



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104270945 B

(45)授权公告日 2017.03.29

(21)申请号 201380023606.0

(22)申请日 2013.03.15

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104270945 A

(43)申请公布日 2015.01.07

(30)优先权数据

61/612,848 2012.03.19 US

61/728,688 2012.11.20 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.11.04

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/032481 2013.03.15

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/142370 EN 2013.09.26

(73)专利权人 巴克老龄化研究所

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 瓦尔盖斯·约翰

戴尔·E·布雷德森

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.

A61K 31/352(2006.01)

A61P 25/28(2006.01)

(56)对比文件

US 20070191330 A1,2007.08.16,说明书.

CN 1649611 A,2005.08.03,权利要求书.

(续)

审查员 王伟民

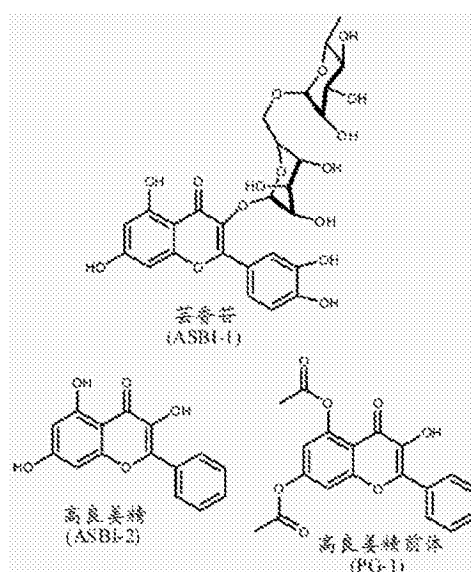
(54)发明名称

APP特异性BACE抑制剂(ASBI)及其用途

(57)摘要

在某些实施方案中提供APP-特异性BACE抑制剂(ASBI)及其用途。在某些实施方案中提供预防或延迟早发性阿尔茨海默氏病患和/或认知功能障碍的发作,和/或改善早发性阿尔茨海默氏病患和/或认知功能障碍的一种或多种症状,或预防或延迟早发性阿尔茨海默氏病患或认知功能障碍至阿尔茨海默氏病的进展的方法,其中所述方法包括向有需要的受试者施用足以预防或延迟早发性阿尔茨海默氏认知功能障碍的发作,和/或改善早发性阿尔茨海默氏认知功能障碍的一种或多种症状,和/或预防或延迟早发性阿尔茨海默氏认知功能障碍至阿尔茨海默氏病的进展的量的APP特异性BACE抑制剂(ASBI)。在某些实施方案中所述ASBI为类黄酮(如高良姜精)或

类黄酮前药(如,高良姜精前药)。



[转续页]

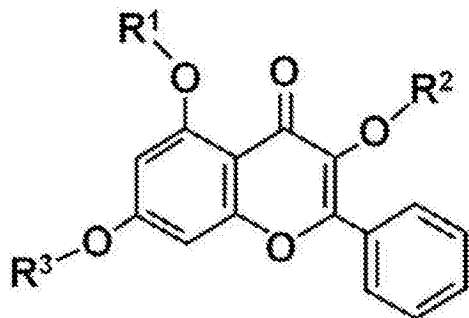
[接上页]

(56)对比文件

Karim Jiménez-Aliaga et al. Quercetin and rutin exhibit antiamyloidogenic and fibril-disaggregating effects in vitro and potent antioxidant activity in APPsw cells.《Life Sciences》.2011,(第89期),摘要.

Benjamin J. Compton et al. Use of acyl substituents to favour 2,3-epoxidation of 5,7-dioxygenated flavones with dimethyldioxirane.《Tetrahedron》.2010,(第67期),第718页 scheme 1.

1. 一种APP特异性BACE抑制剂 (ASBI), 其中所述APP特异性BACE抑制剂为高良姜精前药, 当施用于哺乳动物时, 所述高良姜精前药被加工成高良姜精, 其中所述高良姜精前药由下式表征:

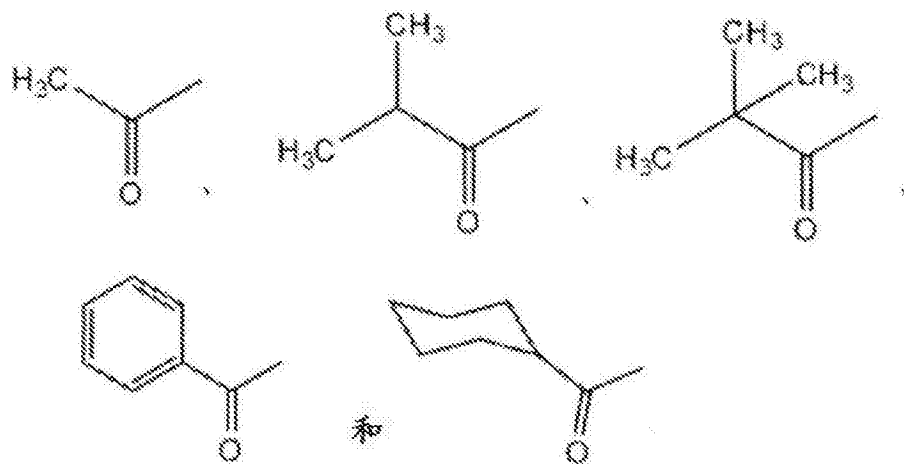


其中:

R^1 为H或在哺乳动物体内去除的保护基团, 其中 R^1 、 R^2 和 R^3 中的至少一者不为H;

R^2 和 R^3 独立地为在哺乳动物体内去除的保护基团;

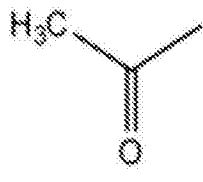
其中所述在哺乳动物体内去除的保护基团独立地选自



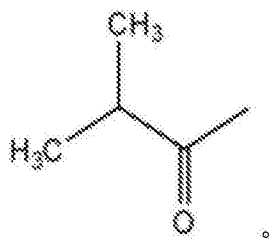
并且其中当施用于哺乳动物时所述前药部分或全部地抑制APP的BACE加工。

2. 根据权利要求1所述的APP特异性BACE抑制剂 (ASBI), 其中 R^1 为H。

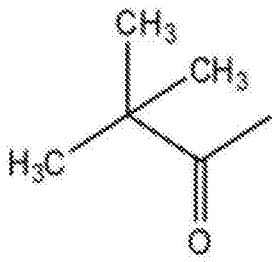
3. 根据权利要求1所述的APP特异性BACE抑制剂 (ASBI), 其中 R^2 和/或 R^3 为



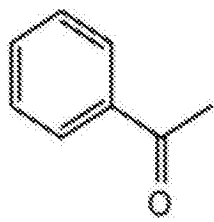
4. 根据权利要求1所述的APP特异性BACE抑制剂 (ASBI), 其中 R^2 和/或 R^3 为



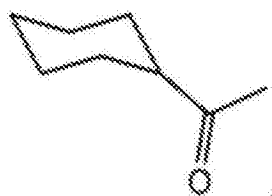
5. 根据权利要求1所述的APP特异性BACE抑制剂(ASBI), 其中 R^2 和/或 R^3 为



6. 根据权利要求1所述的APP特异性BACE抑制剂(ASBI), 其中 R^2 和/或 R^3 为



7. 根据权利要求1所述的APP特异性BACE抑制剂(ASBI), 其中 R^2 和/或 R^3 为



8. 根据权利要求1-7中任一项所述的APP特异性BACE抑制剂(ASBI)在制备用于预防或延迟早发性阿尔茨海默氏认知功能障碍的发作,和/或改善早发性阿尔茨海默氏认知功能障碍的一种或多种症状,和/或预防或延迟早发性阿尔茨海默氏认知功能障碍至阿尔茨海默氏病的进展的药物中的用途。

9. 根据权利要求8所述的用途,其中所述药物包含在药物制剂中的所述APP特异性BACE抑制剂,其中所述ASBI为主要活性组分。

10. 根据权利要求8所述的用途,其中所述药物包含在药物制剂中的所述APP特异性BACE抑制剂,其中所述ASBI为唯一的药物活性组分。

11. 根据权利要求8所述的用途,其中所述药物包含在药物制剂中的所述APP特异性BACE抑制剂,其中未提供用于神经药理学或神经精神病学活性的其它组分。

12. 根据权利要求8所述的用途,其中所述药物用于预防或延迟从认知无症状的早发性阿尔茨海默氏病患过渡至早发性阿尔茨海默氏认知功能障碍。

13. 根据权利要求8所述的用途,其中所述药物用于预防或延迟早发性阿尔茨海默氏认知功能障碍发作。

14. 根据权利要求8所述的用途,其中所述药物用于改善早发性阿尔茨海默氏认知功能障碍的一种或多种症状。

15. 根据权利要求8所述的用途,其中所述药物用于预防或延迟早发性阿尔茨海默氏认知功能障碍至阿尔茨海默氏病的进展。

16. 根据权利要求1-7中任一项所述的APP特异性BACE抑制剂(ASBI)在制备用于改善阿尔茨海默氏病的一种或多种症状,和/或逆转阿尔茨海默氏病,和/或降低阿尔茨海默氏病的进展率的药物中的用途。

17. 根据权利要求16所述的用途,其中所述药物包含药物制剂,其中所述ASBI为主要活性组分或唯一的药物活性组分。

18. 根据权利要求16所述的用途,其中所述药物包含药物制剂,其中除了所述ASBI未提供用于神经药理学或神经精神病学活性的其它组分。

19. 根据权利要求16所述的用途,其中所述药物用于人。

20. 根据权利要求16所述的用途,其中所述药物用于被诊断患有早期阿尔茨海默氏病的受试者。

21. 根据权利要求16所述的用途,其中所述药物用于被诊断患有中期阿尔茨海默氏病的受试者。

22. 根据权利要求16所述的用途,其中所述药物用于被诊断患有晚期阿尔茨海默氏病的受试者。

23. 根据权利要求16所述的用途,其中所述药物用于具有患有阿尔茨海默氏病的家族风险的受试者。

24. 根据权利要求16所述的用途,其中所述药物包含所述ASBI,所述ASBI被配制成用于经由选自口服递送、等电渗递送、透皮递送、胃肠外递送、气溶胶施用、经由吸入施用、静脉内施用和直肠施用的途径施用。

APP特异性BACE抑制剂(ASBI)及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2012年11月20日提交的USSN 61/728,688和2012年3月19日提交的USSN 61/612,848的权益和优先权,所述两者均出于所有目的以引用的方式整体并入本文。

[0003] 政府支持陈述

[0004] 本工作部分由国立卫生研究院的国家老化研究所的资助号R01AG034427支持。政府享有本发明的某些权利。

[0005] 发明背景

[0006] β 淀粉样多肽(AB)为 β 淀粉样纤维和斑块的主要组分,所述 β 淀粉样纤维和斑块被认为在越来越多的病理学中发挥作用。此类病理学的实例包括但不限于阿尔茨海默氏病、唐氏综合征、帕金森病、记忆丧失(包括与阿尔茨海默氏病和帕金森病相关的记忆丧失)、注意力缺陷症(包括与阿尔茨海默氏病、帕金森病和唐氏综合征相关的注意力缺陷症)、痴呆(包括老年前期痴呆,老年性痴呆,与阿尔茨海默氏病、帕金森病和唐氏综合征相关的痴呆)、进行性核上麻痹、皮质基底变性、神经变性、嗅觉障碍(包括与阿尔茨海默氏病、帕金森病和唐氏综合征相关的嗅觉障碍)、 β -淀粉样脑血管病(包括大脑淀粉样脑血管病)、遗传性脑出血、轻度认知障碍("MCI")、青光眼、淀粉样变性、II型糖尿病、血液透析(β 2微球蛋白和由其产生的并发症)、神经变性疾病诸如痒病、牛海绵状脑炎、克雅氏病(Creutzfeldt Jakob disease)、外伤性脑损伤等。

[0007] AB多肽为由被称为淀粉样前体蛋白("APP")的跨膜蛋白的蛋白质水解产生的短的多肽。AB多肽由在接近AB的N-末端位置处通过 β -分泌酶活性和在接近AB的C-末端位置处通过 γ 分泌酶活性的APP切割制备。(APP也由 α -分泌酶活性切割,产生称为可溶性APP α 的分泌的、非淀粉样片段)。 β 位点APP切割酶("BACE-1")被认为是负责通过 β -分泌酶活性产生AB的主要的天冬氨酰蛋白酶。已示出BACE-1的抑制抑制AB的产生。

[0008] 估计阿尔茨海默氏病(AD)使全世界多于2千万人受到折磨并且据信为痴呆的最常见原因。随着世界人口的老龄化,患有阿尔茨海默氏病的人口数目(AD,在美国当前约为540万,将继续升高。阿尔茨海默氏病为与进行性痴呆和记忆丧失相关的神经退行性疾病。AD的两个关键特性为特定大脑区域中含有聚合的AB肽的细胞外沉积物的积聚和AD中神经元突触丢失。虽然AD发病机理复杂,但是有力的遗传和生化证据表明AB的过度产生或未能清除该肽为主要通过淀粉样沉积物导致AD的淀粉样级联反应中最早的事件,推测它参与表征受AD影响的脑组织的神经元纤维缠结形成、神经元功能障碍和小胶质细胞活化。

[0009] AB的积聚被认为是在导致神经变性的复杂的级联反应中的最早事件,如从有力的遗传和生化证据辨别。淀粉样级联反应假说(Hardy和Allsop(1991) Trends Pharmacol.Sci.,12:383-388;Selkoe(1996) J.Biol.Chem.,271:18295-18298;Hardy(1997) Trends Neurosci.,20:154-159;Hardy和Selkoe(2002) Science,297:353-356)陈述AB的过度产生或未能清除此肽主要通过淀粉样沉积物导致AD,推测它参与神经元纤维缠结形成、神经元功能障碍和小胶质细胞活化,这些是受AD影响的脑组织的标志(Busciglio等,(1995) Neuron,14:879-888;Gotz等,(1995) EMBO J.,14:1304-1313;Lewis等,(2001)

Science, 293:1487-1491; Hardy等, (1985) Nat Neurosci., 1:355-358)。

[0010] 考虑到A β 在AD病原学中的发病原因,降低A β 水平或防止毒害神经的A β 物质形成的新型治疗策略已被建议成防止或减慢疾病进展的方法。事实上,过去十年的主要焦点已经抑制脑A β 的产生和聚合、增加薄壁组织的A β 清除以及干扰A β -诱导的细胞死亡。

[0011] 通过膜结合的蛋白酶 β -分泌酶和 γ -分泌酶的APP的相继切割导致A β 的形成。 β -分泌酶途径、 α -分泌酶途径的竞争性蛋白水解途径导致A β 结构域内APP的切割,从而排除A β 的生成(Selkoe (2001) Physiol. Rev., 81:741-766; Hussain等, (1999) Mol. Cell. Neurosci., 14:419-427; Sinha等, (1999) Nature, 402:537-540; Vassar等, (1999) Science, 286:735-741)。 β -位点APP切割酶-1 (BACE1) 被鉴定为在 β -淀粉样途径中介导APP的第一切割的主要的 β -分泌酶活性(同上)。

[0012] BACE1为501个氨基酸的蛋白质,其与真核生物的天冬氨酸蛋白酶(特别是来自胃蛋白酶家族的)具有同源性(Yan等, (1999) Nature, 402:533-537)。与其它天冬氨酸蛋白酶相似,BACE1被合成为具有被弗林蛋白酶切割以释放成熟蛋白质的原结构域的酶原。BACE1为具有切割APP以将胞外域(sAPP β)释放至细胞外间隙的腔活性位点的I型跨膜蛋白。剩余的C-末端片段(CTF)通过 γ -分泌酶经历进一步切割,导致A β 和APP细胞内C-末端结构域(AICD)的释放。

[0013] 已提出早老蛋白为 γ -分泌酶的主要酶组分, γ -分泌酶的APP的不精确切割在C-末端处产生长度变化若干氨基酸的连续的A β 多肽。大部分A β 通常在氨基酸40 (A β 40)处结束,但是已示出42-氨基酸变体(A β 42)更易受聚合的影响,并且已假设成核老年斑形成。 γ -分泌酶的调节也可导致38-氨基酸变体(A β 38)的增加。竞争 α -分泌酶途径为 α -分泌酶和 γ -分泌酶相继切割的结果。已提出将解离素和金属蛋白酶家族的三种金属蛋白酶(ADAM 9、10和17)作为用于 α -分泌酶活性的候选物,所述 α -分泌酶活性切割A β 序列内位置16处的APP。使用过表达实验,已示出ADAM-10可能为用于APP切割的 α -分泌酶(Vassar (2002) Adv. Drug Deliv. Rev., 54:1589-1602; Buxbaum等, (1998) J. Biol. Chem., 273:27765-27767; Koike等, (1999) Biochem. J., 343 (Pt 2):371-375)。该切割还释放胞外域(sAPP α),所述胞外域显示神经保护功能(Lammich等, (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:3922-3927)。83-氨基酸CTF(C83)的随后切割释放p3(其为非淀粉样的)和AICD(Furukawa等, (1996) J. Neurochem., 67:1882-1896)。虽然假设AICD介导细胞内信号传导,但是这些片段的功能并未完全阐明。

[0014] 阐释调节由淀粉样前体蛋白(APP)产生A β 的代谢途径的研究指示产生A β 的分泌酶为良好的治疗靶标,因为 β -分泌酶或 γ -分泌酶的抑制限制A β 产生。事实为 β -分泌酶引发APP加工,因此作为产生A β 的限速步骤,它的抑制已吸引许多研究组的努力。专利文献的实例正在增长并且包括,例如,W02006009653、W02007005404、W02007005366、W02007038271、W02007016012、US2005/0282826、US2007072925、W02007149033、W02007145568、W02007145569、W02007145570、W02007145571、W02007114771、US20070299087、W02005/016876、W02005/014540、W02005/058311、W02006/065277、W02006/014762、W02006/014944、W02006/138195、W02006/138264、W02006/138192、W02006/138217、W02007/050721、W02007/053506、W02007/146225、W02006/138230、W02006/138265、W02006/138266、W02007/053506、W02007/146225、W02008/073365、W02008/073370、W02008/103351、US2009/041201、US2009/041202和W02010/047372。

[0015] 蛋白酶抑制策略的限制为抑制给定靶向蛋白酶, 诸如BACE或 γ -分泌酶复合体切割所有底物。就 γ -分泌酶而言, 除了APP之外的底物, 诸如Notch, 引起对 γ -分泌酶抑制的潜在副作用的关注, 以及 γ -分泌酶抑制剂司马西特 (Semagacestat) 的最近失败用来加强这些关注。

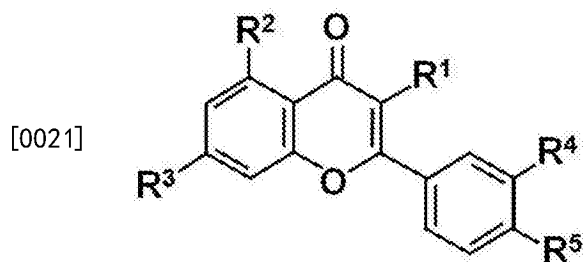
[0016] BACE为涉及导致产生A β 42和阿尔茨海默氏病 (AD) 病理的APP加工的关键酶。BACE-1 (也称为BACE) 自从其发现以来已成为热门研究, 并且可能已超过 γ -分泌酶成为用于药理学研究的最有前途的靶标。 γ -分泌酶作为靶标的一个问题为其已知的Notch切割, 所述Notch在神经元发育中起重要功能。早老蛋白敲除小鼠证明异常的体节发生和具有缩短体长的中轴骨骼的发育以及脑出血 (Shen等, (1997) Cell, 89:629-639; Wong等, (1997) Nature, 387:288-292)。相比之下, 若干组报道BACE1敲除小鼠为健康的并且未示出副作用的迹象 (Luo等, (2001) Nat. Neurosci., 4:231-232; Roberds等, (2001) Hum. Mol. Genet., 10:1317-1324), 而一组在另外能养活的且能生育的小鼠中注意到轻微的神经化学缺陷和行为变化 (Harrison等, (2003) Mol. Cell Neurosci., 24:646-655)。虽然最近的研究已示出BACE1敲除小鼠显示出外周神经的低髓鞘形成 (Willem等, (2006) Science, 314:664-666), 但是成年动物中BACE1抑制的后果不清楚, 其中已发生髓鞘形成。最近已报道BACE1切割多个底物, 包括ST6Gal I、PSGL-1、电压门控钠通道的亚基、APP-类似蛋白 (APLP)、LDL受体相关蛋白 (LRP) 和最近III型神经调节蛋白1 (NRG1) (Willem等, (2006) Science, 314:664-666; Hu等 (2006), Nat. Neurosci., 9:1520-1525)。直接抑制BACE1的后果因此还未充分理解。

[0017] 与过渡态抑制剂复合的BACE-1活性位点的分子模型 (Sauder等 (2000) J. Mol. Biol., 300:241-248) 和随后的X-射线结晶学 (Hong等, (2000) Science, 290:150-153; Maillard等, (2007) J. Med. Chem., 50:776-781) 提供关于BACE-1-底物相互作用的重要信息。在结构上, BACE-1活性位点比其它天冬氨酰蛋白酶更开放并且疏水性更小, 使得难以有效形成体内BACE抑制剂候选物。尽管存在大量集中于形成直接的BACE抑制剂的药物发现, 然而目前没有一个在临床试验中取得显著进步。

[0018] 一些BACE抑制剂诸如LY2811376和CTS21166进入临床试验, 但是由于安全原因未进入1期。BACE的其它生理学底物的发现在BACE抑制剂或BACE调节剂的临床发展中引发了主要关注并且可能是作为用于疾病治疗的这些抑制剂的发展中的显著路障。

[0019] 概述

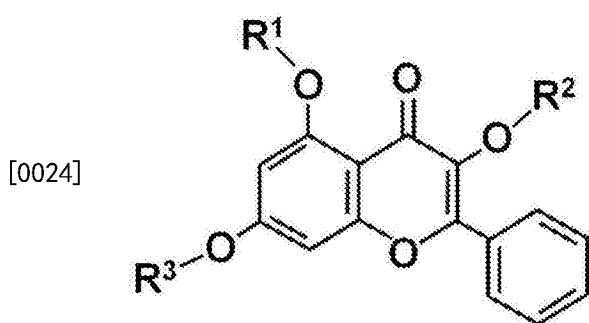
[0020] 在某些实施方案中, 鉴定被认为充当APP-特异性 (或APP-选择性) BACE抑制剂 (ASBI) 的类黄酮及其衍生物或类似物 (及其前药)。在各个实施方案中, 类黄酮可由下式表征:



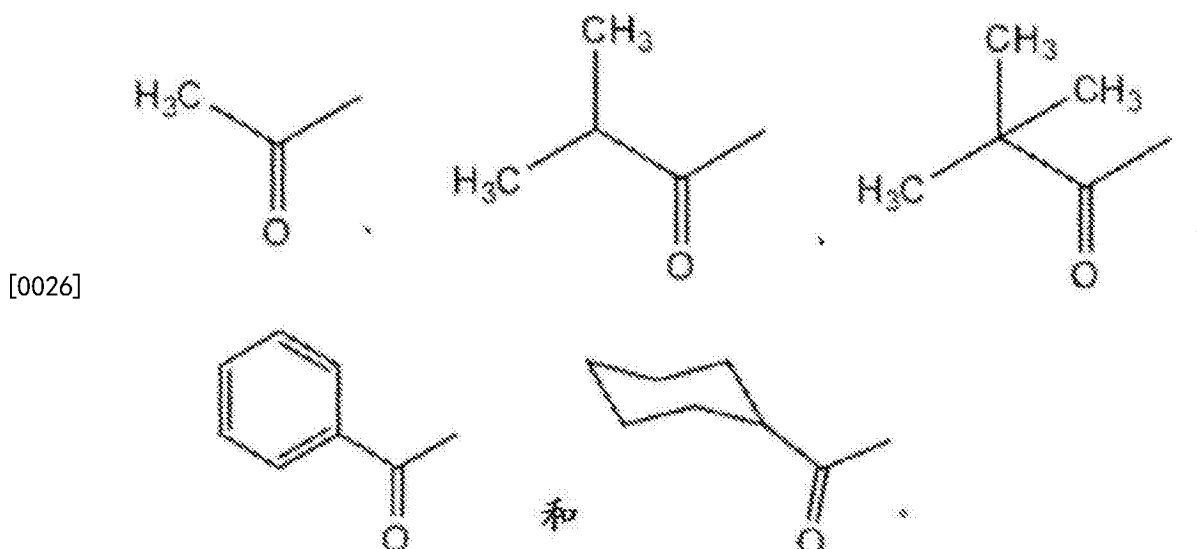
[0022] 其中R¹选自OH、O-糖、O-烷基、O-三氟甲基、O-芳基、O-杂芳基和氨基甲酸酯; R⁴和R⁵独立地选自H、OH、NH₂、O-烷基、O-三氟甲基、S-烷基、S-芳基、羧酸酯、卤素、NH-烷基、N,N-二

烷基、NHC0-烷基和杂芳基,烷基脲以及氨基甲酸酯;并且R²和R³独立地选自H、OH、NH₂、O-烷基、O-三氟甲基、S-烷基、S-芳基、羧酸酯、卤素、NH-烷基、N,N-二烷基、NHC0-烷基、杂芳基、烷基脲以及氨基甲酸酯。在某些实施方案中R²和/或R³为OH。在某些实施方案中R²为OH并且R³为OH。在某些实施方案中R²和/或R³独立地选自O-烷基、S-烷基、NH-烷基和NHC0-烷基。在某些实施方案中R²和R³独立地选自O-烷基、S-烷基、NH-烷基和NHC0-烷基(如,其中所述O-烷基、S-烷基、NH-烷基和NHC0-烷基的烷基组分为C₁₋₁₂烷基或C₁₋₉烷基或C₁₋₆烷基或C₁₋₃烷基)。在某些实施方案中R²和/或R³为卤素(如,Cl、Br、F、I等)。在某些实施方案中R²为卤素并且R³为卤素。在某些实施方案中R²和/或R³独立地选自Cl、Br、F和I。在某些实施方案中R²和/或R³选自S-芳基和杂芳基。在某些实施方案中R²和R³独立地选自S-芳基。在某些实施方案中R²和R³独立地选自杂芳基。在某些实施方案中其中R⁴和/或R⁵为OH。在某些实施方案中R⁴为H并且R⁵为OH。在某些实施方案中R⁴为OH并且R⁵为H。在某些实施方案中R⁴为OH并且R⁵为OH。在某些实施方案中R⁴和/或R⁵为H。在某些实施方案中R⁴为H并且R⁵为H。在某些实施方案中当R⁴和/或R⁵为OH时,R¹为O-糖。在某些实施方案中其中R⁴和/或R⁵独立地选自O-烷基、S-烷基、NH-烷基和NHC0-烷基。在某些实施方案中R⁴和R⁵独立地选自O-烷基、S-烷基、NH-烷基和NHC0-烷基(如,其中所述O-烷基、S-烷基、NH-烷基和NHC0-烷基的烷基组分为C₁₋₁₂烷基或C₁₋₉烷基或C₁₋₆烷基或C₁₋₃烷基)。在某些实施方案中R⁴和/或R⁵为卤素。在某些实施方案中R⁴为卤素并且R⁵为卤素。在某些实施方案中R⁴和/或R⁵独立地选自Cl、Br、F和I。在某些实施方案中R⁴和/或R⁵选自S-芳基和杂芳基。在某些实施方案中R⁴和R⁵独立地选自S-芳基。在某些实施方案中R⁴和R⁵独立地选自杂芳基。在某些实施方案中R¹为O-糖(如,O-单糖、O-二糖、O-三糖)。在某些实施方案中R¹为O-烷基、O-三氟甲基、O-芳基或O-杂芳基。在某些实施方案中APP特异性(或选择性)BACE抑制剂为高良姜精或其衍生物。在某些实施方案中APP特异性BACE抑制剂为高良姜精。在某些实施方案中APP特异性BACE抑制剂为芸香苷或其衍生物。在某些实施方案中APP特异性BACE抑制剂为芸香苷。

[0023] 在多个实施方案中提供ASBI前药。在某些实施方案中前药为高良姜精前药,当施用于哺乳动物时,所述高良姜精前药被加工成高良姜精。示例性的高良姜精前药包括但不限于由下式表征的高良姜精前药:



[0025] 其中R¹、R²和R³为H或在哺乳动物体内去除的保护基团,其中R¹、R²和R³中的至少一者不为H;并且其中当施用于哺乳动物时前药部分或全部地抑制APP的BACE加工。在某些实施方案中R¹、R²和R³中的至少一者独立地选自



[0027] 在某些实施方案中 R^1 为H并且 R^2 和 R^3 相同或不同并且包含以上示出的基团的任何组合。在某些实施方案中前药具有示于图1和/或图2的式。

[0028] 在某些实施方案中,ASBI和/或ASBI前药被提供为药物制剂,其中所述ASBI和/或ASBI前药为主要的活性组分。在某些实施方案中ASBI和/或ASBI前药为唯一的药物活性组分(如,其中所述药物活性抑制BACE)。在某些实施方案中ASBI和/或ASBI前药以药物制剂提供,其中未提供用于神经药理学或神经精神病学活性的其它组分。

[0029] 在某些实施方案中提供预防或延迟早发性阿尔茨海默氏病患和/或认知功能障碍的发作,和/或改善早发性阿尔茨海默氏病患和/或认知功能障碍的一种或多种症状,或预防或延迟早发性阿尔茨海默氏病患或认知功能障碍至阿尔茨海默氏病的进展的方法。所述方法通常包括向有需要的受试者施用(或引起待施用)足以预防或延迟早发性阿尔茨海默氏认知功能障碍的发作,和/或改善早发性阿尔茨海默氏认知功能障碍的一种或多种症状,和/或预防或延迟早发性阿尔茨海默氏认知功能障碍至阿尔茨海默氏病的进展的量的APP特异性BACE抑制剂(ASBI)和/或ASBI前药。在某些实施方案中ASBI和/或ASBI前药包含如本文所述(如,如上所述)的ASBI类黄酮和/或ASBI前药。在某些实施方案中ASBI为高良姜精和/或ASBI前药为高良姜精前药。在某些实施方案中ASBI和/或ASBI前药(如,高良姜精和/或高良姜精前药)以药物制剂施用,其中所述ASBI为主要活性组分。在某些实施方案中ASBI和/或ASBI前药(如,高良姜精和/或高良姜精前药)以药物制剂施用,其中ASBI和/或ASBI前药为唯一的药物活性组分。在某些实施方案中ASBI和/或ASBI前药(如,高良姜精和/或高良姜精前药)以药物制剂施用,其中未提供用于神经病理学或神经精神病学活性的其它试剂。在某些实施方案中所述方法为预防或延迟从认知无症状的早发性阿尔茨海默氏病患过渡至早发性阿尔茨海默氏认知功能障碍的方法。在某些实施方案中所述方法为预防或延迟早发性阿尔茨海默氏认知功能障碍发作的方法。在某些实施方案中所述方法包括改善早发性阿尔茨海默氏认知功能障碍的一种或多种症状。在某些实施方案中所述方法包括预防或延迟早发性阿尔茨海默氏认知功能障碍至阿尔茨海默氏病的进展。在某些实施方案中受试者显示出A β 在年龄为50岁或以上、或55岁或以上或60岁或以上或65岁或以上或70岁或以上或75岁或以上或80岁或以上的临床上正常的人受试者中的生物标记阳性。在某些实施方案中受试者显示出无症状的大脑淀粉样变性。在某些实施方案中受试者显示出与下游神经变性

