



(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 201427676 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 07 月 16 日

(21)申請案號：102100377

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 01 月 04 日

(51)Int. Cl. : *A61K36/232 (2006.01)*

A61K36/882 (2006.01)

A61P25/28 (2006.01)

(71)申請人：絡活生物科技有限公司 (中華民國) LOHA BIOTECH CO., LTD (TW)

臺北市北投區西安街 2 段 165 號

(72)發明人：游裕瑩 YU, YU YING (TW)

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：7 項 圖式數：4 共 12 頁

(54)名稱

親神經物質

NEUROTROPHIC AGENTS

(57)摘要

本發明涉及一中草藥萃取物及其製備方法，可有效的促進神經細胞生長，以用於治療或預防阿茲海默症的用途，特別是當歸、石菖蒲之萃取物。

發明摘要

※ 申請案號: 102100377

※ 申請日: 102.1.4

※IPC 分類: A61K 36/532 (2006.01)
A61K 36/882 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

【發明名稱】親神經物質

NEUROTROPHIC AGENTS

【中文】

本發明涉及一中草藥萃取物及其製備方法，可有效的促進神經細胞生長，以用於治療或預防阿茲海默症的用途，特別是當歸、石菖蒲之萃取物。

【英文】

The present invention relates to an herbal extracts and its preparation method which can effectively promote the growth of neural cells for the purpose of treatment or prevention of Alzheimer's disease. Especially the extracts of *Angelica sinensis* and *Acorus tatarinowii*.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ ）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】親神經物質

NEUROTROPHIC AGENTS

【技術領域】

【0001】 本發明涉及一中草藥萃取物及其製備方法，可有效的促進神經細胞生長，以用於治療或預防阿茲海默症(Alzheimer's disease)的用途。特別是當歸、石菖蒲之萃取物。

【先前技術】

【0002】 阿茲海默症(Alzheimer's disease, AD)是一種神經退化性疾病，患者會失去記憶力和多種認知能力，甚至產生人格特質的改變。全世界有超過 3,500 萬的人罹患阿茲海默症，為老年人最常見的失智症(Dementia)之一。

【0003】 阿茲海默症最主要的病理變化是類澱粉斑塊和含高度磷酸化 tau 蛋白的神經纖維纏結。因發現在阿茲海默症患者基底前腦區(basal forebrain)乙醯膽鹼神經有退化之現象，同時也發現乙醯膽鹼合成酵素(choline acetyltransferase)明顯減少，因而提出了膽鹼假說(Cholinergic Hypothesis)。而目前阿茲海默氏症治療藥物有四個主要係依此理論而研發，包括塔克寧(Cognex® tacrine)、愛憶欣(Aricept® donepezil)、憶思能(Exelon® Galantamine)及利憶靈(Reminyl® rivastigmine)，這些藥物均屬於乙醯膽鹼分解酵素之抑制劑(acetylcholinesterase inhibitor)。另外，基於興奮性神經毒素之理論，另一個治療藥物：滅擾停(memantine)(Ebixa® 憶必佳, Witgen® 威智, Manotin® 滅擾)，屬非選擇性天門冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)接受器抑制劑，可預防麩氨酸(glutamate)導致之興奮性神經損傷，進而改善阿茲海默症病人之症狀。但以上藥物治療均僅能達到中等症狀改善效果，並無法阻止疾病繼續惡化。因此對於神經退化性疾病的治療來

說，設法挽救已受損的神經細胞，並同時刺激該神經細胞的再生，係為較為理想的治療策略。

【0004】 親神經物質大都是源自於氨基酸，可以協助神經元的發展與生存，科學家認為將這些物質導入阿茲海默症病人的腦部，可能有助於修護受損的神經元，神經生長因子 (nerve growth factor; NGF)即為其中一員。NGF 是第一種被發現的神經營養因子 (neurotrophin)，具有神經元營養和促進突觸生長雙重生物學功能，它對中樞及周邊神經元的發育、分化、生長、再生和功能特性的表達均具有重要的調控作用。

