



(21)申請案號：101120859

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 06 月 11 日

(51)Int. Cl. : A61K31/365 (2006.01)

A61K31/585 (2006.01)

A61P21/00 (2006.01)

(71)申請人：高雄醫學大學(中華民國) KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY (TW)

高雄市三民區十全一路 100 號

(72)發明人：羅怡卿 LO, YI CHING (TW)；許雅雲 HSU, YA YUN (TW)；鐘育志 JONG, YUH JYH (TW)

(74)代理人：洪澄文；顏錦順

(56)參考文獻：

US 2011/0288166A1

審查人員：黃文延

申請專利範圍項數：9 項 圖式數：8 共 49 頁

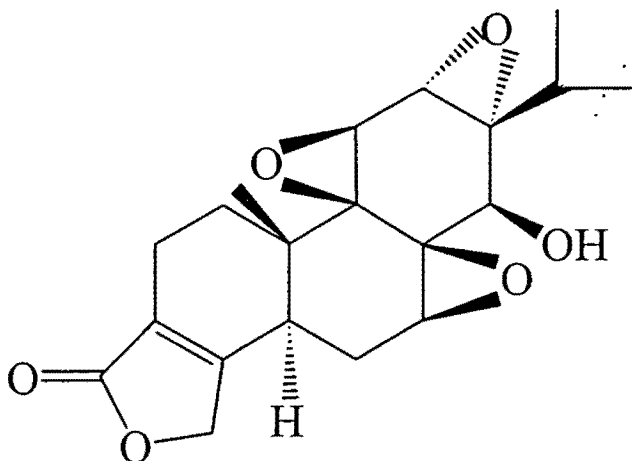
## (54)名稱

雷公藤甲素用於製備治療與運動神經元存活蛋白質表現相關之疾病的藥物的用途

USE OF TRIPTOLIDE FOR MANUFACTURING A MEDICAMENT FOR TREATING A DISEASE RELATED TO SURVIVAL MOTOR NEURON PROTEIN EXPRESSION

## (57)摘要

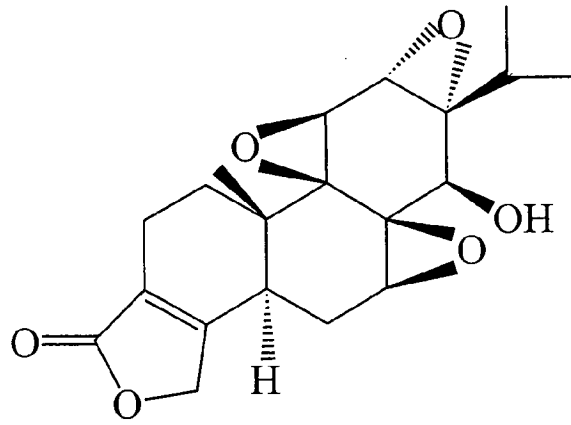
本發明提供一種用於治療與運動神經元存活蛋白質表現相關之疾病的醫藥組合物，包括：一有效量之雷公藤甲素為活性成分，該雷公藤甲素之分子式如式(I)所示：



式 (I) : 以及一藥學上可接受之載體或

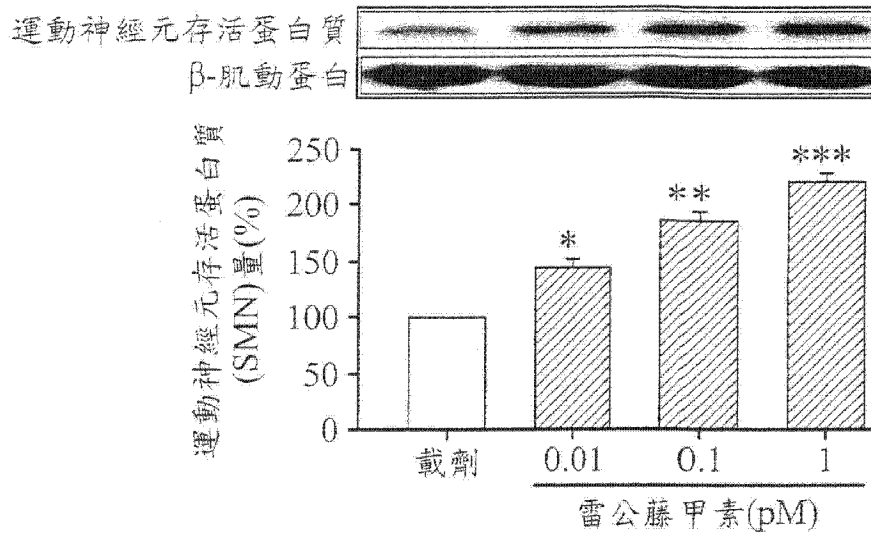
鹽類。

The invention provides a pharmaceutical composition for treating a disease related to survival motor neuron protein expression, including: an effective amount of triptolide, wherein a formula of the triptolide is

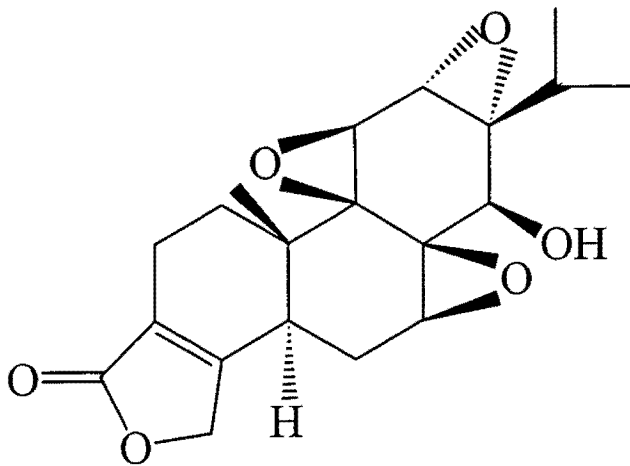


shown as Formula (I):  
pharmaceutically acceptable carrier or salt.

Formula (I); and a



第1A圖



## 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 101120859

A61K 31/365, 31/585

※ 申請日： 101.6.11

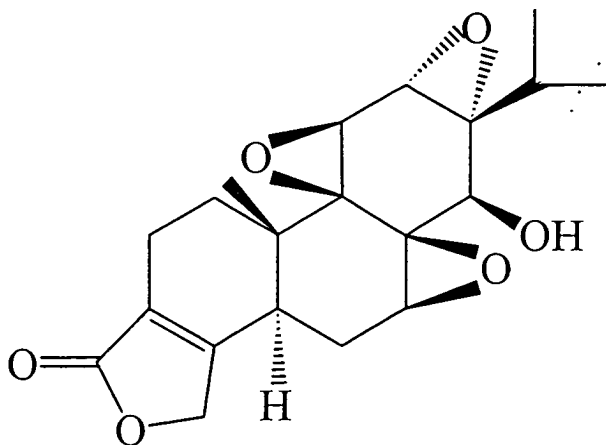
※IPC 分類： A61P 21/00

### 一、發明名稱：(中文/英文)

雷公藤甲素用於製備治療與運動神經元存活蛋白質表現相關之疾病的藥物的用途 /Use of triptolide for manufacturing a medicament for treating a disease related to survival motor neuron protein expression

### 二、中文發明摘要：

本發明提供一種用於治療與運動神經元存活蛋白質表現相關之疾病的醫藥組合物，包括：一有效量之雷公藤甲素為活性成分，該雷公藤甲素之分子式如式(I)所示：

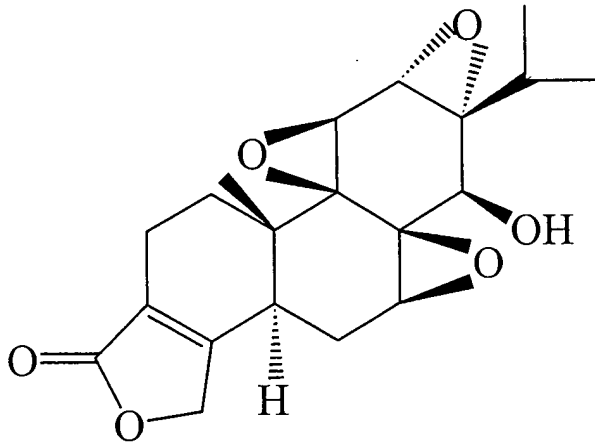


式(I)：以及一藥學

上可接受之載體或鹽類。

## 三、英文發明摘要：

The invention provides a pharmaceutical composition for treating a disease related to survival motor neuron protein expression, including: an effective amount of triptolide, wherein a formula of the triptolide is shown as Formula (I):



Formula (I); and a pharmaceutically acceptable carrier or salt.



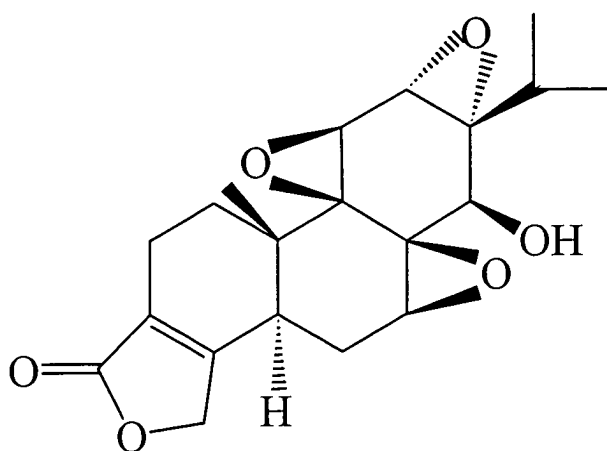
## 四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 ( 1A ) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無。

## 五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種用於治療與運動神經元存活蛋白質 (survival motor neuron protein, SMN) 表現相關之疾病的醫藥組合物，且特別關於一種用於治療與運動神經元存活蛋白質表現相關之疾病的醫藥組合物，其以雷公藤甲素 (triptolide) 為活性成分，其中，由雷公藤甲素具有增加運動神經元存活蛋白質表現的功效。

### 【先前技術】

在人類中，具有一個端粒複製 (telomeric copy) 之運動神經元 1 (survival motor neuron 1, SMN1) 基因與數個中心粒複製 (centromeric copy) 之運動神經元 2 (SMN2) 基因。SMN1 與 SMN2 基因分別編碼出 90% 與 10% 全長運動神經元存活蛋白質 (full-length survival motor neuron, FL-SMN)。一般而言，有效 FL-SMN 蛋白質可維持運動神經元的存活。FL-SMN 蛋白質無所不在地被表現並且位於細胞質與細胞核兩者中。在細胞核中，SMN 藉由緊密的蛋白質-蛋白質互相作用與 Gemin2-8 結合，形成一穩定之多重蛋白質複合物，稱為 gems (Liu and Dreyfuss, 1996)，其在剪接體小核糖蛋白 (spliceosomal small nuclear ribonucleoproteins, snRNPs) 的裝配中扮演一個必要角色 (Meister et al., 2002; Eggert et al., 2006; Neuenkirchen et al., 2008; Talbot and Davies, 2008)。在 SMN 複合物之組成中，Gemin2 與 Gemin3 兩者直接且穩定地與 SMN 互相作用 (Todd et al., 2010)。介

於 SMN 與 Gemin2 之間的關係大於 SMN 複合物之任何其他組成(Ogawa et al., 2007)。SMN 複合物之互相作用的向下調控可導致 SMN 蛋白質的量降低與運動神經元退化(Friesen et al., 2001; Gubitz et al., 2004; Yong et al., 2004; Morris, 2008; Chari et al., 2009)。

