



(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 201207390 A1

(43)公開日：中華民國 101 (2012) 年 02 月 16 日

(21)申請案號：100136085

(22)申請日：中華民國 94 (2005) 年 05 月 17 日

(51)Int. Cl. : **G01N33/15 (2006.01)**

G01N35/08 (2006.01)

(30)優先權：2004/05/18 美國

60/571,892

(71)申請人：布蘭雪特洛克菲勒神經學協會 (美國) BLANCHETTE ROCKEFELLER
NEUROSCIENCES INSTITUTE (US)

美國

(72)發明人：艾科 丹尼爾 ALKON, DANIEL L (US) ; 孫賢坤 SUN, MIAO-KUN (US)

(74)代理人：洪堯順

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：8 項 圖式數：4 共 41 頁

(54)名稱

用於篩選具有抗憂鬱活性的藥劑的方法

METHOD FOR SCREENING AGENT FOR ANTIDEPRESSANT ACTIVITY

(57)摘要

本發明提供使用碳酸酐酶活化物、蛋白質激酶 C 活化物和纖維母細胞生長因子-18(FGF-18)於憂鬱症的治療上。本發明亦為關於改良的用於篩選及辨識可治療憂鬱症的化合物之動物模式及方法。



(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 201207390 A1

(43)公開日：中華民國 101 (2012) 年 02 月 16 日

(21)申請案號：100136085

(22)申請日：中華民國 94 (2005) 年 05 月 17 日

(51)Int. Cl. : **G01N33/15 (2006.01)**

G01N35/08 (2006.01)

(30)優先權：2004/05/18 美國

60/571,892

(71)申請人：布蘭雪特洛克菲勒神經學協會 (美國) BLANCHETTE ROCKEFELLER
NEUROSCIENCES INSTITUTE (US)

美國

(72)發明人：艾科 丹尼爾 ALKON, DANIEL L (US) ; 孫賢坤 SUN, MIAO-KUN (US)

(74)代理人：洪堯順

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：8 項 圖式數：4 共 41 頁

(54)名稱

用於篩選具有抗憂鬱活性的藥劑的方法

METHOD FOR SCREENING AGENT FOR ANTIDEPRESSANT ACTIVITY

(57)摘要

本發明提供使用碳酸酐酶活化物、蛋白質激酶 C 活化物和纖維母細胞生長因子-18(FGF-18)於憂鬱症的治療上。本發明亦為關於改良的用於篩選及辨識可治療憂鬱症的化合物之動物模式及方法。

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於將改善學習和記憶之化合物用於治療憂鬱症。特別是，本發明係關於以碳酸酐酶活化物、蛋白質激酶 C 活化物和纖維母細胞生長因子為藥劑用於治療憂鬱症之領域。本發明亦為關於用於憂鬱症的動物模式之領域。

【先前技術】

A. 憂鬱症與習知治療方式

憂鬱症為跨越年齡及性別界線而影響個人的最普遍且廣為流行的心理疾病其中之一 (Gainotti et al. (2001) J. Neural Neurosurg. Psychiatr. 71: 258-261; Wong et al. (2001) Nature Rev. Neurosci. 2: 343-351; Nestler et al. (2002) Neuron 34: 13-25)。重度憂鬱症的終生機率一般為男性 12%、女性 25%(Kessler et al. (1994) Arch. Gen. Psychiatry 51:8)。此外，在初級照護環境中約有佔所有病人的 5%至 10%顯示出重度憂鬱症，而約有 3%至 5%的病人被診斷為輕鬱症 (Barrett et al. (1988) Arch. Gen. Psychiatry 45:1100)。然而，於一住院病人的環境中，所有病人中的 10%至 14%被診斷為重度憂鬱症 (Blackburn et al. (1997) Br. J. Psychiatry 171:328)。重度憂鬱症之所以特別地失能及有害，有部分的原因為其反覆發生。重度憂鬱症病患於出現第一個症狀後，在兩年的期間內之復發率為大約 40%。在診斷出重度憂鬱症的第二個症狀後的五年期間內，產生復發的比例增加至約為 75% (Solomon et al. (2000) Am. J. Psychiatry 157:229)。

憂鬱症最常見係以三種主要類型的化合物進行治療：(1)單胺氧化酶抑制劑(monoamine oxidase inhibitor)；(2)雜環抗憂鬱劑(heterocyclic antidepressants)；(3)選擇性血清素再吸收抑制劑(selective serotonin reuptake inhibitors, SSRIs)。已知的和現今所開處方的抗憂鬱藥劑具有許多副作用。單胺氧化酶抑制劑為臨床上使用的第一種類型抗憂鬱藥劑。單胺氧化酶抑制劑包含有異卡

波 (isocarboxazid)、苯乙 (phenelzine) 和反苯環丙胺 (tranylcypromine)，其為抑制苯乙胺 (phenylethylamine) 的代謝作用以及多巴胺 (dopamine)、血清素 (serotonin) 和去甲正腎上腺素 (norepinephrine) 的分解作用。由於使用單胺氧化酶抑制劑所伴隨的數種飲食限制之結果，其造成包含如：高血壓、頭痛、肌肉痙攣、睡眠中斷和腸胃併發症等廣泛的副作用，因此單胺氧化酶抑制劑現已不用於當作第一線的抗憂鬱藥劑。包含有米帕明 (imipramine)、地息帕明 (desipramine)、諾催普林 (nortryline)、安米催普林 (amitryline)、多慮平 (doxepin)、普催普林 (protryline) 之三環類抗憂鬱劑會產生多種抗膽鹼激導性副作用，如：昏睡、起立性低血壓、心律不整和體重增加等。選擇性血清素再吸收抑制劑 (SSRIs) 亦產生許多種副作用，雖然其一般較單胺氧化酶抑制劑和雜環抗憂鬱劑為輕微。舉例來說，包含有氟西汀 (fluoxetine)、派羅西汀 (paroxetine)、氟伏沙明 (fluvoxamine)、舍曲林 (sertraline) 和西太普蘭 (citalopram) 等之選擇性血清素再吸收抑制劑 (SSRIs) 與腸胃不適、神經過敏、焦慮和睡眠中斷等有關。

除了與傳統的抗憂鬱藥物有關的數種副作用以外，這些治療亦具有邊際效益的特點。數種關於重度憂鬱症的抗憂鬱治療的效益之研究，已經獲得如下之結論：急性疾病的治療或維持性治療具有 50-60% 的反應率 (Schulberg et al. (1998) Arch. Gen. Psychiatry 55:1121)。抗憂鬱劑與安慰劑之間的平均絕對反應率為 20-25% (Williams et al. (2000) Ann. Intern. Med. 132:743)。因此，新的抗憂鬱劑治療是現在所必需的。

基於在許多抗憂鬱劑的治療中，有時所產生的嚴重有害副作用和邊際效益，因此對於可有效地治療憂鬱症而不產生憂鬱症治療時的副作用的改良藥物有很大的需求。本發明鑑定出可促進或改良學習及記憶力之化合物，來做為治療憂鬱症的一種新的治療方式。

B. 碳酸酐酶

碳酸酐酶為一分佈於包含腦的全身之含鋅酵素，其催化二氧化碳與重碳酸鹽陰離子的轉換(Sun et al. (2002) Trends in Pharm. Sci. 23(2): 83-89;在此包含其全部做為參考資料)。碳酸酐酶 II 為七種人類同功酶中最具活性的，其為一最初於紅血球、膠細胞和腦神經元中所發現的 23.9 kDa 酵素(參考資料同上)。除了其參與 pH 值的調控、重碳酸鹽的再吸收和二氧化碳的呼氣以外，碳酸酐酶於訊息傳遞、長期的突觸轉型和記憶儲存的注意力門限中扮演重要的角色(參考資料同上)。

碳酸酐酶機能不全已知與心智障礙、阿茲海默症和認知受損有關。相反地，碳酸酐酶的活化已被顯示可改善學習及記憶力(參考資料同上；美國專利申請號 PCT/US02/13784；PCT/US03/07102；60/287,721；60/362,081；10/172,005；以及10/476,459；在此的每一篇均包含其全部而做為參考資料)。然而，於本發明之前，該碳酸酐酶所媒介的學習及記憶力之改善，並沒有被視為治療憂鬱症的一種作用機制。雖然，最近的一項生化研究中有使用分離的碳酸酐酶來辨識三個選擇性血清素再吸收抑制劑(SSRIs)-氟西汀(fluxoxetine)、舍曲林(sertraline)和西太普蘭(citalopram)以做為碳酸酐酶的活化物，但是這些實驗並未顯示碳酸酐酶的活化即為改善憂鬱症症狀的作用機制(Casini et al. (2003) Bioorg. Med. Chem. Lett. 13:2765-2768)。

碳酸酐酶的活性受到包含理阿諾鹼受體(ryanodine receptor)媒介訊息途徑的訊息途徑所調控。舉例來說，鈣離子於細胞內經由理阿諾鹼受體的釋放，參與了 γ -氨基丁酸(GABA)所媒介的突觸切換 (Sun et al. (2002) Trends in Pharmacol. Sci. 23(2): 83-89)。於海馬迴錐形細胞中活化理阿諾鹼受體，併隨著去極化所引發的鈣離子導入，而轉變 γ -氨基丁酸(GABA)所媒介的反應，此為一經由理阿諾鹼受體的拮抗劑或碳酸酐酶抑制劑所阻斷的效應(Sun et al. (2000) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 97: 12300-12305)。然而，鈣離子對碳酸酐酶的效應似乎為間接的。

舉例來說，早期的研究顯示鈣離子可經由組織胺或其他試劑，來加強若不是純化的碳酸酐酶就是胃黏膜碳酸酐酶之活化(Puscas et al. (1996) J. Pharmacol. Exp. Ther. 277: 1464-1466)。此外，維拉帕米(verapamil)的劑量依存性碳酸酐酶抑制作用，亦暗示了鈣離子對於碳酸酐酶活化的作用。再者，在人類骨髓單核細胞株中，該碳酸酐酶 II 的合成係為被 PKC 所活化(Sun et al. (2002) Trends in Pharmacol. Sci. 23(2): 83-89)。於是，經由 PKC 所媒介而增加碳酸酐酶的合成，其可以增加碳酸酐酶的活性，因而產生抗憂鬱的效果。

