



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201402119 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 01 月 16 日

(21)申請案號：102112006 (22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 04 月 03 日
(51)Int. Cl. : A61K31/4725 (2006.01) C07D401/12 (2006.01)
A61P25/28 (2006.01)
(30)優先權：2012/04/06 歐洲專利局 12305415.7
2013/03/15 美國 61/792,635
(71)申請人：賽諾菲公司 (法國) SANOFI (FR)
法國
(72)發明人：巴納德 帕斯寇 BARNEOUD, PASCAL (FR)；布藍查德 凡羅尼克 BLANCHARD,
VERONIQUE (FR)；狄雷高耶特 飛利浦 DELAY-GOYET, PHILIPPE (FR)；羅培
茲 瑪賽爾德 LOPEZ GRANCHA, MATHILDE (FR)；馬瑞 凡羅尼克 MARY,
VERONIQUE (FR)；曼那格 尚 MENAGER, JEAN (FR)；魯尼 湯瑪士 ROONEY,
THOMAS (GB)；舒斯勒 娜泰萊 SCHUSSLER, NATHALIE (FR)
(74)代理人：林秋琴；陳彥希；何愛文
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：19 項 圖式數：4 共 38 頁

(54)名稱

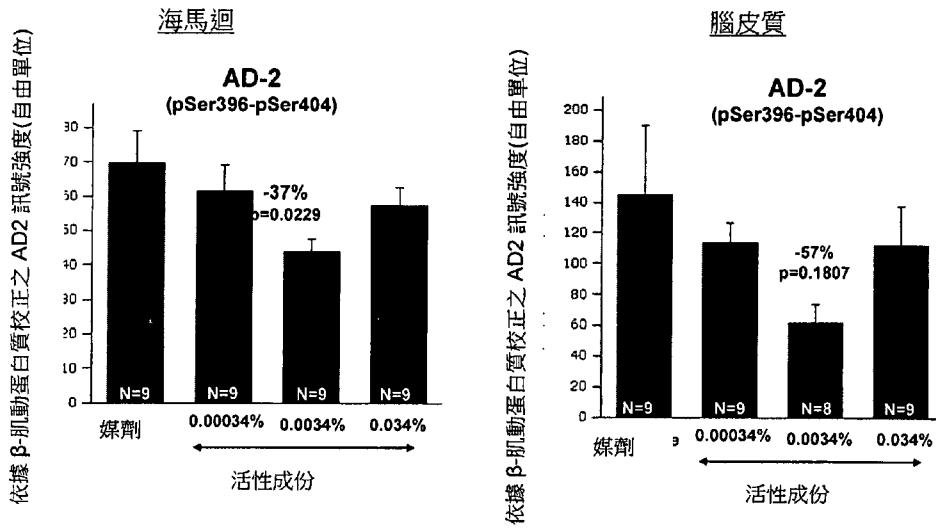
用於治療阿茲海默症之H3受體拮抗劑

AN H3 RECEPTOR ANTAGONIST FOR USE IN THE TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE

(57)摘要

本發明係有關一種在阿茲海默症、其他 tau 蛋白質病變及相關神經退化性疾病之疾病改善療法中使用 2-(環己基甲基)-N-{2-[(2S)-1-甲基吡咯啶-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺之方法。

圖 1



平均值 \pm SEM

非參數統計分析法(與媒劑比較之 Kruskal-Wallis 雙尾試驗法)。



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201402119 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 01 月 16 日

(21)申請案號：102112006 (22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 04 月 03 日
(51)Int. Cl. : *A61K31/4725 (2006.01)* *C07D401/12 (2006.01)*
A61P25/28 (2006.01)
(30)優先權：2012/04/06 歐洲專利局 12305415.7
2013/03/15 美國 61/792,635
(71)申請人：賽諾菲公司 (法國) SANOFI (FR)
法國
(72)發明人：巴納德 帕斯寇 BARNEOUD, PASCAL (FR)；布藍查德 凡羅尼克 BLANCHARD,
VERONIQUE (FR)；狄雷高耶特 飛利浦 DELAY-GOYET, PHILIPPE (FR)；羅培
茲 瑪賽爾德 LOPEZ GRANCHA, MATHILDE (FR)；馬瑞 凡羅尼克 MARY,
VERONIQUE (FR)；曼那格 尚 MENAGER, JEAN (FR)；魯尼 湯瑪士 ROONEY,
THOMAS (GB)；舒斯勒 娜泰萊 SCHUSSLER, NATHALIE (FR)
(74)代理人：林秋琴；陳彥希；何愛文
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：19 項 圖式數：4 共 38 頁

(54)名稱

用於治療阿茲海默症之H₃受體拮抗劑

AN H3 RECEPTOR ANTAGONIST FOR USE IN THE TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE

(57)摘要

本發明係有關一種在阿茲海默症、其他 tau 蛋白質病變及相關神經退化性疾病之疾病改善療法中使用 2-(環己基甲基)-N-{2-[(2S)-1-甲基吡咯啶-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺之方法。

發明摘要

※ 申請案號：102112006

A61K31/4725 (2006.01)

※ 申請日：1020603

※IPC 分類：C07D401/12 (2006.01)

A61P25/28 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

用於治療阿茲海默症之 H3 受體拮抗劑

AN H3 RECEPTOR ANTAGONIST FOR USE IN THE

TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE

【中文】

本發明係有關一種在阿茲海默症、其他 tau 蛋白質病變及相關神經退化性疾病之疾病改善療法中使用 2-(環己基甲基)-N-{2-[(2S)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺之方法。

【英文】

This disclosure relates to methods of using 2-(cyclohexylmethyl)-N-{2-[(2S)-1-methylpyrrolidin-2-yl]ethyl}-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-7-sulfonamide in a disease modifying therapy of Alzheimer's disease, other tauopathies and related neurodegenerative diseases.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

用於治療阿茲海默症之 H3 受體拮抗劑

AN H3 RECEPTOR ANTAGONIST FOR USE IN THE
TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE

【技術領域】

【0001】 本發明係有關一種化合物 2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺，其用於阿茲海默症(AD)、其他 tau 蛋白質病變(tauopathies)及相關神經退化性疾病之疾病改善療法中。

【先前技術】

【0002】 tau 蛋白質病變為一種特徵在於腦部 tau (τ)蛋白質堆積之神經退化性疾病。AD 為最普遍之 tau 蛋白質病變且為最常見之失智症型態。其他 tau 蛋白質病變及相關神經退化性疾病包括皮克氏症(Pick's disease)、進行性核上神經麻痺症、大腦皮質基底核退化症、遺傳性額顳葉失智症及與染色體 17 相關之巴金森氏症(FTDP-17)。

【0003】 失智症為一種嚴重影響人體執行正常日常活動能力之腦部病變。AD 涉及一部份控制思想、記憶及語言之腦部。儘管全世界已有深入研究，但除了有極少數有關家族性 AD 基因突變之病例報告以外，AD 之肇因仍未知，且仍然無法治癒。

【0004】 目前已可針對 AD 之認知力症狀取得數種治療法。目前美國用於治療 AD 之 5 種藥物中，有 4 種為乙醯膽鹼酯酶之抑制劑。另一種藥物則為美金剛(memantine)，係一種 NMDA 受體拮抗劑，

可用於治療中度至重度 AD。目前用於治療 AD 之認知力症狀之藥物 (包括美金剛及乙醯膽鹼酯酶抑制劑) 之效果有限，而且未顯現有效減緩或阻止該疾病進展之效力。仍舊需要發展可以阻止 AD 之病理性發展之療法，因為 AD 中導致神經退化之病理生理過程遠在出現臨床症候以前就已經開始。因此，極需要可以減緩或阻止 AD 及其他 tau 蛋白質病變與神經退化性疾病之病理發展之藥物。

【0005】 已在中樞及周邊神經系統中發現組織胺 H3 受體。投與組織胺 H3 受體配體會影響腦部及周邊之神經遞質分泌，且已視為可用於治療認知力病變，包括 AD 及其他失智症。Brioni 等人注意到 H3 拮抗劑可能用於 AD 之疾病改善療法 (*The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Vol. 336, No. 1, 38-46 (2011))。

