



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107865968 B

(45) 授权公告日 2021.03.05

(21) 申请号 201711057517.4

(22) 申请日 2013.08.03

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 107865968 A

(43) 申请公布日 2018.04.03

(30) 优先权数据  
61/679,668 2012.08.03 US

(62) 分案原申请数据  
201380052023.0 2013.08.03

(73) 专利权人 美国政府(由卫生和人类服务部的部长所代表)

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 J·麦丘 W·郑 M·许  
M·斯瓦鲁普 J·J·马鲁甘

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322

代理人 龙淳

(51) Int.Cl.  
A61K 45/06 (2006.01)  
A61K 31/355 (2006.01)  
A61K 31/724 (2006.01)  
A61P 3/00 (2006.01)  
A61P 25/00 (2006.01)

(56) 对比文件  
Liu.Therapeutic Potential of Cyclodextrins in the Treatment of Niemann-Pick Type C Disease.《Clin Lipidol》.2012,第7卷(第3期),289-301.

审查员 汤明秀

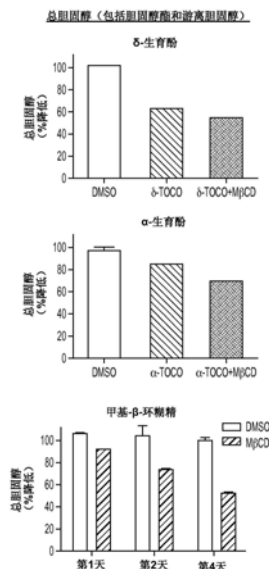
权利要求书1页 说明书24页 附图26页

(54) 发明名称

用于治疗溶酶体贮积症的环糊精

(57) 摘要

本发明提供了使用包括与其他治疗剂包括维生素E组合的环糊精化合物来治疗溶酶体贮积症和/或降低非胆固醇脂类的方法。



1. 一种环糊精化合物在制造用于治疗人溶酶体贮积症的药物中的用途,其中所述环糊精化合物是羟丙基- $\beta$ -环糊精 (HP $\beta$ CD) 或其药学可接受的盐、酯、溶剂化物或水合物,所述溶酶体贮积症是Batten病、Farber病、III型粘脂贮积症 (ML III)、IV型粘脂贮积症 (MLIV)、I型粘多糖贮积病 (MPSI)、VI型粘多糖贮积病 (MPS VI) 或Wolman病,并且所述药物配制成用于颅内给药。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述颅内给药是鞘内、脑室内、大脑内或硬膜外给药。

3. 根据权利要求1或2所述的用途,其中所述HP $\beta$ CD的剂量为0.01mg/Kg至100mg/Kg。

4. 根据权利要求1或2所述的用途,其中所述HP $\beta$ CD的剂量为0.5mg/Kg至8mg/Kg。

5. 根据权利要求1或2所述的用途,其中所述药物还包括药学适当的赋形剂。

## 用于治疗溶酶体贮积症的环糊精

[0001] 本案是申请号为201380052023.0的分案申请。

[0002] 联邦资助的研究

[0003] 本工作得到联邦政府支持。政府具有对本发明的某些权利。

[0004] 相关申请

[0005] 本申请要求于2012年8月3日提交的美国临时申请第61/679,668号的优先权,在此将其全文并入作为参考。

### 发明领域

[0006] 本发明提供使用环糊精化合物以及结合其他药剂使用环糊精化合物治疗大量溶酶体贮积症和/或降低非胆固醇脂类的方法。

### 背景技术

[0007] 环糊精(CD)是环形式的糖分子。 $\alpha$ -CD(6糖)、 $\beta$ -CD(7糖)和 $\gamma$ -CD(8糖)是常用的环糊精。羟丙基- $\beta$ 环糊精(HPBCD)已被批准作为药物赋形剂用于制药用途。最近的报道显示,包括HPBCD和 $\beta$ -甲基环糊精(MBCD)的 $\beta$ -环糊精在C型尼曼匹克(NPC)疾病小鼠模型中降低胆固醇聚积和神经元细胞损失。在CD治疗之后这些NPC KO小鼠的寿命也增加了80-100%。在NPC疾病的猫科动物模型中也获得了类似的阳性结果。另有报道 $\beta$ -CD增加了原代NPC成纤维细胞中的胞吐。

[0008] 最近已经发现, $\delta$ -生育酚增加胆固醇从NPC细胞的外排,并降低胆固醇聚积。已经表明提高溶酶体胞吐是针对所有溶酶体贮积症开发新治疗的治疗策略,上述溶酶体贮积症由因溶酶体蛋白质基因的基因突变导致的50种不同的疾病组成。这些疾病中的表型变化是溶酶体中脂类、糖蛋白和/或其他大分子的聚积以及患者细胞中溶酶体尺寸的增大,其可以导致受感染组织中的细胞功能障碍和细胞死亡。

### 发明内容

[0009] 在一方面,本发明提供治疗受试者中溶酶体贮积症的方法,其包括:确定受试者需要降低非胆固醇脂类或降低非胆固醇主要脂类和大分子聚积,以及对有需要的受试者施用有效量的环糊精化合物或其药学可接受的盐、酯、溶剂化物或水合物。

[0010] 另一方面,本发明提供治疗受试者中溶酶体贮积症的方法,其中受试者之前已经识别为需要降低非胆固醇脂类或降低非胆固醇主要脂类和大分子聚积,上述方法包括对有需要的所述受试者施用有效量的环糊精化合物或其药学可接受的盐、酯、溶剂化物或水合物。

[0011] 另一方面,本发明提供治疗受试者中溶酶体贮积症的方法,其包括以下步骤:对受试者施用有效量的环糊精化合物或其药学可接受的盐、酯、溶剂化物或水合物和额外的治疗剂。

[0012] 在某些方面,本发明提供降低受试者中非胆固醇脂类或降低非胆固醇主要脂类和

大分子聚积的方法,该方法包括:对受试者施用环糊精化合物或其药学可接受的盐、酯、溶剂化物或水合物;以及检测脂类降低的量。

[0013] 在另一方面,本发明提供一种药物组合物,其包括环糊精化合物或其药学可接受的盐、酯、溶剂化物或水合物和维生素E(例如 $\delta$ -生育酚)以及药学可接受的载体或赋形剂。

[0014] 在另一方面,本发明提供治疗患有溶酶体贮积症的受试者的方法,其包括结合其他药剂使用如上所述的药物组合物。

[0015] 在任一上述方面的一实施方式中,施用环糊精化合物的步骤包括以大约0.01mg/Kg/天至100mg/Kg/天的剂量将环糊精化合物施用于受试者例如人。

[0016] 在任一上述方面的另一实施方式中,以单一剂量或每天大约0.5mg/Kg至8mg/Kg的量将环糊精化合物施用于受试者例如人。

[0017] 在任一上述方面的一实施方式中,以单一剂量或每天大约3mg/Kg的量将环糊精化合物施用于受试者例如人。在任一上述方面的又一实施方式中,以单一剂量或每天大约1.0mg/Kg、1.25mg/Kg、1.5mg/Kg、1.75mg/Kg、2.0mg/Kg、2.25mg/Kg、2.5mg/Kg、2.75mg/Kg、3.25mg/Kg、3.5mg/Kg、3.75mg/Kg、4.0mg/Kg、4.25mg/Kg或4.5mg/Kg的量将环糊精化合物施用于受试者例如人。

[0018] 在任一上述方面的又一实施方式中,以单一剂量或每天大约0.1mg/Kg至0.3mg/Kg、0.1mg/Kg至0.4mg/Kg、0.1mg/Kg至0.5mg/Kg、0.1mg/Kg至0.6mg/Kg或0.1mg/Kg至0.7mg/Kg的量将环糊精化合物施用于受试者例如人。

[0019] 在任一上述方面的又一实施方式中,以单一剂量施用环糊精化合物。

[0020] 在任一上述方面的一实施方式中,以单一剂量或每天大约0.05-1mg/Kg的量将额外的治疗剂(与环糊精化合物不同)施用于受试者例如人。在任一上述方面的另一实施方式中,以单一剂量或每天大约0.1mg/Kg至0.3mg/Kg、0.1mg/Kg至0.4mg/Kg、0.1mg/Kg至0.5mg/Kg、0.1mg/Kg至0.6mg/Kg或0.1mg/Kg至0.7mg/Kg的量将额外的治疗剂(与环糊精化合物不同)施用于受试者例如人。

[0021] 在任一上述方面的一实施方式中,以单一剂量施用额外的治疗剂。

[0022] 在另一方面,本发明特征在于治疗受试者中溶酶体贮积症的方法,其包括:确定受试者需要降低非胆固醇脂类或降低非胆固醇主要脂类和大分子聚积;以单一剂量或每天大约0.05mg/Kg至1mg/Kg的量对有需要的受试者施用有效量的环糊精化合物或其药学可接受的盐、酯、溶剂化物或水合物;以及以单一剂量或每天大约0.05mg/Kg至1mg/Kg的量对受试者施用与环糊精化合物不同的额外的治疗剂(例如维生素E)。

[0023] 在另一方面,本发明特征在于治疗受试者中溶酶体贮积症的方法,其包括:确定受试者需要降低非胆固醇脂类或降低非胆固醇主要脂类和大分子聚积;对有需要的受试者施用有效量的环糊精化合物或其药学可接受的盐、酯、溶剂化物或水合物;以及对受试者施用与环糊精化合物不同的额外的治疗剂(例如维生素E)。

[0024] 在一实施方式中,以单一剂量或每天大约0.1mg/Kg至0.3mg/Kg、0.1mg/Kg至0.4mg/Kg、0.1mg/Kg至0.5mg/Kg、0.1mg/Kg至0.6mg/Kg或0.1mg/Kg至0.7mg/Kg的量将环糊精化合物施用于受试者例如人。

[0025] 在另一实施方式中,以单一剂量或每天大约0.1mg/Kg至0.3mg/Kg、0.1mg/Kg至0.4mg/Kg、0.1mg/Kg至0.5mg/Kg、0.1mg/Kg至0.6mg/Kg或0.1mg/Kg至0.7mg/Kg的量将额外

的治疗剂(与环糊精化合物不同)施用于受试者例如人。

[0026] 在又一实施方式中,以单一剂量或每天大约50 $\mu$ M的量将环糊精化合物与10 $\mu$ M的额外的药剂结合施用于受试者例如人。

[0027] 在进一步优选的实施方式中,以单一剂量或每天大约50 $\mu$ M的量将环糊精化合物与10 $\mu$ M $\delta$ -生育酚结合施用于受试者例如人。

[0028] 在其他方面,本发明提供一种试剂盒,其包括单位剂型的有效量的环糊精化合物或其药学可接受的盐、酯、溶剂化物或水合物,以及用于将化合物施用于患有溶酶体贮积症的受试者的说明书。

[0029] 本发明的各种优势包括以下:用环糊精包括羟丙基- $\beta$ -环糊精治疗所有的溶酶体贮积症,但在某些方面C型尼曼匹克病除外;用环糊精包括羟丙基- $\beta$ -环糊精与维生素E结合治疗所有的溶酶体贮积症,用以协同或附加的治疗效果,用于降低使得环糊精治疗实际上更加可行所需的环糊精的剂量,并通过减少两种药物的剂量使副作用更小;用环糊精(例如 $\beta$ -和 $\gamma$ -形式)与修饰的环糊精结合治疗所有的溶酶体贮积症,效力更好,副作用更小;用环糊精和修饰的维生素E治疗所有的溶酶体贮积症,效力更好,副作用更小。

[0030] 而且,本发明提供以本发明的化合物给药,以便基于环糊精作用机制(增加溶酶体胞吐)治疗40-50种溶酶体贮积症中的许多种。

[0031] 本发明的其他方面在下文中公开。

## 附图说明

[0032] 图1是一组显示用 $\delta$ -生育酚、 $\alpha$ -生育酚、甲基- $\beta$ -环糊精、 $\delta$ -生育酚和甲基- $\beta$ -环糊精的组合、以及 $\alpha$ -生育酚和甲基- $\beta$ -环糊精(MBCD)的组合进行处理的Wolman成纤维细胞(Wolman fibroblasts)中总胆固醇(包括胆固醇酯和游离胆固醇)的降低的图。

