



I269812

840437

發明專利說明書

(填寫本書件時請先行詳閱申請書後之申請須知，作※記號部分請勿填寫)

※申請案號：92109924 ※IPC分類：C12Q 1/005
※申請日期：92年04月28日 G01N 33/53

壹、發明名稱：

(中文) 選擇性 P D E 1 0 抑制劑之治療用途
(英文) Therapeutic use of selective PDE10 inhibitors

貳、發明人 (共 3 人)

發明人 1

姓 名：(中文) 勞倫·萊伯
(英文) Lebel, Lorraine Ann
住居所地址：(中文) 美國康乃狄格州格洛頓艾斯頓波因特路
(英文) c/o Pfizer Global Research &
Development, Eastern Point Rd.,
Groton, CT 06340, USA

參、申請人 (共 1 人)

申請人 1

姓名或名稱：(中文) 輝瑞製品股份有限公司
(英文) Pfizer Products Inc.
住居所地址：(中文) 美國康乃狄克州格洛頓艾斯頓波因特路
(或營業所) (英文) Eastern Point Road, Groton, CT 06340,
U.S.A.
國 籍：(中文) 美國 (英文) U.S.A.
代 表 人：(中文) 1. 傑·倫伯
(英文) 1. Lumb, J. Trevor

發明人 2

姓 名：(中文) 法蘭克·米麗蒂
(英文) Menniti, Frank S.
住居所地址：(中文) 美國康乃狄克州格洛頓艾斯頓波因特路
(英文) Eastern Point Road, Groton, CT 06340,
U.S.A.

發明人 3

姓 名：(中文) 克里斯多福·史密特
(英文) Schmidt, Christopher Joseph
住居所地址：(中文) 美國康乃狄格州格洛頓艾斯頓波因特路
(英文) c/o Pfizer Global Research &
Development, Eastern Point Rd.,
Groton, CT 06340, USA

捌、聲明事項

■主張專利法第二十四條第一項優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；日期；案號 順序註記】

1.美國 ; 2002/05/03 ; 10/139,183

2.美國 ; 2002/06/20 ; 10/177,018

肆、中文發明摘要

發明之名稱：選擇性 PDE10 抑制劑之治療用途

本發明係提供一種治療在哺乳類中(包括人類)特定的神經病及精神病異常之方法，其包含以選擇性 PDE10 抑制劑投藥。特定言之，本發明關於治療情緒、運動及焦慮異常、精神病、藥物(例如，酒精)成癮、具有認知缺陷徵候群之異常及神經退化異常和症狀之方法。本發明更提供作為選擇性 PDE10 抑制劑之罌粟鹼(papaverine)的用途。本發明也提供用於確認具有作為選擇性 PDE10 抑制劑之活性的化學化合物之檢定作用。

伍、英文發明摘要

發明之名稱：Therapeutic use of selective PDE10 inhibitors

The invention provides a method for treating certain neurologic and psychiatric disorders in mammals, including humans, comprising administration of a selective PDE10 inhibitor. In particular, the invention relates to treatment of mood, movement, and anxiety disorders; psychosis; drug, for example alcohol, addiction; disorders having as a symptom deficient cognition; and neurodegenerative disorders and conditions. The invention furthermore provides the use of papaverine as a selective inhibitor of PDE10. The invention also provides assays for identifying chemical compounds that have activity as selective PDE10 inhibitors.

