

预防或治疗淀粉样 β 肽相关疾病或状况的医药组合物

技术领域

本发明系有关于一种用于预防或治疗一种与淀粉样 β 肽相关性疾病或
5 状况之医药组合物，其含有作为有效成分的种类叶升麻苷与异类叶升麻苷，
该有效成分能够抑制淀粉样 β 肽生成、累积或聚集。

背景技术

美国专利 7,087,252 B2 揭示了一种从管花肉苁蓉(*Cistanche tubulosa*
10 (Schenk) Wight)的肉质茎所制备之含 25-50 wt%松果菊苷(echinacoside)及
5-15 wt%类叶升麻苷(acteoside)的制剂，其可用于抗老年痴呆症(senile
dementia)。异类叶升麻苷及多种其它苯乙醇苷类(phenylethanoid glycosides)
已知被包含于该制剂中。

申请人前于 WO 2011/157059 A1 揭示了异类叶升麻苷或其医药学上
15 可接受盐于抑制淀粉样 β 肽生成、累积或聚集之用途，以及其于制备预防
或治疗淀粉样 β 肽相关之疾病或状况的药物之用途。

美国专利 7,087,252 B2 及 WO 2011/157059 A1 的全部内容通过参考方
式被并入本案。

于本申请案中发明人延续 WO 2011/157059 A1 的研究并获得一相关
20 的发明成就。

发明内容

有鉴于淀粉样 β 肽和其聚集体，易于生物体内引发各种疾病或状况，
因此本发明之一目的为提供一种抑制淀粉样 β 肽生成、累积或聚集的医药
25 组合物，其可作为食品、饮品、咀嚼物、贴片、皮肤保养品或其他的一添
加剂。本发明之另一目的则提供一种预防或治疗淀粉样 β 肽相关之疾病或
状况的医药组合物。

本发明的又一目的为提供一种医药组合物于制备预防或治疗淀粉样 β
肽相关之疾病或状况的药物之用途。

30 依本发明内容所完成的一种预防或治疗与一淀粉样 β 肽相关之一疾病
或状况的医药组合物包含作为有效成分的种类叶升麻苷与异类叶升麻苷，其
中异类叶升麻苷对该类叶升麻苷的重量比为 4:1 至 1:4。

较佳的，该医药组合物中的异类叶升麻苷对该类叶升麻苷的重量比为

4:1 至 2:3。

较佳的，该医药组合物不含有松果菊苷。

较佳的，该医药组合物能够抑制该淀粉样 β 肽的生成、累积或聚集。

较佳的，该医药组合物能够抑制该淀粉样 β 肽细胞外的生成、累积或

5 聚集。

较佳的，该医药组合物能够抑制该淀粉样 β 肽导致神经元的损伤或凋亡，进而保留、改善或恢复学习与记忆能力。

较佳的，该与淀粉样 β 肽相关之疾病或状况为阿滋海默氏症、轻度认知障碍、路易氏体失智症、唐氏症、荷兰型类淀粉变性症、关岛帕金森氏
10 症-失智症复合症、大脑淀粉样血管病、包涵体肌炎、额颞叶型失智症、年龄相关性黄斑变性或皮克病。

较佳的，该医药组合物是用于治疗阿滋海默氏症。

较佳的，该医药组合物是用于避免或延迟一生物体罹患阿滋海默氏症。

15 较佳的，该医药组合物对人体的有效剂量系相当于每日每公斤体重 0.2 毫克至 4 毫克之该有效成分。

较佳的，该医药组合物包含一种萃取自植物的苯乙醇苷制剂作为该有效成分的来源，其中该制剂包含类叶升麻苷与异类叶升麻苷为主要的苯乙醇成分，且异类叶升麻苷的含量大于该类叶升麻苷。