[0033] 图2是一组显示用 $\delta$ -生育酚(D-T)、 $\alpha$ -生育酚( $\alpha$ -T)、甲基- $\beta$ -环糊精、 $\delta$ -生育酚(D-T)和甲基- $\beta$ -环糊精(MBCD)的组合、以及 $\alpha$ -生育酚和甲基- $\beta$ -环糊精的组合进行处理的Wolman成纤维细胞尼罗红染色的照片。

[0034] 图3是一组显示通过HEXB分泌所测量的Wolman成纤维细胞中胞吐水平的图。

[0035] 图4是一组显示在存在和不存在 $\delta$ -生育酚、 $\alpha$ -生育酚、甲基- $\beta$ -环糊精、 $\delta$ -生育酚和甲基- $\beta$ -环糊精的组合、以及 $\alpha$ -生育酚和甲基- $\beta$ -环糊精的组合的情况下野生型成纤维细胞和溶酶体贮积症成纤维细胞中溶酶体钙外排的图。

[0036] 图5A-5D是多组显示使用Lysotracker检定所测量的各种形式的环糊精( $\alpha$ -CD、 $\gamma$ -CD)、 $\delta$ -生育酚(D-T)及组合在7种疾病和野生型成纤维细胞系中的效果的照片。高度分枝的环糊精(HBCD)也称作Kleptose。

[0037] 图6是一组显示环糊精减轻Wolman病细胞中病理学超微结构变化的照片。缩写:甲基- $\beta$ -环糊精(MBCD)、 $\delta$ -生育酚( $\delta$ -toco)。

[0038] 图7是一组显示用甲基- $\beta$ -环糊精(MBCD)、 $\alpha$ -环糊精( $\alpha$ -CD)或 $\gamma$ -环糊精( $\gamma$ -CD)处理的Farber成纤维细胞的电子显微镜分析的照片。

[0039] 图8是一组显示用甲基- $\beta$ -环糊精(MBCD)处理的Tay-Sach、Fabry和Farber成纤维细胞的电子显微镜分析的照片。

[0040] 图9是一组显示用甲基- $\beta$ -环糊精(MBCD)处理的Wolman、NPA、Batten和MSIIIB成纤

维细胞的电子显微镜分析的照片。

[0041] 图10是一组显示用以下试剂处理的Farber成纤维细胞的电子显微镜分析的照片： $\delta$ -生育酚 (DT) 和甲基- $\beta$ -环糊精 (MBCD)； $\delta$ -生育酚 (DT) 和 $\alpha$ -环糊精 ( $\alpha$ -T)； $\delta$ -生育酚 (DT) 和 $\gamma$ -环糊精 ( $\gamma$ -CD)； $\delta$ -生育酚 (DT) 和Kleptose (也称作HBPCD)； $\alpha$ -生育酚 ( $\alpha$ -T) 和甲基- $\beta$ -环糊精 (MBCD)；以及 $\alpha$ -生育酚 ( $\alpha$ -T) 和Kleptose。KLEPTOSE或TRAPPSOL是化学品HBPCD或HBPCD的商品名。

[0042] 图11 (A和B) 是一组显示环糊精和 $\delta$ -生育酚在NPC1皮肤成纤维细胞中对于降低胆固醇聚积 (Amplex-红胆固醇检定和非律平 (filipin) 染色) 和增大溶酶体 (Lysotracker染色) 的作用的照片。甲基- $\beta$ -环糊精 (MBCD)、HBPCD (Kleptose)。

[0043] 图12 (A和B) 显示了环糊精和 $\delta$ -生育酚在NPC1神经元细胞 (NPC1-NSCs) 中对于降低胆固醇聚积 (Amplex-红胆固醇检定和非律平染色) 和增大溶酶体 (Lysotracker染色) 的作用的照片。(A) 显示Amplex-红 (Amplex-red) 胆固醇检定中确定的浓度-效应。(B) 显示非律平和lysotracker染色。甲基- $\beta$ -环糊精 (MBCD)、 $\delta$ -生育酚 ( $\delta$ -T)。

[0044] 图13 (A和B) 是一组显示单独使用环糊精与结合使用 $\delta$ -生育酚在NPC1神经元细胞 (NPC1-NSCs) 中对于降低胆固醇聚积 (非律平染色) 和增大溶酶体 (Lysotracker染色) 的效果比较的照片。(A) HBPCD+ $\delta$ -生育酚。(B) MBCD+ $\delta$ -生育酚。

[0045] 图14是一组显示用以下试剂处理的3123细胞中lysotracker染色的照片：甲基- $\beta$ -环糊精 (MBCD)；HBPCD或 $\delta$ -生育酚 (DT)。

[0046] 图15是一组显示用以下试剂处理的ML111细胞中lysotracker染色的照片：甲基- $\beta$ -环糊精 (MBCD)；HBPCD或 $\delta$ -生育酚 (DT)。

[0047] 图16是一组显示用以下试剂处理的MLIV细胞中lysotracker染色的照片：甲基- $\beta$ -环糊精 (MBCD)；HBPCD或 $\delta$ -生育酚 (DT)。

[0048] 图17是一组显示用以下试剂处理的MPS1细胞中lysotracker染色的照片：甲基- $\beta$ -环糊精 (MBCD)；HBPCD或 $\delta$ -生育酚 (DT)。

[0049] 图18是一组显示用以下试剂处理的MPSV1细胞中lysotracker染色的照片：甲基- $\beta$ -环糊精 (MBCD)；HBPCD或 $\delta$ -生育酚 (DT)。

## 具体实施方式

### [0050] 治疗方法

[0051] 在一方面，本发明提供一种治疗受试者中溶酶体贮积症的方法，其包括：确定受试者需要降低非胆固醇脂类或降低非胆固醇主要脂类和其他大分子聚积，以及对有需要的受试者施用有效量的环糊精化合物或其药学可接受的盐、酯、溶剂化物或水合物。

[0052] 另一方面，本发明提供一种治疗受试者中溶酶体贮积症的方法，其中受试者之前已经识别为需要降低非胆固醇脂类或降低非胆固醇主要脂类和其他大分子聚积，上述方法包括：对有需要的所述受试者施用有效量的环糊精化合物或其药学可接受的盐、酯、溶剂化物或水合物。

[0053] 在一实施方式中，通过降低受试者中非胆固醇脂类或非胆固醇主要脂类和其他大分子聚积来治疗溶酶体贮积症。

[0054] 在另一实施方式中，非胆固醇脂类是脂色素 (lipopigments)、神经酰胺三己糖苷

(globotriaosylceramide)、神经酰胺、鞘磷脂、硫酸乙酰肝素、部分降解的硫酸乙酰肝素、GM2神经节苷脂、甘油三酯或胆固醇酯。其他大分子包括蛋白质、糖蛋白(含糖蛋白质)、粘多糖(长的不分枝多糖)和其他细胞组分。

[0055] 受试者可以通过向临床医师陈述溶酶体贮积症症状而被识别为患有溶酶体贮积症,其包括但不限于肝和脾增大。贮积可以在早期胚胎发育过程中开始,并且溶酶体贮积症的临床表现可以从早期的严重表型变化为迟发性的轻缓疾病。可以对所述受试者进行多种诊断测试,以确定受试者是否患有溶酶体贮积症,并进一步确定非胆固醇脂类和大分子和非胆固醇主要脂类(即,以大于胆固醇的量或百分含量存在的非胆固醇脂类)的存在。

[0056] 例如,可以使用皮肤活检样本的超微结构检定来检测未降解代谢物的溶酶体聚积。也可以使用特定的溶酶体酶活性的测试来确定特定溶酶体酶的存在。而且,皮肤超微结构和培养的源自皮肤活检的真皮成纤维细胞中特定溶酶体酶的检定二者的关联还可以有利于胆固醇和非胆固醇脂类的确定以及诊断精确性。非律平染色是公知的用于胆固醇的组织化学染色。非律平是高度荧光的,并与胆固醇特异性结合。这种检测细胞膜中胆固醇的方法在临床上用于例如C型尼曼匹克病的研究和诊断。可以使用分子遗传测试,其可以用于细化酶诊断。其他的确定胆固醇和非胆固醇脂类存在的方法包括抗体免疫染色或质谱。

[0057] 溶酶体贮积症包括~40-50种由溶酶体功能缺陷导致的遗传性代谢疾病。作为一组疾病的发病率为大约1:5000-1:10,000。术语溶酶体是指其中细胞膜和其他物质分解成小分子用以再利用的再循环中心。已经发现,脂类、糖蛋白和其他大分子的代谢或运输所需的单个酶或蛋白质的缺乏导致细胞溶酶体中的脂类聚积。溶酶体中过量的脂类或其他物质导致肝和脾的增大。神经元退化症状是牵涉到神经元的患者中常见的临床表现。

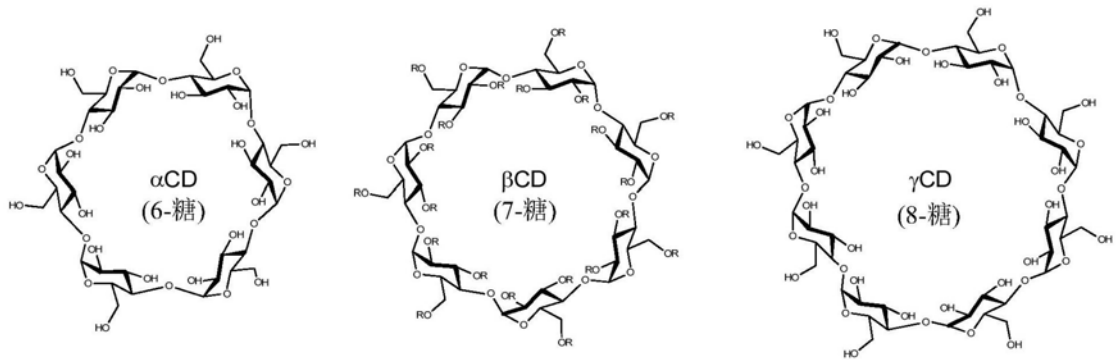
[0058] 本发明治疗的溶酶体贮积症包括,但不限于以下:天冬氨酰葡萄糖胺尿症(Aspartylglucosaminuria)、Wolman病、胱氨酸病、Danon病、Fabry病、Farber病、岩藻糖苷贮积症(Fucosidosis)、戈谢病、I/II/III型GM1-神经节苷酯病(Gangliosidosis)、GM2-神经节苷酯病、I/II型 $\alpha$ -甘露糖苷贮积症(Mannosidosis)、 $\beta$ -甘露糖苷贮积症、异染性脑白质营养不良、I/II型唾液酸贮积症(Sialidosis)、IV型粘脂贮积症、Scheie综合症、Hunter综合症、Sanfilippo综合症A、Sanfilippo综合症B、Sanfilippo综合症C、Sanfilippo综合症D、I/II型半乳糖唾液酸贮积症(Galactosialidosis)、Krabbe病、Sandhoff病、Vogt-Spielmeyer病、Hurler综合症、尼曼匹克病(Niemann-Pick disease)、I-细胞病(粘脂贮积症II)、伪Hurler多营养不良(pseudo-Hurler polydystrophy)、Morquio综合症、Maroteaux-Lamy综合症、Sly综合症、IX型粘多糖贮积病、多硫酸酯酶缺乏症(Multiple sulfatase deficiency)、Batten病、Tay-Sachs病、Pompe病、Batten病、Batten病、迟发性婴儿脂质沉积症(late infantile)、Northern Epilepsy、致密性成骨不全症(Pycnodysostosis)、Schindler病、Sialuria、和Salla病。