圖 1

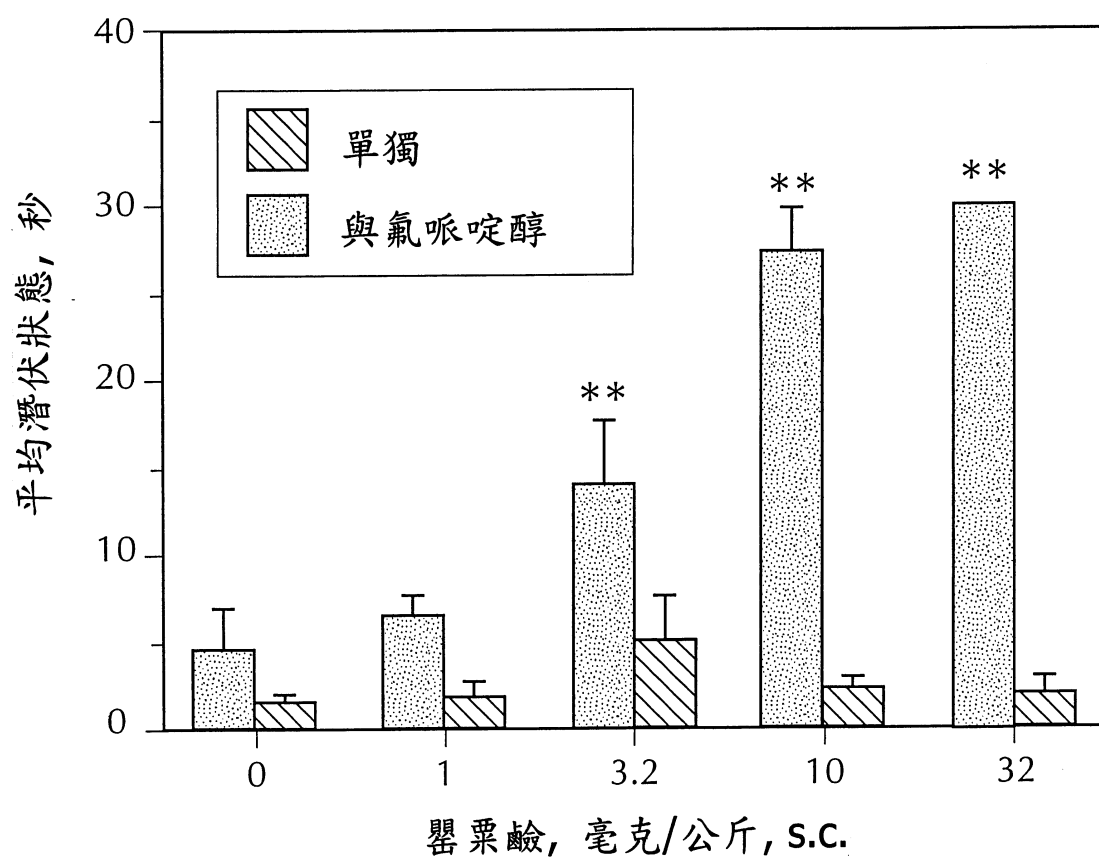


圖 2A

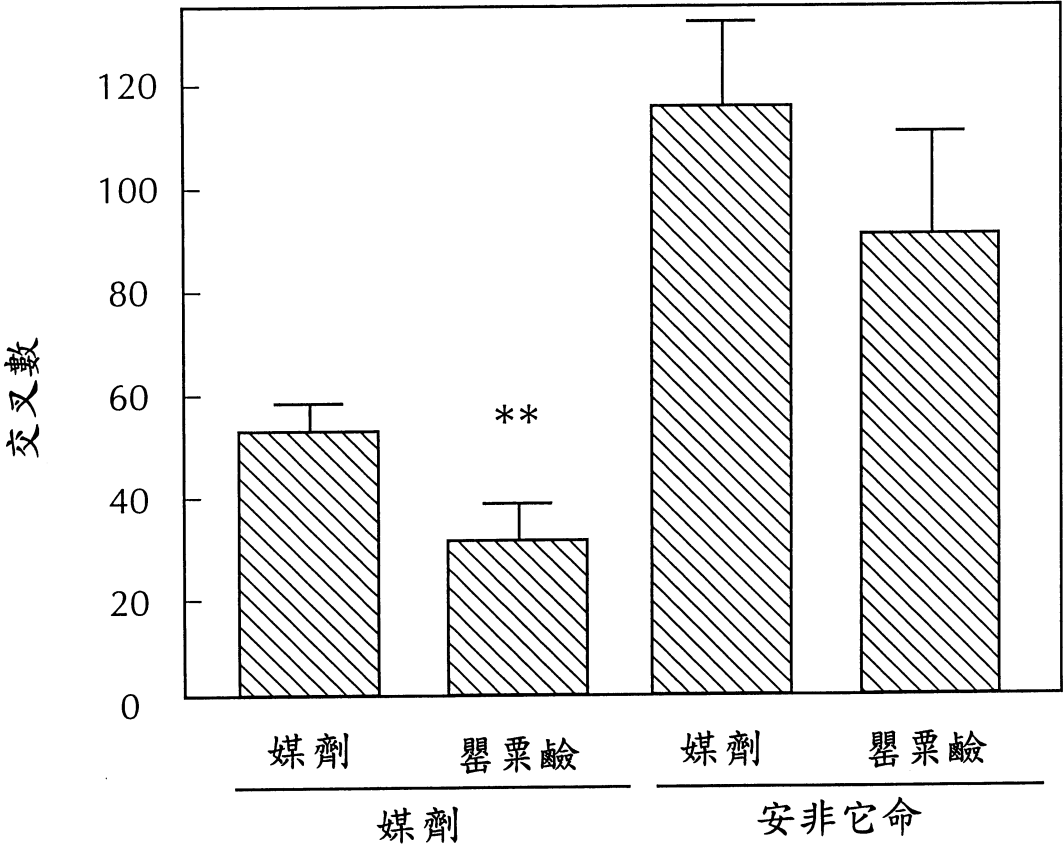


圖 2B

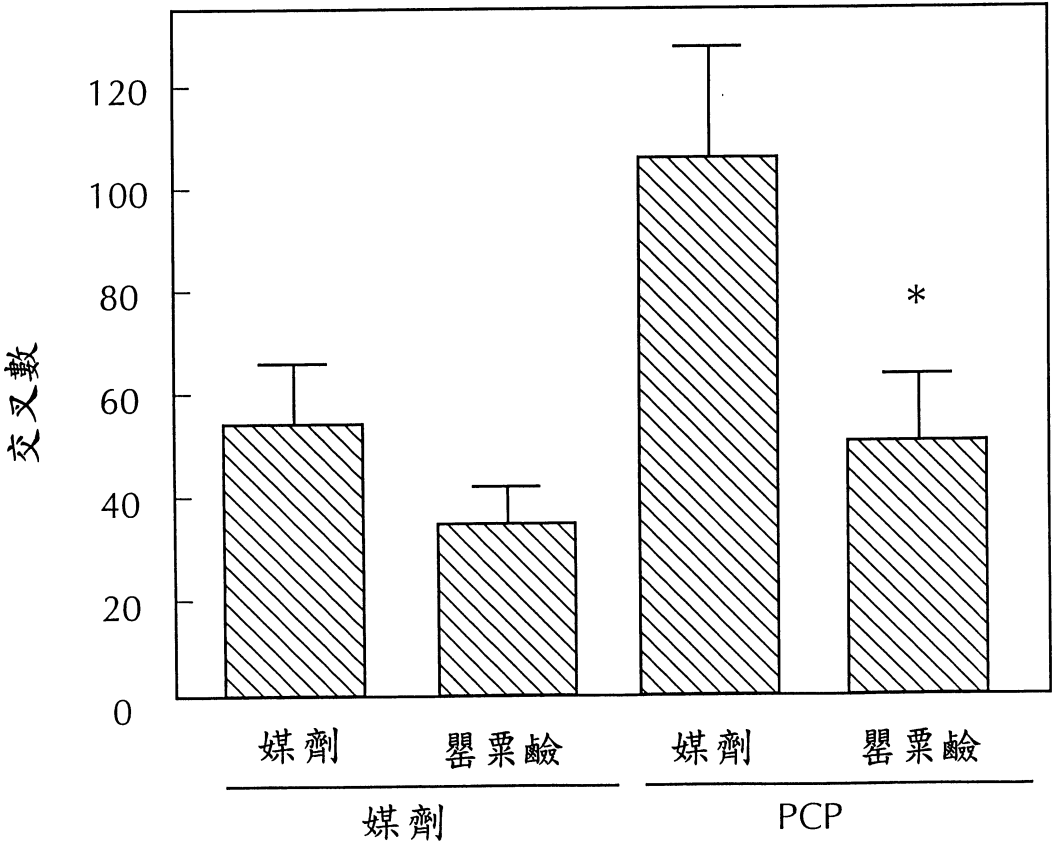


圖 3

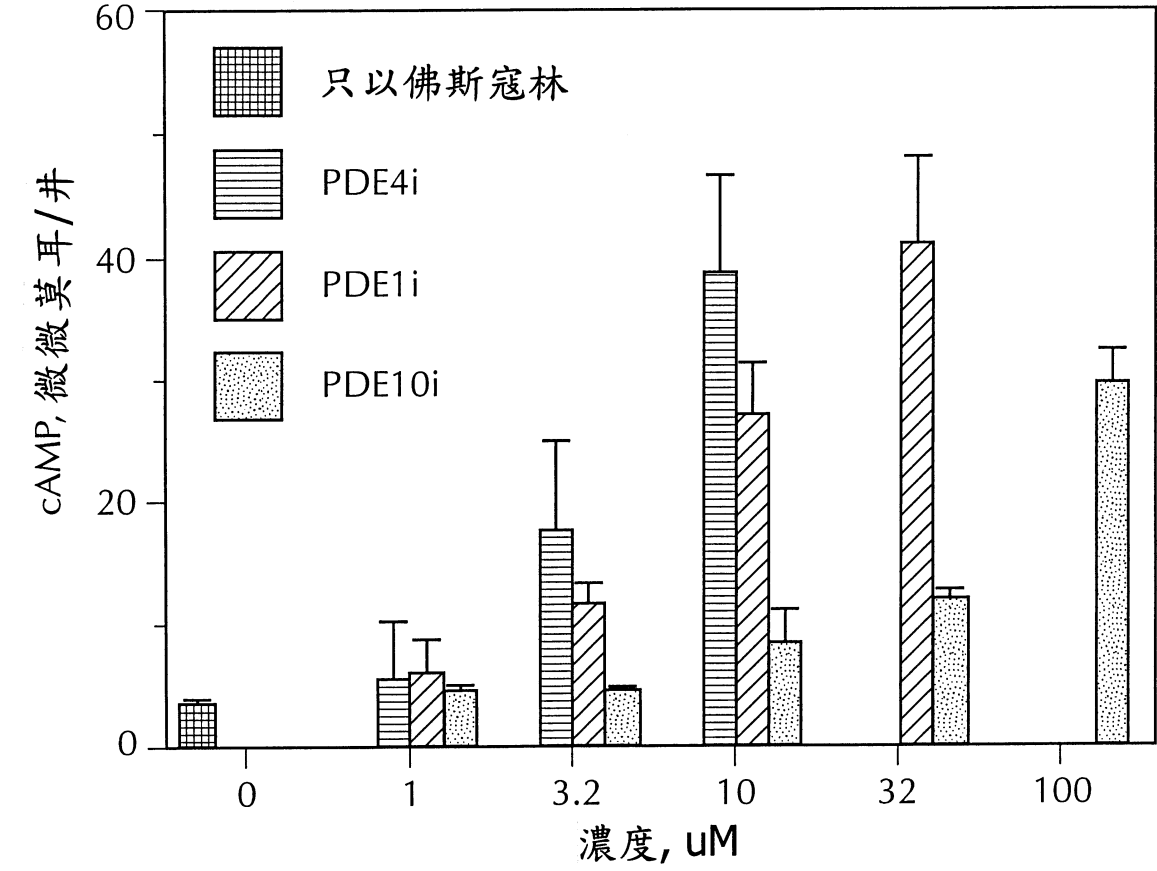


圖 4

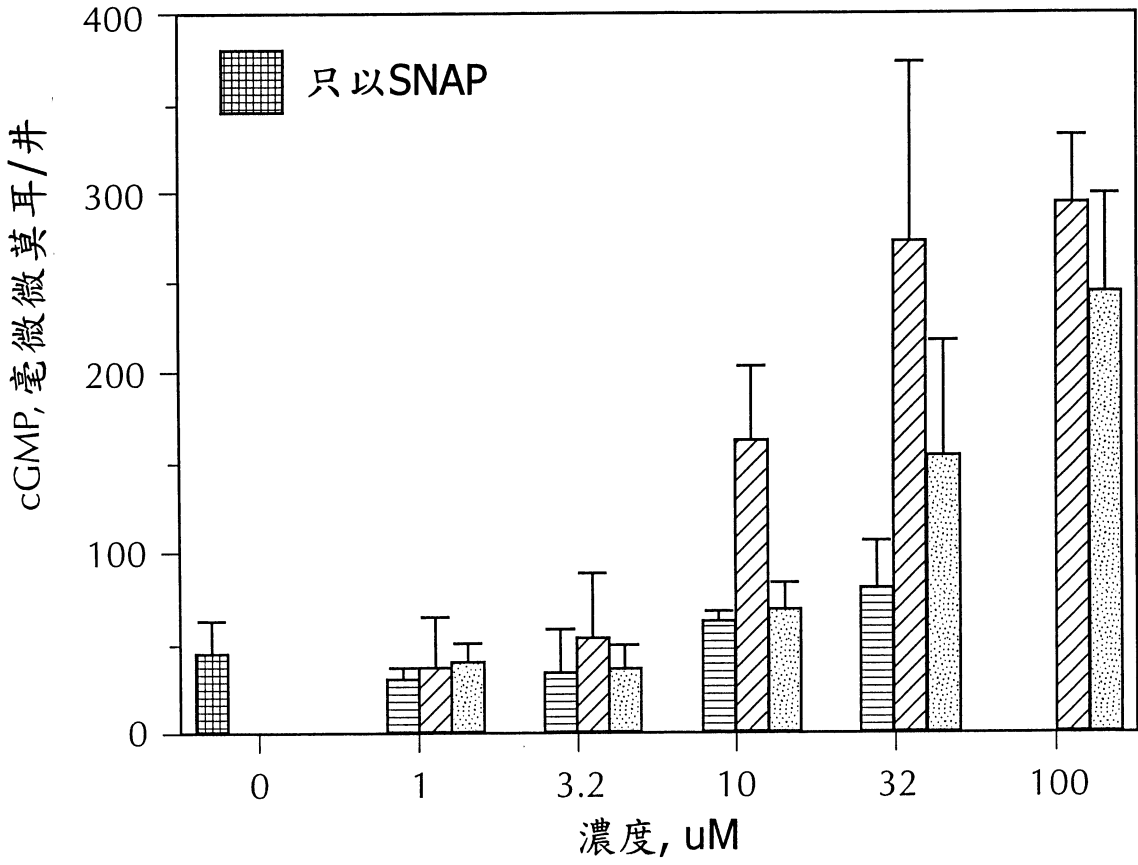


圖 5

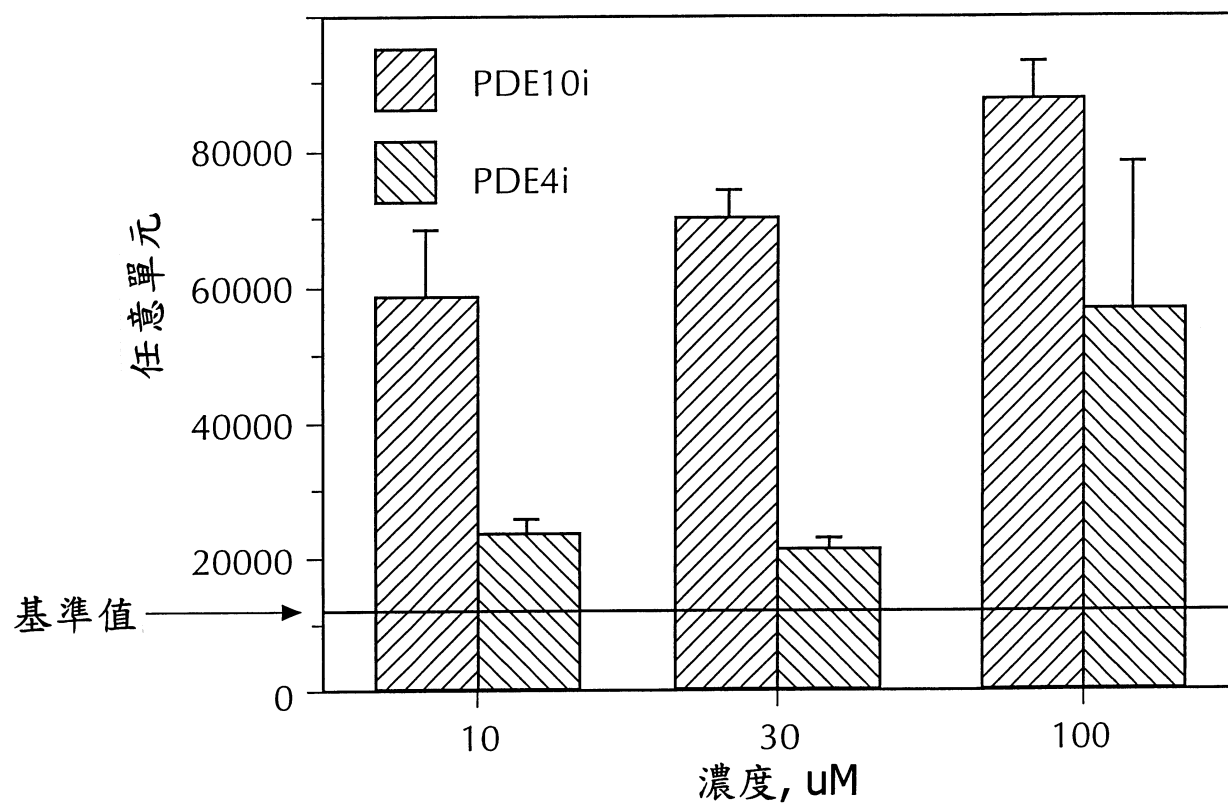
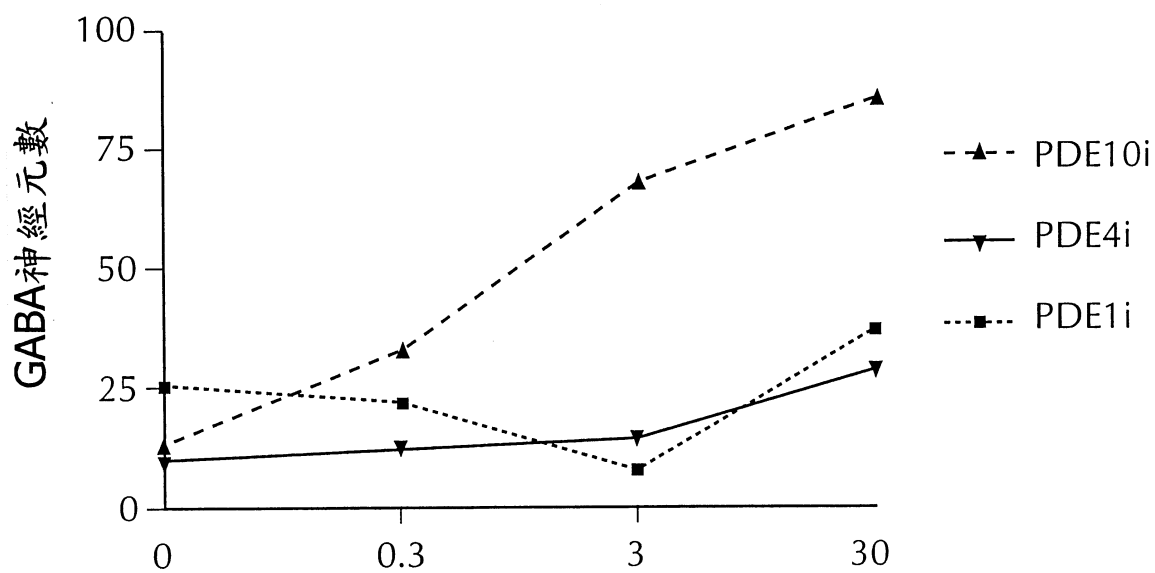


