(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 113473983 B
(45)授权公告日 2024.07.23

(21)申请号 201980092939.6
(22)申请日 2019.12.23
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113473983 A
(43)申请公布日 2021.10.01
(30)优先权数据
62/784,650 2018.12.24 US
62/914,170 2019.10.11 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.08.24
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/068235 2019.12.23
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/139797 EN 2020.07.02
(73)专利权人 索伦托药业有限公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 亚历西斯·拿哈马 H·H·吉
(74)专利代理机构 北京市君合律师事务所 11517
专利代理师 何筝 顾云峰
(51)Int.Cl.
A61K 31/357(2006.01)
A61K 9/00(2006.01)
A61K 9/08(2006.01)
(56)对比文件
Dorothy Cimino Brown.Resiniferatoxin: The Evolution of the "Molecular Scalpel" for Chronic Pain Relief.Pharmaceuticals.2016,1-11.
Jin H. Nam等.TRPV1 on astrocytes rescues nigral dopamine neurons in Parkinson's disease via CNTF.BRAIN.2015, 3610-3622.
Dorothy Cimino Brown.Resiniferatoxin: The Evolution of the "Molecular Scalpel" for Chronic Pain Relief.Pharmaceuticals.2016,1-11.
审查员 魏燕

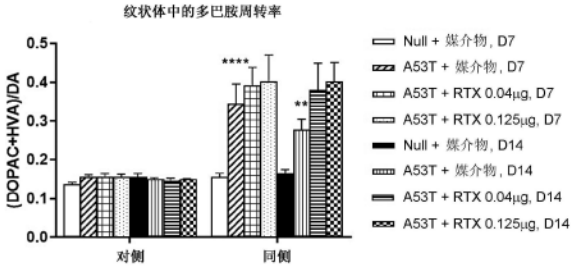
权利要求书1页 说明书14页 附图16页

(54)发明名称

通过施用树脂毒素治疗帕金森病的方法

(57)摘要

公开了一种用于治疗帕金森病(PD)的方法，其包括通过鞘内或脑池内给药施用有效量的树脂毒素(RTX)。在一些实施例中，成人的RTX剂量为约0.1μg至约100μg。



CN 113473983 B

1.包含树脂毒素(RTX)的组合物用于制备在治疗需要治疗帕金森病(PD)的受试者的方法中使用的药物的用途,所述方法包括向所述受试者鞘内或脑池内施用所述药物。

2.根据权利要求1所述的用途,其中所述受试者是成人。

3.根据权利要求1所述的用途,其中所述药物以0.1μg至100μg的剂量施用。

4.根据权利要求3所述的用途,其中所述剂量为0.1μg至1μg、1μg至5μg、5μg至10μg、10μg至20μg、20μg至50μg或50至100μg。

5.根据权利要求1所述的用途,其中所述方法包括向所述受试者鞘内给药。

6.根据权利要求1所述的用途,其中所述方法包括向所述受试者脑池内给药。

7.根据权利要求1所述的用途,其中所述组合物包含所述RTX和药学上可接受的载体。

8.根据权利要求7所述的用途,其中所述药学上可接受的载体包括水。

9.根据权利要求7所述的用途,其中所述药学上可接受的载体包括生理盐水。

10.根据权利要求7所述的用途,其中所述RTX以1μg/ml至100μg/ml范围内的浓度存在于所述组合物中。

11.根据权利要求10所述的用途,其中所述RTX以1μg/ml至5μg/ml、5μg/ml至10μg/ml、10μg/ml至20μg/ml、20μg/ml至50μg/ml或50μg/ml至100μg/ml范围内的浓度存在于所述组合物中。

通过施用树脂毒素治疗帕金森病的方法

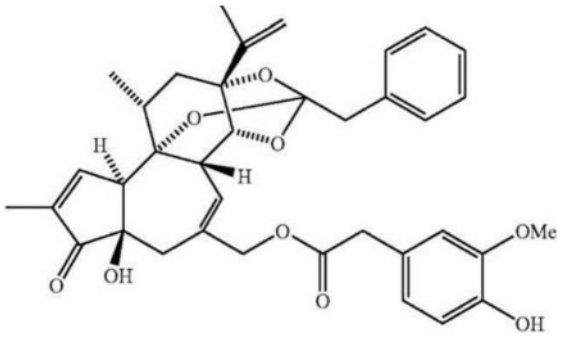
[0001] 本申请要求2018年12月24日提交的美国临时申请第62/784,650号和2019年10月11日提交的美国临时申请第62/914,170号的优先权,其中每一临时申请的内容以全文引用的方式并入本文中。

技术领域

[0002] 本公开提供了一种治疗帕金森病(PD)的方法,其包括通过鞘内或脑池内给药给予有效量的树脂毒素(RTX)。

[0003] 介绍和概述

[0004] RTX充当辣椒素的强效类似物,辣椒素是红辣椒的刺激性主要成分。RTX是一种从大戟属(Euphorbia)的某些物种中分离出来的三环二萜。高香草基是辣椒素的一个重要结构特征,也是将树脂毒素与典型的佛波醇相关化合物区分开来的最突出特征。天然RTX具有以下结构:

[0005] 

[0006] 美国专利第4,939,194号;第5,021,450号和第5,232,684号中描述了RTX和类似化合物,如亭牙毒素和其他化合物(二萜类的20-高香草酯,如12-脱氧佛波醇13-苯乙酸酯20-高香草酸酯和密执毒素20-高香草酸酯)。还鉴定了其他树脂毒素型类佛波类香草素(Szallasi等人(1999)Brit.J.Pharmacol.128:428-434)。

[0007] RTX被称为TrpV1激动剂。TrpV1,即瞬时受体电位阳离子通道亚家族V成员1(也称为类香草素受体1(VR1))是一种多聚体阳离子通道,主要在伤害感受性初级传入神经元中表达(Caterina等人(1997)Nature 389:816-824;Tominaga等人(1998)Neuron 21:531-543)。TrpV1的激活通常通过施加痛热在神经末梢发生,并在某些类型的炎症刺激期间被上调。外周组织中的TrpV1被化学激动剂激活,导致钙通道的开放和痛觉的转导(Szalllasi等人(1999)Mol.Pharmacol.56:581-587)。然而,将某些TrpV1激动剂直接施加于表达TrpV1的神经元的细胞体(神经节)会打开钙通道并触发级联事件,导致程序性细胞死亡(“细胞凋亡”)(Karai等人(2004)J.of Clin.Invest.113:1344-1352)。

[0008] 帕金森病是一种在老龄化人口中发生率越来越高的运动障碍。帕金森病是一种常见的老年致残性疾病,影响美国60岁以上人口的约百分之一。帕金森病的发病率随着年龄的增长而增加,并且个体患该病的累积终生风险为约1/40。症状包括明显的四肢震颤、运动迟缓、身体僵硬和姿势改变。帕金森病的一个可察觉的病理生理学原因是基底神经节中产生多巴胺的细胞的进行性破坏,基底神经节包括黑质的区室部分,是位于脑干的基底核。多

巴胺神经元的丧失导致乙酰胆碱的相对过剩。Jellinger,J.Neural.Transm.56(Supp);1-29:1999。

[0009] 帕金森病是一种进行性病症,其可以从轻微的肢体僵硬和不频繁的震颤开始,并在十年或更长时间内发展为频繁的震颤和记忆障碍,到无法控制的震颤和痴呆。

[0010] 用于治疗帕金森病的药物包括左旋多巴(L-dopa)、司来吉兰(selegiline)、阿朴吗啡(apomorphine)和抗胆碱能药物(anticholinergics)。左旋多巴(左旋二羟基苯丙氨酸)(sinemet)是一种多巴胺前体,可以穿过血脑屏障并在脑中转化为多巴胺。不幸的是,左旋多巴在体内的半衰期很短,而且在长期使用后(即约4-5年后),左旋多巴的作用通常会变得零星和不可预测,导致运动功能的波动、运动障碍和精神方面的副作用。此外,左旋多巴可导致B族维生素缺乏症的出现。

[0011] 司来吉兰(Deprenyl,Eldepryl)已被用作左旋多巴的替代物,并且通过减少脑中多巴胺的分解起作用。不幸的是,司来吉兰在使用约九个月后变得无效。阿朴吗啡是一种多巴胺受体激动剂,已被用于治疗帕金森病,但单独使用时会引起严重的呕吐,以及皮肤反应、感染、嗜睡和一些精神方面的副作用。

[0012] 全身给药的抗胆碱能药物(如苯海索(benzhexol)和邻甲苯海明(orphenedrine))也已用于治疗帕金森病,并通过减少脑中产生的乙酰胆碱的量起作用,从而纠正帕金森病中存在的多巴胺/乙酰胆碱失衡。不幸的是,约70%的服用全身性给予的抗胆碱能药物的患者会出现严重的神经精神副作用,包括幻觉以及运动障碍,还有其他因抗胆碱药物广泛分布而产生的影响,包括视觉影响、吞咽困难、口干和尿潴留。(Playfer,Postgrad.Med.J.,73;257-264:1997和Nadeau,J.Am.Ger.Soc.,45;233-240:1997。

[0013] 在1969年引入左旋多巴之前,立体定向手术是为数不多的帕金森病的治疗之一。单侧立体定向丘脑切开术可有效控制对侧震颤和僵硬,但有偏瘫的风险。双侧丘脑切开术会增加导致言语和吞咽障碍的风险。立体定向苍白球切开术是对苍白球的一部分(基底神经节)进行手术消融,也取得了一些成功。除了手术切除外,在一些病例中,放置在腹侧中间核的高频刺激电极已被发现可以抑制异常运动。存在多种允许探针精确定位的技术,包括计算机断层扫描和磁共振成像。不幸的是,这些外科手术对帕金森病的运动不能、言语和步态障碍症状几乎没有帮助,所有这些手术都会导致破坏性的脑损伤。

[0014] 已对苍白球和豆状核袢进行颅内损伤以治疗震颤和其他帕金森病症状。苍白球切开术的长期结果有时是令人失望的。通过损伤以下丘脑核,已经获得了手术停止震颤的积极结果:(1)腹侧中间核(Vim)或腹外侧后(VLp)核;(2)腹嘴前(Voa)核(Voa和Vop已统称为腹外侧前核(VLa));(3)腹嘴后(Vop)核;(4)丘脑底核(区切开术)和;(5)CM-Pf丘脑核。一般来说,腹外侧丘脑一直是治疗帕金森病和其他全身性给药的耐药性震颤的首选手术目标。皮层的丘脑兴奋对于几乎所有的皮层活动都是必要的。

[0015] 立体定向手术(由神经影像学和电生理记录辅助)已被用于晚期耐药性帕金森病的治疗,靶向过度活跃的苍白球和丘脑底核。在计算机断层扫描或磁共振成像的脑成像辅助下,使用脑图谱作为参考,将电极或探针放入脑中。苍白球(即后腹侧苍白球)、基底神经节、丘脑和丘脑底核的不同部分的损伤已被用于治疗帕金森病的运动障碍。不幸的是,手术脑损伤会对言语、视觉和认知脑区造成损害的风险。除了手术消融或刺激外,外部放射疗法(伽玛刀放射手术)也已在有限的程度上用于治疗耐药性帕金森震颤。这种手术的缺点是,

震颤的减少会在放射外科手术后延迟一周到八个月,而且目前尚不清楚长期益处以及放射副作用。

[0016] 因此,本领域需要一种改进的帕金森病的治疗。

[0017] 本公开提供了一种用于治疗帕金森病(PD)的方法,其包括通过鞘内或脑池内给药来施用有效量的树脂毒素(RTX)。在一些实施例中,成人的RTX剂量为约0.1μg至约100μg。

[0018] 实施方式1是一种用于治疗帕金森病(PD)的方法,其包括向需要治疗PD的受试者鞘内或脑池内施用有效量的树脂毒素(RTX)。

[0019] 实施方式2是一种包含树脂毒素(RTX)的组合物,其用于治疗需要治疗帕金森病(PD)的受试者的方法中。

[0020] 实施方式3是根据实施方式2所述的供使用的组合物,其中所述方法包括向所述受试者鞘内或脑池内施用所述组合物。

[0021] 实施方式4是根据实施方式1所述的方法或根据实施方式2或3所述的供使用的组合物,其中所述受试者是成人。

[0022] 实施方式5是根据前述实施方式中任一项所述的方法或供使用的组合物,其中所述RTX以约0.1μg至约100μg的剂量施用。

[0023] 实施方式6是根据实施方式5所述的方法或供使用的组合物,其中所述剂量为约0.1μg至约1μg、约1μg至约5μg、约5μg至约10μg、约10μg至约20μg、约20μg至约50μg或约50至约100μg。

[0024] 实施方式7是根据前述实施方式中任一项所述的方法或供使用的组合物,其中所述方法包括鞘内给药。

[0025] 实施方式8是根据实施方式1至6中任一项所述的方法或供使用的组合物,其中所述方法包括脑池内给药。

[0026] 实施方式9是根据前述实施方式中任一项所述的方法或供使用的组合物,其中所述RTX以包含所述RTX和药学上可接受的载体的药物制剂的形式施用。

[0027] 实施方式10是根据实施方式9所述的方法或供使用的组合物,其中所述药学上可接受的载体包括水。

[0028] 实施方式11是根据实施方式9所述的方法或供使用的组合物,其中所述药学上可接受的载体包括生理盐水。

[0029] 实施方式12是根据实施方式9至11中任一项所述的方法或供使用的组合物,其中所述RTX以1μg/ml至100μg/ml范围内的浓度存在于所述药物制剂中。

[0030] 实施方式13是根据实施方式12所述的方法或供使用的组合物,其中所述RTX以1μg/ml至5μg/ml、5μg/ml至10μg/ml、10μg/ml至20μg/ml、20μg/ml至50μg/ml或50μg/ml至100μg/ml范围内的浓度存在于所述药物制剂中。

[0031] 附图简要说明

[0032] 图1显示了在AAV-A53T或AAV-Null输注后7天或14天,以0.04μg的低剂量或0.125μg的高剂量单次给予树脂毒素(RTX)对C57Bl/6J雄性小鼠体重(g)的影响。在八周的研究期间,各组之间没有观察到显著差异(双向方差分析)。

[0033] 图2显示了在单侧AAV-A53T或AAV-Null输注后7天或14天,以0.04μg的低剂量或0.125μg的高剂量单次给予树脂毒素对C57Bl/6J雄性小鼠同侧和对侧纹状体中多巴胺水平

(ng/g)的影响。在用媒介物鞘内处理的两个时间点,AAV-A53T输注导致同侧纹状体中多巴胺水平显著降低。***:p<0.0001,AAV1/2-Null媒介物D7与AAV1/2-A53T媒介物(非配对t检验);**:p=0.016,AAV1/2-Null媒介物D14与AAV1/2-A53T媒介物D14(非配对t检验)。

