



(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 200948360 A1

(43)公開日：中華民國 98 (2009) 年 12 月 01 日

(21)申請案號：098113762

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 04 月 24 日

(51)Int. Cl.：

A61K31/427 (2006.01)

C07D493/04 (2006.01)

C07D417/06 (2006.01)

A61P25/28 (2006.01)

(30)優先權：2008/04/24

美國

61/047,729

(71)申請人：必治妥美雅史谷比公司 (美國) BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (US)

美國

(72)發明人：歐布萊特 查理斯 F ALBRIGHT, CHARLES F. (US)；巴頓 朵娜 瑪麗 BARTEN, DONNA MARIE (US)；李煜輝 LEE, FRANCIS Y. (HK)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：13 項 圖式數：10 共 93 頁

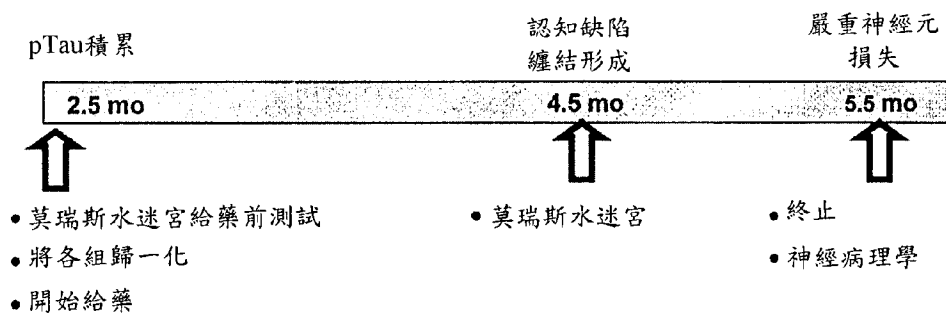
(54)名稱

埃坡黴素 D 於治療包括阿茲海默症之 T A U 相關疾病的用途

USE OF EPOTHILONE D IN TREATING TAU-ASSOCIATED DISEASES INCLUDING ALZHEIMER'S DISEASE

(57)摘要

本發明描述一種使用具有良好腦滲透性、長半衰期及於腦中之高選擇性滯留的埃坡黴素 D (epothilone D) 治療 tau 病變的方法，且提供治療包括阿茲海默症之 tau 病變的有效療法。





(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 200948360 A1

(43)公開日：中華民國 98 (2009) 年 12 月 01 日

(21)申請案號：098113762

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 04 月 24 日

(51)Int. Cl.：

A61K31/427 (2006.01)

C07D493/04 (2006.01)

C07D417/06 (2006.01)

A61P25/28 (2006.01)

(30)優先權：2008/04/24

美國

61/047,729

(71)申請人：必治妥美雅史谷比公司 (美國) BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (US)

美國

(72)發明人：歐布萊特 查理斯 F ALBRIGHT, CHARLES F. (US)；巴頓 朵娜 瑪麗 BARTEN, DONNA MARIE (US)；李煜輝 LEE, FRANCIS Y. (HK)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：13 項 圖式數：10 共 93 頁

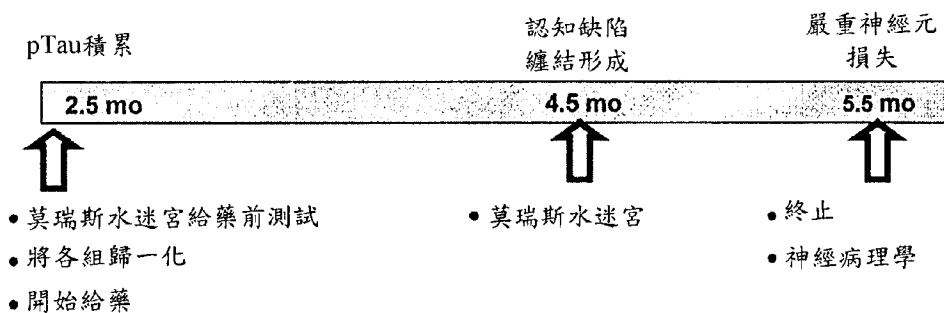
(54)名稱

埃坡黴素 D 於治療包括阿茲海默症之 T A U 相關疾病的用途

USE OF EPOTHILONE D IN TREATING TAU-ASSOCIATED DISEASES INCLUDING ALZHEIMER'S DISEASE

(57)摘要

本發明描述一種使用具有良好腦滲透性、長半衰期及於腦中之高選擇性滯留的埃坡黴素 D (epothilone D) 治療 tau 病變的方法，且提供治療包括阿茲海默症之 tau 病變的有效療法。



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明一般係關於使用埃坡黴素D治療Tau相關疾病，且更特定言之，係關於使用埃坡黴素D治療阿茲海默症。

【先前技術】

阿茲海默症為最常見之癡呆形式，在2006年據估計其影響全世界2700萬人。年齡為AD之最大已知風險因素，85歲或85歲以上者之發病率為25-50%。當群體之平均年齡增大時，AD患者數預計按指數規律上升。AD為65歲及65歲以上者之第五大死亡原因，且大部分患者最終需要居家護理。因此，AD具有巨大的經濟影響，例如美國2005年的直接及間接花費據估計為\$1480億。除經濟花費外，AD對患者及其家庭成員具有破壞性的影響，引起嚴重的情緒悲痛及紛擾。

基於癡呆之存在、記憶及其他認知功能之進行性惡化及癡呆之其他原因之排除，診斷患者患有可能的AD。當臨床診斷係基於腦神經病理學時，僅可死後確認AD之診斷，特定而言，診斷需要對腦組織之評估，包括腦中細胞外斑塊之存在及濃度、細胞內纏結及腦神經退化。癡呆亦為診斷之必需部分，因為觀察到斑塊及纏結存在於認知正常成人中，儘管其程度通常較小。

兩種類型之藥物(膽鹼酯酶抑制劑及N-甲基-D-天冬胺酸(NMDA)拮抗劑)目前被批准用於AD。儘管此等兩種類型之治療劑展示某些臨床益處，但很多患者不起反應，且此

等藥物僅改善AD之症狀(例如認知功能)，很少或不改變疾病進程。為此等原因之故，鑑別用於此破壞性疾病之疾病改善治療劑為醫藥工業之主要焦點。

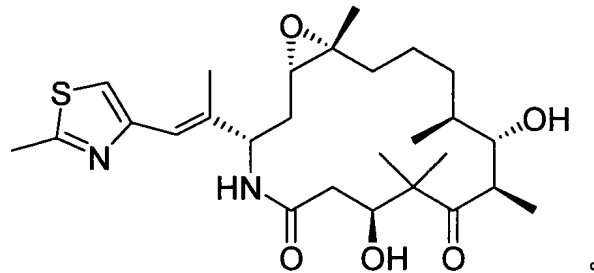
已提出微管穩定劑作為治療tau病變(包括AD)的療法。參見例如Lee等人(參考文獻清單，見下文)。在美國專利5,580,898(1994年5月申請且於1996年12月3日頒予)中，Trojanowski等人提出使用太平洋紫杉醇(paclitaxel)(紫杉酚(Taxol))、藉由穩定微管來治療AD患者。太平洋紫杉醇已證明可作為微管穩定劑高效治療癌症患者；然而，當考量用於AD(下文進一步描述)時，其呈現腦滲透性及外周神經病變問題，且尚未作為治療AD的可行療法出現。

1995年，據報導埃坡黴素B可發揮類似於太平洋紫杉醇的微管穩定作用(Bollag等人，1995)。埃坡黴素A及埃坡黴素B為Hofle等人自微生物纖維堆囊菌(*Sorangium cellulosum*)之發酵產物所分離的天然存在之化合物(例如WO 93/10121)。Hofle等人亦發現由纖維堆囊菌及修飾菌株所產生之37種天然埃坡黴素變異體及相關化合物，包括埃坡黴素C、D、E、F及其他異構體及變異體(例如美國專利第6,624,310號)。

天然埃坡黴素之獨特特徵引起吾人探究其作為潛在抗癌藥物的極大興趣。自首次發現天然埃坡黴素A及B以來距今已近二十年。在不同專利申請案中已發現且描述數百種埃坡黴素類似物，且大量文獻已以標題「埃坡黴素」公開(參見例如Altmann等人，參考文獻清單，見下文，在396-

423)。

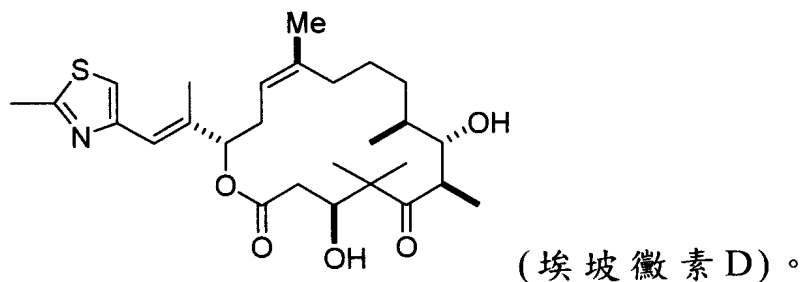
本申請案之受讓人已開發用於治療癌症之伊沙匹隆(ixabepilone)(埃坡黴素B之半合成類似物)。伊沙匹隆具有以下結構式：



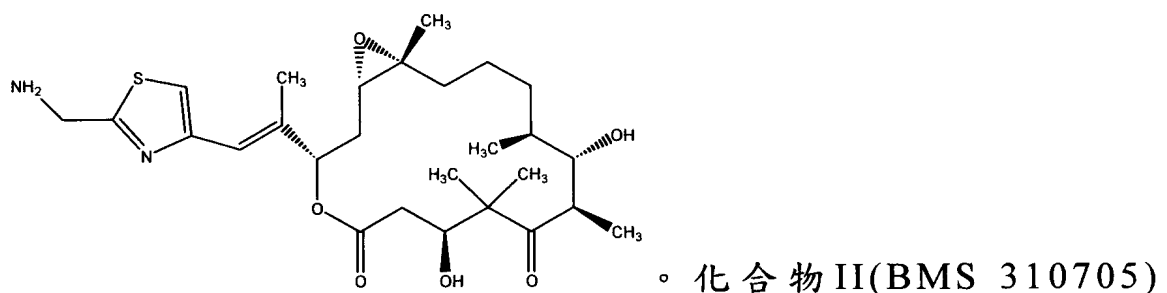
伊沙匹隆之化學名稱為(1S,3S,7S,10R,11S,12S,16R)-7,11-二羥基-8,8,10,12,16-五甲基-3-[(1E)-1-甲基-2-(2-甲基-4-噻唑基)乙烯基]-17-氧雜-4-氮雜雙環[14.1.0]十七烷-5,9-二酮。亦參見US 6,605,599(受讓於本受讓人Bristol-Myers Squibb Company(BMS))。伊沙匹隆為經FDA批准用於治療轉移性乳癌的微管穩定劑且由BMS以商品名IXEMPRA®出售。伊沙匹隆可如US 6,605,599或US 7,172,884中所述來製備，該等專利以引用方式併入本文中。

其他天然埃坡黴素及類似物係在晚期臨床試驗中用於治療癌症之彼等物，包括埃坡黴素B(a/k/a 帕妥匹隆(patupilone)或EPO-906)；在Novartis Pharma AG之III期試驗中用於治療卵巢癌之彼等物及沙戈匹隆(sagopilone)(或ZK-EPO)(埃坡黴素B之苯并噻唑基-7-丙烯基合成類似物)；在Bayer Schering AG之II期試驗中用於治療不同癌症(包括卵巢、乳房、肺、前列腺及黑色素瘤之腫瘤)之彼等物。2007年，美國開始用沙戈匹隆進行II期試驗用於治療

來自乳癌之腦轉移。此外，埃坡黴素D類似物KOS-1584已由Kosan Biosciences, Inc.(現為BMS之全資附屬公司)發展至用於治療非小細胞肺癌及實體腫瘤之II期臨床試驗，且埃坡黴素D已由Kosan與Hoffmann-La Roche, Inc.合作發展至用於治療癌症之II期臨床試驗；然而，用埃坡黴素D治療癌症的臨床試驗在2007年中止。埃坡黴素D之結構可由下式表示：



本申請案之受讓人亦已在臨床上評估用於癌症治療的BMS-310705(本文中之化合物II)。BMS-310705已通過用於治療卵巢癌之I期臨床試驗；其為胺基-埃坡黴素F類似物且具有以下化學結構：



可如US 6,262,094中所述製備，該專利以引用方式併入本文中。

雖然某些埃坡黴素化合物及類似物已在臨床上針對治療癌症加以評估，但癌症藥物是否可有效地用於治療包括

AD之神經退化性疾病卻高度不可預測。存在多種影響此不可預測性的因素。一種因素為因血腦障壁(BBB)而很難達成良好的腦滲透性。當化合物用於治療神經退化性腦疾病時，該化合物必需穿越BBB；然而，因為BBB之功能係保護腦以防外部物質及毒素，所以發現具有良好BBB滲透性的適用藥物具有挑戰性。此外，BBB滲透性為癌症藥物(除腦癌藥物外)之非所要特徵。對於癌症藥物而言，通常設法避免BBB滲透性，而對於經設計用於治療AD或其他神經退化性腦疾病的藥物而言，良好的BBB滲透性係化合物發揮效用所必需的。因此，舉例而言，雖然太平洋紫杉醇為非常成功的癌症藥物，但其尚未作為治療腦疾病(諸如AD)的適用療法而出現，因為其穿越BBB之腦滲透率很低。

影響癌症藥物、尤其微管穩定藥物在治療AD及其他腦疾病中之有效性評估之不可預測性的其他因素包括藥物穿透腦之能力、長期滯留於腦中之能力及相對於外周組織選擇性積累於腦中之能力。此等參數可使用腦血漿比、腦半衰期及滯留於腦中與外周組織(最尤其為肝)中之藥物量之比率來量測。此外，因為此等化合物通常快速自血漿中清除、而自含微管之組織之清除更加緩慢，所以量測微管穩定劑之腦滲透性、滯留及選擇性腦積累係複雜的，使得設定用於血漿含量與組織含量之對比的適當時窗變得重要。若微管穩定劑在某些劑量下對外周組織具有高度細胞毒性，則腦與外周組織比率係尤其重要之度量。若微管穩定

劑(諸如太平洋紫杉醇)以化學治療劑量投與時，則通常發生外周神經病變及其他副作用(Postma等人，1999)。此等副作用在治療癌症患者中可耐受，但在治療罹患AD及其他腦疾病之患者中存在不同的治療窗及可接受之副作用概況。

與期待癌症藥物潛在應用於神經退化性疾病有關的其他挑戰包括投藥模式及與之相關的生物可用性及細胞毒性。

在 WO 2005/075023 A1(2004年1月30日公開，頒予 INSERM之Andrieux等人)中，提出某些埃坡黴素及類似物(包括埃坡黴素A、B、C、D、E及F及苯并噻唑基及吡啶基埃坡黴素B及D類似物)可適用於治療涉及神經元連接障礙之疾病，諸如精神分裂症或自閉症。然而，Andrieux等人未主張權利且由此教示未使用此等化合物治療AD，說明與神經元連接障礙相關的疾病(彼申請案中所主張之彼等疾病)「不同於涉及神經元變性的進行性癡呆症，如阿茲海默症」。

在頒予 Schering AG之Lichtner等人的 WO 03/074053 ('053)(2003年9月12日公開)中，廣泛主張使用各類埃坡黴素化合物及合成類似物來治療腦癌及其他腦疾病，包括原發性腦腫瘤、繼發性腦腫瘤、多發性硬化症及AD。Lichtner等人報導四種化合物(亦即太平洋紫杉醇與其中以如下化合物命名之化合物相比)之某些資料：化合物1：4,8-二羥基-16-(1-甲基-2-(2-甲基-4-噻唑基)-乙烯基-1-氧雜-7-(1-丙基)-5,5,9,13-四甲基-環十六-13-烯-2,6-二酮)；

化合物2：二羥基-3-(1-甲基-2-(2-甲基-4-噻唑基)-乙烯基)-10-丙基-8,8,12,16-四甲基-4,17-二氧雜雙環[14.1.0]十七烷-5,9-二酮；及化合物3：7,11-二羥基-3-(2-甲基苯并噻唑-5-基)-10-(丙-2-烯-1-基)-8,8,12,16-四甲基-4,17-二氧雜雙環[14.1.0]十七烷-5,9-二酮(參見WO '053公開案，第21頁)。

Lichtner等人尤其報導以上三種埃坡黴素類似物之腦及血漿濃度資料，但滯留期僅長達40分鐘。Lichtner等人未能報導與太平洋紫杉醇對比之腦血漿含量的對比資料(因為彼等太平洋紫杉醇腦含量低於偵測含量)，且其未報導與該等任何化合物之腦肝比、半衰期或腦滯留有關的資料(例如藥物長期在腦組織中之濃度)。

鑒於上述內容，此項技術中仍需要治療tau病變(尤其阿茲海默症)的方法。

【發明內容】

本發明人已基於包括行為及神經病理學研究在內之多項活體內研究發現，埃坡黴素D在包括AD之Tau相關疾病之治療中達成驚人之有利概況。本發明人已發現埃坡黴素D呈現有利特性之完美組合，使得該化合物特別適用於治療此等疾病。此等特性不僅包括穿越BBB之高腦滲透性水準，而且亦包括腦中之驚人長半衰期及腦中之驚人之高選擇性滯留(與長期存在於外周組織、最顯著存在於肝中之藥物含量相比)。此外，本發明人進一步發現，使用低劑量之埃坡黴素D(例如使用比達成化學治療作用所投與之彼等劑量小約100倍之劑量)可達成治療Tau相關疾病之驚人

治療優點。因此，本發明人已在用埃坡黴素D治療Tau相關疾病、尤其治療AD中發現可供治療的方法而不產生需要中止使用埃坡黴素D治療需要治療之患者的藥物誘導之副作用及/或藥物-血漿濃度水準。鑒於劑量低(與化學治療處理相比)，使任何副作用大大減少(與投與埃坡黴素及類似物治療癌症所誘導之副作用相比)。

本發明提供使用對於治療AD呈現驚人之有利概況之埃坡黴素D治療Tau相關疾病(包括tau病變)的方法。特定而言，本發明提供一種治療阿茲海默症之方法，該方法包含向患者投與治療有效量之埃坡黴素D之步驟。

本發明進一步提供一種醫藥組合物，其包含用於治療患者之Tau相關疾病之埃坡黴素D，其中該組合物呈現的治療概況包含如本文中定義之良好腦滲透性、腦中之長半衰期及選擇性腦滯留(例如高腦肝比)。較佳實施例包含用於治療tau病變、尤其AD之醫藥組合物，其包含治療有效量之埃坡黴素D及醫藥學上可接受之載劑。本發明之其他實施例及態樣闡述如下。

【實施方式】

縮寫

以下為本說明書中所用各種術語之縮寫：

3R=	重複三次
4R=	重複四次
AD=	阿茲海默症
APP=	β -澱粉樣前驅蛋白質

BBB=	血腦障壁
BMS=	Bristol-Myers Squibb, Co.
CHCl ₃ =	三氯甲烷
CH ₂ Cl ₂ =	二氯甲烷
DMAP=	4-二甲基氨基吡啶
EtOAc=	乙酸乙酯
HPLC=	高壓液相層析法
FDA=	美國食品與藥物管理局 (US Food and Drug Administration)
FTDP-17=	與染色體17關聯之額顳葉型癡呆伴隨帕金森氏病
H, h, hr=	小時
IP=	腹膜內
IV=	靜脈內
LDA=	二異丙基醯胺鋰
LLQ=	定量分析之下限
<LLQ=	低於LLQ，偵測不出
MAP=	微管相關蛋白質
MeOH=	甲醇
min=	分鐘
MTs=	微管
mpk=	毫克/公斤
MWM=	莫瑞斯水迷宮
nM=	奈莫耳

NQ=	因一或多個資料點 < LLQ 而不可量化
PEG=	聚乙二醇
PGP=	P-糖蛋白
PO=	經口(經口投與)
PVP=	聚乙烯吡咯啉酮
RT=	室溫
SiO ₂ =	矽膠
TBAF=	四丁基氟化銨
TBS=	Tris緩衝鹽水
TEA=	三乙胺
TFA=	三氟乙酸
THF=	四氫呋喃
TPGS=	d- α -生育酚聚乙二醇1000丁二酸酯

定義

如本文中所使用之「約」意謂在如一般技術者所測定之特定值之標準偏差的可接受範圍內(考量所述量測及用於量測之儀器(亦即，量測系統之局限))。舉例而言，「約」可意謂在一或多個標準偏差內。如調配物及劑量中所應用，「約」可意謂在報導數值之10%以內、更佳5%以內且甚至更佳2%以內之偏差。

