



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I544923 B

(45)公告日：中華民國 105 (2016) 年 08 月 11 日

(21)申請案號：098145509

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 12 月 29 日

(51)Int. Cl. : A61K31/42 (2006.01)

C07D261/04 (2006.01)

A61P25/00 (2006.01)

(71)申請人：何應瑞 (中華民國) HO, YING JUI (TW)

臺中市南區建國北路 1 段 110 號

中山醫學大學 (中華民國) CHUNG SHAN MEDICAL UNIVERSITY (TW)

臺中市南區建國北路 1 段 110 號

(72)發明人：何應瑞 HO, YING JUI (TW)

(56)參考文獻：

TW 200932734A

審查人員：簡正芳

申請專利範圍項數：9 項 圖式數：7 共 31 頁

(54)名稱

用於治療神經退化性疾病之醫藥組合物

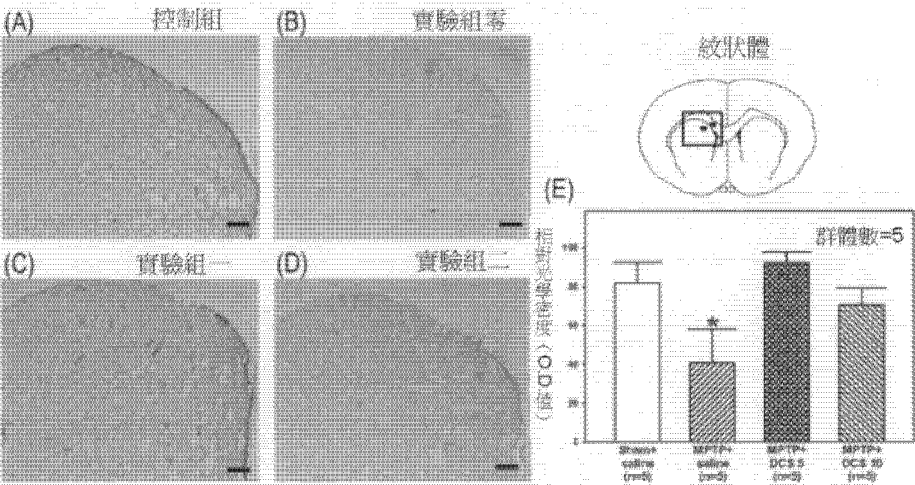
PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS FOR TREATMENT OF NEURODEGENERATIVE DISORDERS

(57)摘要

本發明係關於用於治療神經退化性疾病之醫藥組合物，其係含有 D-環絲胺酸(D-cycloserine)或其衍生物。並提供前述醫藥組合物之使用劑量，用於治療神經退化性疾病症狀，包括抑制神經發炎、抑制神經死亡退化、提升認知功能。

The present invention relates to pharmaceutical compositions for treatment of neurodegenerative disorders, wherein comprising: D-cycloserine or D-cycloserine-related derivatives. The present invention also discloses dosages of said compounds to treat symptoms of neuron-degenerative disorders, including: suppression of neuroinflammation and neurodegeneration, as well as improvement of cognitive functions.

指定代表圖：



第二圖

公告本

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：98145509

※ 申請日：98.12.29

※ IPC 分類：

A61K 31/42 (2006.01)
 C07D 261/04 (2006.01)
 A61P 25/06 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

用於治療神經退化性疾病之醫藥組合物 /
 PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS FOR TREATMENT OF
 NEURODEGENERATIVE DISORDERS

二、中文發明摘要：

本發明係關於用於治療神經退化性疾病之醫藥組合物，其係含有 D-環絲胺酸 (D-cycloserine) 或其衍生物。並提供前述醫藥組合物之使用劑量，用於治療神經退化性疾病症狀，包括抑制神經發炎、抑制神經死亡退化、提升認知功能。

三、英文發明摘要：

The present invention relates to pharmaceutical compositions for treatment of neurodegenerative disorders, wherein comprising: D-cycloserine or D-cycloserine-related derivatives. The present invention also discloses dosages of said compounds to treat symptoms of neuron-degenerative disorders, including: suppression of neuroinflammation and neurodegeneration, as well as improvement of cognitive functions.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(二)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於用於治療神經退化性疾病之醫藥組合物及其使用劑量，該醫藥組合物主要含有 D-環絲胺酸 (D-cycloserine) 或其衍生物。

【先前技術】

研究證據指出，麩胺酸神經系統 (glutamatergic system) 過度活化或 N-甲基-D-天冬酸酯 (N-methyl-D-aspartate, 在本申請案中簡稱 NMDA) 受體之功能太高，均會造成神經系統興奮性毒性 (excitotoxicity)，引起神經退化性疾病 (Javitt. Glycine modulators in schizophrenia. Curr Opin Investig Drugs, 3: 1067-72, 2002)。因此使用藥物以調節 NMDA 受體之活性，預期可以改善神經退化及其所引起的情緒、精神及認知功能障礙。

