



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102427727 A

(43) 申请公布日 2012. 04. 25

(21) 申请号 201080021505. 6

A61K 31/195 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 04. 29

(30) 优先权数据

61/173, 797 2009. 04. 29 US

61/175, 270 2009. 05. 04 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 11. 16

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/001282 2010. 04. 29

(87) PCT申请的公布数据

W02010/126605 EN 2010. 11. 04

(71) 申请人 比奥根艾迪克 MA 公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 马特维·卢卡舍夫

(74) 专利代理机构 上海胜康律师事务所 31263

代理人 李献忠

(51) Int. Cl.

A01N 37/12 (2006. 01)

A01N 37/44 (2006. 01)

权利要求书 5 页 说明书 17 页 附图 14 页

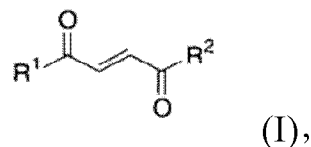
(54) 发明名称

神经变性和神经炎症的治疗

(57) 摘要

本发明提供治疗患有以神经变性和神经炎症中的至少一者为特征的病状的受试者的方法。本发明还提供减轻患有以星形胶质化增强为特征的病状的受试者的星形胶质化的方法。本发明还提供向有需要的受试者提供神经保护的方法。

1. 一种治疗患有以至少一种选自神经变性和神经炎症的症状为特征的病状的受试者的方法,所述方法包括对所述受试者施用治疗有效量的至少一种式 I 化合物:



其中 R^1 和 R^2 独立地选自 OH 、 O^- 和 (C_{1-6}) 烷氧基,条件是 R^1 和 R^2 中的至少一者是 (C_{1-6}) 烷氧基,或其药学上可接受的盐,其中所述对所述受试者施用所述治疗有效量的所述至少一种式 I 化合物或其药学上可接受的盐使得至少一个选自 Ccl20、Ccl3、Ccl4、Cxc11、Cxc110、Cxc12、Cxc13、Cxc16、IL1a、IL1b、Tnf、Ifit3、Nfkb1a、Nfkb1z、Tnfaip2 和 Zc3h12a 的基因在所述受试者中的表达受到抑制。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述以至少一种选自神经变性和神经炎症的症状为特征的病状还以至少一个选自 Ccl20、Ccl3、Ccl4、Cxc11、Cxc110、Cxc12、Cxc13、Cxc16、IL1a、IL1b、Tnf、Ifit3、Nfkb1a、Nfkb1z、Tnfaip2 和 Zc3h12a 的基因的表达增强为特征。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述对所述受试者施用所述治疗有效量的所述至少一种式 I 化合物使得至少一个选自 Gsta2、Gsta3、Gcl1c、Ggt1、Txnrd1、Srxn1、Sqstm1 和 Nqo1 的基因在所述受试者中的表达上调。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述至少一种化合物配制成包括所述至少一种化合物和至少一种选自载剂、佐剂和赋形剂的药学上可接受的媒介物的药物组合物。

5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的方法,其中所述至少一种化合物选自富马酸二甲酯和富马酸单甲酯。

6. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的方法,其中对所述受试者施用的仅有活性剂是富马酸二甲酯 (DMF)。

7. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的方法,其中对所述受试者施用的仅有活性剂是富马酸单甲酯 (MMF)。

8. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的方法,其中对所述受试者施用的仅有活性剂是 DMF 和 MMF。

9. 根据权利要求 1 至 8 中任一项所述的方法,其中所述至少一种化合物以足以在所述受试者中减轻神经变性和神经炎症中的至少一者的量和时间段施用。

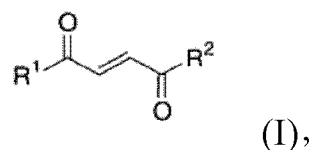
10. 根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的方法,其中所述以至少一种选自神经变性和神经炎症的症状为特征的病状选自:肾上腺脑白质营养不良 (ALD)、酒精中毒、亚历山大氏病、阿尔卑斯氏病、阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化 (路葛雷克氏病)、共济失调毛细血管扩张、巴腾病 (又名史皮莱姆-沃格特-休格尔-巴腾病)、牛海绵状脑病 (BSE)、卡纳万病、大脑性麻痹、柯凯因综合征、皮质基底变性、克罗伊茨费尔特-雅各布病、家族性致死性失眠、额颞叶变性、亨廷顿氏病、HIV 相关性痴呆、肯尼迪氏病、克利伯氏病、路易体性痴呆、神经莱姆病、马查多-约瑟夫病 (脊髓小脑性共济失调 3 型)、多系统萎缩、多发性硬化、发作性睡病、尼曼-皮克病、巴金森氏病、佩利措伊斯-梅茨巴赫病、皮克氏病、原发性脊髓侧索硬化、朊病毒病、进行性核上眼神经麻痹症、雷夫苏姆氏病、山霍夫病、谢耳德氏病、恶性贫血继发性脊髓亚急性联合变性、史皮莱姆-沃格特-休格尔-巴腾病 (又名巴腾病)、脊

髓小脑共济失调、脊髓性肌萎缩、史提尔 - 里查德森 - 奥尔泽斯基病、脊髓痨、中毒性脑病、LHON(莱伯氏遗传性视神经病变、MELAS(线粒体脑肌病 ; 乳酸性酸中毒 ; 中风)、MERRF(肌肉阵挛性癫痫 ; 破碎红纤维病)、PEO(进行性眼外肌麻痹、利氏综合征、MNGIE(肌病和眼外肌瘫痪 ; 神经病 ; 胃肠病 ; 脑病)、科恩 - 塞亚综合征 (KSS)、NARP、遗传性痉挛性截瘫、线粒体肌病和弗里德赖希共济失调。

11. 根据权利要求 10 所述的方法, 其中所述以神经变性和神经炎症中的至少一者为特征的病状是多发性硬化 (MS)。

12. 根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的方法, 其中所述受试者没有患 MS。

13. 一种减轻患有以星形胶质化增强为特征的病状的受试者的星形胶质化的方法, 所述方法包含对受试者施用治疗有效量的至少一种式 I 化合物:



其中 R^1 和 R^2 独立地选自 OH、 O^- 和 (C_{1-6}) 烷氧基, 或其药学上可接受的盐。

14. 根据权利要求 13 所述的方法, 其中所述对所述受试者施用所述治疗有效量的所述至少一种式 I 化合物或其药学上可接受的盐使得至少一个选自 Ccl20、Ccl3、Ccl4、Cxc11、Cxc110、

15. 根据权利要求 13 或 14 所述的方法, 其中所述对所述受试者施用所述治疗有效量的所述至少一种式 I 化合物使得至少一个选自 Gsta2、Gsta3、Gclc、Ggt1、Txnrd1、Srxn1、Sqstm1 和 Nqo1 的基因在所述受试者中的表达上调。

16. 根据权利要求 13 至 15 中任一项所述的方法, 其中所述至少一种化合物配制成包括所述至少一种化合物和至少一种选自载剂、佐剂和赋形剂的药学上可接受的媒介物的药物组合物。

17. 根据权利要求 13 至 16 中任一项所述的方法, 其中所述至少一种化合物配制成包括所述至少一种化合物和至少一种选自载剂、佐剂和赋形剂的药学上可接受的媒介物的药物组合物。

18. 根据权利要求 13 至 17 中任一项所述的方法, 其中所述至少一种化合物选自富马酸二甲酯和富马酸单甲酯。

19. 根据权利要求 13 至 17 中任一项所述的方法, 其中对所述受试者施用的仅有活性剂是富马酸二甲酯 (DMF)。

20. 根据权利要求 13 至 17 中任一项所述的方法, 其中对所述受试者施用的仅有活性剂是富马酸单甲酯 (MMF)。

21. 根据权利要求 13 至 17 中任一项所述的方法, 其中对所述受试者施用的仅有活性剂是 DMF 和 MMF。

22. 根据权利要求 13 至 21 中任一项所述的方法, 其中所述至少一种化合物以足以在所述受试者中减轻神经变性和神经炎症中的至少一者的量和时间段施用。

23. 根据权利要求 13 至 22 中任一项所述的方法, 其中所述以星形胶质化增强为特征的病状选自: 肾上腺脑白质营养不良 (ALD)、酒精中毒、亚历山大氏病、阿尔卑斯氏病、阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化 (路葛雷克氏病)、共济失调毛细血管扩张、巴腾病 (又名史

皮莱姆-沃格特-休格尔-巴腾病)、牛海绵状脑病(BSE)、卡纳万病、大脑性麻痹、柯凯因综合征、皮质基底变性、克罗伊茨费尔特-雅各布病、家族性致死性失眠、额颞叶变性、亨廷顿氏病、HIV 相关性痴呆、肯尼迪氏病、克利伯氏病、路易体性痴呆、神经莱姆病、马查多-约瑟夫病(脊髓小脑性共济失调3型)、多系统萎缩、多发性硬化、发作性睡病、尼曼-皮克病、巴金森氏病、佩利措伊斯-梅茨巴赫病、皮克氏病、原发性脊髓侧索硬化、朊病毒病、进行性核上眼神经麻痹症、雷夫苏姆氏病、山霍夫病、谢耳德氏病、恶性贫血继发性脊髓亚急性联合变性、史皮莱姆-沃格特-休格尔-巴腾病(又名巴腾病)、脊髓小脑共济失调、脊髓性肌萎缩、史提尔-里查德森-奥尔泽斯基病、脊髓痨、中毒性脑病、LHON(莱伯氏遗传性视神经病变)、MELAS(线粒体脑肌病;乳酸性酸中毒;中风)、MERRF(肌肉阵挛性癫痫;破碎红纤维病)、PEO(进行性眼外肌麻痹)、利氏综合征、MNGIE(肌病和眼外肌瘫痪;神经病;胃肠病;脑病)、科恩-塞亚综合征(KSS)、NARP、遗传性痉挛性截瘫、线粒体肌病和弗里德赖希共济失调。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中所述以神经变性和神经炎症中的至少一者为特征的病状是多发性硬化(MS)。

25. 根据权利要求13至22中任一项所述的方法,其中所述受试者没有患MS。

26. 一种鉴别化合物为候选神经保护剂的方法,所述方法包括

a) 在靶细胞、组织或哺乳动物中诱发神经变性和神经炎症中的至少一者,

b) 在所述化合物存在的情况下测量所述靶细胞、组织或哺乳动物中的神经变性和神经炎症中的至少一者的至少一个标志物的表达,和

c) 在所述化合物不存在的情况下测量所述靶细胞、组织或哺乳动物中的神经变性和神经炎症中的至少一者的至少一个标志物的表达,

其中如果在所述化合物存在的情况下神经变性和神经炎症中的至少一者的至少一个标志物的所述表达相对于所述化合物不存在的情况下它的表达而言有所降低,那么所述化合物鉴别为候选神经保护剂。

27. 根据权利要求26所述的方法,更包括:

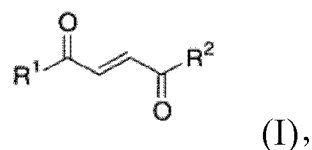
d) 在所述至少一种化合物存在的情况下测量星形胶质化,和

e) 在所述至少一种化合物不存在的情况下测量星形胶质化,

其中在所述化合物存在的情况下的星形胶质化相对于所述化合物不存在的情况下的星形胶质化的程度而言有所降低。

28. 根据权利要求26所述的方法,其中所述至少一个标志物是至少一个选自 Ccl20、Ccl3、Ccl4、Ccl11、Ccl10、Ccl12、Ccl13、Ccl16、IL1a、IL1b、Tnf、Ifit3、Nfkb1a、Nfkb1b、Tnfai2 和 Zc3h12a 的基因的表达水平。

29. 一种向有需要的受试者提供神经保护的方法,所述方法包含对受试者施用治疗有效量的至少一种式 I 化合物:



其中 R^1 和 R^2 独立地选自 OH 、 O^- 和 (C_{1-6}) 烷氧基,条件是 R^1 和 R^2 中的至少一者是 (C_{1-6}) 烷氧基,或其药学上可接受的盐,

其中所述对所述受试者施用所述治疗有效量的所述至少一种式 I 化合物或其药学上可接受的盐使得至少一个选自 Ccl20、Ccl3、Ccl4、Cxc11、Cxc110、Cxc12、Cxc13、Cxc16、IL1a、IL1b、Tnf、Ifit3、Nfkb1a、Nfkb1z、Tnfaip2 和 Zc3h12a 的基因在所述受试者中的表达受到抑制。

30. 根据权利要求 29 所述的方法,其中所述以至少一种选自神经变性和神经炎症的症状为特征的病状还以至少一个选自 Ccl20、Ccl3、Ccl4、Cxc11、Cxc110、Cxc12、Cxc13、Cxc16、IL1a、IL1b、Tnf、Ifit3、Nfkb1a、Nfkb1z、Tnfaip2 和 Zc3h12a 的基因的表达增强为特征。

31. 根据权利要求 29 或 30 所述的方法,其中所述对所述受试者施用所述治疗有效量的所述至少一种式 I 化合物使得至少一个选自 Gsta2、Gsta3、Gclc、Ggt1、Txnrd1、Srxn1、Sqstm1 和 Nqo1 的基因在所述受试者中的表达上调。

32. 根据权利要求 29 至 31 中任一项所述的方法,其中所述至少一种化合物配制成包括所述至少一种化合物和至少一种选自载剂、佐剂和赋形剂的药学上可接受的媒介物的药物组合物。

33. 根据权利要求 29 至 32 中任一项所述的方法,其中所述至少一种化合物选自富马酸二甲酯和富马酸单甲酯。

34. 根据权利要求 29 至 32 中任一项所述的方法,其中对所述受试者施用的仅有活性剂是富马酸二甲酯 (DMF)。

35. 根据权利要求 29 至 32 中任一项所述的方法,其中对所述受试者施用的仅有活性剂是富马酸单甲酯 (MMF)。

36. 根据权利要求 29 至 32 中任一项所述的方法,其中对所述受试者施用的仅有活性剂是 DMF 和 MMF。

37. 根据权利要求 29 至 36 中任一项所述的方法,其中所述至少一种化合物以足以在所述受试者中减轻神经变性和神经炎症中的至少一者的量和时间段施用。

38. 根据权利要求 29 至 37 中任一项所述的方法,其中所述以至少一种选自神经变性和神经炎症的症状为特征的病状选自:肾上腺脑白质营养不良 (ALD)、酒精中毒、亚历山大氏病、阿尔卑斯氏病、阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化 (路葛雷克氏病)、共济失调毛细血管扩张、巴腾病 (又名史皮莱姆-沃格特-休格尔-巴腾病)、牛海绵状脑病 (BSE)、卡纳万病、大脑性麻痹、柯凯因综合征、皮质基底变性、克罗伊茨费尔特-雅各布病、家族性致死性失眠、额颞叶变性、亨廷顿氏病、HIV 相关性痴呆、肯尼迪氏病、克利伯氏病、路易体性痴呆、神经莱姆病、马查多-约瑟夫病 (脊髓小脑性共济失调 3 型)、多系统萎缩、多发性硬化、发作性睡病、尼曼-皮克病、巴金森氏病、佩利措伊斯-梅茨巴赫病、皮克氏病、原发性脊髓侧索硬化、朊病毒病、进行性核上眼神经麻痹症、雷夫苏姆氏病、山霍夫病、谢耳德氏病、恶性贫血继发性脊髓亚急性联合变性、史皮莱姆-沃格特-休格尔-巴腾病 (又名巴腾病)、脊髓小脑共济失调、脊髓性肌萎缩、史提尔-里查德森-奥尔泽斯基病、脊髓痨、中毒性脑病、LHON (莱伯氏遗传性视神经病变)、MELAS (线粒体脑肌病;乳酸性酸中毒;中风)、MERRF (肌肉阵挛性癫痫;破碎红纤维病)、PEO (进行性眼外肌麻痹)、利氏综合征、MNGIE (肌病和眼外肌瘫痪;神经病;胃肠病;脑病)、科恩-塞亚综合征 (KSS)、NARP、遗传性痉挛性截瘫、线粒体肌病和弗里德赖希共济失调。

