

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 31/53

A61P 25/00



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 99814834.2

[45] 授权公告日 2005 年 10 月 5 日

[11] 授权公告号 CN 1221265C

[22] 申请日 1999.12.18 [21] 申请号 99814834.2

[30] 优先权

[32] 1998.12.22 [33] US [31] 09/218,323

[86] 国际申请 PCT/US1999/030281 1999.12.18

[87] 国际公布 WO2000/037063 英 2000.6.29

[85] 进入国家阶段日期 2001.6.21

[71] 专利权人 美国拜尔公司

地址 美国宾夕法尼亚州

[72] 发明人 T·J·肯尼迪

审查员 曲 燕

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 关立新 谭明胜

权利要求书 1 页 说明书 16 页

[54] 发明名称 用于治疗由肉孢子虫、新孢子虫和弓形虫引起的疾病的三嗪酮化合物

[57] 摘要

公开了对于易感染或者已患有能用三嗪酮化合物治疗的诸如肉孢子虫病或弓形虫病等神经性或致流产性疾病的动物进行治疗性或病后预防性治疗的方法，该方法是向动物施用药学有效量的 Ponazuril，包括单次高剂量治疗。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 1-甲基-3-[3-甲基-4-[4-[(三氟甲基)磺酰基]苯氧基]苯基]-1,3,5-三嗪-2,4,6(1H,3H,5H)-三酮,即 Ponazuril 在制备治疗由球虫引起的神经性或致流产性疾病的药物中的用途,条件是所述的球虫不是神经肉孢子虫。
2. 权利要求1的用途,其中所述球虫是肉孢子虫类的球虫。
3. 权利要求2的用途,其中所述肉孢子虫类的球虫选自肉孢子虫属、新孢子虫属和弓形虫属。
4. 权利要求3的用途,其中所述新孢子虫属的球虫是犬新孢子虫或马新孢子虫,弓形虫是冈氏弓形虫。
5. 权利要求3的用途,其中所述新孢子虫属的球虫是造成牛或犬新孢子虫病的犬新孢子虫。
6. 权利要求1的用途,用于病后预防性治疗由球虫引起的神经性或致流产性疾病。
7. 权利要求1或6的用途,其中所述的治疗包括分两次或多次间歇剂量施用 Ponazuril。
8. 权利要求7的用途,其中所施用的间歇剂量是 1.0-100 mg/kg。
9. 权利要求6的用途,其中所述的治疗包括施用 Ponazuril 直至动物产生保护性免疫。
10. 权利要求1或6的用途,其中所述的治疗包括以 2.5-10 mg/kg 的量施用 Ponazuril。
11. 权利要求1的用途,其中所述的治疗包括以大于 10 mg/kg 的单次高剂量施用 Ponazuril。
12. 权利要求1的用途,其中所述的治疗包括以每天 2.5-10 mg/kg 的治疗方案施用 Ponazuril 28 天。
13. 1-甲基-3-[3-甲基-4-[4-[(三氟甲基)磺酰基]苯氧基]苯基]-1,3,5-三嗪-2,4,6(1H,3H,5H)-三酮,即 Ponazuril 在制备治疗由肉孢子虫类的球虫引起的神经性或致流产性疾病的药物中的用途,所述肉孢子虫类的球虫选自新孢子虫属和弓形虫属。

用于治疗由肉孢子虫、新孢子虫和弓形虫
引起的疾病的三嗪酮化合物

5

发明背景

发明领域

本发明涉及用于治疗感染了引起致流产疾病或神经性疾病的寄生虫的动物的三嗪酮化合物。更具体地说，本发明涉及可用于治疗会引起致流产疾病或神经性疾病的寄生的原虫（如球虫）的三嗪酮化合物。

10

现有技术简述

三嗪酮化合物如三嗪二酮（例如地克珠利化合物）和三嗪三酮（例如托曲珠利化合物）已用于治疗 and 预防各种由各式各样原虫引起的哺乳动物、昆虫和鱼类疾病。参见美国专利 4,933,341、4,935,423、5,114,938、5,141,938、5,188,832、5,196,562、5,256,631 和 5,464,837。对这些化合物敏感的原虫包括感染鸟、哺乳动物和昆虫和肠的寄生虫，显示的症状是腹泻、虚损、恶心和呕吐。通常，三嗪酮的作用方式是攻击在内脏和壁细胞中发现的中期寄生虫，使寄生虫的内质网、核周间隙及线粒体溶胀。据称这扰乱了细胞核分裂的能力，使裂殖体和小配子母细胞保持很小，只分别形成少数裂殖子和小配子。最终的结果据说是这些晚期寄生虫穿透新的哺乳动物细胞的能力丧失，有效地阻止了寄生虫在寄主内的复制。