1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6, -四氫吡啶 (在本申請案中簡稱 MPTP) 是多巴胺神經專一性毒素，會破壞黑質緻密區 (substantia nigra pars compacta; 在本申請案中簡稱 SNc) 內之多巴胺神經細胞。MPTP 常被用於誘發齧齒類與靈長類動物產生巴金森氏症 (Ferro, Bellissimo, Anselmo-Franci, Angellucci, Canteras and Da Cunha. Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's

disease : histological, neurochemical, motor and memory alterations. *Journal of Neuroscience Methods*, 148 : 78-87, 2005)。MPTP 不僅會造成運動功能障礙與腦內多巴胺神經細胞退化，也會造成神經發炎。另外，在 MPTP 處理後，也會誘發麩胺酸神經系統過度活化 (Robinson, Freeman, Moore, Touchon, Krentz and Meshul. *Acute and subchronic MPTP administration differentially affects striatal glutamate synaptic function. Exp Neurol*, 180 : 74-87, 2003)。當麩胺酸與甘胺酸同時與 NMDA 受體結合時，會造成離子通道打開，使鈣離子流入細胞內。因此，MPTP 處理後，會造成麩胺酸過度釋放，引起興奮性神經毒性，導致神經細胞死亡 (Raju, Ahern, Shah, Wright, Standaert, Hall et al. *Differential synaptic plasticity of the corticostriatal and thalamostriatal systems in an MPTP-treated monkey model of parkinsonism. Eur J Neurosci*, 27 : 1647-58, 2008, Chassain, Bielicki, Durand, Lolignier, Essafi, Traore et al. *Metabolic changes detected by proton magnetic resonance spectroscopy in vivo and in vitro in a murin model of Parkinson's disease, the MPTP-intoxicated mouse. J Neurochem*, 105 : 874-82, 2008)。

D-環絲胺酸 (D-4-amino-3-isoxazolidone; D-cyclo serine 或簡稱為 DCS) 是一種廣效性抗生素 (俗稱蘭絲菌

素)。目前已知，D-環絲胺酸可以結合在 NMDA 受體上之甘胺酸結合位，是 NMDA 受體的「部分致效劑」(partial agonist)。D-環絲胺酸與典型抗精神病藥物合併投藥，可以改善精神分裂症病患的負性症狀 (negative syndrome) (Goff, Tsai, Manoach and Coyle. Dose-finding trial of D-cycloserine added to neuroleptics for negative symptoms in schizophrenia. Am J Psychiatry, 152 : 1213-5, 1995)。

美國專利號 US 6,551,993 揭露 D-環絲胺酸可改善巴金森氏症與精神分裂症之注意力不足症狀 (inattention)，而無法改善多巴胺神經死亡所引起之腦部神經發炎、神經退化與認知功能缺陷。另外，美國專利字號 US 7,160,913B2 揭露以 D-環絲胺酸併用左旋多巴 (levodopa) 及羥芳絲肼 (benserazide) 可以增進左旋多巴治療巴金森氏症之療效，並且減低左旋多巴所引起的副作用，例如肌張力不全症 (dystonia) 及運動困難 (dyskinesia)。雖然該專利之實施例一及圖一中宣稱使用 D-環絲胺酸合併左旋多巴及羥芳絲肼可以促進左旋多巴之效果，然其所提供之研究結果是投予藥物 ACPC 之結果，並非投予 D-環絲胺酸之結果，更甚者，該圖一中顯示合併投予 ACPC 之效果反而比單獨投予左旋多巴 levodopa 之效果還小。因此難以認定該發明人已經提供任何證據顯示 D-環絲胺酸會影響左旋多巴對巴金森氏症的治療效果且無法應付巴金森氏症患者會出現的多樣化症狀例如：運動功能失

調、心理及精神功能缺陷，甚至情緒障礙、認知缺陷甚至幻覺等 (Neuropsychological deficits in Parkinson's disease patients with visual hallucinations. *Mov Disord*, 21: 1483-7, 2006)。

