



(21)申請案號：100120452

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 06 月 10 日

(51)Int. Cl. : **A61K31/7034(2006.01)**

A61P25/28 (2006.01)

(30)優先權：2010/06/16 美國

61/355,169

(71)申請人：杏輝藥品工業股份有限公司(中華民國) SINPHAR PHARMACEUTICAL CO., LTD.
(TW)

宜蘭縣冬山鄉中山村 84 號

(72)發明人：林漢欽 LIN, HANG CHING (TW)；唐靜靜 TANG, JING JING JUSTINE (CA)；蘇慕寰 SU, MUH HWAN (TW)；黃永名 HUANG, YOUNG MING (TW)

(74)代理人：陳展俊

(56)參考文獻：

KR 20040064830

US 2007/0004011A1

審查人員：俞樹生

申請專利範圍項數：5 項 圖式數：14 共 39 頁

(54)名稱

異類葉升麻苷或其醫藥學上可接受之鹽於抑制澱粉樣 β 肽生成、累積或聚集、以及製備預防或治療澱粉樣 β 肽相關疾病或狀況的藥物之用途

USE OF ISOACTEOSIDE OR PHARMACEUTICALLY ACCEPTABLE SALT THEREOF IN INHIBITING FORMATION, ACCUMULATION OR AGGREGATION OF AMYLOID BETA PEPTIDES, AND IN FABRICATION OF DRUG FOR PREVENTING OR TREATING AMYLOID BETA PEPTIDE-ASSOCIATED DISEASES OR CONDITIONS

(57)摘要

異類葉升麻苷或其醫藥學上可接受之鹽被作為一種澱粉樣 β 肽生成、累積或聚集的抑制劑，以預防或治療與澱粉樣 β 肽相關性疾病或狀況。

Isoacteoside or a pharmaceutically acceptable salt thereof is used in preventing or treating amyloid beta peptide-associated diseases or conditions as an agent for inhibiting formation, accumulation or aggregation of amyloid β peptides.

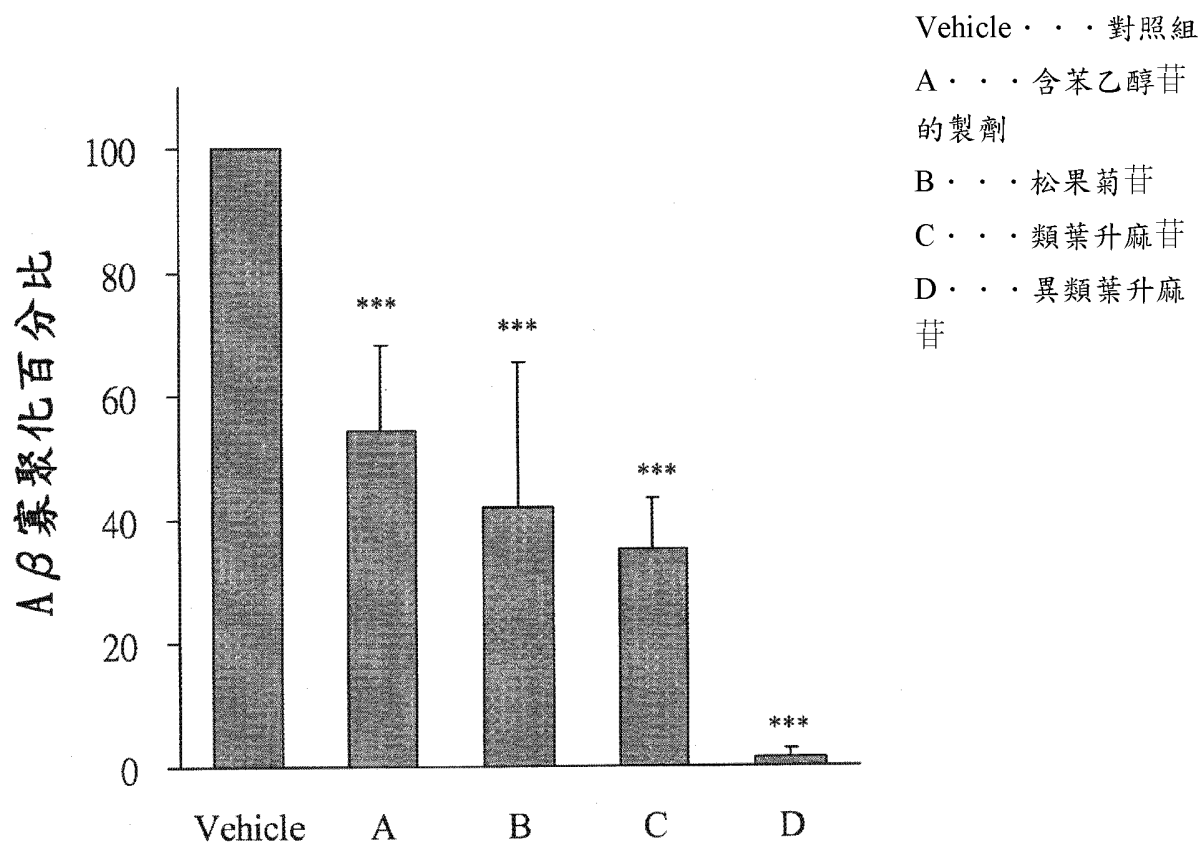
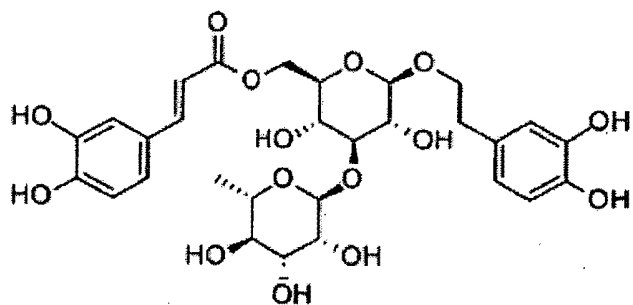