術語「至少x個」與「x個或x個以上」(其中x表示數值)在本文中可互換使用，因為其意欲具有相同含義。

「腦滲透性」係指化合物穿越BBB之能力。因為大部分微管穩定劑之快速外周清除性，所以為評估腦滲透性本

身，在給藥後相對較短時間(例如在給藥後約20分鐘至1小時之時間)量測腦與血漿比率係重要的。具有如本文中所定義之良好腦滲透性的化合物意謂化合物在給藥後20分鐘至1小時具有0.5或大於0.5、更佳0.8或大於0.8之腦與血漿比率且最佳具有1或大於1之比率(亦在給藥後20分鐘與1小時之間的時間)。在評估化合物或藥物是否滿足高腦/血漿比率之該標準(例如，如本文中申請專利範圍中所述)時，因為無法分析人類腦組織以評估藥物濃度，所以必須依賴非人類活體內研究。

「認知收益」意謂如藉由認知測試、量測全面功能及日常活動及行為所鑑定，觀測或報導至少一個需要治療之患者之認知功能之衰退的改善或減輕。通常，使用設計成可量測一患者或一組患者之認知衰退的認知測試來量測認知收益。此等測試之實例包括認知測試，如ADAS-cog(阿茲海默症評估量表、認知分量表)及MMSE(簡易精神狀態檢查法)；行為測試，如NPI(神經精神症狀問卷)；日常活動測試，如ADCS-ADL(阿茲海默症合作研究-日常活動)；及全面功能測試，諸如CIBIC-附加項(基於臨床醫師訪視之印象變化)及CDR(臨床癡呆評定)總和量表。

如本文中所使用之「長期」意謂24小時或超過24小時、通常24至76小時之時期。

如本文中所使用之「高選擇性滯留比」或「高選擇性滯留」意謂如在給藥後長期所量測，藥物或化合物以比存在於其他組織及器官(尤其肝)中之含量高得多的含量滯留於

一組織或器官(尤其腦)中。更特定言之，如本文中所定義，高選擇性滯留比意謂在給藥後24小時或24小時以後，藥物在腦中之濃度為存在於肝中之濃度之4倍或4倍以上，更佳為至少6倍或6倍以上，且最佳地，在給藥後24小時或24小時以後為至少8倍或8倍以上。在評估化合物或藥物是否滿足高腦/血漿比或高腦/肝選擇性滯留之該標準(例如，如本文申請專利範圍中所述)時，因為無法分析人類腦組織以評估藥物濃度，所以必須依賴天然非人類研究。

「影響基礎疾病」意謂與病程相關之生物標記及其他參數(包括CSF或血漿中之生物化學標記、腦容量之變化、如藉由功能成像所量測之腦功能之變化及屍體解剖後可觀測之組織病理學或生物化學之變化)之量測值的改善。可用於AD臨床試驗的典型生物標記包括於CSF中量測之分析物，諸如Tau、磷酸化Tau、 β 澱粉樣蛋白及異前列烷，及腦成像形式，諸如氟去氧葡萄糖PET及容積MRI。可能有用的其他生物標記，尤其檢查突觸活性、MT完整性/功能及氧化壓力的彼等生物標記包括(但不限於)：GABA、神經肽Y、 α -突觸核蛋白、神經顆粒素及血管活性腸肽、微管蛋白、Tau片段、泛素化蛋白、可溶形式之澱粉樣前驅蛋白、嗜鉻粒蛋白B、4-羥基壬烯醛、硝基酪胺酸及8-羥基-去氧肌。

「間歇式」當參考給藥時程使用時意謂給藥時程中存在無規律的中斷。舉例而言，每日、每週、每兩週或每月給藥時程在此定義下不視為間歇式，因為給藥之間之中斷在

各種情況下具有規律性且藉由投與藥物之給藥週期限定。然而，具有一或多個無規律中斷之更詳細給藥時程被視為間歇式的，諸如第5日給藥，隨後2日停藥；或在30日週期之第1、8及15日投藥等。

如本文中所使用之「長半衰期」或「長腦半衰期」意謂藥物具有給藥後20小時或20小時以上之半衰期(視為不依賴於劑量)且更佳給藥後30小時或30小時以上之半衰期且最佳給藥後40小時或40小時以上之半衰期。對於選擇性滯留比，在評估化合物是否具有長腦半衰期時必須依賴於活體內非人類研究。

如本文中所使用之「低劑量」意謂埃坡黴素D化合物之劑量顯著小於為達成化學治療作用所投與之劑量(例如，在特定投藥模式、臨床試驗及/或實驗既定下)，較佳其劑量比化學治療劑量小10倍或10倍以上，更佳其劑量比化學治療劑量小50倍或50倍以上，且甚至更佳其劑量比化學治療劑量小100倍或100倍以上，化學治療劑量亦即以上針對既定實驗、研究或試驗對使用相同投藥方法評估為化學治療有效的劑量。舉例而言，在埃坡黴素D之II期臨床試驗中，所投劑量為以每四週中三週(3週給藥，1週停藥)每週一次90分鐘輸注之形式投與 100 mg/m^2 ，每4週投與累積總量為 300 mg/m^2 。如本文中所定義之低劑量(相對於此臨床試驗劑量)意謂靜脈內投藥後一個月累積 30 mg/m^2 或小於 30 mg/m^2 之劑量、更佳 6 mg/m^2 或小於 6 mg/m^2 之劑量且甚至更佳 3 mg/m^2 或小於 3 mg/m^2 之劑量。因此，作為一替代

實例，每4週投與一次時，低劑量(與以上臨床試驗劑量相比)為30 mg/m²之劑量、更佳6 mg/m²之劑量且甚至更佳3 mg/m²之劑量。因為生物可用性可視投藥模式(例如經口投藥對比靜脈內投藥，其中經口投藥後達成的生物可用性更小)而變，所以相對劑量(亦即，評估給定劑量是否為如本文中所定義之「低劑量」)應基於涉及相同或類似投藥模式之比較。

如本文中所使用之「需要治療之患者」意欲包括將埃坡黴素D用於在醫學上已提出治療過程以延遲疾病之症狀或病徵之發作或發展或加劇或惡化之以下患者：1)已診斷患有在任何臨床階段之Tau相關疾病(包括tau病變、尤其AD)之患者，包括患有輕度認知障礙至晚期癡呆之患者；及/或2)具有Tau相關疾病(包括tau病變、尤其AD)之早期或前驅症狀及病徵的患者；及/或3)因年齡、遺傳或其他因素已診斷為易患Tau相關疾病(包括tau病變、尤其AD)之患者。

「統計顯著認知收益」意謂對至少10%或10%以上之經評估患者、更佳至少25%或25%以上之患者且甚至更佳50%或50%以上之患者群組治療6個月至一年時期後，存在認知收益(例如認知功能衰退之改善或減輕)。較佳地，評估與對照組相比之改善率且此改善率反映至少10%改善(例如，當基於安慰劑組與對照組之間的對比測試分數評估時，其中「改善」意欲包括患者狀況衰退之減輕)，更佳地，觀測到大於25%或25%以上之改善率且最佳35%或35%以上之改善率。

如本文中所定義之「Tau相關疾病」意謂與Tau異常相關之疾病及作為「tau病變」之疾病。Tau相關疾病包括(但不限於)額顳葉型癡呆(包括與染色體17關聯之額顳葉型癡呆伴隨帕金森氏病(FTDP-17)之亞型)、進行性核上眼神經麻痺症、皮質基底核退化症、皮克氏疾病(Pick's disease)、嗜銀顆粒病及帕金森氏病、唐氏症候群(Down syndrome)、腦炎後帕金森氏病、肌緊張性營養不良、C型尼曼-匹克氏病(Niemann-Pick C disease)、拳擊手癡呆、波林特疾病(Blint disease)、朊病毒疾病、肌萎縮性側索硬化、關島型帕金森氏病-癡呆綜合徵、多發性硬化症、青光眼、糖尿病性視網膜病及創傷性腦損傷；及亨廷頓氏病(Huntington's disease)、路易體性癡呆(Lewy body dementia)、夏-馬-圖三氏病(Charcot-Marie-Tooth disease)、遺傳性痙攣性截癱及多系統萎縮症。

如本文中所定義之「tau病變」意謂與腦中原纖維形式之Tau蛋白(纏結)相關的神經退化性疾病。此等疾病包括AD；然而，其他tau病變包括(但不限於)額顳葉型癡呆(包括與染色體17關聯之額顳葉型癡呆伴隨帕金森氏病(FTDP-17)之亞型)、進行性核上眼神經麻痺症、皮質基底核退化症、皮克氏疾病及嗜銀顆粒病。

「埃坡黴素D之治療有效量」意謂埃坡黴素D足以達成以下各者之量：

- (1)減輕或緩解Tau相關病(較佳tau病變，且更佳AD)之至少一種症狀，包括認知功能，諸如癡呆、記憶喪失、理

解力降低、每日從事活動之靈巧性及/或中央調節作用，諸如運動缺陷及視覺；及/或

(2)逆轉、降低、預防、抑制或延遲與Tau相關疾病(較佳tau病變，且更佳AD)相關之認知功能之喪失之發作或加劇，及/或逆轉、降低、預防、抑制或延遲該疾病之一或多種中央調節作用之發作或加劇，包括運動缺陷、視覺等。在本發明之較佳實施例中，埃坡黴素D醫藥化合物不僅可在治療上有效地減輕或緩解Tau相關疾病(較佳tau病變，且更佳AD)之症狀，而且有效地影響基礎疾病(亦即如上所定義之疾病)。

本發明之替代實施例

本發明人已發現，尤其與其他微管穩定劑相比，為治療Tau相關疾病所投與之埃坡黴素D達成驚人之腦滲透性水準、長腦半衰期及選擇性滯留。本發明人進一步發現，在Tau相關疾病(尤其tau病變，及更尤其AD)之治療中，用低劑量之埃坡黴素D可達成明顯增強之治療效果。因此，可投與相對較低劑量之埃坡黴素D用於Tau相關疾病(較佳AD)之有效治療。本發明人因此已開發出採用向患有AD之患者投與埃坡黴素D來治療阿茲海默症的方法。該方法預期在治療上可有效治療人類患者之AD，同時亦產生不太嚴重或較少的副作用(與將微管穩定劑投與人類患者用於化學治療時通常發生的副作用相比)。所減少或排除的此等副作用可包括以下一或多者：胃腸不適(包括(不限於)噁心、腹瀉、口炎/黏膜炎、嘔吐、厭食、便秘及/或腹痛)、

肝中毒、嗜中性白血球減少症、白血球減少症、骨髓抑制、脫髮、肌痛/關節痛、疲乏、肌肉骨骼痛、指甲損害、發熱、頭痛、皮膚脫屑及/或不同等級水準之神經感覺效應。

根據本發明之一替代實施例，提供一種治療阿茲海默症之方法，該方法包含將治療有效量之埃坡黴素D投與患者之步驟，其中埃坡黴素D化合物具有兩種或兩種以上選自如本文中所述之良好腦滲透性、長腦半衰期及高選擇性滯留比之特性，更佳地，其中埃坡黴素D顯示良好腦滲透性、長腦半衰期及選擇性滯留比之所有三種特性(此等術語係於本文中定義)。

根據本發明之另一實施例，提供一種治療阿茲海默症之方法，該方法包含向患者投與治療有效量之埃坡黴素D之步驟，其中埃坡黴素D化合物在投與後具有選自以下兩者或兩者以上之特性：

- 如在給藥後20分鐘至1小時所量測，0.5或大於0.5、更佳0.8或大於0.8、最佳1或大於1之腦滲透性；及/或
- 至少24小時且更佳至少30小時且最佳長達40小時或40小時以上之腦半衰期；及/或
- 給藥後24小時或24小時以後之至少4之腦-肝選擇性滯留比、更佳給藥後24小時或24小時以後之6或6以上之腦-肝選擇性滯留比且最佳給藥後24小時或24小時以後之8或8以上之選擇性滯留比。

根據本發明之另一實施例，提供一種治療阿茲海默症之

方法，該方法包含向患者投與治療有效量之埃坡黴素D之步驟，其中埃坡黴素D化合物在投與後具有選自以下所有三者之特性：

- 如在給藥後20分鐘至1小時所量測，0.5或大於0.5、更佳0.8或大於0.8、最佳1或大於1之腦滲透性；及/或
- 至少24小時且更佳至少30小時且最佳長達40小時或40小時以上之腦半衰期；及/或
- 給藥後24小時或24小時以後之至少4之腦-肝選擇性滯留比、更佳給藥後24小時或24小時以後之6或6以上之腦-肝選擇性滯留比且最佳給藥後24小時或24小時以後之8或8以上之選擇性滯留比。

根據本發明之另一實施例，提供一種治療阿茲海默症之方法，該方法包含向患者投與治療有效量之埃坡黴素D之步驟，其中該方法在治療上可有效治療患者之AD而不產生需要中止使用該方法的藥物誘導之副作用及/或藥物-血漿濃度水準。

根據本發明之另一實施例，提供一種治療阿茲海默症之方法，該方法包含向患者投與治療有效量之埃坡黴素D之步驟，其中該方法在AD治療中提供認知收益、更佳統計上顯著之認知收益而不產生需要中止使用該方法的藥物誘導之副作用及/或藥物-血漿濃度水準。

根據本發明之另一實施例，提供一種治療阿茲海默症之方法，該方法包含向患者投與治療有效量之埃坡黴素D之步驟，其中該方法影響基礎疾病、更佳對基礎疾病起統計

上顯著之影響而不產生需要中止使用該方法的藥物誘導之副作用及/或藥物-血漿濃度水準。

根據本發明之另一實施例，提供一種治療阿茲海默症之方法，該方法包含向患者投與治療有效量之埃坡黴素D之步驟，其中該方法影響基礎疾病、提供認知收益且/或另外具有治療有效性而不產生需要中止使用該方法的副作用，諸如胃腸副作用、白血球減少症及/或神經毒性。

根據本發明之另一實施例，提供一種治療阿茲海默症之方法，該方法包含向患者投與治療有效量之埃坡黴素D之步驟，其中埃坡黴素D之劑量為如本文中所定義之低劑量。

根據本發明之另一實施例，提供一種治療阿茲海默症之方法，該方法包含向患者投與治療有效量之埃坡黴素D之步驟，其中經由靜脈內方式投與埃坡黴素D，且埃坡黴素D在每月給藥週期之累積劑量(亦即，不論時程(例如每週、每兩週、3週給藥、1週停藥等)、在一個月週期期間所投與之化合物之總劑量，)之範圍介於 $0.001\text{-}5\text{ mg/m}^2$ 之間、更佳 $0.01\text{-}5\text{ mg/m}^2$ 之間、甚至更佳 $0.01\text{-}3\text{ mg/m}^2$ 之間、甚至更佳 $0.1\text{-}3\text{ mg/m}^2$ 之間且最佳 $0.1\text{-}1\text{ mg/m}^2$ 之間。

根據本發明之另一實施例，提供一種治療阿茲海默症之方法，該方法包含向患者投與治療有效量之埃坡黴素D之步驟，其中經口投與埃坡黴素D，且以每日計之埃坡黴素D之劑量範圍介於 $0.001\text{-}2\text{ mg/m}^2$ 之間、更佳 $0.01\text{-}2\text{ mg/m}^2$ 之間、甚至更佳 $0.1\text{-}2\text{ mg/m}^2$ 之間、甚至更佳 $0.2\text{-}2\text{ mg/m}^2$ 之

間。

根據本發明之另一實施例，提供一種治療阿茲海默症之方法，該方法包含向患者投與治療有效量之埃坡黴素D之步驟，其中經口投與埃坡黴素D，且以每月計之埃坡黴素D之累積劑量(亦即，不論時程(例如每日、每週、每兩週等)、在一個月週期期間所投與之化合物之總劑量)範圍介於0.03-60 mg/m²之間、更佳0.30-60 mg/m²之間、甚至更佳3-60 mg/m²之間、甚至更佳6-60 mg/m²之間。

根據本發明之另一實施例，提供一種治療阿茲海默症之方法，該方法包含向患者投與治療有效量之埃坡黴素D之步驟，其中埃坡黴素D依照選自每日一次、每週一次、每兩週一次或一月一次之給藥時程經口投與。

根據本發明之另一實施例，提供一種治療阿茲海默症之方法，該方法包含向患者投與治療有效量之埃坡黴素D之步驟，其中埃坡黴素D依照選自每日一次之給藥時程經口投與，且其中埃坡黴素D之日劑量介於0.2至2 mg/m²之間。

根據本發明之另一態樣，根據本發明之上述任一實施例提供治療除AD外之其他tau病變的方法。舉例而言，此等其他tau病變可包括本文中之「tau病變相關疾病」之定義中所提及之一或多種疾病。舉例而言，本發明之一實施例包含根據上述任何實施例使用埃坡黴素D治療AD以及選自以下各者之疾病：額顳葉型癡呆(包括與染色體17關聯之額顳葉型癡呆伴隨帕金森氏病(FTDP-17)之亞型)、進行性

核上眼神經麻痺症、皮質基底核退化症、皮克氏疾病及嗜銀顆粒病、帕金森氏病、唐氏症候群、腦炎後帕金森氏病、肌緊張性營養不良、C型尼曼-匹克氏疾病、拳擊手癡呆、波林特疾病、朊病毒疾病、肌萎縮性側索硬化、關島型之帕金森氏病-癡呆綜合徵、多發性硬化症、青光眼、糖尿病性視網膜病及/或創傷性腦損傷。一較佳實施例包含根據本文中所述之任何實施例使用埃坡黴素D治療tau病變，包括(不限於)選自以下各者之疾病：AD、額顳葉型癡呆(包括與染色體17關聯之額顳葉型癡呆伴隨帕金森氏病(FTDP-17)之亞型)、進行性核上眼神經麻痺症、皮質基底核退化症、皮克氏病及嗜銀顆粒病。

根據本發明之另一實施例，提供可用於治療Tau相關疾病、更佳tau病變、最佳AD的埃坡黴素D。

可預期，以上本發明方法之每一者亦可與一或多種其他本發明方法組合，且以上本發明方法之所有此等不同組合皆涵蓋於本文中。舉例而言，以上本發明方法之一組合可包含治療阿茲海默症之方法，該方法包含向患者投與治療有效量之埃坡黴素D之步驟，其中該方法在治療上可有效治療患者之AD而不產生需要中止使用該方法的藥物誘導之副作用及/或藥物-血漿濃度水準；且其中埃坡黴素D之劑量為經由靜脈內投與之介於 $0.001\text{-}5\text{ mg/m}^2$ 之間之每月累積劑量；且/或其中埃坡黴素D之劑量介於 $0.001\text{至}2\text{ mg/m}^2$ 之間，每日經口投與；且/或其中埃坡黴素D之劑量係選自以上針對經口或靜脈內投與所表示之任一較佳範圍內的劑

量。另一實施例可包含可用於治療人類患者之tau病變的埃坡黴素D，其中使用其在治療上可有效治療AD，且其中埃坡黴素D以每日、每週或間歇給藥週期所投與之0.001-10 mg/m²之間的劑量或0.00003-0.3 mpk之間的劑量投與該患者。

根據本發明之另一實施例，提供一種醫藥調配物，該調配物包含適於投與需要治療AD之人類患者的埃坡黴素D，其中投與該調配物在治療上可有效治療患者之AD而不產生需要中止使用該埃坡黴素D調配物的藥物誘導之副作用及/或藥物-血漿濃度水準。

根據本發明之另一實施例，提供一種醫藥調配物，該調配物包含適於投與人類患者以便治療AD之埃坡黴素D，其中投與該調配物在AD治療中提供統計上顯著之認知收益而不產生需要中止使用該埃坡黴素D調配物的藥物誘導之副作用及/或藥物-血漿濃度水準。

根據本發明之另一實施例，提供一種醫藥調配物，該調配物包含適於投與人類患者以便治療AD之埃坡黴素D，其中該調配物有效地對基礎疾病有影響而不產生需要中止使用該埃坡黴素D調配物的藥物誘導之副作用及/或藥物-血漿濃度水準。

根據本發明之另一實施例，提供如以上實施例中所述之醫藥調配物，其中該調配物包含介於0.0001-10 mg/m²之間、更佳0.001-5 mg/m²之間、更佳0.001-3 mg/m²、甚至更佳0.001-1 mg/m²之間且最佳0.001-0.5 mg/m²之間的埃坡黴

素D之劑量單位。以上本發明醫藥調配物之組合亦涵蓋於本文中。

根據本發明之另一實施例，提供一種用於靜脈內投與人類患者的醫藥調配物，其中該調配物適於傳遞以下範圍內之埃坡黴素D之每月累積劑量：0.001-5 mg/m²之間、更佳0.01-5 mg/m²之間、甚至更佳0.01-3 mg/m²之間、甚至更佳0.1-3 mg/m²之間且最佳0.1-1 mg/m²之間。

根據本發明之另一實施例，提供一種用於經口投與人類患者之醫藥調配物，其中該調配物適於傳遞以下範圍內之埃坡黴素D之每月口服累積劑量：0.03-60 mg/m²之間、更佳0.30-60 mg/m²之間、甚至更佳3-60 mg/m²之間、甚至更佳6-60 mg/m²之間。

根據本發明之另一實施例，提供一種用於經口投與人類患者之醫藥調配物，其中該調配物在醫藥學可接受之溶劑系統中包含埃坡黴素D，該溶劑系統包含約0至50%丙二醇、約1至10% TP GS、約0.5至10%乙醇、約0-90%水及/或約5至85% PEG(諸如PEG-400)。