再者，US 6,974,821 與 US 6,667,297 之摘要中揭露 D-環絲胺酸可以用來治療精神分裂症及阿茲海默氏症，但是並未具體指出是改善這兩項疾病的何種症狀，而且在此專利之 claim 中僅提及自閉症，並未提及其他神經精神疾病。US 6,228,875 主張 D-環絲胺酸與抗精神分裂症藥物合併投藥可以治療精神分裂症與阿茲海默氏症，但是也沒有說明是治療這兩種疾病的何種症狀。US 5,668,117 揭露 D-環絲胺酸與 carbonyl trapping primary amine agents 併用可以治療神經疾病，但是並未說明治療神經疾病之何種症狀。US 5,486,763 與 US 5,087,633 主張 D-環絲胺酸可以增進老年人、阿茲海默氏症病人或正常人之學習與記憶缺陷。US 5,468,763 與 US 5,061,721 揭露 D-環絲胺酸與特定比例之 D-alanine 併用可以改善學習、記憶與認知功能。US 5,187,171 揭露 D-環絲胺酸可以治療 PCP 所誘發的精神分裂症。

發明人與研究同僚近年從事與前述本發明相關主題之研究，如：王安莉。D-cycloserine 對 MPTP 處理後之 Wistar 大鼠的類情境記憶缺陷之影響。生命科學系，碩士論文：35, 2009, Wang, Huang, Ho, Huang, Liou and Ho. Effects

of D-cycloserine on MPTP-induced neuroinflammation and deficits in episodic-like memory in Wistar rats. Taiwanese Psychology Association 48th Conference, 2009, Wang, Huang, Ho, Liou and Ho. Effects of D-cycloserine on MPTP-induced Neuroinflammation and Deficits in Episodic-like Memory in Wistar Rats. The 22nd Biennial Meeting of the ISN/APSN Joint Meeting, 2009 以及 Wang, Liou, Pawlak and Ho. Involvement of NMDA receptors in both MPTP-induced neuroinflammation and deficits in episodic-like memory in Wistar rats. Behav Brain Res, Online publish: 2009。

【發明內容】

綜觀前案，均無法提供 D-環絲胺酸 (D-cycloserine) 或其衍生物確能治療多巴胺神經死亡所引起之腦部神經發炎、神經退化與認知功能缺陷之用途。

由於 MPTP 處理之大鼠其神經系統之變化與認知功能缺陷均與巴金森氏症失智病人的缺陷相似，因此使用 D-環絲胺酸能改善 MPTP 破壞之大鼠的神經與認知功能缺陷，證實 D-環絲胺酸及其衍生物將有利於治療巴金森氏症及其引發的失智症。另外，MPTP 所引發的神經退化現象與臨床上所見之其他神經退化性疾病之病理生理機轉相似，均會出現神經發炎及神經細胞死亡之現象，並且出現認知功能缺陷，因此可以作為其他神經退化性疾病之模式 (model)。

是以，本發明採用腦內注射 MPTP 以引發動物之神經退化性疾病，然後施予 D-環絲胺酸治療，而後測量其神經組織的發炎參數以證實 D-環絲胺酸及其衍生物具有治療神經退化性疾病之功能。而本發明確實提供 D-環絲胺酸或其衍生物對神經退化性疾病之新用途，對病患者是一大福音。

爰此，本發明目的在於提供一種用於治療神經退化性疾病（neurodegenerative disorders）之醫藥組合物，其含有 D-環絲胺酸（D-cycloserine）或其衍生物。

本發明所指之神經退化性疾病指神經發炎相關之疾病，包含但不局限於巴金森氏症、阿茲海默氏症、精神分裂症、中風、多發性硬化症、路易氏體失智症、額葉型失智症小腦脊髓共濟失調。

本發明所指之 D-環絲胺酸衍生物包含離子、鹽、溶劑化物與其他被保護之形式，例如 D-環絲胺酸的鹽類（salt）製劑、酯類（ester）製劑、烷基化（alkylated）製劑、D-丙胺酸（D-alanine）及 D-絲胺酸（D-serine），但不限於例示，而製備這些化合物之步驟是為熟悉此領域之人所熟悉的。

本發明之醫藥組合物能製備成不同投藥之形式，包含藥片、藥錠、藥丸或糖衣錠，亦可填至適合之容器（如：囊劑）或懸浮體，可裝入瓶中。

再者，本發明之醫藥組合物能單獨投藥或與其他治療藥物合併投藥。而能採用口服、非口服（如：靜脈注射、黏膜投藥（trans-mucosal）、舌下投藥、腹腔投藥、腦脊

髓腔內投藥 (intrathecal) 及肌肉注射…等)，取決於治療時的需要。

本發明之另一目的在於提供前述醫藥組合物之使用劑量，其中 D-環絲胺酸之劑量為每天 5 - 10 (毫克/公斤)。

本發明之另一目的以前述醫藥組合物用於治療神經退化性疾病症狀之用途，包括抑制神經發炎、中樞神經退化、神經死亡、改善認知功能缺陷、精神症狀或其他類似相關症狀。

本發明之抑制神經發炎係指抑制腦內微膠細胞活化或其他類似神經發炎症狀。

本發明之認知功能缺陷係指：學習功能、記憶功能、情境記憶功能、物件辨識功能 (object recognition)、視覺空間辨識功能 (visuospatial recognition) 及執行力 (executive function) 或其他類似功能缺陷。