【0006】 本發明係基於臨床前試驗之新發現，在轉殖基因動物模式中，使用符合人類族群所採用劑量投與 2-(環己基甲基)-N-{2-[(2S)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺治療時，可以減緩 tau 蛋白質病變之發展。

【發明內容】

【0007】 本發明係有關一種減緩或阻止 AD 及其他 tau 蛋白質病變與相關之神經退化性疾病之進展之方法，其包括對有此需要之患者投與 2-(環己基甲基)-N-{2-[(2S)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺或其醫藥上可接受之鹽類。

【0008】 本發明另一態樣係以 2-(環己基甲基)-N-{2-[(2S)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺或其醫藥上可接受之鹽類於減緩或阻止 AD 及其他 tau 蛋白質病變與相關之神經退化

性疾病之疾病進展上之用途。

【0009】 本發明另一態樣係化合物 2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺或其醫藥上可接受之鹽類，其係用於減緩或阻止 AD 及其他 tau 蛋白質病變與相關之神經退化性疾病之疾病進展。

定義及縮寫

【0010】 如上述及本發明說明全文中，除非另有說明，否則咸了解下列縮寫與代號均如下定義：

AD	阿茲海默症
ADAS	阿茲海默症評量表
BSA	牛血清白蛋白
CSF	腦脊髓液
DSM-IV	心智異常之診斷及統計分析手冊(Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders)(第 4 版)
MIP-1 α	巨噬細胞發炎蛋白質 1- α
MRI	磁共振攝影
NFT	神經纖維纏結
PHF	配對螺旋纖維絲
PBS	磷酸鹽緩衝生理食鹽水
ROI	感興趣區域
Tg	轉殖基因
WT	野生型
Veh	媒劑

【0011】 如上述及本發明說明全文中，除非另有說明，否則咸了解下列術語均如下定義：

【0012】 本文所採用“活性成份”係指 2-(環己基甲基)-N-{2-[(2S)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺或其醫藥上可接受之鹽類、水合物或溶劑合物、或該醫藥上可接受之鹽類之溶劑合物或水合物。

【0013】 “對潛伏疾病之影響”係指改善與疾病過程有關之生物標記及其他參數之測定值，包括 CSF 或血漿之生化標記、腦部(或部份腦部)體積之變化、腦功能之變化(由功能性影像測定)、組織病理學或生化學變化、及認知力或失能性變化。可用於 AD 臨床試驗及治療之典型生物標記包括在 CSF 中測定之分析物，如：tau 蛋白質、磷酸化 Tau 蛋白質及 β -澱粉樣蛋白。

【0014】 本文所採用“需要治療之患者”或“罹患 tau 蛋白質病變或相關之神經退化性疾病之患者”包括 1)已經診斷罹患處於任何臨床階段之 tau 蛋白質病變(例如：AD)或相關之神經退化性疾病之患者，包括罹患輕度認知力損傷至重度失智症之患者；及/或 2)出現 tau 蛋白質病變(例如：AD)或相關之神經退化性疾病之早期或前驅症狀及徵兆之患者；及/或 3)已經基於年齡、遺傳、可測定之生物標記、或其他因素診斷容易罹患 tau 蛋白質病變(例如：AD)或相關之神經退化性疾病，而經醫學建議接受治療過程以延緩疾病之症狀或徵兆發作或演進或加重或惡化之患者。

【0015】 “患者”或“個體”包括任何哺乳動物。基於治療之目的，“哺乳動物”係指任何歸屬於哺乳動物之動物，包括(但不限於)：人類、家畜及農場動物、及動物園動物、運動比賽動物或寵物動物，如：

狗、馬、貓、牛，等等。哺乳動物為人類較佳。

【0016】 本文所採用罹患“臨床前(preclinical)阿茲海默症”患者係指彼等基於可檢測之阿茲海默症生物標記或檢測微細認知力缺陷證據診斷但尚無功能性損傷之患者。

【0017】 本文所採用“因阿茲海默症造成輕度認知力損傷”之患者係指其出現認知力缺陷，但其損傷尚不足以造成失智症之患者。

【0018】 本文所採用罹患“輕度至中度阿茲海默症”之患者係指基於阿茲海默型 DSM-IV 失智症標準及可能為 AD 之 NINCDS/ADRDA 標準 (Dementia of Alzheimer Type DSM-IV criteria and NINCDS/ADRDA criteria for Probable AD)(國家神經與溝通病變及中風研究/AD 及相關病變學會(National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke/AD and Related Disorders Association))，採用簡易智能狀態測驗 (MiniMentalState Examination)(MMSE)得分 ≥ 10 及 ≤ 25 及認知力藥物研究總體得分 (Cognitive Drug Research global score) = 0.5、1、或 2 所診斷之患者。

【0019】 本文所採用罹患“中度至重度阿茲海默症”係指基於阿茲海默型 DSM-IV 失智症標準及可能為 AD 之 NINCDS/ADRDA 標準 (國家神經與溝通病變及中風研究/AD 及相關病變學會(National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke/AD and Related Disorders Association))，採用簡易智能狀態測驗(MMSE)得分低於 19 及認知力藥物研究總體得分 = 2 或 3 所診斷之患者。

【0020】 本文所採用片語“相關之神經退化性疾病”包括(但不限於)：唐氏症候群(Down's syndrome)、肌強直營養不良及尼曼-皮克(Niemann Pick) C 型疾病。

【0021】 本文所採用術語"tau 蛋白質病變"係與 tau 蛋白質病理學有關之任一種神經退化性疾病。AD 及某些型態之額顳葉失智症(皮克症(Pick's disease)、偶發性額顳葉失智症及因第十七對染色體異常導致的額顳葉型失智症伴隨巴金森症)為最常見之 tau 蛋白質病變型式。其他 tau 蛋白質病變包括(但不限於): 進行性核上神經麻痺症、拳擊員失智症(慢性創傷腦部病變)、萊克-巴迪症(Lytico-Bodig disease)(關島的複合型巴金森失智症)、纏結主導型失智症、嗜銀顆粒症、神經節膠質細胞瘤及神經節細胞瘤、腦膜血管瘤、亞急性硬化性白質腦炎、鉛腦部病變、硬化性結節症、哈-斯二氏症(Hallervorden-Spatz disease)及脂褐質儲積症。

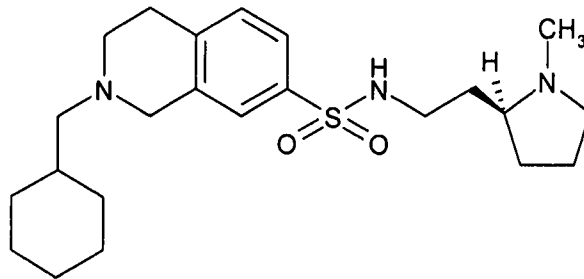
【0022】 本文所採用術語"處理"、"治療", 等等係指得到所需之醫藥與生理效力。該效力可為預防或部份預防疾病、其症狀或病症之預防法, 及/或可為部份或完全治癒疾病、因疾病造成之症狀或不良反應之治療法。本文所採用術語"治療"涵蓋哺乳動物, 特定言之人類疾病之任何治療, 且包括: (a)針對有罹患疾病傾向但尚未診斷出疾病之個體預防疾病發生, 亦即不讓該有罹患疾病傾向但尚未經歷或出現疾病症狀之個體發展出疾病之臨床症狀; (b)抑制疾病, 亦即壓制或降低疾病或其臨床症狀之發展; 或(c)緩解疾病, 亦即逆轉疾病及/或其症狀或病症。

【0023】 本文所採用語法“用於...之 2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺”應了解係等同術語“以 2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺用於...之用途”或“2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯

胺用於製備供...的醫藥上之用途”。

【0024】 基於本發明之目的，所提及之 2-(環己基甲基)-N-{2-[(2S)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺包括其醫藥上可接受之鹽類、水合物與溶劑合物，及該醫藥上可接受之鹽類之溶劑合物與水合物。在一態樣中，該 2-(環己基甲基)-N-{2-[(2S)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺為 2-(環己基甲基)-N-{2-[(2S)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺二富馬酸鹽單水合物。