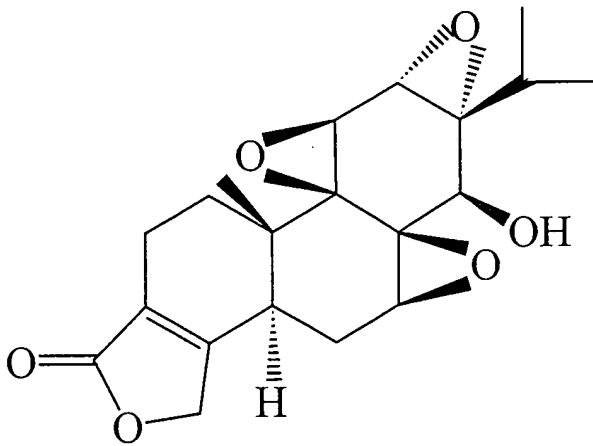
脊髓性肌肉萎縮症(spinal muscular atrophy, SMA)為一種常染色體隱性神經元退化疾病(autosomal recessive neurodegenerative disease)，其以脊髓之前角(anterior horn)中的  $\alpha$ -運動神經元退化為特徵，引起肌肉癱瘓(muscular paralysis)與肌肉萎縮(muscular atrophy)。一般而言，根據發病年齡(age of onset)、嚴重程度與臨床運動功能測試，SMA 被分成三種類型。從最嚴重至輕微之分類為：第一型(沃尼克-霍夫曼症(Werdnig-Hoffmann disease))、第二型(中等程度)與第三型(庫格勃-韋蘭德症(Kugelberg-Welander disease))。另外，還有兩種額外之類型，第四型(具有非常輕微症狀的成人發病)與第 0 型(產前發病結合嚴重症狀導致早期新生兒死亡)(Dubowitz, 1999; Russman, 2007; Lunn and Wang, 2008)。SMA 起因於同型合子瓦解(homozygous disruption)以及由於缺失或突變所導致之 SMN1 基因功能喪失。大於 98%之 SMA 病患的 SMN1 基因功能喪失，但是卻永遠維持至少一個 SMN2 基因的複製(Monani, 2005)。

然而，直至今日，仍然沒有一有效的藥物或治療方式可治療與運動神經元存活蛋白質缺乏相關之疾病，特別是沒有一有效的藥物或治療方式可減緩或反轉於 SMA 中的

神經元退化。因此，目前亟需一新穎之藥物，其可有效治療與運動神經元存活蛋白質表現相關的疾病。

### 【發明內容】

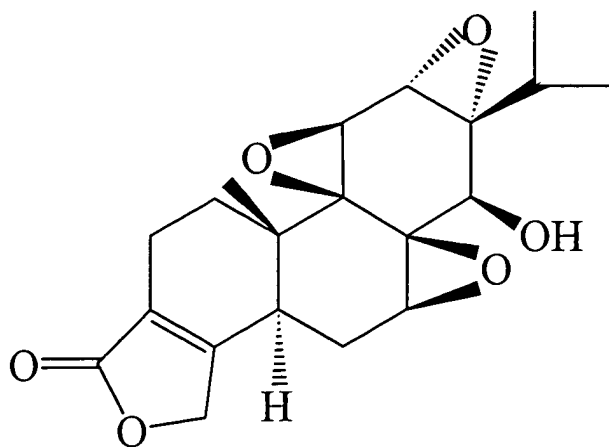
本發明提供一種用於治療與運動神經元存活蛋白質表現相關之疾病的醫藥組合物，包括：一有效量之雷公藤甲素為活性成分，該雷公藤甲素之分子式如式(I)所示：



式(I)；

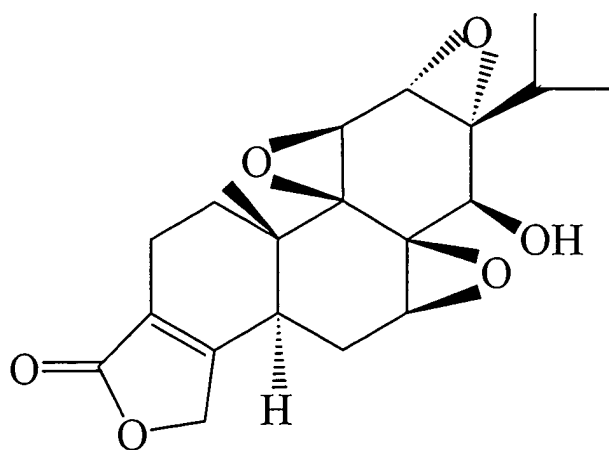
以及一藥學上可接受之載體或鹽類。

本發明也提供一種運動神經元存活蛋白質表現的促進劑，包括雷公藤甲素為活性成分，該雷公藤甲素之分子式如式(I)所示：



式(I)。

本發明還提供一種雷公藤甲素在製備用於治療與運動神經元存活蛋白質表現相關之疾病的藥物用途，該雷公藤甲素之分子式如式(I)所示：



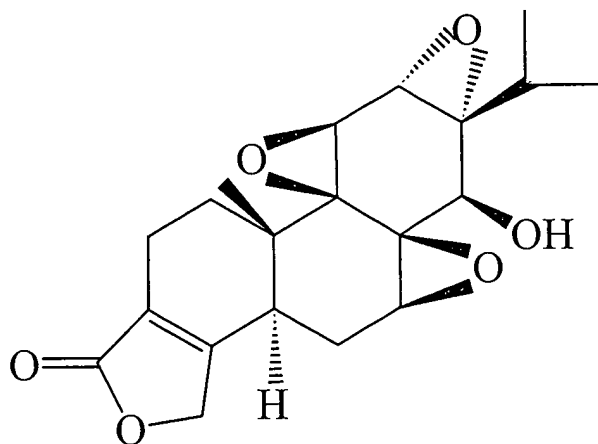
式(I)。

為了讓本發明之上述和其他目的、特徵和優點能更明顯易懂，下文特舉較佳實施例，並配合所附圖示，作詳細說明如下：

### 【實施方式】

在本發明一第一態樣中，本發明提供一種以雷公藤甲素(triptolide)為主要活性成分之用於治療與運動神經元存

活蛋白質表現相關之疾病的醫藥組合物，其具有增加運動神經元存活蛋白質表現的功效，而上述雷公藤甲素之分子式如式(I)所示：



式(I)。

上述本發明之用於治療與運動神經元存活蛋白質表現相關之疾病的醫藥組合物，可包括，但不限於，一有效量之雷公藤甲素與一藥學上可接受之載體或鹽類，其中雷公藤甲素為增加運動神經元存活蛋白質表現的活性成分。

雷公藤甲素，其為原始來自雷公藤 (*Tripterygium wilfordii* Hook. F.) 之一種具有生物活性的二萜內酯。而於本發明藥學組合物中所使用之雷公藤甲素，可為來自一植物或者是為人工合成，並無特別限定。

於此，用語“與運動神經元存活蛋白質表現相關之疾病”意指一疾病，其發病原因與運動神經元存活蛋白質表現量直接相關，抑或是，一疾病，其發病機制牽涉到運動神經元存活蛋白質表現量。與運動神經元存活蛋白質表現相關之疾病的例子，可包括，但不限於，脊髓性肌肉萎縮症、肌萎縮性側索硬化症與運動神經元損傷等。在一實施

例中，上述與運動神經元存活蛋白質表現相關之疾病為脊髓性肌肉萎縮症。又，上述脊髓性肌肉萎縮症可包括第一型、第二型及/或第三型脊髓性肌肉萎縮症，並無特別限制。

本發明組合物中之雷公藤甲素具有增加運動神經元存活蛋白質表現的能力。在一實施例中，雷公藤甲素 *in vitro* 或 *in vivo* 具有增加運動神經元存活蛋白質表現的能力。此外，雷公藤甲素具有增加全長運動神經元存活基因 2 與外顯子 7 缺乏運動神經元存活基因 2 的轉錄能力。又，上述雷公藤甲素具有增加 Gemin2 蛋白質及/或 Gemin3 蛋白質表現的能力，且同時於細胞核內增加之 Gemin2 蛋白質與運動神經元存活蛋白質形成一運動神經元存活蛋白質複合物，又稱之為核點(nuclear gem)。

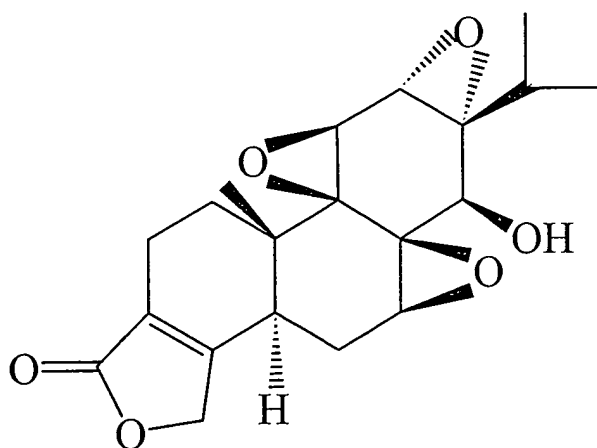
而於上述本發明用於治療與運動神經元存活蛋白質表現相關之疾病的醫藥組合物中，前述藥學上可接受之載體可包括，但不限於溶劑、分散媒(dispersion medium)、套膜(coating)、抗菌與抗真菌試劑與一等滲透壓與吸收延遲(absorption delaying)試劑等與藥學投予相容者。對於不同的給藥方式，可利用一般方法將藥學組合物配置成劑型(dosage form)。

又，上述藥學上可接受之鹽類可包括，但不限於鹽類包括無機陽離子，例如，鹼金屬鹽類，如鈉、鉀或胺鹽，鹼土金屬族鹽類，如鎂、鈣鹽，含二價或四價陽離子之鹽類，如鋅、鋁或銦鹽。此外，也可是為有機鹽類，如二環己胺鹽類、甲基-D-葡糖胺，胺基酸鹽類，如精胺酸、離胺酸、組織胺酸、麩胺酸醯胺。

本發明藥學組合物之給藥可以口服、非口服、經由吸入噴霧 (inhalation spray) 或藉由植入貯存器 (implanted reservoir) 的方式。非口服可包括 (subcutaneous)、皮內 (intracutaneous) 靜脈內 (intravenous)、肌肉內 (intramuscular)、關節內 (intraarticular) 動脈 (intraarterial)、滑囊 (腔) 內 (intrasynovial)、胸骨內 (intrasternal) 蜘蛛膜下腔 (intrathecal)、疾病部位內 (intralesional) 注射以及灌注技術。

口服成分的形式可包括，但不限定於，藥錠、膠囊、乳劑 (emulsions)、水性懸浮液 (aqueous suspensions)、分散液 (dispersions) 與溶液。

另外，在本發明一第二態樣中，本發明提供一種運動神經元存活蛋白質促進劑，其以雷公藤甲素為活性成分，且具有增進運動神經元存活蛋白質表現之功效，而雷公藤甲素之分子式如式 (I) 所示：



式 (I)。

上述運動神經元存活蛋白質促進劑，可包括，但不限於，一有效量之雷公藤甲素，其中雷公藤甲素為增加運動



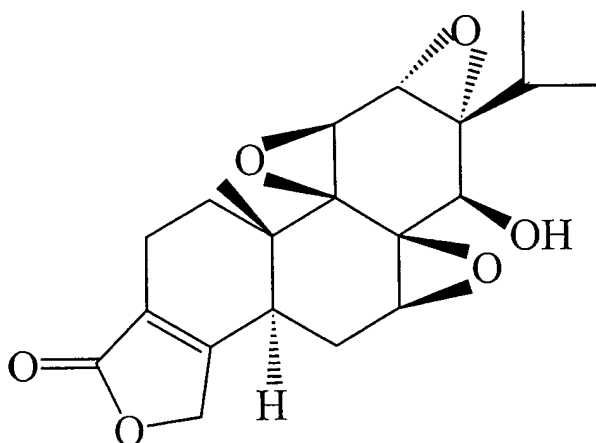
神經元存活蛋白質表現的活性成分。而於本發明促進劑中所使用之雷公藤甲素，可為來自一植物或者是為人工合成，並無特別限定。

本發明運動神經元存活蛋白質促進劑之雷公藤甲素具有增加運動神經元存活蛋白質表現的能力。在一實施例中，雷公藤甲素 *in vitro* 或 *in vivo* 具有增加運動神經元存活蛋白質表現的能力。此外，雷公藤甲素具有增加全長運動神經元存活基因 2 與外顯子 7 缺乏運動神經元存活基因 2 的轉錄的能力。又，上述雷公藤甲素具有增加 Gemin2 蛋白質及/或 Gemin3 蛋白質表現的能力。且同時於細胞核內增加之 Gemin2 蛋白質與運動神經元存活蛋白質形成一運動神經元存活蛋白質複合物，又稱之為核點。

