(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102834010 B
(45)授权公告日 2014.11.05

(21)申请号 201180005716.5
(22)申请日 2011.01.10
(30)优先权数据
61/293,812 2010.01.11 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2012.07.10
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2011/020672 2011.01.10
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2011/085307 EN 2011.07.14
(73)专利权人 菲尼克斯生物技术公司
地址 美国德克萨斯
(72)发明人 O·C·阿丁顿 R·A·纽曼
(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司 72002
代理人 王磊 过晓东
(51)Int.Cl.
A01N 45/00(2006.01)
(56)对比文件
US 2006234955 A1,2006.10.19,
CN 101400358 A,2009.04.01,
US 2006135443 A1,2006.06.22,
Wang et al..Cardiac glycosides provide neuroprotection against ischemic stroke: Discovery by a brain slice-based compound screening platform.《PNAS》.2006,第103卷(第27期),第10461-10466页.

审查员 周伟

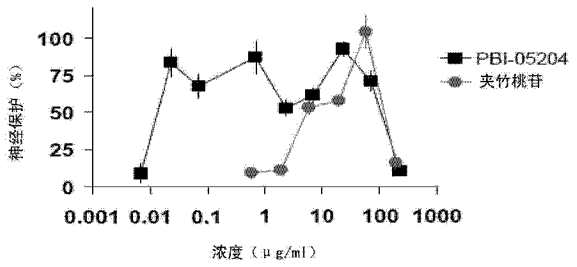
权利要求书2页 说明书23页 附图10页

(54)发明名称

用强心苷治疗神经系统疾病状况的方法

(57)摘要

本发明提供一种通过给予强心苷来治疗个体的神经系统疾病状况的方法。通过将治疗有效量的强心苷给予个体来治疗阿尔茨海默病、亨廷顿病或中风。所述强心苷可以存在于剂型中。



CN 102834010 B

1. 包含通过超临界流体提取从夹竹桃植物物料制备的提取物的组合物在制备用于治疗个体的神经系统疾病状况的药物中的用途，其中所述提取物包含强心苷和在提取期间与所述强心苷一起获得的一种或多种其他治疗有效物质，并且所述强心苷为包含于通过超临界流体提取从夹竹桃植物物料制备的提取物中的夹竹桃苷，其中所述神经系统疾病状况选自阿尔茨海默病、亨廷顿病和中风，其中所述夹竹桃苷的每日剂量为 25μg-1000μg/ 天。

2. 通过超临界流体提取从夹竹桃植物物料制备的提取物或包含通过超临界流体提取从夹竹桃植物物料制备的提取物的组合物在制备用于改善患有神经系统疾病状况的个体的群体中统计学显著数量的个体的临床状态的药物中的用途，其中所述提取物包含强心苷和在提取期间与所述强心苷一起获得的一种或多种其他治疗有效物质，并且所述强心苷为包含于通过超临界流体提取从夹竹桃植物物料制备的提取物中的夹竹桃苷，其中所述神经系统疾病状况选自阿尔茨海默病、亨廷顿病和中风，其中所述夹竹桃苷的每日剂量为 25μg-1000μg/ 天。

3. 通过超临界流体提取从夹竹桃植物物料制备的提取物在制备用于预防或降低具有患神经系统疾病状况风险的个体的群体中发生神经系统疾病状况的发病率的药物中的用途，其中所述提取物包含强心苷和在提取期间与所述强心苷一起获得的一种或多种其他治疗有效物质，并且所述强心苷为包含于通过超临界流体提取从夹竹桃植物物料制备的提取物中的夹竹桃苷，其中所述神经系统疾病状况选自阿尔茨海默病、亨廷顿病和中风，其中所述夹竹桃苷的每日剂量为 25μg-1000μg/ 天。

4. 通过超临界流体提取从夹竹桃植物物料制备的提取物在制备用于治疗个体的中风的药物中的用途，其中所述提取物包含强心苷和在提取期间与所述强心苷一起获得的一种或多种其他治疗有效物质，并且所述强心苷为包含于通过超临界流体提取从夹竹桃植物物料制备的提取物中的夹竹桃苷，其中所述夹竹桃苷的每日剂量为 25μg-1000μg/ 天。

5. 如权利要求 1 所述的用途，其中在给药之后，所述强心苷穿越血脑屏障并在脑组织中保留至少 8 小时的时间。

6. 如权利要求 1 所述的用途，其中所述药物的每日剂量为 0.6 mg-4.8mg 的植物来源的强心苷的超临界 CO_2 提取物。

7. 如权利要求 3 所述的用途，其中所述具有风险的个体的群体的特征在于所述个体年龄增加、所述神经系统疾病状况的家族史、发生神经系统疾病状况的遗传易感性、所述个体中 ApoE4 基因的存在和表达、女性、心血管疾病、糖尿病、唐氏综合征、颅脑损伤、低水平的正规教育、吸烟、过量饮酒和 / 或药物滥用。

8. 如权利要求 1 所述的用途，其中所述强心苷具有不大于 4 L/hr 的脑组织清除速率。

9. 如权利要求 1 所述的用途，其中所述夹竹桃植物物料包括夹竹 (Nerium) 桃物种或黄花夹竹桃 (Thevetia) 物种。

10. 如权利要求 1 所述的用途，其中所述超临界流体提取应用可选地包含改性剂的超临界二氧化碳。

11. 如权利要求 10 所述的用途，其中所述改性剂具有介于超临界流体与提取的化合物之间的挥发性。

12. 如权利要求 1 所述的用途，其中所述提取物包括夹竹桃苷、欧夹竹桃苷 A、夹竹桃苷元、夹竹桃它诺苷和奥多诺苷。

13. 如权利要求 1 所述的用途，其中所述药物包括 0.01 至 100 mg 夹竹桃苷。

14. 如权利要求 1 所述的用途，其中所述药物进一步包括螯合剂、防腐剂、抗氧化剂、吸附剂、酸化剂、碱化剂、消泡剂、缓冲剂、着色剂、电解质、盐、稳定剂、张力调节剂、稀释剂、其他药物赋形剂或者它们的组合。

用强心苷治疗神经系统疾病状况的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用强心苷化合物或包含它们的制剂来治疗神经系统疾病状况的方法。具体地，本发明涉及一种通过将强心苷给予有需要的个体来治疗神经系统疾病或病症的方法。

背景技术

[0002] 神经系统 (neurological) 疾病和病症影响脑功能。已进行许多尝试来开发这些疾病和病症的治疗或改善疗法；然而，尚未开发全面或普遍的疗法，虽然有许多药物治疗方法被证实对各种不同疾病和病症有效。

[0003] 亨廷顿病 (HD) 是影响神经系统的脑遗传病。其由从父母传递至孩子的缺陷基因引起。HD 基因干扰称为“亨廷顿蛋白”的特定蛋白的产生，该蛋白看来在适当的大脑发育中至关重要。HD 的经典指征包括情绪、认知和运动障碍。亨廷顿病的特征在于生涩的不自主运动（舞蹈病），但有时导致无异常运动的僵硬，使用四肢的变化（失用症），丧失身体机能的控制以及痴呆，包括记忆、思维速度、判断的逐渐恶化以及缺乏问题意识和规划。亨廷顿病没有已知的治愈。虽然有许多药物帮助控制与 HD 相关的症状如情绪和运动问题，但是没有停止或逆转该疾病进程的治疗。据认为亨廷顿病是具有一般膜异常的疾病。在亨廷顿病患者的红细胞膜和基底核 (Butterfield DA, Oeswein JQ, Prunty ME, Hisle KC, Markesbery WR, Increased sodium, potassium adenosine triphosphatase activity in erythrocyte membranes inHuntington's disease. Ann Neurology, 4:60-62, 1978) 以及获得自亨廷顿病患者皮肤的成纤维细胞膜 (Schroeder F, Goetz IE, Roberts E, Membraneanomalies in Huntington's disease fibroblasts. J. Neurochem. 43:526-539, 1984) 中观察到与正常相比显著升高的 Na, K-ATP 酶 (Na, K-ATPase) 水平和活性（提高 10 倍）。

[0004] 阿尔茨海默病是痴呆的一种形式神经变性疾病，其损伤脑的智力功能（记忆、方向、计算等），但通常保留脑的运动功能。在阿尔茨海默病中，思维逐渐恶化，导致记忆丧失、精神错乱、定向障碍、判断力受损以及可能影响人进行正常日常活动的能力的其他问题。智力改变的类型、严重程度、顺序和发展变化很大。阿尔茨海默病没有已知的治愈，并且没有已知延缓其发展的方法。对于在该疾病的早期或中期阶段的一些人，诸如他克林的药物可以减轻一些认知症状。安理申（多奈哌齐）和艾斯能（利凡斯的明）是可逆的乙酰胆碱酯酶抑制剂，其适用于治疗阿尔茨海默病类型的轻度至中度痴呆。这些药物（称为胆碱酯酶抑制剂）通过提高神经递质乙酰胆碱的脑水平，帮助恢复脑细胞之间的通信来发挥作用。一些药物可以帮助控制行为症状如失眠、激动、神志恍惚、焦虑和抑郁。这些治疗的目的是使患者更舒适。虽然没有药物已知治愈阿尔茨海默病，但是胆碱酯酶抑制剂可以改善日常活动的表现，或者减少行为问题。目前测试的用于治疗阿尔茨海默病的药物包括雌二醇、非甾体抗炎剂、维生素 E、司来吉兰 (Carbex, Eldepryl) 以及植物产物银杏。

[0005] 在正常情况下，神经元保持其由膜结合的稳态的能量依赖性 Na, K-ATP 酶泵调节的测试膜电位和功能。缺血引发离子平衡的改变，这可能导致不可逆的组织损伤。有人提出

受损的 Na,K-ATP 酶活性在局灶性缺血和创伤性脑损伤的一些模型中的神经病理和凋亡过程中起作用。据报道 Na,K-ATP 酶在中风介导的缺血性脑损伤中的作用与几种不同分子机制有关。抑制 Na,K-ATP 酶催化活性可以例如导致缺血 - 再灌注期间 ATP 消耗的减少。此外,胞质 Ca^{2+} 的缺失可以引起神经元细胞死亡。因此,例如通过强心苷抑制 Na,K-ATP 酶可以导致细胞内 Ca^{2+} 水平的升高以及通过 Na-Ca 交换器排出细胞内 Ca^{2+} 的下降。与此一致,短暂性缺血后 3 天观察到海马 CA1 神经元中相对较低水平的细胞内 Ca^{2+},并且认为钙水平的升高在广泛的缺血后治疗时间中提供保护以免迟发性神经元死亡。

[0006] 强心苷作用的一种药理学学机制涉及它们结合至离子交换泵 Na,K-ATP 酶以及抑制这种特殊酶的活性的能力。催化 Na^+ 和 K^+ 跨越质膜的主动运输的跨膜蛋白 Na,K-ATP 酶是众所周知的强心苷的药理受体。这种酶水解 ATP 并利用自由能驱动 K^+ 转运入细胞和 Na^+ 转运出细胞,与它们的电化学梯度相反 (Hauptman, P. J., Garg, R., and Kelly, R. A. Cardiac glycosidesin the next millennium. Prog. Cardiovasc. Dis. 41:247-254, 1999)。

[0007] Na,K-ATP 酶由两个异源二聚体亚基 (催化 α - 亚基和糖基化 β - 亚基) 组成。还有 γ 亚基,但是其尚未进行详细研究。α - 亚基具有 ATP、Na^+、K^+ 和强心苷的结合位点。β - 亚基的功能是稳定催化 α - 亚基,并且还可以起调节作用。在哺乳动物细胞中已鉴别 4 种不同的 α 同种型 (α 1、α 2、α 3、α 4) 和 3 种不同的 β 同种型 (β 1、β 2 和 β 3)。各亚基类型的相对表达在正常和疾病状态中显著改变。此外,强心苷对不同 α 同种型的表观亲和力完全不同。强心苷结合至 α 1 同种型少于与 α 2 和 α 3 同种型的结合, α 2 和 α 3 同种型对这种类型药物的抑制更敏感 250 倍或更高 (Blanco, G. and Mercer, R. W. Isozymes ofthe Na,K-ATPase:heterogeneity in structure, diversity in function. Am. J. Physiol. 275(Renal Physiol. 44):F633-F650, 1998)。Sakai 等人 (FEBS Letters563:151-154, 2004) 报道 α 3 亚基同种型的表达在人结肠直肠癌细胞中与正常结肠直肠细胞相比升高。

[0008] 强心苷类的相对水对脂溶性范围很广。虽然大多数强心苷可以结合并抑制 Na,K-ATP 酶活性,但是那些比溶于脂质 (亲脂或疏水) 相对更溶于水 (亲水) 的强心苷仅具有有限的穿越称为血脑屏障的至脑的脂质屏障的能力。血脑屏障 (BBB) 是由中枢神经系统 (CNS) 中的脉络丛维持的循环血液与脑脊液 (CSF) 的隔离。内皮细胞限制微观物体 (例如细菌) 以及大分子或亲水分子扩散入 CSF,同时允许小的疏水分子 (O_2、激素、脂溶性强心苷等) 的扩散。

[0009] 欧洲夹竹桃 (Nerium oleander) 是广泛分布于亚洲亚热带、美国西南部和地中海的观赏性植物。早已认识到其医学性质和毒物学性质。它被用于治疗例如痔、溃疡、麻疯病、蛇咬、和甚至诱导流产。夹竹桃提取物的重要但不是唯一的组分夹竹桃苷是强心苷。

[0010] 从夹竹桃 (Nerium) 物种的植物提取糖苷提供来自欧洲夹竹桃的药理学 / 治疗活性成分。其中有夹竹桃苷、黄花夹竹桃次苷 B 和其他强心苷化合物。以商标 ANVIRZEL™ 出售的通过热水提取欧洲夹竹桃获得的夹竹桃苷提取物包含浓缩形式或粉末形式的欧洲夹竹桃的热水提取物。热水夹竹桃提取物 (即 Anvirzel™) 的 I 期临床试验已完成 (Mekhail et al., Am. Soc. Clin. Oncol., vol. 20, p. 82b, 2001)。结论是提供约 57ug 夹竹桃苷 / 天的夹竹桃提取物可以高达 1.2ml/m^2/d 的剂量安全给药。未发现剂量限制性毒性。

[0011] 华蟾素 (Huachansu) 是获得自蟾蜍皮肤的提取物,并且其包含蟾蜍二烯羟酸内

酯，例如强心苷蟾蜍灵。在中国，华蟾素是批准用于治疗癌症的药物。其已用来治疗各种癌症，包括肝癌、胃癌、肺癌、皮肤癌和食管癌。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明提供一种治疗神经系统疾病状况的方法，所述方法包括向有需要的个体给予有效量的包含强心苷的组合物以治疗所述神经系统疾病状况。

[0014] 本发明的另一方面提供一种用包含强心苷的组合物治疗有需要的个体的神经系统疾病或病症的方法，所述神经系统疾病或病症具有与改变的 Na,K-ATP 酶活性相关的病因，所述方法包括：

[0015] 确定所述个体患有神经系统疾病或病症，所述神经系统疾病或病症具有与改变的 Na,K-ATP 酶 α 3 同种型比 α 1 同种型亚基比例相关或者与改变的 Na,K-ATP 酶活性相关的病因；以及

[0016] 指示向所述个体给予包含强心苷的组合物。

[0017] 本发明的一些实施方案包括这样的实施方案，其中：1) 向所述个体开处方并给予治疗相关剂量的包含强心苷的组合物；2) 根据规定的剂量给药方案向所述个体给予包含强心苷的组合物；3) 向所述个体给予包含提取物的组合物，所述提取物包含强心苷；4) 所述提取物还包含在提取期间与强心苷一起获得的一种或多种其他治疗有效物质；5) 所述提取物还包含在提取期间与强心苷一起获得的一种或多种其他治疗有效物质；6) 所述组合物还包含一种或多种其他非强心苷的治疗有效物质，即不是强心苷的物质；和 / 或 7) 向所述个体给予 2mg-22.5mg/ 天的植物或动物来源的包含强心苷的热水提取物，或者 0.6-4.8mg 的植物或动物来源的强心苷的浓缩提取物（例如超临界 CO_2 提取物或有机溶剂提取物），或者 10-500ug 的纯的单一化学形式的强心苷。

[0018] 本发明还提供一种治疗有需要的个体的神经系统疾病状况的方法，所述方法包括：

[0019] 确定所述个体的神经系统疾病状况是否为阿尔茨海默病、亨廷顿病、中风或其他神经系统疾病状况；

[0020] 指示给予强心苷；

[0021] 根据规定的初始剂量给药方案向所述个体给予初始剂量的强心苷一段时间；

[0022] 定期确定个体对用强心苷治疗的临床应答和 / 或治疗应答的充分性；以及

[0023] 如果所述个体的临床应答和 / 或治疗应答是充分的，则根据需要继续用强心苷治疗直至达到期望的临床终点；或者

[0024] 如果所述个体的临床应答和 / 或治疗应答在所述初始剂量和初始剂量给药方案下是不充分的，则逐步提高或逐步降低所述剂量直至实现所述个体中期望的临床应答和 / 或治疗应答。

[0025] 本发明还提供一种预防或降低具有患神经系统疾病状况风险的个体的群体中发生神经系统疾病状况的发病率的方法，所述方法包括：

[0026] 以重现的方式 (on a recurring basis)，向具有患诸如阿尔茨海默病、亨廷顿病、中风或其他神经系统疾病状况的神经系统疾病状况风险的个体的群体中的一个或多个个体给予有效剂量的强心苷一段延长的时间，从而预防或降低所述神经系统疾病状况在所述群体中的发病率。

[0027] 本发明还包括实施方案，其中：a) 所述方法还包括指示向一个或多个个体给予强心苷；b) 所述方法还包括根据规定的剂量给药方案向所述个体给予有效剂量的强心苷一段时间；c) 所述方法还包括定期确定一个或多个个体对用强心苷治疗的临床应答和/或治疗应答的充分性；d) 如果所述个体的临床应答和/或治疗应答是充分的，则所述方法还包括根据需要继续用强心苷治疗直至达到期望的临床终点；e) 如果所述个体的临床应答和/或治疗应答在所述初始剂量和初始剂量给药方案下是不充分的，则所述方法还包括逐步提高或逐步降低所述剂量直至实现所述个体中期望的临床应答和/或治疗应答；f) 将强心苷给予群体中的多个个体；g) 所述重现的方式为每天、每隔一天、每两天、每三天、每四天、每五天、每六天、每周、每隔一周、每两周、每三周、每月、每两个月、每半个月、每隔一个月、每两个月、每季度、每隔一季度、每三个月(trimesterly)、每季节、每半年和/或每年；h) 所述延长的时间为一周或多周、一个月或多个月、一个季度或多个季度和/或一年或多年；i) 所述有效剂量一天中给予一次或多次；j) 所述方法还包括鉴别具有患诸如阿尔茨海默病、亨廷顿病、中风或其他神经系统疾病状况的神经系统疾病状况风险的个体的群体；和/或 k) 具有风险的个体的群体的特征在于所述个体年龄增加、所述神经系统疾病状况的家族史、发生神经系统疾病状况的遗传易感性、所述个体中 ApoE4 基因的存在和表达、女性（与男性相比，多达两倍的妇女患有阿尔茨海默病）、心血管疾病（例如高血压和高胆固醇水平）、糖尿病（特别是这种疾病的 2 型或成年发病形式）、唐氏综合征、颅脑损伤、低水平的正规教育、吸烟、过量饮酒和/或药物滥用。