[0059] 在某些实施方式中,溶酶体贮积症是Tay-Sachs病、鞘脂贮积症、戈谢病、粘脂贮积症、半乳糖唾液酸贮积症、Salla病、胱氨酸病、Danon病、Fabry病、Farber病、脂褐质沉积症(Lipofuscinoses)、Pompe病、神经节苷脂贮积症(Gangliosidosis)、ISSD、Krabbe病、脑白质营养不良、Hurler病、Scheie病、San Filippo病、Sandhoff病、Schindler病、Batten病、或Wolman病。

[0060] 在进一步的实施方式中,溶酶体贮积症是Tay-Sachs病、Fabry病、Farber病、San



[0075]

[0076] 表1.  $\beta$ -环糊精的类型

[0077]

名称	糖#	R	R2#	名称
七(2,6-二-o-甲基)- $\beta$ -环糊精	7	3 位上 R1= -H 和 2、6 位上 R2= -Me 的组合	14	M $\beta$ CD
(2-羟丙基)- $\beta$ -环糊精	7	R1= -H 和 R2= -CH-CHOH-CH <sub>3</sub> 的随机组合	1~10 为 4 最多的种类	Kleptose
(2-羟丙基)- $\beta$ -环糊精	7	R1= -H 和 R2= -CH-CHOH-CH <sub>3</sub> 的随机组合	4 - 10 为 7 最多的种类	Trappsol

[0078] 在某些实施方式中,确定受试者中非胆固醇脂类降低或非胆固醇主要脂类和大分子聚积的步骤包括以下的任意一种或多种。

[0079] Amplex-红胆固醇检定-患者细胞中的总胆固醇通过Amplex-红胆固醇检定试剂盒(Invitrogen)测量。使用同样的试剂盒不用酶酸性脂酶测定未酯化的胆固醇。酯化的胆固醇测定为总胆固醇值与未酯化的胆固醇值之间的差值。通过Multidrop Combi分配器(Thermo Scientific,Waltham,MA)将细胞以4000、1000、300细胞/孔在100、20或5 $\mu$ l培养基中接种在组织培养物处理过的黑色96-孔、384-孔或1536-孔板中,并培养24小时。使用Pintool工作站(Klaypsys,San Diego,CA)向检定板加入DMSO溶液中的化合物稀释液,并培养3天。对于96-孔或384-孔板,将细胞手动或使用离心法洗涤两次,在离心法中,将反转的板置于一叠纸巾上,并以800rpm离心1分钟,然后加入7 $\mu$ l/孔PBS(用45度角分液器(Klaypsys)轻轻加入)。对于96-孔、384-孔或1536-孔板,将来自试剂盒的胆固醇检定混合物以100、20或2.5 $\mu$ l/孔加入,并在37 $^{\circ}$ C下孵育1小时。所得的荧光强度在荧光读板仪(Tecan,Durham,NC)中以560( $\pm$ 10)激发和590( $\pm$ 10)发射进行测量。

[0080] 尼罗红染色-如上所述将细胞在96-孔板中进行培养和处理。在实验这天,将细胞用PBS洗涤两遍,并用1 $\mu$ M尼罗红染料溶液(在细胞培养基中制备)以100 $\mu$ l/孔进行活染色(live-stained),然后在37 $^{\circ}$ C下孵育10分钟。用PBS洗涤两次之后,将细胞在室温(RT)下在PBS中3.2%的多聚甲醛中以100 $\mu$ l/孔固定1小时。通过加入100 $\mu$ l/孔PBS中的1 $\mu$ l/mg Hoechst 33342(Invitrogen),并在RT下孵育30分钟,进行细胞核染色。将板用PBS洗涤两

次,图像在Incell2000成像读板仪中测量,对于中性脂类(胆固醇酯和甘油三酯),使用FITC滤镜组( $Ex=480\pm 20nm$ , $Ex=525\pm 36nm$ ),对于Hoechst细胞核染色,使用DAPI滤镜组。

[0081] LysoTracker染料染色-通过应用对照细胞表现出最小染色而疾病细胞表现出显著染色的适当的LysoTracker染料浓度,对检定进行优化,以使增大的溶酶体可视化。如上所述将细胞在96-孔板中进行培养和处理。在实验这天,将细胞用100 $\mu$ l/孔培养基中的50nM LysoTracker-红DND-99染料(Invitrogen, #L-7528)在37 $^{\circ}$ C下活染色1小时,然后将板用PBS洗涤两次。然后将板在100 $\mu$ l/孔3.2%多聚甲醛中固定1小时,并用PBS洗涤两次。通过加入100 $\mu$ l/孔PBS中的1 $\mu$ l/mg Hoechst33342(Invitrogen),并在RT下孵育30分钟,进行细胞核染色。用PBS洗涤两次之后,将板在4 $^{\circ}$ C下储存,直至进行成像分析。分别使用Incell2000成像读板仪中的DAPI滤镜组和TRITC滤镜组使Hoechst细胞核染色和LysoTracker染色可视化。

[0082] 测量 $\beta$ -氨基己糖苷酶(HEXB)的释放-将成纤维细胞在37 $^{\circ}$ C下在24-孔板中以30,000细胞/孔在0.4ml培养基中培养1天。用检定缓冲液(DMEM,具有2mM D-甘露糖6-磷酸钠盐)洗涤两次之后,将具有0.4ml/孔检定缓冲液的细胞在37 $^{\circ}$ C下与0.2ml/孔检定缓冲液中的化合物一起孵育。在5、10、20、30和40分钟的时间点,将来自24-孔板中每个孔的30 $\mu$ l检定缓冲液等分到96孔黑板中。弃去24-孔板中剩余的检定缓冲液,然后加入0.6ml dH<sub>2</sub>O中的1% Triton-X100,以使细胞溶解。在37 $^{\circ}$ C下孵育30分钟之后,将6 $\mu$ l/孔细胞溶解液加入到具有24 $\mu$ l检定缓冲液的96-孔板中,然后加入90 $\mu$ l/孔pH 4.5的25mM柠檬酸缓冲液中的2.25mM HEXB底物、4-甲基伞形酮基(4-methylumbelliferyl) N-乙酰基- $\beta$ -D-氨基葡萄糖(Sigma-Aldrich, #M2133)。然后,在37 $^{\circ}$ C下孵育1小时,并加入100 $\mu$ l/孔停止液(1M甘氨酸和1M NaOH, pH 10.5)之后,在Tecan荧光读标仪( $Ex=365\pm 20nm$ , $Em=460\pm 20nm$ )中对96-孔板进行测量。

[0083] 细胞内和溶酶体Ca<sup>2+</sup>测量-如之前所述,使用Fluo-8染料试剂盒(ATT Bioquest, Sunnyvale, CA)通过荧光法测量细胞内胞质Ca<sup>2+</sup>浓度。简言之,将成纤维细胞在透明底的黑384-孔板中在20 $\mu$ l培养基中以2500细胞/孔在37 $^{\circ}$ C下培养24小时。将钙染料混合物以20 $\mu$ l/孔加入,在37 $^{\circ}$ C下孵育30分钟,然后在RT下孵育30分钟。然后将板置于荧光动力读板仪( $\mu$ Cell, Hamamatsu, Hamamatsu City, Japan)中。在1Hz下记录基线荧光强度10次,记录10秒钟,然后以20 $\mu$ l/孔将化合物加至仪器内部,然后在1Hz下额外地读取5分钟。将结果依比例归一化至平均基线荧光强度,并取峰值响应(Max.)用于结果计算。与胞质Ca<sup>2+</sup>类似,对Gly-Phe $\beta$ -萘基酰胺(GPN)诱导的溶酶体Ca<sup>2+</sup>进行测量,不同之处在于,在测量释放溶酶体Ca<sup>2+</sup>的基线荧光强度之后,加入200nM GPN代替 $\delta$ -T或 $\alpha$ -T。

[0084] 电子显微镜-将成纤维细胞以150,000细胞/孔在5ml培养基中接种在6-孔板中,并在存在或不存在化合物的情况下培养1天。将细胞在室温下在pH 7.2的2%戊二醛、0.1M二甲砷酸盐(cacodylate)缓冲液中固定1小时,然后在4 $^{\circ}$ C下储存,直至进行TEM分析。将细胞在相同缓冲液中的1%四氧化锇中后固定1小时,并用pH 4.2的0.1M醋酸盐缓冲液中0.5%醋酸双氧铀进行en bloc染色。然后将细胞在梯度乙醇溶液(35%、50%、70%、95%和100%)中脱水,并在环氧树脂(Poly/Bed812, Polysciences)中浸润过夜。加入新鲜的纯树脂之后,将细胞板在55 $^{\circ}$ C下固化72小时。去除聚苯乙烯板之后,选取合适的用于薄切片的区域,用珠宝锯切出,并粘在空的树脂桩(resin stubs)上。在超微切片机(Leica EM UC6)上

切出大约70nm的薄切片,并安装在裸铜网上。对薄切片进行双染色(醋酸双氧铀和醋酸铅),在Hitachi H-7650透射电子显微镜上观察,并使用AMT CCD照像机取图像。

[0085] 在各实施方式中,本发明提供如上所述的方法,其进一步包括施用额外的治疗剂的步骤。

[0086] 在某些实施方式中,额外的治疗剂是维生素。

[0087] 在进一步的实施方式中,额外的治疗剂是维生素E。

[0088] 在其他实施方式中,本发明提供如上所述的方法,其中施用环糊精的步骤包括口服、局部、肠胃外、静脉内或肌内施用化合物。

[0089] 在某些实施方式中,本发明提供的方法包括施用有效量的化合物和药学适当的赋形剂的步骤。

[0090] 在某些实施方式中,本发明提供如上所述的方法,其中受试者是人。

[0091] 在各实施方式中,施用环糊精的步骤包括以单一剂量或每天大约0.01 $\mu$ g/Kg/天至100mg/Kg/天的剂量将化合物施用于受试者例如人。

[0092] 在另一方面,本发明提供一种治疗受试者中溶酶体贮积症的方法,其包括以下步骤:对受试者施用有效量的环糊精化合物或其药学可接受的盐、酯、溶剂化物或水合物以及额外的治疗剂。

[0093] 在某些实施方式中,额外的治疗剂是维生素。

[0094] 在进一步的实施方式中,额外的治疗剂是维生素E。

[0095] 在某些方面,本发明提供一种降低受试者中非胆固醇脂类的方法,该方法包括:对受试者施用环糊精化合物或其药学可接受的盐、酯、溶剂化物或水合物;以及检测脂类降低的量。

[0096] 在一实施方式中,受试者被识别为需要降低脂类。

[0097] 在另一方面,本发明提供一种药物组合物,其包括治疗有效量的本发明的化合物(任意本文所示的式)或其药学可接受的盐、溶剂化物或水合物,以及药学可接受的载体或赋形剂。

[0098] 在一实施方式中,药物组合物与维生素组合。在进一步的实施方式中,维生素是维生素E。

[0099] 在另一方面,本发明提供一种药物组合物,其包括环糊精化合物或其药学可接受的盐、酯、溶剂化物或水合物和维生素E以及药学可接受的载体或赋形剂。

[0100] 在一实施方式中,环糊精化合物是式(I)的化合物或其药学可接受的盐、酯、溶剂化物或水合物。

[0101] 在另一实施方式中,环糊精化合物是2-羟丙基- $\beta$ -环糊精(2HP $\beta$ CD)、羟丙基- $\beta$ -环糊精(HP $\beta$ CD)、甲基- $\beta$ -环糊精(M $\beta$ CD)、 $\alpha$ -环糊精、 $\beta$ -环糊精或 $\gamma$ -环糊精或其药学可接受的盐、酯、溶剂化物或水合物。

[0102] 在另一方面,本发明提供一种治疗患有溶酶体贮积症的受试者的方法,其包括结合另一药剂使用如上所述的药物组合物。

[0103] 在其他方面,本发明提供一种试剂盒,其包括单位剂型的有效量的环糊精化合物或其药学可接受的盐、酯、溶剂化物或水合物,以及用于将化合物施用于患有溶酶体贮积症的受试者的说明书。