以上本發明醫藥調配物之每一者的組合亦涵蓋於本文中。

效用

Tau病變

Tau病變為與腦組織中異常形式之Tau蛋白相關的神經退化性疾病。阿茲海默症(AD)為經鑑別為牽涉Tau功能異常的第一種神經退化性疾病。特定而言，神經原纖維纏結

(其存在為AD病理特徵之一)據發現含有Tau蛋白之原纖維、超磷酸化、構形改變形式。隨後鑑別出其他tau病變，包括與染色體17關聯之額顳葉型癡呆伴隨帕金森氏病(FTDP-17)、進行性核上眼神經麻痺症、皮質基底核退化症、皮克氏疾病及嗜銀顆粒病。此外，與Tau異常(包括超磷酸化Tau、Tau聚集體，及/或與H1/H1 Tau單倍型相關)之關聯與以下疾病相關：帕金森氏病、唐氏症候群、腦炎後帕金森氏病、肌緊張性營養不良、C型尼曼-匹克疾病、拳擊手癡呆、波林特疾病、朊病毒疾病、肌萎縮性側索硬化、關島型之帕金森氏病-癡呆綜合徵、多發性硬化症、青光眼、糖尿病性視網膜病及創傷性腦損傷(Avila等人，2004; Bartosik-Psujek and Stelmasiak 2006; Dickey and Petrucelli 2006; Wostyn, Audenaert等人，2008)。

Tau為結合且穩定微管(MT)的50 kDa至75 kDa微管相關蛋白(MAP)。Tau存在六種一級序列變異體，且此等變異體係藉由選擇性剪接所形成(Lace等人，2007)。剪接變異體含有0、1或2個N-末端插入(0N、1N或2N)與微管結合域之3個重複(3R)或4個重複(4R)之組合。重複域係穩定微管所必需的，而重複域之任一側上之脯胺酸富集區係結合至微管所必需的(Preuss等人，1997)。重複域及脯胺酸富集區藉由多種激酶而磷酸化，導致Tau自微管解離。Tau之N-末端自微管表面伸展開，其中咸信此有助於測定微管之間的間隔且有助於運動蛋白動力激活蛋白(dynactin)結合至微管(Magnani等人，2007)。在正常細胞中，存在含量大

致相等的3R Tau與4R Tau。4R Tau比3R Tau更緊密地結合至微管。

Tau在神經元中最豐裕，其中Tau主要位於軸突。Tau在神經元軸突中為主要的微管相關蛋白，而MAP1家族廣泛分布於神經元中，且MAP2家族主要為細胞體樹突。Tau使軸突微管穩定，藉此促進蛋白質、細胞器、脂質、靶向降解之細胞組分之轉運及細胞分子在細胞體與突觸末端之間的雙向信號傳導。Tau功能異常會干擾軸突傳遞且從而影響神經元功能及存活。剔除小鼠中Tau基因之後果不嚴重，但若Tau與MAP 1B基因均移除，則雙基因剔除小鼠在胚胎期死亡。有些MAP之表現之變化在很多情況下(包括發育)似乎可彼此取代(Avila等人，2004)。

在有些情況下，編碼Tau之基因(有時稱MAPT)之突變引起tau病變，尤其在FTDP-17及其他額顳葉型癡呆中。很多FTDP-17突變使活體外與微管之結合減少且/或增強其形成原纖維之傾向(Lace等人，2007)。其他tau病變相關之突變改變Tau之剪接模式以主要形成3R或4R Tau。N-末端上之另一類Tau突變使與動力激活蛋白之結合能力改變(Magnani等人，2007)。所有此等突變皆可能干擾Tau之正常功能。在AD之情況下，認為 β -澱粉樣蛋白(A β)導致Tau異常。

儘管纏結及其他Tau聚集體為tau病變之病理學特徵，但若干跡象表明，異常Tau之某些其他可溶性未鑑別形式具有神經毒性。說明聚集成神經原纖維纏結之Tau不直接致

病的資料包括人腦及小鼠模型之觀測。舉例而言，檢查阿茲海默症腦之不同區域及疾病階段已得出結論：神經元可存活且以神經原纖維纏結發揮功能數十年(Morsch等人，1999)。同樣，人類Tau(hTau)轉殖基因小鼠具有纏結及嚴重神經退化，但具有纏結之神經元未展示病痛之選擇性徵象且數量太少而不能說明在此模型中所觀測之神經元之顯著損失(Andorfer等人，2005)。當誘導Tau-P301L(Santacruz等人，2005)時，Tg4510(誘導性Tau轉殖基因系)展示顯著且快速的纏結形成、神經退化及行為缺陷。當抑制Tau-P301L表現時，神經退化及認知缺陷大大減少，但纏結形成繼續。使用此等小鼠的其他研究證明可溶性Tau多聚體與認知缺陷相關。類似Tau多聚體亦在FTDP-17及AD腦組織中觀測到(Berger等人，2007)。最後，使用過度表現 β -澱粉樣前驅蛋白(APP)之突變體型的轉殖基因小鼠獲得非原纖維Tau與AD之行為缺陷有關之證據(Roberson等人，2007)。將此等APP小鼠與Tau基因剔除小鼠雜交時，形成澱粉樣蛋白斑塊，但行為缺陷及突觸異常得以防止。在此APP品系中，在突觸及行為缺陷存在下未能偵測到Tau異常。總之，此等研究證明異常Tau之可溶性未鑑別型可能為神經毒性物質。

用於治療tau病變之微管穩定化

在神經退化性疾病中Tau之作用存在兩種主要假設。一種假設提出，異常型Tau干擾細胞功能，而另一種假設提出，功能性Tau之損失引起微管失穩(Avila等人，2004；

Lace等人，2007)。基於第二種假設已提出微管穩定劑作為治療tau病變的療法(Lee等人，1994；美國專利第5,580,898號)。除經鑑別與Tau異常有關之彼等疾病外，對軸突傳遞之不當干擾已牽涉多種疾病。此等疾病包括亨廷頓氏疾病、路易體性癡呆、夏-馬-圖三氏病、遺傳性痙攣性截癱及多系統萎縮症(Roy等人，2005)。

為測試微管穩定劑是否使過度表現Tau之小鼠收益，將PrP T44 Tau轉殖基因小鼠用太平洋紫杉醇處理(Zhang等人，2005)。PrP T44小鼠在脊髓神經元中過度表現正常人類0N3R Tau且因Tau過度表現而導致呈現運動缺陷。太平洋紫杉醇處理3個月使運動功能障礙減輕且增加脊髓之腹根中微管之數目及軸突傳遞。儘管太平洋紫杉醇為不良CNS滲透劑，但其能夠影響位於血腦障壁外部之脊髓之腹側灰質前角中的神經元之傳出軸突。有趣地，此模型(球狀體)中之Tau病變未受影響。因為此模型未展示神經元損失，所以微管穩定劑對神經元存活的影响無法評估。此外，不瞭解脊髓tau病變中所觀測之運動收益是否轉化為皮質-海馬tau病變中之認知收益。舉例而言，對於兩種不同tau病變轉殖基因小鼠品系雜交為過度表現肝糖合成酶激酶3(Gsk3)之轉殖基因小鼠觀測到相反結果。在脊髓tau病變模型中，Tau-Gsk3雙基因動物具有減少之病變，而在前腦tau病變模型中，Tau-Gsk3雙基因動物展示增加之病變(Spittaels等人，2000；Terwel等人，2008)。

微管穩定化已為NAP(一種序列NAPVSIPQ之肽)在若干

動物模型中之影響提供解釋。特定而言，在很多細胞及活體內模型(包括大腦中動脈閉塞(中風模型)、頭外傷、膽鹼毒性病變、老年化及胎兒灑精症候群及脂蛋白元E缺乏小鼠之發育障礙)中，NAP具有神經營養性、抗炎性、抗細胞凋亡性及神經保護活性(Gozes及Spivak-Pohis 2006；Gozes 2007)。對於tau病變而言，在3xTg小鼠中，NAP投與3或6個月據報導可減少A β 含量、超磷酸化Tau及肉胺鹽基不溶性Tau，同時增加可溶性Tau(Matsuoka等人，2007；Matsuoka等人，2008)。3xTg小鼠過度表現APP及Tau-P301L(Oddo等人，2003)。NAP活性之機制未經充分定義，但基於微管蛋白結合至NAP親和柱及對所培養神經元中之微管形成及/或穩定化之影響的跡象表明NAP結合至微管(Divinski等人，2006)。亦已知NAP可抑制A β 聚集，因此其在3xTg模型中可對Tau之上游起作用。NAP因能夠在大鼠中防止太平洋紫杉醇誘導之外周神經病變(US 2006/0247168 A1)而不可能充當典型的微管穩定劑。當微管穩定劑(諸如太平洋紫杉醇)以高化學治療劑量投與時，通常發生外周神經病變(Postma等人，1999)，咸信此由外周神經中之微管之過度穩定化及管束化引起。因為NAP在大鼠中防止太平洋紫杉醇誘導之外周神經病變，所以太平洋紫杉醇及NAP不可能經由相同機制起作用。

亦有人提出，微管穩定劑可具有與明顯Tau功能障礙無關的神經保護作用。微管穩定化合物保護所培養之神經元以防多種毒性損傷，包括A β 42、來自可溶性A β 40之氧化

壓力、溶酶體干擾、鈣誘導之毒性及麩胺酸誘導之毒性 (Burke 等人, 1994; Furukawa 1995; Sponne, Fifre 等人 2003; Michaelis 等人, 2005; Butler 等人, 2007)。假設微管不僅在轉運機制中, 而且在細胞信號傳導(尤其鈣信號傳導)調節中, 可能經由質膜附近之大分子信號傳導複合物之錨定起關鍵作用 (Michaelis 等人, 2005)。微管穩定劑亦經證明可藉由減少反應性氧物質產生及使與ATP產生相關之氧化磷酸化基因之表現增強來增強線粒體功能 (Wagner 等人, 2008)。亦已知微管穩定劑可在癌細胞中之有絲分裂紡錘體之分裂期間廣泛影響細胞信號傳導 (Bergstralh及Ting 2006)。

腦滲透性微管穩定劑

微管穩定劑針對tau病變及其他神經退化性疾病之治療標靶為腦中之微管。然而, 微管穩定劑會引起外周組織中毒(諸如抑制細胞增殖、尤其抑制胃腸道及造血細胞增殖)及外周神經病變。因此高度需要鑑別與外周組織相比、具有優良腦滲透性及腦中之選擇性滯留的微管穩定劑, 以便使針對tau病變及其他神經退化性疾病的治療指數最大化。化合物能夠以相對於外周組織之更長半衰期結合至腦組織為高度所要特性。

紫杉烷系列之微管穩定劑為多種多重抗藥性轉運體(諸如P-糖蛋白(PGP)、ATP結合卡匣、多重抗藥性蛋白及抗乳癌蛋白)之受質。此等多重抗藥性轉運體防止化合物積累於腫瘤及腦組織中。多個實驗室已以有限的成功研究合成

不為多重抗藥性轉運體、尤其PGP之受質的紫杉烷(Minderman等人, 2004; Rice等人, 2005; Ballatore等人, 2007)。亦已嘗試PGP抑制劑與太平洋紫杉醇之共投與(Fellner等人, 2002)。此等努力已展示一些紫杉烷進入腦內之結果, 例如投與後僅4小時達成太平洋紫杉醇在腦中之含量為PGP抑制劑在腎中之含量或KU-237之腦含量(μM 範圍內)之1/30(Michaelis 2006)。因此, 使用PGP抑制劑並非一種增強紫杉烷之腦滲透性的誘人方法。

製備方法及調配物

埃坡黴素D為已知化合物, 其已重新經化學合成且亦已經由纖維堆囊菌菌株之醱酵在纖維堆囊菌之醱酵中作為副產物而分離。埃坡黴素D之完整合成報導於頒予Danishefsky等人之美國專利6,242,469中, 且製備埃坡黴素D及其他埃坡黴素化合物的其他方法可見於美國專利第6,204,388號、美國專利第6,288,237號、美國專利第6,303,342號、WO 03/072730、US 6,410,301; US 2002/137152A1; US 6,867,333、美國專利申請公開案2006 004065中, 該等文獻各自以引用方式併入本文中。用於製備埃坡黴素D之合成方法已經表徵對於全面醫藥開發不實用。一種替代製備方法係使用設計成可提供埃坡黴素B之相對較大產量的改良型菌株進行埃坡黴素B之大規模醱酵, 例如, 如美國專利7,172,884B2中所述, 且接著可將埃坡黴素B去環氧化以提供埃坡黴素D。去環氧化方法(尤其針對埃坡黴素D所應用之去環氧化方法)已為人熟知且亦可

見於頒予 Danishefsky 等人的美國專利 6,965,034(WO 99/43653)中。

製備埃坡黴素 D 之其他方法係闡述於美國專利 6,998,256B2 及 US 7,067,286(「*Methods of Obtaining Epothilone D using Crystallization and/or By the Culture of Cells in the Presence of Methyl Oleate*」)中，其描述使用黃色黏球菌 (*Myxococcus xanthus*) 菌株 K111-40-1 及 K111-72.4.4 及 / 或 Kosan Biosciences Inc.(現為 BMS) 為改良埃坡黴素 D 之製備所開發的其他重組菌株，以生物合成方式製備埃坡黴素 D。用於製備埃坡黴素 D 之醱酵及純化條件亦闡述於美國專利 6,998,256B2 及 US 7,067,286 以及美國專利 6,583,290、6,858,411、6,921,650 及 7,129,071 中，該等各專利受讓於 Kosan(現為 BMS，本發明之受讓人)且以引用方式併入本文中。亦參見 Lau 及 Licari 等人，Kosan Biosciences, 「*Optimizing the Heterologous Production of Epothilone D in Myxococcus xanthus*,」 *Biotechnology & Bioengineering*，第 78 卷，第 3 期，2002 年 5 月 5 日，第 280-88 頁。

可用於製備埃坡黴素 D 的其他方法係說明於美國專利申請案第 12/118,432 號中。本申請案揭示將化學與生物合成步驟組合來製備埃坡黴素，諸如埃坡黴素 D。舉例而言，提供一種方法，其經由重組細胞之醱酵獲得可用於埃坡黴素合成之一或多種中間物且接著將如其中所揭示之使用重組細胞生物合成之中間物經由化學合成法轉化為最終埃坡

黴素化合物。

用於本發明之方法中的埃坡黴素D可以此項技術中已知之不同方式(通常藉由靜脈內(IV)投與、皮下投與、經口投與等)投與患者。舉例而言，埃坡黴素D可用醫藥學上可接受之媒劑或稀釋劑調配。包含埃坡黴素D的醫藥組合物可使用適於所要投藥模式之固體或液體媒劑、稀釋劑及添加劑以典型方式調配。

用於非經腸投藥之例示性組合物包括可含有例如適當非毒性非經腸可接受之稀釋劑或溶劑(諸如甘露糖醇、1,3-丁二醇、水、林格氏溶液(Ringer's solution)、等張氯化鈉溶液(0.9%氯化鈉注射液[生理鹽水]或5%右旋糖注射液))或其他適當分散劑或濕潤劑及懸浮劑(包括合成單酸甘油酯或二酸甘油酯及脂肪酸)的可注射溶液或懸浮液。醫藥學上可接受之組合物及/或投與本發明之化合物之方法可包括使用共溶劑，包括(但不限於)乙醇、N,N-二甲基乙醯胺、丙二醇、甘油及聚乙二醇，例如聚乙二醇300及/或聚乙二醇400。界面活性劑(醫藥學上可接受之表面活性劑)可藉由降低其表面張力來用於增強化合物展布性或濕潤性，該等界面活性劑包括(不限於)d- α -生育酚聚乙二醇1000丁二酸酯(TPGS)、CREMOPHOR[®]、SOLUTOL HS 15[®]、聚山梨醇酯80、聚山梨醇酯20、泊洛沙姆(poloxamer)、吡咯啉酮(諸如N-烷基吡咯啉酮(例如N-甲基吡咯啉酮)及/或聚乙烯吡咯啉酮)；然而，使用CREMOPHOR[®]具有缺點且不佳。調配物亦可包含使用一或多種「緩衝劑」(例如，在添加

增量酸或鹼後賦予介質抵抗有效酸度或鹼度之變化之能力的成份)，包括(不限於)磷酸鈉、檸檬酸鈉、二乙醇胺、三乙醇胺、L-精胺酸、L-離胺酸、L-組胺酸、L-丙胺酸、甘胺酸、碳酸鈉、胺丁三醇(a/k/a參[羥基甲基]胺基甲烷或Tris)及/或其混合物。

投與埃坡黴素化合物之調配物(包括避免使用非離子型界面活性劑(諸如CREMAPHOR®)的調配物)係描述於先前技術中。舉例而言，可供靜脈內投與使用的包含丙二醇與乙醇之混合物的調配物係描述於美國專利6,683,100中。其他調配物可包含聚乙二醇/無水乙醇之混合物，或丙二醇或甘油/無水乙醇之混合物。舉例而言，頒予BMS的WO 2006/105399(PCT/US2006/011920)揭示包括約30至70體積%無水乙醇分別與30至70體積% PEG 300及/或PEG 400之混合物的調配物，其可用鹽水或右旋糖輸注液稀釋用於靜脈內投與，且可經由靜脈內投與而用於將埃坡黴素D投與患者。在此等調配物中，較佳使乙醇之量最小化以避免與乙醇投與相關的副作用。熟習此項技術者容易獲得最佳溶劑比。

為投與埃坡黴素D及類似物所特別設計的其他較佳調配物係揭示於頒予Kosan(現為BMS)的美國專利第7,091,193號中(亦以US 2005/0148543公開)。此專利描述其中將埃坡黴素D與羥丙基- β -環糊精組合於乙醇水溶液中、接著凍乾的調配物。實施例包括將約10 mg埃坡黴素D與約0.4 g羥丙基- β -環糊精於60%第三丁醇水溶液中組合使用、接著凍

乾(根據本發明，可針對個別較低劑量單位之製備依比例減少成份)。接著可使用水、乙醇及/或乙二醇(可包括丙二醇、聚乙二醇400、聚氧乙烯去水山梨糖醇單油酸酯(在商標 TWEEN 80 名下出售))及相關氧化烴將凍乾活性成份「餅」復水以供靜脈內投與。應瞭解可使用不同鏈長及分子量之乙二醇(例如聚乙二醇1000、其他 TWEEN 化合物)。

舉一更特定實例而言，可根據本發明用於將埃坡黴素D傳遞至患者的調配物可包含約0至50%丙二醇、約1至10%TPGS、約0.5至10%乙醇、約0-90%水及/或約5至85%PEG，諸如PEG-400。更特定而言，調配物可包含：

50%丙二醇、10%TPGS、10%乙醇、30%水；或

10%丙二醇、40%PEG-400、5%TPGS、5%乙醇、40%水；或

85%PEG-400、10%TPGS、5%乙醇；或

8.5%PEG-400、1%TPGS、0.5%乙醇、90%水。

根據本發明投與埃坡黴素D之一較佳方法包括經口投與。美國專利6,576,651揭示使用一或多種醫藥學上可接受之酸中和緩衝劑經口投與埃坡黴素的方法。然而，較佳投與方法包括使用錠劑或膠囊，包括固體錠劑或膠囊或液體或明膠填充膠囊。埃坡黴素D之固體錠劑或膠囊可用一或多種腸溶包衣來製備。腸溶包衣多年來用於阻止藥物自經口可攝入之劑型中釋放。視組成及/或厚度而定，腸溶包衣在其開始崩解且容許藥物在較低胃部或小腸之上部中緩慢釋放之前的所需時段抵抗胃酸。某些腸溶包衣之實例係

揭示於美國專利第 6,224,910 號、US 5,225,202、US 2,809,918、US 3,835,221、US 4,728,512 及 US 4,794,001 中，該等專利各自以引用方式併入本文中。

旨在使用埃坡黴素 D 的腸溶包衣錠劑係描述於美國專利申請案第 11/281,834 號中，該文獻以引用方式併入本文中，其可用於調配埃坡黴素之錠劑或膠囊以實施本發明。此調配物包括使用活性成份(亦即埃坡黴素 D)所塗覆之非活性基質粒子，諸如糖珠粒，接著藉由腸溶包衣聚合物及/或一或多個亞塗層囊封。接著將珠粒包括於膠囊內。用於調配埃坡黴素 D 錠劑或膠囊的腸溶包衣可包括腸溶包衣聚合物，諸如羥丙基甲基纖維素鄰苯二甲酸酯、聚乙酸乙烯酯鄰苯二甲酸酯、纖維素乙酸酯鄰苯二甲酸酯、丙烯酸共聚物及甲基丙烯酸共聚物。可用於形成腸溶包衣之甲基丙烯酸共聚物之一實例為 Eudragit.TM. L-30-D 55 水性共聚物分散液，其包含具有約 1:1 之游離羧基與乙酯基團之比率及約 250,000 之平均分子量的由甲基丙烯酸與丙烯酸乙酯所衍生之陰離子型共聚物，其係以含有 30 重量%固體的水性分散液供應。Eudragit.TM. L-30-D 55 水性共聚物分散液係由 Rohm-Pharma Co., Germany 供應。