圖 6



- 陸、（一）、本案指定代表圖為：第 6 圖
（二）、本代表圖之元件代表符號簡單說明：

無

柒、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無



(1)

玖、發明說明

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於中樞神經系統異常的治療。更特定言之，本發明係關於神經病及精神病異常的治療，例如，精神病及包含認知缺陷徵候群之異常。本發明更關於神經退化異常和症狀的治療。本發明也關於 PDE10 抑制劑。本發明也關於用於確認具有作為選擇性 PDE10 抑制劑之活性的化學化合物之檢定作用。

【先前技術】

環系核苷酸、環系腺苷單磷酸 (cAMP) 及環系鳥苷單磷酸 (cGMP) 具有作為調節巨型陣列之細胞內處理的細胞內第二信使的機能，特別係在中樞神經系統的神經元中。其包括 cAMP 及 cGMP 依存性激酶在神經元中的活化作用及後續涉入突觸傳遞素之急性調節作用與神經元分化和存活的磷酸化作用。以涉入 cAMP 及 cGMP 之合成作用及降解作用之酵素的分子多樣性顯示環系核苷酸的複雜性。有 10 種腺苷環化酶家族、2 種鳥苷環化酶及 11 種磷酸二酯酶 (PDE)。而且，已知以不同的神經元型式表現每一個這些類別的多種同工酶，並在既定的神經元內對不同的同工酶有好的局域化及特異性機能的證據。

以膜結合酵素家族 (上述的腺苷環化酶) 合成 cAMP。以廣泛的絲氨酸蛋白醇抑制物 (serpin) 家族受體經由以異三元體 G 蛋白介入之偶合機制調節這些酵素。以增加細胞內 cAMP 引起 cAMP-依存性激酶的活化作用，經由彼等的磷酸化作用調節其它信號激酶、轉錄因子及酵素的活性

。環系 AMP 也可以直接影響以環系核苷酸調節之離子通道、磷酸二酯酶或鳥嘌呤核苷酸交換因子的活性。最近的研究也建議內細胞 cAMP 在其輸送至細胞外之後也可以具有作為神經調節劑及腺苷之前驅體的機能。

合成 cGMP 之鳥苷環化酶以膜結合及細胞質形式存在。將膜結合形式與以 G-蛋白連接之受體(如 ANP(動脈鈉尿))偶合，然而以氧化氮活化可溶性鳥苷環化酶(Wang, X 及 Robinson, P. J. *Journal of Neurochemistry* 68(2):443-456, 1997)。與 cAMP 一樣，在中樞神經系統中的 cGMP 信號的下游調節劑包括以 cGMP-門控之離子通道、以 cGMP-調節之磷酸二酯酶及 cAMP-依存性激酶。環系核苷酸在中樞神經系統內得到重要的信號傳導角色，可以使用會影響環系核苷酸信號調節之化合物得到治療利益。

以磷酸二酯酶催化之環系核苷酸分解代謝作用係調節環系核苷酸信號之主要機制。有 11 種已知以 21 種不同的基因編碼的磷酸二酯酶(PDE)家族。每一種基因典型係產生多種剪接變異體，其進一步造成同工酶的多樣性。PDE 家族係以環系核苷酸基質特異性、調節機制及對抑制劑的敏感度為主的機能加以區別。而且，PDE 在整個有機體中有不同的表現，包括在中樞神經系統中。由於這些不同的酵素活性及局限化作用，故不同的 PDE 同工酶可以具有不同的生理機能。而且，可以選擇性抑制不同的 PDE 家族或同工酶之化合物可以提供特殊的治療效應、較少的副效應或兩種效應。

確認 PDE10 係以一級胺基酸序列及不同的酵素活性為主之獨特家族。EST 資料庫之同系物篩選顯示以鼯鼠的 PDE10A 作為磷酸二酯酶的第一個 PDE10 家族成員 (Fujishige 等人之 *J. Biol. Chem.* 274:18438-18445, 1999; Loughney K.等人之 *Gene* 234:109-117, 1999)。也已經選殖鼠科同系物 (Soderling, S.等人之 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:7071-7076, 1999)，以及已確認老鼠及人類基因兩者的 N-末端剪接變異體 (Kotera, J.等人之 *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 261:551-557, 1999; Fujishige, K.等人之 *Eur. J. Biochem.* 266:1118-1127, 1999)。有高度的同系性物種。鼯鼠 PDE10A1 係將 cAMP 及 cGMP 兩者分別水解成 AMP 及 GMP 之 779 胺基酸蛋白。PDE10 對 cAMP ($K_m=0.05\mu M$) 的親和力比對 cGMP ($K_m=3\mu M$) 更高。但是，以 cGMP 比 cAMP 大約 5 倍的 V_{max} 得到 PDE10 係獨特的 cAMP-抑制之 cGMPase 的暗示 (Fujishige 等人之 *J. Biol. Chem.* 274:18438-18445, 1999)。

PDE10 也係相對於其它 PDE 家族而言獨特局限在哺乳類中。對 PDE10 之 mRNA 僅以高度表現在睪丸及腦部中 (Fujishige K.等人之 *Eur J Biochem.* 266:1118-1127, 1999; Soderling S.等人之 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:7071-7076, 1999; Loughney K.等人之 *Gene* 234:109-117, 1999)。這些初期研究顯示在腦部 PDE10 表現範圍內係以在紋狀核 (尾狀核-被殼)、阿肯伯氏核 (n. accumbens) 及嗅結節中最高。更在最近已在齧齒科腦部的 PDE10 mRNA

(Seeger, T. F. 等人之 Abst. Soc. Neurosci. 26:345.10, 2000)及 PDE10 蛋白 (Menniti, F. S., Stick, C. A., Seeger, T. F., 和 Ryan, A. M., Immunohistochemical localization of PDE10 in the rat brain, William Harvey Research Conference 'Phosphodiesterase in Health and Disease', Porto, Portugal, Dec. 5-7, 2001) 中進行表現圖案的詳細分析。

【發明內容】

本發明係提供一種治療在哺乳類中(包括人類)的憂慮症或精神病異常之方法，其包含以有效治療該憂慮或精神病異常之選擇性 PDE10 抑制劑量投予該哺乳類。

本發明也提供一種治療在哺乳類中(包括人類)的憂慮症或精神病異常之方法，其包含以有效抑制 PDE10 之選擇性 PDE10 抑制劑量投予該哺乳類。

可以根據本發明治療的精神病異常之實例包括(但不限於此)精神分裂症(例如，偏執型、混亂型、緊張型、未分化型或剩餘型)、類精神分裂症、精神分裂情感症(例如，妄想型或抑鬱型)、妄想症、以物質誘發之精神病異常(例如，以酒精、安非它命、大麻、古柯鹼、迷幻藥、吸入劑、類鴉片或天使塵(phencyclidine)誘發之精神病)、偏執型之人格異常及分裂型之人格異常。

可以根據本發明治療的憂慮症異常之實例包括(但不限於此)恐慌症、懼曠症、特殊的畏懼症、社交畏懼症、

強迫症、創傷後壓力異常、急性壓力異常及廣泛性焦慮症。

本發明也提供一種治療在哺乳類中(包括人類)選自與多巴胺促動劑治療法有關連之亨丁頓氏病(Huntington's)及不自主運動之運動異常的方法，其包含以有效治療該異常之選擇性 PDE10 抑制劑量投予該哺乳類。

本發明也提供一種治療在哺乳類中(包括人類)選自與多巴胺促動劑治療法有關連之亨丁頓氏病(Huntington's)及不自主運動之運動異常的方法，其包含以有效抑制 PDE10 之選擇性 PDE10 抑制劑量投予該哺乳類。

本發明進一步提供一種治療在哺乳類中(包括人類)選自巴金森氏病、腿不寧徵候群及原發性顫抖症之運動異常的方法，其包含以有效治療該異常之選擇性 PDE10 抑制劑量投予該哺乳類。

本發明也提供一種治療在哺乳類中(包括人類)選自巴金森氏病、腿不寧症候群及原發性顫抖症之運動異常的方法，其包含以有效抑制 PDE10 之選擇性 PDE10 抑制劑量投予該哺乳類。

本發明也提供一種治療在哺乳類中(包括人類)選自強迫症、杜萊德氏徵候群(Tourette's)及其它抽動異常之異常的方法，該方法包含以有效治療該異常之選擇性 PDE10 抑制劑量投予該哺乳類。