在一實施例中，可將本發明運動神經元存活蛋白質促進劑應用於與運動神經元存活蛋白質相關之疾病的治療。而上述與運動神經元存活蛋白質表現相關之疾病意指一疾病，其發病原因與運動神經元存活蛋白質表現量直接相關，或者是，一疾病，其發病機制牽涉到運動神經元存活蛋白質表現量。與運動神經元存活蛋白質表現相關之疾病的例子，可包括，但不限於，脊髓性肌肉萎縮症、肌萎縮性側索硬化症與運動神經元損傷等。在一實施例中，上述與運動神經元存活蛋白質表現相關之疾病為脊髓性肌肉萎縮症。上述脊髓性肌肉萎縮症可包括第一型、第二型及/或第三型脊髓性肌肉萎縮症，並無特別限制。

在本發明一第三態樣中，本發明提供一種雷公藤甲素在製備用於治療與運動神經元存活蛋白質表現相關之疾病

的藥物的用途，而雷公藤甲素之分子式如式(I)所示：



式(I)。

於此，將上述與運動神經元存活蛋白質表現相關之疾病意定義為一疾病，其發病原因與運動神經元存活蛋白質表現量直接相關，或者是，一疾病，其發病機制牽涉到運動神經元存活蛋白質表現量。與運動神經元存活蛋白質表現相關之疾病的例子，可包括，但不限於，脊髓性肌肉萎縮症、肌萎縮性側索硬化症與運動神經元損傷等。在一實施例中，上述與運動神經元存活蛋白質表現相關之疾病為脊髓性肌肉萎縮症。上述脊髓性肌肉萎縮症可包括第一型、第二型及/或第三型脊髓性肌肉萎縮症，並無特別限制。

於本發明中確認雷公藤甲素具有增加運動神經元存活蛋白質表現的能力。在一實施例中，雷公藤甲素 *in vitro* 或 *in vivo* 具有增加運動神經元存活蛋白質表現的能力。此外，雷公藤甲素具有增加全長運動神經元存活基因 2 與外顯子 7 缺乏運動神經元存活基因 2 的轉錄的能力。又，上述雷公藤甲素具有增加 Gemin2 蛋白質及/或 Gemin3 蛋白質表現的能力，且同時於細胞核內增加之 Gemin2 蛋白質

與運動神經元存活蛋白質形成一運動神經元存活蛋白質複合物，又稱之為核點。

## 【實施例】

### A. 方法

#### 1. 細胞培養

如先前文獻所述來培養 NSC34、小鼠神經母細胞瘤 (neuroblastoma)，N18TG2 與小鼠胚胎脊髓運動神經元 (embryonic spinal cord motor neuron) 細胞株 (Rizzardini et al., 2006)。簡單而言，使細胞生長於添加 10% 熱去活化胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 與抗生素 (100 U·mL<sup>-1</sup> penicillin and 100 mg·mL<sup>-1</sup> 鏈黴素 (streptomycin)) 之達氏修正依氏培養基 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) 中。將細胞培養於 37°C，含 5% CO<sub>2</sub> 之潮濕空氣下直到細胞聚滿 (confluence)。每 3 天更換一次培養基，且每 3-5 天將聚滿之細胞以胰蛋白酶 (trypsin) 溶液來繼代。下述實驗為在 80% 細胞聚滿之狀態下執行。

人類 SMA 纖維母細胞 (fibroblast) 細胞株係從具有知情同意書 (informed consent) 之 SMA 病患切片來建立，且如先前文獻所述來製備 (Yuo et al., 2008)。知情同意書係經由高雄醫學大學附設中和紀念醫院 (Kaohsiung Medical University Chung-Ho Memorial Hospital) 之人體試驗委員會 (institutional review board) (KMUH-IRB-990122) 所公認。將纖維母細胞維持於添加 10% FBS、100 U·mL<sup>-1</sup> 青黴素 (penicillin) 與 100 μg·mL<sup>-1</sup> 鏈黴素之 DMEM/F12 培養基中。

將細胞維持於 37°C，含 5% CO<sub>2</sub> 之潮濕空氣下。

## 2. 細胞存活率分析

細胞存活率係以藉由使用 3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴鹽 (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT) 之定量比色分析 (quantitative colorimetric assay) 來測量，顯示存活細胞之粒腺體 (mitochondrial) 活性。將細胞置於 96 孔盤中且以不同濃度之雷公藤甲素來培養。在 24 小時後，將細胞以 0.1 mg·mL<sup>-1</sup> 終濃度的 MTT 於 37°C 培養 3 小時。藉由添加 100 μL 之二甲基亞砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 來終止反應。藉由使用一微量盤式分析儀 (microplate reader) 測來於 560 nm 之吸收來測定 MTT 甲臍 (formazan) 產物的量。

## 3. 藉由膜聯蛋白 (annexin) V 的細胞凋亡 (apoptosis) 分析

以 Annexin V-FITC/碘化丙啶 (propidium iodide, PI) (Rizzardini et al.) 雙重染色 (double staining) 來偵測遭遇細胞凋亡的細胞。簡單而言，將貼附至塑膠培養盤之細胞藉由 0.25% 之胰蛋白酶來收集並以冷的 PBS 來清洗兩次。將細胞塊以 1×10<sup>6</sup> 顆細胞·mL<sup>-1</sup> 之濃度懸浮於 1 倍的結合緩衝溶液 (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>) 中。之後，於黑暗中，以 Annexin V-FITC 與 PI 培養細胞 15 分鐘 (22-25°C)。藉由 Coulter CyFlow® Cytometer

(Partec, Germany)立即分析經染色之細胞。Annexin V-陽性細胞被視為凋亡細胞。

#### 4. 動物與雷公藤甲素處理

如先前文獻所述來產生類 SMA (SMA-like) ( $\text{Smn}^{-/-}$  SMN2)小鼠(Hsieh-Li et al., 2000)。於本發明中所使用之所有動物以及關於使用動物之所有步驟，為經由於高雄醫學大學之動物管理及使用委員會(the Animal Care and Use Committee)所認證(認證識別：98096)。簡單而言，將雜合之小鼠  $\text{Smn}^{+/-}$  剔除-人類 SMN2 轉殖小鼠( $\text{Smn}^{+/-}$  SMN2<sup>+/+</sup>)與 C57BL/6 小鼠(購自國家實驗動物繁殖及研究中心，台灣)回交(backcross)。在大於六代的遺傳背景純化後，獲得  $\text{Smn}^{+/-}$  SMN2<sup>+/+</sup> 小鼠，其可產生類 SMA 小鼠(Tsai et al., 2008)。藉由尾部 DNA 的 PCR 分析來對小鼠進行基因型分析。動物被允許自由食用食物、水，且居住於常溫與經控制之照明(於 07 時 30 分與 19 時 30 分之間開啟照明)的環境下。

將年齡匹配(age-matched)之動物分成五個實驗組別：野生型(WT,  $\text{Smn}^{+/+}$  SMN2<sup>-/-</sup>)組；SMA 第三型小鼠組；載劑處理 SMA 第三型小鼠組(接受 5% DMSO 於生理時鹽水中)；以 0.01 或 0.1  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$  之雷公藤甲素(溶於 5% DMSO/生理食鹽水中)腹腔注射的 SMA 第三型小鼠組。在實驗期間每日監測存活與體重。

在將動物犧牲之後，獲得小鼠之大腦、脊髓與腓腸肌(gastrocnemius muscle)。之後，立即將所有組織於放射免疫

沈澱分析(radio immuno precipitation assay, RIPA)緩衝溶液中均質化，並在離心後收集上清液。在西方墨點分析之前測定蛋白質量。

## 5. 存活率分析與體重發展

使用 30 口徑(gauge) 1 英吋長的注射針，經由腹腔注射，使五天大的小鼠接受  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$  的雷公藤甲素。將出生之日標示為出生後天數(postnatal day) (P) 1。控制組僅接受等體積的載劑。於 P1 開始測量每日的體重。

## 6. 西方墨點分析

將細胞或組織於細胞分解緩衝溶液(cell lysis buffer) (Thermo) 中均質化。藉由 Bio-Rad DC Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 來測定蛋白質濃度。將各泳道(lane)載入  $20 \mu\text{g}$  蛋白質，之後藉由 SDS-PAGE 來分離，並藉由免疫轉漬法(immunoblotting)轉移至聚二氟乙烯(polyvinyl difluoride)膜。於室溫以含 5% BSA 之三羥甲基氨基甲烷緩衝鹽水(Tris Buffered saline Tween, TBST) ( $50 \text{ mM Tris-HCl}$ ,  $\text{pH } 7.6$ ,  $150 \text{ mM NaCl}$ ,  $0.1\% \text{ Tween } 20$ ) 來進行非專一結合阻擋(block)1 小時，且之後以下列專一的一級抗體之一於  $4^\circ\text{C}$  進行隔夜培養：小鼠單株抗-SMN (1:5000)、兔子多株抗-Gemin2 H-100 (1:500)、兔子多株抗-Gemin3 H-145 (1:500)、兔子多株抗-SUV39H1(1:1000)、兔子多株抗-EZH2 (1:1000)、小鼠單株抗- $\beta$ -肌動蛋白 (1:10000)。將膜以二級抗體於室溫培養 1 小時，且之後藉

由曝光至 BioMaxMR 底片(Kodak)來測定增強的化學發光(chemiluminescence)。核蛋白質之表現偵測而言，根據使用手冊使用核萃取套組(Nuclear Extraction Kit) (Rochester, NY, USA)來分離核萃取物。

## 7. 訊息 RNA(messenger RNA, mRNA)之定量分析

對於定量即時 PCR (qPCR)實驗而言，將 mRNA 從纖維母細胞分離且純化、在必要的處理之後，以 TRIzol 試劑 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)均質化，且之後藉由異硫酸氰胍 - 酚 - 氯仿 (acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform) 萃取法來萃取。根據製造商建議步驟，使用 Reverse Transcription System kit (Promega, Madison, WI, USA)來執行反轉錄。將 1  $\mu$ g 的總 RNA(total RNA)反轉錄成 cDNAs。使用 qPCR 來定量測定全長 SMN2 (FL-SMN2) 與 SMN2 $\Delta$ 7 轉錄程度(transcript levels)。使用 Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)於 ABI PRISM 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 上執行 qPCR。選擇引子來結合於 SMN 外顯子 (exon) 7 (5'-GAAGGTGCTCACATTCCTTAAAT-3') (序列辨識號：1) 與 SMN 外顯子 8 (5'-ATCAAGAAGAGTTACCCATTCCA-3') (序列辨識號：2) 中以用於 FL-SMN2 轉錄體(transcript)的擴增，並選擇引子來結合於 SMN 外顯子 5 (5'-CCACCACCCCACTTACTATCA-3') (序列辨識號：3) 中與 SMN 外顯子 6/ 外顯子 8 border

(5'-GCTCTATGCCAGCATTTCATA-3') (序列辨識號：4) 以擴增經截斷之 SMN2 $\Delta$ 7 轉錄體(Riessland et al., 2006)。根據製造商操作指南，藉由比較 SMN 與 GAPDH 轉錄體，以使用臨界循環(threshold cycle, Ct)方法來計算轉錄體的相對量。將結果標準化做為介於在經處理與未經處理樣本中之轉錄體的相對量之間的比值。執行各樣本的 qPCR 反應於三重複，且實驗重複至少三次。

## 8. 免疫螢光染色 (immunofluorescence staining) 與 nuclear gems 計數

免疫螢光染色為根據一般程序。簡單而言，使人類 SMA 纖維母細胞生長於一玻璃培養槽玻片(glass chamber slides)上。在處理後，將細胞以 4%三聚甲醛(paraformaldehyde)固定，並以於 PBS 中之 0.2% Triton X-100 透性化(permeabilized)。在以於 PBS 中之 2% BSA 阻擋後，將細胞以小鼠單株抗-SMN 抗體與兔子多株抗-Gemin2 H-100 抗體於 4°C 隔夜培養。之後加入 Alexa Fluor 555 山羊抗-小鼠 IgG 與 Alexa Fluor 488 山羊抗-兔子 IgG 二及抗培養 1 小時。4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)核酸染色確認 gems 的位置。在以共軛焦雷射掃描式顯微鏡(FluoView1000; Olympus, Center Valley, PA, USA)觀察前，將玻片固定並且密封。將每 100 個細胞之總計經染色 gems 進行分析。