39. 根据权利要求 38 所述的方法,其中所述以神经变性和神经炎症中的至少一者为特

征的病状是多发性硬化 (MS)。

40. 根据权利要求 29 至 37 中任一项所述的方法,其中所述受试者没有患 MS。

神经变性和神经炎症的治疗

相关申请案交叉参考

[0001] 本申请案要求 2009 年 4 月 29 日提交的美国临时专利申请案第 61/173,797 号和 2009 年 5 月 4 日提交的美国临时专利申请案第 61/175,270 号的优先权。据此这两个申请案的全部公开内容以引用的方式并入本文中。

技术领域

[0002] 本发明提供治疗患有以神经变性和神经炎症中的至少一者为特征的病状的受试者的方法,所述方法通过对受试者施用治疗有效量的至少一种式 I 化合物或其药学上可接受的盐。本发明还提供减轻患有以星形胶质化增强为特征的病状的受试者的星形胶质化的方法,所述方法包括对受试者施用治疗有效量的至少一种式 I 化合物或其药学上可接受的盐。本发明还提供向有需要的受试者提供神经保护的方法,所述方法包括对受试者施用治疗有效量的至少一种式 I 化合物或其药学上可接受的盐。本发明还提供鉴别化合物为治疗以神经变性和神经炎症中的至少一者为特征的病状的候选药剂的筛选方法。

背景技术

[0003] 星形胶质细胞是脑的主要细胞组分。这些胶质细胞占总脑质量的约 90%,且在成人脑中数量上超过神经元 5 至 10 倍。在 20 世纪 80 年代初,表征了两种类型的星形胶质细胞:纤维性和原生质性。纤维性星形胶质细胞(1 型)具有星样形状,通常可见于白质中,且具有在有髓鞘纤维、血液毛细血管之间延伸的长突,并在血脑屏障(BBB)周围形成血管脚板(end-feet)结构。相比而言,原生质性星形胶质细胞(2 型)是有分枝的,具有包封神经元突并存在于灰质中的短突。

[0004] 已推断胶质细胞、小胶质细胞和星形胶质细胞的活化为促成神经变性和神经炎症疾病(包含多发性硬化(MS))的病理学的机理。在疾病早期,星形胶质细胞可分泌募集炎症细胞的细胞因子和趋化因子。随着疾病进展,星形胶质化被认为可促成胶质瘢痕、轴突损坏和脱髓鞘。小胶质细胞已显示在 EAE 发病机理的发展和进展中具有关键作用。由小胶质细胞产生的促发炎症细胞因子加重疾病,且趋化因子将白细胞募集到炎症部位。富马酸二甲酯(DMF)是目前处于复发缓解型 MS(RRMS) 临床试验 III 期的实验性治疗性 BG00012 的活性组分。在 RRMS IIb 期研究中,BG00012 显著减少钆增强型脑病变。在临床前研究中,DMF 已显示抑制鼠类 CNS 炎症和大鼠 EAE。现已发现 DMF 可抑制与 EAE 相关的星形胶质化和小胶质细胞活化。

[0005] 小胶质细胞和星形胶质细胞在神经炎症发病机理中的作用的某些非限制性方面显示于图 2 中。证明星形胶质化在神经变性和神经炎症中的作用的证据是来自多发性硬化(MS)研究,多发性硬化是以神经变性和神经炎症为特征的疾病的一个实例。在这一模型中,星形胶质细胞和小胶质细胞的活化在啮齿动物 MS 模型中在疾病症状发作和轴突损伤之前发生。另外,选择性切除小胶质细胞降低 EAE 疾病严重度和炎症。MS 患者的临床证据更提供证明星形胶质细胞的作用的证据,这是因为星形胶质化在疾病爆发期间增加。另外,已报

导活化的星形胶质细胞为继发性进行性 MS 中的突出细胞类型,且推断小胶质细胞的重新活化为 MS 疾病爆发的驱动因素。

[0006] 多发性硬化 (MS) 是具有针对中枢神经系统 (CNS) 抗原的自身免疫活性的自身免疫疾病。所述疾病的特征在于 CNS 的一部分出现炎症,导致神经元轴突周围的髓鞘损失 (脱髓鞘)、轴突损失和神经元、少突胶质细胞和胶质细胞的最终死亡。关于 MS 和当前疗法的综述,参见例如 McAlpine's Multiple Sclerosis, Alastair Compston 等人,第四版,Churchill Livingstone Elsevier,2006。

[0007] 据估计全球有 2,500,000 人患有 MS。它是年轻成人中最常见的 CNS 疾病之一。MS 是慢性进行性致残疾病,通常在青春期之后的某一时间侵袭它的受害者,诊断一般在 20 岁与 40 岁之间作出,但发作可以更早发生。所述疾病不直接遗传,但遗传易感性在它的发展中起一定作用。MS 是一种伴有异质临床病理学和免疫学表型的复杂疾病。

[0008] MS 有四个主要临床类型:1) 复发缓解型 MS (RR-MS),以由完全康复或康复后的后遗症和残留缺陷清楚界定的复发为特征;疾病复发之间的时期以缺乏疾病进展为特征;2) 继发性进行性 MS (SP-MS),以起初为复发缓解型过程,接着为有或无偶然复发的进展、较小的症状缓解和平线区为特征;3) 原发性进行性 MS (PP-MS),以从偶然平线区的发作开始且允许暂时性较小改善的疾病进展为特征;和 4) 进行性复发型 MS (PR-MS),以进行性疾病发作,具有明确的急性复发,有或无完全康复为特征;复发之间的时期以持续进展为特征。

[0009] 临床上,所述疾病最通常呈现为复发缓解型疾病,且在较小程度上呈现为神经病学残疾的稳定进展。复发缓解型 MS (RR-MS) 呈病灶或多病灶神经病学功能障碍反复发作的形式。发作看起来可经若干年随机地发生、缓解和复发。缓解通常不完全,且一次发作接着另一次,永久性神经缺陷递增,随之逐步向下进展。对于大多数患者,RR-MS 的常见过程的特征在于与疾病进展的最终发作相关的重复复发。疾病的后续过程是不可预知的,但大多数患复发缓解型疾病的患者最终将发展继发性进行性疾病。在复发缓解期,复发与临床不活动期交替发生,且视急性发作之间的神经缺陷的存在而定,可能或可能不留有后遗症。复发缓解期期间,复发之间的时期在临床上稳定的。另一方面,患进行性 MS 的患者展示如以上所定义的缺陷的稳定性增加,且从发作开始或在急性发作期之后,但这一名称不排除新复发的进一步出现。

[0010] MS 病理学部分由在白质中形成病灶炎症脱髓鞘病变反映出,所述病变是患急性及复发性疾病的患者的特点。在患进行性疾病的患者中,脑更全面地受正常出现的白质中的扩散性但分布广泛的 (主要是轴突) 损伤的影响,且大面积的脱髓鞘还位于灰质中,特别是皮质中。

[0011] 大多数用于 MS 的当前疗法旨在减轻炎症和抑制或调节免疫系统。到 2006 为止,用于 MS 的可用治疗减轻炎症并减少新的急性发作的数目,但不是所有治疗都对疾病进展有效。大量临床试验已显示慢性 MS 中炎症的抑制通过持续的疾病进展极少显著地限制残疾的累积,提示神经元损伤和炎症是独立的病理过程。因此,在 MS 晚期,神经变性似乎在即使在不存在明显的炎症的情况下也进展。因此,减缓脱髓鞘,或作为补救机理的加速 CNS 新生髓鞘,或者预防轴突损失和神经元死亡是治疗 MS 的一部分重大目标,特别是在 MS 进行性形式 (诸如 SP-MS) 的情况下。

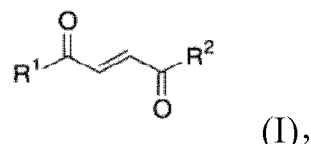
[0012] 先前已提出诸如富马酸二甲酯 (DMF) 的富马酸酯用于治疗 MS (参见例如

Schimrigk 等人, Eur. J. Neurol., 2006, 13(6):604-10; Drugs R&D, 2005, 6(4):229-30; 美国专利第 6,436,992 号)。

[0013] 本文提供富马酸二甲酯 (DMF) 体内和体外减少星形胶质细胞活化和 DMF 抑制炎症细胞因子和由脂多糖 (LPS) 刺激初级星形胶质细胞所诱导的促炎症信号发送的证据。

发明内容

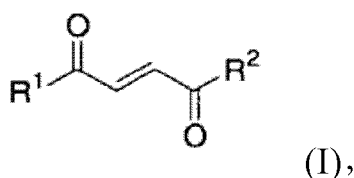
[0014] 本发明提供治疗患有以至少一种选自神经变性和神经炎症的症状为特征的病状的受试者的方法。在一些实施方案中,所述方法包含对受试者施用治疗有效量的至少一种式 I 化合物:



其中 R^1 和 R^2 独立地选自 OH 、 O^- 和 (C_{1-6}) 烷氧基,条件是 R^1 和 R^2 中的至少一者是 (C_{1-6}) 烷氧基,或其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,对受试者施用治疗有效量的至少一种式 I 化合物或其药学上可接受的盐使得至少一个选自 Ccl20 、 Ccl3 、 Ccl4 、 Cxc11 、 Cxc110 、 Cxc12 、 Cxc13 、 Cxc16 、 IL1a 、 II1b 、 Tnf 、 Ifit3 、 Nfkb1a 、 Nfkb1z 、 Tnfaip2 和 Zc3h12a 的基因在所述受试者中的表达受到抑制。在一些实施方案中,所述以至少一种选自神经变性和神经炎症的症状为特征的病状还以至少一个选自 Ccl20 、 Ccl3 、 Ccl4 、 Cxc11 、 Cxc110 、 Cxc12 、 Cxc13 、 Cxc16 、 IL1a 、 II1b 、 Tnf 、 Ifit3 、 Nfkb1a 、 Nfkb1z 、 Tnfaip2 和 Zc3h12a 的基因的表达增强为特征。在一些实施方案中,对受试者施用治疗有效量的所述至少一种式 I 化合物使得至少一个选自 Gsta2 、 Gsta3 、 Gclc 、 Ggt1 、 Txnrd1 、 Srxn1 、 Sqstm1 和 Nqo1 的基因在受试者中的表达上调。在一些实施方案中,至少一个选自 Gsta2 、 Gsta3 、 Gclc 、 Ggt1 、 Txnrd1 、 Srxn1 、 Sqstm1 和 Nqo1 的基因的表达增强是在不存在至少一个选自 Ccl20 、 Ccl3 、 Ccl4 、 Cxc11 、 Cxc110 、 Cxc12 、 Cxc13 、 Cxc16 、 IL1a 、 II1b 、 Tnf 、 Ifit3 、 Nfkb1a 、 Nfkb1z 、 Tnfaip2 和 Zc3h12a 的基因在受试者中的表达受到抑制的情况下达成的。在一些实施方案中,所述至少一种化合物配制成包括所述至少一种化合物和至少一种选自载剂、佐剂和赋形剂的药学上可接受的媒介物的药物组合物。在一些实施方案中,所述至少一种化合物选自富马酸二甲酯和富马酸单甲酯。在一些实施方案中,对所述受试者施用的仅有活性剂是富马酸二甲酯 (DMF)。在一些实施方案中,对所述受试者施用的仅有活性剂是富马酸单甲酯 (MMF)。在一些实施方案中,对所述受试者施用的仅有活性剂是 DMF 和 MMF。在一些实施方案中,所述至少一种化合物以足以在所述受试者中减轻神经变性和神经炎症中的至少一者的量和时间段施用。在一些实施方案中,所述以至少一种选自神经变性和神经炎症的症状为特征的病状选自:肾上腺脑白质营养不良 (Adrenal Leukodystrophy) (ALD)、酒精中毒 (Alcoholism)、亚历山大氏病 (Alexander's disease)、阿尔卑斯氏病 (Alper's disease)、阿尔茨海默氏病 (Alzheimer's disease)、肌萎缩性侧索硬化 (Amyotrophic lateral sclerosis) (路葛雷克氏病 (Lou Gehrig's Disease))、共济失调毛细血管扩张 (Ataxia telangiectasia)、巴腾病 (Batten disease (又名史皮莱姆-沃格特-休格尔-巴腾病 (Spielmeyer-Vogt-Sjögren-Batten disease))、牛海绵状脑病 (Bovine spongiform encephalopathy) (BSE)、卡纳万病 (Canavan disease)、大脑性麻痹

(Cerebral palsy)、柯凯因综合征 (Cockayne syndrome)、皮质基底变性 (Corticobasal degeneration)、克罗伊茨费尔特-雅各布病 (Creutzfeldt-Jakob disease)、家族性致死性失眠 (Familial Fatal Insomnia)、额颞叶变性 (Frontotemporal lobar degeneration)、亨廷顿氏病 (Huntington's disease)、HIV 相关性痴呆 (HIV-associated dementia)、肯尼迪氏病 (Kennedy's disease)、克利伯氏病 (Krabbe's disease)、路易体性痴呆 (Lewy body dementia)、神经莱姆病 (Neuroborreliosis)、马查多-约瑟夫病 (Machado-Joseph disease) (脊髓小脑性共济失调 3 型)、多系统萎缩 (Multiple System Atrophy)、多发性硬化 (Multiple sclerosis)、发作性睡病 (Narcolepsy)、尼曼-皮克病 (Niemann Pick disease)、巴金森氏病 (Parkinson's disease)、佩利措伊斯-梅茨巴赫病 (Pelizaeus-Merzbacher Disease)、皮克氏病 (Pick's disease)、原发性脊髓侧索硬化 (Primary lateral sclerosis)、朊病毒病 (Prion diseases)、进行性核上眼神经麻痹症 (Progressive Supranuclear Palsy)、雷夫苏姆氏病 (Refsum's disease)、山霍夫病 (Sandhoff disease)、谢耳德氏病 (Schilder's disease)、恶性贫血继发性脊髓亚急性联合变性 (Subacute combined degeneration of spinal cord secondary to Pernicious Anaemia)、史皮莱姆-沃格特-休格尔-巴腾病 (又名巴腾病)、脊髓小脑共济失调 (Spinocerebellar ataxia)、脊髓性肌萎缩 (Spinal muscular atrophy)、史提尔-里查德森-奥尔泽斯基病 (Steele-Richardson-Olszewski disease)、脊髓痨 (Tabes dorsalis)、中毒性脑病 (Toxic encephalopathy)、LHON (莱伯氏遗传性视神经病变 (Leber's Hereditary optic neuropathy))、MELAS (线粒体脑肌病 ; 乳酸性酸中毒 ; 中风)、MERRF (肌肉阵挛性癫痫 ; 破碎红纤维病)、PEO (进行性眼外肌麻痹 (Progressive External Ophthalmoplegia))、利氏综合征 (Leigh's Syndrome)、MNGIE (肌病和眼外肌瘫痪 ; 神经病 ; 胃肠病 ; 脑病)、科恩-塞亚综合征 (Kearns-Sayre Syndrome) (KSS)、NARP、遗传性痉挛性截瘫 (Hereditary Spastic Paraparesis)、线粒体肌病 (Mitochondrial myopathy) 和弗里德赖希共济失调 (Friedreich Ataxia)。在一些实施方案中, 以神经变性和神经炎症中的至少一者为特征的病状是多发性硬化 (MS)。在一些实施方案中, 受试者没有患 MS。在一些实施方案中, 受试者患有复发缓解型多发性硬化, 且治疗降低临床复发的频率并延迟躯体残疾的累积。在一些实施方案中, 受试者患有复发缓解型多发性硬化, 且治疗降低临床恶化的频率。