圖 5



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係有關於異類葉升麻苷被用於抑制澱粉樣 β 肽生成、累積或聚集的抑制劑的新用途，尤其有關一種使用異類葉升麻苷於預防或治療一種與澱粉樣 β 肽相關性疾病或狀況之用途發明。

【先前技術】

阿滋海默氏症 (Alzheimer's disease) 被認為與一種具 39-43 個胺基酸的肽的累積相關，該肽被稱之為澱粉樣 β 肽 (amyloid β peptides) (簡稱 $A\beta$)，其為類澱粉前體蛋白 APP (amyloid precursor protein) 的一種水解產物。其中 $A\beta$ 1-40 最為大量且毒性低，而 $A\beta$ 1-42 則對神經元有較高的毒性，且具高度纖維形成性 (fibrillogenic)，被認為是與阿滋海默氏症的發病最為相關的 $A\beta$ 形式。 $A\beta$ 單體可經寡聚化而形成可溶性的 $A\beta$ 寡聚體 (oligomer)，進一步聚集而於細胞外形成不可溶性的纖維絲或老年斑塊 (senile plaque)。

一般認為與 $A\beta$ 相關的疾病或狀況包含唐氏症 (Down syndrome)、荷蘭型遺傳性腦出血伴澱粉樣變病 (Hereditary cerebral hemorrhage with amyloid (HCHWA) Dutch)、關島帕金森氏症-失智症複合症 (Parkinsonism-dementia complex on Guam) (Clinical Neurology and Neurosurgery (1990) 92: 305-310)；大腦澱粉樣血管病 (J. Neuropath. Exp. Neuro. (2002) 61: 282-293)；包涵體肌炎 (Neurology (2006) 66:

65-68)；額顳葉型失智症(Neuroreport (2002) 13-5: 719-723)；年齡相關黃斑變性(Experimental Eye Research (2004) 78: 243-256)；皮克病(Pick's disease)(Neuroscience Letters (1994) 171: 63-66)及其他。

所述 A β 相關的疾病或狀況一般而言係與 A β 的生成、累積或聚集有關，包含因先天如遺傳、或後天如老化或環境等因素而導致生物體中存在不正常的 A β 或 A β 聚集體數量。

一般認為如能抑制 A β 的生成、累積或聚集，應可作為有效預防或治療阿滋海默氏症或其他與澱粉樣 β 肽相關的疾病或狀況的一種方式。

【發明內容】

有鑒於澱粉樣 β 肽和其聚集體，容易於生物體內引發各種疾病或狀況，因此本發明之一目的為提供一種抑制澱粉樣 β 肽生成、累積或聚集的有效成份，其可作為食品、飲品、咀嚼物、貼片、皮膚保養品或其他的一添加劑。本發明之另一目的則提供一種預防或治療澱粉樣 β 肽相關的疾病或狀況的藥物及方法。

為達上述目的，本發明揭示了以異類葉升麻苷或其醫藥學上可接受鹽於抑制澱粉樣 β 肽生成、累積或聚集之用途，以及其於製備預防或治療澱粉樣 β 肽相關的疾病或狀況的藥物之用途。

較佳地，上述異類葉升麻苷或其醫藥學上可接受之鹽

係用以抑制該澱粉樣 β 肽導致神經元的損傷或凋亡，進而保留、改善或恢復學習與記憶能力。

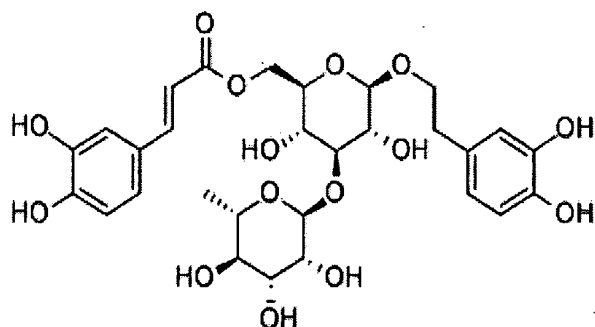
較佳地，上述藥物對人類的一有效劑量係相當於每日每公斤體重 0.2 毫克至 4.0 毫克的異類葉升麻苷或其醫藥學上可接受之鹽。

為讓本發明之上述和其他目的、特徵、和優點能更明顯易懂，下文特舉出實施例，並配合所附圖式，作詳細說明。

【實施方式】

許多由澱粉樣 β 肽引發的疾病均具有一種共通的特徵-澱粉樣 β 肽聚集體的形成。這些澱粉樣 β 肽聚集體可以例如纖維或斑塊的形態出現，並且沉澱在生物體的系統、器官、組織或體液中，進而引發各種疾病或狀況。如能有效抑制澱粉樣 β 肽的生成、累積或聚集，應可避免澱粉樣 β 肽形成聚集體而引發的各種疾病或狀況，其應可作為有效預防或治療澱粉樣 β 肽相關疾病或狀況的方式之一。

有鑒於此，本發明係以具有下式的異類葉升麻苷或其醫藥學上可接受之鹽作為抑制(例如降低或避免)澱粉樣 β 肽生成、累積或聚集的有效成份，尤其是抑制澱粉樣 β 肽細胞外的生成、累積或聚集。