【0005】 根據先前的研究結果指出，目前已有許多親神經物質已為科學家所發現，其包括有神經膠質衍生性神經營養因子(Glial – derived Neurotrophic Factor,GDNF)、大腦衍生性神經營養因子(Brain derived Neurotrophic Factor,BDNF)、神經生長因子(nerve growth factor,NGF)、神經營養因子 3(neurotrophin – 3,NT3)、神經營養因子 4(NT4)，及血小板衍生性生長因子(Platelet – derived growth factor,PDGF)等。這些親神經物質雖已被證實具有促進神經細胞存活的活性，但是其於臨床上卻有許多使用上的限制。此係由於投予這些親神經物質至活體中時，這些親神經物質因具有較大的分子量，並不易穿過血腦障壁(Blood Brain Barrier,BBB)而到達腦部。故直接開發蛋白質藥物用於口服，並不實際，因此可發揮諸如神經生長因子之小分子活性分子做為神經生長因子類似物 (mimics)，用以促進神經細胞的增生並維持其特性，甚至是促進其分化成具有功能的神經元細胞，這將有助於將做為退化性神經疾病的有效預防或治療。

【0006】 CN 1742968 係關於一種治療血管性癡呆症之藥物，其係由中藥材何首烏、黃芪(astragalus root)、丹參(salvia root)、當歸(ligusticum root)、石菖蒲(acorus root)、益智仁(alphinia fruit)、銀杏葉總黃酮(ginkgo leaf total flavone)、地龍(earthworm)、水蛭(leech)及天麻(gastrodia root)製備。以四七湯（制半夏、朱茯苓、石菖蒲、枳實、鬱金）加味治療老年性痴呆 30 例，與對照組腦復新相比療效顯著，對老年性痴呆、中風合併痴呆有良好治療作用。以柴胡、鬱金、紫蘇、石菖蒲之複方（稱之為 SYJN）具有神經保護作用，且可增加大鼠暴露於長期不可預測之壓力 (chronic unpredictable

stress; CUS) 下之神經營養因子 3 (neurotrophin-3)與神經生長因子(NGF)之表現。

【0007】 依上述的結果得知，中草藥複方在預防或治療神經退化性疾病有功效，但複方之表現仍難分開評估。本發明精準的確認了當歸、石菖蒲萃取物促進神經生長作用，顯然更進一步提供預防或治療神經退化性疾病之有效萃取物。

【發明內容】

【0008】 本發明之一個目的為提供一種促進神經細胞生長之中草藥萃取物，其係指當歸萃取物及石菖蒲萃取物。

【0009】 本發明之另一目的為提供一種製備促進神經細胞生長之中草藥萃取物之方法。

【0010】 本發明之另一目的為提供一種本發明之促進神經細胞生長之中草藥萃取物之用途，其係用以預防或治療阿茲海默症。

【0011】 在以下部分中詳細描述本發明。本發明之其他特徵、目的及優勢可易於見於本發明之實施方式及申請專利範圍中。

【圖式簡單說明】

【0012】

第一圖係為當歸水萃取物之高效液相層析圖。

第二圖係為石菖蒲水萃取物之高效液相層析圖。

第三圖係為當歸萃取物及石菖蒲萃取物促進 PC-12 細胞生長的效果。

第四圖係為石菖蒲萃取物保護 PC-12 細胞免於因 $A\beta_{1-42}$ /apoE4 所引起細胞凋亡的效果。

【實施方式】

【0013】 以下實施例旨在進一步說明本發明之技術內容，而非限制本發明之申請專利範圍。

【0014】 製造例：製造當歸萃取物，如一般工藝所述，可經由將當歸

生藥材 100g 壓碎，加入 2 升水，加熱煮沸迴流 1-4 小時，將過濾後之萃取液濃縮乾燥，而得到 30%的當歸萃取物，其高效液相層析圖如圖一所示。製造石菖蒲萃取物，如一般工藝所述，可經由將熟地黃生藥材 100g 壓碎，加入 2 升水，加熱煮沸迴流 1-4 小時，將過濾後之萃取液濃縮乾燥，而得到 30%的石菖蒲萃取物，其高效液相層析圖如圖二所示。高效液相層析儀之管柱為 Thermo Hypersil-Keystone RPC 18,4.6×250 mm；高效液相層析儀之流動相為 20%乙腈(Acetonitrile，含 0.1% 甲酸(formic acid))。0 分鐘，20%乙腈(Acetonitrile，含 0.1% 甲酸(formic acid))10 分鐘，100%乙腈(Acetonitrile，含 0.1% 甲酸(formic acid))40 分鐘，100%乙腈(Acetonitrile，含 0.1% 甲酸(formic acid))50 分鐘，20%乙腈(Acetonitrile，含 0.1% 甲酸(formic acid))60 分鐘；高效液相層析儀之流速為每分鐘 1 毫升(1 mL/min)；其偵檢儀為 DAD，波長設定於 230、254、280 nm。