[0034] 图3显示了在单侧AAV-A53T或AAV-Null输注后7天或14天,以低剂量和高剂量单次给予树脂毒素对C57Bl/6J雄性小鼠同侧和对侧纹状体中3,4-二羟基苯乙酸(DOPAC)水平(ng/g)的影响。***:p=0.003,AAV1/2-Null媒介物D7与AAV1/2-A53T媒介物(非配对t检验);*:p<0.05,AAV-Null+媒介物D14与AAV-A53T+媒介物D14(非配对t检验)。

[0035] 图4显示了在单侧AAV-A53T或AAV-Null输注后7天或14天,以低剂量和高剂量单次给予树脂毒素对C57Bl/6J雄性小鼠同侧和对侧纹状体中高香草酸(HVA)水平(ng/g)的影响。***:p=0.0007,AAV1/2-Null媒介物D7与AAV1/2-A53T媒介物(非配对t检验)(非配对t检验)。

[0036] 图5显示了在单侧AAV-A53T或AAV-Null输注后7天或14天,以低剂量和高剂量单次给予树脂毒素对C57Bl/6J雄性小鼠同侧和对侧纹状体中多巴胺周转率的影响。多巴胺周转率定义为代谢物DOPAC和HVA的浓度总和除以多巴胺的浓度。****:p<0.0001,AAV1/2-Null媒介物D7与AAV1/2-A53T媒介物D7(Mann-Whitney U检验);**:p=0.0011,AAV1/2-Null媒介物D14与AAV1/2-A53T媒介物D14(Mann-Whitney U检验)。

[0037] 图6A-6B显示了总体步态分析分数和判别向量。图6A所示的AAV1/2递送后D7和D14给予RTX/媒介物的组的总体步态分数,是基于D7和D14给药组中AAV1/2-A53T媒介物和AAV1/2-Null媒介物之间所有PC分数的差异,使用所有双侧确定的步态变量的差异值。所述分数可以解释为“个体从平均AAV1/2-Null向平均AAV1/2-A53T的方向有多远”。显示了组平均值+/-95% CI。图的左半部和右半部分别显示了在D7和D14给予RTX/媒介物的组的结果。#:p<0.01,AAV1/2-A53T媒介物D7/D14与AAV1/2-Null媒介物D7/D14(非配对t检验);*:p<0.05,AAV1/2-A53T媒介物D7和AAV1/2-A53T RTX 0.04μg D7和AAV1/2-A53T媒介物D7和AAV1/2-A53T RTX 0.125μg D7(非配对t检验)。图6B显示了在AAV1/2递送后D7和D14给予RTX/媒介物的组的判别向量。每个单独的运动学参数的条形长度表示每个变量在判别分数中的权重(图7),条形方向表示与AAV1/2-Null相比参数值的增加或减少(例如,步速降低,或髋关节角度范围不对称,使得左侧小于右侧)。

[0038] 图7显示了使用十个方差最大旋转主成分的D7和D14给药组的步态参数的PC分数。热图示出了对十个主成分中的每一个产生不同影响的原始参数。热图的每一列还显示了参数的相关性:红色=正相关,蓝色=负相关,黑色=无相关。精细运动测试的PC分数PC#1-PC#10显示在左侧(组平均值+/-SEM)。PC分数对应于右侧热图中显示的PC。例如,PC#2可以解释为“对角肢体间协调”,包括ILC对角和支撑对角(对角,即小跑节奏)的增加,以及其他节奏类型的减少。每个面板顶部PC后面括号中的%是指原始数据中由相应PC解释的变化百分比。#p<0.05,AAV-A53T媒介物D14与AAV-Null媒介物D14(非配对t检验);###p<0.001,AAV-A53T媒介物D7与AAV-Null媒介物D7(非配对t检验);*p<0.05,**p<0.005,AAV-A53T媒介物D7与AAV-A53T RTX 0.125μg D7。PC=主成分,ILC=肢体间协调。

[0039] 图8A-8C显示了D7给药组的最大髋关节角度运动学参数上存在左右不对称性。图8A-8B分别显示了左侧和右侧的最大髋关节角度。左右差异显示于图8C中。显示了组平均值+/-SEM。

[0040] 图9A-9B显示了D7给药组的精细运动总体步态分析得分,强调了步态的左右不对称性的单侧变化。图9A显示了使用76个单独运动学参数的变换后的数据集创建的判别向量,其中使用左右差异而不是左右的平均值。图9B显示了D7给药组的步态判别分数。所述分数可以解释为“个体从平均AAV-Null向平均AAV-A53T媒介物的方向有多远”。显示了组平均值+/-SEM。#:p<0.05(AAV-A53T媒介物D7与AAV-Null媒介物D7之间的非配对t检验)。

[0041] 图10A-10F显示了使用步态的左右不对称性对D7给药组进行的精细运动步态分析。以左侧(图10A)、右侧(图10B)和左右差异(图10C)的对角肢体间协调(或小跑)为例,显示了一般的步态模式。左侧(图10D)、右侧(图10E)和左右差异(图10E)显示了身体姿势和平衡指标,即前肢脚趾间隙。显示了组平均值+/-SEM。

[0042] 图11A-11F显示了使用步态的左右不对称性对D7给药组进行的精细运动技能分析。精细运动技能评估了左侧(图11A)、右侧(图11B)的后肢峰值摆动速度,以及左右差异(图11C)。左侧(图11D)、右侧(图11E)的后肢摆动速度指标,以及左右差异(图11F)。显示了组平均值+/-SEM。

具体实施方式

[0043] 定义

[0044] 如本文所用,“鞘内”或“鞘内给药”是指将药物或药物制剂递送至鞘内空间(也称为蛛网膜下腔)的脑脊液中。

[0045] 如本文所用,“脑池内”或“脑池内给药”是指将药物或药物制剂递送至脑室的脑脊液中。

[0046] “治疗”应被广义地理解并涵盖任何有益效果,包括例如至少部分地延迟、减缓或阻止与PD相关的症状的恶化或补救此类症状。治疗还涵盖带来任何形式的患者功能的改善,如下文详细讨论。

[0047] 除非上下文另有要求,否则“或”以包含性意义使用,即等同于“和/或”。

[0048] 术语“约”表示对组合物的活性或稳定性没有任何显著影响的组合物的组分的量的非实质性变化。在一些实施例中,“约”涵盖在规定值的10%、5%、2%、1%或0.5%内的变化。

[0049] 在没有明确排除,例如“不包括端点”的情况下,所有范围应解释为涵盖端点;因此,例如,“在1至10的范围内”包括值1和10以及所有大于1且小于10的整数和(适当时)非整数值。

[0050] 术语“包含(comprise)”、“包含(comprises)”、“包含(comprising)”、“含有(contain)”、“含有(contains)”、“含有(containing)”、“包括(include)”、“包括(includes)”和“包括(including)”并不旨在进行限制。

[0051] 示例性方法和供使用的组合物

[0052] 本文提供了鞘内或脑池内递送RTX治疗帕金森病(PD)的方法和用于治疗帕金森病(PD)的组合物。本文所述的方法适用于RTX有效,例如能够结合和激活TrpV1或其同源物,并且需要治疗PD的任何受试者。在一些实施例中,RTX以0.1-100μg的剂量给予。在一些实施例中,RTX的剂量范围介于0.1-0.5μg、0.5-1μg、1-2μg、2-5μg、5-10μg、10-20μg、20-30μg、30-40μg、40-50μg、50-60μg、60-70μg、70-80μg、80-90μg或90-100μg。

[0053] 制剂中RTX的浓度可以是用于递送预期剂量的任何合适的值。在一些实施例中,药物制剂中RTX的浓度在0.1至300μg/ml的范围内。在一些实施例中,药物制剂中RTX的浓度在0.1-1μg/ml、1-5μg/ml、5-10μg/ml、10-20μg/ml、10-30μg/ml、20-30μg/ml、20-50μg/ml、50-100μg/ml、100-150μg/ml、150-200μg/ml、200-250μg/ml或250-300μg/ml的范围内。在一些实施例中,药物制剂中RTX的浓度在5-50μg/ml或8-25μg/ml的范围内。

[0054] 从浓缩的储备溶液开始,可以通过在适当的稀释剂(如生理盐水)中稀释来制备用于递送至受试者的RTX制剂。

[0055] 在一些实施例中,包含RTX和药学上可接受的载体的药物制剂的pH值在6至7.6的范围内。所述制剂还包含聚山梨醇酯80和右旋糖。在一些实施例中,聚山梨醇酯80的浓度为2-4%w/v,和/或右旋糖的浓度为4-6%w/v。在一些实施例中,聚山梨醇酯80的浓度为3%w/v,和/或右旋糖的浓度为5%w/v。在一些实施例中,在任何前述制剂中,RTX的浓度可以是10-30μg/ml,如10μg/ml或25μg/ml。在一些实施例中,所述制剂还包含磷酸盐缓冲液,例如在表1中关于磷酸盐缓冲液所示的浓度和pH值。在一些实施例中,所述制剂还包含NaCl,例如在表1中关于NaCl所示的浓度。当两者都存在时,磷酸盐缓冲液和NaCl可以(但不一定)以单个制剂所示的浓度和磷酸盐缓冲液pH值的组合存在。

[0056] 表1.示例性RTX溶液制剂

[0057]

制剂编号	制剂组分	组分浓度
1	RTX 聚山梨醇酯 80 右旋糖 30 mM 磷酸盐缓冲液与 0.44% NaCl	200 μg/mL 7.0% w/v 0.8% w/v 30 mM, pH 7.2
2	RTX 聚乙二醇 300 聚山梨醇酯 80 右旋糖 10 mM 磷酸盐缓冲液与 0.73% NaCl	200 μg/mL 3.0% v/v 0.1% w/v 0.8% w/v 10 mM, pH 6.5
3	RTX 聚乙二醇 300 聚山梨醇酯 80 10 mM 磷酸盐缓冲液与 0.86% NaCl	200 μg/mL 30.0% v/v 1.0% w/v 10 mM, pH 6.5
4	RTX 聚乙二醇 300 聚山梨醇酯 80 10 mM 磷酸盐缓冲液与 0.88% NaCl	200 μg/mL 30.0% v/v 0.04% w/v 10 mM, pH 6.5

[0058]

5	RTX 聚山梨醇酯 80 右旋糖 30 mM 磷酸盐缓冲液与 0.54% NaCl	200 μg/mL 3.0% w/v 0.8% w/v 30 mM, pH 7.2
6	RTX 聚山梨醇酯 80 甘露醇 30 mM 磷酸盐缓冲液与 0.54% NaCl	200 μg/mL 3.0% w/v 0.8% w/v 30 mM, pH 7.2
7	RTX 聚山梨醇酯 80 甘露醇 30 mM 磷酸盐缓冲液与 0.45% NaCl	200 μg/mL 7.0% w/v 0.8% w/v 30 mM, pH 7.2
8	RTX 聚乙二醇 300 聚山梨醇酯 80 甘露醇 10 mM 磷酸盐缓冲液与 0.74% NaCl	200 μg/mL 3.0% v/v 0.1% w/v 0.8% w/v 10 mM, pH 6.5
9	RTX 聚乙二醇 300 聚山梨醇酯 80 右旋糖 10 mM 磷酸盐缓冲液与 0.34% NaCl	200 μg/mL 3.0% v/v 0.1% w/v 3.0% w/v 10 mM, pH 6.5
10	RTX 聚乙二醇 300 聚山梨醇酯 80 甘露醇 10 mM 磷酸盐缓冲液与 0.36% NaCl	200 μg/mL 3.0% v/v 0.1% w/v 3.0% w/v 10 mM, pH 6.5
11	RTX 聚山梨醇酯 80 右旋糖 30 mM 磷酸盐缓冲液与 0.54% NaCl	200 μg/mL 0.03% w/v 0.05% w/v 30 mM, pH 7.2

[0059] 可鞘内或脑池内施用用于治疗PD的RTX。对于鞘内给药,当PD治疗的重点是手部的运动协调时(手部运动协调是PD患者经常遇到的问题),鞘内给药应集中在脊柱的颈椎或胸椎区域。对于PD治疗的全身方法,脑池内给药是优选的。或者,RTX可以在C1-C5的脊柱顶部进行鞘内给药。

[0060] 重要的是,本公开范围内的方法可以提供患者功能的改善。“患者功能的改善”可以定义为通过任何一种或多种因素测量的改善,如疼痛减轻、卧床时间减少、步行增加、更健康的态度、更多样化的生活方式和/或正常肌肉张力允许的愈合。患者功能的改善与生活质量(QOL)的改善是同义的。QOL可以使用例如已知的SF-12或SF-36健康调查评分程序来评估。SF-36在身体功能、由于身体问题造成的角色限制、社会功能、身体疼痛、一般心理健康、由于情感问题造成的角色限制、活力和一般健康认知的八个领域中评估患者的身心健康。获得的分数可以与各种普通群体和患者群体的现有公布值进行比较。

[0061] 实施例1.单次鞘内施用RTX对AAV-A53T小鼠帕金森病样(PD)病理模型的影响

[0062] 使用关于帕金森病(PD)的体内小鼠研究,首先在8周龄的C57B1/6J雄性小鼠中通过单侧腺病毒载体(AAV)输注至脑右半球的黑质(SN)来诱导疾病状态。所述载体含有被配置为过量表达突变的人类A53T-α-突触核蛋白的构建体,这导致了黑质多巴胺能神经元的

退化和纹状体中多巴胺水平的降低。这已被证明会导致PD样症状,包括运动缺陷。

[0063] 在研究开始时,总共有142只2月龄的C57B1/6J小鼠(126只雄性和16只雌性)被圈养在标准温度(22±1℃)和控光环境中(从早上7点到晚上8点开灯),可随意获取食物和水。

[0064] 本研究的目的是研究单次鞘内给予RTX对AAV-A53T小鼠PD样病理模型的影响。在本研究开始之前,进行了一项试验性的耐受性研究,其中16只雄性和16只雌性C57B1/6J小鼠以两种剂量(0.04μg或0.125μg)输注RTX,此后随访24小时以观察该治疗的任何可能的不良反应。

[0065] 在试验性研究组使用的总共32只小鼠中,共有4只小鼠在鞘内输注RTX后的24小时监测期内死亡。两只用0.125μg剂量处理的雌性小鼠在输注后4-24小时内被发现死在笼子里,原因不明。此外,来自同一给药组的一只雌性和一只雄性小鼠在输注RTX后立即死亡。在其余的小鼠中没有观察到显著的不良反应。