【0025】 2-(環己基甲基)-N-{2-[(2S)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺，其如下式(I)之結構：



(I) ,

係一種強力之專一性非咪唑類之組織胺 3(H₃)受體拮抗劑。2-(環己基甲基)-N-{2-[(2S)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺之製法及物理性質與有利醫藥效應已說明於例如：

WO2005/118547 (亦為 US2007/0105834)。2-(環己基甲基)-N-{2-[(2S)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺二富馬酸鹽單水合物鹽說明於 WO2010/151611。

【0026】 Tau 蛋白質為一種表現在神經元之微管結合之蛋白質。Tau 蛋白質過度磷酸化、神經纖維纏結(NFT)之形成及神經發炎均為

AD 及其他 tau 蛋白質病變(例如：皮克氏症、進行性核上神經麻痺症、大腦皮質基底核退化症、遺傳性額顳葉失智症及與染料體 17 相關之巴金森氏症(FTDP-17))之腦部病理標記，其會隨著疾病過程累積或進展。

【0027】 發炎亦為 AD 之特徵。已在 AD 患者之腦部中發現 T 細胞增加。AD 患者之周邊 T 細胞過度表現巨噬細胞炎性蛋白質 1- α (MIP-1 α)，其會與腦部內皮細胞上之趨化素受體 CCR5 結合，且 MIP-1 α -CCR5 交互作用促進 T 細胞通過內皮細胞緊密連接壁移入腦部。CCR5 之向上調節亦會影響老年斑中微膠細胞之募集及累積。

【0028】 已發展一種 THY-Tau22 轉殖基因小鼠模式來探討 tau 蛋白質在 AD 及其他 tau 蛋白質病變中之角色。(參見 Schindowski 等人之 *The American Journal of Pathology*, Vol. 169, No. 2, pp. 599-616 (2006))。THY-Tau22 小鼠顯示 tau 蛋白質之過度磷酸化及類似神經纖維纏結之包涵體(蓋利染色陽性反應)。此等小鼠亦在 6 個月大時出現記憶缺陷。THY-Tau22 在數個 AD-相關之 tau 蛋白質抗原決定基：AT8、AT100、AT180、AT270、12E8、tau-pSer396、及 AP422 上顯示 tau 蛋白質過度磷酸化。

【0029】 本案申請人現已發現，在 THY-Tau22 轉殖基因小鼠模式中，在臨床相關劑量下，使用 2-(環己基甲基)-N-{2-[(2S)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺二富馬酸鹽單水合物治療 6 個月，可降低 tau 蛋白質之過度磷酸化，降低神經纖維纏結(NFT)數量，降低神經發炎、及降低認知力缺陷，其等係 AD 及其他 tau 蛋白質病變與相關之神經退化性疾病之病理標記。

【0030】 2-(環己基甲基)-N-{2-[(2S)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙

基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺二富馬酸鹽單水合物對此等 AD 及 tau 蛋白質病變之數種病理標記之長效性顯示 2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺可用作此等疾病之疾病改善劑。

【0031】 由海馬迴之 AD-2 抗原決定基之西方墨點分析所測定，短期投與(2-週，實例 2)2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺二富馬酸鹽單水合物對 tau 蛋白質磷酸化缺乏效應之結果與 Bitner 等人(*Neuropharmacology*, 60 (2011) pp. 460-466)在 TAPP (tau x APP (β -澱粉樣蛋白前體蛋白質))轉殖基因小鼠之脊柱與海馬迴中，使用不同 H3 受體拮抗劑(ABT-239)處理 2 週之組織病理學試驗中，對 tau 蛋白質過度磷酸化之效應結果相反。此令人意外的結果顯示，2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺之作用機轉不同於使用 ABT-239 時所觀察及由 Bitner (如上述文獻)所提出之效應。

【0032】 最具體且直接證實治療 AD 之改善疾病效果之方法為改善疾病之重要病理特徵。由於病理證據本身僅可從屍體解剖或腦活組織檢體取得，因此臨床環境中需要較間接取得此等證據之方法。證明 AD 藥物之改善疾病效力(亦即對潛伏疾病之影響)之方法包括使用臨床設計(例如：隨機退出試驗設計、隨機開始試驗設計)、生化標記物(例如： β -澱粉樣蛋白肽、tau 蛋白質)、腦部攝影測量值(例如：體素磁共振攝影、磁共振光譜、正子放射斷層掃描攝影、單光子斷層掃描攝影)及認知力與失能測量值。

【0033】 本發明之一項態樣係一種為罹患 tau 蛋白質病變或相關之神經退化性疾病之患者中抑制異常 tau 蛋白質過度磷酸化或凝集

之方法，其包括對該患者投與有效量之 2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺或其醫藥上可接受之鹽類。

【0034】 本發明之另一項態樣係一種化合物 2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺或其醫藥上可接受之鹽類，其用於預防或延緩患者中 tau 蛋白質病變或相關之神經退化性疾病之疾病進展。

【0035】 本發明之另一項態樣係一種化合物 2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺或其一種醫藥上可接受之鹽類，其用於為罹患 tau 蛋白質病變或相關之神經退化性疾病之患者中抑制異常 tau 蛋白質之過度磷酸化或凝集。

【0036】 本發明之另一項態樣係一種預防或延緩患者之 tau 蛋白質病變或相關之神經退化性疾病之進展之方法，其包括為該患者投與 2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺或其醫藥上可接受之鹽類，以便延緩或預防該 tau 蛋白質病變或神經退化性疾病之進展。

【0037】 本發明之另一項態樣係一種為罹患 tau 蛋白質病變或相關之神經退化性疾病之患者中降低磷酸化 tau 蛋白質含量之方法，其包括對該患者投與 2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺或其醫藥上可接受之鹽類。

【0038】 本發明之另一項態樣係一種化合物 2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺或其一種醫藥上可接受之鹽類，其用於為罹患 tau 蛋白質病變或相關之神經退化性疾病之患者中降低磷酸化 tau 蛋白質含量。

【0039】 本發明之另一項態樣係一種為罹患 tau 蛋白質病變或相關之神經退化性疾病之患者中抑制神經纖維纏結形成之方法，其包括對該患者投與 2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺或其醫藥上可接受之鹽類，以便抑制神經纖維纏結形成。

【0040】 本發明之另一項態樣係一種化合物 2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺或其一種醫藥上可接受之鹽類，其用於為罹患 tau 蛋白質病變或相關之神經退化性疾病之患者中抑制神經纖維纏結形成。

【0041】 本發明之另一項態樣係一種治療罹患 tau 蛋白質病變或相關之神經退化性疾病之患者之方法，其係對該患者投與有效抑制該患者神經元細胞中神經纖維纏結含量與/或擴散之用量之 2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺或其醫藥上可接受之鹽類。

【0042】 本發明之另一項態樣係一種化合物 2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺或其一種醫藥上可接受之鹽類，其用於為罹患 tau 蛋白質病變或相關之神經退化性疾病之患者抑制神經元細胞中神經纖維纏結之含量與/或擴散。

【0043】 在一項特別態樣中，係降低患者腦脊髓液中磷酸化 tau 蛋白質及 tau 蛋白質之含量。

【0044】 本發明另一項態樣係一種治療罹患 tau 蛋白質病變或相關之神經退化性疾病之患者之方法，其包括對該患者投與有效降低 tau 蛋白質磷酸化之用量之 2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉

-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺或其一種醫藥上可接受之鹽類。本發明特定態樣中，該 tau 蛋白質病變為阿茲海默症。另一項特定態樣中，該治療法延緩該患者從某一階段之阿茲海默症轉變成更重度階段之阿茲海默症。

【0045】 本發明之另一項態樣係一種改善患者之 tau 蛋白質病變或相關之神經退化性疾病之方法，其包括對該患者投與醫療上有效減緩或阻止細胞骨架功能障礙或其他與 tau 蛋白質相關之功能混亂之用量之 2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺或其一種醫藥上可接受之鹽類。