组合的大脑淀粉样变性。在某些实施方案中受试者显示出与下游神经变性组合的大脑淀粉样变性和轻微的认知/行为退化。在某些实施方案中下游神经变性由选自tau和FDG吸收的神经元损伤的一个或多个升高的标记确定。在某些实施方案中大脑淀粉样变性由PET或CSF分析和/或结构MRI (sMRI) 确定。在某些实施方案中受试者为被诊断患有轻度认知功能障碍的受试者。在某些实施方案中受试者示出大于0且低于约1.5的临床痴呆评定。在某些实施方案中受试者为人。在某些实施方案中受试者处于患有阿尔茨海默氏病的风险中。在某些实施方案中受试者具有患有阿尔茨海默氏病的家族风险。在某些实施方案中具有家族阿尔茨海默氏病 (FAD) 突变。在某些实施方案中受试者具有APOE ϵ 4等位基因。在某些实施方案中ASBI和/或ASBI前药的施用延迟或防止MCI至阿尔茨海默氏病的进展。在某些实施方案中受试者无帕金森病或精神分裂症并且不具有帕金森病或精神分裂症的遗传风险因素。在某些实施方案中受试者未被诊断为患有帕金森病或精神分裂症或处于帕金森病或精神分裂症的风险中。在某些实施方案中受试者未被诊断成具有除了阿尔茨海默氏病之外的神经疾病或病症的风险。在某些实施方案中施用产生CSF中一个或多个选自总-Tau (tTau)、磷酸化-Tau (pTau)、APPneo、可溶性A β 40、pTau/A β 42比率和tTau/A β 42比率的组分的水平的减少和/或CSF中一个或多个选自A β 42/A β 40比率、A β 42/A β 38比率、sAPP α 、sAPP α /sAPP β 比率、sAPP α /A β 40比率和sAPP α /A β 42比率的组分的水平的增加。在某些实施方案中施用产生受试者的脑中斑块负载的减少。在某些实施方案中施用产生受试者的脑中斑块形成率的减少。在某些实施方案中施用产生受试者的认知能力的改善。在某些实施方案中施用产生受试者的临床痴呆评定 (CDR) 的下降率的改善、稳定或减少。在某些实施方案中受试者为人并且施用产生人感知到的生活质量的改善。在某些实施方案中ASBI和/或ASBI前药经由选自以下的途径施用：口服递送、等电渗递送 (isophoretic delivery)、透皮递送、胃肠外递送、气溶胶施用、经由吸入施用、静脉内施用、局部施用于眼、眼内注射和直肠施用。在某些实施方案中化合物口服施用。在某些实施方案中施用在至少三周的时段内或至少6个月的时段内或至少一年的时段内。在某些实施方案中ASBI和/或ASBI前药被配制用于经由选自等电渗递送、透皮递送、气溶胶施用、经由吸入施用、口服施用、静脉内施用、局部递送于眼、眼内注射和直肠施用的途径施用。在某些实施方案中乙酰胆碱酯酶抑制剂 (如，他克林伊匹达克林、加兰他敏、多奈哌齐、艾考哌齐、扎那哌齐 (zanapezil)、卡巴拉汀、盐酸美金刚 (Namenda)、石杉碱甲 (huperzine A)、非色林 (phenserine)、毒扁豆碱、新斯的明、吡斯的明 (pyridostigmine)、安贝氯铵 (ambenonium)、地美卡林 (demarcarium)、腾喜龙 (edrophonium)、拉多替吉 (ladostigil) 和恩其明 (ungeremine)、美曲膦酯 (metrifonate) 等) 未与ASBI和/或ASBI前药结合施用。

[0030] 在多个实施方案中提供改善阿尔茨海默氏病的一种或多种症状、和/或逆转阿尔茨海默氏病、和/或降低阿尔茨海默氏病进展率的方法。所述方法通常包括向有需要的受试者施用 (或引起待施用) 足以改善阿尔茨海默氏病的一种或多种症状、和/或逆转阿尔茨海默氏病、和/或降低阿尔茨海默氏病的进展率的量的APP特异性BACE抑制剂 (ASBI) 和/或ASBI前药。在某些实施方案中ASBI和/或ASBI前药包含如本文所述 (如，如上所述) 的ASBI类黄酮和/或ASBI前药。在某些实施方案中ASBI为高良姜精和/或ASBI前药为高良姜精前药 (如，示于图1和/或图2中的前药)。在某些实施方案中ASBI和/或ASBI前药以药物制剂施用，其中ASBI和/或ASBI前药为主要活性组分。在某些实施方案中ASBI和/或ASBI前药以药物制

剂施用,其中ASBI和/或ASBI前药为唯一的药物活性组分。在某些实施方案中ASBI和/或ASBI前药以药物制剂施用,其中未提供用于神经药理学或神经精神病学活性的其它组分。在某些实施方案中所述受试者为人(或非人哺乳动物)。在某些实施方案中所述受试者为年龄为50岁或以上或55岁或以上或60岁或以上或65岁或以上或70岁或以上或75岁或以上或80岁或以上的人。在某些实施方案中所述受试者被诊断患有早期阿尔茨海默氏病。在某些实施方案中所述受试者被诊断患有中期阿尔茨海默氏病。在某些实施方案中所述受试者被诊断患有晚期阿尔茨海默氏病。在某些实施方案中所述施用降低阿尔茨海默氏病的严重度。在某些实施方案中所述施用改善阿尔茨海默氏病的一种或多种症状。在某些实施方案中所述施用降低阿尔茨海默氏病的进展率。在某些实施方案中施用导致CSF中一个或多个选自总-Tau (tTau)、磷酸化-Tau (pTau)、APPneo、可溶性A β 40、pTau/A β 42比率和tTau/A β 42比率的组分的水平的减少和/或CSF中一个或多个选自A β 42/A β 40比率、A β 42/A β 38比率、sAPP α 、sAPP α /sAPP β 比率、sAPP α /A β 40比率和sAPP α /A β 42比率的组分的水平的增加。为预防或延迟从认知无症状的早发性阿尔茨海默氏病患至早发性阿尔茨海默氏认知功能障碍的过渡的方法。在某些实施方案中施用产生受试者的脑中斑块负载的减少。在某些实施方案中施用产生受试者的脑中斑块形成率的减少。在某些实施方案中施用产生受试者的认知能力的改善。在某些实施方案中施用产生受试者的临床痴呆评定(CDR)的下降率的改善、稳定或减少。在某些实施方案中受试者为人并且所述施用产生人感知到的生活质量的改善。在某些实施方案中所述施用导致减少的大脑淀粉样变性和/或下游神经变性。在某些实施方案中所述下游神经变性由选自tau、FDG吸收、sAPP α 的减少、sAPP β 的增加和A β 的神经元损伤的一个或多个标记确定。在某些实施方案中大脑淀粉样变性由PET、CSF分析和结构MRI (sMRI) 确定。在某些实施方案中受试者示出表明阿尔茨海默氏病的临床痴呆评定。在某些实施方案中受试者具有患有阿尔茨海默氏病的家族风险。在某些实施方案中受试者具有家族阿尔茨海默氏病(FAD)突变。在某些实施方案中受试者具有APOE ϵ 4等位基因。在某些实施方案中受试者无帕金森病或精神分裂症并且不具有帕金森病或精神分裂症的遗传风险因素。在某些实施方案中受试者未被诊断为患有帕金森病或精神分裂症或处于帕金森病或精神分裂症的风险中。在某些实施方案中,受试者不具有除了阿尔茨海默氏病之外的神经疾病或病症。在某些实施方案中受试者未被诊断成具有除了阿尔茨海默氏病之外的神经疾病或病症或处于除了阿尔茨海默氏病之外的神经疾病或病症的风险中。在某些实施方案中ASBI和/或ASBI前药经由选自以下的途径施用:口服递送、等电渗递送、透皮递送、胃肠外递送、气溶胶施用、经由吸入施用、静脉内施用、皮下施用、局部施用于眼、眼内注射和直肠施用。在某些实施方案中ASBI和/或ASBI前药被配制成用于经由选自口服递送、等电渗递送、透皮递送、胃肠外递送、气溶胶施用、经由吸入施用、静脉内施用和直肠施用的途径施用。在某些实施方案中ASBI和/或ASBI前药口服施用。在某些实施方案中施用在至少三周的时段内或至少6个月的时段内或至少一年的时段内。在某些实施方案中乙酰胆碱酯酶抑制剂(如,他克林伊匹达克林、加兰他敏、多奈哌齐、艾考哌齐、扎那哌齐、卡巴拉汀、盐酸美金刚、石杉碱甲、非色林、毒扁豆碱、新斯的明、吡斯的明、安贝氯铵、地美卡林、腾喜龙、拉多替吉和恩其明、美曲膦酯等)未与所述ASBI和/或ASBI前药结合施用。在某些实施方案中ASBI和/或ASBI前药经由选自以下的途径施用:口服递送、等电渗递送、透皮递送、胃肠外递送、气溶胶施用、经由吸入施用、静脉内施用和直肠施用。

[0031] 在多个实施方案中提供减缓哺乳动物中老年性黄斑变性 (AMD) 和/或青光眼进展、停止或逆转老年性黄斑变性 (AMD) 和/或青光眼的方法。所述方法通常涉及向哺乳动物施用足以减缓所述AMD和/或青光眼的一种或多种症状和/或标记的进展、停止或逆转和/或改善所述AMD和/或青光眼的一种或多种症状和/或标记的量的ASBI和/或ASBI前药。在某些实施方案中ASBI和/或ASBI前药包含如本文所述(如,如上所述)的ASBI类黄酮和/或ASBI前药。在某些实施方案中ASBI为高良姜精和/或ASBI前药为高良姜精前药(如,示于图1和/或图2中的前药)。在某些实施方案中ASBI和/或ASBI前药经由选自以下途径施用:口服递送、等电渗递送、透皮递送、胃肠外递送、气溶胶施用、经由吸入施用、静脉内施用、皮下施用、局部施用于眼、眼内注射和直肠施用。在某些实施方案中ASBI和/或ASBI前药被配制成为用于经由选自口服递送、等电渗递送、透皮递送、胃肠外递送、气溶胶施用、经由吸入施用、静脉内施用和直肠施用的途径施用。在某些实施方案中ASBI和/或ASBI前药施用于眼(如,经由滴眼剂、眼内注射等)。在某些实施方案中施用在至少三周的时段内或至少6个月的时段内或至少一年的时段内。

[0032] 定义

[0033] 通常,提及某些元素诸如氢或H意在包括该元素的所有同位素。例如,如果R基团定义为包括氢或H,它也包括氘和氚。因此,同位素标记的化合物在本发明的范围内。

[0034] 通常,“取代的”是指如下文定义的有机基团(如,烷基),有机基团中包含的与氢原子的一个或多个键被与非氢或非碳原子的键替代。取代的基团还包括这样的基团,其中与碳或氢原子的一个或多个键被与杂原子的一个或多个键(包括双键或三键)替代。因此,除非另外指明,否则取代的基团将被一个或多个取代基取代。在一些实施方案中,取代的基团被1、2、3、4、5或6个取代基取代。取代基的实例包括:卤素(即,F、Cl、Br和I);羟基;烷氧基、烯氧基、炔氧基、芳氧基、芳烷氧基、杂环氧基和杂环烷氧基;羰基(氧代);羧基;酯;氨基甲酸乙酯;脞;羟基胺;烷氧基胺;芳烷氧基胺;硫醇;硫化物;亚砷;砷;磺酰基;磺酰胺;胺;N-氧化物;肼;酰肼;脲;叠氮化物;酰胺;脲;脘;胍;烯胺;酰亚胺;异氰酸酯;异硫氰酸酯;氰酸酯;硫氰酸酯;亚胺;硝基;腈(即,CN)等。

[0035] 术语“烷基”是指并且覆盖称为正链烷基、支链烷基、环烷基以及还有环烷基-烷基的任何和所有的基团。示例性的烷基包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、辛基和癸基。术语“环烷基”是指环状的,包括多环的、饱和的烃基。实例包括但不限于环戊基、环己基、二环戊基、降冰片基、八氢萘基和螺[3.4]辛基。在某些实施方案中,烷基含有1-12个碳原子(C₁₋₁₂烷基)或1-9个碳原子(C₁₋₉烷基)或1-6个碳原子(C₁₋₆烷基)或1-5个碳原子(C₁₋₅烷基)或碳原子(C₁₋₄烷基)或1-3个碳原子(C₁₋₃烷基)或1-2个碳原子(C₁₋₂烷基)。

[0036] 举例来说,术语“C₁₋₆烷基”是指具有1至6个碳原子的直链或支链烷基,并且可以通过甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、正戊基、叔戊基、3-甲基丁基、辛戊基和正己基来举例说明。

[0037] 如本文所用的术语“烷氧基”意指通过单一末端氧原子结合的烷基。“烷氧基”可以表示为—O-烷基,其中烷基如上文所定义。术语“芳氧基”以相似的方式使用,并且可以表示为—O-芳基,其中芳基如下文所定义。术语“羟基”是指—OH。

[0038] 相似地,如本文所用的术语“烷基硫基”意指通过单一末端硫原子结合的烷基。“烷

基巯基”可以表示为--S-烷基,其中烷基如上文所定义。术语“芳基巯基”相似地使用并且可以表示为--S-芳基,其中芳基如下文所定义。术语“巯基”是指-SH。

[0039] 芳基为不含有杂原子的环状芳烃。芳基包括单环的、双环的和多环的环系统。因此,芳基包括但不限于苯基、萸基(azulenyl)、庚搭烯基(heptalenyl)、亚联苯基(biphenylenyl)、引达省基(indacenyl)、茛基、菲基、三亚苯基、茈基、萘并萘基(naphthacenyl)、草屈基(chrysenyl)、联苯基、蒽基、茛基、茛满基、并环戊二烯基(pentalenyl)和萘基。在一些实施方案中,芳基含有6-14个碳,而在其它实施方案中,在基团的环部分芳基含有6至12个或甚至6-10个碳原子。虽然短语“芳基”包括含有稠环的基团,诸如稠合的芳族-脂族环系统(如,茛满基、四氢萘基等),但它不包括具有键合于环成员之一的其它基团(诸如烷基或卤基)的芳基。然而,诸如甲苯基的基团被称为取代的芳基。代表性取代的芳基可以为单取代的或不止一次取代的。例如,单取代的芳基包括但不限于2-、3-、4-、5-或6-个取代的苯基或萘基,所述苯基或萘基可以被诸如以上列出的那些取代基取代。

[0040] 术语“杂芳基”是指含有一个或多个选自O、S和N的杂原子的单环或稠环芳族杂环基团。如果芳族杂环基团具有稠环,那么它可包括部分氢化的单环基团。此类杂芳基的实例包括吡唑基、噻唑基、异噻唑基、噻二唑基、咪唑基、呋喃基、噻吩基、噁唑基、异噁唑基、吡咯基、咪唑基、(1,2,3)-和(1,2,4)-三唑基、四唑基、吡喃基、吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、哒嗪基、喹啉基、异喹啉基、苯并呋喃基、异苯并呋喃基、吲哚基、异吲哚基、吲唑基、苯并咪唑基、苯并三唑基、苯并噁唑基、苯并噻唑基、苯并[b]苯巯基、噻吩并[2,3-b]苯巯基、(1,2)-和(1,3)-苯并氧杂硫杂环戊二烯基(benzoxathiol)、色烯基、2-氧基色烯基、苯并噻二唑基、喹噁基、酞嗪基、萘啶基、喹喔啉基、喹唑啉基、噌啉基和呋唑基。

[0041] 化合物的“衍生物”意指化学上修饰的化合物,其中所述化学修饰发生在化合物的一个或多个官能团处。然而期望衍生物保留或增强其衍生自化合物的药理学活性。

[0042] 如本文所用,“施用”是指局部和全身施用,如,包括肠内、胃肠外、肺部和局部/透皮施用。用于本文描述的方法的试剂的施用途径(如,ASBI诸如高良姜精、芸香苷及其类似物、衍生物或前药或其互变异构体或立体异构体或所述ASBI、所述立体异构体或所述互变异构体或其类似物、衍生物或前药的药学上可接受的盐或溶剂化物)包括对受试者如,口服(经口(per os)(p.o.))施用、鼻施用或吸入施用、以栓剂施用、局部接触、透皮递送(如,经由透皮贴剂)、囊内(IT)施用、静脉内(“iv”)施用、腹膜内(“ip”)施用、肌内(“im”)施用、病灶内施用或皮下(“sc”)施用或植入缓释装置如,微型渗透泵、贮库制剂等。施用可为包括胃肠外和粘膜(如,口服、鼻、阴道、直肠或透皮)的任何途径。胃肠外施用包括,如,静脉内、肌内、动脉内、真皮内、皮下、腹膜内、心室内、离子电泳(ionophoretic)和颅内施用。递送的其它模式包括但不限于使用脂质体制剂、静脉内输注、透皮贴剂等。

[0043] 术语“全身施用(systemic administration)”和“全身施用(systemically administered)”是指将本文描述的试剂或组合物施用于哺乳动物使得所述试剂或组合物经由循环系统被递送至体内位点(包括药物作用的靶向位点)的方法。全身施用包括但不限于口服、鼻内、直肠和胃肠外(如,除了通过消化道之外,诸如肌内、静脉内、动脉内、透皮和皮下)施用。

[0044] 术语“共施用”或“同时施用”或“与……结合施用”当例如相对于本文描述的活性

剂如,ASBI诸如高良姜精、芸香苷及其类似物、衍生物或前药)和第二活性剂(如,认知增强剂)使用时,是指施用试剂和/第二活性剂使得两者可同时地实现生理作用。然而,这两种试剂不必一起施用。在某些实施方案中,施用一种试剂可在施用另一种试剂之前。同时的生理作用不必需要循环中同时存在两种试剂。然而,在某些实施方案中,共施用通常导致对于任何给定剂量的两种试剂以其最大血清浓度的显著部分同时存在于体内(如,在血浆中)(如,20%或更高、优选地30%或40%或更高、更优选地50%或60%或更高、最优选地70%或80%或90%或更高)。

[0045] 术语“有效量”或“药学有效量”是指必需产生所需结果的一种或多种试剂的量和/或剂量和/或剂量方案,如,足以减轻哺乳动物内与轻度认知障碍(MCI)相关的一种或多种症状的量或足以减轻特征为哺乳动物脑中的淀粉样沉积物的疾病的严重度或延迟所述疾病进展的量(如,治疗有效量),足以降低特征为哺乳动物脑中的淀粉样沉积物的疾病的风险或延迟所述疾病的发作和/或降低最终的严重度的量(如,预防有效量)。

[0046] 短语“引起待施用”是指由医学专业人员(如,医师),或者控制和/或允许向讨论中的受试者施用试剂的控制受试者的医疗护理的人采取的行动。引起待施用可涉及诊断和/或确定适当的治疗或预防方案和/或为受试者开出特定试剂。此类开处方可包括例如起草处方表格、注解医学记录等。

[0047] 如本文所用,术语“治疗(treating)”和“治疗(treatment)”是指延迟术语适用的疾病或病患或此类疾病或病患的一种或多种症状的发作、延迟或逆转其进展、降低其严重度或对其的缓解或预防。

[0048] 术语“减轻”是指减少或消除该病理或疾病的一种或多种症状,和/或减少该病理或疾病的一种或多种症状的速率或延迟该病理或疾病的一种或多种症状的发作或严重度和/或预防所述病理或疾病。在某些实施方案中,减少或消除病理或疾病的一种或多种症状包括但不限于减少或消除为病理或疾病特征的一个或多个标记(如,总-Tau(tTau)、磷酸化-Tau(pTau)、APPneo、可溶性Aβ40、pTau/Aβ42比率和t Tau/Aβ42比率和/或CSF中一个或多个选自Aβ42/Aβ40比率、Aβ42/Aβ38比率、sAPPα、sAPPα/sAPPβ比率、sAPPα/Aβ40比率、sAPPα/Aβ42比率等的组分的水平的增加)和/或减少、稳定或逆转一个或多个诊断标准(如,临床痴呆评定(CDR))。

[0049] 如本文所用,短语“基本上由……组成”是指方法或组合物中引用的活性药学剂的属或种并且还可包括对于引用的指示或目的本身不具有实质活性的其它试剂。在一些实施方案中,短语“基本上由……组成”明确排除包含一种或多种其它试剂,所述试剂具有除了引用的试剂之外(如,除了ASBI诸如高良姜精、芸香苷及其类似物、衍生物或前药之外)的神经药理学活性。在一些实施方案中,短语“基本上由……组成”明确排除包含除了本文描述的活性剂之外(如,除了ASBI诸如高良姜精、芸香苷及其类似物、衍生物或前药之外)的一种或多种其它活性剂。在一些实施方案中,短语“基本上由……组成”明确排除包含一种或多种乙酰胆碱酯酶抑制剂。

[0050] 术语“受试者”、“个体”和“患者”可交换地指哺乳动物,优选为人或非人灵长类动物,而且还指家养哺乳动物(如,犬或猫科动物)、实验室哺乳动物(如,小鼠、大鼠、兔、仓鼠、豚鼠)和农业哺乳动物(如,马科动物、牛科动物、猪科动物、羊科动物)。在各个实施方案中,所述受试者可为由医院、精神病护理机构(作为门诊病人)或其它临床环境中的医师或其他

保健工作人员护理的人(如,成年男性、成年女性、青少年男性、青少年女性、男童、女童)。在某些实施方案中所述受试者可以不在医师或其他保健工作人员的护理或指示下。

[0051] 如本文所用的术语“制剂”或“药物制剂”或“剂型”或“药物制剂”是指含有至少一种用于递送至受试者的治疗剂或药物的组合物。在某些实施方案中所述剂型包含给定的“制剂”或“药物制剂”并且可以以糖锭剂、丸剂、片剂、胶囊剂、栓剂、膜、条剂、液体、贴剂、薄膜、凝胶、喷雾剂或其它形式的形式施用于患者。

[0052] 术语“粘膜”通常是指体内任何粘液包被的生物膜。在某些实施方案中本文描述的活性剂可经由体内存在的任何粘膜在本文施用,所述粘膜包括但不限于口腔粘膜、经舌的、鼻粘膜、舌下粘膜、肺部粘膜、直肠粘膜和阴道粘膜。通过口腔的粘膜和消化道的那些进行的吸收为关注的。因此,本文涵盖了经口的、颊的、舌下、牙龈的和腭的吸收。

[0053] 术语药物等的“穿粘膜”递送意在涵盖跨过或通过粘膜的所有形式的递送。

[0054] 如本文所用的术语“生物粘附”是指剂型粘附至生物表面(如,粘膜)的过程。

[0055] “受控的药物递送”是指以受控的方式释放或施用来自给定剂型的药物以便实现所需的体内药代动力学特性。“受控的”药物递送的一个方面为能够操纵制剂和/或剂型以便建立所需的药物释放动力学。

[0056] “持续药物递送”是指来自源(如,药物制剂)的药物以持续的方式释放或施用可能从若干分钟延长至几小时、几天、几周或几个月的拖延的却特定的时段。在各个实施方案中术语“持续的”将用于指代一致的和/或基本上恒定水平的药物在范围为若干分钟至一天的时段内的递送,其中曲线特征为缺少即释期,诸如获得自IV施用的即释期。

[0057] 如本文所用的术语“ T_{max} ”意指观察到最大血浆浓度的时间点。

[0058] 如本文所用的术语“ C_{max} ”意指观察到的最大血浆浓度。

[0059] 如本文所用的术语“血浆 $t_{1/2}$ ”意指观察到的“血浆半衰期”并且表示药物血浆浓度达到其最大值(C_{max})的50%所需的时间。这有利于确定药理作用的平均持续时间。此外,它有利于在经由相同或不同途径递送之后不同试验样品的持续时间的直接且有意义的比较。

[0060] 术语“最佳治疗靶向比率”或“OTTR”表示药物以治疗水平存在的平均时间,定义为药物血浆浓度保持在通过药物的消除半衰期进行归一化的 C_{max} 的50%以上的时间乘以用关注的剂型获得的 C_{max} 与在等效剂量的IV施用之后的 C_{max} 的比率并且通过下式计算:

[0061] $OTTR = (C_{max}^{IV} / C_{max}) \times (\text{剂量} / \text{剂量}^{IV}) (C_{max} \text{ 高于 } 50\% \text{ 的时间}) / (\text{药物的最终}^{IV} \text{ 消除半衰期})$ 。

[0062] 附图简述

[0063] 图1示出芸香苷、高良姜精和高良姜精前体-1 (progalangin-1) 的结构。

[0064] 图2说明高良姜精和各种高良姜精前体 (pro-galantin)。

[0065] 图3A说明如在来自小的临床文库的筛选的散点图中示出的AlphaLisa测定中鉴定芸香苷。图3B示意性地说明用于检测MBP-C125的BACE切割的主要的AlphaLisa测定。

[0066] 图4示出在通过BACE的MBP-C125&P5-P5' 切割中筛选生物类黄酮的家族以鉴定ASBI的结果。

[0067] 图5A示出芸香苷&高良姜精抑制SH-SY5Y中的sAPP β 。5B示出通过表面等离子体共振使高良姜精结合至APP片段 (SPR)。

[0068] 图6A示出高良姜精抑制 β -CTF产生。将稳定过表达人APP的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细

胞用10 μ M高良姜精或DMSO处理24小时,然后收集细胞裂解物和条件培养基。细胞裂解物中全长APP和 β -CTF的水平和条件培养基中sAPP α 的水平通过蛋白质印迹检测。图6B示出高良姜精不会抑制神经调节蛋白1的BACE1切割。SEAP-NRG1- β 1的BACE1-依赖性切割通过用DMSO或高良姜精(10 μ M)处理的对照人胚肾293 (HEK293) 细胞(SEAP-NRG1- β 1) 或共表达BACE1的HEK293细胞(SEAP-NRG1- β 1+BACE1) 的上清液的SEAP测定进行评估。SEAP-NRG1- β 1融合蛋白脱落的增加在BACE1共表达时测量。共表达细胞的脱落不受高良姜精的抑制。误差条指示SEM。(N.S., $p>0.05$; $n=4$, student t检验)。

[0069] 图7A和7B说明通过高良姜精抑制APP-Gal4和APLP2-Gal4反式激活。图7A:当存在Mint3和TAZ两者时,用融合至Gal4 DNA结合结构域的APP实现转录的有效反式激活。该反式激活受到高良姜精和BACE抑制剂IV的抑制。图7B:当存在Mint3和TAZ两者时,用融合至Gal4 DNA结合结构域的APLP2也能实现转录的有效反式激活。该反式激活受到高良姜精和BACE抑制剂IV的抑制。图表显示出这样的实验,其中细胞用Gal4-荧光素酶报告基因质粒(用于测量反式激活)、 β -半乳糖苷酶质粒(用于转染效率的归一化)和测试质粒(Mint3、TAZ和APP-Gal4或APLP2-Gal4)共转染。归一化的荧光素酶活性表示为DMSO处理的对照的百分比(图7A、7B)。误差条指示SEM。(*, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$; $n=3$, student t检验)。

[0070] 图8说明高良姜精和高良姜精前体(PG-1)的药代动力学。对于高良姜精和PG-1两者血浆水平高于脑组织水平,但是在PG-1注射之后高良姜精水平远高于高良姜精本身。

[0071] 图9,图A-D示出A β 1-40和A β 1-42水平。A β 1-40水平在高良姜精处理的小鼠的脑中略低(图A)而A β 1-42未改变。A β 1-40和A β 1-42两者在高良姜精前体I处理的小鼠的脑中略低。A β 1-40(图A)略微下降而A β 1-42(图B)保持不变。A β 1-40(图C)和A β 1-42(图D)两者随着高良姜精前体-1下降。对于同胞物种(siblings),所有仅为N=3。

[0072] 图10说明针对ASBI活性的分子-夹子模型。

[0073] 图11说明高良姜精前体(化合物2)的合成方案。

[0074] 详述

[0075] 在某些实施方案中鉴定抑制由新型机制介导的APP加工的 β -分泌酶的生物类黄酮类似物。特别地,据信这些分子抑制MBP-C125APP底物的BACE切割,导致抑制C99产生但不抑制 β -位点肽底物(P5-P5')。此外,本文鉴定的各种生物类黄酮及其类似物抑制神经母细胞瘤SHSY5Y细胞中的sAPP β 。此外证明抑制活性与结合至MBP-C125底物相关。因此,这些分子似乎为APP特定的BACE抑制剂(ASBI)并提供新的机制以调节APP加工。这些ASBI可用于治疗和/或预防特征为病理学APP加工(如,阿尔茨海默氏病、早发性阿尔茨海默氏病患诸如MCI或前症状的MCI等)的病理学。

[0076] ASBI至少为选择性的,似乎对APP底物为特异性的并且被认为示出较少不需要的副作用,因为ASBI通常针对酶的其它底物不具有活性。相对于 γ -分泌酶的抑制剂,除了APP之外的底物,诸如Notch,引起对 γ -分泌酶抑制的潜在副作用的关注,以及 γ -分泌酶抑制剂司马西特的最近失败用来加强这些关注。相似地,就BACE而言,例如,非APP底物诸如PSGL1或LRP的抑制可产生不利的副作用。因此,最佳的BACE抑制剂将为这样的抑制剂,其不结合于BACE但结合于APP,产生APP-特异性BACE抑制(ASBI)。

[0077] 不受特定理论的束缚据信此类ASBI将在膜处与APP或APP-BACE复合体(“无活性的”复合体)相互作用并防止其在早期体内中转变成“活性”复合体,其中在pH<5时,BACE为

完全活化的(参见,如,图10)。已示出一些 β -位点结合抗体阻断BACE对APP的切割,并且也在AD的动物模型中起作用,然而对于有效的药物形成,小有机分子通常优选相对大的生物分子诸如抗体。

[0078] 本文描述的鉴定第一ASBI的数据显示此种方法为可行的。APP-特异性-BACE-抑制剂(ASBI)抑制淀粉样前体蛋白(APP)的BACE切割但不会抑制其它底物的蛋白水解切割。此类治疗被认为表示新一类的阿尔茨海默氏病(或其它淀粉样疾病)治疗。

[0079] 最初筛选448种化合物的临床文库并且本测定导致单一生物类黄酮的鉴定,所述生物类黄酮特异性抑制BACE的MBP-C125底物而不会防止P5-P5'底物的切割。本生物类黄酮芸香苷(参见,如,图1)为也发现其抑制细胞中的sAPP β 的营养补充剂。然后在ASBI中测试一组生物类黄酮并在细胞培养中进行sAPP β 测定。本测试鉴定第二生物类黄酮高良姜精(参见,如图1),其为具有已知人类用途的在ASBI测定中为有效的并且在细胞中防止APP的BACE切割的另一营养补充剂。也已报道高良姜精为乙酰胆碱酯酶(AChE)的抑制剂。使用简单的硝酸纤维素滤膜配体-结合测定证明各种生物类黄酮与MBP-C125底物的最初结合。在ASBI测定中筛选一组生物类黄酮。芸香苷和高良姜精被鉴定为有效调节细胞中sAPP β 水平并示出与APP底物的结合(参见实施例1)。

[0080] 证明生物类黄酮能够抑制APP和APLP2的BACE切割。HEK-293测定用APP或APLP2-Gal4转染以获得该数据。本测定系统通过Orcholski等,(2011)J.Alzheimers Dis.,23(4):689-699描述。用Mint3和Taz转染后实现反式激活。预期ASBI仅抑制APP-Gal4的反式激活,而不会抑制APLP2-Gal4的反式激活。将这些实验细胞用Gal4-荧光素酶报告基因质粒(用于测量反式激活)、 β -半乳糖苷酶质粒(用于转染效率的归一化)共转染并鉴定测试质粒。将归一化的荧光素酶活性表示为对单独通过APP-Gal4转录的倍数诱导(图7A),或表示为单独通过APLP2-Gal4转录的倍数诱导(图7B)。在本测定中10 μ M高良姜精的初步测试示出其抑制APP-Gal4和APLP2-Gal4。

[0081] 这两种生物类黄酮在使用NTg小鼠的脑吸收测定中的最初药代动力学评估示出在sc剂量之后在10mpk时芸香苷不具有任何脑水平,而高良姜精确实示出显著的脑水平(在1h为40ng/g),因此使其能够在转基因(Tg)小鼠模型中评估概念验证研究。通过sc途径以100mpk处理Tg小鼠5天。然后评估高良姜精对sAPP α 和A β 40以及A β 42的作用(参见实施例1)。在本研究中A β 水平的减少非常令人鼓舞的。使用高良姜精的前药使高良姜精脑水平进一步增加是可能的(参见,如,图1)。

[0082] 本文提供的实施例指示某些生物类黄酮具有结合APP并且抑制APP和APLP2的BACE切割的能力因此表明它们为APP特异性BACE抑制剂。这些分子表示对于阿尔茨海默氏病的新一类的治疗,所述治疗将不含由于直接抑制BACE而产生的潜在毒性。在AD小鼠模型中高良姜精也示出可有效减少A β 40和A β 42。

[0083] 尽管芸香苷在小鼠模型中不是有效的,据信这是由于难于通过血脑屏障。然而,这并不意味着芸香苷及其衍生物或类似物不适合用于本文描述的方法。用于将分子运输通过血脑屏障和/或用于绕过血脑屏障的许多方法对本领域技术人员为已知的。