C.蛋白質激酶 C

PKC 已被認為是最大的非受體絲胺酸-蘇胺酸蛋白質激酶基因家族之一。自從於八零年代早期由 Nishizuka 與其同事發現 PKC 以來(Kikkawa et al. (1982) J. Biol. Chem. 257: 13341)，而且其被辨識為巴豆酯(phorbol esters)的主要受體(Ashendel et al. (1983) Cancer Res., 43: 4333)，許多的生理訊息機制都被歸因於這個酵素。PKC 引起廣泛興趣的原因在於，其可在生物體外被鈣離子和二醯基甘油(以及其巴豆酯類似物)活化的獨特能力。此二醯基甘油為一種致效物，其係伴隨著經由生長及分化因子的作用之磷脂轉換而形成。

PKC 的活化已經被證實可改善學習及記憶力(美國專利申請號 PCT/US02/13784; PCT/US03/07102; 60/287,721; 60/362,081; 10/172,005 以及 10/476,459；在此的每一篇均包含全部而做為參考資料)。然而，於本發明之前，此 PKC 所媒介的學習及記憶力之改善，並沒有被視為治療憂鬱症的一種作用機制。而且，在此所揭露的 PKC 活化物，特別是那些可改善學習及記憶力的化合物，之前並沒有被視為具有抗憂鬱症的活性。

D.纖維母細胞生長因子-18(FGF-18)

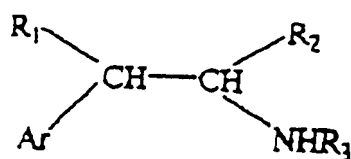
纖維母細胞生長因子-18 (FGF-18) 已經被證實為可改善學習及記憶力 (美國專利臨時申請號 60/429,321 和 PCT/IB03/05408; 其兩者在此均包含全部而做為參考資料)。FGF-18 與其同源的受體結合, 因而活化了一影響 PKC 和碳酸酐酶兩者之 PKC 所媒介的訊息途徑。然而, 於本發明之前, FGF-18 所媒介的學習及記憶力之改善, 並沒有被視為治療憂鬱症的一種作用機制。而且, FGF-18 之前並沒有被視為具有抗憂鬱症的活性。

【發明內容】

本發明提供一種利用促進或改善學習及記憶力之新類型的治療方法、化合物以及組合物來治療憂鬱症。本發明提供治療憂鬱症的方法, 其步驟包含給予含有可促進或改善學習及記憶力的化合物之組合物。

本發明提供一種方法, 其所包含的步驟為: (a) 辨識一患有憂鬱症的個體; 以及 (b) 給予該個體一有效劑量的組合物, 該組合物包含一碳酸酐酶活化物和一藥學上可接受的載體, 其中該碳酸酐酶活化物係選自下列所組成之族群:

(1) 結構式 I



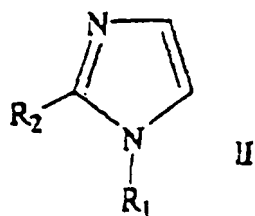
I

(I)

其中 R_1 為氫基(H)或羥基(OH); R_2 和 R_3 為獨立的氫基(H)、羧基(COOH)或較低級烷基, 例如: 直線、分支或環狀的 C_1 - C_6 烷基或 C_1 - C_4 烷基; 且 Ar 為苯基(phenyl)、咪唑基(imidazolyl)或由一個或更多的鹵素、羥

基、胺基或較低級烷基，例如：直線、分支或環狀的 C_1 - C_6 烷基或 C_1 - C_4 烷基所取代之苯基(phenyl)或咪唑基(imidazolyl)；

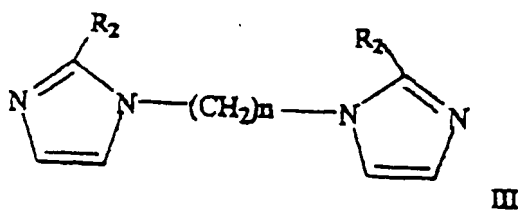
(2) 結構式 II



(II)

其中 R_1 和 R_2 為獨立的氫基(H)或較低級烷基，例如：直線、分支或環狀的 C_1 - C_6 烷基或 C_1 - C_4 烷基；

(3) 結構式 III



(III)

其中 n 為 1 或 2 且 R_2 為氫基(H)或較低級烷基，例如：直線、分支或環狀的 C_1 - C_6 烷基或 C_1 - C_4 烷基；以及結構式 I、II 或 III 的藥物上可接受的鹽類。於本發明之一實施例中，該活化物具有結構式 I，其中 R_1 為氫基或羥基； R_2 為氫基、甲基或羧基； R_3 為氫基或甲基；且 Ar 為苯基(phenyl)或取代的苯基(substituted phenyl)。於一較佳實施例中，該取代的苯基(substituted phenyl)為 4-羥苯基(4-hydroxyphenyl)、4-氟苯基(4-fluorophenyl)、4-胺苯基(4-aminophenyl)、3-胺基-4-羥苯基(3-amino-4-hydroxyphenyl)或 3,4-二羥苯基(3,4-dihydroxyphenyl)。

本發明亦仔細思考使用在此所揭露的碳酸酐酶活化物之衍生物及類似物的方法，其中該衍生物及類似物可增加碳酸酐酶活化效應的潛力，相較於其他標的增加其對於碳酸酐酶的專一性，降低毒性、改善口服劑量型式的穩定性，及/或促進化合物跨越腦血管障壁的能力(前驅藥物)。衍生物係為從上列化合物中增加或移除支鏈所形成之化合物。類似物係為上述化合物的結構變異物，其具有與碳酸酐酶的結合區域有關的相似之增進的物理及/或化學性質。根據本發明之衍生物及類似物係可運送本發明之活化物化合物至一個體的腦中。

於本發明之一實施例中，該碳酸酐酶活化物提供神經元碳酸酐酶活性至少約為丙胺酸(alanine)活性的 110、115、125、135、150、170、180、190、200、210、220、230、240 和 250%。

於一實施例中，本發明的活化物係為一結構式 I、II 或 III 的芳香族胺(aromatic amine)或芳香族胺基酸(aromatic amino acid)。於一較佳實施例中，該活化物活化神經元內的碳酸酐酶。於另一實施例中，該活化物於生物體外活化碳酸酐酶 II 的效果較丙胺酸(alanine)高 1.5 至 2 倍。

於本發明之另一實施例中，該活化物含有結構式 I，其 R_1 為氫基或羥基； R_2 為氫基、甲基或羧基； R_3 為氫基或甲基；且 Ar 為咪唑基(imidazole)或取代的咪唑基(substituted imidazole)。於一較佳之實施例中，該取代的咪唑基(substituted imidazole)為咪唑基-4-基(imidazole-4-yl-) 或 5-甲基咪唑基-4-基(5-methylimidazole-4-yl-)。

於一較佳實施例中，該活化物係選自咪唑基(imidazole)、苯丙胺酸(phenylalanine)、取代的乙胺(substituted ethylamine)、苯乙胺(phenethylamine)、組織胺(histamine)、組胺酸(histidine)、聯結的二咪唑基(linked di-imidazole)、三唑(triazole)和其藥學上可接受的鹽類等所組成之群組。更佳者為，該活化物為組胺酸(histidine)、組織胺(histamine)、苯丙胺酸(phenylalanine)、4-羥苯丙胺酸(4-hydroxy phenylalanine)、4-氟苯丙胺酸(4-fluoro phenylalanine)、3,4-二羥苯丙胺酸(3,4-dihydroxy

phenylalanine)、3-氨基-4-羥苯丙胺酸(3-amino-4-hydroxy phenylalanine)、4-氨基苯丙胺酸(4-amino phenylalanine)、酪胺酸(tyrosine)、多巴胺(dopamine)、正腎上腺激素(noradrenaline)、腎上腺激素(adrenaline)或是5-甲基組織胺(5-methyl histamine)。

本發明亦提供一種方法，其包含下列步驟：(a)辨識一患有憂鬱症的個體；以及(b)給予該個體一有效劑量的組合物，該組合物包含一碳酸酐酶活化物和一藥學上可接受的載體，其中該活化物具有結構式II，其R₁為氫基、甲基、乙基或丙基；且R₂為氫基或甲基。於一實施例中，該活化物於生物體外活化碳酸酐酶II的效果較丙胺酸(alanine)高1.5至2倍。

本發明亦提供一種方法，其包含下列步驟：(a)辨識一患有憂鬱症的個體；以及(b)給予該個體一有效劑量的組合物，該組合物包含一碳酸酐酶活化物和一藥學上可接受的載體，其中該活化物具有結構式III，其中n為1或2；且R₂為氫基或甲基。於一實施例中，該活化物於生物體外活化碳酸酐酶II的效果較丙胺酸(alanine)高1.5至2倍。

本發明亦提供一種對於一有需要的個體治療憂鬱症的方法，其包含給予一有效劑量的組合物，該組合物包含一碳酸酐酶活化物和一藥學上可接受的載體；其中該活化物係選自芳香族胺(aromatic amine)以及芳香族胺基酸(aromatic amino acid)所組成之群組，其中該芳香族胺或芳香族胺基酸具有一單一的芳香族官能基。於一實施例中，該芳香族胺(aromatic amine)或芳香族胺基酸(aromatic amino acid)活化碳酸酐酶II的效果較丙胺酸(alanine)高1.5至2倍。於一較佳實施例中，該活化物為一芳香族胺基酸(aromatic amino acid)，其係選自苯丙胺酸(phenylalanine)、取代的苯丙胺酸(substituted phenylalanine)、組胺酸(histidine)、取代的組胺酸(substituted histidine)、取代的苯丙胺酸咪唑基(substituted phenylalanineimidazole)、取代的咪唑基(substituted imidazole)、聯結的二咪唑基(linked di-imidazole)、以及聯結的取代的二咪唑基(linked substituted di-imidazole)所組成的群組。較佳者為，該活化物為一芳香族胺

(aromatic amine)，其係選自多巴胺(dopamine)、正腎上腺激素(noradrenaline)、腎上腺激素(adrenaline)、組織胺(histamine)和5-甲基組織胺(5-methyl histamine)所組成的群組。