美國專利 7,087,252 B2 揭示了一種從管花肉蓯蓉 (*Cistanche tubulosa* (Schenk) Wight) 的肉質莖所製備之含 25-50 wt% 松果菊苷 (echinacoside) 及 5-15 wt% 類葉升麻苷 (acteoside) 的製劑，其可用於抗老年癡呆症 (senile dementia)。異類葉升麻苷及多種其它苯乙醇苷類 (phenylethanoid glycosides) 已知被包含於該製劑中。

在本發明中，異類葉升麻苷的水合物或其它溶劑溶合物、前藥及代謝物均被視為異類葉升麻苷的功能上等同物。所述“前藥”指一前趨化合物可於生物條件(活體內或活體外)下水解、氧化或進行其他反應而產生異類葉升麻苷。所述“代謝物”係指異類葉升麻苷於細胞或生物體內被代謝所形成之化合物。

當異類葉升麻苷之“醫藥學上可接受鹽”施予生物體時，其通常可具有與異類葉升麻苷相同或類似的醫療功效，並為生理上可忍受的，且不會產生過敏或類似之狀況反應。所述異類葉升麻苷之醫藥學上可接受鹽可包含但不限於，鐵鹽、鈣鹽或鎂鹽等。

所述“預防”意指避免或延遲疾病或狀況在生物體中出現，而所述“治療”則指減緩或阻止疾病或狀況的發展，又

或者使生物體的狀況回復至較佳或正常的狀態。

所述“澱粉樣 β 肽相關性疾病或狀況”指此疾病或狀況的發生通常與澱粉樣 β 肽的生成、累積或聚集相關，且尤其指此疾病或狀況的發生為澱粉樣 β 肽所導致。而當在具有某種疾病或狀況之一定比例上的生物體上發現有澱粉樣 β 肽的不正常生成、累積或聚集現象時，亦可認為此疾病或狀況為澱粉樣 β 肽相關。另外，當澱粉樣 β 肽的聚集處與疾病或狀況所發生的病理特徵影響位置相近時，亦可認為此疾病或狀況為澱粉樣 β 肽相關。

本發明所提供之抑制澱粉樣 β 肽的有效成份，亦可作為食品、飲品等添加劑使用，以達到抑制澱粉樣 β 肽生成、累積或聚集的方便性使用。

本發明所提供之用於治療澱粉樣 β 肽相關性疾病或狀況的藥物或醫藥組合物，其包含異類葉升麻苷或其醫藥學上可接受鹽之有效成份，並可包含適當的載劑、稀釋劑或賦形劑等，以呈現如散劑(powder)、顆粒劑(granule)、錠劑(tablet)、片劑(troche)、丸劑(pill)、膠囊(capsule)、水性或油性溶液(solution)、懸浮液(suspension)、乳膏(cream)、軟膏(ointment)、凝膠(gel)、氣霧劑(aerosol)、栓劑(suppository)、貼劑(patch)或其他所欲形式。上述藥物或醫藥組合物可如口腔、局部、非經腸、皮膚、鼻、眼、眼內或其他途徑投予。

在本文中，所述“或”一般定義為“及/或”，除非另有特別說明。

隨著世界人口老齡化的日益嚴重，與衰老有關的許多疾病例如失智症(dementia)已然成為現今老年疾病之醫療重點研究之一，而在各種失智症中又以阿滋海默氏症最為普遍。阿滋海默氏症是一種慢性的神經退化性疾病，其特徵為病人逐漸失去認知能力且出現嚴重的行為異常，後續也會造成語言和運動能力的喪失，對病患本身與其家人的生活品質容易造成極大的影響。有鑒於罹患阿滋海默氏症的患者人數有逐漸增加的趨勢，造成家庭與社會嚴重的負擔，因此本發明特別檢選與阿滋海默氏症較為相關的 $A\beta$ 進行試驗。

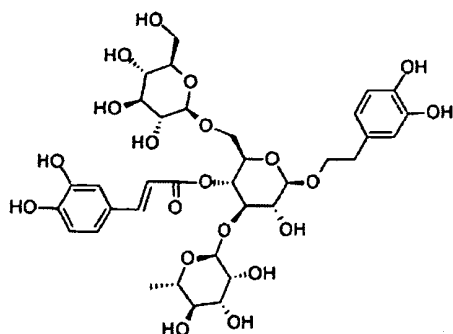
在下列實施例中，利用表一所提供之測試樣品進行 $A\beta$ 試驗，並且與未加入任何測試樣品處理的對照組(Vehicle)進行比較。

表一：進行試驗之樣品

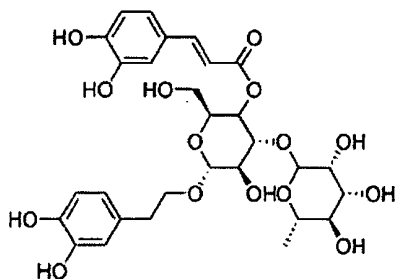
代號	試驗樣品	純度 (%)	來源
A	含苯乙醇苷的 製劑	—	源自於天力再生 Tianlife® (參考 US7087252B2 所述之 抽提物)
B	松果菊苷	99	杏輝實驗室
C	類葉升麻苷	97	杏輝實驗室
D	異類葉升麻苷	97	杏輝實驗室