在製備腸溶包衣珠粒以形成埃坡黴素 D 之膠囊時，可能需要包括一或多個位於埃坡黴素 D 核心與腸溶包衣之間以使彼等層之間的接觸最小化的亞塗層。舉例而言，適於形成亞塗層的物質包括澱粉；明膠；糖，諸如蔗糖、葡萄糖、右旋糖、糖蜜及乳糖；天然及合成膠，諸如阿拉伯

膠、海藻酸鈉、甲基纖維素、羧甲基纖維素，及聚乙烯吡咯啉酮(PVP)聚合物及共聚物，諸如PVP-PVA共聚物；纖維素，諸如乙基纖維素、羥丙基纖維素及羥丙基甲基纖維素；聚乙二醇；及蠟。亞塗層可進一步包含一或多種增塑劑，諸如聚乙二醇、丙二醇、檸檬酸三乙酯、三醋精(triacitin)、鄰苯二甲酸二乙酯、癸二酸三丁酯或其組合。

必要或需要時，埃坡黴素D之錠劑或膠囊視情況可包含其他物質，諸如調味劑、防腐劑或著色劑。

埃坡黴素D之適當劑量可由熟習此項技術者考量本文中所述之結論、結合典型因素(諸如患者之體重、患者之身體狀況等)加以判定。此劑量應含有有效治療tau病變(諸如AD)之量的埃坡黴素D。一般而言，為治療tau病變(包括AD)所投與之埃坡黴素D之劑量範圍視為介於0.0001-10 mg/m²之間，更佳介於0.001-5 mg/m²之間。用於經口及靜脈內投與的其他更佳劑量範圍如上闡述於替代實施例部分中。為與先前結合埃坡黴素及其類似物所投與之化學治療劑量比較之目的，本文中使用單位mg/m²。然而，考量接受(或已接受)藥物之動物種類及體重及/或身高可容易地將單位mg/m²換算為mpk。舉例而言，對於重約70 kg之人類患者而言，0.0001-10 mg/m²之劑量範圍換算為約0.00003-0.3 mpk。有關劑量換算的其他資訊可見於www.rphworld.com/viewlink-25045.html及Cancer Chemother Repts 50 (4):219(1966)中。

藥物可每日、每週或間歇投與。舉例而言，藥物可投與

三週、隨後停藥一週，或投與兩週、隨後停藥一週，或如熟習此項技術者所判定依據其他給藥時程投與。所選特定劑量視投藥模式及所選給藥方案而定。一較佳時程為每日一次口服給藥時程。當每次施藥之間隔期(通常在靜脈內投藥情況下)指定更長時，各單位劑量可大於所提供之每日劑量。

顯然，繼I期試驗之後，在某些II期臨床試驗(包括對於各種劑量而言9至150 mg/m²之劑量擴大)中為治療癌症投與患者之埃坡黴素D之劑量為4週中3週每週(亦即在每4週之第1日、第8日及第15日)以90分鐘輸注投與100 mg/m²。預期用於治療AD之藥物之劑量比在II期臨床試驗中為治療癌症患者所投與之埃坡黴素D之治療劑量小約十倍且更可能小約100倍且或許小超過1000倍，但給藥時程及投藥模式將影響劑量。

藉由以下參考隨附圖式的非限制性實例進一步詳細說明本發明。以下方法係用於實例(繼方法之描述之後)所述之實驗中。

實驗方法(實例1至5)

最近描述Tg4510(一種侵害性Tau轉殖基因小鼠品系)之產生(Santacruz等人，2005；Berger等人，2007)。經使用鈣調蛋白激酶II促進劑，Tg4510品系表現Tau-P301L(一種存在於FTDP-17中的Tau突變體)。Tg4510品系在以下若干態樣中具有獨特性：

- 1.高Tau表現量(相對於小鼠Tau高13倍)；

2. 將Tau表現限制於額顳葉(從而避免以在脊髓中表現Tau為特徵之上述Tau品系之運動缺陷); 及
3. 在4.5個月可量測之認知缺陷之後為快速且廣泛的神經退化(5.5個月損失60% CA1神經元)。

藥物製備供Tg4510研究之用

用26號針將於10%乙醇、90%水中之埃坡黴素D(化合物I)10 ml/kg以0 mpk(媒劑)、1 mpk及10 mpk腹膜內給與。在100%乙醇中製備10倍儲備溶液，且臨給藥前稀釋。將小鼠分3個群組給藥且將資料合併以針對媒劑、1 mpk及10 mpk群組分別得到12、9及15之最終N。在化學通風櫃中對小鼠給藥。

用於Tg4510研究之注射及行為測試時程

此研究使用Tg4510小鼠。此等小鼠為在前腦中過度表現人類P301L突變體Tau之tau病變之經充分表徵之侵害性模型(Santacruz等人，2005；Berger等人，2007)。小鼠藉由異常形式之Tau之積累來表徵，包括類似於在AD腦中所觀測之彼等纏結的纏結、行為缺陷及最終神經元損失。在9週齡(+/- 15日)時，用磷酸鹽緩衝鹽水單模擬劑注射使小鼠適應處理(在化學通風櫃內執行)。接著將小鼠在保持於化學通風櫃內之籠中放養48小時。48小時時段之後，將小鼠轉移至潔淨籠中且進行一組行為測試。

接著將小鼠在莫瑞斯水迷宮(MWM)中測試六日。基於使用探測試驗2環跨越指數之評分進行行為分析之結果，將小鼠分配至各處理組中。小鼠給藥開始時為11週齡(+/- 15

日)且每週給藥一次。第一週給藥之後，執行一組神經病學及身體習性測試(Modified SHIRPA)，包括分析體位、顫抖、皮毛外觀、步態、接觸逃避、體位被動性(positional passivity)、上肢抓力及翻正反射。每週每次給藥後48小時，另外檢查小鼠之皮毛外觀、上肢抓力、翻正反射且是否有任何明顯的刻板行為。在研究過程中未觀測到明顯中毒、體重減輕或運動缺陷之跡象。

第八次給藥(19週齡 $\pm$ 15日)之後，再次在MWM中測試小鼠六日。行為測試之後，恢復給藥直至動物在收穫時為5.5月齡。根據 Institutional Care and Animal Use Committee及National Institutes of Health標準放養並處理動物。

莫瑞斯水迷宮方案

在兩個時點(一次在給藥之前且一次在給藥開始後兩個月)於莫瑞斯水迷宮(MWM)中測試小鼠。於另一個測試室中執行第二輪水迷宮測試。在測試之前，使小鼠適應實驗室2-3日。將小鼠置放於1.5 m直徑之水迷宮中，其中16 cm直徑平台置於水表面下方0.5-1.0 cm處。用非毒性白漆使得水不透明且將水溫調節於22-25℃之間。

每日對小鼠進行4次試驗，每次試驗長達90秒，每次試驗後為10秒平台休止期。若小鼠在90秒內未發現平台，則輕輕地將小鼠導引至平台且容許在此逗留10秒。測試室各自具有大的外部記號以當小鼠找到探測平台時容許小鼠定向。將小鼠置於熱燈下以防止每次試驗後體溫過低。試驗

間隔時間在25至45分鐘範圍內。使用HVS Image Advanced Tracker VP200軟體(Buckingham, UK)追蹤小鼠且測定直到達平台之總移動距離。

對獲自五次試驗之路徑長度之統計分析包括對方差之重複量測分析。統計模型包括作為動物間條目的「處理」(0、1 mpk或10 mpk之埃坡黴素D(化合物I))及如對每隻動物重複量測的5次試驗。若分析指示處理之顯著效應或處理與試驗相互作用，則使用Dunnett檢驗法，對照媒劑組比較1 mpk群組與10 mpk群組之間的差異。使用Dunnett檢驗法分析各象限中之探測路徑長度及各象限中之平台跨越次數。在所有情況下，將1 mpk及10 mpk群組與媒劑組對比。所有計算皆在Windows XP Professional操作系統下、用SAS® 9.1版進行。

獲取訓練執行5個連續日。在第6日之最後獲取訓練後18小時執行探測試驗。在此等60秒試驗期間，將平台移除，且量測小鼠在目標象限中所通過之距離及先前探測平台所位於之區域之跨越次數。監測所有動物之游泳速度；與不影響運動行為的藥物一致，藥物處理未引起游泳速度之任何變化。在處理組之間，漂浮時間(< 5 cm/sec之游泳速度)亦不改變。

組織收集

藉由在5.5個月使頸椎脫臼、隨後摘頭將小鼠無痛處死。立即移除腦且沿中線分成兩個半球。將右半球置放於20 mL之4%三聚甲醛(處死當天新鮮製備)中且在4℃下儲存

隔夜。次日，將腦轉移至含有20 mL TBS(pH 7.4, 20 mM TRIS、100 mM NaCl)之試管中且接著在4°C下儲存直至處理。將右半球包埋於石蠟中，依5微米切片且固定於帶正電荷的玻璃載片上。將載片在60°C烘箱中乾燥隔夜且在室溫下儲存直至染色。將左半球在乾冰上冷凍(2分鐘以內)。

Gallyas方法

Gallyas染色法係用於偵測銀陽性神經原纖維纏結及營養不良型軸突。將固定於玻璃載片上之石蠟包埋的薄切片(5微米)去石蠟且經由依序培育於以下溶劑中來再水合：二甲苯(兩次，每次各10分鐘)、100%乙醇(兩次，每次各10分鐘)、95% MeOH/5% H₂O₂(30分鐘)、95%乙醇(兩次，每次各5分鐘)、80%乙醇(兩次，每次各5分鐘)、50%乙醇(兩次，每次各5分鐘)及水(兩次，每次各5分鐘)。接著將切片置放於5%過碘酸中5分鐘，於dH₂O中洗滌兩次，每次5分鐘，且置放於鹼性碘化銀溶液(含有1%硝酸銀)中1分鐘。

將切片在0.5%乙酸中洗滌10分鐘，於新鮮製備之顯影液中置放15分鐘且再次在0.5%乙酸中洗滌5分鐘。在於去離子水中沖洗之後，將切片於0.1%氯化金中置放5分鐘且再次在去離子水中沖洗。將切片在1%硫代硫酸鈉(大蘇打)中培育5分鐘且接著在自來水中沖洗。在0.1%核快紅中執行對比染色2分鐘。接著將切片在自來水中沖洗，在一系列等級之乙醇(95%、100%、100%)中脫水2分鐘，且在二甲苯3次更換液(每次10滴)中清潔。最後，將Cytoseal 60固定介質及蓋玻片添加至載片上(Richard-Allan Scientific,

Kalamazoo, MI)。使用非參數Kruskal-Wallis檢驗法、隨後使用Graphpad Prism 4之Dunn之多次對比檢驗法執行統計分析。利用參數ANOVA、隨後Dunnett之事後對比檢驗法得到相同結果。

免疫組織化學

將石蠟包埋之薄切片(5微米)去石蠟且在二甲苯之3次更換液、100%乙醇之兩次更換液及95%乙醇之1次更換液中再水合，隨後於水中沖洗。藉由在Black and Decker Steamer(# HS900型)中將10 mM檸檬酸鈉緩衝劑(pH 6.0)中之載片熱蒸30分鐘且接著冷卻30分鐘來執行抗原修復。藉由在90% MeOH中之0.6%過氧化氫中培育15分鐘來移除內源性過氧化酶活性。在TBS中洗滌後，將載片在TBS中之10%正常山羊血清中阻斷一小時。此後將稀釋於阻斷溶液中之AT8磷酸化Tau抗體(Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, Goedert等人，1995)在4℃下培育隔夜。在TBS中洗滌3次之後，將載片在室溫下用抗小鼠IgG抗體培育1小時。在TBS中洗滌後，使用Vectastain ABC Elite套組(Vector Labs Burlingame, CA)偵測信號1小時，隨後使用Vector labs之二胺基聯苯胺試劑進行偵測。將細胞核用蘇木精對比染藍，隨後將載片浸入Scott自來水取代物(Surgipath # 02900, Richmond, IL)中2次且接著在自來水中沖洗。接著將切片在一系列等級之乙醇(95%、100%、100%)中脫水，接著在二甲苯之3次更換液中清潔。接著添加蓋玻片及Cytoseal 60固定介質。

體視學

使用 Aperio ScanScope(Aperio Technologies, Inc., Vista, CA)將 Nissl 染色載片掃描且數位化。在高解析度下捕獲完整腦切片之影像且以光譜內檔案(Aperio 軟體)儲存。為處理影像，使用提取工具捕獲包括完整海馬的 $4,000 \times 4,000$ 像素之區域且另存為輸入 Metamorph(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)中的 JPEG 檔案以便定量分析海馬之 CA1 及 CA3 區域內的細胞損失。改良版之單切片解剖方法(Moller 等人, 1990)因其適用於石蠟包埋之薄組織切片而用於量化細胞損失。為獲得相對較大量細胞，當將石蠟包埋之腦在前齒之間徑向及約 0.75 mm 橫向切割時收集每個第五切片。使用 Metamorph 軟體繪製三個區域且對每個切片計數。每個影像使用相同區域且對每隻動物計數 5 個切片(相隔 5 個載片)。使用 ANOVA、隨後藉由 Dunnett 之事後對比檢驗法執行統計分析。

實例 1

如上所述使用埃坡黴素 D(化合物 I)進行 Tg4510 實驗之設計係描繪於圖 1 中。在此實驗中，用 MWM 測試 2.5 個月之小鼠且將其分配至三個群組中之一者(N=12、13、16)，以便測定各群組類似的預處理表現。在 2.5 個月開始，將媒劑單獨或媒劑與 1 mpk 或 10 mpk 埃坡黴素 D(化合物 I)一起經由每週腹膜內(IP)注射投與小鼠。在 4.5 個月，再次用 MWM 測試小鼠以測定處理對認知表現的影響。5.5 個月後，將小鼠無痛處死且收集腦用於後續分析。

在腫瘤異種移植實驗中，研究者通常在5日期間每隔一日以30 mpk腹膜內投與埃坡黴素D(化合物I)，產生150 mpk之累積劑量。(Chou等人，1998)。因此，如本文中所述，用1 mpk埃坡黴素D(化合物I)處理12週視為比腫瘤學劑量低約100倍，其中以10 mpk處理視為比在此類實驗中所投與之典型腫瘤學劑量低約10倍。當每週一次用1 mpk及10 mpk埃坡黴素D(化合物I)腹膜內給與小鼠2或6個月時，在多種組織(包括肝、腎、心臟、睪丸、腎上腺、骨髓、外周神經、胃、及小腸及大腸)中未觀測到組織病理學異常。

圖2展示在埃坡黴素D(化合物I)或媒劑給與之前，對2.5個月之Tg4510小鼠進行MWM測試之結果。在給藥之前，在獲取或在探測試驗期間，各群組之間不存在統計顯著差異，基於此將動物分組。換言之，圖2以對照組展示各群組之預處理表現類似。

接著將1 mpk、10 mpk埃坡黴素D(化合物I)及媒劑每週一次腹膜內投與Tg4510小鼠，且繼此每週給藥(12週)之後，在4.5個月執行MWM測試。報導於圖3中之結果揭示，經1 mpk埃坡黴素D(化合物I)處理的小鼠能夠比經媒劑處理之小鼠更快速地(亦即，以統計顯著方式($p < 0.01$))探出MWM中隱藏之平台。與媒劑組相比，10 mpk處理組展示改善傾向。此等發現展示，相對於媒劑處理，用埃坡黴素D(化合物I)處理Tg4510小鼠引起統計上顯著之認知功能改善，且此外，與較高劑量(10 mpk)相比，1 mpk之較

低劑量產生改良之結果。顯然，本發明者在本文中進一步證明，基於1 mpk與10 mpk劑量之對比之單獨小鼠實驗，使用此範例之暴露量具有劑量依賴性。因此，10 mpk群組之行為改善並非因10 mpk處理動物中之藥物含量之意外降低而相對於1 mpk群組減少。

實例2

圖4展示將1 mpk、10 mpk埃坡黴素D(化合物I)及媒劑給與4.5個月齡之Tg4510小鼠歷時2個月訓練5日後18小時之探測資料。在圖4中，「TQ」表示目標象限，「AR」表示相鄰右象限，「AL」表示相鄰左象限且「OP」表示相反象限。各象限中兩種表現之量測(亦即，路徑長度%(A)及平台跨越次數(B))係指示於圖4中。對目標象限之偏好說明，小鼠記得在研究之獲取期期間平台所處之位置。如由資料可知，對於路徑長度(A)與平台跨越次數(B)量測而言，媒劑處理之小鼠以對TQ、AR、AL及OP每一者產生類似結果之幾率表現，且其不展示象限偏好。然而，與媒劑組相比，經1 mpk(化合物I)處理之小鼠在記憶方面(例如在回憶已位於TQ之平台方面)展示兩種量測之統計顯著差異。此外，與媒劑組相比，10 mpk群組在路徑長度%量測(A)方面展示顯著更大的表現，但使用平台跨越次數量測(B)時未展示顯著更大的表現。

實例3

為測定埃坡黴素D(化合物I)對腦病理學之影響，檢查來自以上實驗之Tg4510小鼠之亞群(N=5)之腦組織。先前研

究已展示，5.5個月之Tg4510小鼠之海馬之CA1區中之神經元損失約60%(Santacruz等人，2005)。因此，本發明者首先檢查海馬之CA1區中之神經元數目，隨後檢查CA3區。圖5描繪經媒劑、1 mpk埃坡黴素D(化合物I)及10 mpk埃坡黴素D(化合物I)處理後，5.5個月之小鼠之海馬之CA1及CA3區中的神經元計數。

驚人地，如圖5中可見，經1 mpk埃坡黴素D(化合物I)處理的Tg4510小鼠具有比經媒劑處理之動物實質上更多的CA1神經元。實際上，經媒劑處理之小鼠與經1 mpk埃坡黴素D(化合物I)處理之小鼠之間的差異展示，1 mpk埃坡黴素D(化合物I)以與媒劑之統計顯著差異($p < 0.01$)防止神經元損失。經10 mpk埃坡黴素D(化合物I)處理之小鼠具有介於經媒劑處理之小鼠與經1 mpk埃坡黴素D(化合物I)處理之小鼠之間的中等CA1神經元含量。此等結果符合且強化實例1及實例2之行為研究之結果，亦即，證明10倍更低劑量在tau病變治療中不斷地產生明顯改善之結果。

對於海馬之CA3區中之細胞總計數亦觀測到類似傾向，與經媒劑處理之小鼠相比，1 mpk與非轉殖基因小鼠之間存在明顯差異。經處理群組中CA3區之細胞計數升高明顯小於CA1區(其中在當前年齡下更易神經退化)中之細胞計數升高；然而，此等結果證明對腦之多個區域中之基礎疾病的影響。

實例4

亦檢查處理對CA1區中之磷酸化Tau染色的影響。AT8抗

體識別202殘基與205殘基上磷酸化之Tau。超磷酸化Tau之此形式大大富集於AD及其他tau病變患者腦中(Goedert等人, 1995)。

圖6展示如上所述經媒劑、1 mpk埃坡黴素D(化合物I)及10 mpk埃坡黴素D(化合物I)處理之Tg4510小鼠之AT8磷酸化Tau染色。磷酸化Tau染色以深黑色指示。驚人地, 經1 mpk埃坡黴素D(化合物I)處理之小鼠展示少得多的磷酸化Tau染色(尤其與經媒劑處理之小鼠相比)。經10 mpk埃坡黴素D(化合物I)處理之小鼠展示中度磷酸化Tau染色。

實例5

藉由Gallyas銀染色法檢查埃坡黴素D(化合物I)處理對皮質中之神經原纖維纏結形成的影響。圖7展示如上所述經媒劑、1 mpk埃坡黴素D(化合物I)及10 mpk埃坡黴素D(化合物I)處理之Tg4510小鼠之額皮質中神經原纖維纏結之Gallyas銀染色。在圖7中, 銀染色為黑色, 且「NT」代表非轉殖基因, 顯示與血管相關之某些非特異性染色。如圖7中可見, 經1 mpk埃坡黴素D(化合物I)處理之小鼠具有比經媒劑處理之小鼠低得多的神經原纖維纏結含量; 圖7B中定量研究中所有動物之神經原纖維纏結含量。在1 mpk劑量下觀測到對皮質與海馬中之相關疾病的明顯影響, 10 mpk劑量再次展示小幅改善傾向。

如以上實例中所述, 與未處理之Tg4510小鼠相比, Tg4510小鼠經埃坡黴素D(化合物I)處理可防止認知衰退且隨時間改善認知功能。此外, 作為對相關疾病影響之量度

(亦即細胞數、磷酸化Tau染色及銀染色測試)的神經病變測試證明，經埃坡黴素D處理在防止神經元損失、降低異常Tau累積及防止神經原纖維纏結上，與未處理之Tg4510小鼠相比，均呈統計上顯著之程度。因此，本發明在本文中認為其最先發現且證明在經可穩定微管之化合物(亦即埃坡黴素D)處理後，可預防認知降低、Tau病變及神經退化。此外，在本文中，本發明發現經埃坡黴素D處理後可達成的治療效果可具有非線性劑量依賴性。特定而言，在所報導之各種行為及神經病變研究中重複獲得一致的劑量依賴結果，其中在降低十倍劑量(1 mpk)下，在所有量測中均獲得比媒劑明顯增強之有利效果，而更高劑量(10 mpk)展示傾向於大部分量測之效果且在MWM探針試驗之一量測值中展示與媒劑呈統計上顯著差異。