[0066] 对于这项研究,共有110只两月龄的雄性C57B1/6J小鼠分别被单侧输注AAV-A53T(90只小鼠)或AAV-Null(20只小鼠)至黑质中,以诱导PD样病理或充当假对照。使用输注AAV-Null(空)载体的小鼠(“假输注”小鼠),以便对照病毒输注的效果。在AAV-A53T介导的疾病模型诱导7或14天后,通过在腰脊髓区进行单次鞘内注射,用RTX(0.04μg或0.125μg)(5μL体积,由25μg/ml RTX溶液制备,含有0.03%w/v聚山梨醇酯80、0.05%w/v右旋糖、30mM磷酸盐缓冲液和0.54%w/v NaCl,pH7.2,并根据需要用生理盐水稀释)处理小鼠。每个时间点的一个AAV-Null和AAV-A53T输注组用媒介物代替RTX进行处理。

[0067] 然后在AAV输注后7天或14天,通过鞘内输注用RTX或媒介物处理小鼠。将小鼠分配至如下处理组:

[0068] 第1组:10只雄性小鼠假输注AAV-null,并在D7给予媒介物。

[0069] 第2组:15只雄性小鼠输注AAV-A53T,并在D7给予媒介物。

[0070] 第3组:15只雄性小鼠输注AAV-A53T,并在D7给予0.04μg RTX。

[0071] 第4组:15只雄性小鼠输注AAV-A53T,并在D7给予0.125μg RTX。

[0072] 第5组:10只雄性小鼠假输注AAV-null,并在D14给予媒介物。

[0073] 第6组:15只雄性小鼠输注AAV-A53T,并在D14给予媒介物。

[0074] 第7组:15只雄性小鼠输注AAV-A53T,并在D14给予0.04μg RTX。

[0075] 第8组:15只雄性小鼠输注AAV-A53T,并在D14给予0.125μg RTX。

[0076] 每周对动物的体重进行两次监测。在AAV输注后7周进行精细运动学分析。在AAV输注后8周,将小鼠安乐死并进行组织样本采集。通过高效液相色谱法(HPLC)分析同侧和对侧纹状体的多巴胺及其代谢物。

[0077] 所有外科手术均在无菌条件下进行,并且在适用时使用无菌材料、溶液和设备。在生物安全2级(BSL-2)层流罩(BioWizard Golden line 130,Kojair)中进行病毒材料的处理和立体定向输注,并在BSL-1状态设施中进行研究相关行为测试。根据BSL-2级安全规定(理事会指令90/679/EEC)和设施,在AAV载体输注后至多1周内对小鼠进行手术程序和饲养。

[0078] 首先,用5%异氟烷(在70% N_2O和30% O_2中,流量为300ml/min)对小鼠进行麻醉,并将其置于立体定向框架中。在手术过程中,麻醉剂的浓度被降低至1-1.5%。用恒温毯系统将直肠温度维持在37.0±1.0℃。皮肤通过内侧切口打开,并向外侧缩回。右脑半球通过

小颅骨切除术暴露于颅骨。用细镊子小心地取出硬脑膜,然后用AAV-Null Empty(5.1x1012vg/mL)或AAV-A53T(5.1x1012vg/mL)进行立体定向注射,方法如下:将钝的注射针头(30G)与安装在数字引导输注装置(Digital Lab Standard™,Harvard Apparatus)和泵(Pump 11,Elite Nanomite,Harvard Apparatus)上的10μL Hamilton微量注射器相连,降低至黑质水平。AAV材料在以下坐标(相对于前囟)单侧输注至黑质中:AP=3.0mm后部;ML=1.3mm;DV=4.2mm到颅骨表面。以0.4μL/min的速度输注总共2μL载体。在输注后,将插管再留在原位5分钟后拔出。此后将皮肤闭合并消毒。然后使小鼠从麻醉中恢复,并仔细监测可能的手术后并发症。初步恢复后,将动物放回饲养笼中,可随意获取食物和水。

[0079] 在AAV-A53T或AAV-Null输注后7天或14天,小鼠鞘内给予RTX或媒介物。首先,使用2-5%异氟醚对小鼠进行麻醉,并将其置于手术平台上的俯卧位。在剃除皮肤的目标区域后,将赛罗卡因凝胶(2%利多卡因)引入该区域。5分钟后,去除凝胶,用碘溶液擦洗,作为皮肤切口的消毒准备。

[0080] 椎板切除术在腰椎(L5)水平进行,暴露脊髓而不破坏硬脑膜。将连接到安装在微输注系统(Harvard Apparatus)上的10μL Hamilton注射器的插管插入蛛网膜下腔,并推进到L5-L6水平,通过小心地降低至硬脑膜下10至15mm,使针头的开口位于所需位置。用组织密封胶(Tisseel® Duo Quick,Baxter)密封针头和硬脑膜开口之间的接合处,并开始输注。以0.5μL/min的速率注射5μL配制的树脂毒素,然后在5分钟的稳定期后将插管从鞘内空间抽出。抽出后,立即施加另一层薄薄的组织密封胶,以关闭硬脑膜的开口,避免渗漏。此后,肌肉和皮肤层层闭合并进行消毒。使小鼠在恒温笼中恢复,然后将它们放回饲养笼中。

[0081] 在AAV和鞘内输注手术前,给予小鼠丁丙诺啡(Temgesic®,0.06mg/kg,2mL/kg)。在接下来的48小时内每天两次给予额外剂量的丁丙诺啡,总共给予五次。还监测所有小鼠的脱水情况,并在手术后和另外根据需要给予0.9%无菌生理盐水(i.p.)。

[0082] 在整个研究期间,每周测量两次小鼠的体重(在周一和周五)。

[0083] 在AAV-A53T输注后8周,小鼠被腹膜内注射戊巴比妥(Mebunat®,Orion Pharma)进行终末麻醉。然后通过心脏末梢穿刺收集约500μL血液,并转移到预冷的K_2-EDTA管中。此后立即通过离心(2000g,10分钟+4℃)分离血浆。此后,在2.0mL聚丙烯管中收集150μL血浆并在干冰上冷冻。血浆样本储存在-80℃,直到用干冰运送到Sorrento Therapeutics,Inc.。采血后,小鼠经心脏灌注肝素化(2.5IU/mL)生理盐水,以去除脑部血液。灌注后立即在冰上解剖脑。

[0084] 将同侧纹状体和对侧纹状体收集在1.5mL Eppendorf管中,在干冰上快速冷冻(即左右分开),称重并储存在-80℃,以用于多巴胺及其代谢物的HPLC分析。

[0085] 小鼠纹状体组织样本中的多巴胺(DA)、3,4-二羟基苯乙酸(DOPAC)和高香草酸(HVA)浓度通过具有电化学检测的高效液相色谱(HPLC)方法测定。在冰上解冻后,将组织样本在0.1M高氯酸中用MSE Soniprep 150超声破碎机(MSE Scientific Instruments,Crawley,UK)均质化(1:10,w/v)。组织匀浆在4℃下以15000g离心15分钟。上清液通过聚丙烯膜(GHP Acrodisc 13 0.45μm,Pall Corporation,Ann Arbor,MI,USA)过滤,并用0.1M高氯酸稀释(1:1)。将样本转移到塑料小瓶中并立即进行分析。

[0086] ESA HPLC系统(ESA Inc.,Chelmsford,MA,USA)由582溶剂递送系统、DG-1210真空脱气机、542自动进样器、880恒温室、配备双通道5014B微透析池的八通道CoulArray®5600

电化学阵列检测器和CoulArray®for Windows数据采集模块(1.00版本)组成。施加的电位是-175mV(通道1)、+225mV(通道2)、+350mV(通道3)和+450mV(通道4)。在通道2检测DA和DOPAC,在通道3检测HVA。注射体积为10μl。

[0087] 分析物在具有等度运行的Zorbax SB-Aq前置柱(2.1×12.5mm,5μm)的Zorbax SB-Aq反相柱(2.1×100mm,3.5μm,Agilent Technologies Inc.,Little Falls,Wilmington,DE,USA)上分离。将柱维持在35℃下。流动相是100mM磷酸二氢钠,其含有4.75mM柠檬酸一水合物、7mM 1-辛磺酸和50mM EDTA二钠-乙腈混合物(98:2,v/v)。用正磷酸将流动相的pH值调至2.2。流动速率为0.3mL/min。DA、DOPAC和HVA的水平表示为nmol/g湿组织。

[0088] 使用行走模式在输注后7周(MotoRater,TSE Systems,Homburg,Germany)评估小鼠的精细运动技能。在测试当天,在小鼠身体的适当部位,例如四肢关节和尾巴部分做了标记,以简化数据分析过程。使用高速摄像机(300帧/秒)从三个不同的维度,从下方和两侧捕捉运动数据。使用定制的自动分析系统对不同的步态模式和运动进行了分析。分析的参数包括:1)一般步态模式参数(步幅时间和速度、步长、步幅中的站立和摆动时间、肢体间协调),2)身体姿势和平衡(脚趾间隙、髂嵴和髋关节高度、后肢的伸出和缩回、尾部位置和运动),以及3)精细运动技能(步幅中的摆动速度、摆动阶段的挺度指标、不同关节的角度范围和偏差、垂直和水平头部运动)。

[0089] 步态参数总是具有几个(和复杂的)相互关系。例如,较短的步幅和较长的步长会导致更高的速度。可以使用主成分分析(PCA)识别以高度相关参数的集合体现的不同“步态特征”。主成分分析是一种统计工具,用于压缩多变量数据集中的信息,揭示原始变量之间的相关性,并最终创建一小组新的、敏感的不相关参数,即主成分(PC)。

[0090] PCA是基于主成分系数和特征向量的线性变换。变换后的、新的、不相关的变量称为PC分数。第一主成分(PC)对应于这种具有最大可能方差的数据的线性组合。当丢弃第一PC的比例时,第二PC又具有剩余的最大可能方差,其余PC依此类推。特征向量还揭示了关于数据内部结构的信息,即彼此相关的参数。每个PC得分代表了在相应PC中强调的所有参数的组合信息。使用的PC数量是用Kaiser标准(特征值>1.0)确定的。

[0091] 使用特征向量旋转技术简化了PC结果的解释。旋转是一种程序,其中特征向量被操纵以实现简单的结构,或每个特征向量的明显非零元素的数量被优化到合理的尽可能低。在这项研究中,我们使用了保持正交性的方差最大旋转程序。

[0092] 最后,确定了基于PCA的总体步态分析分数。所述分数是基于AAV-null媒介物和AAV-A53T媒介物组在所有PC分数(步态总分)或表现出大效应大小的那些PC(步态判别分数)中的差异。因此,该分数的目的是识别疾病模型特定的原始变量组合-“指纹”-它以最佳可能的方式表征疾病模型并区分两组。在确定“指纹”或判别方向向量后,可以通过将每只小鼠的(归一化)参数数据投影到判别方向向量上来获得总体步态分析分数。最终,可以高度敏感的方式观察药理学药剂的总体运动学效应。

[0093] 实验室人员每日监测动物。如果动物的一般健康状况明显恶化,就用过量的CO_2处死,并将其斩首。可接受的终点的定义包括:在24小时观察期内无自发运动和不能喝水或进食、大量出血、自发性炎症、解剖结构缺失、肿胀或肿瘤大于20毫米,以及在30秒内不能直立。

[0094] 在研究过程中,第1、2、3、4、5和8组都有一只小鼠死亡。第3、4和8组的小鼠在麻醉

下输注期间或输注后立即死亡。第1、2和5组的小鼠在鞘内给药后一天因符合终点标准而被安乐死。

[0095] 在AAV-A53T或AAV-Null输注后7天或14天,单次给予0.04μg或0.125μg RTX对C57Bl/6J雄性小鼠体重的影响呈现于图1中。在8周的研究期间,各组之间没有观察到显著差异(双向方差分析)。

[0096] 在单侧AAV-A53T或AAV-Null输注后7天或14天,以两种剂量单次给予树脂毒素对C57Bl/6J雄性小鼠同侧和对侧纹状体中多巴胺及其代谢物水平的影响呈现于图2-5中。用HPLC进行分析。为了进行统计分析,首先将AAV-Null输注组与用媒介物鞘内处理的AAV-A53T组进行比较,以观察仅A53Tα-突触核苷酸转基因插入的效果。此后,将AAV-A53T媒介物组与用0.04μg或0.125μg的树脂毒素处理的AAV-A53T组进行比较,以观察树脂毒素可能的治疗效果。第7天和第14天组分别进行分析。

[0097] 在单侧AAV-A53T或AAV-Null输注后7天或14天,以两种剂量单次给予RTX对C57Bl/6J雄性小鼠同侧和对侧纹状体中多巴胺(DA)水平的影响呈现于图2中。在用媒介物鞘内处理的两个时间点,AAV-A53T输注导致同侧纹状体中多巴胺水平显著降低。在AAV-A53T输注后7天,用高剂量的树脂毒素处理的小鼠的多巴胺水平有略微升高的趋势。然而,这种差异在统计学上并不显著(单向方差分析)。相反,在第14天用树脂毒素处理的组中观察到轻微相反且不显著的多巴胺水平降低的趋势。

[0098] 在单侧AAV-A53T或AAV-Null输注后7天或14天,以两种剂量单次给予RTX对C57Bl/6J雄性小鼠同侧和对侧纹状体中3,4-二羟基苯乙酸(DOPAC)水平的影响呈现于图3中。在用媒介物鞘内处理的两个时间点,AAV-A53T输注导致同侧纹状体中DOPAC水平显著降低。在AAV-A53T输注后7天,用高剂量的树脂毒素处理的小鼠的DOPAC水平有略微升高的趋势。然而,这种差异在统计学上并不显著(单向方差分析)。在第14天用树脂毒素处理的组中观察到轻微相反且不显著的多巴胺水平降低的趋势。

[0099] 在单侧AAV-A53T或AAV-Null输注后7天或14天,以两种剂量单次给予RTX对C57Bl/6J雄性小鼠同侧和对侧纹状体中高香草酸(HVA)水平的影响呈现于图4中。在用媒介物鞘内处理的两个时间点,AAV-A53T输注导致同侧纹状体中HVA水平显著降低。在AAV-A53T输注后7天,用高剂量的树脂毒素处理的小鼠有浓度略微升高的趋势。然而,这种差异在统计学上并不显著(单向方差分析)。在第14天用树脂毒素处理的组中观察到轻微相反且不显著的HVA水平降低的趋势。

[0100] 在单侧AAV-A53T或AAV-Null输注后7天或14天,以两种剂量单次给予RTX对C57Bl/6J雄性小鼠同侧和对侧纹状体中多巴胺周转率的影响显示于图5中。多巴胺周转率定义为代谢物DOPAC和HVA的浓度总和除以多巴胺的浓度。在用媒介物鞘内处理的两个时间点,AAV-A53T输注导致同侧纹状体中的多巴胺周转率显著增加。在AAV-A53T输注后7天和14天,用两种剂量的树脂毒素处理的小鼠有周转率甚至更高的微弱趋势。然而,这些处理效果在统计学上并不显著(Kruskal-Wallis检验)。