本發明也提供一種治療在哺乳類中(包括人類)選自強迫症、杜萊德氏徵候群(Tourette's)及其它抽動異常之異常

(6)

的方法，該方法包含以有效抑制 PDE10 之選擇性 PDE10 抑制劑量投予該哺乳類。

本發明進一步提供一種治療在哺乳類中(包括人類)的藥物成癮之方法，例如，酒精、安非它命、古柯鹼或鴉片鹼成癮，該方法包含以有效治療藥物成癮之選擇性 PDE10 抑制劑量投予該哺乳類。

本發明也提供一種治療在哺乳類中(包括人類)的藥物成癮之方法，例如，酒精、安非它命、古柯鹼或鴉片鹼成癮，該方法包含以有效抑制 PDE10 之選擇性 PDE10 抑制劑量投予該哺乳類。

如本文所使用的”藥物成癮”代表對藥物不正常的需求，並通常以強迫服用需求的藥物及有強烈的藥物渴望發作的刺激紊亂為特徵。

本發明進一步提供一種治療在哺乳類中(包括人類)包含注意力及/或認知缺陷徵候群之異常的方法，該方法包含以有效治療注意力及/或認知缺陷之選擇性 PDE10 抑制劑量投予該哺乳類。

本發明也提供一種治療在哺乳類中(包括人類)包含注意力及/或認知缺陷徵候群之異常的方法，該方法包含以有效抑制 PDE10 之選擇性 PDE10 抑制劑量投予該哺乳類。

如本文在”包含注意力及/或認知缺陷徵候群之異常”中所使用”注意力及/或認知缺陷”句子係指在一或多種遲滯的認知觀點機能，如記憶、理解力或學習及邏輯能力，

特別係在相對於其它在相同年齡群的個體而言的個體。”
注意力及/或認知缺陷”也表示減低任何個體的一或多種認知觀點機能，例如，發生在與年齡有關的認知衰退。

可以根據本發明治療的包含注意力及/或認知缺陷徵候群之異常的實例係癡呆症(例如，阿茲海默氏病、多發梗塞性癡呆症、酒精性癡呆症或其它與藥物有關的癡呆症、與顱內腫瘤或腦創傷有關連之癡呆症、與亨丁頓氏病或巴金森氏病有關連之癡呆症、或與 AIDS-有關之癡呆症、譫妄症、健忘症、創傷後壓力異常、弱智、學習異常(例如，閱讀障礙、數學障礙或書寫表達障礙)、注意力缺陷/過動異常及與年齡有關的認知衰退。

本發明也提供一種治療在哺乳類中(包括人類)的情緒異常或情緒發作之方法，其包含以有效治療該異常或發作之選擇性 PDE10 抑制劑量投予該哺乳類。

本發明也提供一種治療在哺乳類中(包括人類)的情緒異常或情緒發作之方法，其包含以有效抑制 PDE10 之選擇性 PDE10 抑制劑量投予該哺乳類。

可以根據本發明治療的情緒異常或情緒發作之實例包括(但不限於此)輕度、中度或重度的重鬱症發作、狂燥型或混合型情緒發作、輕狂燥型情緒發作、具有典型特性之抑鬱症發作、具有憂鬱特性之抑鬱症發作、具有緊張特性之抑鬱症發作、具有產後攻擊的情緒發作、中風後的抑鬱症、重鬱症、沮喪症、輕鬱症、經前焦躁症、精神分裂症的精神病後抑鬱症、加重精神病異常之重鬱症(如妄想異

常或精神分裂症)、躁鬱症(例如,躁鬱症第一型、躁鬱症第二型)及循環性情感性人格障礙症。

本發明進一步提供一種治療在哺乳類中(包括人類)的神經退化異常或症狀之方法,該方法包含以有效治療該異常或症狀之選擇性 PDE10 抑制劑量投予該哺乳類。

本發明進一步提供一種治療在哺乳類中(包括人類)的神經退化異常或症狀之方法,該方法包含以有效抑制 PDE10 之選擇性 PDE10 抑制劑量投予該哺乳類。

如本文所使用”神經退化異常或症狀”係指(除非有其它另外的指示)以在中樞神經系統的神經元機能障礙及/或死亡所引起的異常或症狀。以投予會預防在這些異常或症狀中具有神經元機能障礙或死亡風險及/或以補償以有風險的神經元的機能障礙或死亡引起的機能喪失的這種方式增強受損的或健康的神經元機能之試劑可以加速這些異常或症狀的治療。如本文所使用的”神經滋養劑”術語係指具有部份或全部這些特性的物質或試劑。

可以根據本發明治療的神經退化異常或症狀之實例包括(但不限於此)巴金森氏病、亨丁頓氏病、癡呆症(例如,阿茲海默氏病、多發梗塞性癡呆症、與 AIDS-有關的癡呆症及額顳葉癡呆症)、與腦創傷有關連之神經退化、與中風有關連之神經退化、與腦梗塞有關連之神經退化、以血糖過低誘發之神經退化、與癲癇性發作有關連之神經退化、與中神經毒有關連之神經退化及多重系統萎縮症。

在本發明的一個具體實施例中,神經退化異常或症狀

包含在哺乳類中(包括人類)的紋狀核中型多棘神經元之神經退化。

在本發明進一步的具體實施例中，神經退化異常或症狀係亨丁頓氏病。

“中神經毒”係指以神經毒素引起的中毒。神經毒素係任何可以引起神經死亡及因此使神經受損的化學品或物質。神經毒素之實例係酒精，當孕婦成癮時，則其可能造成酒精中毒及已知在新生兒中的胎兒酒精症候群的神經受損。神經毒素的其它實例包括(但不限於此)紅藻胺酸、多摩酸(domoiic acid)、阿克密利酸(acromelic acid)、特定的殺蟲劑(如 DDT)、特定的殺昆蟲劑(如有機磷酸鹽)、揮發性有機溶劑(如 hexacarbons，例如，甲苯)、重金屬(如鉛、汞、砷及磷)、鋁、作為武器的特定化學品(如橙色落葉劑及神經氣體)及神經毒素抗腫瘤劑。

如本文所使用的“選擇性 PDE10 抑制劑”術語係指有效抑制來自 PDE10 家族之酵素的程度更甚於來自 PDE1-9 家族或 PDE11 家族之酵素的物質，例如，有機分子。在一個具體實施例中，選擇性 PDE10 抑制劑係例如具有對 PDE10 之抑制作用的 K_i 比對任何其它的 PDE 酵素之抑制作用小或約 1/10。換言之，該物質以任何其它的 PDE 酵素所需要的濃度的約 1/10 或更低的濃度使 PDE10 活性抑制成相同的程度。

如果物質具有小於或約 10 μ M 之 K_i 時(以小於或約 0.1 μ M 較佳)，則通常將物質視為有效抑制 PDE10 活性。

在本文所述的治療法的一個具體實施例中，選擇性 PDE10 抑制劑係罌粟鹼。

以例如以物質抑制 PDE10 活性的能力與其抑制其它的 PDE 家族的 PDE 酵素之能力可以確認”選擇性 PDE10 抑制劑”。例如，可以檢定該物質抑制 PDE10 活性的能力，與抑制 PDE1、PDE2、PDE3A、PDE4A、PDE4B、PDE4C、PDE4D、PDE5、PDE6、PDE7、PDE8、PDE9 及 PDE10 的活性。

在以上所述的治療法的一個具體實施例中，選擇性 PDE10 抑制劑係罌粟鹼。

本發明也提供一種選擇性抑制在哺乳類中(包括人類)的 PDE10 之方法，其包含以有效抑制 PDE10 之罌粟鹼劑量投予該哺乳類。

如在”一種治療異常之方法”中的”治療”術語係指逆轉、緩和或抑制以該術語適用的異常或一或多種異常徵候群的進展。如本文所使用的術語也包含預防異常，憑病患的症狀而定，其包括預防異常或與其有關連的任何徵候群的攻擊與減低在攻擊之前的異常或任何其徵候群的嚴重性。如本文所使用的”治療”也指預防異常的復發。

例如，如本文所使用的”治療精神分裂症、類精神分裂症或精神分裂情感症”也包含治療一或多種該異常之徵候群(正、負及其它有關連的特性)，例如，治療與其有關連的妄想症及/或幻覺。其它的精神分裂症及類精神分裂症和精神分裂情感症的徵候群實例包括解構的言語、情感

平板、貧語症、喜樂不能、不適當的情感、焦躁情緒(以例如抑鬱、憂慮或氣憤形式)及一些認知機能障礙的徵兆。

如本文所使用的”哺乳類”術語係指”哺乳類”分類的任何成員，包括(但不限於此)人類、狗及貓。

本發明也提供篩選化合物之新穎檢定作用，以確認化合物係選擇性 PDE10 抑制劑。

例如，本發明也提供一種測定化學化合物是否具有選擇性抑制 PDE10 之活性的方法，該方法包含：a)以化學化合物施加於中型多棘神經元培養物；及 b)測量在培養物中的 CREB 磷酸化作用是否增加；以增加的 CREB 磷酸化作用因此測定在步驟(a)中施加的化合物具有選擇性抑制 PDE10 之活性。

本發明係提供一種測定化學化合物是否具有選擇性抑制 PDE10 之活性的方法作為另一個實例，該方法包含：a)以化學化合物施加於中型多棘神經元培養物；及 b)測量以在該培養物中的中型多棘神經元得到的 GABA 量是否增加；以該中型多棘神經元增加的 GABA 產量因此測定在步驟(a)中施加的化合物具有選擇性抑制 PDE10 之活性。

可由一般熟悉本技藝的人使用已知的技術製備中型多棘神經元培養物，例如(但不限於此)，以在本文以下詳細說明的技術。

可將化學化合物使用已知的方法施加於任何一個上述

檢定作用的中型多棘神經元培養物中。可以自動化或手動施基化學化合物。而且，可以根據任何一種檢定作用以高輸出篩選的方式篩選一系列的化學化合物。可視需要使用超過一種以上的中型多棘神經元培養物及/或使用整份的單一中型多棘神經元培養物，以同時及/或連續檢定不同的化合物以選擇性抑制 PDE10 之活性。任何一種這些檢定作用可以包含自動化(例如，電腦化)步驟。

可以使用那些一般熟悉本技藝的人已知的技術測量在中型多棘神經元培養物(類)中的 CREB 磷酸化作用。例如，以均質化使用對 CREB 具有特異性之抗體所得到的蛋白混合物之西方點墨反應處理之中型多棘神經元培養物可以測量 CREB 磷酸化作用。根據一或多種已知的方法可以測量抗體 CREB 複合物，例如，使用第二個螢光標記、放射標記之抗體或以酵素或酵速基質標記之抗體。