【0046】 本發明之另一項態樣係一種為罹患 tau 蛋白質病變或相關之神經退化性疾病之患者干擾 tau 蛋白質之凝集或使其溶解之方法，其包括對該患者投與醫療有效量之 2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺或其醫藥上可接受之鹽類。

【0047】 本發明之另一項態樣係一種化合物 2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺或其一種醫藥上可接受之鹽類，其用於為罹患 tau 蛋白質病變或相關之神經退化性疾病之患者干擾 tau 蛋白質之凝集或使其溶解。

【0048】 本發明之另一項態樣係一種治療 tau 蛋白質病變或相關之神經退化性疾病之方法，其包括對該患者投與 2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺或其醫藥上可接受之鹽類，其中該 2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺或其醫藥上可接受之鹽類可在醫療上有效影響該潛伏疾病。

【0049】 本發明之另一項態樣係一種在神經元、膠質細胞或路易體中抑制或降低 tau 蛋白質磷酸化之方法，其包括讓神經元、膠質細胞或路易體曝露到有效量之 2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺或其醫藥上可接受之鹽類。一項特別態樣中，該 tau 蛋白質為微管結合之 tau 蛋白質。另一項特別態樣中，該 tau 蛋白質為於神經纖維纏結中。另一項態樣中，係抑制或預防 tau 蛋白質之過度磷酸化。

【0050】 本發明另一項態樣係一種降低細胞中 tau 蛋白質含量及 tau 蛋白質之磷酸化之方法，其包括由細胞曝露到有效量之 2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺或其醫藥上可接受之鹽類。一項特別態樣中，該 tau 蛋白質係異常磷酸化。另一項特別態樣中，該異常磷酸化 tau 蛋白質係過度磷酸化。

【0051】 本發明有些具體實施例中，該 tau 蛋白質病變為阿茲海默症。

【0052】 本發明其他具體實施例中，該 tau 蛋白質病變為輕度至中度阿茲海默症。

【0053】 本發明其他具體實施例中，該 tau 蛋白質病變為中度至重度阿茲海默症。

【0054】 本發明其他具體實施例中，該 tau 蛋白質病變為臨床前阿茲海默症。

【0055】 本發明其他具體實施例中，該 tau 蛋白質病變為阿茲海默症造成之輕度認知力損傷。

【0056】 本發明有些具體實施例中，係在長時間期內每天至少一

次投與 2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺或其醫藥上可接受之鹽類。

【0057】 一項態樣中，AD 之治療法進一步包括治療 AD 之一或多種症狀。例如：AD 之治療法包括治療選自下列各物所組成群中之一或多種症狀：記憶障礙、動作障礙、注意力障礙、混亂、易怒及具攻擊性、情緒波動、言語不連續、長期記憶喪失、患者退縮、喪失運動控制力。

【0058】 另一項態樣中，AD 之治療法進一步包括選自下列所組成群中之一或多種因數：認知力維持或降低(其可藉由 ADAS-認知力簡式量表測定)；日常活動力維持或降低(其可藉由 ADCS-ADL 簡式量表測定)；簡易智能狀態測驗(Mini Mental State Examination) (MMSE)總得分維持或降低；來自認知力藥物研究系統(CDR-S)電腦分析之 5 個因數維持或降低；神經精神病徵量表(the Neuropsychiatric Inventory)(NPI)得分維持或降低；NPI 情緒淡漠得分及情緒淡漠評量表-知情者(Apathy Evaluation Scale - Informant)(AES-I)得分維持或降低。

【0059】 本發明有些態樣中，投與活性成份可以延緩患者從某一階段之 AD 轉移成更重度階段之 AD。例如：本發明一項具體實施例包括延緩 AD 患者之臨床失智量表從 1 變化至 2。另一項具體實施例包括延緩患者從輕度至中度 AD 轉變成中度至重度 AD。另一項具體實施例包括延緩從潛伏期 AD 轉變成因阿茲海默症造成之輕度認知力損傷。另一項具體實施例包括延緩從因阿茲海默症造成之輕度認知力損傷轉變成輕度至中度 AD。

【0060】 投藥方式包括(但不限於)：經口、非經腸式(例如：經皮

下、硬膜下、靜脈內、肌內、鞘內、腹膜內、顱內、動脈內或病灶內投藥途徑)、表面、局部(例如：手術應用或手術栓劑)、經直腸及肺部(例如：氣霧劑、吸入劑或粉劑)。投藥途徑可依據所投與之組成物、目標組織，等等而定，且係熟悉此相關技術者習知者。投藥途徑可依任何方式變化，依藥物之物理性質及患者與照護者之方便性決定。

【0061】 本發明活性成份通常呈醫藥組成物型式投藥。該醫藥組成物包含活性成份與一或多種醫藥上可接受之載劑或賦形劑組合。

【0062】 所利用之賦形劑通常為適合投與人類個體或其他哺乳動物者。醫藥上可接受之賦形劑包括至少一種選自醫藥上可接受之載劑、稀釋劑、包衣劑、輔劑、賦形劑或媒劑所組成群中之組份，如：防腐劑、填料、崩解劑、濕化劑、乳化劑、安定劑、懸浮劑、等滲劑、甜味劑、調味劑、香料、著色劑、抗細菌劑、抗真菌劑、其他醫療劑、潤滑劑、吸附劑或促進劑，及分散劑，依投藥模式及劑量型式而定。

【0063】 醫藥組成物可採用熟悉此相關技術者習知之技術製備。

【0064】 本發明一項態樣中，該醫藥組成物包含醫療有效量之活性成份。本文所採用術語"醫療有效量"係指所投與醫藥組成物中活性成份足以誘發所需醫藥或醫療效力時之含量。決定有效量或劑量時，可由參與之醫師考量數個因素，包括(但不限於)：哺乳動物品種、其體型、年齡與性別及一般身體健康狀態；所涉及之特定疾病；所涉及之程度或疾病嚴重性；個別患者之反應；投藥模式；所投與製劑之生體可用性特性；所選用劑量療程；所併用藥物；及其他相關環境條件。

【0065】 一項態樣中，本發明方法包括每天投與患者約 0.25 至約 10 mg 之 2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺，或每天約 0.25 至約 10 mg (以鹼型計) 之 2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺之醫藥上可接受之鹽。在特定具體實施例中，本發明方法包括每天投與患者約 0.5 mg 至約 5 mg (例如：約 0.5、約 1 mg、約 1.5 mg、約 2 mg、約 2.5 mg、約 3 mg、約 3.5 mg、約 4 mg、約 4.5 mg、或約 5 mg)(以鹼型計)之 2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺，或其醫藥上可接受之鹽。另一項具體實施例中，本發明方法包括每天投與患者約 0.25 mg 至約 2.5 mg (以鹼型計)之 2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺或其醫藥上可接受之鹽。

【0066】 本發明之另一項態樣係以 2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺或其醫藥上可接受之鹽類於減緩或阻止 AD 及其他 tau 蛋白質病變與相關之神經退化性疾病之疾病進展之上用途。上述所有態樣、具體實施例及特徵亦適用於該用途。

【0067】 下列實例說明對轉殖基因小鼠 THY-Tau22 投與 2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺二富馬酸鹽單水合物時之效力：

- 由西方墨點分析法分析 AD-2 (pSer396-pSer404) 抗原決定基上之 tau 蛋白質過度磷酸化；

- 由免疫組織化學法分析腦皮質、海馬迴、及杏仁核中 AT-8 (pSer199-202/Thr205)抗原決定基之 tau 蛋白質過度磷酸化；
- 由蓋利染色法(Gallyas staining)分析腦皮質、海馬迴及杏仁核中 NFT 之形成；及
- 由定量性實時聚合酶鏈反應(QPCR)分析海馬迴中之神經發炎(MIP α 之 mRNA 表現)。

【圖式簡單說明】

【0068】 圖 1 說明 THY-Tau22 小鼠經過 6 個月之活性成份治療後，在海馬迴(左圖)及腦皮質(右圖)中 AD2 抗原決定基(pSer396-pSer404)上 tau 蛋白質-磷酸化之西方墨點分析結果。