15

20

25

30

自 1970 年以来，某些被怀疑引起动物神经性和/或致流产性疾病的原虫特别受到关注。一些这类原虫的成功分离和体外培养已被证实是困难的。例如，直到 20 世纪 80 年代晚期仍未实现由脑或脑脊髓液中的成功分离。在确定了感染大脑的寄生虫会造成神经性疾病和感染胎儿的寄生虫会造成致流产疾病之后，需要有能穿过血-脑屏障和胎盘屏障而又不产生不利副作用的有效的抗原虫药物。很少几种药物能穿过动物的血脑屏障或胎盘屏障。但是，本领域已知的能穿过血-脑屏障和/或胎盘屏障从而有效地治疗大脑寄生虫感染的药物中很多有不利的副作用，故其使用不能不冒很大风险。因此，至今尚无经批准的能对这类神经性或致流产性疾病进行有效治疗的有效药物。以下是关于寄生虫疾病的简要说明。

马原虫性脑脊髓炎 (EPM) 是马的一种神经性疾病, 特易发生于处于紧张状态的幼马 (例如纯种赛马和纯种表演马), 因此是对于养马工业经济收入有重要影响的一种疾病。EPM 最早是在 20 世纪 70 年代被认识为一种疾病, 但是一直到 1991 年才由患有 EPM 的马中培养出病原体并被称为神经肉孢子虫。1997 年, 由患 EPM 的马的脑中分离出一种新孢子虫属, 现在称为马新孢子虫 (*Neospora hughesi*)。因此提出 EPM 可由这种新认识的生物体独自引起, 由神经肉孢子虫独自引起, 或由这二者一并引起。EPM 最常造成动作失调 (共济失调)、虚弱和痉挛。这种疾病可以与几乎任何神经性病征相似。它可用为特急的或慢性的病症发生。慢性形式常常在发作时不知不觉间加剧, 在病程到达晚期之前难以诊断并会导致死亡。在最轻微的情形, 仅有的临床症状可能是不很肯定的下肢跛行或轻微的呼吸杂音。在最严重的情形, 马不能吞咽或站立。现在已知, 在最严重的情形, 寄生虫 (如神经肉孢子虫) 感染大脑并造成严重损伤。EPM 的临床症状是由寄生虫产生的直接神经元 (脑和脊髓) 损伤以及由炎症细胞的浸润、水肿及与中枢神经系统 (CNS) 中的裂殖子和分裂体有关的神经元死亡造成的脑损伤引起的。目前, 对于 EPM 的控制尚无认可的有效或预防方法。曾使用过人用药物甲氧苄啶-磺胺组合物。但这种治疗是昂贵的, 而且需要大量的反复用药。

另一种双孢子球虫类寄生虫—冈氏弓形虫 (鼠弓形虫) 已知有一段时间了, 它最早是由猫的肠和肌肉组织中分离得到。这种寄生虫的终寄主是猫, 它可以长期窝藏该生物体并向其它动物, 包括牛、羊、猪和人, 传播卵囊。羊、牛和人的感染与流产及主要影响中枢神经系统的先天获得性疾病有关。近来还发现, 它与怀孕期间受感染之前为血清阴性的受感染种猫生育的小猫的流产和畸形有关。非猫科寄主如牛、羊、猪和人不产生但会发育卵囊并可能受到速殖子和缓殖子对肌肉和脑的侵害, 产生临床疾病症状—神经性症状和伴有胎儿缺陷的流产。曾报道, 60% 的猫对冈氏 3 形虫呈血清阳性。同样, 对于弓形虫病没有认可的治疗或预防方法。

还有另一种双孢子球虫—犬新孢子虫, 在动物中既造成神经性疾病也造成致流产疾病。它最初在 1988 年由狗分离出来, 以前曾将其与冈氏弓形虫混淆。由这种寄生虫引起的疾病在经胎盘感染的幼犬中发

生最严重，其特征是幼犬逐渐严重的瘫痪，特别是后肢；也可能发生多肌类和肝炎。最近已认识到这种疾病是新生牛犊流产和神经性肢体缺陷的主因。在流产的胎儿的脑、脊髓和心脏中可以看到非化脓性脑炎和心肌炎造成的微观损伤。近来已确定犬新孢子虫的终寄主是狗。