本發明提供一種方法，其包含下列步驟：(a)辨識一患有憂鬱症的個體；以及(b)給予該個體一有效劑量的組合物，該組合物包含一蛋白質激酶C活化物和一藥學上可接受的載體，其中該PKC活化物係選自FGF-18、巨環內酯、苯基內醯胺、吡咯啉酮以及其組合所組成的群組。於一較佳實施例中，該巨環內酯為一珊瑚蟲素(bryostatin)或一苔蘚抑素(neristatin)。於一更佳實施例中，該珊瑚蟲素係選自珊瑚蟲素-1、珊瑚蟲素-2、珊瑚蟲素-3、珊瑚蟲素-4、珊瑚蟲素-5、珊瑚蟲素-6、珊瑚蟲素-7、珊瑚蟲素-8、珊瑚蟲素-9、珊瑚蟲素-10、珊瑚蟲素-11、珊瑚蟲素-12、珊瑚蟲素-13、珊瑚蟲素-14、珊瑚蟲素-15、珊瑚蟲素-16、珊瑚蟲素-17和珊瑚蟲素-18所組成的群組。最佳者為，該珊瑚蟲素為珊瑚蟲素-1且該苔蘚抑素為苔蘚抑素-1。

本發明亦提供一種對於一有需要的個體治療憂鬱症的方法，其包含給予一有效劑量的組合物，該組合物包含一蛋白質激酶C活化物和一藥學上可接受的載體；其中該活化物係選自FGF-18、巨環內酯、苯基內醯胺、吡咯啉酮及其組合所組成之族群。於一較佳實施例中，該巨環內酯為一珊瑚蟲素或一苔蘚抑素。於一更佳實施例中，該珊瑚蟲素係選自珊瑚蟲素-1、珊瑚蟲素-2、珊瑚蟲素-3、珊瑚蟲素-4、珊瑚蟲素-5、珊瑚蟲素-6、珊瑚蟲素-7、珊瑚蟲素-8、珊瑚蟲素-9、珊瑚蟲素-10、珊瑚蟲素-11、珊瑚蟲素-12、珊瑚蟲素-13、珊瑚蟲素-14、珊瑚蟲素-15、珊瑚蟲素-16、珊瑚蟲素-17和珊瑚蟲素-18所組成之族群。最佳者為，該珊瑚蟲素為珊瑚蟲素-1，且該苔蘚抑素為苔蘚抑素-1。

本發明亦提供一種對於一有需要的個體治療憂鬱症的方法，其包含給予一有效劑量的組合物，該組合物包含一個或多個下列物質：塔克寧(tacrine，其以COGNEX[®]的商品名稱上市)、凡內克寧(velnacrine)、多奈皮齊(donepezil，其以ARICEPT[®]的商品名稱上市)、加蘭他敏(galantamine，其以REMINYL[®]的商品名稱上市)、美金胺

(memantine，其以 NAMENDA[®]的商品名稱上市)、以及其藥學上可接受的鹽類。

本發明亦提供用於篩選一具有抗憂鬱活性的藥劑的方法，其包含下列步驟：

- (a) 給予一受試個體一在一藥學上可接受的載體內的藥劑，且給予一控制個體該藥學上可接受的載體；
- (b) 將受試個體及控制個體各別地放置於一水池內，並在一測試期間測量其游泳距離及/或游泳時間；以及
- (c) 比較該受試個體和一控制個體的游泳距離或游泳時間，其中該受試個體相對於控制個體所增加的游泳距離或游泳時間為抗憂鬱活性的指標。

於一較佳實施例中，該水池為圓形。較佳者為，該水池的直徑為 100 公分至 200 公分之間。更佳者為，該水池的直徑為 150 公分。較佳者為，該水池並無逃出口。

於另一實施例中，步驟(a)、(b)和(c)係為重複實施的。較佳者為，該步驟為重複三次。

於本發明中用於篩選一具有抗憂鬱活性的試劑之方法，其游泳距離及/或游泳時間以影像工具做測量為較佳。

【實施方式】

A. 定義

於此所使用的“給予(administration)”一組合物，其包含任何途徑的給予，包括有：口服、皮下、腹膜內和肌肉內。

於此所使用的“芳香族(aromatic)”意指一具有相對於一假定的局部結構顯著較高安定性的環狀接合分子實體。於此所使用的芳香族化合物包括多環及雜環化合物。

於此所使用的“碳酸酐酶活化物”意指一種物質，其可藉由於一含鋅水或接近含鋅水的部分與碳酸酐酶結合，而增加碳酸酐酶的催化反應速率。

於此所使用的“憂鬱症”意指重度憂鬱症(major depression)、情緒消沉(dysthymia)和非典型憂鬱症(atypical depression)或未如此明定的憂鬱症。

於此所使用的“一有效劑量”為一足夠減輕與憂鬱症相關的一種或多種症狀的劑量。

於此所使用的“蛋白質激酶 C 活化物(protein kinase C activator)或 PKC 活化物”意指一經由與該蛋白質激酶 C 結合而增加蛋白質激酶 C 所催化的反應速率之物質。

於此所使用的“一單一芳香族官能基(a single aromatic group)”一詞意指只有一單環或一多環芳香族官能基。

於此所使用的“個體(subject)”一詞意指一哺乳動物。

於此所使用的“取代的咪唑基(substituted imidazole)”一詞意指一具有一個或多個取代的官能基連接至其咪唑基環之咪唑基的部分。

於此所使用的“取代的苯基(substituted phenyl)”一詞意指一具有一個或多個取代的官能基連接至其苯基環之苯基的部分。

於此所使用的“藥學上可接受的載體(pharmaceutically acceptable carrier)”一詞意指一化學組合物，其可和活性成份結合，且經由此結合，其可被用於給予該活性成份至一個體。於此所使用的“生理上可接受的(physiologically acceptable)”酯類或鹽類一詞意指該活性成份的一酯類或鹽類形式，其與該藥物組合物的任一其他成份相容，且其對該組合物所給予的個體並非是有害的。

於此所使用的“藥學上可接受的載體”亦包含但並不限於一個或多個下列之：賦形劑、表面活化劑、分散劑、惰性稀釋劑、顆粒和崩解劑、結合劑、潤滑劑、甜味劑、調味劑、著色劑、保存劑、生理可分解性組合物，如明膠、水性媒介和溶劑、油性媒介和溶劑、懸浮劑、分散或濕化劑、乳化劑、緩和劑、緩衝劑、鹽類、增厚劑、填充劑、乳化劑、抗氧化劑、抗生素、抗真菌劑、安定劑以及藥理上可接受的聚合性或疏水性物質。於本發明藥物

組合物中的其他“附加成份”可包含本領域所習知的或例如於此附加做為參考資料的(Genaro, ed., 1985, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa.)這本書所描述者。

於此所描述的藥物組合物之配方，可經由任何習知或於此之後在藥物學領域發展出來的方法所配製。一般來說，如此的配製方法所包含的步驟為：將該活性成份與一載體或一個或多個其他輔助成份相結合，然後，如果有需要或想要，使該產物塑形或封裝成為一所欲的單一或多劑量的單元。

雖然在此所提供的藥物組合物之描述主要係指在倫理上適用於給予人類之藥物組合物，熟習此領域的人士應可理解的是，此種組合物一般可適用於給予所有種類的動物。針對將適合給予人類的藥物組合物做修飾，以使該藥物組合物適合於給予不同的動物係為習知的，且普通熟練的獸醫藥物學家可以經由只是普通的實驗(如果有任何的實驗)來設計及執行如此的修飾。本發明的藥物組合物所給予的個體被預期為，包含但並不限於人類和其他的靈長目動物，以及其他的哺乳動物。

本發明藥物組合物中活性成份、藥學上可接受的載體和任何附加成份的相對劑量將根據所治療個體的身分、體型和狀態以及進一步根據組合物給予的途徑而決定。舉例來說，該組合物可能包含介於 0.1%和 100%(w/w)之間的活性成份。除了該活性成份以外，本發明的藥物組合物可進一步包含一個或多個附加的藥物活性試劑。特別地設想之附加試劑包含止吐劑以及如氰化物和氰酸鹽清除劑等之清除劑。本發明的藥物組合物可使用習知技術所製造的可控制或持續釋放的配方。

給予此化合物的有效劑量，係為於神經訊息途徑的細胞中，促進碳酸酐酶活性的劑量。本發明的化合物其可被給予至一動物，較佳者為一人類，其典型劑量為如本發明所揭示的，為每公斤動物體重為 1 毫克至 100 克之間。然而，所施予的精確劑量將根據許多因素而改變，這些因素包含：所治療的動物種類、所治療的疾病狀態種類、動物的年齡和施予的途徑，但並不限於此。

較佳者為，該化合物的劑量係從每公斤動物體重為 1 毫克至 10 克之間而變動。更佳者為，該劑量是從每公斤動物體重為 10 毫克至 1 克之間而變動。最佳者為，該劑量是從每公斤動物體重為 50 毫克至 100 毫克之間而變動，且每天口服三次。

經由老鼠的劑量來推估人類的劑量，其用於治療人類的苯丙胺酸(phenylalanine, 50mM)或咪唑基(imidazole, 0.5M)試劑的有效劑量可包含每日口服三次每公斤體重為 0.1、0.3、1、3 或 10 毫升(ml)之相等物。

本發明包含此些化合物之衍生物及類似物，且該些衍生物及類似物可增加該碳酸酐酶活化效應的潛力、相較於其他標的增加其對於碳酸酐酶的專一性、降低毒性、改善口服劑量型式的穩定性、及/或促進化合物跨越腦血管障壁的能力(前驅藥物)。衍生物係為從上列化合物增加或移除支鏈所形成之化合物。類似物係為上述化合物的結構變異物，其具有與碳酸酐酶的結合區域有關的相似之增進的物理及/或化學性質。根據本發明之衍生物及類似物係為可運送本發明的活化物化合物至個體的腦中。此化合物可每日數次給予一動物，或給予頻率較低地每日一次、每週一次、每雙週一次、每月一次，甚或頻率更低地每數月一次，或每年一次以及頻率更低。此劑量的使用頻率對於熟習此技藝之人士將是非常顯而易見的，且其係根據所有下列的任何因素，例如，但並不限於，記憶力的類型和嚴重度、所欲治療的注意力障礙或學習障礙，以及動物的種類和年齡等。