【0069】 圖 2 說明 THY-Tau22 小鼠接受 6 個月活性成份治療後，其在腦皮質中對抗異常 tau 蛋白質-過度磷酸化(AT8 IHC)之保護活性。

【0070】 圖 3 說明 THY-Tau22 小鼠經過 6 個月活性成份治療後，其在腦皮質、CA1 海馬迴部份區域、及杏仁核中對抗 NFT 形成(蓋利染色法(Gallyas staining))之保護活性。

【0071】 圖 4 說明 THY-Tau22 小鼠經過 6 個月活性成份治療後，其海馬迴中對抗 MIP-1 α 基因過度表現之保護活性。

【實施方式】

實例 1

【0072】 對 THY-Tau22 小鼠(每個處理組 9 隻小鼠)投與一劑 2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-

磺醯胺二富馬酸鹽單水合物(3及10 mg/kg之口服液(含於甲基纖維素/Tween 80中之懸浮液))時，由西方墨點分析法顯示，對腦皮質中AD-2抗原決定基之tau蛋白質磷酸化沒有影響。

實例2

【0073】 對THY-Tau22小鼠(每個處理組9隻小鼠)投與2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺二富馬酸鹽單水合物(0.002%及0.02%含於飲水中)持續兩周時，由西方墨點分析法顯示，對海馬迴中AD-2抗原決定基之tau蛋白質磷酸化沒有影響。

【0074】 含在飲水中之0.002%及0.02%之曝露劑量強度係與實例3之試驗中所採用含在食物中之0.0034%及0.034%之曝露劑量強度相同。

實例3

【0075】 2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺二富馬酸鹽單水合物係作為食物補充劑，依下列之0.00034%、0.0034%及0.034%之劑量投與THY-Tau22及野生型小鼠6個月：

Tg Veh (n=17)

Tg 活性成份 - 0.034 % (n=17)

Tg 活性成份 - 0.0034 % (n=17)

Tg 活性成份 - 0.00034 % (n=17)

WT Veh (n=17)

WT 活性成份 - 0.034 % (n=17)

WT 活性成份 - 0.0034 % (n=17)

WT 活性成份 - 0.00034 % (n=17)

接受活性成份處理之WT組並未用於生化學及組織學試驗。

【0076】 與接受媒劑(亦即無補充劑之食物)處理之THY-Tau22小鼠比較時，觀察到下列效應：

- 在0.0034%劑量下，海馬迴中AD-2抗原決定基上之tau蛋白質磷酸化在統計上顯著下降(圖1)；
- 在0.0034%及0.034%劑量下，腦皮質中AT-8抗原決定基上tau蛋白質磷酸化在統計上顯著下降(n = 9)(圖2)；
- 在0.0034%及0.034%劑量下之腦皮質、CA1海馬迴部份區域及0.034%劑量下之杏仁核之NFT形成量在統計上顯著下降(n=9) (圖3)；
- 在0.00034%及0.0034%劑量下，海馬迴中之MIP-1 α 基因表現在統計上顯著下降(圖4)。

【0077】 使用2-(環己基甲基)-N-{2-[(2S)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺二富馬酸鹽單水合物處理THY-Tau22轉殖基因小鼠6個月後，觀察到腦皮質中病理性神經元[亦即由蓋利銀沉積法證實之神經纖維纏結(NFT)]之數量顯著減少(0.0034%下之-48%及0.034%下之-41%)。CA1海馬迴部份區域中亦觀察到纖維纏結數量顯著減少(0.0034%下之-25%及0.034%下之-22%)。在杏仁核中，NFT在最高劑量(0.034%)下顯著減少(-31%)，但在0.0034%劑量下則沒有觀察到統計上顯著減少(-19%)。在最低劑量(0.00034%)下，所有分析之腦ROI中，均未在病理神經元(亦即纖維纏結數量)上觀察到保護效應。

【0078】 在腦皮質中，在兩種最高劑量下，均觀察到AT8-陽性神

經元細胞數量(TAU蛋白質之異常過度磷酸化之指標)顯著減少(0.0034%下之-47%及0.034%下之-32%)。此外，在接受0.0034%劑量處理之小鼠腦皮質中，由定性分析結果觀察到神經元細胞體與纖維中AT8-免疫染色強度下降。在其他分析之ROI(亦即杏仁核及CA1與齒狀迴海馬迴兩個部份區域)中均未觀察到AT8-陽性神經元細胞顯著減少。

【0079】 由在食物中接受2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺二富馬酸鹽單水合物投藥6個月之小鼠之曝露結果與彼等接受口服投藥6個月後應該處於穩定狀態之AD患者之結果比較，發現接受0.00034%及0.0034%劑量小鼠相當於患者之安全劑量(分別為人類之約0.25及約2.5 mg劑量)。

組織病理學分析

腦組織切片

【0080】 小鼠接受斷頭處理後，取出腦部，取半腦(用於組織病理學試驗)浸入4°C之4%甲醛(Carlo Erba/code 415691)中進行後固定7天。另一半腦則用於測定生化定量值。

【0081】 取經過後固定之半腦於磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS, P 3813 - 10PAK, Sigma)中培養，移至4°C之20%蔗糖溶液(代碼 27480.294 - Prolabo)中48小時，以確保組織在後續冷凍過程中良好地低溫保存。冷凍時，取半腦浸入使用乾冰冷卻至-25°C與-30°C之間之異戊烷溶液(參考編號24872-323 - Prolabo)中1分鐘，然後存放在-25°C下。

【0082】 使用低溫恆溫器切割整個半腦(Microm, HM560)。在加裝顯微鏡載玻片之Superfrost(VWR)上收集連續之矢狀腦組織切片，然

後存放在 -20°C (切片厚度 $20\ \mu\text{m}$)，或置入含有PBS-疊氮化鈉 0.1% (S-2002, Sigma)之孔中，以避免任何污染，並存放在 4°C 下(切片厚度 $30\ \mu\text{m}$)。

蓋利銀染色法

【0083】 NFT為AD中tau蛋白質病理學之主要鑑定神經病理特徵。其包括成束之配對螺旋纖維絲及直纖維絲，其主要成份為過度磷酸化微管結合tau蛋白質。通常採用蓋利染色法來染色神經纖維纏結病理學(Sun A.等人之*J. Histochem Cytochem*, 2002, 50, 4, pp. 463-472)。

【0084】 每隻小鼠使用連續 $20\ \mu\text{m}$ 半腦切片(直接架在載玻片上)進行蓋利染色法(Braak及Braak之1991, *Brain Pathology*, 1, pp. 213-216)。其詳細製程如下：

【0085】 採用下列試劑：過碘酸 (Sigma參考編號P 7875)；氫氧化鈉(Prolabo參考編號1737-1000)；碘化鉀(Merck參考編號1.05043.1000)；硝酸銀(Sigma參考編號S.8157)； 100% 乙酸(Prolabo參考編號20 104.298)；無水碳酸鈉(Merck參考編號1.06392- 0500)；硝酸銨(Prolabo參考編號21280-293)；矽鎢酸(Sigma參考編號T 2786)； 40% 甲醛(Carlo Erba參考編號415661)；硫代硫酸鈉(Sigma參考編號21724 - 500 g)。

【0086】 第一母液(No. 1)之製法為取 $50\ \text{g}$ 無水碳酸鈉溶解於 $1000\ \text{ml}$ 去離子水中。第二母液(No. II)之製法為取 $2\ \text{g}$ 硝酸銨、 $2\ \text{g}$ 硝酸銀及 $10\ \text{g}$ 矽鎢酸溶解於 $1000\ \text{ml}$ 去離子水中。第三母液(No. III)之製法為取 $2\ \text{g}$ 硝酸銨、 $2\ \text{g}$ 硝酸銀、 $10\ \text{g}$ 矽鎢酸及 $7.3\ \text{ml}$ 市售 37% 甲醛溶液商品溶解於 $1000\ \text{ml}$ 去離子水中。該等母液可穩定存放在不透明容器