[0015] 本发明还提供减轻患有以星形胶质化增强为特征的病状的受试者的星形胶质化的方法。在一些实施方案中, 所述方法包含对受试者施用治疗有效量的至少一种式 I 化合物:



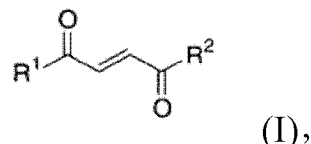
其中 R^1 和 R^2 独立地选自 OH 、 O^- 和 (C_{1-6}) 烷氧基, 或其药学上可接受的盐。在一些实施方案中, 对受试者施用治疗有效量的至少一种式 I 化合物或其药学上可接受的盐使得至少一个选自 Ccl20、Ccl3、Ccl4、Cxc11、Cxc110、Cxc12、Cxc13、Cxc16、IL1a、IL1b、Tnf、Ifit3、Nfkb1a、Nfkb1z、Tnfaip2 和 Zc3h12a 的基因在所述受试者中的表达受到抑制。在一些实

施方案中,对受试者施用治疗有效量的所述至少一种式 I 化合物使得至少一个选自 Gsta2、Gsta3、Gclc、Ggt1、Txnrd1、Srxn1、Sqstm1 和 Nqo1 的基因在受试者中的表达上调。在一些实施方案中,至少一个选自 Gsta2、Gsta3、Gclc、Ggt1、Txnrd1、Srxn1、Sqstm1 和 Nqo1 的基因的表达增强是在不存在至少一个选自 Ccl20、Ccl3、Ccl4、Cxc11、Cxc110、Cxc12、Cxc13、Cxc16、IL1a、IL1b、Tnf、Ifit3、Nfkb1a、Nfkb2、Tnfai2 和 Zc3h12a 的基因在受试者中的表达受到抑制的情况下达成的。在一些实施方案中,所述至少一种化合物配制成包括所述至少一种化合物和至少一种选自载体、佐剂和赋形剂的药学上可接受的媒介物的药物组合物。在一些实施方案中,所述至少一种化合物配制成包括所述至少一种化合物和至少一种选自载体、佐剂和赋形剂的药学上可接受的媒介物的药物组合物。在一些实施方案中,所述至少一种化合物选自富马酸二甲酯和富马酸单甲酯。在一些实施方案中,对所述受试者施用的仅有活性剂是富马酸二甲酯 (DMF)。在一些实施方案中,对所述受试者施用的仅有活性剂是富马酸单甲酯 (MMF)。在一些实施方案中,对所述受试者施用的仅有活性剂是 DMF 和 MMF。在一些实施方案中,所述至少一种化合物以足以在所述受试者中减轻神经变性和神经炎症中的至少一者的量和时间段施用。在一些实施方案中,所述以星形胶质化增强为特征的病状选自:肾上腺脑白质营养不良 (ALD)、酒精中毒、亚历山大氏病、阿尔卑斯氏病、阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化 (路葛雷克氏病)、共济失调毛细血管扩张、巴腾病 (又名史皮莱姆-沃格特-休格尔-巴腾病)、牛海绵状脑病 (BSE)、卡纳万病、大脑性麻痹、柯凯因综合征、皮质基底变性、克罗伊茨费尔特-雅各布病、家族性致死性失眠、额颞叶变性、亨廷顿氏病、HIV 相关性痴呆、肯尼迪氏病、克利伯氏病、路易体性痴呆、神经莱姆病、马查多-约瑟夫病 (脊髓小脑性共济失调 3 型)、多系统萎缩、多发性硬化、发作性睡病、尼曼-皮克病、巴金森氏病、佩利措伊斯-梅茨巴赫病、皮克氏病、原发性脊髓侧索硬化、朊病毒病、进行性核上眼神经麻痹症、雷夫苏姆氏病、山霍夫病、谢耳德氏病、恶性贫血继发性脊髓亚急性联合变性、史皮莱姆-沃格特-休格尔-巴腾病 (又名巴腾病)、脊髓小脑共济失调、脊髓性肌萎缩、史提尔-里查德森-奥尔泽斯基病、脊髓痨、中毒性脑病、LHON (莱伯氏遗传性视神经病变)、MELAS (线粒体脑肌病; 乳酸性酸中毒; 中风)、MERRF (肌肉阵挛性癫痫; 破碎红纤维病)、PEO (进行性眼外肌麻痹)、利氏综合征、MNGIE (肌病和眼外肌瘫痪; 神经病; 胃肠病; 脑病)、科恩-塞亚综合征 (KSS)、NARP、遗传性痉挛性截瘫、线粒体肌病和弗里德赖希共济失调。在一些实施方案中,以神经变性和神经炎症中的至少一者为特征的病状是多发性硬化 (MS)。在一些实施方案中,受试者没有患 MS。在一些实施方案中,受试者患有复发缓解型多发性硬化,且治疗降低临床复发的频率并延迟躯体残疾的累积。在一些实施方案中,受试者患有复发缓解型多发性硬化,且治疗降低临床恶化的频率。

[0016] 本发明还提供鉴别化合物为候选神经保护剂的方法。在一些实施方案中,所述方法包括 a) 在靶细胞、组织或哺乳动物中诱发神经变性和神经炎症中的至少一者, b) 在所述化合物存在的情况下测量所述靶细胞、组织或哺乳动物中的神经变性和神经炎症中的至少一者的至少一个标志物的表达,和 c) 在所述化合物不存在的情况下测量所述靶细胞、组织或哺乳动物中的神经变性和神经炎症中的至少一者的至少一个标志物的表达,其中如果在所述化合物存在的情况下神经变性和神经炎症中的至少一者的至少一个标志物的所述表达相对于所述化合物不存在的情况下它的表达而言有所降低,那么所述化合物鉴别为候选神经保护剂。在一些实施方案中,所述方法更包括: d) 在所述至少一种化合物存在的情

况下测量星形胶质化,和 e) 在所述至少一种化合物不存在的情况下测量星形胶质化,其中在所述化合物存在的情况下的星形胶质化相对于所述化合物不存在的情况下的星形胶质化的程度而言有所降低。在一些实施方案中,所述至少一个标志物是至少一个选自 Ccl20、Ccl3、Ccl4、Cxc11、Cxc110、Cxc12、Cxc13、Cxc16、IL1a、II1b、Tnf、Ifit3、Nfkb1a、Nfkb1z、Tnfaip2 和 Zc3h12a 的基因的表达水平。

[0017] 本发明还提供向有需要的受试者提供神经保护的方法。在一些实施方案中,所述方法包含对受试者施用治疗有效量的至少一种式 I 化合物:



其中 R^1 和 R^2 独立地选自 OH 、 O^- 和 (C_{1-6}) 烷氧基,条件是 R^1 和 R^2 中的至少一者是 (C_{1-6}) 烷氧基,或其药学上可接受的盐,其中对受试者施用治疗有效量的至少一种式 I 化合物或其药学上可接受的盐使得至少一个选自 Ccl20、Ccl3、Ccl4、Cxc11、Cxc110、Cxc12、Cxc13、Cxc16、IL1a、II1b、Tnf、Ifit3、Nfkb1a、Nfkb1z、Tnfaip2 和 Zc3h12a 的基因在所述受试者中的表达受到抑制。在一些实施方案中,所述以至少一种选自神经变性和神经炎症的症状为特征的病状还以至少一个选自 Ccl20、Ccl3、Ccl4、Cxc11、Cxc110、Cxc12、Cxc13、Cxc16、IL1a、II1b、Tnf、Ifit3、Nfkb1a、Nfkb1z、Tnfaip2 和 Zc3h12a 的基因的表达增强为特征。在一些实施方案中,对受试者施用治疗有效量的所述至少一种式 I 化合物使得至少一个选自 Gsta2、Gsta3、Gclc、Ggt1、Txnrd1、Srxn1、Sqstm1 和 Nqo1 的基因在受试者中的表达上调。在一些实施方案中,至少一个选自 Gsta2、Gsta3、Gclc、Ggt1、Txnrd1、Srxn1、Sqstm1 和 Nqo1 的基因的表达增强是在不存在至少一个选自 Ccl20、Ccl3、Ccl4、Cxc11、Cxc110、Cxc12、Cxc13、Cxc16、IL1a、II1b、Tnf、Ifit3、Nfkb1a、Nfkb1z、Tnfaip2 和 Zc3h12a 的基因在受试者中的表达受到抑制的情况下达成的。在一些实施方案中,所述至少一种化合物配制成包括所述至少一种化合物和至少一种选自载体、佐剂和赋形剂的药学上可接受的媒介物的药物组合物。在一些实施方案中,所述至少一种化合物选自富马酸二甲酯和富马酸单甲酯。在一些实施方案中,对所述受试者施用的仅有活性剂是富马酸二甲酯 (DMF)。在一些实施方案中,对所述受试者施用的仅有活性剂是富马酸单甲酯 (MMF)。在一些实施方案中,对所述受试者施用的仅有活性剂是 DMF 和 MMF。在一些实施方案中,所述至少一种化合物以足以在所述受试者中减轻神经变性和神经炎症中的至少一者的量和时间段施用。在一些实施方案中,所述以至少一种选自神经变性和神经炎症的症状为特征的病状选自:肾上腺脑白质营养不良 (ALD)、酒精中毒、亚历山大氏病、阿尔卑斯氏病、阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化 (路葛雷克氏病)、共济失调毛细血管扩张、巴腾病 (又名史皮莱姆-沃格特-休格尔-巴腾病)、牛海绵状脑病 (BSE)、卡纳万病、大脑性麻痹、柯凯因综合征、皮质基底变性、克罗伊茨费尔特-雅各布病、家族性致死性失眠、额颞叶变性、亨廷顿氏病、HIV 相关性痴呆、肯尼迪氏病、克利伯氏病、路易体性痴呆、神经莱姆病、马查多-约瑟夫病 (脊髓小脑性共济失调 3 型)、多系统萎缩、多发性硬化、发作性睡病、尼曼-皮克病、巴金森氏病、佩利措伊斯-梅茨巴赫病、皮克氏病、原发性脊髓侧索硬化、朊病毒病、进行性核上眼神经麻痹症、雷夫苏姆氏病、山霍夫病、谢耳德氏病、恶性贫血继发性脊髓亚急性联合变性、史皮莱姆-沃格特-休格尔-巴腾病 (又名巴腾病)、脊髓小脑共济失调、脊髓性肌萎缩、史提尔-里查德森-奥尔泽

斯基病、脊髓痨、中毒性脑病、LHON(莱伯氏遗传性视神经病变)、MELAS(线粒体脑肌病;乳酸性酸中毒;中风)、MERRF(肌肉阵挛性癫痫;破碎红纤维病)、PEO(进行性眼外肌麻痹)、利氏综合征、MNGIE(肌病和眼外肌瘫痪;神经病;胃肠病;脑病)、科恩-塞亚综合征(KSS)、NARP、遗传性痉挛性截瘫、线粒体肌病和弗里德赖希共济失调。在一些实施方案中,以神经变性和神经炎症中的至少一者为特征的病状是多发性硬化(MS)。在一些实施方案中,受试者没有患MS。在一些实施方案中,受试者患有复发缓解型多发性硬化,且治疗降低临床复发的频率并延迟躯体残疾的累积。在一些实施方案中,受试者患有复发缓解型多发性硬化,且治疗降低临床恶化的频率。

附图说明

- [0018] 图 1A :大鼠 EAE 模型中的 DMF 剂量反应。
- [0019] 图 1B :BG00012 对胶质细胞的抑制。
- [0020] 图 2 :星形胶质细胞和小胶质细胞在神经炎症发病机理中的作用的分子介导。
- [0021] 图 3A :在有和没有 DMF 治疗的情况下,大鼠脊髓的星形胶质细胞染色。
- [0022] 图 3B :利用 Aperio 颜色反褶积 (color deconvolution) 的形态定量。
- [0023] 图 3C :腹灰质和白质区。
- [0024] 图 3D :腹灰质和白质中阳性 GFAP 染色的形态定量。
- [0025] 图 4A :BG200012 抑制 GFAP 的表达。
- [0026] 图 4B :BG200012 抑制 LPS 诱导的 TNF 表达。
- [0027] 图 4C :星形胶质细胞中对 BG00012 的体外 PD 反应。
- [0028] 图 4D :BG00012 治疗后的星形胶质细胞活力。
- [0029] 图 5 :BG00012 抑制炎症细胞因子和由初级星形胶质细胞的 LPS 刺激所诱导的促炎症信号发送。
- [0030] 图 6A :培养的星形胶质细胞中的谷胱甘肽水平。
- [0031] 图 6B :培养的星形胶质细胞的代谢活性。
- [0032] 图 6C :培养的星形胶质细胞的细胞活力。
- [0033] 图 7A :经 MMF 治疗的细胞的原始荧光迹线。
- [0034] 图 7B :经 MMF 治疗的细胞中的 Ca^{++} 运动。
- [0035] 图 7C :数据的非线性回归分析。
- [0036] 图 8A :培养的星形胶质细胞的细胞活力。
- [0037] 图 8B :培养的星形胶质细胞的代谢活性。
- [0038] 图 8C :培养的星形胶质细胞中的 ATP 水平。
- [0039] 图 9 :DMF 和 MMF 增加初级大鼠和人类星形胶质细胞中的 Nrf2 的细胞水平。
- [0040] 图 10 :初级大鼠星形胶质细胞中受 DMF 刺激的典型信号发送途径。
- [0041] 图 11 :初级大鼠星形胶质细胞中受 DMF 影响的主要细胞功能。
- [0042] 图 12 :DMF 治疗减轻 EAE(大鼠脊髓)期间的髓鞘损失。

具体实施方式

[0043] 以神经变性和神经炎症中的至少一者为特征的病状是这些过程中的任一者或两者导致受试者神经系统不能正常工作的病状。正常功能的损失可位于中枢神经系统（例如脑、脊髓）和末梢神经系统的任一或两者中。所述病状的实例包含但不限于肾上腺脑白质营养不良（ALD）、酒精中毒、亚历山大氏病、阿尔卑斯氏病、阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化（路葛雷克氏病）、共济失调毛细血管扩张、巴腾病（又名史皮莱姆-沃格特-休格尔-巴腾病）、牛海绵状脑病（BSE）、卡纳万病、大脑性麻痹、柯凯因综合征、皮质基底变性、克罗伊茨费尔特-雅各布病、家族性致死性失眠、额颞叶变性、亨廷顿氏病、HIV 相关性痴呆、肯尼迪氏病、克利伯氏病、路易体性痴呆、神经莱姆病、马查多-约瑟夫病（脊髓小脑性共济失调 3 型）、多系统萎缩、多发性硬化、发作性睡病、尼曼-皮克病、巴金森氏病、佩利措伊斯-梅茨巴赫病、皮克氏病、原发性脊髓侧索硬化、朊病毒病、进行性核上眼神经麻痹症、雷夫苏姆氏病、山霍夫病、谢耳德氏病、恶性贫血继发性脊髓亚急性联合变性、史皮莱姆-沃格特-休格尔-巴腾病（又名巴腾病）、脊髓小脑共济失调、脊髓性肌萎缩、史提尔-里查德森-奥尔泽斯基病、脊髓痨、中毒性脑病、LHON（莱伯氏遗传性视神经病变）、MELAS（线粒体脑肌病；乳酸性酸中毒；中风）、MERRF（肌肉阵挛性癫痫；破碎红纤维病）、PEO（进行性眼外肌麻痹）、利氏综合征、MNGIE（肌病和眼外肌瘫痪；神经病；胃肠病；脑病）、科恩-塞亚综合征（KSS）、NARP、遗传性痉挛性截瘫、线粒体肌病和弗里德赖希共济失调。