B. 憂鬱症

憂鬱症包含重度憂鬱症(major depression)、情緒消沉(dysthymia)和非典型憂鬱症(atypical depression)或未明定的憂鬱症(minor depression)等的診斷。根據心理疾病診斷統計手冊第四版(American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Ed., Primary Care Version (DSM-IV-PC). American Psychiatric Association Press, Washington, DC 1995)，憂鬱症被分類並定義為不同的次群組。根據 DSM-IV，

重度憂鬱症的診斷需要病患於診斷期間內顯示出下列九種症狀中的至少五種：(1)大部分的時間均感情緒憂鬱（尤其是在早上最為嚴重）；(2)幾乎對於所有活動均顯著地減少興趣及樂趣(快感缺乏(anhedonia))；(3)顯著的體重下降或增加；(4)失眠或嗜睡；(5)精神運動性激動或遲滯；(6)疲累或失去活力；(7)罪惡感或無價值感；(8)無法專注，猶豫不決；以及(9)反覆想到死亡與自殺。為了構成重度憂鬱症的診斷，五個觀察到的症狀中必需有一個為憂鬱情緒或喪失興趣(快感缺乏(anhedonia))。相對地，最常見的憂鬱症型式，非典型憂鬱症(atypical depression)或未如此明定的憂鬱症(亦稱為輕度憂鬱症(minor depression))等的診斷，需要每日顯現或於至少兩個星期的大部分時間之中顯現上述之 2 至 4 種憂鬱症狀。情緒消沉(dysthymia)為一種慢性的、低強度的情緒疾病，其特徵為連續超過兩年的快感缺乏(anhedonia)、低自尊和缺乏活力。受季節影響的不適被認為是一種重度憂鬱症的受季節變化之特徵。

C.動物模式

雖然於發展新的治療試劑和多種動物模式的有效性上有進展，對於用以篩選候選的化合物的抗憂鬱活性之改良的動物模式仍然有急迫的需求(Cryan et al. 2002 Trends Pharmacol 23: 238-45)。現今，憂鬱症最普遍使用的動物模式包含強迫性游泳測試、尾巴懸掛測試和嗅覺球切除術(Cryan et al. (2002) Trends Pharmacol. 23: 238-45)。強迫性游泳測試測量動物於一含有水且無法逃脫的圓柱體內，經過於同一圓柱體內 15 分鐘的預試之後，24 小時的不活動性。其為用於臨床前估計抗憂鬱活性最普遍使用的模式，但其需要測量者的判斷及評分。此測試並無法可靠地估計選擇性血清素再吸收抑制劑(selective serotonin reuptake inhibitors, SSRIs)的抗憂鬱活性(Porsolt (1990) Behavioral Despair: Present Status and Future Perspectives, In: Antidepressants: Thirty Years On, CNS Publishers 85-94; Porsolt et al. (1991) Pharmacological Models of Depression, In: Animal Models in

Psychopharmacology, *Advances in Pharmacological Sciences*. Basel: Birkhauser 137-59; Takamori et al. (2001) *Pharmacology* 73: 147-53; Cryan et al. (2002) *Trends Pharmacol.* 23: 238-45), 並且需要修正過的評分方式來改善檢測(Detke et al. (1995) *Psychopharmacology* 121: 66-72; Detke et al. (1996) *Behav. Brain Res.* 73: 43-46; Cryan et al. (2002) *Trends Pharmacol.* 23: 238-245)。該尾巴懸掛測試導致一種缺乏絕望的狀態，其特徵為缺乏逃脫的努力或掙扎，此狀態會因抗憂鬱劑而強烈反轉。然而，某些動物會爬上其尾巴。將兩邊的嗅球移除之嗅覺球切除術則會造成與憂鬱症變化有關的行為變化。於一新穎明亮的公開區域的裝置內，經由抗憂鬱劑治療可使過度反應慢性地而非急性地反轉(Kelly et al. (1997) *Pharmacol. Ther.* 74: 299-316)。然而，該檢測係根據對憂鬱症的行為相似性。其作用機制並不甚了解。如欲更詳盡探討多種的動物模式，讀者可參考兩篇最近的評論文章(Cryan et al. 2000 *Trends Pharmacol.* 23: 238-245; Nestler et al. (2002) *Neuron* 34: 13-25)。

為了改善對於憂鬱症形成的機制之了解，我們需要可反映病人狀態的動物模式(Cryan et al. 2000 *Trends Pharmacol.* 23: 238-245)。人類憂鬱症與該標準強迫性游泳測試(亦稱為行為的絕望模式)之間的一個差異為，大多數的人類憂鬱症案例所顯示者為缺乏動力(喪失希望)，並無直接的相對原因，而非如強迫性游泳模式之主要特徵中，是以缺乏“活動空間(physical space)”的操作為引發憂鬱症的誘發原因。

本發明提供一種具有提昇預測能力的改良的憂鬱症動物模式。為了說明該“開放空間游泳(open-space-swimming)”模式是否具有“預測正確性(predictive validity)”，將老鼠以全部三種主要抗憂鬱劑做治療。與未治療的動物相比，這些實驗顯示出對行為參數的時間依存性回復(time-dependent restoration)。米帕明(imipramine)為一種三環類抗憂鬱劑(血清素和正腎上腺素的再吸收運輸物之抑制劑)，依普尼西(iproniazid)為一種單胺氧化酶抑制劑，而米安色林(mianserin)為一種非典型抗憂鬱劑，這些抗

憂鬱劑係作為每一類型的代表，用於研究其臨床上的效用。經由測試全部三種原型抗憂鬱劑的效用，來評估憂鬱症動物模式的適用性為一普遍的實施方式。不像強迫性游泳測試，在開放空間游泳測試中，受限的空間並非為決定性的因素，且其活動力為直接量測而不涉及人的判斷及評分。我們的結果顯示，此測試對於包含一選擇性血清素再吸收抑制劑(SSRI)的抗憂鬱劑具有高度預測力，而且對於抗憂鬱劑的治療有改良的靈敏度。於測試期間所移動的距離可量測動物的活動游泳狀態。此外，其對於選擇性血清素再吸收抑制劑(SSRIs)非常靈敏，並不需要任何的評分調整。此模式在作為憂鬱症模式的選擇上是有價值的，其可透露憂鬱症的病理生理學機制，並且尋找新類型的抗憂鬱劑。

動物模式在尋找新的抗憂鬱劑和確認憂鬱症所隱藏的病理生理學機制上是絕對必要的。另一方面，臨床上活性的抗憂鬱劑之可用性，也使得其可以發展和確認廣泛的行為測試，以於動物模式中研究類似憂鬱症的表現症狀。在我們的開放空間模式中，老鼠於測試的過程中迅速且重複地變的固定不動，呈現於試驗過程中增加的“浮動性(floating)”靜止狀態。此開放空間游泳測試對於憂鬱症的有效性，已經由受測試動物以已知的抗憂鬱劑治療所獲得之結果而證實。全部三種主要類型的抗憂鬱劑都有於此研究中進行：米帕明(imipramine)，一種三環類抗憂鬱劑(血清素和正腎上腺素的再吸收運輸物之抑制劑);依普尼西(iproniazid)，一種單胺氧化酶抑制劑;以及米安色林(mianserin)，一種非典型抗憂鬱劑;以及阿拉丙酯(alaproclate)，一種選擇性血清素再吸收抑制劑(SSRI)。於我們的研究中所使用的劑量和使用於抗憂鬱劑研究的老鼠之劑量為類似或相等，而且並沒有引發非特定的運動器官活性的變化(Bai et al. (2001) Pharmacol. Biochem. Behav. 70: 187-192; Krocza et al. (2001) Brain Res. Bull. 55: 297-300; Takamori et al. (2001) Pharmacology 63: 147-153; Kitamura et al. (2002) Pharmacol. Biochem. Behav. 71: 63-69)。

由開放空間游泳測試所獲得的結果可以和先前所報導的資料作比較(Porsolt et al. (1977) *Nature* 266: 730-732; Porsolt et al. (1978) *Eur J. Pharmacol.* 47: 379-391)，於此，對於與強迫性游泳測試中同樣年齡的老鼠，給予這些習知的抗憂鬱劑相同的腹膜內注射劑量(15mg/kg)三次。在我們對於米帕明(imipramine)、依普尼西(iproniazid)和米安色林(mianserin)的研究中，於第三天的移動距離所減少之百分比(以控制組的減少量為100%)分別為 $49.8 \pm 7.6\%$ ($n=8$)， $44.0 \pm 7.7\%$ ($n=8$)和 $33.3 \pm 6.3\%$ ($n=8$)，將其與於強迫性游泳測試中控制組的不活動性百分比相比，其分別為 $61.5 \pm 6.5\%$ ($n=5$; 每天3次 15mg/kg; $P < 0.01$; Porsolt et al. (1977) *Nature* 266: 730-732); $87.6 \pm 7.3\%$ ($n=5$; 每天3次 15mg/kg; $P < 0.01$; Porsolt et al. (1978) *Eur. J. Pharmacol.* 47: 379-391); 以及 $66.5 \pm 7.0\%$ ($n=5$; 每天3次 15mg/kg; $P < 0.01$; Porsolt et al. (1977) *Nature* 266: 730-732)。因此，使用該開放空間游泳測試所檢測之老鼠，與先前報告的資料相比，其對於抗憂鬱劑的治療更為敏感，具有對於依普尼西(iproniazid)統計上的顯著差異($F_{1,12}=11.65$; $P < 0.01$)。

開放空間游泳測試滿足了憂鬱症的動物模式中四個最少要求中的三個(McKinney et al. (1969) *Arch Gen Psychiatr* Vol. 21, 240-8; Cryan et al. (2002) *Trends Pharmacol* 23: 238-45)。這些對於一個合適的動物模式的要求包括：(1)對人類疾病而言，其表現或症狀為合理的類比；(2)存在一可被客觀地監測的行為的變化；(3)經由相同治療所產生的行為變化可回復性，在人類亦為有效的；以及(4)於不同測試者之間具有再現性。跨越不同實驗室的可信度仍是需要被測試的。此已經使用多年的老鼠強迫性游泳測試，普遍被認為是一種對於人類憂鬱症的抗憂鬱劑效用，具有高度的預測性之測試(Porsolt et al. (1977) *Nature* 266: 730-732)。但其用於尋找新類型的有效藥物的重要性並不清楚。