[0084] 通常药物在脑中靶向的机制涉及“通过”或“穿过”所述BBB。在各个实施方案中通过BBB进行药物递送的形式通过渗透方式;通过使用血管活性物质诸如缓激肽用生化地方式;或甚至通过局部暴露于高强度聚焦超声(HIFU)招致其破坏(参见,如,McDannold等,

(2008) *Ultrasound in Medicine and Biology*, 34 (5): 834-840)。用于通过BBB的其它方法可以需要使用内源运输系统,包括载体介导的转运蛋白诸如葡萄糖和氨基酸载体;受体介导的转胞吞作用;和主动外排转运蛋白诸如p-糖蛋白的阻断。用于将药物递送绕过BBB的方法也包括大脑内植入(诸如用针)和对流增强的分布。在某些实施方案中可将甘露醇绕过BBB使用。纳米粒子也可有助于使药物转移穿过BBB(参见,如, Silva, (2008). *BMC Neuroscience*, 9: S4等)。

[0085] 鉴于在高良姜精和芸香苷中发现的ASBI活性,据信相似活性存在于本文描述的许多其它的生物类黄酮类似物中。这些类似物中的任一者的特定ASBI活性可容易地使用例如,上文描述的测定进一步确定并在本文提供的实施例中说明。

[0086] 通过膜结合的蛋白酶 β -分泌酶和 γ -分泌酶的APP的相继切割导致形成A β 。 β -位点APP切割酶-1 (BACE1) 被鉴定为在 β -淀粉样途径中介导APP的首次切割的主要的 β -分泌酶活性。鉴于本文描述的ASBI化合物在APP特异性阻断BACE1活性的能力,据信(并且本文呈现的数据示出)这些ASBI化合物可降低A β 水平或防止毒害神经的A β 物质的形成。因此,这些化合物被认为预防疾病或减缓疾病的进展和/或预防淀粉样疾病途径或减缓淀粉样疾病途径的临床前表现的进展。

[0087] 因此据信可将这些试剂用于预防或延迟早发性阿尔茨海默氏认知功能障碍的发作,和/或改善早发性阿尔茨海默氏认知功能障碍的一种或多种症状,和/或预防或延迟早发性阿尔茨海默氏病患或认知功能障碍至阿尔茨海默氏病的进展,和/或通过非淀粉样途径促进淀粉样前体蛋白 (APP) 的加工。在某些实施方案中可将这些试剂用于治疗阿尔茨海默氏病(如,以减轻疾病的严重度,和/或以改善疾病的一种或多种症状,和/或以减缓疾病的进展)。

[0088] 治疗和预防方法。

[0089] 在多个实施方案中提供利用活性剂(如,ASBI诸如高良姜精、芸香苷及其类似物、衍生物或前药,或其互变异构体或立体异构体,或所述ASBI、所述立体异构体或所述互变异构体或其类似物、衍生物或前药的药学上可接受的盐或溶剂化物)的治疗和/或预防方法。通常所述方法包括向受试者(如,向需要其的人)施用足以实现所需治疗或预防结果的量的一种或多种活性剂。

[0090] 预防

[0091] 在某些实施方案中在各种预防环境中利用活性剂(如,ASBI诸如高良姜精、芸香苷及其类似物、衍生物或前药,或其互变异构体或立体异构体或所述ASBI、所述立体异构体或所述互变异构体或其类似物、衍生物或前药的药学上可接受的盐或溶剂化物)。因此,例如,在某些实施方案中,可将活性剂用于预防或延迟早发性阿尔茨海默氏认知功能障碍的发作,和/或改善早发性阿尔茨海默氏病患和/或认知功能障碍的一种或多种症状,和/或预防或延迟早发性阿尔茨海默氏病患和/或认知功能障碍至阿尔茨海默氏病的进展。

[0092] 因此在某些实施方案中,本文描述的预防方法被考虑用于鉴定为“处于风险中”和/或为具有早期阿尔茨海默氏病 (AD) 病理学变化的证据但未满足MCI或痴呆的临床标准的受试者。不受特定理论的束缚,据信甚至疾病的“临床前”阶段表示从处于进展至AD痴呆风险的具有指示AD-病理生理学过程(缩写为AD-P,参见,如, Sperling等, (2011) *Alzheimer's & Dementia*, 1-13)的生物标记证据的完全无症状的个体至已显示非常轻微的

下降但是尚未满足MCI的标准化标准的生物标记阳性个体(参见,如,Albert等,(2011) *Alzheimer's and Dementia*,1-10 (doi:10.1016/j.jalz.2011.03.008)的连续体。

[0093] 后一组个体可以被归类为“不正常的,未患有MCI”但可被指定为“症状前”或“临床前或“无症状的”或“预显示”)。在各个实施方案中症状前的AD的该连续体也可涵盖(1)已知或据信具有患有AD痴呆的增加了的风险的携带一个或多个载脂蛋白E (APOE) ϵ 4等位基因的个体,此时他们为AD-P生物标记阳性,以及(2)常染色体显性突变的携带者,所述携带者处于他们疾病的症状前的生物标记阳性阶段以及几乎将确实显示临床症状并向痴呆发展。

[0094] 已提出生物标记模型,其中AD-P的最广泛验证的生物标记变得异常并且也以有序的方式达到上限(参见,如,Jack等,(2010) *Lancet Neurol.*,9:119-128.)。本生物标记模型与提出的(AD前/AD)的病理生理学序列平行,并且与追踪AD的临床前(无症状)阶段相关(参见,如,在Sperling等,(2011) *Alzheimer's & Dementia*,1-13中的图3)。脑淀粉样变性的生物标记包括但不限于在正电子发射断层(PET)成像时CSF $A\beta_{42}$ 的减少和增加的淀粉样示踪物保留。升高的CSF tau对AD并非特异的并且被认为是神经元损伤的生物标记。具有代谢减退的颞顶图的PET时下降的氟脱氧葡萄糖18F (FDG)吸收为AD-相关的突触功能障碍的生物标记。在涉及内侧颞叶、旁边缘和颞顶皮质的特征图中结构磁共振成像(MRI)时的脑萎缩为AD-相关的神经变性的生物标记。其它标记包括但不限于体积MRI、FDG-PET或血浆生物标记(参见,如,Vemuri等,(2009) *Neurology*,73:294-301;Yaffe等,(2011) *JAMA* 305:261-266)。

[0095] 在某些实施方案中本文预期的适用于预防方法的受试者包括但不限于特征为患有无症状的大脑淀粉样变性的受试者。在各个实施方案中这些个体在PET淀粉样成像时具有含有升高的示踪物保留的 $A\beta$ 积聚的生物标记证据和/或在CSF测定中具有低的 $A\beta_{42}$,但是通常不存在指示神经变性或轻微的认知和/或行为症状学的其它的脑改变的可检测的证据。

[0096] 应当注意 $A\beta$ 的当前可用的CSF和PET成像生物标记主要提供淀粉样积聚和淀粉样的纤维状形式的沉积物的证据。数据表明 $A\beta$ 的可溶性或低聚物形式可能与斑块相平衡,所述斑块可以用作贮库。在某些实施方案中预期存在可辨认的斑块前(preplaque)阶段,其中仅存在 $A\beta$ 的可溶形式。在某些实施方案中预期淀粉样的低聚物形式在病理学级联反应中可能为关键的并且提供有用的标记。此外,在淀粉样积聚的证据之前可能存在早期的突触变化。

[0097] 在某些实施方案中本文预期的适用于预防方法的受试者包括但不限于特征为具有突触功能障碍和/或早期神经变性证据的淀粉样阳性的受试者。在各个实施方案中这些受试者具有淀粉样阳性和存在一个或多个“下游”AD-P-相关的神经元损伤的标记的证据。神经元损伤的示例性的但非限制性的标记包括但不限于(1)升高的CSF tau或磷酸化-tau,(2)FDG-PET时在AD-样谱图(即,后扣带、楔前叶和/或颞顶皮质)中的代谢减退,以及(3)在特异的组织分布(即,外侧和内侧顶叶、后扣带和外侧颞叶皮质)中的皮质变薄/灰质减少和/或体积MRI时的海马萎缩。其它标记包括但不限于默认网络连通性的fMRI测量。在某些实施方案中早期突触功能障碍,如通过功能成像技术诸如FDG-PET和fMRI进行评估,可在体积损失之前检测。不受特定理论的束缚,据信具有早期神经变性证据的淀粉样阳性个体可沿着轨迹进一步向下(即,在临床前(无症状的)AD)的后期)。

[0098] 在某些实施方案中本文预期的适用于预防方法的受试者包括但不限于特征为具

有神经变性和轻微认知减退的证据的淀粉样阳性的受试者。不受特定理论的束缚,据信具有淀粉样积聚、早期神经变性的生物标记证据和轻微认知减退的证据的那些个体处于临床前(无症状的)AD的后期,并且接近具有轻度认知障碍(MCI)的临床标准的边界区。这些个体可以证明即使他们在标准认知测量时仍在“正常”范围内进行,也从他们自己的基线(特别是如果考虑到代理人的认知储备)减退的证据。不受特定理论的束缚,据信更灵敏的认知测量,特别是具有挑战的情景记忆测量,可以检测淀粉样阳性个体中非常轻微的认知受损。在某些实施方案中标准包括但不限于记忆减退的自我抱怨或其它轻微的神经营为变化。

[0099] 如上所述,适于本文描述的预防方法的受试者/患者包括处于疾病的风险(如,特征为淀粉样斑块形成诸如MCI的病理)但未示出症状的个体以及目前示出某些症状或标记的受试者。已知MCI和以后的阿尔茨海默氏病的风险通常随着年龄而增加。因此,在某些实施方案中,在不具有其它已知风险因素的无症状的受试者中,针对年龄超过50岁的受试者、或年龄超过55岁的受试者或年龄超过60岁的受试者、或年龄超过65岁的受试者、或年龄超过70岁的受试者、或年龄超过75岁的受试者、或年龄超过80岁的受试者预期预防应用,特别是以防止或减缓轻度认知障碍(MCI)的发作或最终严重度,和/或减缓或防止MCI至早期阿尔茨海默氏病(AD)的进展。

[0100] 在某些实施方案中,本文描述的方法特别有益于这样的个体,无论他们是否为无症状的或是否示出疾病的症状,所述个体不具有已知的阿尔茨海默氏病的遗传风险(或其它淀粉样病理学)。这些个体包括亲戚已经历MCI或AD(如,父母亲、祖父母、兄弟姊妹)的那些以及通过遗传或生化标记的分析确定风险的那些。对阿尔茨海默氏病的风险的遗传标记包括,例如,APP基因中的突变,特别是在位置717以及位置670和671处分别被称为Hardy和Swedish突变的突变(参见Hardy (1997) Trends.Neurosci., 20:154-159)。其它风险标记包括早老蛋白基因(PS1和PS2)的突变、AD的家族史、具有家族阿尔茨海默氏病(FAD)突变、APOE ϵ 4等位基因、高胆固醇血症或动脉粥样硬化。如,在Sleegers等,(2010) Trends Genet. 26 (2):84-93中综述了患有阿尔茨海默氏病的其它易感基因

[0101] 在一些实施方案中,受试者为无症状的但是具有患有MCI或阿尔茨海默氏病的家族和/或遗传风险因素。在无症状的患者中,可在任何年龄(如,20岁、30岁、40岁、50岁)开始治疗。然而,通常,直至患者到达至少约40岁、50岁、60岁或70岁时才有必要开始治疗。

[0102] 在一些实施方案中,受试者显示出例如,轻度认知障碍(MCI)或阿尔茨海默氏病(AD)的症状。目前患有阿尔茨海默氏病的个体可从特征性痴呆以及存在上文描述的风险因素识别。此外,许多诊断测试可用于鉴定患有AD的个体。这些包括CSF Tau、磷酸化-tau (pTau)、A β 42水平和C-末端切割的APP片段(APPneo)的测量。升高的总-Tau (tTau)、磷酸化-Tau (pTau)、APPneo、可溶性A β 40、pTau/A β 42比率和tTau/A β 42比率以及降低的A β 42水平、A β 42/A β 40比率、A β 42/A β 38比率、sAPP α 水平、sAPP α /sAPP β 比率、sAPP α /A β 40比率和sAPP α /A β 42比率表示存在AD。在一些实施方案中,受试者或患者被诊断为患有MCI。尿中升高水平的神经丝蛋白(NTP)和/或血浆中升高水平的 α 2-巨球蛋白(α 2M)和/或补体因子H(CFH)也为MCI和/或AD的生物标记(参见,如,Anoop等,(2010) Int.J.Alzheimer's Dis. 2010: 606802)。

[0103] 在某些实施方案中,适于治疗的受试者可能具有年龄相关的记忆受损(AAMI)或轻度认知障碍(MCI)。本文描述的方法特别适合MCI的预防和/或治疗。在这些情况下,所述方

法可延迟或防止MCI的发作,和或减少MCI的一种或多种症状特征和/或延迟或防止从MCI至早、中或晚期阿尔茨海默氏病的进展或减少所述疾病的最终严重度。

[0104] 轻度认知障碍 (MCI)

[0105] 轻度认知障碍 (MCI, 也称为初期痴呆或孤立的记忆缺陷) 为给予个体的诊断, 所述个体具有除了对他们的年龄及教育期待之外的认知受损, 但通常不会显著干扰他们的日常活动 (参见, 如, Petersen等, (1999) Arch. Neurol. 56 (3) : 303-308)。在许多情况下它被认为是正常衰老与痴呆之间的边界或过渡阶段。尽管MCI可呈现多种症状, 但当记忆丧失为主要的症状时, 它被称为“遗忘性MCI”并且经常被视为阿尔茨海默氏病的风险因素 (参见, 如, Grundman等, (2004) Arch. Neurol. 61 (1) : 59-66; 以及网址为 en.wikipedia.org/wiki/Mild_cognitive_impairment-cite_note-Grundman-1)。当个体在除了记忆之外的结构域中具有受损时, 经常将其分类为非遗忘的单个-或多个-结构域MCI并且认为这些个体更可能转化成其它痴呆 (如具有路易小体的痴呆)。存在证据表明当遗忘性MCI患者可能未满足阿尔茨海默氏病的神经病理学标准时, 患者可能处于发展性阿尔茨海默氏病的过渡阶段; 在该假设过渡阶段中的患者证明新皮质中的扩散淀粉样和内侧颞叶中惯常的神经纤维缠结 (参见, 如, Petersen等, (2006) Arch. Neurol. 63 (5) : 665-72)。

[0106] MCI的诊断通常涉及综合的临床评估, 包括临床观察、神经成像、血液测试和神经心理学测试。在某些实施方案中MCI的诊断标准包括但不限于由Albert等, (2011) Alzheimer's & Dementia. 1-10描述的那些。如其中所述, 诊断标准包括 (1) 可由保健提供者不利用先进的成像技术或脑脊液分析使用的核心临床标准, 以及 (2) 可在临床研究设置 (包括临床试验) 中使用的研究标准。第二套标准掺入使用基于成像和脑脊液测量的生物标记。由于AD引起的轻度认知障碍的最后一组标准具有四个确定性等级, 取决于是否存在生物标记发现及其性质。

[0107] 在某些实施方案中MCI的临床评估/诊断包括: (1) 由患者或被调查者或临床医生报道的反映认知变化的问题 (即, 随着时间的推移减退的历史性证据或观察到的证据); (2) 一个或多个认知域中受损的客观证据, 通常包括记忆 (即, 正式测试或床旁测试以建立多域中的认知功能水平); (3) 保存功能性能力中的独立性; (4) 未痴呆的; 以及在某些实施方案中, (5) 与AD病理生理学过程一致的MCI病原学。通常在可能的情况下排除认知减退的血管、创伤、医学原因。在某些实施方案中, 当可行时, 鉴定认知纵向减退的证据。在相关的情况下, 通过与AD遗传因素一致的病史加强诊断。

[0108] 相对于认知域中的受损, 应存在与人的先前水平相比关于认知变化的证据。应在一个或多个认知域中存在降低表现的证据, 其大于将对患者的年龄和教育背景所期望的表现。如果可用重复的评估, 那么随着时间的推移表现的减退应为明显的。该变化可在多种认知域中出现, 包括记忆、执行功能、注意力、语言和视觉空间技能。情景记忆 (即, 学习且保留新信息的能力) 的受损在MCI患者中被视为最常见的, 所述MCI患者随后发展为AD痴呆的诊断。

[0109] 相对于保存功能性能力的独立性, 应当注意患有MCI的人通常具有进行复杂功能性任务的轻微的问题, 他们使用所述复杂功能性任务进行购物。他们可能花费比过去更多的时间、比过去效率低以及在进行此类活动时产生比过去更多的错误。然而, 他们通常保持日常生活中功能的独立性, 具有最小的帮助或协助。

[0110] 相对于痴呆,认知变化应足够轻微,在社会或职业功能中不存在显著受损的证据。如果个体仅被评估过一次,那么变化将从病史和/或受损的认知表现超出已对该个体期望的表现的证据推断。

[0111] 对于客观评估个体的认知受损度,认知测试为最佳的。患有MCI个体的认知测试得分通常为低于针对文化上适当的常模性资料他们的年龄和教育匹配的同龄人的平均值1至1.5个标准差(即,针对受损结构域,当可用时)。

[0112] 情景记忆(即,学习和保留新信息的能力)为MCI患者中最常见的,所述MCI患者随后发展至AD痴呆的诊断。存在多种可用于鉴定在几年内具有高的可能性发展至AD痴呆的那些MCI患者的情景记忆测试。这些测试通常评估立即的和延迟的回忆,使得可能确定延迟期间的保留。已证明可用于这方面的许多(尽管不是所有)测试为具有多个试验的词汇表学习测试。此类测试显示随着时间的推移学习的速率,以及随着学习试验的进程获得的最大量。它们也可用于显示事实上个体注意立即回忆的任务,所述立即回忆然后可被用作基线以评估在延迟回忆时保留的材料相对量。此类测试的实例包括(但不限于:自由和线索选择性回忆测试(Free and Cued Selective Reminding Test)、雷伊听觉言语学习测试(Rey Auditory Verbal Learning Test)和加州言语学习测试(California Verbal Learning Test)。其它情景记忆测量包括但不限于:段落的即时的和延迟的回忆诸如修订的韦氏记忆量表(或其它版本)的逻辑记忆I和II以及非言语材料的即时的和延迟的回忆,诸如韦氏记忆量表-修订的I和II的视觉再生分测验。

[0113] 因为在患有MCI的个体中的其它认知域可受损,需要检查除了记忆之外的域。这些包括但不限于执行功能(如,定势转换(set-shifting)、推理、解决问题、计划)、语言(如,命名、流畅、表情言语和理解)、视觉空间技能和注意控制(如,简单和分散注意)。许多临床神经心理测量可用于评估这些认知域,包括(但不限于连线测试(Trail Making Test)(执行功能)、波士顿命名测试(Boston Naming Test)、字母和归类流畅性(语言)、图复制(空间技能)和前向数字广度(注意力)。

[0114] 如上所述,可将遗传因素掺入MCI的诊断中。如果已知AD的常染色体显性形式为存在的(即,APP、PS1、PS2的突变),那么形成MCI最可能为AD痴呆的前兆。这些病例的大多数形成早发型AD(即,小于65岁发作)。

[0115] 此外,存在形成迟发型AD痴呆的遗传影响。例如,在载脂蛋白E(APOE)基因中存在的一个或两个 $\epsilon 4$ 等位基因为广泛接受为晚发型AD痴呆的渐增风险的遗传变体。证据表明满足MCI的临床、认知和病因学标准的个体,并且也为APOE $\epsilon 4$ 阳性、在几年内比不含该遗传特征的个体更可能发展至AD痴呆。据信其它基因起到重要的,但是比APOE小的作用并且也赋予进展至AD痴呆的风险的变化(参见,如,Bertram等,(2010)Neuron,21:270-281)。

[0116] 在某些实施方案中适用于本文描述的预防方法的受试者包括但不必限于鉴定为具有上文描述的一个或多个核心临床标准的受试者和/或鉴定具有一个或多个如,如下所述的针对MCI的“研究标准”的受试者。

[0117] 针对MCI的鉴定/预后的“研究标准”包括但不限于增加MCI综合征是由于AD的病理生理学过程的可能性的生物标记。不受特定理论的束缚,据信临床标准和生物标记的共同应用可导致MCI综合征是归因于AD病理生理学过程的各种水平的确定性。在某些实施方案中,已经对两种类别的生物标记进行了最大的研究并考虑应用于临床结果。这些包括“AB”

(其包括CSF $A\beta_{42}$ 和/或PET淀粉样成像)和“神经元损伤的生物标记”(其包括但不限于CSF tau/p-tau, MRI时的海马的或内侧颞叶萎缩以及PET或SPECT时的颞顶/楔前叶代谢减退或灌注不足)。

[0118] 不受特定理论的束缚, 据信 $A\beta$ 和神经元损伤 (tau/p-tau的增加或AD的地形图特征中成像生物标记的增加) 两者的证据一起赋予存在AD病理生理学过程的最高的可能性。相反地, 如果这些生物标记为阴性的, 这可以提供关于替代诊断可能性的信息。意识到生物标记发现可能为矛盾的并且因此任何生物标记组合为指示的(鉴别诊断的上下文中使用的指示剂) 并且非本身决定性的。意识到异常的不同严重程度可以赋予不同的可能性或预后, 其难以对广泛应用进行精确定量。

[0119] 对于临床和认知MCI综合征与如病原学的AD一致的那些潜在的MCI受试者, 生物标记分析的添加产生诊断中确定性的水平。在其中已建立MCI的临床和认知综合征的最典型的实例中, 包括情景记忆病症和假定的变性病原学的证据, 最可能的原因为AD的神经变性过程。然而, 最后的结果仍然具有确定性的可变量。进展至AD痴呆的可能性将随着认知减退的严重程度和表明AD病理生理学为根本原因的证据的性质而变化。不受特定理论的束缚, 据信反映神经元损伤的阳性生物标记增加将在几年内发生进展至痴呆的可能性以及反映 $A\beta$ 积聚和神经元损伤两者的阳性发现一起赋予诊断为归于AD的MCI的最高可能性。

[0120] 阳性 $A\beta$ 生物标记和神经元损伤的阳性生物标记提供MCI综合征是归因于AD过程的指示以及受试者正好适合于本文描述的方法。

[0121] 在其中还未测试或不能测试神经元损伤生物标记的情况中的阳性 $A\beta$ 生物标记或在其中还未测试或不能测试 $A\beta$ 生物标记的情况下的神经元损伤的阳性生物标记指示MCI综合征是归因于AD的中间事件的可能性。这些受试者被认为正好适合于本文描述的方法。

[0122] 对于 $A\beta$ 和神经元损伤两者的阴性生物标记表明MCI综合征不是归因于AD。在这些情况下受试者可能不正好适合于本文描述的方法存在磁共振成像可观察从轻度认知障碍至完全病发性阿尔茨海默氏病的退化, 包括脑中的灰质逐渐丧失的证据(参见, 如, Whitwell等, (2008) *Neurology* 70 (7):512-520)。使用选择性结合这些沉积物的C11示踪物, 称为PiB PET成像的技术被用于清楚地示出活性受试者中 β 淀粉样沉积物的位点和形状(参见, 如, Jack等, (2008) *Brain* 131 (Pt 3):665-680)。

[0123] 在某些实施方案中, 当存在以下时通常诊断为MCI: 1) 记忆缺陷的证据; 2) 一般认知和功能能力的保存; 和3) 不存在诊断痴呆。

[0124] 在某些实施方案中可部分通过临床痴呆评定(CDR) 分数鉴定/分类MCI和阿尔茨海默氏病的阶段。CDR为用于表征适用于阿尔茨海默氏病和相关痴呆的认知和功能表现的六个域的五点量表: 记忆、定位、判断&解决问题、公众事务、家&爱好和个人护理。进行每个评分的必要信息通过患者和可靠的被调查者或旁系源(如, 家族成员)的半结构式访谈获得。

[0125] CDR表提供基于访谈数据和临床判断引导临床医生进行适当的评定的描述性锚。除了对每个域的评定, 总体CDR分数可以通过使用算法计算。该分数用于表征和追踪患者的受损/痴呆水平: 0=正常; 0.5=非常轻微的痴呆; 1=轻微的痴呆; 2=中度痴呆; 和3=严重痴呆。示例性的CDR表示于表1。

[0126] 表1. 示例性的临床痴呆评定量(CDR) 表。

[0127]

受损: CDR:	无 0	可疑的 0.5	轻微的 1	中度的 2	严重的 3
记忆	无记忆丧失或轻微的不一致的健忘	一致的轻微的健忘;事件的“良性”健忘的部分回忆	中度记忆丧失;对最近事件为更显著的;缺陷干扰日常活动	严重的记忆丧失;仅保留高度学习的材料;新材料丢失迅速	严重的记忆丧失;仅保留片段
定位	完全定位	除了因时间关系轻微的困难之外的完全定位	因时间关系的中度难度;在检查时对地方定位;在别处可以具有地理方向障碍	因时间关系的严重难度;通常对时间,经常对地方无判断力。	仅定位人
判断&解决问题	很好地解决日常问题&处理业务&财务;关于过去表现判断优良	在解决问题、相似性和差异中轻微受损	在处理问题、相似性和差异中中度难度;社会判断通常保持	在处理问题、相似性和差异中严重受损;社会判断通常受损	不能做出判断或解决问题
公众事务	在工作、购物、志愿者和社会团体中在通常水平独立行使职责	在这些活动中轻微受损	尽管仍可以参与一些活动,但在这些活动中不能独立地行使职责;随机检查似乎正常	在家外面不能假装独立行使职责 在家之外似乎还足以行使职责	在家之外似乎太差而不能行使职责。
家和爱好	很好地保持在家的生活、爱好和知识兴趣	在家的生活、爱好和知识兴趣略微受损	在家时功能的轻微的很小的明确的受损;抛弃了	仅保存了简单的杂物;不良地保持非常受限的兴	在家无显著的功能

[0128]

受损: CDR:	无 0	可疑的 0.5	轻微的 1	中度的 2	严重的 3
			较困难的杂务;抛弃了较复杂的爱好和兴趣	趣	
个人护理	完全能够自我护理		需要提示	在穿衣、卫生、私人用品的保管中需要帮助	个人护理需要大量帮助;经常失禁

[0129] 约0.5或约0.5至1.0的CDR评定经常被认为与MCI临床上相关。较高的CDR评定可表明至阿尔茨海默氏病的进展。

[0130] 在某些实施方案中,当CSF中一个或多个选自Tau、phospho-Tau (pTau)、APPneo、可溶性Aβ40、可溶性Aβ42、和/或Aβ42/Aβ40比率的组分的水平减少时和/或当受试者的脑中斑

块负载减少时和/或当受试者的脑中斑块形成的速率减少时和/或当受试者的认知能力存在改善时,和/或当受试者的生活质量存在感知到的改善时和/或当临床痴呆评定(CDR)中存在显著的减少时和/或当临床痴呆评定的增加速率减缓或停止时和/或当从MCI至早期AD的进展减缓或停止时,施用本文描述的一种或多种试剂(如,ASBI诸如高良姜精、芸香苷及其类似物、衍生物或前药或其互变异构体或立体异构体或所述ASBI、所述立体异构体或所述互变异构体或其类似物、衍生物或其前药的药学上可接受的盐或溶剂化物)被认为有效的。

[0131] 在一些实施方案中,MCI的诊断可通过考虑若干临床测试的结果确定。例如,Grundman等,Arch Neurol (2004) 61:59-66报道可使用建立客观记忆缺失(一般认知的量度(简易精神状态检查表(MMSE),在下文更详细地讨论))以排除记忆之外更广泛的认知减退的简单记忆测试(片段回忆),以及使用验证患者的记忆抱怨和记忆丧失并且确保患者未精神错乱的患者和看护人的结构化临床访谈(CDR),用临床效率建立MCI的诊断。患有MCI的患者在包括在电池中的非记忆认知量度时平均表现出低于正常的小于1的标准差(SD)。学习、注意力、感知速度、类别流畅性和执行功能的测试可能在患有MCI的患者中受损,但这些远不如记忆缺失突出。

[0132] 阿尔茨海默氏病(AD)。

[0133] 在某些实施方案中活性剂(如,ASBI诸如高良姜精、芸香苷及其类似物、衍生物或前药或其互变异构体或立体异构体或所述ASBI、所述立体异构体或所述互变异构体或其类似物、衍生物、或前药的药学上可接受的盐或溶剂化物)和/或其制剂被考虑用于治疗阿尔茨海默氏病。在这些情况下本文描述的方法可用于防止或减缓阿尔茨海默氏病(AD)的发作,当受试者已过渡至临床AD诊断时减少AD的严重度和/或减轻阿尔茨海默氏病的一种或多种症状。

[0134] 特别地,当阿尔茨海默氏病为早期时,所述方法可减少或消除AD的一种或多种症状特征和/或延迟或防止从MCI至早期或后期阿尔茨海默氏病的进展。

[0135] 目前患有阿尔茨海默氏病的个体可由特有的痴呆以及存在上文描述的风险因素识别。此外,许多诊断测试可用于鉴定患有AD的个体。目前患有阿尔茨海默氏病的个体可由特有的痴呆以及存在上文描述的风险因素识别。此外,许多诊断测试可用于鉴定患有AD的个体。这些包括CSF Tau、磷酸化-tau (pTau)、sAPP α 、sAPP β 、A β 40、A β 42水平和/或C末端切割的APP片段(APPneo)的测量。特别是在鉴别诊断的上下文中,升高的Tau、pTau、sAPP β 和/或APPneo和/或降低的sAPP α 、可溶性A β 40和/或可溶性A β 42水平,可表明AD的存在。

[0136] 在某些实施方案中适于治疗的受试者可以具有阿尔茨海默氏病。患有阿尔茨海默氏病的个体也可通过阿尔茨海默氏病和相关病症协会(ADRDA)标准诊断。NINCDS-ADRDA阿尔茨海默氏病标准在1984年由美国国立神经障碍与中风研究所以及阿尔茨海默氏病和相关病症协会(目前称为阿尔茨海默氏病协会(Alzheimer's Association))提出并且在阿尔茨海默氏病(AD)的诊断中用的最多。McKhann等,(1984)Neurology 34(7):939-44。根据这些标准,认知受损和疑似的痴呆综合征的存在应通过用于可能的或大概的AD的临床诊断的神经心理学测试确认。然而,组织病理学确认(脑组织的显微镜检查时)通常用于决定性的诊断。NINCDS-ADRDA阿尔茨海默氏病标准指定在AD中可能受损的八个认知域:记忆、语言、感知技能、注意力、构建能力、定位、解决问题和功能能力)。这些标准已示出优良的可靠

性和有效性。

[0137] 患者功能的基线评估可使用经典的心理测验测量,诸如简易精神状态检查表(MMSE) (Folstein等,(1975) J.Psychiatric Research 12 (3) :189-198) 和阿尔茨海默氏病评估(ADAS),其为用于评估患有阿尔茨海默氏病状态和功能的患者的综合量表进行(参见,如,Rosen等,(1984) Am.J.Psychiatr.,141:1356-1364)。这些心理测验量表提供阿尔茨海默氏病病患的进展的量度。适合的定性生活量表也可用于监测治疗。疾病进展的程度可使用简易精神状态检查表(MMSE) 确定(参见,如,Folstein等,同上)。大于或等于25点的任何分数(在30点中)为有效正常的(完整的)。这以下,分数可指示严重的(≤ 9 点)、中度的(10-20点)或轻微的(21-24点)阿尔茨海默氏病。

[0138] 可将阿尔茨海默氏病分解成不同阶段,包括:如示于表2中的1) 中度的认知减退(轻微的或早期阿尔茨海默氏病),2) 中度地严重认知减退(中度或中期阿尔茨海默氏病),3) 严重的认知减退(中度地严重或中期阿尔茨海默氏病),以及4) 非常严重的认知减退(严重的或晚期阿尔茨海默氏病)。

[0139] 表2.阿尔茨海默氏病的示例性阶段。

[0140]