20 较佳的，该制剂包含 12-32% 类叶升麻苷及 26-46% 的异类叶升麻苷，以该制剂的重量为基准。

较佳的，该植物为一管花肉苘蓉。

较佳的，该制剂系经过一包含以下步骤的方法所制备：

a) 将该管花肉苘蓉的肉质茎以一第一极性溶剂加予萃取；

25 b) 将步骤 a) 获得的萃取物于浓缩后加到装有疏水大孔隙聚合物的柱中，使得苯乙醇苷吸附在聚合物上；

c) 用第二极性溶剂作为流动相流洗液洗脱该柱以除去游离的化合物，而实质上大部份的苯乙醇苷仍然吸附在聚合物上；以及

d) 用第三极性溶剂将苯乙醇苷从聚合物上洗脱下来，得到含有苯乙醇
30 苷的洗脱液，其中第一极性溶剂为水、甲醇、乙醇、水与甲醇的混合溶剂、或水与乙醇的混合溶剂；第二极性溶剂为水；及第三极性溶剂为甲醇、乙醇、水与甲醇的混合溶剂、或水与乙醇的混合溶剂，且该第三极性溶剂与第二极性溶剂相比极性较低；

e)将步骤 d)获得的含有苯乙醇苷的洗脱液浓缩再溶于水中，所得到的水溶液与一大孔树脂接触使得其中的苯乙醇苷吸附在大孔树脂上；及

f)依序以一第四极性溶剂和一第五极性溶剂分别对该大孔树脂进行洗脱，其中该第五极性溶剂的极性较该第四极性溶剂为低，使得以该第四极性溶剂洗脱而得的洗脱液不含有类叶升麻苷与异类叶升麻苷，而以该第四极性溶剂洗脱而得的洗脱液仅包含类叶升麻苷与异类叶升麻苷，其中第四极性溶剂及第五极性溶剂为水与甲醇的混合溶剂、或水与乙醇的混合溶剂。

10 较佳的，该第四极性溶剂为 25~35%乙醇水溶液，而该第五极性溶剂则为 35~45%乙醇水溶液。

为了让本发明之上述和其他目的、特征、和优点能更明显易懂，下文特举出实施例，并配合所附图式，作详细说明。

附图的简要说明

15 图 1 显示药物 A (类叶升麻苷)、I (异类叶升麻苷)、C (控制组，不含药物)及不同比例之 A 与 I 的医药组合物对 A β 1-40 在细胞外累积的影响。

图 2 显示显示药物 A (类叶升麻苷)、I (异类叶升麻苷)、C (控制组，不含药物)及不同比例之 A 与 I 的医药组合物对 A β 1-42 寡聚化的影响。

20 实施发明的最佳方式

许多由淀粉样 β 肽引发的疾病均具有一种共通的特征-淀粉样 β 肽聚集体的形成。这些淀粉样 β 肽聚集体可以例如纤维或斑块的形态出现，并且沉淀在生物体的系统、器官、组织或体液中，进而引发各种疾病或状况。如能有效抑制淀粉样 β 肽的生成、累积或聚集，应可避免淀粉样 β 肽形成聚集体而引发的各种疾病或状况，其应可作为有效预防或治疗淀粉样 β 肽相关疾病或状况的方式之一。

所述“预防”意指避免或延迟疾病或状况在生物体中出现，而所述“治疗”则指减缓或阻止疾病或状况的发展，又或者使生物体的状况回复至较佳或正常的状态。

30 所述“淀粉样 β 肽相关性疾病或状况”指此疾病或状况的发生通常与淀粉样 β 肽的生成、累积或聚集相关，且尤其指此疾病或状况的发生为淀粉样 β 肽所导致。而当在具有某种疾病或状况之一定比例上的生物体上发现有淀粉样 β 肽的不正常生成、累积或聚集现象时，亦可认为此疾病或状况

为淀粉样 β 肽相关。另外，当淀粉样 β 肽的聚集处与疾病或状况所发生的病理特征影响位置相近时，亦可认为此疾病或状况为淀粉样 β 肽相关。

在下列实施例中，利用表一所提供之测试样品进行 $A\beta$ 试验，并且与未加入任何测试样品处理的对照组(Vehicle)进行比较。

5

表一：进行试验之样品

代号	试验样品	浓度	来源
A	类叶升麻苷	50 $\mu\text{g/ml}$	杏辉实验室，纯度 97%
I	异类叶升麻苷	50 $\mu\text{g/ml}$	杏辉实验室，纯度 97%
A:I 40:10	类叶升麻苷 + 异类叶升麻苷	40 $\mu\text{g/ml}$ + 10 $\mu\text{g/ml}$	杏辉实验室，纯度 97%
A:I 30:20	类叶升麻苷 + 异类叶升麻苷	30 $\mu\text{g/ml}$ + 20 $\mu\text{g/ml}$	杏辉实验室，纯度 97%
A:I 20:30	类叶升麻苷 + 异类叶升麻苷	20 $\mu\text{g/ml}$ + 30 $\mu\text{g/ml}$	杏辉实验室，纯度 97%
A:I 10:40	类叶升麻苷 + 异类叶升麻苷	10 $\mu\text{g/ml}$ + 40 $\mu\text{g/ml}$	杏辉实验室，纯度 97%