開放空間游泳模式具有幾個優點。第一，相對於目前最主要的強迫性游泳測試而言，此種測試的一個明顯的優點為，不像在

強迫性游泳測試中的時間抽樣性判斷和評分(Krocicka et al. (2001) Brain Res Bull 55: 297-300; Reneric et al. (2002) Eur. Neuropsychopharmacol. 12: 159-71)，此測試沒有牽涉人類的判斷和評分，因此其監測會比較客觀。第二，客觀的監測提供了改善不同實驗室間的再現性的可能性。第三，強迫性游泳測試並無法反映出一種行為的強度或程度，例如：劇烈的、中等的或溫和的游泳活動性。相反地，這些特徵在開放空間游泳測試中可以直接地量測。此外，在開放空間模式中並沒有觀察到攀爬的行為，這可能是由於可使用的空間大。這可以移除另一項關於在強迫性游泳測試中，攀爬是否應算為超過或等於積極性游泳的人為判斷。第四，此測試並沒有因為空間的侷限而限制了動物的活動，因此能更接近地模擬人類疾病。缺乏動機(機會和希望)而非受限的實體空間是主要(雖然並不是唯一地)造成人類疾病的原因。

D. 碳酸酐酶

碳酸酐酶為一分佈於包含腦的全身之含鋅酵素，其催化二氧化碳與重碳酸鹽陰離子的轉換(Sun et al. (2002) Trends in Pharm. Sci. 23(2): 83-89; 在此包含其全部而做為參考資料)。碳酸酐酶II為七種人類同功酶中最具活性的，其為一最初於紅血球、膠細胞和腦神經元中發現的 23.9 kDa 的酵素(參考資料同上)。除了其參與酸鹼度(pH)的調控、重碳酸鹽的再吸收和二氧化碳的呼氣以外，碳酸酐酶於訊息傳遞、長期的突觸轉型和記憶儲存的注意力門限中扮演重要的角色(參考資料同上)。碳酸酐酶機能不全已知與心智障礙、阿茲海默症和認知受損有關，且碳酸酐酶的活化已被顯示可改善學習及記憶力(參考資料同上；美國專利申請號 PCT/US02/13784 ； PCT/US02/14378 ； PCT/US03/07102 ； 60/287,271； 60/289,137； 60/362,081； 10/172,005； 10/476,459； 以及 10/477,121； 每一篇在此均包含其全部而做為參考資料)。

碳酸酐酶催化二氧化碳的水合作用與碳酸氫根離子的脫水作用之間的可逆反應。最近的研究指出，活化此酵素可以提供一快

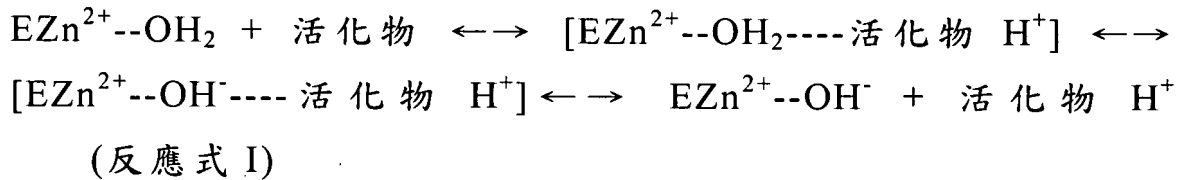
速有效的機制來提昇在記憶相關的神經構造中碳酸氫根離子的濃度。所增加的碳酸氫根離子流量，經由突觸的 GABA_A (γ -胺基丁酸) 接受器通道，而改變突觸後對於 GABA (γ -胺基丁酸) 的神經反應，以及因此對於不同的訊號輸入之神經反應。如此，碳酸酐酶的作用為當作一控制經由神經網路的訊號傳遞的有效警示閘門。於海馬迴 CA1 神經元中碳酸酐酶活性的變化，提供一種用於在釋放 GABA (γ -胺基丁酸) 的突觸之作用狀態之間切換的機制，因而經由該海馬迴網路傳送閘控訊號。

碳酸酐酶活性至少有部份為經由理阿諾鹼受體 (ryanodine receptor, RyR) 的細胞內鈣離子釋放所活化。舉例而言，此理阿諾鹼受體 (RyR, ryanodine receptor) 與 GABA (γ -胺基丁酸) 所媒介的突觸切換有關。鈣離子對於碳酸酐酶的效應似乎為間接的。於人類骨髓單核球細胞株中，碳酸酐酶 II 的合成由蛋白質激酶 C 所活化，此功效可被 $0.1\mu\text{m}$ 形孢菌素 (staurosporine) 所中止。荷爾蒙亦透過環單磷酸腺苷 (cAMP, cyclic adenosine monophosphate) 來調控碳酸酐酶的活性。於是，於紅血球中經由腎上腺素 (adrenaline) 和二丁醯環單磷酸腺苷 (dibutyryl-cAMP) 所導致的碳酸酐酶活性增加可被茶鹼 (theophylline) 所促進，而且經由環單磷酸腺苷 (cAMP, cyclic adenosine monophosphate) 所依賴的蛋白質激酶之磷酸化可以活化碳酸酐酶。

人體內至少有七種碳酸酐酶的同功酶 (Lindskog (1997) Pharmacol. Ther. 74(1): P1-20)。碳酸酐酶 II 針對乙醯偶氮胺 (acetazolamide) 和某些其他抑制劑的結合區域的結構為已知。此種知識使得可以對在此所預期的化合物之衍生物和類似物作合理設計。

根據結構化學、生物化學和醫藥化學的研究，碳酸酐酶的藥物基本資料已經被改善過，並且已經發展出專一的活化物。碳酸酐酶的活化物提供用於治療基因性碳酸酐酶缺乏和記憶性疾病的一個重要工具。許多的胺類和胺基酸類 (例如：多巴胺 (dopamine)、血清素 (serotonin)、正腎上腺素 (noradrenaline)、腎上腺素

(adrenaline)、組織胺(histamine)、組胺酸(histidine)、咪唑基(imidazole)、苯丙胺酸(phenylalanine)或其衍生物(請參照 WO 00/56760, 在此包含其全部而做為參考資料)均為碳酸酐酶的活化物。特別地, 碳酸酐酶活化物經由直接地作為質子的接受者而增加二氧化碳和碳酸氫根離子的轉換(反應式 I)速率。



本發明所包含之碳酸酐酶活化物, 和其經由每一人類碳酸酐酶 II 的活性所產生之活化作用(相對於其經由酵素丙胺酸所產生之活化作用), 係於表一中詳細描述。

E. 蛋白質激酶(Protein Kinase C, PKC)

此 PKC 基因家族現在包含有 11 個基因, 其可被分為四個子群: (1)典型的 PKC α 、 β_1 、 β_2 (β_1 和 β_2 為相同基因之選擇性接合型式)和 γ ; (2)新的 PKC δ 、 ϵ 、 η 和 θ ; (3)非典型的 PKC ζ 、 λ 、 ι 和 κ ; 以及(4)PKC μ 。PKC μ 與新的 PKC 之同功酶相似而其相異點為具有一推定的跨膜區域(由 Blohe et al. (1994) Cancer Metast. Rev. 13: 411; Ilug et al. (1993) Biochem J. 291: 329; Kikkawa et al. (1989) Ann. Rev. Biochem. 58: 31 所評論)。 α 、 β_1 、 β_2 和 γ 同功酶係為鈣離子(Ca^{2+})、磷脂(phospholipid)和二醯基甘油(diacylglycerol)依賴性的, 並且代表 PKC 的典型同功酶, 然而, 其他的同功酶為經由磷脂(phospholipid)和二醯基甘油(diacylglycerol)所活化, 但並不依賴於鈣離子(Ca^{2+})。所有的同功酶都含有五個變異區域(V1-V5), 而且該 α 、 β 和 γ 同功酶含有四個高度保留的結構區域(C1-C4)。除了 PKC α 、 β 和 γ 以外所有的同功酶都缺乏該 C2 區域, 該 λ 、 η 和同功酶亦缺乏在於 C1 中和二醯基甘油(diacylglycerol)結合的兩個富含半胱胺酸之鋅手指區

域中的九個。此 C1 區域亦包含於所有的同功酶之間高度保留的偽受質序列，且其經由阻斷受質結合區域，產生酵素的失活構形，而提供一自我調控功能(House et al. (1987) Science 238, 1726)。

由於這些結構特性，多種 PKC 的同功酶，被認為於回應生理刺激物的訊息傳遞中(Nishizuka (1989) Cancer 10: 1892)，以及在新生細胞的轉型和分化中(Glazer (1994) Protein Kinase C, J.F. Kuo, ed., Oxford U. Press at pages 171-198)，扮演著高獨特性角色。關於對已知的 PKC 的調控物的討論，請參見 PCT/US97/08141、美國專利號 5,652,232、6,080,784、5,891,906、5,962,498、5,955,501、5,891,870 和 5,962,504 (在此每一篇均包含其全部而做為參考資料)。

PKC 活化物的抗憂鬱劑效果為直接地經由 PKC 的活化作用，和/或隨著 PKC 的活化作用後所觀察到的碳酸酐酶之合成增加所媒介。

有越來越多的證據顯示，各別的 PKC 同功酶於生物過程中扮演著不同的，有時為相反的角色，其提供於藥物開發上的兩個方向。一個方向為設計對 PKC 專一的抑制劑(較佳者為對同功酶有專一的)。這個方法很複雜，因為其催化區域並不是主要負責 PKC 的同型專一性之區域。另一個方向為發展具同功酶選擇性和調控區導引性的 PKC 活化物。這些可能提供一種方法，用以克服具有相反生物效用的其他訊息傳遞途徑的效果。一種選擇為，PKC 活化物經過急性的活化之後以引發 PKC 的向下調控。這些可能提供一種方法，用以克服具有相反的生物效用之其他訊息傳遞途徑的效果。另一種選擇為，經由急性活化之後引發 PKC 的向下調控，PKC 活化物可能造成長期的拮抗作用。珊瑚蟲素(bryostatin)現正於臨床試驗中作為一種抗癌試劑。珊瑚蟲素(bryostatin)已知為結合至 PKC 的調控區域而活化該酵素。珊瑚蟲素(bryostatin)為 PKC 的同功酶選擇性活化物的一個實例。除了珊瑚蟲素(bryostatin)以外，另有其他化合物也被發現可調控 PKC(例如請參照 WO 97/43268，在此包含其全部而做為參考資料)。關於對已知的 PKC 的調控物的