[0028] 本发明还提供一种治疗个体的中风的延时 (time-delayed) 方法，所述方法包括：

[0029] 在个体患有中风后的可接受的延迟时间内，根据初始剂量给药方案给予初始剂量的强心苷；

[0030] 确定个体对用强心苷治疗的临床应答和/或治疗应答的充分性；以及

[0031] 如果所述个体的临床应答和/或治疗应答是充分的，则根据需要继续用强心苷治疗直至达到期望的临床终点；或者

[0032] 如果所述个体的临床应答和/或治疗应答在所述初始剂量和初始剂量给药方案下是不充分的，则逐步提高或逐步降低所述剂量直至实现所述个体中期望的临床应答和/或治疗应答。

[0033] 本发明的一些实施方案包括那些实施方案，其中：1) 所述延迟时间为 10 小时或更少、8 小时或更少、6 小时或更少、4 小时或更少、3 小时或更少、2 小时或更少、1 小时或更少、45 分钟或更少、30 分钟或更少、20 分钟或更少、或者 10 分钟或更少；2) 通过评价身体一侧的脸部、手臂和/或腿部的任何虚弱，身体一侧的脸部、手臂和/或腿部的麻木，不能理解口语，不能说话或不能清楚说话，不能书写，眩晕和/或步态失衡，复视以及异常剧烈的头痛来确定个体的临床和/或治疗应答的充分性；或者 3) 它们的组合。

[0034] 本发明还提供强心苷在制备用于治疗个体的神经系统疾病状况的药物中的用途。在一些实施方案中，制备这样的药物包括：提供强心苷；将一定剂量的强心苷包含在药物剂型中；以及包装所述药物剂型。在一些实施方案，所述制备可以如 PCT 国际申请第 PCT/US06/29061 号所述进行。所述制备还可以包括一个或多个额外的步骤，例如：将所述包装的剂型递送给供应商（零售商、批发商和/或分销商）；向患有神经系统疾病状况的个体销售或以其他方式提供所述包装的剂型；与所述药物一起包括标签和包装插页，其提供关于

所述剂型的用途、剂量给药方案、给药、内含物和毒理学特性的说明。在一些实施方案中，神经系统疾病状况的治疗包括：确定个体患有神经系统疾病或病症；指示根据剂量给药方案向所述个体给予强心苷；向所述个体给予包含强心苷的一种或多种药物剂型，其中所述一种或多种药物剂型根据所述剂量给药方案来给药。

[0035] 本发明还提供用于治疗神经系统疾病状况的强心苷或包含强心苷的组合物，即药物制剂或剂型。在一些实施方案，所述包含强心苷的组合物如本文或美国专利第 7,402,325 号、PCT 国际申请第 PCT/US06/29061 号、美国申请第 12/019435 号所述，这些文献的整个公开援引加入本文。

[0036] 在一些实施方案中，患有神经系统疾病状况的个体即有需要的个体是这类个体的群体的一部分。本发明提供一种改善患有神经系统疾病状况的个体的群体中统计学显著数量的个体的临床状态的方法，所述方法包括：向所述个体的群体给予强心苷或包含强心苷的组合物；以及确定所述个体的临床状态。在一些实施方案中，所述统计学显著数量为所述群体的至少 5%。

[0037] 在一些实施方案中，所述神经系统疾病状况为阿尔茨海默病、亨廷顿病、中风或其他神经系统疾病状况，例如本文所述的那些神经系统疾病状况。所述药物可以通过将强心苷包含在含有一种或多种药学可接受的赋形剂的药物剂型中来制备。

[0038] 根据需要继续用强心苷治疗个体。可以根据需要调整剂量或剂量给药方案直至患者达到期望的临床终点，例如与该疾病相关的具体神经系统症状的减少或减轻。确定临床应答和 / 或治疗应答的充分性可以由熟悉所治疗的神经系统疾病状况的临床医师进行。

[0039] 在一些实施方案中，所述神经系统疾病状况选自神经系统疾病、神经系统病症和中风。在一些实施方案中，所述神经系统疾病为神经变性疾病。在一些实施方案，所述神经变性疾病选自亨廷顿病、阿尔茨海默病、帕金森病、肌萎缩性侧索硬化症、牛海绵状脑炎、多发性硬化、糖尿病性神经病、孤独症以及幼年神经细胞蜡样质脂褐素病。在一些实施方案中，中风为缺血性中风或中风介导的缺血性损伤。

[0040] 在一些实施方案中：1) 强心苷选自夹竹桃苷、毒毛花苷 G、蟾蜍灵、洋地黄毒苷、华蟾蜍他灵、华蟾蜍精和脂蟾毒配基；2) 强心苷以纯的形式存在，其通过提取植物或动物来源获得、合成或者通过可用的强心苷的化学修饰（例如衍生化）来制备；3) 强心苷存在于提取物中；4) 强心苷存在于药物制剂或组合物中；5) 强心苷获得自夹竹桃植物物料；6) 所述夹竹桃植物物料包括夹竹桃物种如欧洲夹竹桃、或者黄花夹竹桃 (Thevetia) 物种如黄花夹竹桃 (Thevetia neriifolia)（也称为黄色夹竹桃）；7) 强心苷在给予所述个体后穿越血脑屏障 (BBB)；8) 强心苷提取物任选地在改性剂的存在下通过超临界流体 (SCF) 提取来制备；9) 强心苷为夹竹桃苷；10) 强心苷具有不大于 4L/hr 的脑组织清除速率；和 / 或 11) 在通过本文公开的任何途径给药之后，强心苷在脑组织中保留至少 8 小时的时间。在一些实施方案中，强心苷不含黄夹次苷乙。

[0041] 在一些实施方案中：1) 所述 SCF 提取物还包含至少一种除强心苷之外的其他药理学活性物质，所述其他药理学活性物质在用来制备所述提取物的提取过程期间与所述强心苷一起获得；2) 所述 SCF 提取物还包含至少一种其他非强心苷的药理学活性物质；3) 所述其他药理学活性物质可以在将所述提取物给予个体时促进强心苷的治疗有效性；4) 所述其他药理学活性物质加成或协同地发挥功能以促进强心苷的治疗有效性；和 / 或 5) 所述提

取物获得自蟾蜍皮肤或其分泌物。

[0042] 在一些实施方案中，所述神经系统疾病状况具有与Na,K-ATP酶活性的特定变化相关的病因，这通过增加的酶活性，如与幼年孤独症相关(Clin. Biochem.2009;42(10-11),949-957)；减少的酶活性，如在糖尿病性神经病(Neuroscience 2009)、巴滕病(Exp.Cell Res.2008,314(15):2895-2905)、年龄相关的痴呆和阿尔茨海默病(J.Alzheimers Dis.2008,14(1):85-93;Neurobiol.Aging 2007,28(7):987-994)中观察到的；或者Na,K-ATP酶亚基结构中的特定突变，如与帕金森病相关(Human Gen.2009,126(3):431-447)。

[0043] 本发明的方法的单个步骤可以在不同设备或在相同设备中进行。

[0044] 在一些实施方案中，所述神经元为体外、离体或体内的。在一些实施方案中，所述神经元为CA-1神经元。

[0045] 本发明还提供：一种治疗神经系统疾病状况的方法；一种治疗有需要的个体的神经系统疾病或病症的方法，所述神经系统疾病或病症具有与改变的Na,K-ATP酶活性相关的病因；强心苷在制备用于治疗神经系统疾病状况的药物中的用途；和/或实质上如本文所示和所述用于治疗神经系统疾病状况的强心苷或包含强心苷的组合物。

[0046] 本发明包括本文公开的发明的方面、实施方案和细分实施方案的所有组合。

附图说明

[0047] 下列附图形成本说明书的一部分并描述所要求保护的发明的示例性实施方案。根据这些附图和本文的描述，技术人员能够实施本发明而无需进行过度的实验。

[0048] 图1A-1C示出在神经保护基于脑切片的“中风”测定中夹竹桃苷对黄花夹竹桃次苷B的比较评价的结果(实施例8)，其中在那些物质的存在或不存在下，在氧和葡萄糖剥夺(OGD)的5-6分钟后测定健康皮层神经元的数量。示出3个独立实验的结果。

[0049] 图1D示出从神经保护基于脑切片的“中风”测定中的夹竹桃苷对黄夹次苷乙(对照)的比较评价获得的浓度-反应数据(实施例11)，其中在那些物质的存在或不存在下，在氧和葡萄糖剥夺(OGD)的5-6分钟后测定健康皮层神经元的数量。

[0050] 图1E示出如本文所述的神经保护基于脑切片的“中风”测定中包含夹竹桃苷的SCF提取物的浓度-反应测定的结果(实施例11)，其中无氧或葡萄糖剥夺用作对照。

[0051] 图2A-2C示出在神经保护基于脑切片的“非中风”测定中夹竹桃苷对黄花夹竹桃次苷B的比较评价的结果(实施例8)，其中在那些物质的存在或不存在下，无OGD测定健康皮层神经元的数量。

[0052] 图3A-3C示出在神经保护基于脑切片的“阿尔茨海默病”测定中夹竹桃苷对夹竹桃苷提取物的比较评价的结果(实施例9)，其中在不同量的那些物质的不存在或存在下，在APP/Aβ诱导的变性后测定健康皮层神经元的数量。

[0053] 图4A-4D示出来自神经保护基于皮层-纹状体共培养神经元的“亨廷顿病”测定中夹竹桃苷的比较评价的重复实验的结果(实施例10)，其中在不同量的夹竹桃苷的不存在或存在下，测定用亨廷顿蛋白(htt)的突变体形式转染的皮层神经元和纹状体神经元相对于对照的拯救百分比。

[0054] 图4E示出夹竹桃苷的浓度-反应曲线，这根据其拯救由于亨廷顿病转染的神经元

损伤和死亡的相对能力（结果来自体外测定；实施例 10）。

[0055] 图 5 示出如本文所述的延时的神经保护基于脑切片的“中风”测定的结果（实施例 13），其中 OGD 后满约 2、约 4 或约 6 小时后将“中风”的脑组织用包含强心苷的溶液（包含夹竹桃苷的 SCF 提取物）处理。

[0056] 图 6 示出在 CD1 小鼠中 i.p. 给予包含夹竹桃苷的 SCF 提取物（三角形，标识码：PBI-05204）和夹竹桃苷（圆形）后的 24 小时时间中，血浆和脑组织中夹竹桃苷的浓度 - 时间关系图。示出 5 只小鼠脑 (ng/g) 和血浆 (ng/ml) 中的平均值 ±SD 夹竹桃苷浓度。将 PBI-05204（38mg/kg，包含 0.8mg/kg 夹竹桃苷，50μl）和夹竹桃苷 (3mg/kg，100μl) 溶于 DMSO:PEG400 媒介物，50:50v/v（PBI-05204，28.6mg/ml）或 25:75v/v（夹竹桃苷，1mg/ml）。对照组仅接受 DMSO:PEG400 媒介物。在 0.5、1、2、4、8 和 24 小时，收获血浆和脑组织用于 LC/MS/MS 分析。PBI-05204 和夹竹桃苷给药后均观察到快速和持续的 CNS 渗透。

[0057] 图 7A 和 7B 示出如本文所述进行的神经保护基于脑切片的测定的结果。图 7A 示出显示夹竹桃苷的关系的浓度 - 反应曲线（灰色实心圆）。归一化至每次运行的内部阳性（非 OGD）与阴性 (OGD) 对照之间的差异的 6 次运行的纲要 (compendium) 设为 100%；示出平均值 ±SEM。来自 Wang 等人 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006), 103 (27), 10461-10466) 的黄夹次苷乙（空心方形）的浓度关系在这里重新打印用于比较。图 7B 示出显示 PBI-05204 的关系的浓度反应曲线（黑色实心方形）。归一化至每次运行的内部阳性（非 OGD）与阴性 (OGD) 对照之间的差异的 13 次运行的纲要设为 100%；示出平均值 ±SEM。将来自图 7A 的夹竹桃苷的数据再作图于图 7B 中，推定 PBI-05204 提取物中 3% 的组分为夹竹桃苷。

[0058] 发明详述

[0059] 本发明提供一种通过向有需要的个体给予有效剂量的强心苷来治疗神经系统疾病状况的方法。根据最适合所述个体的剂量给药方案给予强心苷，所述剂量和剂量给药方案的适用性临床上根据常规临床实践以及所治疗的神经系统疾病状况的临床治疗终点来确定。

[0060] 在一些实施方案中，所治疗的神经变性病症或神经系统疾病状况具有与 Na,K-ATP 酶结合活性或者与细胞或组织内的 Na,K-ATP 酶失调相关的病因。在一些实施方案中，所治疗的神经变性病症或神经系统疾病状况具有与 HIF-1α 结合活性或者与细胞或组织内的 HIF-1α 失调相关的病因。这样的失调可以例如作为酶促活性程度的显著改变而发生。这又可以由酶功能、酶含量或者甚至受影响的组织内的分布的变化所致。

[0061] 根据本发明治疗的个体会表现出治疗应答。“治疗应答”表示作为用强心苷治疗的结果，患有所述疾病或病症的个体会获得至少一种以下临床益处：所述疾病或病症的改善，减少与所述疾病或病症相关的症状的发生，所述疾病或病症的部分缓解，所述疾病或病症的完全缓解，或者发展时间增加。换句话说，治疗应答可以是完全或部分治疗应答。

[0062] 治疗应答还可以描述为其中患有神经变性疾病的患者的生活质量改善。生活质量的改善可以例如通过与所述疾病相关的症状（例如震颤、不随意肌运动、丧失或部分丧失神经 - 肌肉协调、记忆保持等）的发生、频率或严重程度的降低而发生。

[0063] “预防具有风险的个体的群体中神经系统疾病状况的发生”表示所述神经系统疾病状况不会在预定时间期间，在人口学预定的具有患所述神经系统疾病状况风险的个体的群体中发生。在所述预定时间期间的预防由于根据本发明的方法向该群体中的个体给予强

心苷而发生。作为一个实例，当将包含强心苷的组合物给予具有患中风风险的个体的群体中的个体一段预定时间时，中风在所述预定时间期间，在那些个体中不会发生。特别地，将包含强心苷的组合物在一年的时间中长期给予具有患阿尔茨海默病风险的个体的群体，并且该群体中的个体在那一年时间期间不表现出与阿尔茨海默病相关的症状。

[0064] “降低具有风险的个体的群体中发生神经系统疾病状况的发病率”含义上与“预防发病率”相关，除了“降低发生的发病率”允许在人口学上预定的个体的群体中发生所述神经系统疾病状况，但是以与其他方面人口学上相似的预定的具有风险的个体的群体（未根据本发明的方法给予包含强心苷的组合物）相比降低的发生率或严重程度发生。

[0065] 如本文所用，“发展时间”是疾病诊断（或治疗）后直至该疾病开始恶化的时间的时期、长度或持续时间。它是维持疾病的水平而没有所述疾病的进一步发展的时间，并且该时间在所述疾病再次开始发展时结束。疾病的发展通过在治疗之前或治疗开始时“分期”患有神经系统疾病状况的个体来确定。例如，在治疗之前或治疗开始时确定所述个体的神经系统健康。然后用强心苷治疗所述个体，并且定期监测神经系统健康。在某个之后的时间点，所述神经系统疾病状况的症状可以恶化，因此使得所述疾病发展并且“发展时间”结束。所述疾病不发展或者所述疾病的水平或严重程度不恶化的时间为“发展时间”。

[0066] 剂量给药方案包括根据剂量给药计划给予的一种或多种强心苷的治疗相关剂量（或有效剂量）。因此，治疗相关剂量是观察到所述疾病或病症对用强心苷治疗的治疗应答并且可以向个体给予强心苷而没有过量的不期望或有害的副作用的治疗剂量。治疗相关剂量对个体是非致死的，即使它可以在患者中引起一些副作用。它是对给予强心苷的个体的临床益处水平超过所述个体由于给予强心苷而经历的有害副作用水平的剂量。治疗相关剂量会根据各种建立的药理学、药效学和药物动力学原理随个体变化。但是，治疗相关剂量（例如，相对于夹竹桃苷）通常不超过 25、100、250、500 或 1000 微克强心苷 / 天，或者其可以在 25-500 或 25-1000 微克强心苷 / 天的范围中。本领域已知在个体中提供靶治疗结果所需的药物的实际量可以根据药学的基本原理随个体变化。

[0067] 治疗相关剂量可以根据通常用于治疗神经系统或神经变性疾病或病症的任何剂量给药方案来给药。治疗相关剂量可以每天一次、两次、三次或更多次的剂量给药计划给药。其可以每隔一天、每三天、每四天、每五天、每半周、每周、每两周、每三周、每四周、每月、每两个月、每半个月、每三个月、每四个月、每半年、每年或者根据任何上述时间的组合给药以达到合适的剂量给药计划。例如，治疗相关剂量可以每天一次给药一周或更多周。

[0068] 下文的实施例包括强心苷在神经系统疾病状况如神经系统疾病、神经系统病症和中风中的有效性的证据。实施例 3 详述用强心苷或者强心苷与一种或多种其他治疗剂的组合治疗阿尔茨海默病的方法。实施例 4 详述用强心苷或者强心苷与一种或多种其他治疗剂的组合治疗亨廷顿病的方法。实施例 5 详述用强心苷或者强心苷与一种或多种其他治疗剂的组合治疗中风介导的缺血性脑损伤的方法。

[0069] 一般来说，如下治疗患有神经系统疾病状况的个体。评价呈现神经系统疾病状况的个体以确定所述神经系统疾病状况是否为阿尔茨海默病、亨廷顿病、中风或其他神经系统疾病状况。指示给予强心苷。根据规定的剂量给药方案向所述个体给予初始剂量的强心苷一段时间。定期确定所述个体的临床应答和治疗应答水平。如果治疗应答水平在一个剂量下太低，则根据预定的剂量逐步提高计划逐步提高剂量直至实现所述个体中期望的治疗