实施例一：神经瘤母细胞株之培养

将原生型(wild type)人类神经瘤母细胞 SH-SY5Y 培养于 Eagle's
 10 Minimum essential Medium (EMEM)/Ham's F12 medium (1:1 混合物) (含
 10% FBS, 10 units/ml penicillin, 10 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin)中，而原生型小鼠神
 经瘤母细胞 Neuro-2a 则培养于 minimum essential medium (MEM)培养基
 (含 10% FBS, 10 units/ml penicillin, 10 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin)中。

实施例二：各样品对 $A\beta$ 1-40 于细胞外的累积测试

将实施例一中的原生型人类神经瘤母细胞 SH-SY5Y 之培养基置换成
 化学成份培养基(EMEM/F12 medium (Cat.No.12500-062), Hepes 5 mM, 葡
 萄糖 0.6%, NaHCO_3 3 mM, 麸酰胺 2.5 mM, 胰岛素 25 $\mu\text{g/ml}$, Transferin
 100 $\mu\text{g/ml}$, Progesterone 20 nM, Putrescine 60 μM , 亚硒酸钠(Sodium selenite)
 20 30 nM, Heparin 2 $\mu\text{g/ml}$)。每个井(well)具有 1×10^5 个 SH-SY5Y 细胞，而培
 养基体积为 300 μl 。30 分钟后，将表一中所示之测试样品分别以 50 $\mu\text{g/ml}$
 的总浓度加入至不同井中处理 24 小时，接着以 Human $A\beta$ 1-40
 Immunoassay kits(Catalog # KHB3482 Invitrogen)分析各井之培养基中的

A β 1-40 含量。

人类神经瘤母细胞 SH-SY5Y 会累积 A β 于细胞外的培养基中，而图 1 显示 SH-SY5Y 并分别经各测试样品处理后，A β 1-40 于培养基中的含量百分比，其系以未加入任何测试样品处理的对照组(C)为比较基准。结果显示为平均值 $\pm$ 标准误差，而对照组和测试样品组间之统计差异标示为：***表示 $P < 0.001$ 。

参考图 1 所示，测试样品 A (类叶升麻苷)减少培养基中的 A β 1-40 含量约 10%，测试样品 A:I 40:10 (类叶升麻苷 40 $\mu\text{g/ml}$ + 异类叶升麻苷 10 $\mu\text{g/ml}$)则减少培养基中的 A β 1-40 含量约 22%，而其余测试样品则减少培养基中的 A β 1-40 含量约 80%。图 1 结果显示类叶升麻苷+异类叶升麻苷 = 30 $\mu\text{g/ml}$ + 20 $\mu\text{g/ml}$; 20 $\mu\text{g/ml}$ + 30 $\mu\text{g/ml}$; 及 10 $\mu\text{g/ml}$ + 40 $\mu\text{g/ml}$ 异类叶升麻苷(D)的测试样品，与异类叶升麻苷 50 $\mu\text{g/ml}$ 的测试样品具有显著降低 A β 1-40 于细胞外累积的极佳活性。

15 实施例三：各测试样品对 A β 1-42 寡聚化的实验

将干燥的 Human A β 1-42 自冰箱取出平衡至室温，加入 1,1,1,3,3,3-Hexa-fluoro-2-propanol (HFIP)溶解 A β 1-42 至浓度为 1mM，而之后在室温下静置 1 小时。以 Hamilton 注射器将上述 A β 1-42/HFIP 容易进行分装，并且以氮气将 HFIP 吹干，接着存放于 -20°C。将 HFIP 处理后的 A β 1-42 以 PBS 溶解，并分别以浓度 50 $\mu\text{g/ml}$ 的测试样品 A-D 且于 4°C 下振荡处理 24 小时，以制备 A β 1-42 之寡聚物(oligomer)，并利用 thioflavine T 结合荧光($\text{Ex}=450 \text{ nm}$, $\text{Em}=482 \text{ nm}$)以分析 A β 1-42 的寡聚化程度。