討論，請看 PCT/US97/08141、美國專利號 5,652,232、6,080,784、5,891,906、5,962,498、5,955,501、5,891,870 和 5,962,5049 (在此，每一篇均包含其全部而做為參考資料)。

現在已經有數個類別的 PKC 活化物被確認。然而，巴豆酯 (phorbol esters)，由於其腫瘤促進活性，因此並不是用於最終的藥物開發之合適化合物 (Ibarreta et al. (1999) *Neuro Report* 10(5&6): 1035-40)。巨環內酯 (macrocyclic lactones，例如：珊瑚蟲素類 (bryostatin) 和苔蘚抑素類 (neristatin))，因其可激發 PKC，因此特別令人感興趣。於珊瑚蟲素類的化合物中，珊瑚蟲素-1 已經被顯示可活化 PKC，且被證實為缺乏腫瘤促進活性。珊瑚蟲素-1，其作為一 PKC 的活化物，由於其劑量反應曲線為雙相性的，因此亦為特別有用的。此外，珊瑚蟲素-1 顯示對於包含 PKC α 、PKC δ 和 PKC ε 的 PKC 同功酶有不同的調控作用。珊瑚蟲素-1 已經於動物和人體進行毒性和安全性的研究，並且對於其作為一抗癌試劑進行積極地研究。於研究中使用珊瑚蟲素-1 已經確定其於人體內的主要副作用為肌痛 (myalgia)，因而限制了其最大的劑量為 40mg/m^2 。

美國專利 4,560,774 號中 (在此包含其全部而做為參考資料) 描述了巨環內酯，尤其是珊瑚蟲素-1。巨環內酯和其衍生物亦於他處如美國專利 6,187,568、6,043,270、5,393,897、5,072,004、5,196,447、4,833,257、4,611,066 號中加以描述 (在此包含其全部而做為參考資料)。上述的專利描述了多種的化合物和巨環酯類的多種用途，包含其作為抗發炎或抗腫瘤試劑的用途 (Szallasi et al. (1994) *Journal of Biological Chemistry* 269(3): 2118-24; Zhang et al. (1996) *Cancer Research* 56: 802-808; Hennings et al. (1987) *Carcinogenesis* 8(9): 1343-1346; Varterasian et al. (2000) *Clinical Cancer Research* 6: 825-828; Mutter et al. (2000) *Bioorganic & Medical Chemistry* 8: 1841-1860) (在此每一篇均包含其全部而做為參考資料)。

如同熟悉此技藝之人士所了解的，巨環內酯化合物和其衍生物，尤其是該珊瑚蟲素類，為可用於組合性的合成技術，且因而可以產生化合物的資料庫以最佳化藥物參數，其包含但不限於組合物的有效性和安全性。此外，這些資料庫可以被分析來決定那些以較佳方式調控 α -分泌酶(α -secretase)及/或 PKC 的成員。

對自然產物和發酵液的組合性資料庫之高通量篩選，已經導致數種新藥物的開發。現在，化學多樣性的產生與篩選一直被廣泛地使用，作為用以發現前導性化合物的主要技術，而這顯然為藥物開發領域的一主要基礎進步。此外，即使於已經識別出一前導性化合物之後，組合性技術提供一用於將所欲的生物活性最適化的寶貴工具。如同將被了解的，個體反應迅速地提供其本身而用於組合性資料庫的開發，而此資料庫是用於篩選藥物，或其他生物的或醫學相關活性，或材料相關的性質。基於本發明的目的之一組合性資料庫係為一與化學相關的化合物的混合物，其可針對一所欲特性而同時被篩選；該資料庫化合物可以溶於溶液中，或共價連接於一固體支持物。於一單一反應中製備多種相關的化合物，可大大地減少及簡化所必須執行的篩選製程的步驟。針對合適的生物特性的篩選，可以使用習知的方法來完成。於是，本發明亦提供用於確認一個或多個發明的化合物，經由結合而有效地調控 α -分泌酶(α -secretase)及/或 PKC 的能力的方法。

於此領域中，有許多的技術可以用於產生如下所述的組合性資料庫，但理應了解的是，本發明並非意為以前述的例示和說明而加以限制(例如：請參見 Blondelle et al. (1995) Trends Anal. Chem. 14: 83; U.S. Patents 5,359,115; 5,362,899; U.S. 5,288,514; PCT publication WO 94/08051; Chen et al. (1994) JACCS I 6: 2661; Kerr et al. (1993) JACCS I 15: 252; PCT publications WO92/10092, WO93/09668; WO91/07087; 和 WO93/20242; 在此每一篇均包含其全部而做為參考資料)。因此，等級大約為 16 至 1,000,000 或更多的多體之各種不同的資料庫，可以針對一特殊的活性或性質而被合成及篩選。

F. 纖維母細胞生長因子-18(FGF-18)

在蛋白質中，纖維母細胞生長因子(FGF)在動物體內扮演著控制胚胎發育，細胞生長，型態發生和組織修復的重要角色 (Hu et al. (1999) *Oncogene*, 18 (16): 2635-42)。FGF-18 為此蛋白質家族中的一員，其為一由 207 個胺基酸所組成之胜肽，由一與空間學習有關的單一記憶相關基因所編碼。其主要表現於肺部和腎臟，並且少量地表現於心臟、睪丸、脾臟、骨骼肌和腦(Hu et al. (1998) *Molecular Cellular Biology*, 18(10): 6063-6074)。序列比對之研究指出， FGF-18 於人類和老鼠之間為高度保留的，且其於 FGF 家族成員中，與 FGF -8 的同源性最高。現在持續的研究中正在調查 FGF-18 於細胞和組織的發展中的完整角色，因而 FGF-18 早已經被識別為在成人肺部和發展中的組織內用於增殖的一訊息分子，而且其與癌細胞有關連。

本發明預計使用 FGF-18，修飾型式的 FGF-18 和 FGF-18 的片段，其每一個具有如 U.S. Provisional Application Serial No. 60/429,321 和 PCT/IB03/05408(在此每一篇均包含其全部而做為參考資料)中所述改善學習和記憶的能力。

所有的書籍、文章、專利或是其他的公開資料和參考文獻在此均包含其全部而做為參考資料。在此對於任何化合物的參考資料包含其消旋物以及單一的鏡像異構物。

實施例

下列實施例為用於進一步闡釋本發明，而不能被以任何的方式解釋為限制其範疇。

[實施例一]

[針對憂鬱症的開放空間游泳測試]

成年的 Wistar 大鼠(180 - 200 克)於進行實驗之前至少一個星期，被養養於一控制溫度(20-24°C)的房間內，允許自由的獲得食

物和水，並且維持一 12 小時的光/暗循環。將其隨機地分配為不同組別(每組八隻)，並且於試驗前至少一小時，將其移至所居住籠內的測試小室。大鼠為各別地置放於一直徑為 152 公分、高 60 公分且充滿 40 公分高的水($22\pm 1^{\circ}\text{C}$)之圓形水池內。該小室和水池為用於空間性水迷宮的初始設置的一部份(Sun et al. (2002) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300: 408-416)。針對不同藥物治療和控制組的測試為以一均衡的順序進行。於這些測試中，大鼠無法逃脫。大鼠可自由的游泳(或是不游)15 分鐘，然後於乾燥之後移離並回到籠內。於測試期間，觀察者隱匿於大鼠的視野外，但可於測試期間內在一攝影銀幕監視器上觀察動物的行為。相同的程序(每天 15 分鐘的時程)於 24 小時後重複，並且再連續額外三天。將藥物溶於生理鹽水溶液中給予測試組，而使用單純的生理鹽水溶液給予控制組。米帕明(imipramine，腹膜內注射 10mg/kg 每天 3 次)、依普尼西(iproniazid，腹膜內注射 10mg/kg 每天 3 次)、米安色林(mianserin，腹膜內注射 10mg/kg 每天 3 次)、阿拉丙酯(alaproclate，腹膜內注射 10mg/kg 每天 3 次)或生理鹽水溶液分別地於游泳測試時程之間，在該第二、第三和第四測試時程之前的 23、2 和 1 小時施予。相對於一單一劑量而言，於測試之前給予三次劑量的基本原理具有較一致性的預測效果(Porsolt et al. (1977) *Nature* 266: 730-732; Porsolt et al. (1978) *Eur J. Pharmacol.* 47: 379-391; Poncelet et al. (1986) *Psychopharmacology* 90: 139-141)。該游泳/漂移路徑係利用一攝影追蹤系統所記錄，此攝影追蹤系統亦於其他研究中的空間性水迷宮所使用(Sun et al., 2002 Sun and Alkon, 2002a)。該系統經由記錄觸發物之連續的 x/y-座標(軌跡水平面上的攝影訊號)來追蹤動物的位置，並且計算其距離，於水池內(樣本期間：0.055 秒)再加上於每一測試在一預定的期間內(15 分鐘)的距離。然而，該追蹤系統既沒有分辨亦沒有確認移動性或不動性的任何時期的期間。為了評估是否由追蹤系統所記錄的移動距離可以反映積極性游泳的期間，調查員亦於線上經由攝影銀幕監視器記錄線上積極性游泳的期間，作為兩種參數的直接比對。

[實施例二]

[開放空間游泳測試引發大鼠的不動性]