应答水平。根据需要继续用强心苷治疗所述个体。剂量或剂量给药方案可以根据需要调整，直至患者达到期望的临床终点，例如疾病本身停止、疾病相关的症状减少、和 / 或疾病过程的发展减少。

[0070] 实施例 8 提供用来评价强心苷用于治疗中风介导的缺血性神经元损伤的有效性的体外测定的详细描述。该测定是氧和葡萄糖剥夺 (OGD) 的基于脑切片的测定，所述氧和葡萄糖剥夺用来诱导 24 小时时的健康皮层神经元的≥ 50% 损失。强心苷黄夹次苷乙 (3μM) 用作阳性对照。在 OGD 处理的脑切片 (中风模型，图 1A-1C) 和非 OGD 处理的脑切片 (非中风模型，图 2A-2C) 中测试夹竹桃苷。数据显示当脑切片 (神经元) 暴露于浓度范围为 0.1-3μM 的夹竹桃苷溶液时，夹竹桃苷提供大幅的神经保护。虽然全身剂量的夹竹桃苷之后在人脑中未进行直接测量，但是可以从夹竹桃提取物的 I 期研究中获得的数据以及以前在啮齿动物研究 (其中检查夹竹桃苷特异性穿越血脑屏障的能力) 中获得的数据假定达到人脑中夹竹桃苷的这个浓度的剂量水平会大概为约 1-10ng、约 3-6ng 或者约 4ng。

[0071] 在 SCF 提取物中存在除夹竹桃苷之外的一种或多种药理学活性组分的证据是通过比较包含纯夹竹桃苷的溶液对包含 SCF 提取物的溶液的浓度 - 反应曲线来获得的。图 1D 示出如实施例 11 所述的神经保护基于脑切片的“中风”测定中包含纯夹竹桃苷的水溶液的浓度 - 反应测定的结果。所述水溶液中夹竹桃苷的浓度为 0.0069-230μg/ml。图 1E 示出如本文 (实施例 11) 所述的神经保护基于脑切片的“中风”测定中包含夹竹桃苷的 SCF 夹竹桃物种提取物的浓度 - 反应测定的结果。数据证实所述提取物比纯夹竹桃苷更有效，表明所述提取物包含提供神经保护的一种或多种药理学活性物质。

[0072] 实施例 11 提供用来评价所述提取物或其组合物用于治疗中风介导的缺血性神经元损伤的有效性的体外测定的详细描述。该测定是氧和葡萄糖剥夺 (OGD) 的基于脑切片的测定，所述氧和葡萄糖剥夺用来诱导 24 小时时的健康皮层神经元的≥ 50% 损失。夹竹桃物种 (例如欧洲夹竹桃) 的母体未分级的 SCF 提取物用作阳性对照。

[0073] 因此，本发明提供一种保护神经元免受氧减少 (depletion) 或氧 - 葡萄糖减少引起的活性损失的方法，所述方法通过将氧减少和 / 或葡萄糖减少的神经元暴露于有效量的夹竹桃苷或包含夹竹桃苷的提取物以最小化活性损失、降低活性损失率、阻止活性损失、减缓活性损失的发生、和 / 或保护暴露氧减少和 / 或葡萄糖减少条件影响的神经元功能。

[0074] 实施例 9 提供用来评价强心苷用于治疗阿尔茨海默病的有效性的体外测定的详细描述。该测定是 APP/Aβ 诱导的 (APP :淀粉样蛋白前体蛋白) 皮层椎体神经元变性的基于脑切片的测定。当被分泌酶切割时，APP 减小为 Aβ 肽，认为 Aβ 肽是 β- 淀粉样蛋白斑块形成的诱发因素。Aβ 蛋白与 β- 淀粉样蛋白斑块形成有关，并且认为其在阿尔茨海默病中如果不是病因便是标志。生物射弹转染用来将重要标记如 YFP (标记黄色荧光蛋白) 和疾病基因构建体引入脑切片中的相同神经元群体。将 YFP 与 APP 同种型共转染，在脑切片制备和转染后的 3-4 天的进程中导致皮层椎体神经元的进行性变性。数据 (图 3A-3C) 显示夹竹桃苷和包含夹竹桃苷的 SCF 提取物向 APP 转染的脑切片提供浓度依赖性神经保护，从而拯救水平几乎为 BACE 抑制剂药物 (即 β 分泌酶抑制剂药物) 所提供的相同水平。β 分泌酶将 APP 前体蛋白切割为有毒的 Aβ- 蛋白。包含夹竹桃苷的 SCF 提取物看来提供比单独夹竹桃苷更大的神经保护。图 3A-3C 中的数据的重要性在于，文献中少有化合物或治疗策略在这种代表阿尔茨海默病的体外测定中表现出神经元的任何显著保护。数据显示诸

如夹竹桃苷的强心苷作为单一物质或者存在于用作单一疗法或与其他产物如 BASE 抑制剂联合的提取物中时对于治疗阿尔茨海默病是有效的。

[0075] 因此，本发明提供一种保护神经元免受阿尔茨海默病引起的活性损失的方法，所述方法包括：将表现出阿尔茨海默病特征的神经元暴露于有效量的夹竹桃苷或包含夹竹桃苷的提取物以最小化活性损失、降低活性损失率、阻止活性损失、减缓活性损失的发生、和 / 或使阿尔茨海默病影响的神经元保持关键功能 (critical functioning)。

[0076] 实施例 10 提供用来评价强心苷用于治疗亨廷顿病的有效性的测定的详细描述。将突变的 htt 蛋白通过电穿孔引入高密度的皮层神经元、纹状体神经元和神经胶质的混合共培养物。将纹状体和皮层神经元用不同颜色的荧光蛋白转染，从而促进共培养物中不同类型神经元的区分识别。有色荧光蛋白用适当波长的光源激活时有荧光并“发射”颜色。数据 (图 4A-4D) 显示就提供更大量的存活神经元而言，夹竹桃苷和包含夹竹桃苷的 SCF 提取物比 KW6002(腺苷 2a 受体拮抗剂) 更有效。因此，本发明提供一种保护神经元免受亨廷顿病引起的活性损失的方法，所述方法包括：将表现出亨廷顿病特征的神经元暴露于有效量的夹竹桃苷或包含夹竹桃苷的提取物以最小化活性损失、降低活性损失率、阻止活性损失、减缓活性损失的发生、和 / 或保护亨廷顿病影响的神经元的正常功能。

[0077] 实施例 13 详述示例性脑切片测定，其用作模型以评价强心苷在中风后的延迟期完成后治疗个体的中风的有效性。如本文所述通过氧葡萄糖剥夺进行脑切片测定；但是，在 0、1、2、4 和 6 小时的延迟期后用强心苷处理脑切片，而不是用强心苷预防性处理脑切片。图 5 中总结的数据证实强心苷如夹竹桃苷或包含夹竹桃苷的 SCF 提取物在中风后多达 1、多达 2、多达 3、多达 4、多达 5、多达约 6 小时的延迟期有效提供显著神经保护。

[0078] 因此，本发明提供一种通过在个体患有中风后向所述个体给予一定剂量的强心苷来治疗个体的中风的延时方法。在个体患有中风后的可接受的延迟时间内，根据初始剂量给药方案给予初始剂量的强心苷。然后，确定所述个体对用强心苷治疗的临床应答和 / 或治疗应答的充分性。如果所述个体的临床应答和 / 或治疗应答是充分的，则根据需要继续用强心苷治疗直至达到期望的临床终点。或者，如果所述个体的临床应答和 / 或治疗应答在所述初始剂量和初始剂量给药方案下是不充分的，则逐步提高或逐步降低所述剂量直至实现所述个体中期望的临床应答和 / 或治疗应答。剂量逐步提高或逐步降低可以与剂量给药方案中的改变联合进行，例如剂量给药频率或剂量给药总时间的改变。

[0079] 本文中的一些脑切片测定在这样的条件下进行，其中 OGD 之前将脑组织用强心苷处理。在那些条件下，数据建立预防性使用的强心苷提供针对中风引起的损伤的神经保护的效用。

[0080] 如果临床医师打算用强心苷与一种或多种其他治疗剂的组合治疗患有神经系统疾病状况的个体，并且已知所述个体患有的具体神经系统疾病状况对用所述一种或多种其他治疗剂治疗至少部分治疗应答，则本发明的方法包括：向有需要的个体给予治疗相关剂量的强心苷和治疗相关剂量的所述一种或多种其他治疗剂，其中所述强心苷根据第一剂量给药方案给药，而所述一种或多种其他治疗剂根据第二剂量给药方案给药。在一些实施方案中，所述第一和第二剂量给药方案是相同的。在一些实施方案中，所述第一和第二剂量给药方案是不同的。

[0081] 如果治疗的神经系统疾病状况为阿尔茨海默病，则所述一种或多种其他治疗剂可

以选自 BACE 抑制剂或乙酰胆碱酯酶抑制剂。在一些实施方案中，所述一种或多种其他治疗剂可以选自 Namenda™（盐酸美金刚）、Aricept™（多奈哌齐）、Razadyne™（加兰他敏）、Exelon™（利凡斯的明）和 Cognex™（他克林）。

[0082] 如果治疗的神经系统疾病状况为亨廷顿病，则所述一种或多种其他治疗剂可以选自天然产物、抗惊厥药、NMDA(n- 甲基 d- 天冬氨酸）受体拮抗剂和钠通道阻断剂。示例性物质包括维生素 E、巴氯芬 (CoQ10 的衍生物）、拉莫三嗪（抗惊厥药）、瑞马西胺（麻醉剂，其为低亲和力 NMDA 拮抗剂）和利鲁唑 (Na 通道阻断剂）。认为这些物质各自的有效性本身较低 (Mestre T.etal,Chochrane Database Systematic Reviews July 8,2009;8(3):CD006455)；但是，预期将包含夹竹桃苷或包含夹竹桃苷的提取物的剂型给予接受这些其他物质中的一种或多种的个体会向患有神经系统病症的个体提供与给予这些物质但未给予夹竹桃苷相比改善的临床效果。

[0083] 如果治疗的神经系统疾病状况为中风介导的缺血性脑损伤（缺血性中风），则除了本发明的基于夹竹桃苷或夹竹桃苷提取物的方法，可以采用文献 (Gutierrez M.et al.“Cerebral protection,brain repair,plasticity and celltherapy in ischemic stroke”Cerebrovasc.Dis.2009;27Suppl 1:177-186) 中公开的治疗方法，例如静脉溶栓。在一些实施方案中，所述一种或多种其他治疗剂可以选自药物如阿替普酶（溶栓剂）。

[0084] 所述一种或多种其他治疗剂可以根据临床医师认为治疗有效的剂量和剂量给药方案给药，或者以临床医师认为亚治疗有效的剂量给药。给予强心苷与一种或多种其他治疗剂的组合所提供的临床益处和 / 或治疗效果可以是加成或协同的，这样的益处或效果的水平通过比较给予所述组合与给予单独的强心苷以及一种或多种其他治疗剂来确定。所述一种或多种其他治疗剂可以根据食品和药物管理局、世界卫生组织、欧洲药品管理局 (E.M.E.A.)、治疗产品管理局 (TGA，澳大利亚）、泛美卫生组织 (PAHO)、药物和医疗器械安全局 (Medsafe，新西兰）或全世界各种卫生部建议或描述的剂量和剂量给药方案给药。

[0085] 强心苷可以是已知具有 Na,K-ATP 酶结合活性和 / 或 HIF-1α（低氧诱导因子 α）结合活性的任何强心苷。强心苷能够穿越血脑屏障，并且在给药之后在脑组织中保留一段延长的时间。在这点上，由于组织结合以及由此产生的低清除率，强心苷应当在给予所述强心苷之后在脑中保留至少 8 小时。

[0086] 强心苷可以纯的形式或者作为与一种或多种其他化合物的混合物存在。强心苷可以作为提取物存在。所述提取物可以通过超临界流体 (SCF) 二氧化碳 (CO_2) 提取来制备，或者是这样的提取物的化学改性形式（例如包含乙醇或者利用 SCF CO_2 和乙醇制备的提取物；实施例 1)。所述提取物可以通过用有机溶剂如乙醇、甲醇、丙醇或其他这样的溶剂提取植物原料来获得。所述提取物可以获得自植物或动物原料。所述动物原料可以是蟾蜍（例如蟾蜍 (Bufo bufo)）的溢泌物。所述植物原料可以是例如获得自夹竹桃物种如欧洲夹竹桃的植物物料，或者是黄花夹竹桃物种如黄花夹竹桃 (Thevetianeriifolia) 或黄花夹竹桃 (Thevetia puruviana)（也称为黄色夹竹桃）的植物物料。可以在按照 2005 年 2 月 15 日以 Addington 的名义提交的目前未决美国临时申请系列号 60/653,210 或 2006 年 1 月 26 日以 Addington 的名义提交的美国申请系列号 11/340,016、2006 年 7 月 28 日以 Addington 的名义提交的美国申请系列号 11/191,650（现在是 2008 年 7 月 22 日授权的美国专利第 7,402,325 号）、或 2006 年 7 月 26 日提交的 PCT 国际专利申请第 PCT/US06/29061 号所述

的方法制备的欧洲夹竹桃叶的干粉上实施所述提取方法，这些文献的全部公开援引加入本文或者通过本文所述的方法加入本文。

[0087] 除非另有说明，本文所用的术语“夹竹桃苷”表示夹竹桃苷的所有已知形式。夹竹桃苷可以外消旋、光学纯或光学富集的形式存在。例如，欧洲夹竹桃植物原料可以获自商业植物供应商如 Aldridge Nursery, Atascosa, Texas。

[0088] 我们的工作显示夹竹桃苷具有良好的穿越 BBB 的能力，并且一旦在脑组织中，在那里停留延长的时间。即夹竹桃苷在脑中的停留时间比考虑到这种分子从实验动物血浆的清除率而预期的停留时间长。因此，与水溶性强心苷如地高辛相比，夹竹桃苷在脑中相对长的停留时间提供这种脂溶性强心苷的明显优点。

[0089] 所述提取物可以通过包含强心苷的植物物料的改性（例如乙醇）或未改性的超临界流体提取来获得。超临界流体提取物可以包含至少一种其他强心苷药理学活性物质和 / 或至少一种其他非强心苷的药理学活性物质，当将所述提取物给予个体时，其有助于强心苷的治疗有效性。其可以加成或协同地有助于强心苷的治疗有效性。本文所用的术语“非强心苷的药理学活性物质”（或组分）表示不是强心苷的化合物。

[0090] 所述提取物可以通过各种不同方法制备。所述提取物可以根据 Dr. Huseyin Ziya Ozel（美国专利第 5,135,745 号）开发的方法制备，其描述在水中制备植物提取物的过程。所报道的水性提取物包含几种分子量为 2KD-30KD 的多糖、夹竹桃苷和夹竹桃苷元 (oleandrigenin)、奥多诺苷 (odoroside) 和夹竹桃它诺苷 (neritaloside)。所报道的多糖包括酸性均聚半乳糖醛酸或阿拉伯糖半乳糖醛酸。授予 Selvaraj 等人的美国专利第 5,869,060 号公开夹竹桃物种的热水提取物及其制备方法，例如实施例 2。然后可以将所得提取物冻干以制备粉末。美国专利第 6,565,897(Selvaraj 等人的美国授权前公开第 20020114852 号和 PCT 国际公开第 WO 2000/016793 号）公开用于制备基本上无菌的提取物的热水提取方法。Erdemoglu 等人 (J. Ethnopharmacol. (2003) Nov. 89(1), 123-129) 公开基于其抗疼痛和抗炎活性，包括欧洲夹竹桃在内的植物的水提取物和乙醇提取物的比较结果。Adome 等人 (Afr. Health Sci. (2003) Aug. 3(2), 77-86；乙醇提取物）、el-Shazly 等人 (J. Egypt Soc. Parasitol. (1996), Aug. 26(2), 461-473；乙醇提取物）、Begum 等人 (Phytochemistry (1999) Feb. 50(3), 435-438；甲醇提取物）、Zia 等人 (J. Ethnolpharmacol. (1995) Nov. 49(1), 33-39；甲醇提取物）、和 Vlasenko 等人 (Farmatsiia. (1972) Sept.-Oct. 21(5), 46-47；醇提取物）公开欧洲夹竹桃的有机溶剂提取物。Singh 等人的美国授权前专利申请公开第 20040247660 号公开用于治疗癌症的蛋白稳定的夹竹桃苷脂质体制剂的制备。Singh 等人的美国授权前专利申请公开第 20050026849 号公开包含环糊精的夹竹桃苷的水溶性制剂。Singh 等人的美国授权前专利申请公开第 20040082521 号公开从热水提取物制备夹竹桃苷的蛋白稳定的纳米颗粒制剂的方法。

[0091] SCF 提取可以在超临界流体中的改性剂如乙醇的存在下进行，以提高从植物物料提取期望的化合物。改性剂一般具有介于超临界流体与提取的化合物之间的挥发性，并且它们必须可与超临界流体混溶。在一些实施方案中，所述改性剂在环境条件下为液体。作为非限制性实例，改性剂可以选自乙醇、甲醇、丙醇、丙酮、乙酸乙酯、二氯甲烷等。

[0092] 所述提取物是药理学活性化合物如夹竹桃苷或其他强心苷、欧夹竹桃苷

(oleaside)以及其他植物原料的混合物。来自超临界流体方法的夹竹桃苷提取物按重量计包含理论范围为0.9%-2.5%的夹竹桃苷。已获得包含不同量的夹竹桃苷的SCF提取物。在一实施方案中,所述SCF提取物包括约2重量%的夹竹桃苷。

[0093] 所述SCF提取物可以包含各种组分的混合物。这些组分中的一些包括夹竹桃苷、欧夹竹桃苷A、夹竹桃苷元、夹竹桃它诺苷、奥多诺苷(odorside)(Wang X,Plomley JB,Newman RA and Cisneros A.LC/MS/MS analyses of anoleander extract for cancer treatment,Analytical Chem.72:3547-3552,2000)以及其他未鉴定的组分。所述SCF提取物的SCF可提取的未鉴定的组分可以包括至少一种其他强心苷药理学活性组分和/或至少一种其他非强心苷的药理学活性组分,其有助于所述SCF提取物中的夹竹桃苷的有效性。即至少一种其他SCF可提取的组分与夹竹桃苷加成或协同地发挥作用以提供所观察到的有效性。

[0094] 已确定包含夹竹桃苷或者夹竹桃苷和一种或多种其他药理学活性组分(强心苷和/或非强心苷)的提取物可以提供神经保护。因此本发明的SCF提取物包含夹竹桃苷以及本身可以是强心苷或非强心苷的一种或多种其他生物学活性组分(或者基本上由夹竹桃苷以及本身可以是强心苷或非强心苷的一种或多种其他生物学活性组分组成),其提供神经保护。