图 2 显示表 1 中的测试样品分别对 A β 1-42 寡聚化(oligomerization)的影响，结果以百分比显示，并以未加入任何测试样品处理的对照组(C)为基准。图 2 结果显示表 1 中的各测试样品均具有抑制 A β 1-42 寡聚化的活性，其中以类叶升麻苷+异类叶升麻苷 = 30 $\mu\text{g/ml}$ + 20 $\mu\text{g/ml}$; 20 $\mu\text{g/ml}$ + 30 $\mu\text{g/ml}$; 及 10 $\mu\text{g/ml}$ + 40 $\mu\text{g/ml}$ 异类叶升麻苷(D)的测试样品，与异类叶升麻苷 50 $\mu\text{g/ml}$ 的测试样品对降低 A β 1-42 的寡聚化具有较佳的活性，进而可抑制 A β 形成纤维丝或老年斑块。

综合上述结果，异类叶升麻苷及类叶升麻苷的医药组合物可作为抑制 A β 生成、累积或聚集之有效成份，预计此医药组合物可有效抑制 A β 导致神经元的损伤或凋亡，以进而保留、改善或恢复学习与记忆能力。此外，根据上述结果，此医药组合物可用于预防或治疗 A β 相关疾病或状况。

所述 $A\beta$ 相关疾病或状况可包含但不限于阿滋海默氏症、轻度认知障碍、路易氏体失智症、唐氏症、荷兰型类淀粉变性症、关岛帕金森氏症-失智症复合症、大脑淀粉样血管病、包涵体肌炎、额颞叶型失智症、年龄相关性黄斑变性、皮克病以及其他。另,所述 $A\beta$ 虽以 $A\beta$ 中最大量的 $A\beta 1-40$ 或具有高度纤维形成性的 $A\beta 1-42$ 为例,然亦可包含其他胺基酸片段。

图 1 及 2 的结果显示异类叶升麻苷具有较佳的活性,但在实际应用上,异类叶升麻苷为一种含糖分子,不易以化学合成方式制备。以植物来源获得高纯度异类叶升麻苷的成本亦极高。由于图 1 及 2 的结果亦显示类叶升麻苷和异类叶升麻苷的混合物作为淀粉样 β 肽抑制剂具有可比拟于纯异类叶升麻苷的活性,因此假使一医药组合物可包含适当组成比的类叶升麻苷和异类叶升麻苷,则可在兼顾经济效益和医疗功效等实际应用面考量上,将此医药组合物用于代替纯化之异类叶升麻苷于预防或治疗淀粉样 β 肽相关的疾病或状况。

在本发明的下列实施例中,首先参考美国专利案 US7,087,252 所述制备含有苯乙醇苷的管花肉苁蓉制剂之方法,其包括下列步骤: a)将管花肉苁蓉的地下部分(肉质茎)以一第一极性溶剂加予萃取; b)将步骤 a)获得的萃取物加到装有疏水大孔隙聚合物的柱中,使得苯乙醇苷被吸附在聚合物上; c)用第二极性溶剂作为流动相流洗液洗脱该柱以除去游离的化合物,而实质上大部份的苯乙醇苷仍然吸附在聚合物上;以及 d)用第三极性溶剂将苯乙醇苷从聚合物上洗脱下来,得到含有苯乙醇苷的洗脱液,该第三极性溶剂与第二极性溶剂相比极性较低。

上述步骤 a)的第一极性溶剂可例如为水、或水与乙醇的混合溶剂。步骤 c)的第二极性溶剂为水。步骤 d)的第三极性溶剂则可例如包含甲醇、乙醇、水与甲醇的混合溶剂、或水与乙醇的混合溶剂,而第三极性溶剂较佳为水与乙醇的混合溶剂。