[0101] 为了检查单侧AAV1/2-A53T-aSyn注射是否导致运动障碍,在AAV1/2输注后7周,使用运动学步态分析来测量精细运动技能和步态缺陷。

[0102] 首先,评估每个分析步态周期的95个步态参数。如果可能的话,最初分别确定左右两侧的参数值。相对于AAV1/2-Null对照组,最明显的AAV1/2-A53T诱导的步态差异(p<

0.05,非配对t检验,假设方差不等)与肢体间协调和整体速度下降有关:后肢(D7和D14)和前肢(D14)的站立时间增加,同侧步态(步伐)增加(D7和D14),对角步态(小跑)减少(D7和D14,见于支撑对角参数),特别是后肢的双支撑和占空比增加(D7和D14),以及三肢支撑时间增加(D7)。此外,在描述精细运动功能的参数中也观察到显著变化,如:后肢脚趾间隙减少(D7),髋关节角度运动范围偏差增加(D7),头部运动增加(D14),前肢脚趾抬起角度减少(D7),以及后肢运动轨迹高度曲线减少(D14)。

[0103] 建立总体步态分析分数以评估与AAV1/2-Null对照组相比,经媒介物处理的AAV1/2-A53T小鼠中AAV1/2-A53T诱导的步态缺陷,重点是左右不对称性。总体步态分数由使用PCA构建的判别向量并通过利用两组的PC分数差异(从D7和D14媒介物处理组汇集)确定。PCA中使用的数据集由76个选定的参数组成;所有双侧确定的参数都表示为左右两侧之间的差异。将所有参数归一化为标准分数。判别向量条形图(图6B)示出了最能表征和捕捉AAV1/2-A53T诱导的步态变化的变量组合,其可以解释如下:总体速度(步幅时间、距离和速度)较慢,双支撑阶段增加,特别是在后肢。另外,对角支撑的比例减少,支撑三和四(3或4肢同时接触地面)增加。最明显的左右不对称出现在髋关节角度(最大和范围)、前肢脚趾间隙、后肢回缩和后肢摆动速度。

[0104] 将所有这些在判别向量中被强调的步态变量精简在一起,总体步态分析分数显示D7和D14媒介物处理组的高度显著的AAV1/2-A53T-aSyn诱导的表型(非配对t检验,AAV-Null与AAV-A53T媒介物;$p<0.0001$(D7),$p<0.01$(D14))。

[0105] 早期RTX处理(D7)对AAV1/2-A53T诱导的运动缺陷的影响分析显示,RTX剂量依赖性的运动功能恢复,表现为总体步态分析分数向AAV1/2-Null组转移。与AAV1/2-A53T媒介物处理的对照组相比,低剂量和高剂量RTX处理后总体步态分数的恢复显著改善(单向方差分析,$p=0.0013$,然后进行Dunnett检验:$p=0.0063$(RTX 0.04μg),$p=0.0011$(RTX 0.125μg)),表明处理效果良好(图6A)。D14组的处理效果无统计学意义($p>0.05$;单向方差分析)。然而,当与AAV1/2-A53T媒介物小鼠相比时,在两个RTX处理组中都存在AAV1/2-Null组的趋势。

[0106] 接下来,我们检查了通过RTX处理显著恢复的各别步态参数($p<0.05$,非配对t检验),这些参数说明了总体分数的差异。我们观察到与AAV-A53T媒介物组相比,RTX处理组的以下变化:步幅时间和后肢站立时间(D7高剂量)、对角步态(D7两种剂量)和支撑对角(D7高剂量)、支撑三(D7高剂量)、同侧和同源步态(D7高剂量)、髋关节ROM(D7两种剂量、D14高剂量)和髋关节ROM偏差(D7,高剂量)、最小膝关节角度(D7高剂量)、头部旋转(D14,两种剂量)以及单双支撑(D7高剂量)。与总体步态分数类似,这些观察到的RTX诱导的单一步态参数的差异与AAV-Null“健康”对照组的方向一致。重要的是,观察到的RTX在改善这些参数方面的功效与最初受AAV1/2-A53T递送影响的参数基本相同,这表明动物的功能运动恢复。

[0107] D14 AAV-Null组的四只小鼠被排除在步态分析之外,因为它们的步态表现表明由于鞘内手术操作导致了脊髓损伤。此外,D14 AAV-A53T媒介物组的两只动物也被排除在外。这两只动物都没有步态障碍的迹象,另一只被证实可能是AAV1/2-A53T转导不成功,如同侧纹状体多巴胺浓度处于健康动物的水平所指示。

[0108] 使用十个方差最大旋转主成分对D7和D14给药组的步态参数进行的PCA显示于图7中。热图(显示在右侧)示出了对十个主成分中的每一个产生不同影响的原始参数。热图的

每一列还显示了参数的相关性:白色＝正相关,灰色＝负相关,黑色＝无相关。精细运动测试的PC分数PC#1-PC#10显示在左侧(组平均值+/-SEM)。PC分数对应于右侧热图中显示的PC。例如,PC#2可以解释为“对角肢体间协调”,包括ILC对角和支撑对角(对角,即小跑节奏)的增加,以及其他节奏类型的减少。每个面板顶部PC后面括号中的%是指原始数据中由相应PC解释的变化百分比。#p<0.05,AAV-A53T媒介物D14与AAV-Null媒介物D14(非配对t检验);###p<0.001,AAV-A53T媒介物D7与AAV-Null媒介物D7(非配对t检验);*p<0.05,**p<0.005,AAV-A53T媒介物D7与AAV-A53T RTX 0.125μg D7。PC＝主成分,ILC＝肢体间协调。

[0109] 讨论.在本研究中,首先在8周龄的C57B1/6J雄性小鼠中通过单侧腺病毒载体(AAV)输注至脑右半球的黑质(SN)来诱导帕金森病样状态。输注载体旨在过度表达突变的人类A53T-α-突触核蛋白,导致黑质多巴胺能神经元的退化和纹状体中多巴胺水平的降低。这已被证明会导致帕金森病样症状,包括运动缺陷。为了对照病毒输注本身的影响,使用了输注AAV-Null(空)载体的小鼠对照组。在AAV-A53T介导的疾病模型诱导7天或14天后,通过在腰椎脊髓区域单次鞘内输注,用媒介物或树脂毒素(RTX,0.04μg或0.125μg)处理小鼠。在第7天或第14天,用媒介物处理经AAV-Null处理的健康对照小鼠。

[0110] 研究显示,低剂量或高剂量的鞘内RTX给药均无显著不良反应。研究中的死亡(110只小鼠中的6只死亡)在各组之间均匀分布,包括2只用媒介物处理的小鼠。此外,这些小鼠中有3只在给药期间或之后的麻醉中死亡。其余的死亡是在鞘内输注后24小时内观察到。对小鼠的监测显示,这些小鼠没有从手术中正常恢复,表现为昏睡和被动行为。因为死亡在媒介物组和RTX低剂量组和高剂量组之间均匀分布,这可能是由侵入性外科手术和麻醉并发症引起的。在其余的小鼠中没有观察到不良反应。此外,在研究期间,媒介物组和RTX处理组中同样观察到稳定的体重增加。

[0111] 在AAV输注后7周和用RTX处理后6或5周进行精细运动技能的分析。观察到AAV-A53T介导的疾病状态在AAV-Null组和各自的AAV-A53T媒介物组之间有非常显著的差异。将AAV-A53T媒介物组与树脂毒素处理组进行比较,发现在早期(D7)处理组中,RTX在低剂量和高剂量下都有显著的处理效果,因为RTX处理组向AAV-Null(“健康”)组转移。在AAV-A53T输注后14天用RTX处理的组中,也有类似的但在统计学上不显著的向各自AAV-Null组转移的趋势。当通过主成分分析分离出个别参数时,这些步态拯救效应在与肢体间协调有关的参数和表明试图补偿不对称变化(表现为例如增加髋关节角度范围)的参数中最为强烈。此外,AAV-A53T媒介物处理的小鼠的步态周期有显著更多的“抽搐运动”,表明人类PD的典型步态不太平稳。在单侧输注AAV-A53T的小鼠中,步态的不对称变化是可以预期的。

[0112] 与在用突变的A53T-α-突触核蛋白的病毒载体处理的同侧的多巴胺和代谢物水平显著较低的AAV-A53T输注小鼠相反,AAV-Null组在同侧和对侧纹状体中的多巴胺、DOPAC和HVA水平相似。这些结果表明,在D7和D14组中均成功诱导疾病模型。然而,在比较用媒介物给药的AAV-A53T组和用RTX处理的相应组之间的多巴胺及其代谢物水平时,没有显示出RTX处理的显著效果。这表明,步态障碍的显著缓解是通过与黑质纹状体多巴胺能通路不直接相关的机制来实现的。已知神经炎症在PD中发挥重要作用,它的减弱可能是对观察到的RTX有益作用的一种可能解释。

[0113] 总之,在AAV输注后7周分析运动技能时,在AAV-A53T模型诱导后7天鞘内给予RTX对C57B1/6J雄性小鼠具有显著的拯救作用。在AAV-A53T输注后14天用RTX处理的组中也观

察到类似的统计学上不显著的趋势性效果。然而,模型诱导后8周从纹状体分析的多巴胺和代谢物水平没有显示出显著的处理效果,表明作用机制与黑质纹状体多巴胺能通路没有直接关系。未观察到RTX处理的显著不良反应。

[0114] 实施例2.对造成左右不对称的步态的分析

[0115] 对上述研究中的D7精细运动步态分析数据进行了重新评估,以确定左右不对称是如何体现在运动学参数上的,而不是评估发生在双侧并在“正常”总体步态分数中捕捉的变化。

[0116] 通常,评估动物的左侧和右侧的测试参数,总分和判别向量是基于特定参数的左侧和右侧值的平均值。例如,最大髋关节角度是由左侧和右侧角度的平均值决定的,它在AAV-Null媒介物组和AAV-A53T媒介物组中是相似的。然而,如图8A-8C所示,当分别分析左侧和右侧最大髋关节角度的测量值时,与AAV-Null小鼠相比,AAV-A53T媒介物处理的小鼠左侧(图8A)的髋关节角度最大值比右侧(图8B)小。图8C显示AAV-A53T媒介物处理的小鼠髋关节角度的最大左右差异最大。当与AAV-A53T和媒介物处理的小鼠相比时,用AAV-A53T和0.05μg RTX处理的小鼠(n=14)和用AAV-A53T和0.124μg RTX处理的小鼠(n=14)显示最大差异有所减小。

[0117] 精细运动步态分析是通过使用变换后的数据集创建判别向量来进行的,其中使用左右差异而不是左右的平均值。如图9A所示,条形长度对应于与AAV-Null组相比,在AAV-A53T媒介物组中明显的参数的左右不对称性。显示在第7天给药的组的用于PCA分析的个别步态参数。在图9B中,左右步态差异判别分数显示AAV-A53T媒介物组中的显著表型。与AAV-A53T媒介物组相比,用RTX处理的两组都显示出显著较低的判别向量分数($p<0.05$,非配对t检验)。

[0118] 还分析了其他步态参数的左右不对称性,如肢体间协调、髋关节功能、摆动速度和前肢间隙。图10A-10C显示了在对角肢体间协调上体现的左右不对称性。图10A和10B分别显示了左侧和右侧的对角肢体间协调百分比的图。AAV-A53T媒介物组的左侧对角肢体间协调低于右侧。左右差异显示在图10C中,并揭示了RTX的处理效果,因为低和高RTX剂量组的小鼠表现出的对角肢体间协调差异较小,在AAV-A53T媒介物处理小鼠的范围内。图10D-10F中显示了前肢脚趾间隙参数,这是身体姿势和平衡的一个方面。左侧、右侧和左右差异分别显示在图10D、10E和10F中。AAV-A53T媒介物小鼠显示左侧的脚趾间隙(图10D)比右侧(图10E)大。左右差异图(图10F)显示,两组RTX处理的小鼠的脚趾间隙与AAV-Null媒介物小鼠相似,与AAV-A53T媒介物组不同。

[0119] 通过检查后肢峰值摆动速度和摆动速度指标的左右不对称性来进一步评估精细运动技能,如图11A-11F所示。图11A和11B分别显示了左侧和右侧的后肢峰值摆动速度(cm/s)的图。如图11C所示,与AAV-A53T媒介物D7组相比,两个RTX处理组的峰值摆动速度左右差异都有所减小。图11D和11E分别显示了左侧和右侧的后肢摆动速度(cm/s)的图。如图11E所示,与AAV-A53T媒介物D7组相比,两个RTX处理组的左右差异都有所减小。

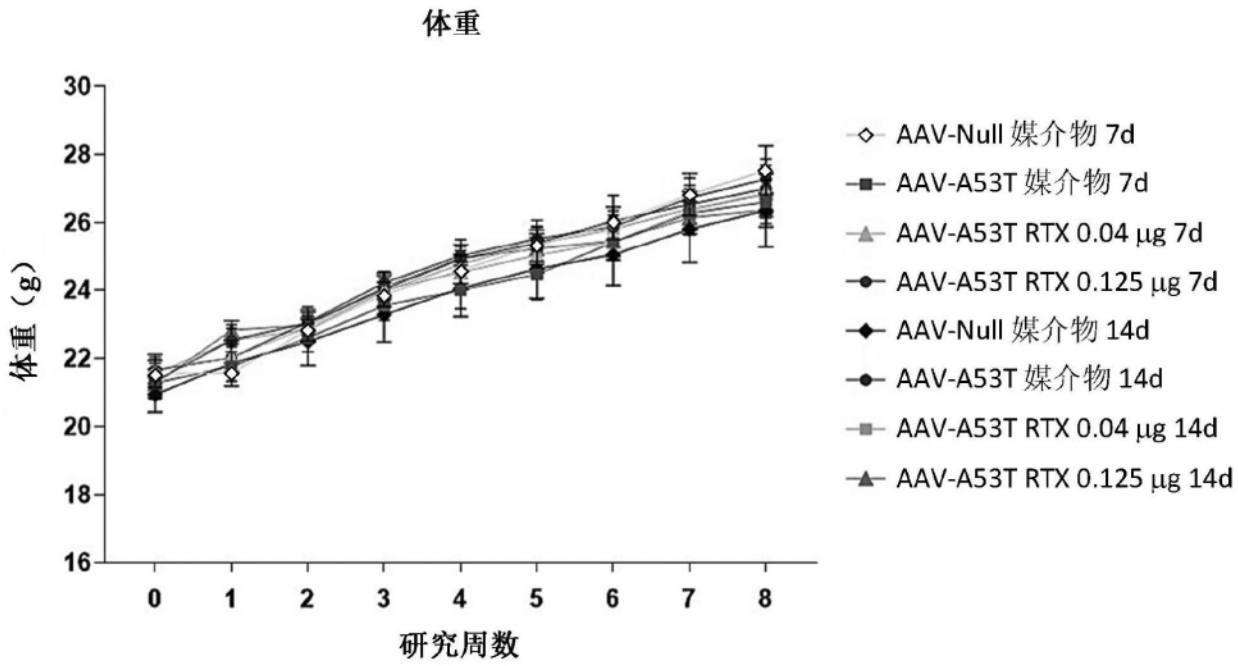

体重
体重（g）
研究周数
AAV-Null 媒介物 7d
AAV-A53T 媒介物 7d
AAV-A53T RTX 0.04 μg 7d
AAV-A53T RTX 0.125 μg 7d
AAV-Null 媒介物 14d
AAV-A53T 媒介物 14d
AAV-A53T RTX 0.04 μg 14d
AAV-A53T RTX 0.125 μg 14d