5 目前对于狗或牛的犬新孢子虫或马的马新孢子虫尚无认可的治疗或预防方法。

本领域的已知文献，包括上述文献，没有建议或提出使用诸如托曲珠利或托曲珠利一砒（近来称为“Ponazuril”）等三嗪酮化合物治疗受球虫，或者更具体地说，治疗受引起致流产病或神经性疾病的肉孢子虫感染的动物而不会造成无法忍受的副作用。因此，需要有一种改进的和安全的方法，用于治疗受到表现为神经性或致流产性疾病的寄生虫病折磨的动物。

发明概要

15 根据上述，本发明包括一种改进的治疗患病动物的方法，所述动物患有可以用三嗪酮化合物治疗的寄生虫神经性疾病或致流产病，该方法包括对动物施用的药理学有效量的化合物，所述的改进包括三嗪酮化合物是 Ponazuril。

20 本文使用的术语“药理学上有效量”是指所施用的三嗪酮的数量高至足以抑制造成神经性疾病和/或流产的寄生的原虫（通常是球虫）的体内或体外生长。药理学上有效量控制了被感染组织中寄生虫，因此使动物的健康改善。

25 另外，本发明包括一种对感染寄生虫的动物进行病后预防 (metaphylactically) 性治疗的方法，该寄生虫能引起可用 Ponazuril 治疗的神经性或致流产性疾病。病后预防性治疗包括采用病后预防有效的方案对动物施用 Ponazuril。“病后预防有效方案”是指长期以预定的间歇给药方式施用三嗪酮化合物，直至该动物通过，例如产生保护性免疫响应或清除寄生虫而克服了入侵的寄生虫。通常此方案将有效地控制寄生虫和防止临床病症。病后预防有效剂量也可以长期服用 5 年或动物的终生，尤其是在寄生虫难以控制的情形。

30 本发明还包括一种单次高剂量治疗动物的方法。此方法包括向患有对用三嗪酮治疗敏感的寄生虫性神经性病或致流产疾病的动物施用药理学上有效量的单次高剂量 Ponazuril。术语“单次高剂量”是指只

施用一次的剂量。此剂量比治疗性或病后预防性治疗中使用的剂量高得多，对于控制寄生虫引起的疾病有效，并且本身不产生不利作用，例如毒性。Ponazuril 的单次高剂量高于 10 mg/kg。下面将更详细地说明本发明的这一方面及其它方面。

5

发明详述

如上所述，本发明涉及一种治疗感染或患有寄生虫疾病的动物的方法，该疾病表现为可用三嗪酮化合物治疗的神经性或致流产性疾病，所述方法包括向动物施用药理学有效数量的 Ponazuril。这些动物的示例性而非限制性的实例有马、牛、猫、狗、猪、羊、鸟、昆虫和人。感染或引起疾病的寄生虫是肉孢子虫类的球虫，它们可显示为神经性或致流产性疾病。其示例性而非限制性的实例可选自肉孢子虫属、新孢子虫属和弓形虫属。肉孢子虫属通常是选自神经肉孢子虫、马新孢子虫、尤新孢子虫和冈氏弓形虫。原虫性感染或疾病包括但不限于 EPM、新孢子虫病和弓形虫病。

15

在实施本发明时，治疗由本文所述原虫引起的寄生虫感染或疾病使得神经性和致流产性疾病的症状减轻。一般，这些症状包括跛行、动作失调、瘫痪、流产、新生儿虚弱及其它相关病症。对于治疗性处理，已经患有以上疾病症状的动物用三嗪酮化合物进行治疗。通常治疗期为约 28-90 天，优选约 28-60 天。应该清楚，对于治疗性处理，治疗方案可以是每天一次、每天二次或多次、每隔一天一次、甚至每周一次，这取决于诸如疾病的严重性和引起疾病的寄生虫的种类。但是，在某些情形，治疗方案可以无限延长，有时延至动物的终生。在动物受更具抗性的寄生虫种系感染时，将会需要后一治疗。但是，治疗可以根据需要被延长更长时间，直到疾病的症状消除。优选的治疗是每天 1 次进行约 28 天。