[0044] 在一些实施方案中，对患者施用如本文所述的至少一种化合物或其药学上可接受的盐产生“神经保护”，或换言之，对患者施用化合物的作用是神经保护。神经保护包括神经系统、它的细胞、结构和功能在损伤或损害之后的维持、抢救、康复和再生中的至少一者。在一些实施方案中，神经保护包括初级神经保护和二级神经保护中的至少一者。“初级神经保护”是包括直接调节驻留在 CNS 内的神经细胞（至少一种选自神经元、少突神经胶质细胞、星形胶质细胞和小胶质细胞的细胞类型）的结构和 / 或功能的保护。“二级神经保护”是包括调节通常驻留在 CNS 外部的至少一种细胞类型（例如免疫细胞）的结构或功能的保护。在二级神经保护中，至少一种化合物或其药学上可接受的盐直接或间接地作用于通常驻留在 CNS 外部的至少一种细胞类型上以调节所述至少一种细胞类型的结构和 / 或功能。所述至少一种细胞类型随后直接或以别的方式调节驻留在 CNS 内的神经细胞（至少一种选自神经元、少突神经胶质细胞、星形胶质细胞和小胶质细胞的细胞类型）的结构和 / 或功能。在一些实施方案中，神经保护包括减轻受试者的神经变性或神经炎症的严重性或等级。神经系统、它的细胞、结构和功能的“维持”包括至少一种化合物或其药学上可接受的盐在本文公开的疾病或病状的至少一种病征或症状显现之前施用于受试者且减轻疾病或病状最后的严重性和 / 或降低疾病和 / 或病状的发作等级的实施方案。

[0045] 在一些实施方案中，待治疗的病状的特征为诸如在受试者的神经细胞中的促炎症基因的表达增强。在受试者经历星形胶质化的情况下，例如至少一个选自 Ccl20、Ccl3、Ccl4、Ccl11、Ccl10、Ccl2、Ccl3、Ccl6、IL1a、IL1b、Tnf、Ifit3、Nfkb1a、Nfkb2、Tnfai2 和 Zc3h12a 的促炎症基因的表达在受试者中是增加的。在一些实施方案中，对受试者施用如本文所述的至少一种化合物或其药学上可接受的盐使得至少一个选自 Ccl20、Ccl3、Ccl4、Ccl11、Ccl10、Ccl2、Ccl3、Ccl6、IL1a、IL1b、Tnf、Ifit3、Nfkb1a、Nfkb2、Tnfai2 和 Zc3h12a 的基因的表达受到抑制。

[0046] 本文还公开神经保护基因的某些实例,即 Gsta2、Gsta3、Gclc、Ggt1、Txnrd1、Srxn1、Sqstm1 和 Nqo1。在一些实施方案中,对受试者施用如本文所述的至少一种化合物或其药学上可接受的盐使得至少一个选自 Gsta2、Gsta3、Gclc、Ggt1、Txnrd1、Srxn1、Sqstm1 和 Nqo1 的基因上调。

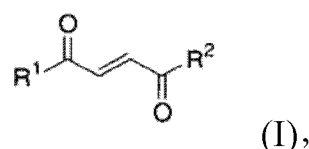
[0047] 术语“治疗有效量”是指预防或延迟受试者的以神经变性或神经炎症为特征的病状的至少一个症状的发作或缓解其症状或达到所需生物结果(诸如星形胶质化减轻)的化合物或其药学上可接受的盐的量

[0048] 在一些实施方案中,至少一个选自 Ccl20、Ccl3、Ccl4、Cxc11、Cxc110、Cxc12、Cxc13、Cxc16、IL1a、IL1b、Tnf、Ifit3、Nfkb1a、Nfkb1z、Tnfaip2、Zc3h12a、Gsta2、Gsta3、Gclc、Ggt1、Txnrd1、Srxn1、Sqstm1 和 Nqo1 的基因的表达水平在受试者中测量。在一些实施方案中,基因的表达通过测定这一基因的 mRNA 的表达水平来测量。在一些实施方案中,基因的表达通过测定这一基因所编码的蛋白质产物的表达水平来测量。在一些实施方案中,所述蛋白质产物是在受试者的脑脊髓液中测量。在一些实施方案中,表达水平在至少一个选自治疗开始之前、治疗期间和治疗之后的时间点测量。

[0049] 术语“治疗”是指以在统计上显著的程度或所属领域的技术人员可检测的程度上有效预防或延迟受试者的以神经变性或神经炎症为特征的病状的至少一个症状的发作或缓解其症状的量、方式和/或模式来施用疗法。有效量、方式或模式可视受试者而不同且可根据受试者进行调整。关于本文提及的神经病症,本发明方法提供的治疗旨在改善病症的病状(或减轻不利影响),且未必完全消除或治愈病症。

[0050] 除非另有说明,否则术语“MMF”是指呈酸形式的富马酸单甲酯(富马酸甲基氢酯(methyl hydrogen fumarate),又名“MHF”)以及它相应的盐。

[0051] 在一些实施方案中,本发明方法包括对患有所述病状的受试者施用治疗有效量的至少一种式 I 化合物:



其中 R¹ 和 R² 独立地选自 OH、O⁻ 和 (C₁₋₆) 烷氧基,或其药学上可接受的盐。(C₁₋₆) 烷氧基可选自例如 (C₁₋₅) 烷氧基、(C₁₋₄) 烷氧基、(C₁₋₃) 烷氧基、乙氧基、甲氧基、(C₂₋₃) 烷氧基、(C₂₋₄) 烷氧基、(C₂₋₅) 烷氧基和 (C₁₋₆) 烷氧基。在式 I 化合物的一些实施方案中,药学上可接受的盐是金属 (M) 阳离子的盐,其中 M 可为碱金属、碱土金属或过渡金属,诸如 Li、Na、K、Ca、Zn、Sr、Mg、Fe 或 Mn。在非限制性说明性实施方案中,式 I 化合物是富马酸二甲酯(R¹ 是 CH₃ 且 R² 是 CH₃) 或富马酸单甲酯(R¹ 是 CH₃ 且 R² 是 O⁻ 或 OH,例如富马酸单甲酯的药学上可接受的盐,例如特别是 Ca-MMF)。

[0052] 在某些实施方案中,本发明方法使受试者的神经变性和/或神经炎症减轻。这些神经保护作用未必消除所有损害或变性,而宁可

[0053] 在一些实施方案中,所述至少一种化合物或其药学上可接受的盐以足以在所述受试者中减轻神经变性和神经炎症中的至少一者的量和时间段施用。在一些实施方案中,所述至少一种化合物以足以在所述受试者中减轻星形胶质化的量和时间段施用。在一些实施方案中,所述至少一种化合物或其药学上可接受的盐以足以向受试者提供神经保护的量和

时间段施用。

[0054] 本发明方法可包含用治疗有效量的至少一种选自 DMF 和 MMF 的化合物治疗受试者。关于 DMF 或 MMF, 治疗有效量可在约 1mg/kg 至约 50mg/kg (例如约 2.5mg/kg 至约 20mg/kg 或约 2.5mg/kg 至约 15mg/kg) 的范围内。如所属领域的技术人员所知, 有效剂量还将视施用途、赋形剂用量和与其它疗法性治疗 (包含使用其它治疗剂) 共同使用的可能性而不同。举例来说, 待对受试者施用的 DMF 或 MMF 的有效剂量, 例如经口施用, 可为每天约 0.1g 至约 1g, 例如每天约 200mg 至约 800mg (例如每天约 240mg 至约 720mg, 或每天约 480mg 至约 720mg, 或每天约 720mg)。举例来说, 每天 720mg 可以 2、3、4 或 6 次等剂量的分开施用来施用。

[0055] 在所述方法的一些实施方案中, 药物制剂中存在 120mg 富马酸二甲酯。在所述方法的一些实施方案中, 药物制剂每天三次 (TID) 对患者施用。在所述方法的一些实施方案中, 药物制剂每天两次 (BID) 对患者施用。

[0056] 在所述方法的一些实施方案中, 药物制剂中存在 240mg 富马酸二甲酯。在所述方法的一些实施方案中, 药物制剂每天三次 (TID) 对患者施用。在所述方法的一些实施方案中, 药物制剂每天两次 (BID) 对患者施用。

[0057] 在所述方法的一些实施方案中, 药物制剂在患者消耗食物之前或之后至少一小时才施用。

[0058] 在所述方法的一些实施方案中, 施用药物制剂更包括对患者施用第一剂量的药物制剂持续第一投用时期; 和对患者施用第二剂量的药物制剂持续第二投用时期。在所述方法的一些实施方案中, 第一投用时期为至少一周。在所述方法的一些实施方案中, 第一剂量的药物制剂包括 120mg 富马酸二甲酯, 且药物制剂每天三次 (TID) 对患者施用, 持续第一投用时期。在所述方法的一些实施方案中, 第二剂量的第一药物制剂包括 240mg 富马酸二甲酯, 且所述第一药物制剂每天三次 (TID) 对患者施用, 持续第二投用时期。在所述方法的一些实施方案中, 第二剂量的第一药物制剂包括 240mg 富马酸二甲酯, 且所述第一药物制剂每天两次 (BID) 对患者施用, 持续第二投用时期。在所述方法的一些实施方案中, 如果在第二投用时期期间, 患者经历潮红或胃肠紊乱, 那么对患者施用包括 120mg 富马酸二甲酯的剂量的第一药物制剂, 每天三次 (TID), 持续 1 周至 1 个月的时期。

[0059] 治疗性化合物 (例如 DMF 或 MMF) 可由允许传递治疗神经病症的化合物的任何方法施用。举例来说, 治疗性化合物可经由药丸、片剂、微片剂、丸剂、微丸剂、胶囊 (例如含有微片剂)、栓剂、经口施用的液体制剂和呈饮食增补剂形式施用。药学上可接受的组合物可包含众所周知的药学上可接受的赋形剂, 例如如果组合物是含有活性剂的水溶液, 那么它可为等渗盐水、5% 葡萄糖或其它类似物。可使用诸如环糊精的增溶剂或熟悉此领域者所熟知的其它增溶剂作为传递治疗性化合物的药用赋形剂。关于一些含有 DMF 和 / 或 MMF 的制剂, 参见例如美国专利第 6, 509, 376 号和第 6, 436, 992 号。至于施用途, 组合物可经口、鼻内、经皮、皮下、皮内、经阴道、耳内、眼内、肌肉内、经颊、直肠、经粘膜或经由吸入或静脉内施用来施用。DMF 或 MMF 优选经口施用。

[0060] 在一些实施方案中, 根据本发明的方法包括经口施用含有主要由 60-240mg (例如 120mg) 富马酸二甲酯组成的呈肠溶衣微片剂形式的药物制剂的胶囊。在一些实施方案中, 所述微片剂的平均直径是 1-5mm, 例如 1-3mm 或 2mm。

[0061] 治疗性化合物可呈持续释放或控制释放药物制剂形式施用。所述制剂可由所属领域的技术人员利用各种技术制备。举例来说,制剂可含有治疗性化合物、速率控制聚合物(也就是控制治疗性化合物从剂型中释放的速率的物质)和任选其它赋形剂。速率控制聚合物的一些实例是羟基烷基纤维素、羟丙基烷基纤维素(例如羟丙基甲基纤维素、羟丙基乙基纤维素、羟丙基异丙基纤维素、羟丙基丁基纤维素和羟丙基己基纤维素)、聚(亚乙基)氧化物、烷基纤维素(例如乙基纤维素和甲基纤维素)、羧甲基纤维素、亲水性纤维素衍生物和聚乙二醇,以及如 WO 2006/037342、WO 2007/042034、WO 2007/042035、WO 2007/006308、WO 2007/006307 和 WO2006/050730 中所述的组合物。

[0062] 在富马酸二甲酯对患者施用的一些实施方案中,DMF 在含有肠溶衣微片剂的胶囊中配制。这种制剂在本文中称为“BG-12”或“BG00012”。片剂的包衣由不同层构成。第一层是甲基丙烯酸-甲基丙烯酸甲酯共聚物/异丙醇溶液,其隔离片剂核心以防被后续施用的水混悬液潜在水解。随后由水性甲基丙烯酸-丙烯酸乙酯共聚物混悬液给予片剂的肠溶衣。胶囊的全部组分和定量组成列于表 1 中。

表 1

成分	量/胶囊	功能
核心微片剂		
活性成分:		
富马酸二甲酯*	120.00 mg	活性成分
赋形剂:		
交联羧甲纤维素钠	15.00 mg	崩解剂
微晶纤维素	131.60 mg	填充剂
硬脂酸镁	5.00 mg	润滑剂
滑石	19.80 mg	助流剂
无水胶态二氧化硅	2.60 mg	助流剂
核心微片剂的质量	294.00 mg	
包衣微片剂		
赋形剂:		
柠檬酸三乙酯**	7.60 mg	增塑剂
甲基丙烯酸-甲基丙烯酸甲酯共聚物(1:1), 呈甲基丙烯酸-甲基丙烯酸甲酯共聚物(1:1)溶液 12.5%**	5.50 mg (44.00 mg)	膜包衣剂
西甲硅油 (对应于西甲硅油 PhEur), 呈西甲硅油乳液	0.17 mg	防沫剂

USP**	(0.53 mg)	
微粉粒滑石**	13.74 mg	润滑剂
甲基丙烯酸-丙烯酸乙酯共聚物(1:1), 呈甲基丙烯酸-丙烯酸乙酯共聚物(1:1)分散液 30%**	33.00 mg (110.00 mg)	膜包衣剂
肠溶衣微片剂的质量	354.01 mg	
明胶胶囊的质量	96.00 mg	
装满的胶囊的质量	450.01 mg	

[0063] 所述制造过程和过程控制包含以下：

A) 称量活性和非活性成分且用适当的标签鉴别各起始物质（名称、批号、量）。

B) 掺合：制备含有活性成分富马酸二甲酯和核心微片剂的所有赋形剂的粉末混合物。

C) 制片：旋转压力机安装有多个冲压工具、一个除尘器，且粉末混合物根据给定的规格来制片。

D) 薄膜包覆：根据常用的薄膜包覆方法，通过使用薄膜包覆设备喷洒隔离溶液来隔离微片剂核心。在薄膜包覆盘中用肠溶衣混悬液喷洒隔离的核心。控制微片剂的耐胃性 (gastro-resistance) 和活性成分含量。

E) 胶囊装填：以微片剂活性成分计，给胶囊装填对应于每胶囊 120mg 活性成分的量。控制胶囊装填重量和胶囊长度。

F) 包装：在起泡机上将胶囊包装于热成形 PVC/PE/PVdC- 铝泡罩中。

[0064] 合成和配制 DMF 和 MMF 的其它方法提供于例如美国专利第 7, 320, 999 号的 5-7 栏处的实施例以及 WO 2006/037342、WO2007/042034、WO 2007/042035、WO 2007/006308、WO 2007/006307 和 WO 2006/050730 中。