本發明之精神症狀係指感官幻覺或類似症狀，例如：視幻覺、聽幻覺及其他感官幻覺。

【實施方式】

下述之實施例提供本發明更進一步細節之說明，這些實施例為本發明最佳之實施例，其用以說明此發明，然非限制本發明之範圍。

實施例一

本發明使用 39 隻雄性 Wistar 大鼠 (體重 306.2 ± 0.9 g; BioLASCO Taiwan Co., Ltd.) 為實驗動物。所有研究方法均符合實驗規範 (the NIH Guide for the Care and Use

of Laboratory Animals), 並通過中山醫學大學動物實驗許可 (IACUC approval No. : 434)。所有動物都接受立體定位手術, 將 MPTP 注射到腦部黑質體緻密區, 以建立巴金森氏症動物模式。MPTP 處理後隔天起每天下午 18:00 經由腹腔注射施予 D-環絲胺酸 0、5 或 10 毫克/公斤/天 (組別名稱依序為: 實驗組零 (MPTP+生理食鹽水組), 實驗組一 (MPTP+DCS 5) 組及實驗組二 (MPTP+DCS 10 組)。假手術組 (即控制組) 之動物則接受腹腔注射生理食鹽水 (1 毫升/公斤/天) (稱為控制組或 Sham+生理食鹽水組), 連續處理 13 天。以下分別以控制組、實驗組零、實驗組一及實驗組二稱之。

腦部手術: 所有的實驗動物都以腹腔注射 Zoletil (2 毫克/公斤; Virbac, Carros, France) 進行麻醉後實施立體定位手術, 將 MPTP-HCl (每 2 微升生理食鹽水含 1 微莫耳 MPTP; Sigma, MO, USA) (Gevaerd, Takahashi, Silveira and Da Cunha. Caffeine reverses the memory disruption induced by intra-nigral MPTP-injection in rats. Brain Res Bull, 55: 101-6, 2001, Da Cunha, Gevaerd, Vital, Miyoshi, Andreatini, Silveira et al. Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia. Behav Brain Res, 124: 9-18, 2001) 或生理食鹽水 (2 微升) 以微量注射法注入大鼠腦部黑質體緻密區 (SNc)。

類情境記憶試驗 (Episodic-like memory test)

MPTP 處理後第 13 天進行類情境記憶試驗，在一個開放空間（ $60 \times 60 \times 40$ 公分，無頂蓋使大鼠可覺察外面遠距之線索）之中進行，開放空間的底板分成 9 個大小相同的區域，視訊攝影機置於開放空間中心的上方 160 公分處，以記錄分析大鼠的行為。本試驗使用兩種以金屬或塑膠製成之物件供大鼠探索，該物件重量皆為 950 克，因此大鼠無法移動該物件。其基底直徑、高度、顏色、形狀與表面觸感皆不同，其中金屬物件為圓柱狀體（直徑 6.5 公分、高 12 公分、銀色與表面光滑）；塑膠物件則為長方體（其橫切面為 7.5×5 公分、高 15 公分、表面粗糙透明）。測驗前一天，將大鼠置入此開放空間 2 次，允許其自由探索，每次 5 分鐘，2 次間隔 4 小時，使其適應該測驗環境。

類情境記憶試驗參照先前文獻所報告之方法執行 (Li and Chao. Electrolytic lesions of dorsal CA3 impair episodic-like memory in rats. *Neurobiol Learn Mem*, 89: 192-8, 2008)，該方法包含兩個樣版試驗與一個測驗試驗 (test)，在第一個樣版試驗中，請參考第一圖 (A)，將大鼠置入開放空間中，其中放置四個相同之物件（請搭配第一圖 (A) 之左上圖）讓大鼠探索 5 分鐘。間隔 60 分鐘後，大鼠被再次置入該空間，並接受第二個樣版試樣（5 分鐘），其中物件置換成另一種物件，並改變其空間的放置位置（請搭配第一圖 (A) 之左下圖）。再一次 60 分鐘的間隔後，進行測驗試驗，其中與第一個樣版試驗相同之兩個物件，稱為第一組 (1)，與第二個樣版試驗相同之兩個物

件，稱為第二組(2)，然而第一組(1)及第二組(2)中，皆有一置於原位置之原位置物件(11)、(21)，第一組(1)及第二組(2)中皆有一置於新的位置之新位置物件(12)、(22)，(請搭配第一圖(A)之右下圖)。記錄大鼠探索各物件所花之時間。