可以使用那些一般熟悉本技藝的人已知的技術測量在中型多棘神經元培養物(類)中的 CREB。例如，可以先使用許多已知的核菌株的其中之一及微管蛋白偵測在中型多棘神經元培養物中的神經元，以確認處理的細胞。接著可以使用對 GABA 具有特異性之以螢光標記之抗體偵測 GABA-表現神經元。或以自動化系統，或以視覺計算 GABA-表現神經元數量。可以使用除了螢光法之外的影像處理系統，包括(但不限於此)以放射標記之 GABA-表現抗體。另一方式係可將處理之中型多棘神經元培養物均質化，並以任何許多已知的方法定量其中的 GABA，包括(但

不限於此)HPLC、ELISA 或酵素反應。

本發明的詳細說明

吾等以本發明確認選擇性 PDE10 抑制劑。吾等使用該抑制劑及類似的選擇性 PDE10 抑制劑測定 PDE10 抑制劑對在表現高 PDE10 值之神經元群中(紋狀核中型多棘神經元)的環系核苷酸代謝具有特徵性及獨特效應。這些抑制劑也增加在這些神經元中的轉錄調節劑 cAMP 反應元素結合蛋白(CREB)之磷酸化作用。CREB 磷酸化作用與各種基因的轉錄變化有關連。因此，其因此具有機能性結果，其包括(但不限於此)神經元的存活效應及以反映在增加長期增效性的神經組織中的分化和變化。吾等在此揭示 PDE10 抑制劑在中型多棘神經元中具有這種效應，即促進這些神經元分化成 GABA 顯型。而且，吾等揭示 PDE10 抑制劑對完整動物中的中樞神經系統具有機能性效應。吾等尤其揭示給予老鼠的 PDE10 抑制劑加強以多巴胺 D2 受體拮抗劑氟哌啶醇誘發之昏厥，但是在單獨給予相同劑量時不會引起昏厥。PDE10 抑制劑也抑制以 NMDA 受體拮抗劑天竺麩誘發之高運動力。這些發現支持 PDE10 抑制劑會影響中樞神經系統及在治療學上可用於治療在申請專利範圍內引證的中樞神經系統異常的申請專利範圍。

例如，可自陰莖海綿體製備 PDE2、3 及 5 同工酶(包括人類 PDE)；自心室製備 PDE1(包括人類)；自骨骼肌製備 PDE4 同工酶(包括人類)。例如，可自犬視網膜製備

PDE6。例如，以 Boolell, M.等人之 *Int. J. Impotence Research* 8:7-52, 1996 說明自原生組織製備酵素的說明，將其併入本文以供參考。

同樣可以原生組織製備 PDE7-11。另一選擇係以轉染成例如 SF9 細胞之完整的人類重組體克隆可以得到來自 PDE7-9 及 11 家族之同工酶，分別如 Fisher, D. A.等人之 *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 246, 570-577, 1998; Soderling, S. H.等人之 *PNAS* 96:7071-7076, 1999; Fisher, D. A.等人之 *J. Biol. Chem.* 273, 15559-15564, 1998B 及 Fawcett, L.等人之 *PNAS* 97:3702-3707, 2000 所述。也可以自轉染成 SF9 細胞之老鼠重組體克隆得到 PDE10(Fujishige 等人之第 226 冊 *European Journal of Biochemistry*, 1118-1127(1999))。接著以來自細胞溶胞產物的可溶性部份的 FPLC 製備酵素，如以 PDE6 所述。將上述的參考文以其全文併入本文以供參考。

在一個檢定作用中，以 PDE10 及來自其它基因家族之 PDE 篩選抑制環系核苷酸水解作用之物質。在每一個 PDE 檢定作用中所使用的環系核苷酸基質濃度係 $1/3$ 之 K_m 濃度，容許比較所有不同的酵素之 IC_{50} 值。使用如以上所述以閃爍親近法 (SPA) 為基準之方法 (Fawcett 等人, 2000) 測量 PDE 活性。在不同的物質濃度及使得 IC_{50} 近似於 K_i (在 $1/3$ 之 K_m 濃度下具有 3:1 之未標記對以 $[^3H]$ 標記之比例的 cGMP 及 cAMP) 之低基質的存在下檢定混合的酵素量 (PDE1-11)，以測定 PDE 活性。將最終檢定體積以檢

定緩衝液[20 毫克分子量之 Tris-HCl pH7.4、5 毫克分子量之 $MgCl_2$ 、1 毫克/毫升之胎牛血清白蛋白]製成 100 微升。以酵素開始反應，在 30℃ 下培育 30-60 分鐘，以得到 <30% 之基質轉換，並以 50 微升矽酸鉍 SPA 珠 (Amersham)(對 PDE9 及 11 而言，包括 3 毫克分子量的各個未標記之環系核苷酸)終止反應。將平盤再密封及搖動 20 分鐘，然後允許珠在暗室中沉降 30 分鐘及接著在 TopCount 平盤讀取機上(康乃狄克州梅瑞登(Meriden)之 Packard)計數。可將放射活性單元轉化成未抑制之控制品(100%)的活性百分比，對抑制劑濃度作圖，並使用'擬合曲線'微軟 Excel 延伸可以獲得抑制 IC_{50} 值。

一種選擇性 PDE10 抑制劑之實例係罌粟鹼(1-[(3,4-二甲氧基苯基)甲基]-6,7-二甲氧基異喹啉)。罌粟鹼係在治療腦及動脈血管痙攣與陽痿所使用的已知有效的平滑肌鬆弛劑。雖然不完全瞭解這些治療活性的基礎，但是通常將彼等描述成非選擇性磷酸二酯酶抑制劑的罌粟鹼活性(第 6 版 The Pharmacological Basis of Therapeutics, A. G. Gilman, L. S. Goodman, A. Gilman(編輯者)紐約市 Macmillan 出版公司，1980, p380)。雖然罌粟鹼係天然生成的植物生物鹼，但是已在例如 Brochmann-Hanssen 等人之 J. Pharm. Sci. 60:672, 1971 中說明其完整的生物合成作用，將其併入本文以供參考。

可根據本發明投予或單獨或與在醫藥上可接受之載體組合的選擇性 PDE10 抑制劑，或以單次或多次劑量投藥

。適合的醫藥載體包括惰性固體稀釋劑或填充劑、無菌水溶液及各種有機溶劑。接著可將因此形成的醫藥組成物輕易以各種劑型投藥，如藥片、粉劑、錠劑、糖漿、注射溶液及類似劑型。若必要時，這些醫藥組合物可以包括附加的成份，如香料、結合劑、賦形劑及類似成份。因此，就口服投藥的目的而言，可以一起使用包括各種賦形劑(如檸檬酸鈉、碳酸鈣及磷酸鈣)之藥片與各種崩散劑(如澱粉、甲基纖維素、藻酸及特定的複合矽酸鹽)、與結合劑(如聚乙烷基環吡咯酮、蔗糖、白明膠及阿拉伯膠)。此外，常以製錠為目的而使用潤滑劑(如硬脂酸鎂、月桂基硫酸鈉及滑石粉)。也可以使用相似型式的固體組成物作為軟及硬填充膠囊中的填充劑。較佳的該物質包括乳糖或牛奶糖及高分子聚乙二醇。在希望以水懸浮液或酏劑用於口服投藥時，則可將其中基本的活性成份與各種甜味劑或調味劑、著色劑或染料和若必要時的乳化或懸浮劑及與稀釋劑(如水、乙醇、丙二醇、甘油及其組合物)組合在一起。

關於非經腸投藥，可以使用包括在芝麻油或花生油、水性丙二醇或在無菌水溶液中的選擇性 PDE10 抑制劑之溶液。若必要時，應該將這些水溶液經適當地緩衝，並使液體稀釋劑先以充份的食鹽水或葡萄糖成為等滲液。這些特殊的水溶液尤其適合於經靜脈內、肌肉內、皮下及腹膜內投藥。以那些熟悉本技藝的人已知的標準技術可輕易取得所有的無菌水性培養基。

可將選擇性 PDE10 抑制劑以本發明的口服、皮膚(例

如，經由貼片的使用)、非經腸(例如，經靜脈內)、直腸或局部治療法投藥。通常根據本文所述的方法用於治療異常或症狀之 PDE10 抑制劑的日劑量通常係以係每公斤欲治療之病患的體重計從約 0.01 至約 100 毫克/公斤為範圍。可將選擇性 PDE10 抑制劑以每天計從約 1 毫克至多達約 7000 毫克為範圍之劑量以單次或分次(即多次)份量投予平均重量的成人(約 70 公斤)，其係作為一種劑量實例，以治療精神病異常或亨丁頓氏病。可由一般熟練的醫師以斟酌已知的考量(如欲治療之病患的體重、年齡及症狀、受苦難的嚴重性及所選擇的特殊投藥路徑)進行以上述劑量範圍為基準之變化。

由以下的實例例證本發明。但是，當然不希望由以下的實例細節限制如本文詳細說明及申請專利範圍所引證的本發明。

【實施方式】

實例

實例 1. 選擇性 PDE10 抑制劑：罌粟鹼：

以 PDE10 及來自其它基因家族之 PDE 的綜合測驗篩選抑制環系核苷酸水解作用之罌粟鹼。在每一個 PDE 檢定作用中所使用的環系核苷酸基質濃度係 $1/3$ 之 K_m 濃度。其容許比較所有不同的酵素之 IC_{50} 值。

使用在以上詳細說明段落中所述之矽酸鈣 SPA 珠的檢定作用測量 PDE 活性。將放射活性單元轉化成未抑制

之控制品(100%)的活性百分比，對抑制劑濃度作圖，並使用‘擬合曲線’微軟 Excel 延伸獲得抑制 IC_{50} 值。

吾等觀察罌粟鹼係一種特別有效力競爭的 PDE10 抑制劑，具有 18nM 之 IC_{50} 值(表 1)。罌粟鹼對所有其它測試的 PDE 具有相當低的效力。在 PDE10 之後，以罌粟鹼最有效力抑制的酵素係 PDE4，具有 320nM 之 IC_{50} ，該值比 PDE10 更低 19 倍。因此，這些數據顯露首先罌粟鹼係選擇性 PDE10 抑制劑及可以使用該化合物研究該酵素物理性。

表 1. 罌粟鹼抑制作用的 IC_{50} 值。以基質濃度係 1/3 之 K_m 值的基質濃度測定每一種酵素的 IC_{50} ，以容許比較所有的酵素。PDE10 選擇率係以 PDE10 之 IC_{50} 值除以所提供的 PDE 之 IC_{50} 值。