松果菊苷(Echinacoside)、類葉升麻苷(Acteoside)和異類葉升麻苷(Isoacteoside)分別具有下列結構式：

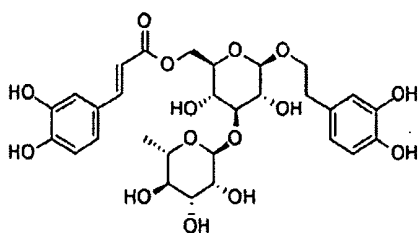
松果菊苷：



類葉升麻苷：



異類葉升麻苷：



實施例一：神經瘤母細胞株之培養

將原生型(wild type)人類神經瘤母細胞 SH-SY5Y 培養於 Eagle's Minimum essential Medium (EMEM)/Ham's F12 medium (1:1 混合物) (含 10% FBS, 10 units/ml penicillin, 10 µg/ml Streptomycin) 中，而原生型小鼠神經瘤母細胞 Neuro-2a 則培養於 minimum essential medium (MEM) 培養

基 (含 10% FBS, 10 units/ml penicillin, 10 μ g/ml Streptomycin) 中。

實施例二：各樣品對 A β 1-40 於細胞外的累積測試

將實施例一中的原生型人類神經瘤母細胞 SH-SY5Y 之培養基置換成化學成份培養基 (EMEM/F12 medium (Cat.No.12500-062), Hepes 5 mM, 葡萄糖 0.6%, NaHCO₃ 3 mM, 麩醯胺 2.5 mM, 胰島素 25 μ g/ml, Transferin 100 μ g/ml, Progesterone 20 nM, Putrescine 60 μ M, 亞硒酸鈉 (Sodium selenite) 30 nM, Heparin 2 μ g/ml)。每個井 (well) 具有 1 $\times$ 10⁵ 個 SH-SY5Y 細胞，而培養基體積為 300 μ l。30 分鐘後，將表一中所示之測試樣品 A-D 分別以 50 μ g/ml 的濃度加入至不同井中處理 24 小時，接著以 Human A β 1-40 Immunoassay kits (Catalog # KHB3482 Invitrogen) 分析各井之培養基中的 A β 1-40 含量。

人類神經瘤母細胞 SH-SY5Y 會累積 A β 於細胞外的培養基中，而圖 1 顯示 SH-SY5Y 井分別經各測試樣品 A-D 處理後，A β 1-40 於培養基中的含量百分比，其係以未加入任何測試樣品處理的對照組為比較基準。結果顯示為平均值 $\pm$ 標準誤差，而對照組和測試樣品組間之統計差異標示 * 表示 P<0.05，** 表示 P<0.01，且 *** 表示 P<0.001。

參考圖 1 所示，測試樣品 A (含苯乙醇苷的製劑) 和測試樣品 C (類葉升麻苷) 減少培養基中的 A β 1-40 含量約 20%，而測試樣品 D (異類葉升麻苷) 則減少培養基中的 A β 1-40 含

量達 $47.44 \pm 16.62\%$ 。圖 1 結果顯示異類葉升麻苷(D)具有顯著降低 A β 1-40 於細胞外累積的極佳活性。

實施例三：各測試樣品對 A β 1-40 於細胞內的累積實驗

每個井均具有 1×10^5 個 SH-SY5Y 細胞，而培養基體積為 300 μ l。將各井中的 SH-SY5Y 細胞以濃度 50 μ g/ml 的測試樣品 A-D 處理 24 小時後，分別將各井中的細胞部份製成細胞均質液，並利用 Human A β 1-40 Immunoassay kits(Catalog # KHB3482 Invitrogen)分析其 A β 1-40 含量。

圖 2 顯示 SH-SY5Y 井之細胞內的 A β 1-40 含量百分比，其係以未加入任何測試樣品處理的對照組為比較基準。如圖 2 所示，測試樣品 A-D 均未明顯造成 A β 於細胞中累積。

實施例四：各測試樣品對 APP 在細胞中表現的影響實驗

每個井具有 1×10^5 個 SH-SY5Y 細胞，而培養基體積為 300 μ l。將各井中的 SH-SY5Y 細胞以濃度 50 μ g/ml 的測試樣品 A-D 處理 24 小時後，將細胞部分以均質緩衝液(50 mM Hepes pH 7.5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM PMSF, 5 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin)進行均質，利用超高速離心除去不溶物質。將蛋白質以 SDS-聚丙烯醯胺膠電泳(polyacrylamide gel electrophoresis)分離，並轉漬到 PVDF 膜後再利用免疫轉漬法(immunoblot) (antiA β 1-17, 6E10 或 antiAPP-c 端抗體)來檢視 holoAPP 含量。

圖 3 顯示測試樣品 A-D 對 APP 在細胞中表現的影響，其以百分比表示，並以未加入任何測試樣品處理的對照組 (Vehicle) 為基準。如圖 3 所示，測試樣品 A-D 並未降低 APP 表現的活性。

實施例五：各測試樣品對 A β 1-40 於細胞外的降解實驗

小鼠神經瘤母細胞 neuro-2a 會於化學成份培養基中釋放出分解 A β 的酵素，但不會累積足以偵測的 A β 量於培養基中。將培養 neuro-2a 於培養基培養 24 小時，之後將不含細胞的培養基取出，並分別以濃度 50 μ g/ml 的測試樣品 A-D 及 10ng 人工合成的 A β 1-40 處理 24 小時，之後檢視各測試樣品是否具有可促進培養基中的酵素降解 A β 的活性。利用 Human A β 1-40 Immunoassay kits (Catalog # KHB3482 Invitrogen) 分別檢驗各井中的 A β 1-40 之殘留量，其顯示為百分比，並以未加入任何測試樣品處理的對照組 (Vehicle) 為比較基準。如圖 4 所示，測試樣品 D (異類葉升麻苷) 並未促進 A β 於細胞外的降解。