[0065] 本发明将在以下实施例中进一步描述，这些实施例不限制权利要求书中所述的本发明范围。

方法

[0066] 大鼠 EAE：

[0067] 在第 0 天，用含 MOG 1-125 (100 微克 / 大鼠) 的 IFA 在尾巴根部对雌性 Brown Norway 大鼠 (Charles River Laboratories) 进行皮内免疫。第 3 天，每天经口传递呈于 0.8% HPMC 中的混悬液形式的 DMF (BG00012)，5、25、50、100、200mg/kg。N = 6/ 组。得分 0 = 无疾病，1 = 尾巴麻痹，2 = 后肢无力，3 = 后肢麻痹，4 = 后肢麻痹且前肢无力，5 = 垂死或死亡。根据机构动物委员会 (Institutional Animal Committee) 指南进行实验性体内手

术。

[0068] 初级星形胶质细胞培养物：

[0069] 如制造商方案所述培养来自皮质、海马和纹状体 (Lonza clontech) 的大鼠星形胶质细胞。向培养物中添加 DMF 于 DMSO 中的限制稀释液, 持续 6 小时或 24 小时, 且用大肠杆菌 (E. Coli) LPS (Sigma) 刺激。使用 QIAgen Rneasy 方法制备 RNA。

[0070] 组织学和形态测定：

[0071] 腰椎脊髓切面制备成 FFPE 切面以用于免疫组织化学分析且在 DAKO 自动染色机上使用 GFAP 抗体 (DAKO)、IBA-1 (Wako)、CD3 (DAKO) 来处理。使用 Aperio Spectrum Color Deconvolution 软件进行形态测定分析。

[0072] 表达分析：

[0073] 总 RNA 使用 Qiagen RNeasy 方法从快速冷冻腰椎脊髓切面制备。使用 Applied Biosciences TaqMan 探针扩增特异性转录产物且使用 GAPDH 辅助探针归一化。

实施例 1：

[0074] BG00012, 也就是一种可经口利用的富马酸二甲酯 (DMF) 制剂, 正处于复发缓解型多发性硬化 (RRMS) 的 III 期测试中。在 IIb 期测试中, BG-12 显著减少钆增强的脑病变且减少 T1 低信号黑洞。BG00012 的活性组分富马酸二甲酯 (DMF) 在大鼠 EAE 模型中测试。如图 1A 所示, 用各种剂量的 DMF 处理患实验上诱发的 EAE 的大鼠以剂量依赖性方式减轻 EAE 症状。用 200mg/kg DMF 处理完全消除疾病。(图 1A)。

[0075] 图 1B 显示用媒介物或 BG00012 处理的大鼠的脊髓的横截面。图 a-f 的处理和染色如下：

- a. Luxol Fast Blue/ 媒介物
- b. Luxol Fast Blue/BG00012
- c. GFAP/ 媒介物
- d. GFAP/BG00012
- e. IBA1/ 媒介物
- f. IBA1/BG00012

[0076] 如图 1B 所示, 用 BG00012 处理的脊髓中的活化的星形胶质细胞和小胶质细胞明显减少, 且髓鞘被保存下来。

实施例 2

[0077] 这一实施例显示, BG00012 体内减少星形胶质细胞活化。具体地说, DMF 处理的大鼠的脊髓的灰质中的活化星形胶质细胞比仅接受媒介物的大鼠的脊髓中少。图 3A 显示, 用 GFAP 抗体染色以鉴别活化星形胶质细胞的脊髓的横截面。图 (a) 和 (b) 来自仅用媒介物处理的大鼠, 分别放大 5 倍和 20 倍, 而图 (c) 和 (d) 来自用 100mg/kg DMF 处理的大鼠, 分别以放大 5 倍和 20 倍显示。

[0078] 图 3B 显示使用 Apeiro 颜色反褶积的形态定量。

[0079] 图 3C 显示大鼠脊髓横截面, 其中指明腹灰质和白质区。这些区被选出用于形态测定。图 3D 显示腹灰质和白质中阳性 GFAP 染色的形态定量。

实施例 3

[0080] 这一实验显示, BG00012 减少初级培养的星形胶质细胞的活化。图 4A 显示在指示

浓度的 DMF 刺激 6 小时和 24 小时之后, GFAP 表达的定量 PCR 分析。如图所示, DMF 以浓度依赖性方式抑制 GFAP 表达。

[0081] 图 4B 显示在收集前 4 小时添加 0、10 和 30ng/ml LPS 的情况下, 在指示浓度的 DMF 刺激 24 小时之后, TNF 表达的定量 PCR 分析。如图所示, LPS 以剂量依赖性方式诱导 TNF 表达, 且所诱导的 TNF 表达以剂量依赖性方式受 DMF 抑制。

[0082] 图 4C 显示在指示浓度的 DMF 刺激 6 小时和 24 小时之后, NQO1 表达的定量 PCR 分析。如图所示, DMF 以浓度依赖性方式诱导 Nqo1 表达。从所述数据还显而易见, 与通过 6 小时暴露来诱导相比, Nqo1 通过暴露于 DMF 24 小时以更高水平来诱导。

[0083] 最终, 图 4D 显示, BG00012 (DMF) 或媒介物 (DMSO) 处理星形胶质细胞 24 小时后, MTT 测定的结果。所述数据表明, 星形胶质细胞活力不受 BG00012 处理损害。

实施例 4

[0084] 图 5 显示, BG00012 抑制炎症细胞因子和由初级星形胶质细胞的 LPS 刺激所诱导的促炎症信号发送。初级星形胶质细胞用如所指示的 0、10 和 100ng/ml 的 LPS 处理, 而且用如所指示的 0、3、10 或 30 μ M DMF 处理。各基因在各条件下的表达的量值在 0 到 1 的范围内, 以致以颜色表示的差异表示各基因的表达随条件改变的变化。最深的绿色表示无可检测到的表达 (0), 而最鲜的红色表示所述基因可测量到的最高表达 (1)。一般来说, 数据显示这些基因的表达因 LPS 处理而增加, 其中所有标志物均显示由 100ng/ml LPS 处理诱导。许多标志物的诱导的表达受到 DMF 处理抑制。具体来说, Ccl20、Ccl3、Ccl4、Cxc11、Cxc110、Cxc12、Cxc13、Cxc16、IL1a、IL1b、Tnf、Ifit3、Nfkb1a、Nfkbiz、Tnfaip2 和 Zc3h12a 诱导受到大幅抑制。

实施例 5

[0085] 这一实施例提供的数据表明 DMF (BG00012) 可抑制大鼠中与慢性复发型 EAE (crEAE) 相关的星形胶质化和小胶质细胞活化。

[0086] crEAE 通过皮内 MOG/IFA 免疫在 Brown Norway 大鼠中诱发。BG00012 在免疫后的头三天每日经口施用。BG00012 在所有处理组中降低疾病的平均临床得分。对于 100mg/kg 处理组, 第 28 天的平均疾病得分是 0.71 ($n = 6$, $SD = 1.17$), 而媒介物组是 2.29 ($n = 6$, $SD = 1.29$)。腰椎脊髓切面的免疫组织化学显示 GFAP (用于活化的星形胶质细胞的标志物) 和 IBA-1 (用于活化的小胶质细胞的标志物) 的染色减少。

[0087] 脊髓的 mRNA 的定量 PCR 揭示, 与媒介物处理组相比, BG00012 处理组的 IBA-1 和 GFAP mRNA 分别减少 52% 和 54%。

[0088] BG00012 对特异性星形胶质细胞和小胶质细胞的直接效应使用初级大鼠星形胶质细胞和 RAW264.7 巨噬细胞进行体外测试。在 BG00012 存在的情况下的 LPS 刺激使得星形胶质细胞和巨噬细胞中的 TNF- α mRNA 分别减少 77% 和 59%。LPS 刺激细胞的全面基因表达概况显示, BG00012 在两种细胞类型中均可抑制许多促炎症基因产物。

[0089] 这些研究结果表明, 反应性胶质增生的抑制和巨噬细胞功能的抑制可作为 BG00012 的双重消炎和 CNS 神经保护作用机制的一部分对它的治疗性作用有贡献。

[0090] 本文所报导的数据表明, BG00012 抑制复发大鼠 EAE 中的疾病。组织学分析已显示, BG00012 处理的脊髓中的星形胶质细胞活化标志物的水平降低。体外数据显示, BG00012 可直接抑制星形胶质细胞的活化。最终, 促炎症基因表达在 LPS 刺激的初级星形胶质细胞

中在 BG00012 处理后减少。这些研究结果指出, BG00012 在抑制反应性胶质增生和双重消炎和 CNS 神经保护作用机制中的作用。

实施例 6

[0091] 这一实施例分析 MMF 对培养的星形胶质细胞的作用。具体地说, 结果显示, MMF 处理上调细胞还原电势, 减少 H_2O_2 诱导的 Ca^{++} 运动, 且减少 H_2O_2 诱导的细胞死亡。

[0092] 人类脊髓星形胶质细胞的初级培养物通过滴定 MMF 或 DMSO 作为稀释对照而处理 24 小时。与化合物一起培育 24 小时后, 用生长培养基洗涤细胞 1 次, 且与细胞渗入型底物单氯二胺 (monochlorobimane) 一起培育。当结合于谷胱甘肽时, 这一底物增强荧光。用 MMF 处理之后, 观察到细胞谷胱甘肽水平有明显的浓度依赖性增加。图 6A。类似的 MMF 处理的细胞还与细胞渗入型底物刃天青 (resazurin) 一起培育, 其在经由细胞氧化还原机理还原成试卤灵 (resorufin) 之后增强荧光, 且用作细胞代谢活性的量度 (CellTiter-Blue 测定)。这一测定证明与图 6A 中类似的结果: 处理的细胞还原所述底物的能力呈明显的 MMF 浓度依赖性增加。图 6B。为确保谷胱甘肽和代谢活性的增加不简单地归因于应答 MMF 处理的细胞增殖, 将平行的细胞器皿与钙黄绿素 AM (calcein AM) 一起培育。细胞酯酶裂解这一分子以产生荧光代谢物, 此提供细胞活力的量度和相对的总细胞数目。未观察到实质的浓度依赖性变化。图 6C。综上所述, 这些数据表明 MMF 处理上调培养的人类脊髓星形胶质细胞的抗氧化剂反应, 此可在氧化激发之后提供神经保护益处。

[0093] 在另一实验中, 人类脊髓星形胶质细胞的初级培养物通过滴定 MMF 或 DMSO 作为稀释对照而处理 24 小时。与化合物一起培育 24 小时后, 用 HBSS 洗涤细胞 1 次, 且与 Calcium4 (Molecular Devices) 负荷染料一起培育。这一染料渗入细胞中且在结合游离的细胞内 Ca^{++} 之后增强荧光。细胞随后用 50mM H_2O_2 激发且监测荧光的变化。图 7A 显示细胞的原始荧光迹线, 表明 MMF 以剂量依赖性方式降低细胞内 Ca^{++} 的运动。图 7B 显示, 荧光强度超过基线的变化的定量 (DRFU), 证明相对于背景水平 (与无 H_2O_2 对照相比), 30mM MMF 减少 Ca^{++} 的累积, 且针对 H_2O_2 激发的保护是剂量依赖性的。用非线性回归拟合这组数据揭示 $EC_{50} = 5.4mM$ 。图 7C。这些数据表明, MMF 能够抑制细胞内 Ca^{++} 的释放, 此举可通过阻止下游细胞凋亡级联的开始提供神经保护益处。

[0094] 在另一实验中, 人类脊髓星形胶质细胞的初级培养物通过滴定 MMF 或 DMSO 作为稀释对照而处理 24 小时。与化合物一起培育 24 小时后, 用 HBSS 洗涤细胞 1X 次且用 500mM H_2O_2 激发 2 小时, 随后在正常生长培养基中洗涤, 接着再培育 24 小时。图 8A 显示, 使用与图 6 中相同的钙黄绿素 AM 技术监测细胞活力的结果, 短暂的 500mM H_2O_2 处理, 继之以 24 小时恢复期, 观察到显著的降低。活力的这一损失由 MMF 以浓度依赖性方式衰减。图 8B 显示, 关于细胞代谢观察到类似效应, 如由底物刃天青的细胞依赖性降低所测量。图 8C 显示, 通过检查细胞 ATP 水平观察到稍微更适度的 MMF 依赖性保护效应, 但观察到明确的浓度依赖性反应。有趣的是, MMF 的最高浓度似乎降低细胞 ATP 水平。综上所述, 这些数据表明, MMF 在人类脊髓星形胶质细胞中触发针对氧化应力的神经保护性反应。

实施例 7

[0095] 从如上所示受处理的星形胶质细胞培养物制备总细胞溶解产物。利用蛋白质印迹 (Western blotting) 检测 Nrf2。包含 GAPDH 作为管家蛋白对照。图 9 中所示的结果显示, DMF 和 MMF 增加初级大鼠和人类星形胶质细胞中的 Nrf2 的水平。

实施例 8

[0096] DMF 处理的星形胶质细胞中基因表达的全面分析使用 Affymetrix GeneChip 技术进行。受 DMF 影响的基因被鉴别为与未处理的星形胶质细胞相比,在 DMF 处理的细胞中水平显著 ($p < 10^{-7}$) 增加的转录产物。所得基因列表使用 Ingenuity IPA 数据库注解。如图 10 所示,DMF 活化 Nrf2 靶基因(包含已知调控谷胱甘肽代谢的基因)的表达。如图 11 所示,DMF 对全面基因表达的调节表明对与神经系统发育、功能和疾病有关的星形胶质细胞功能有影响。细胞保护和谷胱甘肽代谢所涉及且这一测定中所鉴别的特定基因包含但不限于 Gsta2、Gsta3、Gclc、Ggt1、Txnrd1、Srxn1、Sqstm1 和 Nqo1。

实施例 9

[0097] 如图 12 所示,DMF 处理减少大鼠脊髓在 EAE 期间的髓鞘损失。用 Aperio 软件进行 EAE 脊髓的形态测定分析。组织学变化用 Aperio Image Scope 软件 v10.1 定量。使用颜色反褶积算法选择棕色 DAB 染色(GFAP 和 IBA-1 免疫染色)或亮翠蓝染色(Luxol Fast Blue)的强度阈值。阳性染色由各强度阈值的强阳性染色像素的百分比确定。每只大鼠定量三个腰椎脊髓切面,且对于最终强度值,求取强阳性像素百分比值的平均值。