本发明提供了一种进一步纯化方法,其系直接将上述含苯乙醇苷的管花肉苁蓉制剂经进一步纯化,以得到仅含有类叶升麻苷与异类叶升麻苷之苯乙醇苷的医药组合物。此进一步纯化方法包括步骤: e)将含有多种苯乙醇苷的管花肉苁蓉制剂以大孔树脂进行纯化; f)依序以第四极性溶剂与第五极性溶剂分别对大孔树脂进行洗脱,其中第四极性溶剂的极性较第五极性溶剂为低,使经由第五极性溶剂洗脱而出的苯乙醇苷大抵仅包含类叶升麻苷与异类叶升麻苷。在一较佳实施例中,第四极性溶剂可例如为 25~35% 乙醇水溶液,而第五极性溶剂则可例如为 35~45% 乙醇水溶液。

较佳的, 该疏水大孔隙聚合物及大孔树脂为交联聚芳族物质, 更佳的为交联的聚苯乙烯, 或交联的苯乙烯和二乙烯苯共聚物, 例如 D-101 型或 AB-8 型的材料。

将上述经第五极性溶剂洗脱后的洗脱液进行浓缩或干燥, 即可直接得到实质上仅含异类叶升麻苷与类叶升麻苷之苯乙醇苷的医药组合物。

实施例四: 仅含有异类叶升麻苷与类叶升麻苷之苯乙醇苷的医药组合物

将管花肉苁蓉药材 10 kg, 切成饮片, 加 8 倍量水浸泡 1 小时后煎煮提取 2 小时, 过滤, 滤液备用。药渣再加 6 倍量水煎煮提取 2 次, 每次 1 小时, 过滤。合并三次滤液, 减压浓缩至比重 1.10 (50℃), 加乙醇至含醇量达 60%, 冷藏 12 小时, 倾出上清液, 将残留的悬浊液过滤, 合并上清液和滤液, 减压浓缩并回收乙醇至比重 1.10 (50℃), 得提取浸膏。

将提取浸膏 6 kg 加 1 倍量水加热溶解, 徐徐注入已处理好的大孔吸附树脂柱内, 先用水洗脱, 收集药材 4 倍量水洗脱液备用; 再用 40%乙醇洗脱, 收集药材 5 倍量 40%乙醇洗脱液备用。将水洗脱液再注入大孔吸附树脂柱中, 先用药材 3 倍量水洗脱, 弃去水洗脱液; 再用 40%乙醇洗脱, 收集药材 4 倍量 40%乙醇洗脱液备用。合并 2 次 40%乙醇洗脱液, 浓缩, 干燥, 即得含有苯乙醇苷的制剂 1107 g。

以高效液相色谱法测定, 溶剂 A: 含 0.1%甲酸的乙腈(acetonitrile, CAN), 溶剂 B: 含 0.1%甲酸的 MQ-H₂O, 柱: Agilent Zorbax SB-C18 柱, 2.1 x 150 mm, 5μm; 流速: 0.3 ml/min; UV 波长: 333 nm。上述苯乙醇苷制剂中的松果菊苷、类叶升麻苷以及异类叶升麻苷之含量, 经计算后所得之结果分别为 33.6 wt%、3.65 wt %以及 6.05 wt %。

将 200 公克上述含苯乙醇苷的制剂溶于 800 克水中, 以一溶液形式流经大孔树脂以便进行纯化。接着依序先后分别以 30%乙醇和 40%乙醇进行洗脱。在薄层析片(聚酰胺(Polyamide))以 UV 365nm 检测个别的洗脱液, 其中 30%乙醇的洗脱液中未包含类叶升麻苷与异类叶升麻苷, 而 40%乙醇的洗脱液中则仅包含类叶升麻苷与异类叶升麻苷之苯乙醇苷 23.6 g。在此实施例中, 所测得洗脱液中的类叶升麻苷为 22.5 wt%, 而异类叶升麻苷为 36.4 wt%。