[0095] 在SCF提取物中存在除夹竹桃苷之外的一种或多种生物学活性组分的进一步证据是通过比较包含纯夹竹桃苷的水溶液对包含所述SCF提取物的水溶液的浓度-反应曲线来获得的。图1D示出如实施例11所述的神经保护基于脑切片的“中风”测定中包含纯夹竹桃苷的水溶液的浓度-反应测定的结果。所述水溶液中夹竹桃苷的浓度为0.0069-230μg/ml。

[0096] 图1E示出如本文所述的神经保护基于脑切片的“中风”测定中包含夹竹桃苷的SCF提取物的浓度-反应测定的结果。数据证实所述提取物比纯夹竹桃苷更有效,表明所述提取物包含提供神经保护的一种或多种药理学活性物质。

[0097] 如通过本文所包括的测定中的有效性确定的,可能所述提取物的相对性能也不同。即便如此,如果强心苷以足够高的量或浓度存在于提取物中以能够制备治疗相对剂量,则该提取物考虑为本发明的一部分。

[0098] 强心苷可以配制为任何合适的药学可接受的剂型。肠胃外、耳部、眼部、鼻部、可吸入、口腔、舌下、肠、局部、口服、经口以及可注射的剂型特别有用。具体剂型包括固体或液体剂型。示例性合适的剂型包括片剂,胶囊剂,丸剂,胶囊形片剂,锭剂,药囊,溶液剂,混悬剂,分散剂,小瓶,袋,瓶,可注射的液体,可i.v.(静脉内)、i.m.(肌肉内)或i.p.(腹腔内)给药的液体以及药物科学中的技术人员已知的其他这样的剂型。

[0099] 加入本发明的剂量的强心苷的量为至少一个或多个剂型,并且可以根据已知的药剂学原理来选择。有效量或治疗相关量的治疗化合物是明确预期的。术语“有效量”关于例如药品被理解为,药学有效量是预期的。药学有效量是足以产生需要或期望的治疗应答的活性成分的量或数量,或者换句话说,所述量在给予患者时足以引起可感知的生物学应答。所述可感知的生物学应答可以作为给予单剂量或多剂量的活性物质的结果发生。剂量可以包括一个或多个剂型。应当理解对于任何患者,具体的剂量水平取决于各种因素,包括所治疗的适应症、所述适应症的严重程度、患者健康、年龄、性别、重量、饮食、药理学应答、所用

的具体剂型以及其他此类因素。

[0100] 口服给药的期望剂量是高达 5 个剂型，尽管可以给予少至一个和多至十个剂型。示例性剂型每个剂型包含 0.6mg 的 SCF 提取物，总计每个剂量 0.6-60mg(1-10 剂量水平)。

[0101] 强心苷可以足以向个体提供 12-1200ug 或者更多或更少的夹竹桃苷初始剂量的量存在于剂型中。剂型可以包含 0.01-100mg 的夹竹桃苷、夹竹桃苷提取物或者包含夹竹桃苷的欧洲夹竹桃提取物。

[0102] 为了用于治疗哺乳动物，强心苷可以包含在剂型中。所述剂型的一些实施方案没有进行肠溶包衣，并且在 0.5-1 小时或更少的时间内释放它们负载的强心苷。所述剂型的一些实施方案经过肠溶包衣，并且在胃的下游如空肠、回肠、小肠和 / 或大肠（结肠）释放它们负载的强心苷。肠溶包衣剂型会在口服给药后 1-10hr 内将强心苷释放入全身循环。

[0103] 基于初期动物剂量给药数据，预期 50-75% 所给予的夹竹桃提取物剂量是可口服生物利用的，因此每个剂型提供 0.25-0.4mg、0.1-50mg、0.1-40mg、0.2-40mg、0.2-30mg、0.2-20mg、0.2-10mg、0.2-5mg、0.2-2.5mg、0.2-2mg、0.2-1.5mg、0.2-1mg、0.2-0.8mg、0.2-0.7 或 0.25-0.5mg 夹竹桃苷。考虑到成人的平均血容量为 5 升，预期的夹竹桃苷血浆浓度 为 0.05-2ng/ml、0.005-10ng/mL、0.005-8ng/mL、0.01-7ng/mL、0.02-7ng/mL、0.03-6ng/mL、0.04-5ng/mL 或 0.05-2.5ng/mL。存在于 SCF 提取物中的夹竹桃苷的推荐每日剂量一般为每天两次约 0.25- 约 50mg，或者每天两次或约每 12 小时约 0.9-5mg。所述剂量可以为约 0.5- 约 100mg/ 天、约 1- 约 80mg/ 天、约 1.5- 约 60mg/ 天、约 1.8- 约 60mg/ 天、约 1.8- 约 40mg/ 天。最大耐受剂量可以为约 100mg/ 天、约 80mg/ 天、约 60mg/ 天、约 40mg/ 天、约 38.4mg/ 天或者约 30mg/ 天的包含夹竹桃苷的夹竹桃提取物，并且最低有效剂量可以为约 0.5mg/ 天、约 1mg/ 天、约 1.5mg/ 天、约 1.8mg/ 天、约 2mg/ 天或者约 5mg/ 天。

[0104] 应当注意本文中的化合物可以在本发明的制剂中具有一种或多种功能。例如，化合物可以既作为表面活性剂又作为水混溶的溶剂或者既作为表面活性剂又作为水不混溶的溶剂。

[0105] 液体组合物可以包含一种或多种药学可接受的液体载体。所述液体载体可以是水性、非水性、极性、非极性和 / 或有机载体。通过实例而非限制的方式，液体载体包括水混溶的溶剂、水不混溶的溶剂、水、缓冲液以及它们的混合物。

[0106] 本文所用的术语“水溶性溶剂”或“水混溶的溶剂”可互换使用，指不会与水形成两相混合物或者可充分溶于水中以提供包含至少 5% 溶剂而液相不会分离的水性溶剂混合物的有机液体。所述溶剂适合给予人或动物。通过实例而非限制的方式，示例性的水溶性溶剂包括 PEG(聚（乙二醇))、PEG400(近似分子量为约 400 的聚（乙二醇))、乙醇、丙酮、烷醇、醇、醚、丙二醇、丙三醇、三醋精、聚（丙二醇）、PVP(聚（乙烯基吡咯烷酮))、二甲亚砜、N,N- 二甲基甲酰胺、甲酰胺、N,N- 二甲基乙酰胺、吡啶、丙醇、N- 甲基乙酰胺、丁醇、soluphor(2- 吡咯烷酮)、pharmasolve(N- 甲基 -2- 吡咯烷酮)。

[0107] 本文所用的术语“水不溶性溶剂”或“水不混溶的溶剂”可互换使用，指与水形成两相混合物或者当溶剂在水中的浓度超过 5% 时提供相分离的有机液体。所述溶剂适合给予人或动物。通过实例而非限制的方式，示例性水不溶性溶剂包括中链 / 长链甘油三酯、油、蓖麻油、玉米油、维生素 E、维生素 E 衍生物、油酸、脂肪酸、橄榄油、softisan 645(二甘油辛酸酯 / 癸酸酯 / 硬脂酸酯 / 羟基硬脂酸癸二酸酯)、miglyol、captex(Captex 350 :甘油

三辛酸酯 / 癸酸酯 / 月桂酸甘油三酯 ;Captex 355 :甘油三辛酸酯 / 癸酸甘油三酯 ;Captex 355EP/NF :甘油三辛酸酯 / 癸酸中链甘油三酯)。

[0108] 合适的溶剂列于“国际人用药品注册技术要求谐调会议 (ICH) 关于工业 Q3C 杂质的指导原则 :残余溶剂”(“International Conference on Harmonisationof Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use(ICH)guidance for industry Q3CImpurities:Residual Solvents”)(1997),其中推荐药品中何种量的残余溶剂被认为是安全的。示例性溶剂列为 2 类或 3 类溶剂。3 类溶剂包括例如乙酸、丙酮、茴香醚、1- 丁醇、2- 丁醇、乙酸丁酯、叔丁基甲基醚、枯烯、乙醇、乙基醚、乙酸乙酯、甲酸乙酯、甲酸、庚烷、乙酸异丁酯、乙酸异丙酯、乙酸甲酯、甲基 -1- 丁醇、甲基乙基酮、甲基异丁基酮、2- 甲基 -1- 丙醇、戊烷、1- 戊醇、1- 丙醇、2- 丙醇、或乙酸丙酯。

[0109] 可以在本发明中用作水不混溶的溶剂的其他材料包括 :Captex 100 :丙二醇二癸酸酯 ;Captex 200 :丙二醇二辛酸酯 / 二癸酸酯 ;Captex 200P :丙二醇二辛酸酯 / 二癸酸酯 ;丙二醇二辛酸癸酸酯 ;Captex 300 :甘油三辛酸酯 / 癸酸酯 ;Captex 300EP/NF :甘油三辛酸酯 / 癸酸中链甘油三酯 ;Captex350 :甘油三辛酸酯 / 癸酸酯 / 月桂酸酯 ;Captex 355 :甘油三辛酸酯 / 癸酸酯 ;Captex 355EP/NF :甘油三辛酸酯 / 癸酸中链甘油三酯 ;Captex 500 :三醋精 ;Captex 500P :三醋精 (药用级) ;Captex 800 :丙二醇二 (2- 乙基己酸酯) (2-Ethythexanoate) ;Captex 810D :甘油三辛酸酯 / 癸酸酯 / 亚油酸酯 ;Captex 1000 :甘油三癸酸酯 ;Captex CA :中链甘油三酯 ;Captex MCT-170 :中链甘油三酯 ;Capmul GMO :甘油单油酸酯 ;Capmul GMO-50EP/NF :甘油单油酸酯 ;Capmul MCM :中链甘油一酯 & 甘油二酯 ;Capmul MCM C8 :甘油单辛酸酯 ;Capmul MCM C10 :甘油单癸酸酯 ;Capmul PG-8 :丙二醇单辛酸酯 ;Capmul PG-12 :丙二醇单月桂酸酯 ;Caprol 10G1000 :十甘油 (decaglycerol) 十油酸酯 ;Caprol 3GO :三甘油单油酸酯 ;Caprol ET :混合脂肪酸的聚甘油酯 ;Caprol MPGO :六甘油二油酸酯 ;Caprol PGE 860 :十甘油单油酸酯、二油酸酯。

[0110] 本文所用的“表面活性剂”指包含极性或带电荷的亲水部分以及非极性的疏水 (亲脂) 部分的化合物 ;即表面活性剂是两性的。术语表面活性剂可以指一种化合物或者化合物的混合物。表面活性剂可以是增溶剂、乳化剂或分散剂。表面活性剂可以是亲水的或疏水的。

[0111] 亲水表面活性剂可以是适合用于药物组合物的任何亲水表面活性剂。这类表面活性剂可以为阴离子型、阳离子型、两性离子型或非离子型,但目前优选非离子型亲水表面活性剂。如上文所讨论的,这些非离子型亲水表面活性剂一般具有大于约 10 的 HLB 值。亲水表面活性剂的混合物也在本发明的范围内。

[0112] 相似地,疏水表面活性剂可以是适合用于药物组合物的任何疏水表面活性剂。一般来说,合适的疏水表面活性剂具有小于约 10 的 HLB 值。疏水表面活性剂的混合物也在本发明的范围内。

[0113] 其他合适的增溶剂的实例包括 :醇和多元醇如乙醇、异丙醇、丁醇、苯甲醇、乙二醇、丙二醇、丁二醇及其异构体、甘油、季戊四醇、山梨醇、甘露醇、二乙二醇单乙基醚 (transcutol)、异山梨醇二甲醚、聚乙二醇、聚丙二醇、聚乙烯醇、羟丙基甲基纤维素和其他纤维素衍生物、环糊精和环糊精衍生物 ;平均分子量为约 200 至约 6000 的聚乙二醇的醚,例如四氢糠醇 PEG 醚 (glycofurol,以商品名 Tetraglycol 购自 BASF) 或甲氧基

PEG(UnionCarbide)；酰胺，例如 2- 吡咯烷酮、2- 哌啶酮、己内酰胺、N- 烷基吡咯烷酮、N- 羟基烷基吡咯烷酮、N- 烷基哌啶酮、N- 烷基己内酰胺、二甲基乙酰胺和聚乙烯基吡咯烷酮；酯，例如丙酸乙酯、柠檬酸三丁酯、乙酰基柠檬酸三乙酯、乙酰基柠檬酸三丁酯、柠檬酸三乙酯、油酸乙酯、辛酸乙酯、丁酸乙酯、三醋精、丙二醇单乙酸酯、丙二醇二乙酸酯、己内酯及其异构体、戊内酯及其异构体、丁内酯及其异构体；和本领域已知的其他增溶剂，例如二甲基乙酰胺、异山梨醇二甲醚 (Arlasolve DMI(ICI))、N- 甲基吡咯烷酮 (Pharmasolve(ISP))、单辛精、二乙二醇单乙基醚 (以商品名 Transcutol 获自 Gattefosse) 和水。增溶剂的混合物也在本发明的范围内。

[0114] 除上述以外，本文提到的化合物可容易地从标准商业来源获得。

[0115] 澄清的液体组合物对于裸眼是视觉澄清的，因为基于该组合物的总重，其包含少于 5 重量 %、少于 3 重量 % 或少于 1 重量 % 的悬浮固体。

[0116] 尽管不必需，但本发明的组合物或试剂盒可以包含螯合剂、防腐剂、抗氧化剂、吸附剂、酸化剂、碱化剂、消泡剂、缓冲剂、着色剂、电解质、盐、稳定剂、张力调节剂、稀释剂、其他药物赋形剂或者它们的组合。

[0117] 本文所用的术语“抗氧化剂”表示抑制氧化并因此用来防止制剂被氧化过程破坏的物质。通过实例而非限制的方式，这类化合物包括抗坏血酸、抗坏血酸柠檬酸酯、维生素 E、维生素 E 衍生物、丁基化的羟基茴香醚、丁基化的羟基甲苯、次磷酸、一硫代甘油、没食子酸丙酯、抗坏血酸钠、亚硫酸氢钠、甲醛次硫酸钠、偏亚硫酸氢钠以及本领域技术人员已知的其他此类材料。

[0118] 本文所用的术语螯合剂表示螯合溶液中的金属离子的化合物。示例性螯合剂包括 EDTA(乙二胺四乙酸四钠)、DTPA(二亚乙基三胺五乙酸五钠)、HEDTA(N-(羟基乙基)- 乙二胺三乙酸的三钠盐)、NTA(次氮基三乙酸三钠)、乙醇二甘氨酸二钠 (Na_2EDG)、二乙醇甘氨酸钠 (DEGNa)、柠檬酸以及本领域技术人员已知的其他化合物。

[0119] 本文所用的术语“吸附剂”表示能够通过物理或化学 (化学吸附) 方式将其他分子保持在其自身表面上的物质。通过实例而非限制的方式，这类化合物包括粉末化和活化的炭以及本领域技术人员已知的其他材料。

[0120] 本文所用的术语“碱化剂”表示用来提供碱性介质的化合物。通过实例而非限制的方式，这类化合物包括氨溶液、碳酸铵、二乙醇胺、单乙醇胺、氢氧化钾、硼酸钠、碳酸钠、碳酸氢钠、氢氧化钠、三乙醇胺 (triethanolamine)、和三乙醇胺 (trolamine) 以及本领域技术人员已知的其他化合物。

[0121] 本文所用的术语“酸化剂”表示用来提供酸性介质的化合物。通过实例而非限制的方式，这类化合物包括乙酸、氨基酸、柠檬酸、富马酸和其他 α- 羟基酸、盐酸、抗坏血酸和硝酸以及本领域技术人员已知的其他化合物。

[0122] 本文所用的术语“消泡剂”表示防止或减少在填充组合物表面上形成的泡沫量的化合物或多种化合物。通过实例而非限制的方式，合适的消泡剂包括二甲硅油、SIMETHICONE、辛苯昔醇 (octoxynol) 以及本领域技术人员已知的其他化合物。

[0123] 本文所用的术语“缓冲剂”表示用来在稀释或者添加酸或碱时抵抗 pH 变化的化合物。通过实例而非限制的方式，这类化合物包括偏磷酸钾、磷酸钾、一碱价乙酸钠 (monobasic sodium acetate) 以及无水和脱水的柠檬酸钠以及本领域技术人员已知的其

他这样的材料。

[0124] 本文所用的术语“稀释剂”或“填充剂”表示用作填充剂以在制备片剂和胶囊时产生期望的体积、流动特性和压缩特征的惰性物质。通过实例而非限制的方式，这类化合物包括磷酸氢钙、高岭土、乳糖、蔗糖、甘露醇、微晶纤维素、粉末化的纤维素、沉淀的碳酸钙、山梨醇、和淀粉以及本领域技术人员已知的其他材料。

[0125] 本文所用的术语“防腐剂”表示用来防止微生物生长的化合物。通过实例而非限制的方式，这类化合物包括苯扎氯铵、苄索氯铵、苯甲酸、苯甲醇、西吡氯铵、三氯叔丁醇、苯酚、苯乙醇、硝酸苯汞、醋酸苯汞、硫柳汞、间甲酚、氯甲十四烷基吡啶、苯甲酸钾、山梨酸钾、苯甲酸钠、丙酸钠、山梨酸、麝香草酚、以及对羟基苯甲酸甲酯、乙酯、丙酯或丁酯以及本领域技术人员已知的其他化合物。

[0126] 本文所用的术语“着色剂”表示用来赋予药物制剂颜色的化合物。通过实例而非限制的方式，这类化合物包括 FD&C 红 No. 3、FD&C 红 No. 20、FD&C 黄 No. 6、FD&C 蓝 No. 2、FD&C 绿 No. 5、FD&C 橙 No. 5、FD&C 红 No. 8、焦糖和氧化铁（黑色、红色、黄色）、其他 FD&C 染料和天然着色剂如葡萄皮提取物、甜菜红粉末、β- 胡萝卜素、胭脂树红、胭脂红、姜黄、红辣椒、它们的组合以及本领域技术人员已知的其他这样的材料。

[0127] 本文所用的术语“稳定剂”表示用来稳定活性物质避免物理、化学或生化过程的化合物，否则这些过程会降低所述物质的治疗活性。通过实例而非限制的方式，合适的稳定剂包括白蛋白、唾液酸、肌酐、甘氨酸和其他氨基酸、烟酰胺、乙酰基色氨酸钠、氧化锌、蔗糖、葡萄糖、乳糖、山梨醇、甘露醇、甘油、聚乙二醇、辛酸钠和糖精钠以及本领域技术人员已知的其他化合物。