中。

【0087】 本方法中以下每個步驟均在攪拌下進行。

1.前處理：將載玻片上之切片浸入 5%過碘酸水溶液中 5 分鐘，然後於去離子水中潤洗 5 分鐘 2 次。

2.銀染法：新鮮製備碘化銀溶液，取 4 g 氫氧化鈉溶解於 50 ml 蒸餾水中，添加 10 g 碘化鉀，混合，使其完全溶解。攪拌添加 3.5 ml 1%硝酸銀之水溶液。添加蒸餾水至最終體積 100 ml，激烈攪拌溶液至澄清為止。取半腦切片浸入鹼性碘化銀溶液中 1 分鐘。再以 0.5% 乙酸水溶液潤洗約 10 分鐘。

3.檢測法：新鮮製備檢測劑，取 10 份體積(50 ml)母液 I、3 份體積(15 ml)母液 II、7 份體積(35 ml)母液 III 激烈混合，直到溶液澄清為止。檢測 5 至 30 分鐘。若出現淡褐色，則表示充份檢測。在顯微鏡下觀察載玻片，檢查檢測程度。

4.於去離子水中迅速潤洗切片。

5.固定法：取切片在 1%硫代硫酸鈉中固定 5 分鐘後，於去離子水中迅速潤洗。

6.切片於加熱板上脫水。

7.加一滴封片膠(Pertex[®]封片膠)至載玻片上，輕輕覆上蓋玻片。

AT8 之免疫組織化學

【0088】 過度磷酸化微管結合 tau 蛋白質為配對螺旋纖維絲之主要成份。與磷酸化有關之抗-tau 蛋白質抗體可用來判斷來自正常腦部及 AD 腦部之 tau 蛋白質中出現磷酸化之特定胺基酸。例如：廣泛使用單株抗 AT8。該抗體可檢測磷酸化 tau 蛋白質之磷酸化絲胺

酸 202 及磷酸化蘇胺酸 205 抗原決定基(AT8 抗原決定基(M. Goedert 等人之 *Neuroscience Letters*, (1995) 189, 3, pp. 167-169))。

【0089】 在 30 μm 浮動切片上使用 AT8 抗體，並依據親和素-生物素辣根過氧化物酶方法，進行免疫組織化學法。詳細製程如下：

【0090】 採用下列試劑：0.1M PBS 緩衝劑含於 1 升 H_2O 中(2.23 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ (Prolabo 參考編號 33 616.262)，29 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$ (Prolabo 參考編號 28 028.298)，9 g NaCl (Prolabo 參考編號 27 810.295))；PBS-Triton (0.15%)緩衝劑 Triton x 100 (Sigma 參考編號 23 479-9) (PBS-T)(1 升 0.1M PBS 緩衝劑，1.5 ml Triton)；0.2M PBS 緩衝劑含於 1 升 H_2O 中(4.46 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ ，58 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$ ，18 g NaCl)；30% H_2O_2 (Sigma 參考編號 H 1009)；3,3'-二胺基聯苯胺四鹽酸鹽(Sigma 參考編號 D9015，100 mg，存放在 -20°C)；Vectastain® ABC 套組(參考編號 PK 4000, Vector)；BSA：牛血清白蛋白(Sigma 參考編號 A8022)。

【0091】 切片於 0.1 M-PBS-0.15% triton 溶液中預培養 3 x 10 分鐘後，於室溫之 0.1M-PBS-1.5%過氧化氫- 50%甲醇中培養 30 分鐘。於 0.1 M-PBS-0.15% triton 中洗滌 3 次後，再於封阻緩衝劑[亦即 BSA 於 0.01 M PBS 中稀釋成 10%] 中培養 30 分鐘。於室溫下與小鼠抗-人類 PHF-Tau 蛋白質單株抗體(純系 AT8, Thermo Science, MN1020，於 0.1M PBS - 0.05% Triton 中稀釋 1/500)培養一夜後，與二級抗體(來自山羊之抗小鼠 IgG 生物素基化全抗體，Amersham, RPN1177，於 0.1M PBS - 0.05% Triton 中稀釋 1/500)培養 1 小時 30 分鐘。最後於與過氧化物酶偶聯之親和素複合物(Vectastain ABC 套組，Vector Laboratories，於 0.1M PBS 中稀釋 1/400)中培養 30 分鐘。切片於過

氧化物酶受質溶液(含 0.003%過氧化氫、0.05%二胺基聯苯胺四鹽酸鹽之 0.1 M PBS)中短暫培養，於 NaCl 0.9% 溶液中潤洗。最後架在載玻片上，於室溫下乾燥，脫水及使用 Eukitt 覆蓋蓋玻片。

蓋利染色法及 AT8 免疫染色法之定量影像分析法

【0092】 採用影像分析系統定量 tau 蛋白質病理學之兩種標記物(亦即蓋利染色法及 AT8 免疫染色法)。採用虛擬顯微鏡(Microscopic virtual slide)技術(利用 Olympus 全玻片數位掃描系統(dotslide scanner system))在高度放大倍數(亦即 10 倍物鏡)及解析度下取得全染色之半腦切片影像。此等切片係沿著不同之感興趣區域(ROI)之內外軸，在不同位置取得。

【0093】 所有影像均在電腦化工作平台(Mercator system/Explora Nova，使用 Dotslide 軟體)上定量分析。每張影像先利用手動界定不同 ROI 之輪廓。進行蓋利染色法時，分析三個 ROI：(腦皮質、海馬迴之 CA1 部份區域、及杏仁核)。進行 AT8-免疫染色法時，分析四個 ROI：腦皮質、杏仁核、海馬迴之 CA1 與齒狀迴部份區域、及齒狀迴。

【0094】 在來自半腦(其中可在 THY-TAU22 動物死亡時之年齡(亦即 8 個月大)發現 tau 蛋白質病變)之內外軸之 8 個切片中不同 ROI 估算蓋利染色法-陽性或 AT8-陽性細胞總數。採用此參數計算指定組中蓋利染色-或 AT8-陽性細胞總數之平均值 \pm SEM。

【0095】 所有數據均利用軟體儲存，並從 Excel 試算表中選取。

MIP1 α 之 mRNA 表現-製程

【0096】 1. RNA 製法：取來自每隻小鼠之半海馬迴置入包含 50 個 1.4mm 磁珠與 0.5 ml Applied Biosystems 核酸純化溶胞液(1X)之

Precellys CK14 管中。使用均質器 Precellys24 (Bertin technology) 均勻研磨組織 2 次，每次 10 秒。使用 6100 PrepStation (Applied Biosystems)，根據製造商之指示，包括 DNase 酵素處理法(從植物與動物組織單離總 RNA 之方法(protocol Isolation of Total RNA from Plant and Animal Tissue))單離總 RNA。採用 2100 Bioanalyser(Agilent Technologies)，取 1 μ l 於 RNA LabChip (Agilent)上分析總 RNA 之品質與濃度。

2. 實時 PCR

【0097】 從每隻小鼠取 2 μ g 總 RNA 利用寡(dT)16 及隨機引子，使用高容量 cDNA Archive 套組(High-Capacity cDNA Archive Kit)(Applied Biosystems)，依據製造商之指示進行逆轉錄。最終逆轉錄反應包括之模板為 100 μ l。樣本在 25 $^{\circ}$ C 下培養 10 分鐘後，在 37 $^{\circ}$ C 下 120 分鐘，然後在 95 $^{\circ}$ C 下加熱，使酵素變性並停止反應。進行實時 PCR 時，使用來自 Qiagen 之 quantitect 引子分析法(quantitect primer assay)(QT00252266)擴增管家基因 R.L37A，及使用下列引子擴增 MIP1 α ：(5'-TGCCCTTGCTGTTCTTCTCT-3')；(5'-GTGGAATCTTCCGGCTGTAG-3')。依據製造商之指示，使用 ABI Prism 7900 序列檢測器(Applied Biosystems)進行擴增。

3. 表現結果

【0098】 進行 qPCR 時，採用方程式：每個海馬迴樣本之 $2^{(Ct(L37a)-Ct(MIP1\alpha))}$ 除以參考總腦樣本之 $2^{(Ct(L37a)-Ct(MIP1\alpha))}$ ，將閥值循環數(Ct)換算成相對量(RQ)。