[0104] 在一实施方式中,环糊精化合物是式(I)的化合物或其药学可接受的盐、酯、溶剂化物或水合物。

[0105] 在另一实施方式中,环糊精化合物是2-羟丙基- $\beta$ -环糊精(2HPBCD)、羟丙基- $\beta$ -环糊精(HPBCD)、甲基- $\beta$ -环糊精(MBCD)、 $\alpha$ -环糊精、 $\beta$ -环糊精或 $\gamma$ -环糊精或其药学可接受的盐、酯、溶剂化物或水合物。

[0106] 在另一实施方式中,试剂盒还包括维生素E。

[0107] 在另一实施方式中,本发明提供如上所述的方法,其还包括合成或获得环糊精化合物的步骤。本发明的再另一实施方式是一种制造本文所述的任意化合物的方法,其使用任何本文所述的合成方式,或使用本领域普通技术人员已知的方法。

[0108] 在某些实施方式中,包括 $\alpha$ -、 $\beta$ -和 $\gamma$ -环糊精的环糊精在野生型和具有LSD(Wolman病)的细胞二者中均增加细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 和溶酶体胞吐。

[0109] 在各实施方式中,环糊精减少了6种具有LSD的细胞系中增大的溶酶体。

[0110] 在另一实施方式中,环糊精降低了具有Wolman病的细胞和其他细胞中的超微结构病理学变化。

[0111] 在某些实施方式中,环糊精与生育酚结合协同或附加地降低了NPC和Wolman病细胞中的胆固醇聚积。

[0112] 本发明的化合物的抑制量或剂量的范围可以是大约0.1mg/Kg至大约500mg/Kg,或者,大约1至大约50mg/Kg。抑制量或剂量也会取决于给药途径以及与其他药剂联用的可能性而变化。

[0113] 术语本发明的化合物的“抑制量”是指足以降低生物样品或受试者中病症的量。应理解,当将本发明的化合物的所述抑制量施用于受试者时,其处于适合于医师确定的任何医疗处理的适当的受益/风险比。如本文所用,术语“生物样品”是指生物来源的物质,其可以意在施用于受试者。生物样品的例子包括,但不限于,血液及其组分,例如血浆、血小板、血液细胞亚群等;器官,例如,肾、肝、心脏、肺等;精子和卵子;骨髓及其组分;或干细胞。

[0114] 如本文所指,短语“结合”或“联合”在指施用环糊精化合物和额外的治疗剂(与环糊精化合物不同)例如维生素E化合物时,是指一起提供环糊精和额外的治疗化合物的所有形式的施用,例如,其中两种化合物同时施用(例如,在单独的单一制剂中)或以任何顺序相继施用。例如,在适当的方面,对于相继施用,可以将环糊精化合物和额外的治疗剂分开配制,并在彼此的大约0.25、0.5、1、2、5、10、15、20、30、40、50或60分钟内施用。对于相继施用,优选地,可以将环糊精化合物和额外的治疗剂分开配制,并在彼此的大约30、20、10或5分钟内施用。

[0115] 在改善受试者的状态时,如果需要,可以施用维持剂量的本发明的化合物、组合物或组合。随后,当症状已经减轻至所需的水平时,给药的剂量或频率或二者可以随症状变化而降低至改善的状态得以保持的水平,治疗应当停止。但是,受试者在疾病症状有任何复发时可以要求长期的间歇性治疗。

[0116] 但是,应当理解到,本发明的化合物和组合物的总日剂量将由主治医生在合理的医学判断的范围内决定。任何特定患者具体的抑制剂量将取决于多种因素,其包括被治疗的病症和病症的严重程度;所用特定化合物的活性;所用的特定组合物;患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食;给药时间、给药途径和所用特定化合物的排泄率;治疗持续时

间;与所用特定化合物结合或巧合的药物;以及医学领域公知的类似因素。

[0117] 以单一或分开的剂量施用于受试者的本发明化合物的总日抑制剂量可以是以下的量:例如,0.01-50mg/Kg体重,或更通常为0.1-25mg/Kg体重。单一剂量组合物可以含有这样的量或其约数,以组成日剂量。在一实施方式中,根据本发明的治疗方案包括以单一或多剂量每天对需要该治疗的患者施用大约10mg至大约1000mg本发明的化合物。在另一实施方式中,治疗方案包括以单一或多剂量每天对需要该治疗的患者施用大约25mg至大约6000mg本发明的化合物。例如,可以将本发明的化合物以4000、4200、4400、4600、4800或5000mg的总日剂量一天两次施用于患者。

[0118] 优选的用于哺乳动物包括人的环糊精单一用量为0.1mg/Kg至8mg/Kg,更优选0.5mg/kG或1.0mg/Kg至2mg/Kg、3mg/Kg、4mg/Kg、5mg/Kg、6mg/Kg、7mg/Kg或84mg/Kg。用于哺乳动物包括人的一具体的优选单一用量为3mg/Kg。

[0119] 在环糊精化合物与维生素E化合物例如 $\delta$ -生育酚一起或联合给药的组合疗法中,对于环糊精化合物和维生素E化合物(例如 $\delta$ -生育酚)中的每一种,用于哺乳动物包括人的优选单一剂量可以是0.05-5mg/Kg,或优选0.05-1mg/Kg,对于环糊精化合物和维生素E化合物例如 $\delta$ -生育酚中的每一种,更优选为0.1mg/Kg至0.5mg/Kg、0.6mg/Kg或0.7mg/Kg,对于环糊精化合物和维生素E化合物例如 $\delta$ -生育酚中的每一种,再更优选为0.1mg/Kg至0.3mg/Kg或0.4mg/Kg。

[0120] 在本发明的实施方式中,用环糊精化合物和维生素E化合物(例如 $\delta$ -生育酚)的组合治疗溶酶体贮积症可以使用比单独使用环糊精化合物时更低剂量的环糊精化合物来实现治疗效果。在某些方面,环糊精化合物的施用量至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%或至少90%,与如果不使用维生素E化合物的情况下施用而实现治疗效果所需的环糊精化合物的量相比更少。

#### [0121] 生物数据

[0122] 表1(amplex红)源自NPC1患者的皮肤成纤维细胞在晚期核内体和溶酶体中表现出显著且可重现的胆固醇聚积,因此,提供了强壮的NPC1疾病的细胞模型。使用生化检定(Amplex红)表型筛选以测量未酯化的胆固醇; $\delta$ -生育酚(“ $\delta$ -T”或“Delta-T”)  $\delta$ -T被识别为以浓度依赖的方式大大降低细胞胆固醇聚积的主导化合物。我们进一步评价了单独的环糊精以及与 $\delta$ 生育酚结合的环糊精在其他溶酶体贮积症中的效果,我们发现, $\alpha$ -CD、 $\beta$ -CD和 $\gamma$ -CD可以降低胆固醇聚积,且MBCD是最有效之一。

[0123] 图2.(尼罗红)将细胞在 $\delta$ 生育酚、 $\alpha$ 生育酚和MBCD加上组合的存在下培养3天,然后用尼罗红对中性脂类进行染色。 $\delta$ 生育酚和MBCD处理降低了中性脂类的聚积,并且当组合使用时,其更为显著。 $\alpha$ 生育酚不那么有效。

[0124] 图3.(Hex检定)  $\delta$ -T在Wolman成纤维细胞中刺激溶酶体胞吐.已有报道,2-羟丙基- $\beta$ -环糊精促进依赖于钙的溶酶体胞吐,这为其在LSD成纤维细胞中的胆固醇降低效应提供了可能的机制。我们通过测定细胞外培养基中的溶酶体酶 $\beta$ -氨基己糖苷酶(HEXB)的活性对 $\delta$ -T处理过的Wolman成纤维细胞中的溶酶体胞吐进行了测量。我们发现,与媒介物处理的细胞相比较,用40 $\mu$ M $\delta$ -生育酚处理24小时之后的培养基中HEXB活性增加。这些结果表明, $\delta$ -T的药理学作用可以通过增加胞质Ca<sup>2+</sup>和增强溶酶体胞吐来介导。

[0125] 图4. (钙检定)  $\delta$ -T增加细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度并减轻NPC1细胞中的溶酶体钙缺乏。细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ ——重要第二信使的浓度增加触发许多种细胞反应,包括溶酶体胞吐。在NPC1成纤维细胞中,存在有钙稳态的调节异常,如通过溶酶体 $\text{Ca}^{2+}$ 缺乏所证实。已有报道,补偿溶酶体 $\text{Ca}^{2+}$ 损失的处理(例如,姜黄素)降低NPC1细胞中的胆固醇贮积。为了探讨 $\delta$ -T是否会类似地通过细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 的变化发挥其作用,我们在用 $\delta$ -T处理之后对NPC1和Wolman细胞二者中的胞质钙水平进行了测量。我们发现, $\delta$ -T在NPC1和Wolman成纤维细胞中以及在对照成纤维细胞中均刺激胞质 $\text{Ca}^{2+}$ 的瞬时增加。此外,细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 对 $\delta$ -T的反应不依赖于细胞外的 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度,这说明 $\text{Ca}^{2+}$ 响应于 $\delta$ -T自细胞内贮积位点例如ER释放。我们进一步考察了NPC1成纤维细胞中 $\delta$ -T对Gly-Phe $\beta$ -萘基酰胺(GPN)释放的溶酶体 $\text{Ca}^{2+}$ 的影响。与先前的报道一致,与对照细胞中相比较,NPC1细胞中溶酶体 $\text{Ca}^{2+}$ 得以降低。将NPC1成纤维细胞用 $40\mu\text{M}$  $\delta$ -T处理24小时显著增加了溶酶体 $\text{Ca}^{2+}$ 。

[0126] 图5. 基于NPC1和Wolman细胞二者的数据,我们假设 $\delta$ -T对细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 和溶酶体胞吐的药理学作用是消除溶酶体贮积的通用机制。为了测试该假设,我们测量了 $\delta$ -T在源自具有6种其他疾病的患者的成纤维细胞中降低通过LysoTracker染色测定的酸性/溶酶体区室(compartment)尺寸的能力。这些成纤维细胞中出现的溶酶体贮积由以下组成:在Batten(CLN2)中为蜡样质/脂褐质,在Fabry中为神经酰胺三己糖苷,在Farber中为神经酰胺,在NPA中为鞘磷脂,在B型Sanfilippo中为部分降解的硫酸乙酰肝素,在Tay-Sachs中为GM2神经节苷脂(表S1)。尽管未经处理的成纤维细胞表现出LysoTracker染色增加,表明溶酶体增大,但用 $40\mu\text{M}$  $\delta$ -T进行的处理在考察的所有6种成纤维细胞细胞系中均显著降低了LysoTracker染色。因此,最初在NPC1和Wolman细胞中证实的通过 $\delta$ -T改善溶酶体病理学可以推广到其他的溶酶体贮积症中。

[0127] 在NPC1和Wolman成纤维细胞中,混合脂类贮积表型导致溶酶体显著增大。因此,我们接下来确定了这些细胞中增大的溶酶体是否可以通过用 $\delta$ -T处理得以降低。使用对细胞内酸性区室进行染色的探针LysoTracker,以使NPC1细胞中增大的内溶酶体区室可视化。如所预计,我们在NPC1和Wolman成纤维细胞二者中均发现了LysoTracker染色增加。用 $40\mu\text{M}$  $\delta$ -T或 $300\mu\text{M}$  MBCD进行处理在两种类型的成纤维细胞中均显著降低了LysoTracker染色。

[0128] 图6. NPC1和Wolman成纤维细胞均具有明显的超微结构表型,这通过电子显微镜可见。通过 $\delta$ -T处理减少酸性细胞区室与通过超微结构病理学减轻证实的细胞内贮积降低是一致的。

[0129] 电子显微图像显示出充满以下的增大的溶酶体:在NPC1细胞中为层状膜和稠密的嗜钺材料,在Wolman细胞中为脂类微滴样和裂缝样溶酶体。用 $40\mu\text{M}$  $\delta$ -T进行的处理显著减少了两种细胞类型的溶酶体中特征性贮积材料。这些结果一起证实,在NPC1和Wolman细胞中, $\delta$ -T介导的胆固醇降低与疾病表型的减轻相关。