實例6

在不同團式靜脈內實驗中之埃坡黴素D表現(與其他微管穩定劑相比)

在一組實驗中，在以1至12 mpk之劑量團式靜脈內投與裸小鼠(每組3隻小鼠)之尾靜脈內之後，評估伊沙匹隆(氮雜埃坡黴素B類似物)、化合物II(BMS 310705，21-胺基埃坡黴素F)及埃坡黴素D(化合物I)且與太平洋紫杉醇對比。使用10% CREMAPHOR®、10%乙醇及含有5%右旋糖之80%水，將四種化合物各自以5 ml/kg給與。為測定各種化合物之相對腦滲透性，在有機相萃取之後，使用液相層析以及串聯質譜術(LC/MS/MS)在單一劑量之後量測不同時

間下之化合物之血漿、腦及肝含量，如圖8A-8D及表1中所報導。不量測經太平洋紫杉醇處理之小鼠的肝含量。

圖8A展示以1 mpk靜脈內投與之後小鼠之血漿、腦及肝中之化合物II在不同時間下之濃度。

圖8B展示以12 mpk靜脈內投與之後小鼠之血漿、腦及肝中之伊沙匹隆在不同時間下之濃度。

圖8C展示以4 mpk靜脈內投與之後小鼠之血漿及腦中之太平洋紫杉醇在不同時間下之濃度。

圖8D展示以5 mpk靜脈內投與之後小鼠之血漿、腦及肝中之埃坡黴素D(化合物I)在不同時間下之濃度。

資料展示，如藉由腦與肝之化合物含量比率所量測，尤其在初始分布及血漿藥物清除之後之更晚時間，化合物II及伊沙匹隆具有中等的腦含量(相對於外周組織)。如所預期，太平洋紫杉醇腦含量低。詳言之，給藥之後至少24小時，太平洋紫杉醇腦含量不超過血漿藥物含量。意外地，如藉由在給藥後6小時及24小時時超過肝含量之高腦含量所證明，埃坡黴素D(化合物I)具有非常良好之腦滲透性與選擇性滯留之組合特性。此證明，相對於外周組織(包括血漿及組織，最顯著為作為潛在中毒部位的肝)，埃坡黴素D(化合物I)意外地滯留於標靶器官(腦)中。

更特定而言，表1報導四種微管穩定劑(太平洋紫杉醇、化合物II(BMS 310705)、伊沙匹隆及埃坡黴素D)在使用裸小鼠圍式靜脈內給藥(如表中所報導之不同mpk)之後的腦滲透性對比資料，此資料亦反映於圖8A-8D中。在各種化

合物給與後，腦血漿比通常因自血漿中快速損耗及藥物藉由結合至微管滯留於腦中而隨時間增大。接著腦血漿比因滯留於腦中的化合物更少而降低，諸如觀測到化合物II在6小時與24小時之間展示減少。不論腦血漿比隨時間之變化，當將給藥後短時間(例如，給藥後20-60分鐘之間)之資料對比時，此比率提供化合物之內在腦滲透性之量測。在本文之表中，藉由首先計算個別動物之比率且接著測定該等比率之平均值來計算腦血漿比及腦肝比；本文之表中報導由此所得之平均值。

表 1

化合物	劑量 (mpk)	時間(小 時)	血漿濃度 (nM)	腦濃度 (nM)	腦血漿比	腦肝比
太平洋紫杉醇	4	1	447	47	0.10	NQ
		6	43	16	0.37	NQ
		24	12	15	1.25	NQ
化合物II	1	6	3	6.8	2.1	0.01
		24	1	1.3	1.2	0.02
伊沙匹隆	12	0.12	11,236	579	0.05	0.05
		0.33	3057	495	0.16	0.09
		1	390	284	0.73	0.07
		2	171	360	2.1	0.11
		6	53	371	7.0	0.30
		24	8	236	30	1.2
埃坡黴素D	5	6	6	2794	470	149
		24	1	2046	2046	1204

參看表1，如藉由給藥後1小時0.1之腦血漿比所證明，太平洋紫杉醇為不良腦滲透劑；伊沙匹隆因給藥後1小時0.73之腦血漿比而為比太平洋紫杉醇更強的腦滲透劑(表1)。在給藥後6-24小時時，腦血漿比反映內在腦滲透性與腦中之滯留(半衰期)。埃坡黴素D給藥後6小時及24小時之資料展示腦血漿比比伊沙匹隆增大至少60倍，伊沙匹隆在

此組中具有次最高的腦血漿比。

腦肝比不僅提供腦滯留與半衰期之更單一量測，而且提供選擇性滯留(與外周組織相比)。不同於無細胞血漿，因為肝(選擇肝之主要原因在於其經良好灌注且傾向於具有比多種其他外周組織更高之含量)含有可滯留化合物之微管，所以腦肝比具有重要作用。與腦血漿比(其中最佳量測時間在20-60分鐘範圍內)相比，較佳比較給藥後更晚時間(例如24小時或24小時以後)之腦肝比，此時血漿含量明顯降低，從而容許對特異性滯留於腦及肝細胞內的藥物進行更準確的量測。腦肝比之對比展示，相對於肝，埃坡黴素D高度選擇性滯留於腦中。舉例而言，埃坡黴素D之24小時腦肝比為1204，與同組實驗中伊沙匹隆(1.2)及化合物II(0.02)之更低比率相比，此為非常高的比率。

在一單獨實驗中，使用如上所述之類似方案，繼團式靜脈內投與之後，評估更長時間(亦即長達168小時)之埃坡黴素D血漿及腦濃度，例外之處為使用中年三重轉殖基因小鼠(Oddo等人，2003)、在不同科學工作者操作下。此實驗之結果報導於下表2及圖10中。

表2(僅埃坡黴素)

時間(小時)	血漿濃度(nM)	腦濃度(nM)	腦/血漿比	腦/肝比
0.05	25,100	1127	0.04	0.42
0.17	2003	595	0.28	1.1
.33	549	529	0.86	0.38
1	325	422	1.2	0.42
3	70	468	6.1	0.30
6	43	141	3.3	0.24
16	0.8	210	265	NQ
24	0.9	82.7	89	NQ

96	<LLQ (0.6 nM)	25.2	NQ	NQ
168	<LLQ (0.6 nM)	16.3	NQ	NQ

此等資料證明埃坡黴素D單次給藥後長期滯留於腦組織中至少168小時(7日)。表1及表2中埃坡黴素D之絕對腦含量及比率可不同；重要的係應注意，表1及表2中所述之實驗分別由不同科學工作者使用不同小鼠品系在不同時間下執行。本發明者已注意到，靜脈內注射時間之小差異可改變確切的暴露量分布、尤其最大血漿濃度，此將影響腦濃度，且此外，靜脈內注射時間可因不同科學工作者而異。因此，在單次實驗內比較化合物最佳。儘管出現此問題，但微管穩定劑之整體傾向及相對特徵在彼此對比時通常為一致的，且此等結果展示，與化合物II、伊沙匹隆及太平洋紫杉醇相比，埃坡黴素D為腦滲透性及滯留實質上得以改善的高度腦滲透劑。舉例而言，即使將獲自兩個單獨實驗的資料對比，埃坡黴素D在給藥後6小時之腦血漿比在表1中為2046且在表2中為89，但仍明顯地大於表1中太平洋紫杉醇(0.37)及化合物II(2.1)之比率。因為表2所述之研究中的肝含量低於24小時時之較低量化水準(在此研究中，LLQ為49 nM)，所以此時腦肝比不可量化(NQ)。

WO 03/074053 A1廣泛地揭示某些埃坡黴素用於治療腦疾病之用途。根據彼公開案，在以5 mpk團式靜脈內投與之後的開頭40分鐘期間量測三種埃坡黴素(不包括埃坡黴素D)之血漿含量及腦含量。WO 03/074053 A1中所報導之其中鑑定為化合物1(4,8-二羥基-16-(1-甲基-2-(2-甲基-4-噻唑基)-乙基)-1-氧雜-7-(1-丙基)-5,5,9,13-四甲基-環十六-

13-烯-2,6-二酮)及太平洋紫杉醇的腦及血漿濃度資料係轉載於下表1中。此資料係以單位 $\mu\text{g/ml}$ 及分鐘報導於WO 03/074053中；將此資料換算為nM且以nM及hr報導於表3中用於對比之目的。本發明者在本文中未獨立地證明此資料(根據表3)，而係基於彼公開案中所提供之數值(如換算為hr及nM)將其轉載。

表 3

化合物	時間(小時)	血漿濃度(nM)	腦濃度(nM)	腦血漿比
化合物III	0.17	1540	580	0.4
	0.33	1150	1540	1.3
	0.67	580	1150	2
太平洋紫杉醇	0.17	940	<LLQ	NQ
	0.33	700	<LLQ	NQ
	0.67	230	<LLQ	NQ

因為此資料僅依40分鐘報導，所以此研究中僅腦滲透性可藉由檢查腦血漿比來評估。儘管未揭示偵測含量，但太平洋紫杉醇因腦含量低於LLQ而據推測具有不良腦滲透性(符合表1中之資料)。需要在給藥後至少24小時量測之腦滯留及選擇性腦滲透性(與外周組織相比)之量測未論述於WO 03/074053 A1中。

實例 7

經口投與之後的埃坡黴素D表現

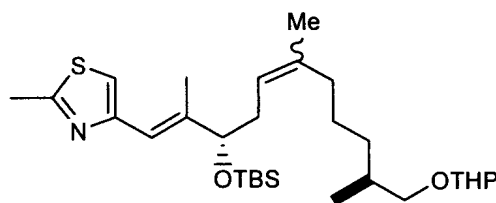
為了進一步分析埃坡黴素D在tau病變治療中之表現，在兩個實驗中評估化合物，兩個實驗包括藉由經口管飼法分別以10 mpk及35 mpk投與C57BL/6小鼠。此外，在此等實驗中亦評估作為4,8-二羥基-16-(1-甲基-2-(2-甲基-4-噻唑基)-乙烯基-1-氧雜-7-(1-丙基)-5,5,9,13-四甲基-環十六-13-

烯-2,6-二酮的化合物(在本文中為化合物III)且在埃坡黴素D與化合物III之間進行並列式對比。以下首先報導製備及分離化合物III之實驗細節，且接著描述生物學活體內資料。

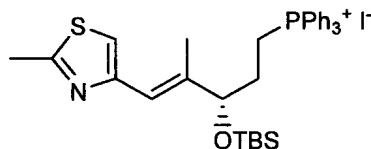
一般實驗資訊：

在以下程序中，所有溫度均以攝氏度列出。在Bruker 500、400或300 MHz儀器上運作¹H-NMR光譜，且參照四甲基矽烷($\delta=0.0$)，以ppm(δ)報導化學位移。所有蒸發操作皆在減壓下進行。除非另有說明，否則LC/MS分析在Waters儀器上進行，該Waters儀器使用採用4 mL/min之流率、使用MeOH中之0.1% TFA/水梯度[0-100%歷時3分鐘，4分鐘實驗時間]的Phenomenex-Luna 3.0×50 mm S 10逆相管柱及設定於220 nm的UV偵測器，或使用採用5 mL/min之流率、使用10 mM乙酸銨乙腈/水梯度[5-95%歷時3分鐘，4分鐘實驗時間]的Phenomenex-Luna 3.0×50 mm 10u逆相管柱及設定於220 nm的UV偵測器。除非另有說明，否則使用40-63目矽膠管柱或使用Biotage Horizon系統或使用特定HPLC設備及條件進行純化。

步驟 1：



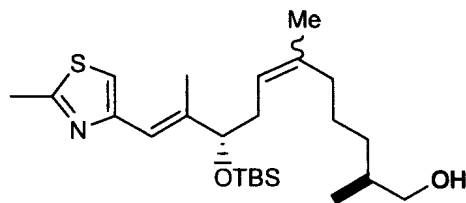
合成中間物-1



磷鹽 A

在 0℃ 下將雙(三甲基矽烷基)醯胺鈉(63.7 mL, 63.7 mmol)添加至磷鹽 A(根據 Nicolaou 等人, J. Am. Chem. Soc. 1997, 119, 7974-7991 所製備; 40.5 g, 57.9 mmol)於 300 mL THF 中之溶液中, 且將此溶液攪拌 5 分鐘。快速添加 (6S)-6-甲基-7-(四氫-2H-吡喃-2-基氧基)庚-2-酮(根據 US7,326,798 所製備; 14.54 g, 63.7 mmol)於 50 mL THF 中之溶液, 且將混合物溫熱至室溫隔夜。將反應混合物傾注入飽和 NH₄Cl 中且用 EtOAc(300 mL)萃取。將有機層用鹽水洗滌, 經硫酸鎂乾燥, 過濾且真空蒸發。將粗產物經由矽膠管柱(EtOAc/己烷 0-10%)純化, 產生 16 g(30.7 mmol, 53%)合成中間物-1。¹H NMR(500 MHz, CDCl₃) δ ppm 6.90 (s, 1H), 6.43 (s, 1H), 5.20-5.05 (m, 1H), 4.6-4.5 (m, 1H), 4.15-4.00 (m, 1H), 3.9-3.8 (m, 1H), 3.6-3.3 (m, 2H), 3.25-3.05 (m, 1H), 2.70 (s, 3H), 2.35-2.15 (m, 2H), 2.05-1.90 (m, 5H), 1.90-1.75 (m, 1H), 1.75-1.65 (m, 3H), 1.65-1.45 (m, 6H), 1.45-1.25 (m, 3H), 1.15-1.00 (m, 1H), 1.00-0.80 (m, 12H), 0.05--0.05 (dd, 6H)。MS (LCMS) [M+H]=522.44, [M+Na]=544.42。

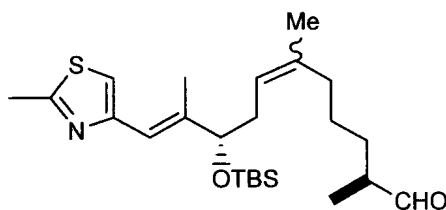
步驟 2：



合成中間物-2

在室溫下將對甲苯磺酸單水合物(5.83 g, 30.7 mmol)添加至合成中間物-1(16 g, 30.7 mmol)於300 mL乙醇中之溶液中。將混合物攪拌7小時，傾注入飽和NaHCO₃中且用二氯甲烷(300 mL)萃取兩次。將合併有機層用鹽水洗滌且經硫酸鎂乾燥。過濾且移除溶劑後，使用Biotage系統(EtOAc/己烷，10-45%)純化粗物質，產生9.8 g(22.4 mmol, 73%)合成中間物-2。¹H NMR(500 MHz, CDCl₃) δ ppm 6.92-6.90 (m, 1H), 6.45-6.40 (m, 1H), 5.15-5.00 (m, 1H), 4.10-4.00 (m, 1H), 3.50-3.30 (m, 2H), 2.69 (s, 3H), 2.35-2.15 (m, 2H), 2.1-1.9 (m, 5H), 1.75-1.50 (m, 5H), 1.50-1.25 (m, 3H), 1.10-0.75 (m, 13H), 0.05--0.05 (dd, 6H)。MS (LCMS) [M+H]=438.29, [M+Na]=460.24。

步驟3：

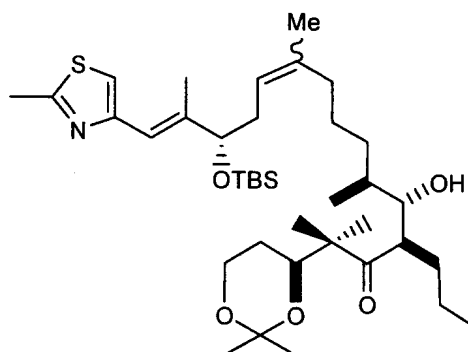


合成中間物-3

在-78℃下將DMSO(4.88 mL, 68.8 mmol)緩慢添加至草酰氯(2.94 mL, 33.6 mmol)於100 mL二氯甲烷中之溶液中。攪拌10分鐘後，添加100 mL二氯甲烷中之合成中間

物-2(7 g, 15.99 mmol)且繼續攪拌30分鐘。添加TEA 11.14 mL, 80 mmol), 且將混合物溫熱至 -10°C 。添加飽和 NaHCO_3 後, 將反應混合物用二氯甲烷(100 mL)萃取兩次。將合併有機層用鹽水洗滌, 經 Na_2SO_4 乾燥, 過濾且蒸發以得到黃色油狀粗產物。用15% EtOAc/己烷溶劑溶離、經由短 SiO_2 管柱過濾, 且真空濃縮, 得到7 g(16 mmol, 100%)無色油狀之合成中間物-3。 ^1H NMR(500 MHz, CDCl_3) δ ppm 9.6-9.5 (d, 1H), 6.9 (m, 1H).6.4 (m, 1H), 5.2-5.1(m, 1H), 4.1-4.0 (m, 1H), 2.7 (s, 3H), 2.3-2.2 (m, 3H), 2.2-1.8 (m, 5H), 1.7-1.5 (m, 4H), 1.4-1.2 (m, 3H), 1.1-1.0(m, 3H), 0.87 (s, 9H), 0.03 (s, 3H), 0.01 (s, 3H)。

步驟4：

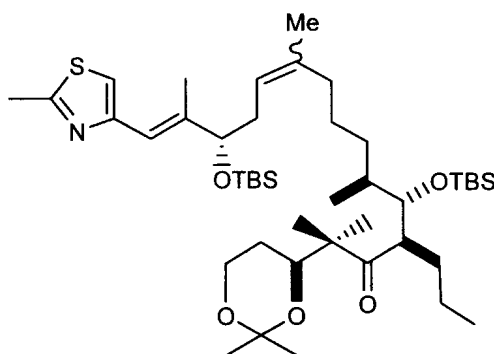


合成中間物-4

沿用 Klar 等人之方法 (Angew. Chem. Int. Ed. 2006, 45, 7942-7948)。在 -78°C 下向 200 mL THF 中添加 70 mL 之 0.5 M 新製 LDA(35 mmol), 隨後添加 8.48 g(35 mmol)(S)-2-(2,2-二甲基-1,3-二噁烷-4-基)-2-甲基庚-3-酮 (Klar 等人, Synthesis 2005, 2, 301-305)。在 -30°C 下繼續攪拌30分鐘。冷卻至 -78°C 後, 添加 1.0 M ZnCl_2 (35.0 mL, 35 mmol) 之溶

液，且將所得溶液攪拌20分鐘。歷經20分鐘添加合成中間物-3(7 g, 16.06 mmol)於50 mL THF中之溶液。將混合物在-78℃下另攪拌8小時。將混合物傾注入飽和NH₄Cl中且用EtOAc(300 mL)萃取兩次。將有機層用鹽水洗滌，經Na₂SO₄乾燥且真空濃縮。使用SiO₂管柱(EtOAc/己烷，0-10%)純化殘餘物，得到7.5 g(11 mmol, 69%)作為首先分離及主要丁醛醇異構體的合成中間物-4。¹H NMR(500 MHz, CDCl₃) δ ppm 6.90 (m, 1H), 6.43 (m, 1H), 5.15-5.05 (m, 1H), 4.15-4.00 (m, 2H), 4.00-3.80 (m, 2H), 3.50-3.40 (m, 1H), 3.30-3.20 (m, 1H), 2.85-2.75 (m, 1H), 2.69 (s, 3H), 2.35-2.15 (m, 2H), 2.10-1.90 (m, 5H), 1.75-0.75 (m, 41H), 0.05--0.05 (d, 6H)。MS (LCMS) [M+H]=678.47, [M+Na]=700.44。

步驟5：

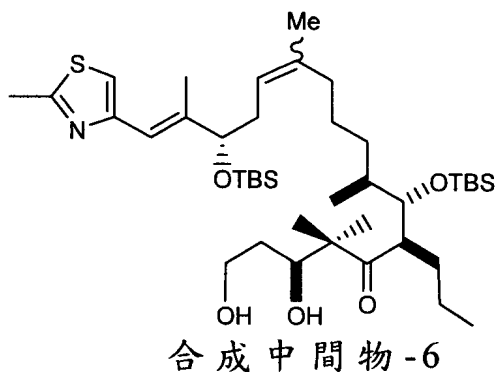


合成中間物-5

在0℃下將2,6-二甲基吡啶(6.87 mL, 59 mmol)添加至合成中間物-4(8 g, 11.8 mmol)於200 mL二氯甲烷中之溶液中，隨後添加第三丁基二甲基矽烷基三氟甲磺酸酯(8.13 mL, 35.4 mmol)。將混合物溫熱至室溫隔夜，傾注入飽和

