 , 心律逐漸恢復正常 ; 但奎寧丁在此濃度並無明顯的功效 (數據未顯示) 。

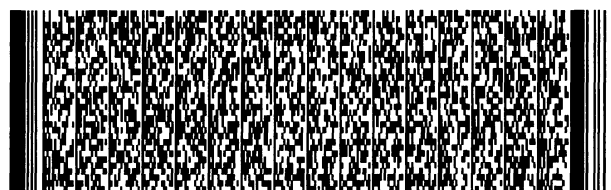
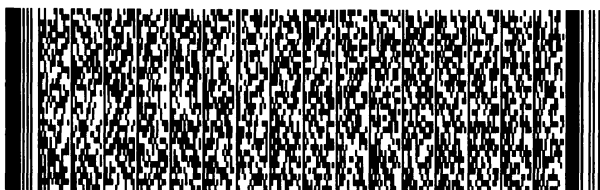
在麻醉的大鼠之靜脈注射 $3.5 \times 10^{-6}$ 及 $3.5 \times 10^{-5}$ 克/公斤劑量之沙立樸吩 , 對其血壓及心跳均無明顯的改變 (第8圖及第9圖 , 其中 , 對照組及藥物組之差異並無統計上的意義 (ANOVA) ) , 但注射上述劑量之沙立樸吩 , 對於缺血期間心室心動快速 (VT) 及心室纖維性跳動 (VF) 的發生率及發生後的持續時間均會減少 , 並且在缺血期間動物的



## 五、發明說明 (25)

死亡率亦會減少（參見表2）；在缺血再灌流期間，VT及VF之發生率及動物死亡率，均會被沙立樸吩所抑制（表3）。此外，由進一步之心臟組織染色及切片評估發現，當沙立樸吩的注射量為 $3.5 \times 10^{-6}$ 及 $3.5 \times 10^{-5}$ 克/公斤時，即能有效地減少心臟壞死（表4）。一般而言，心臟缺血時，乳酸脫氫酶（LDH）的濃度會有增加的現象，但由上述實施例之動物血液中LDH的含量測定發現，投服沙立樸吩能減少缺血或再灌流期間LDH的釋出量（表5），這個結果更證明沙立樸吩及其相關衍生物，的確對於缺血或再灌流期間之心臟傷害有保護作用。更特別地，由表6可知，投服 $3.5 \times 10^{-6}$ 及 $3.5 \times 10^{-5}$ 克/公斤劑量的沙立樸吩，對於正常的動物，並沒有觀察到一氧化氮（NO）濃度的上升，但對於缺血或及缺血再灌流期間，其血液中NO的釋出量卻有明顯地增加。在表4的更進一步實驗中發現，若動物先注射投與一氧化氮合成抑制劑L-NAME（N- $\omega$ -硝基-L-精胺酸甲基酯；1毫克/公斤），則沙立樸吩保護心肌缺血性壞死的作用消失，此結果顯示沙立樸吩防止心肌缺血性壞死與其促進缺血性心臟組織一氧化氮之合成與釋放有關。

由以上結果顯示，本發明之沙立樸吩及其相關衍生物，不管是在離體心臟實驗或是在活體內的實驗，均有優異的心臟保護作用，且由動物實驗顯示，在不影響血壓心跳及呼吸的劑量之下，沙立樸吩及其相關衍生物即可對於缺血或及/或缺血再灌流時，所造成的心臟傷害有優異的保護作用，其作用機轉除了因為有鈉/鉀管道抑制作用之



## 五、發明說明 (26)

外，沙立樸吩及其相關衍生物所具有之抗氧化作用、促進NO產生的作用等，亦可能是沙立樸吩為何有如此優異的心臟保護作用之解釋。

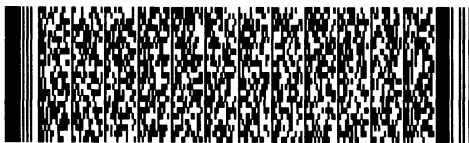
雖然本發明已以較佳實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟悉此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作各種之更動與潤飾，因此本發明之保護範圍，當視後附之申請專利範圍而所界定者為準。



四、中文發明摘要 (發明之名稱：沙立樸吩相關衍生物之製備及對心臟疾病之應用)