【0015】 測試例一：促進神經細胞增生之中草藥萃取物之離體模式活性測試例。以大鼠腎上腺髓質嗜鉻細胞瘤(pheochromocytoma)細胞株 PC-12 細胞為離體篩選模式。PC-12 細胞可經由神經生長因子(Nerve Growth Factor, NGF)誘導而長出神經突觸，分化成類似交感神經元的細胞，因此 PC-12 細胞常做為研究神經細胞分化與神經退化性疾病的模式。目前很多對於阿茲海默症的理論，包括 A β 導致神經細胞氧化壓力提高、氧化壓力失衡導致細胞凋亡等，都曾在 PC-12 細胞模式上被證實。也有研究利用 A β 誘導 PC-12 細胞凋亡，建立模擬阿茲海默症的細胞模式，作為篩檢抗阿茲海默症藥物的細胞模式。

【0016】 大鼠腎上腺髓質嗜鉻細胞瘤細胞株 PC-12 細胞於含有胎牛血清及馬血清之培養基中培養 24 小時後，加入測試樣品處理 PC-12 細胞 48 小時，觀察細胞型態，並以 MTT 呈色分析法評估細胞的存活率。

- ※ 試驗分析本發明萃取物對 PC-12 細胞之生長分化作用時，係以顯微鏡觀察細胞型態。
- ※ 試驗分析本發明萃取物對 PC-12 細胞之生長增生作用時，係以計算 96 孔微量盤各孔中之細胞存活率，以 MTT 呈色分析法評估癌細胞的存活率。

※ MTT 呈色分析法：MTT 是一種 tetrazolium salt，全名為 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl] 2,5-diphenyltetrazolium bromide，為黃色染劑，可被活細胞吸收並在粒腺體中被 succinate-tetrazolium reductase 還原成藍色的 formazan，常用於篩檢物質對細胞之生長及增生的影響。

【0017】 依前述離體模式活性測試例之方法，進行二十幾種中草藥萃取物處理 PC-12 細胞 48 小時，發現本發明之當歸萃取物、石菖蒲萃取物可促進 PC-12 細胞增生，其增生效果分別為 278.9%及 171.3%，更優於對照組的銀杏萃取物 EGb761 的增生效果 124.8%，其中當歸萃取物促進神經細胞生長之效果(278.9%)與神經生長因子 NGF 處理 (50 ng/mL)組別效果(310.8%) 相當(如圖三所示)。

【0018】 測試例二：保護神經細胞免於凋亡之中草藥萃取物之離體模式活性測試例。將 $A\beta_{1-42}$ 粉末溶於 Tris-HCl 緩衝液 (100 mM, pH 7.4) 與純化並更換緩衝液的 apoE4 蛋白混合於 iDMEM 培養液中，將其配製為含有 $A\beta_{1-42}$ 5 μ M與 apoE4 20 μ g/mL的培養液，之後置於細胞培養箱中 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 / 95% air) 培養 48 小時，使 $A\beta_{1-42}$ 與 apoE4 能夠形成複合物。將含有 $A\beta_{1-42}$ /apoE4 的培養液與欲測試之中草藥萃取物同時處理已接種於 96 孔微量盤並刺激分化的 PC-12 細胞 48 小時，再以 MTT 方法測試中草藥保護 PC-12 細胞免於因 $A\beta_{1-42}$ /apoE 所引起細胞凋亡之能力。本測試例以銀杏萃取物 EGb761 為對照組，眾多的研究指出 EGb761 對於神經細胞具有保護功效，包括直接抑制神經細胞的壞死與凋亡，也有研究指出 EGb761 對於主司學習與記憶的海馬迴細胞有保護功效，另外 EGb761 也可提高 SD 大鼠體內的 α -secretase 活性，相對降低 $A\beta$ 的生成。EGb761 也可抑制 $A\beta$ 之聚集，且降低 caspase-3 活性，因此認定 EGb761 具有延緩阿滋海默症進展之潛力。

【0019】 依前述離體模式活性測試例之方法，處理本發明之石菖蒲萃取物，發現本發明之石菖蒲萃取物可增加 PC-12 細胞遭受 $A\beta_{1-42}$ /apoE4 毒性下的存活率(188.5%)，其效果比對照組銀杏萃取物 EGb761 的 153.1%還要優越(如圖四所示)。