图1

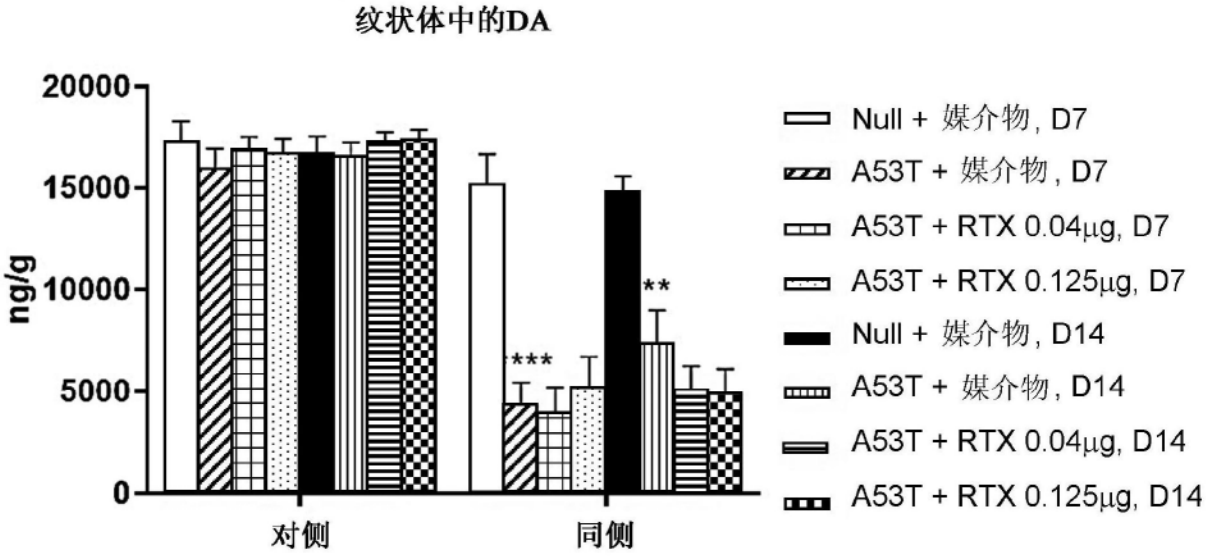

纹状体中的DA
ng/g
对侧
同侧
***
**
Null + 媒介物, D7
A53T + 媒介物, D7
A53T + RTX 0.04μg, D7
A53T + RTX 0.125μg, D7
Null + 媒介物, D14
A53T + 媒介物, D14
A53T + RTX 0.04μg, D14
A53T + RTX 0.125μg, D14

图2

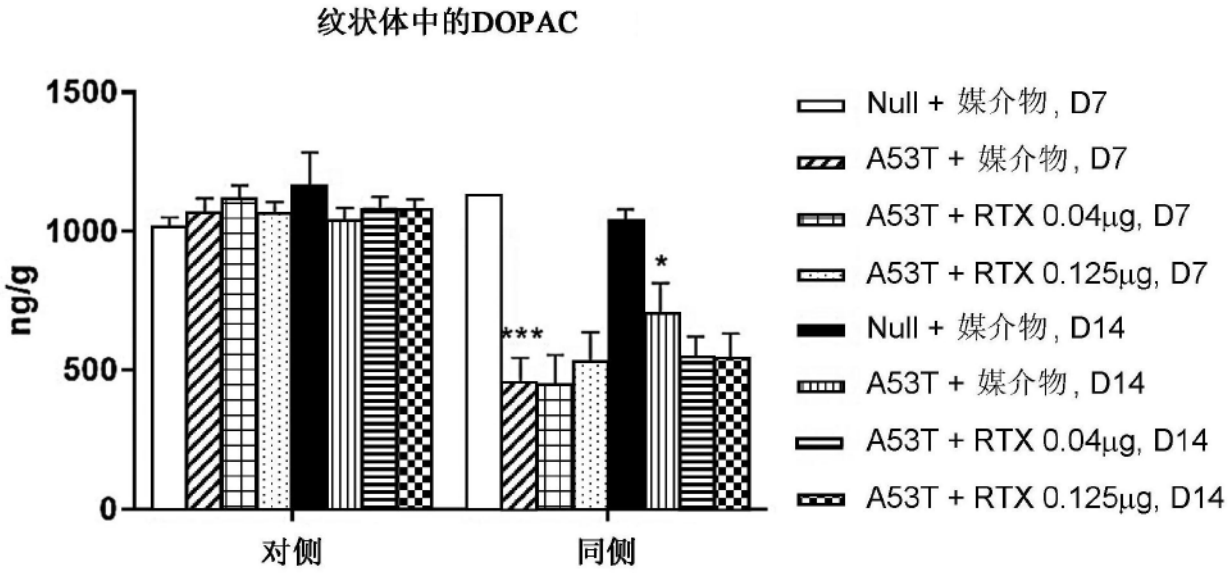

纹状体中的DOPAC
1500
1000
500
0
ng/g
***
*
对侧
同侧
Null + 媒介物, D7
A53T + 媒介物, D7
A53T + RTX 0.04μg, D7
A53T + RTX 0.125μg, D7
Null + 媒介物, D14
A53T + 媒介物, D14
A53T + RTX 0.04μg, D14
A53T + RTX 0.125μg, D14

图3

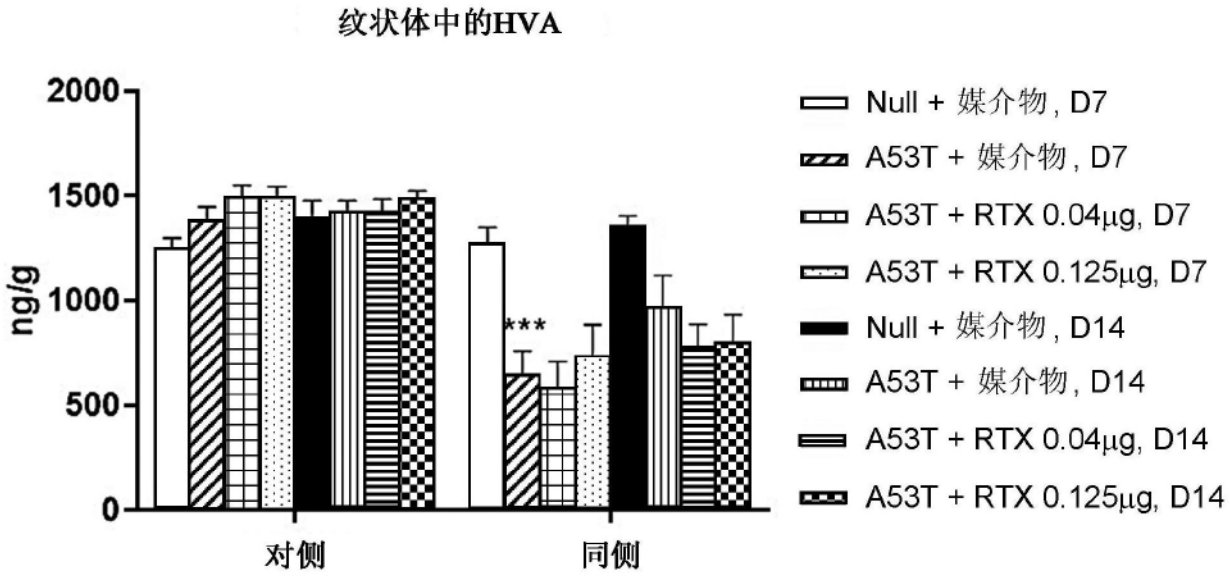

纹状体中的HVA
2000
1500
1000
500
0
ng/g
***
对侧
同侧
Null + 媒介物, D7
A53T + 媒介物, D7
A53T + RTX 0.04μg, D7
A53T + RTX 0.125μg, D7
Null + 媒介物, D14
A53T + 媒介物, D14
A53T + RTX 0.04μg, D14
A53T + RTX 0.125μg, D14

图4

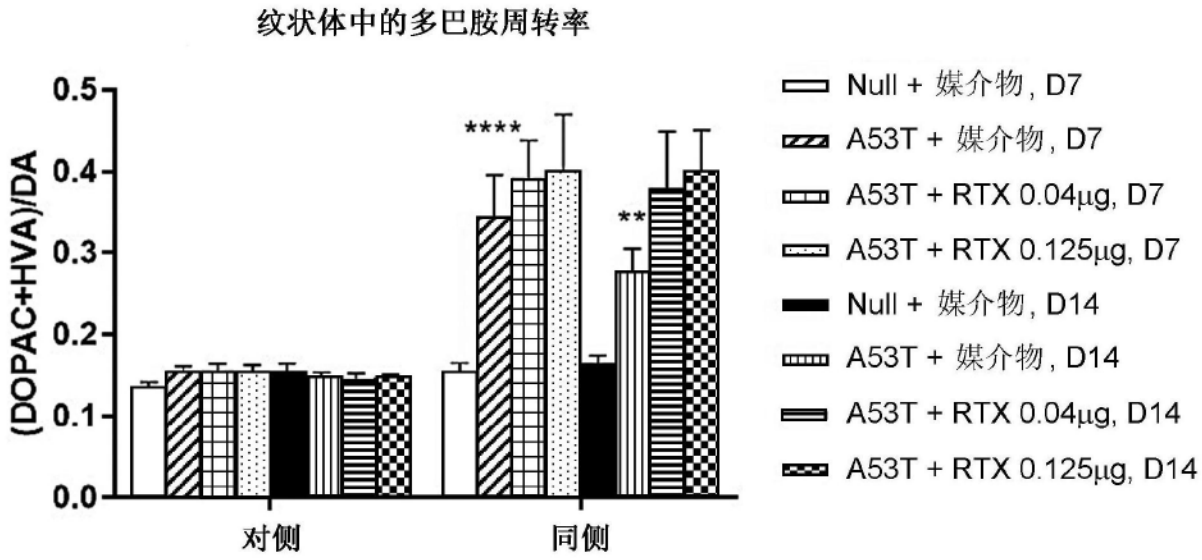

纹状体中的多巴胺周转率
(DOPAC+HVA)/DA
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
****
**
对侧
同侧
Null + 媒介物, D7
A53T + 媒介物, D7
A53T + RTX 0.04μg, D7
A53T + RTX 0.125μg, D7
Null + 媒介物, D14
A53T + 媒介物, D14
A53T + RTX 0.04μg, D14
A53T + RTX 0.125μg, D14

图5

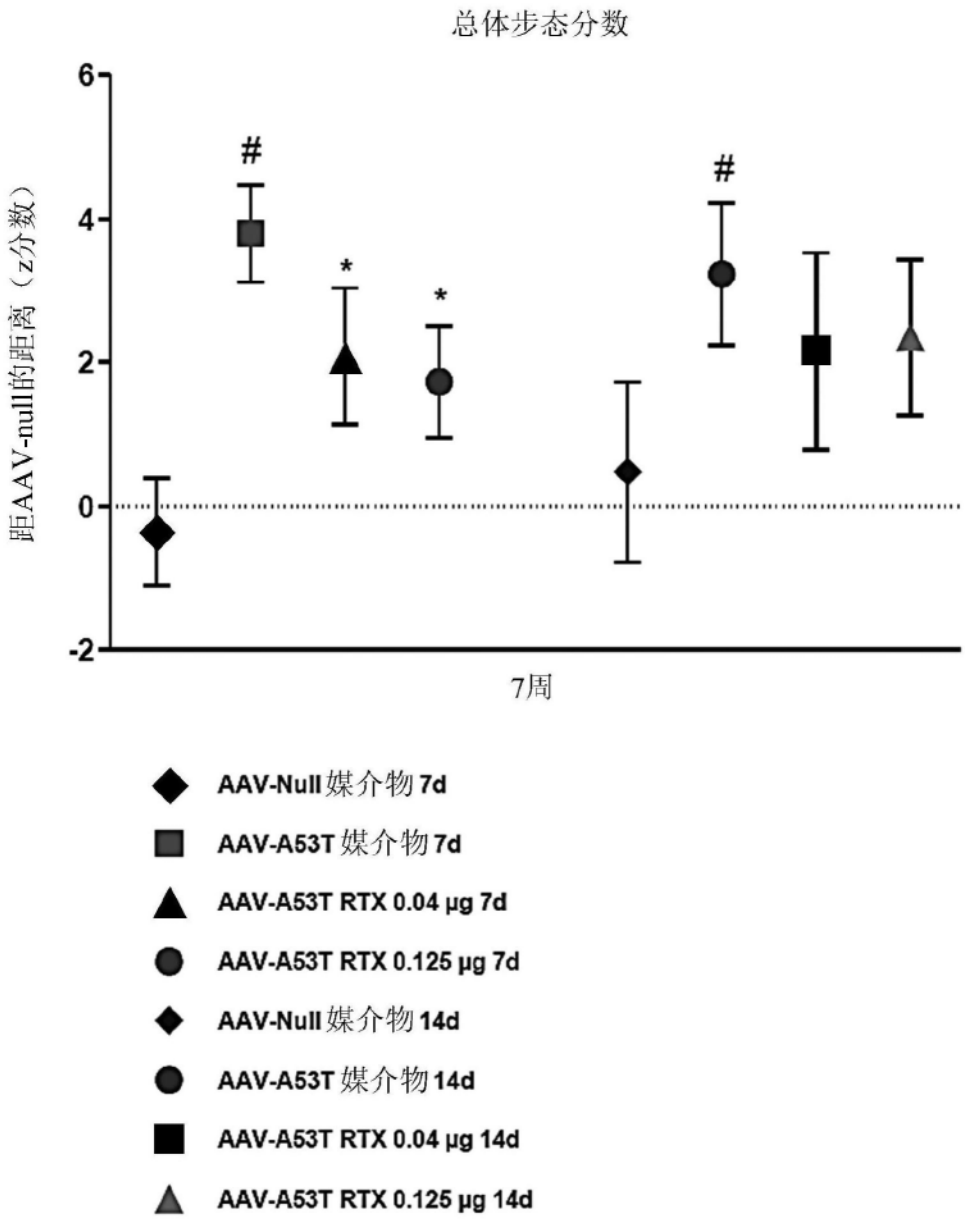

总体步态分数
距AAV-null的距离（z分数）
6
4
2
0
-2
#
*
*
#
7周
AAV-Null媒介物7d
AAV-A53T媒介物7d
AAV-A53T RTX 0.04 μg 7d
AAV-A53T RTX 0.125 μg 7d
AAV-Null媒介物14d
AAV-A53T媒介物14d
AAV-A53T RTX 0.04 μg 14d
AAV-A53T RTX 0.125 μg 14d