25

对病后预防性治疗，受感染的动物接受治疗以使它们免于发生疾病的临床表现。这种治疗最终使动物通过例如建立有效的免疫响应获得控制寄生虫的能力，以防止进一步感染，而不需要再服用 Ponazuril。根据本发明，这种病后预防活性是指按照预定的间歇治疗方案（病后预防有效的治疗方案）使用三嗪酮化合物控制在前次治疗后可能已感染了动物的原虫。因此，施行病后预防有效的治疗方案以便通过例如杀死或减少原虫的数目，降低它们引起疾病的能力。大体

30

上，病后预防有效治疗方案可以在动物的终生每月施行约一次，或者直到在动物内产生内在的清除机制，例如有效的免疫响应，以使它不受进一步感染。后一情形可以在5年或更短的时间内发生。正如如理解的那样，病后预防治疗是以这样的认识为基础的：当动物受本文所述的原虫感染时，在相当长一段时间内（例如感染后2-6个月）它们不显示临床症状，例如神经性症状或流产。相反，肠内的原虫感染在感染后不久就显示出来。根据本发明，病后预防治疗防止了寄生虫寄居和引起临床疾病。该治疗方案是按照一种间歇的计划，大约每月一次、每2个月1次或者每2周1次，剂量相当于约1.0-100 mg/kg，优选为约1.0-25 mg/kg，更优选为约2.5-10 mg/kg。特别是在有耐药性的情形（例如动物受耐药种系感染时），会需要高剂量范围。需要的剂量水平和治疗期限属于本领域普通技术人员的权限。对于患EPM的马或患新孢子虫病的牛，一种优选的治疗方案是每28天服用约1.0-25 mg/kg、更优选约2.5-10 mg/kg 三嗪三酮。

对于单次高剂量治疗，Ponazuril 以药理学上有效量给药，该量大于10 mg/kg，最高达约100 mg/kg。本发明的一个鲜明的特点是本发明化合物可能是无毒的，因此可以以高剂量给药。高剂量给药的优点是不需要反复给药，而某些三嗪酮化合物如果以很高的剂量给药会产生不利的副作用。

不受任何特定理论的约束，据信本发明所述的治疗方法的出乎意料的成功是由于Ponazuril能穿过血-脑屏障或胎盘屏障。据认为，本发明化合物容易穿过血-脑屏障，并且也能穿过胎盘屏障，原位杀死脑和脑脊髓液/脊随中的原虫。现有还发现，这类化合物即使在本发明所述的单次高剂量治疗方案所需的高剂量下也是无毒和不引起突变的。

在此以前，还没有经济合算的、易服用的药物可用于有效治疗和预防这些疾病而不在动物中产生不可接受的副作用，例如毒性和突变性。

在实施本发明时，Ponazuril 可以以任何方便向动物给药的方式配制。适合口服给药的制剂是优选的制剂，它们可以是悬浮液、片剂、胶囊、凝胶、糊剂、大丸剂或粉末、颗粒或小丸形式的制剂。优选的口服给药制剂是糊剂或饲料添加物。其它可采用的给药方式包括非肠

道、局部、肌内和粘膜内给药，或以本领域技术人员已知的其它途径给药。还优选以浇泼的方式局部给药。

通常，在制剂中使用药学上可接受的载体和辅助剂。其实例可以是选自以下物质的增稠剂：Carbopol、无机增稠剂如硅酸盐、膨润土或胶体二氧化硅，以及有机增稠剂如脂肪醇或脂肪酸酯；润湿剂，选自聚乙二醇和十二烷基硫酸钠与 Carbopol；更具体地说，对于本发明优选的糊剂，Carbopol974P 是最优选的增稠剂。还可以使用选自对羟基苯甲酸酯、醇和醛的防腐剂。它们可以是液体、固体或气体物质，此外它们呈惰性或者是医学上可接受，并且与活性组分相容。

令人惊奇的是，本发明的糊剂在用于治疗寄生虫时有效。更具体地说，本发明的糊剂令人惊奇地使三嗪酮，特别是托曲珠利和 Ponazuril 释放穿过血-脑屏障或胎盘屏障并攻击已侵入大脑或感染怀孕动物的胎儿的寄生虫。为方便起见：这里提供了本发明优选的糊剂的一个具体实施方案及其制备方法的说明。本发明的一种优选的糊剂包括三嗪三酮（例如 Ponazuril）、丙二醇、增稠剂如 Carbopol、防腐剂如对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯以及水的微粒化悬浮液。其制备可如下进行：将水（通常是纯化水）和丙二醇混合后加热至约 70℃并在该温度下加入防腐剂，将形成的混合物冷却至室温，然后加入 Carbopol（优选 Carbopol 974P），最后加入三嗪三酮，混合完毕后用氢氧化钠将 PH 调节至约 6.0。最优选的糊剂含 15% w/w Ponazuril, 20% w/w 丙二醇、0.5% w/w Carbopol 974P、0.14% 对羟基苯甲酸甲酯、0.02% w/w 对羟基苯甲酸丙酯、0.1% w/w 氢氧化钠，其余为纯化水。可以加入甜味剂，包括葡萄糖、蔗糖、乳糖、果糖、山梨糖醇、木糖醇、人造甜味剂和糖密以增进可口性。另外，同样可加入酵母或肝风味剂。