[0130] 我们已经发现, $\alpha$ -CD、 $\beta$ -CD和 $\gamma$ -CD可以降低NPC细胞中的胆固醇聚积。我们还发现,这些CD增加了细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ ,并提高了胞吐。胆固醇降低作用的排列顺序为MBCD> $\alpha$ -CD> $\gamma$ -CD。此外,我们使用电子显微镜分析发现,CD处理降低了NPC细胞超微结构中的病理学变化。我们还发现,CD降低了Wolman病的原代成纤维细胞中增大的溶酶体,该Wolman病是因溶酶体中酸性脂酶功能障碍造成的另一种表现出胆固醇酯聚积的溶酶体贮积症。电子显微镜数据显示,在Wolman细胞中,CD的效果比 $\delta$ -生育酚更为显著。

[0131] 我们还发现了CD和 $\delta$ -生育酚对于NPC细胞和其他6种溶酶体贮积症细胞(包括Wolman、A型尼曼匹克、Farber、Tay-Sachs、MSIIIB和CLN2(Batten)病)的协同作用。荧光标记的CD研究表明,CD迅速地进入细胞并从细胞中出来,表明是经由胞吐。我们还具有证实 $\alpha$ -CD、 $\beta$ -CD和 $\gamma$ -CD增强胞吐的数据。

[0132] 定义

[0133] 以下所列的是用于说明本发明的各种术语的定义。除非在具体的例子中或者单独地或作为较大基团的一部分加以限定,这些定义贯穿本说明书和权利要求均适用于其所用的术语。烃基取代基中的碳原子数可以通过前缀“C<sub>x</sub>-C<sub>y</sub>”表示,其中x是取代基中碳原子数的最小值,且y是最大值。类似地,C<sub>x</sub>链是指含有x个碳原子的烃基链。

[0134] 前缀“卤代”是指与前缀连接的取代基被一个或多个独立地选择的卤素基团取代。例如,“C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>卤代烷基”是指其中至少一个氢基团被卤素基团取代的C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基取代基。

[0135] 如果所描述结构中的连接元素是“不存在”或“键”,则所描述结构中左边的元素与所描述结构中右边的元素直接连接。例如,如果化学结构描述为X-(L)<sub>n</sub>-Y,其中L不存在或n为0,则化学结构为X-Y。

[0136] 如本文所用,术语“烷基”是指直链或支链饱和烃基。例如,“C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基”含有1-8个碳原子。烷基的例子包括,但不限于,甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、新戊基、正己基、庚基、辛基等。

[0137] 如本文所用,术语“烯基”表示含有一个或多个双键的直链或支链烃基。例如,“C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基”含有2-8个碳原子。烯基包括,但不限于,例如,乙烯基、丙烯基、丁烯基、1-甲基-2-丁烯-1-基、庚烯基、辛烯基等。

[0138] 如本文所用,术语“炔基”表示含有一个或多个叁键的直链或支链烃基。例如,“C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基”含有2-8个碳原子。代表性的炔基包括,但不限于,例如,乙炔基、1-丙炔基、1-丁炔基、庚炔基、辛炔基等。

[0139] 术语“环烷基”表示源自单环或多环饱和碳环化合物的一价基团。环烷基的例子包括,但不限于,环丙基、环丁基、环戊基、环己基、二环[2.2.1]庚基和二环[2.2.2]辛基等。术语“碳环”或“碳环的”或“碳环基”是指含有0个杂原子环原子的饱和的(例如,“环烷基”)、部分饱和的(例如,“环烯基”或“环炔基”)或完全不饱和的(例如,“芳基”)环体系。碳环基可以是,不限于,单环,或者两个或多个稠环,或者桥环或螺环。碳环基可以含有,例如,3-10个环元素(即,C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>碳环基,例如C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>环烷基)。取代的碳环基可以具有顺式或反式几何结构。碳环基代表性的例子包括,但不限于,环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基、环戊烯基、环戊二烯基、环己二烯基、金刚烷基、十氢化萘基、八氢茛基、环己烯基、苯基、萘基、茛基、茛满基、1,2,3,4-四氢萘基、茛基、异茛基、二环癸基、蒽基、菲、苯并萘亚甲基(benzonaphthenyl)(也称作“萘基(phenalenyl)”)、萘烷基和降蒽烷基等。碳环基可以通过基团的任何可取代的碳原子与母体分子部分连接。

[0140] 术语“芳基”是指含有6-14个碳环原子的芳香族碳环基。芳基的非限定性例子包括苯基、萘基、蒽基和茛基等。芳基可以通过基团的任何可取代的碳原子与母体分子部分连接。

[0141] 术语“杂芳基”是指通常含有5-18个环原子的芳香族杂环基,其中至少一个环原子是杂原子。杂芳基可以是单环,或者是两个或多个稠环。五元杂芳基的非限定性例子包括

咪唑基;呋喃基;苯硫基(或噻吩基或硫代呋喃基);吡唑基;噁唑基;异噁唑基;噻唑基;1,2,3-,1,2,4-,1,2,5-和1,3,4-噁二唑基;和异噻唑基。六元杂芳基的非限定性例子包括吡啶基;吡嗪基;嘧啶基;哒嗪基;和1,3,5-,1,2,4-和1,2,3-三嗪基。6/5元稠环杂芳基的非限定性例子包括苯并噻吩基、异苯并噻吩基、苯并异噁唑基、苯并噁唑基、嘌呤基和邻氨基苯甲基(anthranylyl)。6/6-元稠环杂芳基的非限定性例子包括喹啉基;异喹啉基;和苯并噁嗪基(包括噌啉基和喹啉基)。

[0142] 术语“杂环烷基”是指非芳香族的3-、4-、5-、6-或7-元环或二环或三环基稠合体系,其中环原子中的至少一个是杂原子,并且其中(i)每个五元环具有0-1个双键,每个六元环具有0-2个双键,(ii)氮和硫杂原子可以任选地被氧化,(iii)氮杂原子可以任选地季铵化(quaternized),并且(iv)任何上述的环均可以与苯环稠合。代表性的杂环烷基包括,但不限于,[1,3]二氧戊环、吡咯烷基、吡唑啉基、吡唑烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、哌啶基、哌嗪基、噁唑烷基、异噁唑烷基、吗啉基、噻唑烷基、异噻唑烷基和四氢呋喃基等。

[0143] 术语“杂环的”或“杂环”或“杂环基”是指饱和的(例如,“杂环烷基”)、部分不饱和的(例如,“杂环烯基”或“杂环炔基”)或完全不饱和的(例如,“杂芳基”)环体系,其中环原子中的至少一个是杂原子(即,氮、氧或硫),其余的环原子独立地选自碳、氮、氧和硫。杂环基可以经由该基团中任何可取代的碳或氮原子与母体分子部分连接,其条件是产生稳定的分子。杂环基可以是,但不限于,单环。单环杂环基的非限定性例子包括呋喃基、二氢呋喃基、吡咯基、异吡咯基、吡咯啉基、吡咯烷基、咪唑基、异咪唑基、咪唑啉基、咪唑烷基、吡唑基、吡唑啉基、吡唑烷基、三唑基、四唑基、二硫杂环戊烷基(dithiolyl)、氧硫杂环戊烷基(oxathiolyl)、噁唑基、异噁唑基、噻唑基、异噻唑基、噻唑啉基、异噻唑啉基、噻唑烷基、异噻唑烷基、噻二唑基、噁噻唑基(oxathiazolyl)、噁二唑基、吡喃基、二氢吡喃基、吡啶基、哌啶基、哌嗪基、嘧啶基、吡嗪基、哌嗪基、三嗪基、异噁嗪基、噁唑烷基、异噁唑烷基、噁噻嗪基、噁二嗪基、吗啉基、氮杂苄基(azepinyl)、氧杂苄基(oxepinyl)、硫杂苄基(thiepinyl)或二氮杂苄基(diazepinyl)。杂环基还可以包括,不限于,两个或更多个稠合在一起的环,例如,如萘啶基、噻唑并嘧啶基、噻吩并嘧啶基、嘧啶并嘧啶基或吡啶并嘧啶基。杂环基可以包括一个或更多个硫原子作为环成员;在一些情形中,硫原子可以氧化成SO或SO<sub>2</sub>。杂环基中的氮杂原子可以或可以不被季铵化,可以或可以不氧化成N-氧化物。此外,氮杂原子可以或可以不被N-保护。

[0144] 如本文所用,术语“任选取代的”、“任选取代的烷基”、“任选取代的烯基”、“任选取代的炔基”、“任选取代的碳环”、“任选取代的芳基”、“任选取代的杂芳基”、“任选取代的杂环”和任何其他任选取代的基团是指未取代的或者通过将其上的一个、两个、或三个或更多个氢原子用典型的取代基独立地取代的基团,上述取代基包括,但不限于:

[0145] -烷基、-烯基、-炔基、-芳基、-芳基烷基、-杂芳基、-杂芳基烷基、-杂环烷基、-环烷基、-碳环基、-杂环基,

[0146] -F、-Cl、-Br、-I,

[0147] -OH、被保护的羟基、烷氧基、氧代、硫代氧代,

[0148] -NO<sub>2</sub>、-CN、CF<sub>3</sub>、N<sub>3</sub>,

[0149] -NH<sub>2</sub>、被保护的氨基、-NH烷基、-NH烯基、-NH炔基、-NH环烷基、-NH-芳基、-NH-杂芳基、-NH-杂环基、-二烷基氨基、-二芳基氨基、-二杂芳基氨基,