NaHCO₃中且用二氯甲烷萃取。將有機層用鹽水洗滌，經Na₂SO₄乾燥且真空移除溶劑。將殘餘物經由SiO₂管柱(EtOAc/己烷，5-10%)純化以產生合成中間物-5(7.8 g，9.84 mmol，83%)。¹H NMR(500 MHz, CDCl₃) δ ppm 6.90 (s, 1H), 6.44 (s, 1H), 5.15-5.05 (m, 1H), 4.25-4.20 (m, 1H), 4.10-4.00 (m, 1H), 4.00-3.90 (m, 1H), 3.90-3.75 (m, 1H), 3.75-3.70 (m, 1H), 3.10-3.00 (, 1H), 2.70 (s, 3H), 2.35-2.15 (m, 2H), 2.00-1.85 (m, 5H), 1.70-0.75 (m, 50H), 0.10--0.05 (m, 12H).MS (LCMS) [M+H]=792.48, [M+Na]=814.44。

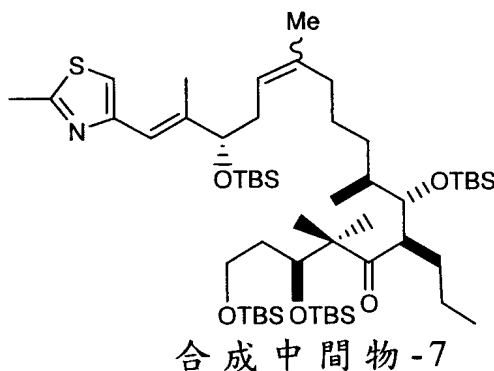
步驟6：



在室溫下將對甲苯磺酸單水合物(1.8 g，9.44 mmol)添加至合成中間物-5(6.8 g，8.58 mmol)於100 mL乙醇中之溶液中。攪拌6小時之後，添加飽和NaHCO₃且將混合物用EtOAc萃取。將有機層用鹽水洗滌，經Na₂SO₄乾燥且真空濃縮。使用1 g合成中間物-5重複反應。使用Biotage系統(EtOAc/己烷，10-40%)純化合並粗產物以產生合成中間物-6(5 g，6.65 mmol，68%)。¹H NMR(500 MHz, CDCl₃) δ ppm 6.9 (s, 1H), 6.44 (s, 1H), 5.15-5.05 (m, 1H), 4.15-4.00 (m, 1H), 4.00-3.90 (m, 1H), 3.90-3.80 (m, 1H), 3.75-3.65

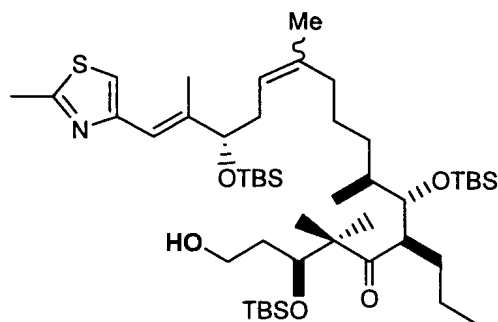
(m, 1H), 3.65-3.55 (m, 1H), 3.10-2.90 (m, 2H), 2.69 (s, 3H), 2.25-2.15(m, 2H), 2.00-0.75 (m, 50H), 0.10--0.05 (m, 12H)。MS (LCMS) [M+H]=752.42。

步驟 7：



在 0℃ 下將 2,6-二甲基吡啶 (7.7 mL, 66.5 mmol) 添加至合成中間物-6 (5 g, 6.65 mmol) 於 200 mL 二氯甲烷中之溶液中，隨後添加第三丁基二甲基矽烷基三氟甲烷磺酸酯 (9.16 mL, 39.9 mmol)。將混合物溫熱至室溫隔夜，接著傾注入飽和 NaHCO₃ 中且用二氯甲烷萃取。將有機溶劑蒸發且將粗混合物經由具有 EtOAc/己烷 (10-20%) 之 SiO₂ 層過濾以得到油狀合成中間物-7 (6.9 g, 100%)。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 6.9 (s, 1H), 6.44 (s, 1H), 5.20-5.05 (m, 1H), 4.10-4.00 (m, 1H), 3.95-3.85 (m, 1H), 3.80-3.75 (m, 1H), 3.70-3.60 (m, 1H), 3.60-3.50 (m, 1H), 3.10-3.00 (m, 1H), 2.69 (s, 3H), 2.25-2.15 (m, 2H), 2.00-0.75 (m, 67H), 0.10--0.05 (m, 24H)。

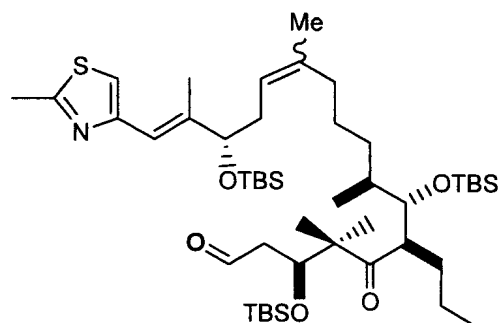
步驟 8：



合成中間物-8

在 0℃ 下將 (+/-)-樟腦-10-磺酸 (1.18 g, 5.1 mmol) 添加至合成中間物-7 (5 g, 5.1 mmol) 於 80 mL 二氯甲烷與 40 mL MeOH 中之溶液中。將混合物在 0℃ 下攪拌 6 小時，傾注入飽和 NaHCO₃ 中且用二氯甲烷萃取。將有機層用鹽水洗滌，經 Na₂SO₄ 乾燥且濃縮以產生油狀合成中間物-8 (3.6 g, 4.15 mmol, 81%)。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 6.90 (s, 1H), 6.44 (s, 1H), 5.2-5.1 (m, 1H), 4.1-4.0 (m, 2H), 3.85-3.75 (m, 1H), 3.7-3.6 (m, 2H), 3.1-3.0 (m, 1H), 2.7 (s, 3H), 2.3-2.2 (m, 2H), 2.0-1.9 (m, 6H), 1.7-1.5 (m, 5H), 1.5-1.3 (m, 3H), 1.3-1.1 (m, 6H), 1.1-1.0 (m, 4H), 1.0-0.8 (m, 35H), 0.1--0.1 (m, 18H)。MS (LCMS) [M+H]=866.49。

步驟 9：

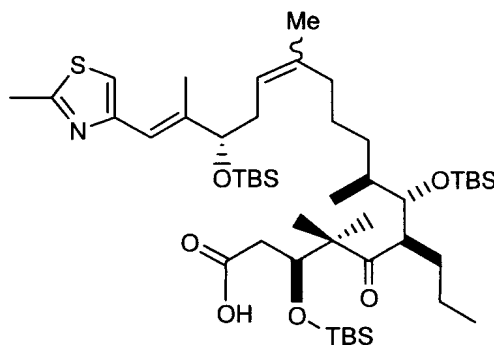


合成中間物-9

在 -78℃ 下將 DMSO (1.24 mL, 17.5 mmol) 添加至草醯氯

(0.8 mL, 9.14 mmol)於40 mL二氯甲烷中之溶液中。攪拌10分鐘後，添加合成中間物-8(3.6 g, 4.15 mmol)於40 mL二氯甲烷中之溶液。30分鐘後，添加TEA(3.76 mL, 27.0 mmol)且歷經2小時將反應混合物溫熱至0°C。添加飽和NaHCO₃且將混合物用二氯甲烷萃取。將有機層用鹽水洗滌，經Na₂SO₄乾燥且真空濃縮以得到油狀合成中間物-9(3.6 g, 4.16 mmol, 100%)。¹H NMR(500 MHz, CDCl₃) δ ppm 9.77 (m, 1H), 6.9 (s, 1H), 6.44 (s, 1H), 5.3 (s, 1H), 5.2-5.1 (m, 1H), 4.5-4.4 (m, 1H), 4.1-4.0 (m, 1H), 3.8-3.7 (m, 1H), 3.1-3.0 (m, 1H), 2.7 (s, 3H), 2.6-2.1 (m, 4H), 2.0-1.9 (m, 4H), 1.7-1.5 (m, 4H), 1.5-1.3 (m, 5H), 1.3-1.1 (m, 5H), 1.1-1.0 (m, 3H), 1.0-0.8 (m, 35H), 0.1--0.1 (m, 18H)。

步驟10：

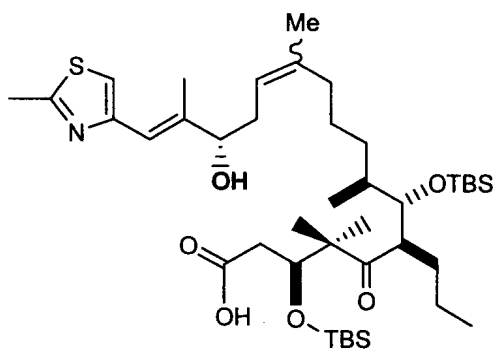


合成中間物-10

在0°C下向合成中間物-9(3.6 g, 4.16 mmol)於120 mL t-BuOH與85 mL THF中之溶液中添加30 mL水、2-甲基丁-1-烯(18.5 g, 264 mmol)、磷酸二氫鈉(1.6 g, 13.2 mmol)及亞氯酸鈉(2.98 g, 26.4 mmol)。在0°C下攪拌2小時後，將混合物傾注入飽和Na₂S₂O₃溶液(100 mL)中且用EtOAc(300

mL)萃取三次。將合併有機層用鹽水洗滌，經 Na_2SO_4 乾燥且真空濃縮。使用Biotage系統(EtOAc/己烷，10-50%)純化殘餘物以得到無色油狀之合成中間物-10(2.8 g，3.18 mmol，72%)。 ^1H NMR(500 MHz, CDCl_3) δ ppm 6.93 (s, 1H), 6.66 (s, 0.5H), 6.46 (s, 0.5H), 5.25-5.0 (m, 1H), 4.4-4.3 (m, 1H), 4.2-4.0 (m, 1H), 3.9-3.7 (m, 1H), 3.2-3.0 (m, 1H), 2.7 (d, 3H), 2.6-2.4 (m, 1H), 2.4-2.0 (m, 3H), 2.0-1.0 (m, 23H), 1.0-0.8 (m, 35H), 0.1--0.1 (m, 18H). MS (LCMS) $[\text{M}+\text{H}]=881.53$ 。

步驟 11：

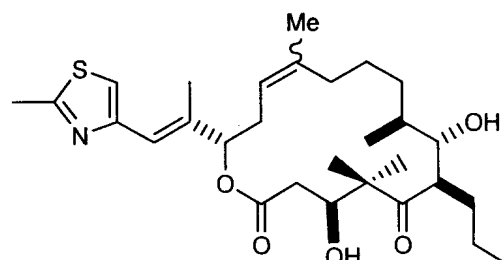


合成中間物-11

在室溫下將TBAF(42 mL，1.0 M)添加至合成中間物-10(2.8 g，3.18 mmol)於5 mL THF中之溶液中。將混合物攪拌6小時，接著傾注入飽和 NH_4Cl 中且用EtOAc(300 mL)萃取兩次。將合併有機層用HCl(1.0 N，200 mL)、飽和 NaHCO_3 及鹽水洗滌且經 Na_2SO_4 乾燥以得到黏油狀之合成中間物-11(2.6 g，3.3 mmol，100%)。 ^1H NMR(500 MHz, CDCl_3) δ ppm 6.9 (s, 1H), 6.6-6.5 (m, 1H), 5.2-5.1 (m, 1H), 4.4-4.3 (m, 1H), 4.15-4.05 (m, 1H), 3.8-3.7 (m, 1H), 3.4-3.2

(m, 1H), 3.1-3.0 (m, 1H), 2.8-2.7 (m, 2H), 2.66 (d, 3H), 2.5-2.4 (m, 1H), 2.4-2.3 (m, 2H), 2.3-2.2 (m, 1H), 2.0-0.8 (m, 46H), 0.1-0.0 (m, 12H). MS (LCMS) [M+H]=766.3, [M-H₂O]=748.3。

步驟 12：



化合物 III 之 13 E/Z 混合物

在室溫下向合成中間物-11(2.6 g, 3.3 mmol)於 27 mL THF 中之溶液中添加 TEA(2.36 mL, 17 mmol)，隨後添加 2,4,6-三氯苄醯氯(3.31 g, 13.57 mmol)。將反應混合物攪拌 20 分鐘，接著用 260 mL 甲苯稀釋。將甲苯溶液歷經 4 小時緩慢添加至 DMAP(3.86 g, 31.6 mmol)於 1400 mL 甲苯中之經攪拌混合物中，之後，TLC 指示反應完成。添加 HCl(4.0 N, 12.5 mL)，且將溶劑真空移除。使用 Biotage 系統(EtOAc/己烷，0-10%)部分地純化殘餘物，得到含有單矽烷基產物的混合物且上述混合物(13 E/Z 異構體)包括化合物 III(1.1 g)。MS (LCMS) (520.2, 634.2)。使此物質經受去保護作用而不進一步純化。

步驟 13：化合物 III

在 -20°C 下將 1 mL TFA/CH₂Cl₂(20% v/v)添加至上述反應混合物(102 mg)之溶液中。將反應混合物轉移至冰浴中且

攪拌1小時。將溶劑真空移除，添加小份甲苯，接著再蒸發，得到白色固體。使用125 mg經部分純化之混合物重複相同反應。將兩種反應殘餘物合並且經由SiO₂管柱(EtOAc/ 烷，20-35%)純化，得到白色固體(180 mg)。將白色固體溶解於5 mL MeOH中，且藉由HPLC(Varian, Dynamax PDA-2偵測器；Waters C18管柱；A：具有0.05% TFA之水；B：具有0.05% TFA之乙腈，等度溶離)純化。收集到兩個主峰(峰值1：73.4 mg，38%；及峰值2：41.8 mg，22%)。

因觀測到C-14烯性質子與C-13甲基之間的NOE，峰值1經測定為13-Z(1-氧雜編號)異構體。¹H NMR(500 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.14 (s, 1H), 6.75 (s, 1H), 5.15-5.05 (m, 1H), 5.05-5.00 (m, 1H), 4.45-4.35 (m, 1H), 3.65-3.55 (m, 1H), 3.35-3.25 (m, 1H), 2.92 (s, 3H), 2.55-2.45 (m, 2H), 2.35-2.25 (m, 2H), 2.25-2.15 (m, 1H), 2.00 (s, 3H), 1.90-1.80 (m, 1H), 1.80-1.65 (m, 5H), 1.60-1.45 (m, 2H), 1.45-1.30 (m, 5H), 1.25-1.15 (m, 3H), 1.05-0.95 (m, 6H), 0.90-0.85 (t, 3H)。MS (LCMS) [M+H]=520.3。

因C-14烯性質子與C-13甲基之間NOE之缺乏，峰值2經測定為13-E異構體(以下實例7實驗之化合物III)。¹H NMR(500 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.03 (s, 1H), 6.65 (s, 1H), 5.3-5.2 (m, 1H), 5.05-5.00 (m, 1H), 4.45-4.40 (m, 1H), 3.65-3.60 (m, 1H), 3.4-3.3 (m, 1H), 2.77 (s, 3H), 2.6-2.3 (m, 4H), 2.15-2.05 (m, 1H), 1.99 (s, 3H), 1.95-1.85 (m, 1H),

1.8-1.7 (m, 2H), 1.57 (s, 3H), 1.50-1.35 (m, 4H), 1.29 (s, 3H), 1.25-1.10(m, 3H), 1.0-0.9 (m, 6H), 0.9-0.8 (t, 3H)。

MS (LCMS) [M+H]=520.3。

對埃坡黴素D及化合物III之口服活體內研究

使用 85% PEG-400、10% TPGS 及 5.0% 乙醇將各種化合物(根據以上剛剛所述之實驗製備並描述的埃坡黴素D及化合物III)以 10 ml/kg 給與每組三隻小鼠(10 mpk及35 mpk)。在給藥後之不同時間間隔，使用組織均質化、乙腈萃取及液相層析串聯質譜術(LC/MS/MS)量測血漿、腦及肝化合物含量。研究結果總結於表4及表5中，且35 mpk研究結果亦報導於圖9中。特定而言，表4報導埃坡黴素D(化合物1)及化合物III在經口投與(10 mpk)後直至給藥(對於化合物III，直至仍可偵測之給定LLQ之程度)後24小時在腦中之濃度，且表5報導且圖9繪製埃坡黴素D(化合物1)及化合物III在經口投與(35 mpk)後直至給藥(對於化合物III，再次直至可偵測之程度)後5至24小時在腦中之濃度。(因為對於化合物III僅可偵測一種腦濃度值，所以未對表4資料製圖)。在以下表4及表5(其中數值<LLQ)中，LLQ數值係註明於括號中。

表 4

化合物	時間(小時)	血漿濃度 (nM)	腦濃度(nM)	腦/血漿比	腦/肝比
化合物III	1	12.3	9.6	0.8	0.1
	5	1.3	<LLQ (3.7 nM)	NQ	NQ
	7	1.2	<LLQ (3.7 nM)	NQ	NQ

	24	<LLQ (0.2 nM)	<LLQ (3.7 nM)	NQ	NQ
埃坡黴素D	1	15.1	10.6	0.7	0.4
	3	3.9	7.0	1.8	1.3
	4	2.5	9.9	4.0	3.4
	8	1.4	6.4	4.6	1.8
	13	0.1	6.3	47.3	5.1
	24	0.2	9.1	44.5	8.0
	48	<LLQ (0.1 nM)	5.4	NQ	NQ
	96	<LLQ (0.1 nM)	3.0	NQ	NQ

表 5

化合物	時間(小時)	血漿濃度 (nM)	腦濃度(nM)	腦/血漿比	腦/肝比
化合物III	1	47.7	67.7	2.3	0.4
	5	3.0	4.6	1.4	NQ
	24	0.7	<LLQ	NQ	NQ
埃坡黴素D	1	52.7	61.3	1.1	0.5
	5	3.6	76.9	25.2	11.3
	24	<LLQ (0.5 nM)	118	NQ	18.7

正如所見，對於化合物III，更晚時間(亦即在1小時或大於1小時之後)之組織含量展示化合物III含量在腦組織中快速降低。因此，如在兩個實驗中觀測到在24小時缺乏可量測之腦含量，化合物III具有不良腦滯留。埃坡黴素D經口給與揭示在1小時時0.7及1.1之腦血漿比，反映良好的腦滲透性。不同於化合物III，埃坡黴素D之腦含量維持超過24小時(表2、表4及表5，圖9-10)。埃坡黴素D經口給與之腦肝比說明，靜脈內給藥後，埃坡黴素D選擇性滯留於腦中，符合表1及表2中之資料。特定而言，埃坡黴素D之腦肝比在給藥後24小時、在10 mpk及35 mpk下分別為8及19(表4及表5)。此等數值反映埃坡黴素D之非常高的選擇性腦肝滯留比。

實例 8

靜脈內、經口及腹膜內投與之後的埃坡黴素D半衰期

資料

為進一步評估埃坡黴素D之特性以便治療tau病變，經由多種研究計算埃坡黴素D之腦半衰期，且結果報導於表6中。為計算長半衰期化合物之準確的腦半衰期，需要在單次給藥之後對若干種半衰期進行量測。經由表2中所述之研究(其中量測單次給藥之後7日內的腦濃度)，靜脈內給藥後之埃坡黴素D(化合物I)之腦半衰期為61小時(表6)。多種投藥途徑及多種劑量後之小鼠腦半衰期平均為46.0+/- 7小時(表6)。類似地，靜脈內給藥後之大鼠腦半衰期為31小時(表6)。相比之下，如圖9中所示，化合物III之腦半衰期明顯比埃坡黴素D大大縮短。作為埃坡黴素D腦半衰期之另一說明，提供將研究結果繪圖的圖10(資料報導於上表2中)，圖10展示在利用5 mpk團式靜脈內投藥法給藥後長達175小時之時期的腦濃度水準。

表 6

物種	投藥途徑	劑量(mpk)	半衰期(小時)
小鼠	靜脈內	5	61
小鼠	經口	10	46
小鼠	腹膜內	1	44
	腹膜內	10	41, 37, 45, 46
大鼠	靜脈內	1	31

引用文獻清單

Altmann 等人，「The Chemistry and Biology of Epothilones-The Wheel Keeps Turning,」Chem. Med. Chem

第2卷(2007).

Andorfer, C., C. M. Acker 等人(2005). 「Cell-cycle reentry and cell death in transgenic mice expressing nonmutant human tau isoforms.」 *J Neurosci* 25(22): 5446-54.

Andrieux, A., P. Salin 等人(2006). 「Microtubule stabilizer ameliorates synaptic function and behavior in a mouse model for schizophrenia.」 *Biol Psychiatry* 60(11): 1224-30.

Avila, J., J. J. Lucas 等人(2004). 「Role of tau protein in both physiological and pathological conditions.」 *Physiol Rev* 84(2): 361-84.

Ballatore, C., E. Hyde 等人(2007). 「Paclitaxel C-10 carbamates: potential candidates for the treatment of neurodegenerative tauopathies.」 *Bioorg Med Chem Lett* 17(13): 3642-6.

Bartosik-Psujek, H. 及 Z. Stelmasiak (2006). 「The CSF levels of total-tau and phosphotau in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis.」 *J Neural Transm* 113(3): 339-45.

Berger, Z., H. Roder 等人(2007). 「Accumulation of pathological tau species and memory loss in a conditional model of tauopathy.」 *J Neurosci* 27(14): 3650-62.