用以下示例性而非限制性实施例进一步说明本发明。

实施例

实施例 1

用马进行药物动力学研究，比较在给药单剂量托曲珠利之后不同时刻托曲珠利、Ponazuril 和托曲珠利-亚砷的血液浓度。所有的马都接受单剂量 10 mg/kg，以悬浮液形式口服给药。在治疗时刻(0)和在治疗后 0.25、0.5、1、2、4、6、12、24、48 和 72 小时抽取血样。

取样的结果列在表 1 中。令人吃惊的是，接受托曲珠利的马在其血清中显示出相当高浓度的 Ponazuril。另外，在血流中还发现相当高浓度的托曲珠利 - 亚砷。这表明单独的 Ponazuril 本身会产生预期能通过血 - 脑屏障的有效血液浓度，这是为治疗神经性疾病，例如由神经

5 肉孢子虫、冈氏弓形虫、犬新孢子虫和马新孢子虫引起的神经性疾病所需要的特征。

表1 单剂量托曲珠利在马中的药物动力学

D	测定的化合物	血液中浓度,mg/l				
		0	0.25	0.5	1	4
A	托曲珠利		0.027	0.773	2.863	4.511
	托曲珠利-亚砷		<0.01	0.077	0.070	0.159
	Ponazuril		0.010	0.089	0.088	0.171
B	托曲珠利		0.061	0.393	2.617	4.296
	托曲珠利-亚砷		<0.01	0.025	0.047	0.083
	Ponazuril		<0.01	0.029	0.036	0.040
C	托曲珠利		0.061	0.560	3.286	5.788
	托曲珠利-亚砷		<0.01	0.024	0.041	0.097
	Ponazuril		<0.01	0.013	0.019	0.026
D	托曲珠利		0.017	0.295	3.286	2.165
	托曲珠利-亚砷		<0.01	0.027	0.039	0.058
	Ponazuril		<0.01	0.011	0.021	0.024
E	托曲珠利		<0.01	0.039	1.146	3.175
	托曲珠利-亚砷		<0.01	<0.01	0.021	0.064
	Ponazuril		<0.01	<0.01	0.017	0.015
F	托曲珠利		0.110	0.428	1.741	--
	托曲珠利-亚砷		<0.01	0.026	0.044	--
	Ponazuril		<0.01	0.012	<0.01	--

D	测定的化合物	血液中浓度,mg/l					
		6	12	24	48	72	
A	托曲珠利	5.149	5.066	6.434	7.607	6.653	
	托曲珠利 亚砒	0.167	0.230	0.407	0.732	0.592	
	Ponazuril	0.108	0.170	0.324	1.622	1.933	
B	托曲珠利	11.474	11.670	11.690	6.677	5.058	
	托曲珠利 亚砒	0.320	0.451	0.566	0.454	0.346	
	Ponazuril	0.131	0.254	0.255	0.831	0.880	
C	托曲珠利	14.202	13.751	--	9.758	7.633	
	托曲珠利 亚砒	0.280	0.436	--	0.477	0.377	
	Ponazuril	0.061	0.135	--	0.540	0.642	
D	托曲珠利	3.816	10.544	7.236	8.234	--	
	托曲珠利 亚砒	0.133	0.668	0.461	0.749	--	
	Ponazuril	0.030	1.651	0.315	0.986	--	
E	托曲珠利	11.335	12.032	8.694	6.869	--	
	托曲珠利 亚砒	0.259	0.430	0.481	0.741	--	
	Ponazuril	0.074	0.268	0.231	0.501	--	
F	托曲珠利	10.966	6.660	10.224	7.096	--	
	托曲珠利 亚砒	0.245	0.453	0.633	0.642	--	
	Ponazuril	0.061	0.725	0.192	0.532	--	

实施例 2:

一种代表性的三嗪三酮 Ponazuril(1-甲基-3-[4-对[三氟甲基)磺酰基苯氧基]间甲苯基]-S-三嗪-2,4,6(1H,3H,5H)三酮)配制成糊剂用以对马给药。使用列在表 2 中的组分制备以下制剂。

5 表 2 马用 Ponazuril 糊剂的组分

组分	理论量	实际量 % w/w
微粒化 Ponazuril	22.5 Kg	15.0
聚丙二醇	30.0 Kg	20.0
Carbopol 974P	0.750 Kg	0.5
对羟基苯甲酸甲酯, NF	0.210 Kg	0.14
对羟基苯甲酸丙酯, NF	0.030 Kg	0.02
氢氧化钠, NF	0.150 Kg	0.10
纯化水	96.365 Kg	64.24

10 制剂用方法 (A) 和 (B) 制备如下。第一种方法 (A) 包括: 1) 将一部分水与聚丙二醇混合; 2) 加入防腐剂 (对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯); 3) 缓慢加入 Carbopol 974P, 直到得到均匀的悬浮液; 4) 加入微粒化形式的 Ponazuril; 5) 加入氢氧化钠使悬浮液的 PH 约为 6.0; 和 6) 加入剩余的水至体积足量。最终的悬浮液是糊状形式, 它可以向马口服释药。

15 第二种方法 (B) 包括: 1) 将一部分水与聚丙二醇混合; 2) 加热至 70℃; 3) 加入防腐剂 (对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯), 同时保持溶液为 70℃; 4) 将溶液冷却至室温; 5) 缓慢加入 Carbopol 974P, 直到得到均匀的悬浮液; 6) 加入微粒化形式的 Ponazuril; 7) 加入氢氧化钠使悬浮液的 PH 约为 6.0; 和 8) 加入剩余的水至体积足量。最终的悬浮液是糊状形式, 它可以向马口服释药。

20 形成的糊剂对马施用, 发现该糊剂可口并很受欢迎。

实施例 3:

试验一种代表性的三嗪三酮 Ponazuril(1-甲基-3-[4-对(三氟甲基)磺酰基苯氧基]间甲苯基]-S-三嗪-2,4,6-(1H,3H,5H)三酮)治疗已

显示 EPM 症状的马的能力。将该化合物按实施例 1 中所述配成糊剂，使用 Ponazuril 作为 15% 的活性组分 (a. i.)。对已诊断患有 EPM 的马以 2.5 mg/kg 至 10 mg/kg 的剂量每天一次，用药 28 天。

5 自然发生的 EPM 临床病例通过特征描述和实验室诊断作全面鉴定。用来将 EPM 阳性马纳入这一实验的诊断如下：由指示 EPM 的标准的神经病学检查（包括放射照相法）确定的慢性神经性失调缺陷；对神经肉孢子虫 LgG 的蛋白质印迹阳性；红血球计数低于 500 个/mL；CSF 指数—总蛋白质 <90，IgG 指数 >0.3，AQ 商数 <2.2。

10 其它要求是马除了 EPM 外无它种疾病。因此，它们必须满足以下标准：对于 EHV-1，CSF 阴性 (<1:4)；对于维生素 E，血清值正常 (2.0 μg/mL)；无癫痫发作；无行为障碍。

15 诊断过的马随机地分成几组。第 1 组的马每日以 5 mg/kg 的剂量接受糊剂，第 2 组马以 10 mg/kg 的剂量每日接受糊剂。治疗剂量以体重为基础。对马进行评价 90 天（中止治疗后约 60 天），以确定治疗确实有效。用以下系统记录对治疗的响应；

20 1) 0 = 完全成功 - 临床正常，CSF 阴性；2) 1 = 在正常的步法下勉强发觉缺陷；3) 2 = 通过后退、转向、摆动、颞腰施压和颈伸展，缺陷容易觉察和扩大；4) 3 = 在散步，转头、腰部施压或伸颈时，缺陷很突出；5) 4 = 跌绊、倾侧和不由自主地跌倒；6) 5 = 躺着，不能站起。在此记分系统中，一个单位的改进被认为是明显改善。

25 此研究的结果示于表 3。在 10 mg/kg 组内治疗了 28 天的所有的 (100%) 马到用 Ponazuril 开始治疗 (第 0 天) 后的 90 天都显示出临床评分的明显改善。用 5 mg/kg 剂量治疗的 9 匹马中的 8 匹 (88.9%) 显示出有效的改善。当把每组的各个治疗日的评分相加，则得到总的评分。第 1 组马和第 2 组马的总分的改善大致相等。因此断定，5 mg/kg 或 10 mg/kg 的 Ponazuril 对于马的 EPM 的主动治疗是有效的。