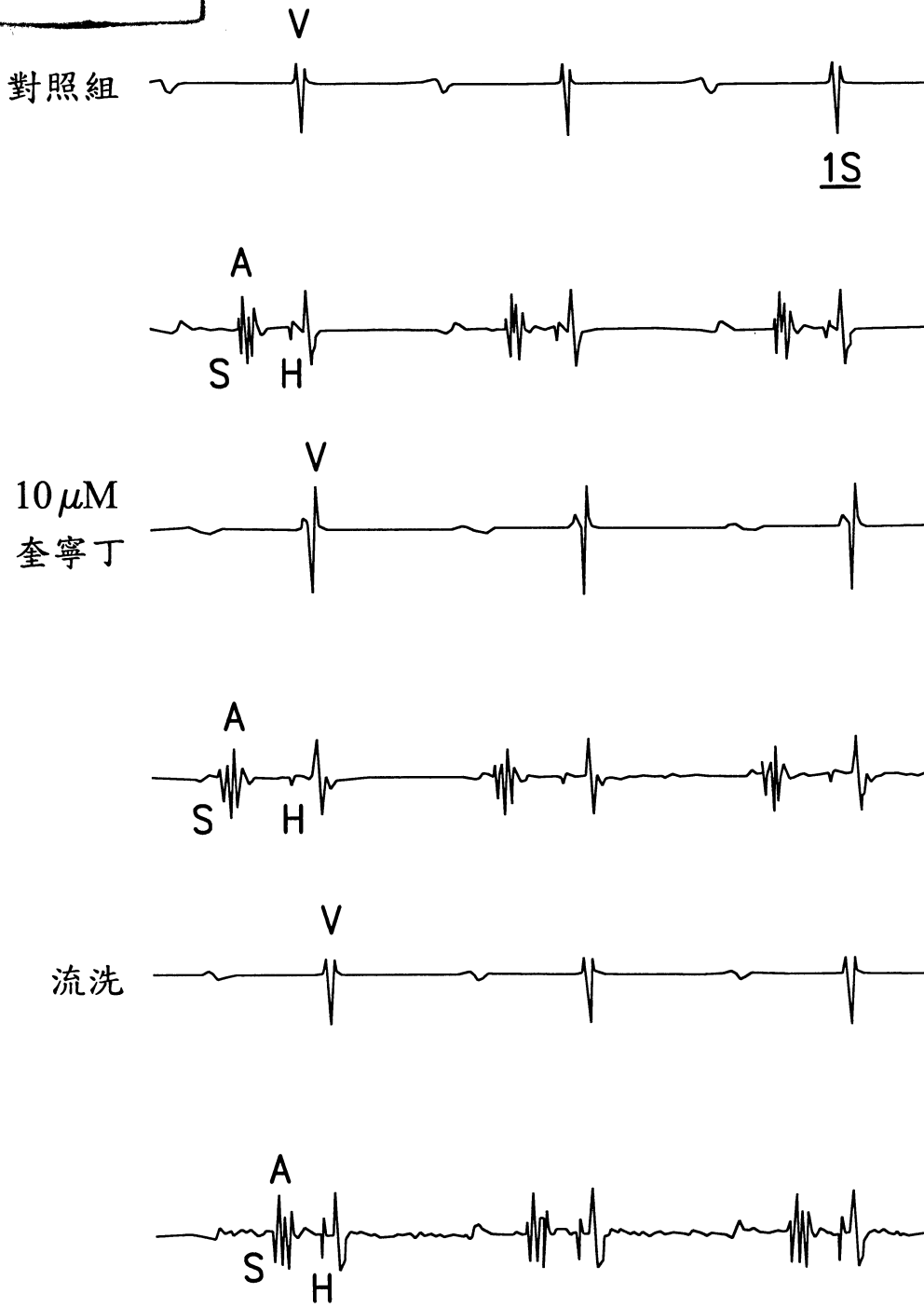
本發明揭露沙立樸吩 (thaliporphine) 及其相關衍生物用於心臟疾病的治療及預防，包括心律不整、心肌缺血或心肌梗塞所引起的心臟疾病，以及心律不整或急性心肌梗塞所引起的心因性猝死。

英文發明摘要 (發明之名稱：)

