

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102834002 A

(43) 申请公布日 2012. 12. 19

(21) 申请号 201080060203. X

(22) 申请日 2010. 10. 29

(30) 优先权数据

61/256, 927 2009. 10. 30 US

61/265, 468 2009. 12. 01 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 06. 29

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/054872 2010. 10. 29

(87) PCT申请的公布数据

W02011/053876 EN 2011. 05. 05

(71) 申请人 麻省理工学院

地址 美国马萨诸塞州

申请人 麻省总医院

博德研究所

(72) 发明人 蔡立慧 管吉松

斯蒂芬·J·哈格蒂

爱德华·赫尔森 弗洛伦斯·瓦格纳

约翰内斯·格雷夫

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 顾晋伟 卢蓓

(51) Int. Cl.

A01N 37/12(2006. 01)

A61K 31/195(2006. 01)

权利要求书 4 页 说明书 37 页 附图 69 页

(54) 发明名称

CI-994 和地那林用于治疗记忆 / 认知和焦虑病症的用途

(57) 摘要

本发明涉及促进认知功能和 / 或治疗认知功能病症和受损的方法和组合物。特别地, 通过向对象施用 CI-994 或地那林或其可药用盐、酯、前药或代谢物实现所述方法。

1. 在有此需要的对象中治疗认知功能病症或受损的方法,其包括:
向所述对象施用 4-(乙酰氨基)-N-(2-氨基苯基)苯甲酰胺(CI-994)或其可药用盐、酯、前药或代谢物。
2. 在有此需要的对象中治疗认知功能病症或受损的方法,其包括:
向所述对象施用地那林或其可药用盐、酯、前药或代谢物。
3. 根据权利要求 1 或 2 的方法,其中向所述对象施用 CI-994 和地那林的组合。
4. 根据权利要求 1 或 2 的方法,其中所述对象还接受其他治疗以治疗所述病症。
5. 根据权利要求 1-4 中任一项的方法,其中以低于 15mg/m² 的剂量每天一次地连续 14 天施用 CI-994 和 / 或地那林。
6. 根据权利要求 1-4 中任一项的方法,其中每天一次地至少连续 2 天施用 CI-994 和 / 或地那林。
7. 根据权利要求 1-4 中任一项的方法,其中以 0.001mg/kg 至 50mg/kg 的剂量至少连续 2 天施用 CI-994 和 / 或地那林。
8. 根据权利要求 1-4 中任一项的方法,其中以至多 0.4mg/kg 的剂量至少连续 14 天施用 CI-994 和 / 或地那林。
9. 根据权利要求 1-4 中任一项的方法,其中以 0.001mg/kg 至 50mg/kg 的剂量至少连续 2、3、4、5、6 或 7 天施用 CI-994 和 / 或地那林。
10. 根据权利要求 1-4 中任一项的方法,其中每两天一次地施用 CI-994 和 / 或地那林。
11. 根据权利要求 1-4 中任一项的方法,其中一天中一次地施用 CI-994 和 / 或地那林,并且给药之间间隔至少 2 天。
12. 在有此需要的对象中治疗认知功能病症或受损的方法,其包括:向所述对象施用有效量的 4-(乙酰氨基)-N-(2-氨基苯基)苯甲酰胺(CI-994)、地那林或其可药用盐、酯或前药,其中 CI-994 或地那林经口、透皮、静脉内、经皮、皮下、经鼻、肌内、腹膜内、颅内或脑室内施用。
13. 根据权利要求 1-4 中任一项的方法,其中所述认知功能病症 / 受损与以下有关:阿尔茨海默氏病、亨廷顿病、癫痫引起的记忆丧失、精神分裂症、鲁宾斯坦 - 泰比综合征、雷特综合征、脆性 X 综合征、路易体痴呆、血管性痴呆、ADHD、诵读困难、与孤独症有关的双相型障碍以及社交、认知和学习病症、创伤性颅脑受损或注意力不集中症。
14. 根据权利要求 1-4 中任一项的方法,其中所述认知功能病症 / 受损与以下有关:焦虑症、条件反射恐惧反应、恐慌症、强迫症、创伤后应激障碍、恐惧症、社交焦虑症或物质依赖的恢复。
15. 根据权利要求 1-4 中任一项的方法,其还包括将所述对象暴露于认知行为疗法(CBT)、精神疗法、行为暴露治疗、虚拟现实暴露(VRE)或认知补救疗法。
16. 在有此需要的对象中治疗阿尔茨海默氏病的方法,其包括:
向所述对象施用 4-(乙酰氨基)-N-(2-氨基苯基)苯甲酰胺(CI-994)或其可药用盐、酯、前药或代谢物,其中以每天小于 15mg/m² 的剂量施用 CI-994。
17. 在有此需要的对象中治疗阿尔茨海默氏病的方法,其包括:
向所述对象施用地那林或其可药用盐、酯、前药或代谢物,其中以每天小于 15mg/m² 的剂量施用地那林。

18. 在有此需要的对象中治疗阿尔茨海默氏病的方法,其包括:
向所述对象施用有效量的 4-(乙酰氨基)-N-(2-氨基苯基)苯甲酰胺 (CI-994) 或其可药用盐、酯、前药或代谢物,其中每两天一次地施用 CI-994。
19. 在有此需要的对象中治疗亨廷顿病的方法,其包括:
向所述对象施用有效量的 4-(乙酰氨基)-N-(2-氨基苯基)苯甲酰胺 (CI-994) 或其可药用盐、酯、前药或代谢物。
20. 在有此需要的对象中治疗亨廷顿病的方法,其包括:
向所述对象施用有效量的地那林或其可药用盐、酯、前药或代谢物。
21. 根据权利要求 19 或 20 的方法,其中每两天一次地施用 CI-994 和 / 或地那林。
22. 根据权利要求 19 或 20 的方法,其中经口、透皮、经鼻或腹膜内施用 CI-994 和 / 或地那林。
23. 在有此需要的对象中治疗亨廷顿病的方法,其包括:
向所述对象施用有效量的 4-(乙酰氨基)-N-(2-氨基苯基)苯甲酰胺 (CI-994) 或其可药用盐、酯、前药或代谢物,其中根据病史、家族史或脑成像试验选择所述治疗方法。
24. 在有此需要的对象中治疗亨廷顿病的方法,其包括:
向所述对象施用有效量的地那林或其可药用盐、酯、前药或代谢物,其中根据病史、家族史或脑成像试验选择所述治疗方法。
25. 根据权利要求 23 或 24 的方法,其中不根据亨廷顿病生物标志物基因的表达水平选择所述治疗方法,所述亨廷顿病生物标志物基因选自 ANXA1、AXOT、CAPZA1、HIF1A、JJAZ1、P2Y5、PCNP、ROCK1 (p160ROCK)、SF3B1、SP3、TAF7 和 YIPPEE。
26. 改善正常对象中认知功能的方法,其包括:
向所述对象施用有效量的 4-(乙酰氨基)-N-(2-氨基苯基)苯甲酰胺 (CI-994) 或其可药用盐、酯、前药或代谢物。
27. 改善正常对象中认知功能的方法,其包括:
向所述对象施用有效量的地那林或其可药用盐、酯、前药或代谢物。
28. 根据权利要求 26 或 27 的方法,其中以低于 $15\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量每天一次地连续 14 天施用 CI-994 或地那林。
29. 根据权利要求 26 或 27 的方法,其中每两天一次地施用 CI-994 或地那林。
30. 根据权利要求 26 或 27 的方法,其中一天中一次地施用 CI-994 或地那林,并且给药之间间隔至少 2 天。
31. 根据权利要求 26 或 27 的方法,其中经口、透皮、静脉内、经皮、皮下、经鼻、肌内、腹膜内、颅内或脑室内施用 CI-994 或地那林。
32. 促进对象中恐惧消退的方法,其包括:
以有效促进恐惧消退的量向所述对象施用 4-(乙酰氨基)-N-(2-氨基苯基)苯甲酰胺 (CI-994) 或其可药用盐、酯、前药或代谢物。
33. 促进对象中恐惧消退的方法,其包括:
以有效促进恐惧消退的量向所述对象施用地那林或其可药用盐、酯、前药或代谢物。
34. 根据权利要求 32 或 33 的方法,其中每两天一次地施用 CI-994 或地那林。
35. 根据权利要求 32 或 33 的方法,其中通过经口、透皮、静脉内、经皮、皮下、经鼻、肌

内、腹膜内、颅内或脑室内途径施用 CI-994 或地那林。

36. 包含 4-(乙酰氨基)-N-(2-氨基苯基)苯甲酰胺 (CI-994) 或其可药用盐、酯、前药或代谢物的组合物,其配制用于经口、透皮、静脉内、经皮、皮下、经鼻、肌内、腹膜内、颅内或脑室内施用。

37. 包含 4-(乙酰氨基)-N-(2-氨基苯基)苯甲酰胺 (CI-994) 或其可药用盐、酯、前药或代谢物的组合物,其配制成每天一次至少连续 2、3、4、5、6 或 7 天的低于 0.001mg/kg 至 50mg/kg 的剂量。

38. 根据权利要求 37 所述的组合物,其中以 0.001mg/kg 至 15mg/kg 的剂量至少连续 2 天地施用 CI-994 和 / 或地那林。

39. 根据权利要求 37 所述的组合物,其中以至多 15mg/kg 的剂量至少连续 14 天施用 CI-994 和 / 或地那林。

40. 根据权利要求 37 所述的组合物,其中以 0.04mg/kg 的剂量施用 CI-994 和 / 或地那林。

41. 包含地那林或其可药用盐、酯、前药或代谢物的组合物,其配制用于经口、透皮、静脉内、经皮、皮下、经鼻、肌内、腹膜内、颅内或脑室内施用。

42. 包含地那林或其可药用盐、酯、前药或代谢物的组合物,其配制成每天一次连续 14 天的低于 15mg/m² 的剂量。

43. 药盒,其包括

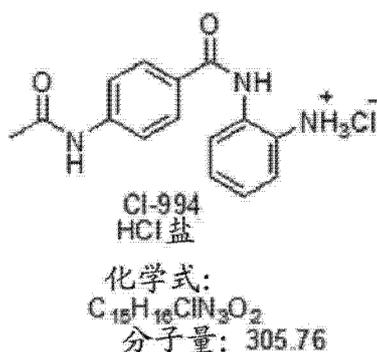
容器,其容纳配制用于经口、透皮、静脉内、经皮、皮下、经鼻、肌内、腹膜内、颅内或脑室内施用以增强认知功能的有效量的 4-(乙酰氨基)-N-(2-氨基苯基)苯甲酰胺 (CI-994) 或其可药用盐、酯、前药或代谢物,和

向需要认知增强的对象施用 CI-994 的说明书。

44. 具有晶体形式的 4-(乙酰氨基)-N-(2-氨基苯基)苯甲酰胺 (CI-994) 的盐。

45. 包含 4-(乙酰氨基)-N-(2-氨基苯基)苯甲酰胺 (CI-994) 的 HCl 盐的组合物。

46. 根据权利要求 45 所述的组合物,其中 CI-994 的 HCl 盐具有以下化学结构:



47. 于制剂中包含 4-(乙酰氨基)-N-(2-氨基苯基)苯甲酰胺 (CI-994) 的组合物,所述制剂包含:

- a) 5-15% 选自 DMA、NMP, EtOH 和 DMSO 的化合物;
- b) 25-50% 选自 PEG400、克列莫佛和 HP-β 的化合物;和
- c) 0-70% 选自盐水、水和 D5W 的化合物。

48. 根据权利要求 47 所述的组合物,其中所述制剂为 10% 的 DMA、45% 的 PEG400 和 45% 的盐水或水或 D5W。

49. 根据权利要求 47 所述的组合物,其中所述制剂为 10% 的 DMA、45% 的 PEG400 和 45% 的盐水或水或 D5W。

50. 根据权利要求 47 所述的组合物,其中所述制剂为 10% 的 EtOH、45% 的 PEG400 和 45% 的盐水或水或 D5W。

51. 根据权利要求 47 所述的组合物,其中所述制剂为 10% 的 DMA、30% 的克列莫佛和 60% 的盐水或水或 D5W。

52. 根据权利要求 47 所述的组合物,其中所述制剂为 10% 的 DMSO、30% 的克列莫佛和 60% 的盐水或水或 D5W。

53. 根据权利要求 47 所述的组合物,其中所述制剂为 5% 的 DMA、30% 的克列莫佛和 65% 的盐水或水或 D5W。

54. 根据权利要求 47 所述的组合物,其中所述制剂为 10% 的 DMA、20% 的克列莫佛和 70% 的盐水或水或 D5W。

55. 根据权利要求 47 所述的组合物,其中所述制剂为 10% 的 DMA 和 90% 的 HP- β -CD 水溶液。

56. 根据权利要求 47 所述的组合物,其中所述制剂为 10% 的 DMSO、40% 的 PG 和 50% 的盐水或水或 D5W。

57. 在有此需要的对象中治疗认知功能病症或受损的方法,其包括:

以 0.001-50.0mg/kg 的剂量向所述对象施用 4-(乙酰氨基)-N-(2-氨基苯基)苯甲酰胺 (CI-994) 或其可药用盐、酯、前药或代谢物。

58. 根据权利要求 57 的方法,其中以 0.001mg/kg 至 15mg/kg 的剂量至少连续 2 天施用 CI-994 和 / 或地那林。

59. 根据权利要求 57 的方法,其中以至多 15mg/kg 的剂量至少连续 14 天施用 CI-994 和 / 或地那林。

60. 根据权利要求 57 的方法,其中以 0.04mg/kg 的剂量施用 CI-994 和 / 或地那林。

61. 根据权利要求 57 的方法,其中以 0.1-1.0mg/kg 的剂量每天一次地至少连续 10 天施用 CI-994。

62. 根据权利要求 57 的方法,其中每天一次地至少连续 2、3、4、5、6 或 7 天施用 CI-994。

63. 根据权利要求 57 的方法,其中每天一次地、每两天一次地、每三天一次地、每四天一次地、每五天一次地、每六天一次地或者每七天一次地施用 CI-994。

CI-994 和地那林用于治疗记忆 / 认知和焦虑病症的用途

[0001] 相关申请

[0002] 根据 35U. S. C. § 119(e), 本专利申请主张 2009 年 10 月 30 日提交的美国临时专利申请 No. 61/256927 和 2009 年 12 月 1 日提交的 No. 61/265468 的权益, 以上专利申请的全部内容作为参考并入本文。

技术领域

[0003] 本发明一般性地涉及用于治疗与记忆丧失和认知功能受损有关的疾病和病症的方法和组合物。

技术背景

[0004] 在自然衰老的过程中, 脑发生萎缩, 并且它是与认知功能受损和记忆丧失有关的神经退行性疾病的早期特征。阿尔茨海默氏病、亨廷顿病以及其他相关痴呆疾病会造成认知功能显著丧失, 经常导致患病患者恶化至病废状态 (invalid state)。已知尚无治疗阿尔茨海默氏病以及相关痴呆病的方法, 并且造成这些疾病的原因也不是很清楚。此外, 临床前研究尚未找到在发生实质性神经元损失后使受损记忆恢复的策略。

[0005] 在真核细胞中, 核 DNA 包绕着由组蛋白 H2A、H2B、H3 和 H4 组成的蛋白核心, 形成染色质, 其中组蛋白的碱性氨基酸与 DNA 中带负电的磷酸基相互作用。约 146 个 DNA 碱基对包绕组蛋白核心以构成核小体颗粒, 即染色质的重复结构基序。组蛋白发生 N 末端赖氨酸残基的 α , ϵ -氨基翻译后乙酰化。乙酰化反应由被称为组蛋白乙酰基转移酶 (histone acetyl transferase, HAT) 的酶所催化。乙酰化中和了赖氨酸侧链的正电荷, 并且被认为会以有利于转录的方式影响染色质结构 (例如, 通过提高转录因子对 DNA 的可接近性)。据报道被称为组蛋白脱乙酰基酶 (histone deacetylase, HDAC) 的酶家族能够使组蛋白乙酰化逆转。已报道了 HDAC 家族的 11 个成员, 其称为 HDAC1-HDAC11, 并且已提议将它们分为三个不同的类别: I 类, 包括 HDAC1、2、3 和 8, II 类, 包括 HDAC4、5、6 和 7, 以及 IV 类, 包括 HDAC11。在体内染色质乙酰化状态被认为是通过 HAT 和 HDAC 活性之间的动态平衡来维持的。调控组蛋白乙酰化是染色质调节和基因调控的一个组成部分, 其在包括细胞增殖和分化的多种生物过程中起关键作用 (Roth 等人, 2001)。近期的报道详细说明了组蛋白乙酰化在如神经元分化、记忆形成、药物成瘾和抑郁的 CNS 功能中的重要性 (Citrome, 2003; Johannessen and Johannessen, 2003; Tsankova 等人, 2006)。然而, 尚不清楚 11 种组蛋白脱乙酰基酶中的哪一种负责所观察到的 CNS 作用。例如, 人们发现尽管与对照小鼠相比, HDAC1 Tg 小鼠在学习行为方面未显示出任何差异, 但通过巴甫洛夫恐惧条件反射 (Pavlovian fear conditioning) 和莫里斯水迷宫实验 (Morris water maze tests) 评价, HDAC2Tg 小鼠学习能力受损。因此, 据信 HDAC2 抑制剂增强记忆和学习能力 (美国公开的专利申请 2008/0300205)。据信提高 HDAC1 活性的试剂具有神经保护性并且可以用作治疗神经病症的试剂, 所述神经病症包括阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、亨廷顿病、肌萎缩性侧索硬化 (Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS)、缺血性脑损伤和外伤性脑损伤 (美国专利

申请 No. 12/508481, 其名称为 : 组蛋白脱乙酰基酶 1 (HDAC1) 的激活保护 DNA 不受损害并且提高神经元存活)。

发明内容

[0006] 本发明在一个方面涉及对促进认知功能并因此用于治疗记忆丧失和认知功能病症 / 受损的方法和组合物的发现。因此, 本发明的一个方面涉及在有此需要的对象中治疗认知功能病症或受损的方法。所述方法包括向对象施用 4-(乙酰氨基)-N-(2-氨基苯基) 苯甲酰胺 (CI-994) 或其可药用盐、酯、前药或代谢物。根据本发明的一些方面, 通过向有此需要的对象施用地那林 (dinaline) 或其可药用盐、酯、前药或代谢物来治疗认知功能病症或受损。

[0007] 在一些实施方案中, 组合施用 CI-994 和地那林。在一些实施方案中, 对象还接受组合行为疗法。可以每天一次以低于 $15\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量连续 14 天施用 CI-994 和 / 或地那林。可以在至少连续 2 天里每天一次地、或者每两天一次地、或者一天中一次但给药之间间隔至少两天地施用 CI-994 和 / 或地那林。在一些实施方案中, 以 $0.001\text{mg}/\text{kg}$ 至 $50\text{mg}/\text{kg}$ 的剂量至少连续 2 天施用 CI-994 和 / 或地那林。在一些实施方案中, 以至多 $0.4\text{mg}/\text{kg}$ 的剂量至少连续 14 天施用 CI-994 和 / 或地那林。在一些实施方案中, 以 $0.001\text{mg}/\text{kg}$ 至 $50\text{mg}/\text{kg}$ 的剂量至少连续 2、3、4、5、6 或 7 天施用 CI-994 和 / 或地那林。

[0008] 根据本发明的一些方面, 在有此需要的对象中通过经口、透皮 (transdermally)、静脉内、经皮 (cutaneously)、皮下 (subcutaneously)、经鼻、肌内、腹膜内、颅内或脑室内施用有效量的 4-(乙酰氨基)-N-(2-氨基苯基) 苯甲酰胺 (CI-994)、地那林或其可药用盐、酯或前药来治疗认知功能病症或受损。认知功能病症 / 受损可以与以下有关 : 阿尔茨海默氏病、亨廷顿病、癫痫引起的记忆丧失、精神分裂症、鲁宾斯坦 - 泰比综合征 (Rubinstein Taybi syndrome)、雷特综合征 (Rett Syndrome)、脆性 X 综合征、路易体痴呆 (Lewy body dementia)、血管性痴呆、与孤独症有关的双相型障碍以及社交、认知和学习障碍、创伤性颅脑损伤或注意力不集中症。在一些实施方案中, 认知功能病症 / 受损与以下有关 : 焦虑症 (anxiety disorders)、恐惧条件反射 (conditioned fear response)、恐慌症 (panic disorders)、强迫症、创伤后应激障碍、恐惧症 (phobias)、社交焦虑症 (social anxiety disorders) 或物质依赖的恢复。在一些实施方案中, 对象可接受精神疗法、行为暴露治疗、虚拟现实暴露 (virtual reality exposure, VRE) 疗法或认知矫正疗法。

[0009] 根据本发明的一些方面, 提供了治疗阿尔茨海默氏病的方法。所述方法包括向对象施用 4-(乙酰氨基)-N-(2-氨基苯基) 苯甲酰胺 (CI-994) 或其可药用盐、酯、前药或代谢物, 其中以有效地维持累积有效 CI-994 血清浓度的低剂量施用 CI-994。根据本发明的一些方面, 通过施用地那林或其可药用盐、酯、前药或代谢物治疗阿尔茨海默氏病, 其中以有效地维持累积有效地那林血清浓度的低剂量施用地那林。在一些实施方案中, 每两天施用一次地那林。

[0010] 根据本发明的一些方面, 提供了治疗亨廷顿病的方法。所述方法包括向对象施用有效量的 CI-994、地那林或其可药用盐、酯、前药或代谢物。可以每两天施用一次 CI-994 和 / 或地那林。在一些实施方案中, 可以经口、透皮、经鼻或腹膜内施用 CI-994 和 / 或地那林。可以根据病史、家族史或脑成像测试来选择治疗方法。在一些实施方案中, 不根据亨廷顿病

生物标志物基因的表达水平选择治疗方法,所述生物标志物基因选自 ANXA1、AXOT、CAPZA1、HIF1A、JJAZ1、P2Y5、PCNP、ROCK1 (p160ROCK)、SF3B1、SP3、TAF7 和 YIPPEE。

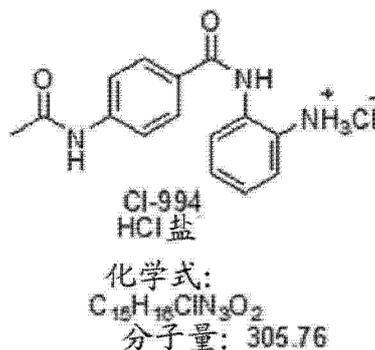
[0011] 根据本发明的一些方面,提供了改善正常对象认知功能的方法。所述方法包括向对象施用有效量的 CI-994、地那林或其可药用盐、酯、前药或代谢物。在一些实施方案中,以低于 $15\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量每天一次连续 14 天施用 CI-994 或地那林。在一些实施方案中,以 $1\text{mg}/\text{kg}$ 的剂量每天一次连续 10 天施用 CI-994 和 / 或地那林。可以每两天一次施用 CI-994 或地那林,或者一天中一次地施用,但给药之间间隔至少 2 天。可以经口、透皮、静脉内、经皮、皮下、经鼻、肌内、腹膜内、颅内或脑室内向对象施用 CI-994 或地那林。

[0012] 根据本发明的一些方面,提供了促进对象恐惧消退的方法。所述方法包括向对象施用有效量的 CI-994、地那林或其可药用盐、酯、前药或代谢物。可以每两天一次施用 CI-994 或地那林。施用途径包括经口、透皮、经鼻和腹膜内施用。

[0013] 本发明的一些方面涉及包含 CI-994、地那林或其可药用盐、酯、前药或代谢物的组合物。可以配制所述组合物以用于经口、透皮、静脉内、经皮、皮下、经鼻、肌内、腹膜内、颅内或脑室内施用。所述组合物可以包含每天一次至少连续 2、3、4、5、6 或 7 天的以低于 $0.001\text{mg}/\text{kg}$ 至 $50\text{mg}/\text{kg}$ 的剂量配制的 4-(乙酰氨基)-N-(2-氨基苯基)苯甲酰胺 (CI-994) 或其可药用盐、酯、前药或代谢物。在一些实施方案中,以 $0.001\text{mg}/\text{kg}$ 至 $15\text{mg}/\text{kg}$ 的剂量至少连续 2 天施用 CI-994 和 / 或地那林。在一些实施方案中,以至多 $15\text{mg}/\text{kg}$ 的剂量至少连续 14 天施用 CI-994 和 / 或地那林。在一些实施方案中,以 $0.04\text{mg}/\text{kg}$ 的剂量施用 CI-994 和 / 或地那林。所述组合物可配制成用于每天一次连续 14 天的低于 $15\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量。本发明的一些方面涉及药盒 / 试剂盒,其包含容器和向需要认知增强的对象施用 CI-994 的说明书,所述容器容纳配制用于经口、透皮、静脉内、经皮、皮下、经鼻、肌内、腹膜内、颅内或脑室内施用以增强认知功能的有效量 4-(乙酰氨基)-N-(2-氨基苯基)苯甲酰胺 (CI-994) 或其可药用盐、酯、前药或代谢物。

[0014] 在本发明的范围内还考虑了包含 CI-994 的 HCL 盐的组合物。在一些实施方案中,CI-994 的盐具有以下化学结构:

[0015]



[0016] 根据本发明的一些方面,提供了晶体形式的 4-(乙酰氨基)-N-(2-氨基苯基)苯甲酰胺 (CI-994) 的盐。根据本发明的一些方面,提供了在制剂中包含 4-(乙酰氨基)-N-(2-氨基苯基)苯甲酰胺 (CI-994) 的组合物。所述制剂可以包含 a) 5-15% 的选自 DMA、NMP、EtOH 和 DMSO 的化合物; b) 25-50% 的选自 PEG400、克列莫佛 (cremophor) 和 HP- β 的化合物和 c) 0-70% 的选自盐水 (saline)、水和 D5W 的化合物。所述制剂的不同实施方案包括: 10% 的 DMA、45% 的 PEG400 和 45% 的盐水或水或 D5W; 10% 的 DMA、45% 的 PEG400 和

45%的盐水或水或D5W;10%的EtOH、45%的PEG400和45%的盐水或水或D5W;10%的DMA、30%的克列莫佛和60%的盐水或水或D5W;10%的DMSO、30%的克列莫佛和60%的盐水或水或D5W;5%的DMA、30%的克列莫佛和65%的盐水或水或D5W;10%的DMA、20%的克列莫佛和70%的盐水或水或D5W;10%的DMA和90%的HP- β -CD水溶液以及10%的DMSO、40%的PG和50%的盐水或水或D5W。

[0017] 根据本发明的一些方面,提供了在有此需要的对象中治疗认知功能病症或受损的方法。所述方法包括以0.1-1.0mg/kg的剂量向对象施用4-(乙酰氨基)-N-(2-氨基苯基)苯甲酰胺(CI-994)或其可药用盐、酯、前药或代谢物。在一些实施方案中,以0.1-1.0mg/kg的剂量每天一次至少连续10天施用CI-994。

[0018] 根据本发明的一些方面,提供了在有此需要的对象中治疗认知功能病症或受损的方法。所述方法包括以0.001-50.0mg/kg的剂量向对象施用4-(乙酰氨基)-N-(2-氨基苯基)苯甲酰胺(CI-994)或其可药用盐、酯、前药或代谢物。在一些实施方案中,以0.001mg/kg至15mg/kg的剂量至少连续2天施用CI-994和/或地那林。在一些实施方案中,以至多15mg/kg的剂量至少连续14天施用CI-994/或地那林。在一些实施方案中,以0.04mg/kg的剂量施用CI-994和/或地那林。在一些实施方案中,以0.1-1.0mg/kg的剂量每天一次至少连续10天施用CI-994。在一些实施方案中,每天一次至少连续2、3、4、5、6或7天施用CI-994。

[0019] 本发明的每个限定可涵盖本发明的多个实施方案。因此,预期涉及任何一个要素或要素组合的本发明的每个限定均可以包含在本发明的每个方面中。本发明在其应用上不限于以下说明中所述的或在附图中所示组成部分的详细构造和布置。本发明能够采用其他实施方案并且能够以多种方式实施或进行。另外,本文所使用的用语和术语是出于说明的目的而不应视为限制。在本文中,“包括”、“包含”或者“具有”、“含有”、“涉及”及其变化形式旨在涵盖随后所列的项目及其等同形式和附加项目。

附图说明

[0020] 附图仅为示例性的,并且不是实现本文所公开的发明所必需的。

[0021] 图1显示了CI-994和地那林的酶抑制活性。两种化合物主要为I类HDAC抑制剂。图1A显示了CI-994和地那林的时间依赖性酶抑制活性。两种化合物主要为I类HDAC抑制剂。

[0022] 图2显示了鲁宾斯坦-泰比(Rubinstein Taybi)CBP^{+/-}小鼠中组蛋白乙酰化标志物的减少。使用抗体对鲁宾斯坦-泰比CBP^{+/-}小鼠的矢状面脑切片(sagittal brain section)的免疫染色显示海马神经元中AcH2B水平降低(图2A)。使用抗 β -肌动蛋白、H2B(未乙酰化)、AcH2A、AcH3和AcH4的抗体对CBP^{+/-}和WT小鼠的海马蛋白提取物的蛋白质印迹分析显示出类似的AcH2B水平降低(图2B)。对蛋白质印迹分析的定量显示 β -肌动蛋白、总H2B、AcH2A、AcH3的水平无差异,但AcH2B水平具有显著差异。使用另一种AcH2B抗体也观察到了类似的H2B乙酰化降低(图2C)。

[0023] 图3显示了与小鼠脑中HDAC2敲除有关的组蛋白乙酰化标志物(H4K5、H4K12和H2B)的增加。使用蛋白质印迹分析与HDAC2敲除小鼠有关的组蛋白乙酰化标志物。

[0024] 图4显示了与小鼠脑中HDAC2过表达有关的组蛋白乙酰化标志物(H4K12)的减

少。H4K12 是与 HDAC2 功能有关的关键组蛋白标志物。使用蛋白质印迹分析与 HDAC2 过表达小鼠有关的组蛋白乙酰化标志物。

[0025] 图 5 显示了 HDAC 抑制剂对 HEK293 细胞中组蛋白乙酰化标志物的作用。以 10 μ M 的量将包括 SAHA 和 CI-994 的一系列化合物与完整 HEK293 细胞一起孵育 6 小时。使用抗乙酰基 H4K12 抗体和辣根过氧化物酶缀合的第二抗体以及基于鲁米诺的底物的蛋白质印迹分析显示与 DMSO 对照相比,乙酰化水平提高。这证明了 CI-994 的细胞 HDAC 活性以及特异性标志物 H4K12 乙酰化的增加。

[0026] 图 6 是图 5 中所示的原始蛋白质印迹数据的定量。相对于 DMSO 对照,CI-994 使 H4K12 乙酰化水平提高超过 50 倍。这表明 CI-994 在完整细胞中稳健的 HDAC 活性以及 CI-994 对特异性组蛋白位点 (H4K12) 的作用。

[0027] 图 7 是对用于测量 HDAC 抑制剂对 HeLa 细胞裂解物中组蛋白乙酰化标志物作用的原始蛋白质印迹的定量。考察了一系列化合物,CI-994 和 SAHA 比较突出。相对于 DMSO 对照,CI-994 使 H4K12 乙酰化水平提高超过 10 倍。该柱状图表明 CI-994 在完整细胞中稳健的 HDAC 活性以及 CI-994 对特异性组蛋白位点 (H4K12) 的作用。

[0028] 图 8 显示了小鼠原代纹状体细胞中 H4K12 乙酰化标志物的增加。A,分离自用 HDAC 抑制剂处理过的小鼠脑的原代纹状体细胞的蛋白质印迹。显示了 2 个组,其中每组有 3 个独立样品。B,该柱状图显示了图 8A 中所示蛋白质印迹的定量。相对于 DMSO 对照,CI-994 对组蛋白位点 H4K12 的乙酰化水平具有显著作用。在 1 和 10 μ M, CI-994 处理导致增加 5 倍。

[0029] 图 9 显示用 CI-994 处理神经元细胞在体外增加了 H4 和 H2B 组蛋白乙酰化。该柱状图显示了对检验原代纹状体细胞中其他乙酰化标志物的蛋白质印迹凝胶分析的定量。测试了三种化合物,包括 CI-994 和 SAHA。相对于 DMSO 对照,CI-994 显著增加了四乙酰化 H4 和四乙酰化 H2B。在 1 和 10 μ M, CI-994 处理导致两种标志物增加 2-5 倍。

[0030] 图 10 显示用 CI-994 处理神经元细胞在体外增加 H4K12 乙酰化。A,显微照片显示通过用 DMSO 或 1 μ M CI-994 孵育 6 小时处理后原代神经元细胞中荧光的增加。绿色荧光的增加对应于 H4K12 乙酰化水平的提高。B,对照表明在脑区域特定原代培养物 (皮层和纹状体) 中孵育 6h 后,1 和 10 μ M 的 CI-994 不造成整体细胞数目的增加或减少。C,柱状图显示在脑区域特定原代培养物 (皮层和纹状体) 中孵育 6h 后,1 和 10 μ M CI-994 导致 H4K12 乙酰化增加。

[0031] 图 11 显示用 CI-994 处理神经元细胞在体外增加了 H2B 乙酰化。A,显微照片显示了用 DMSO 或 10 μ M CI-994 孵育 6 小时处理后原代神经元细胞中荧光的增加。深红色荧光的增加对应于 H2B 四乙酰化水平的提高。B,对照表明在脑区域特定的原代培养物 (纹状体) 中孵育 6h 后,1 和 10 μ M 的 CI-994 不造成整体细胞数目的增加或减少。C,该柱状图显示在脑区域特定的原代培养物 (纹状体) 中孵育 6h 后,1 和 10 μ M 的 CI-994 导致 H2B 四乙酰化的增加。

[0032] 图 12 显示了小鼠前脑原代细胞培养物中 CI-994 的剂量应答。数据表明了 CI-994 剂量增加对 H4K12 乙酰化水平的作用。CI-994 能够以相对低的剂量功能性抑制 HDAC 酶并且在剂量增加时导致功能性应答提高。

[0033] 图 13 显示 CI-994 以剂量依赖性方式增加了特定细胞类型和脑区域中 H4K12 的乙

酰化。A, 显微照片显示了用 DMSO 或 10 μ M CI-994 处理 (6h) 后对原代神经元细胞培养物中特定细胞类型的影响。与神经元 (map2+ 染色)、神经胶质 (GFAP+ 染色) 和大细胞类型共定位的 H4K12 免疫荧光增加。B, 对与特定细胞类型和特定脑区域细胞培养物中 H4K12 乙酰化有关的荧光增加的定量。

[0034] 图 14. 该图证明 CI-994 处理激活了人神经祖细胞中 TCF/LEF 萤光素酶 (luciferase) 报告基因, 其 EC50 为约 7 μ M。当与 Wnt 条件培养基混合时, CI-994 对 TCF/LEF 报告基因显示出强协同作用, 其 EC50 相同, 但激活水平明显更高。这些效力与对组蛋白乙酰化所观察到的效力一致。

[0035] 图 15 是通过腹膜内注射全身性施用 30mg/kg 单剂 CI-994 后的药代动力学数据总结。显示了从 5 分钟到 24 小时期间 C-57 小鼠的血浆和脑中 CI-994 的浓度时间曲线。该数据表明 CI-994 在脑和血浆中达到较大浓度。脑 C_{max} (12.3 μ M) 和 AUC (38.1 μ M) 水平均明显高于有效体外浓度。

[0036] CI-994 易于穿过血脑屏障。

[0037] 图 16 是通过腹膜内注射全身性施用 10mg/kg 单剂 CI-994 后的药代动力学数据总结。显示了从 5 分钟到 24 小时期间 C-57 小鼠的血浆和脑中 CI-994 的浓度时间曲线。该数据表明 CI-994 在脑和血浆中达到较大浓度。脑 C_{max} (4.8 μ M) 和 AUC (11 μ M) 水平均明显高于有效体外浓度。在该较低剂量, CI-994 易于穿过血脑屏障。

[0038] 图 17 是通过腹膜内注射全身性施用 1mg/kg 单剂 CI-994 后的药代动力学数据总结。显示了从 5 分钟到 8 小时期间 C-57 小鼠的血浆和脑中 CI-994 的浓度时间曲线。该数据表明即使全身施用低剂量, 脑和血浆中 CI-994 的水平也是显著的。脑 C_{max} (0.45 μ M) 和 AUC (1.2 μ M) 水平接近有效体外浓度。什么样的脑中必要暴露条件将与改善记忆有关的行为表型相关联是非显而易见的。这表明低剂量的 CI-994 和暴露与高 20-30 倍的剂量和暴露一样有效。

[0039] 图 18 是通过腹膜内注射全身性施用 30、10 和 1mg/kg 单剂 CI-994 后小鼠脑中浓度时间曲线的总结。在这些剂量水平中, 脑暴露是与剂量成比例的。已表明所有三种暴露特征在接下来的体内记忆模型中是有效的。该数据定义了据我们所知先前尚未报道的在 CNS 相关适应症中起效所需的最佳和最小暴露。

[0040] 图 19 显示用 CI-994 急性处理增加了全脑中 H4K5 组蛋白乙酰化。A, 以几种不同的赋形剂组合配制 CI-994, 并通过腹膜内注射以 30mg/kg 的剂量施用。施用 1 小时后, 固定全脑并通过蛋白质印迹分析对 H4K5 乙酰化的影响。B, 定量柱状图表明当以 5% 的 DMSO/30% 的克列莫佛 /65% 的盐水或 10% 的 DMA/30% 的克列莫佛 /60% 的盐水配制时, CI-994 导致脑组蛋白乙酰化水平改变。DMSO- 二甲基亚砷; DMA- 二甲基乙酰胺。

[0041] 图 20 显示用 CI-994 急性处理增加了全脑中组蛋白乙酰化。A, 以几种不同的赋形剂组合配制 CI-994, 并通过腹膜内注射以 30mg/kg 的剂量施用。施用 1 小时后, 固定全脑并通过蛋白质印迹分析对 H4K5 乙酰化的影响。B, 定量柱状图表明当以 5% 的 DMA/45% 的 PEG 400/50% 的盐水或 5% 的 NMP/30% 45% 的 PEG 400/60% 的盐水配制时, CI-994 导致脑组蛋白乙酰化水平改变。PEG- 聚乙二醇; DMA- 二甲基乙酰胺; NMP-N- 甲基吡咯烷酮。

[0042] 图 21 显示了使用 CI-994 急性处理的实验方案以及对成年雄性 C57BL/6J 小鼠的脑特定区域中组蛋白乙酰化的相应作用。如下进行实验: 使用根据图中所示方案进行给药

的一系列 HDAC 抑制剂进行实验,所述方案即急性给药:全身性施用,随后对特定脑区域切片并固定以检验不同化合物所造成的组蛋白乙酰化变化。组蛋白乙酰化水平的变化将会与 HDAC 抑制剂的功能活性一致。因此,这些实验帮助证明 CI-994 已进入脑中,以及位于与学习和记忆有关的特定脑区域的细胞核中。此外,CI-994 导致也与学习和记忆效果有关的特定乙酰化标志物的增加。

[0043] 图 22 表明 CI-994 的急性处理导致小鼠皮层中四乙酰化 H4 和 H2B 水平显著提高。A 图中所示的柱状图为 B 图中所示的蛋白质印迹凝胶数据的定量。将该数据相对于组蛋白 H3 水平归一化。CI-994 导致皮层中这两种标志物增加 2 倍。这表明 CI-994 是皮层中 HDAC 的功能性抑制剂。

[0044] 图 23 显示使用 CI-994 急性处理提高了 H4K12 和 H2B5 的乙酰化水平。1 小时后,在皮层中,CI-994 导致 H4K12 和 H2BK5 的乙酰化水平提高 2-3 倍。对于 H4K12 来说,在这些条件下该作用对于 CI-994 是独有的。

[0045] 图 24 显示使用 CI-994 急性处理导致成年雄性小鼠海马中四乙酰化 H4 的乙酰化水平提高。在海马中,施用 CI-994 1 小时后,四乙酰化 H4 的乙酰化水平提高 2-3 倍。在该实验中,在海马中对四乙酰化 H2B 的水平没有影响。

[0046] 图 25 显示 CI-994 的长期施用增加了全脑中组蛋白乙酰化。蛋白质印迹凝胶分析表明即使在 CI-994 长期施用后(每天施用,施用 10 天),CI-994 仍可以对小鼠脑中的乙酰化水平发挥作用。蛋白质印迹显示与载体对照相比,四乙酰化 H2B 和乙酰化 H4K5 得到增加。

[0047] 图 26 表明如通过场景恐惧条件反射实验(contextual fear conditioning paradigm)中僵立(freezing)%所测量的,几种化学类别的 HDAC 抑制剂对提高小鼠记忆不起作用。

[0048] 图 27 表明如通过僵立时间%所测量的,每天施用 30mg/kg 剂量的 CI-994(施用 10 天)改善了场景恐惧条件反射实验中小鼠的记忆。

[0049] 图 28 显示当使用相同 30mg/kg 剂量的隔日给药时间表时,CI-994 在该记忆模型中同样有效。有效总剂量减少 50%并保持了效力。

[0050] 图 29 显示了按照相同的每天施用共施用 10 天的给药时间表检验较低剂量 CI-994 的剂量应答研究。该柱状图表明在所有剂量:10、5 和 1mg/kg 下,CI-994 作为记忆增强剂是有效的。

[0051] 图 30 显示 CI-994 能够挽救鲁宾斯坦-泰比综合征 CBP^{+/-} 小鼠模型中所见的诱导认知缺陷。以每天施用 1mg/kg 的低剂量,施用 10 天,CI-994 将这些小鼠的记忆修复至与野生型同窝小鼠同等的水平。

[0052] 图 31 显示 CI-994 挽救了阿尔茨海默氏病小鼠模型中 p25/CK 诱导的认知缺陷。以每天施用 1mg/kg 的低剂量,施用 10 天,CI-994 能够挽救该阿尔茨海默氏病小鼠模型中的认知缺陷。每个柱中的数字表示每组中小鼠的数目。p25 载体组表示非诱导的载体处理的小鼠,p25/CK 载体组表示诱导的未处理的小鼠。对照组由以正常饲料喂食的不表达 p25 的 tet0-p25Tg 小鼠组成。

[0053] 图 32 表明与 WT 对照小鼠相比,HDAC2 过表达小鼠在恐惧记忆消退方面受损。A,该图显示过表达 HDAC1 的小鼠表现出正常消退。B,HDAC2 过表达小鼠不能消除条件反射恐

惧反应。

[0054] 图 33 表明使用急性给药方式 CI-994 促进记忆形成和恐惧消退。A, 在野生型小鼠中, CI-994 处理和未处理之间的差异极小。B, 用 2 次剂量的 CI-994 (急性处理方式) 处理的 HDAC2 过表达小鼠表现出改善的记忆形成和恐惧消退。与未处理的 HDAC2 过表达小鼠相比, 观察到了显著的改善。

[0055] 图 34 表明在恐惧记忆消退试验后, 在饲养笼中休息一段时间后恐惧记忆将自发地恢复。

[0056] 图 35 显示在一个月自发恢复后, 与载体处理的小鼠相比, CI-994 处理显著降低了 HDAC2 过表达小鼠的僵立水平。

[0057] 图 36 显示了 CI-994 的 HPLC 方法的建立。A, 该色谱图表示 6.25 μ g/mL 的检测限 (LOQ) 信号。B, 该色谱图显示了 10x 信号强度的信号。两个色谱图均显示了 > 95% 的化学纯度。

[0058] 图 37 显示了 CI-994 的溶解度方案。

[0059] 图 38 显示了多种赋形剂组合中 CI-994 的混合制剂结果。

[0060] 图 39 显示了 CI-994HCl 盐溶液的图片。

[0061] 图 40 显示与 wt 对照 (n = 7, 雄性, ** P = 0.0043, 双因素方差分析) 相比, HDAC2 敲除小鼠 (n = 8, 雄性) 表现出更快的场景恐惧消退。

[0062] 图 41 显示 CI-994 促进恐惧记忆消退。A, 用于测试 CI-994 对恐惧记忆消退之作用的方案。B, 在每天的前 3 分钟暴露期间, CI-994 处理组中的恐惧记忆消退要比载体处理组快的多。第三天, CI-994 组与对照组相比表现出显著较短的僵立时间。每组 N = 8。*, p < 0.05。C, 在消退第 1 天, 注射前后 CI-994 组在两种场景暴露训练中表现出更快的僵立时间缩短。D, 在消退第 2 天, 注射前后 CI-994 组在两种场景暴露训练中表现出更快的僵立时间缩短。E, CI-994 组和对照组之间未观察到显著差异, 在提醒电击 (reminder shock) 后 24 小时, 两组均表现出高僵立水平。

[0063] 图 42 显示了 p25 小鼠皮层中 HDAC1 和 HDAC2 的表达。A, 皮层神经元中 HDAC2 免疫反应性强度的定量。(对来自 3 只小鼠的 > 600 个神经元进行定量。) B, 皮层神经元中 HDAC1-IR 强度的定量。(对来自 3 只小鼠的 > 500 个神经元进行定量。)

[0064] 图 43 表明 CI-994 处理 (1mg/kg, 腹膜内) 提高了 CK-p25 小鼠中突触素 (synaptophysin, SVP) 的表达。

[0065] 图 44A 和 44B 显示在 5XFAD 小鼠 (5 种常见的阿尔茨海默氏病的突变基因) 的皮层神经元中 HDAC2 的表达提高而 AchH4K12 降低。A, AchH4K12 免疫反应性的定量。B, HDAC2 免疫反应性的定量。图 44C-E 证明了人阿尔茨海默氏脑的特征为组蛋白脱乙酰基酶 HDAC2 水平提高。图 44C 显示了对照脑、轻度阿尔茨海默氏病 (Braak and Braak (B&B) 阶段 III-IV) 病例和重度阿尔茨海默氏病 (B&B 阶段 V-VI) 病例的海马 CA1 区和内嗅皮层的石蜡包埋切片的 HDAC2 代表性免疫组织化学照片。上图的比例尺 = 0.7mm, 下图为 0.35mm。D, 对照 (n = 4)、B&B III-IV (n = 3) 和 B&B V-VI (n = 4) 脑的 CA1 区中 HDAC2 水平的定量, F_{2,8} = 4.495, p < 0.05。E, 对照 (n = 4)、B&B III-IV (n = 3) 和 B&B V-VI (n = 4) 脑的内嗅皮层 (EC) 中 HDAC2 水平的定量, F_{2,8} = 4.988, p < 0.05。F, 病例详细情况 -BB 阶段 III-IV 表示患有所谓“轻度”阿尔茨海默氏病的患者, 其特点为轻度至进行性记忆丧失以及认知功能