图6A

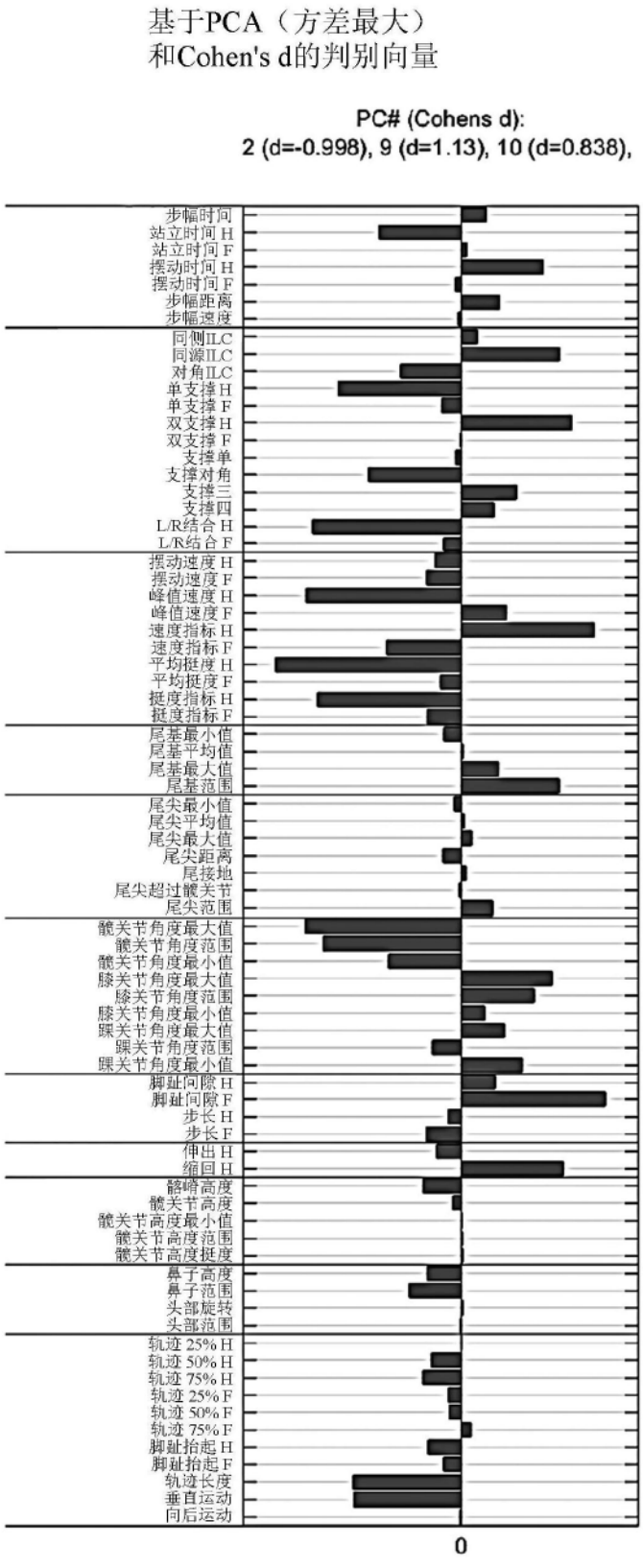

基于PCA（方差最大）
和Cohen's d的判别向量
PC# (Cohens d):
2 (d=-0.998), 9 (d=1.13), 10 (d=0.838),
步幅时间
站立时间 H
站立时间 F
摆动时间 H
摆动时间 F
步幅距离
步幅速度
同侧ILC
同源ILC
对角ILC
单支撑 H
单支撑 F
双支撑 H
双支撑 F
支撑单
支撑对角
支撑三
支撑四
L/R结合 H
L/R结合 F
摆动速度 H
摆动速度 F
峰值速度 H
峰值速度 F
速度指标 H
速度指标 F
平均挺度 H
平均挺度 F
挺度指标 H
挺度指标 F
尾基最小值
尾基平均值
尾基最大值
尾基范围
尾尖最小值
尾尖平均值
尾尖最大值
尾尖距离
尾接地
尾尖超过髋关节
尾尖范围
髋关节角度最大值
髋关节角度范围
髋关节角度最小值
膝关节角度最大值
膝关节角度范围
膝关节角度最小值
踝关节角度最大值
踝关节角度范围
踝关节角度最小值
脚趾间隙 H
脚趾间隙 F
步长 H
步长 F
伸出 H
缩回 H
髂嵴高度
髋关节高度
髋关节高度最小值
髋关节高度范围
髋关节高度挺度
鼻子高度
鼻子范围
头部旋转
头部范围
轨迹 25% H
轨迹 50% H
轨迹 75% H
轨迹 25% F
轨迹 50% F
轨迹 75% F
脚趾抬起 H
脚趾抬起 F
轨迹长度
垂直运动
向后运动
0

图6B

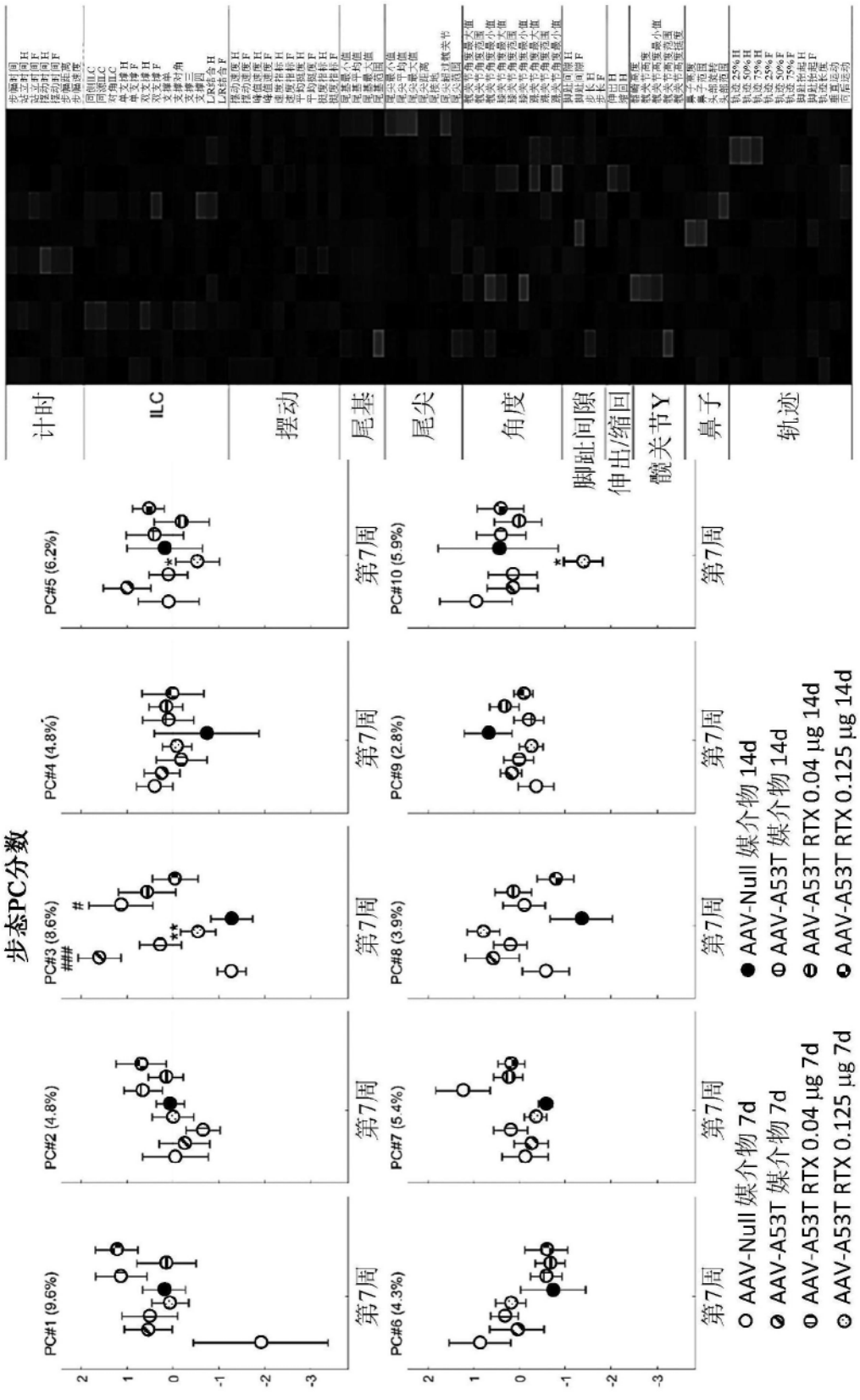

步态PC分数
PC#1 (9.6%)
PC#2 (4.8%)
PC#3 (8.6%)
PC#4 (4.8%)
PC#5 (6.2%)
PC#6 (4.3%)
PC#7 (5.4%)
PC#8 (3.9%)
PC#9 (2.8%)
PC#10 (5.9%)
第7周
计时
ILC
摆动
尾基
尾尖
角度
脚趾间隙
伸出/缩回
髋关节Y
鼻子
轨迹
AAV-Null 媒介物 7d
AAV-A53T 媒介物 7d
AAV-A53T RTX 0.04 μg 7d
AAV-A53T RTX 0.125 μg 7d
AAV-Null 媒介物 14d
AAV-A53T 媒介物 14d
AAV-A53T RTX 0.04 μg 14d
AAV-A53T RTX 0.125 μg 14d

图7

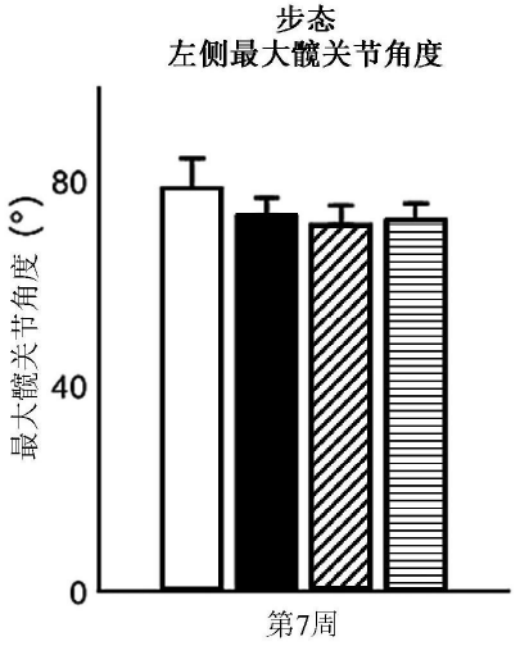

步态
左侧最大髋关节角度
最大髋关节角度 (°)
80
40
0
第7周

图8A

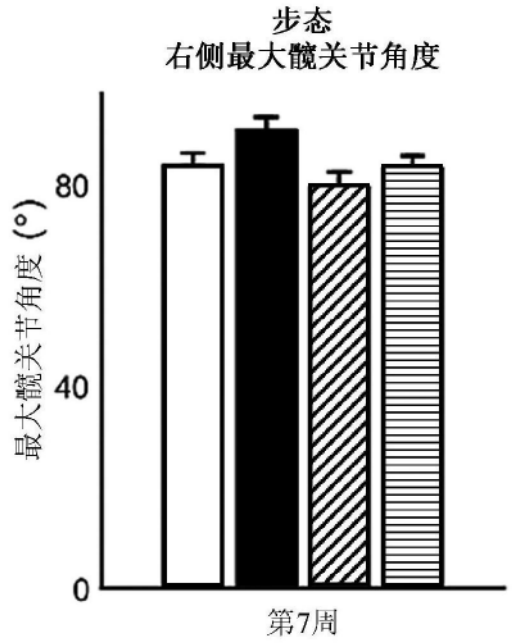

步态
右侧最大髋关节角度
最大髋关节角度 (°)
80
40
0
第7周

图8B

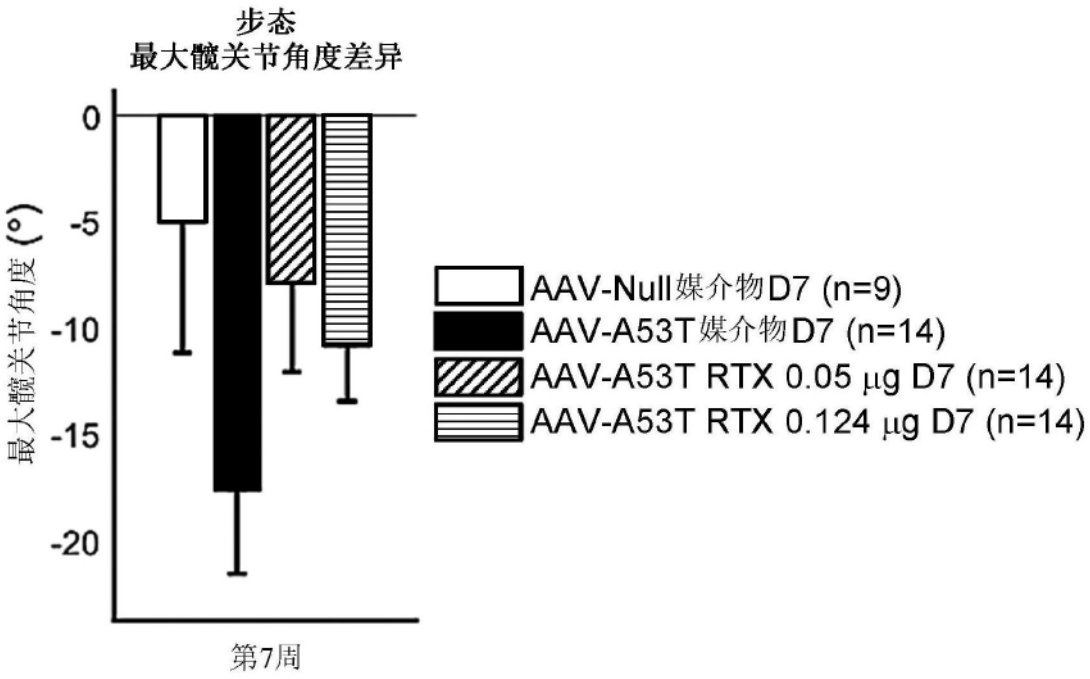

步态
最大髋关节角度差异
0
-5
-10
-15
-20
最大髋关节角度 (°)
第7周
AAV-Null媒介物D7 (n=9)
AAV-A53T媒介物D7 (n=14)
AAV-A53T RTX 0.05 μg D7 (n=14)
AAV-A53T RTX 0.124 μg D7 (n=14)