腦皮質及海馬迴均質液之 tau 蛋白質磷酸化之西方墨點分析法

【0099】 進行墨點分析時，取冷凍之小鼠組織(海馬迴或腦皮質)

使用 Precellys 24 組織均質器，於已添加蛋白酶抑制劑(Sigma 混合液 1% v/v)及磷酸酶抑制劑(岡田酸(okadaic acid) 1 μ M、氟化鈉 100 mM)之 350 μ l RIPA 緩衝劑(來自 Cell Signaling)(20mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl、1 mM Na₂ EDTA、1 mM EGTA、1% NP-40、1% 去氧膽酸鈉、2.5 mM 焦磷酸鈉、1 mM β -甘油磷酸酯、1 mM Na₃VO₄、1 μ g/ml 亮抑酶肽(leupeptin))中均質化。離心後(16000 x g 4°C 下 10 分鐘)，利用 BioRad DC 蛋白質分析特套組，使用 BSA 作為標準物，測定上清液蛋白質含量。取等量蛋白質(5 μ g)加至 15 孔 4-12% Bis-Tris 凝膠(NuPAGE, Invitrogen)中，於 200V 下，在 MOPS 緩衝劑中，依據製造商指示進行電泳 50 分鐘。然後取蛋白質在 30 V 下，於包含 20%甲醇之轉印緩衝劑(Invitrogen)中 2 小時，轉印至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(Invitrogen)上。於含 5%無脂奶粉之 TBS Tween 0.1%中阻斷後，取墨點與經過含 5% BSA 之 TBS Tween 0.1%稀釋之一級抗體於 4°C 下培養一夜。使用下列小鼠抗體檢測 Tau 蛋白質：AD-2 1/20,000° (Biorad, 56484)，其辨識 Ser396 及 Ser404 上之 tau 蛋白質磷酸化。每一個墨點再使用抗 β -肌動蛋白抗體 1/5,000° (Sigma, A-5316)為探針，校正蛋白質總量。

【0100】 與一級抗體培養後，於 TBS Tween 0.1%中潤洗墨點，於室溫下，在經過含 5%無脂奶粉之 TBS Tween 0.1%中稀釋之抗小鼠 IgG 辣根過氧化物酶(HRP)-偶聯二級抗體 1/10,000°(GE healthcare, NA9310)培養 1 小時。洗滌後，使用加強發光劑(ECL advance, GE Healthcare)使墨點顯影，並利用冷光影像分析儀(luminescent image analyzer)LAS 3000 (FUJIFILM)取得影像。利用 Multigauge V3.0 軟體(FUJIFILM)定量免疫反應訊號。每個訊號均利用 β -肌動蛋白校正

(相同凝膠，同一個孔)。進行統計分析時，採用非參數試驗法(與媒介比較之 Kruskal-Wallis 雙尾試驗法)。

【0101】 活性成份在 THY-Tau22 小鼠海馬迴中對抗異常 tau 蛋白質過度磷酸化之西方墨點分析結果示於圖 1。

【0102】 在 0.0034%劑量下，顯著抑制 AD-2 抗原決定基上之 tau 蛋白質磷酸化(-37%， $p=0.0229$)，但對 AT-8 抗原決定基僅出現抑制傾向(-22%，不顯著)。亦在腦皮質中證實小幅但不顯著之效應(-57%， $p=0.1807$)。

【符號說明】

無

【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

無

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

無

【序列表】(請換頁單獨記載)

無

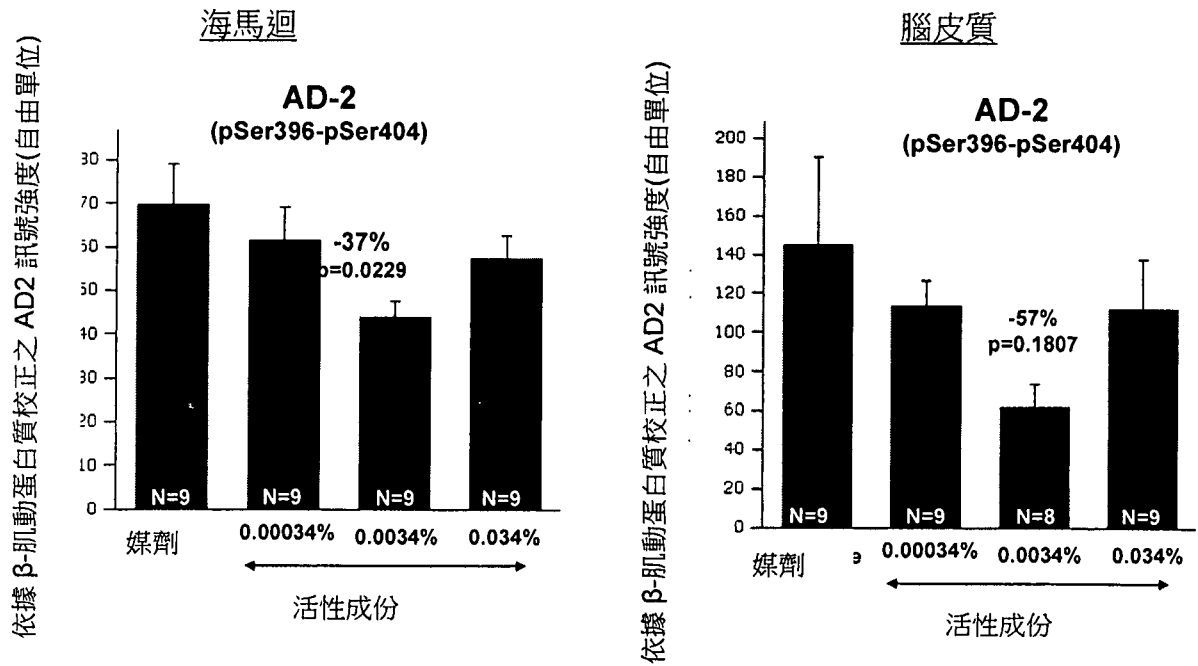
申請專利範圍

- 1.一種化合物 2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺或其醫藥上可接受之鹽類，其係用於預防或延緩患者中 tau 蛋白質病變(tauopathy)或相關之神經退化性疾病之疾病進展。
- 2.根據申請專利範圍第 1 項之化合物，其中抑制患者中異常 tau 蛋白質過度磷酸化或凝集。
- 3.根據申請專利範圍第 1 項之化合物，其中降低該罹患 tau 蛋白質病變或相關之神經退化性疾病之患者中磷酸化 tau 蛋白質之含量。
- 4.根據申請專利範圍第 1 項之化合物，其中抑制該患者中神經纖維纏結(neurofibrillary tangle)之形成。
- 5.根據申請專利範圍第 1 項之化合物，其中抑制該患者中神經元細胞之神經纖維纏結含量。
- 6.根據申請專利範圍第 1 項之化合物，其中減緩或阻止細胞骨架功能障礙或其他與 tau 蛋白質有關之功能混亂。
- 7.根據申請專利範圍第 1 項之化合物，其中降低患者之腦脊髓液中磷酸化 tau 蛋白質及 tau 蛋白質之含量。
- 8.根據申請專利範圍第 1 項之化合物，其中干擾或溶解該患者中 tau 蛋白質凝集物。
- 9.根據申請專利範圍第 1 項之化合物，其中抑制或降低該患者之神經元、膠質細胞或路易體中 tau 蛋白質之磷酸化。
- 10.根據申請專利範圍第 9 項之化合物，其中該 tau 蛋白質係微管結合之 tau 蛋白質。