显著降低;BB阶段 V-VI 表示患有所谓“重度”阿尔茨海默氏病的患者,其特点为严重记忆丧失和痴呆病,运动能力丧失以及幻觉。

[0066] 图 45A 显示采用每天和每两天的给药时间表以多种剂量施用的 CI-994 增强野生型(WT)小鼠中的记忆形成。图 45B 显示 CI-994 提高了 WT 小鼠中的记忆形成,而盐酸多奈哌齐(Aricept,胆碱酯酶抑制剂)则不。

[0067] 图 46A 证明长期 CI-994 改善了 CK-p25 小鼠中的记忆受损,而盐酸多奈哌齐处理则不。图 46B 显示长期 CI-994 处理改善了 CK-p25 小鼠中的空间记忆缺陷。图 46C 显示 CI-994 处理改善了 CK-p25 小鼠中的记忆提取缺陷。

[0068] 图 47 证明了脑振荡(brain oscillation)中 CI-994 的长效作用。A, θ 频带中的 LFP 功率。B, γ 频带中的 LFP 功率。

[0069] 图 48A 显示 CI-994 和 D-环丝氨酸(DCS)在正常消退方式中促进恐惧消退,而图 48B 证明 CI-994 处理在再巩固方式中促进恐惧消退,而 D-环丝氨酸处理则不。图 48C 显示 CI-994 促进特定场景下恐惧记忆的消退。

[0070] 图 49A-H 显示 CI-994 有效并持续地使创伤性长期记忆消退。

[0071] 图 50 是通过腹膜内注射全身性施用 0.1mg/kg 单剂 CI-994 后的药代动力学数据的总结。数据表明在低剂量施用后 CI-994 易于穿过血脑屏障并存在。

[0072] 图 51 显示以 0.1mg/kg 施用的长期 CI-994 处理改善了 CK-p25 小鼠中的记忆受损。

具体实施方案

[0073] 本发明在一个方面涉及对促进认知功能并因此用于治疗记忆丧失和认知功能病症/受损的方法和组合物的发现。因此,本发明的一个方面涉及通过向有此需要的对象施用有效量的 HDAC 抑制剂 4-(乙酰氨基)-N-(2-氨基苯基)苯甲酰胺(CI-994)、其代谢物地那林或其可药用盐、酯或前药来治疗认知功能病症/受损的方法。出人意料地,根据本发明已发现 CI-994 及其代谢物在体内改善认知功能,而其他 HDAC 抑制剂(甚至是具有类似结构的一些抑制剂)不能以这种方式在体内起作用。非常意外的是 CI-994 表现出惊人的体内效力,而在体外测定中表现的更有效的其他 HDAC 抑制剂无法对认知功能获得相同结果。

[0074] 如以下实施例所示,使用针对 10 种重组人 HDAC 同工型的酶结合测定(选择性和效力)发现根据本发明有用的化合物主要是 I 类 HDAC 抑制剂。然而,还发现仅结合特征不足以确定化合物是否能对体内认知功能表现出改善。例如,据发现 HDAC I 类抑制剂的几种化合物不导致体内记忆测定的改善。例如,MS-275、MGC-D0103 和阿皮西汀(apicidin)不导致认知改善。数据表明如通过场景恐惧条件反射实验中僵立(freezing)%所测量的,几种化学类别的 HDAC 抑制剂对提高小鼠记忆不起作用。根据体外抑制 HDAC 酶的能力,哪种化合物将会有效是非显而易见的。更重要地,该数据显示由于 CI-994 (MS-275 和 MGCD0103)在这些条件下在该模型中无效,因此其他化合物构成了相同的苯甲酰胺化学类别。不同于这些其他分子,如通过时间%所测量的,在场景恐惧条件反射实验中每天施用剂量范围在 1-30mg/kg 的 CI-994 共 10 天改善了小鼠的记忆。根据前一页所示的数据,该化合物或该类化合物的有效性是非显而易见的。

[0075] CI-994 不仅在使用每天施用共施用 10 天的给药方式的记忆模型中有效,而且它在使用以 1mg/kg 和 30mg/kg 的剂量每两天施用的给药时间表时同样有效。如数据所示,有

效总剂量降低了 50% 并且保留了效力。还发现即使全身施用低剂量时, 具有显著的脑和血浆中 CI-994 水平, 以产生体内作用。通过腹膜内注射全身性施用 1mg/kg 单剂 CI-994 产生了有效浓度。什么样的脑中必要暴露条件与改善记忆有关的行为表型相关联是非显而易见的。非常出人意料地, 本文显示低剂量的 CI-994 和暴露与高 20-30 倍的剂量和暴露的一样有效。如实施例所示, 产生了通过腹膜内注射全身性施用 30、10 和 1 和 0.1mg/kg 单剂 CI-994 后小鼠脑中的浓度时间曲线。在这些剂量水平中, 脑暴露是与剂量成比例的。已显示所有四种暴露曲线在随后的体内记忆模型中是有效的。该给药方式应是有效的以及什么是最佳给药时间表是非显而易见的。据信尚未报道使用 CI-994 或任何其他 HDAC 抑制剂的有效的每两天的给药时间表。该给药时间表适用于 CI-994 是非显而易见的, 该时间表可以扩展到该 HDAC 抑制剂化学类别的其他成员或用于其他 HDAC 抑制剂化学类别也是显而易见的。

[0076] 还已通过实验证明 CI-994 已进入脑中, 以及进入位于与学习和记忆有关的特定脑区域的细胞核中。此外, CI-994 导致同样与学习和记忆作用有关的特定乙酰化标志物的增加。

[0077] 根据本发明还发现可以将 CI-994 改变为对溶解度有显著影响的盐形式。如以下实施例所示, CI-994 的 HCl 盐形式在水溶液中的溶解度比 CI-994 大 35 倍。HPLC 分析确认 CI-994 的 HCl 盐形式的化学和溶液稳定性至少为 2 小时。该盐制剂适合在不使用其他赋形剂的条件用于递送 CI-994。这些发现非常出乎意料。

[0078] 另外, 根据本发明发现了能够改善 CI-994 溶解度的几种制剂。要求权利的制剂是 (化学和溶液) 稳定的 5mg/ml 的溶液制剂, 其包含有机溶剂和一系列广泛的可药用赋形剂。在一些情况下, 这些制剂表现为与单独在盐水中的 CI-994 游离碱相比, 2 小时溶解度提高了 62 倍。

[0079] 在一些实施方案中, 提供了治疗阿尔茨海默氏病的方法。例如, 本文所示的数据表明每天施用 0.1mg/kg 低剂量的 CI-994, 施用 10 天能够挽救该阿尔茨海默氏病小鼠模型中的认知缺陷。这种低剂量在该模型中会有效是非常出人意料的。在一些实施方案中, 治疗具有认知功能受损和显著神经元损失的对象。本发明的一些方面涉及改善正常对象中认知功能的方法。根据本发明还出人意料地发现本文所述的化合物对于恐惧消退是有用的。恐惧消退是通常在不存在嫌恶性无条件刺激 (unconditioned stimulus, US) 的情况下, 条件刺激 (conditioned stimulus, CS) 重复出现时所发生的条件反射恐惧反应的减少。消退不会抹去最初 CS-US 的关联, 而是认为形成新的记忆。恐惧消退缺陷被认为对创伤后应激障碍 (post-traumatic stress disorder, PTSD)、恐惧症、焦虑症等有贡献。恐惧消退行为实验 (fear extinction behavioral paradigm) 被认为是人应激障碍和恐惧症的模型。重要地, 消退不是简单的忘记, 而是涉及了新的抑制性学习 (Myers and Davis, 2002)。以下所示数据表明过表达 HDAC1 的小鼠表现出正常的消退。HDAC2 过表达则不能消除条件反射恐惧反应。相反, 在 HDAC2 功能丧失的小鼠中促进了恐惧消退。HDAC2 是开发对人应激和情绪障碍 (如创伤后应激障碍 (PTSD)) 的新型治疗性干预的良好靶标。施用于小鼠时会抑制 HDAC1、2 和 3 的化学品 CI994 促进了恐惧记忆的消退。在野生型小鼠中, CI-994 处理和未处理之间的差异极小。然而, 用两剂 CI-994 处理 (急性处理方式) 的 HDAC2OE 小鼠表现出改善的记忆形成和恐惧消退。这些结果是显著并且出乎意料的。该数据表明 CI-994 在另

一种不同形式的记忆形成中是有效的。另外,CI-994 在急性给药环境中是有效的。在 5 天中使用两剂的 CI-994 实现了对 HDAC2 OE 的挽救。

[0080] 如本文所使用的,“记忆”是指恢复与过去事件或知识有关的信息的能力。记忆丧失的对象是不能回想起一个或多个记忆的对象。记忆包括短时记忆(还称为工作记忆或近事记忆)和长时记忆。短时记忆涉及最近的事件,而长时记忆涉及对时间更长事件的回想。评价回想记忆能力的方法是本领域技术人员所知的并且可以包括常规认知试验。

[0081] “认知功能”是指与信息搜集和/或处理有关的动物或人对象的心理过程;信息和/或概念的理解、推理和/或应用;概念和/或信息的抽象化或具体化;创造力、解决问题和可能的直觉行为;以及如概念和/或信息的学习、理解和/或认识的心理过程。心理过程不同于信念、愿望等。在一些实施方案中,可以通过用于认知功能的一种或多种试验或测定进行评价并因此任选地进行定义。用于认知功能的试验或测定的非限制性实例包括 CANTAB(参见,例如, Fray 等人,“CANTAB battery: proposed utility in neurotoxicology.” *Neurotoxicol Teratol.* 1996;18(4):499-504)、斯特鲁测验 (Stroop Test)、连线测验 (Trail Making)、韦氏数字广度 (Wechsler Digit Span) 或 CogState 计算机化认知测验(还参见 Dehaene 等人,“Reward-dependent learning in neuronal networks for planning and decision making.” *Brain Res.* 2000;126:21729; Iverson 等人,“Interpreting change on the WAIS-III/WMS-III in clinical samples.” *Arch Clin Neuropsychol* 2001;16(2):183-91;和 Weaver 等人,“Mild memory impairment in healthy older adults is distinct from normal aging.” *Cogn.* 2006;60(2):146-55)。

[0082] 本发明的方法可以用于促进正常对象的认知功能或用于治疗患有认知功能病症的对象。如本文所使用的,正常对象是未被诊断患有认知功能受损相关病症的对象。

[0083] 认知功能受损是指不如在年龄相当的正常对象中所观察到的认知功能强健的认知功能并且其包括认知功能降低的状态。在一些情况下,与年龄相当的正常对象中所测量的认知功能相比,认知功能降低了约 5%、约 10%、约 30% 或更多。可在任何可检出程度上提高认知功能,但是在人中优选地将认知功能提高至足以允许受损对象进行正常生活的日常活动。

[0084] 在一些实施方案中,提供了用于治疗认知功能病症或受损的方法。所述方法包括向有此需要的对象施用有效量的 4-(乙酰氨基)-N-(2-氨基苯基)苯甲酰胺 (CI-994) 或其代谢物地那林。可以以有效维持对象中有效累积 CI-994 血清浓度的低剂量施用 CI-994 或地那林。可以每两天施用一次 CI-994 或地那林。在一些实施方案中,可以每天施用 1 次、2 次、3 次、4 次或 5 次和/或 2 天、每 3 天、每 4 天、每 5 天、每 6 天、每 7 天等施用 CI-994 或地那林。CI-994 或地那林还可以施用至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 天。可以经口、透皮、静脉内、经皮、皮下、经鼻、肌内、腹膜内、颅内或脑室内施用 CI-994 或地那林。

[0085] 在一些实施方案中,认知功能病症或受损与以下有关,但不限于此:阿尔茨海默氏病、亨廷顿病、癫痫引起的记忆丧失、精神分裂症、鲁宾斯坦-泰比综合征 (Rubinstein Taybi syndrome)、雷特综合征 (Rett Syndrome)、脆性 X 综合征、路易体痴呆 (Lewy body dementia)、血管性痴呆、与孤独症有关的双相型障碍以及社交、认知和学习障碍、ADHD、诵读困难、学习障碍、创伤性颅脑损伤、中风引起的认知和运动损伤、创伤性脑损伤、神经变性

和神经元损失介导的认知受损以及注意力缺失症。在一些实施方案中,认知功能病症或受损与以下有关,但不限于此:焦虑症、条件反射恐惧反应、恐慌症、强迫症、创伤后应激障碍、恐惧症、社交焦虑症、物质依赖恢复或年龄相关性记忆损害(Age Associated Memory Impairment, AAMI)以及年龄相关性认知衰退(Age Related Cognitive Decline, ARCD)。本领域技术人员将认识到本发明的方法可以用于治疗与认知功能病症或受损有关的任何病症。

[0086] 阿尔茨海默氏病是以认知和非认知神经精神病学症状为特征的退行性脑病,该病占65岁以上患者中所有痴呆病病例的约60%。在阿尔茨海默氏病中,控制记忆的认知系统已被损坏。通常,长时记忆保留而短时记忆丢失;相反,记忆可能会混淆,从而导致在识别本应熟悉的人或地方时发生错误。在阿尔茨海默氏病中,精神病学症状是常见的,许多患者中都存在精神病(幻觉和错觉)。有可能的是阿尔茨海默氏病的精神病症状涉及多巴胺或乙酰胆碱浓度的变化,其可以增大多巴胺能/胆碱能平衡,从而导致精神病行为。例如,已提出多巴胺释放的提高可能导致了精神分裂症阳性症状。这可能导致多巴胺能/胆碱能平衡的正破坏。在阿尔茨海默氏病中,胆碱能神经元的减少有效地降低了乙酰胆碱的释放,从而导致多巴胺能/胆碱能平衡的负破坏。事实上,用于减轻精神分裂症中精神异常的抗精神病药也用于减轻阿尔茨海默氏病患者中的精神异常并且可以与本文所述的组合物混合以在本发明所述的方法中使用。

[0087] 根据本发明,还提供了通过施用根据本发明的CI-994或地那林或其他相关化合物来恢复阿尔茨海默氏病患者记忆的方法。这类方法任选地包括施用所述抑制剂和监测对象以鉴别先前丢失记忆的恢复。可以通过本领域已知的常规试验来监测对象。例如,在教科书中(如上所述的DSM)或医学文献中所述的一些方法。

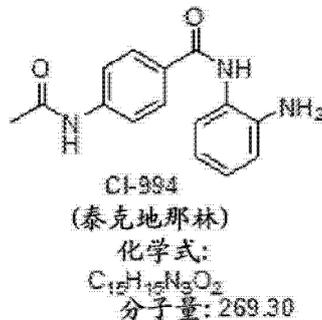
[0088] 在另一些实施方案中,阿尔茨海默氏病患者是晚期阿尔茨海默氏病患者。建议用于治疗阿尔茨海默氏病的多种药物是设计用于通过预防斑块形成来治疗早期疾病的。由于实际改善了记忆和认知而不是仅预防斑块积累,因此本发明的化合物在治疗早期和晚期痴呆病中均有用。

[0089] 血管性痴呆病,也称为“多梗塞性痴呆病(multi-infarct dementia)”,是指由均会导致脑中血管病变的不同机制所造成的一组综合征。血管性痴呆病的主要亚类为(例如)轻度血管性认知受损、多梗塞性痴呆病、由单次策略性梗塞造成的血管性痴呆病(影响丘脑、大脑前动脉、顶叶或扣带回)、由出血性病变造成的血管性痴呆病、小血管病(包括,例如,由腔隙性病变和宾斯旺格病(Binswanger disease)造成的血管性痴呆病)和阿尔茨海默氏病与血管性痴呆病的混合。

[0090] 创伤后应激障碍(PTSD)是可以在暴露于其中发生严重身体损害或受到威胁的恐吓事件或痛苦经验后发展出的焦虑症。可以触发PTSD的创伤事件包括暴力人身攻击、自然或人为灾害、事故或军事战斗。一般说来,它是恐惧记忆消退受损的疾病。恐惧消退是通常在不存在嫌恶性无条件刺激(US)的情况下,条件刺激(CS)重复出现时所发生的条件反射恐惧反应的减少。消退不会抹去最初CS-US的关联,但是被认为形成新的记忆。恐惧消退缺陷被认为对创伤后应激障碍(PTSD)、恐惧症、焦虑症等有贡献。有趣地,我们发现与WT对照小鼠相比,HDAC2过表达小鼠的恐惧记忆消退受损(图32);而与野生型对照相比,HDAC2敲除小鼠表现出更快速的场景恐惧消退(图40)。

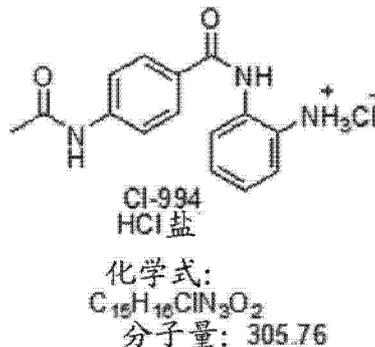
[0091] 在一些实施方案中,除 CI-994 或地那林之外,对象可以经历其他疗法以治疗病症。组合疗法可以是适合于治疗特定疾病的任何类型的疗法。例如,组合疗法可以是行为疗法或药剂。行为疗法包括(但不限于)电惊厥疗法(electroconvulsive seizure therapy)、体育锻炼、团体疗法、谈话疗法或条件反射疗法。在另一实施方案中,所述行为疗法是认知-行为疗法。在以下书籍中说明了可以在本发明方法中使用的行为疗法的实例,例如,由 K. Dobson 编写,由 Guilford Publications, Inc. 公司于 2002 年出版的认知-行为疗法(Cognitive-Behavioral Therapies);由 Rian E. McMullin 编写,由 Norton, W. W. & Company, Inc. 公司于 2000 年出版的新版认知疗法技术手册(The new Handbook of Cognitive Therapy Techniques);和由 Judith S. S. Beck 编写,由 Guilford Publications, Inc. 公司于 1995 年出版的认知疗法:基础与扩展(Cognitive Therapy: Basics and Beyond),以上书籍以其全部内容作为参考并入本文。HDAC 抑制剂 CI-994 具有以下化学式:

[0092]



[0093] 在一些实施方案中,施用 CI-994 的可药用盐。在一些实施方案中,所述可药用盐具有以下化学式:

[0094]



[0095] 在一些实施方案中,施用了 CI-994 的代谢物地那林。地那林具有以下化学式:

[0096]



[0097] 根据本发明的一些方面,单独施用 CI-994 或地那林或其可药用盐。在一些实施方案中,组合施用 CI-994 和地那林。CI-994 可以与地那林同时施用,或者在施用地那林之前施用。在一些方面,在使用地那林后施用 CI-994。

[0098] 此外,上述实施方案所有可能的组合也构成了本发明的一部分。在一些方面,本发明还提供了 CI-994、地那林及其可药用盐的代谢物、盐、溶剂化物和前药。因此,本发明所述的化合物可以与酸形成盐。可药用盐的实例包括与无机酸的加成盐,所述无机酸如盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硝酸、高氯酸、硫酸和磷酸,以及与有机酸的加成盐,所述有机酸如醋酸、甲磺酸、三氟甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、对甲基苯磺酸、苯甲酸、樟脑磺酸、扁桃酸、草酸、琥珀酸、反丁烯二酸、酒石酸和马来酸等。同样地,本发明所述的化合物可含有一个或多个酸性质子,并因此它们可以与碱形成盐,这些也构成了本发明的一部分。这些盐的实例包括与金属阳离子的盐,如(例如)碱金属离子、碱土金属离子或铝离子;或者它可以与有机或无机碱配位。可用的有机碱包括二乙胺和三乙胺等。可用的无机碱包括氢氧化铝、氢氧化钙、氢氧化钾、碳酸钠和氢氧化钠。根据带电官能团的数目并且根据阳离子和阴离子的化合价,可以有不止一个阳离子或阴离子。

[0099] 来源于可药用无毒有机碱的盐包括以下的盐:伯胺、仲胺和叔胺,包括天然取代胺在内的取代胺、环胺以及碱性离子交换树脂,如精氨酸、甜菜碱、咖啡因、胆碱、N, N-二苄基乙二胺、二乙胺、2-二乙氨基乙醇、2-二甲氨基乙醇、乙醇胺、乙二胺、N-乙基吗啉、乙基吡啶、葡萄糖胺、氨基葡萄糖、组氨酸、海巴明(hydrabamine)、异丙胺、赖氨酸、甲基葡萄糖胺、吗啉、哌嗪、哌啶、聚胺树脂、普鲁卡因、嘌呤、可可碱、三乙胺、三甲胺、三丙胺、氨丁三醇等。

[0100] 只要在用于治疗目的时是可药用的,那么对可以使用的盐类型没有限制。可以通过常规化学方法从含有碱性或酸性部分的母体化合物合成盐。一般地,这些盐可以通过将游离酸或碱形式的这些化合物与水中或有机溶剂(如醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈)中或两者的混合物中的化学计量的适当碱或酸反应而制得。

[0101] 本发明的一些化合物可以以非溶剂化以及溶剂化形成存在,如(例如)水合物。本发明涵盖了具有药物活性的所有这些上述形式。

[0102] 本发明的化合物可包含至少一个手性中心。本发明包括每一个可能的立体异构体及其混合物,特别地,其外消旋混合物。可以通过任何常用方法制备单一对映异构体,例如,通过在手性固定相上对外消旋混合物的色谱分离,通过其非对映体盐的分步结晶(fractional crystallization)技术拆分外消旋混合物,通过手性合成,通过酶法拆分或者通过生物转化。可以对任何手性合成中间体或对 CI-994 或地那林进行这种拆分。作为另外一种选择,可以使用构型已知的旋光纯起始材料或试剂通过旋光对映特异合成法获得任何对映异构体。

[0103] 本发明的一些化合物可以作为几种非对映异构体存在,这些非对映异构体可以通过如色谱法或分步结晶的常规方法分离。本发明的一些化合物可以显示出顺式/反式异构体。本发明包括每种几何异构体及其混合物。无论是通过合成还是通过将它们物理混合获得,本发明涵盖所有异构体及其混合物(例如,外消旋混合物)。本发明涉及制备以上所述新型化合物、它们的衍生物、它们的类似物、它们的互变异构形式、它们的立体异构体或它们的药物可用盐或溶剂化物的方法。

[0104] 如本文所使用的,组蛋白脱乙酰基酶抑制剂是抑制、降低或以其他方式调节组蛋

白脱乙酰基酶活性的化合物。在多个实施方案中,根据本文所提供的方法,与不存在 CI-994 或地那林相比,施用 CI-994 或地那林将组蛋白脱乙酰基酶的活性降低至少约 5%、至少约 15%、至少约 25%、至少约 50%、至少约 75%、至少约 90%或至少约 100%或更多。在另一些实施方案中,组蛋白脱乙酰基酶的活性降低至少约 95%或至少约 99%或更多。评价组蛋白脱乙酰基酶活性的方法在本领域中是已知的,并且在以下文献中有所说明,例如, Richon 等人, *Methods Enzymol*, 376 :199-205 (2004) ;Wegener 等人, *Mol Genet Metab.*, 80(1-2) : 138-47 (2003) ;美国专利 No. 6110697 和美国专利公开 No. 20050227300、20050118596、20030161830、20030224473、20030082668、20030013176 和 20040091951, 以上所有文献以其全部内容作为参考并入本文。评价人患者中组蛋白脱乙酰基酶活性的方法在本领域中也是已知的,并且在以下文献中有所说明,例如,美国专利公开 No. 20050288227, 其以其全部内容作为参考并入本文。

[0105] 本发明还提供了通过施用 CI-994、地那林或其可药用盐、酯或前药来治疗阿尔茨海默氏病的方法。阿尔茨海默氏病是其中控制记忆的认知系统已被损坏的病症。通常,长时记忆保留而短时记忆丢失;相反,记忆可能会混淆,从而导致在识别本应熟悉的人或地方时发生错误。

[0106] 可以定期施用 CI-994 或地那林,如在一个或多个剂量中每天、每周或每月施用。作为另外一种选择,可以以非定期的方式施用,例如,每当症状开始时施用。

[0107] 可以经口、透皮、静脉内、经皮、皮下、经鼻、肌内、腹膜内、颅内或脑室内施用 CI-994 或地那林。

[0108] 本发明还提供了通过施用有效量的 CI-994 或地那林来治疗亨廷顿病的方法。亨廷顿病是神经系统疾病,它会导致与不幸发展至死亡有关的认知衰退。与亨廷顿病有关的认知症状包括思维速度、注意力和短时记忆的丧失和 / 或行为症状。可以每两天施用一次 CI-994 或地那林。可以经口、透皮、静脉内、经皮、皮下、经鼻、肌内、腹膜内、颅内或脑室内施用 CI-994 或地那林。在一些实施方案中,不根据亨廷顿病生物标志物基因的表达水平选择治疗方法,所述亨廷顿病生物标志物基因选自 ANXA1、AXOT、CAPZA1、HIF1A、JJAZ1、P2Y5、PCNP、ROCK1 (p160ROCK)、SF3B1、SP3、TAF7 和 YIPPEE。在一些实施方案中,不根据美国专利申请 US2007/0015183 中所公开的亨廷顿病生物标志物基因的表达水平选择诊断和治疗方法。在一些实施方案中,根据病史、家族史或脑成像试验选择诊断和治疗方法。

[0109] 如本文所使用的,治疗病症或患者是指采取措施以获得有益或需要的结果,包括临床结果。有益或需要的临床结果包括(但不限于)与病症有关的一种或多种症状(包括认知功能病症)的减轻或改善,疾病程度的降低,疾病发展的延迟或减缓,疾病状况的改善、缓和或稳定以及其他有益结果,如认知功能的改善或认知功能衰退速度的降低。

[0110] 本发明还涉及通过施用有效量的 CI-994 或地那林来改善正常对象中的认知功能。改善认知功能包括促进对象的认知功能从而使其更接近或超过年龄相当的正常、未受损对象的功能。正常对象是未被诊断患有与认知功能损害有关的任何病症或病症的对象。对象的认知表现受多种因素的影响,并且可以实施本发明所述的方法以抵消任何因素,例如,睡眠剥夺、精神疲劳、身体疲劳或用力过度。

[0111] 对象应表示人或脊椎动物或哺乳动物,其包括(但不限于)狗、猫、马、奶牛、猪、绵羊、山羊、火鸡、鸡和灵长类(例如猴)。在一些实施方案中,对象是不需要 HDAC 抑制剂的那

些。优选人对象。

[0112] 术语本发明治疗化合物的有效量是指实现所需生物学作用所必需或足以实现所需生物学作用的量。例如,本发明治疗化合物的有效量为足以重新建立记忆访问的量。与本文所提供的教导相结合,通过选择多种活性化合物和权重因素,如效力、相对生物利用率、患者体重、不利副作用的严重程度以及优选施用模式,可以设计不会导致严重毒性但又能彻底有效治疗特定对象的有效预防或治疗方案。用于任何特定应用的有效量可以根据以下因素而不同,如所治疗的疾病或病症、所施用的特定治疗化合物、对象的体型大小、或者疾病或病症的严重程度。本领域的技术人员可以在不需要进行过多实验的情况下根据经验确定本发明特定治疗化合物的有效量。本发明的组合物包含如本文所述的化合物或其可药用盐或水合物。

[0113] 用于递送的本文所述化合物的主题剂量通常可以小于 $15\text{mg}/\text{m}^2$ (每天施用一次,施用连续 14 天),根据应用,所述剂量可以每天、每周或每月以及以它们之间任何其他时间量施用。在一些实施方案中,以低于 $15\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量每天施用一次 CI-994 和 / 或其代谢物,施用连续 14 天。在一个实施方案中,每天施用一次所述组合物,施用至少连续 2 天。在另一实施方案中,每两天施用一次所述治疗化合物,或者一天中一次地施用但给药之间至少间隔 2 天。在另一些实施方案中,剂量可以为每两天施用 $30\text{mg}/\text{m}^2$,或甚至可以耐受 $80\text{mg}/\text{m}^2$ 的急性剂量。由于在给定剂量下不同人之间存在一些变化,因此在一些情况下可以使剂量个性化。考虑到本文所提供的教导,这种调节是在本领域技术人员的技术范围内的。以下将给出与每天一次小于 $15\text{mg}/\text{m}^2$ 的经口剂量水平有关的血清水平,其以平均值表示并在括号中列出方差(方差表示为平均值的百分比)。有 2 种浓度的度量, C_{max} 和 AUC。

[0114] $C_{\text{max}}(\text{ng}/\text{mL}) = 570 (25.1\%)$

[0115] $\text{AUC}(\text{ng}\cdot\text{hr}/\text{mL}) = 9500 (62.7\%)$

[0116] 在一些实施方案中,以 $0.01\text{mg}/\text{kg}$ 、 $0.05\text{mg}/\text{kg}$ 、 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ 、 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 、 $1\text{mg}/\text{kg}$ 、 $5\text{mg}/\text{kg}$ 、 $10\text{mg}/\text{kg}$ 、 $20\text{mg}/\text{kg}$ 、 $30\text{mg}/\text{kg}$ 、 $50\text{mg}/\text{kg}$ 、 $75\text{mg}/\text{kg}$ 或 $100\text{mg}/\text{kg}$ 的剂量施用 CI-994 和 / 或其代谢物。在一些实施方案中,以小于 $15\text{mg}/\text{kg}$ 的剂量施用 CI-994 和 / 或其代谢物。在一些实施方案中,以 $1\text{mg}/\text{kg}$ 的剂量每天一次施用 CI-994 和 / 或其代谢物,施用连续 10 天。

[0117] 以可药用溶液施用本发明的制剂,所述溶液通常可以包含可药用浓度的盐、缓冲剂、防腐剂、相容性载体以及任选其他治疗成分。

[0118] 对于在治疗中的使用,可以通过将治疗剂或化合物递送至所需表面(例如粘膜、全身)的任何形式向对象施用有效量的根据本发明的治疗化合物。可以通过本领域技术人员已知的任何方式来实现本发明药物组合物的施用。在一些实施方案中,施用途径包括(但不限于)经口、透皮、肠胃外、静脉内、经皮、皮下、肌肉、经鼻、腹膜内、舌下、气管内、吸入、眼部、阴道、直肠、颅内和脑室内施用。优选的施用途径包括经口、透皮、经鼻和腹膜内施用。

[0119] 对于经口施用,通过将活性化合物与本领域公知的可药用载体混合可以容易地配制本发明的治疗化合物。这些载体能够使本发明的化合物配制成片剂、丸剂、糖锭、胶囊、液体剂、凝胶剂、糖浆、浆液、悬浮液等以用于待治疗对象的经口。可以获得作为固体赋形剂的用于经口使用的药物制剂,任选地研磨所得混合物并处理颗粒混合物,在添加适合助剂(如果需要)后获得片剂或糖锭芯。特别地,适合的赋形剂为填充剂,如糖,包括乳糖、蔗

糖、甘露糖醇或山梨糖醇；纤维素制剂，如（例如）玉米淀粉、小麦淀粉、大米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄芪胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和 / 或聚乙烯吡咯烷酮（PVP）。如果需要，可以加入崩解剂，如交联的聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或海藻酸或它的盐，如海藻酸钠。任选地，还可以在盐水或缓冲液中配制经口制剂，即，用于中和和内部酸性条件的 EDTA，或者可以在没有任何载体的情况下施用。

[0120] 还具体考虑了上述组分的经口剂型。可以化学修饰所述组分从而该衍生物的经口递送是有效的。一般地，所考虑的化学修饰为将至少一个部分连接到组分分子本身上，其中所述部分使得能够 (a) 抑制蛋白水解作用；和 (b) 从胃或肠摄取到血流中。还期望所述组分整体稳定性的提高以及体内循环时间的增加。此类部分的实例包括：聚乙二醇、乙二醇和丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮和聚脯氨酸。在由 Hocenberg 和 Roberts 主编，由 Wiley-Interscience (New York, NY) 公司于 1981 年出版的“酶药物 (Enzymes as Drugs)”一书中由 Abuchowski 和 Davis 编写的“可溶性聚合物-酶加合物 (Soluble Polymer-Enzyme Adducts)”中的第 367-383 页；Newmark 等人，1982, J. Appl. Biochem. 4 :185-189。可以使用的其他聚合物有聚-1,3-二氧戊环和聚-1,3,6-三氧八环。如以上所指出的，对于药物使用来说，聚乙二醇部分是优选的。

[0121] 释放的位置可以是胃、小肠（十二指肠、空肠或回肠）或大肠。本领域技术人员能够获得不会在胃中溶解但是将会在十二指肠或肠的其他位置释放材料的制剂。优选地，通过保护治疗剂或通过是在胃环境以外（如在肠中）释放生物活性物质使释放避开胃环境的有害作用。

[0122] 为了确保完全的胃抗性，对至少 pH 5.0 不透过的包衣是重要的。用作肠溶衣的更常见的惰性成分的实例为醋酸纤维素偏苯三酸酯 (cellulose acetate trimellitate, CAT)、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯 (hydroxypropylmethylcellulose phthalate, HPMCP)、HPMCP 50、HPMCP 55、聚醋酸乙烯邻苯二甲酸酯 (polyvinyl acetate phthalate, PVAP)、Eudragit L30D、Aquateric、苯二甲酸醋酸纤维素 (cellulose acetate phthalate, CAP)、Eudragit L、Eudragit S 和虫胶 (Shellac)。可以使用混合膜形式的这些包衣。

[0123] 还可以在片剂上使用不旨在用于保护不受胃影响的包衣或包衣混合物。这可以包括糖衣或使片剂易于吞咽的包衣。胶囊可以由用于递送干燥治疗剂（即粉末）的硬壳（如明胶）组成；对于液体形式，可以使用软明胶壳。扁囊剂的壳材料可以是厚的淀粉或其他可食用的纸。对于丸剂、糖锭、模制片剂或研制片剂，可以使用湿块化技术 (moist massing techniques)。

[0124] 可以将治疗剂以粒径约 1mm 的颗粒或小粒的形式作为细微的多个颗粒包含在制剂中。用于胶囊施用的材料的制剂还可以是作为粉末、轻压栓剂或甚至片剂。可以通过挤压制备治疗剂。

[0125] 着色剂和调味剂均可以包含在内。例如，可以（如通过脂质体或微球包裹）配制治疗剂，然后再包含在可食用产品中，如含有着色剂和调味剂的冷藏饮料中。

[0126] 可以用惰性材料稀释或增大治疗剂的体积。这些稀释剂可以包括碳水化合物，特别是甘露糖醇、 α -乳糖、无水乳糖、纤维素、蔗糖、改性的葡聚糖和淀粉。还可以将某些无机盐用作填充剂，包括三磷酸钙、碳酸镁和氯化钠。一些可商购的稀释剂为 Fast-Flo、Emdex、STA-Rx 1500、Emcompress 和 Avicell。

[0127] 可以将崩解剂包含在治疗剂制剂中以构成固体剂型。用作崩解剂的材料包括（但不限于）淀粉，其包括基于淀粉的商品化崩解剂 Explotab。淀粉羟基乙酸钠、安伯来特 (Amberlite)、羧甲基纤维素钠、超支链淀粉 (ultramylopectin)、海藻酸钠、明胶、橙皮 (orange peel)、酸性羧甲基纤维素、天然海绵和膨润土均可以使用。另一种形式的崩解剂为不溶性阳离子交换树脂。可以将粉状胶用作崩解剂和粘合剂，并且这些可以包括粉状胶，如琼脂、卡拉牙胶或黄芪胶。作为崩解剂，海藻酸及其钠盐也是有用的。粘合剂可以用于将治疗剂固定在一起以形成硬的片剂，并且它包括来自天然产物的材料，如阿拉伯胶、黄芪胶、淀粉和明胶。其他包括甲基纤维素 (MC)、乙基纤维素 (EC) 和羧甲基纤维素 (CMC)。聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 和羟丙基甲基纤维素 (HPMC) 均可以在醇溶液中使用以使治疗剂成粒。

[0128] 可以将减磨剂包含在治疗剂制剂中以防止制剂加工期间发生粘着。可以将润滑剂用作治疗剂与模具壁之间的层，并且这些润滑剂可以包括（但不限于）：包括其镁和钙盐的硬脂酸、聚四氟乙烯 (PTFE)、液体石蜡、植物油和蜡。还可以使用可溶性润滑剂，如十二烷基硫酸钠、十二烷基硫酸镁、多种分子量的聚乙二醇、Carbowax 4000 和 6000。

[0129] 可以加入可改善配制期间药物流动特性并辅助压片期间重排的助流剂。所述助流剂可以包括淀粉、滑石、煅制二氧化硅和水合硅铝化合物。

[0130] 为了辅助治疗剂在水环境中溶解，可以加入表面活性剂作为润湿剂。表面活性剂可以包括阴离子去污剂，如十二烷基硫酸钠、丁二酸二辛基磺酸钠和二辛基磺酸钠。可以使用阳离子去污剂并且其可以包括苯扎氯铵或苜索氯铵。可以作为表面活性剂包含在制剂中的可能的非离子去污剂的列表为聚月桂醇 400、聚乙二醇 40 硬脂酸酯、聚氧乙烯氢化蓖麻油 10、50 和 60、单硬脂酸甘油酯、聚山梨酯 40、60、65 和 80、脂肪酸蔗糖酯、甲基纤维素和羧甲基纤维素。这些表面活性剂可以单独或以不同比例作为混合物存在于治疗剂制剂中。

[0131] 可以经口使用的药物制剂包括由明胶制成的推入配合型胶囊以及由明胶和增塑剂（如甘油或山梨糖醇）制成的软密封胶囊。推入配合型胶囊可以含有与如乳糖的填充剂、如淀粉的粘合剂和 / 或如滑石或硬脂酸镁的润滑剂以及任选的稳定剂混合的活性成分。在软胶囊中，可以将活性化合物溶解或悬浮在适合的液体中，如脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇。另外，可以加入稳定剂。还可以使用配制用于经口施用的微球。在本领域中已对这类微球进行了明确定义。所有经口施用的制剂均应处于适于这类施用的剂量。

[0132] 对于口腔施用，组合物可以采用以常规方式配制的片剂或糖锭的形式。

[0133] 对于吸入施用，可以借助于适合的抛射剂以来自加压包装或喷雾器的气溶胶喷雾的形式方便地递送用于根据本发明用途的化合物，所述抛射剂例如二氯二氟甲烷、三氯一氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他适合的气体。就加压气溶胶来说，可以通过设置阀门以递送计量的量来确定剂量单元。可以将吸入器或吹药器中使用的（例如）明胶胶囊和药筒配制成含有化合物和如乳糖或淀粉的适合粉末基剂的粉末混合物。

[0134] 考虑将设计用于治疗产品肺部递送的多种机械装置用于实施本发明，所述装置包括（但不限于）喷雾器、定量吸入器和粉末吸入器，所有这些装置是本领域技术人员所熟悉的。

[0135] 适合于本发明实践的市售设备的一些具体实例为由 Mallinckrodt, Inc. (St. Louis, Missouri) 生产的 Ultravent 喷雾器；由 Marquest Medical Products (Englewood, Colorado) 生产的 Acorn II 喷雾器；由 Glaxo Inc. (Research Triangle Park, North

Carolina) 生产的 Ventolin 定量吸入器 ;和由 Fisons Corp. (Bedford, Massachusetts) 生产的 Spinhaler 粉末吸入器。

[0136] 所有这些装置需要使用适合于分散治疗剂的制剂。通常,每种制剂对于所使用的装置类型是特定的,并且除在疗法中可用的常规稀释剂和 / 或载体外,可以包括使用适当的抛射剂材料。另外,考虑了脂质体、微囊或微球、包合物或其他类型载体的使用。根据化学修饰的类型或所使用装置的类型,还可以在不同制剂中制备经化学修饰的治疗剂。

[0137] 适用于喷雾器(喷射或超声波喷雾器)的制剂通常将包含溶于水中的治疗剂。制剂还可以包含缓冲液和单糖(例如,用于稳定和调节渗透压)。喷雾器制剂还可以包含表面活性剂以减少或防止在形成气溶胶时溶液雾化所引起的化合物表面诱导聚集。用于定量吸入器装置使用的制剂一般将包含细碎粉末,其含有借助于表面活性剂悬浮在抛射剂中的治疗剂。抛射剂可以是用于该目的的任何常规材料,如氟氯化碳、氢化含氯氟烃、氢氟化碳或烃类,包括三氯氟甲烷、二氯二氟甲烷、二氯四氟乙烷和 1,1,1,2- 四氟乙烷或它们的组合。适合的表面活性剂包括山梨糖醇三油酸酯和大豆磷脂。油酸也可以用作表面活性剂。

[0138] 用于从粉末吸入器给药的制剂将包含含有治疗剂的细碎干燥粉末并且它还可以包含以有利于粉末从装置分散的量存在的膨胀剂,如乳糖、山梨糖醇、蔗糖或甘露醇,所述的量例如,按制剂重量计的 50 至 90%。最有利地,应将治疗剂制成平均粒度小于 10mm(或微米级)的颗粒形式,最优选地,0.5 至 5mm 的颗粒形式,以最有效地递送至远端肺。

[0139] 还考虑了根据本发明的药物组合物的经鼻递送。经鼻递送能够在将治疗产品施用至鼻后使根据本发明的药物组合物直接进入血流中,而不需要该产品在肺中沉积。用于经鼻递送的制剂包括具有葡聚糖或环糊精的那些。

[0140] 对于经鼻施用,有用的装置为其上连接计量喷雾器的小型硬质瓶。在一个实施方案中,通过将根据本发明方案的药物组合物吸入到限定体积的室中来递送计量的剂量,其中所述室具有孔,其尺寸能够在压缩该室中液体时通过形成喷雾使气溶胶制剂雾化。压缩该室以施用根据本发明的药物组合物。在一个具体的实施方案中,该室为活塞布置。该类装置是市售的。

[0141] 作为另外一种选择,使用了具有孔或开孔的塑料挤压瓶,所述孔或开孔的尺寸使得能够在挤压时通过形成喷雾使气溶胶制剂雾化。所述开孔通常位于瓶的顶部,并且所述顶部一般为锥形以部分放入鼻部通道中以用于有效施用气溶胶制剂。优选地,经鼻吸入器将提供计量的气溶胶制剂以用于施用测量过剂量的药物。

[0142] 当希望全身递送时,可以将化合物配制用于通过注射肠胃外施用,例如,通过团块注射(bolus injection)或连续输注。用于注射的制剂可以以单位剂型存在,例如,在安瓿或在多剂量容器中,并加入防腐剂。组合物可以采用如在油性或水性赋形剂中的悬浮液、溶液或乳液的形式,并且可以含有配方剂,如悬浮剂、稳定剂和 / 或分散剂。

[0143] 用于肠胃外施用的药物制剂包括水溶形式的活性化合物的水溶液。另外,可以将活性化合物的悬浮液制备成适合的油性注射悬浮液。适合的亲脂性溶剂或赋形剂包括如芝麻油的脂肪油剂,或如油酸乙酯或三酸甘油酯的合成脂肪酸酯,或脂质体。水性注射悬浮液可以含有提高悬浮液粘度的物质,如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或葡聚糖。任选地,悬浮液还可以含有适合的稳定剂或提高化合物溶解度的试剂以使得能够制备高浓度溶液。

[0144] 作为另外一种选择,活性化合物可以处于粉末形式以用于在使用之前和适合的载

体组成,例如,无菌的无热原水。

[0145] 除先前所述的制剂外,还可以将所述化合物配制为储库制剂。这类储库制剂可以用适合的聚合物或疏水性材料来配制(例如,作为可用油剂中的乳液),或者用离子交换树脂来配制,或者配制为微溶衍生物,例如,微溶盐。

[0146] 药物组合物还可以包含适合的固体或凝胶相载体或赋形剂。这类载体或赋形剂的实例包括(但不限于)碳酸钙、磷酸钙、多种糖类、淀粉、纤维素衍生物、明胶和聚合物,如聚乙二醇。

[0147] 适合的液体或固体药物制剂形式为,例如,用于吸入的水溶液或盐溶液、微囊封装的、涡卷化(encochleated)、涂覆到微小金颗粒上、包含在脂质体中、喷雾、气溶胶、用于植入到皮肤中的小粒或在尖锐物体上干燥以刮涂到皮肤中的形式。药物组合物还包括微粒、粉末、片剂、包衣片剂、(微)胶囊、栓剂、糖浆、乳液、悬浮液、膏剂、滴剂或活性化合物缓释制剂,在这些制剂中,如上所述按照常规使用赋形剂和添加剂和/或助剂,如崩解剂、粘合剂、包衣剂、膨胀剂、润滑剂、调味剂、甜味剂或增溶剂。所述药物组合物适合在多种药物递送系统中使用。对于药物递送方法的简评,请参见 Langer, Science 249 :1527-1533, 1990, 其作为参考并入本文。

[0148] 可以施用根据本发明的治疗化合物和任选的其他治疗剂本身(纯的)或者可药用盐的形式。在医疗中使用时,所述的盐应是可药用的,但是非可药用盐可以方便地用于制备其可药用盐。这些盐包括(但不限于)由下列酸所制备的那些:盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、马来酸、醋酸、水杨酸、对甲苯磺酸、酒石酸、柠檬酸、甲磺酸、蚁酸、丙二酸、琥珀酸、萘-2-磺酸和苯磺酸。另外,可以将这些盐制备成碱金属或碱土金属盐,如羧基的钠、钾或钙盐。

[0149] 适合的缓冲剂包括:乙酸和盐(1-2% w/v);柠檬酸和盐(1-3% w/v);硼酸和盐(0.5-2.5% w/v);以及磷酸和盐(0.8-2% w/v)。适合的防腐剂包括苯扎氯铵(0.003-0.03% w/v);氯代丁醇(0.3-0.9% w/v);对羟基苯甲酸酯类(0.01-0.25% w/v)和硫柳汞(0.004-0.02% w/v)。

[0150] 根据本发明的药物组合物含有有效量的根据本发明的治疗化合物,所述化合物任选地包含在可药用载体中。术语可药用载体表示适于施用给人或其他脊椎动物的一种或多种相容性固体或液体填充剂、稀释剂或包封物质。术语载体表示与活性成分混合以有利于应用的有机或无机的天然或合成成分。药物组合物的组分还能够以不存在将显著削弱所需药物效率的相互作用的方式与本发明化合物混合或者彼此混合。

[0151] 可以使用能够将治疗剂递送穿过血脑屏障的制剂将所述治疗剂递送至脑。将治疗剂递送至脑的一个障碍是脑的生理特征和结构。血脑屏障由与单层内皮细胞并列的特化毛细血管组成。通过紧密连接使细胞间区域封闭,因此从血液至脑的唯一通道是穿过内皮细胞。该屏障只允许某些物质(如亲脂性分子)通过并且阻止其他有害化合物和病原体进入。因此,亲脂性载体可用于将非亲脂性化合物递送至脑。例如,已发现作为人脑中天然存在的脂肪酸 DHA 可用于将共价连接于其上的药物递送至脑中(如美国专利 6407137 中所述的那些)。美国专利 5525727 描述了用于将药物物质特异并持续地递送至脑中的二氢吡啶吡啶鎓盐载体氧化还原系统。美国专利 5618803 描述了使用膦酸盐衍生物的靶向药物递送。美国专利 7119074 描述了用于将化合物递送穿过血脑屏障的与 PEG- 低聚物 / 聚合物相缀合