Bergstralh, D. T. 及 J. P. Ting (2006). 「Microtubule

stabilizing agents: their molecular signaling consequences and the potential for enhancement by drug combination.」

Cancer Treat Rev 32(3): 166-79.

Bollag, D. M., P. A. McQueney 等人 (1995). 「Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action.」 Cancer Res 55(11): 2325-33.

Burke, W. J., G. Raghu 等人 (1994). 「Taxol protects against calcium-mediated death of differentiated rat pheochromocytoma cells.」 Life Sci 55(16): 313-9.

Butler, D., J. Bendiske 等人 (2007). 「Microtubule-stabilizing agent prevents protein accumulation-induced loss of synaptic markers.」 Eur J Pharmacol 562(1-2): 20-7.

Chou, T.C., Zhang, X.G. 等人 (1998). 「Desoxyepothilone B: An efficacious microtubule-targeted antitumor agent with a promising *in vivo* profile relative to epothilone B.」 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 9642-9647.

Dickey, C. A. 及 L. Petrucelli (2006). 「Current strategies for the treatment of Alzheimer's disease and other tauopathies.」 Expert Opin Ther Targets 10(5): 665-76.

Divinski, I., M. Holtser-Cochav 等人 (2006). 「Peptide neuroprotection through specific interaction with brain tubulin.」 J Neurochem 98(3): 973-84.

Fellner, S., B. Bauer 等人 (2002). 「Transport of paclitaxel (Taxol) across the blood-brain barrier in vitro and in

vivo.」 J Clin Invest 110(9): 1309-18.

Furukawa, K.及M. P. Mattson (1995). 「Taxol stabilizes $[Ca^{2+}]_i$ and protects hippocampal neurons against excitotoxicity.」 Brain Res 689(1): 141-6.

Gerth等人「*Epothilons A and B: Antifungal and Cytotoxic Compounds from Sorangium cellulosum (Myxobacteria)*,」 Journal of Antibiotics, 第49卷, 第6期(1996年6月), 第560-563頁

Goedert, M., R. Jakes等人(1995), 「Monoclonal antibody AT8 recognises tau protein phosphorylated at both serine 202 and threonine 205.」 Neurosci. Lett. 189: 167-170.

Gozes, I. (2007). 「Activity-dependent neuroprotective protein: from gene to drug candidate.」 Pharmacol Ther 114(2): 146-54.

Gozes, I.及I. Spivak-Pohis (2006). 「Neurotrophic effects of the peptide NAP: a novel neuroprotective drug candidate.」 Curr Alzheimer Res 3(3): 197-9.

Kolman, A. (2004). 「Epothilone D (Kosan/Roche).」 Curr Opin Investig Drugs 5(6): 657-67.

Lace, G. L., S. B. Wharton等人(2007). 「A brief history of tau: the evolving view of the microtubule-associated protein tau in neurodegenerative diseases.」 Clin Neuropathol 26(2): 43-58.

Lee 等人, "Microtubule stabilizing drugs for the

treatment of Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* 15增刊 2: S87-9 (1994).

Magnani, E., J. Fan 等人 (2007). 「Interaction of tau protein with the dynactin complex.」 *Embo J* 26(21): 4546-54.

Matsuoka, Y., A. J. Gray 等人 (2007). 「Intranasal NAP administration reduces accumulation of amyloid peptide and tau hyperphosphorylation in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease at early pathological stage.」 *J Mol Neurosci* 31(2): 165-70.

Matsuoka, Y., Y. Jouroukhin 等人 (2008). 「A neuronal microtubule-interacting agent, NAPVSIPQ, reduces tau pathology and enhances cognitive function in a mouse model of Alzheimer's disease.」 *J Pharmacol Exp Ther* 325(1): 146-53.

Michaelis, M. L. (2006). 「Ongoing in vivo studies with cytoskeletal drugs in tau transgenic mice.」 *Curr Alzheimer Res* 3(3): 215-9.

Michaelis, M. L., S. Ansar 等人 (2005). 「 β -Amyloid-induced neurodegeneration and protection by structurally diverse microtubule-stabilizing agents.」 *J Pharmacol Exp Ther* 312(2): 659-68.

Michaelis, M. L., K. I. Seyb 等人 (2005). 「Cytoskeletal integrity as a drug target.」 *Curr Alzheimer Res* 2(2): 227-9.

Minderman, H., T. A. Brooks 等人 (2004). 「 Broad-spectrum modulation of ATP-binding cassette transport proteins by the taxane derivatives ortataxel (IDN-5109, BAY 59-8862) and tRA96023. 」 *Cancer Chemother Pharmacol* 53(5): 363-9.

Moller, A., P. Strange 等人 (1990). 「 Efficient estimation of cell volume and number using the nucleator and the disector. 」 *J Microsc* 159(Pt 1): 61-71.

Morsch, R., W. Simon 等人 (1999). 「 Neurons may live for decades with neurofibrillary tangles. 」 *J Neuropathol Exp Neurol* 58(2): 188-97.

Oddo, S., A. Caccamo 等人 (2003). 「 Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. 」 *Neuron* 39(3): 409-21.

Postma, T. J., K. Hoekman 等人 (1999). 「 Peripheral neuropathy due to biweekly paclitaxel, epirubicin and cispatin in patients with advanced ovarian cancer. 」 *Journal of Neuro-Oncology* 45: 241-246.

Preuss, U., J. Biernat 等人 (1997). 「 The 'jaws' model of tau-microtubule interaction examined in CHO cells. 」 *J Cell Sci* 110 (Pt 6): 789-800.

Rice, A., Y. Liu 等人 (2005). 「 Chemical modification of paclitaxel (Taxol) reduces P-glycoprotein interactions and

increases permeation across the blood-brain barrier in vitro and in situ.」 J Med Chem 48(3): 832-8.

Roberson, E. D., K. Searce-Levie 等人 (2007). 「Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model.」 Science 316(5825): 750-4.

Roy, S., B. Zhang 等人 (2005). 「Axonal transport defects: a common theme in neurodegenerative diseases.」 Acta Neuropathol 109(1): 5-13.

Santacruz, K., J. Lewis 等人 (2005). 「Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function.」 Science 309(5733): 476-81.

Spittaels, K., C. Van den Haute 等人 (2000). 「Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylates protein tau and rescues the axonopathy in the central nervous system of human four-repeat tau transgenic mice.」 J Biol Chem 275(52): 41340-9.

Sponne, I., A. Fife 等人 (2003). 「Apoptotic neuronal cell death induced by the non-fibrillar amyloid-beta peptide proceeds through an early reactive oxygen species-dependent cytoskeleton perturbation.」 J Biol Chem 278(5): 3437-45.

Terwel, D., D. Muyllaert 等人 (2008). 「Amyloid activates GSK-3beta to aggravate neuronal tauopathy in bigenic

mice.」 Am J Pathol 172(3): 786-98.

Wagner, B.K, Kitami, T. 等人 (2008). 「 Large-scale chemical dissection of mitochondrial function.」 Nature Biotechnology 26(3): 343-351.

Wostyn, P., K. Audenaert 等人 (2008). 「 Alzheimer's disease-related changes in diseases characterized by elevation of intracranial or intraocular pressure.」 Clin Neurol Neurosurg 110(2): 101-9.

Zhang, B., A. Maiti 等人 (2005). 「 Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model.」 Proc Natl Acad Sci U S A 102(1): 227-31.

【圖式簡單說明】

圖 1 展示使用埃坡黴素 D(化合物 I)對 Tg4510 小鼠之基本實驗設計；

圖 2 展示在給與埃坡黴素 D(化合物 I)之前，對 2.5 個月之 Tg4510 小鼠進行莫瑞斯 (Morris) 水迷宮 (MWM) 測試之結果；

圖 3 展示在給與埃坡黴素 D(化合物 I)2 個月後，對 4.5 個月之 Tg4510 小鼠進行 MWM 測試之結果；

圖 4 展示將給與埃坡黴素 D(化合物 I)歷時 2 個月之 4.5 個月齡之 Tg4510 小鼠訓練 5 天後的 18 小時探測資料。「TQ」表示目標象限，「AR」表示相鄰右象限，「AL」表示相鄰左象限且「OP」表示相反象限。對表現的兩種度量(亦即路

徑長度%(A)及平台跨越次數(B))加以描述；

圖5展示經媒劑、1 mpk埃坡黴素D(化合物I)及10 mpk埃坡黴素D(化合物I)處理後，5.5個月之Tg4510小鼠之海馬之CA1及CA3區中的神經元數；

圖6展示經媒劑、1 mpk埃坡黴素D(化合物I)及10 mpk埃坡黴素D(化合物I)處理之Tg4510小鼠之海馬中之磷酸化Tau染色。每組展示3個小鼠的代表性切片。AT8陽性染色為暗灰色及黑色；

圖7展示經媒劑、1 mpk埃坡黴素D(化合物I)或10 mpk埃坡黴素D(化合物I)處理之Tg4510小鼠中之神經原纖維纏結之Gallyas銀染色。圖7A展示皮質染色之代表性顯微照片，其中黑色銀染色為陽性的。在非轉殖基因小鼠中觀測到更淺之背景染色及血管之某些染色。圖7B量化展示皮質與海馬中之銀染色；

圖8展示在至多24小時之不同時間間隔下靜脈內投藥後小鼠之血漿、腦及肝中化合物II(圖8A)、伊沙匹隆(圖8B)、太平洋紫杉醇(圖8C)及埃坡黴素D(化合物I)(圖8D)之濃度；

圖9展示在經口投藥(35 mpk)後腦中之埃坡黴素D(化合物I)及化合物III(如本文中實例7中所述)在給藥後長達5至24小時之濃度；及

圖10展示小鼠之血漿、腦及肝中之埃坡黴素D在給藥後長達一週之時間間隔後的濃度。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 98113762

※ 申請日期： 98.4.24

※IPC 分類：A61K³¹/427 (2006.01)
 C07D 493/64 (2006.01)
 C07D 417/06 (2006.01)
 A61P 25/28 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

埃坡黴素D於治療包括阿茲海默症之TAU相關疾病的用途

USE OF EPOTHILONE D IN TREATING TAU-ASSOCIATED DISEASES
 INCLUDING ALZHEIMER'S DISEASE

二、中文發明摘要：

本發明描述一種使用具有良好腦滲透性、長半衰期及於腦中之高選擇性滯留的埃坡黴素D(epothilone D)治療tau病變的方法，且提供治療包括阿茲海默症之tau病變的有效療法。

三、英文發明摘要：

Methods of treating tauopathies are described using epothilone D that exhibit good brain penetration, long half-life, and high selective retention in brain, and provides effective therapies in treating tauopathies including Alzheimer's disease.

七、申請專利範圍：

1. 一種埃坡黴素D(epothilone D)之用途，其係用於製備供治療需要此治療之患者之Tau相關疾病之藥劑。
2. 如請求項1之用途，其中該Tau相關疾病為阿茲海默症(Alzheimer's disease)。
3. 如請求項1之用途，其中該Tau相關疾病係選自：額顳葉型癡呆(包括與染色體17關聯之額顳葉型癡呆伴隨帕金森氏病(Parkinsonism)(FTDP-17)之亞型)、進行性核上眼神經麻痺症、皮質基底核退化症、皮克氏疾病(Pick's disease)及嗜銀顆粒病、帕金森氏病(Parkinson's disease)、唐氏症候群(Down syndrome)、腦炎後帕金森氏病、肌緊張性營養不良、C型尼曼-匹克疾病(Niemann-Pick C disease)、拳擊手癡呆、波林特疾病(Blint disease)、朊病毒疾病、肌萎縮性側索硬化、關島型帕金森氏病-癡呆綜合徵(Parkinsonism-dementia complex of Guam)、多發性硬化症、青光眼、糖尿病性視網膜病及創傷性腦損傷。
4. 如請求項1至3中任一項之用途，其中該埃坡黴素D係經口投與。
5. 如請求項1至3中任一項之用途，其中該埃坡黴素D係靜脈內投與。
6. 如請求項1至5中任一項之用途，其特徵在於該埃坡黴素D具有良好腦滲透性、長腦半衰期及高選擇性腦肝滯留比。

7. 如請求項1至5中任一項之用途，其中該埃坡黴素D在給藥後20分鐘與1小時之間的時段經量測具有0.5或0.5以上之腦滲透性以及以下任一者或兩者：24小時或超過24小時之腦半衰期，及2)在給藥後24小時或超過24小時之2或2以上之腦肝選擇性滯留比。
8. 如請求項1至7中任一項之用途，其中該包含埃坡黴素D之藥劑在治療上可有效治療患者之AD，不會產生需要中止該用法的藥物所誘發副作用。
9. 如上述請求項中任一項之用途，其中每日、每週或間歇式投與的該埃坡黴素D係以介於0.0001-10 mg/m²之間的劑量投與患者。
10. 如請求項1至3中任一項之用途，其中該埃坡黴素D之劑量介於0.0001-0.05 mg/m²之間，且該埃坡黴素D係以每日口服劑量投與人類患者。
11. 如請求項1至3中任一項之用途，其中該埃坡黴素D之劑量介於0.0001-30 mg/m²之間，且該埃坡黴素D係以每週、每兩週、每月或間歇式給藥週期靜脈內投與人類患者。
12. 一種用於治療Tau相關疾病之醫藥組合物，其包含埃坡黴素D。
13. 如請求項12之醫藥組合物，其中該Tau相關疾病為阿茲海默症。