## 9. 資料分析



藉由採取用於多重比較之 Bonferroni 事後比較檢定 (post hoc test) 的 Kaplan-Meier 曲線與對數等級檢定 (log-rank test) 來分析存活率。藉由採取用於多重比較 ANOVA 之事後比較檢定 Tukey's 來評估體重曲線。藉由採取 ANOVA 之所有配對比較以 Dunnett's 來檢定執行蛋白質程度與即時 PCR 資料的統計分析。資料被顯示為平均值±標準差。機率值 (probability values, *P*) 小於 0.05 被視為在所有實驗中為顯著的。以社會科學統計套裝軟體 (Statistical Package for Social Sciences) (SPSS, Version 14.0, Chicago, IL, USA) 來分析所有資料。

## 10. 材料

雷公藤甲素與 MTT 為獲自 Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)。DMEM、Ham's F-12 Medium、FBS、青黴素、兩性黴素 (amphotericin) B 與鏈黴素為獲自 Invitrogen。用於 SDS-PAGE 的所有材料為獲自 Bio-Rad。抗 Gemin2, Gemin3 與 SUV39H1 之兔子抗體與所有二級抗體為獲自 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)。抗 EZH2 之兔子抗體為獲自 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)。抗 SMN 小鼠之抗體為獲自 BD Bioscience (San Jose, CA, USA)。抗  $\beta$ -肌動蛋白之小鼠抗體為獲自 Sigma-Aldrich。所有其他化學物為購自 Sigma Chemical Co.。

## B. 結果

### 1. 在類運動神經元(motor neuron-like)細胞株 NSC34 中於 pM 濃度之雷公藤甲素增加 SMN、Gemin2 與 Gemin3 的蛋白質程度

首先藉由使用 NSC34 細胞來實驗雷公藤甲素(0.01-1 pM)對於 SMN 蛋白質之調控的影響。將細胞以載劑(0.001% DMSO 於二次水中)與雷公藤甲素(0.01、0.1 與 1 pM)分別處理 24 小時。之後將蛋白質萃取物進行 SDS-PAGE，並藉由西方墨點法來分析將 SMN、Gemin2、Gemin3 與  $\beta$ -肌動蛋白的表現。將在以  $\beta$ -肌動蛋白標準化之 SMN、Gemin2、與 Gemin3 程度中的改變進行定量，且表示成載劑組的百分比。對於 SMN 以及 Gemin2、Gemin3 的結果分別顯示於第 1A 圖與第 1B 圖中。柱狀物表示從三個獨立實驗之平均值 $\pm$ 標準差。相對於載劑組 \* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$  與 \*\*\* $P < 0.001$ (採用 ANOVA 後再用 Dunnett's 檢定)。

結果指出，與載劑(0.001% DMSO 於二次水中)處理細胞相較，雷公藤甲素顯著地向上調控 SMN 蛋白質程度(第 1A 圖)。之後研究雷公藤甲素對於 SMN 複合物(SMN complex)之組成，Gemin2 與 Gemin3 之表現的影響。如於第 1B 圖中所示，雷公藤甲素顯著地增加 Gemin2 與 Gemin3 的表現。

### 2. 在人類 SMA 纖維母細胞中於 pM 濃度之雷公藤甲素增加 SMN 蛋白質程度

藉由將來自三種不同類型之 SMA 病患的纖維母細胞

以雷公藤甲素處理，來進一步探討在人類 SMA 纖維母細胞中雷公藤甲素對於 SMN 蛋白質表現之調控的影響。分別將纖維母細胞以雷公藤甲素（0.01、0.1 與 1 pM）處理 24 小時。將蛋白質進行萃取並進行 SDS-PAGE。之後，藉由西方墨點法來測量 SMN 與  $\beta$ -肌動蛋白的蛋白質表現。將在以  $\beta$ -肌動蛋白標準化之 SMN 蛋白質程度中的改變進行定量，且表示成載劑組的百分比。對於來自第一類型、第二類型與第三類型之 SMA 病患的纖維母細胞的西方墨點分析結果，分別顯示於第 2A 圖、第 2B 圖與第 2C 圖中。對於來自第一類型、第二類型與第三類型之 SMA 病患的纖維母細胞的 SMN 蛋白質程度的定量結果顯示於第 2D 圖中。柱狀物表示從三個獨立實驗之平均值 $\pm$ 標準差。相對於載劑組 \* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$  與 \*\*\* $P < 0.001$ （採用 ANOVA 後再用 Dunnett's 檢定）。

結果指出，於所有三種類型之 SMA 纖維母細胞中，與載劑（0.001% DMSO 於二次水中）處理細胞相較，雷公藤甲素皆顯著地向上調控 SMN 蛋白質程度（第 2A-D 圖）。

### 3. 於 SMA 纖維母細胞中雷公藤甲素增加 Gemin2 與 Gemin3 的表現以及含 SMN 之 nuclear gems 的數目

接著，研究在三種不同類型之 SMA 纖維母細胞中雷公藤甲素對於 SMN 複合物組成的表現的影響。

分別將纖維母細胞以雷公藤甲素（0.01、0.1 與 1 pM）處理 24 小時。藉由西方墨點法來分析 Gemin2、Gemin3 與  $\beta$ -肌動蛋白的蛋白質表現。將在以  $\beta$ -肌動蛋白標準化之

Gemin2 與 Gemin3 蛋白質程度中的改變進行定量。對於來自第一類型、第二類型與第三類型之 SMA 病患的纖維母細胞的結果，分別顯示於第 3A 圖、第 3B 圖與第 3C 圖中。柱狀物表示從三個獨立實驗之平均值 $\pm$ 標準差。相對於載劑組  $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$  與  $***P < 0.001$ （採用 ANOVA 後再用 Dunnett's 檢定）。如於第 3A-C 圖中所示，於所有三種類型之 SMA 纖維母細胞中，雷公藤甲素顯著地增加 Gemin2 與 Gemin3 的表現。

另外，核點(nuclear gem)的數目與 SMN 蛋白質程度相關，且其在具有 SMA 之病患中顯著地被減少。為更進一步確定增加之 SMN 量的確為功能性蛋白，使用共軛焦顯微鏡來分析，於經雷公藤甲素處理之細胞中之 SMN 的細胞內位置。將人類 SMA 第三型纖維母細胞以雷公藤甲素(1 pM)處理 24 小時。以抗-SMN-與抗-Gemin2-專一抗體，藉由共軛焦顯微鏡來觀察含 SMN 之 nuclear gems 的總數/100 個細胞。使用 Alexa Fluor 555 山羊抗-小鼠 IgG (紅色)與 Alexa Fluor 488 山羊抗-兔子 IgG (綠色)為二級抗體。DAPI (藍色)被用於核染色(nuclei staining)。第 4A 圖顯示染色結果，第 4B 圖顯示含 SMN 與 Gemin2 結合在細胞核內之核點的總數。柱狀圖表示從三個獨立實驗之平均值 $\pm$ 標準差。相對於載劑組， $*P < 0.05$ （採用 ANOVA 後再用 Dunnett's 檢定）。如於第 4A-B 圖中所示，與經載劑處理之 SMA 纖維母細胞相較，以雷公藤甲素(1 pM)處理，顯著地增加核點的數目。

#### 4. 雷公藤甲素於人類 SMA 纖維母細胞中增加全長 SMN2(FL-SMN2)轉錄體

為了測定是否雷公藤甲素誘導之 SMN 蛋白質的增加導致了含外顯子 7 之 SMN 蛋白質之量的增加，使用區別兩變體 (FL-SMN2 與 SMN2 $\Delta$ 7) 之引子組的 qPCR 來實驗雷公藤甲素來實驗雷公藤甲素對於 SMN2 轉錄的影響。

將細胞以雷公藤甲素(0.01, 0.1 與 1 pM)處理 24 小時。將以 GAPDH 標準化之 FL-SMN2/SMN2 $\Delta$ 7 比進行定量。所有資料顯示成從三個獨立實驗之相對於 GAPDH 於任意單位(arbitrary unit)形式的平均值 $\pm$ 標準差。對於來自第三類型之 SMA 病患的纖維母細胞的結果，顯示於第 5A 圖與第 5B 圖中，而對於來自第一類型之 SMA 病患的纖維母細胞的結果，顯示於第 5C 圖與第 5D 圖中。相對於載劑組 \* $P < 0.05$  與 \*\* $P < 0.01$  (採用 ANOVA 後再用 Dunnett's 檢定)。

FL-SMN2 轉錄體相較於 SMN2 $\Delta$ 7 轉錄體增加至一較大的程度。FL-SMN2 比 SMN2 $\Delta$ 7 的比值顯著地增加至 1.6 倍於以雷公藤甲素處理 SMA 第三型纖維母細胞之後 (第 5A 圖與第 5B 圖)，而不是以雷公藤甲素處理 SMA 第一型纖維母細胞之後 (第 5C 圖與第 5D 圖)。這些結果指出雷公藤甲素增加 SMN 蛋白質程度，部分是因為 SMN2 轉錄體的活化。它們也指出至少在 SMA 第三型纖維母細胞中，雷公藤甲素可促進外顯子 7 的插入(inclusion)。

#### 5. 在 SMN2 活化濃度並未偵測到細胞毒性影響

使用 MTT 分析與 Annexin V/PI staining 染色來實驗雷

公藤甲素在活化 SMN2 之濃度的細胞毒性。

分別將 SMA 纖維母細胞以載劑與雷公藤甲素 (0.01、0.1、1、10 與 100 pM) 處理 24 小時。藉由 MTT 分析測定細胞存活率，結果顯示於第 6A 圖中。將細胞存活率中之改變顯示成載劑組之百分比。藉由使用 Annexin V/PI 染色之流式細胞儀來分析細胞凋亡。將各組別之細胞凋亡顯示為一細胞凋亡指數 (apoptosis index)，其係藉由計算凋亡細胞 (Annexin V-陽性細胞) 之百分比來評估，結果顯示於第 6B 圖中。將環己醯亞胺 (cycloheximide, CHX)  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  使用為誘發細胞凋亡之正控制組。柱狀物表示從三個獨立實驗之平均值  $\pm$  標準差。相對於載劑組  $***P < 0.001$  (採用 ANOVA 後再用 Dunnett's 檢定)。

如於第 6A 與 6B 圖中所示，不論載劑或雷公藤甲素兩者都不具細胞毒性且都不增加細胞死亡。

## 6. 雷公藤甲素在類 SMA 小鼠之神經元與肌肉組織中增加 SMN 蛋白質程度

由於上述 *in vitro* 資料顯示雷公藤甲素可顯著地增加 SMA 蛋白質於人類 SMA 纖維母細胞中，因此更進一步實驗雷公藤甲素對於類第三型 SMA 小鼠中的影響。

分別將小鼠 ( $\text{Smn}^{-/-}\text{SMN2}$ ) 每日注射載劑或雷公藤甲素 ( $0.01$  或  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ ，腹腔注射) 達一週。從野生型 (WT,  $\text{Smn}^{+/+}\text{SMN2}^{-/-}$ ) ( $n = 5$ ) 與經載劑或雷公藤甲素處理之類第三型 SMA 組別中 (每組  $n = 5$ ) 分離出大腦、脊髓與腓腸肌。分別萃取來自多種組織之總蛋白質，並藉由西

方墨點法來測定 SMN 蛋白質含量，結果顯示第 7A 圖中。又，將大腦、脊髓與腓腸肌中之 SMN 蛋白質進行定量，結果顯示於第 7B 圖中。將  $\beta$ -肌動蛋白（對於大腦與脊髓）或 GAPDH（對於腓腸肌）使用為載入控制組。相對於載劑組  $*P < 0.05$  與  $**P < 0.01$ 。相對於野生型組， $###P < 0.001$ （採用 ANOVA 後再用 Dunnett's 檢定）。

在此 *in vivo* 實驗期間，在所有組別中，小鼠之體重與死亡率沒有顯著改變（資料未顯示）。如於第 7A 與 7B 圖中所示，來自經雷公藤甲素處理 SMA 小鼠組別的所有組織接顯示，SMN 蛋白質程度之顯著提升，特別是在較高劑量 ( $0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ) 使用時。最重要地，這些 *in vivo* 資料指出，雷公藤甲素增加 SMN 蛋白質於涉及 SMA 病狀的兩個主要組織，脊髓與肌肉中。