的该治疗化合物的两亲性前药。可以通过与亲脂性载体的共价连接或者与亲脂性载体的共配制来修饰本文所述的化合物。其他方式也是本领域技术人员已知的。

[0152] 可以将本发明的治疗剂与其他治疗剂一起递送以用于提高记忆提取或用于治疗记忆丧失相关病症的症状或病因。例如,环境强化 (environmental enrichment, EE) 已用于增强记忆。EE 包括在对象周围创造出刺激性环境。还可以结合其他治疗剂以治疗潜在的病症或提高记忆恢复。

[0153] 本发明所述的化合物与其他药物以单位剂量或药盒 / 试剂盒形式的组合的实例包括与以下试剂的组合:抗阿尔茨海默氏病试剂、 β -分泌酶抑制剂、 γ -分泌酶抑制剂、HMG-CoA 还原酶抑制剂、NSAID (包括布洛芬)、N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 受体拮抗剂 (如美金胺 (memantine))、胆碱酯酶抑制剂 (如加兰他敏、利凡斯的明 (rivastigmine)、多奈哌齐和他克林)、维生素 E、CB-1 受体拮抗剂或 CB-1 受体反向激动剂、抗生素 (如多西环素和利福平)、抗淀粉样蛋白抗体或者影响提高本发明化合物的效力、安全性、方便性或者降低不希望的副作用或毒性的受体或酶的其他药物。上述组合的列表仅是说明性的而不意欲以任何方式进行限制。

[0154] 本发明还包括制品,它是指任何一个或一组组件。在一些实施方案中,所述制品是药盒 / 试剂盒。所述制品包括一个或多个容器内的根据本发明的药物级或诊断级化合物。该制品可以包括宣传或说明本发明化合物用途的说明书或标签。

[0155] 如本文所使用的,“宣传”包括所有商业运营方法,其包括以下方法:教育、医院及其他临床说明书,包括药物销售在内的制药行业活动,以及任何广告或其他促销活动 (包括与治疗如阿尔茨海默氏病的认知病症有关的本发明组合物相关的书面、口头和电子通信的任何形式)。

[0156] “说明书”可以定义宣传的组分,并且它通常包括书写在本发明组合物包装上或与之相连的说明书。说明书还可以包括以任何方式提供的任何口头或电子说明书。

[0157] 因此,在一些实施方案中,可以将本文所述的试剂组装成药物或诊断或研究药盒 / 试剂盒中以有利于它们在治疗、诊断或研究应用中的使用。药盒 / 试剂盒可以包括容纳本发明组分以及使用说明书的一个或多个容器。具体地,这些药盒 / 试剂盒可以包含本文所述的一种或多种试剂以及说明预定治疗应用以及这些试剂的正确施用的说明书。在某些实施方案中,药盒 / 试剂盒中的试剂可以在适合于特定应用和该试剂施用方法的药物制剂和剂量中。

[0158] 所述药盒 / 试剂盒可设计成有利于医师对本文所述方法的使用,并且所述药盒 / 试剂盒可以采用多种形式。在适用的情况下,可以以液体形式 (例如,以溶液的形式) 或以固体形式 (例如,以干燥粉末的形式) 提供所述药盒 / 试剂盒的每种成分。在某些情况下,一些成分可以是可组成的或者是可处理的 (例如,成为活性形式),例如,通过加入适合的溶剂或其他物质 (例如,水或细胞培养基),所述溶剂或其他物质可以随或不随药盒 / 试剂盒一起提供。如本文所使用的,“说明书”可定义说明和 / 或宣传组分,并且它通常包括书写在本发明包装上或与之有关的说明书。说明书还可以包括以任何形式提供的任何口头或电子说明书,这使得用户将明确认识到该说明书与药盒 / 试剂盒有关,例如,视听说明书 (例如,录像带、DVD 等)、基于互联网和 / 或网络的通讯等。书面说明书可以处于管理药物或生物制品生产、使用或销售的政府机构所规定的形式,该说明书还可以反映生产、使用或销售

机构批准用于人施用。

[0159] 所述药盒 / 试剂盒可以在一个或多个容器中包含任何一种或多种本文所述的组分。举例来说,在一个实施方案中,所述药盒 / 试剂盒可以包括用于混合该药盒 / 试剂盒中一种或多种组分和 / 或分离和混合样品以及应用于对象的说明书。该药盒 / 试剂盒可以包括容纳本文所述试剂的容器。可以无菌制备该试剂,并将其包装在注射器中并冷藏运输。作为另外一种选择,可以将试剂放置在小瓶或其他容器中以用于存储。第二容器可以具有无菌制备的其他试剂。作为另外一种选择,所述药盒 / 试剂盒可以包括在注射器、小瓶、管或其他容器中预混合并运输的活性试剂。

[0160] 所述药盒 / 试剂盒可以具有多种形式,如纸塑小袋、收缩包装小袋、可真空密封小袋、可密封热成型盘或类似的小袋或盘的形式,其中具有疏松地包装在小袋、一根或多根管、容器、箱或袋中的附属配件。可以在加入附件后对药盒 / 试剂盒灭菌,借此使得能够打开容器中的各个附件。可以使用任何适合的灭菌技术对药盒 / 试剂盒灭菌,如辐射灭菌、加热灭菌或本领域中已知的其他灭菌方法。根据特定应用,所述药盒 / 试剂盒还可以包括其他组分,例如,容器、细胞培养基、盐、缓冲液、试剂、注射器、针、用于应用或除去消毒剂的织物(如纱布)、一次性手套、施用前试剂的载体等。

[0161] 可以提供任何适合形式的药盒 / 试剂盒组分,例如,液体溶液或干燥粉末。当所提供的组分为干燥粉末时,可以通过加入适合的溶剂使所述粉末重构,所述适合的溶剂也是可以提供的。在使用液体形式组分的实施方案中,所述液体形式可以是浓缩的或者是现成的。所述溶剂将取决于该化合物以及使用或施用的形式。适合于药物组分的溶剂是熟知的并且从文献中可获得。所述溶剂将取决于该化合物以及使用或施用的形式。

[0162] 在一类实施方案中,所述药盒 / 试剂盒可以包含分隔开的载体装置从而严格密封地容纳一个或多个容器装置,如小瓶、管等,每个容器装置包含要在所述方法中使用的单独元件中的一个。例如,其中一个所述容器可以包含用于测定的阳性对照。另外,所述药盒 / 试剂盒可以包括用于其他组分的容器,例如,可在测定中使用的缓冲液。

[0163] 本发明还涵盖完成包装和标记的药物产品。该生产制品包括在适当器皿或容器(如玻璃小瓶或其他气密性容器)中的适当单位剂量形式。就适合于肠胃外施用的剂型来说,所述活性成分是无菌的并且适合于作为不含颗粒的溶液形式施用。换言之,本发明包括肠胃外用溶液和冻干粉末,两种形式均是无菌的,并且后者适合于在注射前重构。作为另外一种选择,所述单位剂量形式可以是适合于经口、透皮、局部或粘膜递送的固体。

[0164] 在另一个实施方案中,本发明的组合物是与生物相容性去污剂或其他蛋白质一起保存在容器中的,所述去污剂包括(但不限于)卵磷脂、牛磺胆酸和胆固醇;所述其他蛋白质包括(但不限于) γ 球蛋白和血清白蛋白。更优选地,本发明的组合物与人血清白蛋白一起储存以用于人,并且与牛血清白蛋白一起储存以用于兽医。

[0165] 与任何药物产品一样,包装材料和容器设计成保护储存和运输期间产品的稳定性。另外,本发明的产品包括建议医师、技师或患者如何正确预防或治疗所讨论疾病或病症的使用说明书或其他信息材料。换言之,所述生产制品包括指示或建议剂量方案的说明书,其包括(但不限于)真实剂量、监测程序以及其他监测信息。

[0166] 更具体地,本发明提供了生产制品,其包括包装材料,如箱、瓶、管、小瓶、容器、喷雾器、吹药器、静脉(i. v.)输液袋、封袋等;和包含在所述包装材料内的药物试剂的至少一

种单元剂量形式。本发明还提供了生产制品,其包括包装材料,如箱、瓶、管、小瓶、容器、喷雾器、吹药器、静脉(i. v.) 输液袋、封袋等;和包含在所述包装材料内的每种药物试剂的至少一种单位剂量形式。本发明还提供了生产制品,其包括包装材料,如箱、瓶、管、小瓶、容器、喷雾器、吹药器、静脉(i. v.) 输液袋、封袋等;和包含在所述包装材料内的每种药物试剂的至少一种单位剂量形式。本发明还提供了生产制品,其包括优选地以无菌形式包装的针或注射器以用于注射所述制剂,和/或包装的酒精棉片。

[0167] 在具体的实施方案中,生产制品包括包装材料和药物试剂,以及包含在所述包装材料内的说明书,其中所述药物试剂是 CI-994 或地那林和可药用载体,并且所述说明书指示了用于预防、治疗或处理患有认知病症(如阿尔茨海默氏病)的对象的剂量方案。

[0168] 治疗性监测:通过监测记忆的常规方法确定所选治疗参数的适当性,例如,剂量、日程、佐剂选择等。另外,可以监测患者对所需作用的临床情况,例如,认知功能的提高。如果所实现的作用不够,那么可以通过其他治疗来提高患者并且可以修改治疗参数,如通过提高本发明组合物和/或其他活性试剂的量或者改变给药途径。

[0169] 通过以下实施例进一步说明了本发明,并且决不应将以下实施例视作进一步的限制。本专利申请所引用的所有参考文献(包括文献、授权专利、公开的专利申请和共同待决的专利申请)的全部内容明确地作为参考并入本文。

[0170] 实施例

[0171] 实施例 1:作为 HDAC 抑制剂的 CI-994 和地那林的表征

[0172] 体外结合数据:测定了 CI-994 和地那林对几种已知的 HDAC 同工型的酶抑制活性。图 2 中显示了这两种化合物的酶抑制特征图。还与另一些已知记忆增强剂进行了比较并且比较了它们抑制相同 HDAC 酶的能力。两种化合物基本上是 I 类 HDAC 抑制剂。

[0173] 实施例 1A:作为时间依赖性 HDAC 抑制剂的 CI-994 和地那林的表征

[0174] 体外结合数据:通过预孵育 1-3 小时测定了 CI-994 和地那林对几种已知的 HDAC 同工型的酶抑制活性。图 1A 中示出了这两种化合物的酶抑制特征图。还与另一些已知记忆增强剂进行了比较并且比较了它们抑制相同 HDAC 酶的能力。两种化合物基本上是 I 类 HDAC 抑制剂。

[0175] 实施例 2:鲁宾斯坦-泰比 CBP^{+/-}小鼠中的乙酰化标志物

[0176] 本实施例中的数据之前已发表,但是在本文中提供该数据以证明 CI-994 在脑中引起的特定乙酰化标志物(H2B)的相关性及其如何与鲁宾斯坦-泰比治疗相关。实施例 2 的数据不是本发明的一部分。

[0177] 使用抗体对鲁宾斯坦-泰比 CBP^{+/-}小鼠的矢状脑切片的免疫染色显示海马神经元中 AcH2B 水平降低(图 2A)。使用抗 β -肌动蛋白、H2B(未乙酰化)、AcH2A、AcH3 和 AcH4 的抗体对来自 CBP^{+/-}和 WT 小鼠的海马蛋白提取物的蛋白质印迹分析显示了类似的 AcH2B 水平降低(图 2B)。对蛋白质印迹分析的定量显示 β -肌动蛋白、总 H2B、AcH2A、AcH3 的水平无差异,但 AcH2B 的水平具有显著差异。使用另一种 AcH2B 抗体也观察到了类似的 H2B 乙酰化的降低(图 2C)。

[0178] 实施例 3:神经元细胞系中 CI-994 的体外数据。

[0179] CI-994 细胞 HDAC 活性的功能性测量(免疫荧光分析)

[0180] 材料和方法:

[0181] 如下所示,实施了培养的神经元中组蛋白乙酰化水平变化的免疫荧光检测:

[0182] 第 1 天:

[0183] 1) 根据底部无接触 (no touch bottom) 方案,使用 185nl 针头工具将化合物通过针头从 384 孔板 (Abgene) 中转移出。

[0184] 第 2 天:约 24 小时化合物处理后

[0185] 1) 使用留下约 5ul 残余量并且不接触板底部的洗板机 (Tecan) 方案吸出培养基;或者,使用 12 通道吸取棒 (aspirator wand) 温和地对孔进行吸取以除去培养基。

[0186] 2) 使用多通道移液器或液体操作系统 (例如,Combi,标准管;低速) 添加 75ul 甲醛 (4% 的 PBS 溶液) 并将孔在室温下孵育 10 分钟。

[0187] 3) 吸出甲醛并用 100ul PBS 清洗细胞 3 次。

[0188] 4) 吸出 PBS 并加入 100ul 封闭 / 透化缓冲液 (0.1% Triton-X100,2% BSA 的 PBS 溶液) 并将孔在室温下孵育 1 小时。

[0189] 5) 吸出封闭缓冲液并加入用封闭缓冲液以 1 : 500 稀释的第一抗体,并将孔在 4 度孵育过夜。

[0190] 第 3 天:

[0191] 1) 吸出第一抗体,并用 100ul 封闭缓冲液清洗孔 3 次。

[0192] 2) 加入 50ul 以 1 : 500 稀释的第二抗体以及 Hoeschst (从 10mg/mL (16mM) 储备溶液中以 1 : 1000 稀释),并将用箔片覆盖的孔在室温下孵育 1.5 小时以防止光漂白。

[0193] 3) 用 100ul PBS 清洗孔 3 次,加入 100ul PBS,并将板密封。

[0194] 4) 然后,将板在 Acumen/IX Micro 上读取。

[0195] 5) 将板在 4 度储存。

[0196] 结果:在脑区域特定原代培养物 (皮层和纹状体) 中孵育 6 小时后,1 和 10uM 的 CI-994 导致 H4K12 乙酰化和 H2B 四乙酰化水平升高。CI-994 能够以相对低剂量功能性抑制 HDAC 酶并在较高剂量导致功能性响应的提高 (图 10、11 和 12)。

[0197] 实施例 4:急性给药后与学习和记忆相关的脑特定区域中乙酰化标志物的增加

[0198] 材料和方法:

[0199] 图 21 中示出了在成年小鼠脑特定区域中使用 CI-994 的急性处理的实验方案以及对组蛋白乙酰化的相应影响。如下所示,制备了用于特定脑切片蛋白质印迹分析的粗蛋白裂解物:

[0200] 1. 对于解剖的冷冻脑组织:

[0201] a. 在冰上使组织冻融,并立即小心地在 250ul 冰冷悬浮缓冲液中匀浆。

[0202] (100ul 用于约 2-3mm³ 组织;根据需要调整)

[0203] 1. 5mL 一次性研棒 (Fisher cat#03-392-100)

[0204] b. 尽快加入等体积的 2×SDS 凝胶上样缓冲液,并上下吸取进行混合。

[0205] 2. 将样品在 95°C 放置 5min。

[0206] 3. 通过平稳通过 23-25 号皮下注射器针头 (2-3×) 或者通过简单的超声处理来剪切粘稠染色体 DNA (均使用针头方法并且其工作良好)。避免起沫 / 起泡。

[0207] 4. 在室温下,将样品以 10000g 离心 10min,并将上清液转移至新试管中。

[0208] 5. 基于蛋白质浓度,根据需要等分样品。

[0209] 悬浮缓冲液:

[0210] 0.1M NaCl、0.01M TrisCl (pH7.6)、0.001M EDTA (pH8.0) (可以提前配制所提及的缓冲液, 室温保存)。在临使用前, 加入: 1× 磷酸酶 / 蛋白酶抑制剂混合物 (例如, ThermoFisher “HALT,” cat#78440)

[0211] 5mM 丁酸钠 (HDAC 抑制剂)。

[0212] 2×SDS 凝胶上样缓冲液:

[0213] 100mM TrisCl (pH 6.8)、4% SDS、20% 甘油 (可以提前配制所提及的缓冲液, 室温保存)。在临使用前, 加入: 200mM 二硫苏糖醇 (得自 1M 储备溶液), 5mM 丁酸钠 (HDAC 抑制剂)

[0214] 结果: CI-994 的急性处理导致成年小鼠皮层中 H4 和 H2B (四) 组蛋白乙酰化水平显著提高。由于在这些条件下其他已知的 HDAC 抑制剂不能在该脑区域中对这些特定标志物产生作用, 因此这是 CI-994 所特有的 (图 22)。CI-994 还提高了皮层中特定单个组蛋白位点上的乙酰化 (H4K12 和 H2BK5)。就 H4K12 而言, 在这些条件下该作用是 CI-994 所特有的 (图 23)。

[0215] 使用 CI-994 的急性处理还导致成年雄性小鼠海马中四乙酰化 H4 的乙酰化水平提高。未观察到对海马中四乙酰化 H2B 水平的作用 (图 24)。

[0216] 实施例 5: 小鼠中的行为数据 - 对应于记忆和认知改善的表型

[0217] 材料和方法:

[0218] 对 C57/BL6WT 小鼠注射 10 天载剂 (vehicle) 或 HDAC 抑制剂。第 11 天, 在场景恐惧条件反射实验中训练小鼠 (训练包括将小鼠暴露于条件反射箱 (场景, TSE) 3 分钟), 然后进行足部电击 (2 秒, 0.8mA, 恒定电流)。训练后 1 小时, 对小鼠注射 HDAC 抑制剂或载剂。第 12 天, 将小鼠返回到训练箱中, 并监测和记录僵立行为。

[0219] 结果: 如通过场景恐惧条件反射实验中僵立 % 所测量的, 几种化学类别的 HDAC 抑制剂对提高小鼠记忆均不起作用。根据体外抑制 HDAC 酶的能力, 哪种化合物将会有效是非显而易见的。更重要地, 该数据显示构成与 CI-994 (MS-275 和 MGCD0103) 一样的苯甲酰胺化学物质类型的其他化合物在这些条件下在该模型中是无效的。

[0220] 图 27 表明如通过僵立时间 % 所测量的, 每天施用 30mg/kg 剂量的 CI-994 (施用 10 天) 改善了场景恐惧条件反射实验中小鼠的记忆。它与效力已有报道的 SAHA 一样有效。据我们所知, 对于在任何条件下的 CI-994 或对于这类化合物来说, 之前均未报道过这种作用。根据图 26 中所示的数据, 该化合物或该类化合物会有效是非显而易见的。

[0221] 使用相同 30mg/kg 剂量的隔日给药时间表时, CI-994 在该记忆模型中也同样有效 (图 28)。使用低剂量 (1mg/kg 剂量) 每日和隔日给药时间表时, CI-994 在该模型中也同样有效。我们将有效总剂量降低了 50% 并保持了效力。该给药方案有效是非显而易见的, 而何为最佳给药时间表也是非显而易见的。据我们所知, 尚未报道过使用 CI-994 或任何其他 HDAC 抑制剂的有效隔日给药时间表。该给药时间表可用于 CI-994 是非显而易见的, 该时间表可以扩展到该化学类别 HDAC 抑制剂的其他成员以及用于其他化学类别的 HDAC 抑制剂是非显而易见的。

[0222] 按照相同的每日给药时间表 (10 天) 检验低剂量 CI-994 的剂量应答研究表明 CI-994 在所有剂量 (10、5 和 1mg/kg) 下作为记忆增强剂是有效的。在 1mg/kg 的低剂量下,

10 天给药期内所需的总剂量为 10mg/kg(图 29)。尚没有描述在这些低剂量下 CI-994 或任何其他 HDAC 抑制剂的这种作用的报道。

[0223] 实施例 6 :CI-994 挽救了鲁宾斯坦 - 泰比小鼠模型中的认知缺陷

[0224] 材料和方法 :

[0225] CBP 突变小鼠 (B6. Cg-Tg (Camk2a-Crebbp^{*})1364Tabe/J) 得自 Jackson 实验室。CREB 结合蛋白的该带 FLAG- 表位标签的显性负截短体 (FLAG-CBP Δ 1, 缺少氨基酸 1084-2441 的编码序列) 的表达在空间上涉及前脑 (海马、杏仁核、纹状体和皮层) 中的神经元并且在时间上通过 CaMKII α 启动子涉及出生后发育。CBP 的这种显性负突变形式 (设计用于中断使用 CBP 作为其目标基因表达之共激活物的转录因子) 在海马中以内源 CBP 水平的 95% 以及在皮层中以内源 CBP 水平的 84% 从该转基因中表达。半合 (hemizygous) 小鼠表现出海马依赖性记忆缺陷 (如长期增益的降低、空间学习缺陷和场景恐惧条件反射受损), 并且没有在 CBP 缺陷型突变模型中所观察到的发育受损。我们对 CBP 突变半合小鼠及其同窝对照注射 10 天载剂或 CI-994。第 11 天, 在场景恐惧条件反射实验中训练小鼠 (训练包括将小鼠暴露于条件反射箱 (场景, TSE) 3 分钟), 然后进行足部电击 (2 秒, 0.8mA, 恒定电流)。训练后 1 小时, 对小鼠注射 CI-994 或载剂。第 12 天, 将小鼠返回到训练箱中, 并监测和记录僵立行为。

[0226] 参考文献 :

[0227] Learn Mem. 2005Mar-Apr ;12(2) :111-9. Transgenic mice expressing a truncated form of CREB-binding protein(CBP) exhibit deficits in hippocampal synaptic plasticity and memory storage. Wood MA, Kaplan MP, Park A, Blanchard EJ, Oliveira AM, Lombardi TL, Abel T

[0228] 结果 :CBP (+/-) 杂合小鼠代表鲁宾斯坦 - 泰比综合征人疾病模型。它是被认为在人中偶然出现的相同遗传突变。患有该综合征的人具有记忆 / 认知和发育缺陷。使用我们标准的给药方式 (1mg/kg, QD, 10 天), CI-994 将这些小鼠的记忆恢复至与野生型同窝小鼠同等的水平。在这种 1mg/kg 的低剂量下, CI-994 的作用是极其显著的 (图 30)。

[0229] 实施例 7 :CI-994 挽救了阿尔茨海默氏病小鼠模型中 p25/CK 诱导的认知缺陷

[0230] 材料和方法 :

[0231] CK/p25 小鼠是可诱导的神经退行性疾病小鼠模型。通过使 CamK2a-tTA 和 tet0-p25 Tg 小鼠系杂交产生了双转基因小鼠。在存在多西环素的情况下, p25 的表达受抑制。当除去多西环素时, 在前脑中强烈诱导了 p25 的表达。p25 诱导 6 周导致大量神经元损失、β - 淀粉样肽产生升高、τ 相关病理以及学习和记忆受损。对于这些实验, 将多西环素从 3 个月大的 CK/p25 小鼠和同窝对照中除去 6 周。随后, 对小鼠注射 10 天 CI-994 或载剂。第 11 天, 在场景恐惧条件反射实验中训练小鼠 (训练包括将小鼠暴露于条件反射箱 (场景, TSE) 3 分钟), 然后进行足部电击 (2 秒, 0.8mA, 恒定电流)。训练后 1 小时, 对小鼠注射 CI-994 或载剂。第 12 天, 将小鼠返回到训练箱中, 并监测和记录僵立行为。

[0232] 参考文献 :

[0233] Cruz JC, Tseng H-C, Goldman JA, Shih H, Tsai L-H. Aberrant Cdk5 activation by p25 triggers pathological events leading to neurodegeneration and neurofibrillary tangles. Neuron 2003, 40 :471-483.

[0234] Fischer A, Sananbenesi F, Pang PT, Lu B, Tsai L-H. Opposing roles of transient and prolonged expression of p25 in synaptic plasticity and hippocampus-dependent memory. *Neuron*, 2005, 48 :825-838.

[0235] Fischer A, Sananbenesi F, Wang X, Dobbin M, Tsai, L-H. Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodeling. *Nature* 2007, 447 :178-182.

[0236] 结果 :以每天施用 1mg/kg 的低剂量,施用 10 天,CI-994 能够挽救该阿尔茨海默氏病小鼠模型中的认知缺陷 (图 31)。p25 载剂组表示非诱导的载剂处理的小鼠, p25/CK 载剂组表示诱导的未处理的小鼠。对照组由以正常饲料喂食的不表达 p25 的 tet0-p25Tg 小鼠组成。

[0237] 值得注意的是即使在大量神经元损失后,1mg/kg 的 CI-994 处理能够修复场景恐惧条件反射学习。p25 的脑病理类似于患有神经变性和记忆受损的人患者。因此, CI-994 在 CK/p25 模型中的有益效果为使用 CI-994 治疗 (患有阿尔茨海默氏病及其他痴呆病的人) 患者以改善他们的认知功能提供了希望。

[0238] 实施例 8 :CI-994 有利于记忆形成和恐惧消退

[0239] 材料和方法 :

[0240] 在第 0 天使用场景恐惧条件反射实验训练小鼠 (训练包括将小鼠暴露于条件反射箱 (场景, TSE) 3 分钟), 然后进行三次足部电击 (2 秒, 0. 8mA, 恒定电流, 每次间隔 15 秒)。从第 1 天开始, 在消退试验中训练小鼠。对于每个训练日, 将小鼠暴露于条件反射箱 2 次, 每次 3 分钟, 无足部电击 (2 次消退试验 / 天)。第一次试验后 1 小时, 对小鼠注射 CI-994 (30mg/kg, 腹腔内)。注射后 1 小时, 进行第二次消退试验。测量每次试验中的僵立时间。

[0241] 对于记忆再巩固实验, 在如上所述的恐惧消退训练后, 使小鼠在饲养笼中居住 1 个月。随后, 将小鼠再次暴露于条件反射箱 3 分钟, 测量它们的僵立行为。已经证实在恐惧记忆消退试验后, 在饲养笼中休息一段时间后恐惧记忆将自发恢复 (图 34)。推测的恐惧消退机制将触发与恐惧记忆相竞争的新记忆形成并反过来降低恐惧反应。相反地, 已提议基于再巩固的恐惧记忆消退实验来直接改变激活的恐惧记忆, 从而使得降低的恐惧反应不会自发恢复 (Extinction-reconsolidation boundaries :key to persistent attenuation of fear memories. Monfils MH, Cowansage KK, Klann E, LeDoux JE. *Science*. 2009May15 ; 324(5929) :951-5. Epub 2009Apr2)。

[0242] 结果 :引人注意的是, 接受 CI-994 处理的 WT 小鼠消退的速度要比载剂处理组明显更快。重要地, CI-994 处理减轻了 HDAC2 过表达小鼠中恐惧记忆消退的受损。5 次消退试验后, CI-994 处理的 HDAC2OE 小鼠的僵立水平下降至 30%, 而载剂处理的 HDAC2 过表达小鼠继续表现出较高水平的僵立行为 (70%)。因此, CI-994 在另一种不同形式的记忆形成中是有效的。另外, CI-994 在急性剂量环境中是有效的。在 5 天中以 30mg/kg 使用 2 剂 CI-994 实现了对 HDAC2 过表达小鼠的救治。

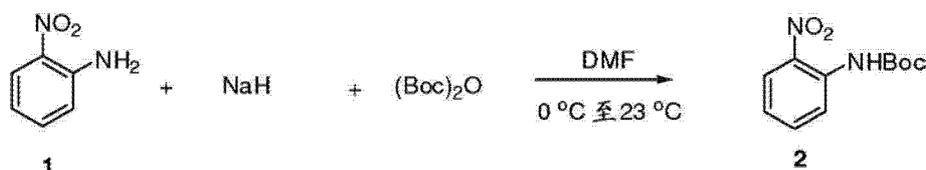
[0243] 我们现已显示了在多种疾病状态中就频率和剂量而言的几种给药方式。这些实验表明 CI-994 处理有益于嫌恶性记忆的消退。因此, 在治疗恐惧症、包括创伤后应激障碍 (PTSD) 的应激障碍以及情感障碍中, 这种处理是有前途的。

[0244] 对于记忆再巩固实验来说, 在一个月自发恢复后, 与载剂处理的小鼠相比, CI-994 处理显著降低了 HDAC2 过表达小鼠的僵立水平 (图 35)。这些发现突出了使用 CI-994 治疗

人 PTSD 的可能性。该数据还表明适当的训练方式结合 CI-994 处理可以导致恐惧记忆的永久性抹去。

[0245] 实施例 9 :CI-994 和地那林的合成、表征和配制

[0246]



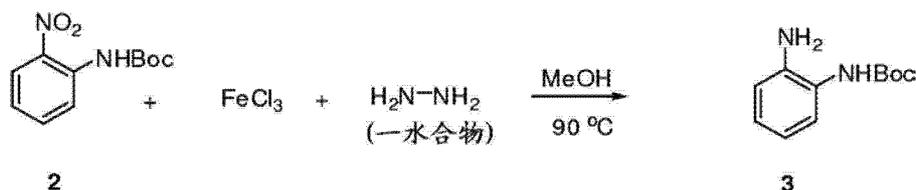
[0247] 将 2-硝基苯胺 1 (25g, 182.4mmol, 1.0 当量) 在无水 DMF (400mL) 中溶解并冷却至 0°C。在氩气氛下, 将 60% 的 NaH (7.7g, 200.7mmol, 1.1 当量) 缓慢加入到反应混合物中。30 分钟后, 将溶解于无水 DMF (100mL) 中的 (Boc)₂O (47mL, 218.8mmol, 1.2 当量) 在该温度下缓慢加入到反应混合物中。使反应混合物缓慢达到 23°C 并继续搅拌 5h。反应完成后, 将反应混合物倾注入冰水中, 过滤出沉淀的固体, 水洗 (3×100mL) 并干燥。将材料通过硅胶短柱以提供浅黄色固体状的叔丁基-2-硝基苯基氨基甲酸酯 2。

[0248] 得率 = 24g (55%)。

[0249] TLC/R_f = 0.6 (20% EtOAc 的己烷溶液)

[0250] ¹H NMR (DMSO-d₆, 500MHz) δ 9.58 (s, 1H), 7.95 (d, 1H, J = 8.5Hz), 7.67 (d, 2H, J = 4Hz), 7.30-7.26 (m, 1H), 1.45 (s, 9H)。

[0251]



[0252] 将叔丁基-2-硝基苯基氨基甲酸酯 2 (24g, 100mmol, 1 当量)、FeCl₃ (1g, 5.57mmol, 0.06 当量)、一水合肼 (150mL) 和甲醇 (440mL) 混合并加热至 90°C。剧烈搅拌 2-3 小时后, 将反应混合物通过硅藻土趁热过滤并用 EtOAc 清洗。将滤液在真空下浓缩以除去 EtOAc-MeOH。用冷水稀释该粗残余物, 过滤所得固体并用己烷清洗以提供乳白色固体状叔丁基-2-氨基苯基氨基甲酸酯 3。

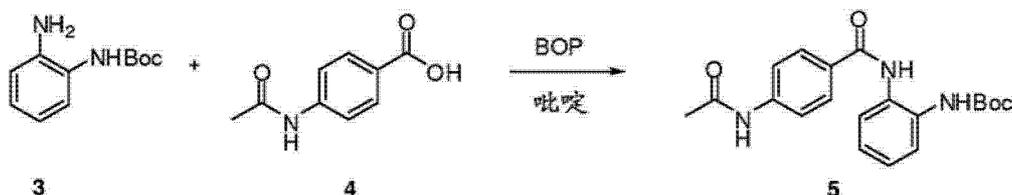
[0253] 得率 3 : (19g, 91% 得率)。

[0254] TLC : 0. K, R_f=0.4 (30% EA 的己烷溶液)。

[0255] ¹H NMR (DMSO-d₆, 500MHz) δ 8.25 (br s, 1H), 7.17 (d, 1H, J=7.5Hz), 6.82 (t, 1H, J=7.5Hz), 6.67 (d, 1H, J=8.0Hz), 6.51 (t, 1H, J=7.5Hz), 4.80 (s, 2H), 1.45 (s, 9H)。

[0256] MS : 109 [M-Boc+H]⁺。

[0257]



[0258] 将叔丁基-2-氨基苯基氨基甲酸酯 3 (19g, 91.7mmol, 1 当量)、4-乙酰胺基苯甲酸

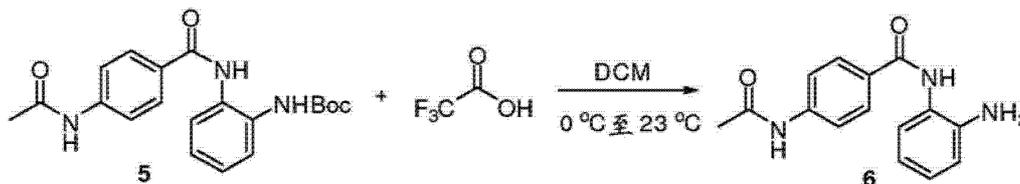
4(18g, 100mmol, 1.1 当量) 和 BOP(48.2g, 109mmol, 1.2 当量) 在吡啶(100mL) 中溶解。在 23℃ 搅拌 48 小时后, 将反应混合物加入水中, 搅拌并过滤出所得沉淀物, 用水、醚清洗并在真空下干燥以提供苯甲酰胺 5。

[0259] 得率 = 30g(90%)。

[0260] TLC/Rf=0.5(100%的 EtOAc)

[0261] ^1H NMR(DMSO- d_6 , 500MHz) δ 10.23(s, 1H), 9.73(s, 1H), 8.66(s, 1H), 7.90(d, 2H, J=8.0Hz), 7.72(d, 2H, J=9.0Hz), 7.53(t, 2H, J=8.5Hz), 7.19-7.14(m, 2H), 2.09(s, 3H), 1.45(s, 9H); MS: 270[M-Boc+H] $^+$; HPLC: 210nm 下为 98.80%。

[0262]



[0263] 将 TFA(100mL) 分批加入到 0℃ 的 Boc 保护的苯甲酰胺 5(18g, 48.7mmol) 在无水 DCM(250mL) 中的溶液中。将混合物缓慢加热到 23℃。搅拌 2h 后, TLC 显示反应完全。在真空中除去 TFA, 用水稀释反应混合物, 并用饱和 NaHCO_3 将 pH 调节至约 8。过滤所得沉淀物, 用水、醚清洗并在真空下干燥以提供乳白色固体状的 4-乙酰氨基-N-(2-氨基苯基)苯甲酰胺 6。

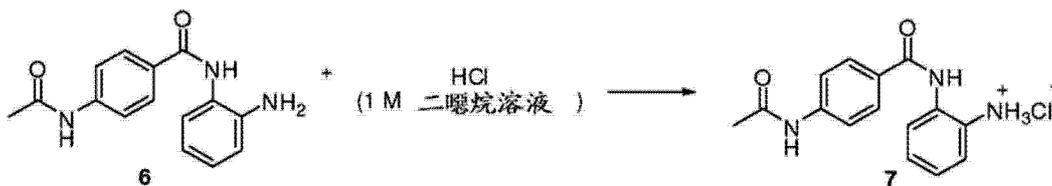
[0264] 得率: (11.5g, 84%)。

[0265] TLC: 良好, Rf=0.3(10% MeOH 的 DCM 溶液)

[0266] ^1H NMR(DMSO- d_6 , 500MHz) δ 10.18(s, 1H), 9.54(s, 1H), 7.93(d, 2H, J=9.0Hz), 7.69(d, 2H, J=8.0Hz), 7.15(d, 1H, J=7.5Hz), 6.96(t, 1H, J=8.0Hz), 6.78(d, 1H, J=8.0Hz), 6.59(t, 1H, J=7.5Hz), 4.87(br s, 2H), 2.08(s, 3H);

[0267] MS: 270[M+1] $^+$; HPLC: 210nm 下为 97.71%。

[0268]



[0269] 将 1M HCl 在二噁烷中的溶液(6mL) 加入到 0℃ 的 4-乙酰氨基-N-(2-氨基苯基)苯甲酰胺 6(520mg, 1 当量) 在丙酮中的溶液中(6mL)。除去冰浴, 并将反应混合物缓慢加热到 23℃。搅拌 2h 后, 在真空下除去溶剂, 用醚清洗粗残余物并在真空下干燥以提供乳白色固体状的单盐酸盐 7。

[0270] 得率: (520mg, 87%) ,

[0271] TLC: Rf = 0.3(10% MeOH 在 DCM 中的溶液)

[0272] CI-994 游离碱的配制与鉴定:

[0273] HPLC 方法开发

[0274] 色谱柱: Luna C18, 5 μm (150 * 4.6mm);

[0275] 流动相(等度): 0.01% TFA : 甲醇 = 5 : 95

[0276] 进样体积 :10 μ l

[0277] 波长 :254nm

[0278] 参数

[0279] LOQ = 6.25 μ g/ml

[0280] 标准曲线 :6.25 ~ 200 μ g/ml, $y = 32.279x + 28.856$, $r^2 = 1$

[0281] 使用以上所列的 HPLC 条件建立标准曲线以对溶液中 CI-994 的水平进行定量 (图 36)。

[0282] 使用以上所列的方案,确定了 CI-994 游离碱在几种溶剂中的最大溶解度。CI-994 的游离碱在盐水 (0.9% NaCl) 中具有至少 2 小时的 0.08mg/mL 的最大溶解度。通过 HPLC 以 2 小时的时间点监测 CI-994 游离碱的溶液和化学稳定性。

[0283] DMSO- 二甲基亚砷 ;DMA- 二甲基乙酰胺 ;NMP-N- 甲基吡咯烷酮 ;

[0284] EtOH- 乙醇 ;盐水 -0.9% 的 NaCl 溶液。

化合物	载剂中的浓度 (mg/ml)				
	DMSO	DMA	NMP	EtOH	氯化钠溶液
CI-994	266.15	246.04	243.28	2.12	0.08

[0285] 制剂

[0287] 检验了使用多种赋形剂的一系列制剂以改善 CI-994 游离碱在盐水中的溶解度 (图 38)。使用 4 种有机溶剂和一系列广泛的可药用赋形剂,所有制剂均达到了 2 小时或更久的 (化学和溶液) 稳定 5mg/ml 溶液制剂的目标。与 CI-994 游离碱在仅仅盐水中的 2 小时溶解度相比,这表明改善了 62 倍。

[0288] 方案 :

[0289] 1) 称量游离碱并在有机溶剂 (DMSO、DMA、NMP、EtOH) 中溶解

[0290] 2) 添加赋形剂,混合 (根据需要,涡旋、超声和 / 或加热混合) 并目视监测溶解度和均一性

[0291] 3) 添加盐水,混合 (根据需要,涡旋、超声和 / 或加热混合) 并目视监测溶解度和均一性

[0292] 4) 通过 HPLC 进一步分析能够提供至少 2 小时目视稳定的组合以测定溶液浓度。

[0293] 通过 HPLC 对 CI-994 制剂的浓度确认

	制剂 (赋形剂比例)	样品中的浓度 (mg/mL)		
		0hr	2hr	4hr
	10% DMSO+45% PEG400+45% 氯化钠溶液*	5.88	5.42	5.76
	10% NMP+45% PEG400+45% 氯化钠溶液	5.53	5.89	5.29
	10% EtOH+45% PEG400+45% 氯化钠溶液*	5.45	4.92	4.39
	10% DMA+30% 克列莫佛 +60% 氯化钠溶液	5.41	5.36	4.56
[0294]	10% DMA+45% PEG400+45% 氯化钠溶液	4.66	4.56	4.56
	10% DMSO+30% 克列莫佛 +60% 氯化钠溶液	5.43	5.04	5.02
	10% NMP+30% PEG400+60% 氯化钠溶液	5.16	5.00	4.72
	10% DMA+30% PEG400+60% 氯化钠溶液	4.39	4.38	4.15
	5% DMA+45% PEG400+50% 氯化钠溶液	4.91	4.67	4.18
	5% NMP+45% PEG400+50% 氯化钠溶液	4.44	4.48	4.06
	5% DMSO+30% 克列莫佛 +65% 氯化钠溶液	4.72	4.38	4.04
	5% EtOH+45% PEG400+50% 氯化钠溶液	4.74	4.54	4.07

[0295] *以 6mg/mL 的目标浓度配制

[0296] 使用我们的标准制剂和分析方案,我们使用 HPLC 分析确认了成功组合的浓度。所有 12 种制剂提供了至少 2h 的稳定溶液(+/-15%的目标浓度)。将 10% DMSO+30% 克列莫佛 +60% 盐水的制剂用于本文所报道的研究。

[0297] CI-994 的 HCl 盐的配制和鉴定:

[0298] 通过 HPLC 的 CI-994HCl 盐的线性度 (BROAD-SAI-140)

[0299] 标准储备溶液的制备:

[0300] 1. 将 1.166mg 的 CI-994HCl 盐 (BROAD-SAI-140) 溶解到 1ml 0.025% 三氟乙酸水溶液与乙腈 1:1 的组合中。

[0301] 观察结果:化合物完全溶解并且观察到清澈、无色的溶液(图 39, 照片 1)。制备标准储备溶液以用于开展基于面积计数的测定溶液中 CI-994HCl 盐的稳健 HPLC 方法。

[0302] 线性度

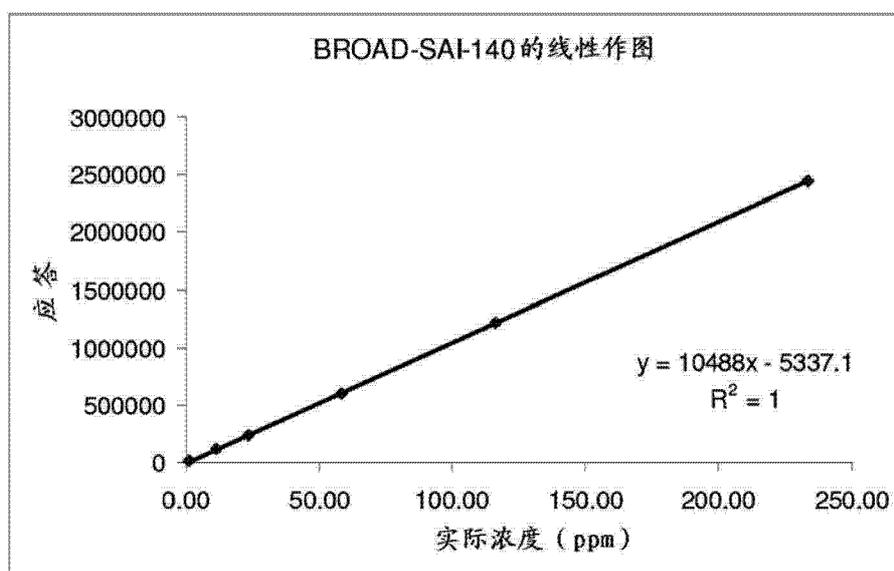
[0303] 线性溶液制备:

[0304]

水平	目标 ppm	所取的储备溶液	使用稀释剂 得到的最终 稀释体积*	实际 ppm	应答
1	200	0.4 ml , 500ppm	1 ml	233.20	2443990
2	100	0.5 ml , 200 ppm	1 ml	116.60	1215128
3	50	0.5 ml , 100 ppm	1 ml	58.30	596573
4	20	0.4 ml , 50 ppm	1 ml	23.32	238336
5	10	0.5 ml , 20 ppm	1 ml	11.66	121497
6	1	0.1 ml , 10 ppm	1 ml	1.17	11826

*稀释剂是1:1组合的乙腈: 0.025% TFA水溶液

[0305]



[0306] 在 5mg/ml 的目标浓度下 CI-994 HCl 盐 (BROAD-SAI-140) 在盐水 (0.9% NaCl) 中的溶解度研究

[0307] 程序：

[0308] 1. 在容量为 1.5mL 的 eppendorf 管中称量 2.501mg CI-994HCl 盐。

[0309] 2. 通过使用微量移液器加入 500 μ 10.9% 的盐水溶液。

[0310] 3. 手动振荡管。

[0311] 观察结果：溶液变浑浊。

[0312] 4. 对步骤 3 中的上述溶液超声处理 5 分钟。

[0313] 观察结果：当加入 0.9% 盐水溶液时，溶液变为白色浑浊溶液。发现沉淀物均匀分布（图 39，照片 2）。

[0314] 5. 将上述溶液离心 15 分钟

[0315] 观察结果：化合物沉降于管底部，上清液溶液变透明（图 39，照片 3）。

[0316] 6. 将步骤 5 中上清液的透明溶液用于分析。

[0317] BROAD-SAI-140 的溶解度结果

溶解度 结果编号	目标浓度	样品时间	溶解于其中的药物的量
			mg/ml 氯化钠溶液
[0318]	5 mg/ml	初始时	2.852
		2小时	2.841

[0319] 通过使用 CI-994 的 HCl 盐形式,我们能够证明 CI-994 在水溶液中的溶解度改善了 35 倍。HPLC 分析确认 CI-994 的 HCl 盐形式的化学和溶液稳定性至少为 2 小时。该制剂适合在不使用其他赋形剂的条件用于递送 CI-994。

[0320] 实施例 10 :HDAC 抑制剂, CI-994, 促进恐惧记忆消退。

[0321] 材料和方法 :

[0322] 在三天消退试验前,将两组小鼠在场景恐惧条件反射中训练 2 次。在每个消退日,在不进行任何电击的情况下将小鼠暴露于训练箱 3 分钟,然后将其返回至饲养笼中。暴露后 1 小时,对小鼠注射 CI-994 (25mg/kg) 或载体,并在第二次 3 分钟暴露前 1 小时返回饲养笼中。监测训练笼中每只小鼠的僵立行为。为了测试恐惧记忆恢复,在上次消退试验后一小时施加提醒电击。在提醒电击后 24 小时测定僵立时间。

[0323] 结果 :测量每天第一次 3 分钟暴露期间小鼠的僵立水平并作图。CI-994 处理组中的恐惧记忆消退要比载体处理组快的多。第三天,CI-994 组与对照组相比表现出显著较短的僵立时间。每组 N = 8。*, p < 0.05 (图 41, 图 B)。测定消退第 1 天期间,注射前后,两次场景暴露训练中小鼠的僵立水平并作图。CI-994 组表现出更快的僵立时间降低 (图 41, 图 C)。对消退第 2 天期间,注射前后,两次场景暴露训练中小鼠的僵立水平定量并作图。CI-994 组表现出更快的僵立时间降低 (图 41, 图 D)。提醒电击后 24 小时,在训练场景下测量每个组的僵立水平。CI-994 组和对照组之间未观察到显著差异,两组均表现出高僵立水平 (图 41, 图 E)。