表 3: EPM 感染的马对用托曲珠利 - 砒治疗的响应

马	5 mg/Kg 剂量			10 mg/Kg 剂量		
	天 0	天 28	天 90	天 0	天 28	天 90
A	2	1	2			
B	2	1	1			
C				4	2	1
D				3	2	0
E				2	2	1
F	3	2	0			
G				2	1	1
H				2	2	1
I	2	1	0			
J	2	0	0			
K				3	0	0
L	2	3	3			
M	2	2	0			
N	2	2	0			
O	3	3	2			
总和	17	13	6	19	15	4

实施例 4:

- 5 为确定 Ponazuril 提供的保护的围, 进行了体外试验。评价了以下寄生虫种系对该化合物的敏感性: 神经肉孢子虫 SN3; 镰形肉孢子虫 SF1; 冈氏弓形虫 RH; 和犬新孢子虫 NC-1. Ponazuril 在两个浓度 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 下进行试验。

10 在所有体外试验中都使用牛鼻甲骨 (BT) 细胞。细胞在 25 cm^2 烧瓶中于 RPMI 1640 培养基中生长至融合, 该培养基中补加了 10 % v/v 胎牛血清 (FBS)、100 单位青霉素 (G/ml)、100 mg 链霉素/ml 和 5

$\times 10^{-2}$ mM 的 2-巯基乙醇。在细胞融合后，将细胞保持在 FBS 减量 (2% v/v) 的相同培养基中。将细胞培养物在 37°C 于含有 5% 二氧化碳和 95% 空气的潮湿气氛中培养。

5 为了使寄生虫生长，将单层 BT 细胞用寄生虫感染并用倒置显微镜检查损伤 (细胞病变效应, “CPE”) 的发展或很多胞外裂殖子的存在。一旦观察到损伤或存在很多胞外寄生虫，则用 5 ml 滴管的头部刮取该单层，并将 1-3 滴这种含裂殖子的流体转移到含新鲜 BT 细胞的 2 个烧瓶中。神经肉孢子虫和镰形肉孢子虫的裂殖子以这种方式每 5-10 天传代一次，而冈氏弓形虫和犬新孢子虫的速殖子每 3-4 天传代一次。

10 用来测定 Ponazuril 的效力的试验是微量滴定单层破坏试验 (Mzcrotiter Monolayer Disrption Assay, MMDA)。用此试验确定寄生虫或化合物对 BT 细胞是否有毒性。将平底 96 孔微量滴定板接种上 BT 细胞，形成的单层细胞用来确定托曲珠利和 Ponazuril 对裂殖子形成的影响，其方法同用 CPE 法测定一样 (蚀斑形成)。将单层细胞接
15 种上寄生虫 (神经肉孢子虫或镰形肉孢子虫 (50,000/孔); 冈式弓形虫 (10,000/孔); 犬新孢子虫 (20,000/孔))。所有各孔都在感染 2 小时后加入试验化合物。未处理和未感染的单层孔作为寄生虫对照样，而未感染的药物处理的 BT 细胞则作为毒性对照样。每种处理条件用六个重复样检验。逐日目测监视各孔，当未处理的裂殖子感染细胞有 90-
20 100% 裂解 (90-100% CPE) 时，停止试验。将板的所有各孔均用磷酸缓冲盐水 (PBS) 冲洗，在 100% 甲醇中固定 5 分钟，随后在结晶紫溶液中染色。裂殖子引发的破坏区域或因为毒性造成的 BT 细胞死亡的区域不吸收结晶紫。使用 ELISA 板阅读器定量确定结晶紫的结合量，用这些数据确定抑制破坏度达 50% 时的 Ponazuril 浓度 (抑制浓度 50 或
25 IC_{50})。显示抑制作用的数据列在表 4。该数据表明，低至 1 μ g/ml 的 Ponazuril 可以对由犬新孢子虫、冈式弓形虫和镰形肉孢子虫造成的细胞破坏提供 100% 的抑制，而对于由神经肉孢子虫造成的细胞破坏产生 100% 抑制则需要 10 μ g/ml 的 Ponazuril。这说明，诸如托曲珠利和 Ponazuirl 等三嗪酮化合物对于治疗由球虫引起的、已知与神经
30 性和致流产性疾病综合症有关的疾病有效，这包括由神经肉孢子虫、犬新孢子虫、马新孢子虫和冈氏弓形虫引起的疾病。另外，Ponazuril 对于 BT 细胞无毒性。