## 7. 雷公藤甲素處理改善類 SMA 小鼠的存活率與類降低了 SMA 小鼠的體重減輕

先前文獻已顯示出生後 5 天(P5)之 SMA 小鼠顯示此疾病之清楚表現形式(Le et al., 2005; Avila et al., 2007)，且 P5 至 P13 為 SMA 小鼠最佳的藥物治療時期(minimal window) (Narver et al., 2008)。於此實驗中，從出生後 5 天至出生後 18 天，每日以雷公藤甲素( $0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )或載劑腹腔注射類 SMA 小鼠 ( $\text{Smn}^{-/-}\text{SMN2}$ ) 與野生型小鼠 (WT,  $\text{Smn}^{+/+}\text{SMN2}^{-/-}$ )，並監測其存活率與體重。以 Kaplan-Meier 存活曲線顯示以雷公藤甲素處理 ( $n = 15$ ) 或載劑 ( $n = 13$ ) 處理之小鼠的存活，結果顯示於第 8A 圖中。 $P < 0.001$ （對數

等級檢定)。第 8B 圖顯示以雷公藤甲素處理( $n = 15$ )或載劑( $n = 13$ )處理之 SMA 小鼠以及以雷公藤甲素處理( $n = 20$ )或載劑( $n = 20$ )處理之野生型小鼠的體重。相對於以載劑處理組之 SMA 小鼠， $*P < 0.05$  與  $**P < 0.01$  (採用 ANOVA 後再用 Tukey's 檢定)。

如於第 8A 圖中所示，雷公藤甲素處理的小鼠存活率比載劑處理的小鼠存活率增加了 3.63 天 (經雷公藤甲素處理，存活率為  $11.86 \pm 1.25$  天；經載劑處理，存活率為  $8.23 \pm 1.45$  天)，其顯示牠們壽命 44.16% 的增加。SMA 之第一臨床症狀之一為體重降低。SMA 小鼠於年齡 5 天 (P5) 時明顯體重不足 (Le et al., 2005)。以 5 天年齡與野生型小鼠相較，載劑處理 SMA 小鼠顯示顯著之體重差異 ( $1.90 \pm 0.37$  g 相對於  $2.65 \pm 0.70$  g，第 8B 圖)。然而，與載劑處理 SMA 小鼠相較，雷公藤甲素處理 SMA 小鼠顯示在體重方面輕微的增加。在年齡 10 至 12 天生長曲線顯示明顯地不同。

上述各實驗清楚顯示，雷公藤甲素可 *in vitro* 及 *in vivo* 增加 SMN 蛋白質之表現。又雷公藤甲素可增加為 SMN 複合物之組成的 Gemin2 與 Gemin3 的表現，且增加之 SMN 蛋白質與 Gemin2 形成 SMN 複合物，並可在細胞核中形成核點 (nuclear gem)。再者，雷公藤甲素在可使 SMN2 活化之濃度並無細胞毒性。因此由上述各實驗結果可清楚得知，雷公藤甲素可用於治療運動神經元存活蛋白質表現相關之疾病，特別是 SMA。



雖然本發明已以較佳實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作些許之更動與潤飾，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

**【圖式簡單說明】**

第 1A 與 1B 圖分別顯示雷公藤甲素在 NSC34 細胞中對於 SMN 蛋白質程度與 SMN 複合物組成的影響。

第 2A 至 2D 圖顯示在來自不同類型之 SMA 病患之人類 SMA 纖維母細胞中，由於雷公藤甲素的 SMN 蛋白質程度向上調控。

第 3A 至 3C 圖顯示雷公藤甲素在來自不同類型之 SMA 病患之人類 SMA 纖維母細胞中對於 SMN 複合物組成 Gemin2 與 Gemin3 蛋白質表現的影響。

第 4A 與 4B 圖分別顯示雷公藤甲素在人類 SMA 第三型纖維母細胞細胞株中對於核中之含 SMN 和 Gemin2 的核點與核點之數目的影響。

第 5A 與 5B 圖顯示在 SMA 第三型纖維母細胞中藉由定量即時 PCR 所測定之 FL-SMN2 與 SMN2 $\Delta$ 7 轉錄體。

第 5C 與 5D 圖顯示在 SMA 第一型纖維母細胞中藉由定量即時 PCR 所測定之 FL-SMN2 與 SMN2 $\Delta$ 7 轉錄體。

第 6A 圖顯示雷公藤甲素對於人類 SMA 第三型纖維母細胞不具細胞毒性影響。

第 6B 圖顯示藉由使用 Annexin V/PI 染色之流式細胞儀測定經雷公藤甲素處理之人類 SMA 第三型纖維母細胞的凋亡的結果。

第 7A 與 7B 圖顯示在經雷公藤甲素處理之類 SMA 小鼠之腦部、脊髓與肌肉中的 SMN 蛋白質向上調控。

第 8A 與 8B 圖分別顯示雷公藤甲素增加類 SMA 小鼠之存活率與減少 SMA 小鼠的體重降低。

**【主要元件符號說明】**

無。

## 序列表

<110> 雷公藤甲素用於製備治療與運動神經元存活蛋白質表現相關之疾病的藥物的用途

<120> 高雄醫學大學

<130> 0911-A52772TW

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 1

gaaggtgctc acattcctta aat

23

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 2

atcaagaaga gttaccatt cca

23

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 3  
ccaccacccc acttactatc a 21

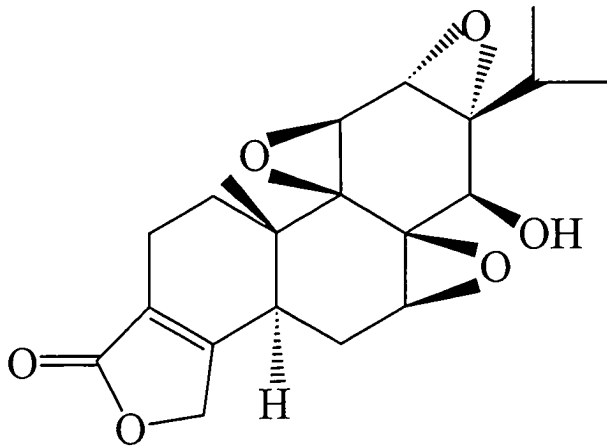
<210> 4  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 引子

<400> 4  
gctctatgcc agcatttcca ta 22

## 七、申請專利範圍：

1. 一種雷公藤甲素在製備用於治療與運動神經元存活蛋白質表現相關之疾病的藥物的用途，該雷公藤甲素之分子式如式(I)所示：



式(I)。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述之雷公藤甲素在製備用於治療與運動神經元存活蛋白質表現相關之疾病的藥物的用途，其中該與運動神經元存活蛋白質表現相關之疾病包括脊髓性肌肉萎縮症、肌萎縮性側索硬化症或運動神經元損傷。

3. 如申請專利範圍第 1 項所述之雷公藤甲素在製備用於治療與運動神經元存活蛋白質表現相關之疾病的藥物的用途，其中該與運動神經元存活蛋白質表現相關之疾病為脊髓性肌肉萎縮症。

4. 如申請專利範圍第 3 項所述之雷公藤甲素在製備用於治療與運動神經元存活蛋白質表現相關之疾病的藥物的用途，其中該脊髓性肌肉萎縮症包括第一型、第二型及/或第三型脊髓性肌肉萎縮症。

5.如申請專利範圍第 1 項所述之雷公藤甲素在製備用於治療與運動神經元存活蛋白質表現相關之疾病的藥物的用途，其中該式(I)所示的化合物具有增加運動神經元存活蛋白質表現的能力。

6.如申請專利範圍第 1 項所述之雷公藤甲素在製備用於治療與運動神經元存活蛋白質表現相關之疾病的藥物的用途，其中該式(I)所示之化合物具有增加全長運動神經元存活基因 2 與外顯子 7 缺乏運動神經元存活基因 2 的轉錄的能力。

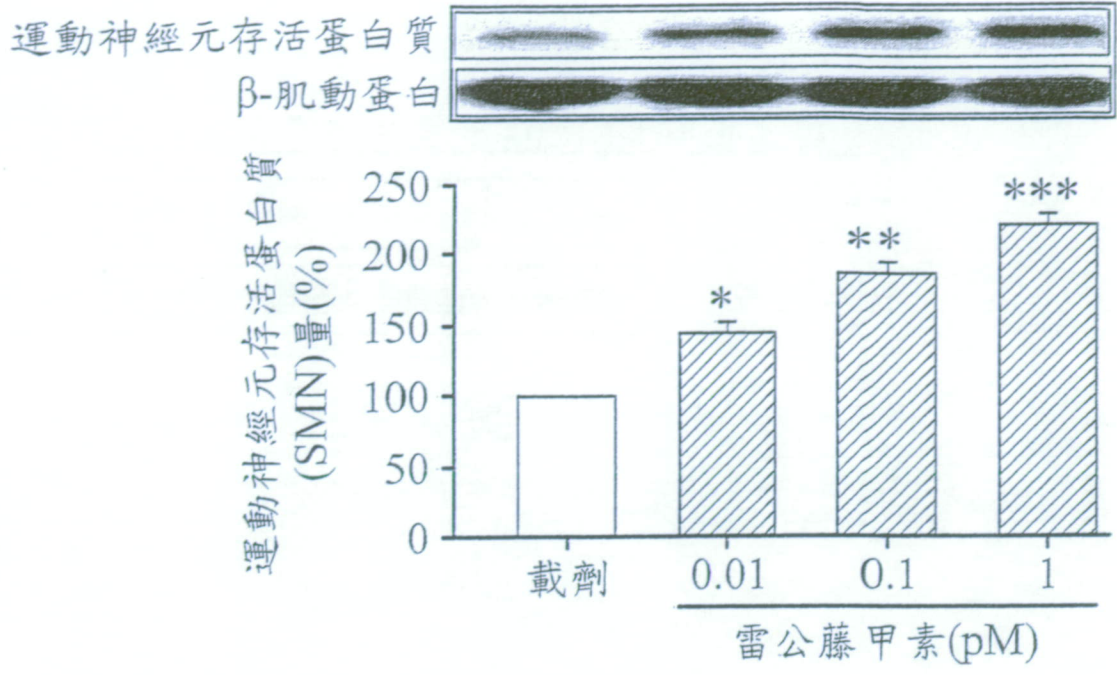
7.如申請專利範圍第 1 項所述之雷公藤甲素在製備用於治療與運動神經元存活蛋白質表現相關之疾病的藥物的用途，其中該式(I)所示之化合物具有增加 Gemin2 蛋白質及/或 Gemin3 蛋白質表現的能力。

8.如申請專利範圍第 7 項所述之雷公藤甲素在製備用於治療與運動神經元存活蛋白質表現相關之疾病的藥物的用途，其中於細胞核內該增加之 Gemin2 蛋白質與運動神經元存活蛋白質形成一運動神經元存活蛋白質複合物。

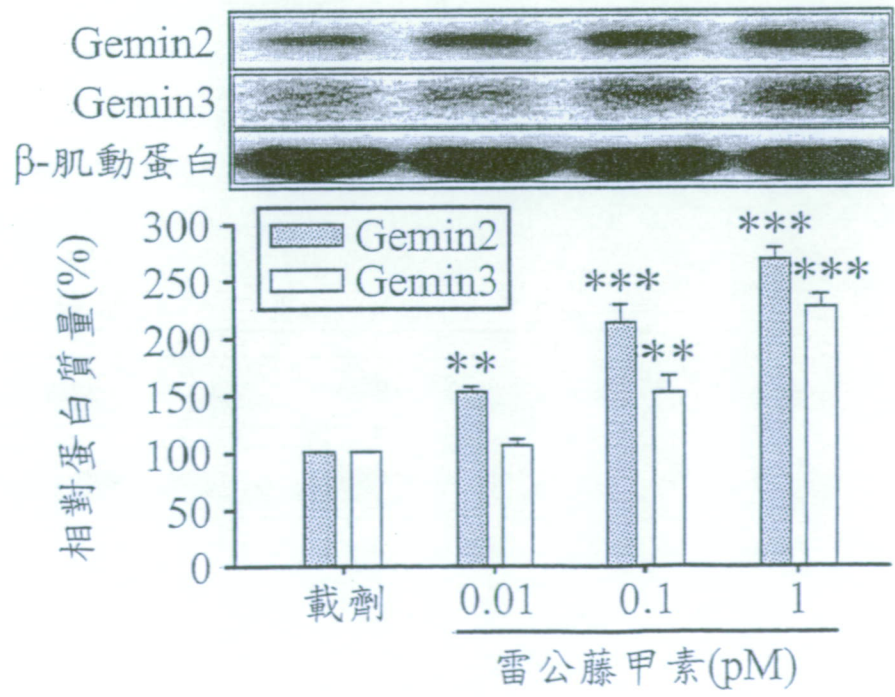
9.如申請專利範圍第 1 項所述之雷公藤甲素在製備用於治療與運動神經元存活蛋白質表現相關之疾病的藥物的用途，其中該雷公藤甲素具有促進核點形成於一細胞核中的能力。