以單因子變異數分析(one-way ANOVA)，結果顯示在第一個與第二個樣版試驗中，大鼠對物件的總探索時間並無顯著差異($P > 0.05$ ，數據未呈現)，在測驗試驗中，各組大鼠之總物件探索時間亦無差異，控制組： 48.0 ± 8.2 秒、實驗組零： 58.8 ± 14.7 秒、實驗組一： 54.4 ± 5.9 秒，實驗組二： 25.4 ± 4.3 秒，組間差異(between-group differences)($F(3, 35) = 2.397$ ， $P = 0.085$)，但可見DSC處理之影響趨勢。以 2×2 變異數分析[2×2 即物件近時效應(object recency) $\times$ 位置]，並以組間物件因子分成四組分析，結果顯示：不同組的處理有因位置而產生的物件近時效應“object recency by location”之交互作用，控制組($F(1, 9) = 13.747$ ， $P = 0.005$)、實驗組一($F(1, 9) = 5.795$ ， $P = 0.039$)與實驗組二($F(1, 8) = 22.252$ ， $P = 0.002$)。但是在實驗組零($F(1, 9) = 1.516$ ， $P = 0.249$)中未發現此交互作用。

請參考第一圖(B)，其顯示各組大鼠探索物件之時間，其中 $*P < 0.05$ ， $**P < 0.01$ ，#1 $P = 0.066$ ，#2 $P = 0.065$ ，#3 $P = 0.051$ ，與控制組做比較，實驗數據以平均值 $\pm$ 標準

差表示。在第一圖 (B) 中，實驗組零具有新近物件之主要效應 (main effects) ($F(1, 9) = 6.736, P = 0.029$)，但是其他各組均無此新近物件之主要效應。另外所有動物均無物件位置 (location) 之主要效應。以配對 t 檢定分析，結果顯示控制組 ($d.f. = 9, t = 3.051, P < 0.05$)、實驗組零 ($d.f. = 9, t = 2.897, P < 0.05$) 與實驗組二 ($d.f. = 8, t = 3.249, P < 0.05$) 之大鼠花較長時間探索位於第一組 (1) 之原位置物件 (11) (相較於探索位於新位置的第一組之新位置物件 (12) 而言)。且在實驗組一之大鼠探索位於相同位置的第一組 (1) 之原位置物件 (11) 之時間略長於探索位於新位置的第一組之新位置物件 (12) 之時間 ($d.f. = 9, t = 2.101$ ，稍微低於臨界值 2.69) (第一圖 (B))。又，配對 t 檢定分析顯示控制組 ($d.f. = 9, t = 2.614$ ，稍微低於臨界值 (2.69) 與實驗組二動物 ($d.f. = 8, t = 4.028, P < 0.001$) 花較長之時間探索被更動位置的第二組 (2) 之新位置物件 (22) (相較於第一組 (1) 之原位置物件 (11) 而言)。但是實驗組零與實驗組一之動物則無此行為表現。

上述結果顯示控制組動物可以表現出類情境記憶，牠們可以區辨新物件與舊物件 (what and when)，也可以區辨物件之位置 (where)，但是 MPTP 處理會干擾上述行為。經過 D-環絲胺酸 (10 毫克/公斤/天) 治療後，可以使 MPTP 處理之動物恢復情境記憶功能。

實施例二

組織與影像分析 (Histological assay and image analysis)

類情境記憶試驗後隔天，將大鼠以 CO₂ 深度麻醉後犧牲，隨機從每組選出 5-6 隻大鼠以 4% 三聚甲醛 (paraformaldehyde) (以磷酸緩衝溶液 PBS 配製) 進行心臟灌流，而後迅速將腦取出，並在 4°C 以 4% 三聚甲醛之 20% 蔗糖溶液做固定，再將冷凍之腦切片 (30 微米)。採用本實驗室先前之方法 (Wang, Wu, Liou, Wang, Pawlak and Ho. MPTP lesion causes neuroinflammation and deficits in object recognition in Wistar rats. Behav Neurosci, (in press), 2009)，進行免疫染色，以抗大鼠酪胺酸羥化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) (1:2000; Zymade, USA) 之小鼠單株抗體在 4°C 與組織反應至隔天或以抗大鼠 MHC class II 抗體 (OX-6; 1:200; BD Biosciences Pharmingen, CA, USA) 進行染色。含海馬迴之腦組織切面，以尼氏染色法 (Nissl stain) 辨識海馬迴中的神經細胞。