[0324] 实施例 11 :p25 小鼠皮层中 HDAC1 和 HDAC2 的表达。

[0325] 在 p25 小鼠的皮层中测量了 HDAC1 和 HDAC2 的表达。发现 p25-CK 小鼠中 HDAC2 的表达显著高于对照小鼠 (图 42A)。相反,HDAC1 的表达未改变 (图 42B)。

[0326] CK-p25 小鼠中 HDAC2 的表达显著高于对照小鼠。相反,CK-p25 小鼠中组蛋白 4 赖氨酸 12 (AcH4K12) 的乙酰化强度降低。长期 CI-994 处理 (1mg/kg, 腹膜内) 10 天 (从 p25 诱导后 6 周开始) 增加了 H4K12 的乙酰化。在 CK-p25 小鼠中诱导 p25-GFP 6 周。CK-p25 小鼠在皮层神经元中还表现出 hdac2 表达的升高以及 AcH4K12 的降低。长期 CI-994 处理 (1mg/kg, 腹膜内) 10 天 (从 p25 诱导后 6 周开始) 增加了 H4K12 的乙酰化。在 CK-p25 小鼠中诱导 p25-GFP 6 周。

[0327] 实施例 12 :CI-994 处理提高了 CK-p25 小鼠中突触素 (SVP) 的表达。

[0328] 在 CK-p25 小鼠中诱导 p25-GFP 6 周。然后,小鼠接受 10 天长期 CI-994 处理 (1mg/kg, 腹膜内)。分离海马,并通过蛋白质印迹分析进行蛋白质定量。p25 的 6 周表达导致 SVP 显著降低。长期 CI-994 处理挽救了 CK-p25 小鼠中 SVP 的表达。此外,作为反应性星形细胞标志物的 GFAP 在 CK-p25 小鼠中升高,而在 CI-994 处理组中降低 (图 43)。这些结果显示 CI-994 处理在 CK-p25 小鼠中在神经变性后诱导了活性突触发生,其作用与改善认知功

能和记忆一致。

[0329] CI-994 处理还上调了 CK-p25 小鼠中 MAP2 阳性树突。诱导 p25-GFP 6 周。随后,小鼠接受 10 天长期 CI-994 处理 (1mg/kg, 腹膜内)。固定小鼠,并用作为树突标志物的 MAP-2 抗体染色。在 6 周诱导的 CK-p25 脑中,MAP2 染色强度显著降低。长期 CI-994 处理提高了 CK-p25 小鼠中 MAP2 染色强度。这些结果表明在神经变性后,CI-994 诱导了活性树突生长。

[0330] 实施例 13 :5XFAD 小鼠 (具有 5 种常见阿尔茨海默氏病突变基因的转基因小鼠) 的皮层神经元中 HDAC2 表达升高而 Ach4K12 降低。

[0331] 5XFAD 小鼠及其同窝对照为 10 月龄。据发现 5XFAD 小鼠中 HDAC2 的表达显著高于对照小鼠 (图 44B)。相反,5XFAD 小鼠中 Ach4K12 强度显著降低 (图 44A)。

[0332] 与同窝对照相比,5XFAD 小鼠的海马 CA1 神经元中 HDAC2 的表达也升高。相反,5XFAD 小鼠中 HDAC1 的强度与同窝对照 (10 个月大) 类似。

[0333] 人阿尔茨海默氏脑的特征在于组蛋白脱乙酰基酶 HDAC2 的水平提高。图 44C 显示了对照脑、轻度阿尔茨海默氏病 (Braak and Braak (B&B) 阶段 III-IV) 病例和重度阿尔茨海默氏病 (B&B 阶段 V-VI) 病例的海马 CA1 区和内嗅皮层的石蜡包埋切片中 HDAC2 的代表性免疫组织化学图片。上图的比例尺 = 0.7mm, 下图为 0.35mm。图 44F 中显示了病例的详细情况。

[0334] 实施例 14 :CI-994 和记忆形成

[0335] CI-994 增强了野生型 (WT) 小鼠中记忆形成。用 CI-994 处理野生型 C57/BL6 小鼠 10 天。如图 45A 中所示,施用不同的剂量。在图 45A 的每个柱的底部示出了每组中小鼠的总数。随后,用场景恐惧条件反射实验训练小鼠,并在训练后 24 小时进行测试。图 45A 的最后两个柱显示了每两天一次注射 CI-994 (注射 10 天) 的两组小鼠 (总计 5 剂)。低至 1mg/kg 的 CI-994 剂量能够增强小鼠中记忆形成。相反,盐酸多奈哌齐 (胆碱酯酶抑制剂) 对 WT 小鼠中记忆形成没有作用。用 CI-994 (1mg/kg, 腹膜内) 或盐酸多奈哌齐 (1mg/kg) 处理野生型 C57/BL6 小鼠,处理 10 天。每组 n = 20。给药 10 天后,用场景恐惧条件反射实验训练小鼠,并在训练后 24 小时进行测试。CI-994 处理显著提高了 WT 小鼠中的记忆形成,而盐酸多奈哌齐处理在记忆形成中未表现出任何作用 (图 45B)。

[0336] 实施例 15 :CI-994 和记忆受损

[0337] 长期 CI-994 处理改善了 CK-p25 小鼠中的记忆受损,而盐酸多奈哌齐处理则不行。在 CK-p25 小鼠中诱导 p25-GFP 6 周。随后,小鼠接受 10 天长期 CI-994 (1mg/kg, 腹膜内)、盐酸多奈哌齐 (1mg/kg) 或载剂。用场景恐惧条件反射实验训练所有组的小鼠,并在 24 小时后进行测试。长期 CI-994 处理挽救了 CK-p25 小鼠中的记忆受损 (图 46A),而盐酸多奈哌齐则不行。僵立表示扣除电击前的基础僵立水平,在暴露于训练场景 3 分钟期间的僵立时间百分比。

[0338] 长期 CI-994 处理还改善了 CK-p25 小鼠中空间记忆缺陷。在 CK-p25 小鼠中诱导 p25-GFP 6 周。随后,小鼠接受 10 天长期 CI-994 (1mg/kg, 腹膜内) 或载剂 (图 46B)。用标准莫里斯水迷宫 (Morris watermaze) 实验训练所有 3 组小鼠 6 天。在每次试验中,将小鼠置于游泳池中 60 秒以寻找隐藏的平台。每天进行总计 3 次试验,试验间间隔 5 分钟。图 46B 显示了水迷宫装置的图画。对每组小鼠找到平台所花的平均时间作图 (逃脱等待期)。用 CI-994 处理的 CK-p25 小鼠显示出与对照小鼠类似的学习曲线,而用载剂处理的 CK-p25

小鼠在定位隐藏平台时明显时间延长。这些效果甚至在上次剂量后 7 天仍能观察到,这相当令人吃惊。

[0339] CI-994 处理改善了 CK-p25 小鼠中的记忆提取缺陷。在 CK-p25 小鼠中诱导 p25-GFP 6 周。随后,小鼠接受 10 天长期 CI-994(1mg/kg,腹膜内)或载体。如上所述,用莫里斯水迷宫(Morris watermaze)实验训练 2 组小鼠 7 天。第 8 天,除去平台并测试小鼠的记忆提取。对每组小鼠在目标象限区域中所花的平均时间作图。第 8 天,用 CI-994 处理的 CK-p25 小鼠表现出与第 7 训练日在目标象限区域中所花的时间相当,这表明具有记忆提取能力。相反,第 8 天,用赋形剂处理的 CK-p25 小鼠在目标象限区域中所花的时间比训练日(第 7 天)期间显著更少。因此,CK-p25 小鼠的空间记忆提取受损,而 CI-994 处理挽救了该记忆提取缺陷。

[0340] 实施例 16:脑振荡中 CI-994 的长效作用。

[0341] 在 CK-p25 小鼠中诱导 p25-GFP 6 周。随后,小鼠接受 10 天长期 CI-994 处理(1mg/kg,腹膜内)或载体。CI-994 处理后 10 天,使用 2%异氟烷使小鼠麻醉,并使用玻璃电极在海马 CA1 区测量同步放电。对于每只动物,记录 5 分钟的局部场电位(local field potential,LFP)。对于使用载体处理的 CK-p25 小鼠,n = 5,对于使用 CI-994 处理的 CK-p25 小鼠,n = 4。与对照动物相比,CK-p25 小鼠表现出振荡功率(oscillation power)明显降低(降低超过 10 倍)。CI-994 处理显著提高了 CK-p25 小鼠 CA1 区中的振荡功率(图 47A- θ 带中的 LFP 功率;图 47B- γ 带中的 LFP 功率)。

[0342] 实施例 17:CI-994 和恐惧消退

[0343] 在正常消退实验下,CI-994 和 D-环丝氨酸(DCS)有利于恐惧消退。用场景恐惧条件反射实验训练野生型 C57/BL6 小鼠。训练后 5 天,用 DCS(15mg/kg)或 CI-994(30mg/kg)注射小鼠,随后在无电击的训练场景中进行 21 分钟的消退试验。测量了消退试验的第一个 3 分钟内的僵立时间和消退训练后 24 小时的测试试验中的时间。在消退训练 24 小时后,DCS 和 CI-994 处理组均表现出僵立明显减少(图 48A)。

[0344] CI-994 处理有利于再巩固范例下的恐惧消退,而 D-环丝氨酸处理则不行。在两次电击的场景恐惧条件反射实验中训练小鼠。随后,在接下来的 4 天内,小鼠接受再巩固训练。每天,将小鼠暴露于场景 3 分钟以重新激活先前所获得的恐惧记忆,然后根据说明,注射 CI-994、DCS 或载体。注射后一小时,将小鼠放回到相同场景中 3 分钟。测量每天第一次试验的僵立时间并作图。在该实验下,CI-994 明显有利于恐惧消退,而 DCS 则不行(第 2-4 训练日的双因素方差分析,每组 n = 20;图 48B)。

[0345] 初始恐惧记忆训练后 1 个月,测试恐惧记忆的自发恢复。CI-994 处理组显示出比赋形剂组明显更低的僵立水平,而 DCS 处理组与赋形剂组相比无显著差异(t 检验)。

[0346] CI-994 还有利于特定场景下恐惧记忆的消退。将小鼠置于新型训练箱中 3 分钟并接收 30 秒的发声,随后电击。24 小时后,进行第二次训练。第二次恐惧条件反射训练后 24 小时,将小鼠暴露于训练室(仅场景)以提取场景依赖的记忆。提取后 1 小时,注射 CI-994(30mg/kg)。注射后一小时,将小鼠放回到所述室中 3 分钟以进行消退训练。每天进行一次重激活-消退试验(进行 3 天),并且在最后一次训练后 5 天测量僵立水平。(每组 n = 10)。CI-994 处理增强了特定场景下的恐惧记忆消退(图 48C)。

[0347] 实施例 18:CI-994 有效并持续地使创伤性长期记忆消退。

[0348] 图 49A 中示出了用于探索 HDAC 抑制剂 CI-994 (5mg/kg) 使创伤性长期记忆消退的效力的试验设计的图示。训练后 30 天,每天将小鼠在它们所训练的相同场景中暴露两个 3 分钟消退时间段。CI-994 显著降低了动物的僵立水平,这表明条件反射恐惧消退(对于天数的作用, $p < 0.001$; 对于载体处理的动物, $n = 10$, 对于 CI-994 处理的动物, $n = 11$; 图 49B)。当最后一次消退试验后 30 天再次试验时,与赋形剂处理的那些相比,CI-994 处理的动物仍表现出降低的僵立水平,这表明消退长期持续 ($t_{13} = 4.402$, $p < 0.001$; 图 49C)。图 49D 中示出了用于探索使用 CI-994 (5mg/kg) 使记忆消退的特异性的试验设计的图示。在对场景(场景 A)和暗示($3 \times 0.8\text{mA}$ 电击, 2 秒,与发声相配合)条件反射恐惧后 30 天,首先将小鼠在与训练发生的场景(场景 A)不同的场景(场景 B)中单独暴露于暗示,并且随后每天在它们所训练的相同场景(场景 A)中暴露两个 3 分钟的消退时间段。该消退时间段结束后,将小鼠再次暴露于场景 B,并测试它们的记忆。CI-994 不影响在不同于消退场景的场景中形成记忆(未详细说明,对于处理和时间的影响; 每组 $n = 10$ 只小鼠; 图 49E),但是在发生消退的场景中仅仅它降低了动物的僵立水平(对于天数的影响, $p < 0.05$; 每组 $n = 10$ 只小鼠; 图 49F)。当最后一次消退试验后 30 天再次试验时,在消退场景中,与载体处理的那些相比,CI-994 处理的动物仍表现出降低的僵立水平 ($t_8 = 2.955$, $p < 0.05$; 图 49G),但是在不同的场景中并非如此(未详细说明,对于处理的影响, 每组 $n = 5$; 图 49H),这表明了场景特异的消退记忆的长期持续。

[0349] 实施例 19:小鼠中单次 0.1mg/kg 腹膜内给药后血浆和脑中 CI-994 的浓度-时间曲线。

[0350] 图 50 中示出了通过腹膜内注射全身施用 0.1mg/kg 单剂 CI-994 后的药代动力学数据总结。在该图中显示了 5 分钟至 8 小时期间 C-57 小鼠的血浆和脑中的 CI-994 的浓度时间曲线。该数据表明 CI-994 在脑和血浆中所达到的浓度。CI-994 易于穿过血脑屏障并在低剂量施用后存在。

[0351] 实施例 20:1.0 和 0.1mg/kg 的 CI-994 减轻了 CK-p25 小鼠中的认知缺陷

[0352] 在 CK-p25 小鼠中诱导 p25-GFP 6 周。随后,小鼠接受 10 天长期 CI-994 (0.1mg/kg 或 1mg/kg, 腹膜内)或载体。用场景恐惧条件反射实验训练所有组的小鼠,并在 24 小时后进行测试。长期 CI-994 处理挽救了 CK-p25 小鼠中记忆的受损(图 51)。

[0353] 实施例 21:CI-994 处理修复了 CK-p25 小鼠皮层神经元中 H4K12 的乙酰化和树突密度

[0354] CK-p25 小鼠在皮层神经元中表现出降低的 AcH4K12。长期 CI-994 处理 (0.1mg/kg, 腹膜内) 10 天(从 p25 诱导后 6 周开始)提高了 H4K12 的乙酰化。在 CK-p25 小鼠中诱导 p25-GFP 6 周。

[0355] CI-994 处理上调了 CK-p25 小鼠中 MAP2 阳性树突。诱导 p25-GFP 6 周。随后,小鼠接受 10 天长期 CI-994 处理 (0.1mg/kg, 腹膜内)。固定小鼠,并用作为树突标志物的 MAP-2 抗体染色。在 6 周诱导的 CK-p25 脑中,MAP2 染色强度显著降低。长期 CI-994 处理提高了 CK-p25 小鼠中 MAP2 染色强度。这些结果显示在神经变性后 CI-994 诱导了活性树突生长。

[0356] 据认为上述书面说明书足以使本领域技术人员能够实施本发明。本发明不受限于实施例所提供的范围,因为实施例旨在作为本发明一个方面的一个说明并且其他功能等效的实施方案也在本发明的范围内。除本文所示或所述的那些之外,根据上述说明,本发明

的多种修改将对于本领域技术人员来说是显而易见的,并且将处于所附权利要求的范围之内。本发明的优势不必须由本发明的每个实施方案所涵盖。

作为HDAC抑制剂的CI-994和地那林的特征

已知的和新的记忆增强剂的同工酶效力和选择性

记忆增强剂	I类 HDACs											IIa类 HDACs		IIb类 HDACs		IV类 HDACs	
	HDAC1	HDAC2	HDAC3	HDAC4	HDAC5	HDAC6	HDAC7	HDAC8	HDAC9	HDAC10	HDAC11	HDAC6	HDAC9	HDAC10	HDAC11		
丁酸盐	8.3	7.04	4.82	10.4	5,726	6,403	4,380	5,619	5,881								
丙戊酸盐	35.4	59.2	218	97.1	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000		
SAHA	0.002	0.003	0.006	0.700	>30	>15	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	0.004		
CI-994	0.299	0.432	1.33	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30		
地那林	0.681	0.931	1.39	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30		

体外HDAC IC₅₀ (μM);使用同工酶特异性底物
(10分钟预孵育)

图 1

作为时间依赖性HDAC抑制剂的CI-994和地那林的表征

已知的和新的记忆增强剂的同工酶效力和选择性

记忆增强剂	I类 HDACs											IIa类 HDACs		IIb类 HDACs		IV类 HDACs	
	HDAC1	HDAC2	HDAC3	HDAC4	HDAC5	HDAC6	HDAC7	HDAC8	HDAC9	HDAC10	HDAC11	HDACs	HDACs	HDACs	HDACs	HDACs	HDACs
丁酸盐	8.3	7.04	4.82	10.4	5,726	6,403	4,380	5,619	5,881								
丙戊酸盐	35.4	59.2	218	97.1	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000
SAHA	0.002	0.003	0.006	0.700	>30	>15	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30
CI-994	0.040	0.050	0.050	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30
地那林	0.149	0.078	0.104	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30

体外 HDAC IC₅₀ (μM);使用同工酶特异性底物 (1-3小时预孵育)

图 1A

体内HDACi生物标志物：鲁宾斯坦泰比 **CBP**^{+/-}小鼠中的乙酰化标志物

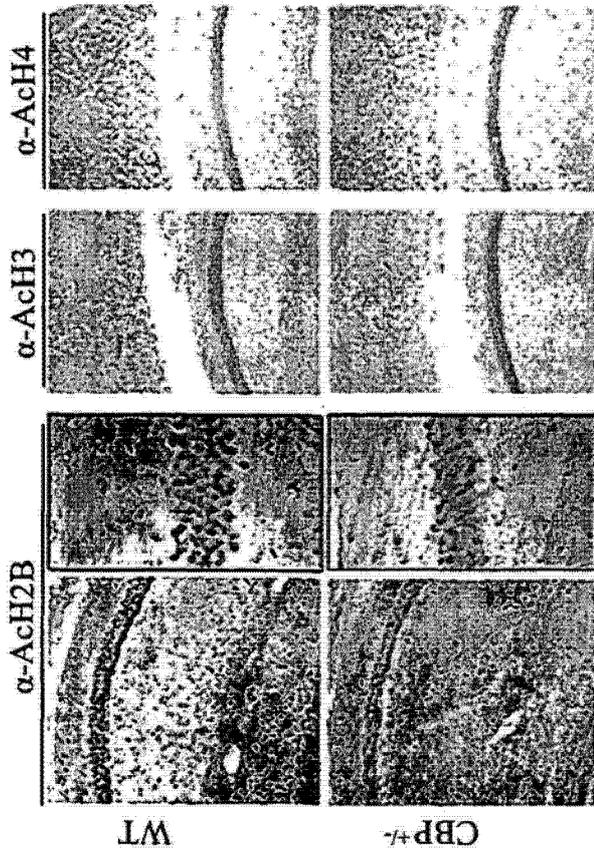


图 2A

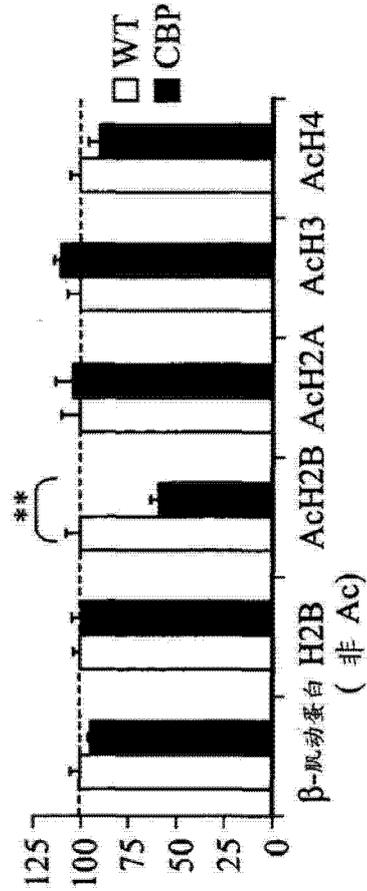
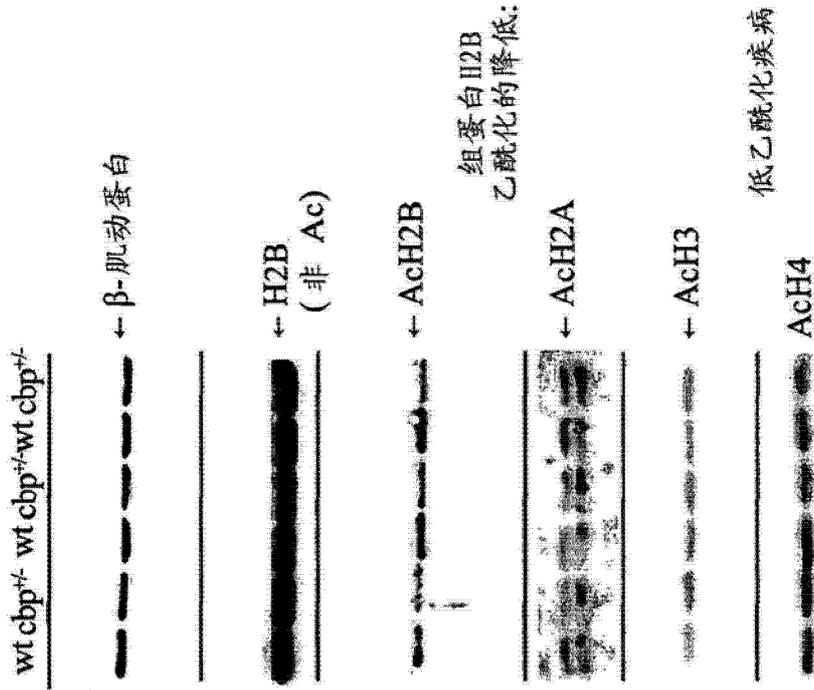


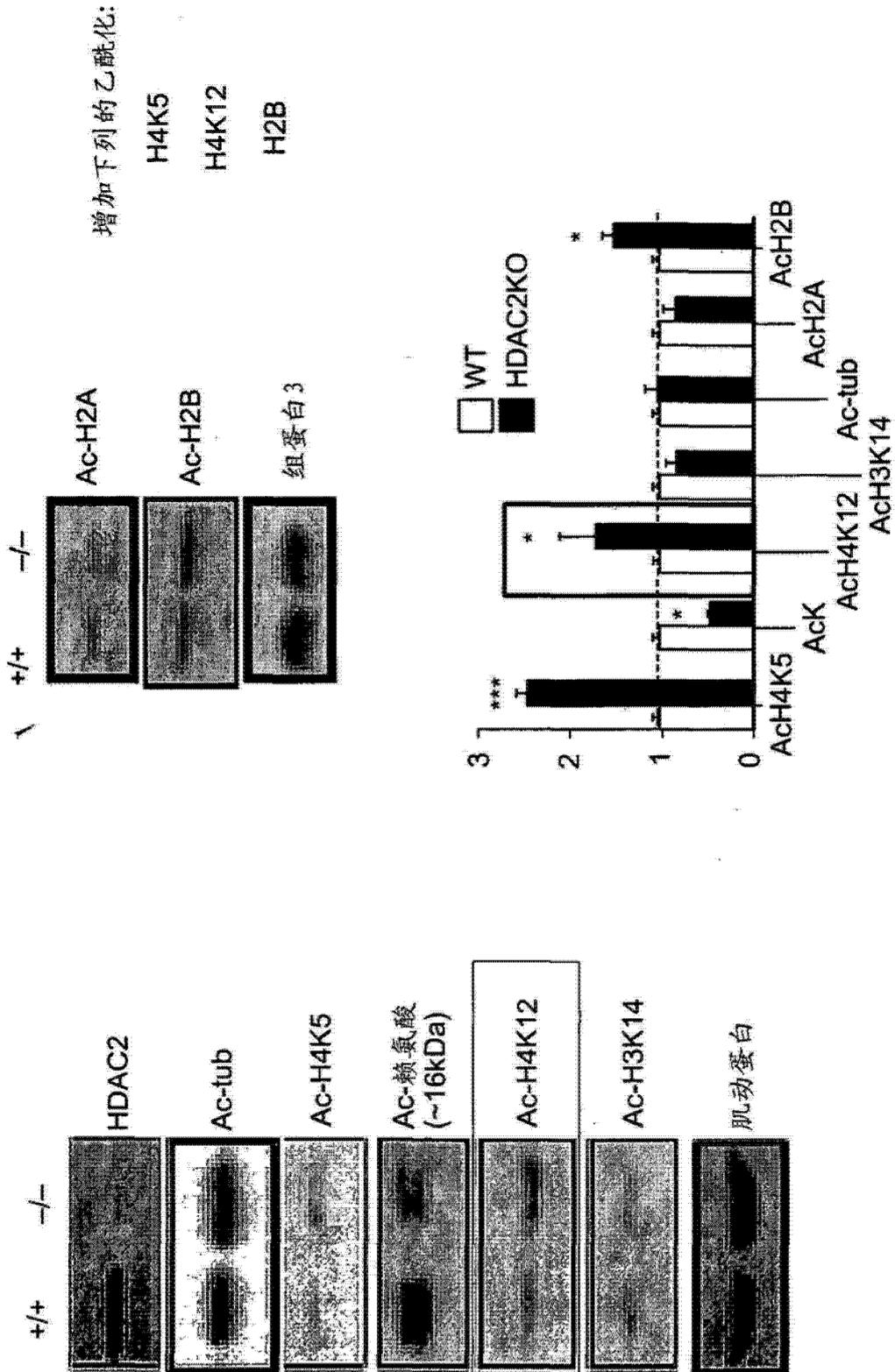
图 2C



来自 Alarcon et al. Neuron. 2004 Jun 24;42(6):947-59

图 2B

在I类HDAC中，HDAC2负调控记忆形成和突触塑性



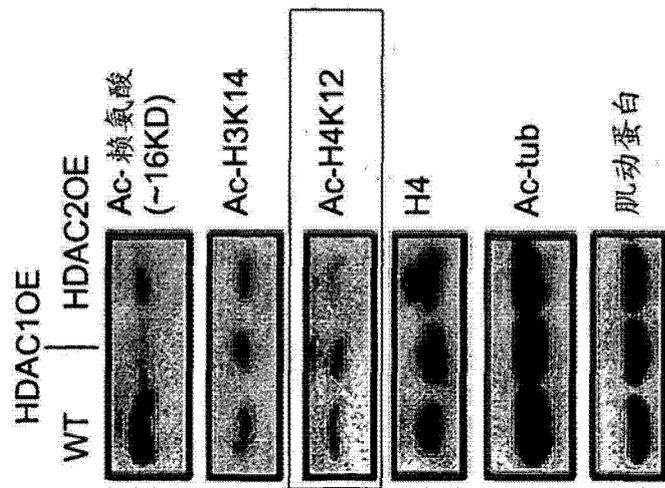
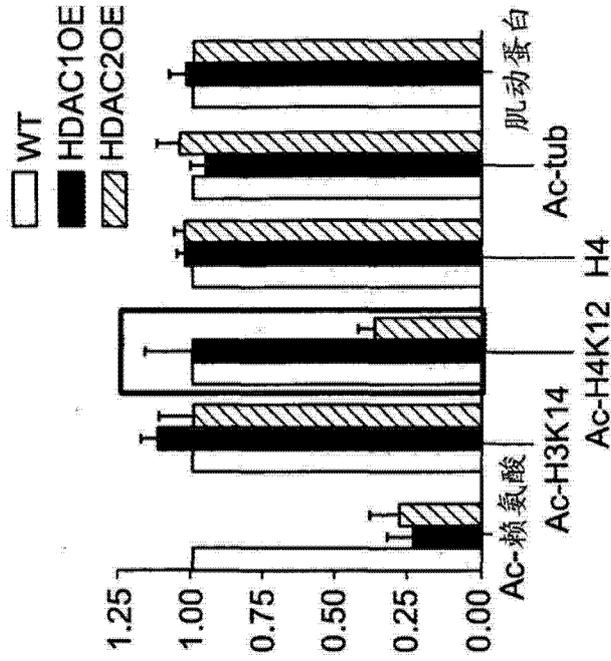
体内HDACi生物标志物: HDAC2 KO小鼠中的乙酰化标志物