八、圖式：(如後所示)

公告本



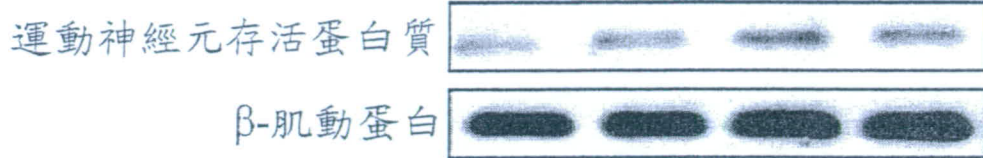
第 1A 圖



第 1B 圖

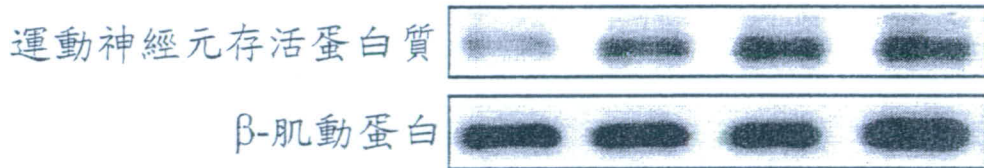


脊髓性肌肉萎縮症第一型纖維母細胞



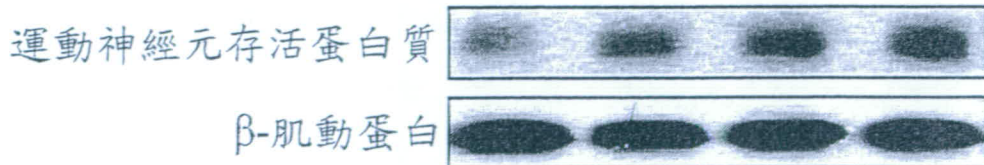
第 2A 圖

脊髓性肌肉萎縮症第二型纖維母細胞

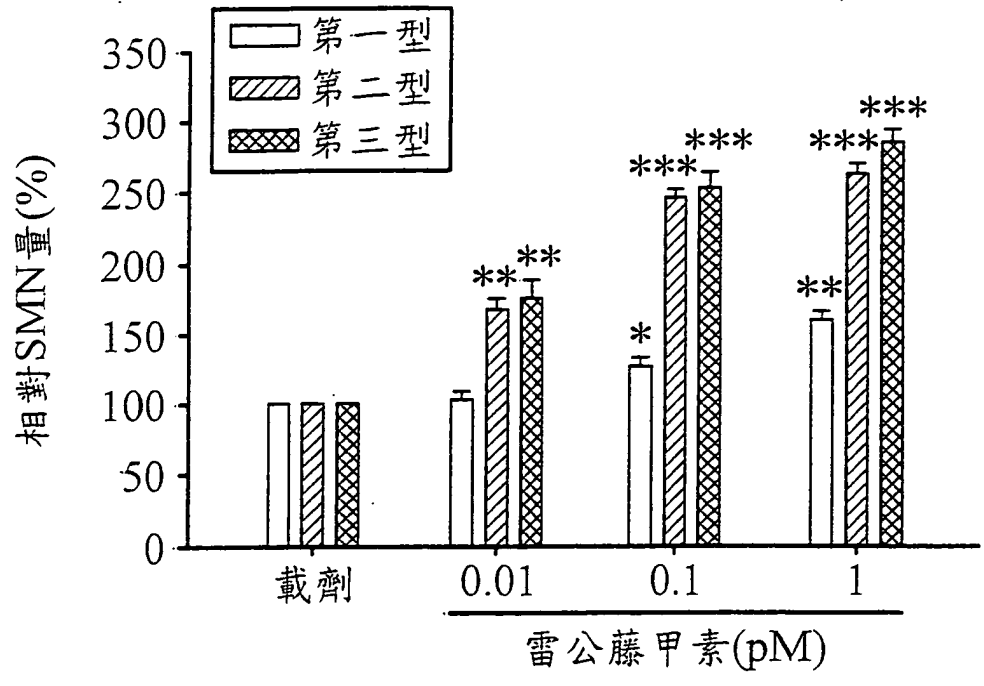


第 2B 圖

脊髓性肌肉萎縮症第三型纖維母細胞

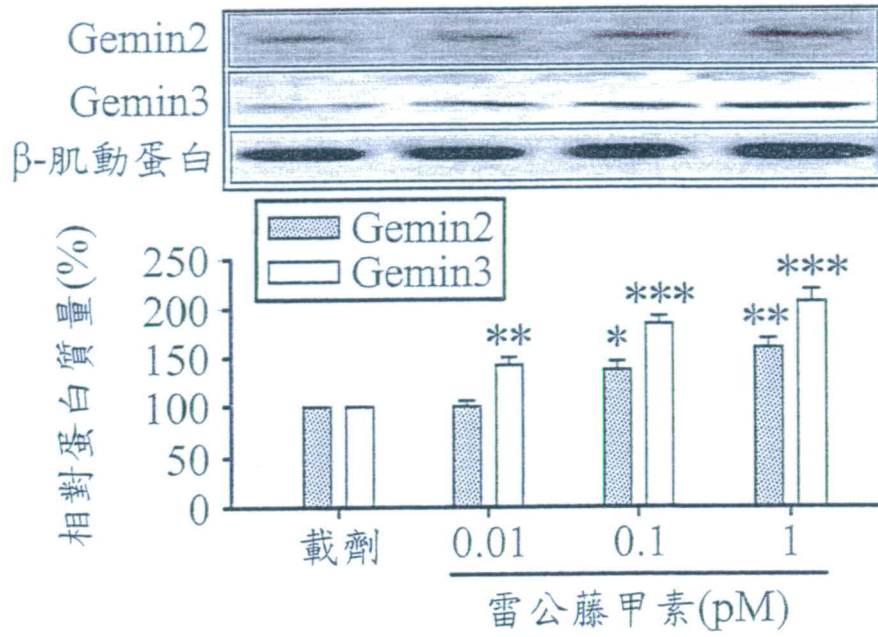


第 2C 圖



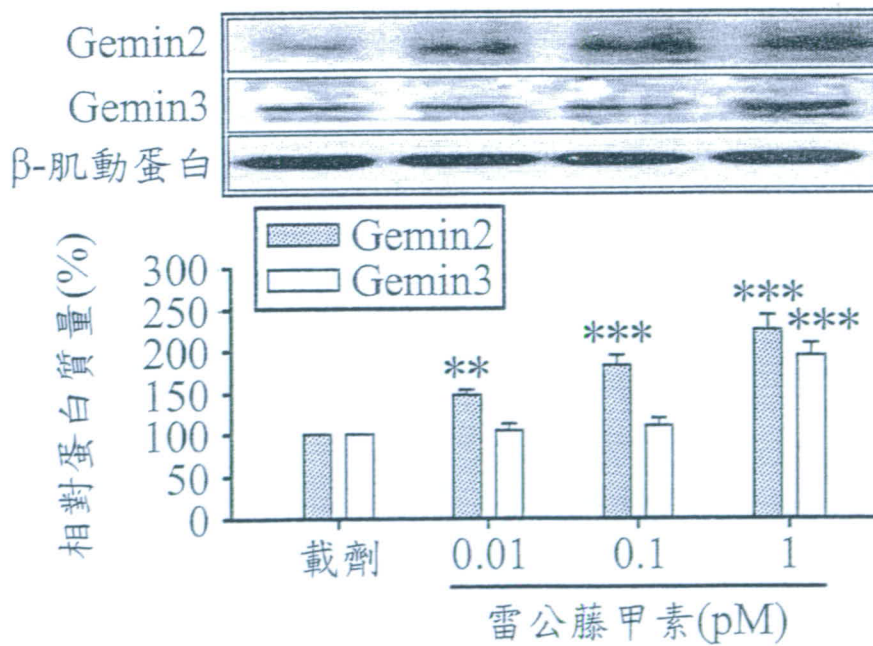
第 2D 圖

脊髓性肌肉萎縮症第一型纖維母細胞



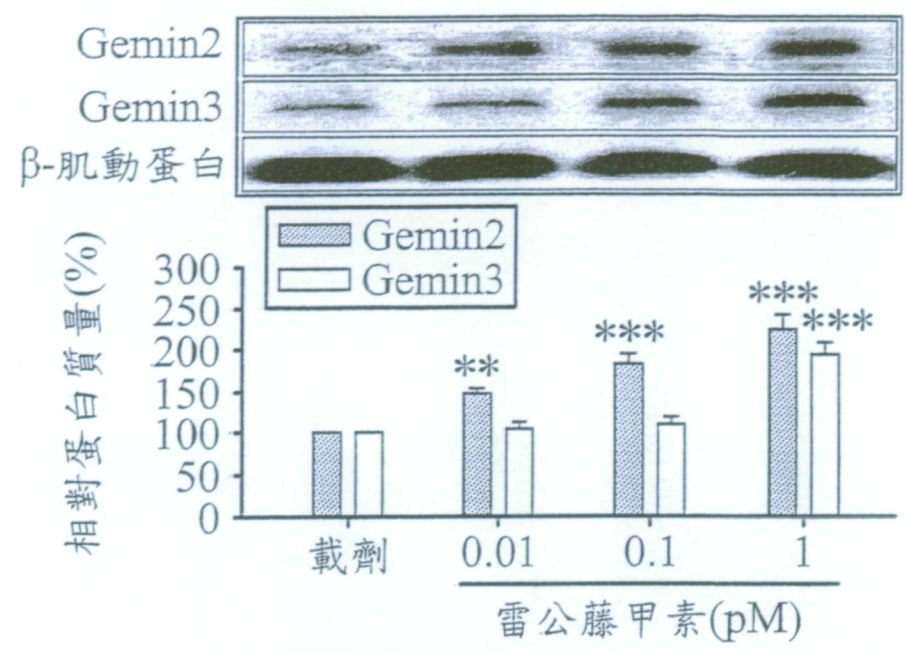
第3A圖

脊髓性肌肉萎縮症第二型纖維母細胞



第3B圖

脊髓性肌肉萎縮症第三型纖維母細胞

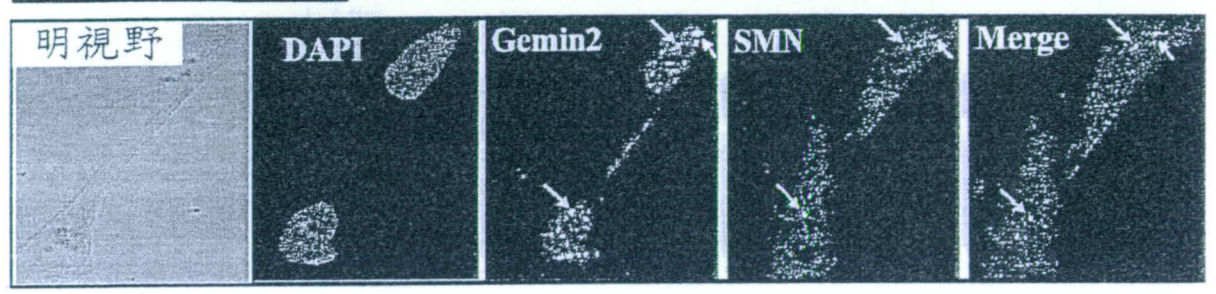


第 3C 圖

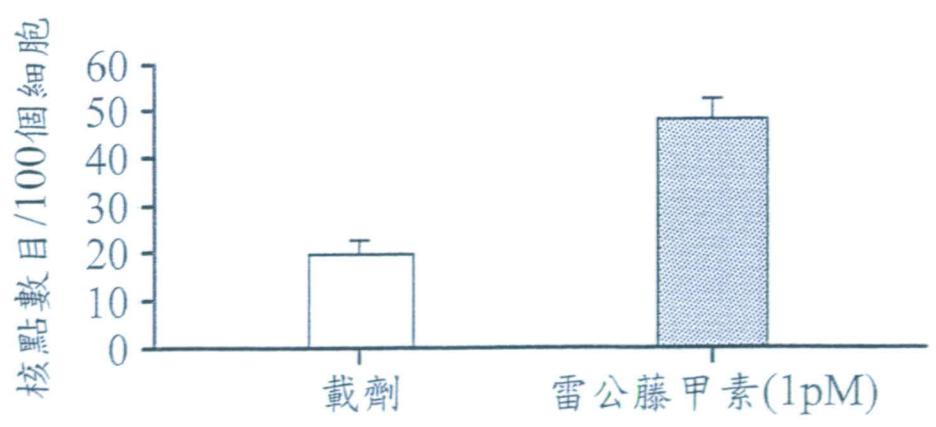
載劑



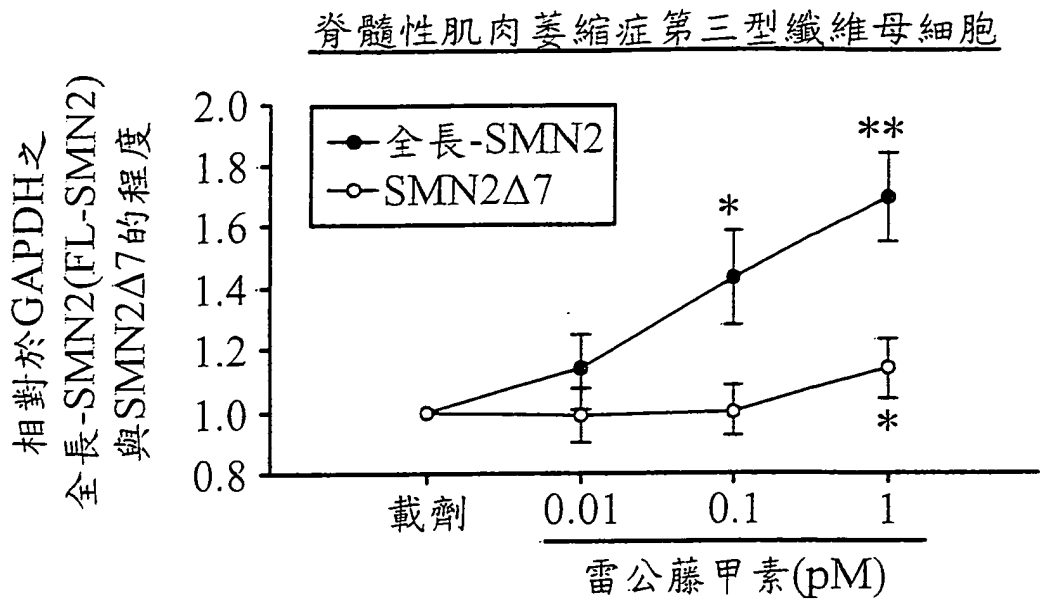
雷公藤甲素(1pM)