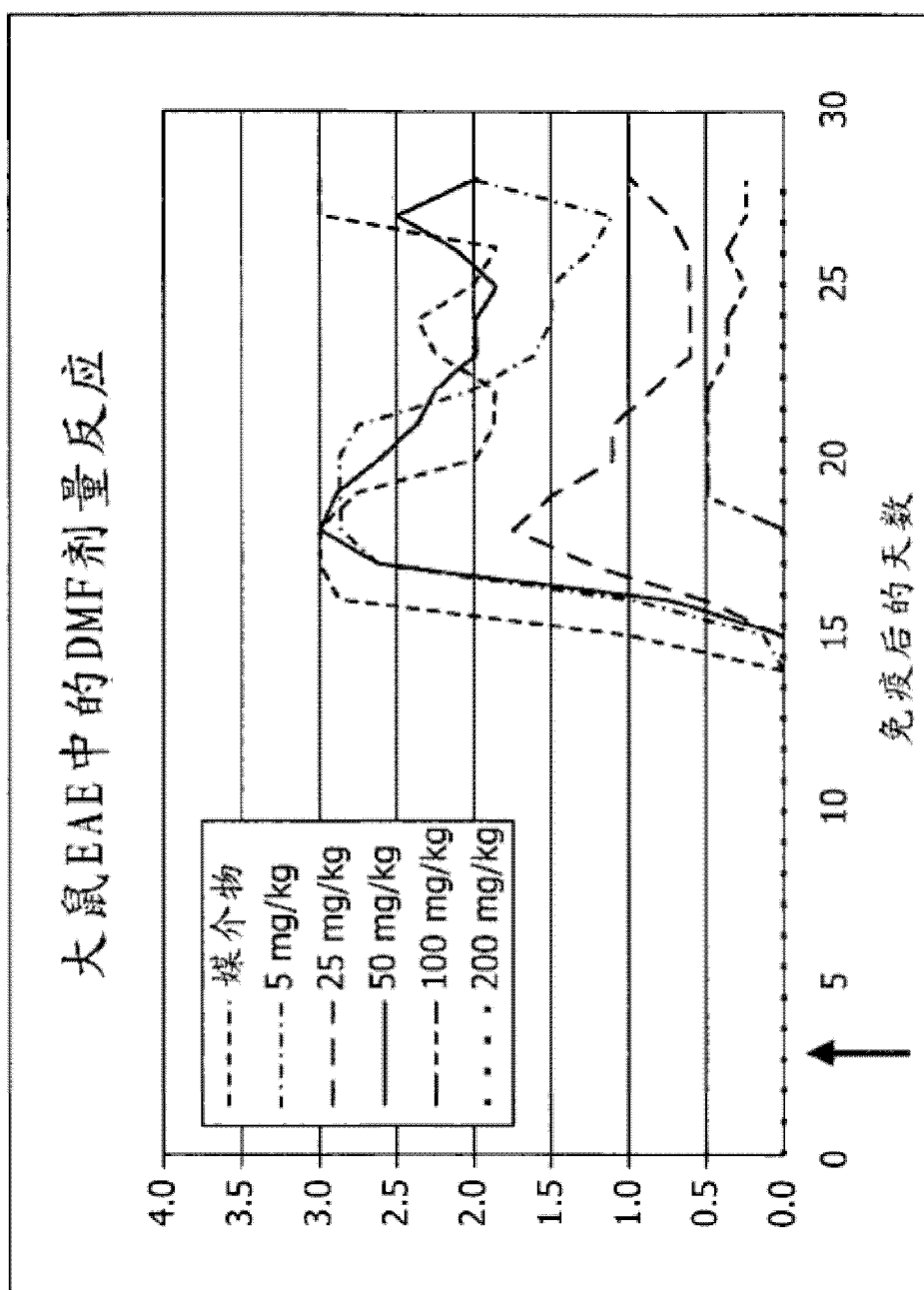


图 1A

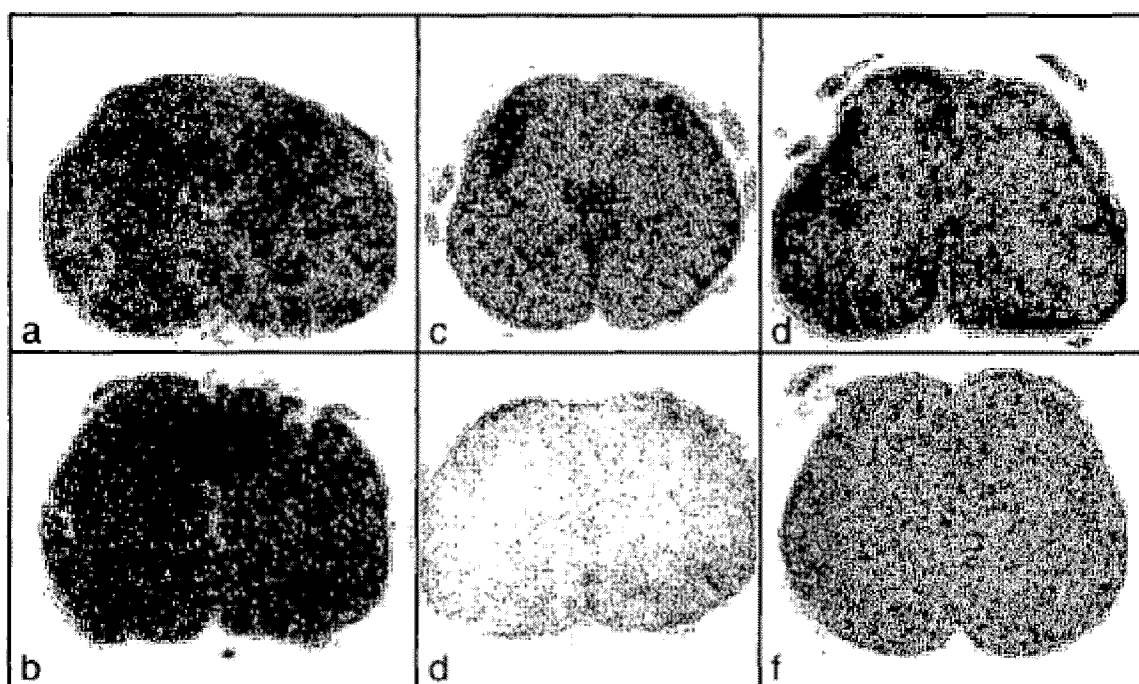


图 1B

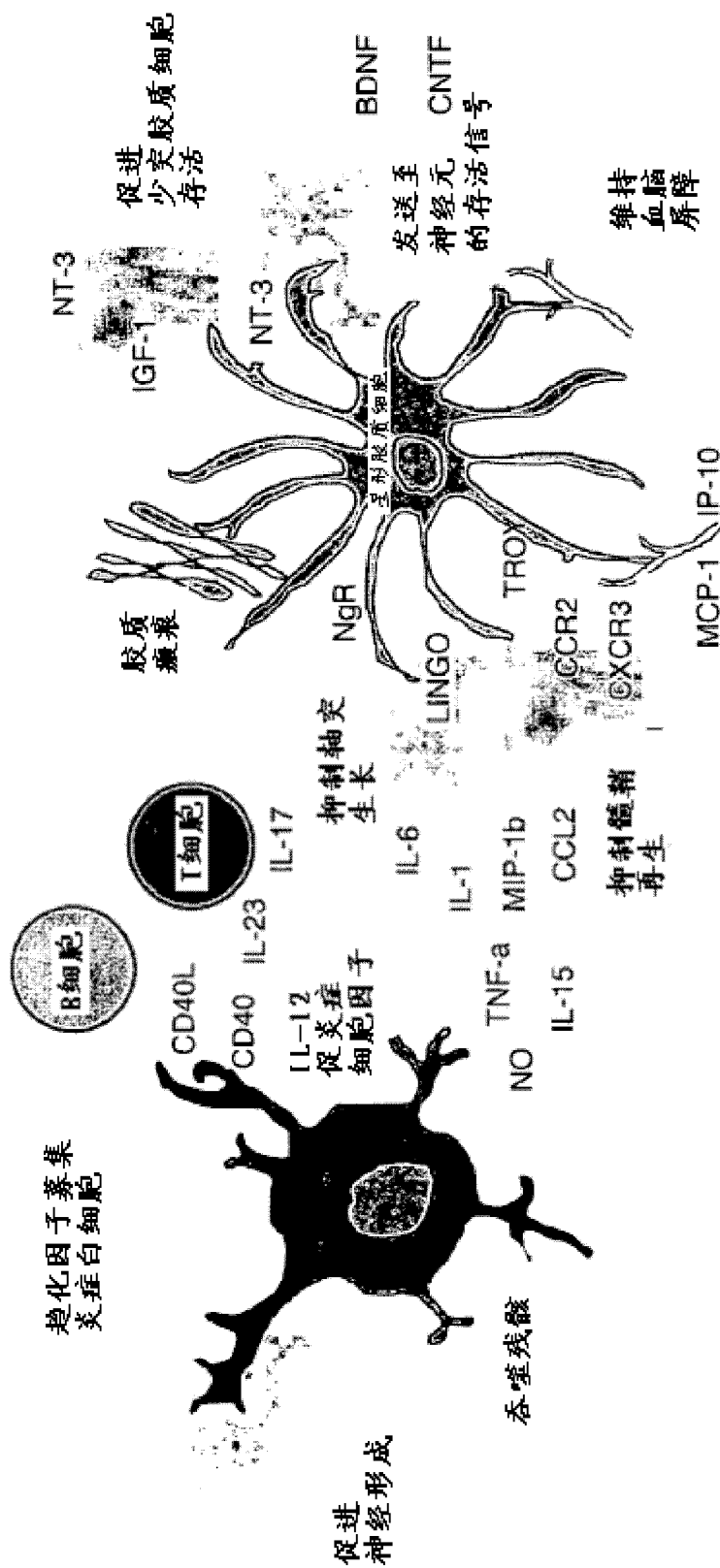


图 2

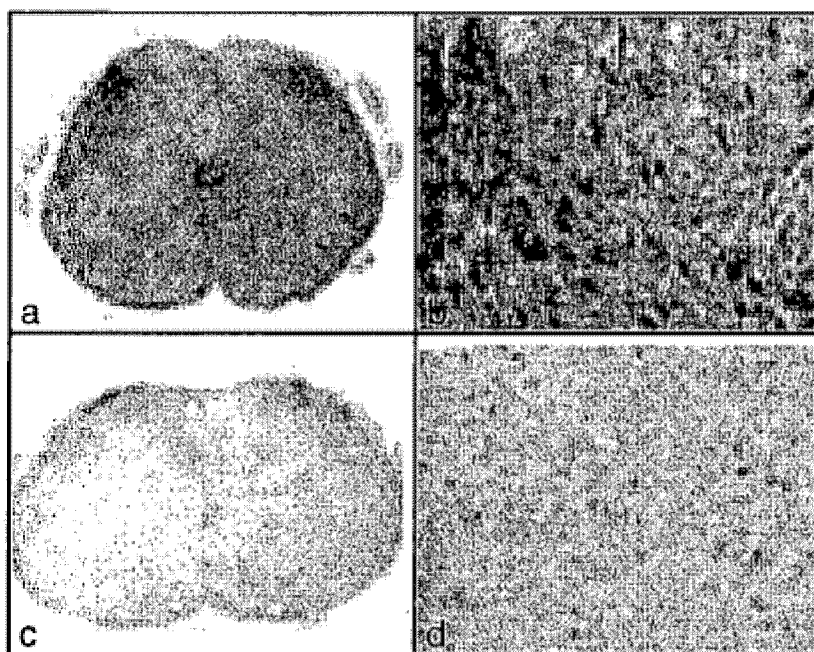


图 3A

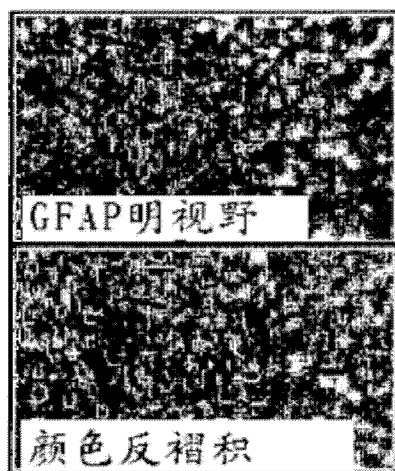


图 3B

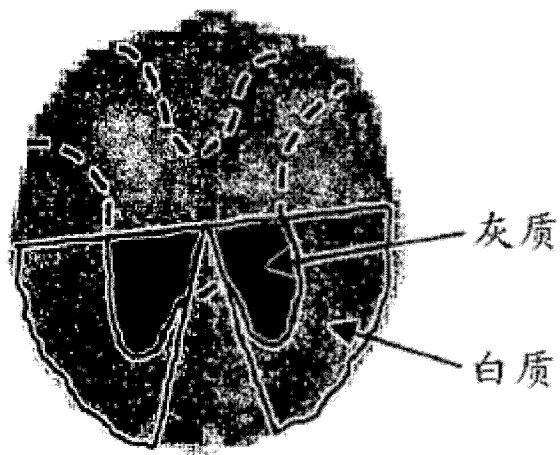


图 3C

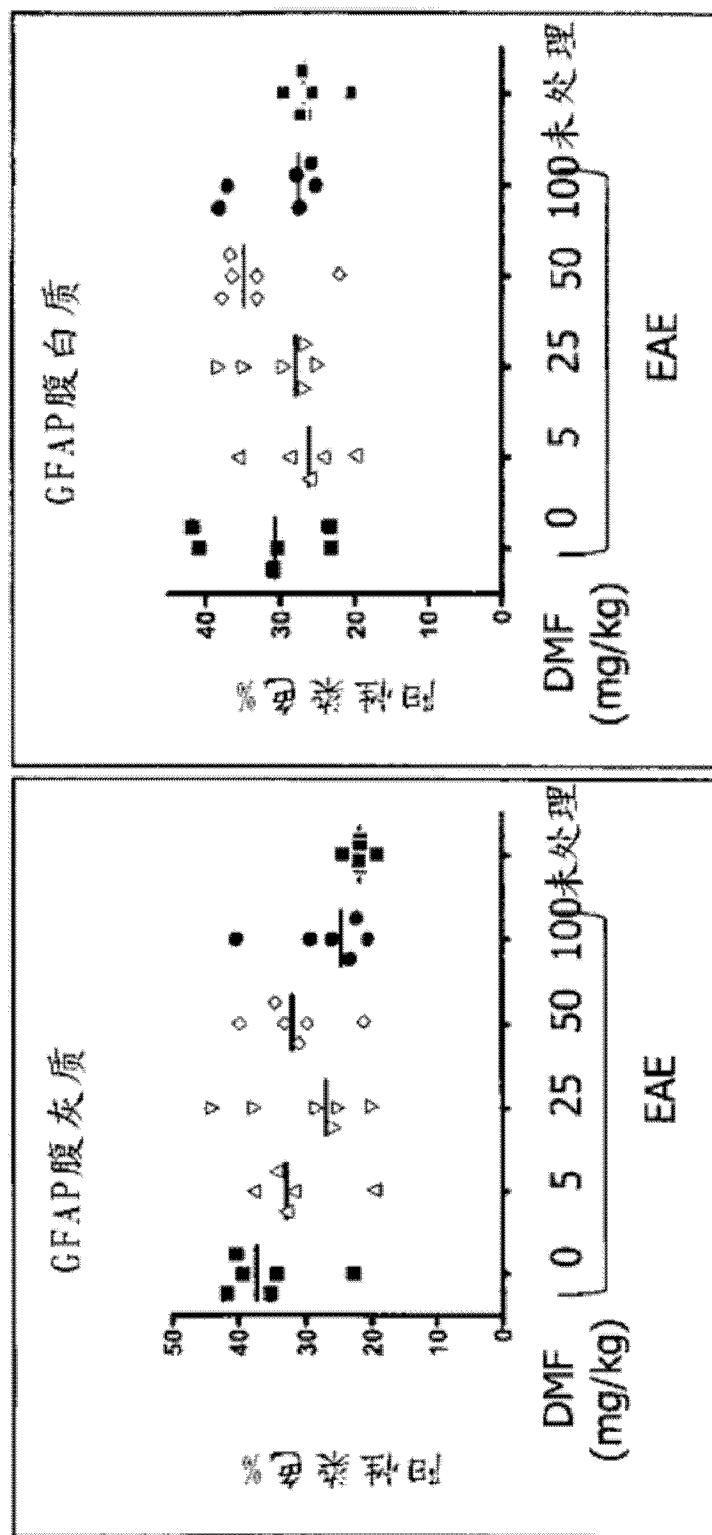


图 3D

BG200012抑制GFAP的表达