同工酶	IC_{50} , μM	選擇率 (IC_{50}/IC_{50} , PDE10)
PDE10	0.018	-
PDE1	37	2,055
PDE2	9	500
PDE3A	1.3	72
PDE4A	1.9	105
PDE4B	1.4	78
PDE4C	0.8	44
PDE4D	0.32	18
PDE5	8	444
PDE6	0.86	48
PDE7	27	1,500
PDE8	>10	>555
PDE9	400	20,000
PDE11	11	611

實例 2. 選擇性 PDE10 抑制劑對在中型多棘神經元中的環系核苷酸代謝效應：

吾等檢查如以實例 1 測定為選擇性 PDE10 抑制劑之罌粟鹼對在原培養液中的老鼠中型多棘神經元中的環系核苷酸代謝效應。

在 BDNF 的存在下自 E17 老鼠胚紋狀核培養之神經元顯示非常類似於以上所述的顯型(Ventimiglia 等人之 Eur. J. Neurosci. 7 (1995) 213-222)。以約 50%的這些神經元菌株具有正性的 GABA 免疫反應性，確定在培養液中有中型多棘神經元的存在。以 RNAase 保護檢定作用確定在這些培養液中的 PDE-10 信使以 4-6DIV 的表現。

如以上所述製備紋狀核培養液(Ventimiglia 等人之 Eur. J. Neurosci. 7:213-222, 1995)。簡言之，解剖 E17 老鼠的紋狀核(尾狀核及被殼)，將其解離，以得到單細胞懸浮液及以 5×10^4 神經元/井之密度覆蓋在以聚-L-鳥胺酸/昆布胺酸塗佈之多井平盤中。將細胞覆蓋在具有 B27 補充物及 BDNF(100 毫微克/毫升)之神經細胞無血清培養基中。典型係在 4 天之後進行活體外實驗。中型多棘神經元包含大部份在這些培養液中的細胞(如以 GABA 免疫反應性確定的 50 至 60%)。

關於 RNAase 保護檢定作用，如以上所述(Iredale, PA 等人之 Mol. Pharmacol. 50:1103-1110, 1996)，以在 20°C 下以 150,000xg 離心 21 小時這些老鼠中型多棘神經元的原培養液經由 5.6M 之氯化銨梯度製備 RNA。將 RNA 片

再懸浮在 0.3M 醋酸鈉 pH5.2 中，在乙醇中沉澱及以分光光度測定法測定濃度。以自鼯鼠 cDNA 分離的 941bp 片段(對應於 bp380-bp1294)的 PCR 放大作用製備 PDE10 基因核酸探子。接著將該片段選殖成 pGEM32Zf。將載體線型化，並使用 T7 RNA 聚合酶合成以 [^{32}P]-標記之反義基因核酸探子。使用 RPAII 套組(Ambion)進行 RNase 保護檢定作用。簡言之，將 5 微克總細胞 RNA 與以 [^{32}P]-標記之反義基因核酸探子($\sim 105\text{cpm}/\text{樣品}$)在 42°C 下經隔夜雜交。在隔天將樣品與 RNase A 及 T1 在 37°C 下培育 30 分鐘，並接著沉澱經保護之雙株 RNA 片段及在含尿素之 6%聚丙稀醯胺凝膠上成長。

爲了分析罌粟鹼對環系核苷酸的效應，故在 4 天之後以不含 $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+}$ 之磷酸鹽緩衝之食鹽水清洗活體外紋狀核細胞培養液，並在包括不含 $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+}$ 之磷酸鹽緩衝之食鹽水、30mM 之 HEPES、1mM 之 CaCl_2 、1 毫克/毫升之右旋糖及 5mM 之 MgCl_2 的緩衝液經 1 小時預沉澱。將紋狀核細胞曝露於磷酸二酯酶抑制劑及在 37°C 下培育 20 分鐘。在測量 cGMP 時，在以化合物培育 20 分鐘之後，將神經元以亞硝酸鐵氰化鈉(氧化氮來源)刺激 2 分鐘。在測量 cAMP 時，在以化合物培育 20 分鐘的期間，將神經元以佛斯寇林(腺苷酸環化酶之活化劑)刺激。使用 9:1 之 cAMP SPA 直接篩選檢定緩衝液(具有 0.01%疊氮鈉之 0.05M 醋酸鹽)與緩衝液 A(133 毫克/毫升之溴化十二烷基三甲基銨)之組合物溶胞細胞，並將溶胞產物在乾冰上冷

凍。使用 cGMP[I125]或 cAMP[I125]閃爍親近法(SPA)系統(分別係 Amersham 編號 RPA 540 及 RPA 449)偵測在細胞溶胞產物中的各個環系核苷酸濃度。

單獨的罌粟鹼不會在紋狀核中產生可測到變化的或 cAMP 或 cGMP 之基礎值。吾等因此檢查化合物在其中分別以佛斯寇林或沒有任何供體亞硝鹽鐵氰化鈉(SNP)刺激 cAMP 或 cGMP 合成作用之條件下的效應。以佛斯寇林(0.1-10 μ M)經 20 分鐘的培養液刺激作用得到濃度依存性增加的 cAMP 值。以培養液短暫曝露於 SNP(3-1000 μ M)2 分鐘得到濃度依存性增加的 cGMP 值。以單獨的佛斯寇林不會改變 cGMP 濃度，也不會以 SNP(300 μ M)增加 cAMP 值。爲了測定罌粟鹼對 cAMP 或 cGMP 的代謝效應，故將紋狀核培養液以各種濃度的化合物培育及接著以次大有效的或佛斯寇林(1 μ M)或 SNP(100 μ M)濃度刺激。這些佛斯寇林或 SNP 濃度分別造成比 cAMP 或 cGMP 之基礎值增加 2-3 倍。罌粟鹼造成以濃度依存性增加以 SNP 誘發之 cGMP 累積作用，具有 11.7 μ M 之 EC₂₀₀ 值(得到增加 2 倍的抑制劑濃度)(表 2)。在 100 μ M 時發現最大效應，在此時的 cGMP 值比在以單獨的 SNP 刺激之培養液中提升 5 倍。罌粟鹼也造成增加在以佛斯寇林刺激之培養液中的 cAMP 累積作用。但是，以化合物促進 cAMP 增加的效力比對 cGMP 小 3.3 倍。將罌粟鹼在紋狀核培養液中的效應與具有不同選擇率之其它 PDE 抑制劑比較(表 2)。IBMX(非選擇性抑制劑)造成以濃

度依存性增加在以 SNP-或佛斯寇林刺激之培養液中的 cGMP 及 cAMP 兩者之累積作用，分別具有 19 及 30 μ M 之 EC_{200} 值。選擇性 PDE4 抑制劑(咯利普蘭)增加以佛斯寇林刺激之培養液中的 cAMP 之累積作用，具有 2.5 μ M 之 EC_{200} 值，並需要更多 10 倍的濃度使 cGMP 累積速度加倍。托普司特 zaprinast)(一種偏好 PDE 之 cGMP 抑制劑)以 98 μ M 之濃度使在這些神經元中的 cAMP 值加倍。但是，以 100 μ M 之該化合物不會使 cGMP 值完全 2 倍。這些數據顯露首先罌粟鹼對在中型多棘神經元中的環系核苷酸調節作用獨特的效應，以及該效應係由於對 PDE10 的選擇性。

表 2

使在老鼠紋狀核神經元之原培養液中的 cGMP 及 cAMP 提升之 EC_{200} 。將 EC_{200} 值以使在以 SNP-或佛斯寇林刺激之培養液中的 cGMP 及 cAMP 分別得到增加 200% 之濃度表示。每一個值係以指定的實驗次數(n)的平均 $\pm$ S.E.M.。在每一次實驗中，在 3-6 個同種培養液重複每一個條件。

化合物	cGMP 以 μ M 計之 EC_{200} ， $\pm$ S.E.M.(n)	Camp	Camp/cGMP
罌粟鹼	11.7 $\pm$ 8.2(4)	38.3 $\pm$ 11.4(4)	3.3
咯利普蘭	29.2 $\pm$ 10.3(3)	2.5 $\pm$ 2.0(3)	0.09
托普司特	98.3 $\pm$ 10.3(3)	>100(3)	1
IBMX	19.5(1)	30.2(2)	1.5

實例 3. 選擇性 PDE10 抑制劑在基底神經節機能之動物中的效應：

在人類及非人類哺乳類中的研究顯示以基底神經節調節運動範圍與認知及感情/慾望行為 (Graybiel, A. M.之 *Current Biology* 10(14):R509-11, 2000)。已發展使用以嚙齒科中的實驗模式評定化合物對基底神經節機能的效應。吾等發現罌粟鹼在兩種這樣的模式中具有非預期獨特的行為效應分布。

測試單獨或與氟哌啶醇組合之罌粟鹼誘發 CD 雄鼠昏厥的能力效應。使用該動物模式分析化合物對基底神經節的產量效應。將罌粟鹼 (1.0、3.2、10 或 32 毫克/公斤)或媒劑經皮下投藥。就部份實驗而言，立即以氟哌啶醇投藥。在投予藥物之後 30 分鐘，以動物前掌放在上升 (10 公分)的棍棒 (1 公分直徑)上及測定以 30 秒的潛伏截止點使兩隻前掌自棍棒移開的潛伏狀態，以定量昏厥程度。以庫斯卡-沃雷斯變異分析比較，在每一組治療組內分出潛伏狀態等級。事後分析係以曼-惠特尼 (Mann Whitney) U 試驗。

抗精神病劑 (氟哌啶醇)在該模式中產生強烈的昏厥現象，如先前所述 (Chartoff, E 等人之 *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 291:531-537, 1999)。發現氟哌啶醇最大的有效劑量係 1 毫克/公斤 s.c.。相對之下，在單獨投予高達 32 毫克/公斤 s.c. ($p=0.86$)之罌粟鹼劑量時，則其不會誘發昏厥。但是，如圖 1 所示，罌粟鹼會加強以次大劑量之氟哌啶醇

(在 0.3%酒石酸中的 0.32 毫克/公斤 s.c.)($p < 0.001$)的昏厥效應。加強以氟哌啶醇誘發之昏厥的罌粟鹼的最低有效劑量係 32 毫克/公斤 s.c.。以該實驗證明罌粟鹼可以改變基底神經節的產生，與抗精神病活性一致的方向。

實例 4. 選擇性 PDE10 抑制劑在精神病之動物模式中的效應：

吾等接著檢查罌粟鹼對在行為箱中測量的老鼠運動活性的效應。將減低在嚙齒科中以 PCP 刺激之運動活性的作用公認係搜尋新穎抗精神病劑的初期篩選。通常更新的非典型抗精神病劑證明會優先抑制以 PCP-相對於以安非它命刺激之運動活性。自 Charles River(麻州之 Wilmington)獲得 Sprague-Dawley 雄成鼠(250-300 公克)。使用在市售的行為箱中(賓州 Allentown 之 Coulbourn Instrument)的交叉行為評定運動活性。在投予藥物之後，以 5 分鐘間隔收集 1 小時的數據。使動物接受或媒劑(5% DMSO, 5%Emulphor, 90%食鹽水)、天使塵(PCP, Sigma Chem. Co.)或安非它命硫酸鹽(RBI)，接著立即接受或媒劑或試驗化合物。使用司徒特氏 t-試驗進行統計分析。