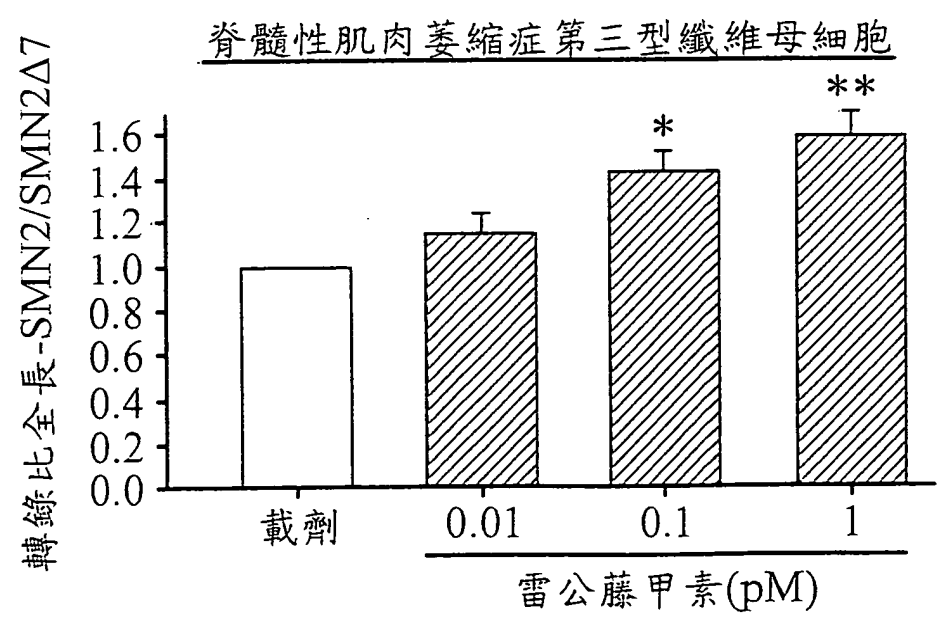
第4A圖



第4B圖

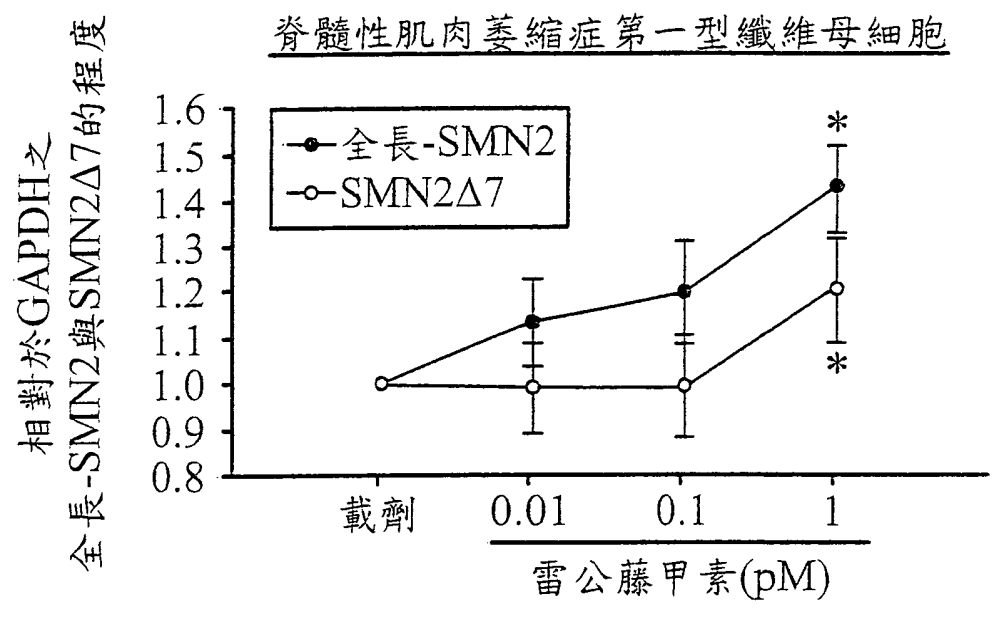


第5A圖

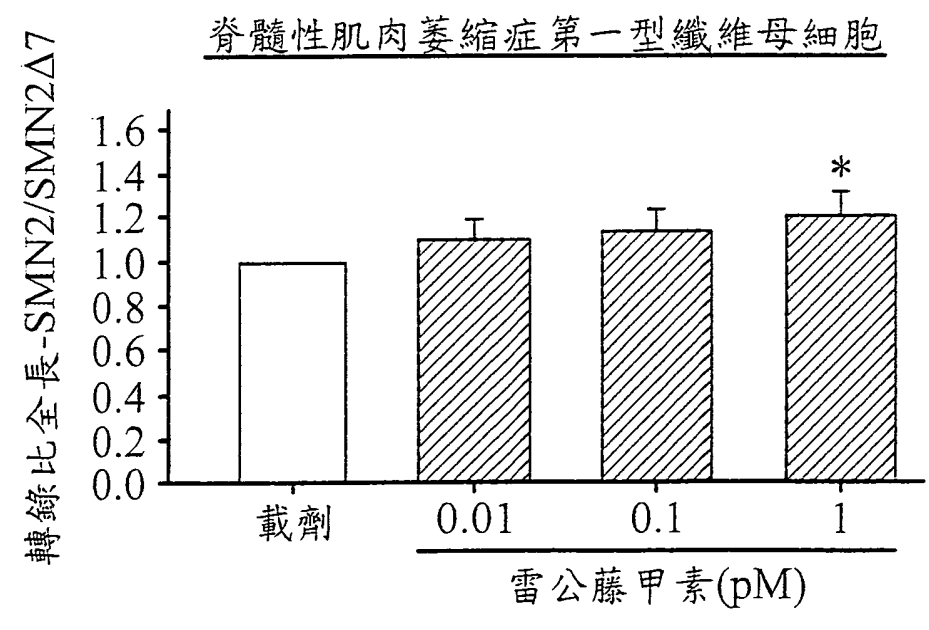


第5B圖

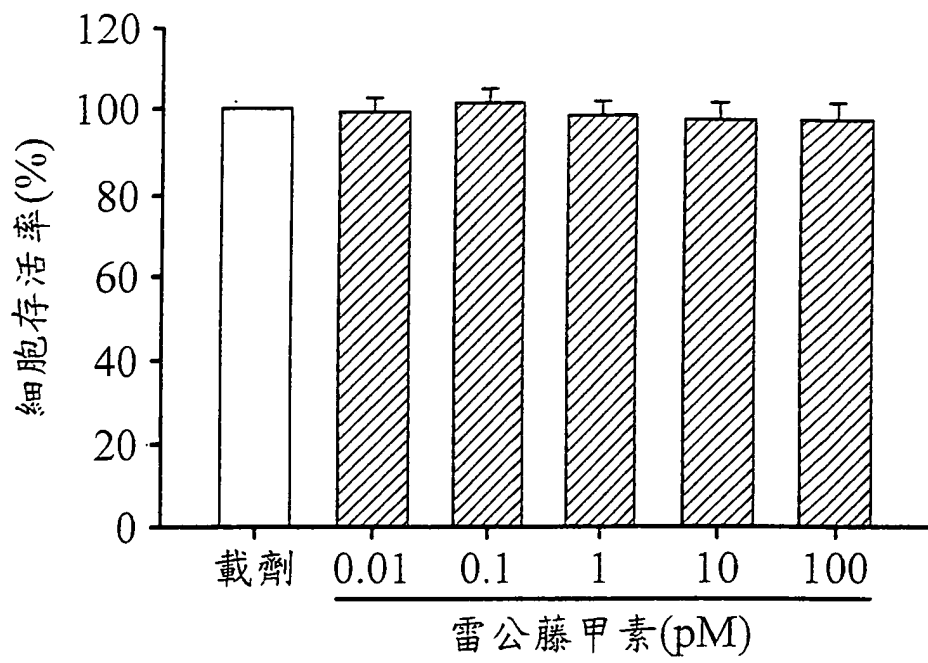




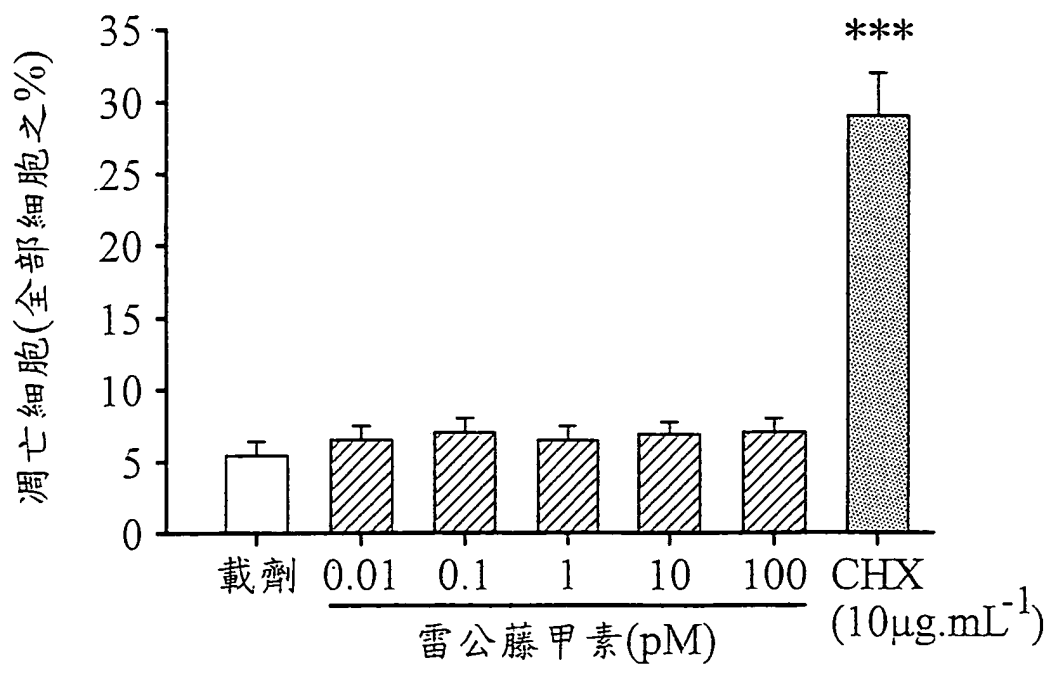