以配有 CCD (Optronics, USA) 之顯微鏡 (ZEISS AXioskop2, Germany) 與軟體 (Image Pro Plus Software 6.0 (Media Cybernetics, CA, USA)) 觀察，以三個正方形區域 (36,477、18,769 與 2,354 微平方米) 之「相對光學密度」(relative optic density) 分別定量紋狀體的 TH 免疫反應，以及在 SNc 與海馬迴 CA1 區域 (hippocampal CA1 area) 之神經細胞密度。將 TH 染色圖像轉換為灰階，

以測量紋狀體內多巴胺神經細胞投射 (DAergic projection) 的密度。測量方法是將待測區域之灰階密度，減去胼胝體內無免疫活性之背景染色數值，便得到對 TH 有免疫反應的組織之「相對光學密度」。為進一步測量 SNc 的多巴胺神經細胞密度，擷取此區之影像並將此與正方形區域重疊，計算有 TH 免疫反應的神經細胞體的數量。另外，參照文獻所記載之方法偵測活化之微膠細胞的密度 (Wang, Wu, Liou, Wang, Pawlak and Ho. MPTP lesion causes neuroinflammation and deficits in object recognition in Wistar rats. Behav Neurosci, (in press), 2009, Sugama, Yang, Cho, DeGiorgio, Lorenzl, Albers et al. Age-related microglial activation in 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurodegeneration in C57BL/6 mice. Brain Res, 964: 288-94, 2003)，其腦切片在等距離位置下取樣，計算在 SNc、紋狀體與海馬迴處活化之微膠細胞的數量 (測量區域分別為 18,769、36,477 與 18,769 微平方米)。由於海馬迴 CA1 區內神經細胞排列緊密，因此難以計算此區域內錐狀神經細胞 (pyramidal neurons) 之數量，因此本研究利用半定量方法 (semi-quantitative method) 計算此區域內染上尼氏染色的神經細胞佔區域面積之百分比作為神經密度之指標。

腦切片之免疫染色與尼氏染色的結果如第二圖至第七圖所示：

第二圖係 D-環絲胺酸 (DSC) 對 MPTP 處理之大鼠腦部紋狀體多巴胺神經末梢的影響。第二圖 (A) 至 (D) 係以酪胺酸羥化酶 (tyrosine hydroxylase; TH) 將多巴胺神經末梢染色。第二圖 (E) 為組織染色之相對光學密度 (O.D. 值) 結果, $* P < 0.05$ 。

第三圖係 D-環絲胺酸 (DSC) 對 MPTP 處理之大鼠腦部 SNc 多巴胺神經細胞的影響。第三圖 (A) 至 (D) 以酪胺酸羥化酶 (tyrosine hydroxylase; TH) 將多巴胺神經細胞染色。第三圖 (E) 為組織染色後多巴胺神經細胞密度結果, 與控制組比較 $* P < 0.05$, $*** P < 0.001$ 。與實驗組零比較 $\# P < 0.05$, $\#1 P = 0.081$ 。

第四圖係 D-環絲胺酸 (DSC) 對 MPTP 處理所導致紋狀體內微膠細胞活化之影響。第四圖 (A) 至 (D) 中活化之微膠細胞以 OX-6 標定。第四圖 (E) 為活化之微膠細胞密度。

第五圖係 D-環絲胺酸 (DSC) 對 MPTP 處理所導致 SNc 內微膠細胞活化之影響。第五圖 (A) 至 (D) 中活化之微膠細胞以 OX-6 標定。第五圖 (E) 為活化之微膠細胞密度, 與控制組相比 $*** P < 0.001$ 。

第六圖係 D-環絲胺酸 (DSC) 對 MPTP 處理所導致海馬迴內微膠細胞活化之影響。第六圖 (A) 至 (D) 中活化之微膠細胞以 OX-6 標定。第六圖 (E) 為活化之微膠細胞密度, 與控制組相比 $*** P < 0.001$ 。

第七圖係 D-環絲胺酸 (DSC) 對 MPTP 處理造成海馬迴

CA1 區的錐狀神經細胞密度減少之影響。第七圖 (A) 至 (D) 為海馬迴 CA1 區錐狀神經細胞，以尼氏染色 (Nissl stain) 之組織圖，第七圖 (E) 利用半定量方法 (semi-quantitative method) 計算區域內尼氏染色的神經細胞佔面積之百分比。與控制組相比*** $P < 0.001$ 。