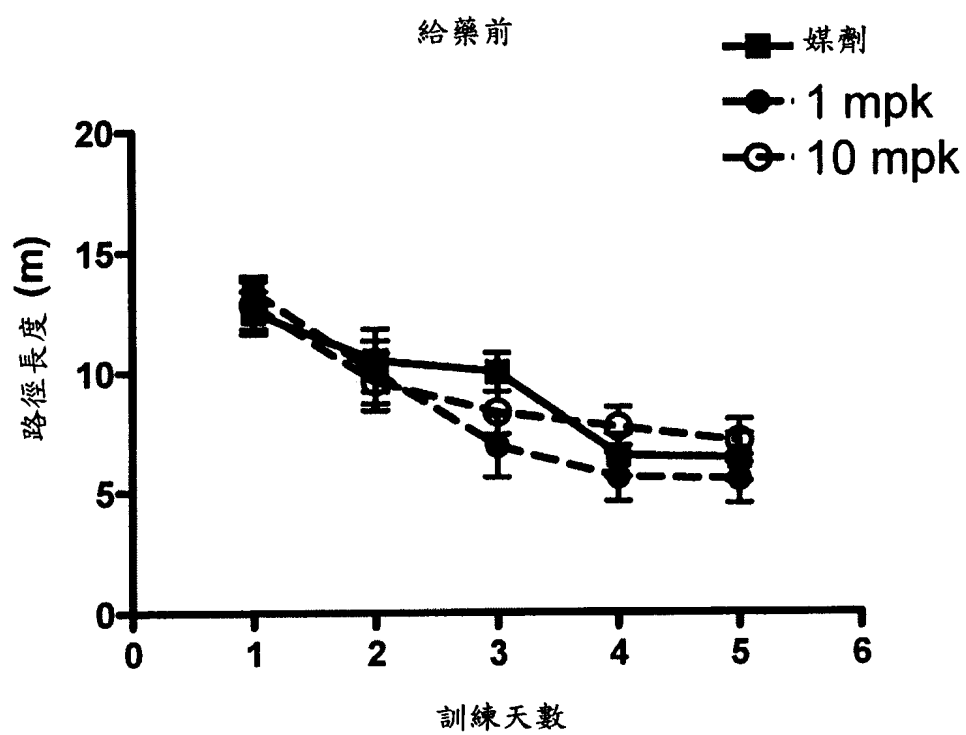


圖2

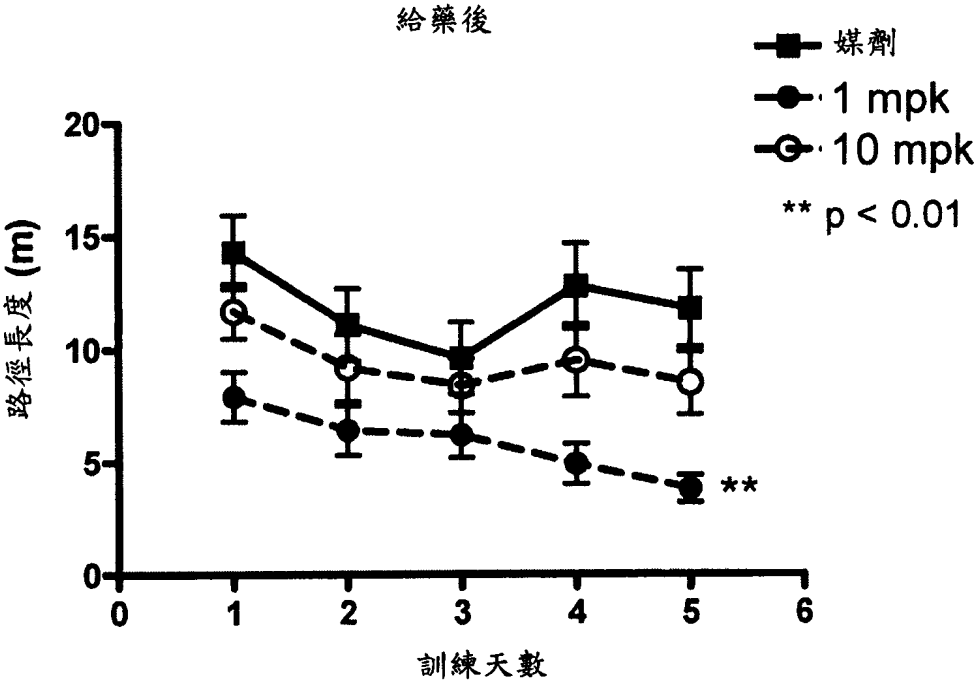


圖3

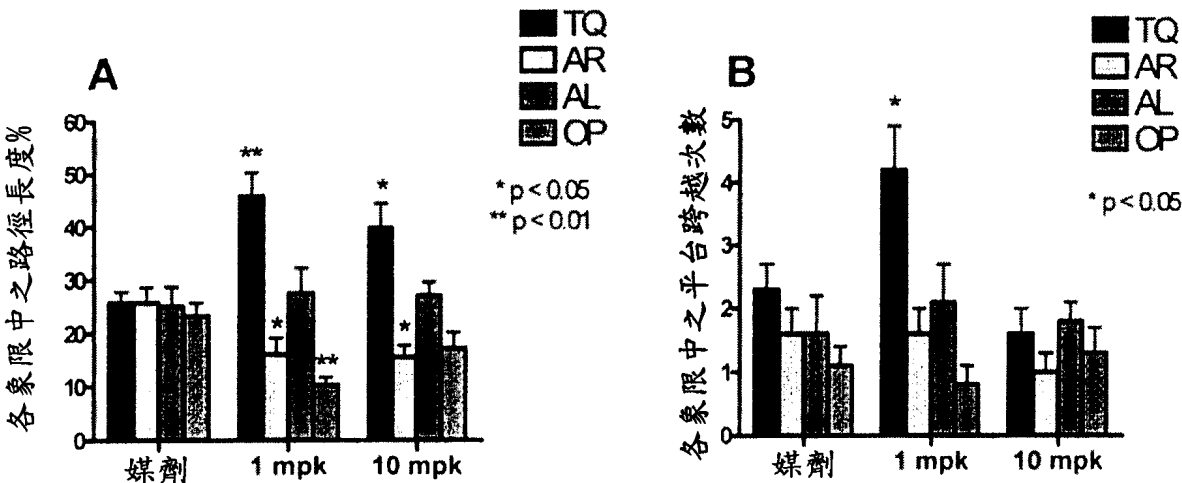


圖 4

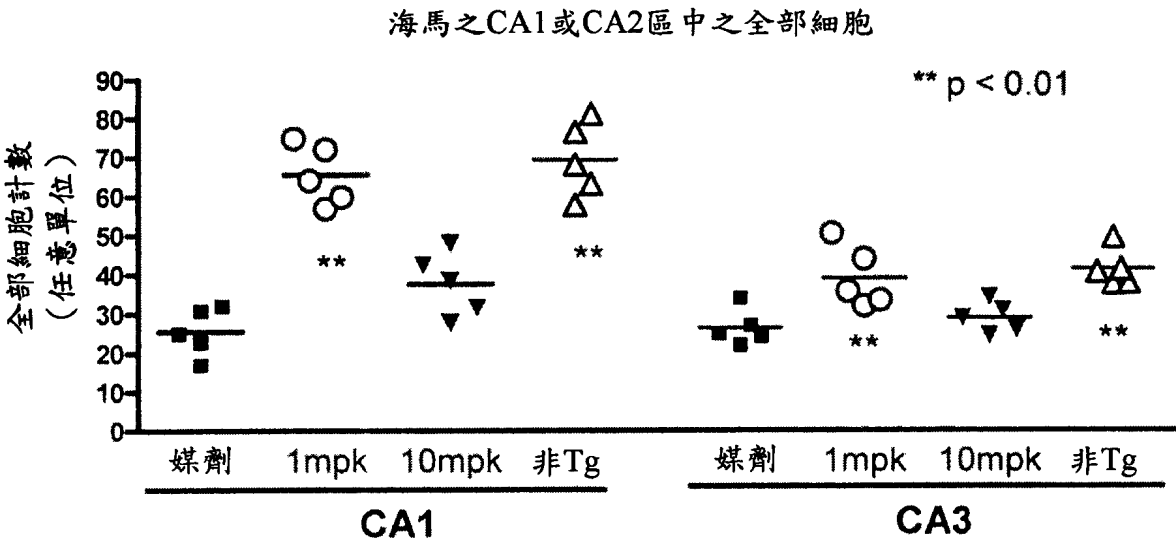


圖5

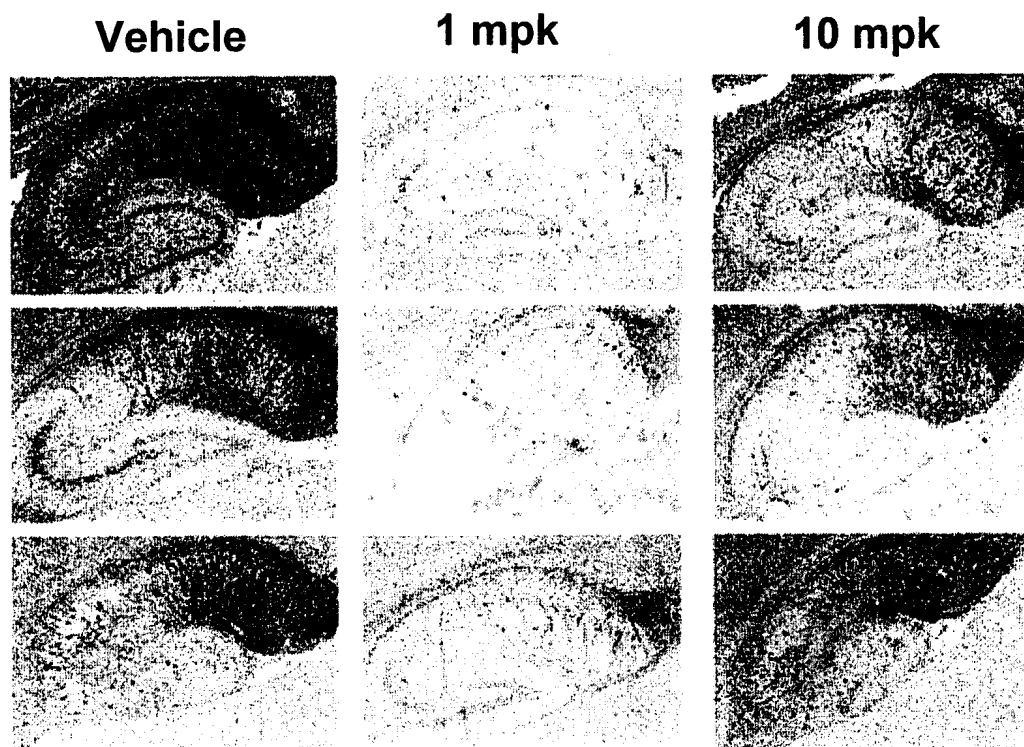


圖6

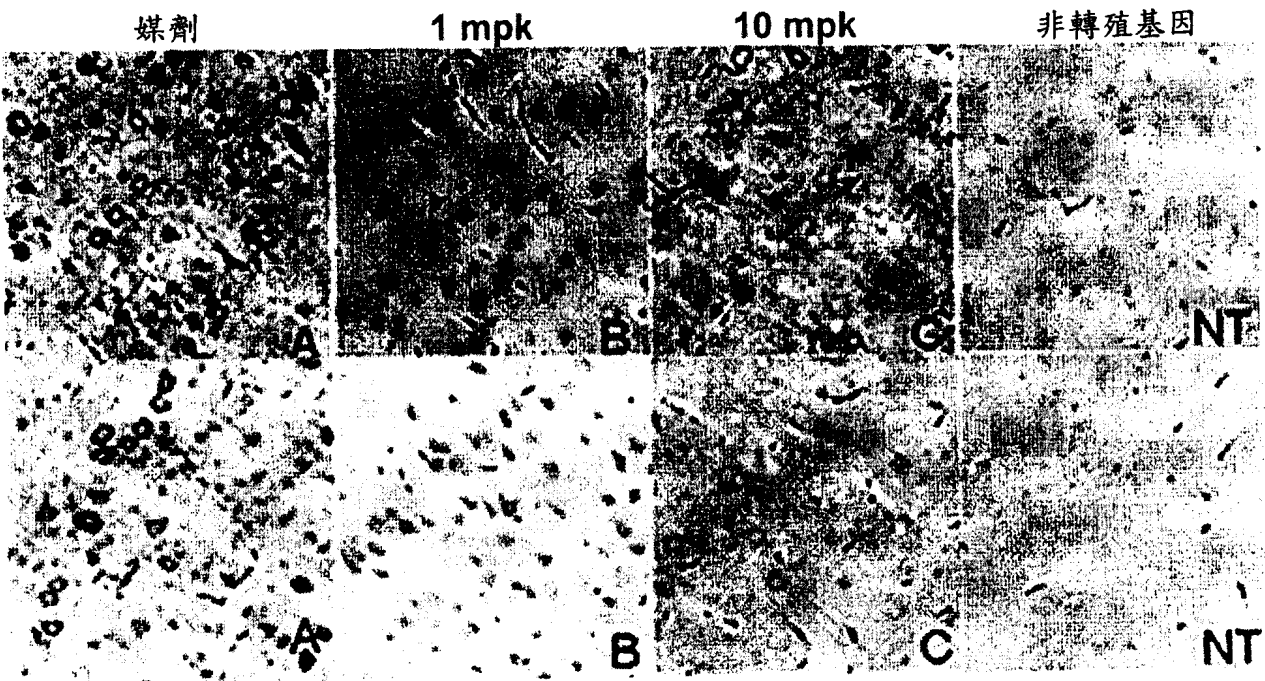


圖7A

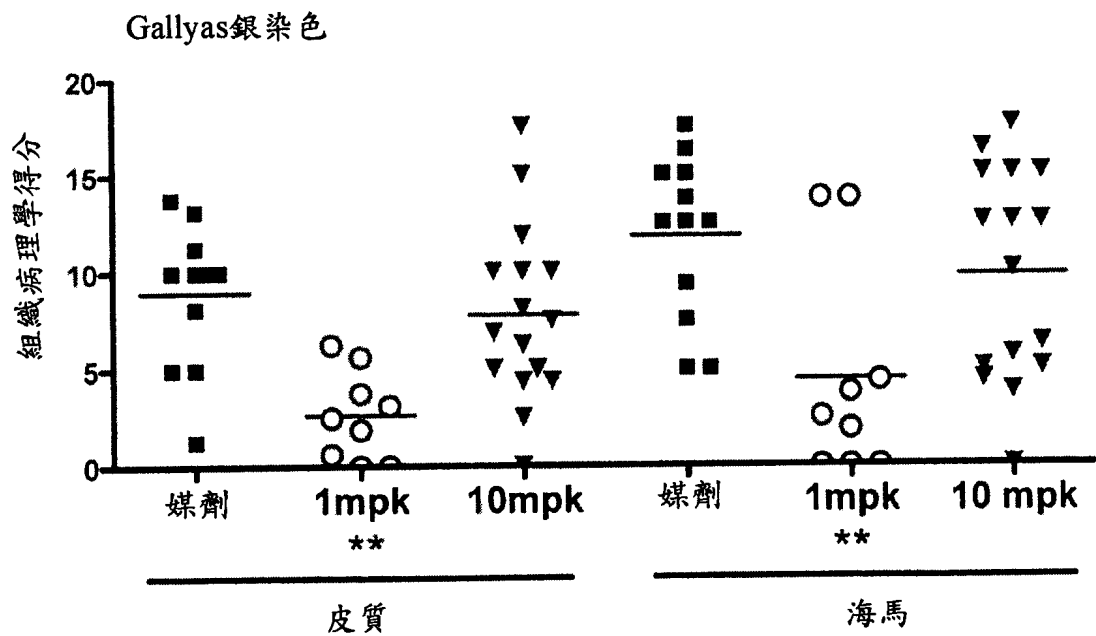


圖7B

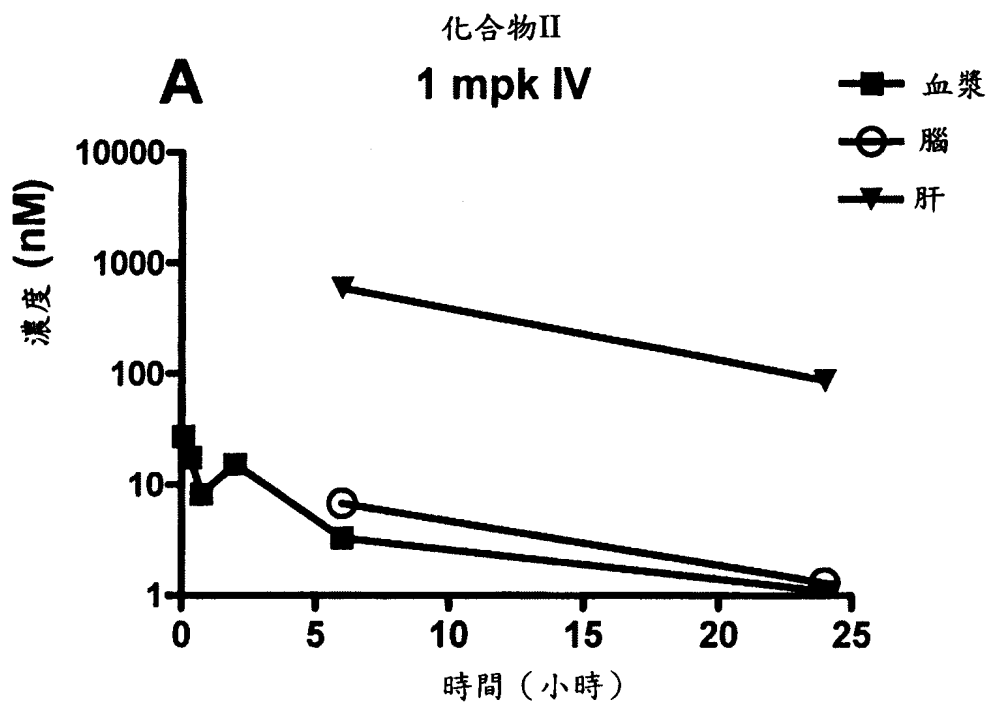


圖8A

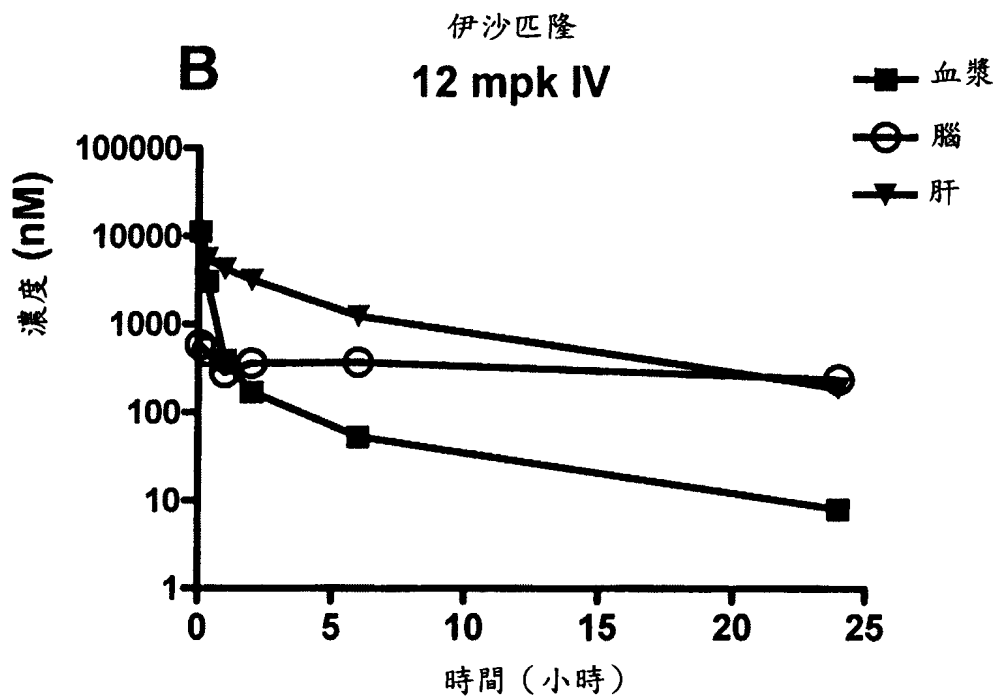


圖8B

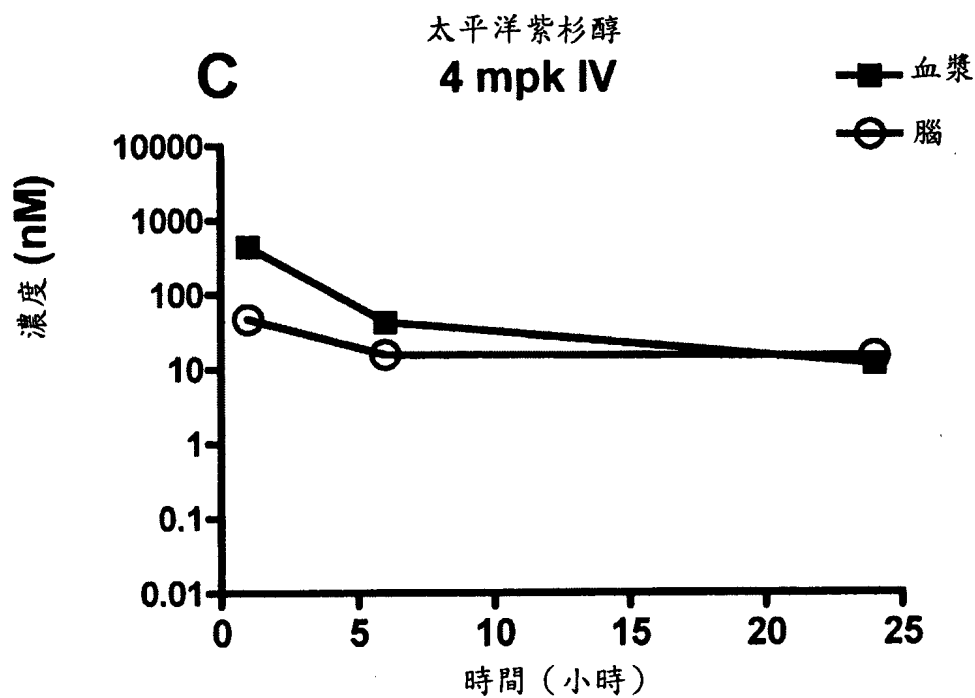


圖 8C

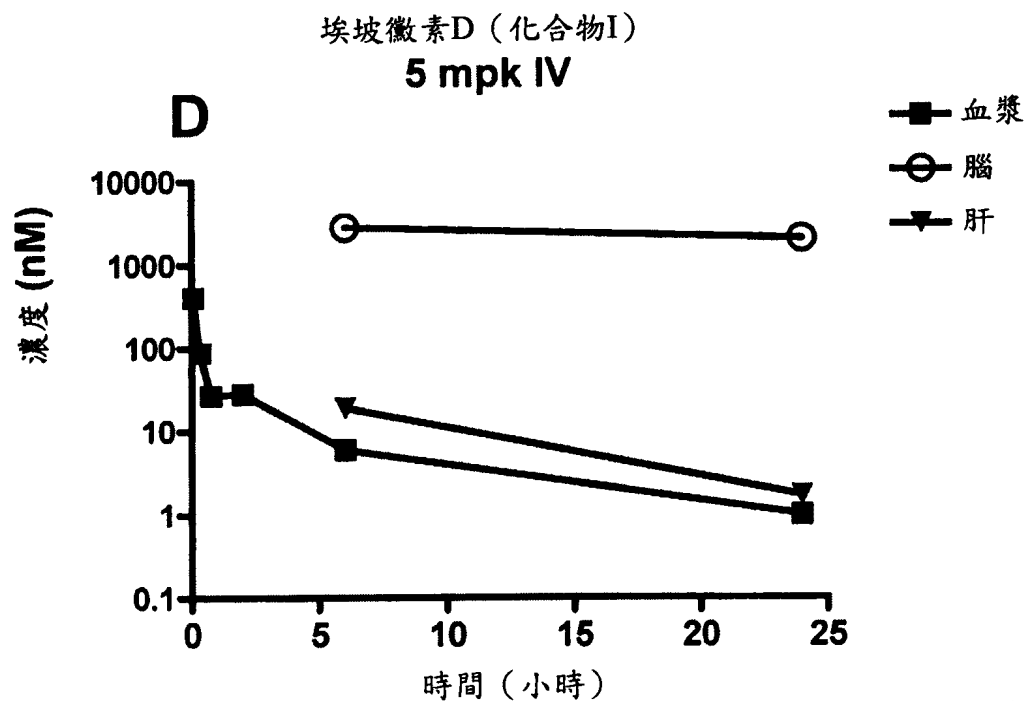


圖 8D

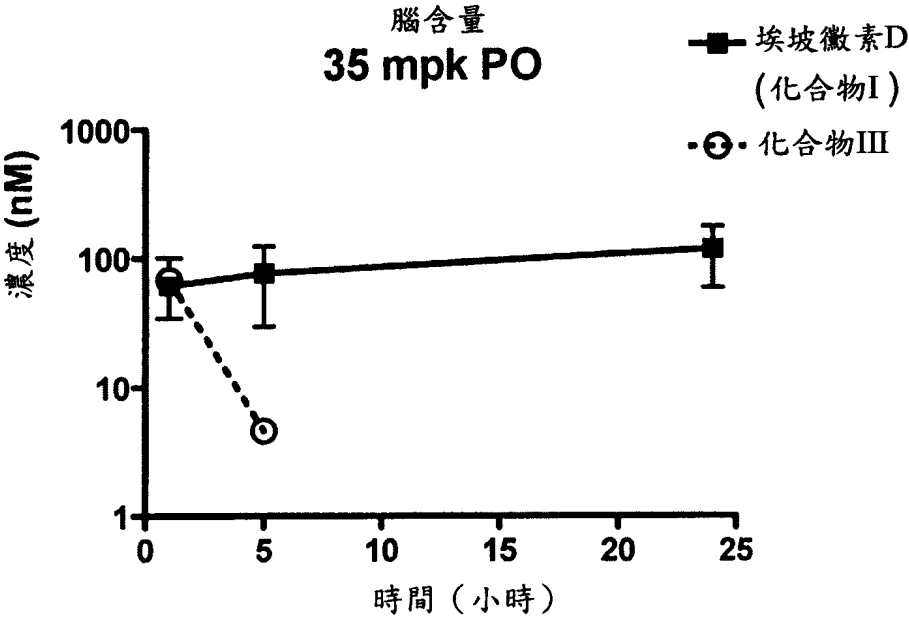


圖9

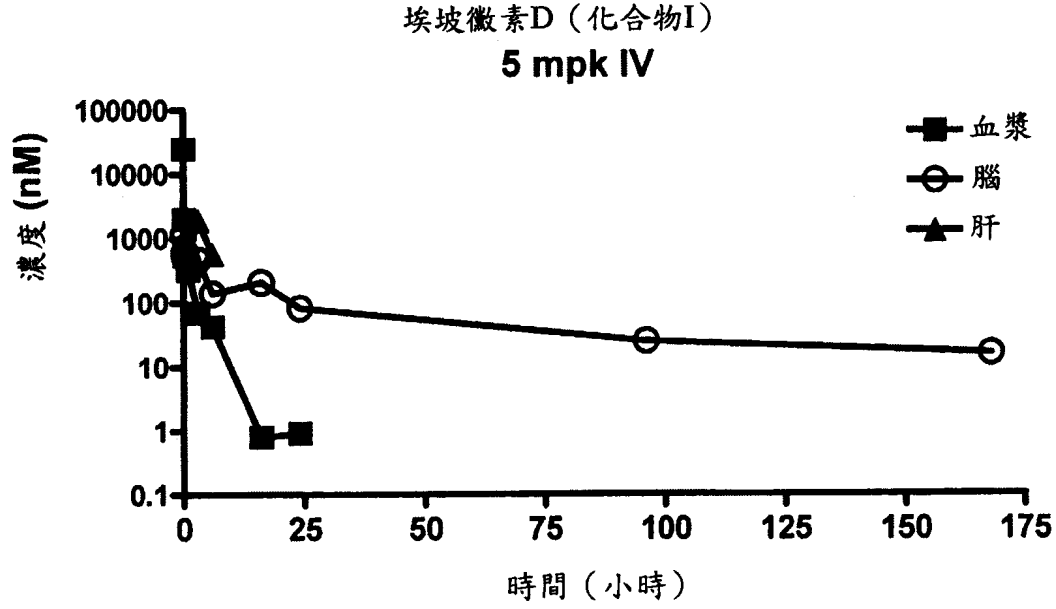


圖 10

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