中度的认知减退(轻微的或早期AD)	
	在本阶段，仔细的医学访谈在以下领域检测出清晰的缺陷： 最近事件的知识的减少。 进行挑战心算的能力受损。例如，7s从100反向计数。 进行复杂任务的能力降低，诸如营销、为客人设计晚餐或买单和理财。 个人史的记忆的减少。 受影响的个体似乎可能沉默寡言的并且孤僻的，特别是在社会或精神挑战的情况下。
中度严重的认知减退(中度或中期阿尔茨海默氏病)	
	记忆中出现重要缺口以及认知功能中出现缺陷。日常活动的一些帮助成为必要的。在本阶段，个体可以： 在医学访谈期间不能回忆起诸如他们当前的地址、他们的电话号码、他们毕业的大学或高中的名字的重要细节。 对他们在哪或关于日期、周几或季节变得困惑。 对于较小挑战性的心算具有困难；例如，4s从40反向计数或2s从20反向计数。 对于季节或场合选择适当的服装上需要帮助。 通常保留关于本身的大量知识并知道他们自己的名字以及他们配偶或子女的名字。 在进食或使用盥洗室时通常不需要帮助。
严重的认知减退(中度严重或中期阿尔茨海默氏病)	
	记忆困难继续恶化，可能出现显著的人格改变以及受影响的个体在日常活动中需要大量的帮助。在本阶段，个体可能： 对最近经历和事件以及他们的环境失去大部分意识。 不完全地回忆他们的个人史，尽管他们通常回忆他们自己的名字。 偶尔忘记他们配偶的或主要照顾者的名字但是通常可把熟悉的面孔和不熟悉的面孔区分开来。 穿衣需要适当地帮助；无监护时，可能或出现诸如把睡衣穿成白天衣服或穿错鞋的错误。 经历他们正常睡眠/睡醒周期的破坏。 处理盥洗室的细节上需要帮助(冲洗厕所、正确地擦拭和处理卫生纸)。 增加的大小便失禁的发作。 经历显著的个性变化和行爲症状，包括疑心和妄想(例如，认为他们的照顾者为冒充者)；幻觉(看见或听到不在那的事物)；或诸如搓手或撕纸中的强制的、重复的行为。 易于徘徊并变得迷失。
非常严重的认知减退(严重的或晚期阿尔茨海默氏病)	
	当个体失去对环境反应的能力、讲话的能力以及最后控制运动的能力时，这是该疾病的末期。

[0141]

经常地, 个体失去可辨认的讲话的能力, 尽管可以偶尔发出词语或短语。

个体在进食时和上厕所时需要帮助并且存在通常的失禁。

在无帮助时个体失去行走的能力, 然后失去无支撑的就坐的能力、微笑的能力以及支撑自己头的能力。

条件反射变得异常的并且肌肉变得僵硬。吞咽受损。

[0142] 在各个实施方案中, 当CSF中一个或多个选自Tau、磷酸化-Tau (pTau)、APPneo、可溶性Aβ40、可溶性Aβ42、和/或以及Aβ42/Aβ40比率的组分的水平减少时和/或当受试者的脑中斑块负载减少时和/或当受试者的脑中斑块形成的速率减少时和/或当受试者的认知能力存在改善时, 和/或当受试者的生活质量存在感知到的改善时和/或当受试者的临床痴呆评定 (CDR) 中存在显著的减少时和/或当临床痴呆评定的增加速率减缓或停止时和/或当AD的进展减缓或停止时 (如, 当从一个阶段至如表3列出的另一阶段的过渡减缓或停止时), 向诊断患有阿尔茨海默氏病的受试者施用本文描述的一种或多种试剂被认为有效的。

[0143] 在某些实施方案中适于本方法的受试者通常不含除了阿尔茨海默氏病之外的神经疾病或病症。例如, 在某些实施方案中, 所述受试者不具有诸如帕金森病、和/或精神分裂症、和/或精神病的神经疾病或病症或未处于患上诸如帕金森病、和/或精神分裂症、和/或精神病的神经疾病或病症的风险中。

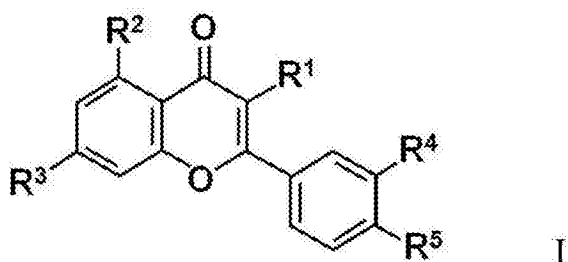
[0144] 活性剂。

[0145] 本文描述的方法部分基于以下发现: 施用一种或多种活性剂如, ASBI诸如高良姜精、芸香苷及其类似物、衍生物或前药可用于治疗和/或预防特征为脑中淀粉样沉积物的疾病, 例如, 轻度认知功能障碍、阿尔茨海默氏病、黄斑变性等。

[0146] 生物类黄酮。

[0147] 在某些实施方案中本文描述的方法中使用的活性剂包含类黄酮, 诸如高良姜精或芸香苷或其衍生物和/或类似物。在某些实施方案中所述类黄酮由式I表征:

[0148]



[0149] 其中R¹选自OH、O-糖、O-烷基、O-三氟甲基、O-芳基、O-杂芳基; R⁴和R⁵独立地选自H、OH、NH₂、O-烷基、O-三氟甲基、S-烷基、S-芳基、羧酸酯、卤素、NH-烷基、N,N-二烷基、NHCO-烷基和杂芳基、烷基脲以及氨基甲酸酯; 并且R²和R³独立地选自H、OH、NH₂、O-烷基、O-三氟甲基、S-烷基、S-芳基、羧酸酯、卤素、NH-烷基、N,N-二烷基、NHCO-烷基、杂芳基、烷基脲以及氨基甲酸酯。

[0150] 在某些实施方案中R²和/或R³为OH。在某些实施方案中R²为OH并且R³为OH。在某些实施方案中R²和/或R³独立地选自O-烷基、S-烷基、NH-烷基和NHCO-烷基。在某些实施方案中O-烷基、S-烷基、NH-烷基和NHCO-烷基的所述烷基组分为C₁₋₁₂烷基或C₁₋₉烷基或C₁₋₆烷基或C₁₋₃烷基。在某些实施方案中R²和/或R³为卤素。在某些实施方案中R²为卤素并且R³为卤素。

在某些实施方案中 R^2 和/或 R^3 独立地选自Cl、Br、F和I。在某些实施方案中 R^2 和/或 R^3 选自S-芳基和杂芳基。在某些实施方案中 R^2 和 R^3 独立地选自S-芳基。在某些实施方案中 R^2 和 R^3 独立地选自杂芳基。在某些实施方案中 R^4 和/或 R^5 为OH。在某些实施方案中 R^4 为H并且 R^5 为OH或 R^4 为OH并且 R^5 为H。在某些实施方案中 R^4 为OH并且 R^5 为OH。在某些实施方案中 R^4 和/或 R^5 为H。在某些实施方案中 R^4 为H并且 R^5 为H。在某些实施方案中当 R^4 和/或 R^5 为OH时, R^1 为O-糖。在某些实施方案中 R^4 和/或 R^5 独立地选自O-烷基、S-烷基、NH-烷基和NHCO-烷基。在某些实施方案中 R^4 和 R^5 独立地选自O-烷基、S-烷基、NH-烷基和NHCO-烷基。在某些实施方案中O-烷基、S-烷基、NH-烷基和NHCO-烷基的所述烷基组分为 C_{1-12} 烷基或 C_{1-9} 烷基或 C_{1-6} 烷基或 C_{1-3} 烷基。在某些实施方案中 R^4 和/或 R^5 为卤素。在某些实施方案中 R^4 为卤素并且 R^5 为卤素。在某些实施方案中 R^4 和/或 R^5 独立地选自Cl、Br、F和I。在某些实施方案中 R^4 和/或 R^5 选自S-芳基和杂芳基。在某些实施方案中 R^4 和 R^5 独立地选自杂芳基。在某些实施方案中 R^1 为O-糖(如,O-单糖、O-二糖、O-三糖等)。在某些实施方案中 R^1 为O-烷基、O-三氟甲基、O-芳基或O-杂芳基。

[0151] 在某些实施方案中APP特异性BACE抑制剂为高良姜精或其衍生物。在某些实施方案中APP特异性BACE抑制剂为芸香苷或其衍生物。

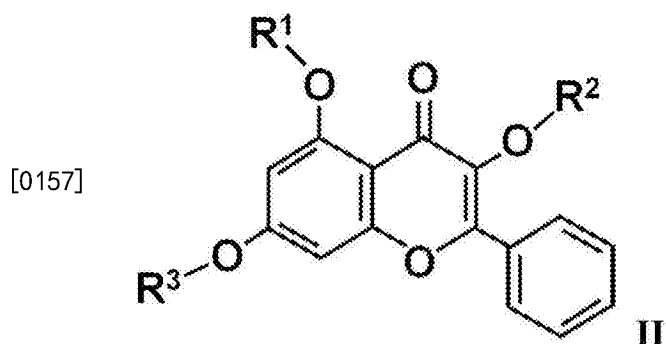
[0152] 本文预期的制备高良姜精和/或芸香苷和/或其各种衍生物的方法对本领域的技术人员为已知的。高良姜精和芸香苷两者可以以某些衍生物商购获得。

[0153] 使用本领域技术人员熟知的方法,可进一步官能化这些化合物以制备本文描述的各种衍生物和类似物。例如使用各种商购获得的二羟基-2-苯基-4H-色烯-4-酮,实施例2中描述的程序将用于合成类似物。至乙酰氧基的转化将如实施例2中所述进行。将使用二甲基过氧化酮的处理以转化成3-羟基黄酮。可用弱碱进行进一步水解以去除乙酰氧基保护基团,黄酮衍生物的粗混合物可通过快速色谱和重结晶纯化以获得所需的黄酮类似物。

[0154] 类黄酮前药。

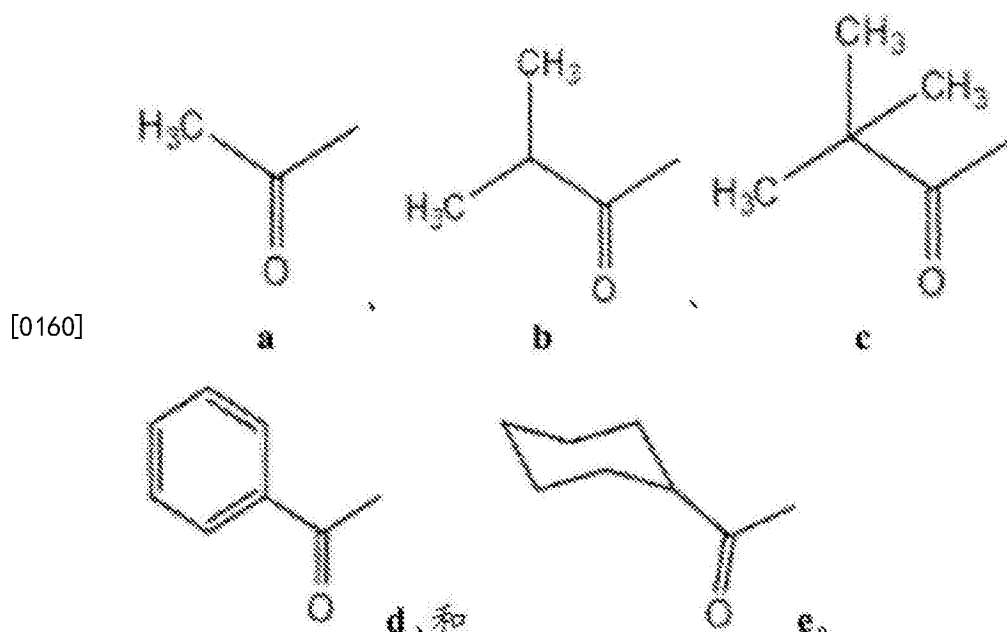
[0155] 在某些实施方案中预期本文描述的各种类黄酮可以类黄酮前药提供。示例性的高良姜精前药示于图2。

[0156] 在某些实施方案中所述前药为由式II表征的高良姜精前药:



[0158] 其中 R^1 、 R^2 和 R^3 为H或在哺乳动物体内去除的保护基团,其中 R^1 、 R^2 、和 R^3 中的至少一者不为H;并且当施用于哺乳动物时其中所述前药部分或全部地抑制APP的BACE加工。

[0159] 在某些实施方案中 R^1 、 R^2 和 R^3 中的至少一者独立地选自 R^1 、 R^2 和 R^3 中的至少一者独立地选自



[0161] 在某些实施方案中 R^1 为H。在某些实施方案中 R^2 为以上的基团a并且 R^3 为以上的基团a、b、c、d或e。在某些实施方案中 R^3 为以上的基团a,并且 R^2 为以上的基团a、b、c、d或e。在某些实施方案中, R^2 和 R^3 均为以上的基团a。

[0162] 在某些实施方案中 R^1 为H。在某些实施方案中 R^2 为以上的基团b,并且 R^3 为以上的基团a、b、c、d或e。在某些实施方案中 R^3 为以上的基团b,并且 R^2 为以上的基团a、b、c、d或e。在某些实施方案中, R^2 和 R^3 均为以上的基团b。

[0163] 在某些实施方案中 R^1 为H。在某些实施方案中 R^2 为以上的基团c,并且 R^3 为以上的基团a、b、c、d或e。在某些实施方案中 R^3 为以上的基团c,并且 R^2 为以上的基团a、b、c、d或e。在某些实施方案中, R^2 和 R^3 均为以上的基团c。

[0164] 在某些实施方案中 R^1 为H。在某些实施方案中 R^2 为以上的基团d,并且 R^3 为以上的基团a、b、c、d或e。在某些实施方案中 R^3 为以上的基团d,并且 R^2 为以上的基团a、b、c、d或e。在某些实施方案中, R^2 和 R^3 均为以上的基团d。

[0165] 在某些实施方案中 R^1 为H。在某些实施方案中 R^2 为以上的基团e,并且 R^3 为以上的基团a、b、c、d或e。在某些实施方案中 R^3 为以上的基团e,并且 R^2 为以上的基团a、b、c、d或e。在某些实施方案中, R^2 和 R^3 均为以上的基团e。

[0166] 本文描述的制备诸如高良姜精前药的方法对本领域的技术人员为已知的。

[0167] 一种此类方案在实施例2中进行了说明(参见图11中用于合成化合物2的合成方案)。

[0168] 各种活性剂和合成方案旨为示例性的并且为非限制性的。使用本文提供的教导可合成许多其它类黄酮、类黄酮衍生物和类黄酮前药ASBI化合物并且可通过本领域技术人员鉴定。

[0169] 药物制剂。

[0170] 在某些实施方案中本文描述的一种或多种活性剂(如,ASBI诸如高良姜精、芸香苷及其类似物、衍生物或前药,或其互变异构体或立体异构体或所述ASBI、所述立体异构体或所述互变异构体或其类似物、衍生物或前药的药学上可接受的盐或溶剂化物)向有需要的

哺乳动物,如,向处于特征为淀粉样前体蛋白异常加工的病理风险的哺乳动物或患有特征为淀粉样前体蛋白异常加工的病理的哺乳动物,处于MCI进展至阿尔茨海默氏病风险的哺乳动物等施用。在某些实施方案中施用活性剂以预防或延迟早发性阿尔茨海默氏病患和/或认知功能障碍的发作、和/或以改善早发性阿尔茨海默氏认知功能障碍的一种或多种症状、和/或以预防或延迟早发性阿尔茨海默氏病患或认知功能障碍至阿尔茨海默氏病的进展、和/或通过非淀粉样途径以促进淀粉样前体蛋白(APP)的加工。

[0171] 活性剂可以以“天然的”形式或,如果需要,以盐、酯、酰胺、前药、衍生物等形式施用,条件是所述盐、酯、酰胺、前药或衍生物为药理上适合的,即,在本方法中为有效的。活性剂的盐、酯、酰胺、前药和其它衍生物可使用合成有机化学领域中的技术人员已知的标准程序制备并例如,通过3月(1992)Advanced Organic Chemistry;Reactions,Mechanisms and Structure,第四版.N.Y.Wiley-Interscience描述,以及如上所述。

[0172] 例如,可制备药学上可接受的盐用于本文描述的具有能够形成盐的官能团的任何试剂。药学上可接受的盐为保留母体化合物活性的任何盐并且不对被施用其的受试者和在其施用的环境中产生任何另外的有害或不利作用的任何盐。

[0173] 在多个实施方案中药学上可接受的盐可以来源于有机或无机碱。所述盐可以为单价或多价离子。特别关注的是无机离子,锂离子、钠离子、钾离子、钙离子和镁离子。可以用胺,特别是铵盐诸如单-、二-和三烷基胺或乙醇胺制备有机盐。也可以用咖啡因、氨丁三醇和相似的分子形成盐。

[0174] 配制如盐、酯、酰胺、前药等药物活性剂的方法对本领域技术人员为熟知的。例如,盐可使用通常涉及与适合的酸反应的常规方法由游离碱制备。通常,药物的碱形式溶解在诸如甲醇或乙醇的极性有机溶剂中并将酸添加至其中。所得盐或者沉淀或可通过添加极性较小的溶剂从溶液中提取出来。用于制备酸加成盐的适合的酸包括但不限于有机酸,如,乙酸、丙酸、乙醇酸、丙酮酸、草酸、苹果酸、丙二酸、琥珀酸、马来酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸、水杨酸等,以及无机酸,如,盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等。通过用适合的碱处理酸加成盐可被再转化成游离碱。本文活性剂的某些特别优选的酸加成盐包括卤盐,诸如可以使用盐酸或氢溴酸制备。相反地,本发明活性剂的碱式盐的制备使用药学上可接受的碱诸如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙、三甲胺等以相似的方式制备。特别优选的碱性盐包括碱金属盐,如钠盐和铜盐。

[0175] 对于制备碱性药物的盐形式,平衡离子的pKa优选为比药物的pKa低至少约2个pH单位。相似地,对于制备酸性药物的盐形式,平衡离子的pKa优选为比药物的pKa高至少约2个pH单位。这允许平衡离子将溶液的pH带至比pH_{max}低的水平以达到盐平台期,此时盐的溶解度胜过游离酸或游离碱的溶解度。活性药学成分(API)和在酸或碱中的可电离基团的pKa单位的差异的广义规则意在使质子转移积极有利的。当API与平衡离子的pKa差异不显著时,在水环境中可以形成固体络合物但可能迅速比例失调(即,分解成药物和平衡离子的个体实体)。

[0176] 优选地,平衡离子为药学上可接受的平衡离子。适合的阴离子盐形式包括但不限于乙酸盐、苯甲酸盐、苄酸盐(benzylate)、酒石酸氢盐、溴化物、碳酸盐、氯化物、柠檬酸盐、乙二胺四乙酸盐、乙二磺酸盐、丙酸酯十二烷基硫酸盐(estolate)、富马酸盐、葡庚糖酸盐、葡糖酸盐、氢溴酸盐、盐酸盐、碘化物、乳酸盐、乳糖醛酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、扁桃酸盐、

甲磺酸盐、甲基溴、甲基硫酸盐、粘酸盐、萘磺酸盐、硝酸盐、双羟萘酸盐 (pamoate) (双羟萘酸盐 (embonate))、磷酸盐和磷酸氢盐、水杨酸盐和双水杨酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、甲苯磺酸盐、三乙基碘、戊酸盐等,而适合的阳离子盐形式包括但不限于铝盐、苄星青霉素 (benzathine)、钙盐、乙二胺、赖氨酸、镁盐、葡甲胺、钾盐、普鲁卡因 (procaine)、钠盐、氨三丁醇、锌盐等。

[0177] 酯的制备通常包括活性剂的分子结构内存在的羟基和/或羧基的官能化。在某些实施方案中,酯通常为游离醇基团的酰基-取代的衍生物,即,来源于式 RCOOH 的羧酸部分,其中 R 为烷基,并且优选为低级烷基。如果需要,可通过使用常规的氢解或水解过程将酯再转化成游离酸。

[0178] 也可使用本领域技术人员已知的技术或相关文献中描述的技术制备酰胺。例如,可以使用适合的胺反应物由酯制备酰胺或它们可以通过与氨或低级烷基胺反应由酸酐或酰氯制备。

[0179] 在各个实施方案中,本文鉴定的活性剂(如,ASBI诸如高良姜精、芸香苷及其类似物、衍生物或前药或其互变异构体或立体异构体或所述ASBI、所述立体异构体或所述互变异构体或其类似物、衍生物、或前药的药学上可接受的盐或溶剂化物)可用于胃肠外施用、局部施用、口服施用、鼻施用(或其它吸入)、直肠施用或局部施用(诸如通过气溶胶或透皮)用于预防和/或治疗性治疗本文描述的一个或多个病理学/指示(如,病理学特征为过量的淀粉样斑块形成和/或沉积物或不需要的淀粉样或前淀粉样加工)。

[0180] 本文描述的活性剂也可与药学上可接受的载体(赋形剂)组合以形成药理学组合物。药学上可接受的载体可含有一种或多种生理上可接受的化合物,其起到,例如,稳定组合物或以增加或降低活性剂吸收的作用。生理上可接受的化合物可包括,例如,碳水化合物,诸如葡萄糖、蔗糖、或葡聚糖,抗氧化剂,诸如抗坏血酸或谷胱甘肽,螯合剂,低分子量蛋白质,保护和吸收增强剂诸如脂质,减少活性剂的清除或水解的组合物,或活性剂或赋形剂或其它稳定剂和/或缓冲液。

[0181] 其它生理上可接受的化合物,特别是在片剂、胶囊剂、胶帽等制备中使用的化合物包括但不限于粘合剂、稀释剂/填充剂、崩解剂、润滑剂、悬浮剂等。

[0182] 在某些实施方案中,将制造的口服剂型(如,片剂)、赋形剂(如,乳糖、蔗糖、淀粉、甘露醇等)、任选崩解剂(如碳酸钙、羧甲基纤维素钙、羧甲基淀粉钠、交联聚维酮等)、粘合剂(如 α -淀粉、阿拉伯树胶、微晶纤维素、羧甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基纤维素、环糊精等)和任选润滑剂(如,滑石、硬脂酸镁、聚乙二醇6000等),例如,添加至活性组分或组分(如,ASBI诸如高良姜精、芸香苷及其类似物、衍生物或前药或其互变异构体或立体异构体或所述ASBI、所述立体异构体或所述互变异构体或其类似物、衍生物或前药的药学上可接受的盐或溶剂化物)并将所得组合物进行压缩。必要时如,使用用于掩蔽味道或用于肠溶或缓释的已知方法对压缩产物进行包衣。适合的包衣材料包括但不限于乙基纤维素、羟甲基纤维素、POLYOX® yethylene glycol、邻苯二甲酸乙酸纤维素、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯和Eudragit (Rohm&Haas, Germany; 甲基丙烯酸-丙烯酸共聚物)。

[0183] 其它生理上可接受的化合物包括润湿剂、乳化剂、分散剂或特别有用于防止微生物的生长或作用的防腐剂。各种防腐剂为熟知的并且包括,例如,苯酚和抗坏血酸。本领域技术人员将理解药学上可接受的载体的选择,包括生理上可接受的化合物取决于,例如,活

性剂的施用途和活性剂的特定物理-化学特征。

[0184] 在某些实施方案中所述赋形剂为无菌的并且通常不含不合需要的物质。这些组合可通过常规的、熟知的杀菌技术杀菌。对于各种口服剂型赋形剂诸如片剂和胶囊剂,不需要杀菌。USP/NF标准通常为足够的。

[0185] 根据施用方法药物组合物可以多种单位剂型施用。适合的单位剂型包括但不限于粉剂、片剂、丸剂、胶囊剂、锭剂、栓剂、贴剂、鼻喷雾剂、注射剂(injectable)、可植入的缓释制剂、粘着薄膜(mucoadherent film)、局部清漆、脂质复合体等。

[0186] 包含本文描述的活性剂的药学组合物(如,ASBI诸如高良姜精、芸香苷及其类似物、衍生物或前药或其互变异构体或立体异构体或所述ASBI、所述立体异构体或所述互变异构体或其类似物、衍生物或前药的药学上可接受的盐或溶剂化物)可通过常规混合、溶解、制粒、包糖衣、磨细、乳化、包裹、包埋或冻干方法制造。可使用一种或多种生理上可接受的载体、稀释剂、赋形剂或促进把活性剂加工至药学上可使用的制剂中的助剂以常规方式配制药学组合物。恰当的制剂取决于选择的施用途。

[0187] 在某些实施方案中,本文描述的活性剂经配制用于口服施用。对于口服施用,可通过将活性剂与适合于本领域熟知的口服递送的药学上可接受的载体组合容易地配制适合的制剂。此类载体使得本文描述的活性剂能够被配制成片剂、丸剂、糖衣丸、囊片、锭剂(lizenge)、软胶囊、胶囊剂、液体、凝胶、糖浆剂、膏剂、悬浮剂等用于待治疗患者的口服摄入。对于诸如,例如,粉剂、胶囊剂和片剂的口服固体制剂,适合的赋形剂可包括填充剂诸如糖(如,乳糖、蔗糖、甘露醇和山梨醇)、纤维素制剂(如,玉米淀粉、小麦淀粉、米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄蓍胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟甲基纤维素钠)、合成聚合物(如,聚乙烯吡咯烷酮(PVP))、粒化剂;和结合剂。如果需要,可以添加崩解剂,诸如交联的聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或海藻酸或其盐诸如海藻酸钠。如果需要,使用标准的技术可以对固体剂型包有糖衣或包有肠溶衣。包有肠溶衣的粒子的制备公开于例如美国专利No.4,786,505和4,853,230。

[0188] 对于通过吸入施用,用适合的推进剂,如,二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它适合的气体以来自加压的包裹或喷雾器的喷雾剂的形式方便地递送活性剂。就加压的气雾剂而言,可通过提供递送测定量的阀确定剂量单位。可以配制如用于吸入器或吹入器的明胶的胶囊剂和药筒,其含有化合物和适合的粉末基质诸如乳糖或淀粉的粉末混合物。

[0189] 在多个实施方案中可将活性剂配制成诸如,如含有常规的栓剂基质(诸如可可脂或其它甘油酯)的栓剂或保留灌肠的直肠或阴道组合物。配制用于直肠或阴道递送的活性剂的方法对本领域的技术人员为熟知的(参见,如,Allen(2007) Suppositories, Pharmaceutical Press)并且通常包括将活性剂与适合的基质(如,亲水的(PEG)、亲脂材料诸如可可脂或Witepsol W45)、两亲性材料诸如Suppocire AP和聚乙二醇化甘油酯(polyglycolized glyceride)等)组合。针对所需的熔解/递送特性选定且混合基质。

[0190] 对于局部施用,可将本文描述的活性剂(如,ASBI诸如高良姜精、芸香苷、及其类似物、衍生物或前药或其互变异构体或立体异构体或所述ASBI、所述立体异构体或所述互变异构体或其类似物、衍生物或前药的药学上可接受的盐或溶剂化物)配制成本领域熟知的溶液、凝胶、软膏、乳膏、悬浮剂等。

[0191] 在某些实施方案中根据本领域技术人员熟知的标准将本文描述的活性剂配制用于全身施用(如,作为血管注射剂)。全身性制剂包括但不限于设计用于通过注射,如皮下、静脉内、肌内、囊内或腹膜内注射施用的那些以及设计用于透皮、粘膜口服或肺部施用的那些。对于注射,可将本文描述的活性剂配制成水溶液,优选生理上相容的缓冲液诸如Hanks溶液、林格氏溶液或生理盐水缓冲液和/或某些乳液制剂。溶液可含有诸如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂的配方试剂。在某些实施方案中活性成分可呈粉剂形式提供,用于在使用前用适当的媒介物(例如无菌无热原水)配制。对于粘膜施用和/或对于血/脑屏障通道,可在制剂中使用适于待渗透屏障的渗透剂。此类渗透剂通常为本领域已知的。可注射的制剂和可吸入的制剂通常以无菌的或基本上无菌的制剂提供。

[0192] 除了先前描述的制剂之外,也可以将活性剂配制成贮库制剂。此类长效制剂可通过植入(例如皮下地或肌内)或通过肌内注射施用。因此,例如,可以用适合的聚合物材料或疏水性材料(例如在可接受的油中作为乳剂)或离子交换树脂配制活性剂,或作为微溶的衍生物,例如,作为微溶的盐。

[0193] 在某些实施方案中使用常规的透皮药物递送系统也可将本文描述的活性剂递送通过皮肤,即,透皮“贴剂”,其中活性剂通常被包含在层合结构中,所述层合结构作为待固定至皮肤的药物递送装置。在此类结构中,药物组合物通常被包含在上背层下面的层或“贮库”中。应理解在该环境中的术语“贮库”是指大量的“活性成分”,所述活性成分最终可用于递送至皮肤表面。因此,例如,“贮库”可以包括在贴剂背层的粘合剂中或本领域技术人员已知的任何各种不同的基体制剂中的活性成分。所述贴剂可以含有单一贮库或它可以含有多个贮库。

[0194] 在一个示例性实施方案中,贮库包括在药物递送期间用来将系统固定至皮肤的药学上可接受的接触型粘合材料的聚合物基体。适合的皮肤接触粘合材料的实例包括但不限于聚乙烯、聚硅氧烷、聚异丁烯、聚丙烯酸酯、聚氨酯等。或者,含有药物的贮库和皮肤接触粘合剂以单独且独特的层存在,同时粘合剂在贮库的下面,在这种情况下,所述贮库可以为如上所述的聚合物基体,或可以为液体或水凝胶贮库,或可以呈现一些其它形式。在这些层压制品中的背层优选作为“贴剂”的主要结构元素发挥作用并且为装置提供许多柔性,所述背层用作装置的上表面。选定用于背层的材料优选对活性剂和存在的任何其它材料基本上不可渗透的。

[0195] 或者,可使用其它药学递送系统。例如,脂质体、乳剂和微乳剂/纳米乳为递送媒介物的熟知的实例,所述递送媒介物可以用于保护和递送药物活性化合物。也可使用某些有机溶剂诸如二甲基亚砷,尽管经常在较大毒性的代价下。

[0196] 在某些实施方案中将本文描述的活性剂(如,ASBI诸如高良姜精、芸香苷及其类似物、衍生物或前药或其互变异构体或立体异构体或所述ASBI、所述立体异构体或所述互变异构体或其类似物、衍生物或前药的药学上可接受的盐或溶剂化物)配制成纳米乳。纳米乳包括但不限于水包油(O/W)纳米乳和油包水(W/O)纳米乳。纳米乳可被定义为平均液滴直径范围为约20至约1000nm的乳剂。通常,平均液滴尺寸为约20nm或50nm至约500nm。术语次微米乳剂(SME)和小型-乳剂被用作同义的。

[0197] 示例性的水包油(O/W)纳米乳包括但不限于:表面活性剂胶束--由小分子表面活性剂或洗涤剂组成的胶束(如,SDS/PBS/2-丙醇);聚合物胶束--由聚合物、共聚物或嵌段共

聚物表面活性剂组成的胶束(如,Pluronic L64/PBS/2-丙醇);共混的胶束--其中存在不止一种表面活性剂组分或其中液相中的一者(通常为醇或脂肪酸化合物)参与胶束胶束的形成(如,辛酸/PBS/EtOH);整合胶束--其中活性剂用作辅助的表面活性剂,形成胶束的整合部分的共混的胶束;和皮克林(Pickering)(固相)乳剂--其中活性剂与固体纳米粒子的外部缔合的乳剂(如,聚苯乙烯纳米粒子/PBS/无油相)。

[0198] 示例性的油包水(W/O)纳米乳包括但不限于:表面活性剂胶束--由小分子表面活性剂或洗涤剂组成的胶束(如,磺基琥珀酸二辛酯/PBS/2-丙醇、肉豆蔻酸异丙酯/PBS/2-丙醇等);聚合物胶束--由聚合物、共聚物或嵌段共聚物表面活性剂组成的胶束(如,PLURONIC® L121/PBS/2-丙醇);共混的胶束--其中存在不止一种表面活性剂组分或其中液相中的一者(通常为醇或脂肪酸化合物)参与胶束的形成(如,癸酸/辛酸甘油二酯/PBS/EtOH);整合胶束--其中活性剂用作辅助的表面活性剂,形成胶束的整合部分的共混的胶束(如,活性剂/PBS/聚丙二醇);和皮克林(固相)乳剂--其中活性剂与固体纳米粒子的外部缔合的乳剂(如,壳聚糖纳米粒子/无水相/矿物油)。