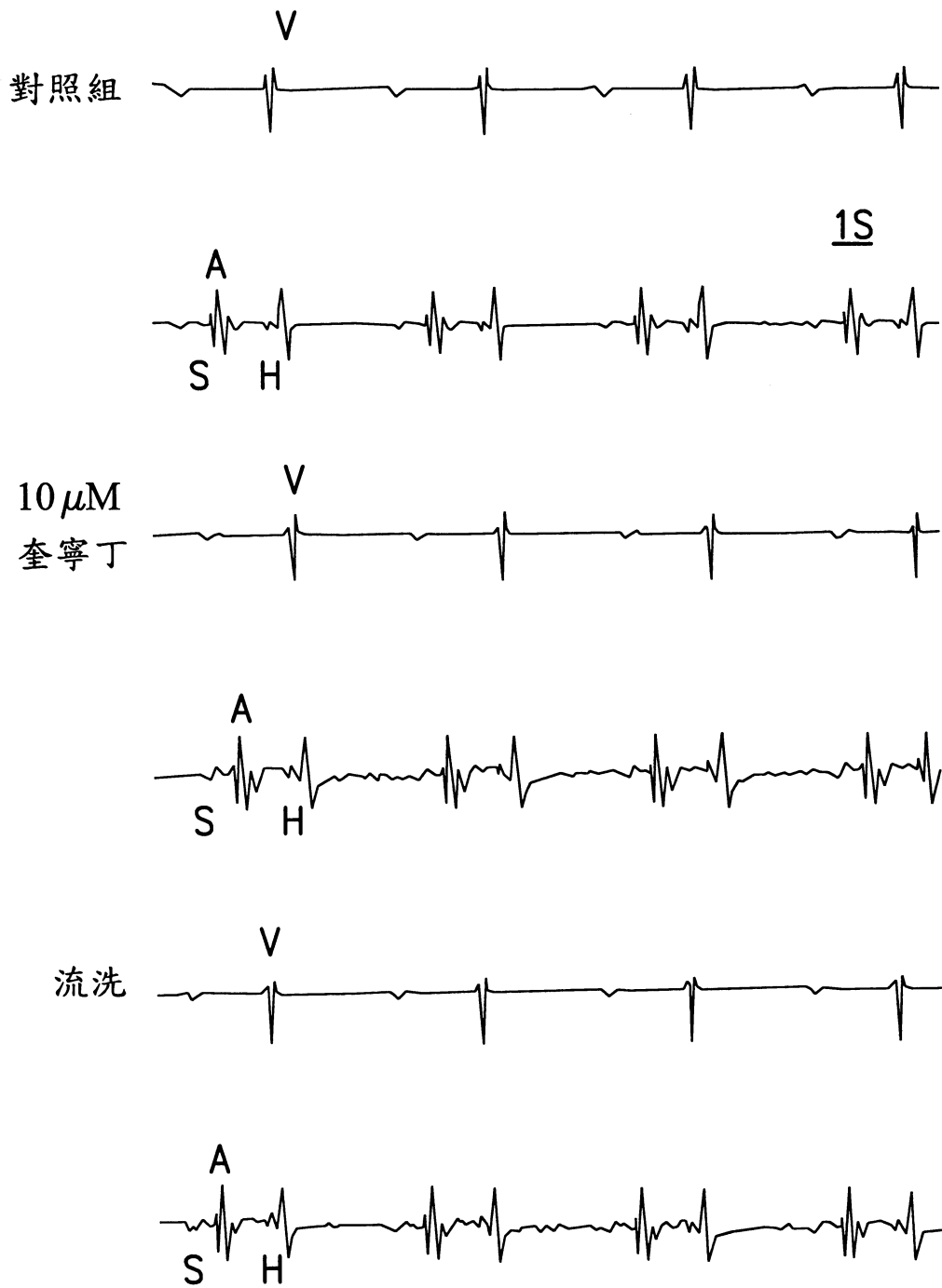


89 108 508

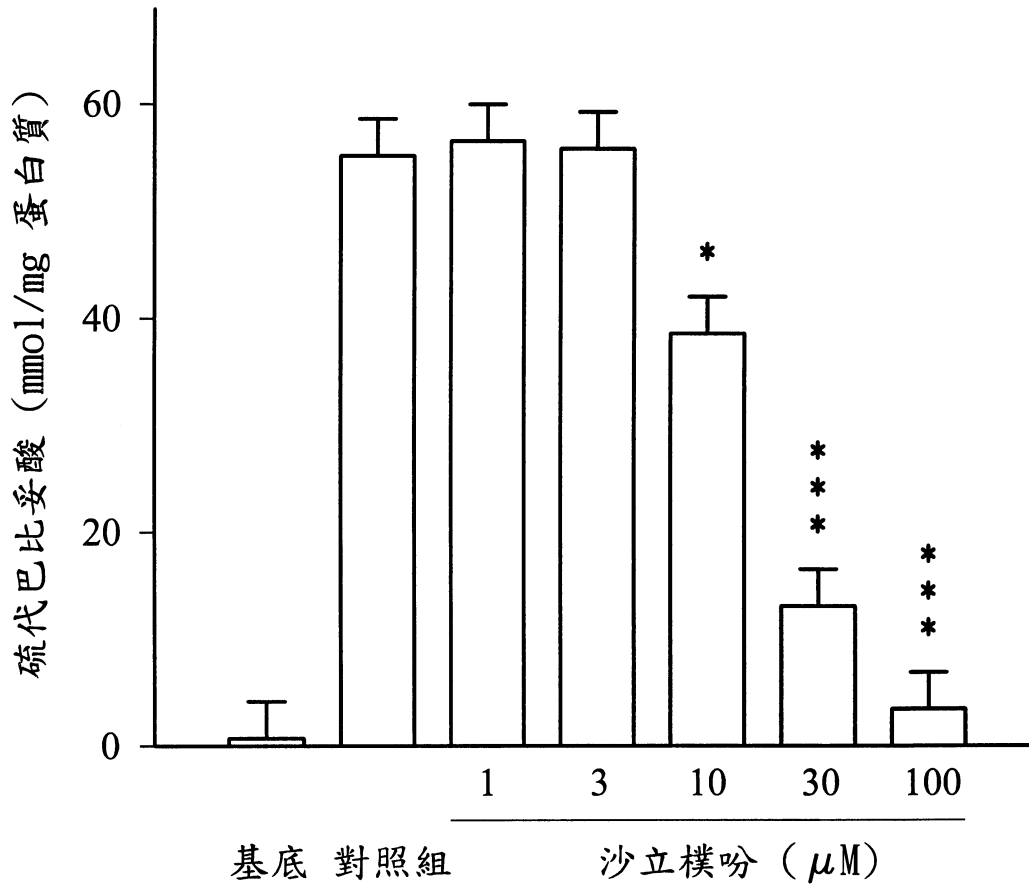
公告本



第 1 圖

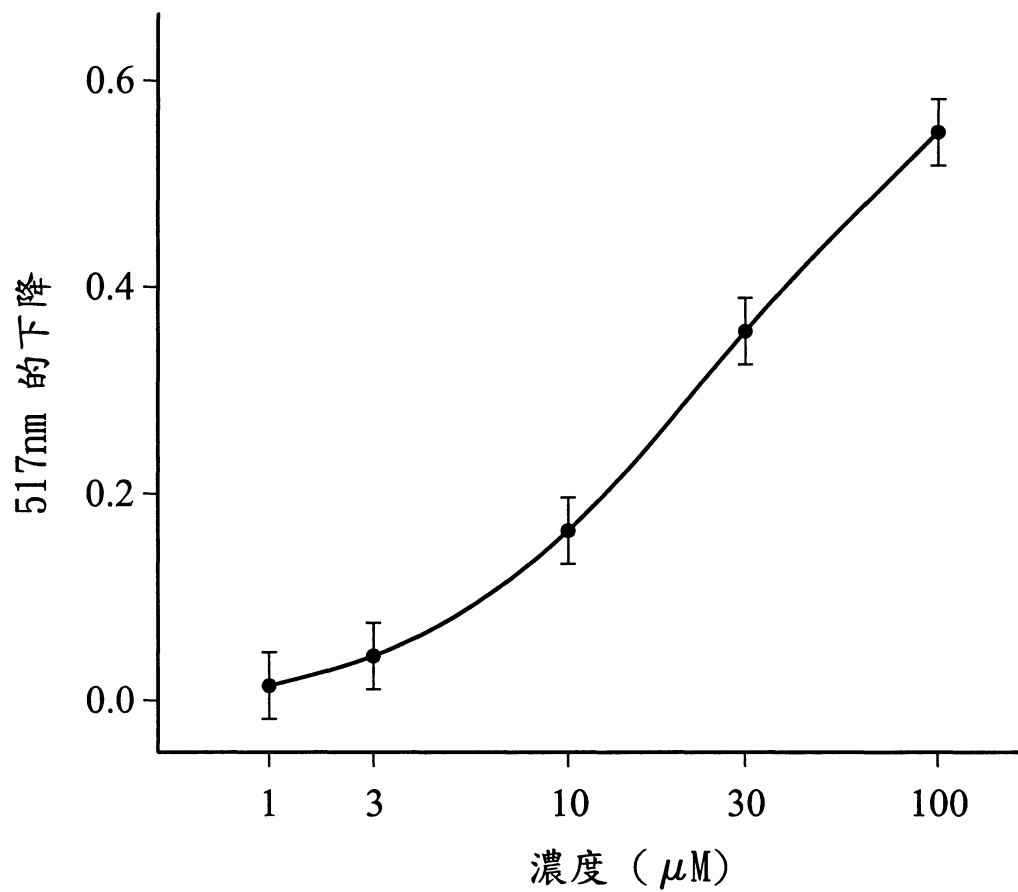


第 2 圖

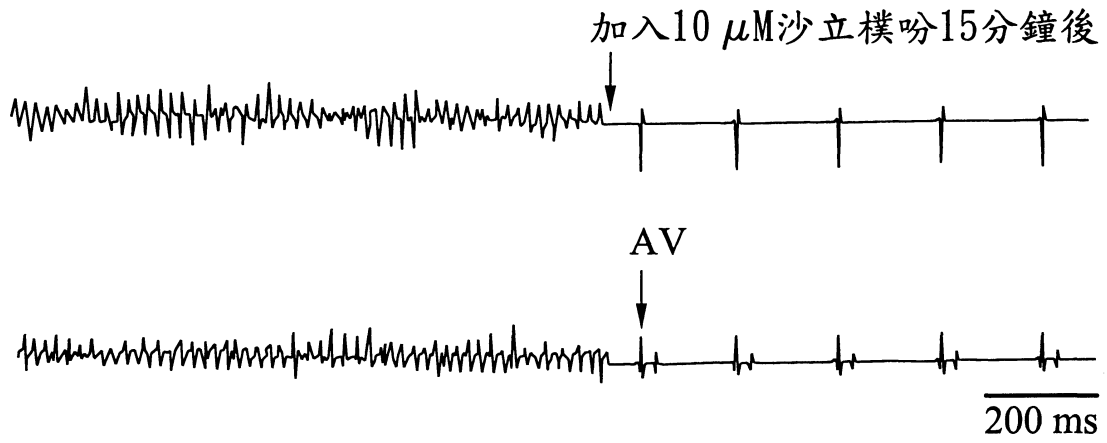


第 3 圖

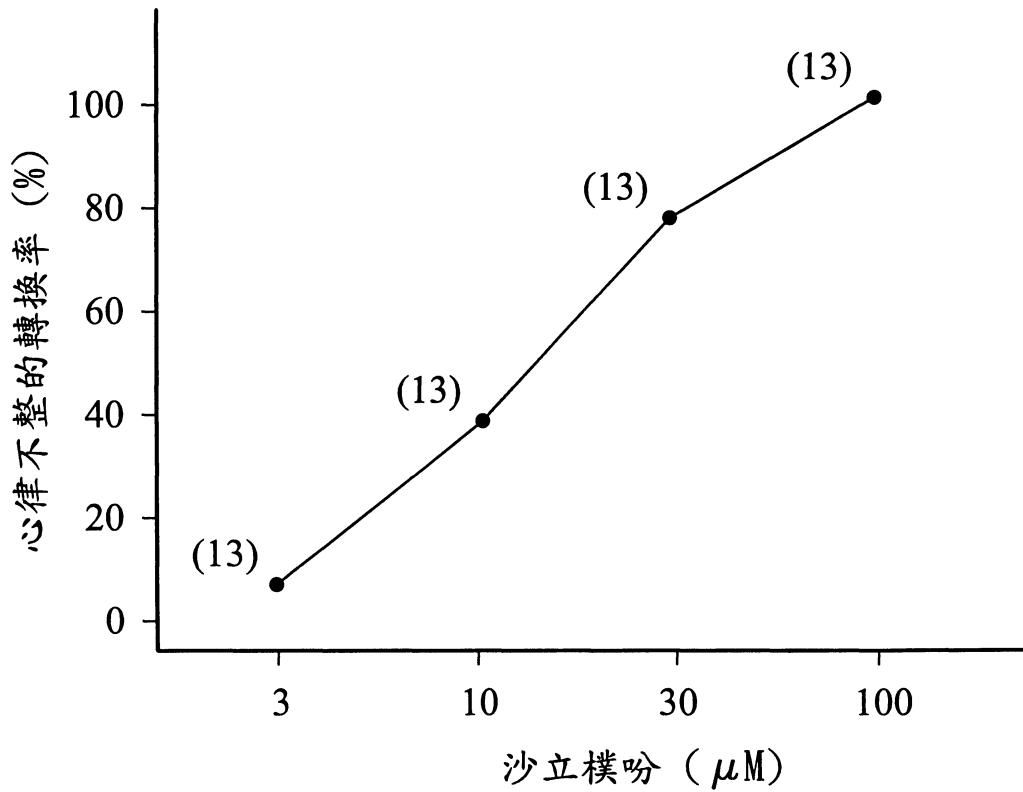