注射生理鹽水溶液的大鼠(每組八隻)顯示一逐漸且顯著的移動性(移動距離)下降(第一圖; $F_{3,31}=49.717$; $P<0.001$)。該移動距離包含於完整的 15 分鐘內，在所有的活動中移動的所有距離，無論是經由積極的游泳(active swimming)/搜尋亦或是其為明顯地經由腿的非搜尋活動所引起之緩慢的漂流所造成的。積極的游泳其定義為當一隻大鼠正在進行積極的游泳動作以移動橫越水池。不像於強迫性游泳測試中報告的行為模式(例如：Rénéric et al., 2002)，其並無觀察到於牆上攀爬，此可能是因為大鼠可用的空間較大。隨著測試進行，該控制組的大鼠顯示漸進地減少及縮短積極性游泳的間歇性期間。於這些控制組大鼠中，在其第三次的測試時，可達到移動性下降量最大(第一圖)。典型地，一控制組大鼠並沒有產生那些剛好足夠維持其頭高於該水平面以外的任何活動(不動性，在此並未顯示)，在強迫性游泳測試中，此特徵行為被認為是憂鬱症的一個指標。

[實施例三]

[針對習知的抗憂鬱劑治療引發的不動性之靈敏度]

與控制組相比，抗憂鬱劑的治療顯著地減少於測試中移動距離的下降(第一圖)。統計分析顯示整組的顯著效果($F_{3,16}=25.071$; $P<0.001$)指出，注射有抗憂鬱劑的大鼠之移動性顯著地高於只注射生理鹽水的大鼠。這些大鼠顯示較多且維持較長的積極性游泳/搜尋期間，雖然於此研究中積極性游泳的期間並沒有被各別地量化，而是以游泳的距離來衡量。此外，一事後分析(post hoc analysis)顯示第二次測試和第四次測試之間的顯著差異($P<0.05$)，其證實了接受抗憂鬱劑治療的大鼠組之較高的移動性。雖然依普尼西(iproniazid)顯現其所施予劑量較米帕明(imipramine)和米安色林(mianserin)在不動性的下降上更為有效，統計分析顯示，對於此

三組施予藥物的組別，其並無組別間顯著的差異($F_{2,12}=4.199$; $P < 0.05$ ，第一圖)。將本結果與之前所報導使用強迫性游泳測試所獲得的資料作比較，顯示出本測試一般表現出一改善的抗憂鬱劑效果。

[實施例四]

[針對選擇性血清素再吸收抑制劑(SSRI)抗憂鬱治療引發的不動性之靈敏度]

阿拉丙酯(alaproclate)為一種 SSRI，其於開放空間游泳測試中與一控制組相比，對於不動性的下降係為有效的。統計分析顯示出組別之間的顯著性差異($F_{1,8}=32.60$; $P < 0.001$)，其指出注射阿拉丙酯(alaproclate)的大鼠的移動性顯著地高於只注射生理鹽水的大鼠。

所觀察到的移動距離之差異是否可以反映積極性游泳的不同期間，是經由記錄當大鼠明顯地表現積極性游泳，亦即在水池中進行明顯的環繞游泳的移動的期間來評估。不同組別的結果之比較係顯示於第二圖 B。阿拉丙酯(alaproclate)組的積極性游泳期間顯著地比控制組長(組別差異： $F_{1,8}=31.51$; $P < 0.001$)。於移動距離的變化百分比(以控制組的相對應變化作為 100%)並沒有與積極性游泳期間的變化百分比(以控制組的相對應變化作為 100%)有顯著的差異($P > 0.05$, unpaired t-test)。於是，此結果顯示該參數“移動距離”可確實地反映在測試過程的移動性期間。

[實施例五]

[針對苯丙胺酸(phenylalanine)引發的不動性之靈敏度]

如同於此所描述的，大鼠的憂鬱症行為可以經由將動物置放於一開放空間游泳裝置內，每天一次，每次 15 分鐘所引發。在三天的時間內，該些動物經歷三次的測試。該些動物被分為三組：控制組大鼠(8 隻)、苯丙胺酸大鼠(10 隻)和米帕明(imipramine)大鼠(10 隻)。控制組的大鼠在第二次測試的 3.5 小時前，於其尾巴

靜脈上給予一生理鹽水溶液的單一靜脈注射劑量。苯丙胺酸組的大鼠在第二次測試的 3.5 小時前，於其尾巴靜脈上給予一苯丙胺酸的單一靜脈注射劑量。米帕明(imipramine)組的大鼠分別在第一次、第二次和第三次測試的 23、2 和 1 小時前，給予三次腹膜內注射劑量(10mg/kg)。

苯丙胺酸，其為一種碳酸酐酶活化物，於開放空間游泳測試中，與一控制組和一以抗憂鬱劑米帕明(imipramine)所治療的組相比，對於不動性的下降是有效的(第三圖)。統計分析顯示在苯丙胺酸組、米帕明(imipramine)組和控制組之間的顯著差異，因此其指出注射苯丙胺酸的大鼠之移動性顯著地高於注射米帕明(imipramine)或是生理鹽水溶液的大鼠的移動性。

[實施例六]

[針對珊瑚蟲素-1(bryostatin-1)引發的不動性之靈敏度]

如同於此所描述的，大鼠身上的憂鬱症行為可以經由將動物置放於一開放空間游泳裝置內，每天一次，每次 15 分鐘所引發。在三天的時間內，該些動物經歷三次測試。該些動物被分為三組：控制組大鼠(8 隻)、珊瑚蟲素-1 大鼠(10 隻)和米帕明大鼠(10 隻)。控制組的大鼠在第二次測試的 3.5 小時前，於其尾巴靜脈上給予一生理鹽水溶液的單一靜脈注射劑量。珊瑚蟲素-1 組的大鼠在第二次測試的 3.5 小時前，於其尾巴靜脈上給予一珊瑚蟲素-1 的單一靜脈注射劑量(80 μ g/kg)。米帕明組的大鼠分別地在第一次、第二次和第三次測試的 23、2 和 1 小時前，給予三次腹膜內注射劑量(10mg/kg)。

珊瑚蟲素-1，其為一種 PKC 活化物，於該開放空間游泳測試中，與控制組和抗憂鬱劑米帕明之治療組相比，對於不動性的下降是有效的(第四圖)。統計分析顯示於珊瑚蟲素-1、米帕明組和控制組之間的顯著差異，因此其指出注射珊瑚蟲素-1 的大鼠之移動性顯著地高於注射米帕明(imipramine)或是生理鹽水溶液的大

鼠之移動性($F_{2,27}=6.168$; $P=0.007$)。該珊瑚蟲素-1 組和米帕明組之間並沒有觀察到有顯著的差異($F_{2,27}=10.128$; $P=0.724$)。

[實施例七]

[針對咪唑基(imidazole)引發的不動性之靈敏度]

咪唑基，其為一種碳酸酐酶活化物，於開放空間游泳測試中，與控制組和抗憂鬱劑米帕明之治療組相比，對於不動性的下降是有效的。

[實施例八]

[針對聯結的咪唑基(linked imidazole)引發的不動性之靈敏度]

聯結的咪唑基(結構式 III；其中 R_2 為 H 而且 $n=1$ 或 2)，其為一種碳酸酐酶活化物，於開放空間游泳測試中，與控制組和抗憂鬱劑米帕明之治療組相比，對於不動性的下降是有效的。

[實施例九]

[針對酪胺酸(tyrosine)引發的不動性之靈敏度]

酪胺酸(tyrosine)，其為一種碳酸酐酶活化物，於開放空間游泳測試中，與控制組和抗憂鬱劑米帕明之治療組相比，對於不動性的下降是有效的。

[實施例十]

[針對 4-氟-苯丙胺酸(4-fluoro-phenylalanine)引發的不動性之靈敏度]

4-氟-苯丙胺酸(4-fluoro-phenylalanine)，其為一種碳酸酐酶活化物，於開放空間游泳測試中，與控制組和抗憂鬱劑米帕明之治療組相比，對於不動性的下降是有效的。

[實施例十一]

[針對提供碳酸酐酶活性為丙胺酸(alanine)所觀察到的 150%和 250%之間之碳酸酐酶活化物所引發的不動性之靈敏度]

可活化碳酸酐酶 II 的化合物，其活性為相對於丙胺酸(alanine)所觀察到活性的 150%和 250%之間，於該開放空間游泳測試中，與控制組和抗憂鬱劑的治療組相比，對於不動性的下降是有效的。

[實施例十二]

[針對苔蘚抑素(neristatins)引發的不動性之靈敏度]

苔蘚抑素(neristatins)，其為一種 PKC 的活化物，於開放空間游泳測試中，與控制組和抗憂鬱劑米帕明之治療組相比，對於不動性的下降是有效的。

[實施例十三]

[針對 FGF-18 引發的不動性之靈敏度]

FGF-18，其為一種 PKC 活化物，於開放空間游泳測試中，與控制組和抗憂鬱劑米帕明之治療組相比，對於不動性的下降是有效的。

【圖式簡單說明】

第一圖 說明在開放空間游泳測試中，米帕明(imipramine)、依普尼西(iproniazid)和米安色林(mianserin)三種抗憂鬱劑對於老鼠活動力的效果。

第二圖 說明在開放空間游泳測試中，阿拉丙酯(alaproclate)對老鼠游泳的活動力和時間的效果。

第三圖 說明在開放空間游泳測試中，比較米帕明(imipramine)和碳酸酐酶活化物，苯丙胺酸(phenylalanine)對老鼠的活動力的效果。

第四圖 說明在開放空間游泳測試中，比較米帕明(imipramine)和 PKC 活化物，珊瑚蟲素-1(bryostatin-1)對老鼠的活動力的效果。

【主要元件符號說明】

無

表一 碳酸酐酶活化物

作用基	Ar	R1	R2	R3	活性 %/ 控制組碳酸酐酶 II 活性
1	H	H	COOH	H	100
2	Phenyl	H	COOH	H	186.7
3	Phenyl	H	H	H	109.5
4	4-Hydroxyphenyl	H	COOH	H	189.1
5	4-Fluorophenyl	H	COOH	H	167.7
6	4-Aminophenyl	H	COOH	H	159.4
7	3-Amino-4-hydroxyphenyl	H	COOH	H	176.3
8	3,4-Dihydroxyphenyl	H	COOH	H	134.3
9	3,4-Dihydroxyphenyl	H	H	H	137.5
10	3,4-Dihydroxyphenyl	OH	H	H	115.5
11	3,4-Dihydroxyphenyl	OH	H	CH ₃	135.0
12	3,4-Dihydroxyphenyl	OH	CH ₃	H	129.0
13	Phenyl	OH	CH ₃	CH ₃	134.5
14	Imidazole	(只有 Ar 沒有其他 C-C 鍵)			230.0
15	Imidazole-4-yl	H	H	H	150.0
16	Imidazole-4-yl	H	COOH	H	170.0
17	5-Methylimidazole-4-yl	H	H	H	130.5