【符號說明】

【0020】 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】

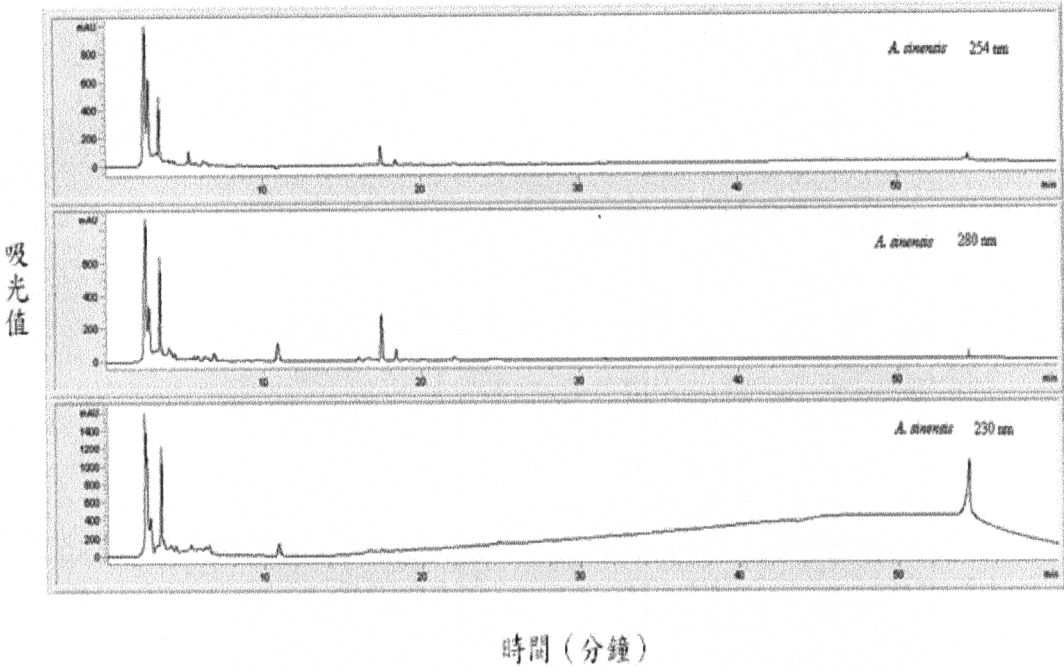
國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

【序列表】(請換頁單獨記載)