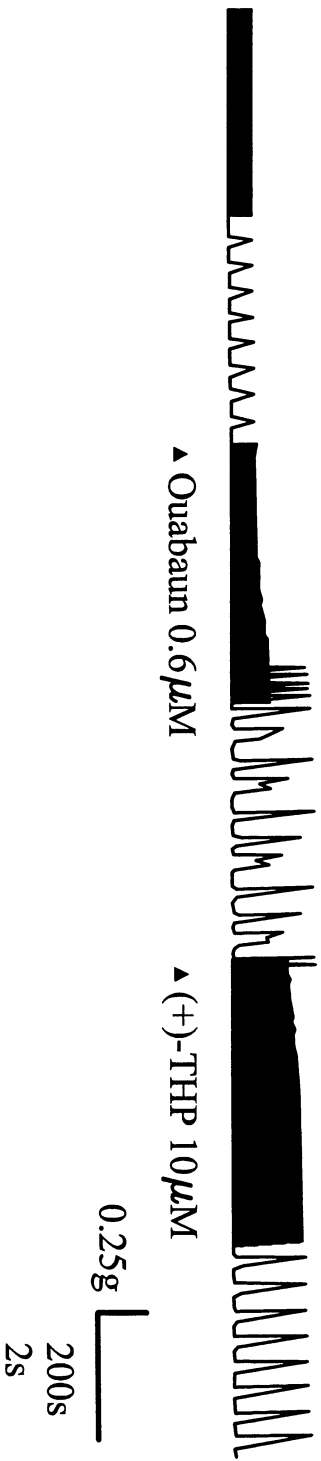
第 4 圖



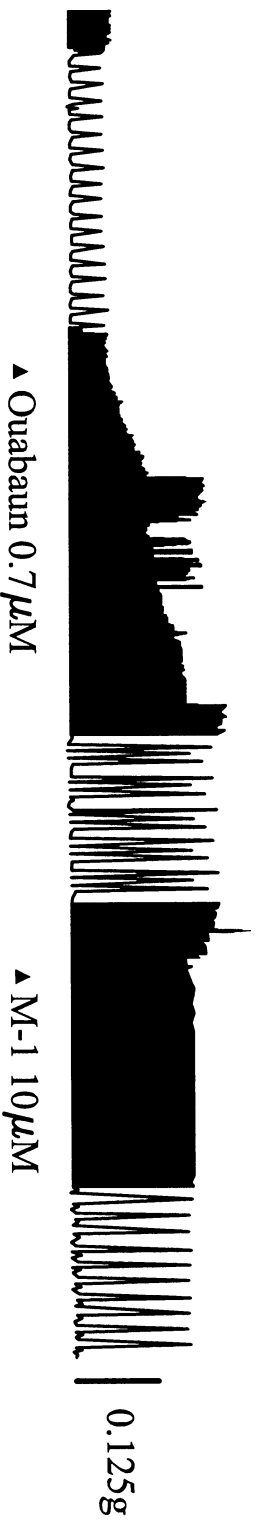
第5A圖



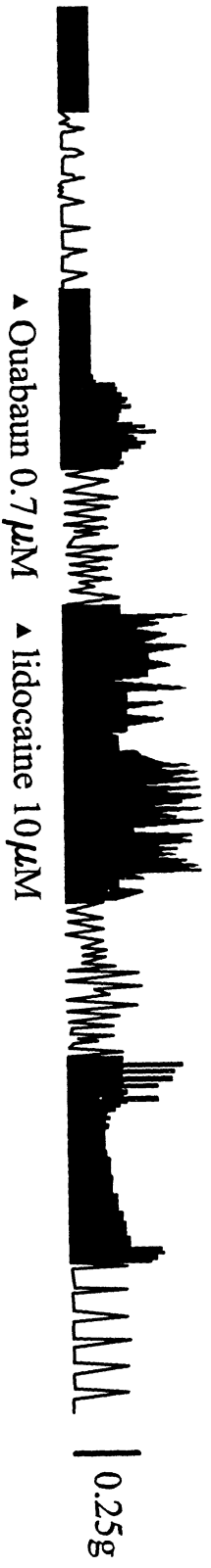
第5B圖



第6A圖



第6B圖



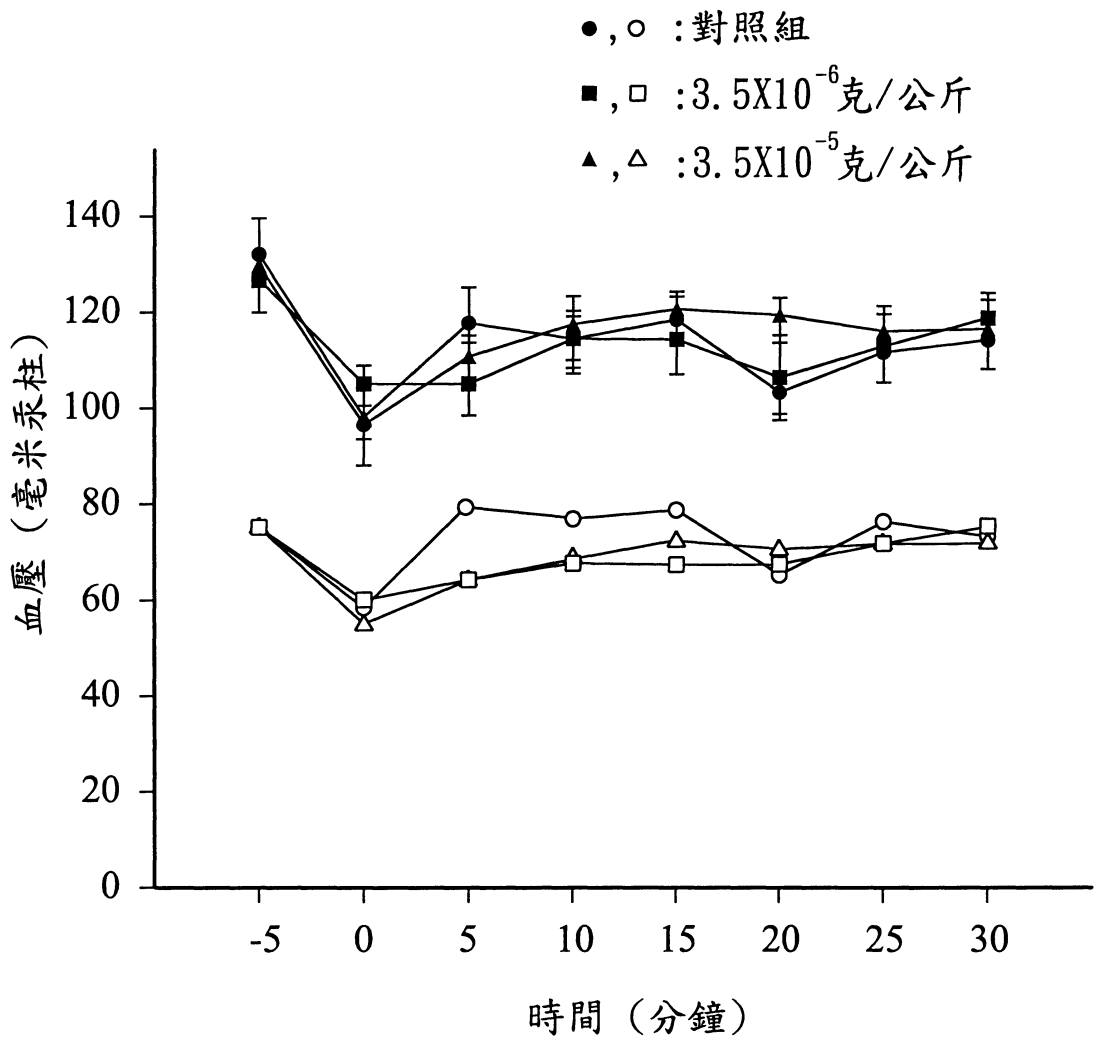
第7A圖



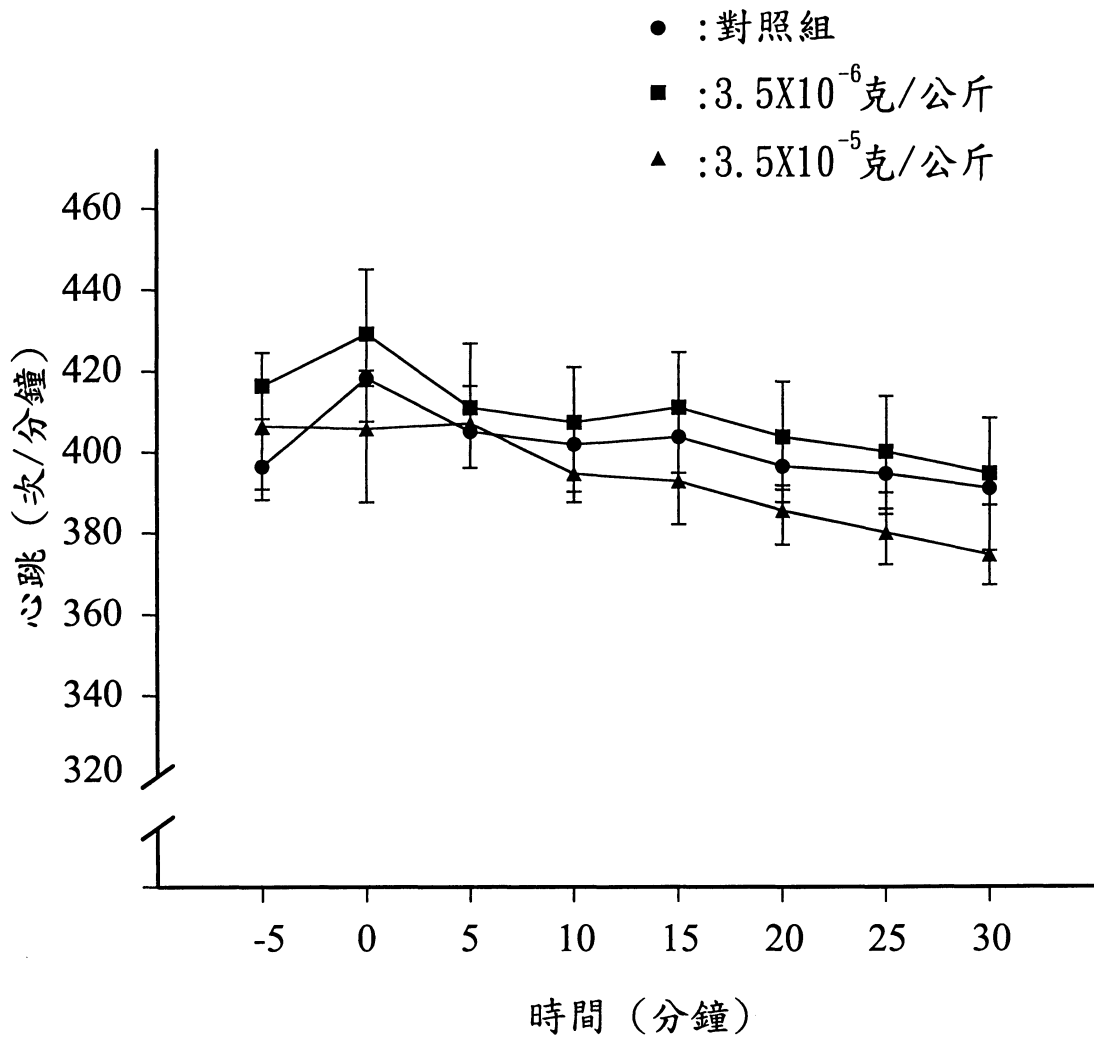