[0199] 如上所述,在某些实施方案中纳米乳包含一种或多种表面活性剂或洗涤剂。在一些实施方案中表面活性剂为非阴离子洗涤剂(如,聚山梨醇酯表面活性剂、聚氧乙烯醚等)。用于本发明的表面活性剂包括但不限于诸如化合物的TWEEN®、TRITON®和TYLOXAPOL®家族的表面活性剂。

[0200] 在某些实施方案中乳剂还包含含有一个或多个阳离子卤素的化合物,包括但不限于西吡氯铵。在又另外的实施方案中,组合物还包含增强组合物与微生物的相互作用的一种或多种化合物(“相互作用增强剂”)(如,缓冲液中的螯合剂像乙二胺四乙酸或亚乙基双(氧乙烯次氨基)四乙酸)。

[0201] 在一些实施方案中,纳米乳还包含乳化剂以帮助乳剂的形成。乳化剂包括在油/水界面聚集以形成一种连续的膜的化合物,所述膜防止两个相邻液滴之间直接接触。本发明的某些实施方案以可以容易地用水稀释至所需浓度而不会损害它们的抗病原性质的水包油乳剂组合物为特征。

[0202] 除了分散在水相中的分离的油液滴之外,某些水包油乳剂还可含有其它脂质结构,诸如小的脂囊泡(如,经常由若干基本上同中心的通过水相层彼此分离的脂双层组成的脂质球)、胶束(如,以50-200个分子排列的一小簇两亲性分子使得极性头基向外朝向水相并且非极性尾部向内分开远离水相)或层状相(其中每个粒子由通过水薄膜分离的平行两亲性双层组成的脂质分散体)。

[0203] 由于驱动非极性残基(如,长烃链)远离水的疏水作用力形成这些脂质结构。以上脂质制备通常可被描述成表面活性剂脂质制备(SLP)。SLP对粘膜具有最小毒性并且被认为在小肠内代谢(参见如,Hamouda等,(1998)J.Infect.Disease 180:1939)。

[0204] 在某些实施方案中乳剂包含分布在水相中的不连续的油相,第一组分包含醇和/或甘油,并且第二组分包含表面活性剂或含有卤素的化合物。水相可包含任何类型的水相,包括但不限于水(如,去离子水、蒸馏水、自来水)和溶液(如,磷酸盐缓冲盐溶液或其它缓冲系统)。油相可包含任何类型的油,包括但不限于,植物油(如,大豆油、鳄梨油、亚麻油、椰子油、棉籽油、角鲨烯油、橄榄油、芥花油、玉米油、油菜籽油、红花油和葵花油)、动物油(如,鱼油)、风味油、水不溶性维生素、矿物油和机油。在某些实施方案中,油相包含30-90体积%的

水包油乳剂(即,构成最终乳剂的总体积的30-90%),更优选为50-80%。无需将制剂限制于特定的表面活性剂。然而,在某些实施方案中,表面活性剂为聚山梨醇酯表面活性剂(如,TWEEN 20®、TWEEN 40®、TWEEN 60®和TWEEN 80®)、苯氧基聚乙氧基乙醇(如,TRITON® X-100、X-301、X-165、X-102和X-200以及TYLOXAPOL®)或十二烷基硫酸钠等。

[0205] 在某些实施方案中存在含有卤素的组分。取决于含有卤素的化合物的性质,在一些优选的实施方案中含有卤素的化合物包含氯化盐(如,NaCl、KCl等)、十六烷基卤化吡啶、十六烷基三甲基卤化铵、十六烷基二甲基乙基卤化铵、十六烷基二甲基苄基卤化铵、十六烷基三丁基卤化膦、十二烷基三甲基卤化铵、十四烷基三甲基卤化铵、西吡氯铵、十六烷基三甲基氯化铵、十六烷基苄基二甲基氯化铵、十六烷基溴化吡啶、十六烷基三甲基溴化铵、十六烷基二甲基乙基溴化铵、十六烷基三丁基溴化膦、十二烷基三甲基溴化铵、十四烷基三甲基溴化铵等。

[0206] 在某些实施方案中乳剂包含季铵化合物。季铵化合物包括但不限于N-烷基二甲基苄基铵糖精盐、1,3,5-三嗪-1,3,5(2H,4H,6H)-三乙醇;1-癸铵,N-癸基-N,N-二甲基-,氯化物(或)二癸基二甲基氯化铵;2-(2-(对-(二异丁基)甲苯氧基(cresosxy))乙氧基)乙基二甲基苄基氯化铵;2-(2-(对-(二异丁基)苯氧基)乙氧基)乙基二甲基苄基氯化铵;烷基1或3苄基-1-(2-羟乙基)-2-氯化咪唑啉;烷基双(2-羟乙基)苄基氯化铵;烷基去甲基苄基氯化铵;烷基二甲基3,4-二氯苄基氯化铵(100%C12);烷基二甲基3,4-二氯苄基氯化铵(50%C14,40%C12,10%C16);烷基二甲基3,4-二氯苄基氯化铵(55%C14,23%C12,20%C16);烷基二甲基苄基氯化铵;烷基二甲基苄基氯化铵(100%C14);烷基二甲基苄基氯化铵(100%C16);烷基二甲基苄基氯化铵(41%C14,28%C12);烷基二甲基苄基氯化铵(47%C12,18%C14);烷基二甲基苄基氯化铵(55%C16,20%C14);烷基二甲基苄基氯化铵(58%C14,28%C16);烷基二甲基苄基氯化铵(60%C14,25%C12);烷基二甲基苄基氯化铵(61%C11,23%C14);烷基二甲基苄基氯化铵(61%C12,23%C14);烷基二甲基苄基氯化铵(65%C12,25%C14);烷基二甲基苄基氯化铵(67%C12,24%C14);烷基二甲基苄基氯化铵(67%C12,25%C14);烷基二甲基苄基氯化铵(90%C14,5%C12);烷基二甲基苄基氯化铵(93%C14,4%C12);烷基二甲基苄基氯化铵(95%C16,5%C18);烷基二甲基苄基氯化铵(和)二癸基二甲基氯化铵;烷基二甲基苄基氯化铵(如在脂肪酸中);烷基二甲基苄基氯化铵(C12-C16);烷基二甲基苄基氯化铵(C12-C18);烷基二甲基苄基和二烷基二甲基氯化铵;烷基二甲基二甲基苄基氯化铵;烷基二甲基乙基溴化铵(90%C14,5%C16,5%C12);烷基二甲基乙基溴化铵(如在大豆的脂肪酸中的混合的烷基和烯基);烷基二甲基乙基苄基氯化铵;烷基二甲基乙基苄基氯化铵(60%C14);烷基二甲基异丙基苄基氯化铵(50%C12,30%C14,17%C16,3%C18);烷基三甲基氯化铵(58%C18,40%C16,1%C14,1%C12);烷基三甲基氯化铵(90%C18,10%C16);烷基二甲基(乙基苄基)氯化铵(C12-18);二-(C8-10)-烷基二甲基氯化铵;二烷基二甲基氯化铵;二烷基二甲基氯化铵;二烷基二甲基氯化铵;二烷基甲基苄基氯化铵;二癸基二甲基氯化铵;二异癸基二甲基氯化铵;二辛基二甲基氯化铵;十二烷基双(2-羟乙基)辛基氢氯化铵;十二烷基二甲基苄基氯化铵;十二烷基氨基甲酰基甲基二甲基苄基氯化铵;十七烷基羟乙基氯化咪唑啉;六氢化-1,3,5-三(2-羟乙基)-s-三嗪;肉豆蔻基二甲基苄基氯化铵(myristalkonium chloride)(和)Quat RNIUM 14;N,N-二甲基-2-羟基丙基氯化

铵聚合物;正烷基二甲基苄基氯化铵;正烷基二甲基乙基苄基氯化铵;正十四烷基二甲基苄基氯化铵一水合物;辛基癸基二甲基氯化铵;辛基十二烷基二甲基氯化铵;辛基苯氧基乙氧基乙基二甲基苄基氯化铵;氧二亚乙基双(烷基二甲基氯化铵);季铵化合物、二椰油烷基二甲基氯化物;三甲氧基硅基丙基二甲基十八烷基氯化铵;三甲氧基硅基季铵盐、三甲基十二烷基苄基氯化铵;正十二烷基二甲基乙基苄基氯化铵;正十六烷基二甲基苄基氯化铵;正十四烷基二甲基苄基氯化铵;正十四烷基二甲基乙基苄基氯化铵;和正十八烷基二甲基苄基氯化铵。

[0207] 纳米乳制剂和制备这些的方法对本领域技术人员为熟知的并且描述在例如美国专利No:7,476,393、7,468,402、7,314,624、6,998,426、6,902,737、6,689,371、6,541,018、6,464,990、6,461,625、6,419,946、6,413,527、6,375,960、6,335,022、6,274,150、6,120,778、6,039,936、5,925,341、5,753,241、5,698,219、d5,152,923和在Fanun等,(2009) Microemulsions:Properties and Applications (Surfactant Science),CRC Press,Boca Ratan Fl。

[0208] 在某些实施方案中,可将本文描述的一种或多种活性剂提供为如,在准备用以稀释的储存容器(如,在预先测量的体积)中,或在准备用于添加一定量的水、醇、过氧化氢或其它稀释剂的可溶性胶囊中的“浓缩液”。

[0209] 缓释(extended release)(持续释放(sustained release))制剂。

[0210] 在某些实施方案中考虑本文描述的活性剂的“缓释”制剂。在各个实施方案中设计此类缓释制剂以避免静脉内的高峰血浆水平和常规即释口服剂型。

[0211] 示例性的持续释放制剂包括,例如,含有治疗剂的固体聚合物的半渗透基体。已建立持续释放材料的各种用途并且所述用途为本领域技术人员熟知的。取决于它们的化学性质,持续释放胶囊可以在几周至高达超过100天释放化合物。取决于治疗剂的化学性质和生物稳定性,可使用用于稳定的其它策略。

[0212] 在某些实施方案中此类“缓释”制剂利用粘膜并且可独立地控制片剂崩解(或侵蚀)和/或药物随着时间推移从所述片剂的溶出和释放以提供更安全的递送特性。在某些实施方案中本文描述的活性剂的口服制剂(如,ASBI诸如高良姜精、芸香苷及其类似物、衍生物或前药,或其互变异构体或立体异构体,或所述ASBI、所述立体异构体或所述互变异构体或其类似物、衍生物或前药的药学上可接受的盐或溶剂化物)提供单次的、重复的剂量,所述剂量包括在确定量的时间内递送确定量的活性剂。

[0213] 一种示例性缓释制剂为基本上均质的组合物,所述组合物包含约0.01%至约99% w/w、或约0.1%至约95%、或约0.1%、或约1%、或约2%、或约5%、或约10%、或约15%、或约20%至约80%、或至约90%、或至约95%、或至约97%、或至约98%、或至约99%的活性成分(如,ASBI诸如高良姜精、芸香苷及其类似物、衍生物或前药或其互变异构体或立体异构体,或所述ASBI、所述立体异构体或所述互变异构体或其类似物、衍生物或前药的药学上可接受的盐或溶剂化物)和一种或多种粘膜粘附剂(在本文也称为“生物粘附剂”),所述粘膜粘附剂提供至受试者(患者)的靶向粘膜的粘附并且还可以包含以下的一种或多种:单一片剂中提供赋形剂结合的一种或多种粘合剂;一种或多种形成水凝胶的赋形剂;一种或多种膨胀剂;一种或多种润滑剂;一种或多种助流剂;一种或多种增溶剂;一种或多种表面活性剂;一种或多种调味剂;一种或多种崩解剂;一种或多种缓冲赋形剂;一种或多种包衣剂;

一种或多种控释调节剂;和一种或多种调节和控制药物的溶出或崩解时间和动力学或保护活性药物免于降解的其它赋形剂和因子。

[0214] 在多个实施方案中用于口腔粘膜递送的持续释放药药剂型可为固体或非固体。在一个优选的实施方案中,剂型为在与唾液接触之后变成水凝胶的固体。

[0215] 适合的赋形剂包括但不限于添加至需要产生商品的制剂的物质并且可包括但不限于:膨胀剂、粘合剂、表面活性剂、生物粘附剂、润滑剂、崩解剂、稳定剂、增溶剂、助流剂和影响溶出或崩解时间的添加剂或因子。适合的赋形剂不限于以上那些,以及用于口服制剂的其它适合的无毒的药理学上可接受的载体可见于Remington's Pharmaceutical Sciences,第17版,1985。

[0216] 在某些实施方案中本文描述的用于口腔粘膜药物递送的活性剂的缓释制剂包括至少一种生物粘附(粘膜粘附)剂或若干生物粘附剂的混合物以促进药物递送期间至口腔粘膜的粘附。此外,当剂型润湿时,所述生物粘附剂也可以有效控制剂型侵蚀时间和/或药物随着时间推移的溶出动力学。此类粘膜粘附药物递送系统为非常有益的,因为它们可延长药物在吸收位点的停留时间并增加药物的生物利用度。形成水凝胶的粘膜粘附聚合物通常为亲水的和可膨胀的,其含有许多有利于粘附的形成氢键的基团,像羟基、羧基或胺。当以干燥形式使用时,它们从粘膜表面吸收水分并膨胀,产生通过氢键、静电相互作用、疏水性相互作用或范德华相互作用的聚合物/粘液相互作用。

[0217] 示例性的适合的粘膜粘附或生物粘附材料包括但不限于天然的、合成的或生物聚合物、脂质、磷脂等。天然的和/或合成的聚合物的实例包括纤维素衍生物(诸如甲基纤维素、羧甲基纤维素、羟乙基纤维素、羟乙基甲基纤维素等)、天然树胶(诸如瓜尔豆胶、黄原胶、刺槐豆胶、刺梧桐树胶、硫酸镁铝(veegum)等)、聚丙烯酸酯(诸如CARBOPOL®、聚卡波菲等)、藻酸盐、含有硫醇的聚合物、POLYOX® yethylene、所有分子量的聚乙二醇(PEG)(优选地1000至40,000Da的任何化学,直链或支链)、所有分子量的葡聚糖(优选1000至40,000Da的任何来源)、嵌段共聚物,诸如通过乳酸和乙醇酸的组合(各种粘度、分子量和乳酸-至-乙醇酸比率的PLA、PGA、PLGA)制备的那些、任何数目的聚乙二醇-聚丙二醇嵌段共聚物和重复单元的组合物(诸如PLURONICS®、TEKTRONIX®或GENAPOL®嵌段共聚物)、以上共聚物的物理或化学连接单元的混合物的组合(例如PEG-PLA或PEG-PLGA共聚物)。优选地,生物粘附赋形剂选自以下:聚乙二醇、POLYOX® yethylene、聚丙烯酸聚合物,诸如CARBOPOL®(诸如CARBOPOL® 71G、934P、971P、974P等)和聚卡波菲(诸如NOVEON® AA-1、NOVEON® CA-1、NOVEON® CA-2等),纤维素及其衍生物并且最优选为聚乙二醇、卡波普、和/或纤维素衍生物或其组合。

[0218] 在某些实施方案中粘膜粘附/生物粘附赋形剂通常以1-50%w/w、优选1-40%w/w或最优选5-30%w/w存在。特定的制剂可以含有一种或多种任何组合的不同的生物粘附剂。

[0219] 在某些实施方案中用于口腔粘膜药物递送的制剂还包括粘合剂或两种或更多种粘合剂的混合物,所述粘合剂促进赋形剂至单一剂型的结合。示例性的粘合剂选自纤维素衍生物(诸如甲基纤维素、羧甲基纤维素、羟乙基纤维素、羟乙基甲基纤维素等)、聚丙烯酸酯(诸如CARBOPOL®、聚卡波菲等)、POVIDONE®(所有等级)、任何分子量或等级、辐射或非辐射的POLYOX®、淀粉、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、AVICEL®等。在某些实施方

案中粘合剂通常以0.5-60%w/w,优选1-30%w/w并且最优选1.5-15%w/w存在。

[0220] 在某些实施方案中制剂还包含至少一种形成水凝胶的赋形剂。示例性的形成水凝胶的赋形剂选自聚乙二醇和具有乙二醇主链的其它聚合物,无论为均聚物或交联的杂聚物、使用乙二醇单元的嵌段共聚物,诸如POLYOX® polyethylene均聚物(诸如POLYOX® N10/MW=100,000 POLYOX®-80/MW=200,000; POLYOX® 1105/MW=900,000; POLYOX®-301/MW=4,000,000; POLYOX®-303/MW=7,000,000, POLYOX® WSR-N-60K,其全部为Union Carbide的商标名),所有分子量和等级的羟丙基甲基纤维素(HPMC)(诸如METOLOSE® 90SH50000、METOLOSE® 90SH30000,其全部为Shin-Etsu Chemical公司的商标名),泊洛沙姆(诸如LUTROL® F-68、LUTROL® F-127、F-105等,所有商标名为BASF Chemical), GENAPOL®,聚乙二醇(PEG,诸如PEG-1500、PEG-3500、PEG-4000、PEG-6000、PEG-8000、PEG-12000、PEG-20,000等),天然树胶(黄原胶、刺槐豆胶等)和纤维素衍生物(HC、HMC、HMPC、HPC、CP、CMC),游离的或交联的及其组合的基于聚丙烯酸的聚合物,生物可降解的聚合物诸如聚乳酸、聚乙醇酸及其任意组合(无论为物理共混或交联的)。在某些实施方案中,水凝胶组分可以为交联的。形成水凝胶的赋形剂通常以0.1-70%w/w,优选1-50%w/w或最优选1-30%w/w存在。

[0221] 在某些实施方案中制剂还可以包括至少一种控释调节剂,所述调节剂为这样的物质,剂型水合时将优先粘附药物分子因此降低其由口服剂型扩散的速率。此类赋形剂也可以降低制剂的水吸收速率,因此可实现较为延长的药物溶出和从片剂的释放。通常选择的赋形剂为亲脂性的并且能够自然复合至疏水性或亲脂性药物。释放调节剂和药物的解离度可通过改变制剂中调节剂-至-药物比率而改变。此外,此类相互作用可以通过制造过程中释放调节剂与活性药物的适当组合而适当地增强。或者,控释调节剂可以为合成的带电聚合物或具有正或负净电荷的生物聚合物,其能够经由静电相互作用结合至活性位点,因此调节其通过片剂扩散和/或其通过粘膜表面渗透的动力学。类似于以上提及的其它化合物,此类相互作用为可逆的并且不会涉及与活性位点的永久化学键。在某些实施方案中控释调节剂通常可以以0-80%w/w,优选地1-20%w/w,最优选1-10%w/w存在。

[0222] 在多个实施方案中缓释制剂还可以包括形成口服剂型必需的其它常规组分,其为本领域技术人员熟知的。这些组分可以包括一种或多种膨胀剂(诸如乳糖USP、Starch 1500、甘露醇、山梨醇、麦芽糖醇或其它非还原糖;微晶纤维素(如, AVICEL®)、磷酸氢钙、蔗糖及其混合物)、至少一种增溶剂(诸如环糊精、pH调节剂、盐和缓冲液、表面活性剂、脂肪酸、磷脂、脂肪酸金属等)、金属盐和缓冲液有机物(诸如乙酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐等)或无机物(磷酸盐、碳酸盐、碳酸氢盐、硼酸盐、硫酸盐、亚硫酸盐、亚硫酸氢盐、偏亚硫酸氢盐、氯化物等)、金属诸如钠、钾、钙、镁等的盐)、至少一种润滑剂(诸如硬脂酸和诸如硬脂酸镁、硬脂酸钙等二价阳离子、滑石、单硬脂酸甘油酯等)、一种或多种助流剂(诸如胶态二氧化硅、沉淀的二氧化硅、煅制氧化硅(CAB-O-SIL® M-5P、Cabot Corporation的商标)、stearowet和sterotex、二氧化硅(诸如SILOID®和SILOX® 二氧化硅-Grace Davison Products的商标,Aerosil-Degussa Pharma的商标)、高级脂肪酸、其金属盐、氢化植物油等)、调味剂或甜味剂和着色剂(诸如阿斯巴甜、甘露醇、乳糖、蔗糖、其它人工甜味

剂;氧化铁和FD&C色淀)、帮助稳定药物物质以免化学或物理降解的添加剂(诸如抗氧化剂、抗水解剂、聚合阻滞剂等。抗氧化剂可以包括BHT、BHA、维生素、柠檬酸、EDTA、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、硫脲、甲硫氨酸、表面活性剂、氨基酸(诸如精氨酸、甘氨酸、组氨酸、甲硫氨酸盐)、pH调节剂、螯合剂和呈干燥形式或溶液形式的缓冲液)、可能影响片剂崩解动力学和从片剂释放药物的一种或多种赋形剂,并且因此药代动力学(崩解剂诸如本领域技术人员已知的那些并且可以选自淀粉、羧甲基纤维素型或交联的聚乙烯吡咯烷酮(诸如交联聚维酮、PVP-XL)、海藻酸盐、基于纤维素的崩解剂(诸如纯化的纤维素、甲基纤维素、交联的羧甲基纤维素钠(Ac-Di-Sol)和羧甲基纤维素)、纤维素的低取代羟丙基醚、微晶纤维素(诸如AVICEL®)、离子交换树脂(诸如AMBRELITE® IPR 88)、树胶(诸如琼脂、刺槐豆胶、刺梧桐胶、果胶和黄耆胶)、瓜尔豆胶、刺梧桐胶、甲壳质和壳聚糖、思密达(smecta)、吉兰糖胶、卵叶车前果壳(isapghula husk)、波拉克林钾(polacrillin potassium)(Tulsion³³⁹)、放气崩解剂(诸如柠檬酸和酒石酸连同碳酸氢钠、碳酸钠、碳酸氢钾或碳酸钙)、羟基乙酸淀粉钠(诸如EXPLOTAB®和PRIMOGE®)、淀粉DC等,至少一种可用于延长药物释放的任何类型的生物可降解聚合物。示例性的聚合物组合物包括但不限于,乳酸和乙醇酸的聚酸酐和共聚物、聚乳酸-羟基乙酸共聚物(poly(dl-lactide-co-glycolide))(PLGA)、聚(乳酸)(PLA)、聚(乙醇酸)(PGA)、聚原酸酯、蛋白和多糖。

[0223] 在某些实施方案中,可对活性剂进行化学修饰以显著调节血浆中的药代动力学。这可以例如通过与聚(乙二醇)(PEG)缀合(包括位点-特异性聚乙二醇化)实现。聚乙二醇化可以通过优化药代动力学、降低免疫原性和给药频率来改善药物性能。

[0224] 还提供制备本文描述的用于GI或口腔粘膜递送的活性剂的制剂的方法(如,ASBI诸如高良姜精、芸香苷及其类似物、衍生物或前药)。一种方法包括粉磨、干粉混合和经由直接压片来制粒的步骤。或者,可以使用湿法制粒方法。此类方法(诸如高剪切制粒方法)包括在混合器中混合活性成分和可能的一些赋形剂。粘合剂可以是以干混状态添加或在用于制粒的液体中溶解的赋形剂中的一种。于混合器中将制粒溶液或悬浮液添加至干粉中并混合直至实现所需特征。这通常产生将为用于产生具有充足的溶解时间、含量均匀度和其它物理特征的剂型的适合特征的颗粒。在湿法制粒步骤之后,所述产物通常为干燥的和/或接着,在干燥之后进行研磨以得到所需尺寸范围内的主要百分比的产物。有时,使用装置诸如振动碎粒机或磨粉机湿法改变大小之后干燥产物。然后通过用筛分装置的第一筛选处理干燥制粒以得到可接受的尺寸范围,然后研磨过大的粒子。

[0225] 另外,可以通过替代制粒方法制造制剂,所述方法对本领域技术人员为已知的,诸如喷雾流化床制粒、挤压和滚圆或流化床旋转制粒。

[0226] 另外,本发明的片剂剂型可以通过将以如上所述制造的初始片剂与本领域已知的适合的包衣剂进行包覆来制备。此类包衣剂意在保护活性核心免于损害(磨损、破坏、灰尘形成),免于运输和储存期间核心被暴露的影响(大气湿度、温度波动),并且自然地也可对这些薄膜包衣染色。薄膜包衣对水蒸气的密封效果通过水蒸气渗透性表达。包衣可以通过以下可用方法中的一种进行,诸如沃斯特包衣(Wurster coating)、干燥包衣、薄膜包衣、流化床包衣、锅包衣等。通常的包衣材料包括聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、聚乙烯吡咯烷酮乙酸乙烯酯共聚物(PVPVA)、聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯醇/聚乙二醇共聚物(PVA/PEG)、邻苯二甲酸乙酯纤维素、乙基纤维素、吉兰糖胶、麦芽糖糊精、甲基丙烯酸酯、甲基纤维素、羟丙基甲基纤

纤维素(所有等级和分子量的HPMC)、角叉菜胶、虫胶等。

[0227] 在某些实施方案中可将本文描述的包含活性剂的片剂核心用生物粘附剂和/或pH抗性材料包衣以使得诸如以上定义的那些材料能够改善片剂在舌下腔中的生物粘附。

[0228] 在某些实施方案中,将本文描述的活性剂(如,ASBI诸如高良姜精、芸香苷及其类似物、衍生物或前药)配制成包合配合物。尽管不限于环糊精包合配合物,应当注意环糊精为最经常地用于形成药物包合配合物的试剂。环糊精(CD)为葡萄糖的环状低聚物,其通常含有通过 α -1,4键合连接的6个、7个或8个葡萄糖单体。这些低聚物通常分别被称为 α -CD、 β -CD和 γ -CD。含有高达12个葡萄糖单体的高级低聚物为已知的,并且包括在本文描述的制剂中。还考虑官能化环糊精包合配合物。示例性但非限制性的官能化环糊精包括但不限于羟基丁烯基环糊精的磺酸盐、磺酸盐和亚磺酸盐或二磺酸盐;环糊精的混合醚的磺酸盐、磺酸盐和亚磺酸盐或二磺酸盐,其中醚取代基中的至少一者为羟基丁烯基环糊精。示例性的环糊精包括多糖醚和烷基多糖苷醚,所述多糖醚包含至少一个2-羟基丁烯基取代基,其中至少一个羟基丁烯基取代基为磺化的和亚磺酸化的或二磺酸化的,所述烷基多糖苷醚包含至少一个2-羟基丁烯基取代基,其中至少一个羟基丁烯基取代基为磺化的和亚磺酸化的或二磺酸化的。在各个实施方案中考虑在磺化的羟基丁烯基环糊精与本文描述的一种或多种活性剂之间形成的包合配合物。制备环糊精和环糊精包合配合物的方法见于例如美国专利公布No:2004/0054164和其中引用的参考文献以及美国专利公布No:2011/0218173和其中引用的参考文献。

[0229] 药代动力学(PK)和制剂属性

[0230] 本文描述的延长(控制)释放口服(GI或粘膜)制剂的优点为它们可以将于靶向治疗窗内的血浆药物浓度保持比即释制剂(无论基于固体剂型或液体的剂型)长的持续时间。对于此类常规即释制剂通常观察到的高峰血浆水平将通过超过1至12小时或更长的药物的延长释放而变钝。此外,血浆水平的迅速下降将会避免,因为在片剂的溶出时间长度期间,药物将不断地从口腔进入血流,因此提供具有较为稳定平台期的血浆药代动力学。此外,由于血浆药物药代动力学中的峰值和低谷的下降(它们损害治疗安全),可以通过使潜在的有害副作用最小化来改善本文描述的剂型的治疗安全性。

[0231] 在多个实施方案中通过利用粘膜和通过独立地控制片剂崩解(或侵蚀)和药物随着时间推移从片剂的溶出和释放设计本文描述的活性剂的口腔粘膜制剂以避免静脉内的高峰血浆水平和常规即释口服剂型以提供更安全的递送特性。本文描述的口服制剂提供包括确定量活性剂的单次的重复剂量。

[0232] 本文描述的生物粘附口腔粘膜制剂的优点为它们显示出高度一致的生物利用度并且可以将具有显著较低变异性的靶向治疗窗内的血浆药物浓度保持比当前可用剂型(无论固体剂型或IV剂型)长的持续时间。此外,血浆水平的迅速下降将会避免,因为在片剂的溶出时间长度期间或更长时间,药物将不断地从口腔或胃肠道进入血流,因此提供具有与常规即释口服剂型相比延长的稳定平台期的血浆药代动力学。此外,由于血浆药物药代动力学中的峰值和低谷的相对下降(它们损害治疗安全并为当前可用剂型的特点),可以通过使潜在的有害副作用最小化来改善本文描述的剂型的治疗安全。

[0233] 在多个实施方案中可设计本文描述的生物粘附制剂以操纵和控制本文描述的活性剂的药代动力学特性。因此,可调节所述制剂以实现“减缓”崩解时间(和侵蚀动力学特

性)并减缓药物释放,因此使得能够延长提供持续药物作用的药代动力学特性。尽管可以设计此类制剂以仍能提供快速起效,它们主要旨在使得能够持续药物PK并产生效果同时保持片剂的其它表现属性诸如生物粘附、作用的再现性、变钝的 $C_{\max}$ 等。

[0234] 本发明的生物粘附粘膜制剂的性能和属性不依赖制造过程。本领域中许多常规的、明确的和已知的方法可用于制造本发明的制剂(诸如湿法和干法制粒、直接压片等)而不会影响剂型物理化学性质或体内性能。

[0235] 在施用本发明的剂型之后,显示本文描述的活性剂的测量血浆水平的延长的平台期的示例性的数学比率为术语“最佳治疗靶标比率”或“OTTR”,其表示药物以治疗水平存在的平均时间,定义为药物血浆浓度保持在通过药物的消除半衰期进行归一化的 $C_{\max}$ 的50%以上的时间,乘以在关注的剂型中获得的 $C_{\max}$ 与在等效剂量的IV施用之后归一化的 $C_{\max}$ 的比率。在某些实施方案中OTTR可通过下式计算:

[0236] $OTTR = (C_{\max}^{IV} / C_{\max}) \times (\text{剂量} / \text{剂量}^{IV}) (\text{高于} 50\% C_{\max} \text{的时间}) / (\text{药物的最终}^{IV} \text{消除半衰期})$ 。

[0237] 在某些实施方案中OTTR大于约15、或大于约20、或大于约25、或大于约30、或大于约40、或大于约50。

[0238] 施用

[0239] 在某些实施方案中本文描述的一种或多种活性剂(如,ASBI诸如高良姜精、芸香苷及其类似物、衍生物或前药)向有需要的哺乳动物施用,如,向处于特征为异常的淀粉样前体蛋白加工的病理的风险或罹患这种病理的哺乳动物,向处于MCI至阿尔茨海默氏病的进展的风险的哺乳动物等。在某些实施方案中施用活性剂以预防或延迟早发性阿尔茨海默氏认知功能障碍的发作,和/或改善早发性阿尔茨海默氏认知功能障碍的一种或多种症状,和/或预防或延迟早发性阿尔茨海默氏病患或认知功能障碍至阿尔茨海默氏病的进展,和/或促进通过非淀粉样途径的淀粉样前体蛋白(APP)的加工。在某些实施方案中施用一种或多种活性剂用于治疗早期、中期或晚期阿尔茨海默氏病,如,以降低疾病的严重度,和/或以改善疾病的一种或多种症状,和/或以减缓疾病的进展。

[0240] 在多个实施方案中本文描述的活性剂(如,ASBI诸如高良姜精、芸香苷及其类似物、衍生物或前药)可通过许多途径的任一种施用。因此,例如它们可口服施用、胃肠外施用、(静脉内(IV)施用、肌肉(IM)施用、贮库-IM、皮下(SQ)施用和贮库-SQ)、舌下施用、鼻内(吸入)施用、鞘内施用、透皮(如,经由透皮贴剂)施用、局部施用、离子电渗施用(ionophoretically)或直肠施用。通常选择促进递送至脑的剂型(如,通过血脑屏障)。在这种情况下,应当注意本文描述的化合物容易地递送至脑。本领域技术人员已知的剂型适于化合物的递送。

[0241] 所述活性剂以足以在不存在对受治疗受试者的不期望的副作用下发挥在预防和/或治疗方面有用的效应的量/剂量方案施用。特定量/剂量方案将根据个体的体重、性别、年龄和健康状况;特定化合物的制剂、生化性质、生物活性、生物利用度和副作用而变化。

[0242] 在某些实施方案中治疗或预防有效量可以通过在已知的体外和体内模型系统中测试针对受治疗病症的试剂来凭经验确定。治疗或预防有效剂量可通过首先施用低剂量,然后递增直至达到实现所需作用且具有极低或无不需要的副作用的剂量来确定。