图 3

在I类HDAC中，HDAC2负调控记忆形成和突触塑性

降低下列的乙酰化：

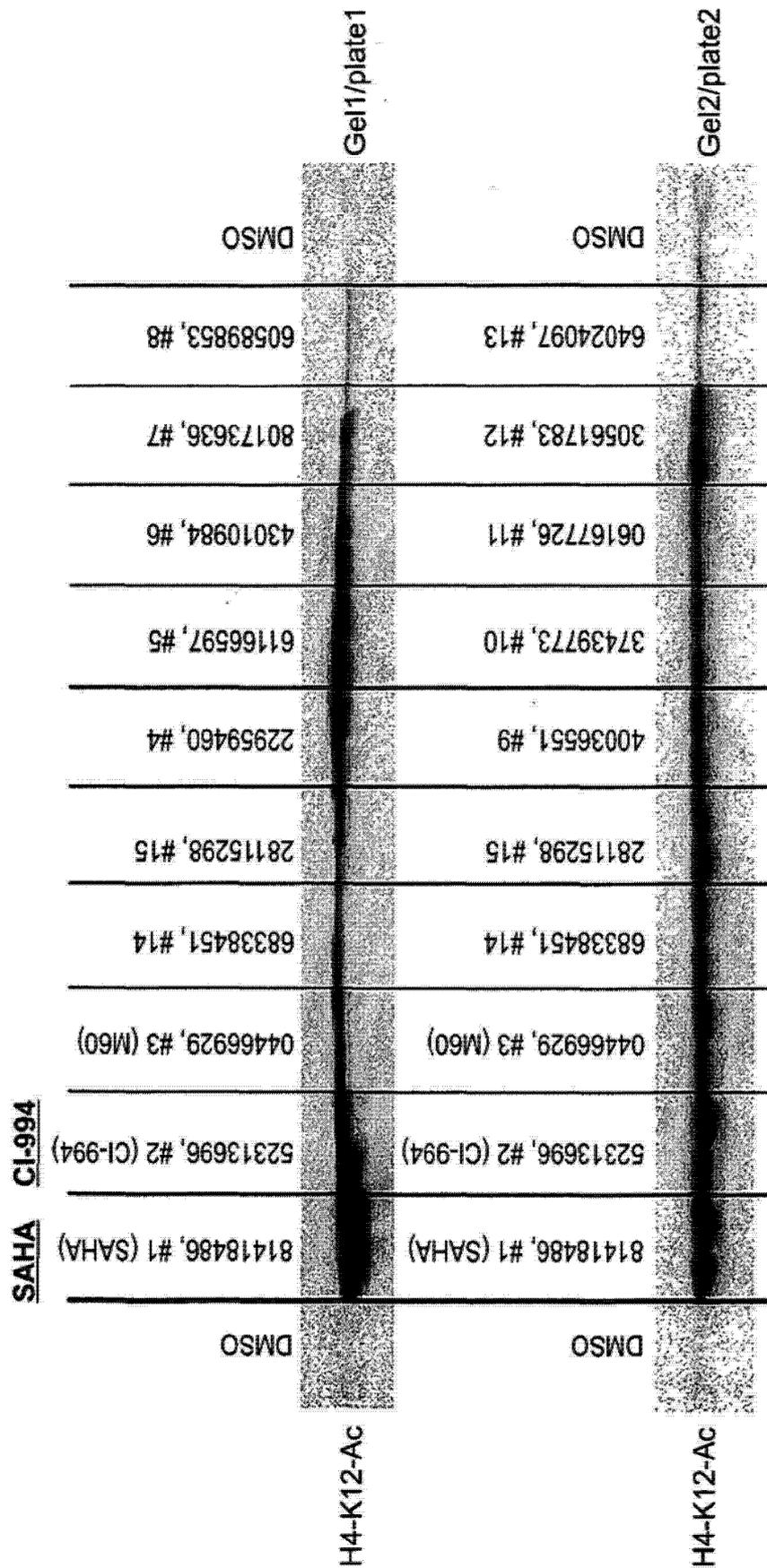
H4K12



体内HDACi生物标志物：HDAC2 OE小鼠中的乙酰化标志物

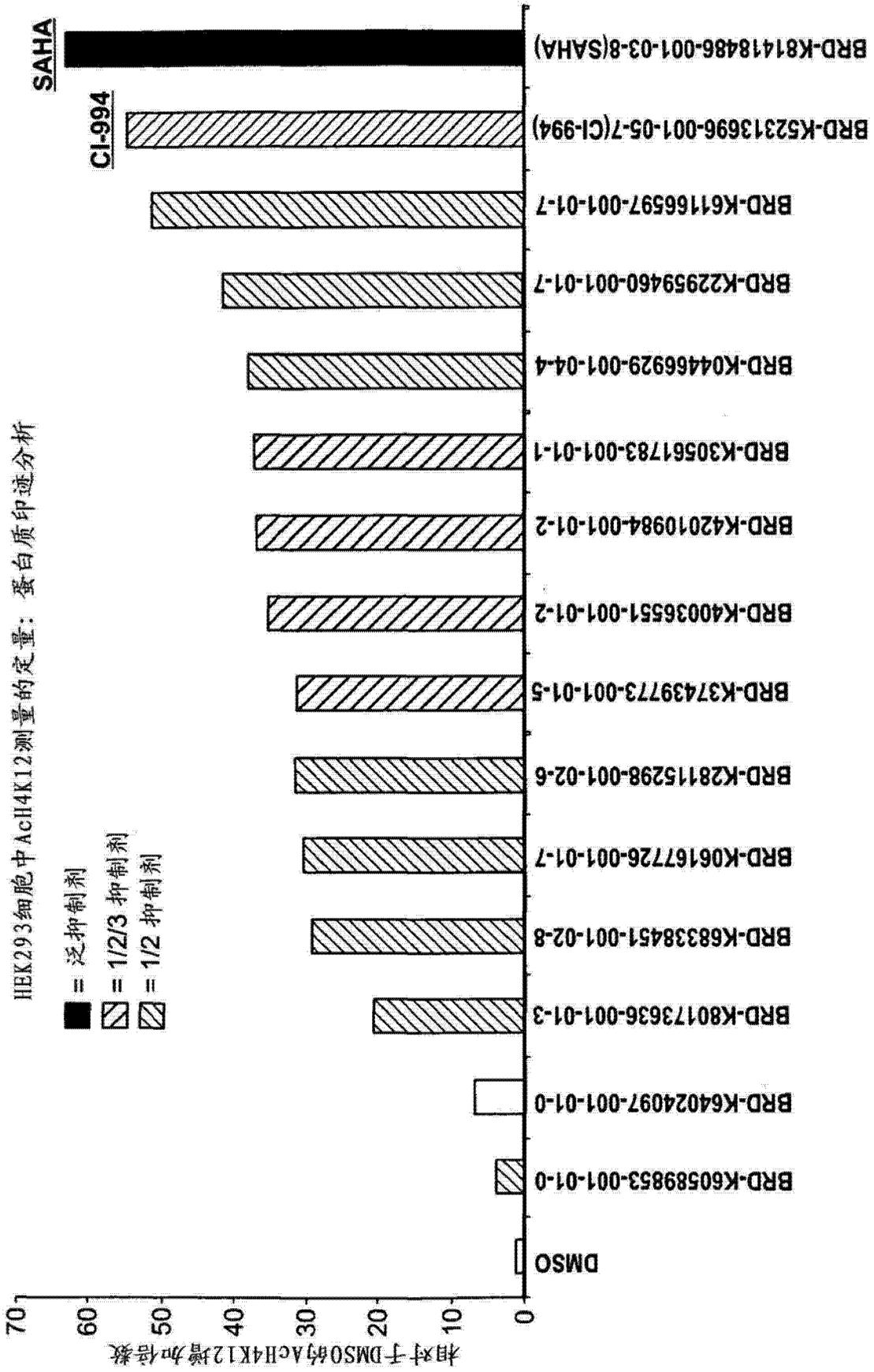
图 4

293细胞中H4-K12乙酰化的诱导：蛋白质印迹



所有化合物为10 μM; 6小时孵育

图 5



9 图

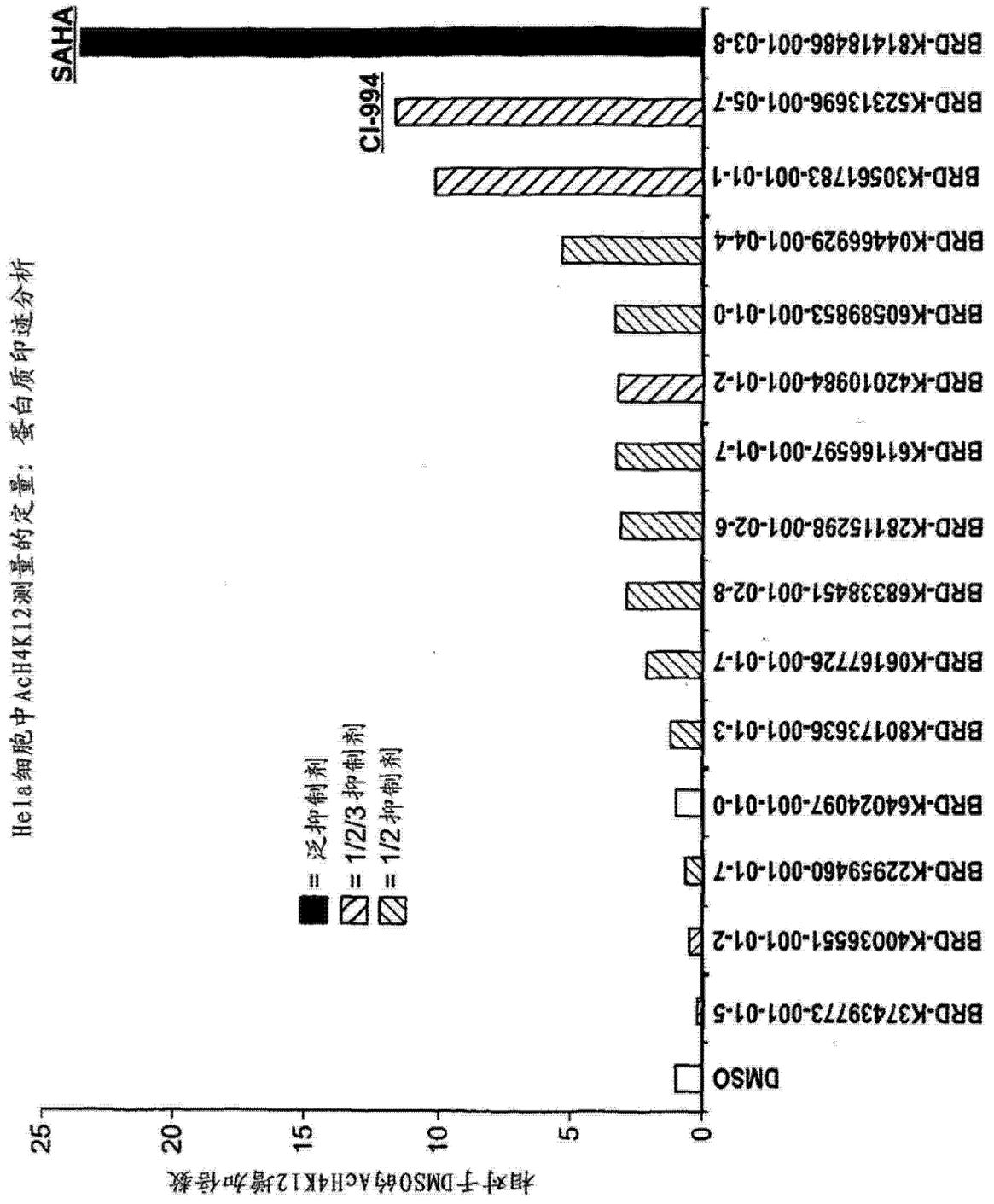


图 7

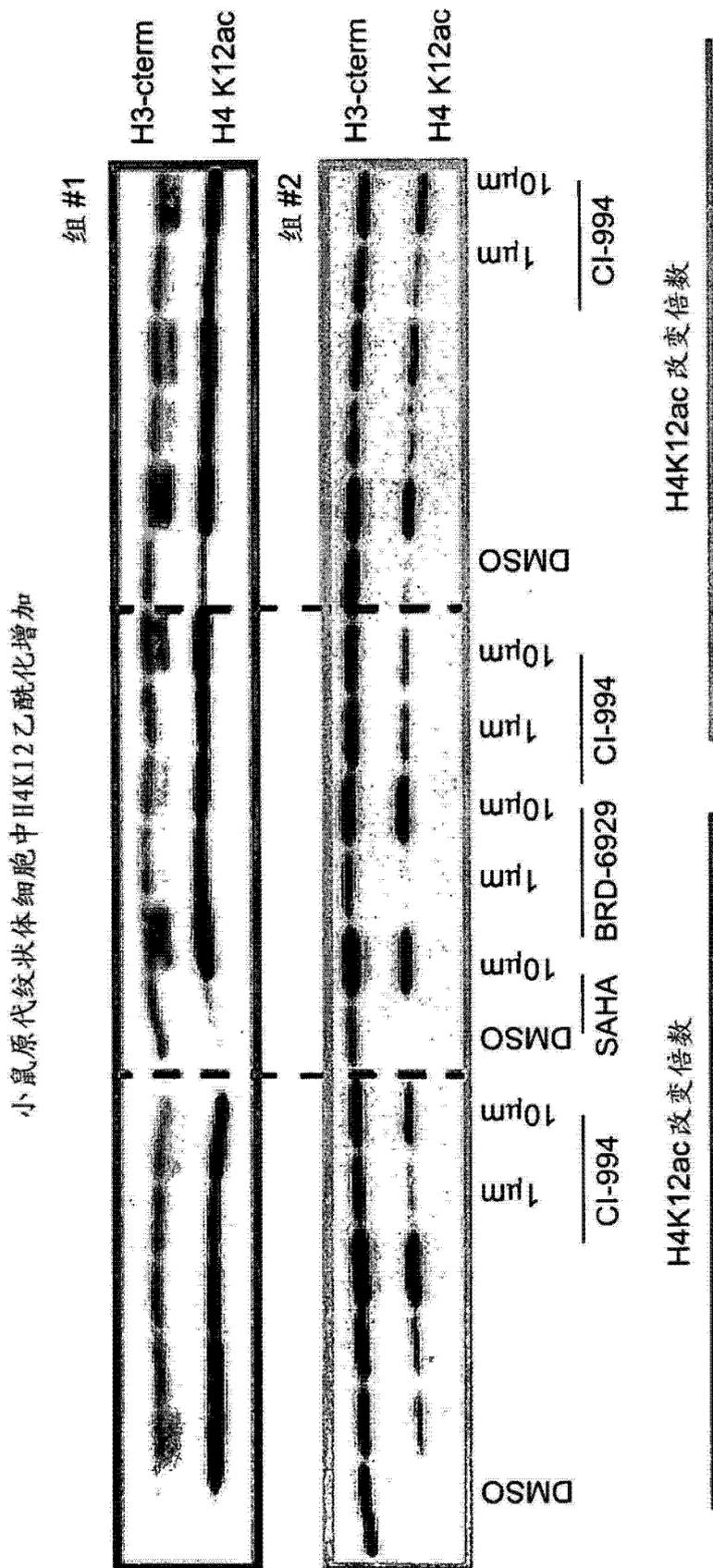


图 8A

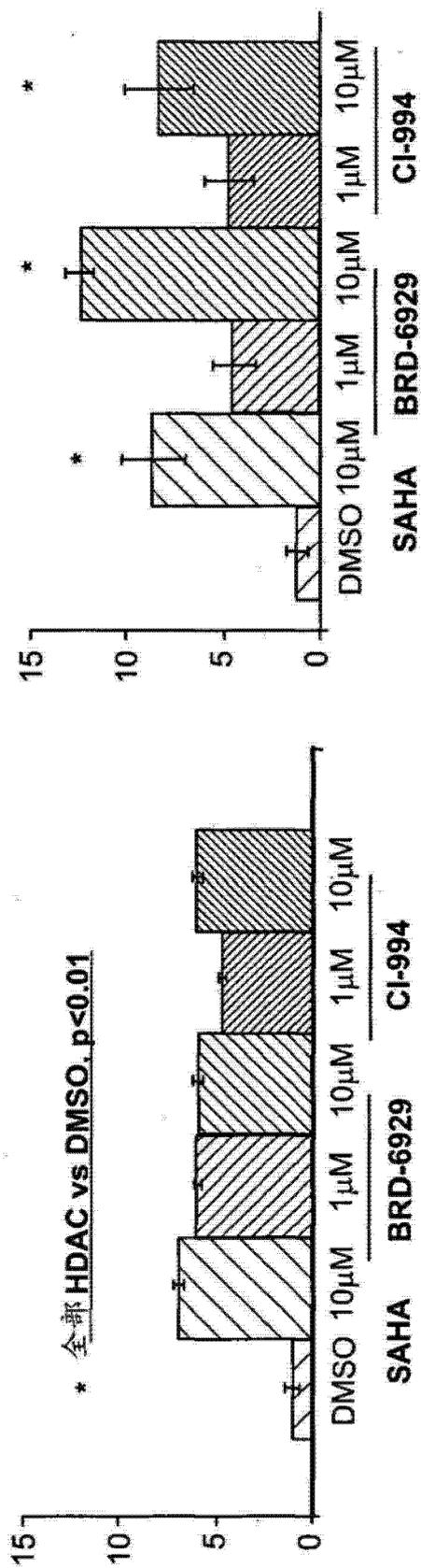


图 8B

在体外用CI-994处理神经元细胞增强了H4和H2B组蛋白乙酰化

原代纹状体细胞: DIV10, 24hrs +/-HDACi

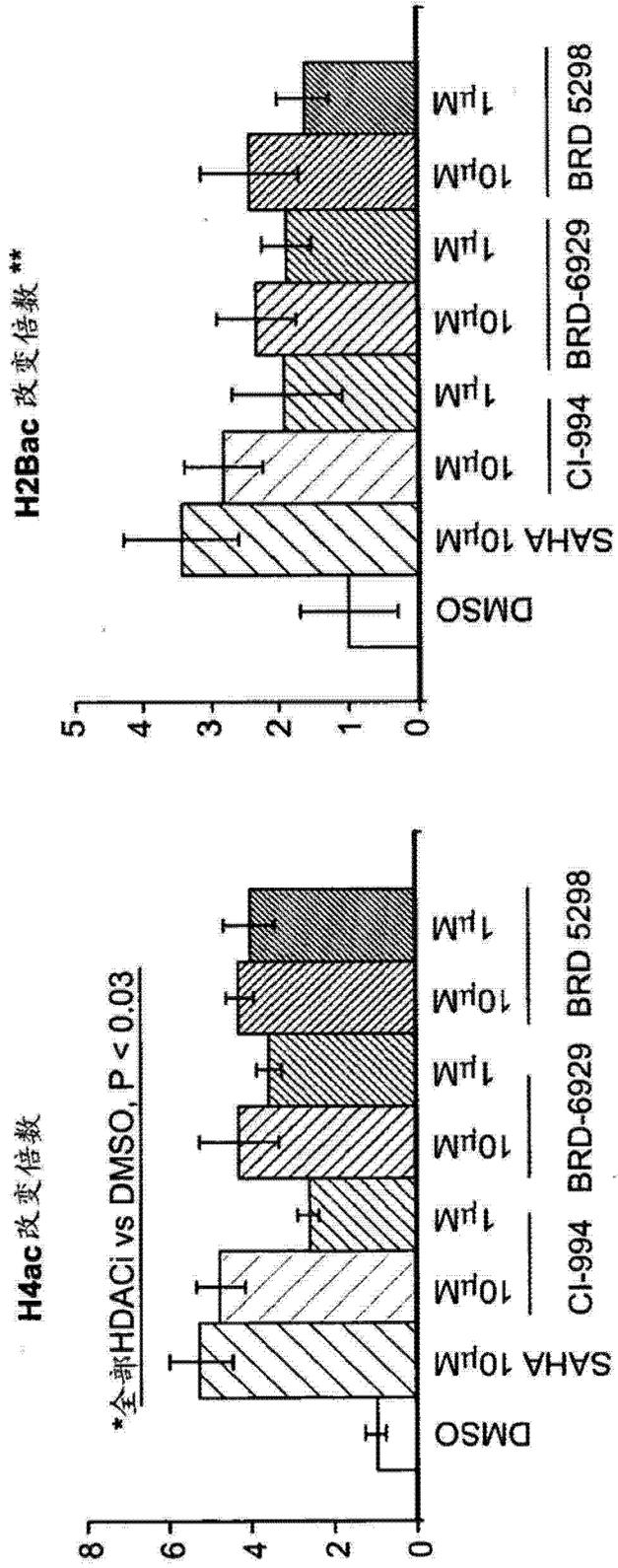


图 9

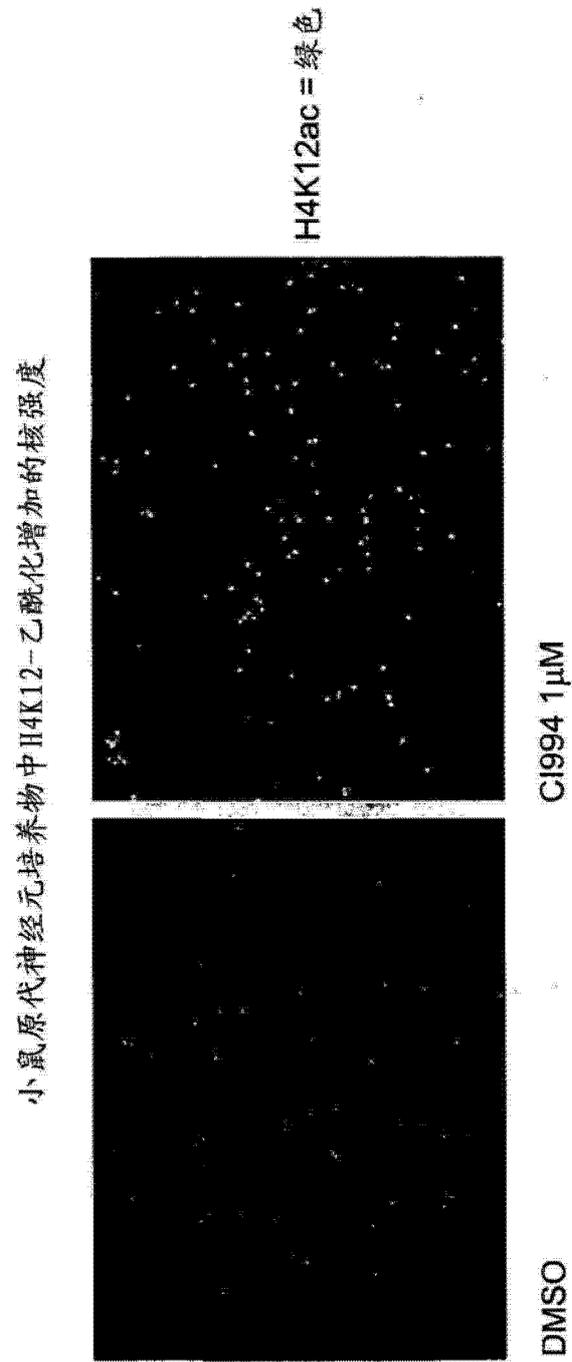


图 10A

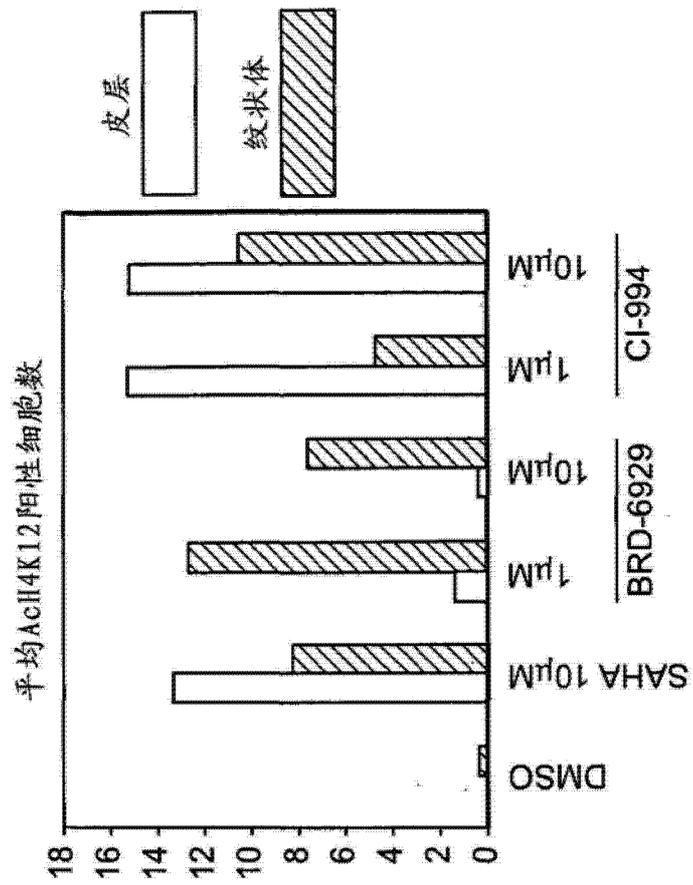


图 10C

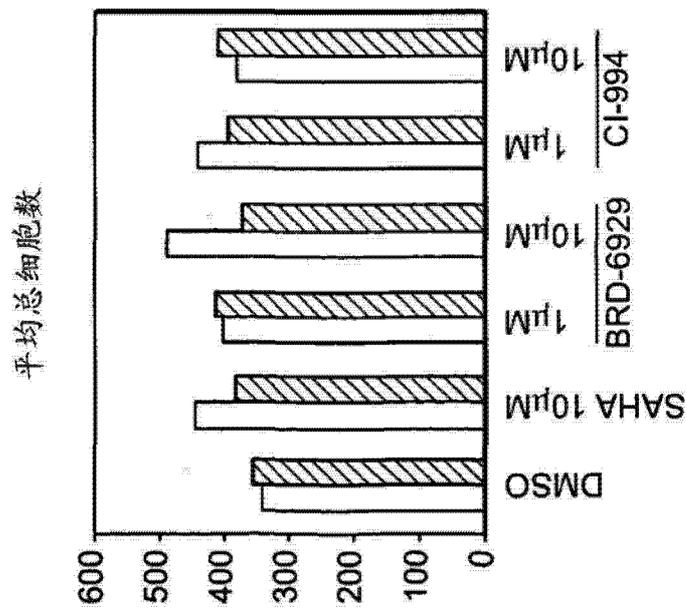


图 10B

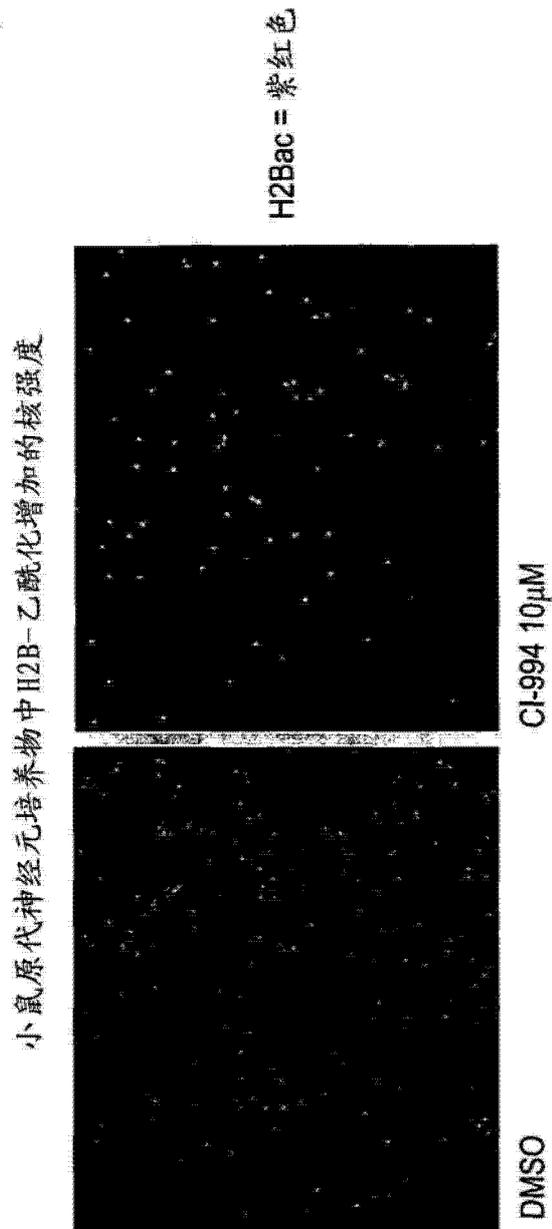


图 11A

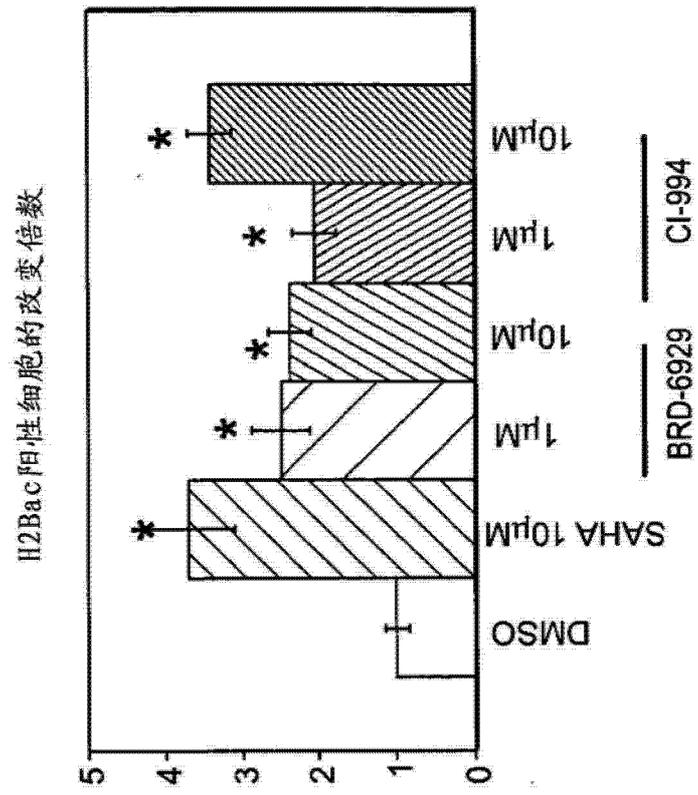


图 11C

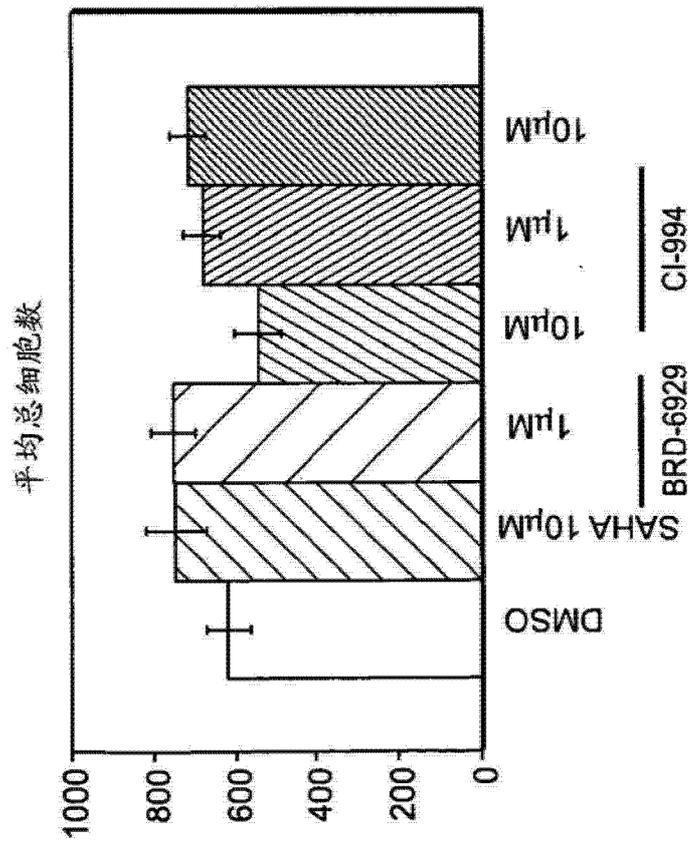


图 11B

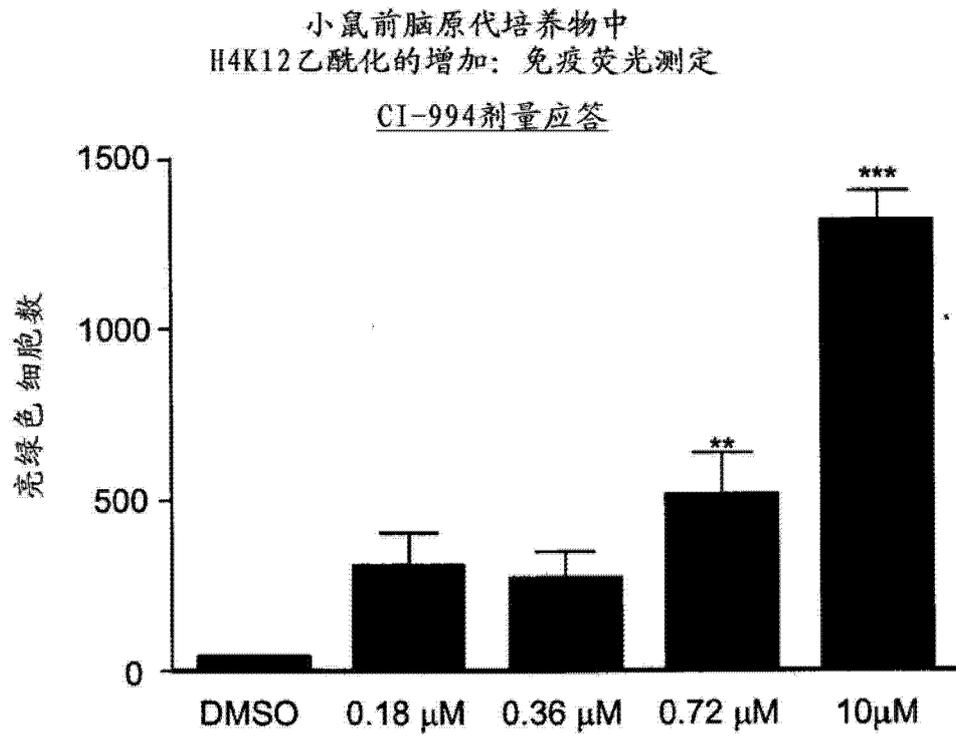


图 12

CI-994剂量依赖性使得特定细胞类型和
脑区域中H4K12乙酰化的增加

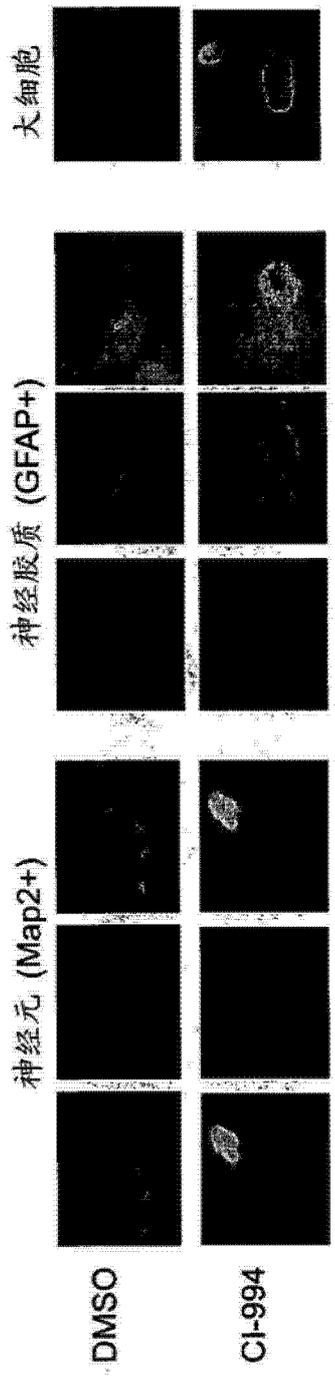


图 13A

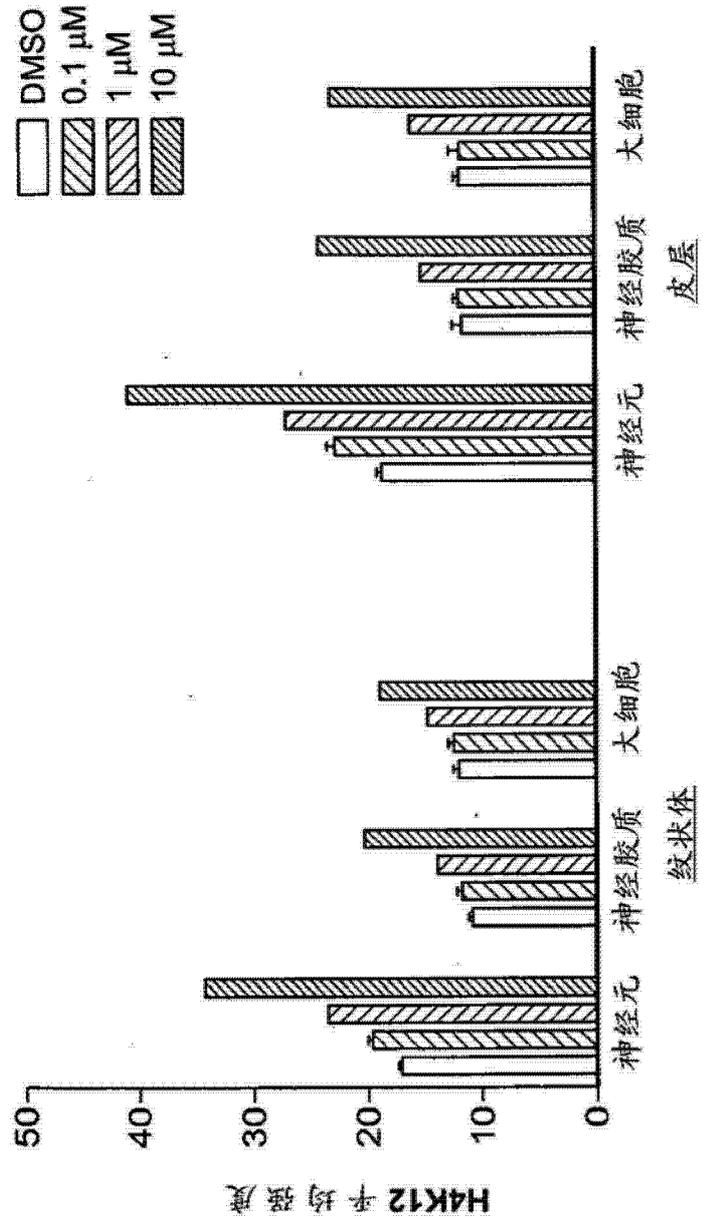


图 13B

人神经祖细胞中CI-994对TCF/LEF报告基因的剂量应答

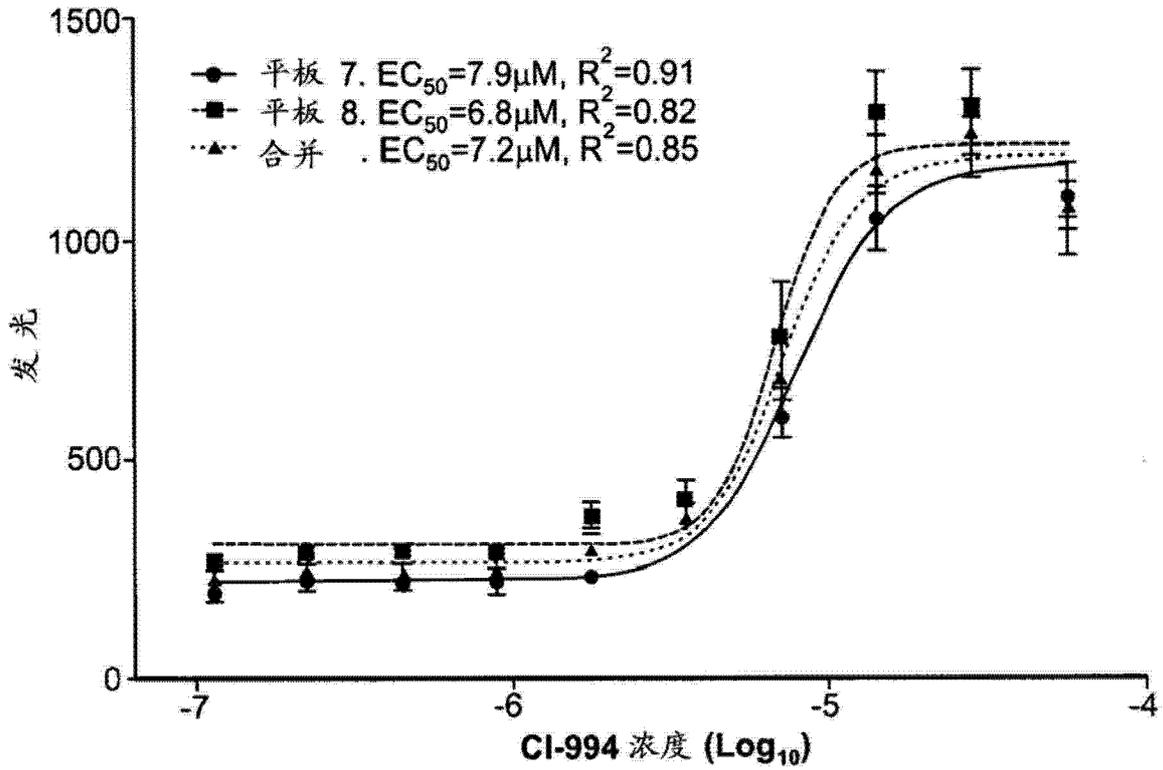


图 14A

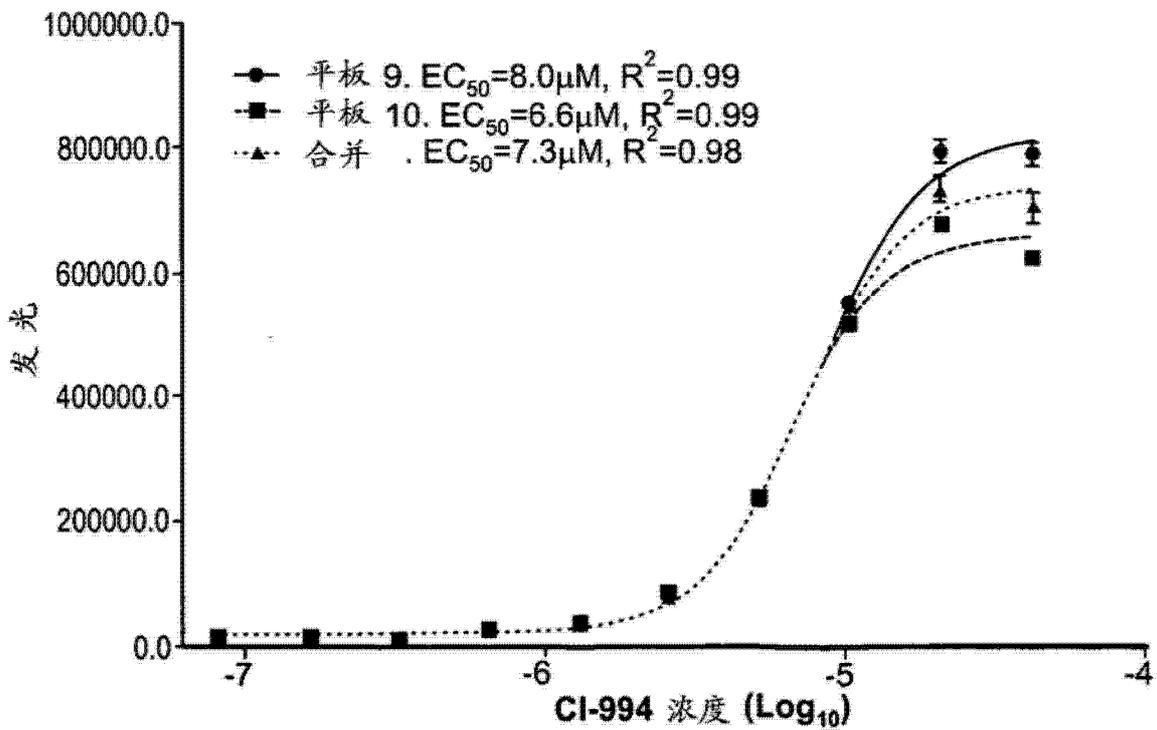


图 14B

小鼠中单次30mg/kg腹腔内给药后血浆和脑中CI-994的浓度-时间曲线

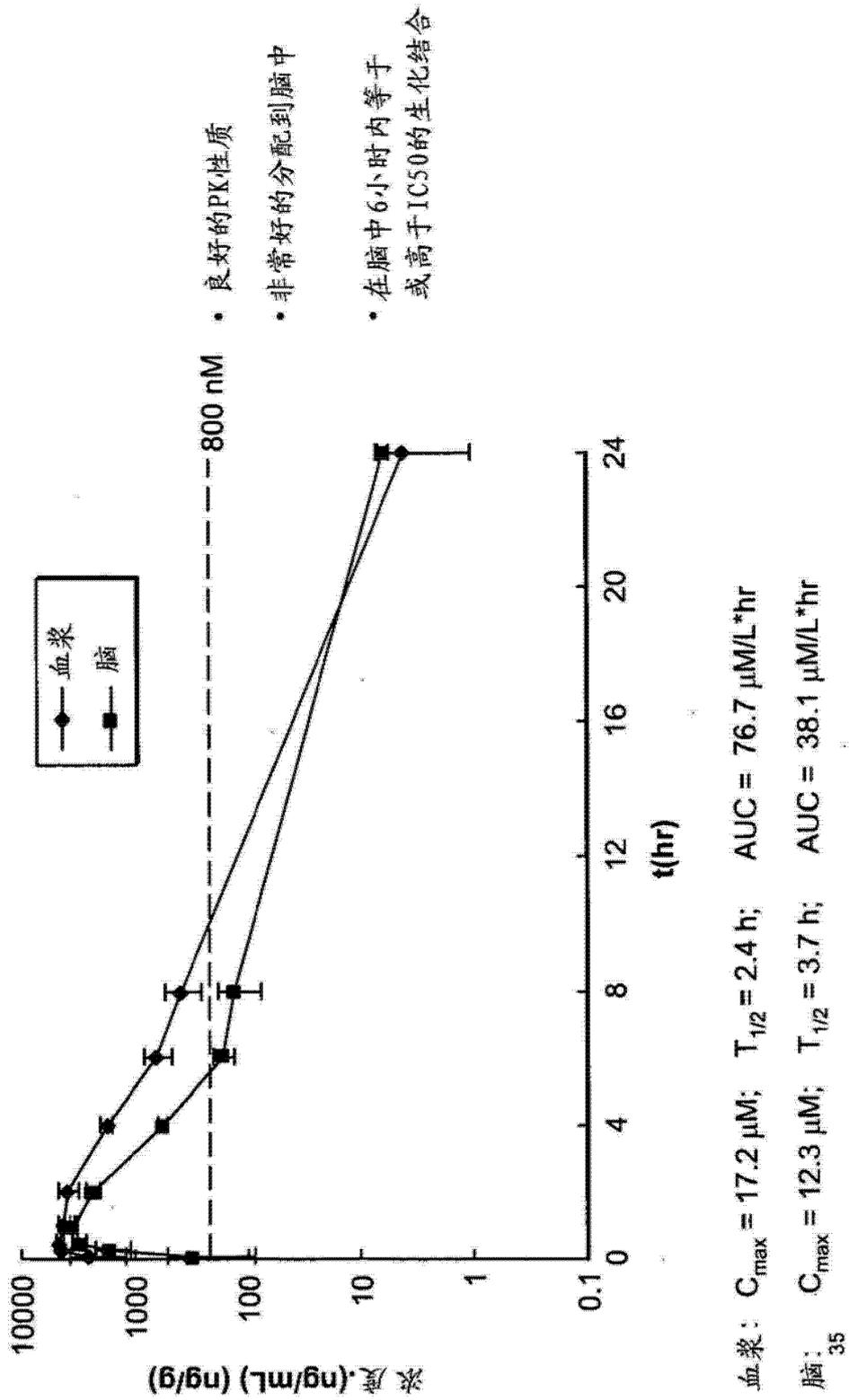


图 15

小鼠中单次10mg/kg腹腔内给药后血浆和脑中CI-994的浓度-时间曲线

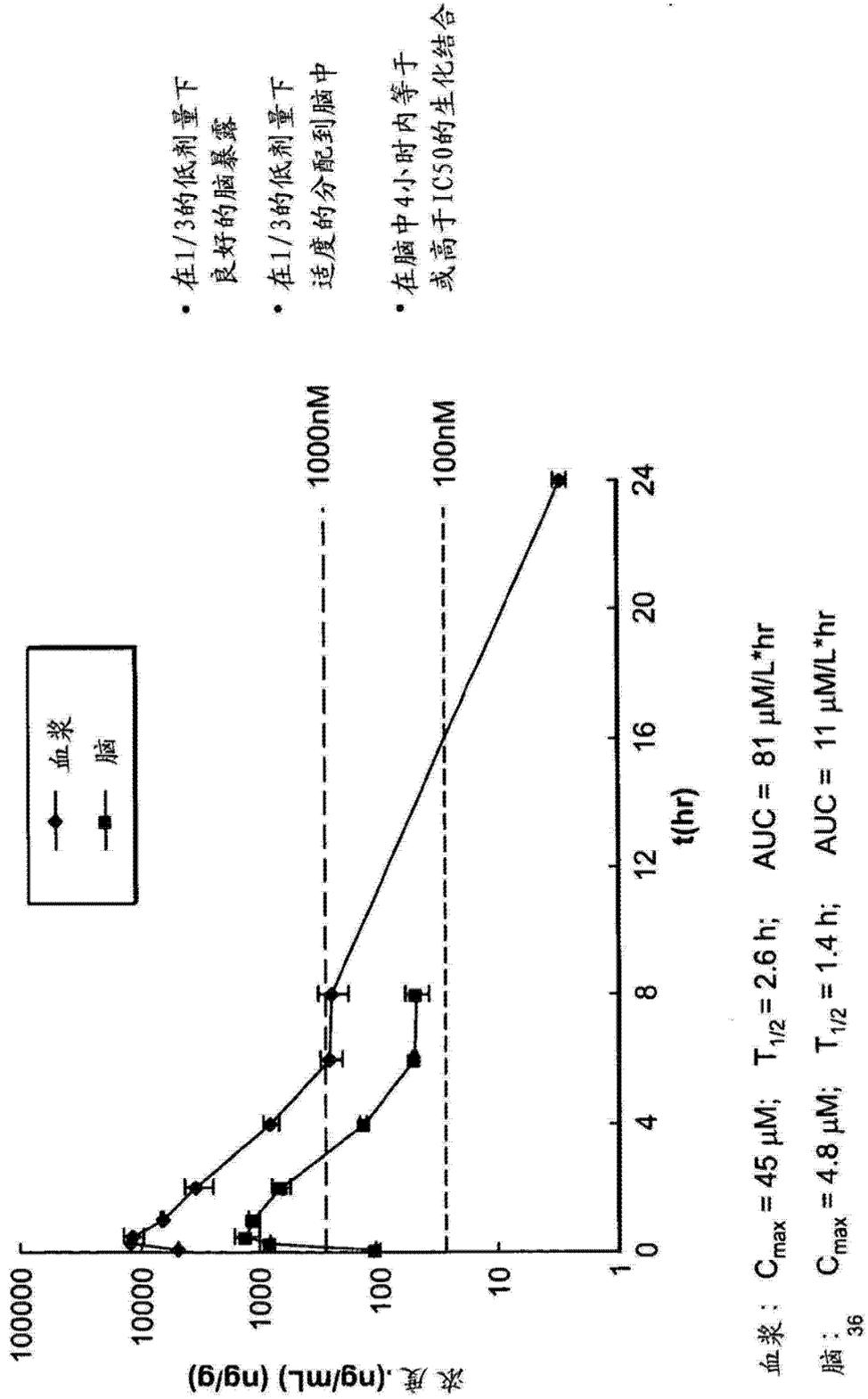
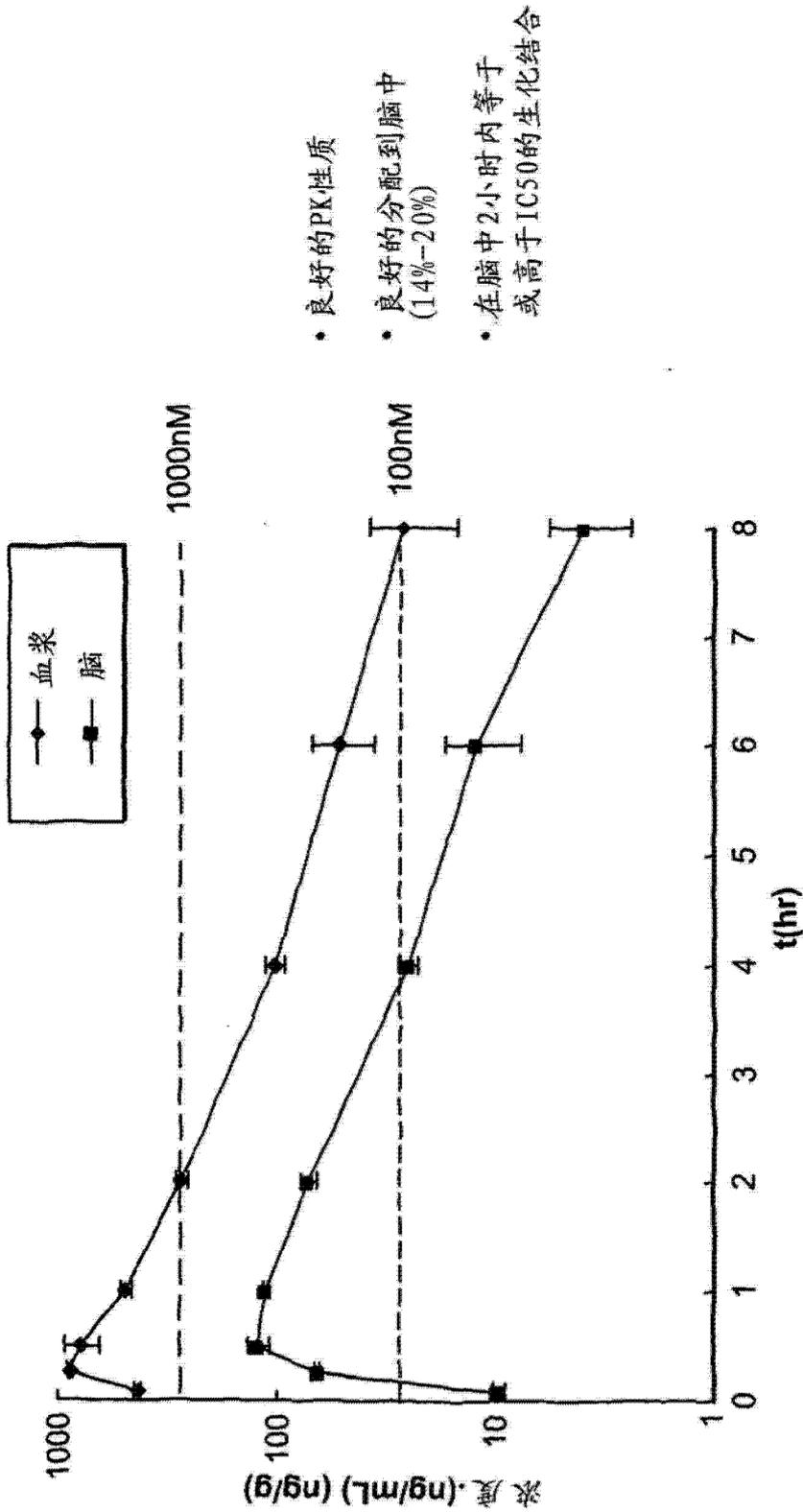


图 16

小鼠中单次1mg/kg腹腔内给药后血浆和脑中CI-994的浓度-时间曲线

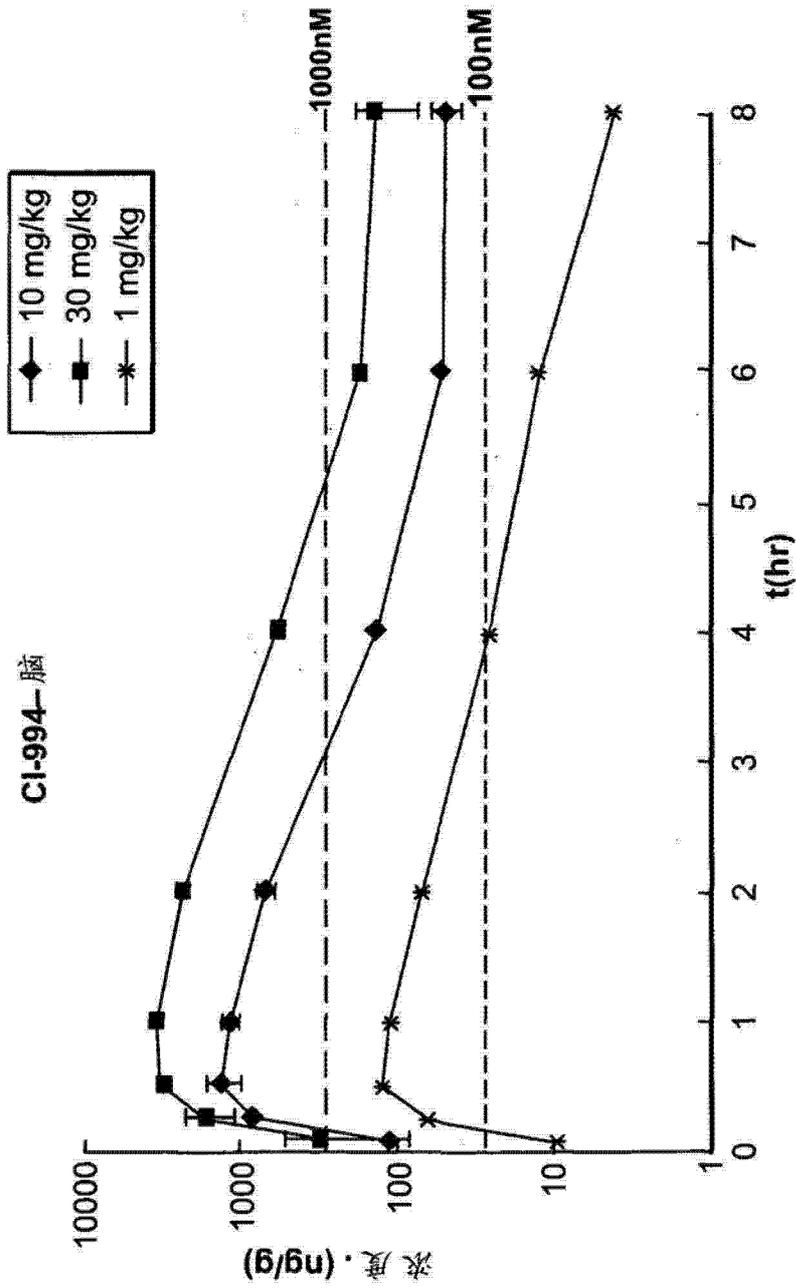


- 良好的PK性质
- 良好的分配到脑中 (14%-20%)
- 在脑中2小时内等于或高于IC50的生化结合

血浆: $C_{max} = 3.3 \mu\text{M}$; $T_{1/2} = 2.0 \text{ h}$; $AUC = 6.4 \mu\text{M/L}\cdot\text{hr}$
 脑: $C_{max} = 0.45 \mu\text{M}$; $T_{1/2} = 1.5 \text{ h}$; $AUC = 1.2 \mu\text{M/L}\cdot\text{hr}$

图 17

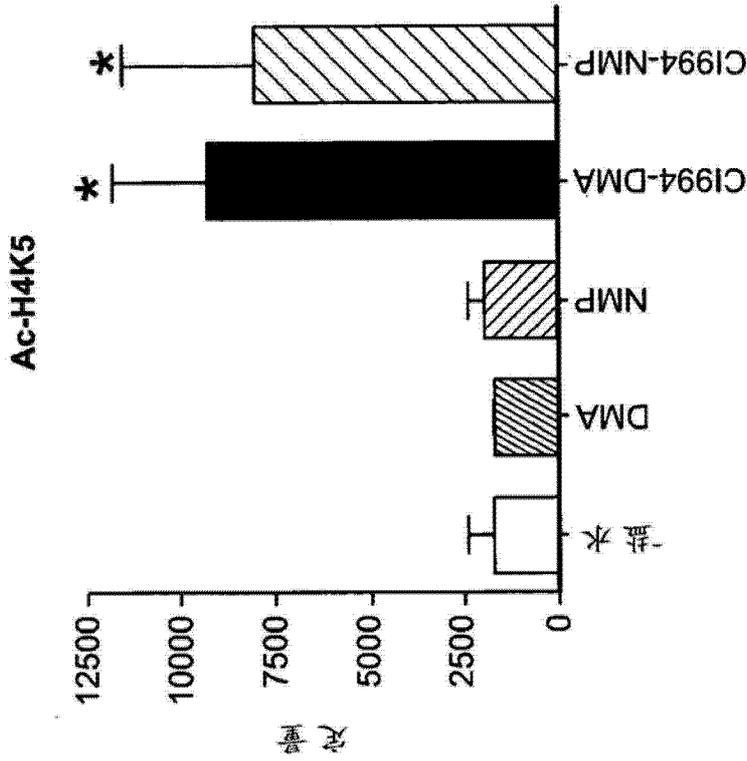
小鼠中单次30、10、1mg/kg腹膜内给药后脑中CI-994的浓度-时间曲线



在所有剂量水平下血浆和脑PK参数相似
在脑中暴露是与剂量成正比的

图 18

在整个脑中用CI-994的急性处理增强组蛋白乙酰化, 30mg/kg腹膜内单次给药



*相对于载体剂对照有显著差异
 P < 0.05
 N=3/组

图 20B

相对于H3归一化的Ac-H4K5



给药后1小时分析

盐水: 100%盐水
 DMA: 5% DMA, 45% PEG, 50% 盐水
 NMP: 5% NMP, 45% PEG, 50% 盐水
 CI994-DMA: 30mg/kg CI994在DMA载体剂中
 CI994-NMP: 30mg/kg CI994在NMP载体剂中