图8C

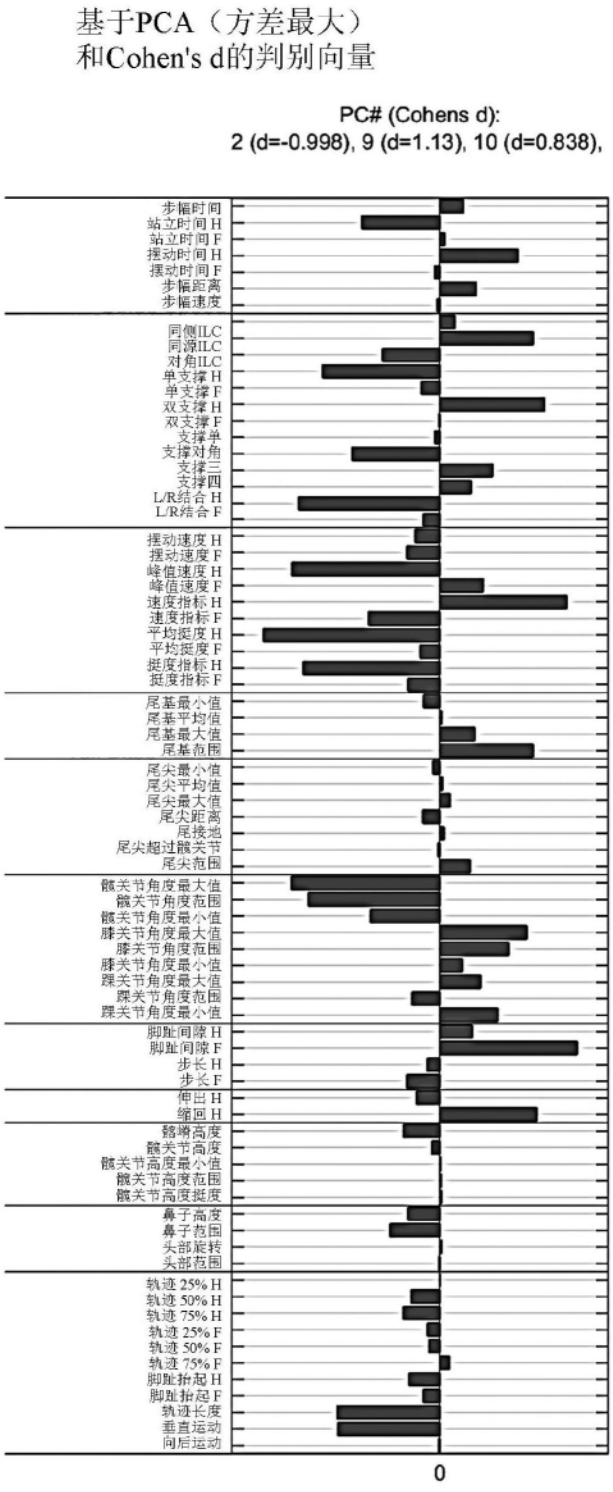

基于PCA（方差最大）
和Cohen's d的判别向量
PC# (Cohens d):
2 (d=-0.998), 9 (d=1.13), 10 (d=0.838),
步幅时间
站立时间 H
站立时间 F
摆动时间 H
摆动时间 F
步幅距离
步幅速度
同侧ILC
同源ILC
对角ILC
单支撑 H
单支撑 F
双支撑 H
双支撑 F
支撑单
支撑对角
支撑三
支撑四
L/R结合 H
L/R结合 F
摆动速度 H
摆动速度 F
峰值速度 H
峰值速度 F
速度指标 H
速度指标 F
平均挺度 H
平均挺度 F
挺度指标 H
挺度指标 F
尾基最小值
尾基平均值
尾基最大值
尾基范围
尾尖最小值
尾尖平均值
尾尖最大值
尾尖距离
尾接地
尾尖超过髋关节
尾尖范围
髋关节角度最大值
髋关节角度范围
髋关节角度最小值
膝关节角度最大值
膝关节角度范围
膝关节角度最小值
踝关节角度最大值
踝关节角度范围
踝关节角度最小值
脚趾间隙 H
脚趾间隙 F
步长 H
步长 F
伸出 H
缩回 H
髋高度
髋关节高度
髋关节高度最小值
髋关节高度范围
髋关节高度挺度
鼻子高度
鼻子范围
头部旋转
头部范围
轨迹 25% H
轨迹 50% H
轨迹 75% H
轨迹 25% F
轨迹 50% F
轨迹 75% F
脚趾抬起 H
脚趾抬起 F
轨迹长度
垂直运动
向后运动
0

图9A

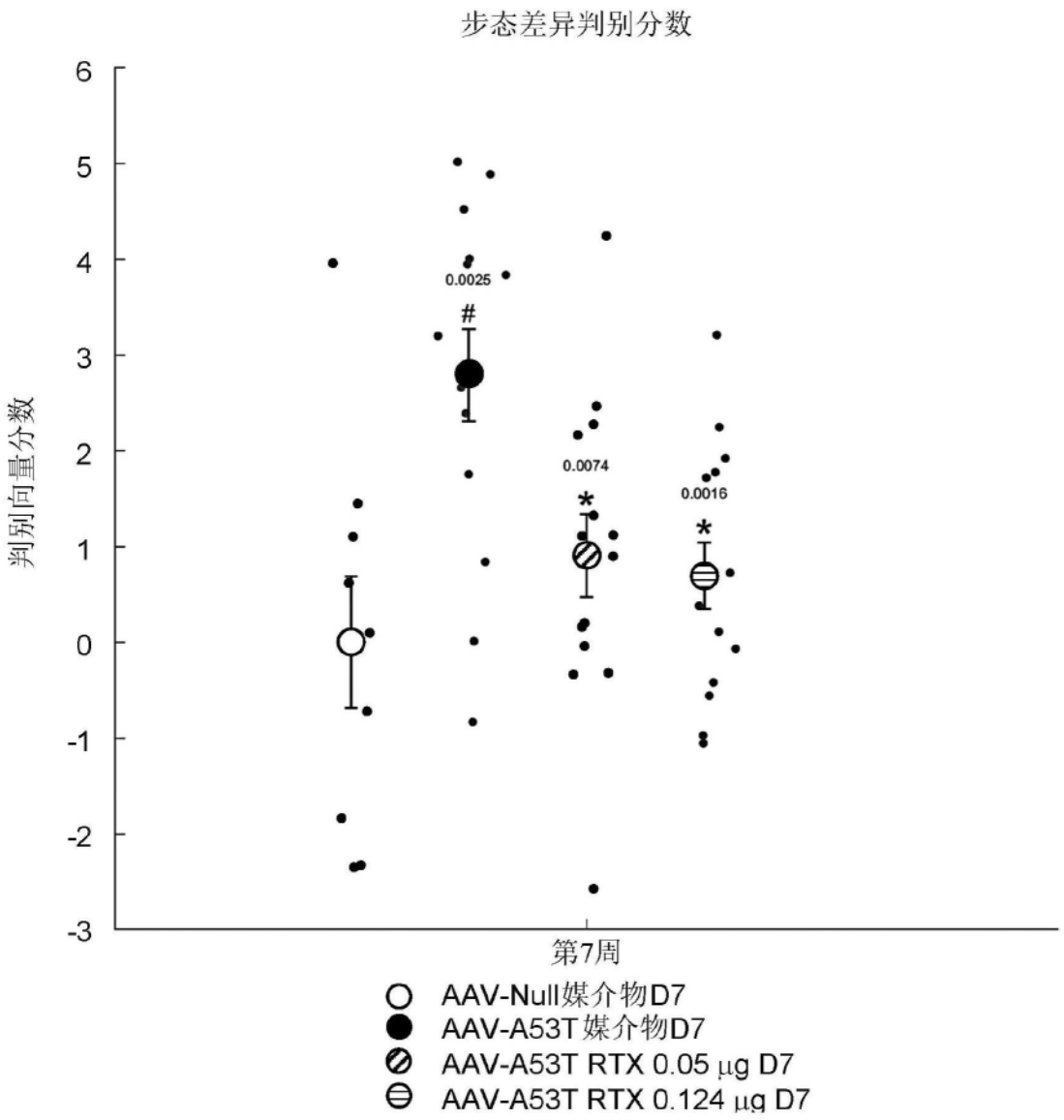

步态差异判别分数
判别向量分数
6
5
4
3
2
1
0
-1
-2
-3
0.0025
#
0.0074
*
0.0016
*
第7周
AAV-Null媒介物D7
AAV-A53T媒介物D7
AAV-A53T RTX 0.05 μg D7
AAV-A53T RTX 0.124 μg D7

图9B

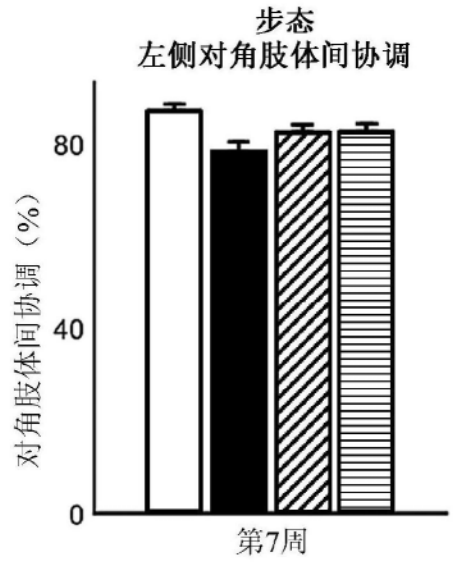

步态
左侧对角肢体间协调
对角肢体间协调（%）
80
40
0
第7周

图10A

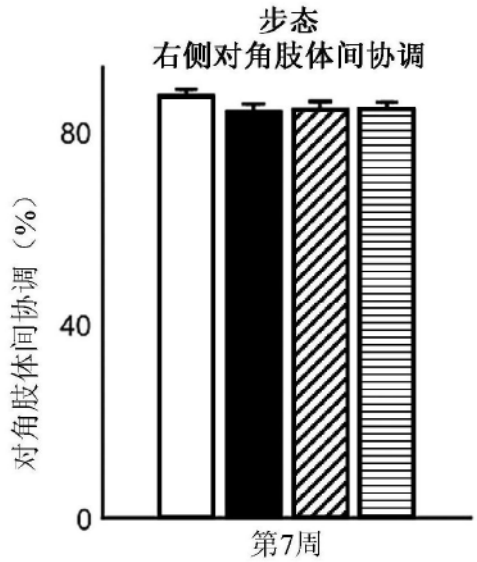

步态
右侧对角肢体间协调
对角肢体间协调（%）
80
40
0
第7周

图10B

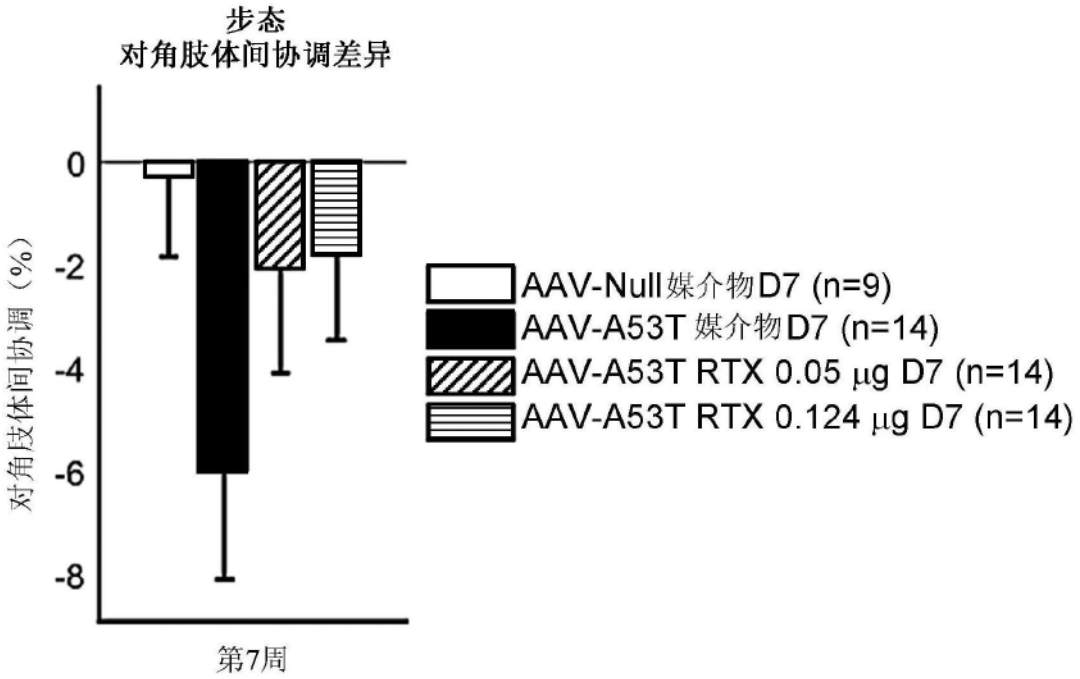

步态
对角肢体间协调差异
0
-2
-4
-6
-8
对角肢体间协调（%）
第7周
AAV-Null媒介物D7 (n=9)
AAV-A53T 媒介物D7 (n=14)
AAV-A53T RTX 0.05 μg D7 (n=14)
AAV-A53T RTX 0.124 μg D7 (n=14)