實施例六：各測試樣品對 A β 1-42 寡聚化的實驗

將乾燥的 Human A β 1-42 自冰箱取出平衡至室溫，加入 1,1,1,3,3,3-Hexa-fluoro-2-propanol (HFIP) 溶解 A β 1-42 至濃度為 1mM，而之後在室溫下靜置 1 小時。以 Hamilton 注射器將上述 A β 1-42/HFIP 容易進行分裝，並且以氮氣將 HFIP 吹乾，接著存放於 -20°C。將 HFIP 處理後的 A β 1-42 以 PBS

溶解，並分別以濃度 $50\mu\text{g/ml}$ 的測試樣品 A-D 且於 4°C 下振盪處理 24 小時，以製備 $\text{A}\beta 1-42$ 之寡聚物(oligomer)，並利用 thioflavine T 結合螢光($\text{Ex}=450\text{ nm}$, $\text{Em}=482\text{ nm}$)以分析 $\text{A}\beta 1-42$ 的寡聚化程度。

圖 5 顯示測試樣品 A-D 分別對 $\text{A}\beta 1-42$ 寡聚化(oligomerization)的影響，結果以百分比顯示，並以未加入任何測試樣品處理的對照組為基準。參考圖 5 所示測試樣品 A(含苯乙醇苷的製劑)、B(松果菊苷)、C(類葉升麻苷)和 D(異類葉升麻苷)均具有抑制 $\text{A}\beta 1-42$ 寡聚化的活性，其中異類葉升麻苷(D)可抑制 $\text{A}\beta 1-42$ 寡聚化程度達 98.93 ± 1.70 ，亦即異類葉升麻苷(D)可有效降低 $\text{A}\beta 1-42$ 的寡聚化，進而可抑制 $\text{A}\beta$ 形成纖維絲或老年斑塊。

圖 6 顯示 $\text{A}\beta$ 的生成、清除與聚集過程(參考來源：Pharmacology & Therapeutics (2005) 108:131)。參考圖 6，其用以說明培養基中細胞外的 $\text{A}\beta$ 累積(1)會受到 $\text{A}\beta$ 細胞內累積量(2)、APP 表現(3)、 $\text{A}\beta$ 降解(4)、 $\text{A}\beta$ 寡聚化(5)以及 $\text{A}\beta$ 生成(6)等影響。根據上述實施例二至六的細胞實驗結果，相較於其他測試樣品 A-C 而言，異類葉升麻苷(D)具有降低細胞外 $\text{A}\beta$ 累積(1)之作用，並且對於降低 $\text{A}\beta$ 的寡聚化程度(5)有極佳的效用，應可進一步用以抑制 $\text{A}\beta$ 的聚集。此外，異類葉升麻苷(D)降低 $\text{A}\beta$ 於細胞外累積(1)的作用並非源於異類葉升麻苷增進了 $\text{A}\beta$ 於細胞內的累積(2)、降低了細胞的 APP 表現(3)、或增進了 $\text{A}\beta$ 於細胞外進行降解(4)，因此推測異類葉升麻苷(D)應可直接減少 $\text{A}\beta$ 的生成(6)。

綜合上述結果，異類葉升麻苷(D)或其醫藥學上可接受鹽可作為抑制 $A\beta$ 生成、累積或聚集之有效成份，預計異類葉升麻苷(D)可有效抑制 $A\beta$ 導致神經元的損傷或凋亡，以進而保留、改善或恢復學習與記憶能力。此外，根據上述結果，異類葉升麻苷(D)或其醫藥學上可接受鹽應可用於預防或治療 $A\beta$ 相關疾病或狀況，以及用於用於抑制 $A\beta$ 的生成、累積或聚集。

所述 $A\beta$ 相關疾病或狀況可包含但不限於阿滋海默氏症、輕度認知障礙、路易氏體失智症、唐氏症、荷蘭型類澱粉變性症、關島帕金森氏症-失智症複合症、大腦澱粉樣血管病、包涵體肌炎、額顳葉型失智症、年齡相關性黃斑變性、皮克病以及其他。另，所述 $A\beta$ 雖以 $A\beta$ 中最大量的 $A\beta 1-40$ 或具有高度纖維形成性的 $A\beta 1-42$ 為例，然亦可包含其他胺基酸片段。

在上述測試樣品中，異類葉升麻苷(D)具有降低 $A\beta$ 生成、累積和聚集的最佳效用。下列實施例七至十一中，首先於 250~300 公克重的雄性 SD 大鼠(購自樂斯科股份有限公司)之側腦室內輸注 $A\beta 1-42$ ，以造成大鼠的神經損壞，影響大鼠的記憶與學習操作能力，並可誘導大鼠腦中形成似老年斑塊的沈積，以作為擬似阿滋海默氏症的動物模式。 $A\beta$ 誘導之阿滋海默氏症的動物模式可例如參考 Nabeshima 等人之文獻資料 (Neuroscience Letters (1994) 170: 63-66)(British Journal of Pharmacology (1999) 126: 235-244)。