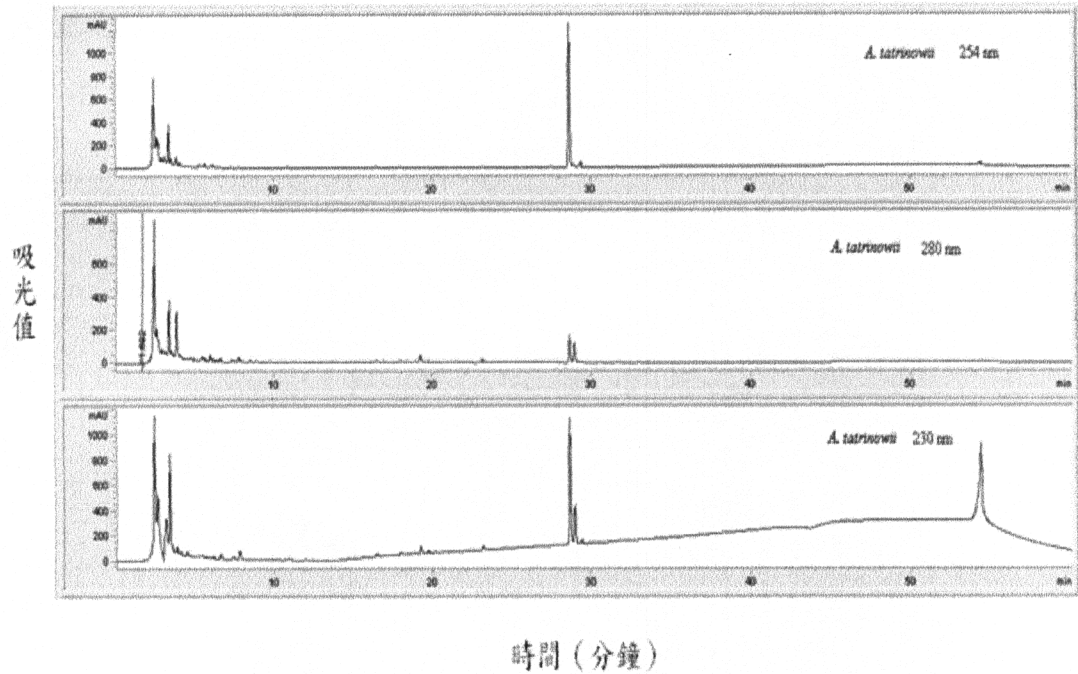
申請專利範圍

- 1.一種親神經物質，係包含一種有效促進神經細胞生長之中草藥萃取物。
- 2.根據申請專利範圍第 1 項所述之中草藥萃取物為當歸萃取物。
- 3.根據申請專利範圍第 1 項所述之中草藥萃取物為石菖蒲萃取物。
- 4.根據申請專利範圍第 2 項所述之當歸萃取物，係指水萃取物。
- 5.根據申請專利範圍第 3 項所述之石菖蒲萃取物，係指水萃取物。
- 6.根據申請專利範圍第 3 項所述之石菖蒲萃取物，係指乙醇萃取物。
- 7.根據申請專利範圍第 1 項之促進神經細胞生長，係指預防及/或治療阿茲海默症。

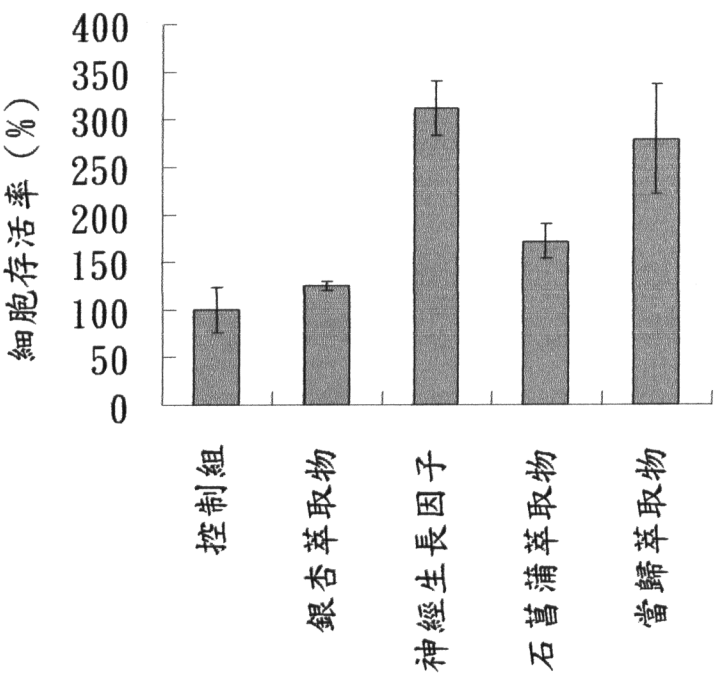
圖式



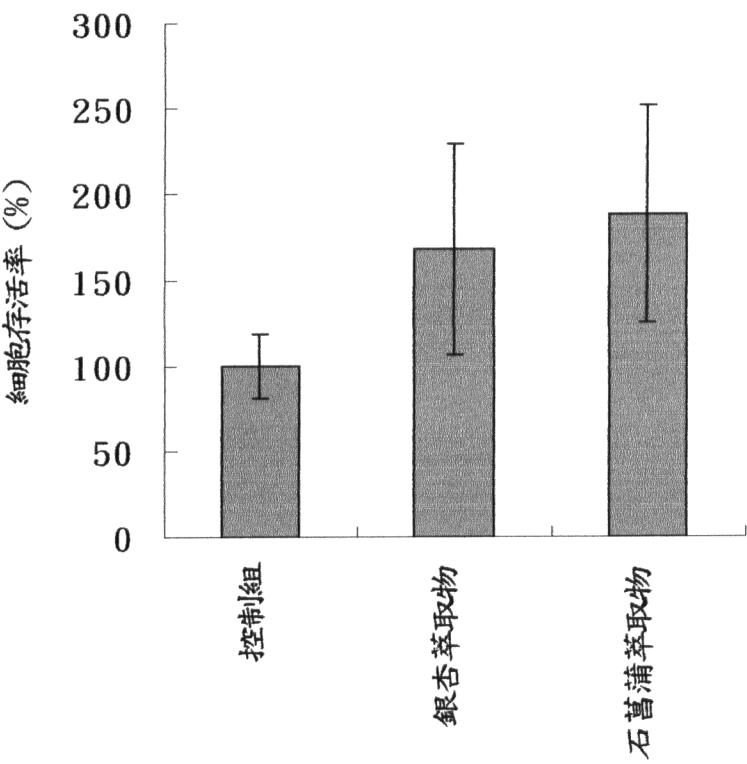
第一圖



第二圖



第三圖



第四圖