- [0150] -O-烷基、-O-烯基、-O-炔基、-O-环烷基、-O-芳基、-O-杂芳基、-O-杂环基，
- [0151] -C(O)-烷基、-C(O)-烯基、-C(O)-炔基、-C(O)-环烷基、-C(O)-芳基、-C(O)-杂芳基、-C(O)-杂环烷基，
- [0152] -CONH<sub>2</sub>、-CONH-烷基、-CONH-烯基、-CONH-炔基、-CONH-环烷基、-CONH-芳基、-CONH-杂芳基、-CONH-杂环烷基，
- [0153] -OCO<sub>2</sub>-烷基、-OCO<sub>2</sub>-烯基、-OCO<sub>2</sub>-炔基、-OCO<sub>2</sub>-环烷基、-OCO<sub>2</sub>-芳基、-OCO<sub>2</sub>-杂芳基、-OCO<sub>2</sub>-杂环烷基、-OCONH<sub>2</sub>、-OCONH-烷基、-OCONH-烯基、-OCONH-炔基、-OCONH-环烷基、-OCONH-芳基、-OCONH-杂芳基、-OCONH-杂环烷基，
- [0154] -NHC(O)-烷基、-NHC(O)-烯基、-NHC(O)-炔基、-NHC(O)-环烷基、-NHC(O)-芳基、-NHC(O)-杂芳基、-NHC(O)-杂环烷基、-NHC(O)NH<sub>2</sub>、-NHC(O)NH-烷基、-NHC(O)NH-烯基、-NHC(O)NH-炔基、-NHC(O)NH-环烷基、-NHC(O)NH-芳基、-NHC(O)NH-杂芳基、-NHC(O)NH-杂环烷基、NHC(S)NH<sub>2</sub>、-NHC(S)NH-烷基、-NHC(S)NH-烯基、-NHC(S)NH-炔基、-NHC(S)NH-环烷基、-NHC(S)NH-芳基、-NHC(S)NH-杂芳基、-NHC(S)NH-杂环烷基、-NHC(NH)NH<sub>2</sub>、-NHC(NH)NH-烷基、-NHC(NH)NH-烯基、-NHC(NH)NH-炔基、-NHC(NH)NH-环烷基、-NHC(NH)NH-芳基、-NHC(NH)NH-杂芳基、-NHC(NH)NH-杂环烷基、-NHC(NH)-烷基、-NHC(NH)-烯基、-NHC(NH)-炔基、-NHC(NH)-环烷基、-NHC(NH)-芳基、-NHC(NH)-杂芳基、-NHC(NH)-杂环烷基，
- [0155] -C(NH)NH-烷基、-C(NH)NH-烯基、-C(NH)NH-炔基、-C(NH)NH-环烷基、-C(NH)NH-芳基、-C(NH)NH-杂芳基、-C(NH)NH-杂环烷基，
- [0156] -S(O)-烷基、-S(O)-烯基、-S(O)-炔基、-S(O)-环烷基、-S(O)-芳基、-S(O)-杂芳基、-S(O)-杂环烷基-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-SO<sub>2</sub>NH-烷基、-SO<sub>2</sub>NH-烯基、-SO<sub>2</sub>NH-炔基、-SO<sub>2</sub>NH-环烷基、-SO<sub>2</sub>NH-芳基、-SO<sub>2</sub>NH-杂芳基、-SO<sub>2</sub>NH-杂环烷基，
- [0157] -NHSO<sub>2</sub>-烷基、-NHSO<sub>2</sub>-烯基、-NHSO<sub>2</sub>-炔基、-NHSO<sub>2</sub>-环烷基、-NHSO<sub>2</sub>-芳基、-NHSO<sub>2</sub>-杂芳基、-NHSO<sub>2</sub>-杂环烷基，
- [0158] -CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、聚烷氧基烷基、聚烷氧基、-甲氧基甲氧基、-甲氧基乙氧基、-SH、-S-烷基、-S-烯基、-S-炔基、-S-环烷基、-S-芳基、-S-杂芳基、-S-杂环烷基或甲基硫代甲基。
- [0159] 应理解到，芳基、杂芳基、碳环、杂环、烷基等可以进一步被取代。
- [0160] 如本文所用，术语“卤代”和“卤素”是指选自氟、氯、溴和碘的原子。
- [0161] 如本文所用，术语“受试者”是指哺乳动物。因此，受试者是指，例如，犬、猫、马、牛、猪、豚鼠等。优选地，受试者是人。当受试者是人时，受试者可以是患者或健康的人。
- [0162] 术语“非胆固醇脂类”意在指任何不是胆固醇的脂类，例如，大分子。示例性的非胆固醇脂类包括，但不限于，脂色素、神经酰胺三己糖苷、神经酰胺、鞘磷脂、硫酸乙酰肝素、部分降解的硫酸乙酰肝素、GM2神经节苷脂、甘油三酯和胆固醇酯及其衍生物。“非胆固醇主要脂类”意在指不是胆固醇的脂类，其以大于胆固醇的量存在，使其成为非胆固醇主要脂类。
- [0163] 如本文所用，术语“离去基团”或“LG”是指任何在涉及该基团的化学反应过程中离去的基团，其包括但不限于，例如，卤素、对溴苯磺酸酯、甲磺酸酯、对甲苯磺酸酯、三氟甲磺酸酯、对硝基苯甲酸酯、磷酸酯基团。
- [0164] 如本文所用，“被保护的羟基”是指用上文定义的羟基保护基保护的羟基，该保护

基包括,例如,苯甲酰基、乙酰基、三甲基甲硅烷基、三乙基甲硅烷基、甲氧基甲基。

[0165] 如本文所用,术语“羟基保护基”是指在本领域中已知的在合成过程中保护羟基不受不希望的反应影响的不稳定化学部分。在所述合成过程之后,可以选择性地去除本文所述的羟基保护基。已知的羟基保护基概括地描述于T.H.Greene和P.G.M.Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第三版, John Wiley&Sons, New York (1999)。羟基保护基的例子包括苄氧基羰基、4-硝基苄氧基羰基、4-溴苄氧基羰基、4-甲氧基苄氧基羰基、甲氧基羰基、叔丁氧基羰基、异丙氧基羰基、二苯基甲氧基羰基、2,2,2-三氯乙氧基羰基、2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基羰基、2-糠基氧基羰基、烯丙氧基羰基、乙酰基、甲酰基、氯乙酰基、三氟乙酰基、甲氧基乙酰基、苯氧基乙酰基、苯甲酰基、甲基、叔丁基、2,2,2-三氯乙基、2-三甲基甲硅烷基乙基、1,1-二甲基-2-丙烯基、3-甲基-3-丁烯基、烯丙基、苄基、对甲氧基苄基二苯基甲基、三苯基甲基(三苯甲基)、四氢呋喃基、甲氧基甲基、甲基硫代甲基、苄氧基甲基、2,2,2-三氯乙氧基甲基、2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基甲基、甲磺酰基、对甲苯磺酰基、三甲基甲硅烷基、三乙基甲硅烷基、三异丙基甲硅烷基等。本发明优选的羟基保护基是乙酰基(Ac或-C(O)CH<sub>3</sub>)、苯甲酰基(Bz或-C(O)C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)和三甲基甲硅烷基(TMS或-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)。

[0166] 如本文所用,术语“氨基保护基”是指在本领域中已知的在合成过程中保护氨基不受不希望的反应影响的不稳定化学部分。在所述合成过程之后,可以选择性地去除本文所述的氨基保护基。已知的氨基保护基概括地描述于T.H.Greene和P.G.M.Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第三版, John Wiley&Sons, New York (1999)。氨基保护基的例子包括,但不限于,叔丁氧基羰基、9-苄基甲氧基羰基、苄氧基羰基等。

[0167] 如本文所用,术语“被保护的氨基”是指用上文定义的氨基保护基保护的氨基。

[0168] 术语“烷基氨基”是指具有结构-N(R<sub>a</sub>R<sub>b</sub>)的基团,其中R<sub>a</sub>和R<sub>b</sub>独立地为H或烷基。

[0169] 如本文所用,术语“药学可接受的盐”是指通过本发明的方法形成的化合物的那些盐,其在合理的医学判断范围内适合用于在没有过度的毒性、刺激性、过敏反应等的情况下与人和低级动物的组织接触,并且与合理的收益/风险比相称。药学可接受的盐是本领域公知的。例如,S.M.Berge等人在 *J. Pharmaceutical Sciences*, 66:1-19 (1977) 中详细描述了药学可接受的盐。盐可以在本发明化合物的最终分离和纯化过程中原位制备,或者可以分开地通过使游离碱官能团与合适的有机酸反应制备。药学可接受的盐的例子包括,但不限于,无毒的酸加成盐,或者氨基与无机酸例如盐酸、氢溴酸、磷酸、硫酸、和高氯酸形成的盐,或与有机酸例如乙酸、马来酸、酒石酸、柠檬酸、琥珀酸或丙二酸形成的盐,或通过使用本领域使用的其他方法例如离子交换形成的盐。其他的药学可接受的盐包括,但不限于,己二酸盐、藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、双葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、甲酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、葡糖酸盐、半硫酸盐(hemisulfate)、庚酸盐、己酸盐、氢碘化物、2-羟基-乙磺酸盐、乳糖醛酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐(pectinate)、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、三甲基乙酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、对甲苯磺酸盐、十一烷酸盐、戊酸盐等。代表性的碱金属或碱土金属盐包括钠、锂、钾、钙或镁盐等。当合适时,其他的药学可接受的盐包括无毒的铵、季铵和胺阳离子,其使用例如卤化物、氢氧化物、羧酸盐、硫酸

盐、磷酸盐、硝酸盐、具有1-6个碳原子的烷基、磺酸盐和芳基磺酸盐的抗衡离子形成。

[0170] 如本文所用,术语“药学可接受的酯”是指通过本发明的方法形成的化合物的酯,其在体内水解,且包括在人体内很容易分解成母体化合物或其盐的那些酯。合适的酯基团包括,例如,衍生自药学可接受的脂肪族羧酸特别是链烷酸、链烯酸、环烷酸和链烷二酸的那些酯基团,其中每个烷基或烯基部分有利地具有不多于6个碳原子。具体的酯的例子包括,但不限于,甲酸酯、乙酸酯、丙酸酯、丁酸酯、丙烯酸酯和乙基琥珀酸酯。

[0171] 如本文所用,术语“药学可接受的前药”是指通过本发明的方法形成的化合物的那些前药,其在合理的医学判断范围内适合用于在没有过度的毒性、刺激性、过敏反应等的情况下与人和低级动物的组织接触,与合理的收益/风险比相称,并且对于其既定的用途是有效的,以及本发明的化合物的可能的两性离子形式。如本文所用,“前药”是指可在体内通过代谢方式(例如,通过水解)转化以得到任何本发明的式所示化合物的化合物。各种形式的前药是本领域已知的,例如,如以下文献中所讨论:Bundgaard, (ed.), *Design of Prodrugs*, Elsevier (1985); Widder等人(ed.), *Methods in Enzymology*, vol.4, Academic Press (1985); Krogsgaard-Larsen等人, (ed.) “*Design and Application of Prodrugs, Textbook of Drug Design and Development*, Chapter 5, 113-191 (1991); Bundgaard等人, *Journal of Drug Deliver Reviews*, 8:1-38 (1992); Bundgaard, *J. of Pharmaceutical Sciences*, 77:285 et seq. (1988); Higuchi和Stella (eds.) *Prodrugs as Novel Drug Delivery Systems*, American Chemical Society (1975); 和Bernard Testa & Joachim Mayer, “*Hydrolysis In Drug And Prodrug Metabolism: Chemistry, Biochemistry And Enzymology*,” John Wiley and Sons, Ltd. (2002)。

[0172] 本发明还包括还有本发明化合物的药学可接受的前药的药物组合物。例如,本发明的具有游离氨基、酰氨基、羟基或羧基的化合物可以转化成前药。前药包括如下的化合物:其中氨基酸残基或两个或更多个(例如,2、3或4个)氨基酸残基的多肽链通过酰胺或酯键与本发明化合物的游离氨基、羟基或羧基基团共价结合。氨基酸残基包括,但不限于,通常通过三个字母的符号表示的20种天然出现的氨基酸,而且还包括4-羟基脯氨酸、羟基赖氨酸、锁链素(demosine)、异锁链素、3-甲基组氨酸、正缬氨酸、 $\beta$ -丙氨酸、 $\gamma$ -氨基丁酸、瓜氨酸、同型半胱氨酸、高丝氨酸、鸟氨酸和甲硫氨酸。还可以包括其他类型的前药。例如,游离羧基可以衍生为酰胺或烷基酯。游离羟基可以使用包括但不限于半琥珀酸酯(hemisuccinates)、磷酸酯、二甲基氨基乙酸酯和磷酰氧基甲氧基羰基的基团衍生,如以下文献中所概括:*Advanced Drug Delivery Reviews*, 1996, 19, 1-15。另外包括羟基和氨基的氨基甲酸酯前药,其为羟基的碳酸酯前药、磺酸酯和硫酸酯。还包括将羟基衍生化为(酰氧基)甲基和(酰氧基)乙基醚,其中酰基可以是烷基酯,其任选地被包括但不限于醚、胺和碳酸官能团的基团取代,或者其中酰基是上述的氨基酸酯。这种类型的前药描述于 *J. Med. Chem.* 1996, 39, 10中。游离胺也可以衍生为酰胺、磺酰胺或膦酰胺(phosphonamides)。所有这些前药部分均可以合并有包括但不限于醚、胺和羧基官能团的基团。

[0173] 如本文所用,“溶剂化物”是指本发明的化合物与一种或更多种有机或无机溶剂分子的物理缔合。这种物理缔合常包括氢键。在某些情形中,溶剂化物能够分离,例如,当一种或更多种溶剂化物分子合并并在结晶固体的晶格中。

[0174] 本发明预计的取代基和变量的组合仅是导致形成稳定化合物的那些组合。如本文所用,术语“稳定”是指化合物具备足以允许制造的稳定性,并且在足够长的时间内保持化合物的完整性以可用于本文详述的目的(例如,治疗性或预防性地施用于受试者)。