第 5C 圖



第 5D 圖

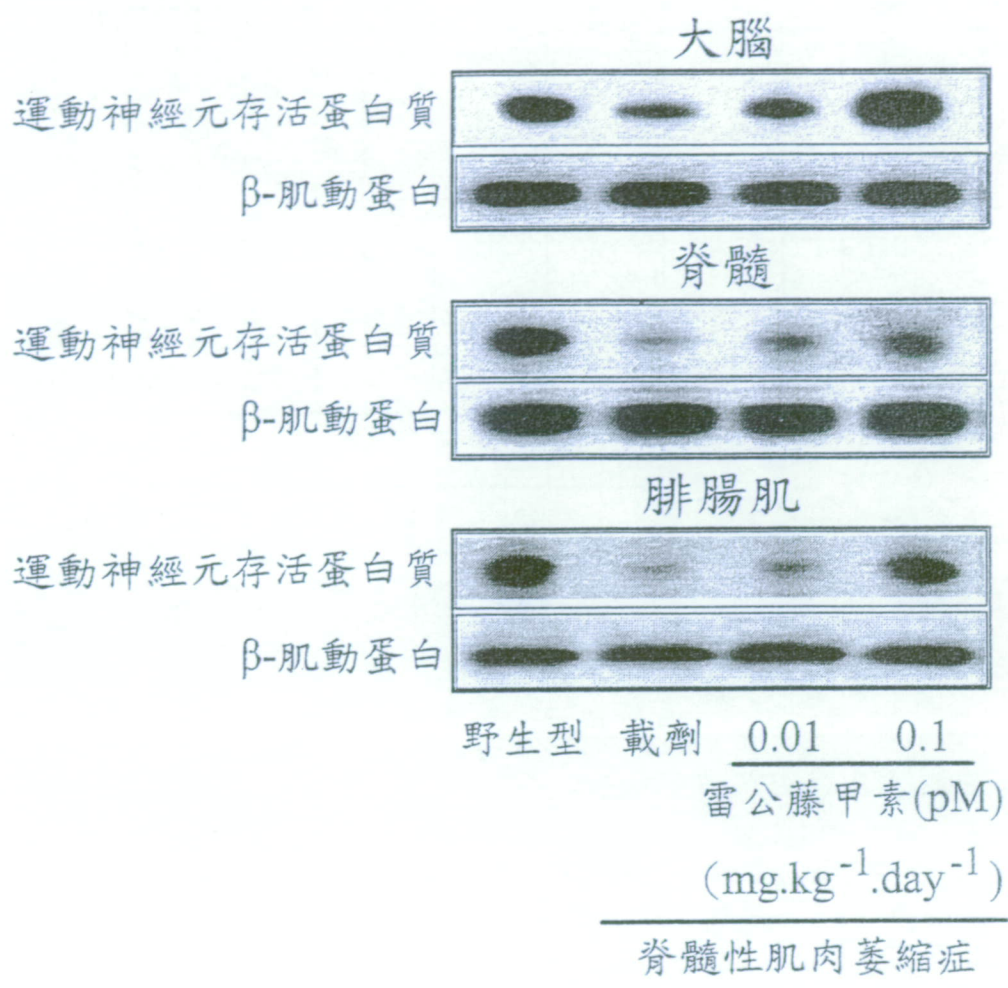


第 6A 圖

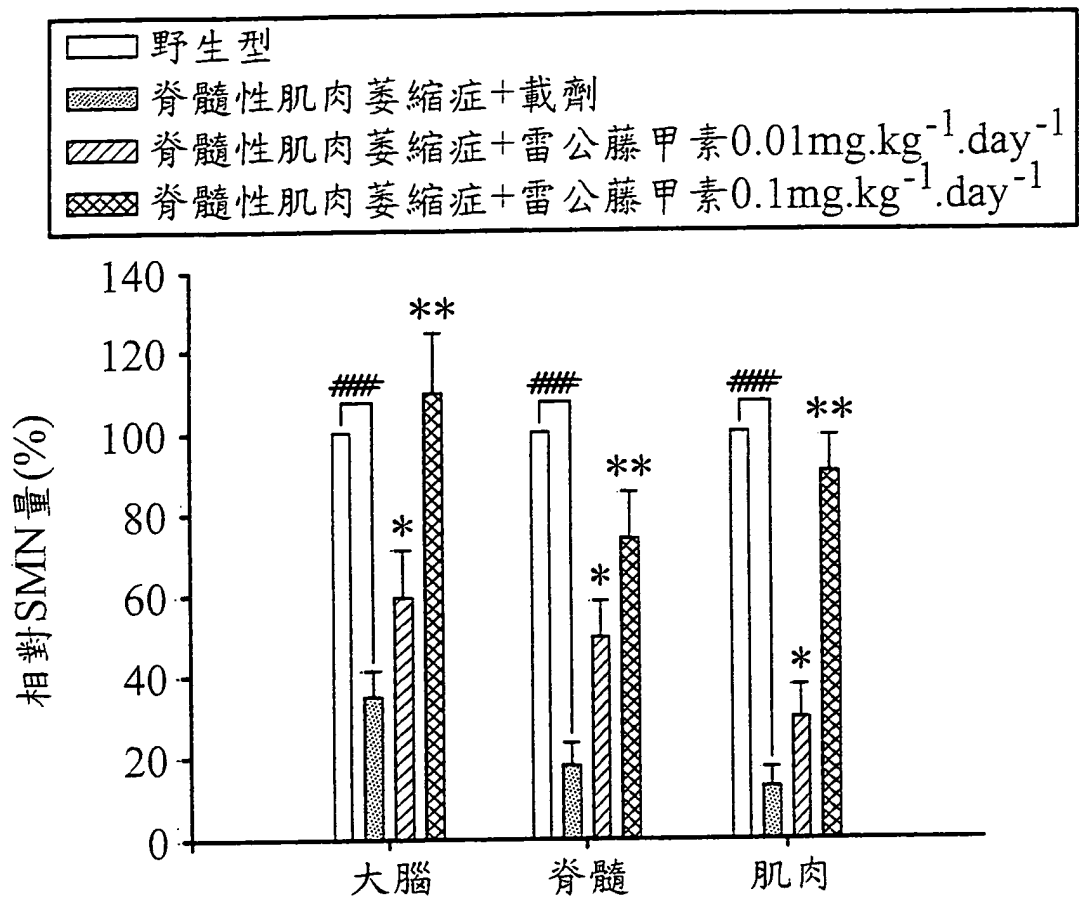


第 6B 圖

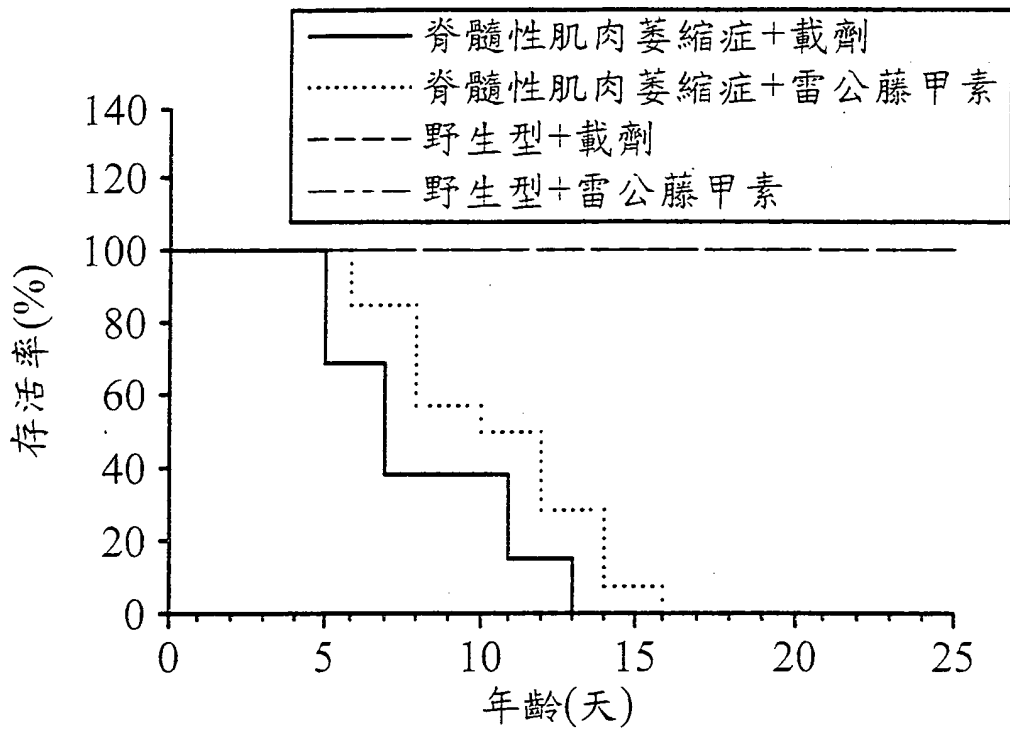




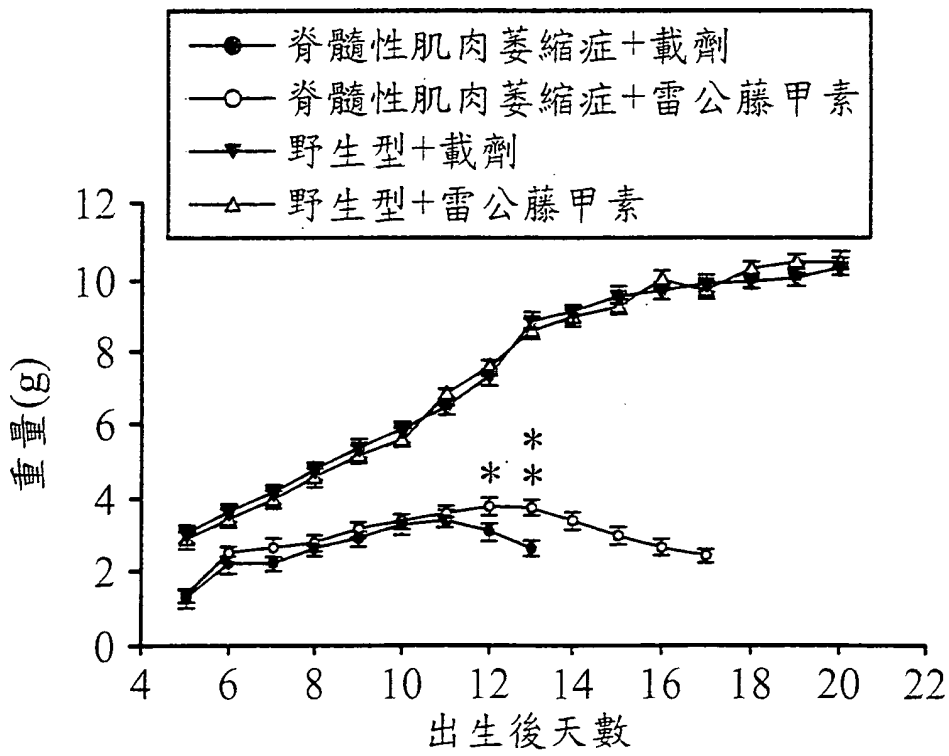
第7A圖



第 7B 圖



第8A圖



第8B圖