图10C

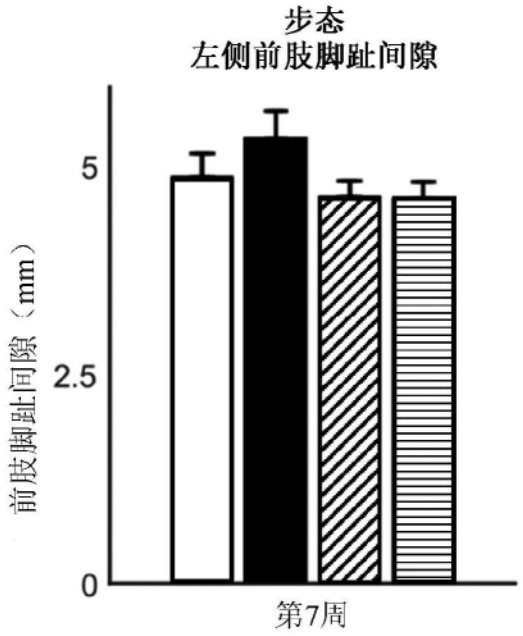

步态
左侧前肢脚趾间隙
5
2.5
0
前肢脚趾间隙（mm）
第7周

图10D

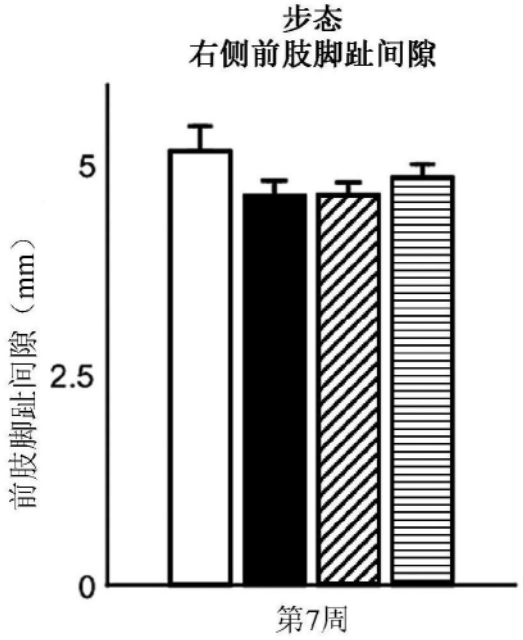

步态
右侧前肢脚趾间隙
前肢脚趾间隙（mm）
5
2.5
0
第7周

图10E

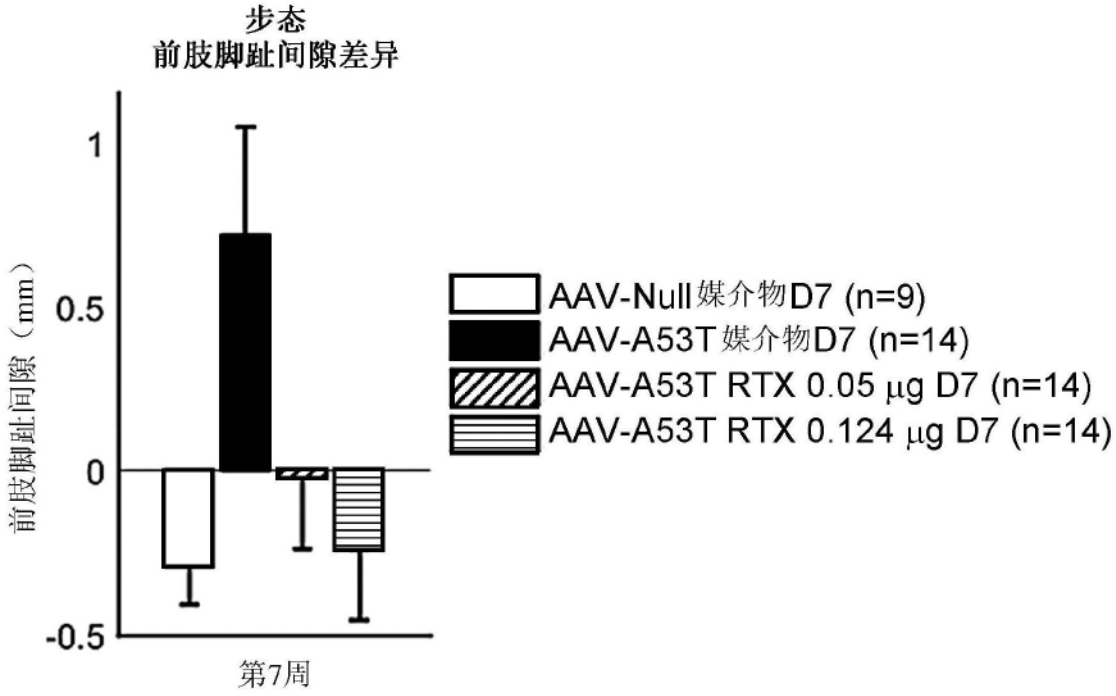

步态
前肢脚趾间隙差异
前肢脚趾间隙（mm）
1
0.5
0
-0.5
第7周
AAV-Null媒介物D7 (n=9)
AAV-A53T媒介物D7 (n=14)
AAV-A53T RTX 0.05 μg D7 (n=14)
AAV-A53T RTX 0.124 μg D7 (n=14)

图10F

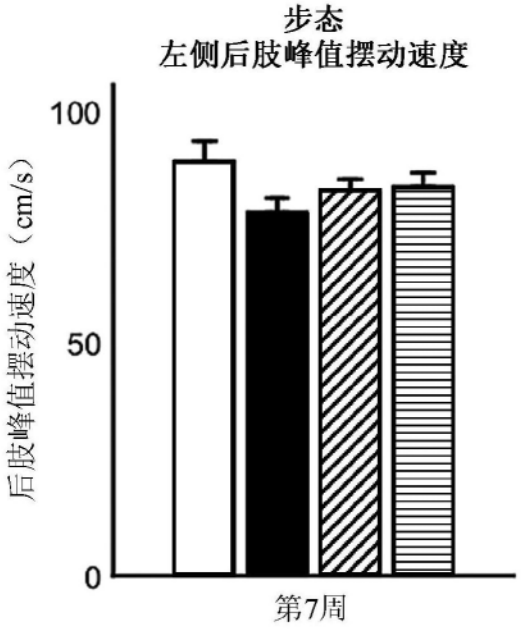

步态
左侧后肢峰值摆动速度
后肢峰值摆动速度（cm/s）
100
50
0
第7周

图11A

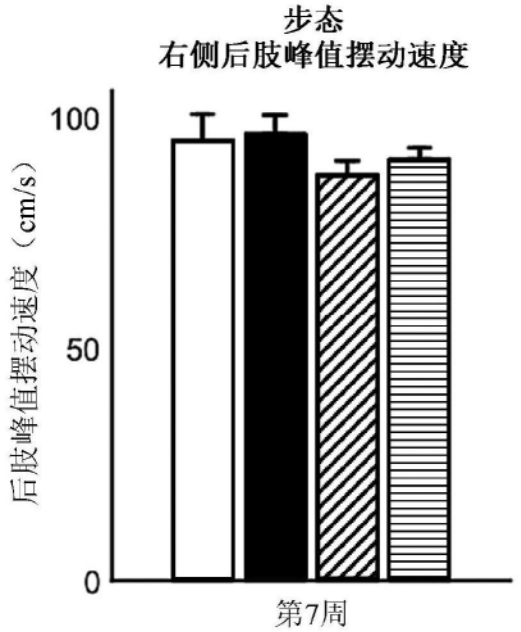

步态
右侧后肢峰值摆动速度
后肢峰值摆动速度（cm/s）
100
50
0
第7周

图11B

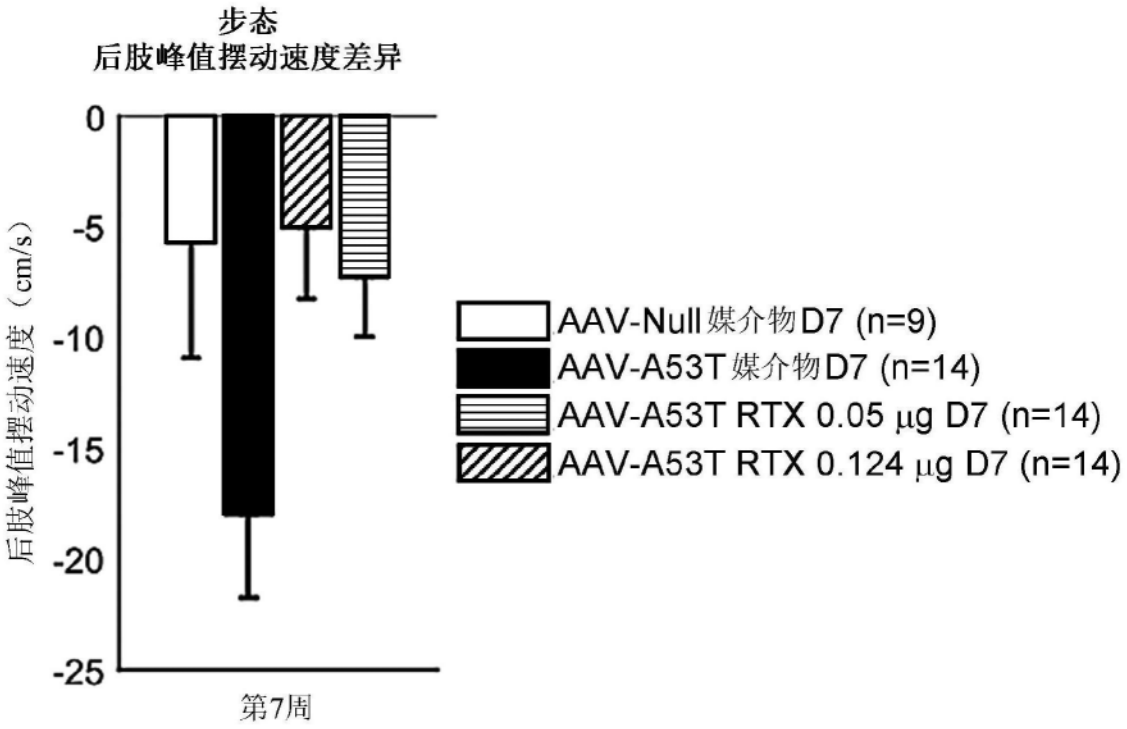

步态
后肢峰值摆动速度差异
0
-5
-10
-15
-20
-25
后肢峰值摆动速度（cm/s）
第7周
AAV-Null媒介物D7 (n=9)
AAV-A53T媒介物D7 (n=14)
AAV-A53T RTX 0.05 μg D7 (n=14)
AAV-A53T RTX 0.124 μg D7 (n=14)

图11C

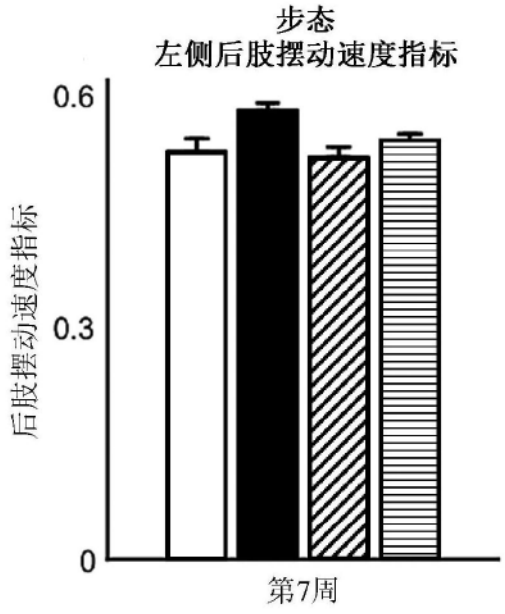

步态
左侧后肢摆动速度指标
0.6
0.3
0
后肢摆动速度指标
第7周

图11D

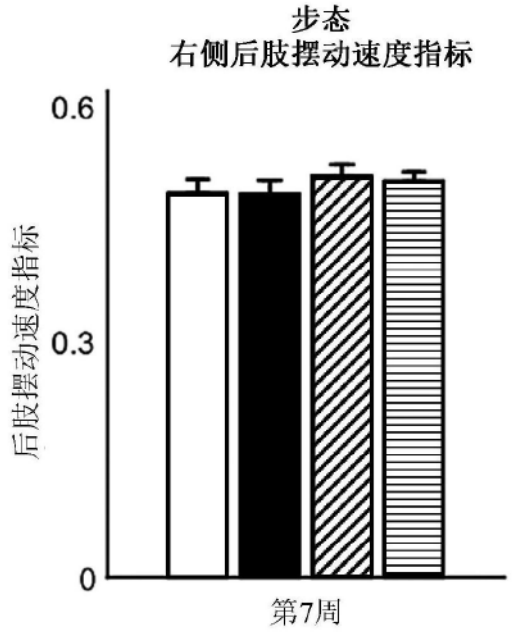

步态
右侧后肢摆动速度指标
0.6
0.3
0
后肢摆动速度指标
第7周

图11E

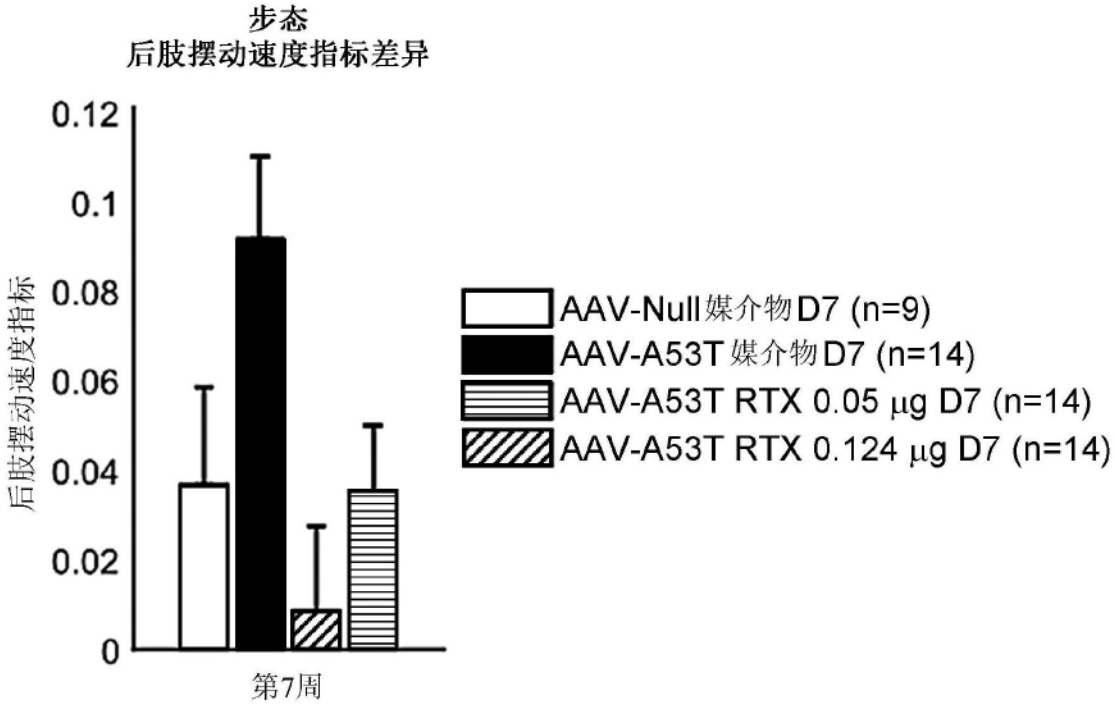

步态
后肢摆动速度指标差异
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
后肢摆动速度指标
第7周
AAV-Null媒介物D7 (n=9)
AAV-A53T媒介物D7 (n=14)
AAV-A53T RTX 0.05 μg D7 (n=14)
AAV-A53T RTX 0.124 μg D7 (n=14)

图11F