第7B圖



第7C圖



第 8 圖



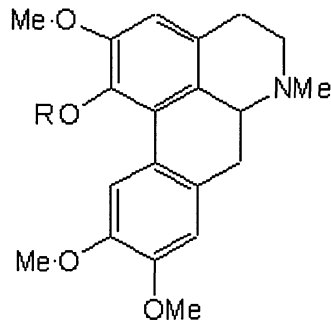
第 9 圖

## 六、申請專利範圍

1. 一種用於在哺乳動物中治療或預防心臟疾病的醫藥組合物，包括：

(i) 一有效量之式I化合物

公告本



I

修正  
補充  
本93年9月20日

及其酯類衍生物，其中，R是氫、乙醯、丙醯或丁醯，或其藥學上可接受的鹽類；以及

(ii) 一藥學上可接受的載體或賦形劑。

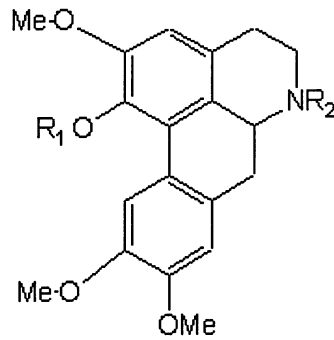
2. 如申請專利範圍第1項所述之醫藥組合物，其中該心臟疾病包括心律不整、心肌缺血或心肌梗塞所引起的心臟疾病，以及心律不整或急性心肌梗塞所引起的心因性猝死。

3. 一種用於在哺乳動物中治療或預防心臟疾病的醫藥組合物，包括：

(i) 一有效量之式II化合物



## 六、申請專利範圍



II

及其酯類衍生物，其中：

R<sup>1</sup> 是氫、乙醯、丙醯或丁醯；

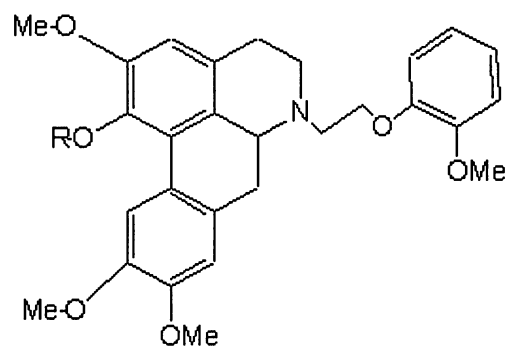