#### [0175] 药物组合物

[0176] 本发明的药物组合物包括与一种或更多种药学可接受的载体一起配制的治疗有效量的本发明的化合物。如本文所用,术语“药学可接受的载体”是指任何类型的无毒的惰性固体、半固体或液体填料、稀释剂、包封材料或制剂辅料。可以将本发明的药物组合物以口服、直肠、肠胃外、池内、阴道内、腹膜内、局部(作为粉末、软膏或滴剂)、颊含或者作为口喷雾或鼻喷雾施用于人或其他动物。

[0177] 用于口服给药的液体剂型包括药学可接受的乳剂、微乳、溶液、混悬剂、糖浆剂和酞剂。除活性化合物以外,液体剂型还可以含有本领域常用的惰性稀释剂,例如,水、醇或其他溶剂、增溶剂和乳化剂,例如,乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苜醇、苯甲酸苜酯、丙二醇、1,3-丁二醇、聚山梨醇酯、二甲基甲酰胺、油(具体地,棉籽油、落花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、单-或二-甘油酯、甘油、四氢呋喃醇、聚乙二醇和脱水山梨糖醇的脂肪酸酯及其混合物。除惰性稀释剂以外,口服组合物还可以包括佐剂,例如润湿剂、乳化和助悬剂、抗氧化剂、甜味剂、调味剂和芳香剂。液体剂型还可以包封在明胶胶囊中,其中本发明的化合物可以溶解在药学可接受的载体中,该药学可接受的载体含有例如,一种或更多种增溶剂(例如,聚山梨醇酯80和单和二甘油酯)和其他合适的赋形剂(例如,抗氧化剂例如抗坏血酸棕榈酸酯,或甜味剂或调味剂)。

[0178] 可注射制剂,例如,无菌的可注射水性或油性混悬剂可以使用合适的分散剂或润湿剂和助悬剂根据已知技术配制。无菌的可注射制剂也可以是在无毒的肠胃外可接受稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液、混悬剂或乳剂,例如,1,3-丁二醇中的溶液。在可接受的媒介物和溶剂当中,可以使用的是水、林格溶液、U.S.P和等渗氯化钠溶液。此外,无菌的固定油常规用作溶剂或助悬介质。出于该目的,可以使用任何混合的固定油,包括合成的单-或二甘油酯。此外,可注射制剂中使用脂肪酸例如油酸。

[0179] 在某些优选的实施方式中,将本发明的组合物颅内给药,例如,注射到脑中,例如,通过直接注射到脑中。直接注射可以通过脑室内和大脑内途径进行。将组合物注射到脑中还可以使用用于给药的装置进行。由于环糊精和 $\delta$ -生育酚可以造成脑穿透和药物快速代谢的挑战,将药物直接施用于中枢神经系统可以通过使用硬膜外(注射或输注到硬膜外隙中)、大脑内(到大脑中)、脑室内(到脑室中)或鞘内(到脊椎管中)注射实现。Pathan等人(Recent Patents on Drug Delivery&Formulation 2009,3,71-89)描述了一些将组合物施用于脑的方法,在此将其全文并入作为参考。

[0180] 为了延长药物的作用,常常合意的是减缓药物从皮下或肌肉注射的吸收。通过使用水溶性差的结晶或无定形材料的液体混悬剂,可以实现这一点。药物的吸收速率则取决于其溶解速率,这进而可以取决于晶体尺寸和结晶形式。或者,肠胃外施用的药物形式的延迟吸收可以通过将药物溶解或混悬在油媒介物中实现。本发明还考虑了即时释放形式。

[0181] 用于直肠或阴道给药的组合物优选为栓剂,其可以通过将本发明的化合物与适当的非刺激性赋形剂或载体例如可可脂、聚乙二醇或栓剂蜡混合制备,上述赋形剂或载体在环境温度下是固体,但在体温下是液体,因此在直肠或阴道腔中融化,并释放出活性化合

物。

[0182] 类似类型的固体组合物也可以用作软填充和硬填充的明胶胶囊中的填料,其使用例如乳糖以及高分子量聚乙二醇等的赋形剂。

[0183] 活性化合物也可以是具有一种或更多种上述赋形剂的微胶囊形式。

[0184] 固体剂型片剂、糖衣丸、胶囊、丸剂和颗粒剂可以制备有包衣和壳例如肠溶衣、控释包衣和药物制剂领域公知的其他包衣。在这样的固体剂型中,活性化合物可以与至少一种惰性稀释剂例如蔗糖、乳糖或淀粉混合。作为通常的作法,这样的剂型还可以包括惰性稀释剂以外的额外的物质,例如,压片润滑剂和其他压片助剂例如硬脂酸镁和微晶纤维素。在胶囊、片剂和丸剂的情形中,剂型还可以包括缓冲剂。

[0185] 优选地,将本发明的化合物配制在固体分散体中,其中化合物可以在分子水平上分散在包括药学可接受的亲水性聚合物的基质中。基质还可以含有药学可接受的表面活性剂。适用于配制本发明化合物的固体分散技术包括,但不限于,熔体挤出、喷雾干燥或溶剂蒸发。

[0186] 用于本发明化合物的局部或经皮给药的剂型包括软膏剂、糊剂、乳膏、洗剂、凝胶、粉末、溶液、喷雾剂、吸入剂或贴剂。将活性组分在无菌条件下与药学可接受的载体和如果需要的话任何所需的防腐剂或缓冲剂混合。眼科制剂、滴耳剂、眼膏、粉末和溶液也考虑在本发明的范围内。

[0187] 除本发明的活性化合物以外,软膏、糊剂、乳膏和凝胶还可以含有赋形剂,例如动物和植物脂肪、油、蜡、石蜡、淀粉、黄芪胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅酮、膨润土、硅酸、滑石和氧化锌或其混合物。

[0188] 除本发明的化合物以外,粉末和喷雾剂还可以含有赋形剂,例如乳糖、滑石、硅酸、氢氧化铝、硅酸钙和聚酰胺粉末或这些物质的混合物。喷雾剂可以额外地含有常用的推进剂,例如氯氟烃。

[0189] 透皮贴剂具有向身体提供化合物受控输送的附加优势。这种剂型可以通过将化合物溶解或分散在合适的介质中制造。也可以使用吸收促进剂增加化合物穿过皮肤的通量。通过提供控速膜,或者通过将化合物分散在聚合物基质或凝胶中,可以对速率进行控制。

[0190] 本文所述的化合物含有一个或更多个不对称中心,因此产生对映异构体、非对映异构体和其他立体异构形式,其可以就绝对立体化学而言定义成(R)-或(S)-,或者对于氨基酸定义成(D)-或(L)-。本发明意在包括所有这些可能的异构体,以及其外消旋或光学纯的形式。通过上述的方法可以由其各自的光学活性前体制备光学异构体,或者通过对外消旋混合物进行拆分来制备。拆分可以在拆分剂的存在下通过色谱或通过重复结晶或通过本领域技术人员已知的这些技术的一些组合进行。有关拆分进一步的细节可见于Jacques等人,Enantiomers, Racemates, and Resolutions (John Wiley&Sons, 1981)。当本文所述的化合物含有烯属双键或其他几何不对称中心时,除非另外说明,化合物意在包括E和Z两种几何异构体。类似地,所有的互变异构形式也均要包括在内。在本文中出现的任何碳-碳双键的构象均仅出于便利而选择,其并无意于指定特定的构象,除非上下文如此说明;因此,在本文中任意描述成反式的碳-碳双键可以是顺式、反式或二者任何比例的混合物。

[0191] 合成的化合物可以从反应混合物中分离,并通过例如柱层析、高压液相色谱或重结晶的方法进一步纯化。如本领域技术人员可以认识到,更多合成本文的式的化合物的方

法对本领域普通技术人员来说将是明显的。此外,可以以另外可选的顺序或秩序进行各种合成步骤,得到所需的化合物。此外,本文所述的溶剂、温度、反应时间等仅仅是出于示例说明的目的,本领域普通技术人员将会认识到,反应条件的变化可以产生所需的本发明的桥连大环产物。用于合成本文所述化合物的合成化学转化和保护基方法学(保护和脱保护)是本领域已知的,其包括,例如,描述于R.Larock,Comprehensive Organic Transformations,VCH Publishers (1989);T.W.Greene和P.G.M.Wuts,Protective Groups in Organic Synthesis,2d.Ed.,John Wiley and Sons (1991);L.Fieser和M.Fieser,Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis,John Wiley and Sons (1994);和L.Paquette,ed.,Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis,John Wiley and Sons (1995) 及其随后的版本。

[0192] 本发明的化合物可以通过经由本文所述的任何合成手段加上各种官能团加以修饰,以提高选择性生物特性。这些修饰是本领域已知的,包括以下的修饰,其增加进入到给定生物系统(例如,血液、淋巴系统、中枢神经系统)中的生物渗透,增加口服利用度,增加溶解性以使得可以通过注射给药,改变代谢和改变排泄速率。

[0193] 本文中变量的任何定义中一系列化学基团的详述包括作为任何单一基团或所列基团组合的变量的定义。本文中变量的实施方式的详述包括作为任何单一实施方式或者与任何其他实施方式或其一部分的组合的实施方式。

[0194] 实施例

[0195] 结合以下实施例将会更好地理解本发明的化合物和方法,这些实施例仅仅是要进行示例说明,而不是对本发明的范围加以限定。以下实施例可以根据上述的路线制备,或者根据下述的合成步骤制备。对所公开实施方式的各种变化和修饰将是本领域技术人员显而易见的,这些变化和修饰包括,但不限于,有关本发明的化学结构、取代基、衍生物、制剂和/或方法的变化和修饰,其可以在不偏离本发明的精神和所附权利要求的范围的情况下进行。

[0196] 本文的化学结构含有某些-NH-、-NH<sub>2</sub>(氨基)和-OH(羟基),其中对应的氢原子可以不明确出现;但其应根据具体情况理解成-NH-、-NH<sub>2</sub>或-OH。

[0197] 实施例1:δ-生育酚和环糊精处理降低溶酶体贮积症细胞的溶酶体中的脂类聚积

[0198] 对于甲基-β-环糊精对源自Wolman病患者的成纤维细胞系中脂类聚积的作用进行了考察。将Wolman成纤维细胞用δ-生育酚、α-生育酚、甲基-β-环糊精或者δ-生育酚和甲基-β-环糊精的组合或者α-生育酚和甲基-β-环糊精的组合加以处理。然后使用Amplex-红胆固醇氧化酶检定(Invitrogen)根据制造商说明书测量总胆固醇和游离胆固醇。如在图1A-1C(总胆固醇)和图1D-1F(游离胆固醇)中显示,用δ-生育酚、甲基-β-环糊精或者δ-生育酚和甲基-β-环糊精的组合或者α-生育酚和甲基-β-环糊精的组合处理,导致Wolman成纤维细胞中的总胆固醇和游离胆固醇显著减少。为了进一步表征该处理对脂类聚积的作用,将处理过的成纤维细胞用尼罗红检定进行评价,以测量中性脂类聚积。简言之,将用各种药物处理过的细胞用选择性标记细胞内的脂类聚积的尼罗红进行染色。尼罗红染色通过荧光显微镜可视化。如图2所示,未经处理的Wolman成纤维细胞表现出中性脂类聚积的胞质小滴。这些中性脂类聚积在用δ-生育酚或甲基-β-环糊精处理时得以显著降低。有趣的是,α-生育酚处理未能表现出任何对中性脂类聚积的作用。

[0199]  $\delta$ -生育酚、 $\alpha$ -生育酚、甲基- $\beta$ -环糊精或者 $\delta$ -生育酚和甲基- $\beta$ -环糊精的组合或 $\alpha$ -生育酚和甲基- $\beta$ -环糊精的组合的处理对溶酶体胞吐的作用使用HEXB检定测定。简言之,通过用药物处理之后测量分泌到培养基中的溶酶体酶HEXB的水平,测定溶酶体胞吐的水平。如图3所示,如通过HEXB分泌所测定,用 $\alpha$ -生育酚、甲基- $\beta$ -环糊精或者 $\delta$ -生育酚和甲基- $\beta$ -环糊精的组合或 $\alpha$ -生育酚和甲基- $\beta$ -环糊精的组合处理导致溶酶体胞吐显著增加。用 $\delta$ -生育酚和甲基- $\beta$ -环糊精的组合处理的Wolman成纤维细胞中观察到的胞吐水平最高。