將大鼠麻醉後，於大鼠的左腦室設置輸注管，進行縫合後歸回飼養籠中照顧。圖 7 顯示動物試驗之實驗排程，於開始輸注 A β 1-42 後的第 7 天進行探索能力(exploration behavior)之評估，第 8 至 9 天進行被動迴避反應(passive avoidance learning)之評估，第 10 至 13 天進行水迷宮(water maze)之評估，而第 14 天則進行空間性探索實驗(probe test)。實驗組別設計如表二所示，其中假手術組(Sham)以 TFA 溶液(64.9% sterile ddH₂O, 35% acetonitrile, 0.1% trifluoroacetic acid)進行處理，而其他實驗組則每小時以 0.5 μ l 溶解於 TFA 溶液的 A β 1-42 處理，相當於每天給予 300pmol/12 μ l 的 A β 1-42 (Tocris 1428; MW: 4514.08)。整個試驗期間，於進行例如探索能力、被動迴避反應以及水迷宮測定之每日訓練前經口投予測試樣品給實驗大鼠。表二顯示各個實驗組別的條件，其中測試樣品 D 為表一中的異類葉升麻苷，而 Aricept 則為市售用以治療失智症例如阿滋海默氏症的藥物。所有測試樣品均以二次蒸餾水每日製備，並以胃管經口灌胃方式給予。

在實施例七至十一中，結果顯示為平均值 $\pm$ 標準誤差，而 A β 1-42 對照組和其他實驗組間之統計差異標示*表示 $P < 0.05$ ，**表示 $P < 0.01$ ，而***表示 $P < 0.001$ 。

最後所有實驗大鼠均犧牲，取其腦部進行切片和染色，並進行神經傳遞物質的測定。

表二：動物實驗設計

實驗組別	誘導藥 (腦室輸入)	測試樣品 (胃管經口灌食)	大鼠數
假手術組 (Sham)	TFA solution	二次蒸餾水	12
Aβ1-42	Aβ1-42		12
D 低劑量組		D 2.5 mg/kg	12
D 高劑量組		D 5 mg/kg	12
正對照組 Aricept		Aricept 0.75 mg/kg	12

實施例七：探索能力之設備與測定

探索能力測定裝置係由一長、寬、高均 40 cm 及一個不銹鋼底板所組成，底板上有 16 個直徑 3 cm 的洞，距兩側 7 cm，各洞之間距 4 cm。每隻大鼠的測定時間為 10 分鐘，測試大鼠穿洞的次數。

圖 8 顯示根據表二所示之動物探索行為(exploration behavior)的實驗結果。如圖 8 所示，A β 1-42 經腦室輸注予實驗大鼠後，會造成實驗大鼠的探索能力低下，而測試樣品 D(異類葉升麻苷)和 Aricept 均可有效增進實驗大鼠的探索能力，且測試樣品 D (異類葉升麻苷)於 5 mg/kg 的劑量下優於 Aricept 0.75 mg/kg 的功效。

實施例八：被動迴避反應實驗

被動迴避裝置由一明室、一暗室以及一介於兩室間的閘門所構成。

將大鼠置入明室，同時開啟閘門，以大鼠在 90 秒內進入暗室者，供做本實驗。

訓練期：將篩選過之大鼠，置入明室，同時開啟閘門，待大鼠進入暗室後，關閉閘門，同時於底板通以電流刺激 5 秒，之後自暗室取出大鼠，歸回飼養籠。

於訓練後 24 小時，再將大鼠置入明室，同時並開啟閘門，記錄大鼠在明室之滯留時間 (step-through latency, STL)。

圖 9 顯示根據表二所示之動物進行被動迴避反應的實驗結果。參考圖 9，實驗大鼠經腦室輸注給予 $A\beta 1-42$ 後，會顯著造成實驗大鼠之被動迴避學習反應的障礙，而經測試樣品 D (異類葉升麻苷) 和 Aricept 的治療均可反轉實驗大鼠因腦室輸注 $A\beta 1-42$ 導致實驗大鼠被動迴避學習障礙之現象。如圖 9 所示，測試樣品 D (異類葉升麻苷) 於 2.5 mg/kg 的劑量下與 Aricept 0.75 mg/kg 的效果相當，而測試樣品 D (異類葉升麻苷) 於 5 mg/kg 的劑量下則優於 Aricept 0.75 mg/kg 的功效。

實施例九：水迷宮實驗

本實驗將泳池分成四個象限，將隱藏平臺固定置於第四象限上，並且置於水面下方 1 公分處。每一大鼠每天均給予兩次訓練，而兩次訓練間隔為 4 小時，而每次訓練均

給予 2 分鐘以找尋隱藏平臺。第一次訓練為空間表現 (spatial performance) 試驗，每隻大鼠最多給予 120 秒的時間游泳找尋隱藏平臺，若大鼠於 120 秒內成功找到隱藏平臺，則讓大鼠於平臺上休息 30 秒鐘；而若大鼠於時間終止前尚未找到隱藏平臺，則將大鼠的分數計為 120 秒，並將其抓至隱藏平臺休息 30 秒鐘。此空間表現試驗一共進行 4 天。於第 5 天將隱藏平臺自水迷宮泳池取走，再將大鼠置於第一象限，並且給予 60 秒鐘的時間游泳，記錄大鼠於泳池內原隱藏平臺的象限所花之時間，以進行參考記憶試驗 (probe test)。

圖 10 顯示根據表二所示之動物進行空間表現試驗結果，而圖 11 顯示根據表二所示之動物進行參考記憶試驗的實驗結果，並與假手術組 (Sham)、 $A\beta 1-42$ 對照組和正對照組 Aricept 的結果作比較。參考圖 10 及圖 11 所示，動物實驗結果顯示測試樣品 D 和藥物 Aricept 均可改善 $A\beta 1-42$ 誘發水迷宮空間表現和參考記憶缺失之現象，而測試樣品 D 5 mg/kg 則優於對照組 Aricept 0.75 mg/kg 之效果。