在 SNc 與紋狀體均可發多巴胺神經的 TH 免疫反應。由於 TH 染色之解析度佳，所以在光學顯微鏡下可以計算特定區域內多巴胺神經細胞體的數量。以半定量法可以確認 MPTP 處理後，造成紋狀體內 TH 免疫反應的相對光學密度下降 [$P = 0.020$ ，請搭配第二圖 (B) 與 (E)]，以及在 SNc 內多巴胺神經細胞密度下降 [$P < 0.001$ ，請搭配第三圖 (B) 與 (E)]，D-環絲胺酸 (5 與 10 毫克/公斤/天) 處理後，可以阻斷 MPTP 處理所造成之上述多巴胺神經退化之現象[請參考第二圖 (C)、(D) 與 (E)；第三圖 (C)、(D) 與 (E)]。第五圖與第六圖顯示 MPTP 處理會增加大鼠腦內 SNc 與海馬迴的活化微膠細胞，半定量法分析顯示在 SNc[請參考第五圖 (B) 與 (E)]與海馬迴[請參考第六圖 (B) 與 (E)]之活化微膠細胞密度較控制組高 ($P < 0.001$)，以 D-環絲胺酸 (5 與 10 毫克/公斤/天) 處理，會抑制上述 SNc[請參考第五圖 (C)、(D) 與 (E)]與海馬迴[請參考第六圖 (C)、(D) 與 (E)]中因 MPTP 處理而活化之微膠細胞。另外，如第四圖所示，MPTP 處理雖然會導致紋狀體內微膠細胞活化，但是未達顯著差異。如第七圖所示，MPTP 處理會降低海馬迴 CA1 區內錐狀神經細胞之密度

($P < 0.001$)，D-環絲胺酸 (10 毫克/公斤/天) 處理可以阻斷 MPTP 處理所造成的上述神經退化現象。

上述實驗結果顯示：MPTP 處理除了會破壞多巴胺神經系統，也會引發微膠細胞活化之神經發炎現象，並且導致海馬迴出現神經退化。D-環絲胺酸 (5 或 10 毫克/公斤/天) 處理可以抑制上述多巴胺神經退化與海馬迴神經死亡之現象，其效果可能是經由抑制微膠細胞活化之神經發炎反應。

總結來說，D-環絲胺酸能抑制 MPTP 所誘發之腦部多巴胺神經細胞退化、微膠細胞活化、海馬迴神經細胞退化。且 D-環絲胺酸也可以抑制 MPTP 所誘發之情境記憶缺陷及辨識功能障礙。惟須注意前述實施例僅代表本發明之各種態樣與特徵，以詳細說明及例示，以使熟習此技術者能施行並加以利用，為任何替代、變更或修改均應在不脫離本發明之精神與範圍內進行。熟知此領域之人可從本發明得到本文所述之結果及優點；動物、方法以僅為示範性之較佳實施例代表，並非欲限制本發明之範圍。熟知此項技術者會對本發明做修正、變更及其他用途，唯這些修正與變更均應包含在本發明之精神內，並應當在本發明所附之專利請求項所定義之範圍內。

【圖式簡單說明】

第一圖 (A) 為實施例一之類情境記憶試驗中，物件在開放空間的放置位置。(●：舊的物件，□：新的物件)。

第一圖 (B) 為實施例一之類情境記憶試驗中，各組大

鼠探索物件之時間。

第二圖 (A) 為實施例二中控制組之大鼠腦部紋狀體組織染色圖。(第二圖 (A) 至 (D) 均以抗大鼠酪胺酸羥化酶之小鼠單株抗體染色，50 倍顯微鏡觀察，而圖中—：比例尺為 200 微米。)

第二圖 (B) 為實施例二中實驗組零之大鼠腦部紋狀體組織染色圖。

第二圖 (C) 為實施例二中實驗組一之大鼠腦部紋狀體組織染色圖。

第二圖 (D) 為實施例二中實驗組二之大鼠腦部紋狀體組織染色圖。

第二圖 (E) 為實施例二中大鼠腦部紋狀體組織染色之相對光學密度結果。

第三圖 (A) 為實施例二中控制組之大鼠腦部 SNc 組織染色圖。(第三圖 (A) 至 (D) 均以抗大鼠酪胺酸羥化酶之小鼠單株抗體染色，50 倍顯微鏡觀察，而圖中—：比例尺為 200 微米。)

第三圖 (B) 為實施例二中實驗組零之大鼠腦部 SNc 組織染色圖。

第三圖 (C) 為實施例二中實驗組一之大鼠腦部 SNc 組織染色圖。

第三圖 (D) 為實施例二中實驗組二之大鼠腦部 SNc 組織染色圖。

第三圖 (E) 為實施例二中大鼠腦部 SNc 組織染色之多

巴胺神經細胞密度。

第四圖 (A) 為實施例二中控制組之大鼠腦部紋狀體組織染色圖。(第四圖 (A) 至 (D) 均以抗大鼠 MHC class II 抗體 OX-6 染色，50 倍顯微鏡觀察，而圖中—：比例尺為 200 微米，其中插入之方塊小圖係以 200 倍顯微鏡觀察。)