图 20A

在成年雄性C57BL/6J小鼠的脑特定区域中用CI-994急性处理的
实验方案以及对应的对照组蛋白乙酰化的作用

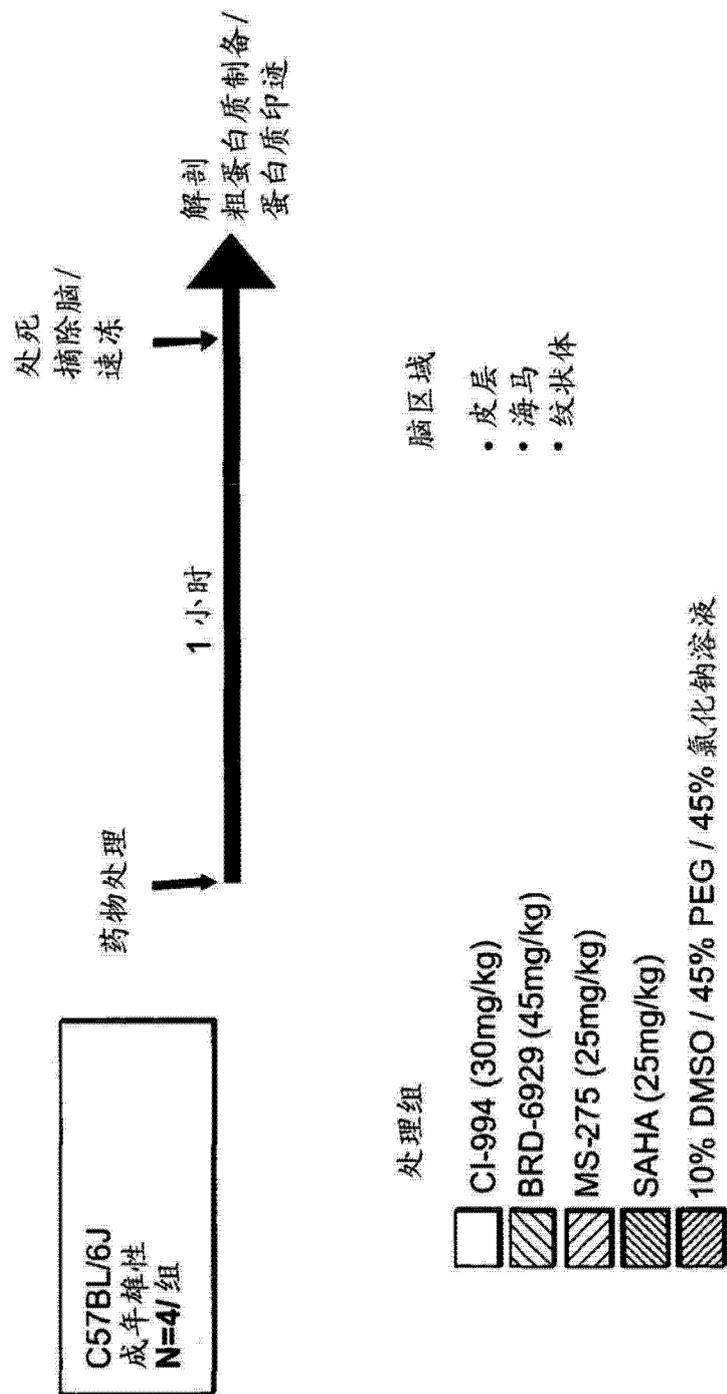


图 21

在成年雄性C57BL/6J小鼠中用CI-994急性处理导致的皮层中H4和H2B(四)组蛋白乙酰化增加

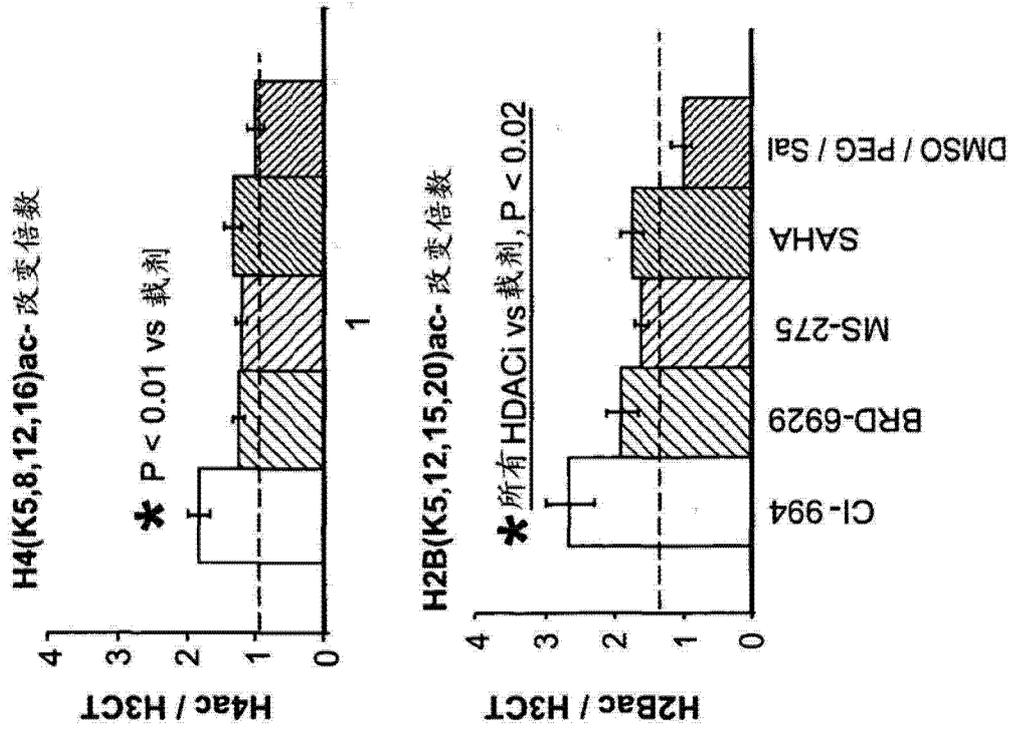


图 22A

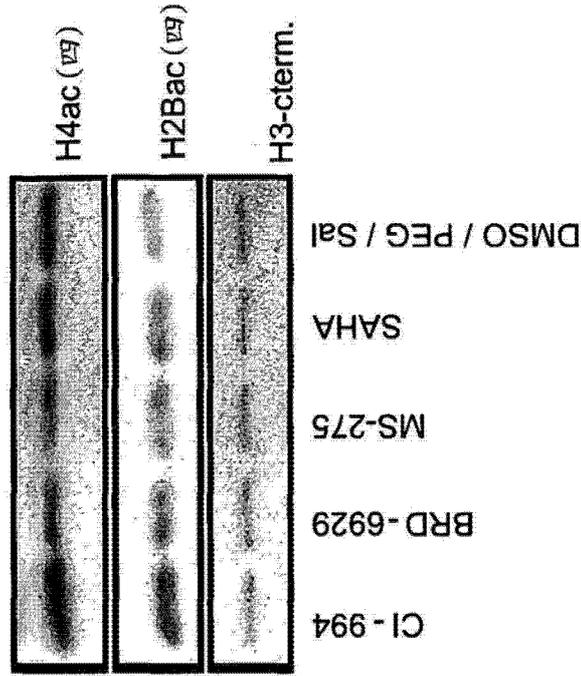


图 22B

在成年雄性C57BL/6J小鼠中用CI-994急性处理导致皮层中H4K12和H2BK5组蛋白乙酰化增加

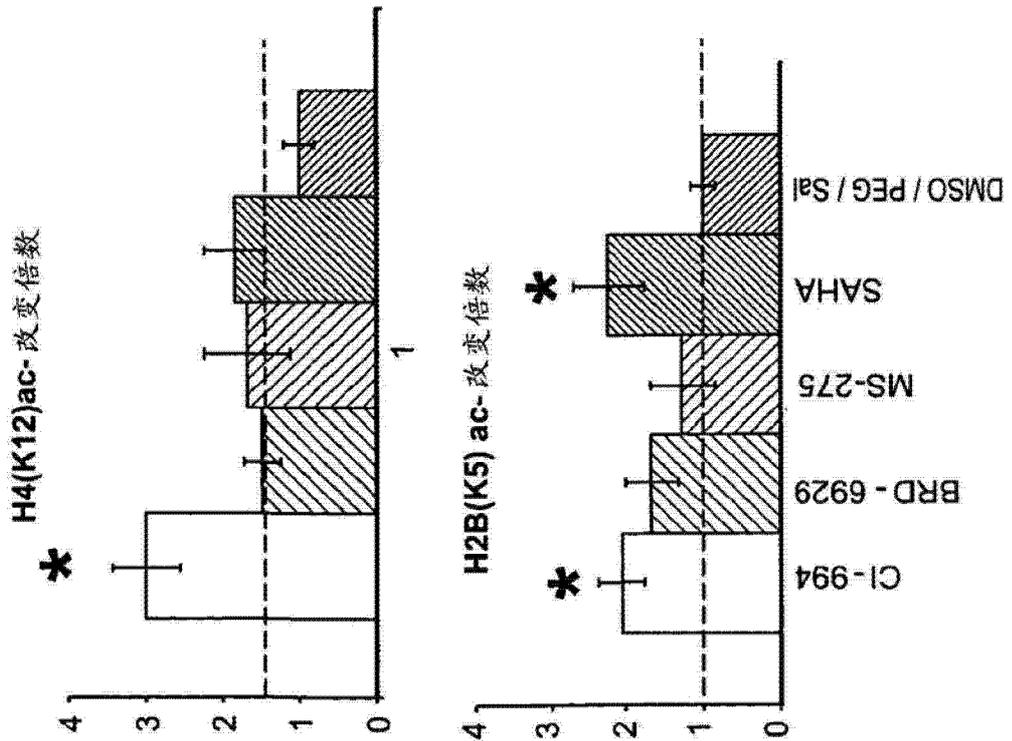


图 23A

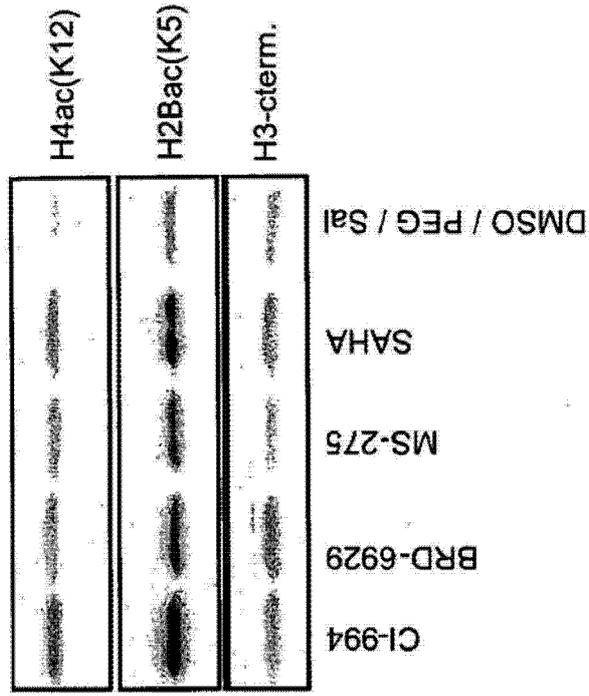


图 23B

在成年雄性C57BL/6J小鼠中用CI-994急性处理
导致海马中四-H4组蛋白乙酰化增加

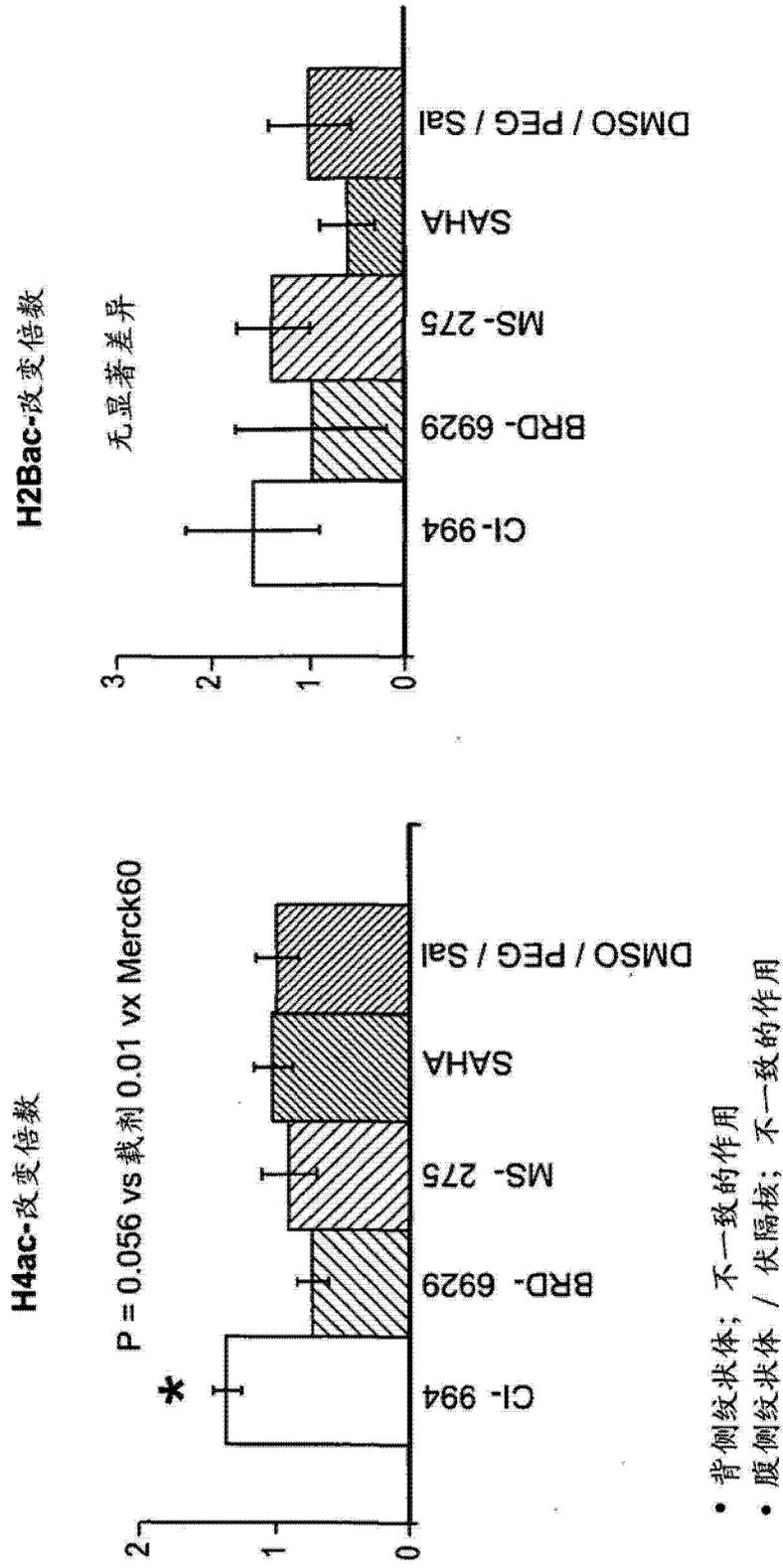
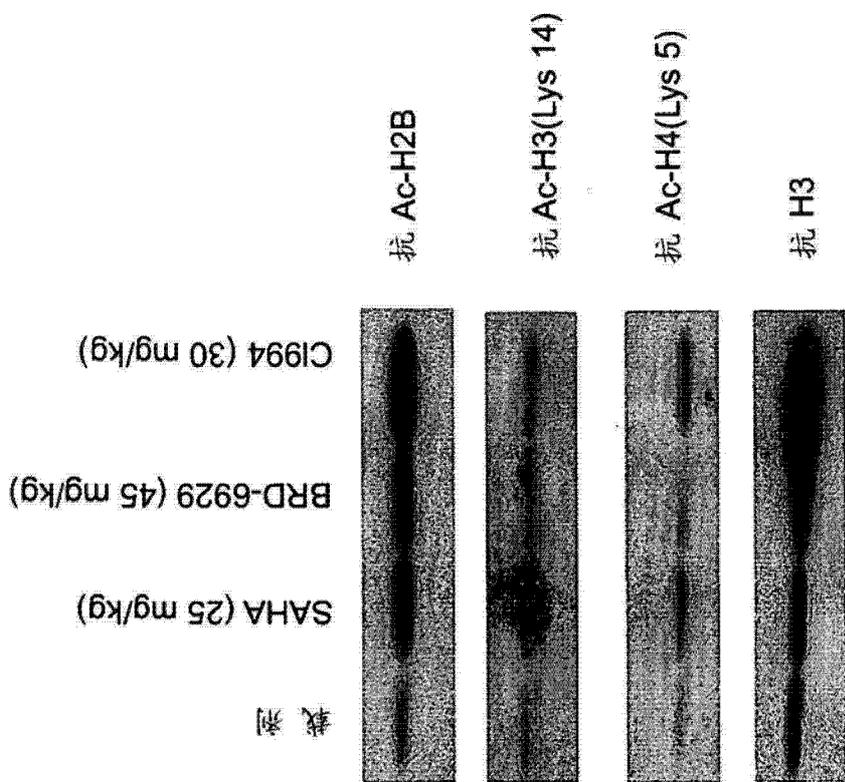


图 24

CI-994的长期处理增强了整个脑中的组蛋白乙酰化, 30mg/kg腹膜内, QD, 10天



10天后对相关乙酰化标志物的显著生物学作用

图 25

在WT C57/BL6小鼠中并非所有HDAC抑制剂增强记忆形成, 2.5mg/kg腹腔内, QD, 10天

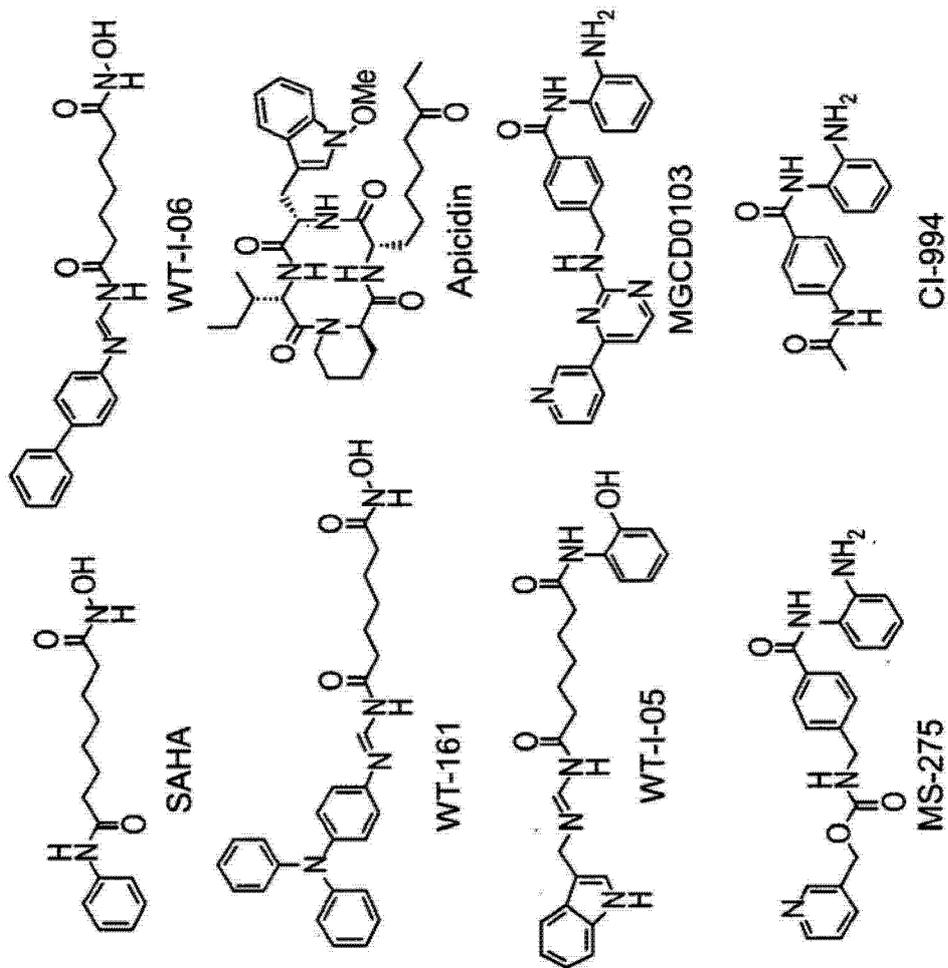
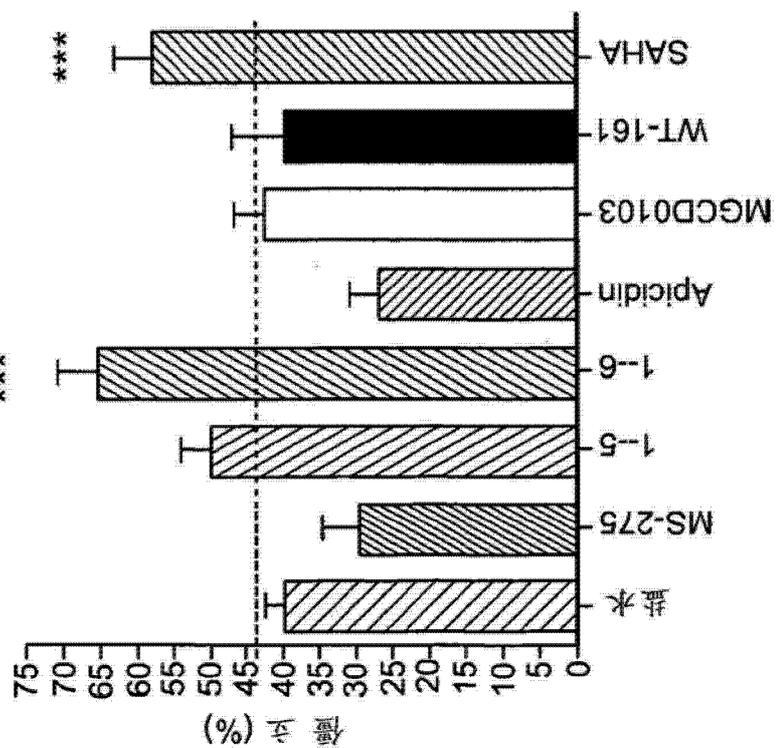
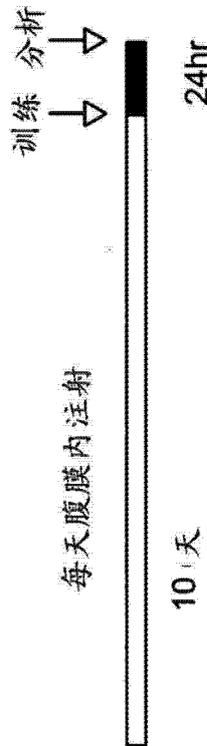
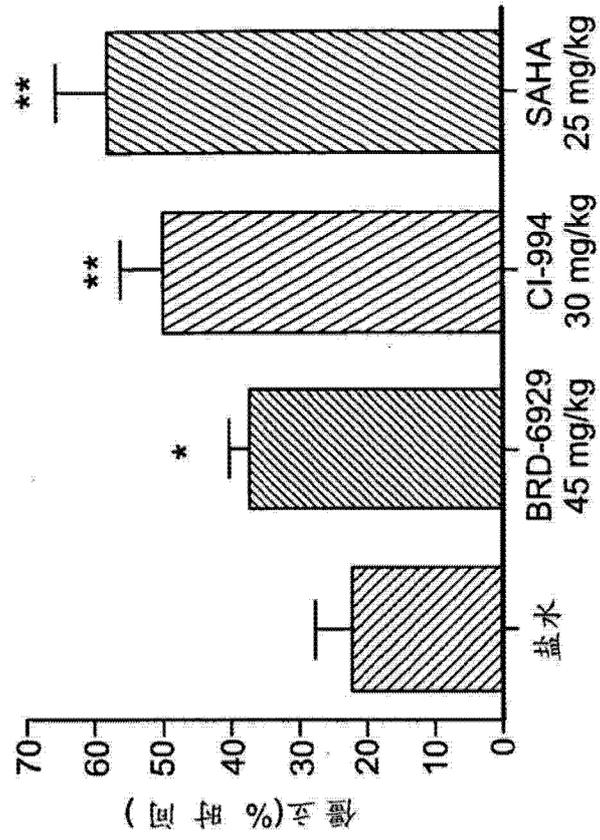


图 26

CI-994在WT C57/BL6小鼠中增加联想式学习和记忆
30mg/kg, 腹膜内, QD, 10天

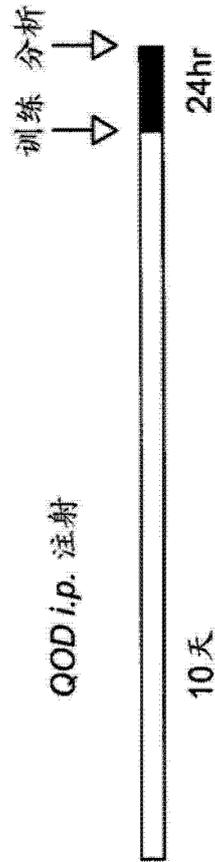
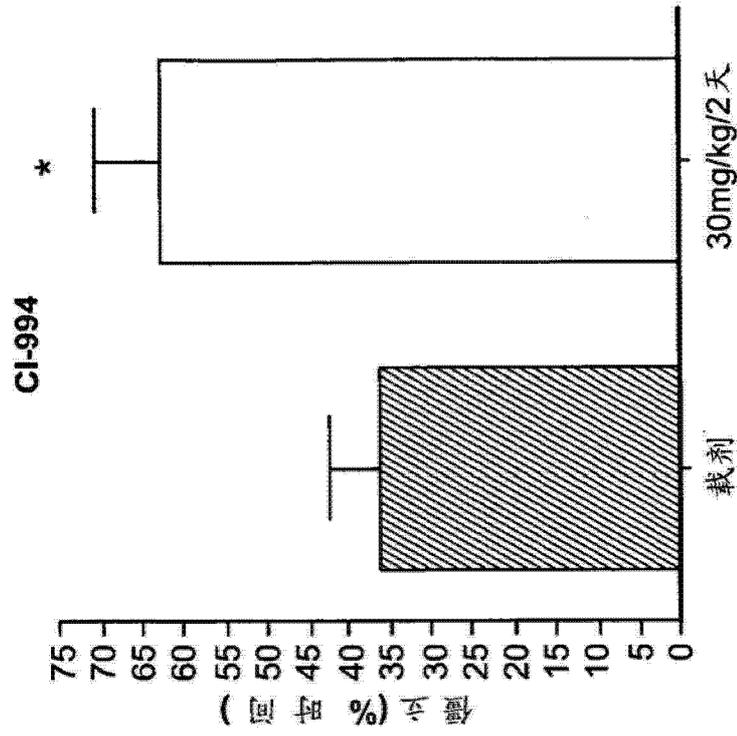
场景恐惧条件反射



对于30mg/kg群体总剂量为300mg/kg

图 27

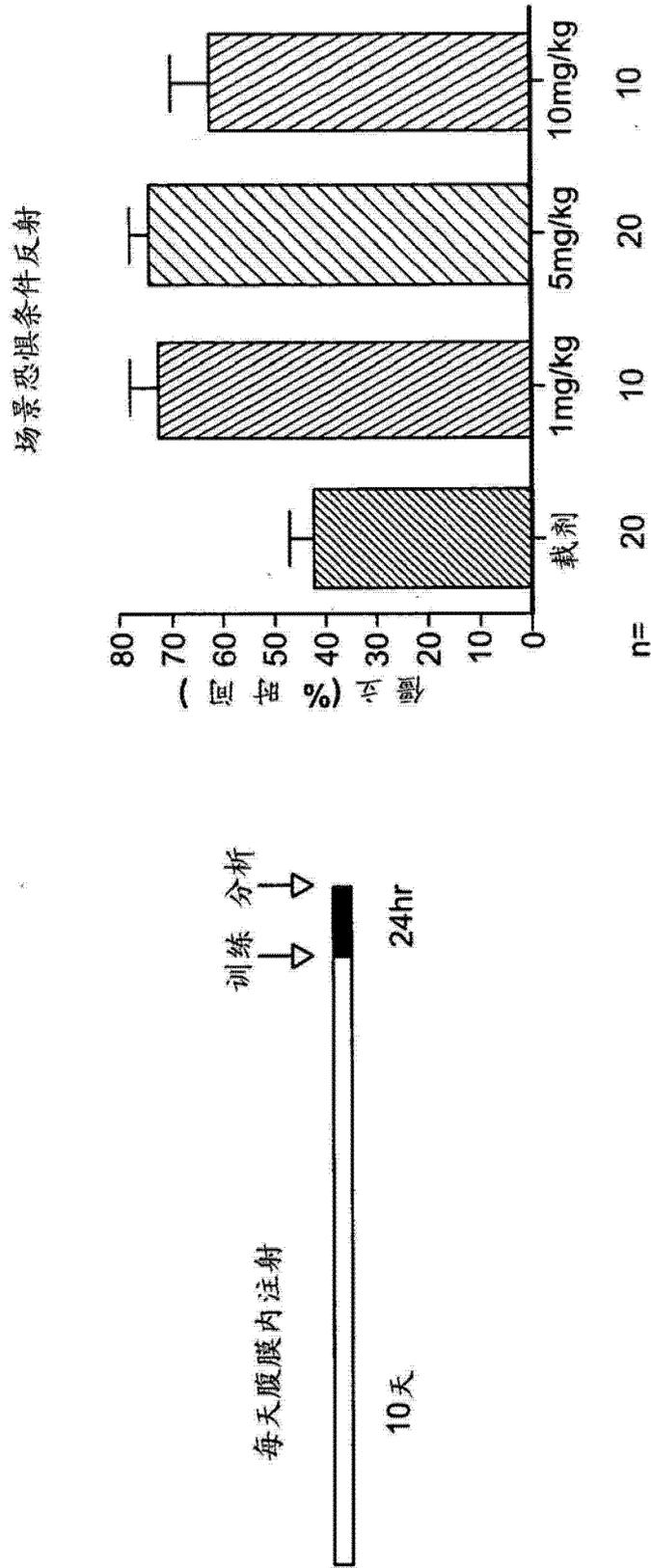
CI-994通过间隔给药在WT C57/BL6小鼠中增加联想式学习和记忆
30mg/kg, 腹腔内, QD, 10天, 共5次