[0128] 本文所用的术语“张力调节剂”表示可以用来调整液体制剂的张力的化合物或多种化合物。合适的张力调节剂包括丙三醇、乳糖、甘露醇、右旋糖、氯化钠、硫酸钠、山梨醇、海藻糖以及本领域技术人员已知的其他化合物。

[0129] 本发明的组合物还可以包含油，例如不挥发性油、花生油、芝麻油、棉籽油、玉米油和橄榄油；脂肪酸，例如油酸、硬脂酸和异硬脂酸；以及脂肪酸酯，例如油酸乙酯、肉豆蔻酸异丙酯、脂肪酸甘油酯和乙酰化的脂肪酸甘油酯。所述组合物还可以包含醇，例如乙醇、异丙醇、十六醇、甘油和丙二醇；甘油缩酮，例如 2,2- 二甲基 -1,3- 二氧戊环 -4- 甲醇；醚，例如聚（乙二醇）450；石油烃，例如矿物油和矿脂；水；药学合适的表面活性剂、助悬剂或乳化剂；或者它们的混合物。

[0130] 应当理解用于药物制剂领域的化合物一般起到各种功能或目的。因此，如果本文所称的化合物仅被提及一次或被用来定义多于一个本文的术语，则其目的和功能不应当理解为仅限于该所称的目的或功能。

[0131] 所述制剂的一种或多种组分可以其游离碱或者药学或分析可接受的盐形式存在。如本文所用，“药学或分析可接受的盐”指已根据需要通过使其与酸反应以形成离子结合对而改性的化合物。可接受的盐的实例包括例如由无毒的无机酸或有机酸形成的常规无毒的盐。合适的无毒的盐包括来源于无机酸的那些盐，例如盐酸、氢溴酸、硫酸、磺酸、氨基磺酸、磷酸、硝酸以及本领域技术人员已知的其他无机酸。所述盐制备自有机酸如氨基酸、乙酸、丙酸、琥珀酸、乙醇酸、硬脂酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、扑酸、马来酸、羟基马来酸、苯乙酸、葡糖酸、苯甲酸、水杨酸、磺胺酸、2- 乙酰氧基苯甲酸、富马酸、甲苯磺

酸、甲磺酸、乙烷二磺酸、草酸、羟乙磺酸以及本领域技术人员已知的其他有机酸。其他合适的盐的列表可以在 Remington′ s Pharmaceutical Sciences, 17th.ed., MackPublishing Company, Easton, PA, 1985, p.1418 中找到，该文献的相关公开援引加入本文。

[0132] 短语“药学可接受的”在本文中用来指在合理的医学判断的范围内，适合用于与人类和动物的组织接触而没有过度毒性、刺激、过敏反应或者任何其他问题或并发症的、具有合理的利益 / 风险比的那些化合物、材料、组合物和 / 或剂型。

[0133] 剂型可以通过制药工业已知的任何常规方法制备。液体剂型可以通过在容器中提供至少一种液体载体以及夹竹桃苷或包含夹竹桃苷的提取物来制备。一种或多种其他赋形剂可以包含在所述液体剂型中。固体剂型可以通过提供至少一种固体载体以及夹竹桃苷或包含夹竹桃苷的提取物来制备。一种或多种其他赋形剂可以包含在所述固体剂型中。

[0134] 剂型可以利用常规包装设备和材料来包装。其可以包含在包装、瓶、小瓶 (via)、袋、注射器、封皮、包装盒、透明包装、盒、安瓿或其他这样的容器中。

[0135] 本发明包括一种改善患有神经系统疾病状况的个体的群体中统计学显著数量的个体的临床状态的方法，所述方法包括 :向所述个体的群体给予强心苷或包含强心苷的组合物 ;以及确定所述个体的临床状态。在一些实施方案中，所述统计学显著数量为所述群体的至少 5%、至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80% 或至少 90%。在一些实施方案中，所述组合物包含夹竹桃苷或包含夹竹桃苷的提取物。所述提取物任选包含一种或多种其他药理学活性化合物，其与夹竹桃苷协作以改善所述个体的临床状态。

[0136] 如本文所用，“衍生物”为 :a) 结构上与第一化学物质相关并且理论上可衍生自所述第一化学物质的化学物质 ;b) 由相似的第一化合物形成的化合物，或者可以想象产生自另一第一化合物的化合物，如果该第一化合物的一个原子被另一原子或原子基团代替 ;c) 衍生自或获得自母体化合物并包含所述母体化合物的必要元素的化合物 ;或者 d) 可以在一个或多个步骤中由具有相似结构的第一化合物制备的化合物。

[0137] 通过上文的描述和下文的实施例，本领域技术人员能够实施所要求保护的发明而无需进行过度的实验。参考下文的实施例会更好地理解上文的描述，这些实施例详述用于制备本发明实施方案的某些方法。对这些实施例的所有参考都是为了说明的目的。下文的实施例不应当被认为是穷举的，而仅仅说明本发明预期的许多实施方案中的极少数。

[0138] 夹竹桃苷可以购自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)。

实施例

[0139] 实施例 1 粉末化的夹竹桃叶的超临界流体提取

[0140] 方法 A. 用二氧化碳提取

[0141] 通过收获、洗涤和干燥夹竹桃叶原料，然后使所述夹竹桃叶原料通过如美国专利号 5,236,132、5,598,979、6,517,015 和 6,715,705 所述的那些粉碎和脱水设备来制备粉末化的夹竹桃叶。所用的起始原料的重量为 3.94kg。

[0142] 在提取装置中于 300 巴 (30MPa, 4351psi) 的压力和 50° C(122° F) 的温度下将起始原料与纯 CO_2 混合。总计使用 197kg 的 CO_2，以使溶剂比原料的比例为 50:1。然后使 CO_2 与原料的混合物通过分离装置，该装置改变混合物的压力和温度并从二氧化碳分离提

取物。

[0143] 所得的提取物 (65g) 为褐色、粘稠的粘性材料，具有美好的香气。颜色可能是由叶绿素引起的。对于确切收率测定，将管和分离器用丙酮漂洗，并且将丙酮蒸发以获得另外 9g 提取物。提取物总量为 74g。基于起始原料的重量，提取物的收率为 1.88%。利用高压液相色谱法和质谱法计算提取物中夹竹桃苷的含量为 560.1mg，或者收率为 0.76%。

[0144] 方法 B. 用二氧化碳与乙醇的混合物提取

[0145] 通过收获、洗涤和干燥夹竹桃叶原料，然后使所述夹竹桃叶原料通过如美国专利号 5,236,132、5,598,979、6,517,015 和 6,715,705 所述的那些粉碎和脱水设备来制备粉末化的夹竹桃叶。所用的起始原料的重量为 3.85kg。

[0146] 在提取装置中于 280 巴 (28MPa，4061psi) 的压力和 50° C(122° F) 的温度下将起始原料与纯 CO_2 和作为改性剂的 5% 乙醇混合。总计使用 160kg 的 CO_2 和 8kg 乙醇，以使溶剂比原料的比例为 43.6:1。然后使 CO_2、乙醇和原料的混合物通过分离装置，该装置改变混合物的压力和温度并从二氧化碳分离提取物。

[0147] 在除去乙醇后，所得的提取物 (207g) 为暗绿色、粘稠的粘性团块，明显包含一些叶绿素。基于起始原料的重量，提取物的收率为 5.38%。利用高压液相色谱法和质谱法计算提取物中夹竹桃苷的含量为 1.89g，或者收率为 2.1%。

[0148] 实施例 2 粉末化的夹竹桃叶的热水提取

[0149] 热水提取通常用来从夹竹桃叶提取夹竹桃苷和其他活性组分。热水提取方法的实例可以在美国专利第 5,135,745 号和第 5,869,060 号中找到。

[0150] 使用 5g 粉末化的夹竹桃叶进行热水提取。将 10 体积的沸水（按夹竹桃起始原料的重量计）加入粉末化的夹竹桃叶，并且将混合物持续搅拌 6 小时。然后将混合物过滤，收集叶残余物，并且在相同的条件下再提取。将滤液合并和冻干。提取物的外观为棕色。干燥的提取物材料重量为约 1.44g。将 34.21mg 提取物材料溶于水，并且利用高压液相色谱法和质谱法进行夹竹桃苷含量分析。夹竹桃苷的量测定为 3.68mg。基于提取物的量，夹竹桃苷收率计算为 0.26%。下表显示实施例 1 的两种超临界二氧化碳提取与热水提取的夹竹桃苷收率之间的比较。

[0151] 收率比较

[0152]

提取介质	基于提取物总重量的夹竹桃苷收率
超临界二氧化碳 :实施例 1，方法 A	0.76%
超临界二氧化碳 :实施例 1，方法 B	2.1%
热水提取 :实施例 2	0.26%

[0153] 实施例 3 治疗包括但不限于阿尔茨海默病的神经系统疾病状况

[0154] 方法 A. 强心苷治疗

[0155] 向呈现阿尔茨海默病的个体开强心苷，并且根据规定的剂量给药方案将治疗相关剂量给予所述个体一段时间。定期确定所述个体的治疗应答水平。如果治疗应答水平在一个剂量下太低，则根据预定的剂量逐步提高计划逐步提高剂量直至实现所述个体中期望的

治疗应答水平。根据需要继续用强心苷治疗所述个体，并且可以根据需要调整剂量或剂量给药方案，直至患者达到期望的临床终点。

[0156] 方法 B. 联合治疗：强心苷与另一物质

[0157] 按照上文的方法 A，除了向所述个体开处方并给予一种或多种其他治疗剂用于治疗阿尔茨海默病或其症状。所述一种或多种其他治疗剂可以在强心苷之前、之后或与其一起给药。还可以逐步提高（或逐步降低）所述一种或多种其他治疗剂的剂量。合适的一种或多种其他治疗剂包括 Namenda™（盐酸美金刚）、Aricept™（多奈哌齐）、Razadyne™（加兰他敏）、Exelon™（利凡斯的明）和 Cognex™（他克林）。

[0158] 实施例 4 治疗包括但不限于亨廷顿病的神经系统疾病状况

[0159] 方法 A. 强心苷治疗

[0160] 向呈现亨廷顿病的个体开强心苷，并且根据规定的剂量给药方案将治疗相关剂量给予所述个体一段时间。定期确定所述个体的治疗应答水平。如果治疗应答水平在一个剂量下太低，则根据预定的剂量逐步提高计划逐步提高剂量直至实现所述个体中期望的治疗应答水平。根据需要继续用强心苷治疗所述个体，并且可以根据需要调整剂量或剂量给药方案，直至患者达到期望的临床终点。给予的剂量可以与实施例 3 或本文其他地方描述的剂量相似。

[0161] 方法 B. 联合治疗：强心苷与另一物质

[0162] 按照上文的方法 A，除了向所述个体开处方并给予一种或多种其他治疗剂用于治疗亨廷顿病或其症状。所述一种或多种其他治疗剂可以在强心苷之前、之后或与其一起给药。还可以逐步提高（或逐步降低）所述一种或多种其他治疗剂的剂量。合适的一种或多种其他治疗剂包括维生素 E、巴氯芬 (CoQ10 的衍生物）、拉莫三嗪（抗惊厥药）、瑞马西胺（麻醉剂，其为低亲和力 NMDA 拮抗剂）和利鲁唑 (Na 通道阻断剂）。

[0163] 实施例 5 治疗包括但不限于缺血性中风的神经系统疾病状况

[0164] 方法 A. 强心苷治疗

[0165] 向呈现缺血性中风的个体开强心苷，并且根据规定的剂量给药方案将治疗相关剂量给予所述个体一段时间。定期确定所述个体的治疗应答水平。如果治疗应答水平在一个剂量下太低，则根据预定的剂量逐步提高计划逐步提高剂量直至实现所述个体中期望的治疗应答水平。根据需要继续用强心苷治疗所述个体，并且可以根据需要调整剂量或剂量给药方案，直至患者达到期望的临床终点。给予的剂量可以与实施例 3 或本文其他地方描述的剂量相似。

[0166] 方法 B. 联合治疗：强心苷与另一物质

[0167] 按照上文的方法 A，除了向所述个体开处方并给予一种或多种其他治疗剂用于治疗缺血性中风或其症状。所述一种或多种其他治疗剂可以在强心苷之前、之后或与其一起给药。还可以逐步提高（或逐步降低）所述一种或多种其他治疗剂的剂量。

[0168] 实施例 6 包含夹竹桃苷的溶液的 HPLC 分析

[0169] 使用下列条件在 HPLC(Waters) 上分析样品（夹竹桃苷标准品、SCF 提取物和热水提取物）：Symmetry C18 柱 (5.0μm，150×4.6mm I.D. ；Waters)；MeOH: 水 =54:46(v/v) 的流动相，并且流速为 1.0ml/min。检测波长设置为 217nm。通过将化合物或提取物溶于固定量的 HPLC 溶剂以实现夹竹桃苷的近似靶浓度来制备样品。

[0170] 实施例 7 测定正常神经元组织中的 α 3 和 α 1 表达

[0171] 可以按照 2008 年 11 月 6 日以 Phoenix Biotechnology, Inc. 的名义提交的 PCT 国际申请第 PCT/US08/82641 号所示的方法，该文献的整个公开援引加入本文。

[0172] 实施例 8 在中风和非中风的体外测定中评价强心苷

[0173] 方法 A. 中风：制备皮层脑切片和 OGD

[0174] 由 PND 7Sprague-Dawley 大鼠幼崽制备新皮层脑切片。将大脑皮层解剖，切为 400 微米厚的切片，并且在铺板 (plating) 之前转移入包含冷的具有 1uM MK-801 的人工脑脊液的容器；MK-801 并不包括在任何随后的过程中。为了利用瞬时氧 - 葡萄糖剥夺 (OGD) 模拟缺血性损伤，将来自各个脑的一个半球的切片在低 O_2(0.5%) 环境中暴露于不含葡萄糖、N_2 通气的人工脑脊液 7.5min。然后将 OGD 切片与来自对侧半球的对照切片并排放置在硝化纤维素或 Millicell(Millipore) 透性膜上，所述对照切片的制备相同，除了无 OGD。铺板后 30 分钟，将该脑切片对转染，转移至 24- 孔板，并且在加湿室中于 37° C 和 5%CO_2 下温育。在每个实验中，5-6 分钟的氧 - 葡萄糖剥夺 (OGD) 用来诱导 24hr 时的健康皮层神经元的 >50% 损失（比较图 1A 中的前两个柱）。设定浓度 (3μM) 的黄夹次苷乙用作内部阳性对照。对于夹竹桃苷，0.3-3μM 的全部三个浓度看来在前两个实验中均提供神经保护（图 1A 和 1B），因此在第三次运行中降低测试的夹竹桃苷浓度（图 1C），并且表明神经保护的阈浓度在 0.1 和 0.3μM 之间。

[0175] 方法 B. 非中风：脑切片测定

[0176] 在“非中风”脑切片上测试夹竹桃苷和 PBI-05204；即切片并用 YFP 转染但不使其通过 OGD 额外创伤的脑切片。参见上文所列的实验方法。我们观察到包括黄夹次苷乙在内的许多神经保护化合物可以向这类脑切片提供中等水平的神经保护，这可由保护免受切片过程和培养本身引起的创伤推测。可以在图 2A-2C 中看到，夹竹桃苷看来能够向这类“非 OGD”脑切片提供与黄夹次苷乙相似水平的神经保护，这表明强心苷甚至在氧或葡萄糖剥夺不存在的情况下仍介导神经保护。

[0177] 实施例 9 在阿尔茨海默病的体外 APP 测定中评价强心苷

[0178] 在 APP/Aβ 诱导的皮层椎体神经元变性的大鼠脑切片模型中，生物射弹转染不仅用来引入重要标记如 YFP，而且还用来将疾病基因构建体引入脑切片中的相同神经元群体。因此，APP/Aβ 脑切片模型共转染 YFP 与 APP 同种型，在脑切片制备和转染后 3-4 天的过程中导致皮层椎体神经元的进行性变性。在图 3A-3C 中的三个运行中可以看到，夹竹桃苷和 PBI-05204 看来均能够向 APP 转染的脑切片提供剂量依赖性神经保护，拯救至几乎为 BACE 抑制剂药物可以提供的水平。

[0179] 实施例 10 在亨廷顿病的体外皮层纹状体共培养测定中评价强心苷

[0180] 在这个测定中，代替使用完整脑切片，将突变的 htt 通过电穿孔引入排列在 96- 孔板中的皮层神经元、纹状体神经元和神经胶质的高密度的混合共培养物。这个测定平台的目标是组合复杂原代培养系统（其概括体内疾病相关神经元群体的相互关联性的关键方面）的生物学 / 临床相关性与进行大规模全自动筛选活动的能力。在这个测定中，在体外 1-2 周的过程中，转染的突变的 htt 构建体诱导纹状体和皮层神经元的进行性变性，随后利用 Cellomics Arrayscan VTI 平台上的自动图像获取和目标检测算法将其定量。利用在与治愈亨廷顿病倡议 (Cure Huntington's Disease Initiative) 联合进行的大规模筛选活

动中开发的方案，每个数据点均绘自6个孔，每个孔中有16个图像在Cellomics Arrayscan上被自动捕获、加工和分析。在整个运行中，在每个周期中采集并分析约25,000个图像，每周4个周期。

[0181] 皮层－纹状体共培养测定平台

[0182] 在神经元平板接种之前制备纯神经胶质培养物以建立具有汇合的神经胶质床的96-孔板。然后将皮层和纹状体组织分别分离，用适当的DNA构建体“核转染(nucleofecte)”，并且后来通过表达不同荧光蛋白如YFP、CFP和mCherry而可区分。然后将这些分别转染的皮层和纹状体神经元完全混合，并且平板接种入包含先前平板接种的神经胶质单层的96-孔板。

[0183] 在这个皮层－纹状体共培养平台中测试夹竹桃苷和PBI-05204(欧洲夹竹桃的超临界CO_2提取物)，并且这些化合物初步看来是目前我们观察到的在这个测定系统中已评价的>400种后期药物分子中最强的结果。为了比较，包括KW6002(腺苷2a受体拮抗剂)的剂量－反应图，KW6002是我们常规包括的作为这个共培养测定的阳性对照的化合物(参见图4E)。夹竹桃苷的有效性与KW6002持平，而其效价看来高约100倍。