發明專利說明書

分割案

(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：100136085

※申請日：94.5.17

※IPC 分類：

G01N 33/15 (2006.01)
G01N 35/08 (2006.01)

原申請案號：94115920

一、發明名稱：(中文/英文)

用於篩選具有抗憂鬱活性的藥劑的方法 /

METHOD FOR SCREENING AGENT FOR ANTIDEPRESSANT
ACTIVITY

二、中文發明摘要：

本發明提供使用碳酸酐酶活化物、蛋白質激酶 C 活化物和纖維母細胞生長因子-18(FGF-18)於憂鬱症的治療上。本發明亦為關於改良的用於篩選及辨識可治療憂鬱症的化合物之動物模式及方法。

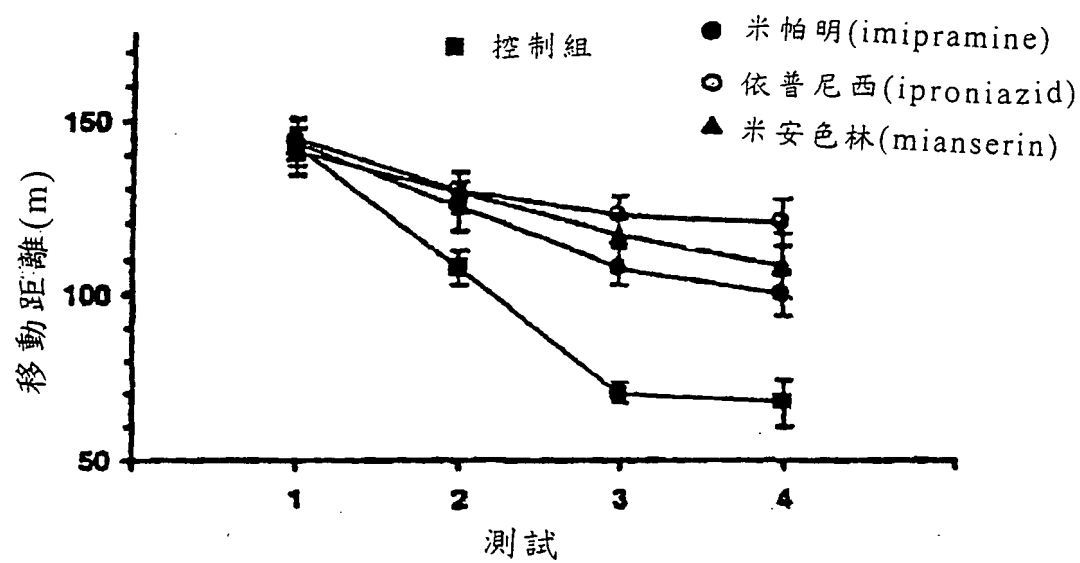
三、英文發明摘要：

The invention provides for the use of carbonic anhydrase activators; protein kinase C activators and FGF-18 to treat depressive disorders. The invention also relates to improved animal models and methods for screening and identifying compounds the treatment of depressive disorders.

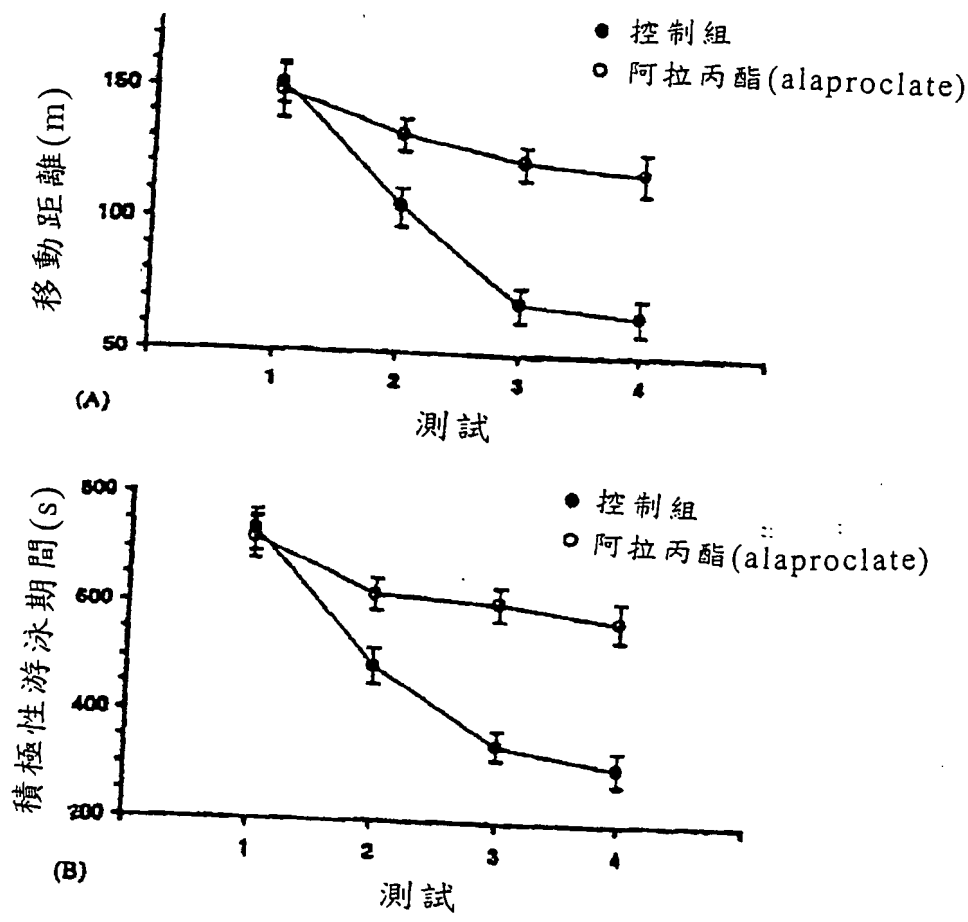
七、申請專利範圍：

1. 一種用於篩選一具有抗憂鬱活性的藥劑的方法，其包含下列步驟：
 - (a) 施予一受試個體一於藥學上可接受的載體中的藥劑，且給予一控制個體該藥學上可接受的載體；
 - (b) 個別地將該受試個體和控制個體置放於一水池內，並在一測試期間測量其游泳距離及/或游泳時間；以及
 - (c) 比較該受試個體和一控制個體的游泳距離或游泳時間，其中該受試個體相對於控制個體所增加的游泳距離或游泳時間為抗憂鬱活性的指標。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該水池為圓形。
3. 如申請專利範圍第 2 項所述之方法，其中該水池的直徑為 100 公分至 200 公分之間。
4. 如申請專利範圍第 3 項所述之方法，其中該水池的直徑為 150 公分。
5. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該水池並無逃出口。
6. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該步驟(a)、(b)和(c)係為重複實施的。
7. 如申請專利範圍第 6 項所述之方法，其中些步驟為重複三次。
8. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該游泳距離及/或游泳時間係以影像工具做測量。

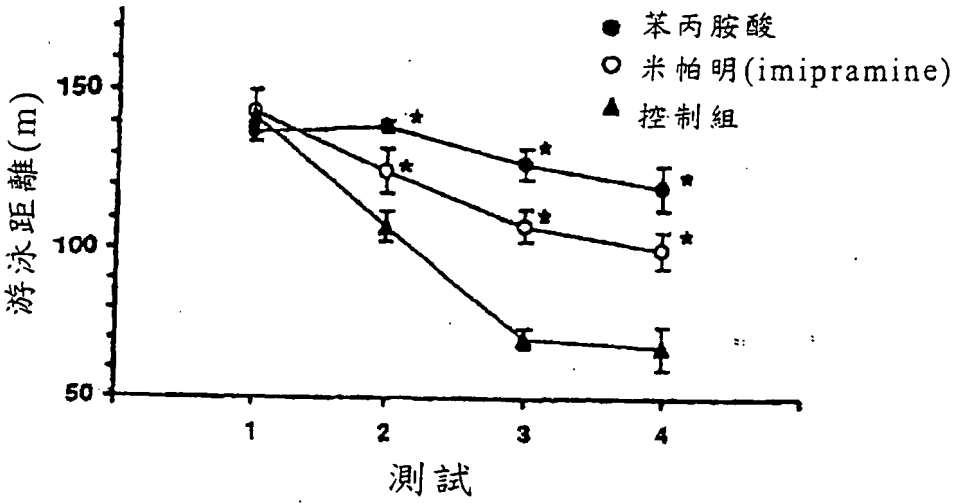
八、圖式：



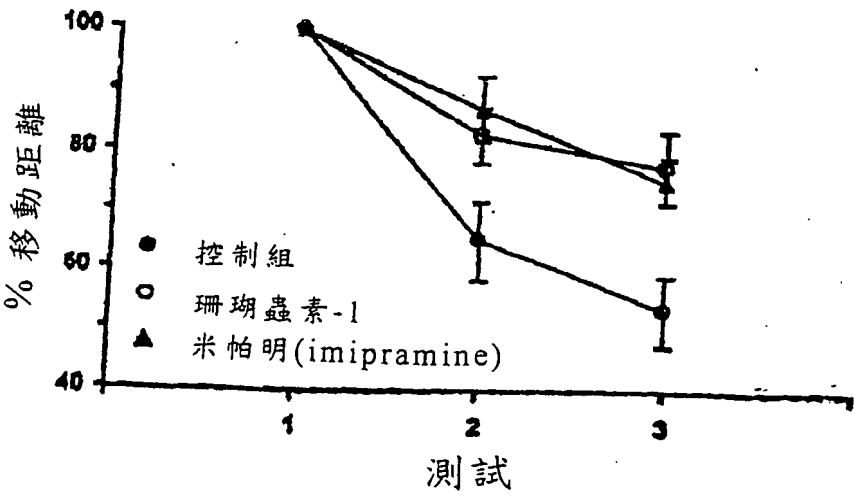
第一圖



第二圖 A 及 第二圖 B



第 三 圖



第 四 圖

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（ 無 ）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：

無