每隔一天给药的总剂量为150 mg/kg

图 28

CI-994使用低剂量在WT C57/BL6小鼠中增加联想式学习和记忆
 1mg/kg, 腹腔内, QD, 10天



对于1mg/kg群体的总剂量为10mg/kg

图 29

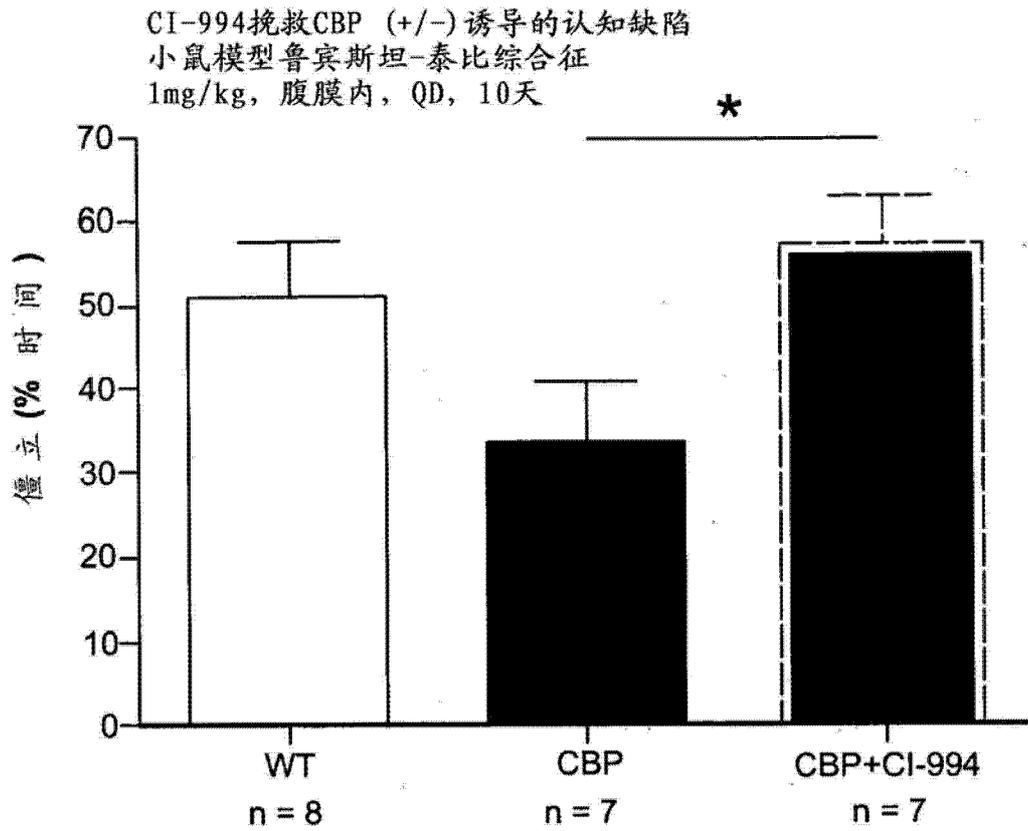


图 30

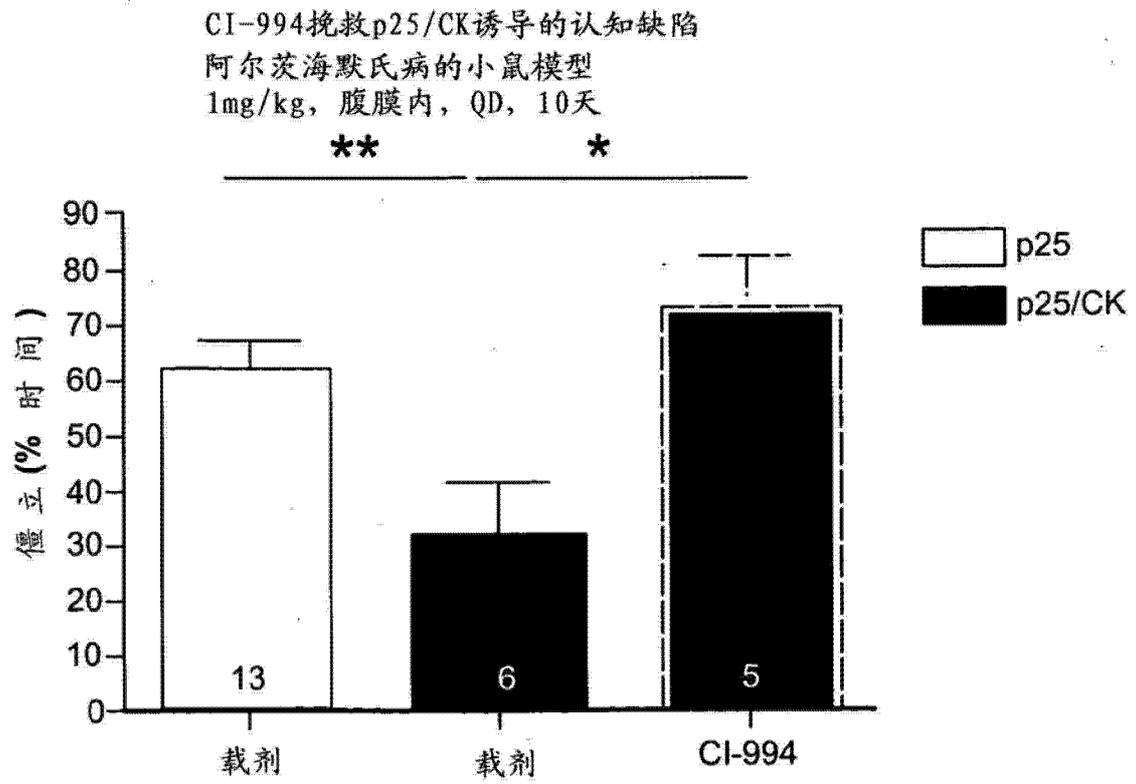


图 31

HDAC2过表达小鼠具有受损的恐惧记忆消退

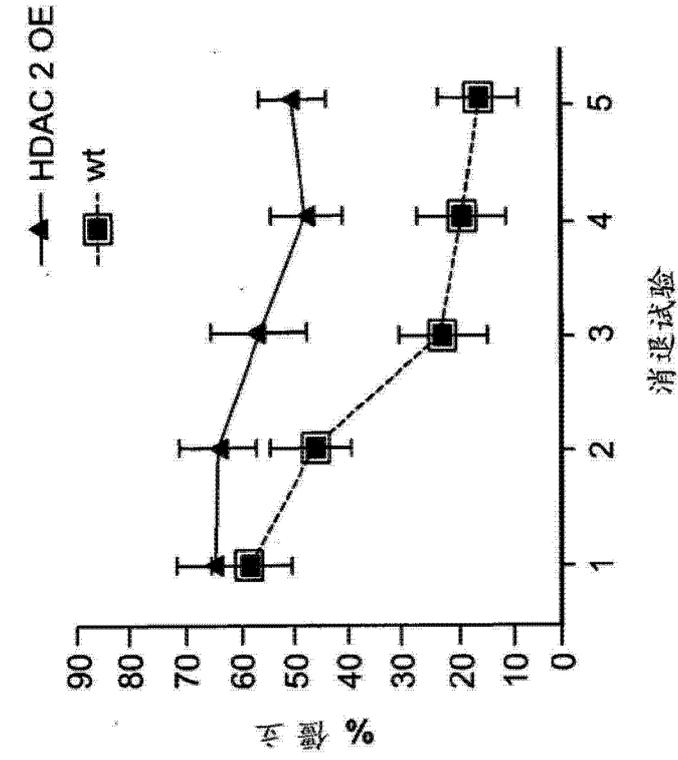


图 32A

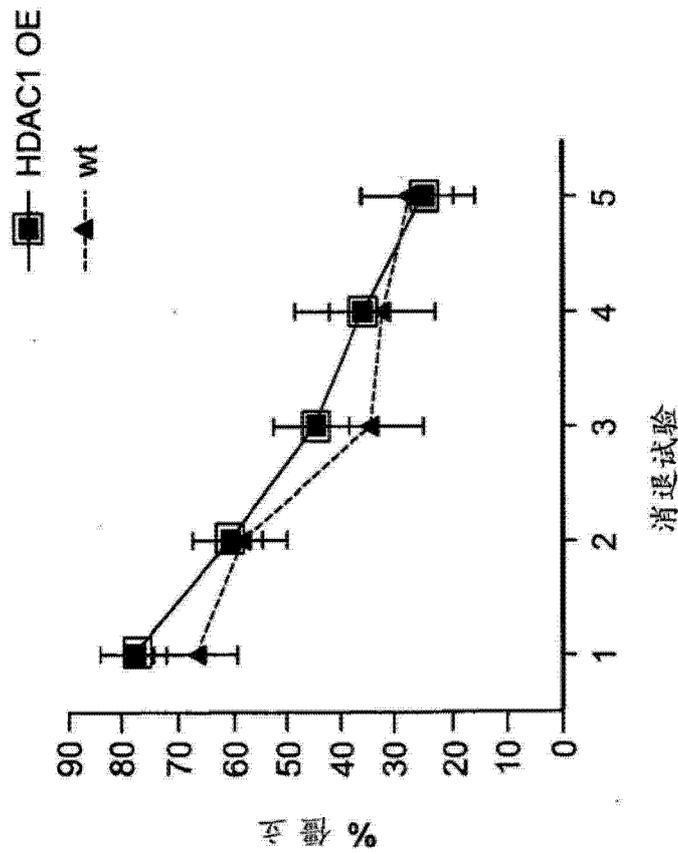


图 32B

CI-994促进记忆形成和恐惧消退. 急性给药方式: 30mg/kg, 腹腔内X2天

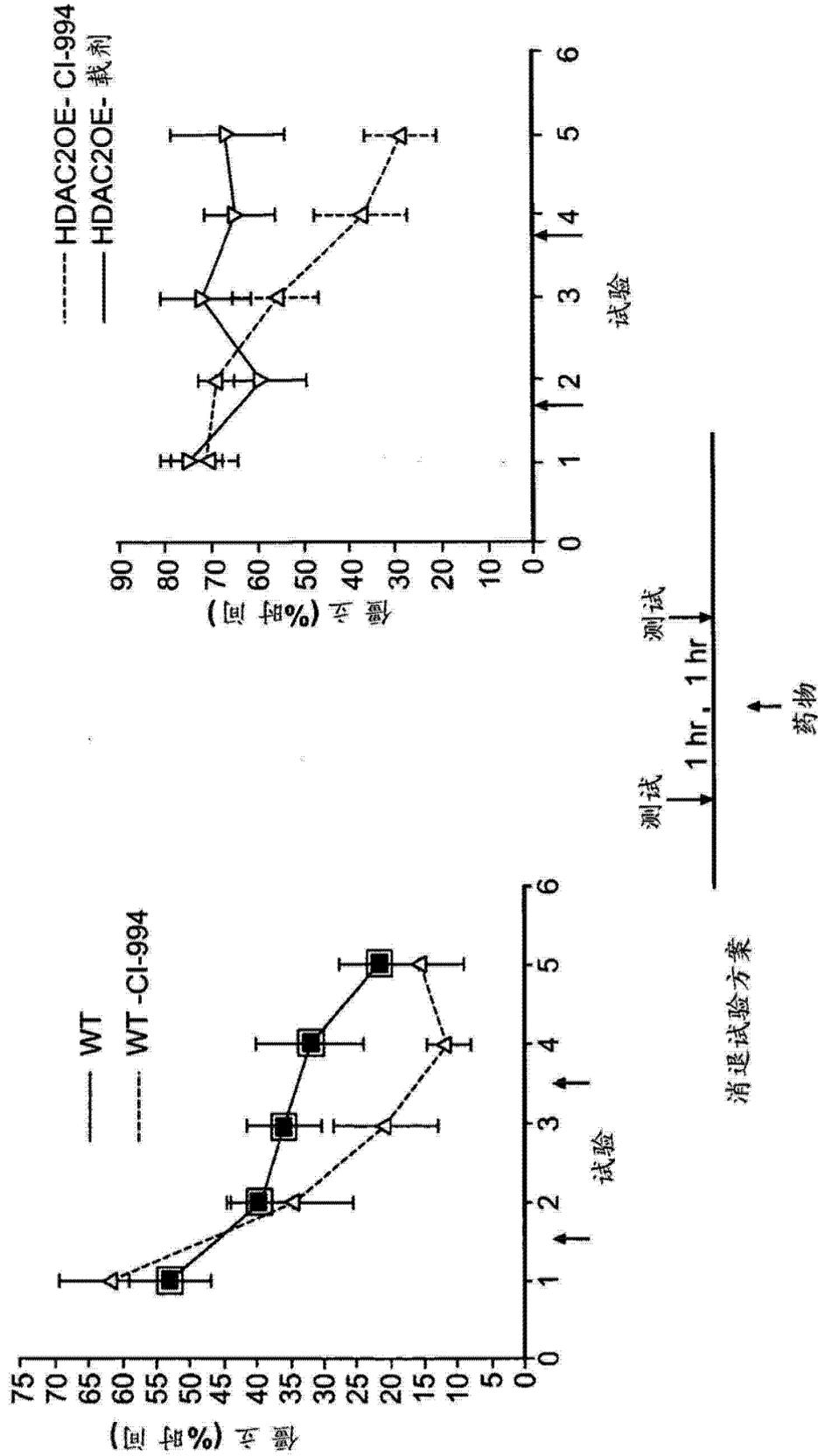


图 33A

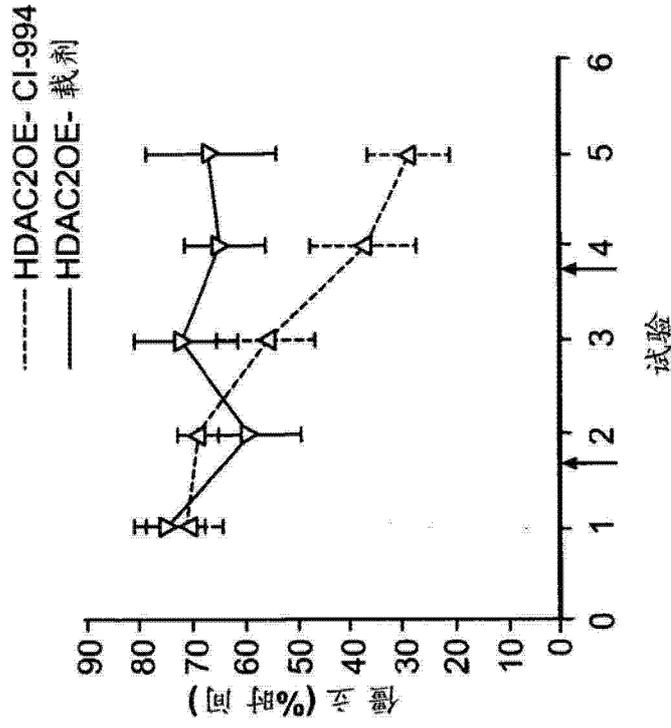


图 33B

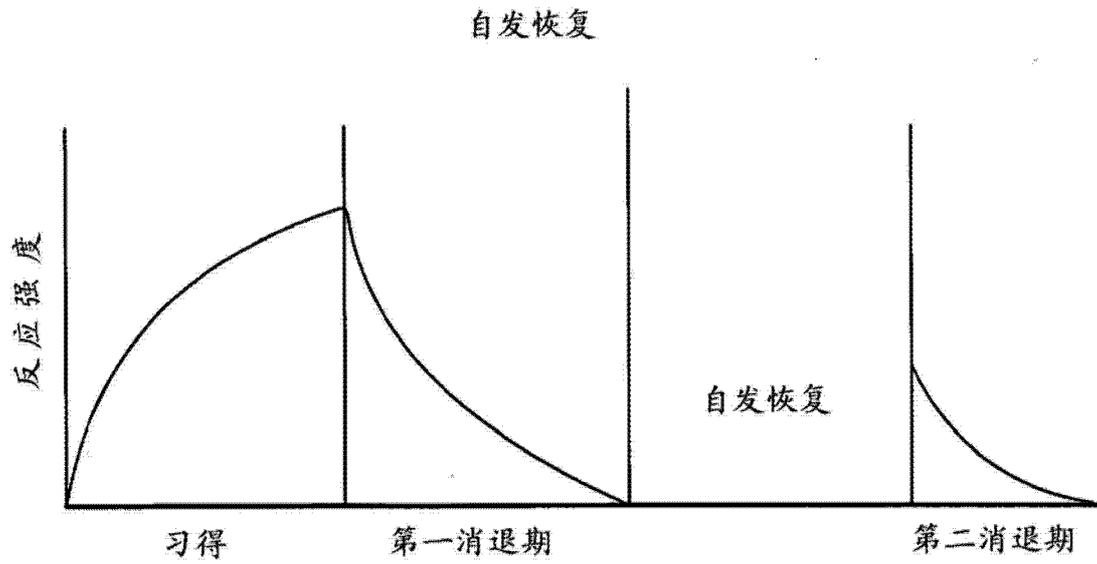


图 34

在消退过程中急性CI-994处理抑制自发恐惧记忆恢复

HDAC2过表达小鼠，消退训练后1个月

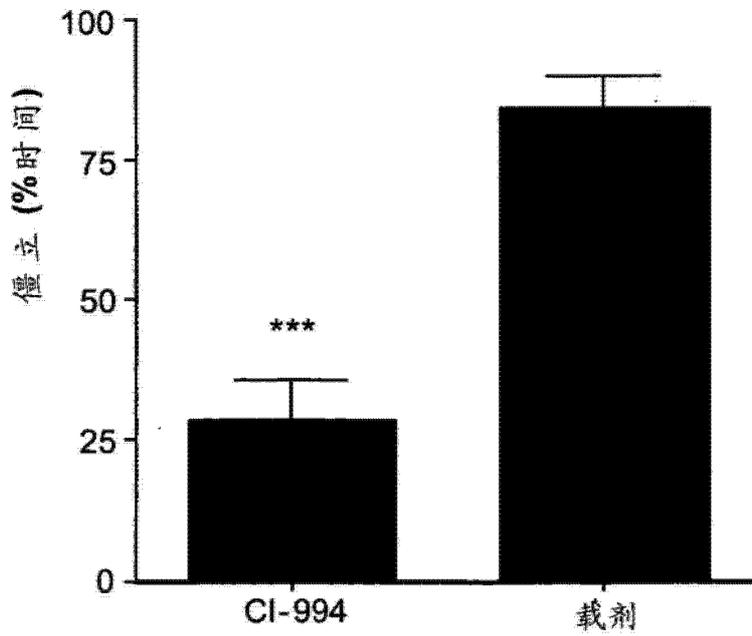


图 35

HPLC方法开发-CI-994

• 典型色谱图

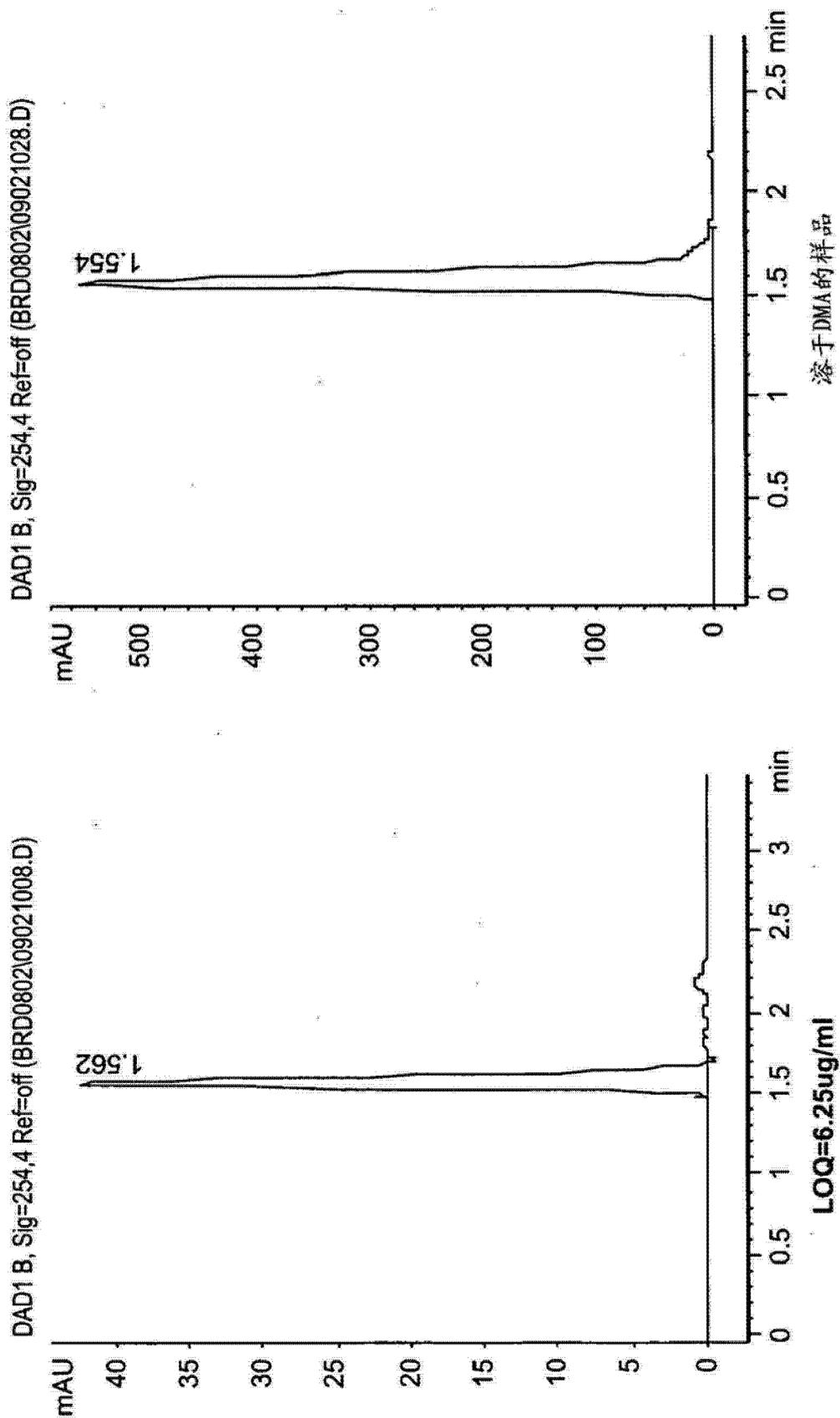


图 36

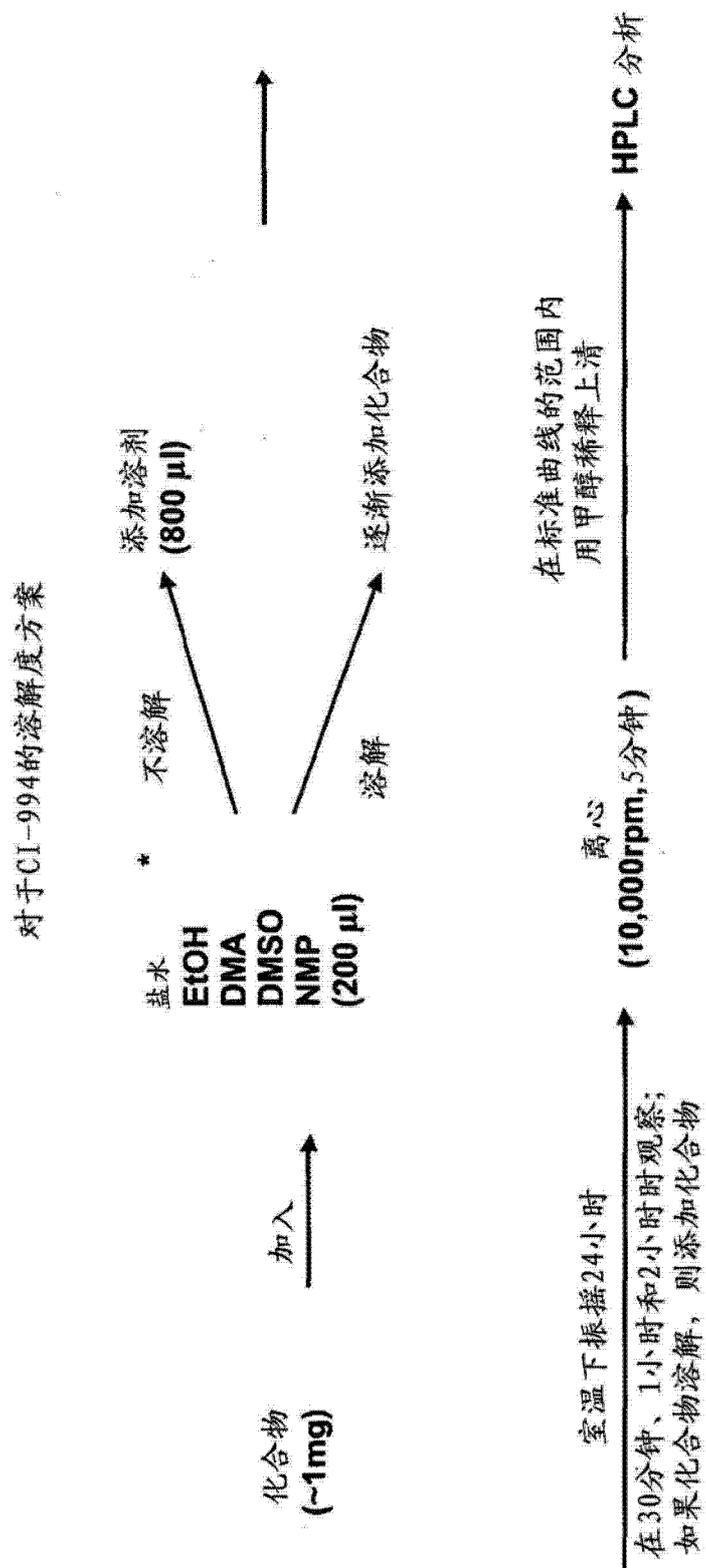


图 37

在多个赋形剂组合中CI-994的合并的制剂结果—肉眼观察

• 成功的制剂

- 10%DMA+45%PEG400+45%盐水或水或D5W(肉眼观察20小时稳定)
- 10%NMP+45%PEG400+45%盐水或D5W或水(肉眼观察20小时稳定)
- 10%EtOH+45%PEG400+45%盐水或D5W或水(肉眼观察20小时稳定)
- 10%DMA+30%克列莫佛+60%盐水或D5W(肉眼观察20小时稳定)
- 10%DMSO+30%克列莫佛+60%盐水或D5W(肉眼观察20小时稳定)

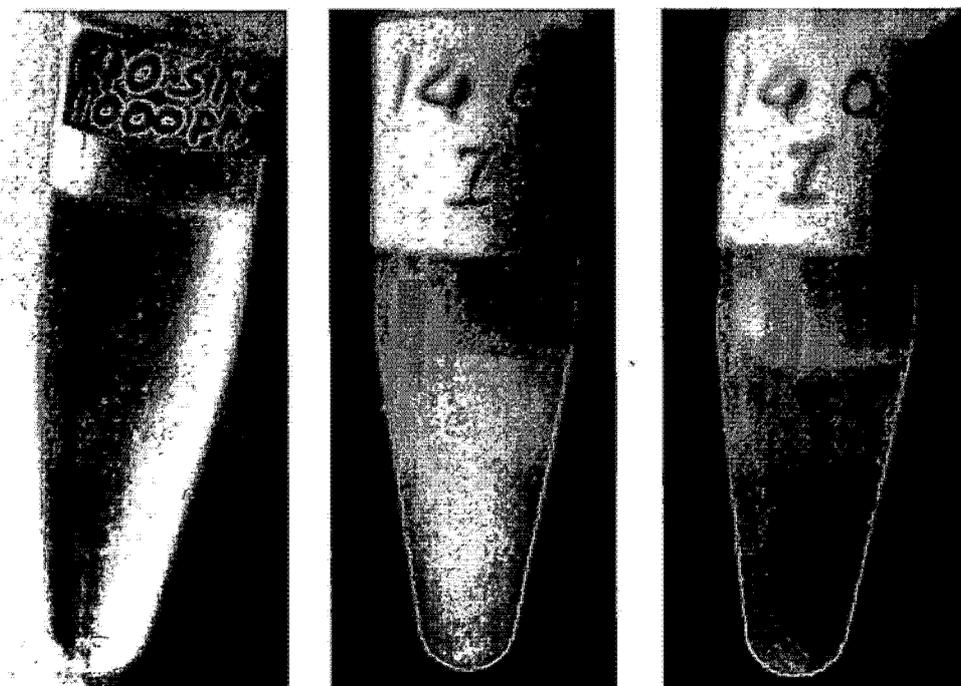
• 有可能的制剂

- 5%DMA+30%克列莫佛+65%盐水(肉眼观察-20分钟稳定)
- 10%DMA+20%克列莫佛+70%盐水(肉眼观察-10分钟稳定)
- 10%DMA+90%(30%HP- β -CD水溶液)(肉眼观察-30分钟稳定)
- 10%DMSO+40%PG+50%盐水或D5W或水(肉眼观察10分钟稳定)

• 失败的制剂

- 5%DMA+95%(30%HP- β -CD水溶液)
- 10%DMSO+90%(30%HP- β -CD水溶液)
- 5%DMA+5%Tween80+90%盐水
- 5%DMA+30%PG+65%盐水

图 38



照片1

照片2

照片3

图 39

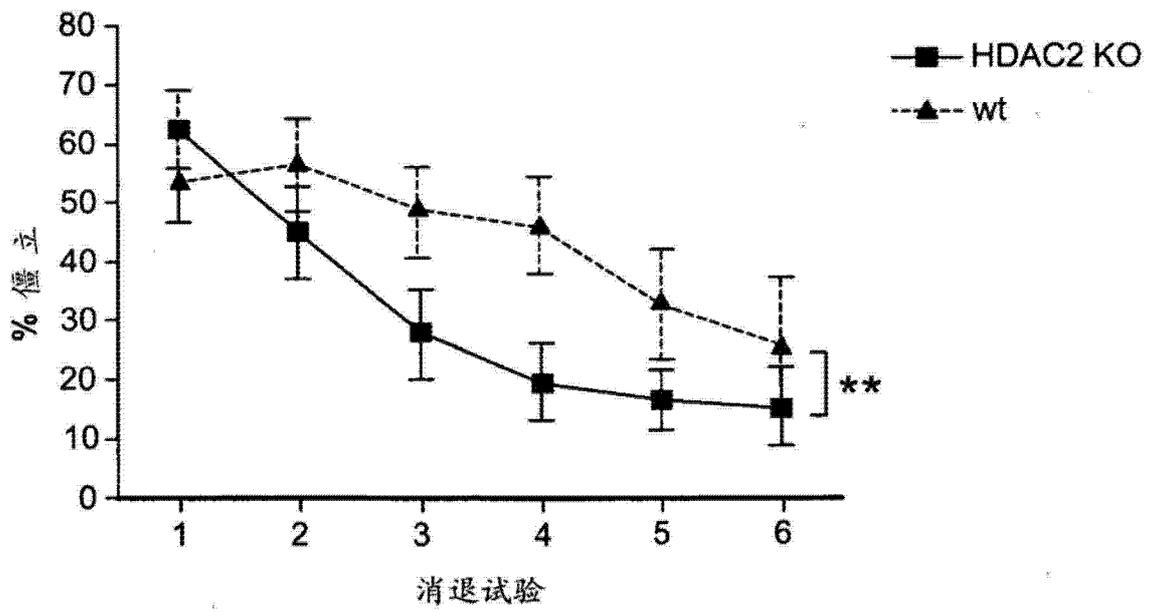


图 40

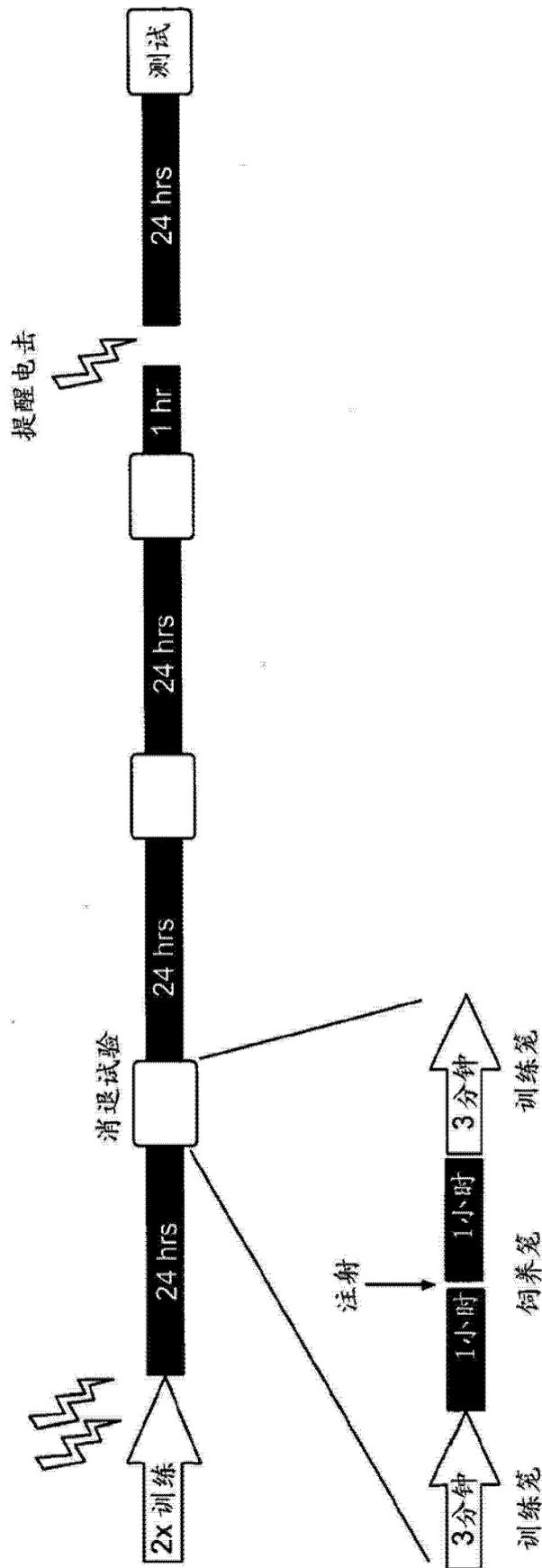


图 41A

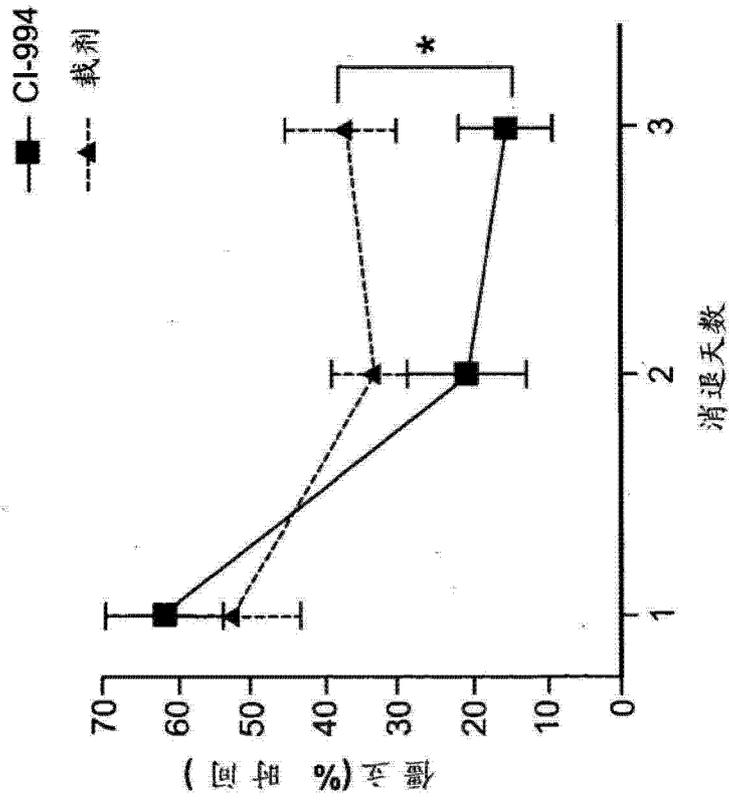


图 41B

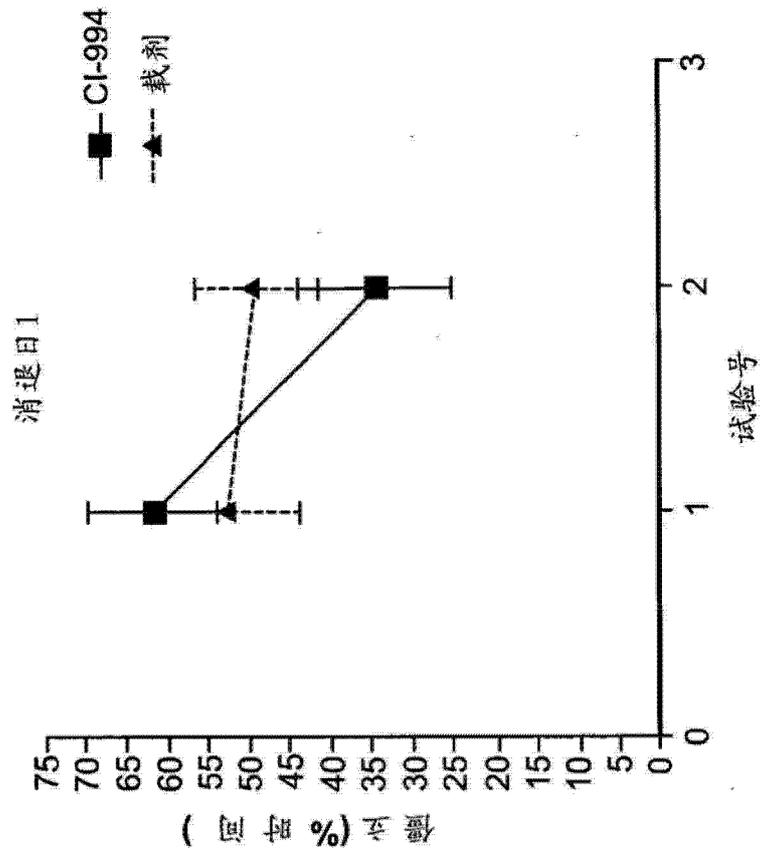


图 41C

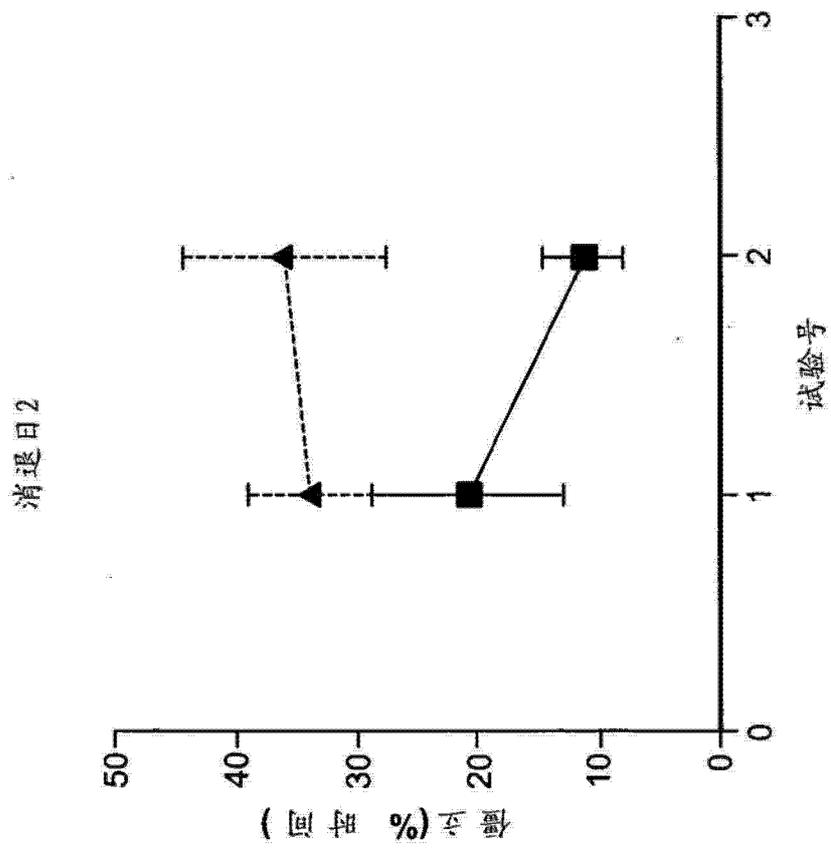


图 41D

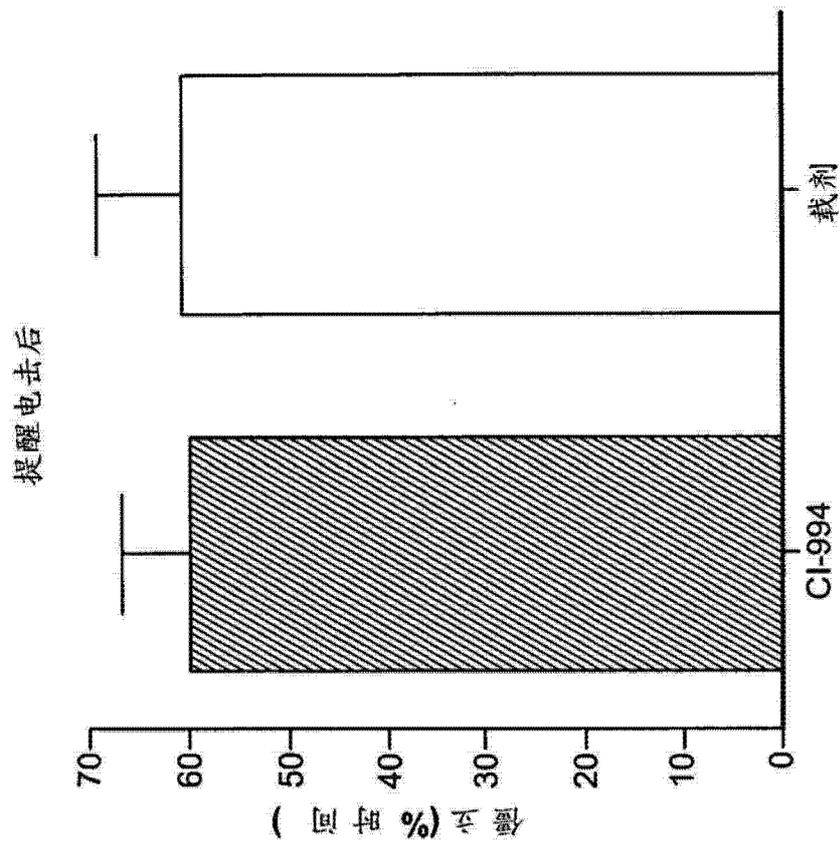


图 41E

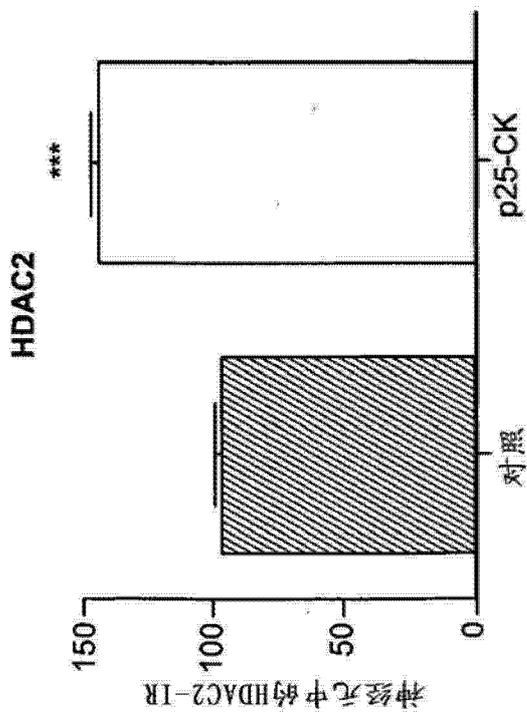


图 42A

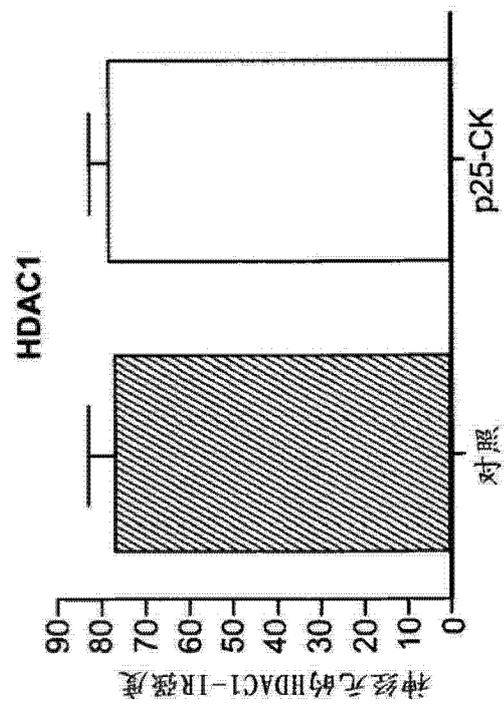


图 42B

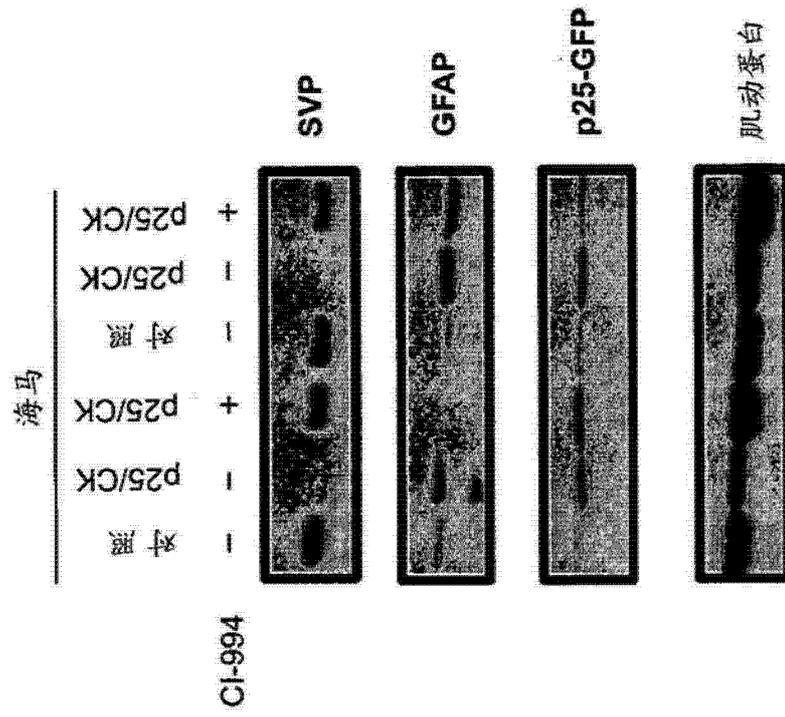


图 43

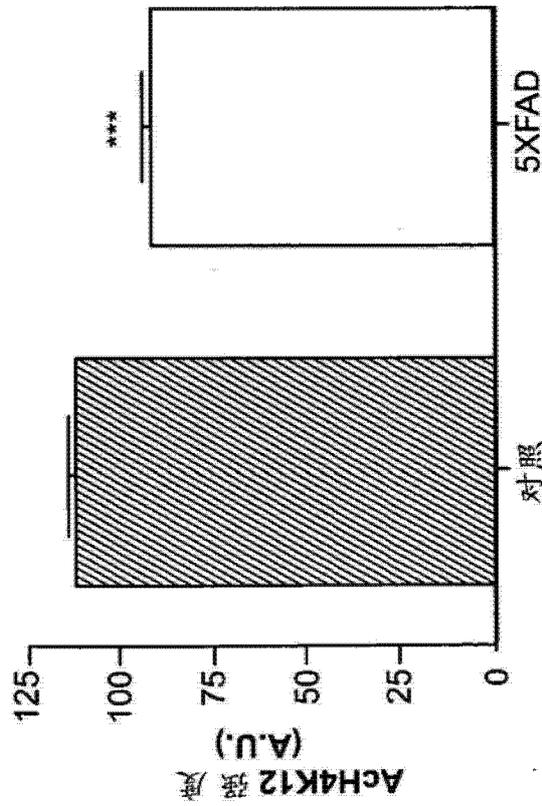


图 44A

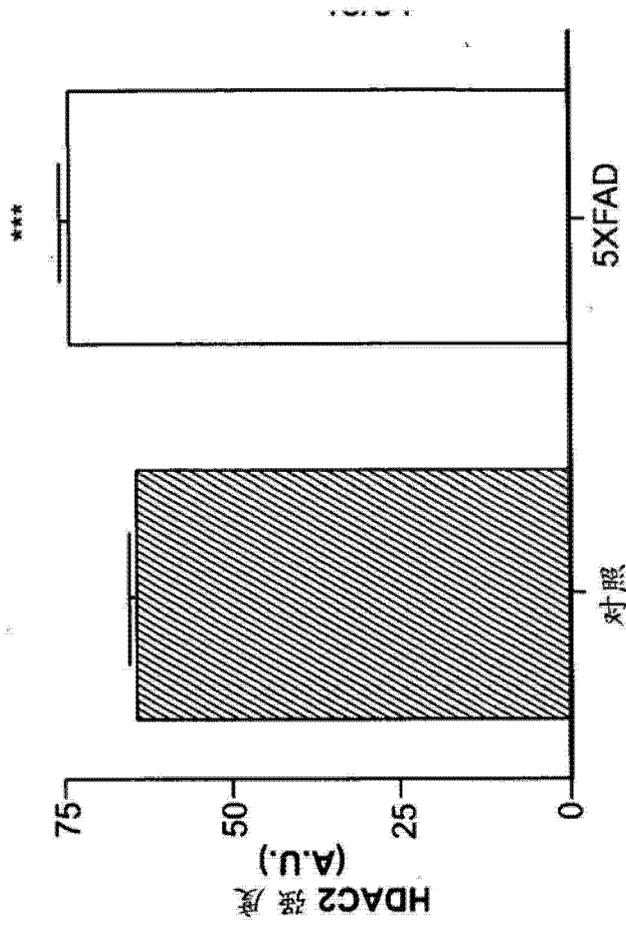


图 44B

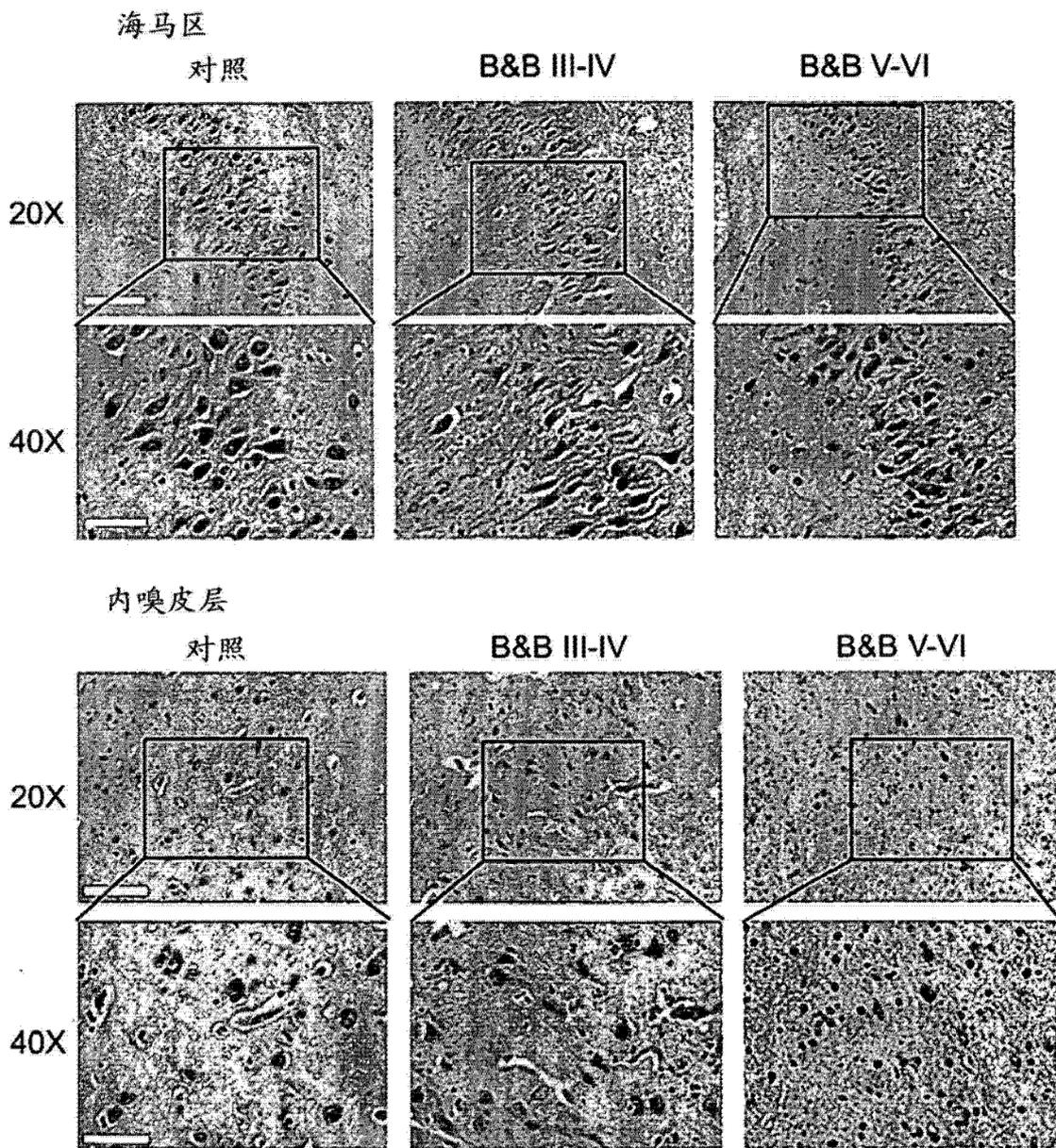


图 44C

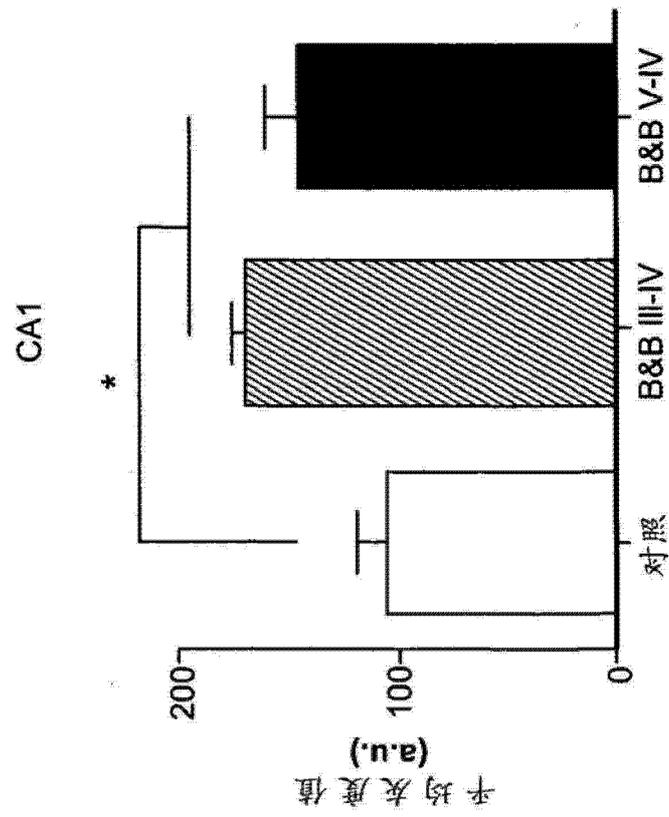


图 44D

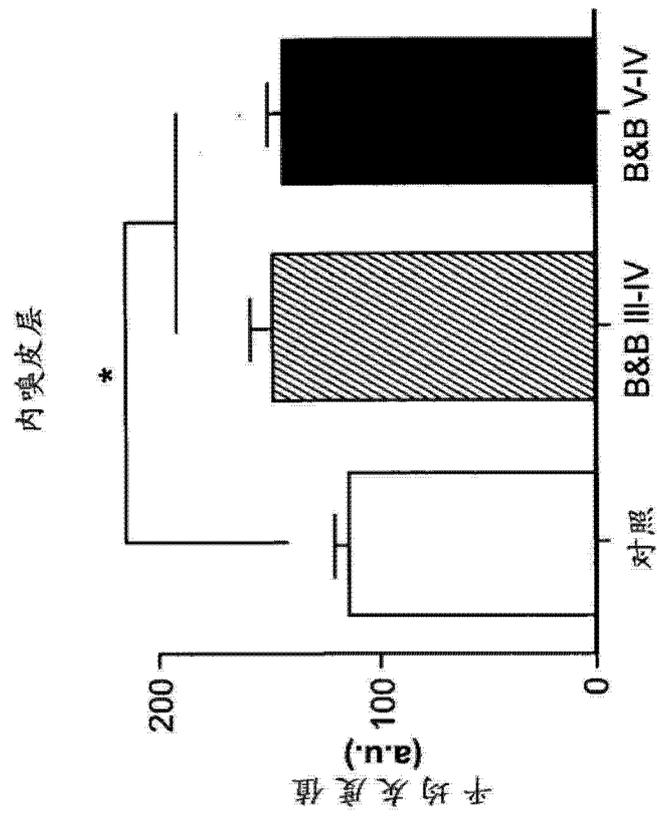


图 44E

病例细节: BB, Braak和Braak分期

样品ID	诊断	性别	年龄 (岁)	死后间隔 (小时)
BM9	对照	f	72	23
BM11	对照	f	73	13
BM17	对照	f	77	47
912	BBIV	f	103	5
1314	对照	m	56	36
1315	BBVI	f	64	9
1323	BBIII-IV	m	94	24
1325	BB VI	f	80	30
1360	BB VI	f	88	31
1368	BB III	f	95	24
1377	BB V	m	78	24