[0243] 在某些实施方案中,当口服施用时,本文描述的有效预防或延迟早发性阿尔茨海

默氏认知功能障碍的发作,和/或改善早发性阿尔茨海默氏认知功能障碍的一种或多种症状,和/或预防或延迟早发性阿尔茨海默氏病患或认知功能障碍至阿尔茨海默氏病的进展,和/或通过非淀粉样途径促进淀粉样前体蛋白(APP)的加工,和/或治疗或防止AD范围为约0.1mg/天至约500mg/天或约1,000mg/天、或约0.1mg/天至约200mg/天,例如,约1mg/天至约100mg/天,例如,约5mg/天至约50mg/天。在一些实施方案中,受试者以约0.05至约0.50mg/kg,例如,约0.05mg/kg、0.10mg/kg、0.20mg/kg、0.33mg/kg、0.50mg/kg的剂量施用化合物。应理解,尽管患者可以以一个剂量开始,但是当患者病患变化时该剂量可以随着时间推移而变化(增加或降低,视情况而定)。取决于结果评估,可以使用更高剂量。例如,在某些实施方案中,可施用高达多达1000mg/天,如,5mg/天、10mg/天、25mg/天、50mg/天、100mg/天、200mg/天、300mg/天、400mg/天、500mg/天、600mg/天、700mg/天、800mg/天、900mg/天或1000mg/天。

[0244] 在各个实施方案中,本文描述的活性剂可胃肠外施用,例如,通过IV、IM、贮库-IM、SC或贮库-SC。当胃肠外施用时,应递送约0.5至约100mg/天,优选地约5至约50mg/天的治疗有效量。当贮库制剂用于每月注射一次或每两周注射一次时,剂量应为约0.5mg/天至约50mg/天,或约15mg至约1,500mg的每月剂量。部分由于患有阿尔茨海默氏病患者的健忘,优选的是胃肠外剂型为贮库制剂。

[0245] 在各个实施方案中,本文描述的活性剂可舌下施用。当舌下给定时,所述化合物和/或其类似物可以以上文描述用于IM施用的量每天给定一至四次。

[0246] 在各个实施方案中,本文描述的活性剂可鼻内施用。当通过该途径给定时,适当的剂型为鼻喷雾或干粉,如本领域技术人员已知的。用于鼻内施用的化合物和/或其类似物的剂量为上文描述用于IM施用的量。

[0247] 在各个实施方案中,本文描述的活性剂可鞘内施用。当通过该途径给定时,适当的剂型可为如本领域技术人员已知的胃肠外剂型。用于囊内施用的化合物和/或其类似物的剂量为上文描述用于IM施用的量。

[0248] 在某些实施方案中,本文描述的活性剂可局部施用。当通过该途径给定时,适当的剂型为乳膏剂、软膏剂或贴剂。当局部施用时,剂量为约1.0mg/天至约200mg/天。因为可通过贴剂递送的量为有限的,所以可以使用两个或更多个贴剂。贴剂的数目和尺寸并不重要,重要的是递送的化合物的治疗有效量,如本领域技术人员已知。化合物可通过如本领域技术人员已知的栓剂直肠施用。当通过栓剂施用时,治疗有效量为约1.0mg至约500mg。

[0249] 在各个实施方案中,本文描述的活性剂可通过如本领域技术人员已知的植入物施用。当通过植入施用化合物时,治疗有效量为上文描述的用于贮库施用的量。

[0250] 在多个实施方案中可将剂型以每天1次、2次、3次或4次施用于受试者。优选的是将化合物以每天三次或更少次,更优选为每天一次或两次施用。优选的是试剂以口服剂型施用。

[0251] 对本领域技术人员显而易见的是,精确剂量和施用频率将取决于正治疗的特定病患,正治疗的病患的严重度,特定患者的年龄、体重、一般身体状况和个体可能服用的如本领域熟练的施用医师熟知的其它药物。

[0252] 当本文描述相对于人中的用途的组合物和方法时,它们也适合于动物,如,兽医用途。因此某些优选的生物体包括但不限于人、非人灵长类动物、犬科动物、马科动物、猫科动

物、猪科动物、有蹄动物、兔类动物等。

[0253] 上述制剂和施用方法旨为示例性并且非限制性的。应理解,使用本文提供的教导,可容易地设计其它适合的制剂和施用模式。

[0254] 组合治疗

[0255] 在某些实施方案中,本文描述的活性剂(如,ASBI诸如高良姜精、芸香苷及其类似物、衍生物或前药)可与用于治疗或防止特征为脑中淀粉样沉积物的疾病(包括MCI和/或AD)的其它治疗剂或方法组合使用。此类试剂或方法包括:乙酰胆碱酯酶抑制剂(包括但不限于,如,(-)-非色林对映体、他克林、伊匹达克林(ipidacrine)、加兰他敏、多奈哌齐、艾考哌齐、扎那哌齐、卡巴拉汀、石杉碱甲、非色林、毒扁豆碱、新斯的明、吡斯的明、安贝氯铵、地美卡林、腾喜龙、拉多替吉和恩其明);NMDA受体拮抗剂(包括但不限于如,美金刚胺);毒蕈碱型受体激动剂(包括但不限于,如,他沙利定(Talsaclidine)、AF-102B、AF-267B(NGX-267));烟碱受体激动剂(包括但不限于,如,异丙克朗(AZD-3480)); β -分泌酶抑制剂(包括但不限于如,噻唑烷二酮,包括罗格列酮和吡格列酮); γ -分泌酶抑制剂(包括但不限于,如,司马西特(LY-450139)、MK-0752、E-2012、BMS-708163、PF-3084014、begacestat(GSI-953)和NIC5-15);A β 聚合的抑制剂(包括但不限于,如,氯碘羟喹(Clioquinol)(PBT1)、PBT2、高牛磺酸(tramiprosate)(高牛磺酸(homotaurine))、鲨肌醇(Scyllo-inositol)(亦称,鲨环己六醇(scyllo-cyclohexanehexol)、AZD-103和ELND-005)、具有A β 片段的被动免疫(包括但不限于如,Bapineuzemab)和表没食子儿茶素-3-没食子酸酯(Epigallocatechin-3-gallate)(EGCg));抗炎剂诸如环氧合酶II抑制剂;抗氧化剂诸如维生素E和银杏内酯(ginkgolide);免疫学方法,诸如,例如,具有A β 肽的免疫或抗A β 肽抗体的施用;他汀类药物;以及直接或间接神经营养剂诸如CerebrolysinTM、AIT-082(Emilieu(2000) Arch. Neurol. 57:454)、神经生长因子(Netrin)(Luorenco(2009) Cell Death Differ 16:655-663)、神经生长因子模拟物、NGF、NGF模拟物、BDNF和未来其它神经营养剂、促进神经形成的试剂如干细胞治疗。如在Mangialasche等, Lancet Neurol (2010) 9:702-716中描述用于与托烷司琼(tropisetron)、双硫仑(disulfiram)、和厚朴酚(honokiol)和/或尼美西泮(nimetazepam)组合以治疗或防止特征为脑中淀粉样沉积物的疾病,包括MCI和/或AD的其它药理剂。

[0256] 在各个实施方案中,具有一种或多种本文描述的活性剂的组合治疗明确排除将这些试剂与乙酰胆碱酯酶抑制剂结合施用。

[0257] ASBI在年龄相关性黄斑变性和青光眼中的用途。

[0258] 尽管在各个实施方案中,ASBI的用途被考虑用于预防或延迟早发性阿尔茨海默氏病患和/或认知功能障碍的发作,和/或改善早发性阿尔茨海默氏病患和/或认知功能障碍的一种或多种症状,或预防或延迟早发性阿尔茨海默氏病患或认知功能障碍至阿尔茨海默氏病的进展,和/或用于治疗阿尔茨海默氏病,还考虑ASBI的其它用途。特别地,在某些实施方案中,考虑ASBI的用途用于治疗和/或预防老年性黄斑变性和/或青光眼。

[0259] 不受特定理论的束缚,据信蛋白的异常细胞外沉积物可能有助于老年性黄斑变性(AMD)发病机理和进展,在阿尔茨海默氏病和动脉粥样硬化中也是这种情况。在这两种病患中,蛋白沉积物含有许多共享的成分诸如apoE、补体和A β 多肽。例如,在人AMD中,A β 肽沉积物与玻璃疣相关,在那它发生积聚并与激活的补体组分处于相同位置(Anderson等,(2004)

Exp.Eye.Res.,78:243-256;Dentchev等,(2003) Mol.Vis.,9:184-190;Johnson等,(2002) Proc Natl Acad Sci USA 99:11830-11835.)。Luibl等,(2006) J.Clin.Invest.,116:378-385示出使用特异性识别A β 的低聚物形式的抗体,在人供体眼睛的玻璃疣、RPE下基底沉积物和RPE中存在潜在地毒性淀粉样低聚物。这些A β 低聚物在不含玻璃疣的对照年龄匹配的供体眼中未检测到。Isas等,(2010) Invest.Ophthalmol Vis.Sci.,51:1304-1310还检测玻璃疣中的可溶性以及成熟的A β 纤维。总之,这些发现暗示在AMD的发病机理中的A β 。此外,在AMD的鼠模型中,已于RPE下基底沉积物和新生血管损伤中检测A β 肽(Ding等,(2008) Vision Res.,48:339-345;Malek等,(2005) Proc Natl Acad Sci USA,102:11900-11905)。在本模型中,进食高脂肪、富含胆固醇(HFC)饮食的成熟的靶向人APOE4的替换小鼠(APOE4小鼠)(APOE4-HFC小鼠)显示出在干燥和润湿AMD中均观察到形态学印记。这些印记包括厚的扩散的RPE下沉积物、含有脂质和蛋白的焦点玻璃疣样沉积物、Bruch膜的增厚、与光感受器变性的区域相对的RPE萎缩的斑块型区域和CNV(Malek等,(2005) Proc Natl Acad Sci USA,102:11900-11905)。据信,在AMD的APOE4-HFC小鼠模型中,A β 积聚引起RPE/脉络膜水平的损害并且先前已示出抗-A β 40-特异性抗体的全身施用可部分减弱在本模型中显示出的视觉功能的减退(Ding等(2008) Vision Res.,48:339-345)。也已证明同时靶向A β 40和A β 42的抗A β 免疫疗法阻断APOE4-HFC小鼠中的组织病理学变化并完全保护视觉功能(Ding等,(2011) Proc.Nat'l.Acad.Sci.U.S.A.,108(28):E279-E287)。

[0260] 不受特定理论的束缚,据信在眼中,通过BACE和在视网膜以及视网膜色素上皮(RPE)细胞层中的 γ -分泌酶的活性而使APP加工成A β 并且sAPP α 和A β 被分泌至玻璃体液(参见,如,(Prakasam等,(2008) J.Alzh.Dis.,20:1243-1253)。A β 被进一步运输至眼房水,在那其可被容易地测量。

[0261] 鉴于这些发现,据信ASBI,如,如本文所述,可用于治疗或预防老年性黄斑变性(AMD)和/或青光眼。因此,据信可将ASBI施用于受试者以减缓或防止AMD(和/或青光眼)的出现,和/或减少AMD的一种或多种症状,和/或减缓、停止或逆转疾病的进展。在各个实施方案中为了这些目的将一种或多种ASBI(如,本文描述的任何一种或多种活性剂)施用于受试者(如,人、非人哺乳动物)。如上所述,在各个实施方案中,经由选自口服递送、等电渗递送、透皮递送、胃肠外递送、气溶胶施用、经由吸入施用、静脉内施用和直肠施用的途径施用ASBI。

[0262] 在某些实施方案中,直接施用于眼睛。因此例如,在某些实施方案中,可将试剂经由眼内注射以滴眼剂等形式施用于眼睛。

[0263] 通常以有效量施用ASBI用于治疗 and/或预防AMD或青光眼,其中有效量将通过施用形式变化。在某些实施方案中有效量为足以减轻哺乳动物中一种或多种与老年性黄斑变性(AMD)相关的症状的量。在某些实施方案中所述有效量为这样的量,即足以降低风险或延迟发作,和/或降低特征为玻璃体和/或眼房水中A β 的减少和/或视网膜和/或RPE细胞层上的淀粉样沉积物的AMD疾病(或青光眼)的最终严重度的量。

[0264] 评估APP加工的测定系统

[0265] 不受特定理论的束缚,据信本文描述的活性剂(如,ASBI诸如高良姜精、芸香苷及其类似物、衍生物或前药)通过非淀粉样途径促进APP的加工和/或通过淀粉样途径降低或抑制APP的加工。在非淀粉样途径中,首先通过A β 序列内的 α -分泌酶切割APP,释放APPs α 胞

外域(“sAPP α ”)。相比之下,当 β -分泌酶在AB的氨基末端切割APP时起始淀粉样途径,从而释放APPs β 胞外域(“sAPP β ”)。通过非淀粉样和淀粉样途径的APP加工在本领域为已知的并且如,由Xu(2009) *J Alzheimers Dis.*, 16(2):211-224,和De Strooper等,(2010 *Nat Rev Neurol* 6(2):99-107综述。

[0266] 一种评估活性剂功效的方法为通过淀粉样途径确定APP加工水平的减少或消除,如,通过响应于施用所关注试剂的 β -分泌酶切割的APP加工水平的减少或消除。用于确定 β -分泌酶切割位点处APP切割的程度的测定在本领域为熟知的。例如,在美国专利No.5,744,346和5,942,400中描述示例性测定。用于确定sAPP α 和sAPP β 以及APPneo和AB在生物样品中存在及水平的试剂盒商购获得自,如,PerkinElmer。

[0267] ASBI测定。

[0268] 本文描述的任何化合物的ASBI活性可使用,例如,在本文提供的实施例中说明的测定容易地验证。基本上,在某些实施方案中利用一对测定以鉴定抑制MBP-C125 APP底物而不是 β -位点肽底物(P5-P5')的BACE切割,从而导致抑制C99的产生的化合物。

[0269] 如在实施例中说明,在一个实施方案中,可将MBP-C125 APP695野生型融合蛋白用作其中一种底物。第二底物可为商购获得的P5-P5' 荧光底物。将这些底物中的任一者与重组BACE(R&D(目录号931-AS-050)在,例如,96孔板格式中孵育。对于MBP-C125底物,可使用AlphaLisa测定作为读出,测量来自BACE切割的C-99产物。对于P5-5' 底物,可将BACE切割时荧光的丢失用作读出。ASBI将抑制MBP-C125底物的BACE切割同时不会抑制荧光底物。

[0270] 其它无细胞测定

[0271] 可用于证明活性剂的抑制活性的示例性测定,例如,在WO 00/17369、WO 00/03819和美国专利No.5,942,400和5,744,346中描述。此类测定可在无细胞孵育或在使用表达 α -分泌酶和/或 β -分泌酶的细胞以及具有 α -分泌酶和 β -分泌酶切割位点的APP底物的细胞孵育中进行。

[0272] 在一个示例性实施方案中,将所关注的试剂与含有APP的 α -分泌酶和 β -分泌酶切割位点的APP底物接触,例如,完整的APP或变体、APP片段,或含有氨基酸序列KM-DA或NL-DA(APP-SW)的重组的或合成的APP底物在存在 α -分泌酶和/或 β -分泌酶、其片段、或具有 α -分泌酶或 β -分泌酶活性并且有效切割APP的 α -分泌酶或 β -分泌酶切割位点的合成的或重组的多肽变体的情况下在适合于酶的切割活性的孵育条件下孵育。具有所需活性的试剂降低或防止APP底物的切割。适合的底物任选地包括可以为含有底物肽和可用于促进肽或其 α -分泌酶和/或 β -分泌酶切割产物的纯化或检测的修饰的融合蛋白或多肽的衍生物。有用的修饰包括插入用于抗体结合的已知的抗原表位;标签或可检测部分的连接、结合底物的连接等。

[0273] 用于无细胞体外测定的适合的孵育条件包括,例如:大约200纳摩尔至10微摩尔底物,大约10至200皮摩尔酶,和大约0.1纳摩尔至10微摩尔试剂,在水溶液中,pH约为4-7,大约37°C下,持续大约10分钟至3小时的时段。这些孵育条件仅为示例性的,并且可根据对特定测定组分和/或所需测量系统的需要而变化。针对特定测定组分的孵育条件的优化应说明使用的特定 α -分泌酶和/或 β -分泌酶及其最佳pH,可能在该测定中使用的任何其它酶和/或标记等。此类优化为常规的并且将无需过多实验。

[0274] 另一示例性测定利用具有融合至APP-SW的C-末端125个氨基酸的麦芽糖结合蛋白

(MBP)的融合肽。通过抗MBP捕获抗体在测定底物上捕获MBP部分。在存在 α -分泌酶和/或 β -分泌酶的情况下捕获的融合蛋白的孵育分别导致在 α -分泌酶和/或 β -分泌酶切割位点处切割底物。该系统可用于筛选所关注试剂的抑制活性。切割活性的分析例如可通过切割产物的免疫测定来进行。一种此类免疫测定例如,使用抗体SW192检测在切割的融合蛋白羧基末端暴露的独特表位。该测定在例如美国专利No.5,942,400中描述。

[0275] 细胞测定

[0276] 可使用许多基于细胞的测定以评估所关注试剂对相对 α -分泌酶活性与 β -分泌酶活性和/或APP的加工以释放淀粉样AB低聚物和非淀粉样AB低聚物的活性。细胞内并且在存在或不存在试剂的情况下APP底物与 α -分泌酶和/或 β -分泌酶的接触可用于证明 α -分泌酶促进和/或 β -分泌酶抑制试剂的活性。优选地,在存在试剂的情况下的测定提供与非抑制对照相比至少约30%、最优选至少约50%的酶活性的抑制。

[0277] 在一个实施方案中,使用天然表达 α -分泌酶和/或 β -分泌酶的细胞。或者,修饰细胞以表达重组的 α -分泌酶和/或 β -分泌酶或合成的变体酶,如上文讨论。可以将APP底物添加至培养基并且优选在细胞中表达。可使用天然表达APP、APP的变体或突变形式的细胞,或表达APP的同工型、突变体或变体APP、重组的或合成的APP、APP片段、或合成的APP肽或含有 α -分泌酶和/或 β -分泌酶APP切割位点的融合蛋白的转化的细胞,条件是允许表达的APP与酶接触并且可分析酶的切割活性。

[0278] 通常由APP加工AB的人细胞系提供有用的方法以测定试剂的抑制活性。可例如通过免疫测定,诸如蛋白质印迹或酶联免疫测定(EIA)诸如通过ELISA测量AB和/或其它切割产物的产生以及至培养基的释放。

[0279] 表达APP底物和活性 α -分泌酶和/或 β -分泌酶的细胞可在存在试剂的情况下孵育以证明 α -分泌酶和/或 β -分泌酶相比于对照的相对酶活性。 α -分泌酶与 β -分泌酶的相对活性可通过分析APP底物的一个或多个切割产物测量。例如, β -分泌酶活性对底物APP的抑制预期将降低特异性 β -分泌酶诱导的APP切割产物诸如AB、sAPP β 和APP_{neo}的释放。 α -分泌酶活性对底物APP的促进或增强预期将增加特异性 α -分泌酶诱导的APP切割产物诸如sAPP α 和p3肽的释放。

[0280] 尽管神经细胞和非神经细胞加工和释放AB,内源 β -分泌酶活性水平为低的并且经常难于通过EIA检测。因此优选使用已知具有增强 β -分泌酶活性、增强APP至AB的加工,和/或增强AB的产生的细胞类型。例如,用APP的瑞典突变形式(APP-SW);用印地安那突变形式(APP-IN);或用APP-SW-IN转染细胞提供具有增强的 β -分泌酶活性并且产生可容易测量的AB的量的细胞。

[0281] 在此类测定中,例如,表达APP、 α -分泌酶和/或 β -分泌酶的细胞在适于APP底物的切割位点处 α -分泌酶和/或 β -分泌酶酶活性的条件下于培养基中孵育。一旦将细胞暴露于试剂,释放至培养基中的AB的量和/或细胞裂解物中APP的CTF99片段的量与对照相比降低。可,例如,通过与特异性抗体的免疫反应分析APP的切割产物,如上文讨论。

[0282] 用于分析 α -分泌酶和/或 β -分泌酶活性的优选细胞包括原代人神经元细胞、原代转基因动物神经元细胞,其中所述转基因为APP,和诸如表达APP的稳定293细胞系的那些其它细胞,例如,APP-SW。

[0283] 体内测定:动物模型

[0284] 可将各种动物模型用于分析所关注试剂对相关 α -分泌酶和/或 β -分泌酶活性和/或加工APP以释放A β 的活性。例如,可将表达APP底物、 α -分泌酶和/或 β -分泌酶的转基因动物用于证明试剂的抑制活性。已经例如,在美国专利No.5,877,399;5,612,486;5,387,742;5,720,936;5,850,003;5,877,015和5,811,633以及在Ganes等,1995,Nature 373:523中描述某些转基因动物模型。优选的为显示出与AD的病理生理学相关的特征的动物。本文描述的试剂至转基因小鼠的施用为显示试剂的抑制活性提供替代方法。还优选在药学上的有效载体中和经由以适当的治疗量到达靶向组织的施用途施用试剂。

[0285] 在 β -分泌酶切割位点处 β -分泌酶介导的APP切割和A β 释放的抑制可在这些动物中通过测量动物体液诸如脑脊液或组织中的切割片段进行分析。同样地,在 α -分泌酶切割位点处 α -分泌酶介导的APP切割和sAPP α 的释放的促进或增强可在这些动物中通过测量动物体液诸如脑脊液或组织中的切割片段分析。在某些实施方案中,优选针对A β 沉积物或斑块的脑组织分析。

[0286] 一旦APP底物与 α -分泌酶和/或 β -分泌酶在存在试剂的情况下于足以允许酶介导的APP的切割和/或从底物释放A β 的条件下接触时,期望的试剂有效降低 β -分泌酶切割位点处 β -分泌酶-介导的APP切割和/或有效降低A β 的释放量。试剂还优选有效增强 α -分泌酶切割位点处 α -分泌酶-介导的APP切割和增加sAPP α 的释放量。当此类接触为向动物模型施用试剂时,例如,如上所述,所述试剂有效降低动物的脑组织中的A β 沉积物,以及减少 β 淀粉样斑块的数目和/或尺寸。当此类施用为向人受试者时,所述试剂有效抑制或减缓特征为增强的A β 量的疾病的进展,减缓AD的进展,和/或防止处于这些疾病风险的患者中AD的发作或形成。

[0287] 监测临床功效的方法

[0288] 在各个实施方案中,治疗的有效性可通过将开始施用试剂(如,ASBI诸如高良姜精、芸香苷及其类似物、衍生物或前药)之前的疾病参数的基线测量与已施用试剂或类似物之后一个或多个时间点的相同参数进行比较来确定。可被测量的一个示例性参数为APP加工的生物标记(如,肽低聚物)。此类生物标记包括但不限于血液、血浆、血清、尿液、粘液或脑脊液(CSF)中升高的sAPP α 、p3(A β 17-42或A β 17-40)、sAPP β 、可溶性A β 40、和/或可溶性A β 42水平。升高的sAPP α 和/或p3水平,和下降的sAPP β 和/或APPneo水平的检测为治疗是有效的指示器。相反地,下降的sAPP α 和/或p3水平,和/或升高的sAPP β 、APPneo、Tau或磷酸化-Tau(pTau)水平的检测为治疗是无效的指示器。

[0289] 确定治疗有效性的另一参数为脑中淀粉样斑块沉积物的水平。淀粉样斑块可使用本领域已知的任何方法确定,如,如通过CT、PET、PIB-PET和/或MRI确定。试剂(如,ASBI诸如高良姜精、芸香苷及其类似物、衍生物或前药)的施用可导致斑块形成速率的减少,甚至脑中斑块沉积物的回缩或减少。治疗的有效性也可通过观察受试者的认知能力的稳定和/或改善来确定。可使用任何领域接受的方法评估认知能力,包括例如,临床痴呆评定(CDR)、简易精神状态检查表(MMSE)或Folstein测试、在DSM-IV(精神疾病诊断与统计手册,第四版)或DSM-V中列出的评估标准等。

[0290] 可使用本领域已知的任何方法监测临床功效。监测功效的可测量的生物标记包括但不限于监测sAPP α 、sAPP β 、A β 42、A β 40、APPneo和p3(如,A β 17-42或A β 17-40)的血液、血浆、血清、尿液、粘液或脑脊液(CSF)水平。升高的sAPP α 和/或p3水平,和下降的sAPP β 和/或

APPneo水平的检测为治疗或预防方案是有效的指示器。相反地,下降的sAPP α 和/或p3水平,和升高的sAPP β 和/或APPneo水平的检测为治疗或预防方案是无效的指示器。其它生物标记包括Tau和磷酸化-Tau (pTau)。下降的Tau和pTau水平的检测为治疗或预防方案是有效的指示器。

[0291] 也可通过测量脑中淀粉样斑块负载确定功效。当脑中的淀粉样斑块负载未增加或降低时,治疗或预防方案被认为是有效的。相反地,当脑中的淀粉样斑块负载增加时,治疗或预防方案被认为是无效的。淀粉样斑块负载可使用本领域已知的任何方法确定,如,包括CT、PET、PIB-PET和/或MRI。

[0292] 也可通过测量受试者的认知能力确定功效。认知能力可使用本领域已知的任何方法测量。示例性测试包括指定临床痴呆评定(CDR)分数或应用简易精神状态检查表(MMSE)(Folstein等,Journal of Psychiatric Research 12(3):189-98)。如,当应用CDR或MMSE时,保持相同分数或实现改善分数的受试者指示治疗或预防方案为有效的。相反地,如,当应用CDR或MMSE时,收到指示下降的認知能力的分数的受试者,指示治疗或预防方案已为无效的。

[0293] 在某些实施方案中,监测方法可牵涉在施用试剂的剂量之前确定受试者中可测量的生物标记或参数(如,淀粉样斑块负载或认知能力)的基线值并将其与治疗后可测量的生物标记或参数的值进行比较。

[0294] 在其它方法中,确定对照群体的可测量的生物标记或参数的对照值(如,平均值和标准差)。在某些实施方案中,对照群体中的个体未接受先前治疗并且不患有AD、MCI也无患有AD或MCI的风险。在这种情况下,如果可测量的生物标记或临床参数的值接近对照值,那么治疗被认为是有效的。在其它实施方案中,对照群体中的个体未接受先前治疗并且已被诊断患有AD或MCI。在这种情况下,如果可测量的生物标记或临床参数的值接近对照值,那么治疗被认为是无效的。

[0295] 在其它方法中,监测目前未接受治疗但已经历治疗的先前疗程的受试者的生物标记或临床参数中的一个或多个以确定是否需要继续治疗。受试者中生物标记或临床参数中的一个或多个测量值可与先前疗程之后受试者中先前实现的值进行比较。或者,在受试者中测量的值可与经历疗程之后的受试者群体中确定的对照值(平均值加标准差/ANOVA)进行比较。或者,受试者中的测量值可与保持无疾病症状的预防治疗的受试者群体,或示出改善的疾病特征的预防治疗的受试者群体的对照值比较。在这种情况下,如果可测量的生物标记或临床参数的值接近对照值,那么治疗被认为是有效的并且不必继续。在所有这些情况下,相对于对照水平的显著差异(如,大于标准差)为应在受试者中继续治疗的指示器。

[0296] 在某些实施方案中用于分析的组织样品通常为来自受试者的血液、血浆、血清、尿液、粘液或脑脊液。

[0297] 试剂盒。

[0298] 在各个实施方案中,可将活性剂(如,APP特异性BACE抑制剂(ASBI)诸如高良姜精、芸香苷及其类似物、衍生物、互变异构体或立体异构体或其前药,如本文所述)包封在多剂量或单剂量容器中。所述包封试剂可以试剂盒提供,例如,包括可装配以供使用的组成部分。例如,冻干形式的活性剂和适合的稀释剂可以以使用前用于组合的单独组分提供。试剂盒可以包括用于共施用的活性剂和第二治疗剂。活性剂和第二治疗剂可以以单独的组成部

分提供。试剂盒可以包括多个容器,每个容器容纳化合物的一个或多个单位剂量。容器优选地适合于所需的施用模式,包括但不限于如,如本文所述用于口服施用的片剂、凝胶胶囊剂、缓释胶囊剂等;用于胃肠外施用的贮库产品、预装注射器、安瓿、小瓶等;和用于局部施用的贴剂、药贴 (medipad)、乳膏等。

[0299] 在某些实施方案中,提供试剂盒,其中所述试剂盒包括:本文描述的优选以药物组合物提供的一种或多种ASBI化合物,或其前药、互变异构体或立体异构体,或所述化合物、所述立体异构体、或所述互变异构体或前药的药学上可接受的盐或溶剂化物并且在一个适合的容器或多个容器中和/或具有适合的包装;任选地一种或多种其它活性剂,如果存在其优选地作为药物组合物并且在一个或多个适合的容器中和/或以适合的包装提供;以及任选地供使用的说明书,例如如何施用所述化合物或组合物的书面指示。

[0300] 在另一实施方案中,提供这样的试剂盒,其包括单个容器或多个容器:包含一种或多种本文描述的和/或要求保护的ASBI化合物,或其互变异构体或立体异构体,或所述化合物、所述立体异构体或所述互变异构体的药学上可接受的盐或溶剂化物的药学上可接受的组合物,任选地包含一种或多种其它治疗剂的药学上可接受的组合物;以及任选地其用途的使用说明书。所述试剂盒可以任选地包括适于预期用途或用途的标记(如,指导性材料)。

[0301] 与任何药物产品一样,设计包装材料和/或容器以在储存和装运期间保护产品的稳定性。此外,试剂盒可包括供使用的说明书或可建议使用者诸如,例如,医师、技师或患者关于如何以预防、治疗或改善所关注疾病的治疗恰当地施用所述组合物的其它信息材料。在一些实施方案中,说明书可指示或建议给药方案,其包括但不限于实际剂量和监测程序。

[0302] 在一些实施方案中,说明书可包括指示施用所述组合物可产生不良反应的信息材料,所述不良反应包括但不限于过敏反应诸如,例如,过敏性。信息材料可指示过敏反应可能仅显示出轻微的痒疹或可能很严重并且包括红皮病、血管炎、过敏性、Steven-Johnson综合征等。在某些实施方案中信息材料可以指示过敏性可为致命的并且当任何外源蛋白被引入体内时可能会出现。在某些实施方案中信息材料可以指示这些过敏反应可显示本身的荨麻疹或皮疹,发展成为致命的全身反应并在暴露诸如,例如,10分钟之后迅速出现。信息材料还可指示过敏反应可以引起受试者经历感觉异常、低血压、喉水肿、精神状态变化、面部或咽血管性水肿、气道阻塞、支气管痉挛、荨麻疹和瘙痒症、血清疾病、关节炎、过敏性肾炎、肾小球肾炎、颞动脉炎、嗜酸性细胞增多症或其组合。

[0303] 尽管指导材料通常包括书面材料或印刷材料,但它们不限于这些。本发明考虑能够储存此类说明书并且将它们传播至最终用户的任何介质。此类介质包括但不限于电子存储介质(如,磁盘、录音带、暗盒、芯片)、光学介质(如,CD ROM)等。此类介质可以包括至提供此类指导材料的互联网网站的地址。

[0304] 在一些实施方案中,所述试剂盒可包括一种或多种包装材料诸如,例如,箱、瓶、管、小瓶、容器、喷雾器、吸入器、静脉内(I.V.)输液袋、封袋等;和试剂(包含本文描述的活性剂)的至少一种单位剂型和包装材料。在一些实施方案中,试剂盒还包括将组合物用作预防、治疗或改善关注疾病的治疗的说明书。

[0305] 在一些实施方案中,所述试剂盒可包括一种或多种包装材料诸如,例如,箱、瓶、管、小瓶、容器、喷雾器、吸入器、静脉内(I.V.)输液袋、封袋等;和包装材料内包含含有一种或多种活性剂(如,APP特异性BACE抑制剂(ASBI)诸如高良姜精、芸香苷及其类似物、衍生