[0184] 实施例11在中风和非中风的体外测定中评价强心苷和本发明的提取物

[0185] 方法A. 中风：制备皮层脑切片和OGD

[0186] 由PND 7Sprague-Dawley大鼠幼崽制备新皮层脑切片。将大脑皮层解剖，切为400-μ 厚的切片，并且在铺板之前转移入包含冷的具有1uMMK-801的人工脑脊液的容器；MK-801并不包括在任何随后的过程中。为了利用瞬时氧－葡萄糖剥夺(OGD)模拟缺血性损伤，将来自各个脑的一个半球的切片在低O_2(0.5%)环境中暴露于不含葡萄糖、N_2通气的人工脑脊液7.5min。然后将OGD切片与来自对侧半球的对照切片并排放置在硝化纤维素或Millicell (Millipore)透性膜上，所述对照切片的制备相同，除了无OGD。铺板后30分钟，将该脑切片对转染，转移至24-孔板，并且在加湿室中于37° C和5%CO_2下温育。在每个实验中，5-6分钟的氧－葡萄糖剥夺(OGD)用来诱导24hr时的健康皮层神经元的>50%损失。设定浓度(3μM)的黄夹次苷乙(强心苷)用作内部阳性对照。对于夹竹桃苷(强心苷)，0.3-3μM的全部三个浓度看来在前两个实验中均提供神经保护，因此在第三次运行中降低测试的夹竹桃苷浓度，并且表明神经保护的阈浓度在0.1和0.3μM之间。未分级的提取物(例如夹竹桃物种的未分级提取物)或其级分也可以如对夹竹桃苷所述使用。

[0187] 方法B. 非中风：脑切片测定

[0188] 在“非中风”脑切片上测试夹竹桃苷和PBI-05204(未分级的欧洲夹竹桃的SCF提取物)；即切片并用YFP转染但不使其通过OGD额外创伤的脑切片。参见上文所列的实验方法。我们观察到包括黄夹次苷乙在内的许多神经保护化合物可以向这类脑切片提供中等水平的神经保护，这可由保护免受切片过程和培养本身引起的创伤推测。数据证实夹竹桃苷和所述提取物看来能够向这类“非OGD”脑切片提供与黄夹次苷乙相似水平的神经保护，这表明强心苷甚至在氧或葡萄糖剥夺不存在的情况下仍介导神经保护。

[0189] 实施例12SCF提取物的HPLC分析

[0190] 这个测定的目的是鉴定包含强心苷的提取物。来自各提取物的样品分析如下。将提取物(1-3mg)溶于1-5ml的甲醇水溶液(水中的80%甲醇)。将稀释的样品(10-25μl)用Agilent Zorbax SB-C18柱分析，利用水中的80%甲醇作为流动相，流速为0.7mL/min，并

且在以下波长进行 DAD-UV 流出物监测 :203、210、217、230、254、280、310 和 300nm。当比较提取物样品与参考样品的保留时间和谱线 (spectra) 时,通过色谱图上的峰形成证实阳性鉴定。

[0191] 实施例 13 用于确定神经保护的延时脑切片测定

[0192] 根据实施例 11 进行这个测定,除了进行以下变化。在 OGD 和引入建议的神经保护剂之间允许指定的时间长度。如果治疗相对于 OGD 处理时间延迟,确定 PBI-05204 向脑切片提供神经保护的能力。数据显示欧洲夹竹桃提取物的 2hr 延迟被良好耐受,表现出与 OGD 处理后立即施用 PBI-05204 所达到的相似水平的神经保护。神经保护益处随 PBI-05204 给药的 4-6hr 延迟而减少,但仍在显著并生理学相关的神经保护水平。

[0193] 如本文所用,术语“约”或“大约”表示指定值的 ±10%、±5%、±2.5% 或 ±1%。如本文所用,术语“基本上”表示“很大程度上”或“至少大部分”或“超过 50%”。

[0194] 上文是本发明的具体实施方案的详细描述。应当理解,尽管本文为了说明的目的已描述本发明的具体实施方案,但在不背离本发明的精神和范围的情况下可以进行各种修改。因此,本发明只受所附权利要求书的限制。可以根据本公开进行和执行本文公开和要求保护的所有实施方案而无需进行过度的实验。

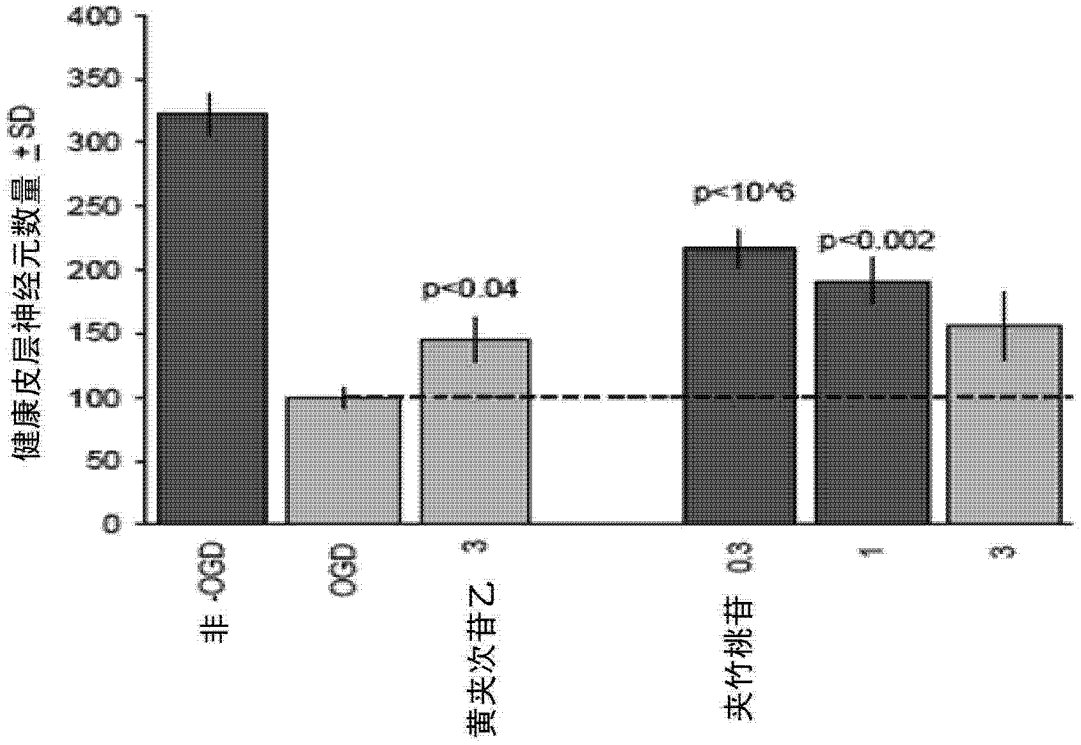

健康皮层神经元数量 ±SD
400
350
300
250
200
150
100
50
0
p<0.04
p<10^6
p<0.002
非-OGD
OGD
3
0.3
1
3
黄夹次苷乙
夹竹桃苷

图 1A

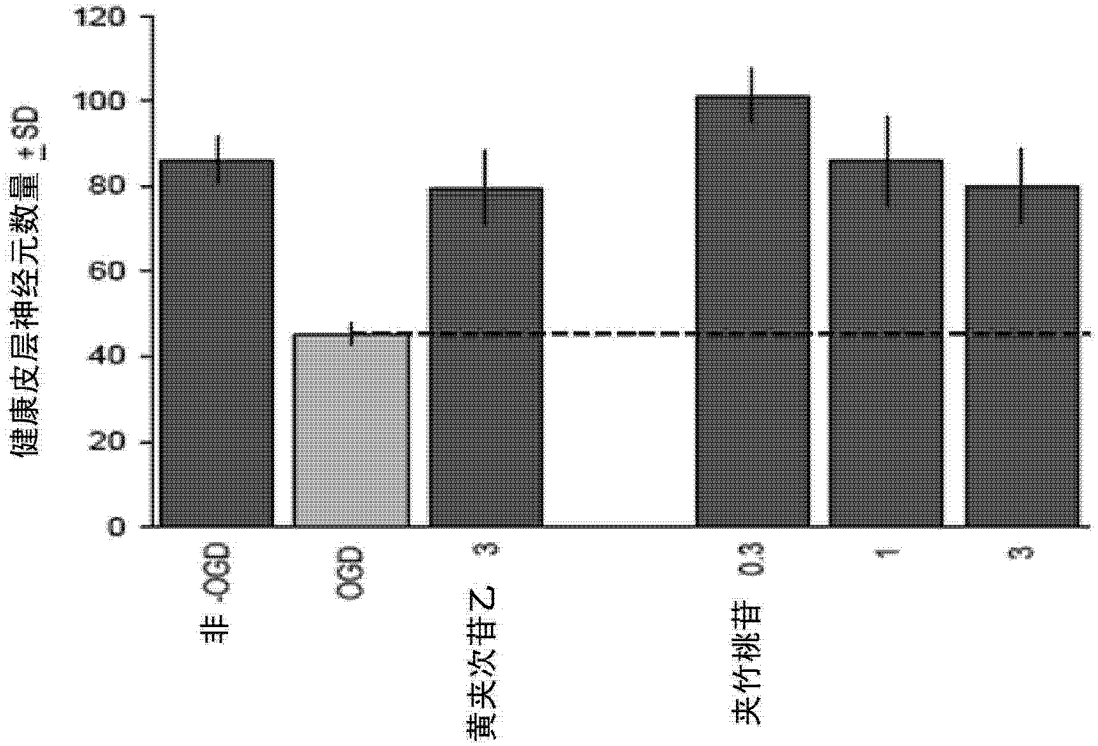

健康皮层神经元数量 ±SD
120
100
80
60
40
20
0
非-OGD
OGD
3
0.3
1
3
黄夹次苷乙
夹竹桃苷

图 1B

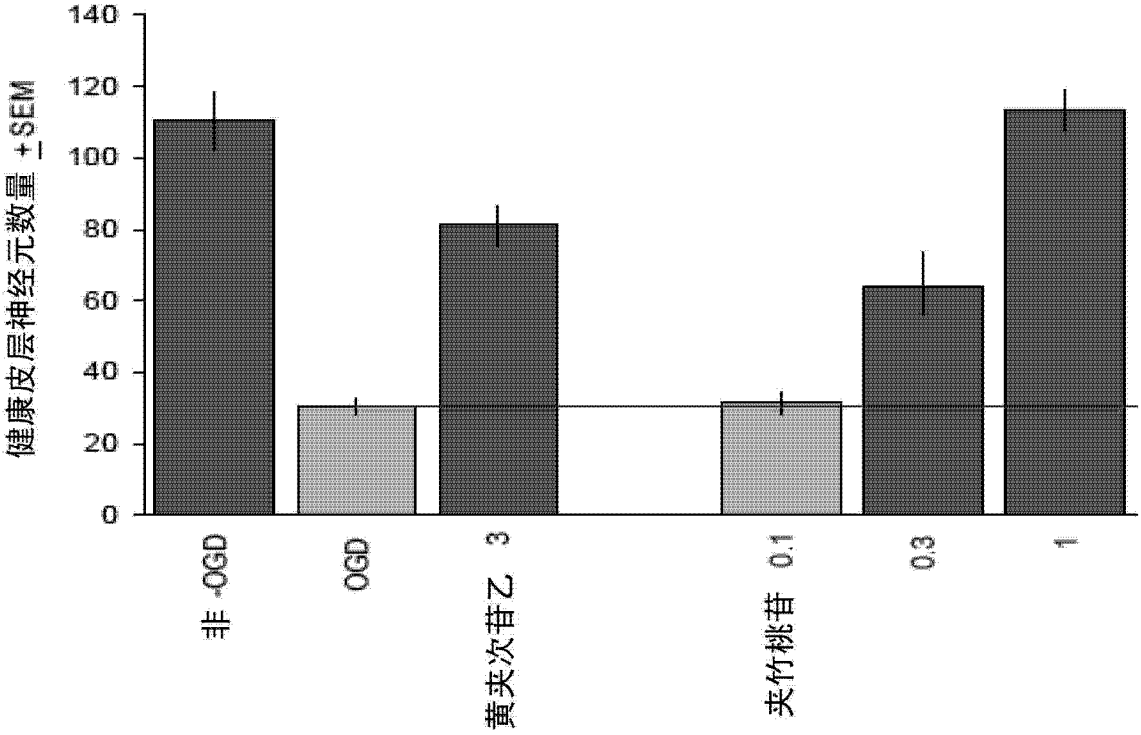

健康皮层神经元数量 ±SEM
140
120
100
80
60
40
20
0
非-OGD
OGD
黄夹次苷乙 3
夹竹桃苷 0.1
0.3
1

图 1C

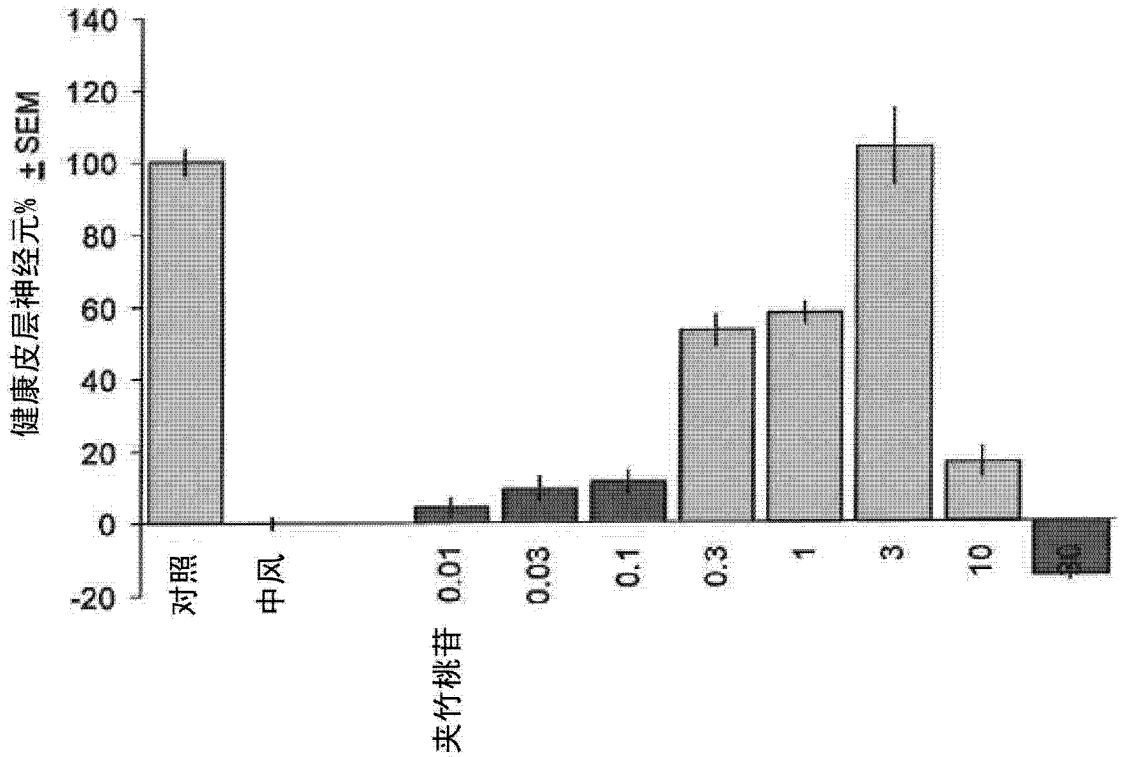

健康皮层神经元% ±SEM
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
对照
中风
夹竹桃苷 0.01
0.03
0.1
0.3
1
3
10
30

图 1D

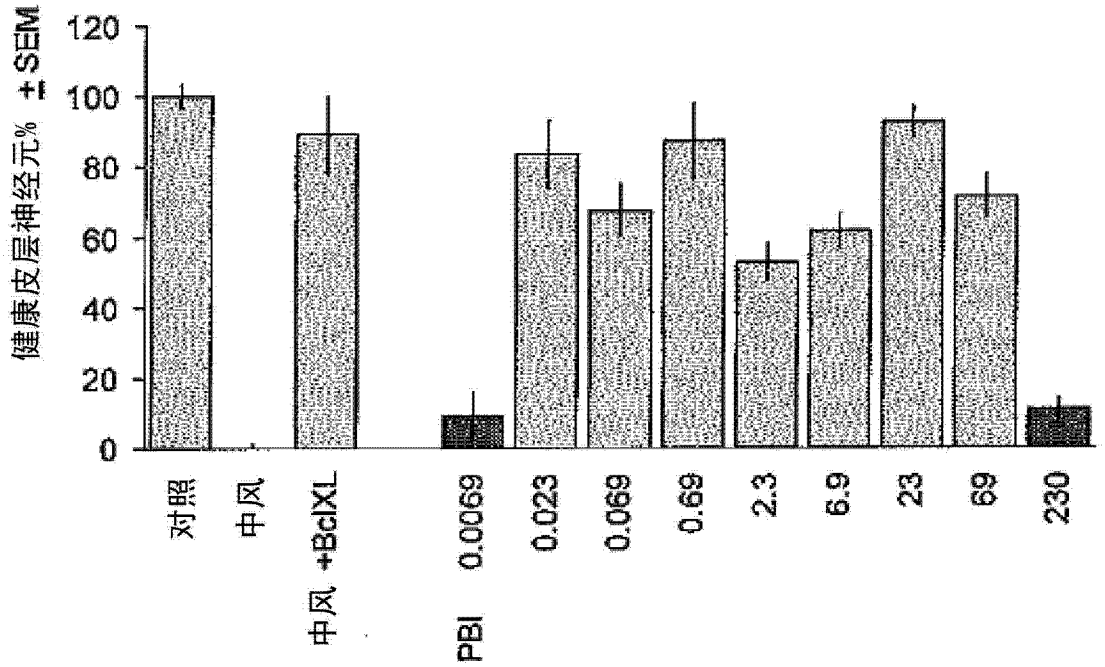

健康皮层神经元% +SEM
120
100
80
60
40
20
0
对照
中风
中风 +BclXL
PBI 0.0069
0.023
0.069
0.69
2.3
6.9
23
69
230