R<sup>2</sup> 是乙基、烯丙基、丙基、丁基、異丁基或環丙基甲基；

或其藥學上可接受的鹽類；以及

(ii) 一藥學上可接受的載體或賦形劑。

4. 如申請專利範圍第3項所述之醫藥組合物，其中該心臟疾病包括心律不整、心肌缺血或心肌梗塞所引起的心臟疾病，以及心律不整或急性心肌梗塞所引起的心因性猝死。

5. 一種如式III之化合物



III



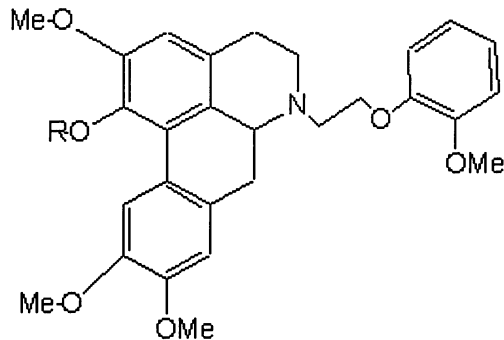


## 六、申請專利範圍

或其酯類，其中，R1是氫、乙醯、丙醯或丁醯，或其藥學上可接受的鹽類。

6. 一種用於在哺乳動物中治療或預防心臟疾病的醫藥組合物，包括：

(i) 一有效量之式III化合物



III

及其酯類衍生物，其中，R是氫、乙醯、丙醯或丁醯，或其藥學上可接受的鹽類；以及

(ii) 一藥學上可接受的載體或賦形劑。

7. 如申請專利範圍第6項所述之醫藥組合物，其中該心臟疾病包括心律不整、心肌缺血或心肌梗塞所引起的心臟疾病，以及心律不整或急性心肌梗塞所引起的心因性猝死。

8. 如申請專利範圍第1、3及6項中任一項所述之醫藥組合物，其係以注射或口服的方式給藥至所需的病患。