物、互变异构体或立体异构体或其前药,如本文所述)的试剂的至少一个单位剂型的第一组合物,连同包含第二试剂诸如,例如,用于治疗 and/或预防阿尔茨海默氏病的试剂(如,如本文所述)、或任何前药、共同药物(codrug)、代谢物、类似物、同系物、同源物、衍生物、盐及其组合的第二组合物。在一些实施方案中,试剂盒还可以包括将组合物用作预防、治疗或改善所关注疾病的治疗的说明书。

[0306] 在某些实施方案中说明书/指导材料(当存在时)教导试剂盒中含有的活性剂的剂量和/或治疗方案和/或反向指标。尽管指导材料,当存在时,通常包括书面材料或印刷材料,但它们不限于这些。本发明考虑能够储存此类说明书并且将它们传播至最终用户的任何介质。此类介质包括但不限于电子存储介质(如,磁盘、录音带、暗盒、芯片)、光学介质(如,CD ROM)等。此类介质可以包括至提供此类指导材料的互联网网站的地址。

实施例

[0307] 提供下列实施例来举例说明,但不限制要求保护的本发明。

[0308] 实施例1

[0309] APP-特异性BACE抑制剂(ASBI):一类新的用于阿尔茨海默氏病的

[0310] 治疗剂

[0311] 在各种病理学的治疗中,蛋白酶抑制策略(如,BACE抑制剂)的关键限制为底物靶标作用的混乱,即,给定的靶向蛋白酶,诸如BACE或 γ -分泌酶复合体抑制所有底物的切割。就 γ -分泌酶而言,除了APP之外的底物,诸如Notch,引起对 γ -分泌酶抑制的潜在副作用的关注,以及 γ -分泌酶抑制剂司马西特的最近失败用来加强此类关注。就BACE而言,非APP底物诸如PSGL1或LRP的抑制引起相似关注。

[0312] 因此,最佳的BACE抑制剂将为不结合BACE但结合APP的抑制剂,产生APP-特异性BACE抑制(ASBI)。此类治疗将表示一类新的阿尔茨海默氏病治疗剂:ASBI。

[0313] 在本实施例中报道的关于第一ASBI的鉴定的数据证明此类方法为可行的。APP-特异性BACE抑制剂(ASBI)抑制淀粉样前体蛋白(APP)的BACE切割而不会抑制其它底物的蛋白水解切割。通过在ASBI测定中筛选448种临床化合物(NCC 3364)的小文库鉴定生物类黄酮—芸香苷、柑橘黄酮苷—其在1 μ M的剂量下作为ASBI是有效的。一组生物类黄酮的其它分析显示第二分子、高良姜精、来自高良姜根茎的生物类黄酮,其在50 μ M的剂量下作为ASBI类似地起作用。这些生物类黄酮表示据信为用于AD的一类新的调节疾病的治疗剂的首批成员。

[0314] 据信,先前还未报道本文列出的鉴定APP-特异性BACE抑制剂,和评估它们调节APP加工特异性的体内能力的方法的系统应用。鉴定生物类黄酮营养补充剂,其提供在细胞模型中充当ASBI的分子导向化合物。已示出,在AD小鼠模型中通过前药方法引起的这种生物类黄酮的升高的脑水平导致A β 42的减少。因此ASBI表示用于AD的一类新的治疗剂。

[0315] 材料和方法

[0316] 化合物。

[0317] 芸香苷(ASBI-1)获得自Sigma(目录号R5143,St.Louis,MO),高良姜精(ASBI-2)获得自Sigma(目录号282200,St.Louis,MO)并且合成高良姜精前体(PG-1)。

[0318] ASBI测定。

[0319] 由以下两部分组成a) 用于抑制MBP-C125底物的BACE切割的化合物的评估和b) 用于P5-P5' 底物的BACE抑制的候选物的评估

[0320] a) MBP-C125切割测定。

[0321] 将携带APP的125个C-末端残基的麦芽糖-结合-蛋白的蛋白构建体(1 μ L的1mM于水中)与类黄酮(100 μ M)孵育15分钟。然后提交所述混合物以通过BACE切割(Sigma#B9059, 5 μ L的3单位/ml于BACE缓冲液中) 30分钟。在0、10、20和30分钟之后,将2 μ L反应混合物冷冻并在不同的时间点对产生的APP-C99的量同时定量。通过使用经抗APP受体微珠(AL275AC) 替换抗A β 受体微珠(AL275AC) 并使得抗体与2x ALPHALisa缓冲液混合而修饰的Perkin Elmer ALPHALisa Amyloid Amyloid Beta试剂盒(AL275C) 进行定量。

[0322] b) P5-P5' 切割测定。

[0323] 使用来自Sigma-Aldrich (CS0010) 的 β -分泌酶(BACE1) Activity Detection试剂盒和标准方案测量100 μ M类黄酮对荧光底物P5-P5' 的BACE切割的抑制。

[0324] 质粒。

[0325] pAPtag5-NRG1- β 1构建体由Carl Blobel博士友好提供(Horiuchi等, (2005) Dev.Biol.283:459-471)。BACE1构建体来自Michael Willem博士和Christian Haass博士的赠予(Willem等, (2006) Science 314:664-666)。构建体pCMV5-Mint3、pMst-A β PP、pG5E1B-luc和pCMV-LacZ由Thomas Südhof博士、Patrick Mehlen博士和Veronique Corset博士慷慨提供(Cao (2001) Science 293:115-120。构建体pEF-N-FLAG-TAZ由Michael Yaffe博士和Iain Farrance博士友好提供。先前描述了构建体pcDNA3.1-APLP2-Gal4(Orcholski等, (2011) J.Alzheimers Dis.23:689-699)。

[0326] 细胞培养和蛋白质印迹。

[0327] 过表达人A β PP (7W) 的中国仓鼠卵巢(CHO) 细胞系由Edward Koo博士友好提供。用Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 将质粒构建体短暂转染至HEK293T或7W细胞中。如先前描述进行蛋白质印迹分析(Swistowski等, (2009) J.Neurosci., 29:15703-15712)。简而言之,在转染之后48小时,收获细胞并在NP-40细胞裂解缓冲液(50mM TrisHCl, pH 8.0, 150mM NaCl和1%NP-40) 中裂解。将细胞裂解物与1X LDS上样缓冲液(Invitrogen) 和50mM DTT混合,并在100 $^{\circ}$ C煮沸10min。在SDS-PAGE和电转移之后,使用抗APP抗体(CT15, 来自Edward Koo博士的友好赠予,针对 β -CTF;全长APP和sAPP α 的6E10 (Covance)) 进行蛋白质印迹。用第二抗体孵育之后进行三十分钟的TBS-Tween洗涤。

[0328] 神经调节蛋白1脱落测定。

[0329] 在含有或不含全长野生型BACE1的6孔格式中,使用如先前描述的Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 将编码人胎盘分泌型碱性磷酸酶(SEAP) -NRG1 (pAPtag5-NRG1- β 1) 融合蛋白的cDNA构建体转染至HEK293细胞中(Vassar等, (1999) Science, 286:735-741)。在转染之后,将培养基用含有10%热灭活的胎牛血清的DMEM替代并孵育24小时。在条件培养基中测量SEAP活性。对于碱性磷酸酶活性测量,将200 μ L反应溶液(0.1 M甘氨酸, pH 10.4, 1mM MgCl₂, 1mM ZnCl₂, 含有1mg/ml 4-硝基苯基磷酸二钠盐六水合物, Sigma) 添加至20 μ L条件培养基中。在405nm处读取吸光度。使用双尾学生t检验进行统计分析。

[0330] 反式激活测定。

[0331] 将HEK293T细胞用五种质粒共转染: (1) pG5E1B-luc, 0.3 μ g; (2) pCMV-LacZ, 0.1 μ g;

(3) pMst-APP (APP-Gal4) 或 pcDNA3.1-AP LP2-Gal4, 0.3 μ g; (4) pCMV5-Mint3, 1.0 μ g; (5) pEF-N-FLAG-TAZ, 1.0 μ g。在0.2ml/孔细胞培养物裂解缓冲液 (Promega) 转染之后48小时收获细胞, 并分别用Promega荧光素酶测定试剂盒和Promega β -半乳糖苷酶测定试剂盒确定它们的荧光素酶和 β -半乳糖苷酶活性。通过 β -半乳糖苷酶活性标准化荧光素酶活性以控制转染效率和对转录的一般影响。使用Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 在六孔板中以80-90%汇合 (cofluency) 进行转染。

[0332] 表面等离子体共振 (SPR) 测试。

[0333] 使用Biacore T-100 (GE Healthcare), 将羧甲基化葡聚糖 (CM-5) 芯片的四个流动池 (FC1、FC2、FC3、FC4) 表面依次用50mM NaOH、1mM HCl、0.05% H₃PO₄和20mM磷酸钠pH 7.4, 125mM氯化钠以30 μ l/min的流速平行洗涤1min。将三种融合蛋白使用20mM磷酸盐, 125mM氯化钠pH 7.4经由胺偶合固定化。三种蛋白为MBP-eAPP₂₃₀₋₆₂₄-含有麦芽糖结合蛋白 (MBP) 和APP的胞外域的残基230-624的融合蛋白 (90-kDa) (FC4)、eAPP₂₃₀₋₆₂₄-仅含有残基230-624的蛋白 (45-kDa) (FC2) 和TRX-eAPP₅₇₅₋₆₂₄-含有硫氧还蛋白 (TRX) 和胞外域的残基575-624的融合蛋白 (20-kDa) (FC3)。如在Libeu等, (2011) J. Alzheimers Dis., 25 (3): 547-566 Libeu等 (2011) 描述制备所述蛋白。将流通池FC1用作对照。将高良姜精从10mM在DMSO中的溶液稀释至50 μ M在1% DMSO、20mM磷酸钠pH 7.4, 125mM氯化钠、0.05% Tween中的溶液, 然后以1.5系列稀释10步。对于含有60秒结合相和240秒解离相的每次稀释记录结合痕迹 (binding trace)。在20 $^{\circ}$ C下以20 μ l/min的恒定流速进行每次循环。将另外240秒的以60 μ l/min穿过细胞的缓冲液流应用作为再生相以促进化合物从蛋白质的完全解离。使用Biacore T100评价软件通过减去参考和缓冲液信号获得sensograms。用PRISM (Graphpad Inc) 模拟结合曲线。

[0334] 药代动力学 (PK) 分析。

[0335] 在包括用50 μ l的5mg/ml化合物在二甲基亚砜 (DMSO) 中的储液或对于25g小鼠为10mg/kg的剂量对5只成年非转基因小鼠进行皮下 (Sub-Q) 注射的标准PK中评估高良姜精和高良姜精前体的脑渗透率。在1、2、4、6和8小时用氯胺酮/赛拉嗪麻醉注射的小鼠并通过心脏穿刺收集血液。然后用盐水灌注小鼠, 切割脑组织并在干冰上快速冷冻。将血液以3000rpm离心10分钟并收集血浆上清液。将血浆和右半脑送至Integrated Analytical Solutions (IAS, Berkeley, CA), 其中化合物的参考样品用于组织和血浆中化合物水平分析。化合物水平使用LC-MS/MS方法确定。

[0336] 试点功效测试。

[0337] 将高良姜精和高良姜精前体 (PG-1) 溶解于10%的solutol/15%的DMSO/75%的聚乙二醇 (PEG)。对于每种化合物以10mg/ml制备储液并以40mkd的剂量将100 μ l每天皮下注射保持14天。在高良姜精和高良姜精前体组中存在5只PDAPP AD模型J20小鼠, 以及9只仅经媒介物处理的J20对照。在治疗最后一天注射后2小时, 如上所述麻醉小鼠, 收集血浆的血液, 收集脑组织。进一步微切割右半脑以分离海马和内嗅皮层并且该组合的组织被用于生化分析。剩余的组织 and 血浆被送至IAS用于化合物水平分析。

[0338] 生物化学。

[0339] 使用海马/内嗅皮层组织确定A β 1-42和A β 1-40水平。简而言之, 称重冷冻的组织样品, 并在5M胍-HCl/50mM Tris, pH8中超声制备20% w/v。在冰水中用样品管进行超声处理, 60Hz下4x5秒, 然后80Hz下3x5秒。然后将样品在室温旋转3小时并在-20 $^{\circ}$ C冷冻直至测定。根

据制造商的说明书,Invitrogen ELISA试剂盒被用于A β 1-40和A β 1-42。

[0340] 结果

[0341] APP-特异性BACE抑制剂 (ASBI) 的鉴定

[0342] 使用双底物测试范例建立用于鉴定ASBI的主要高通量筛选 (HTS) 测定 (图3A&3B)。先前报道的 (Sinha等 (1999) Nature, 402:537-540) BACE底物,由融合至野生型APP的羧基端125个氨基酸的麦芽糖结合蛋白组成的MBP-C125 APP₆₉₅野生型融合蛋白被用作主要的底物;商购获得的P5-P5' 荧光底物被用作第二底物,所述荧光底物来源于APP的BACE切割位点的P5-P5' 残基。这些底物中的每一种与重组的BACE (R&D (目录号931-AS-050) 在96孔板格式中孵育。对于MBP-C125底物,来自BACE切割的C-99产物使用 AlphaLISA测定作为读出来测量 (图3B)。对于P5-P5' 底物,BACE切割之后荧光的消失被用作读出。预计ASBI将抑制MBP-C125底物的BACE切割,而不会抑制荧光底物的切割,取决于ASBI结合APP底物的地点。

[0343] 基于448种化合物的临床化合物文库的初步筛选,预期命中率非常低,因为在最初筛选中仅鉴定一种化合物。潜在“命中”的剂量反应曲线为下一步要做的以鉴定经验证的“命中”用于进一步开发。对于每种候选物在10 μ M的初始浓度下进行HTS筛选。完成448种商购获得的临床化合物的小的临床化合物文库的初始筛选。筛选产生单一的命中 (图3A),鉴定为生物类黄酮芸香苷 (ASBI-1,也称为芸香苷),其来源于见于荞麦中的柑橘黄酮苷。这种生物类黄酮降低SH-SY5Y细胞中的sAPP β ,并示出APP特异性,由此支持这一概念,即芸香苷特别地作用于APP的BACE切割。测试下一组生物类黄酮 (图4),首先测试它们抑制细胞中sAPP β 的能力。鉴定也以ASBI起作用的另一种生物类黄酮,高良姜精,抑制MBP底物的BACE (图4,菱形) 切割同时示出对P5-P5' 底物无抑制 (图4,圆圈)。高良姜精 (ASBI-2) 为见于高良姜根茎中的黄烷醇,并通常用作营养补充剂。

[0344] 生物类黄酮ASBI对细胞中sAPP β 和APP加工的作用。

[0345] 通过两种主要途径加工APP:非淀粉样途径涉及 α -分泌酶切割,将APP催化水解成sAPP α 和 α -CTF (C83),同时淀粉样途径以 β -分泌酶切割开始,将APP切割成sAPP β 和 β -CTF (C99)。然后通过 γ -分泌酶切割 β -CTF,产生A β 和AICD。在表达APP的SH-SY5Y神经母细胞瘤细胞中测试ASBI抑制 β -分泌酶加工APP的能力。由BACE切割产物形成的sAPP β 片段使用来自Perkin-Elmer (目录号A2132) 的AlphaLisa测定测量。在最初筛选中发现芸香苷之后,证明在1 μ M下,略微抑制SH-SY5Y细胞中sAPP β 的产生 (图5A)。一组生物类黄酮的测试导致将高良姜精鉴定为ASBI。用高良姜精处理SH-SY5Y细胞在50 μ M时相似地降低sAPP β 水平。未检测对APP水平的影响。

[0346] 生物类黄酮ASBI抑制APP-Gal4和APLP2-Gal4反式激活

[0347] 尽管APP-C31切割与细胞死亡相关,但是在 γ -分泌酶切割之后产生的APP细胞内结构域 (AICD) 已牵涉各种信号传导途径,并已示出调节许多基因的表达,包括KAI1、脑啡肽酶和APP本身 (Hong等, (2000) Science, 290:150-153)。建立APP-Gal4/Mint3/TAZ反式激活测定 (Maillard等, (2007) J. Med. Chem., 50:776-781;Hardy等, (1991) Trends Pharmacol. Sci., 12:383-388), 并使用该测定,发现ASBI抑制APP-Gal4反式激活 (图7)。为了确认该作用,使用APP-Gal4/Fe65反式激活测定。检查ASBI在APLP2-Gal4反式激活中的作用 (图7)。这些结果指示芸香苷 (ASBI-1) 和高良姜精 (ASBI-2) 抑制APP和相关家族成员APLP2-Gal4的反式激活。

[0348] ASBI与APP的相互作用

[0349] 为了探索ASBI与APP的相互作用,使用配体印迹技术,其中将MBP-C125 APP在硝酸纤维素印迹上进行斑点印迹并在用生物类黄酮处理后检测至蛋白的结合。将与牛血清白蛋白(BSA)的硝酸纤维素滤纸结合测定用作对照。生物类黄酮的结合使用UV和MALDI质谱分析确定。这是蛋白小分子相互作用的定性测量但是确实示出ASBI结合至APP。

[0350] 然后使用表面等离子体共振(SPR)以证明结合至APP并确定高良姜精对APP的亲合力。

[0351] 表面等离子体共振(SPR)筛选:

[0352] 使用SPR确定化合物对APP的胞外域的结合亲合力。开发测量化合物对APP的胞外域的片段的亲和力的技术。使用高良姜精结合实验TRX-eAPP575-624。将eAPP交叉连接至CM5 Biacore芯片(GE Healthcare)。流过芯片中使用各种浓度的高良姜精并使用Biacore T100确定等离子体共振信号(图5B)。

[0353] 生物类黄酮ASBI处理降低AD转基因小鼠模型中的A β

[0354] 评估小鼠中生物类黄酮芸香苷和高良姜精的脑渗透性并发现在10mpk皮下施用之后,在脑中未检测到芸香苷,同时在中能检测到低水平的高良姜精(1h时,C_{max}~50ng/g)(图8)。脑与血浆比率为1:10。为了观察如果高良姜精的脑水平能够被增强,则测试前药(PG-1)并且产生高良姜精至脑的增强的递送(1h时,C_{max}~100ng/g)。基于这些药代动力学分析,决定在AD小鼠模型,PDAPP(J20)小鼠中测试高良姜精和高良姜精前体(PG-1)。

[0355] 在40mpk时用高良姜精治疗J20小鼠示出海马和皮质中A β 40的一些减少而A β 42保持不变。然而,用高良姜精前体治疗示出A β 40和A β 42的减少与用前药治疗后观察的高良姜精升高的脑水平一致。综上所述,这些结果指示在AD的转基因小鼠模型中生物类黄酮高良姜精与APP直接相互作用,抑制APP而非神经调节蛋白或BACE-靶标肽的BACE切割,抑制BACE-依赖性APP核信号传导,并减少A β 1-42。

[0356] 讨论

[0357] 鉴定用作营养补充剂并通过新型机制抑制 β -分泌酶介导的APP加工的两种生物类黄酮类似物。这些分子抑制MBP-C125 APP底物的BACE切割,导致抑制C99的产生,而不会抑制 α -位点肽底物(P5-P5')的切割。此外,这些生物类黄酮降低神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞中的sAPP β ,然而高良姜精未能减少神经调节蛋白BACE-依赖性脱落。此外,证明活性与结合至MBP-C125的底物相关。这些发现限定调节APP加工的新的机制。

[0358] 本文描述的方法解决对阿尔茨海默氏病(AD)的蛋白酶抑制策略的关键限制,提供避免通过抑制给定靶向蛋白酶(诸如BACE或 γ -分泌酶复合体)的所有底物的切割的机制。除了APP之外的 γ -分泌酶底物,诸如Notch,引起对 γ -分泌酶抑制的潜在副作用的关注,以及 γ -分泌酶抑制剂司马西特的最近失败用来加强这些关注。就BACE而言,非APP底物诸如PSGL1或LRP引起类似关注。因此,最佳的BACE抑制剂将为结合于APP而非BACE的抑制剂,产生APP-特异性BACE抑制(ASBI)。此类治疗,如本文所述,表示一类新的阿尔茨海默氏病治疗。

[0359] 两种已知的BACE底物在免疫功能中可能为重要的:P-选择素糖蛋白配体-1(Lichtenthaler等,(2003) J.Biol.Chem.278:48713-48719),其介导白细胞粘附,和唾液酸转移酶ST6Gal I(Kitazume等,(2003) J.Biol.Chem.,278:14865-14871),其为在切割之后

分泌并涉及调节免疫反应的酶。唾液酸- α -2,6半乳糖残基与B-细胞特异性凝集素,CD22/Siglec-2的相互作用对B-细胞功能(同上)为重要的,所述唾液酸- α -2,6半乳糖残基仅通过ST6Gal I合成。值得注意的是,一些糖基化酶缺乏的小鼠似乎正常生长但是随着年龄的增长示出轻微神经异常;鞘糖脂-缺乏的小鼠示出声刺激诱导的致命的听觉性发作。在这方面,重要的是注意还未出现关于无BACE1的小鼠对免疫应激反应的报道。还已示出BACE1加工APP同族体、APLP2;这种同族体具有与推定的BACE1切割位点附近的APP不同的序列特异性,而高良姜精也抑制APLP2的BACE切割。APLP2蛋白水解产物的水平在BACE1缺乏的小鼠中降低并在BACE1过表达的小鼠中升高(Pastorino等,(2004) *Mol. Cell Neurosci.*, 25:642-649)。考虑到AD中对疾病调节治疗的迫切需要,开发APP底物-特异性BACE抑制剂的方法为新型的并且能够产生对疾病有效的临床候选物。

[0360] 建立鉴定ASBI的HTS测定。在本测定中448种化合物的临床文库的初始筛选导致特异性抑制BACE的MBP-C125底物而不会防止P5-P5'底物的切割的生物类黄酮的鉴定。这种生物类黄酮,芸香苷,为营养补充剂,也发现其抑制细胞中sAPP β 的产生。然后在细胞培养物中在ASBI和sAPP β 测定中测试一组生物类黄酮。由该测试鉴定另一生物类黄酮,高良姜精。高良姜精为在ASBI测定以及细胞中有效防止APP的BACE切割的另一营养补充剂。证明使用简单的硝酸纤维素滤膜配体-结合测定将各种生物类黄酮最初结合至MBP-C125底物。在ASBI测定中筛选一组生物类黄酮。然而,仅芸香苷和高良姜精与ASBI一样有效(图4)。高良姜精调节细胞中sAPP β 水平并证明结合至APP底物(图5)。有趣的是,已报道高良姜精为乙酰胆碱酯酶(AChE)的抑制剂(Guo等,(2010) *Chemico-Biol. Interaction*, 187:246-248)并诱导自噬(Wen等,(2012) *Pharmacology*, 89:247-255)。

[0361] 使用APP或APLP2-Gal4转染的HEK-293测定证明生物类黄酮抑制APP和APLP2的BACE切割(参见,如,Orcholski等,(2011) *J. Alzheimers Dis.*, 23(4):689-99中对测定的描述)。用Mint3和Taz转染后实现反式激活。预期ASBI仅抑制APP-Gal4的反式激活,而不是APLP2-Gal4的反式激活。然而,高良姜精抑制APP-Gal4和APLP2-Gal4。因此,高良姜精显示出APP-家族特异性而不是APP特异性;然而,考虑到来源于APLP2的AB-样片段的证明,抑制APP和APLP2的BACE切割的能力可能比仅抑制APP的切割更理想(Eggert等,(2004) *J. Biol. Chem.* 279(18):18146-18156)。

[0362] 使用NTg小鼠的脑吸收测定中两种生物类黄酮的初始药代动力学评估示出芸香苷不穿过血脑屏障,然而高良姜精确实示出一些脑渗透,因此使其能够在转基因(Tg)小鼠模型中用于概念验证研究的评估。然后评估高良姜精对AB40和AB42的体内作用(图7)。在本研究中AB β 水平的减少是非常鼓舞人心的。使用高良姜精的前药(PG-1),高良姜精的脑水平的进一步增加是可能的,并且证明在体内PG-1比高良姜精更有效降低AB40和AB42。

[0363] 总之,当前研究指示某些生物类黄酮具有结合APP并抑制APP和APLP2的BACE切割的能力,从而表明它们以APP特异性BACE抑制剂起作用。这些表示一类新的用于阿尔茨海默氏病的治疗剂,所述治疗剂将不含BACE的直接抑制的潜在毒性。在AD小鼠模型中,作为其前药类似物的高良姜精,高良姜精前体-1也示出有效减少AB40和AB42。

[0364] 实施例2

[0365] 作为ASBI的高良姜精前体

[0366] 进行CNS暴露研究并且该研究由时程设计组成以收集肝素化的血浆和脑。在sc施

用10mg/kg高良姜精或高良姜精前体(化合物-2)之后,化合物的血浆和脑水平通过定量LC/MS/MS方法学来确定。用含有内标的乙腈:甲醇(1:1)混合物沉淀血浆样品。将脑样品在乙酸乙酯中直接均化或用液-液方法从5M胍匀浆物中提取。将所得上清液蒸发至干燥并经受LC/MS/MS分析。对于每个化合物,使用5只小鼠用于分析。然后确定脑与血浆比率和血浆/脑C_{max}水平(参见,如,图8)。

[0367] 实验程序—化合物合成

[0368] 5,7-二乙酰氧基黄酮:

[0369] 将5,7-二羟基-2-苯基-4H-色烯-4-酮(5.00g,19.67mmol)添加至乙酸酐在吡啶(1:5,42mL)中的溶液并将反应混合物在环境温度下搅拌60小时。将反应混合物用乙醚(100mL)稀释并过滤。将固体用额外乙醚(3x50mL)洗涤并在高真空下干燥,获得呈白色结晶固体的二乙酸4-氧代-2-苯基-4H-色烯-5,7-二基酯(6.40g,18.92mmol,96%)。

[0370] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.36 (s, 3H, CH₃COO), 2.45 (s, 3H, CH₃COO), 6.67 (s, 1H, H-3), 6.85 (d, J=2 Hz, 1H, H-6), 7.36 (d, J=2 Hz, 1H, H-8), 7.50 (m, 3H, H-3', 5', H-4'), 7.84 (dd, J=8Hz, 2H, H-2', 6') ;

[0371] ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 21.2 (q, CH₃COO), 21.3 (q, CH₃-C=O), 108.7 (d, C-3), 109.1 (d, C-8), 113.7 (d, C-6), 115.1 (s, C-4a), 126.3 (2×d, C-2', 6'), 129.2 (2×d, C-3', 5'), 131.2 (d, C-4'), 131.9 (s, C-1'), 150.3 (s, C-5), 154.0 (s, C-7), 157.8 (s, C-8a), 162.6 (s, C-2), 168.1 (s, CH₃-C=O), 169.5 (s, CH₃COO), 176.5 (s, C-4) .

[0372] DMDO的制备:

[0373] 将3L三颈圆底反应烧瓶装配有高效机械搅拌器、固体加料漏斗和冷凝器(30cm)、用于向下移位的装置,连接于两颈收集瓶,后者通过干冰/丙酮浴冷却至-78℃。反应烧瓶装载水(254mL)、丙酮(192mL)和NaHCO₃(58g)的混合物并在冰/水浴的帮助下冷却至5-10℃。在剧烈搅拌和冷却时,将固体OXONE®(120g,0.195mol)分五份在3分钟间隔下添加。在最后添加3min之后,将加料漏斗用塞子替代,并将适度真空(80-100mmHg)应用于所述烧瓶。从反应烧瓶移除冷浴(5-10℃),并同时剧烈搅拌,在90分钟的时段内蒸馏DMDO/丙酮溶液并在冷却的(-78℃)收集瓶中收集。将收集瓶升温至-20℃并经K₂CO₃干燥3小时。将DMDO溶液过滤至干燥烧瓶中并保存在-20℃下直至使用。收集大约130ml DMDO溶液。通过将0.2mL干燥的DMDO溶液的等分试样溶解在CDCl₃中并将二甲基过氧化酮的甲基质子信号的高度(在δ 1.65)与丙酮(0.5%)右侧¹³C伴峰的高度进行比较,经由NMR确定DMDO的浓度,产生0.05M DMDO溶液。该分析必须毫无延迟地进行!