實施例十：大鼠腦部組織染色結果

將進行水迷宮實驗後的大鼠斷頭，並且快速將腦自頭蓋骨內移開，進行腦部海馬區 $A\beta 1-42$ 之免疫組織染色。圖 12A 至 12E 顯示腦部組織染色結果。在圖 12B 中，在連續輸注 $A\beta 1-42$ 的大鼠腦中發現大量的斑塊，而在圖 12C 和圖 12D 中，經測試樣品 D (異類葉升麻苷) 2.5 mg/kg 處理後的大

鼠腦中僅發現極少量的斑塊，而經測試樣品 D(異類葉升麻苷) 5mg/kg 處理後的大鼠腦中則幾乎沒有斑塊產生。比較圖 12C 至圖 12E，經測試樣品 D(異類葉升麻苷)處理後的大鼠腦中，其斑塊數量明顯小於經藥物 Aricept 處理過後的結果。由此結果可知，測試樣品 D(異類葉升麻苷)可有效抑制 $A\beta$ 經聚集而形成斑塊，或者消除斑塊。

實施例十一：大鼠大腦皮質區及海馬區中的神經傳導物質含量

將進行水迷宮實驗後的大鼠犧牲掉，並快速將腦自頭蓋骨內移開，按 Glowinski & Iversen 之方法，將大腦皮質區及海馬區進行區別取出，且之後分別稱重，並加入 50 mM Na-phosphate buffer(pH 7.8)，進行均質，以供進行神經傳遞物質濃度及酶含量的測定。

表三和表四分別為根據表二所示之實驗大鼠於其腦部皮質區和海馬區的神經傳導物質多巴胺(DA)與其代謝物 DOPAC 和 HVA 之含量檢測結果。參考表三和表四所示之結果， $A\beta$ 1-42 造成實驗大鼠之皮質區和海馬區的 DA 含量降低，而測試樣品 D 和 Aricept 均可反轉 $A\beta$ 1-42 造成實驗大鼠之皮質區和海馬區的 DA 含量降低之現象。

表三：根據表二所示之實驗大鼠於其腦部皮質區的神經傳導物質多巴胺(DA)與其代謝物 DOPAC 和 HVA 之含量檢測結果

	DOPAC	HVA	DA
Sham	16.75±1.70*	3.71±0.58	3.92±0.44**
Vehicle	11.66±1.13	2.76±0.43	2.33±0.28
D 2.5 mg/kg	12.53±3.33	2.92±0.58	2.67±0.43
D 5 mg/kg	13.80±3.03	2.74±0.69 ×	3.84±0.47*
Aricept	10.49±2.38	2.42±0.78	3.10±0.46

表 4：根據表 2 所示之實驗大鼠於其腦部海馬區的神經傳導物質多巴胺(DA)與其代謝物 DOPAC 和 HVA 之含量檢測結果

	DOPAC	HVA	DA
Sham	5.87±0.92	3.68±0.41	5.36±0.75***
Vehicle	5.13±0.80	3.39±0.36	1.00±0.21
D 2.5 mg/kg	4.98±1.15	3.68±0.46	5.41±1.30***
D 5 mg/kg	4.13±0.45	3.29±0.25	4.07±0.59***
Aricept	3.19±1.00	2.45±0.33	1.33±0.37

圖 13A 為根據表二所示實驗大鼠於其腦部皮質區和海馬區的神經傳導物質乙醯膽鹼(Acetylcholine)的含量檢測結果，而圖 13B 則為根據表二所示實驗大鼠於其腦部皮質區和海馬區的膽鹼(Choline)含量檢測結果。參考圖 13A 和

圖 13B 所示之結果， $A\beta 1-42$ 造成實驗大鼠之皮質區和海馬區的乙醯膽鹼含量降低，而測試樣品 D 和 Aricept 均可反轉 $A\beta 1-42$ 造成實驗大鼠之皮質區和海馬區的乙醯膽鹼含量降低之現象，且其中以測試樣品 D（異類葉升麻苷）5 mg/kg 的結果最佳。

圖 14A 和圖 14B 分別顯示根據表二所示實驗大鼠於其腦部皮質區和海馬區所測得的乙醯膽鹼酯酶 (acetylcholinesterase) 活性結果。參考圖 14A 和圖 14B 所示之結果， $A\beta 1-42$ 造成實驗大鼠皮質區和海馬區的乙醯膽鹼酯酶活性增加，而測試樣品 D 和 Aricept 均可反轉 $A\beta 1-42$ 造成實驗大鼠皮質區和海馬區的乙醯膽鹼酯酶活性增加之現象。

由於 $A\beta$ 的聚集體會損傷細胞，進而引發各種疾病或狀況。根據實施例二至六的細胞試驗結果，異類葉升麻苷可有效抑制 $A\beta$ 的生成、累積或聚集，進而避免 $A\beta$ 形成聚集體，其可用於預防或治療阿滋海默氏症以及其他 $A\beta$ 相關疾病或狀況。

根據實施例七至九的動物試驗結果，異類葉升麻苷具有顯著改善 $A\beta$ 所致之記憶或學習能力衰退的效果。而根據實施例十所示結果，異類葉升麻苷可有效抑制 $A\beta$ 經聚集而形成斑塊，或者消除斑塊。此外，根據實施例十一，異類葉升麻苷可有效反轉神經傳導物質因 $A\beta$ 而減少的現象，故可具有改善記憶或學習能力衰退的效果。根據上述細胞和動物試驗結果，如將異類葉升麻苷或其醫藥學上可接受之