图 1E

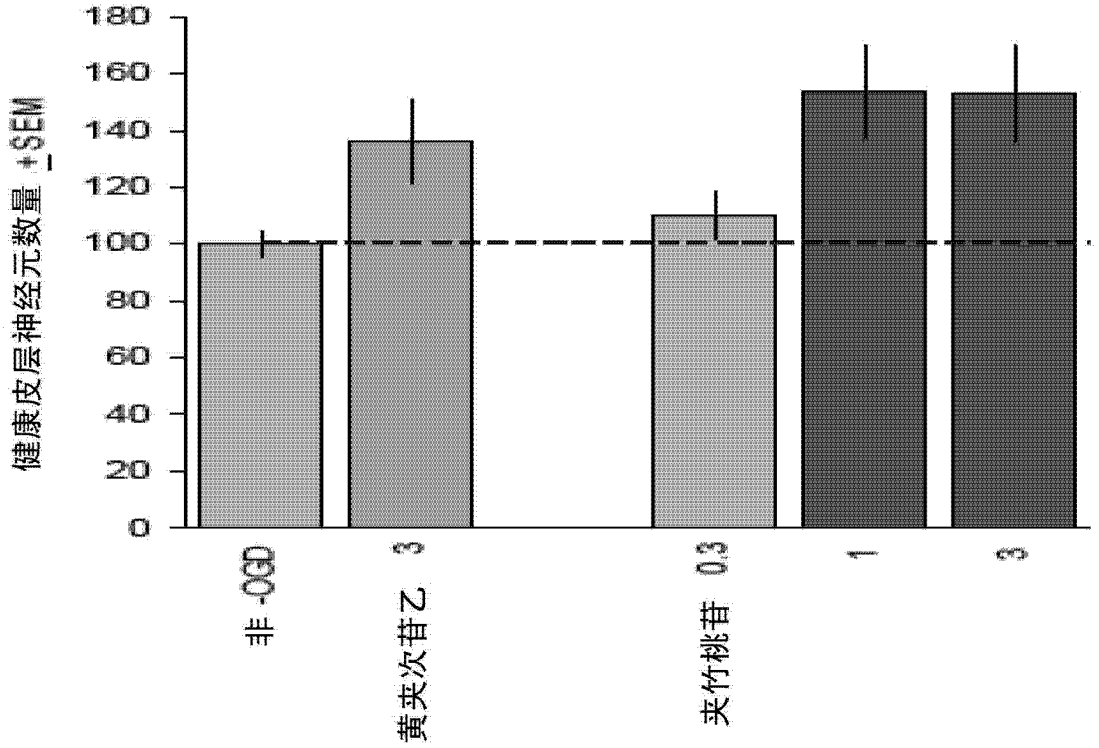
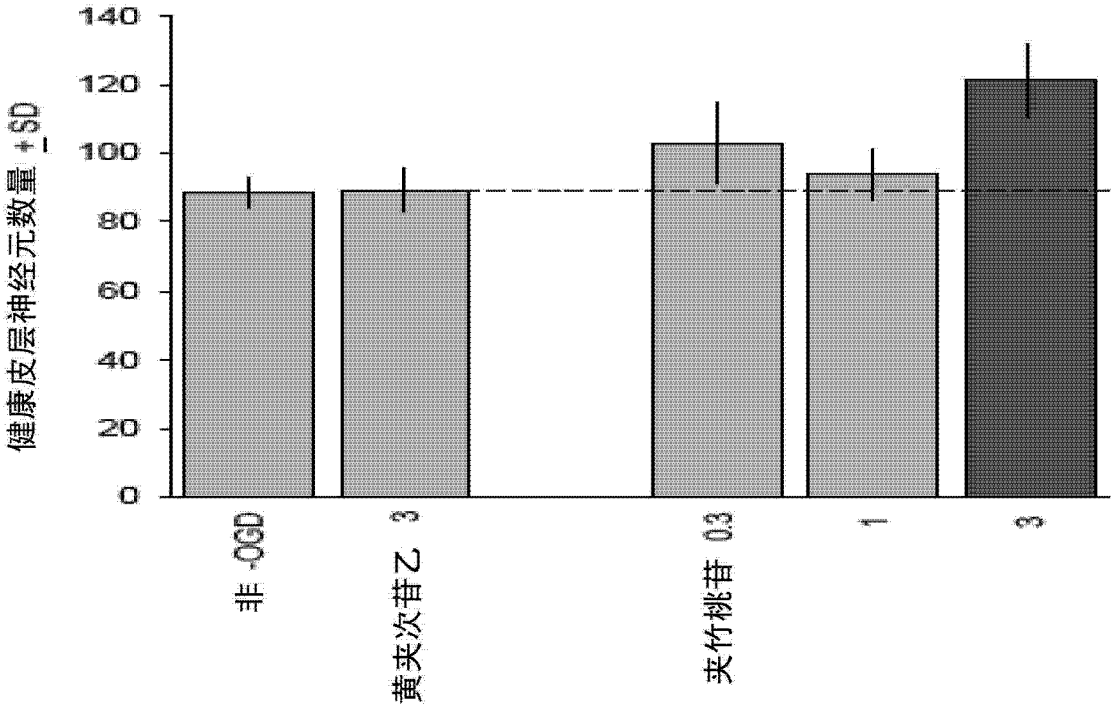
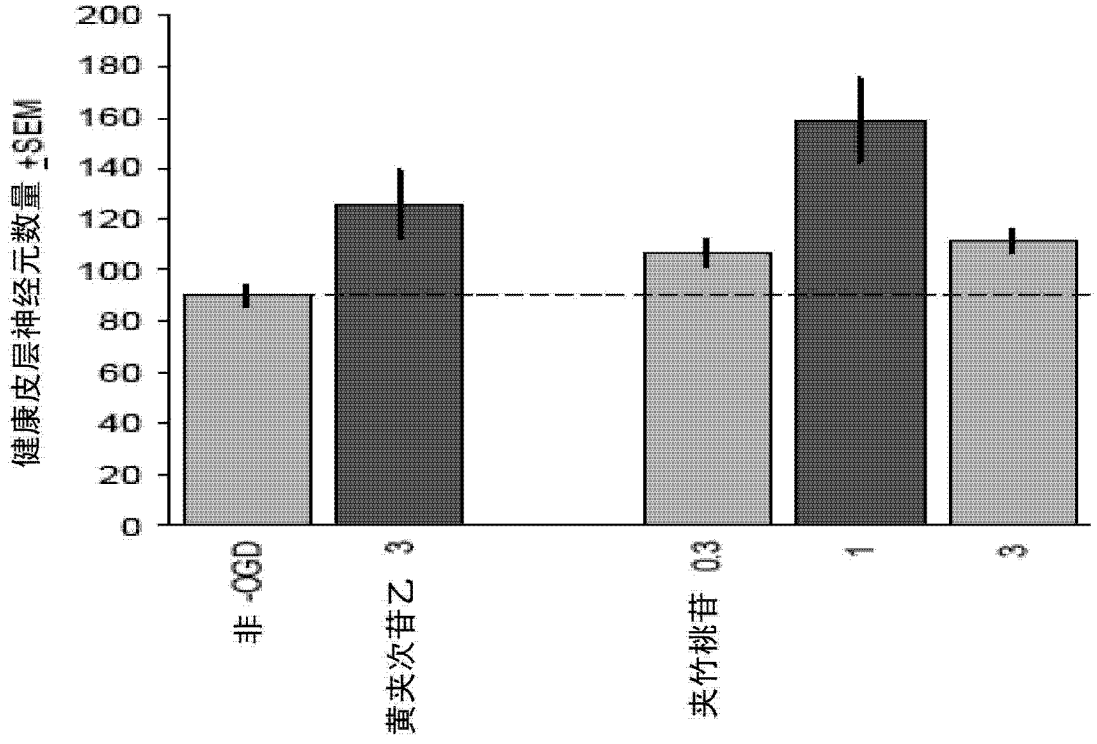

健康皮层神经元数量 +SEM
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
非 -OGD
黄夹次苷乙 3
夹竹桃苷 0.3
1
3
非中风：夹竹桃苷，运行1

图 2A



非中风：夹竹桃苷，运行2

图 2B



非中风：夹竹桃苷，运行3

图 2C

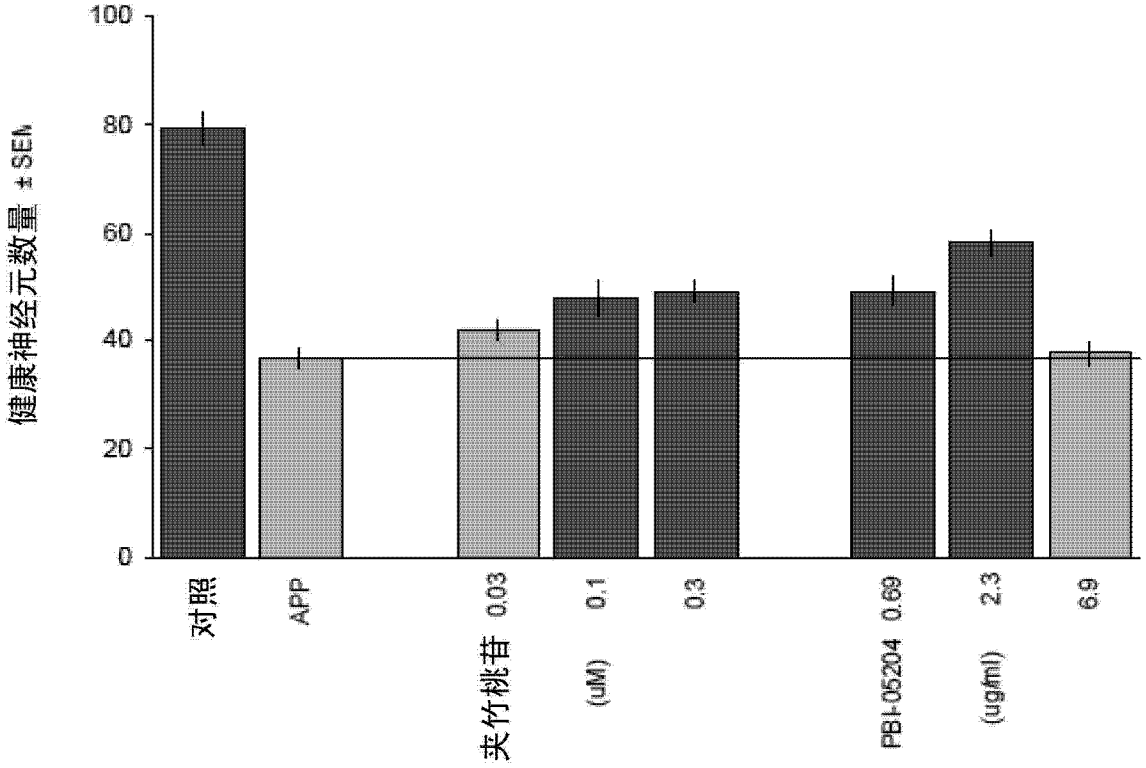

健康神经元数量 ±SEM
100
80
60
40
20
0
对照
APP
夹竹桃苷 0.03
0.1
(uM)
0.3
PBI-05204 0.69
2.3
(ug/ml)
6.9

图 3A

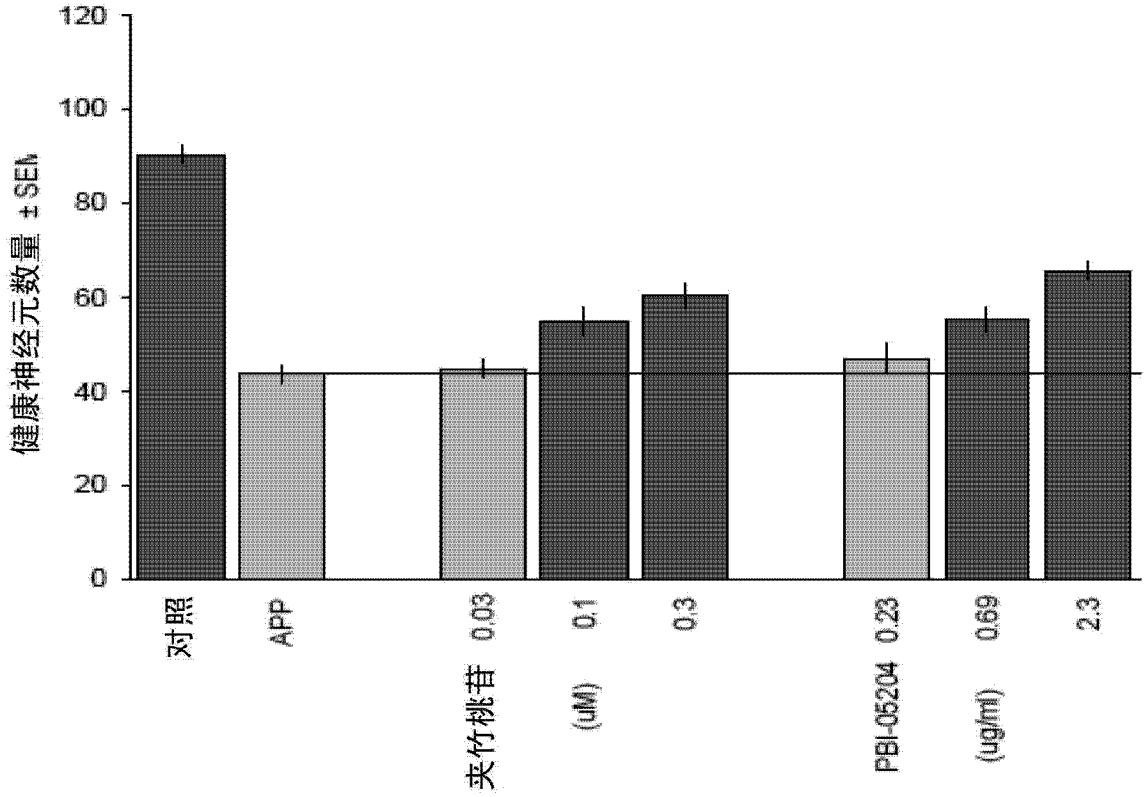

健康神经元数量 ±SEM
120
100
80
60
40
20
0
对照
APP
夹竹桃苷 0.03
0.1
(uM)
0.3
PBI-05204 0.23
0.69
(ug/ml)
2.3

图 3B

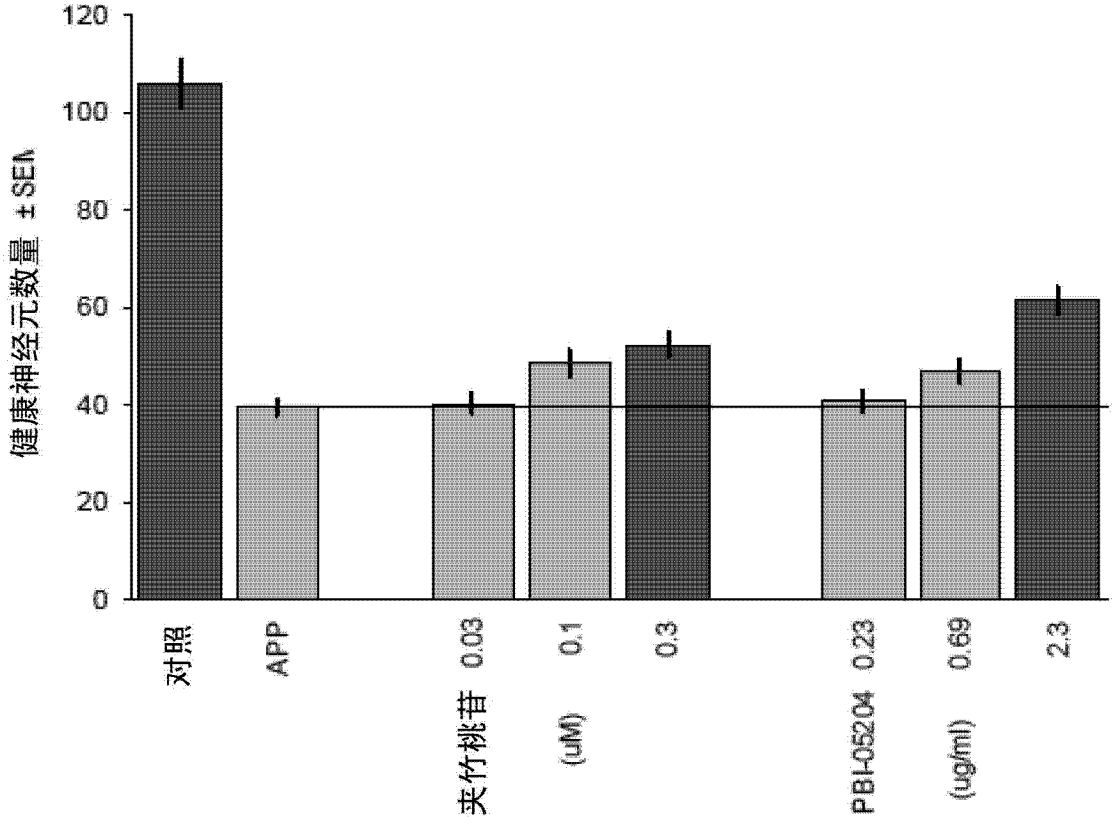

健康神经元数量 ±SEM
120
100
80
60
40
20
0
对照
APP
0.03
0.1
0.3
夹竹桃苷 (uM)
0.23
0.69
2.3
PBH-05204 (ug/ml)

图 3C

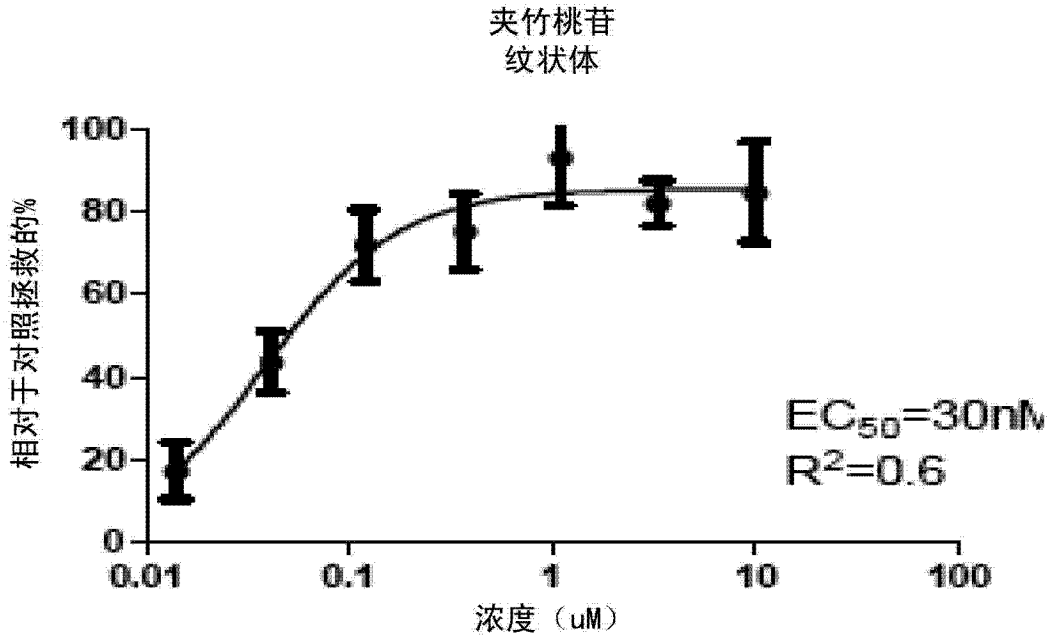

夹竹桃苷
纹状体
相对于对照拯救的%
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
100
浓度（uM）
EC50=30nM
R2=0.6