[0374] 5,7-二乙酰氧基-3-羟基黄酮:

[0375] 将二乙酸4-氧代-2-苯基-4H-色烯-5,7-二基酯(1.80g,5.32mmol)添加至干燥粉状4 Å分子筛(1.80g)在DCM(32ml)中的悬浮液中并冷却至0℃。逐滴添加DMDO溶液(120ml,7.02mmol,1.32当量)。将所得溶液在0℃搅拌3小时并允许升温至环境温度并在该温度下搅拌48小时。将反应混合物过滤通过在CELITE®床上的无水硫酸钠层并将挥发物在环境温度下真空去除,获得呈油状物的粗品二乙酸7-氧代-1a-苯基-7,7a-二氢-1aH-环氧乙烯并[2,3-b]色烯-4,6-二基酯(约1.90g)。将该油状物直接用于下一阶段。

[0376] 将粗反应混合物(约1.90g)在含有15mg p-TSA的DCM(32ml)中搅拌。将反应混合物

几乎立即固化。将反应混合物用DCM (20ml) 稀释并搅拌2天,其中TLC分析指示消耗二乙酸7-氧代-1 α -苯基-7,7 α -二氢-1 α H-环氧乙烯并[2,3-b]色烯-4,6-二基酯。将反应混合物吸附至硅胶并重复快速柱色谱法(氯仿作为洗脱液)获得不纯的二乙酸3-羟基-4-氧代-2-苯基-4H-色烯-5,7-二基酯(800mg)。通过从丙酮/乙醚混合物重结晶实现进一步纯化以获得呈乳膏固体的二乙酸3-羟基-4-氧代-2-苯基-4H-色烯-5,7-二基酯(660mg, 1.86mmol, 35%, 经2步)。将材料分离成水合物。此外,即使在真空下经延长干燥之后,痕量的乙醚也不能在真空下去除。

[0377] 应理解的是,本文所述的实施例和实施方案仅是为了描述的目的,且将对本领域熟练技术人员暗示,鉴于其的各种修改或变化将包括在本申请的主旨和范围和所附权利要求的范围内。本文引用的所有出版物、专利和专利申请为了所有目的据此通过引用整体并入。

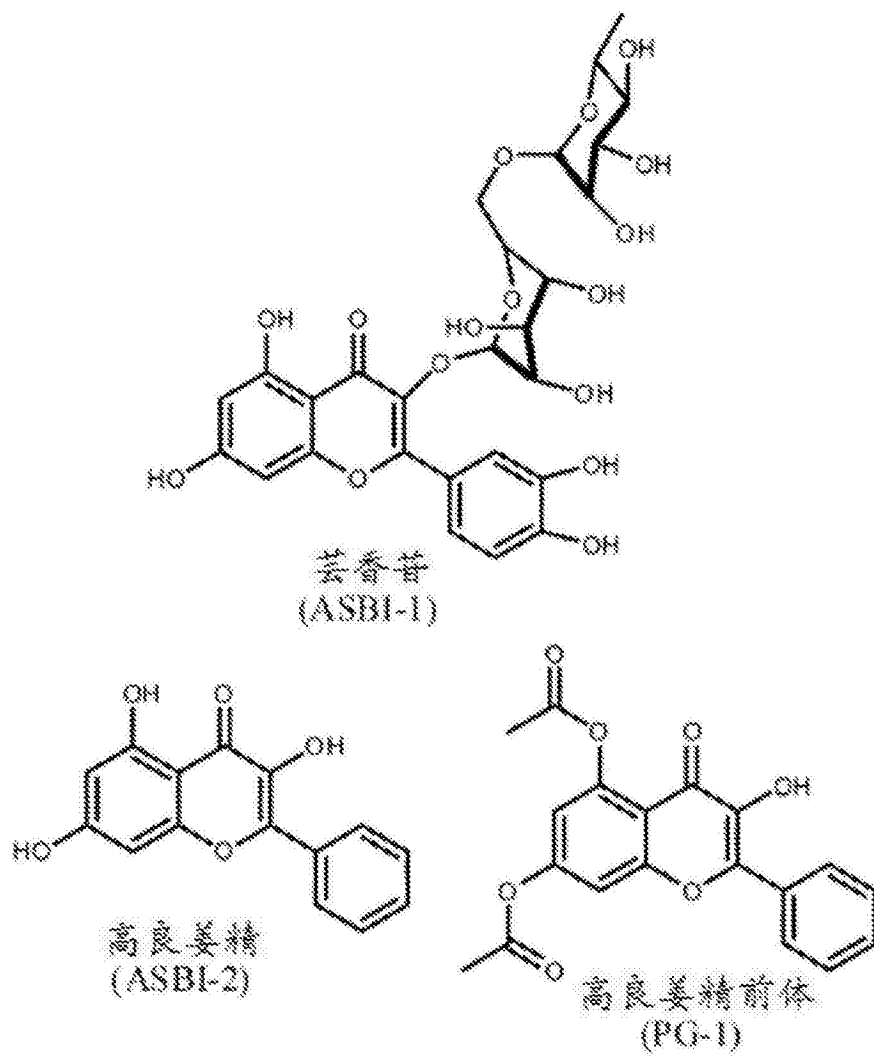


图1

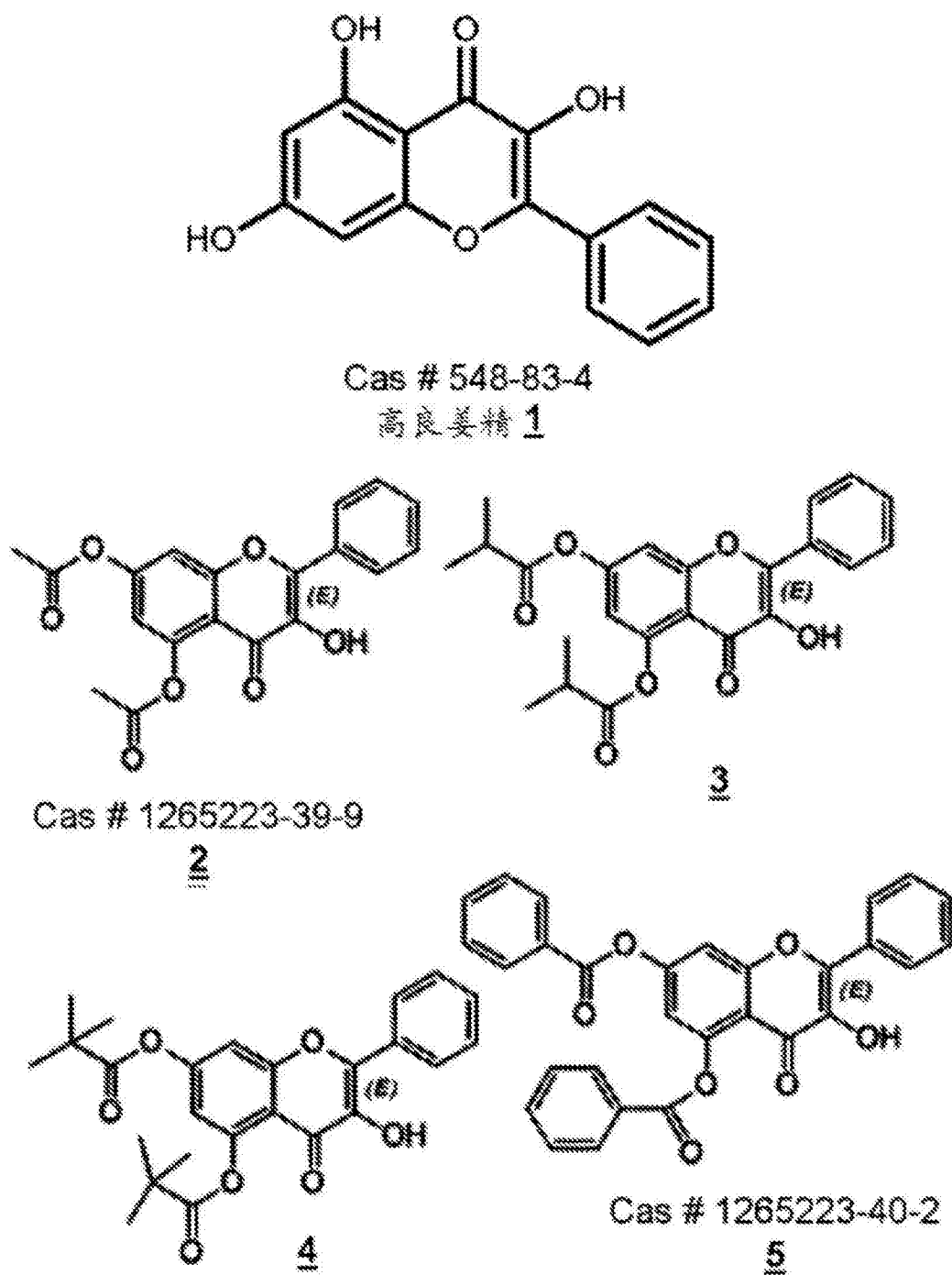


图2

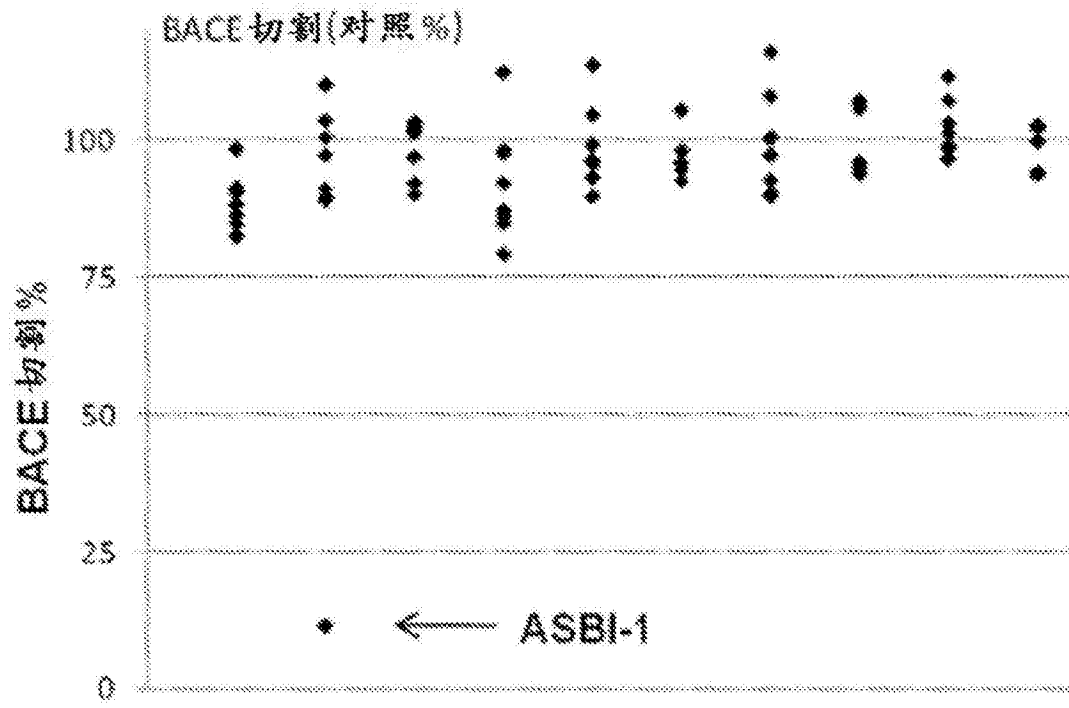


图3A

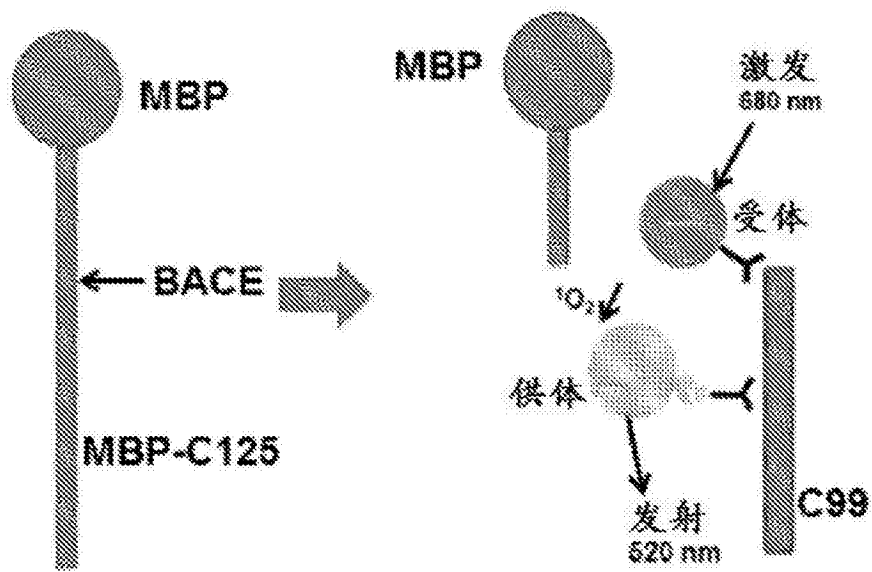


图3B

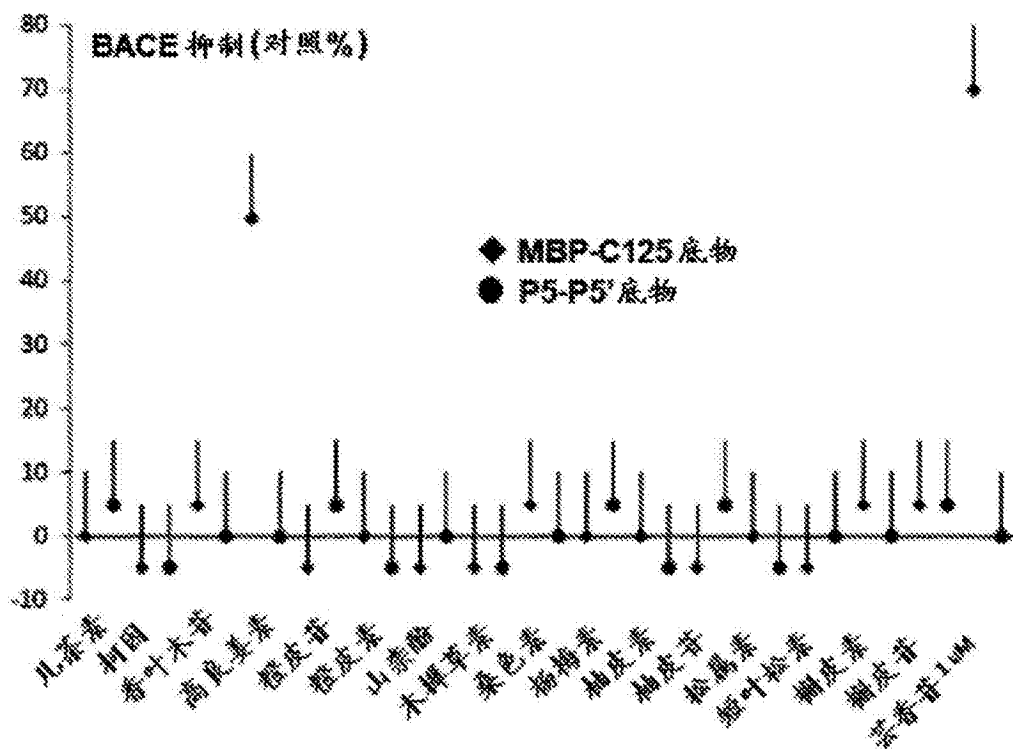


图4

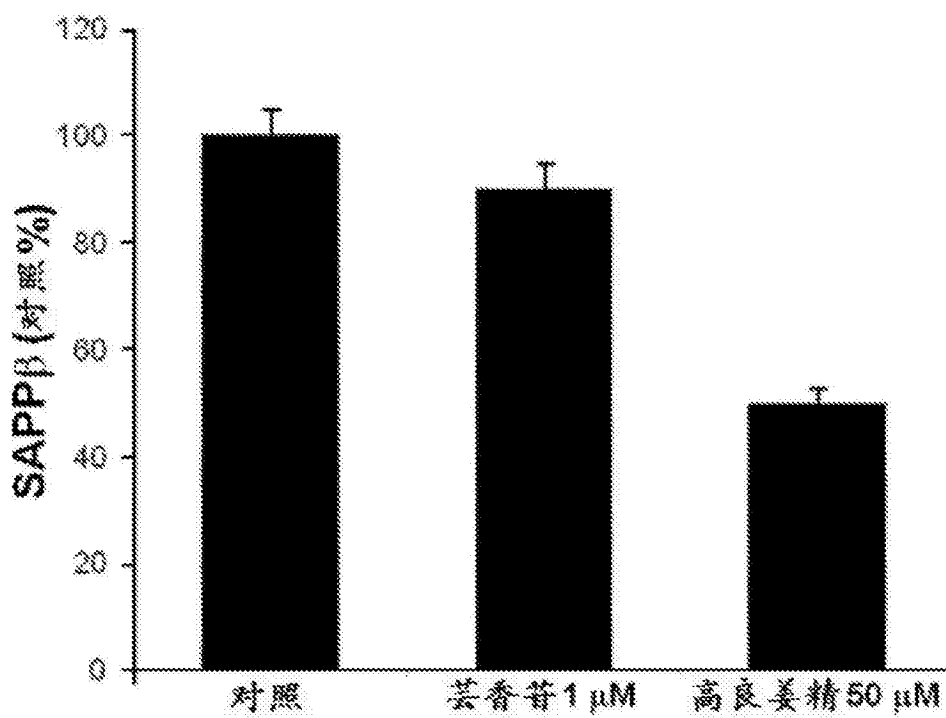


图5A

结合至不同APP片段的高良姜精

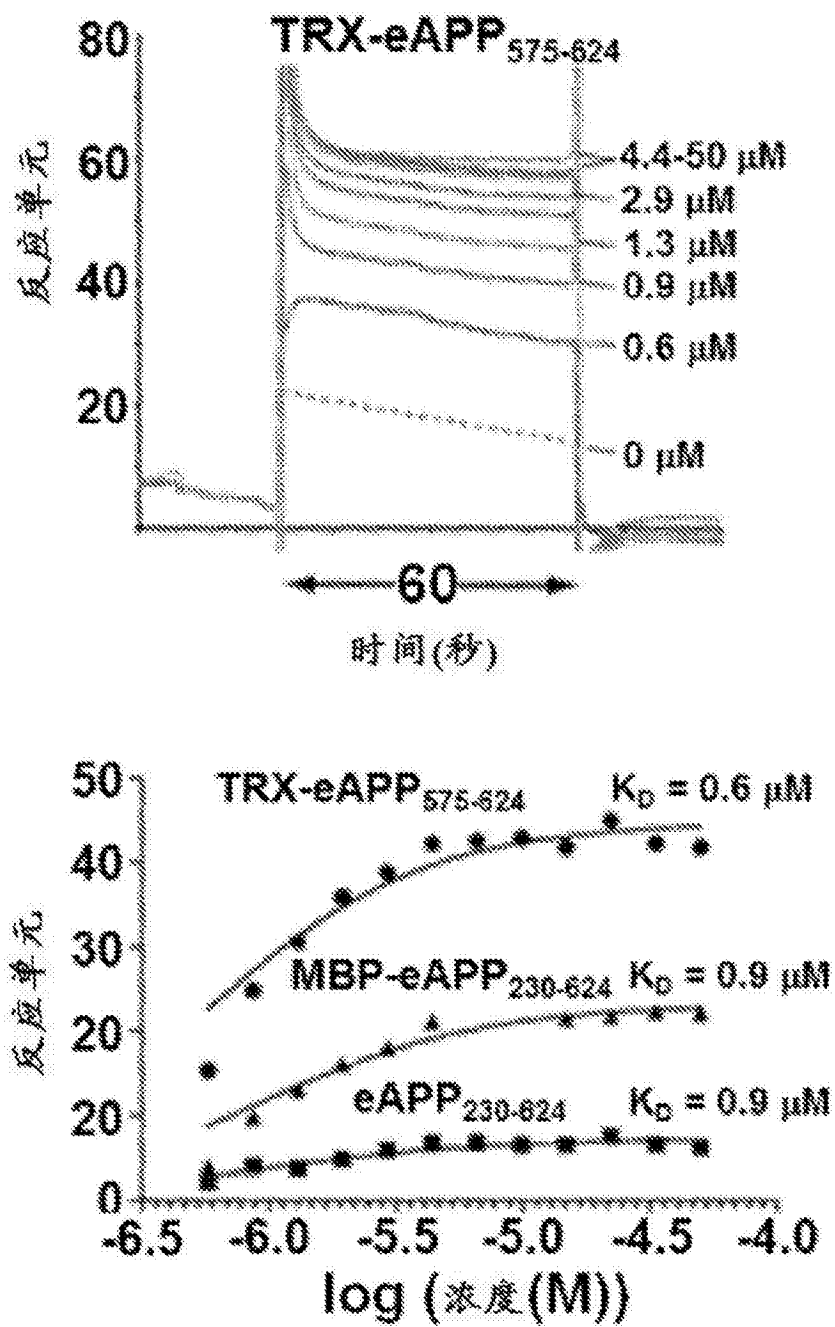


图5B

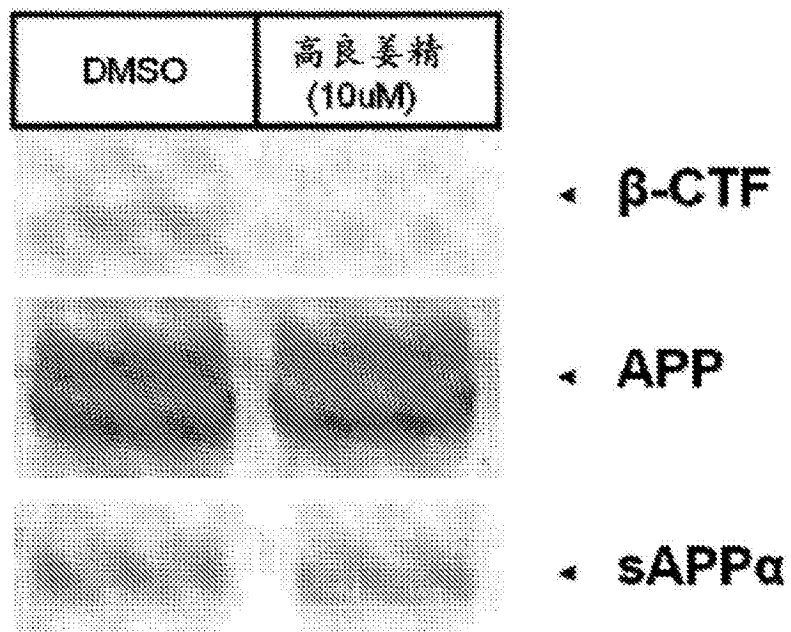


图6A

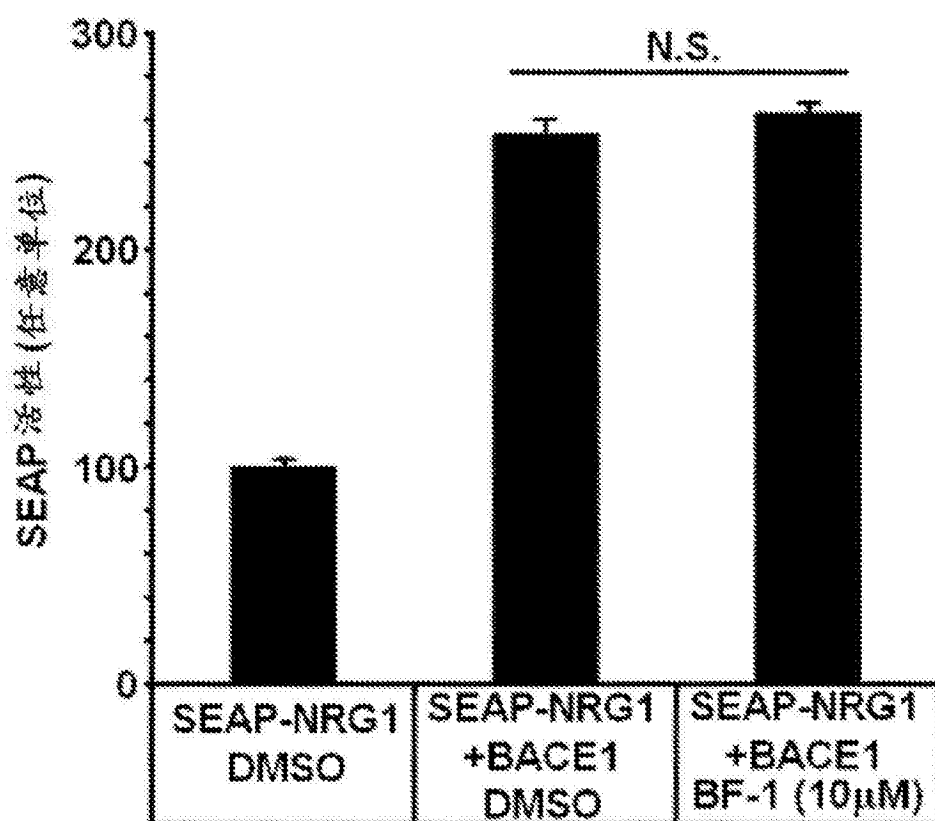


图6B

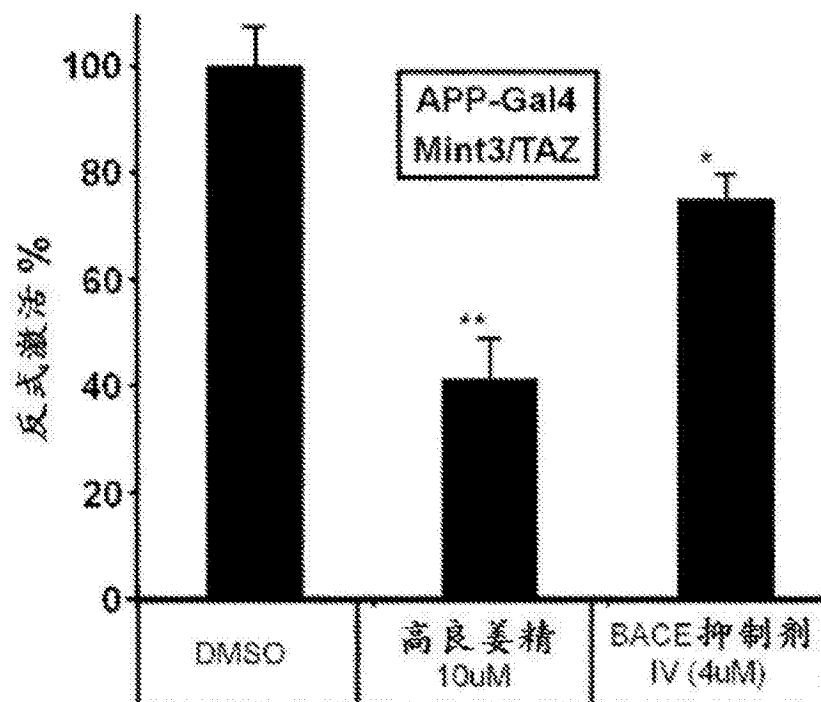


图7A

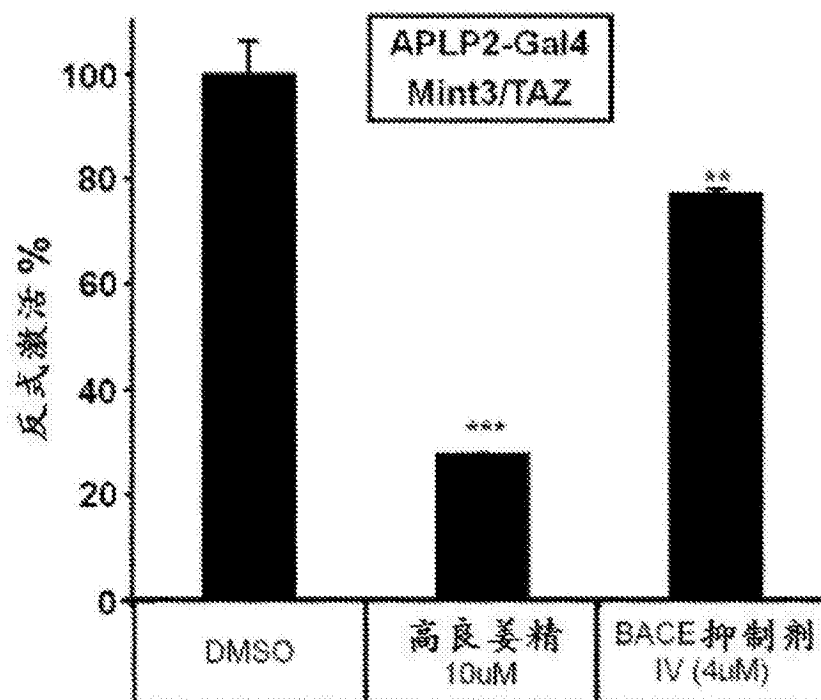


图7B

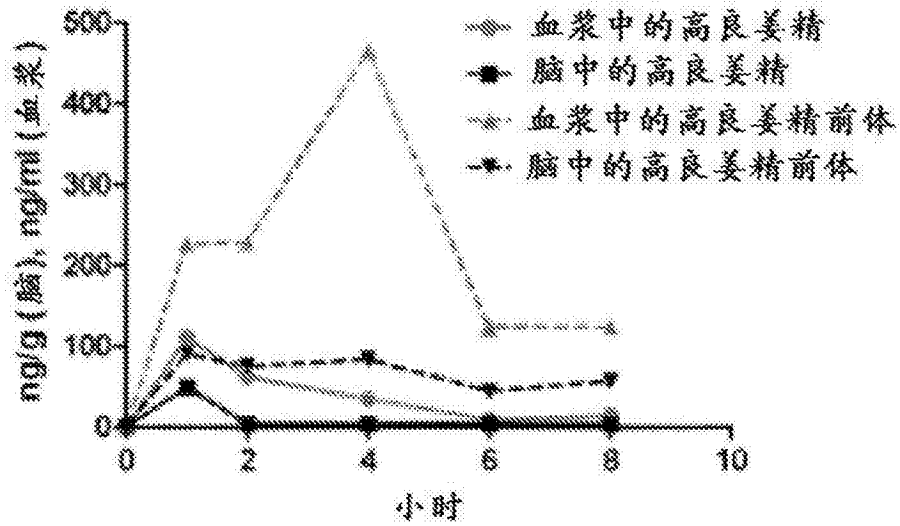


图8

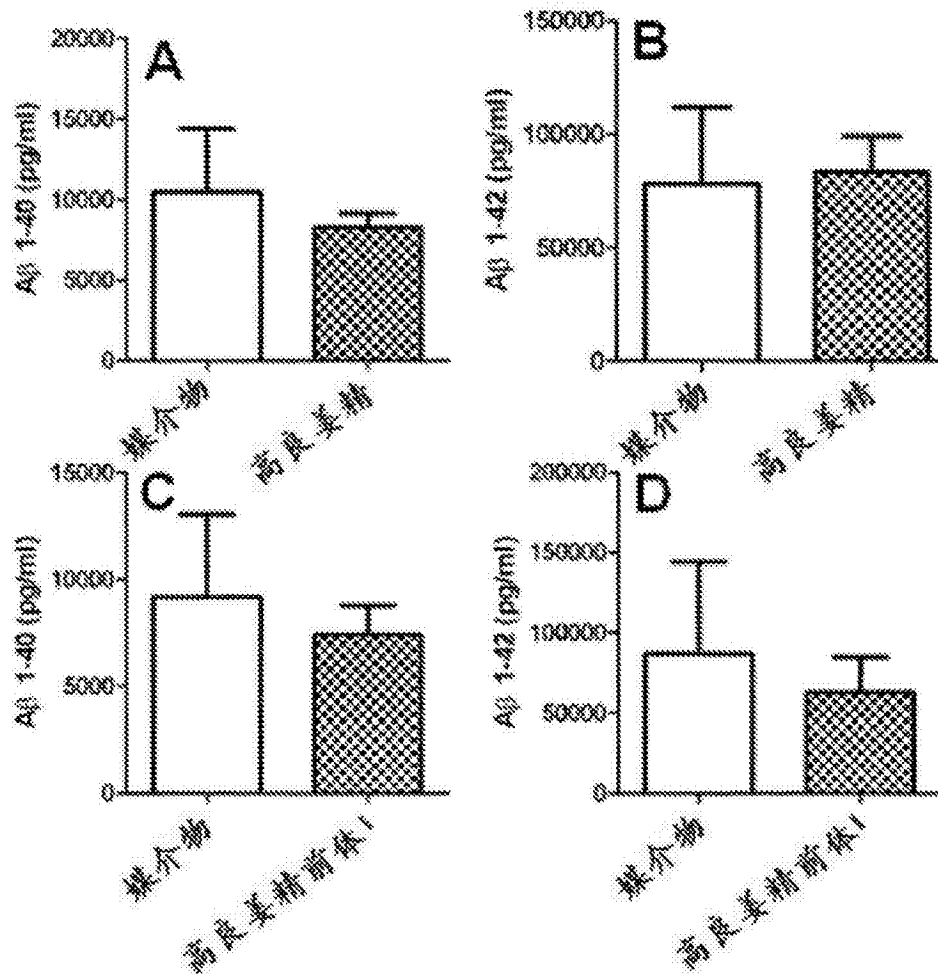


图9

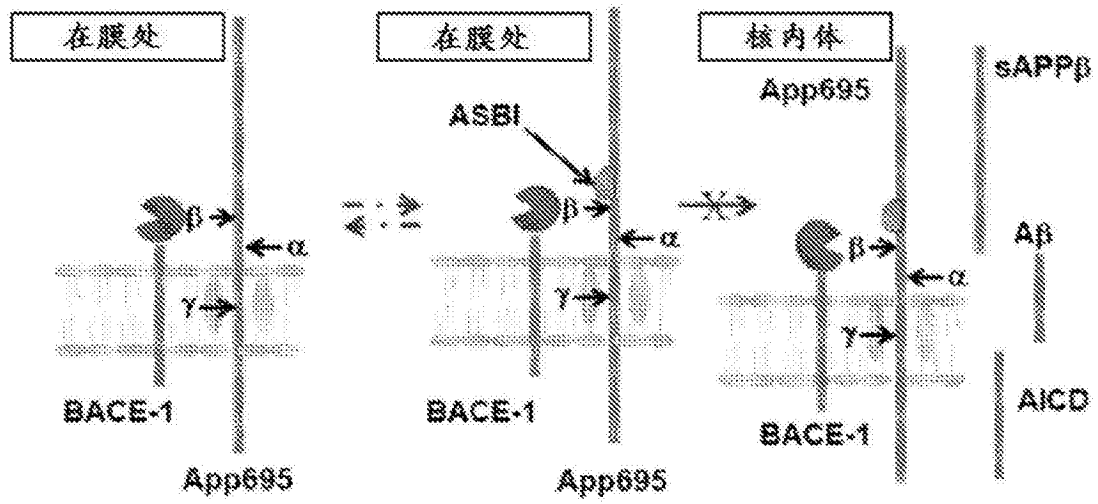


图10

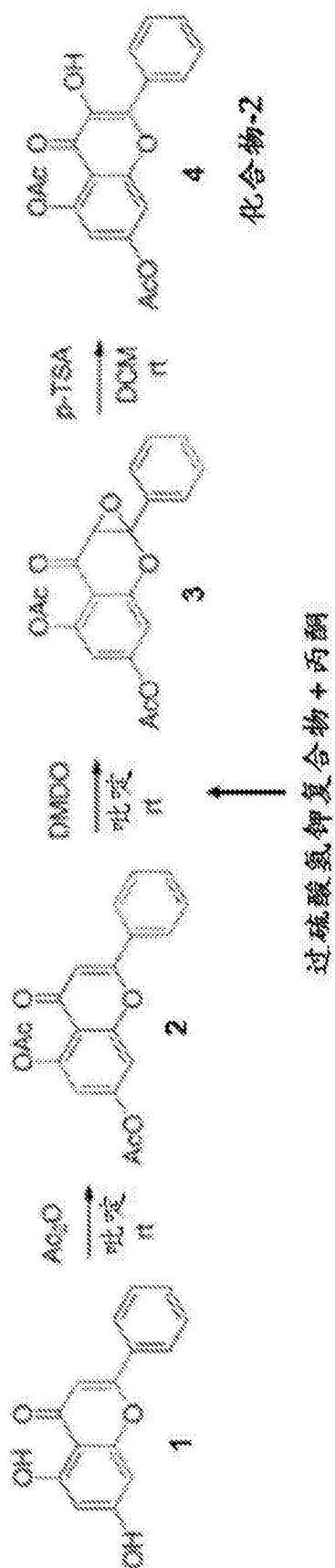


图11