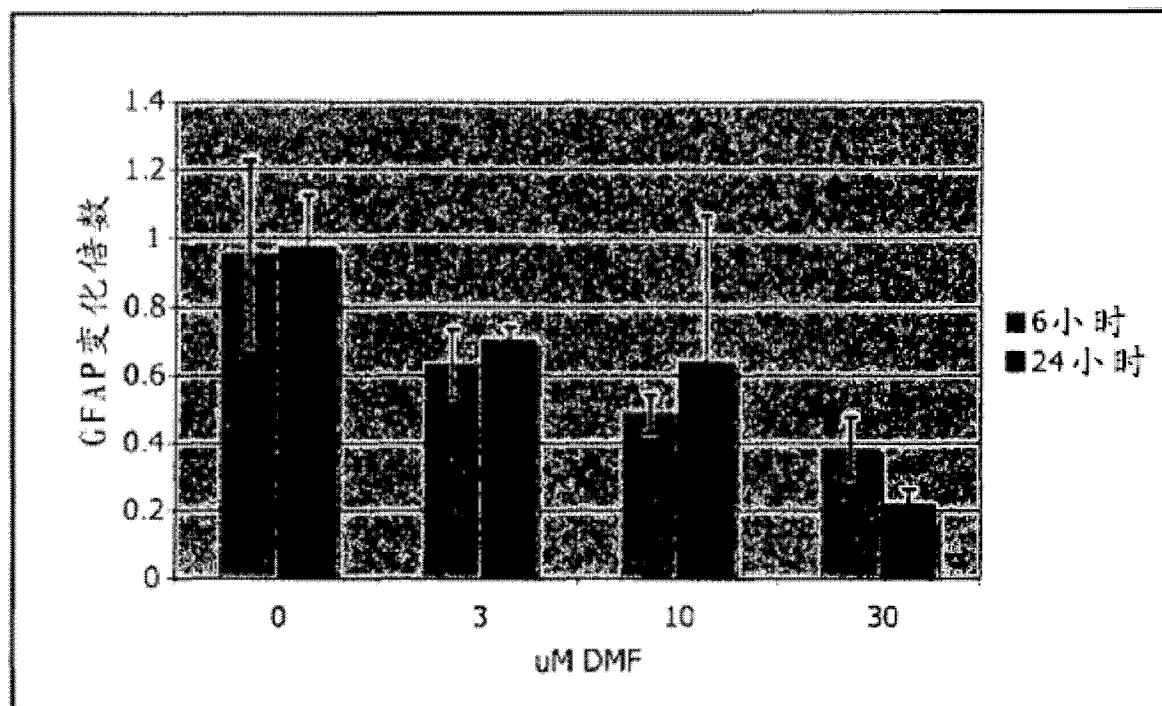


图 4A

BG200012抑制LPS诱导的TNF表达

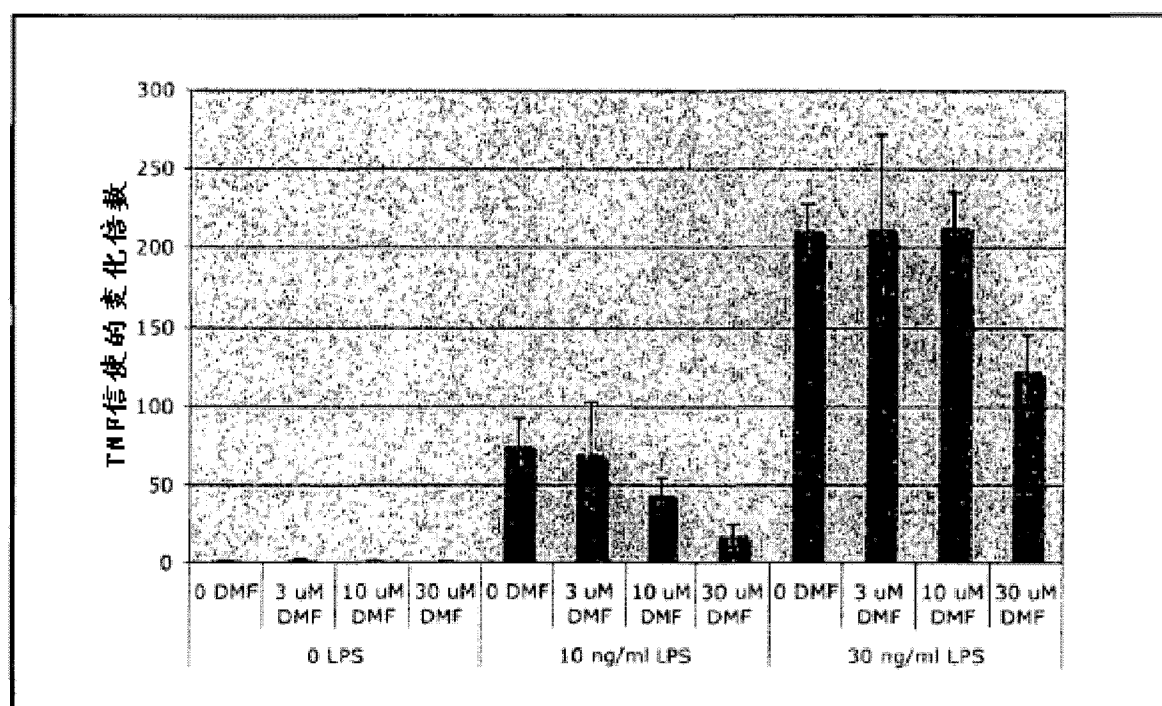


图 4B

星形胶质细胞中对BG00012的体外PD反应

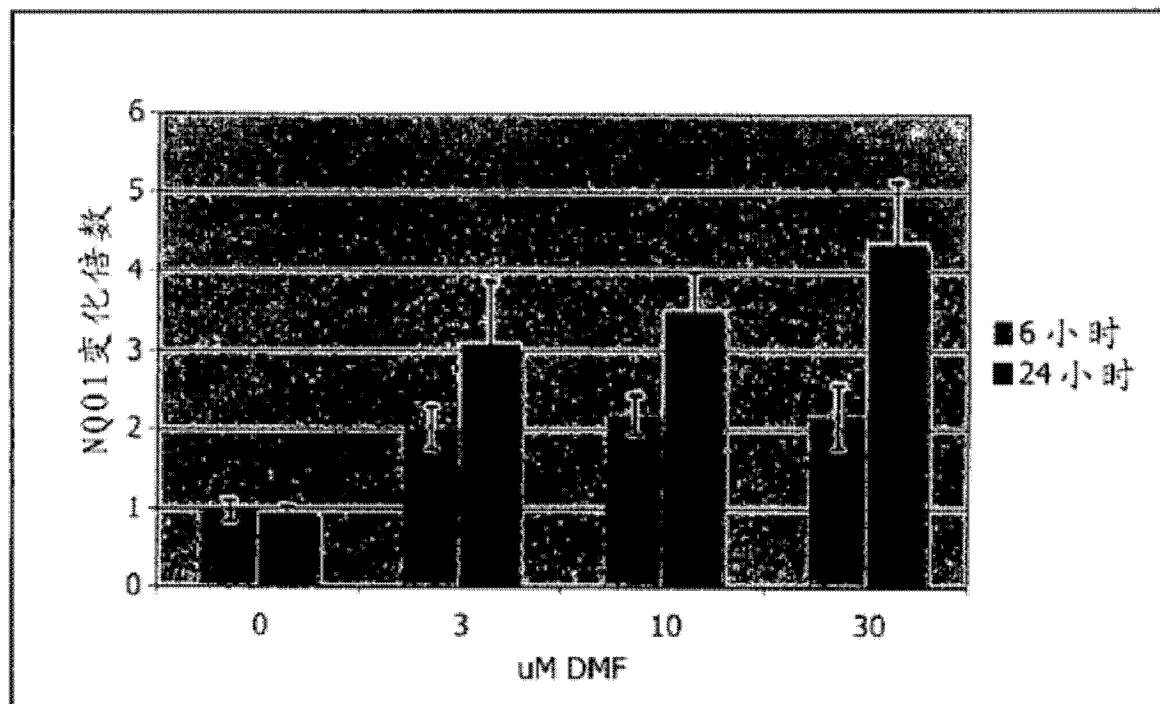


图 4C

星形胶质细胞活力未受BG00012处理损害

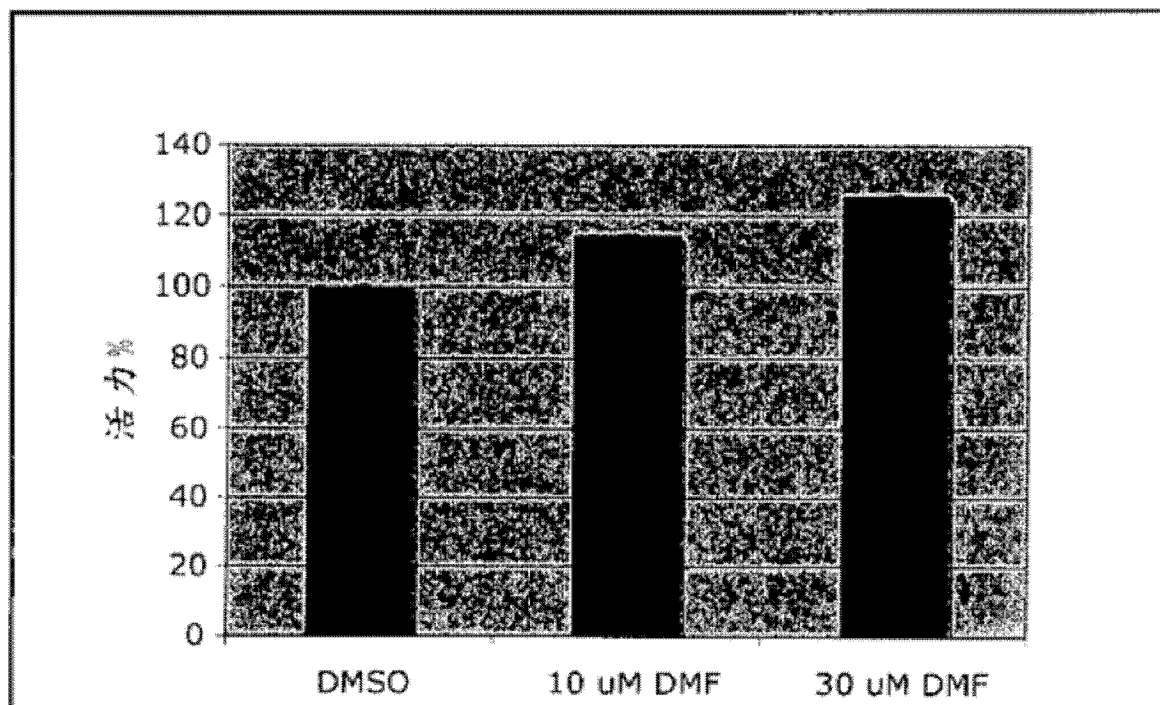


图 4D

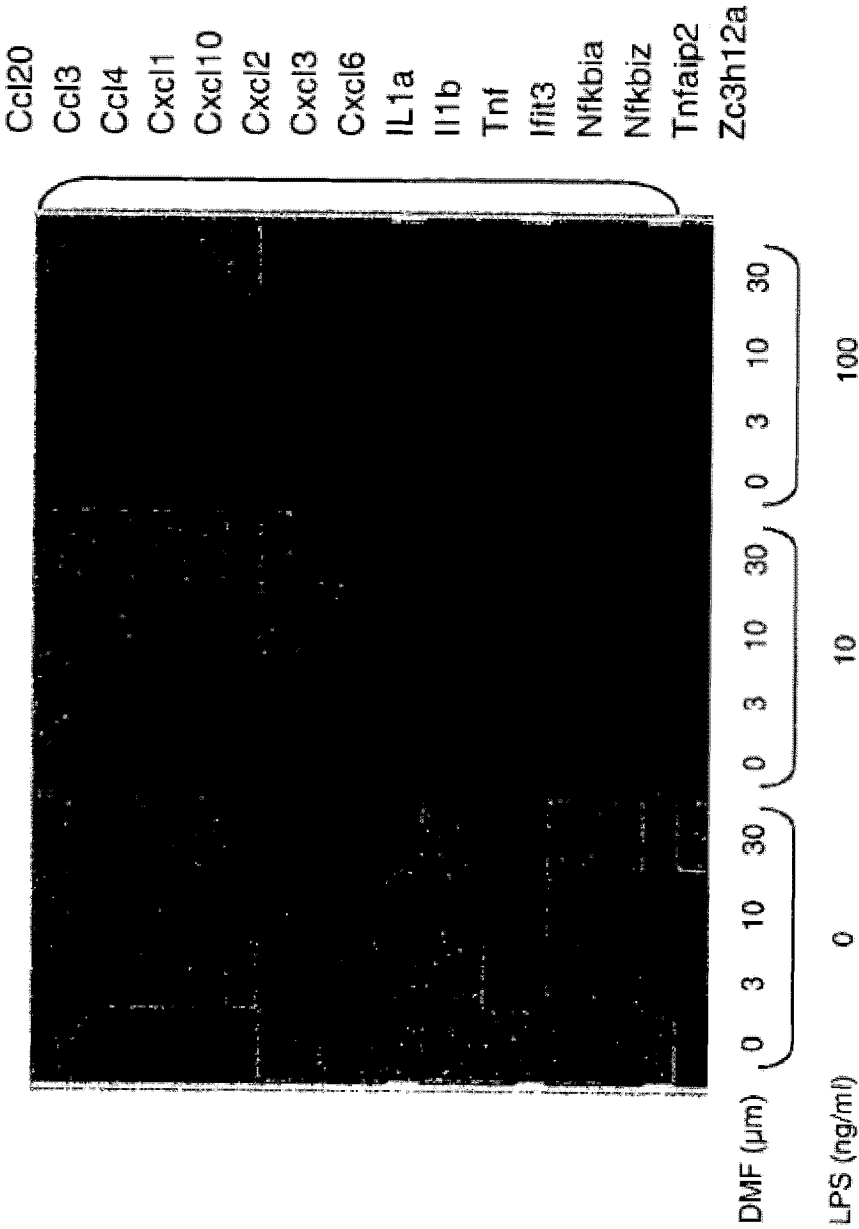


图 5

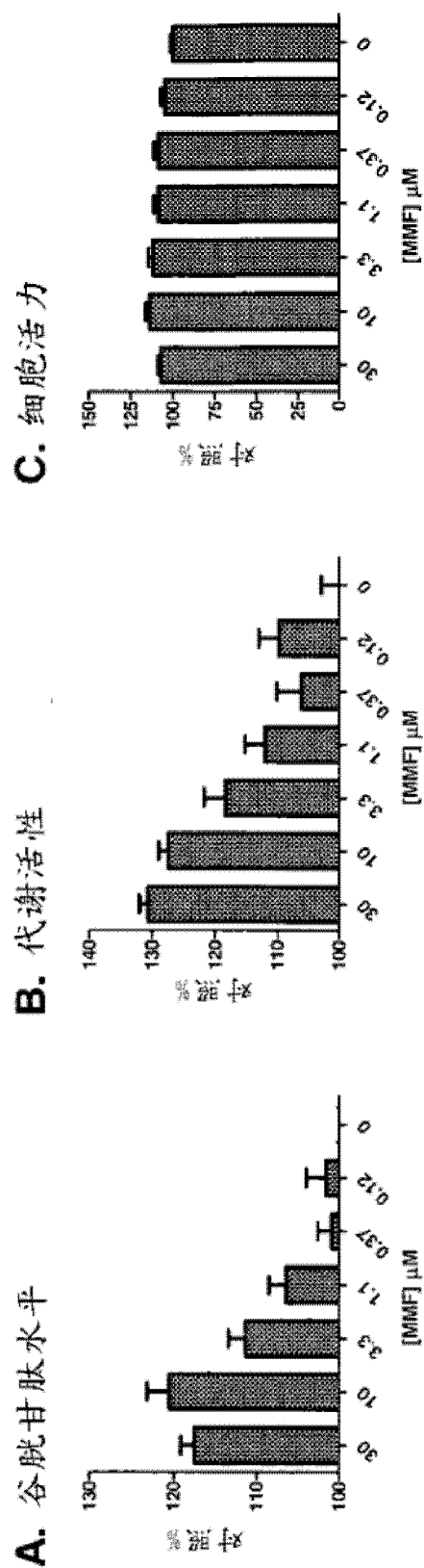


图 6