图 4A

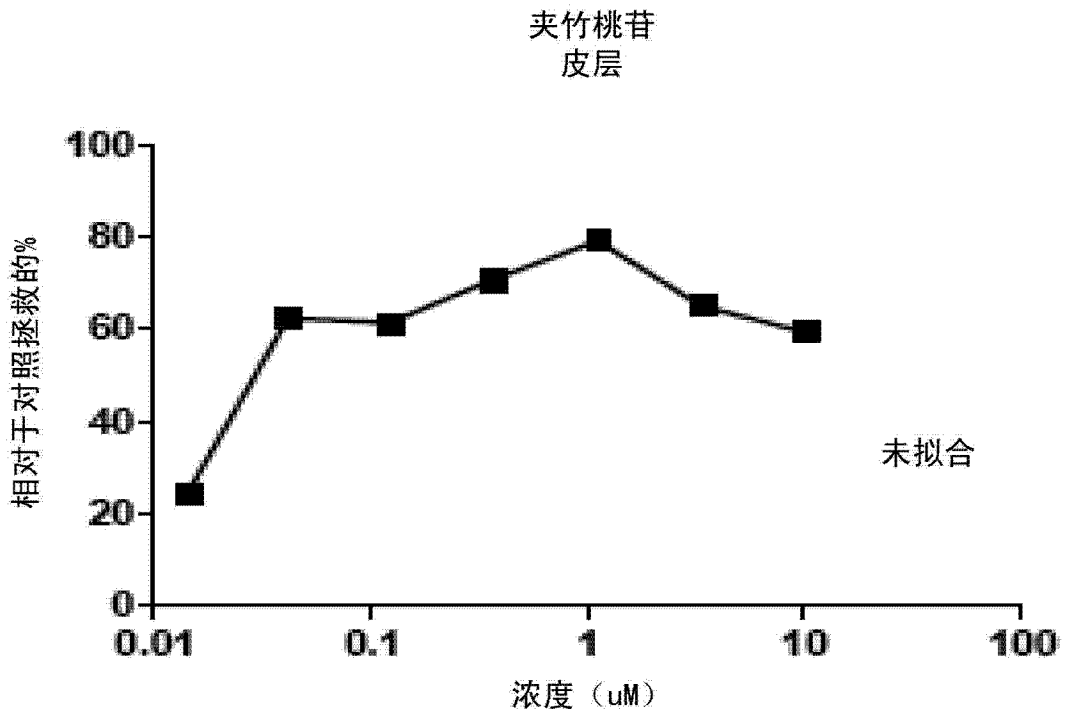

夹竹桃苷
皮层
100
80
60
40
20
0
相对于对照拯救的%
未拟合
0.01
0.1
1
10
100
浓度（uM）

图 4B

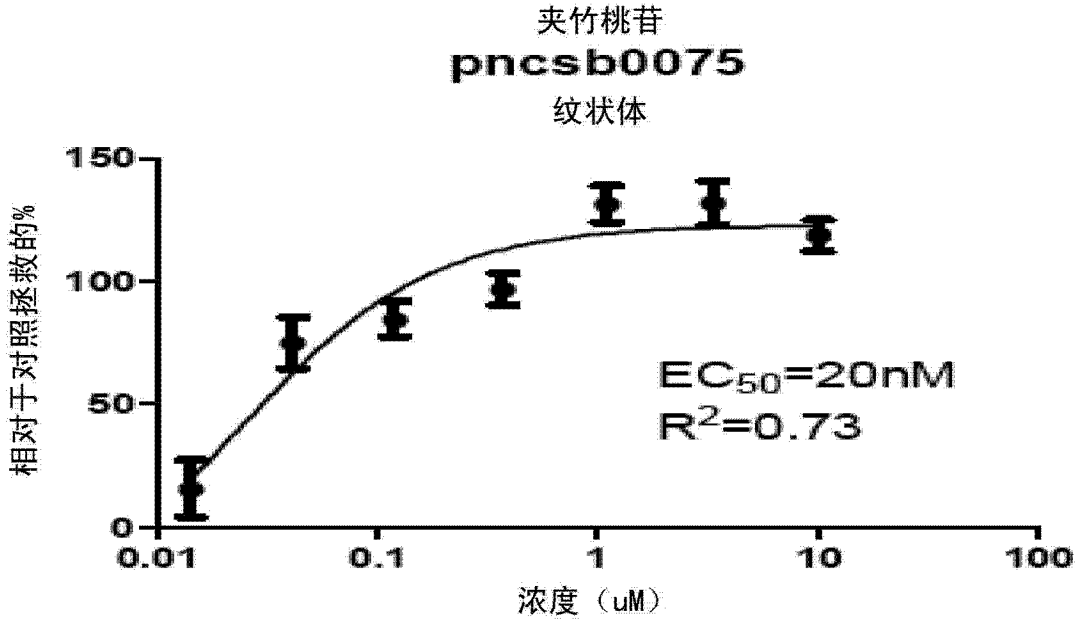

夹竹桃苷
pncsb0075
纹状体
150
100
50
0
相对于对照拯救的%
EC50=20nM
R2=0.73
0.01
0.1
1
10
100
浓度（uM）

图 4C

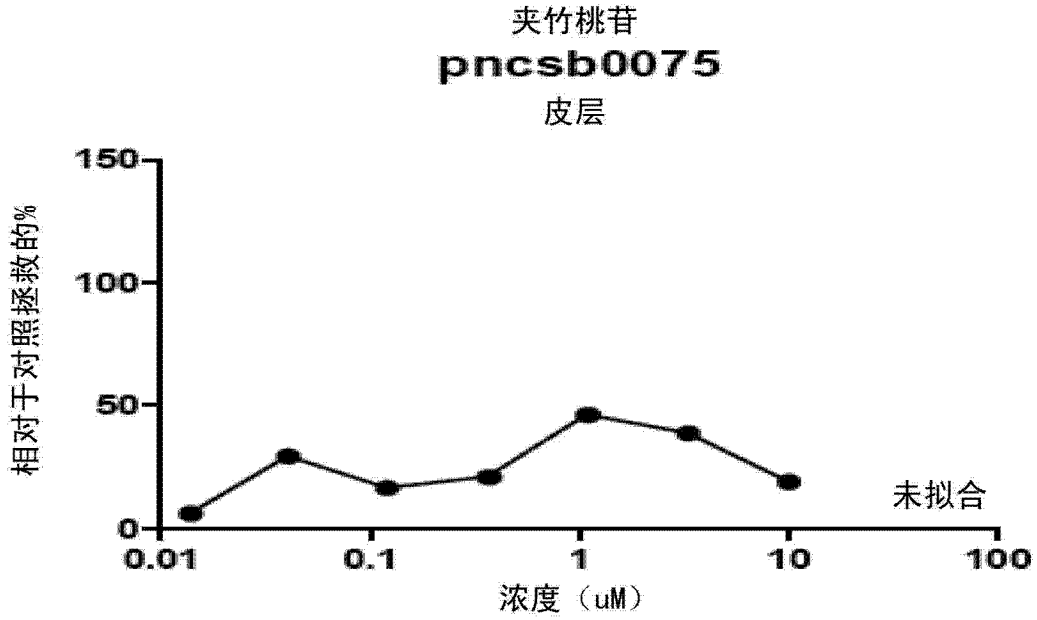

夹竹桃苷
pncsb0075
皮层
150
100
50
0
相对于对照拯救的%
未拟合
0.01
0.1
1
10
100
浓度（uM）

图 4D

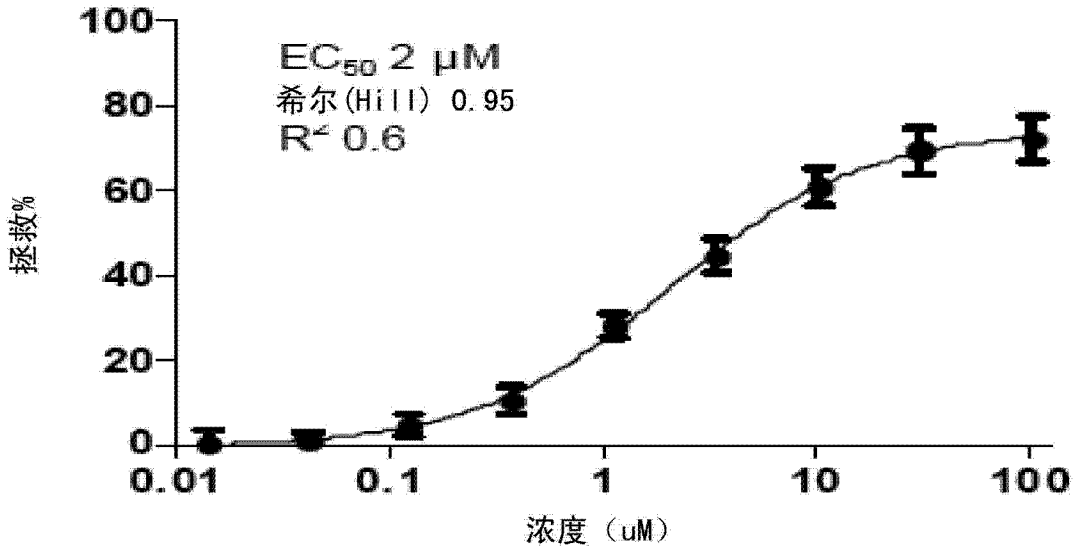

100
80
60
40
20
0
拯救%
EC50 2 μM
希尔(Hill) 0.95
R² 0.6
0.01
0.1
1
10
100
浓度（uM）

图 4E

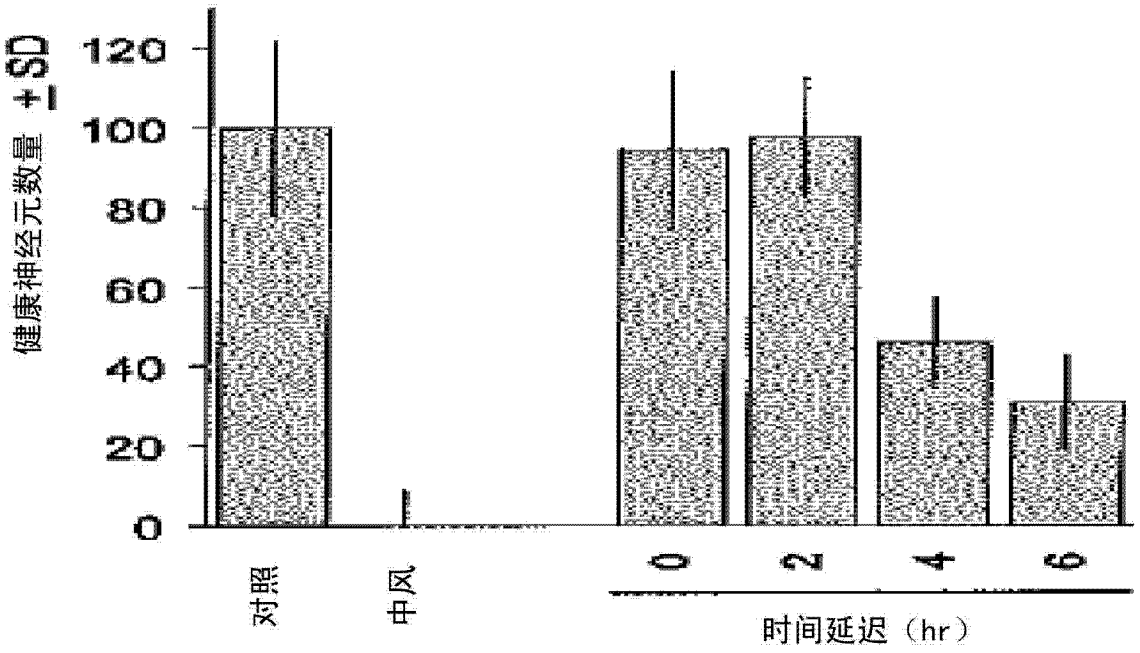

健康神经元数量 +SD
120
100
80
60
40
20
0
对照
中风
0
2
4
6
时间延迟（hr）

图 5

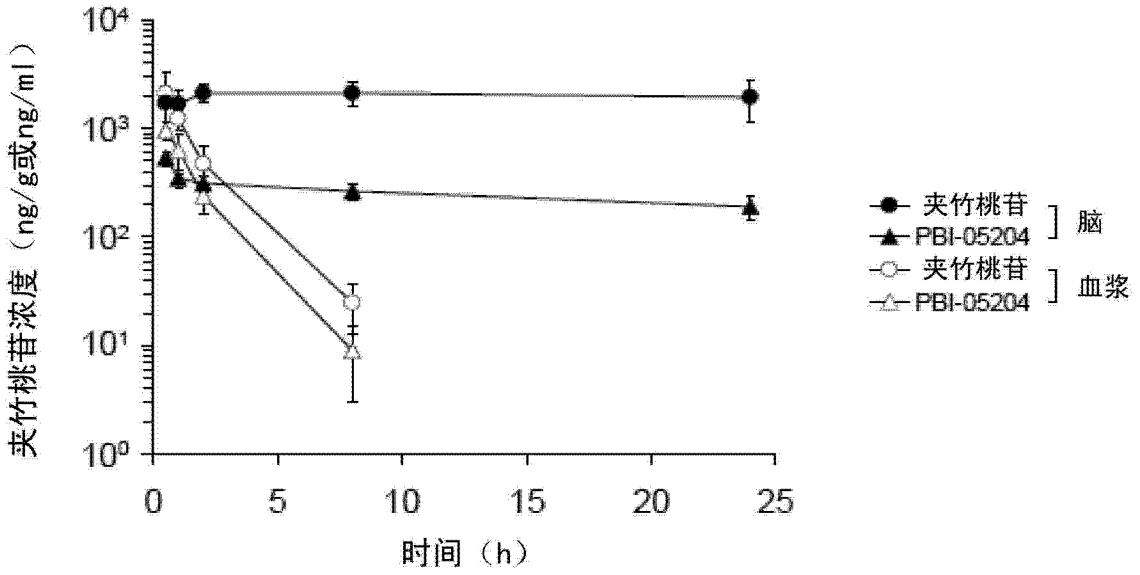

夹竹桃苷浓度（ng/g或ng/ml）
10⁴
10³
10²
10¹
10⁰
0
5
10
15
20
25
时间（h）
夹竹桃苷
PBI-05204
脑
夹竹桃苷
PBI-05204
血浆

图 6

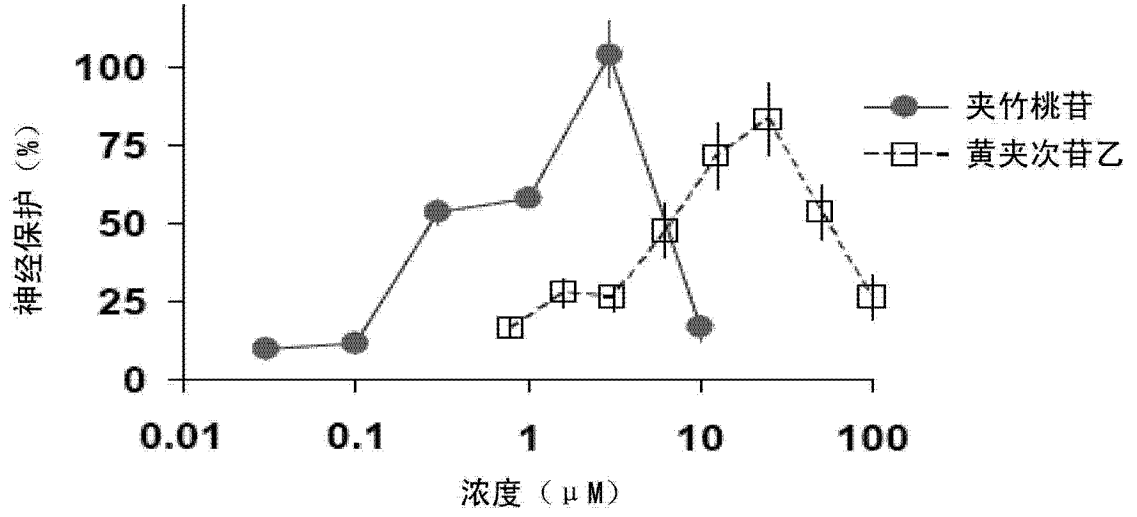

100
75
50
25
0
神经保护（%）
0.01
0.1
1
10
100
浓度（μM）
夹竹桃苷
黄夹次苷乙

图 7A

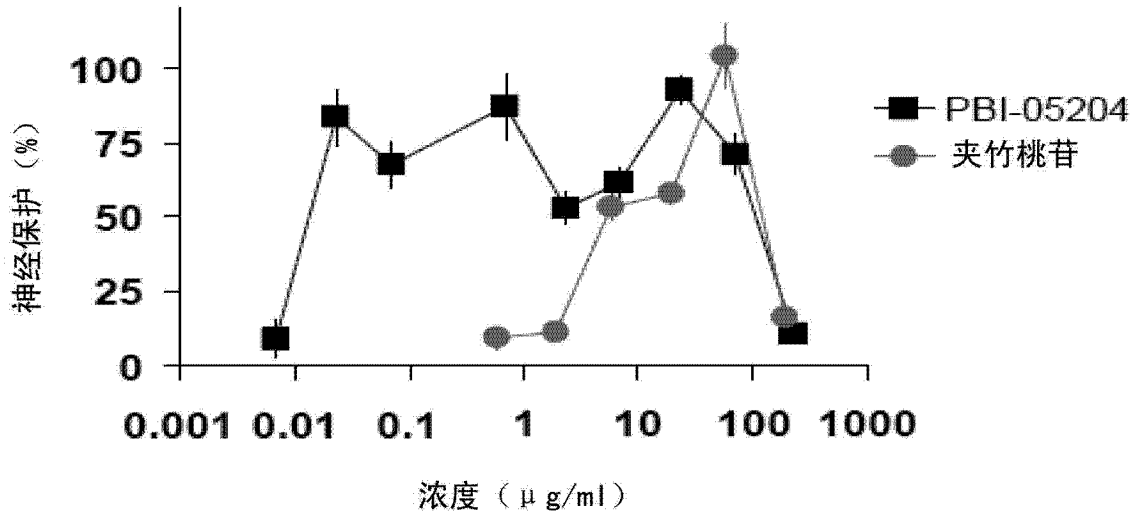

100
75
50
25
0
神经保护（%）
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
浓度（μg/ml）
PBI-05204
夹竹桃苷

图 7B