图 44F

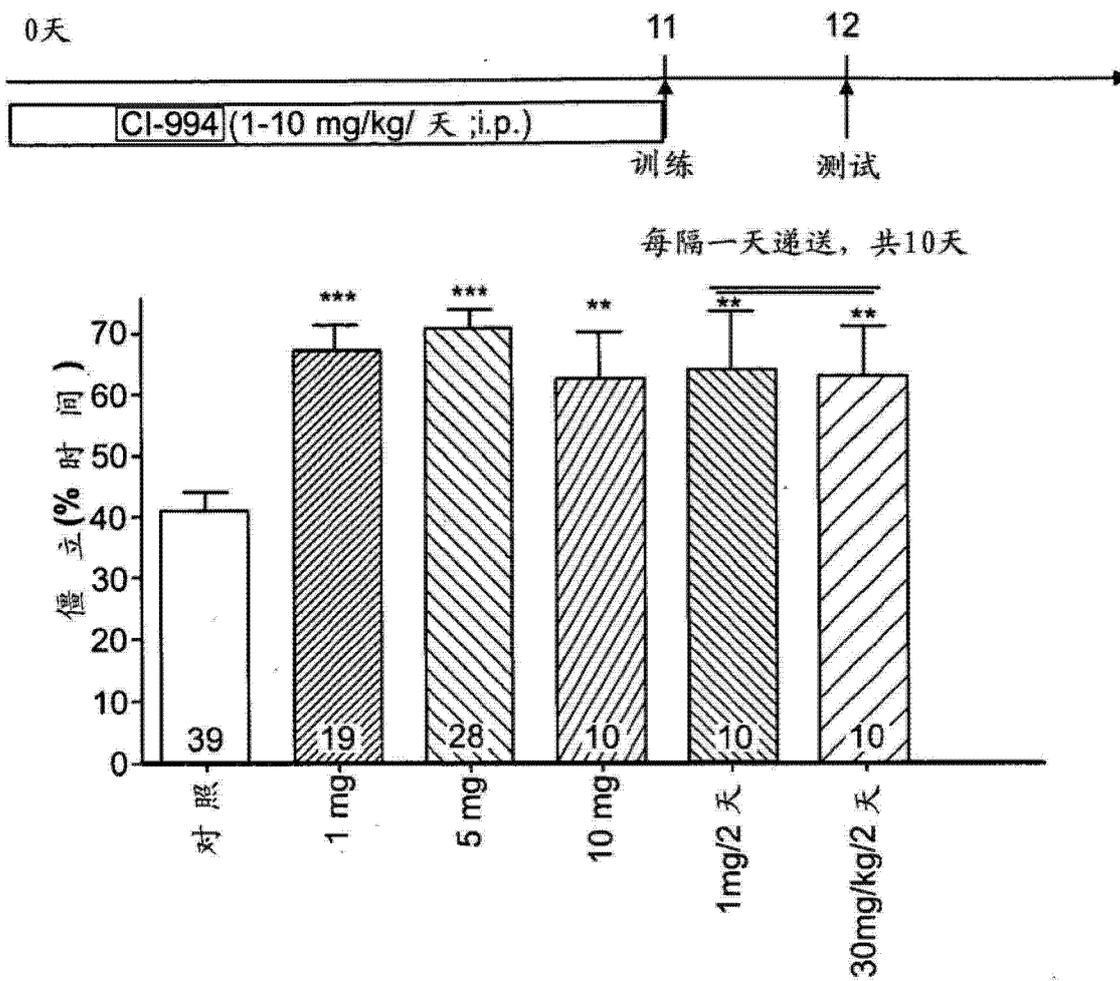


图 45A

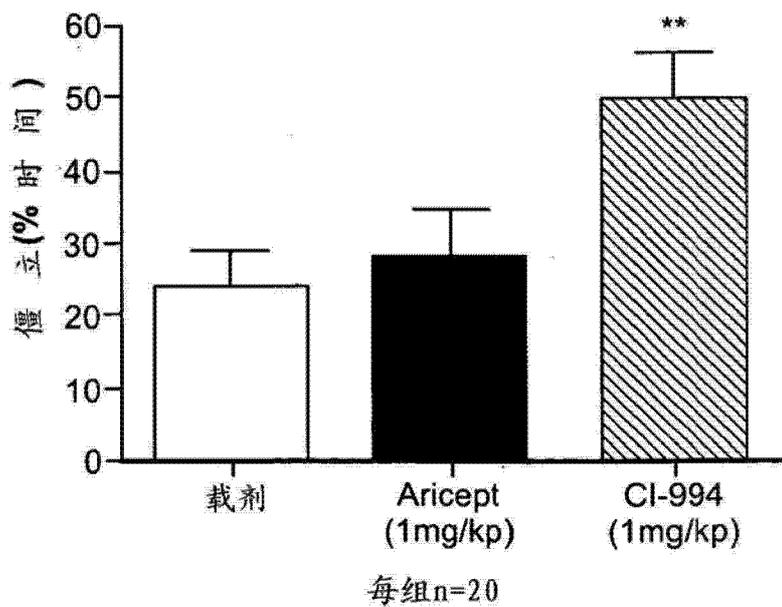


图 45B

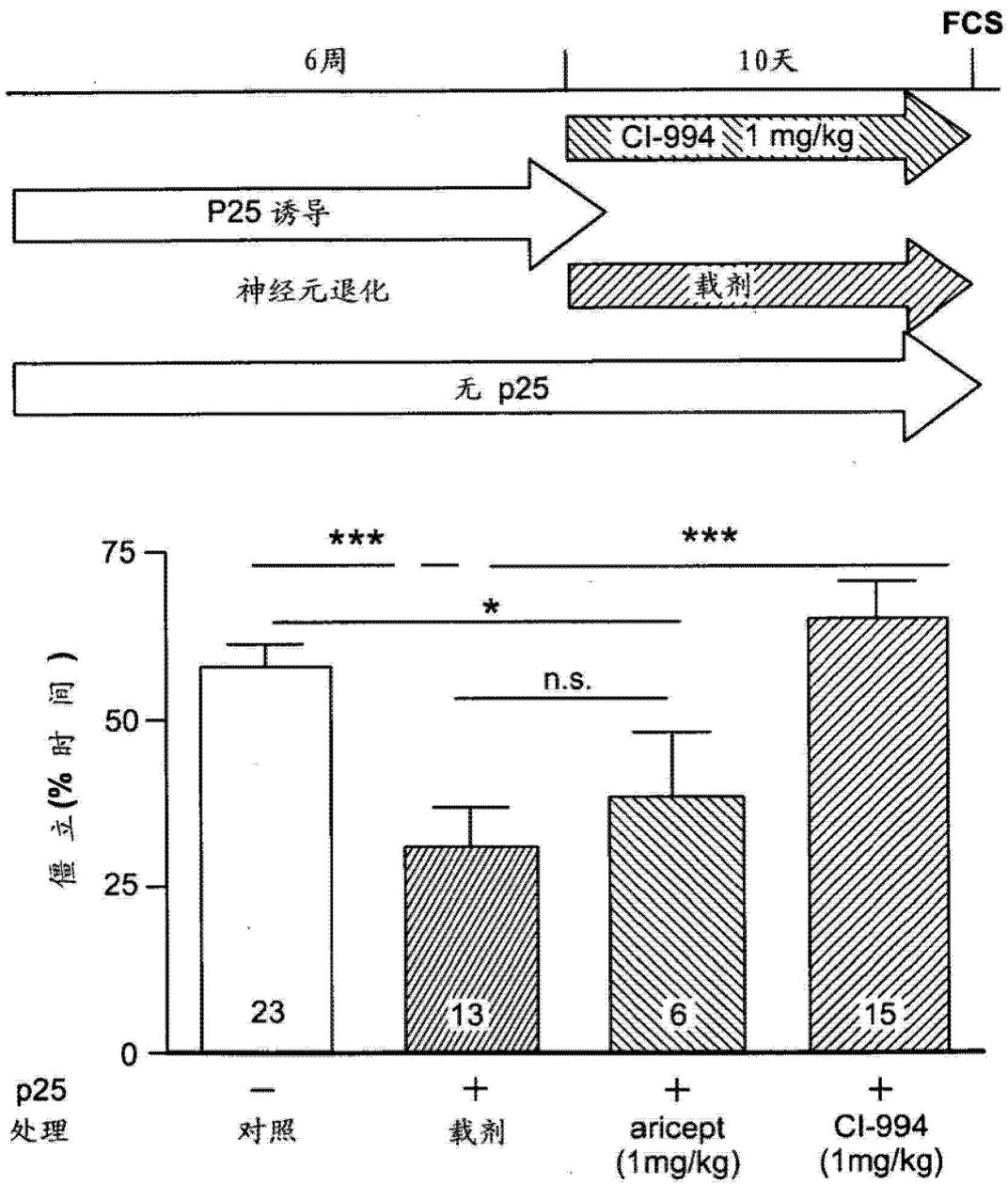


图 46A

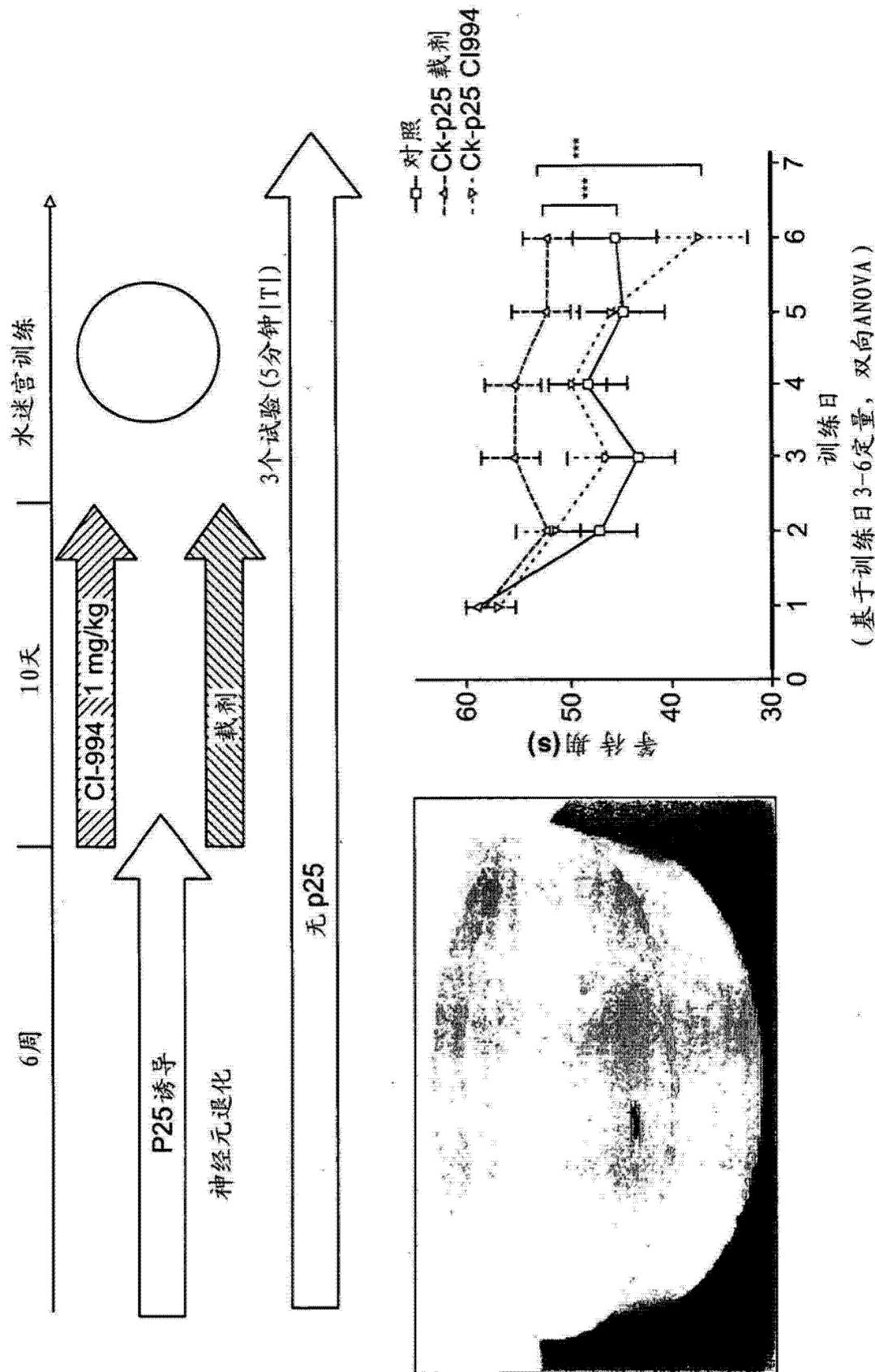


图 46B

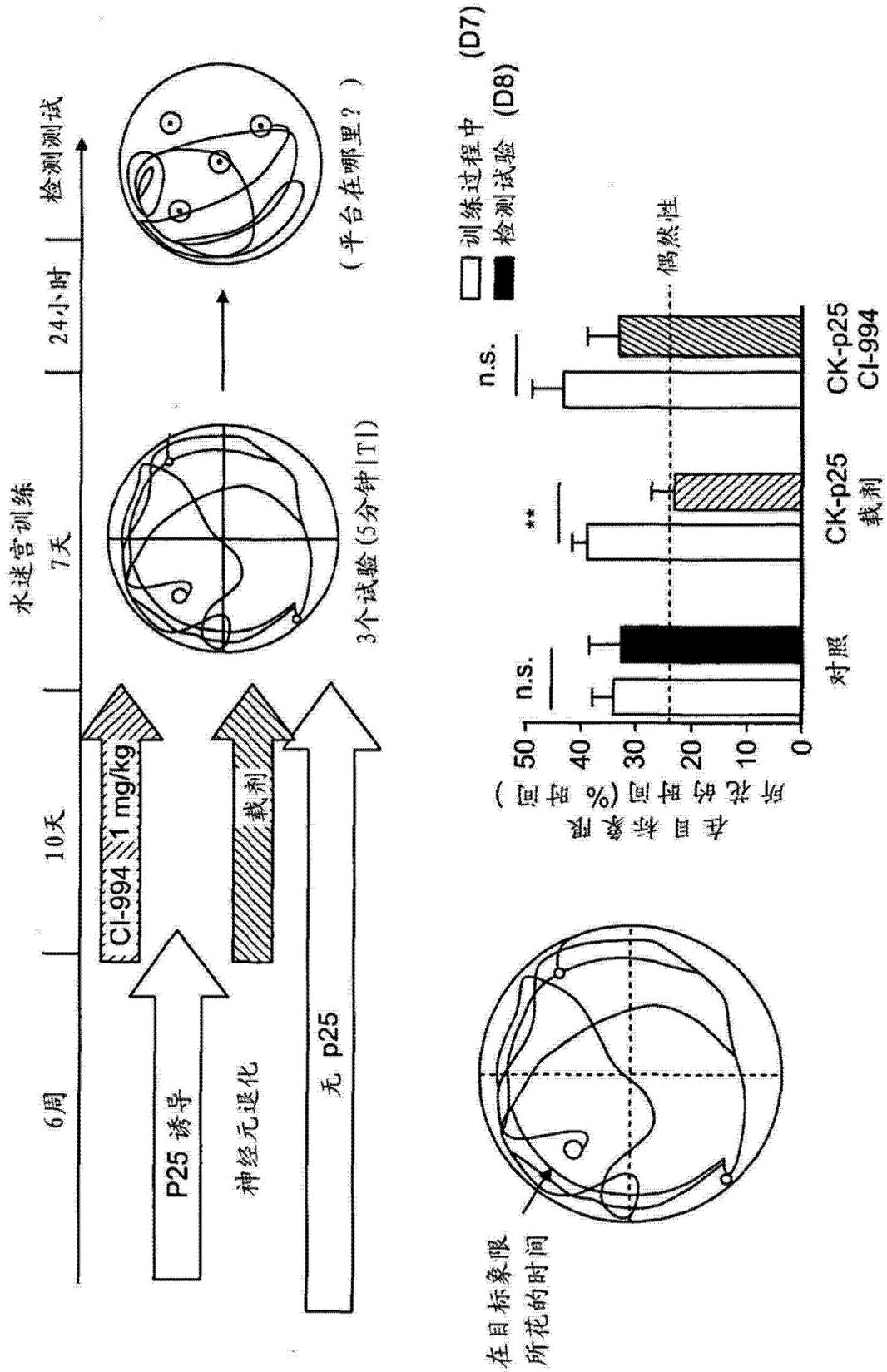


图 46C

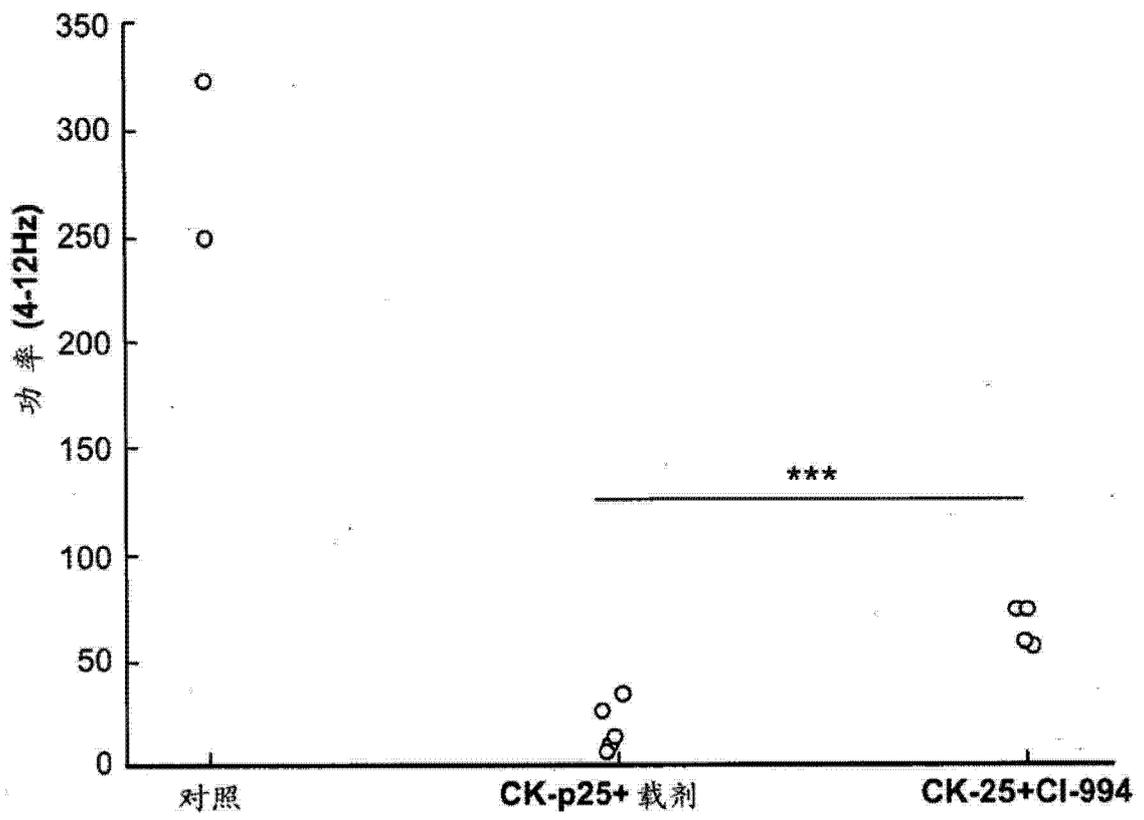


图 47A

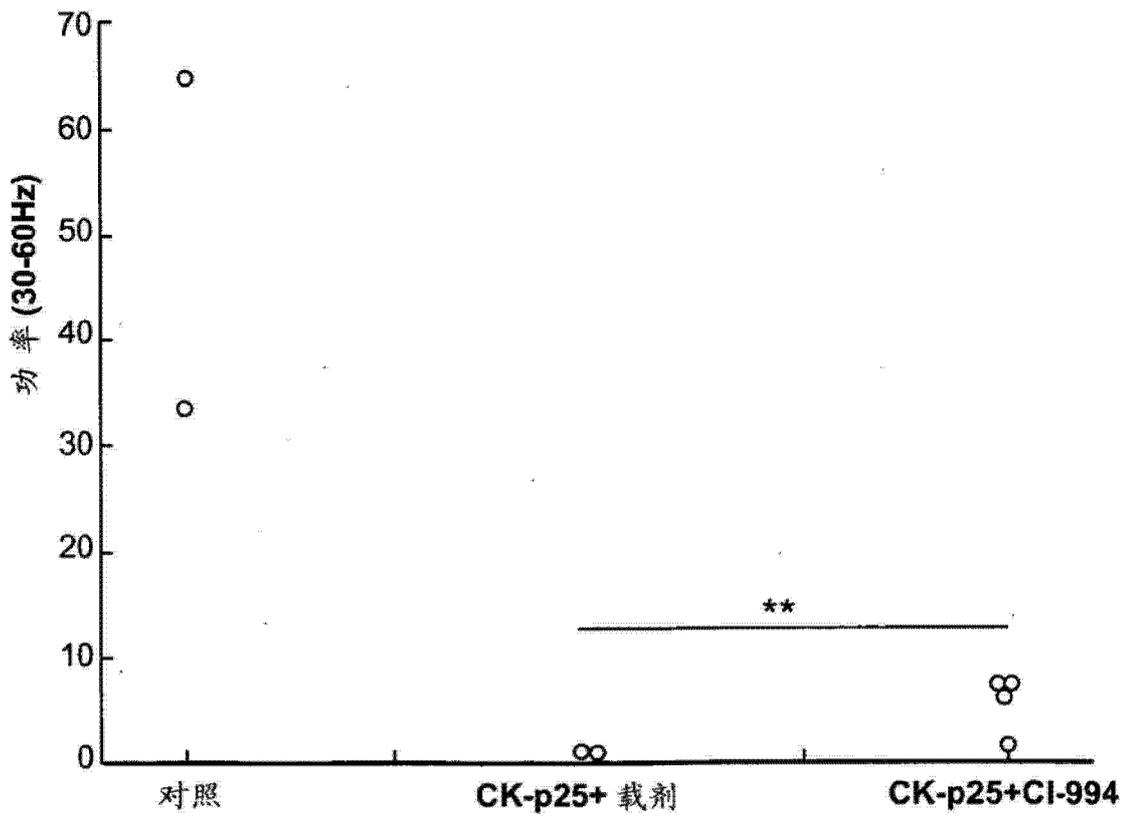


图 47B

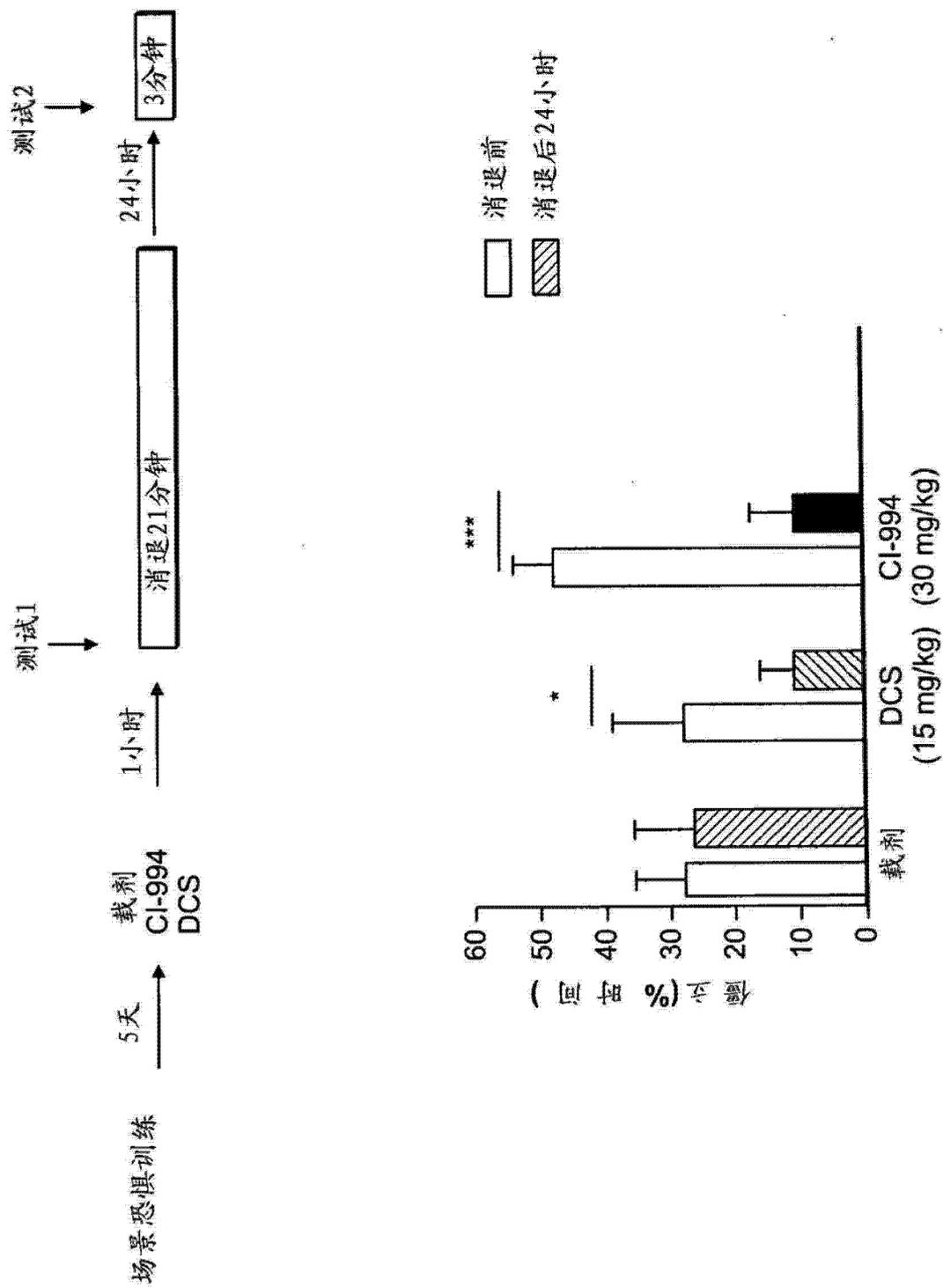


图 48A

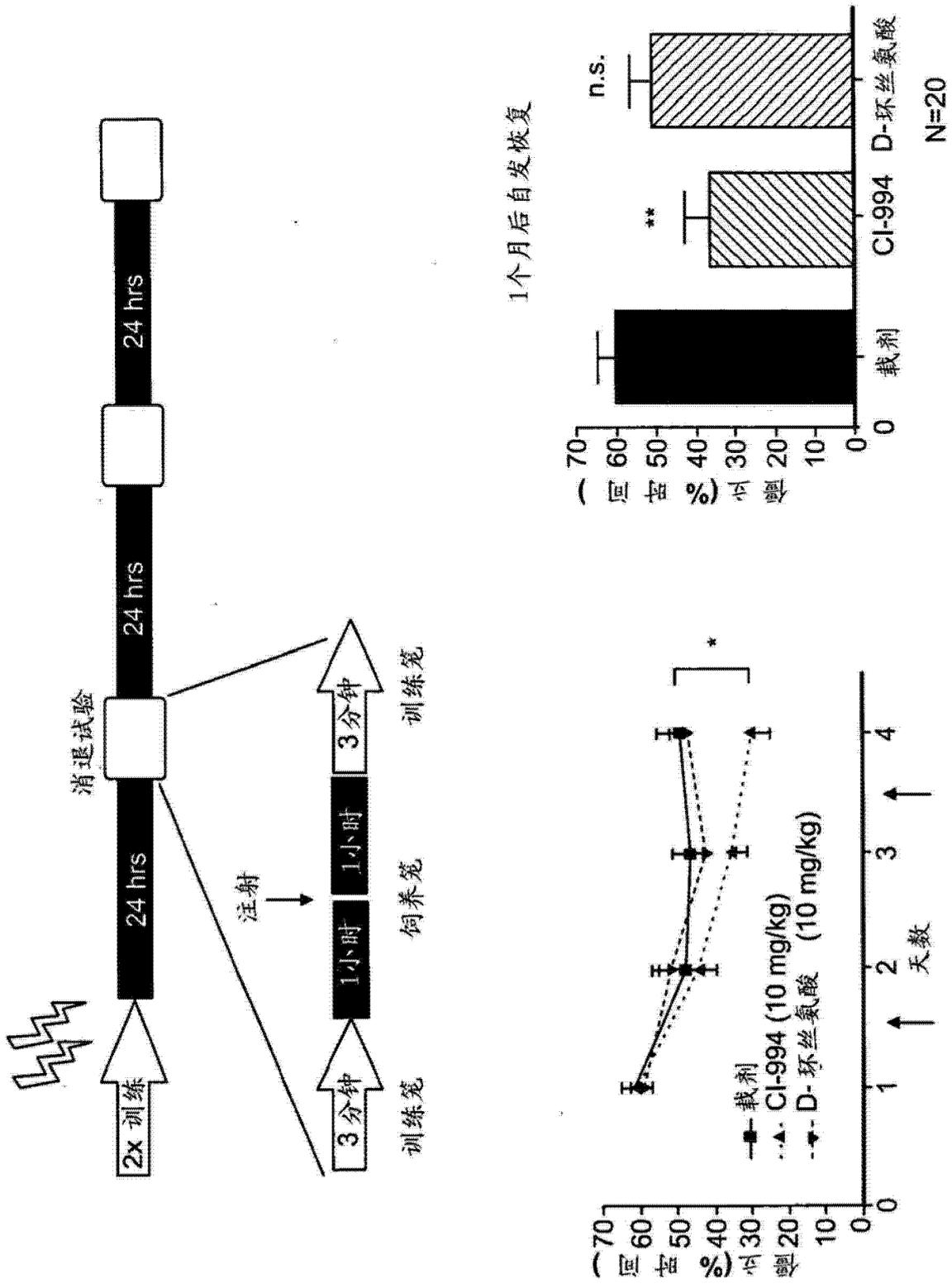


图 48B

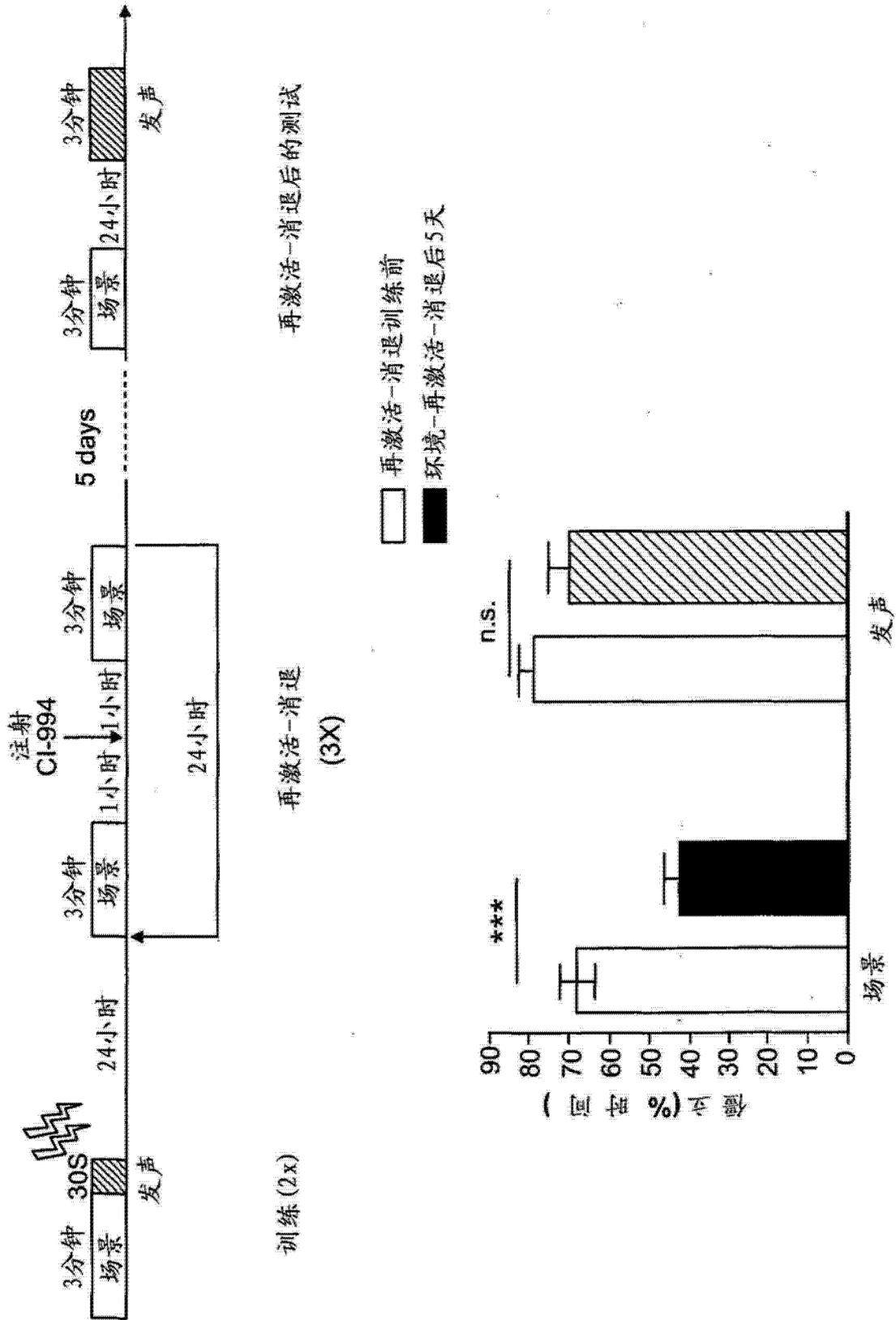


图 48C

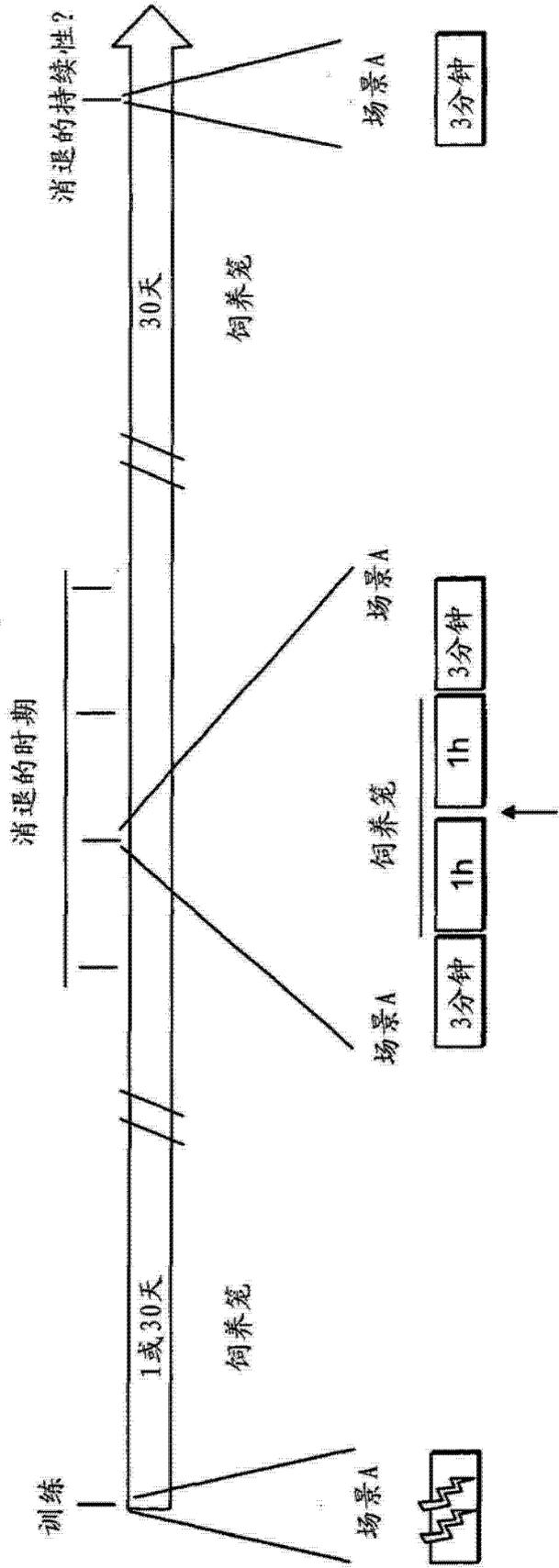


图 49A

单次注射HDACi CI-994, 5mg/kg

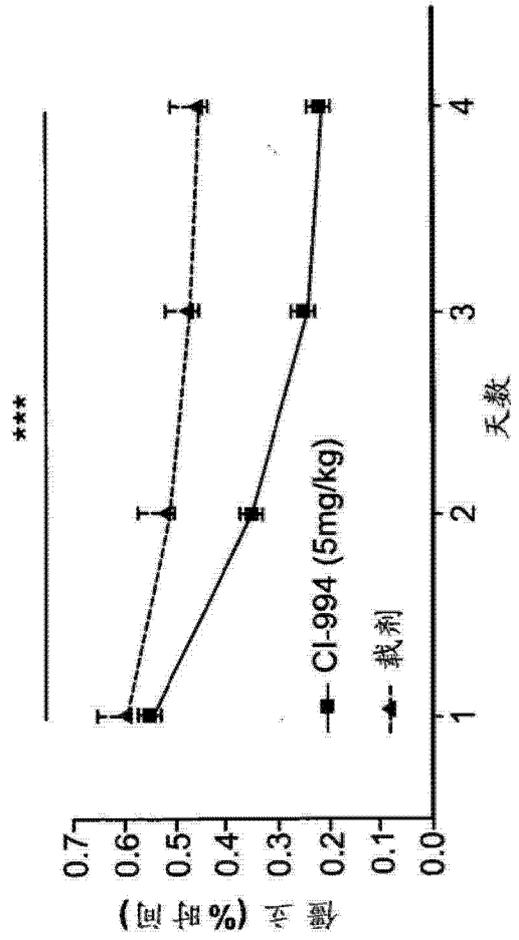


图 49B

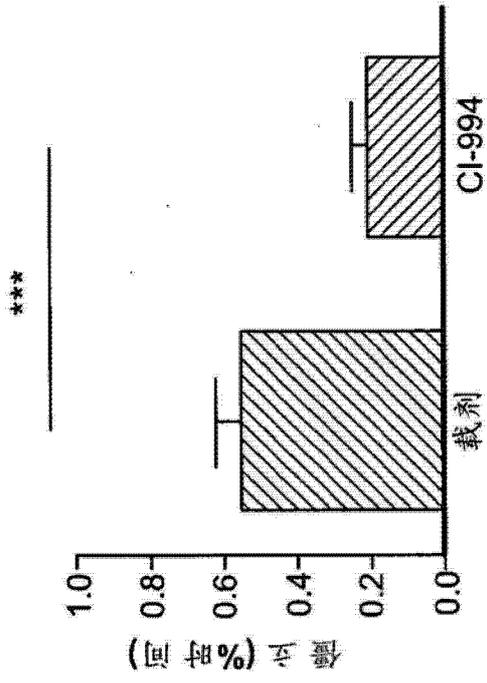


图 49C

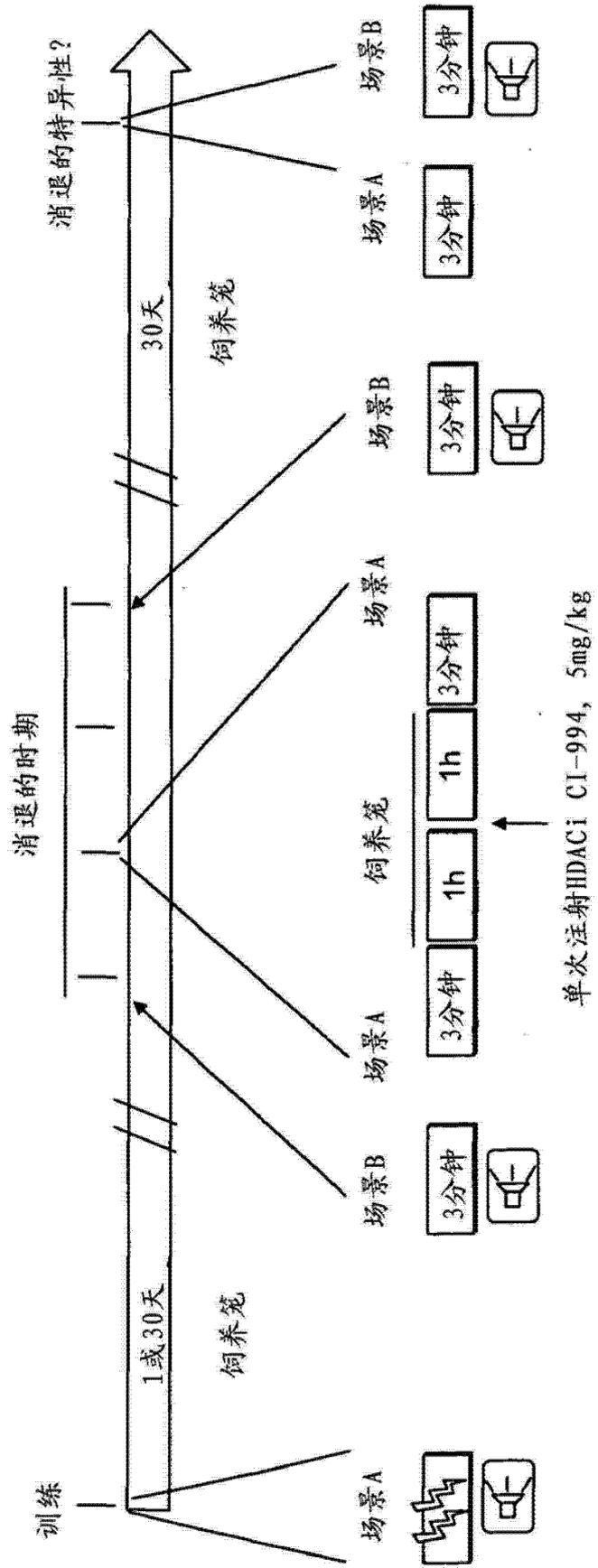


图 49D

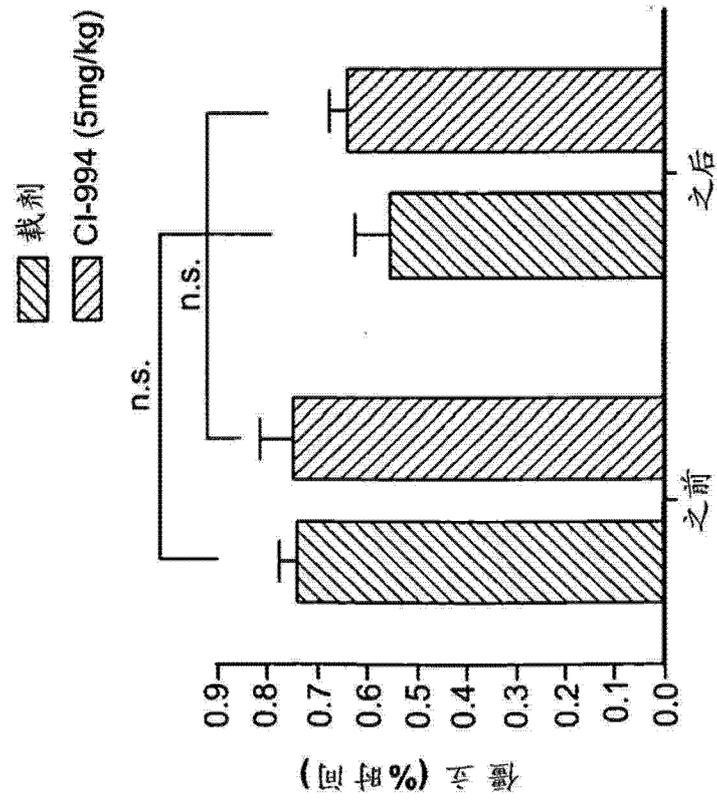


图 49E

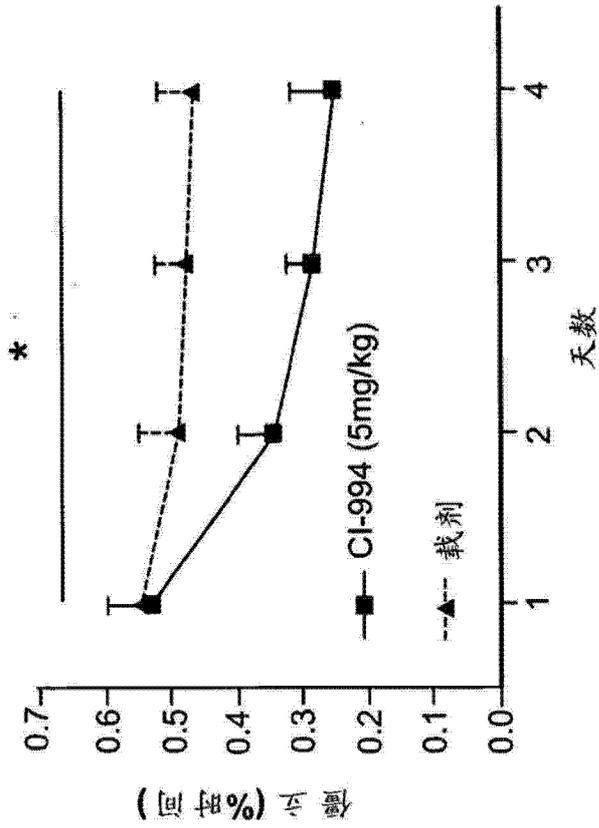


图 49F

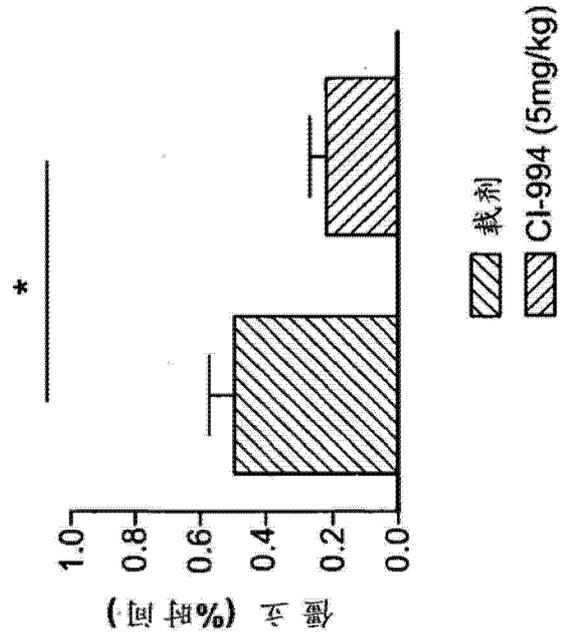


图 49G

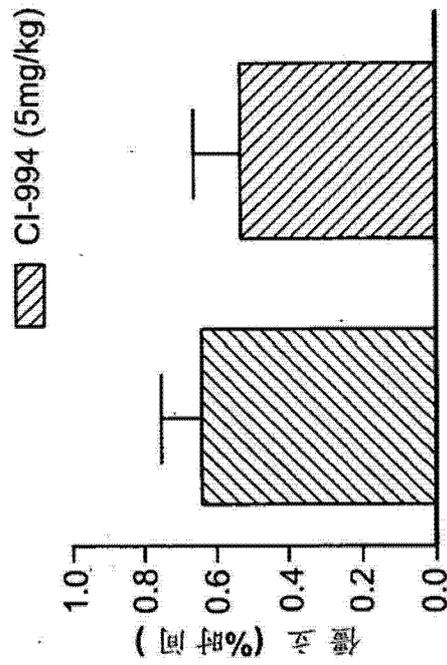


图 49H

小鼠中单次0.1 mg/kg腹腔内给药后
血浆和脑中的CI-994的浓度-时间曲线

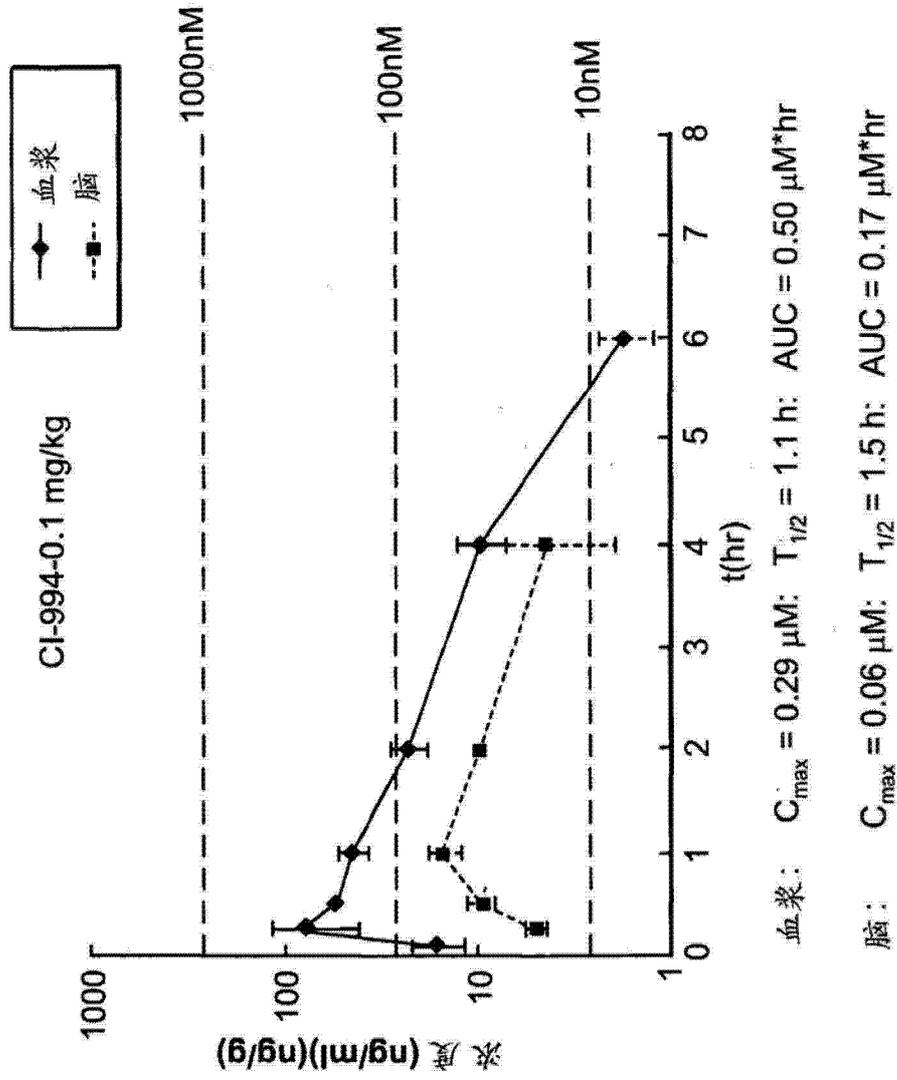


图 50

在CK-p25小鼠中1.0和0.1mg/kg的CI-994减轻认知缺陷

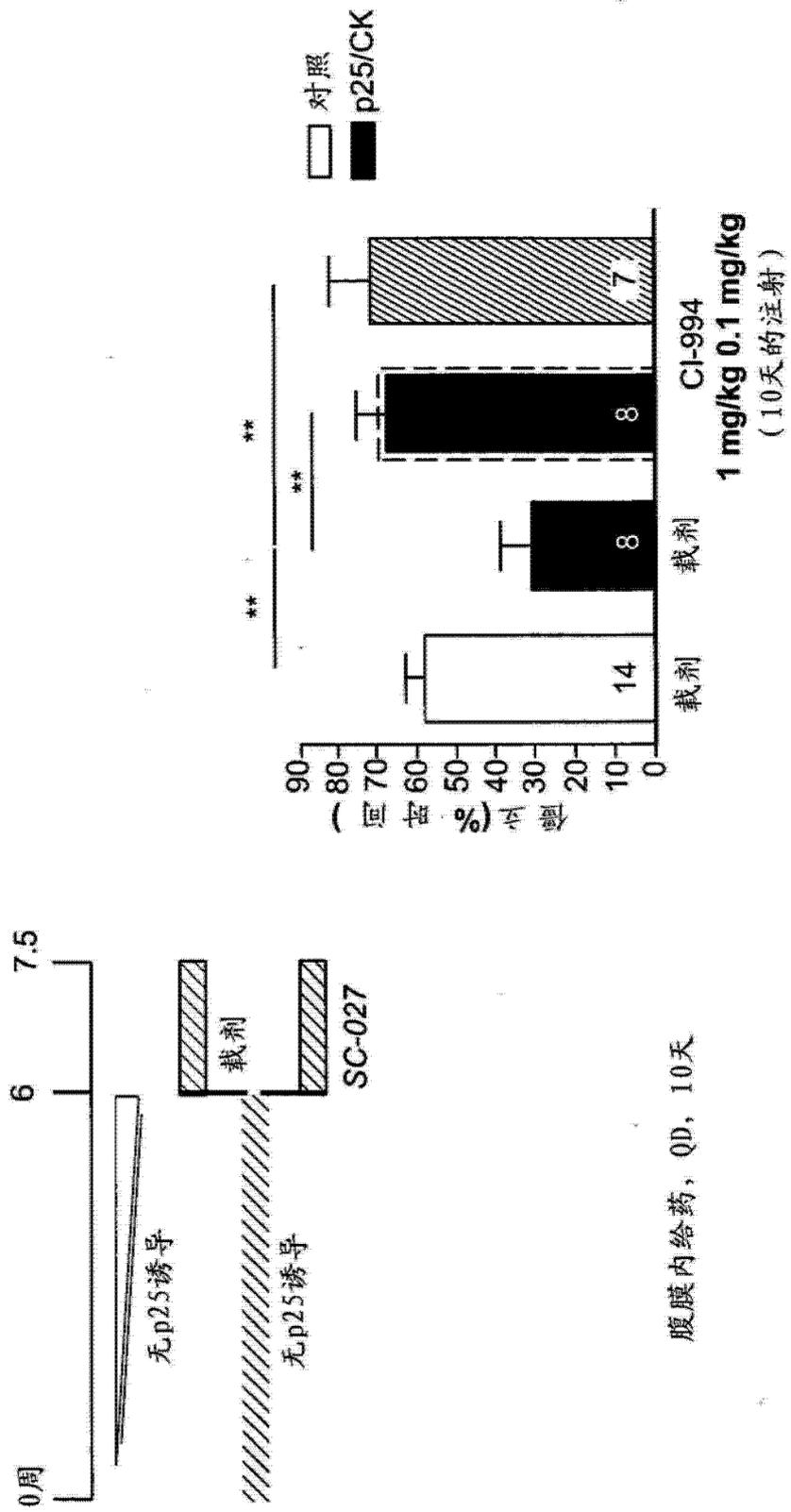


图 51