- 11.根據申請專利範圍第 10 項之化合物，其中該 tau 蛋白質為於神經纖維纏結中。
- 12.根據申請專利範圍第 1 項之化合物，其中抑制或預防 tau 蛋白質之過度磷酸化。
- 13.根據申請專利範圍第 1 至 12 項中任一項之化合物，其中 tau 蛋白質病變為阿茲海默症。
- 14.根據申請專利範圍第 13 項之化合物，其中該阿茲海默症為輕度至中度阿茲海默症。
- 15.根據申請專利範圍第 13 項之化合物，其中該阿茲海默症為中度至重度阿茲海默症。
- 16.根據申請專利範圍第 13 項之化合物，其中該阿茲海默症為臨床前之阿茲海默症。
- 17.根據申請專利範圍第 13 項之化合物，其中該阿茲海默症為因阿茲海默症造成之輕度認知力損傷。
- 18.根據申請專利範圍第 1 至 17 項中任一項之化合物，其中 2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺或其醫藥上可接受之鹽在長時間期內至少一天投藥一次。
- 19.根據申請專利範圍第 1 至 18 項中任一項之化合物，其中 2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺或其醫藥上可接受之鹽係為 2-(環己基甲基)-*N*-{2-[(2*S*)-1-甲基吡咯啉-2-基]乙基}-1,2,3,4-四氫異喹啉-7-磺醯胺二富馬酸鹽單水合物。

圖式

圖 1



平均值 \pm SEM

非參數統計分析法(與媒劑比較之 Kruskal-Wallis 雙尾試驗法)。

圖 2

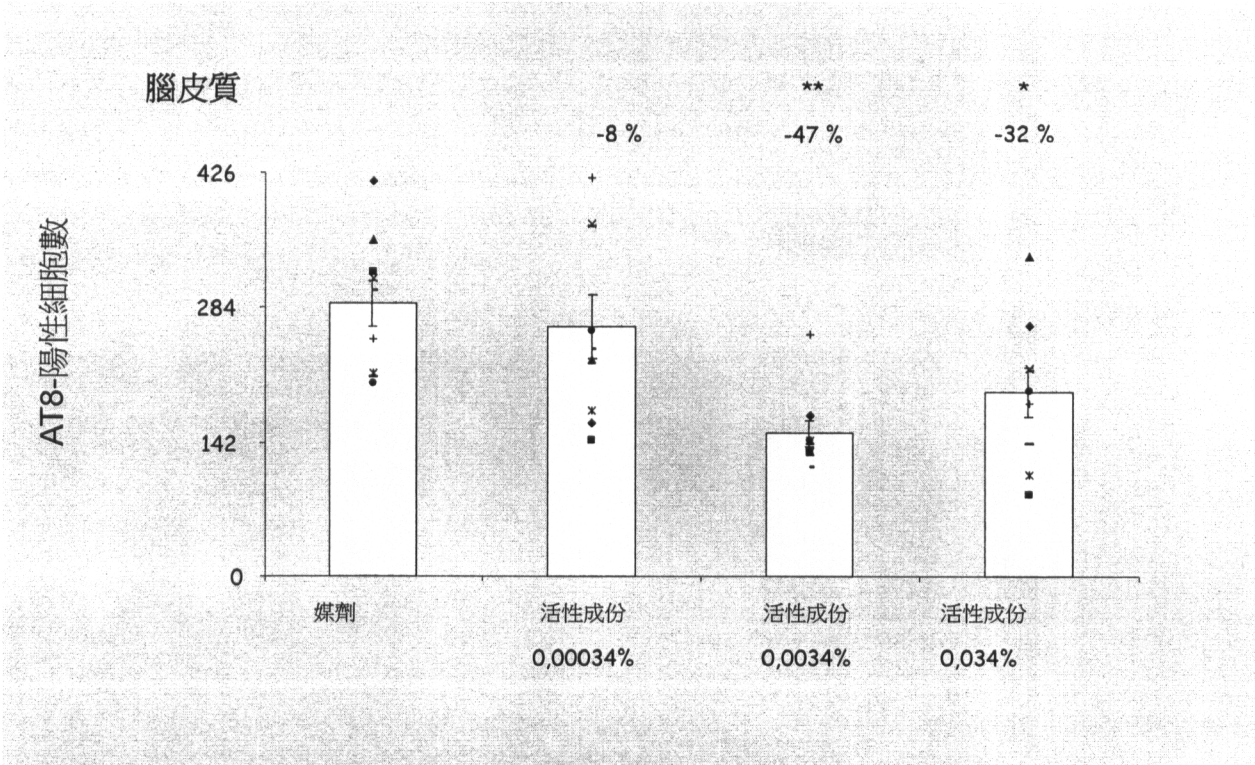


圖 3

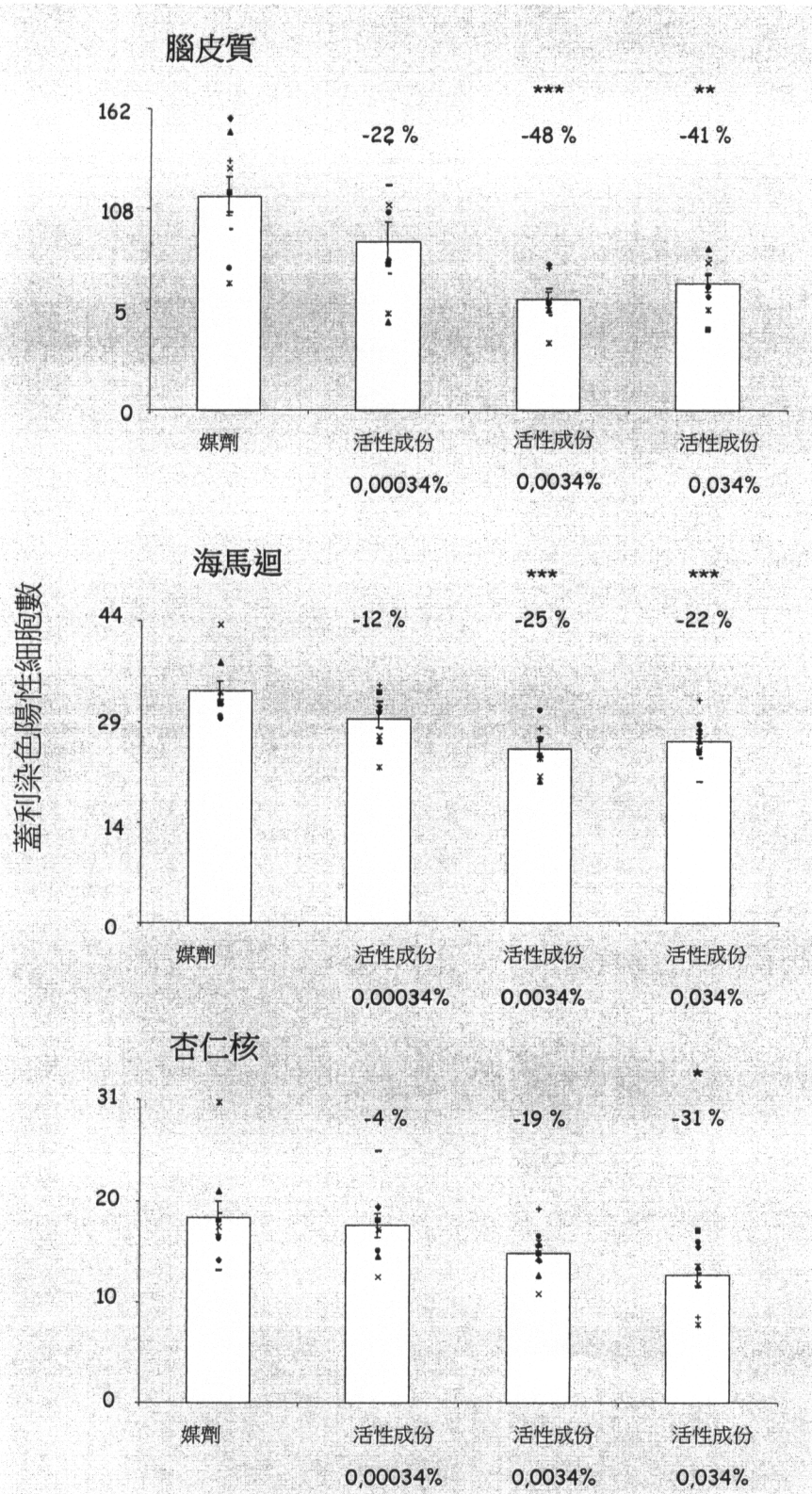


圖 4