精神刺激劑安非它命及天使塵(PCP)兩者會強烈增加在該模式中的運動活性。單獨的罌粟鹼(32 毫克/公斤 s.c.)得到少量降低的運動活性，其在一些研究中具有統計學上的顯著性(圖 2)。但是，以該相同劑量之罌粟鹼得到顯著減低以 3.2 毫克/公斤 i.p.之天使塵刺激之運動活性，

不會影響以效用相等之安非它命劑量(1 毫克/公斤 i.p.)得到的活性。

在使用這種運動動物篩選的另一個實驗中，將罌粟鹼與安非它命(1 毫克/公斤 i.p.) 或 PCP(3.2 毫克/公斤 s.c.) 共同投藥，並以 30 分鐘測量運動性。在該實驗中，罌粟鹼會有效抑制以安非它命及 PCP 兩者刺激之運動性。

以上兩種實驗的結果顯示罌粟鹼對運動性具有的行爲效應與抗精神性分布一致。

在以下的實例 5-7 中，根據如本發明的詳細說明所述測定選擇性 PDE10 抑制劑及選擇性 PDE1B 抑制劑(表 3 展示對 PDE1、2、3、4、5、7、8、9、10 及 11 而言的選擇性 PDE10 抑制劑以 μM 計之 IC_{50})。

表 3

以對化合物之 IC_{50} 值證明其細選擇性 PDE10 抑制劑。
 以約 $1/3$ 之 K_m 值之基質濃度測定對每一種酵素之 IC_{50} 。

同工酶	IC_{50} , μM
PDE10	0.04
PDE1A	0.97
PDE2	0.86
PDE3A	1.2
PDE4D	1.6
PDE5	3.2
PDE7B	6.4
PDE8A	>10
PDE9	4.8
PDE11	0.78

實例 5. PDE 抑制劑對在中型多棘神經元中的 cAMP 及 cGMP 累積效應：

如實例 2 的討論，自 E17 或 E18 老鼠胚之紋狀核製備中型多棘神經元。將紋狀核以酪胺酸消化，並將解離細胞覆蓋在具有包括 B27 補充物之神經細胞無血清培養基中以聚-L-鳥胺酸/昆布胺酸塗佈之平盤上。關於環系核苷酸形成作用及 CREB 磷酸化作用的檢定，也以 50 毫微克/毫

升之 BDNF 補充神經元及在 6DIV 下使用。在此時約 90% 之細胞具有神經元形態學及對 GABA 具有 50% 之正性染色。

在中型多棘神經元培養液中，吾等發現對 PDE10 和 PDE1B 及咯利普蘭(其對 PDE4 具有選擇性)之選擇性抑制劑會加強增加分別以佛斯寇林或 SNAP 刺激之 cAMP(圖 3) 或 cGMP(圖 4)之累積作用。但是在沒有刺激物的存在下加入化合物時，則未偵測到任何的 cAMP 或 cGMP 變化。

以 PDE 抑制劑加強增加 cAMP 相對於 cGMP 之效力分化該抑制劑(表 4)。在表 4 中，以 EC_{200} 表示效力，即分別在 cAMP 或 cGMP 中增加 200% 以佛斯寇林或 SNAP 誘發增加的累積作用之 PDE 抑制劑濃度。

表 4

中型多棘神經元， EC_{200} ， μM

	CGMP	cAMP	cAMP/cGMP
選擇性 PDE10 抑制劑	4.0±1.0	28.9±7.0	7.2
選擇性 PDE1B 抑制劑	1.4±0.4	3.9±1.3	2.8
咯利普蘭	71.1±9.9	2.0±0.2	0.03

實例 6. PDE 抑制劑對在中型多棘神經元中的 CREB 磷酸化效應：

以 cAMP 及 cGMP 分別活化蛋白激酶 PKA 及 PKG。該兩種激酶能夠使轉錄調節劑 CREB 磷酸化。吾等檢查在

表 3 中的選擇性 PDE 抑制劑對作為在環系核苷酸信號梯瀑中的下游事件之 CREB 的磷酸化效應。

以佛斯寇林之刺激作用得到強烈增加的 CREB 磷酸化作用，如以西方點墨反應的測量。選擇性 PDE 10 抑制劑及咯利普蘭也會增加 CREB 磷酸化作用，如以西方點墨反應的測量。在圖 5 中展示選擇性 PDE10 抑制劑與咯利普蘭的效應比較。測定增加 CREB 磷酸化作用之效率等級係佛斯寇林 > 選擇性 PDE 10 抑制劑 > 咯利普蘭。選擇性 PDE1B 抑制劑不具增加 CREB 磷酸化作用之活性。

實例 7. PDE 抑制劑對在中型多棘神經元的分化效應：

在 CREB 磷酸化作用之後活化的轉錄事件包含神經元的存活及分化作用。吾等調查在表 3 中的 PDE 抑制劑是否會完成中型多棘神經元的存活及分化作用。使用以 Ventimiglia 等人所使用的樣本進行這些實驗(參考如上之 Ventimiglia 等人，1995)，以檢定 BDNF 對這些在中型多棘神經元中的處理效應。特別係將 PDE 抑制劑在塗覆時加入中型多棘神經元培養基中，並接著使用來自 Cellomics, Inc.(美國賓州 Pittsburgh)之 Array Scan System 定量在 6DIV 下各種與神經元存活及分化作用有關的參數。

在檢查的參數當中，吾等發現選擇性 PDE10 抑制劑會顯著地增加 GABA 神經元數量。可將細胞如以下的方式染色：藍色-核；綠色-神經元；紅色-對 GABA 具有正性

染色的神經元。選擇性 PDE10 抑制劑與 BDNF 一樣有效，反之，咯利普蘭及選擇性 PDE1B 抑制劑不具任何效應(圖 6)。

討論

曾提出使用當場的雜交作用高表現在紋狀核、阿肯伯氏核及嗅結節中的 PDE10 mRNA(如上之 Seeger, T. F. 等人)。也曾使用 PDE10 蛋白質之單株抗體發現在這些腦部區域中具有相對高的 PDE10 蛋白質值(如以上之 Menniti, F. S., Stick, C. A., Seeger, T. F., 和 Ryan, A. M., Immunohistochemical localization of PDE10 in the rat brain)。在紋狀核及阿肯伯氏核內，吾等發現在中型多棘神經元中具有高表現值之 PDE10 mRNA。中型多棘神經元係紋狀核、阿肯伯氏核及嗅結節的神經元產量，並代表約 95% 在這些腦部結構中所有的神經元。而且，在自紋狀核、阿肯伯氏核及嗅結節突出至其它的腦部區域(包括蒼白球及腦部黑質)之中型多棘神經元之突出物(軸索及末端)中觀察到高的 PDE10 蛋白質值。這些腦部區域本身具有低的或無法偵測到的 PDE10 mRNA 值。因此，在這些區域中的高 PDE10 蛋白質值起源於中型多棘神經元的軸索及末端。此外，PDE10 mRNA 及蛋白質以較低的值表現在其它腦部區域(皮質、海馬及小腦)的神經元中。

在紋狀核及阿肯伯氏核中的高 PDE10 表現值對基底神經節大部份的皮質輸入核與中腦多巴胺能突出物之主要

末端範圍特別有利。紋狀核及其腹部延伸(阿肯伯氏核)接受來自實際上每一個腦皮質區域之谷胺酸能傳送物，並具有作為寬的皮質活性範圍之副皮質整和位置之機能。通常認為背紋狀核涉入運動行為的調節作用，反之，包括阿肯伯氏核之腹面區具有調節情感/慾望行為的機能。因此，吾等相信 PDE10 有可能涉入調節許多這些基本的生理處理的信號途徑。

事實上吾等係揭示 PDE10 之抑制作用對在中型多棘神經元中的環系核苷酸代謝作用及 CREB 信號具有與那些以 PDE4 或 PDE1 及其它主要以這些神經元表現之 PDE 的抑制作用造成的效應不同的效應。吾等也揭示 PDE10 抑制劑對在活體內基底神經節具有可論證的效應。

選擇性 PDE10、4 及 1 抑制劑各自增加在分別以 SNAP 或佛斯寇林刺激之中型多棘神經元中的 cGMP 及/或 cAMP 累積作用(圖 3 及 4)。但是，抑制劑以不同的效力比影響兩種環系核苷酸(表 3)。這些差異有可能反映出 PDE10、4 及 1 對兩種環系核苷酸的內因性親和力與區分不同的 PDE 進入環系核苷酸池中。顯然這些抑制劑在沒有刺激作用的存在下對 cAMP 及 cGMP 值不具可測量的效應。CREB 的磷酸化作用係其中一種以環系核苷酸信號梯瀑活化的下游事件。吾等證明選擇性 PDE10 抑制劑及選擇性 PDE4 抑制劑會增加 CREB 磷酸化作用，以選擇性 PDE10 抑制劑更有效力及效率。在沒有其它刺激物及因此在沒有可偵測到的環系核苷酸值的存在下加入化合物時，

則這些效應會發生。吾等已展示選擇性 PDE1B 抑制劑不具活性。這些結果顯示 PDE10 在中型多棘神經元中的環系核苷酸信號中扮演獨特的角色，以及 PDE10 特別顯現與 CREB 磷酸化調節作用的組合。

在活體外系統中所闡述的不同的 PDE10 抑制效應相當於在活體內基底神經節機能獨特的 PDE10 抑制效應。吾等揭示以選擇性 PDE10 抑制劑(罌粟鹼)加強多巴胺 D₂ 受體拮抗劑(氟哌啶醇)之昏厥效應，不會只產生昏厥。而且，該化合物會減低以 NMDA 受體拮抗劑(天使塵)誘發之過度運動。以罌粟鹼的該藥理分布預測其及所有的 PDE10 抑制劑可用於治療神經病及精神病異常，其包含在基底神經節內的機能障礙，如以下的討論。

以皮質輸入紋狀核提供 GABA 能中型多棘神經元初期激發動力。依次以來自中腦的大量谷胺酸能輸入調節中型多棘神經元的谷胺酸能活化作用。已在神經元研究中證實這兩種傳送物系統的拮抗本性。例如，以或多巴胺受體促動劑或谷胺酸受體的 NMDA 副型的拮抗劑可在實驗室動物中產生運動刺激物活性(Carisson, M. L.和 Carisson, A. 之 Trends Neurosci. 13:272-276, 1990)。NMDA 受體拮抗劑減低 D₂ 多巴胺受體拮抗劑(如氟哌啶醇)之昏厥效應，作為以氟哌啶醇誘發之基因表現(Chartoff, E.等人之 J Pharmacol. Exp. Ther. 291:531-537, 1999)。更已在最近證明以阻礙 D₂ 多巴胺受體造成增加紋狀核 NMDA 受體的磷酸化或活化狀態(Leveque 等人之 Journal of Neuroscience