第四圖 (B) 為實施例二中實驗組零之大鼠腦部紋狀體組織染色圖。

第四圖 (C) 為實施例二中實驗組一之大鼠腦部紋狀體組織染色圖。

第四圖 (D) 為實施例二中實驗組二之大鼠腦部紋狀體組織染色圖。

第四圖 (E) 為實施例二中大鼠腦部紋狀體組織染色之活化微膠細胞密度。

第五圖 (A) 為實施例二中控制組之大鼠腦部 SNc 組織染色圖。(第五圖 (A) 至 (D) 均以抗大鼠 MHC class II 抗體 OX-6 染色，50 倍顯微鏡觀察，而圖中—：比例尺為 200 微米，其中插入之方塊小圖係以 200 倍顯微鏡觀察。)

第五圖 (B) 為實施例二中實驗組零之大鼠腦部 SNc 組織染色圖。

第五圖 (C) 為實施例二中實驗組一之大鼠腦部 SNc 組織染色圖。

第五圖 (D) 為實施例二中實驗組二之大鼠腦部 SNc 組織染色圖。

第五圖 (E) 為實施例二中大鼠腦部 SNc 組織染色之活

化微膠細胞密度。

第六圖 (A) 為實施例二中控制組之大鼠海馬迴組織染色圖。(第六圖 (A) 至 (D) 均以抗大鼠 MHC class II 抗體 OX-6 染色，50 倍顯微鏡觀察，而圖中—：比例尺為 200 微米，其中插入之方塊小圖係以 200 倍顯微鏡觀察。)

第六圖 (B) 為實施例二中實驗組零之大鼠海馬迴組織染色圖。

第六圖 (C) 為實施例二中實驗組一之大鼠海馬迴組織染色圖。

第六圖 (D) 為實施例二中實驗組二之大鼠海馬迴組織染色圖。

第六圖 (E) 為實施例二中大鼠海馬迴組織染色圖之活化微膠細胞密度。

第七圖 (A) 為實施例二中控制組之大鼠海馬迴組織染色圖。(第七圖 (A) 至 (D) 均以尼氏染色 (Nissl stain) 染海馬迴 CA1 區錐狀神經細胞，200 倍顯微鏡觀察，而圖中—：比例尺為 200 微米。)

第七圖 (B) 為實施例二中實驗組零之大鼠海馬迴組織染色圖。

第七圖 (C) 為實施例二中實驗組一之大鼠海馬迴組織染色圖。

第七圖 (D) 為實施例二中實驗組二之大鼠海馬迴組織染色圖。

第七圖 (E) 為實施例二中大鼠海馬迴組織染色圖之尼

氏染色的神經細胞佔面積之百分比

【主要元件符號說明】

(1) 第一組

(11) 原位置物件

(12) 新位置物件

(2) 第一組

(21) 原位置物件

(22) 新位置物件

105年4月19日 修正
補充

2016年4月19日替換頁

公告本

七、申請專利範圍：

1. 一種 D-環絲胺酸 (D-cycloserine) 用於製備治療多巴胺神經細胞死亡所引起之腦部神經發炎、神經退化與認知功能缺陷之醫藥組合物的用途，其中該 D-環絲胺酸之劑量為每天 5 - 10 (毫克/公斤)。

2. 如申請專利範圍第 1 項之用途，其中該醫藥組合物之投予途徑選自包括：口服、靜脈注射、黏膜投藥 (trans-mucosal)、舌下投藥、腹腔投藥、腦脊髓腔內投藥 (intrathecal) 及肌肉注射。

3. 如申請專利範圍第 1 項之用途，其中該治療多巴胺神經細胞死亡所引起之腦部神經發炎係指抑制神經發炎。

4. 如申請專利範圍第 3 項之用途，其中該抑制神經發炎係指抑制腦內微膠細胞活化。

5. 如申請專利範圍第 1 項之用途，其中該治療多巴胺神經細胞死亡所引起之神經退化係指抑制中樞神經退化或神經死亡。

6. 如申請專利範圍第 1 項之用途，其中該治療多巴胺神經細胞死亡所引起之認知功能缺陷係指改善認知功能缺陷及精神症狀。

7. 如申請專利範圍第 6 項之用途，其中該認知功能缺陷係選自包括：學習功能、記憶功能、情境記憶功能、物件辨識功能 (object recognition)、視覺空

間辨識功能 (visuospatial recognition) 及執行力 (executive function) 之缺陷。

8. 如申請專利範圍第 6 項之用途，其中該精神症狀係指幻覺。

9. 如申請專利範圍第 8 項之用途，其中該幻覺選自包括視幻覺、聽幻覺及其他感官幻覺。