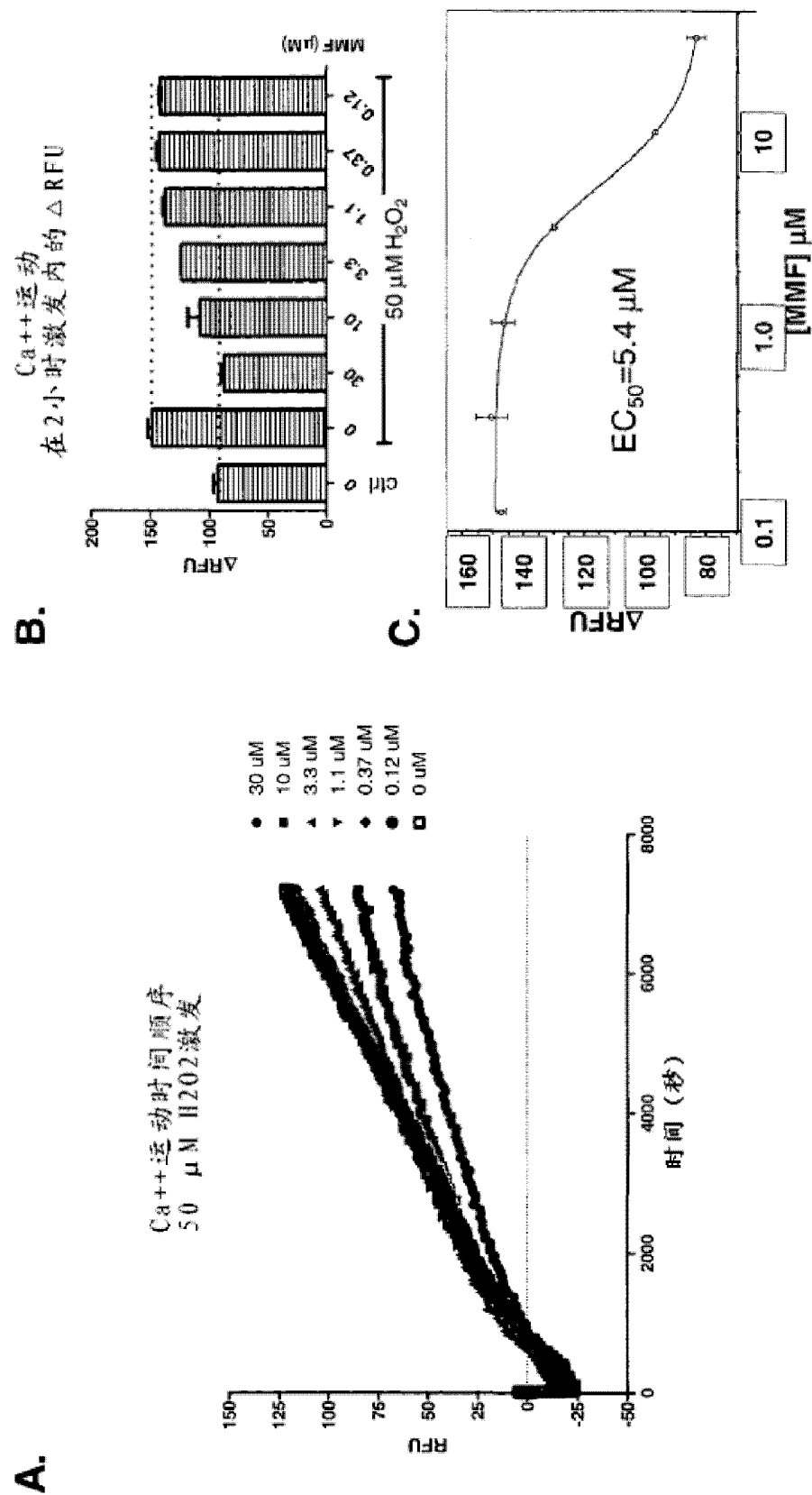


图 7

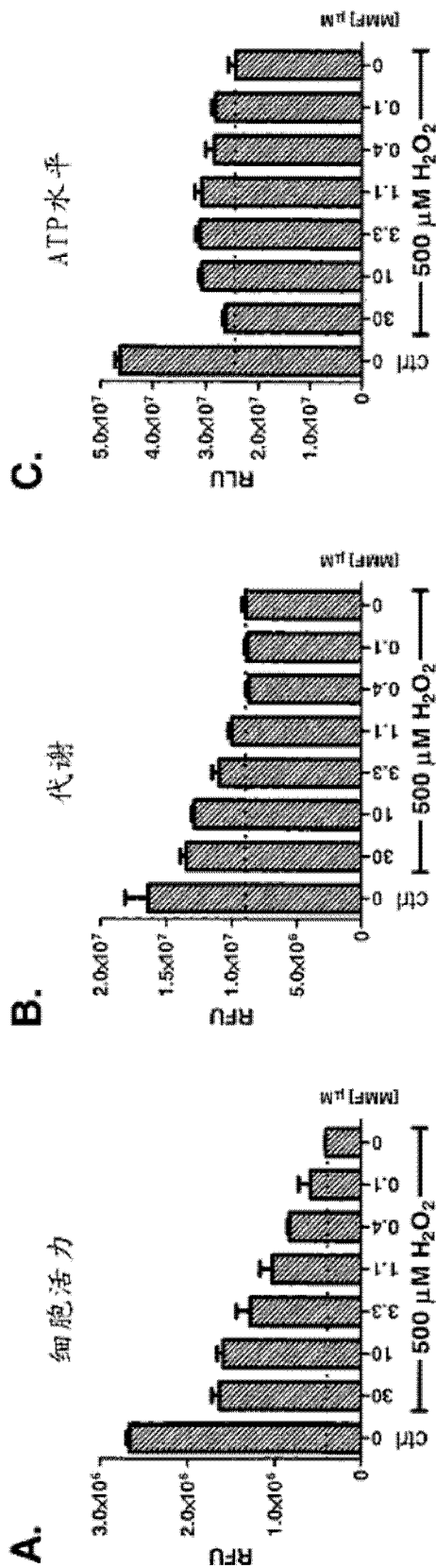


图 8

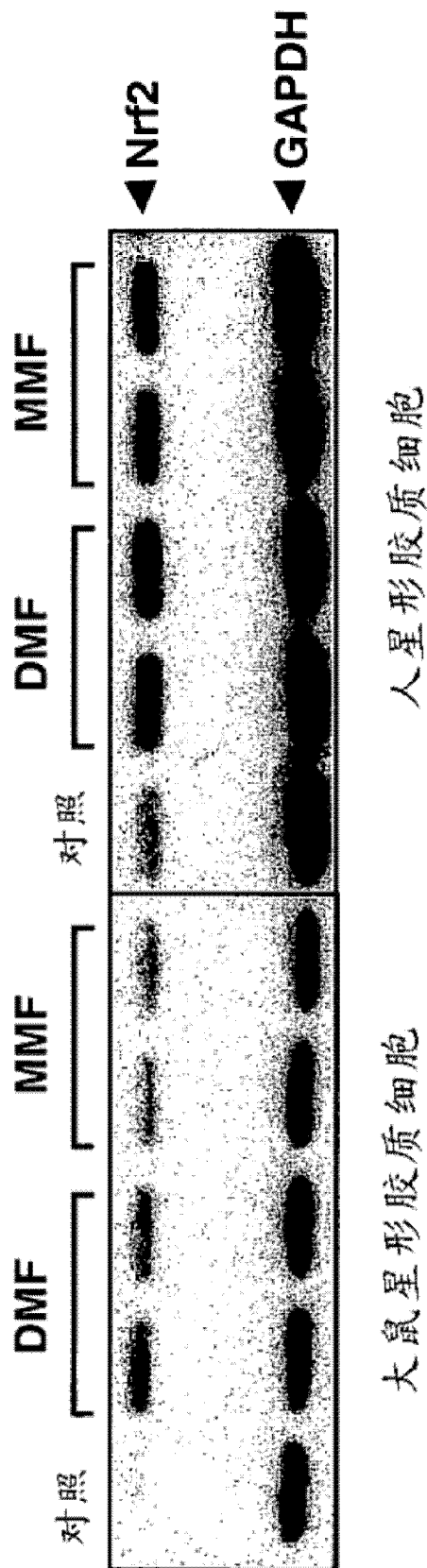


图 9

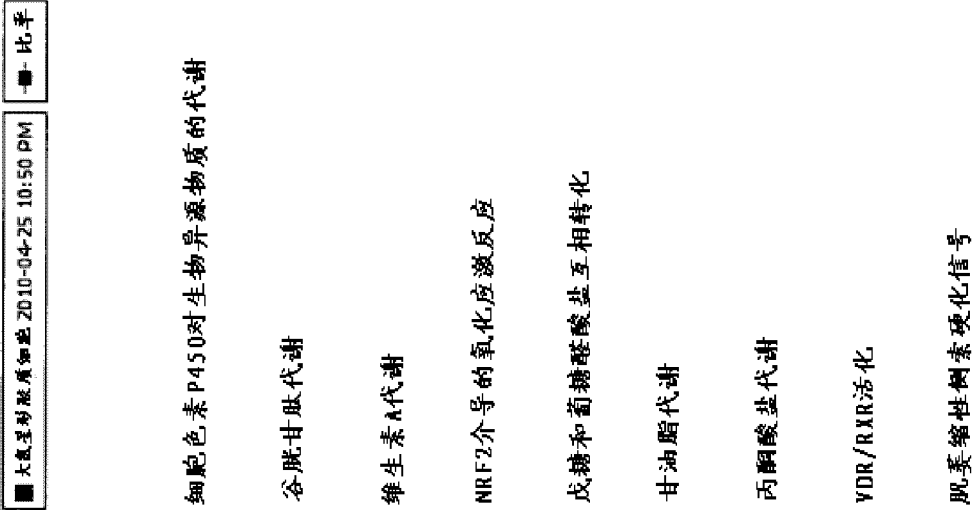


图 10

■大直径形胶质细胞 2010-04-25 10:50 PM

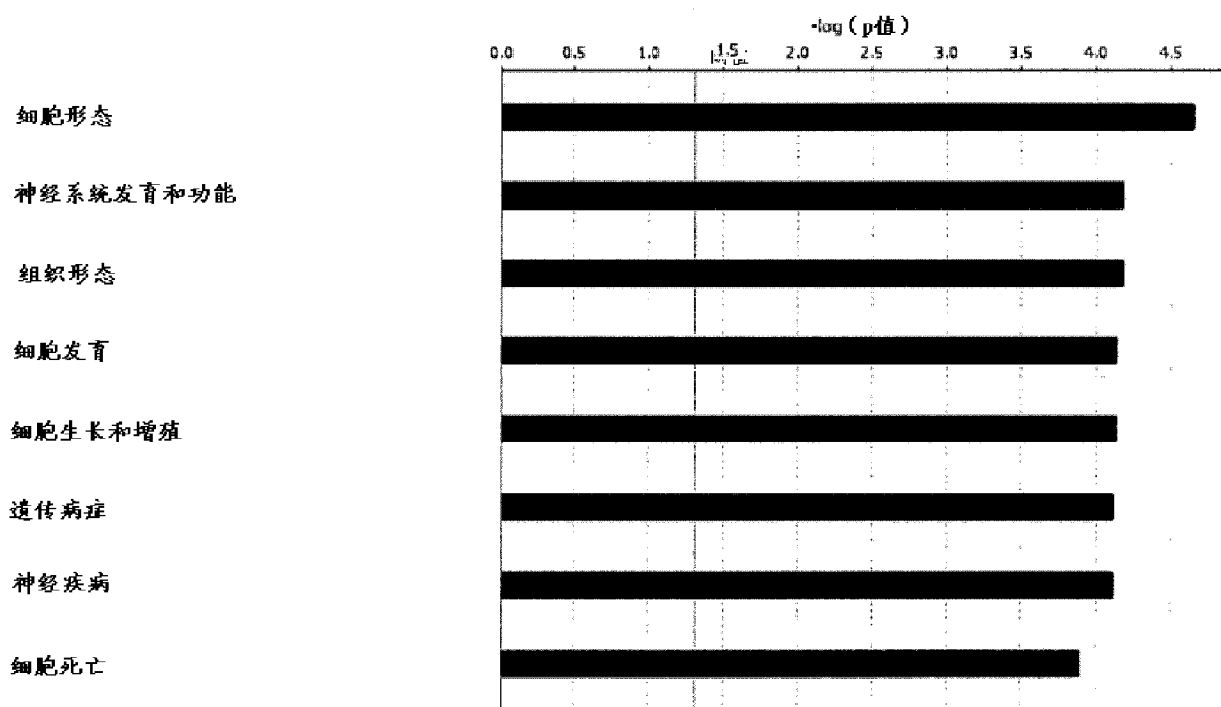
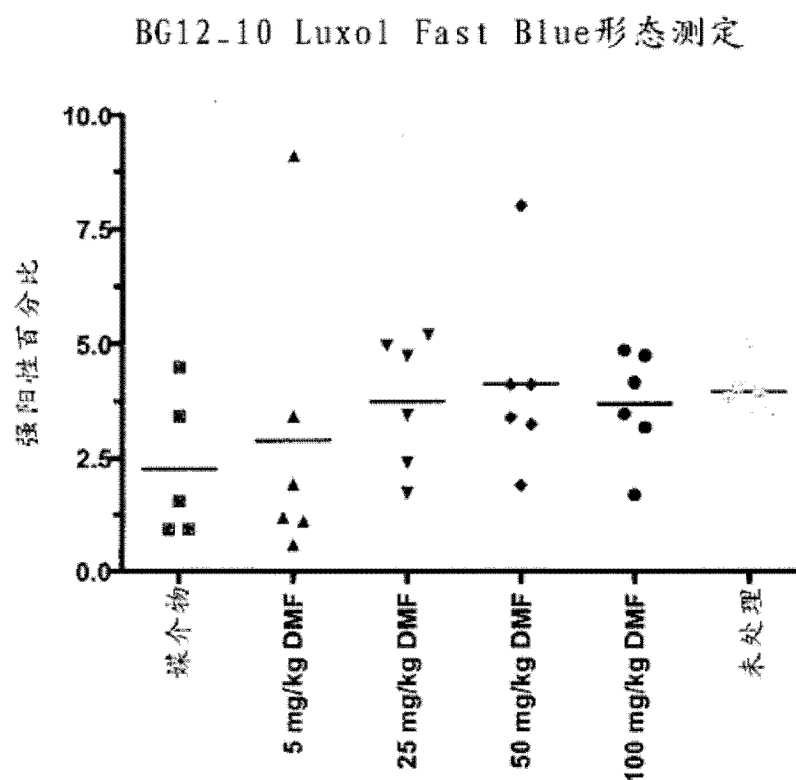


图 11



DMF处理减少EAE（大鼠脊髓）期间的髓鞘损失
形态测定法的描述将由Sarah Ryan提供

图 12