20(11):4011-4020, 2000)。

對所有在臨床上有效的抗精神病劑具有效力之 D_2 -拮抗劑活性的認知引導精神分裂症徵候群係在腦邊緣多巴胺系統中活動過度的結果的原始假設。以化學化合物減低直接或間接的多巴胺促動劑的能力成為搜尋新的抗精神病劑重要的實驗室試驗。更在最近以 NMDA 受體拮抗劑(如 PCP)精確地再現人類的精神分裂症正、負及認知徵候群的能力(在 1959 年的 Luby 等人；在 1959 年的 Rosenbaum 等人；在 1994 年的 Krystal 等人)引導發展出低功能學說理論的精神分裂症。該假設簡單地提出在精神分裂症中以紋狀核介入之行爲抑制作用有缺陷，由於谷胺酸能減低之故，以及尤其係以 NMDA 受體介入之神經傳遞作用。該假設與 D_2 多巴胺受體拮抗劑已知的抗精神病效應完全一致，提供彼等直接或間接不抑制以皮質輸入紋狀核之能力(如以上所述)。以 PCP 複製在人類的精神分裂症徵候群的真實性引導在嚙齒科中使用以 PCP 刺激之運動作為搜尋新穎抗精神病劑之初期篩選。以更新及想必更有效的非典型抗精神病劑證明抵抗以 PCP 刺激之運動活性比以安非它命刺激之運動活性更具優勢的活性證明可能出現對該研討方法的支持(Gleason S. D. 和 Shannon H. E. 之 Psychopharmacol. 129:79-84, 1997)。

雖然目前的抗精神病治療法的研討方法通常係以薄膜受體為標的，但是吾等在此提出 PDE10 在中型多棘神經元內的細胞內現象也可以得到抗精神病效應。已知以增加

cAMP 及 PKA 活性增強紋狀核神經元對谷胺酸促動劑(包括 NMDA)的反應(Colwell, C. S.和 M. S. Levine 之 J. Neuroscience 15(3):1704-1713, 1995)。氟哌啶醇之精神安定作用也憑增加的 cAMP 值(Ward, R. P.和 D. M. Dorsa 之 Neuroscience 89(3):927-938, 1999)及 PKA 活化作用(Adams, M. R.等人之 Proc Natl Acad Sci USA 94:12157-12161, 1997)而定。在 D₂ 受體受到阻礙之後，也會使紋狀核 cGMP 值增加(Altar, C. A.等人之 Eur J. Pharmacol. 181:17-21, 1990)，以及已知 PKG 會使部份與 PKA 相同的下游基質(包括蛋白質磷酸酶 I 之內源性抑制劑，DARPP)磷酸化(Greengard P 等人之 Brain Res. Rev. 26:274-284, 1998)。因此，吾等假設可以合理地預期能夠選擇性增加在紋狀核內的中型多棘神經元中的環系核苷酸值之試劑會增大紋狀核機能，以得到抗精神病效應，並假設 PDE10 抑制劑將具有治療精神病之治療效應，因為這種化合物將抑制以 PDE10 催化之 cAMP 及 cGMP 代謝作用，增加在中型多棘神經元中的這些環系核苷酸值。

除了精神病之外，不正常的基底神經節機能已和各種神經精神病症狀有牽連，包括注意力缺陷/過度活動異常(ADHD)及有關的注意力異常(Seeman, P.等人之 Molecular Psychiatry 3:386-96, 1998)、抑鬱症(Kapur, S.之 Biol. Psychiatry 32:1-17, 1992; Willner, P.之 Brain Res. 287:225-236, 1983)、強迫症(包括杜萊德氏徵候群及其它抽動異常)(Graybiel AM. Rauch SL. 之 Toward a

neurobiology of obsessive-compulsive disorder. *Neuro.* 28(2):343-7, 2000)及物質成癮 (Self, D. W.之 *Annals of Med.* 30:379-389, 1998)。許多神經異常也與基底神經節機能障礙有關連，包括巴金森氏病、腿不寧徵候群 (Hening, W.等人之 *Sleep* 22:970-999, 1999)及亨丁頓氏病 (Vonsattel JP 等人之 *Neuropathological classification of Huntington's disease. J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 44:559-577, 1985)。因此，以吾等在本文所述之研究為基礎，吾等相信 PDE10 抑制劑對這些異常具有治療衝擊力。

CREB 磷酸化作用誘發各種具有神經元機能之效應物的基因轉錄作用，包括增強神經元的存活性及/或分化作用。吾等揭示選擇性 PDE10 抑制劑可以增加中型多棘神經元成為 GABA 能顯型之分化作用(圖 6)。咯利普蘭(選擇性 PDE4 抑制劑)及選擇性 PDE1B 抑制劑未證明具有該活性(圖 7)。

PDE10 對 CREB 磷酸化作用的抑制效應具有特別關於治療神經退化症狀(如亨丁頓氏病)之顯著性。

在中型多棘神經元中的 CREB 磷酸化作用及中型多棘神經元成為 GABA 能顯型之分化作用也各自提供有用確認具有作為選擇性 PDE10 抑制劑之活性的有機化合物的方式。

以本文的數據顯示 PDE10 在中型多棘神經元中的分化作用及/或存活性中的獨特角色。這些神經元在亨丁頓

(35)

氏病中易受到選擇性傷害，並已假設其可能起因於喪失對這些神經元的營養援助 (Zuccato 等人之 Loss of Huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. Science. 293:493-498, 2001)。吾等結論選擇性 PDE10 抑制劑具有關於中型多棘神經的神經營養活性。吾等進一步結論 PDE10 抑制劑有可能具有關於任何表現 PDE10 之神經元的神經營養活性，以及 PDE10 因此有用於治療神經退化疾病，包括(但不限於此)在本文確認之神經退化疾病。

最後 PDE10 mRNA 及蛋白質也表現在海馬及皮質的神經元中。因為認知處理係憑海馬及皮質機能而定，故吾等相信 PDE10 也在認知處理扮演角色及可以使用 PDE10 抑制劑治療具有認知及/或注意力缺陷機能的特徵組成之異常，如阿茲海默氏病及與年齡有關的認知衰退 (ARCD)。

【圖式簡單說明】

圖 1：該圖式係以棍棒圖展示哺乳類的昏厥相對於增加的罌粟鹼劑量。灰棍棒代表與氟哌啶醇 (haloperidol) 組合之罌粟鹼及展示以罌粟鹼對以氟哌啶醇誘發之昏厥的潛效性。黑棍棒代表單獨的罌粟鹼。這些黑棍棒展示以高達 32 毫克/公斤劑量之單獨的罌粟鹼誘發昏厥。更特定言之，在測試之前 30 分鐘，先將以指定劑量之罌粟鹼或單獨或與氟哌啶醇 (0.32 毫克/公斤) 組合投藥。每一個棍

(36)

棒係以提高的棍棒表示對除去兩隻前掌的 6 隻類似的測試動物之平均效力。使用庫斯卡-沃雷斯 (Kruskal-Wallis) 變異分析比較對單獨的罌粟鹼相對於加上氟哌啶醇之分級的潛伏狀態。事後分析顯示服用 3.2、10 及 32 毫克/公斤之罌粟鹼加上氟哌啶醇之動物比以單獨的氟哌啶醇治療的動物具有顯著 (**) 更長的潛伏狀態。

圖 2：該圖式係兩個棍棒圖，各自展示在行為箱研究中先經 60 分鐘及接著投予物質之動物的平均 +SEM 交叉數。以上圖表較以罌粟鹼對獨自運動的效應與以罌粟鹼對以安非它命誘發之運動的效應。以下圖比較以罌粟鹼對獨自運動的效應與以罌粟鹼對以 PCP 誘發之運動的效應。將安非它命以 1 毫克/公斤經 i.p. 投藥。將 PCP 以 3.2 毫克/公斤經 i.p. 投藥。將罌粟鹼以 32 毫克/公斤與任何一種試劑經 i.p. 共同投藥。數據代表對 n=8 隻老鼠/組先經 60 分鐘及接著投予藥物之平均 +SEM 交叉數。以司徒特氏 (Student's) 試驗之 $**p < 0.01$ 係相對於媒劑/媒劑控制品； $*p < 0.05$ 係相對於媒劑/PCP。

圖 3：該圖式係展示在以佛斯寇林 (forskolin) 刺激之中型多棘神經元培養物中的 cAMP 濃度。也展示選擇性 PDE10 抑制劑、選擇性 PDE1B 抑制劑及選擇性 PDE4 抑制劑對在受刺激之神經元中的 cAMP 濃度之效應。

圖 4：該圖式係展示在以 SNAP 刺激之中型多棘神經元培養物中的 cGMP 濃度。也展示選擇性 PDE10 抑制劑、選擇性 PDE1B 抑制劑及選擇性 PDE4 抑制劑對在受刺

(37)

激之神經元中的 cGMP 濃度之效應。

圖 5：比較選擇性 PDE10 抑制劑及咯利普蘭（rolipram）（選擇性 PDE4 抑制劑）對在中型多棘神經元培養物中的 CREB（環系 AMP 反應元素結合蛋白）磷酸化作用之相對效應。以西方點墨反應測量磷酸化之 CREB 量。

圖 6：以該圖式展示對以選擇 PDE10 抑制劑、選擇性 PDE4 抑制劑（咯利普蘭）及選擇性 PDE1B 抑制劑治療之神經元的 GABA-正性中型多棘神經元之相對數量。

95年6月8日

(1)

拾、申請專利範圍

附件 2A：第 92109924 號專利申請案

中文申請專利範圍替換本

民國 95 年 6 月 8 日修正

1. 一種用於測定化學化合物是否具有選擇性抑制 PDE10 之活性的方法，該方法包含：

a)將化學化合物施加於中型多棘神經元培養物；及

b)測量在培養物中的 CREB 磷酸化作用是否增加；

以 CREB 磷酸化作用的增加而判定在步驟(a)中施加的化合物具有選擇性抑制 PDE10 之活性。

2. 一種用於測定化學化合物是否具有選擇性抑制 PDE10 之活性的方法，該方法包含：

a)將化學化合物施加於中型多棘神經元培養物；及

b)測量以該培養物中的中型多棘神經元製得的 GABA 量是否增加；

以該中型多棘神經元增加的 GABA 產量判定在步驟(a)中施加的化合物具有選擇性抑制 PDE10 之活性。