虽然本发明已以数个较佳实施例揭露如上, 然其并非用以限定本发明, 任何熟习此技艺者, 在未脱离本发明所揭示之精神下所完成之等效改变或修

饰，均应包含在下述之权利要求内。

权 利 要 求

1. 一种预防或治疗与一淀粉样 β 肽相关的一疾病或状况的医药组合物，其包含作为有效成分的类叶升麻苷与异类叶升麻苷，其中异类叶升麻
5 苷对该类叶升麻苷的重量比为约 4:1 至约 1:4。
2. 如权利要求 1 所述的医药组合物，其中异类叶升麻苷对该类叶升麻苷的重量比为约 4:1 至约 2:3。
3. 如权利要求 1 所述的医药组合物，其不含有松果菊苷。
4. 如权利要求 1 所述的医药组合物，其中该医药组合物能够抑制该淀
10 粉样 β 肽的生成、累积或聚集。
5. 如权利要求 1 所述的医药组合物，其中该医药组合物能够抑制该淀粉样 β 肽细胞外的生成、累积或聚集。
6. 如权利要求 1 所述的医药组合物，其中该医药组合物能够抑制该淀粉样 β 肽导致神经元的损伤或凋亡，进而保留、改善或恢复学习与记忆能
15 力。
7. 如权利要求 1 所述的医药组合物，其中该与淀粉样 β 肽相关的疾病或状况为阿滋海默氏症、轻度认知障碍、路易氏体失智症、唐氏症、荷兰型类淀粉变性症、关岛帕金森氏症-失智症复合症、大脑淀粉样血管病、包涵体肌炎、额颞叶型失智症、年龄相关性黄斑变性或皮克病。
8. 如权利要求 1 所述的医药组合物，其中该医药组合物是用于治疗阿
20 滋海默氏症。
9. 如权利要求 1 所述的医药组合物，其中该医药组合物是用于避免或延迟一生物体罹患阿滋海默氏症。
10. 如权利要求 1 所述的医药组合物，其中该医药组合物对人体的有效
25 剂量系相当于每日每公斤体重 0.2 毫克至 4 毫克的该有效成分。
11. 如权利要求 3 所述的医药组合物，其包含一种萃取自植物的苯乙醇苷制剂作为该有效成分的来源，其中该制剂包含类叶升麻苷与异类叶升麻苷为主要的苯乙醇成分，且异类叶升麻苷的含量大于该类叶升麻苷。
12. 如权利要求 11 所述的医药组合物，其中该制剂包含 12-32%类叶
30 升麻苷及 26-46%的异类叶升麻苷，以该制剂的重量为基准。
13. 如权利要求 12 所述的医药组合物，其中该植物为一管花肉苘蓉。
14. 如权利要求 13 所述的医药组合物，其中该制剂系经过一包含以下步骤的方法所制备：

a)将该管花肉苁蓉的肉质茎以一第一极性溶剂加予萃取；

b)将步骤 a)获得的萃取物于浓缩后加到装有疏水大孔隙聚合物的柱中，使得苯乙醇苷吸附在聚合物上；

5 c)用第二极性溶剂作为流动相流洗液洗脱该柱以除去游离的化合物，而实质上大部份的苯乙醇苷仍然吸附在聚合物上；以及

d)用第三极性溶剂将苯乙醇苷从聚合物上洗脱下来，得到含有苯乙醇苷的洗脱液，其中第一极性溶剂为水、甲醇、乙醇、水与甲醇的混合溶剂、或水与乙醇的混合溶剂；第二极性溶剂为水；及第三极性溶剂为甲醇、乙醇、水与甲醇的混合溶剂、或水与乙醇的混合溶剂，且该第三极性溶剂与
10 第二极性溶剂相比极性较低；

e)将步骤 d)获得的含有苯乙醇苷的洗脱液浓缩再溶于水中，所得到的水溶液与一大孔树脂接触使得其中的苯乙醇苷吸附在大孔树脂上；及

f)依序以一第四极性溶剂和一第五极性溶剂分别对该大孔树脂进行洗脱，其中该第五极性溶剂的极性较该第四极性溶剂为低，使得以该第四极性溶剂洗脱而得的洗脱液不含有类叶升麻苷与异类叶升麻苷，而以该第四
15 极性溶剂洗脱而得的洗脱液仅包含类叶升麻苷与异类叶升麻苷，其中第四极性溶剂及第五极性溶剂为水与甲醇的混合溶剂、或水与乙醇的混合溶剂。

15. 如权利要求 14 所述的医药组合物，其中该第四极性溶剂为
20 25~35%乙醇水溶液，而该第五极性溶剂则为 35~45%乙醇水溶液。