表4: Ponazuil的体外试验数据

生物体	细胞破坏的抑制%			
	0.1 μ g/mL	1 μ g/mL	5.0 μ g/mL	10 μ g/mL
神经肉孢子虫	0	40	90	100
镰形肉孢子虫	61	100	100	100
生物体	细胞破坏的抑制%			
犬新孢子虫 NC-1	0.001 μ g/mL	0.01 μ g/mL	0.1 μ g/mL	1.0 μ g/mL
	3	13	100	100
冈氏弓形虫	11	16	100	100

实施例 5:

进行此实施例以便确定诸如托曲珠利等三嗪酮是否能通过血-脑屏障。将正常的马分成三组，每组三匹马。第一组马按 2.5 mg/kg 的剂量口服 5% 悬浮液形式的托曲珠利。第二组马按 5.0 mg/kg 的剂量口服 5% 悬浮液形式的托曲珠利。第 3 组马按 7.5 mg/kg 的剂量口服 5% 悬浮液形式的托曲珠利。每日用药，共 10 天。在第 48、96 和 240 小时抽取血样，测定血清中的托曲珠利、托曲珠利-亚砷和 Ponazuril 的浓度。治疗开始 10 天后（第 10 天），由各个马取出脑脊髓液样品，再次测定这些样品中托曲珠利、托曲珠利-亚砷和 Ponazuril 的浓度。血清和脑脊髓液中的托曲珠利、托曲珠利-亚砷和 Ponazuril 的浓度列在表 5a 和 5b 中。在用托曲珠利治疗以后，马血和脑脊髓液中的 Ponazuril 浓度相当高，其中脑脊髓液内的 Ponazuril 浓度与托曲珠利本身的浓度大体相当。这证明托曲珠利和 Ponazuril 都有效地穿过血脑屏障，而且 Ponazuril 比托曲珠利更有效地穿过此屏障。对于本领域的技术人员，这些数据暗示三嗪酮化合物也能有效地穿过胎盘屏障。

表 5a 在反复施用托曲珠利后，马中的药物浓度

马编号	10天给药剂量 (mg/Kg)	托曲珠利浓度			第10天的脑脊 髓液
		48 Hrs	96 Hrs	240 Hrs	
1	2.5	4.49	9.85	15.29	0.23
2	2.5	4.0	9.09	9.60	0.06
3	2.5	11.6	13.1	15.21	0.15
4	5.0	7.28	14.17	24.92	0.19
5	5.0	9.18	14.03	16.54	0.12
6	5.0	9.26	18.19	17.59	0.26
7	7.5	N/A	27.74	30.08	0.50
8	7.5	9.90	19.55	24.15	0.21
9	7.5	10.46	18.47	23.53	0.45
平均	2.5mg/Kg 剂量	6.70	10.68	13.37	0.15
平均	5.0 mg/Kg 剂量	8.57	15.46	19.68	0.19
平均	7.5 mg/Kg 剂量	10.18	21.92	25.95	0.39

表 5b 在反复施用托曲珠利后，马中的药物浓度

马编号	10天给药剂量 (mg/Kg)	托曲珠利浓度 ↓			第10天的脑脊 髓液
		48 Hrs	96 Hrs	240 Hrs	
1	2.5	0.29	0.99	2.61	0.09
2	2.5	0.24	1.15	2.36	0.07
3	2.5	3.70	3.13	4.04	0.11
4	5.0	0.48	2.09	5.44	0.12
5	5.0	0.63	2.03	2.03	0.14
6	5.0	0.48	2.66	5.61	0.21
7	7.5	6.35	2.69	6.31	0.23
8	7.5	0.78	2.89	6.37	0.17
9	7.5	0.52	3.09	7.06	0.27
平均	2.5mg/Kg 剂量	1.41	1.76	3.00	0.09
平均	5.0 mg/Kg 剂量	0.53	2.26	5.02	0.16
平均	7.5 mg/Kg 剂量	2.55	2.89	6.58	0.22

5 虽然上面出于示例说明的目的对本发明作了详细描述，但是应该清楚，这些细节只是为了示例说明，除非可能受到权利要求的限制，在不偏离本发明的精神和范围的条件下，本领域技术人员可以作出变动。