鹽以一有效治療量，例如相當於約 0.2 毫克/公斤至 4 毫克/公斤(亦即對 60 公斤成人的建議劑量約為 12 毫克至 240 毫克)的異類葉升麻苷之每日劑量投予至一人類個體，其應可作為預防或治療阿滋海默氏症以及其他 $A\beta$ 相關疾病或狀況之方法。

雖然本發明已以數個較佳實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者，在未脫離本發明所揭示之精神下所完成之等效改變或修飾，均應包含在下述之申請專利範圍內。

【圖式簡單說明】

圖 1 顯示各井(well)之細胞外的 $A\beta$ 1-40 含量百分比，結果顯示本發明的異類葉升麻苷(D)具有顯著降低 $A\beta$ 1-40 於細胞外累積的極佳活性；

圖 2 顯示各井之細胞內的 $A\beta$ 1-40 含量百分比；

圖 3 顯示各測試樣品對 APP 表現量的影響；

圖 4 顯示各測試樣品對 $A\beta$ 1-40 降解的影響；

圖 5 顯示各測試樣品對 $A\beta$ 1-42 寡聚化的影響；

圖 6 顯示 $A\beta$ 的生成、清除與聚集過程；

圖 7 顯示動物試驗的時程表；

圖 8 顯示各測試樣品對實驗大鼠的探索能力影響；

圖 9 顯示各測試樣品對實驗大鼠之被動迴避反應的影響；

圖 10 顯示各測試樣品對實驗大鼠進行水迷宮空間表

現的影響；

圖 11 顯示各測試樣品對實驗大鼠進行水迷宮參考記憶試驗的影響；

圖 12A-12E 顯示實驗大鼠的腦部組織染色結果；

圖 13A 顯示實驗大鼠腦部皮質區和海馬區的乙醯膽鹼含量檢測結果；

圖 13B 顯示實驗大鼠腦部皮質區和海馬區的膽鹼含量檢測結果；

圖 14A 顯示實驗大鼠腦部皮質區所測得的乙醯膽鹼酯酶活性結果；

圖 14B 顯示實驗大鼠腦部海馬區所測得的乙醯膽鹼酯酶活性結果。

【主要元件符號說明】

Vehicle 對照組

A 含苯乙醇苷的製劑

B 松果菊苷

C 類葉升麻苷

D 異類葉升麻苷

發明專利說明書



(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：100/120452

A61K 31/034 (2006.01)

※申請日：100. 6. 10

※IPC 分類：

A61P 25/28 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

異類葉升麻苷或其醫藥學上可接受之鹽於抑制澱粉樣 β 肽生成、累積或聚集、以及製備預防或治療澱粉樣 β 肽相關疾病或狀況的藥物之用途

USE OF ISOACTEOSIDE OR PHARMACEUTICALLY ACCEPTABLE SALT THEREOF IN INHIBITING FORMATION, ACCUMULATION OR AGGREGATION OF AMYLOID BETA PEPTIDES, AND IN FABRICATION OF DRUG FOR PREVENTING OR TREATING AMYLOID BETA PEPTIDE-ASSOCIATED DISEASES OR CONDITIONS

二、中文發明摘要：

異類葉升麻苷或其醫藥學上可接受之鹽被作為一種澱粉樣 β 肽生成、累積或聚集的抑制劑，以預防或治療與澱粉樣 β 肽相關性疾病或狀況。

三、英文發明摘要：

Isoacteoside or a pharmaceutically acceptable salt thereof is used in preventing or treating amyloid beta peptide-associated diseases or conditions as an agent for inhibiting formation, accumulation or aggregation of amyloid β peptides.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：圖 5。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

Vehicle 對照組

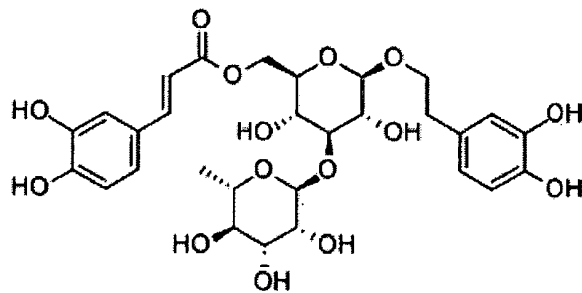
A 含苯乙醇苷的製劑

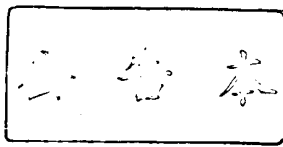
B 松果菊苷

C 類葉升麻苷

D 異類葉升麻苷

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：





七、申請專利範圍：

103. 2. 5

1. 一種以異類葉升麻苷或其醫藥學上可接受之鹽用於製備治療與一澱粉樣 β 肽相關之一疾病或狀況的藥物之用途，其中該藥物抑制該澱粉樣 β 肽的生成、累積或聚集，該疾病或狀況為阿滋海默氏症、輕度認知障礙、路易氏體失智症、唐氏症、荷蘭型類澱粉變性症、關島帕金森氏症-失智症複合症、大腦澱粉樣血管病、包涵體肌炎、額顳葉型失智症、年齡相關性黃斑變性或皮克病。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之用途，其中該藥物抑制該澱粉樣 β 肽細胞外的生成、累積或聚集有關。
3. 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之用途，其中該澱粉樣 β 肽為 $A\beta 1-40$ 或 $A\beta 1-42$ 。
4. 如申請專利範圍第 1 項所述之用途，其中上述藥物係用於治療阿滋海默氏症。
5. 如申請專利範圍第 1 項所述之用途，其中上述藥物對人類的一有效劑量係相當於每日每公斤體重 0.2 毫克至 4.0 毫克的異類葉升麻苷或其醫藥學上可接受之鹽。