[0200] 为了进一步表征环糊精对源自溶酶体贮积症(Wolman、Tay-Sachs、Farber、Battern和Fabry)患者的成纤维细胞系中溶酶体功能的作用,测定了环糊精处理对溶酶体 $\text{Ca}^{2+}$ 释放的影响。将野生型和溶酶体贮积症成纤维细胞二者均用 $\delta$ -生育酚和甲基- $\beta$ -环糊精的组合或 $\alpha$ -生育酚和甲基- $\beta$ -环糊精的组合进行处理,并测量200nM Gly-Phe $\beta$ -萘基酰胺(GPN)刺激的溶酶体 $\text{Ca}^{2+}$ 释放的水平。如图4所示,与未经处理的野生型成纤维细胞相比较,未经处理的溶酶体贮积症成纤维细胞表现出 $\text{Ca}^{2+}$ 释放的降低。但是,将Wolman成纤维细胞、Tay-Sachs成纤维细胞、Farber成纤维细胞、Battern成纤维细胞和Fabry成纤维细胞用 $\delta$ -生育酚和甲基- $\beta$ -环糊精的组合或 $\alpha$ -生育酚和甲基- $\beta$ -环糊精的组合处理,使溶酶体 $\text{Ca}^{2+}$ 释放恢复至野生型成纤维细胞中观察到的水平。

[0201] 使用Lysotracker检定测定了各种环糊精、 $\delta$ -生育酚以及环糊精和 $\delta$ -生育酚的组合对野生型和溶酶体贮积症成纤维细胞(Wolman、Tay-Sachs、Fabry、Farber和MPSIIIB成纤维细胞)中脂类聚积和溶酶体尺寸的影响。简言之,将细胞用各种组合和浓度的药物进行处理,然后用在细胞内的酸性区室即溶酶体中聚积的嗜碱性荧光探针Lyso tracker染料进行染色。如图5A-5D所示,Lysotracker染色显示出与野生型细胞相比较,Wolman、Tay-Sachs、Fabry、Farber和MPSIIIB成纤维细胞中的溶酶体增大。用单独的 $\delta$ -生育酚或甲基- $\beta$ -环糊精处理降低了溶酶体聚积和溶酶体尺寸,但用单独的其他环糊精处理没有显著的作用。而且, $\delta$ -生育酚和甲基- $\beta$ -环糊精的组合导致了脂类聚积和溶酶体尺寸的显著降低。

[0202] 实施例2: $\delta$ -生育酚和环糊精处理导致溶酶体贮积症细胞的溶酶体中病理学超微结构变化的减轻。

[0203] 通过电子显微镜考察了 $\delta$ -生育酚和甲基- $\beta$ -环糊精对溶酶体贮积症细胞中溶酶体的超微结构病理学的影响。简言之,在将野生型和溶酶体贮积症成纤维细胞用 $\delta$ -生育酚、甲基- $\beta$ -环糊精或 $\delta$ -生育酚和甲基- $\beta$ -环糊精处理之后,将成纤维细胞固定并包埋。然后制备包埋细胞的薄切片,并通过电子显微镜对超微结构病理学进行考察。如图6所示,未经处理的Wolman成纤维细胞在溶酶体内具有层状嗜钺结构。此外,在溶酶体中细胞还具有典型的细长裂缝形状的脂滴。但是,通过用 $\delta$ -生育酚和/或甲基- $\beta$ -环糊精进行处理,这些异常结构得以显著降低。 $\delta$ -生育酚和/或甲基- $\beta$ -环糊精对其他溶酶体症成纤维细胞——Farber(图7、8和10);Tay-Sachs(图8);Fabry(图8);Wolman(图9);NPA(图9);Batten(图9);MSIIIB(图9)的超微结构病理学的影响通过电子显微镜加以分析。如图7-10所示,处理过的细胞呈现为典型的成纤维细胞(形状细长,细胞核发育较好,线粒体正常,肿胀光滑的和粗糙的ER),但是相当大量的核内体(endosomal)(特别是多囊体)和溶酶体区室填有脂滴和多层体。这些区室对于Farber来说是典型的,如之前所观察到。大多数细胞仅有小面积的这些结构,但一些细胞大量填充有这些结构。

[0204] 实施例3:在人NPC1成纤维细胞和神经干细胞(NPC-NSCs)中单独使用环糊精以及

与 $\delta$ -生育酚结合使用环糊精的作用

[0205] 在另一组实验中,在源自NPC1患者的皮肤成纤维细胞中,需要高浓度的HBPCD(以毫摩尔计)降低胆固醇聚积和增大的溶酶体(图11A)。但是,低浓度的 $50\mu\text{M}$  HBPCD与 $10\mu\text{M}$  $\delta$ -生育酚结合便达到与 $5\text{mM}$  HBPCD相同的效果。尽管 $160\mu\text{M}$  MBCD几乎完全逆转了NPC1细胞的表型,浓度小得多的 $20\mu\text{M}$  MBCD与 $10\mu\text{M}$  $\delta$ -生育酚结合便达到了较高浓度单独使用的MBCD达到的类似结果(图11B)。总之,数据表明,对于降低NPC1成纤维细胞中的胆固醇聚积和增大的溶酶体尺寸,MBCD比HBPCD更为有效(20倍以上)。与单独使用两种药物时相比较,与 $10\mu\text{M}$   $\delta$ -生育酚结合时,需要浓度小得多的HBPCD和MBCD。

[0206] 实施例4:在源自NPC1患者的神经细胞中单独使用环糊精以及与 $\delta$ -生育酚结合使用环糊精的作用

[0207] 由于NPC1病的大多数症状是在中枢神经系统内,人NPC1神经元细胞是更好的用于药物评价的NPC1疾病模型的代表。

[0208] 从NPC1皮肤成纤维细胞产生诱导的多能干细胞(IPSCs),并将其分化成神经干细胞(NPC1-NSCs)。在Amplex-红胆固醇检定中,在NPC1-NSCs中,HBPCD和MBCD的IC<sub>50</sub>值分别为 $12$ 和 $10\mu\text{M}$ ,而 $\delta$ -生育酚的IC<sub>50</sub>为 $18\mu\text{M}$ (图12)。在荧光显微镜实验中,HBPCD和MBCD对降低胆固醇聚积(非律平染色)和增大的溶酶体(Lysotracker染色)的作用也均优于 $\delta$ -生育酚(图12B)。总之,数据表明,HBPCD在人NPC1神经元细胞中比在NPC1皮肤成纤维细胞中有效得多,而 $\delta$ -生育酚在NPC1神经元细胞中的效力则比在NPC1成纤维细胞中更弱。

[0209] 实施例5:环糊精和 $\delta$ -生育酚的组合疗法在NPC1-NSCs中有效降低了各个化合物的浓度,并增加了降低胆固醇聚积和增大的溶酶体的作用

[0210] 在降低NPC1-NSCs中的胆固醇聚积和增大的溶酶体方面,浓度大为降低的 $50\mu\text{M}$  HBPCD与 $10\mu\text{M}$  $\delta$ -生育酚结合经测定实现了与单独使用的 $5\text{mM}$  HBPCD相同的效果(图13A)。类似地,在NPC1-NSCs中, $20\mu\text{M}$  MBCD与 $10\mu\text{M}$  $\delta$ -生育酚结合的效果与单独使用的 $160\mu\text{M}$  MBCD类似(图13B)。这些数据表明,在降低NPC1神经元细胞中的胆固醇聚积和增大的溶酶体方面,较低浓度的环糊精和 $\delta$ -生育酚的组合疗法可以实现与单独使用时高浓度的两种化合物类似的治疗效果。这种与低浓度 $\delta$ -生育酚组合治疗NPC1所需的HBPCD或MBCD浓度的降低对于患者的临床应用是十分重要的。

[0211] 取自使用人NPC1神经干细胞(NPSCs)进行的研究的剂量推荐如下:(1)通过Amplex-红胆固醇检定测量的HBPCD对于降低胆固醇聚积的IC<sub>50</sub>值为 $50\mu\text{M}$ , $\delta$ -生育酚的IC<sub>50</sub>为 $15\mu\text{M}$ 。因此,比例是3.3倍。(2)在组合疗法实验中, $50\mu\text{M}$  HBPCD+ $10\mu\text{M}$  $\delta$ -生育酚显著降低了胆固醇聚积,其与 $5\text{mM}$  HBPCD相当,而单独的 $50\mu\text{M}$  HBPCD或 $10\mu\text{M}$  $\delta$ -生育酚均未表现出显著的胆固醇降低作用。(3)HBPCD(MW=1380.25)和 $\delta$ -生育酚(MW=402.65)的分子量比是3.4倍。

[0212] 假定小鼠体重 $25\text{g}$ ,其中脑:身体比例为1:40,假设HBPCD和 $\delta$ -生育酚在通过脑室内注射或鞘内注射进行直接的中枢神经体统注射之后得以完全分布,对于哺乳动物包括人,优选的环糊精单独使用的剂量为 $0.1\text{mg/Kg}$ 至 $8\text{mg/Kg}$ ,更优选 $0.5\text{mg/kG}$ 或 $1.0\text{mg/Kg}$ 至 $2\text{mg/Kg}$ 、 $3\text{mg/Kg}$ 、 $4\text{mg/Kg}$ 、 $5\text{mg/Kg}$ 、 $6\text{mg/Kg}$ 、 $7\text{mg/Kg}$ 或 $84\text{mg/Kg}$ 。一具体优选的用于哺乳动物包括人的环糊精单独使用的剂量为 $3\text{mg/Kg}$ 。在环糊精化合物与维生素E化合物例如 $\delta$ -生育酚一起给药或联合给药的组合疗法中,优选的用于哺乳动物包括人的环糊精化合物和维生素E化合物(例如 $\delta$ -生育酚)中每一种的单一剂量可以是 $0.05\text{--}1\text{mg/Kg}$ ,更优选环糊精化合物和维

生素E化合物(例如 $\delta$ -生育酚)中的每一种为0.1mg/Kg至0.5mg/Kg、0.6mg/Kg或0.7mg/Kg,再更优选环糊精化合物和维生素E化合物(例如 $\delta$ -生育酚)中每一种为0.1mg/Kg至0.3mg/Kg或0.4mg/Kg。

[0213] 实施例6:单独使用环糊精和环糊精与 $\delta$ -生育酚组合疗法的效果

[0214] 已在具有9种类型溶酶体贮积症(包括NPC1(图14)、Batten、Farber、ML III(图15)、MLIV(图16)、MPS1(图17)、MPS VI(图18)、NPA和Wolman病)的源自患者的皮肤成纤维细胞中测定了单独使用环糊精以及环糊精与 $\delta$ -生育酚组合疗法的效果。已经发现,对于单独化合物的应用,对于降低这些细胞中增大的溶酶体尺寸的显著效果,需要8mM HBPCD或300 $\mu$ M MBCD。但是,在与10 $\mu$ M $\delta$ -生育酚组合时,500 $\mu$ M HBPCD或20 $\mu$ M MBCD便显著降低了这些细胞中增大的溶酶体。结果表明了环糊精与 $\delta$ -生育酚对于降低源自患有9种溶酶体贮积症的患者原代成纤维细胞中的增大的溶酶体的附加/协同作用。结果还表明,当其与 $\delta$ -生育酚组合使用时,环糊精的剂量可以降低10倍或更多。与 $\delta$ -生育酚组合的环糊精剂量的显著降低对于溶酶体贮积症的治疗较为重要,因为高剂量的环糊精在长期的治疗过程中可能导致更为严重的副作用(这些患者中的许多人可能会需要终生治疗)。

[0215] 此外,在LSD患者的治疗中,很难实现环糊精的高血浆和脑浓度。在与 $\delta$ -生育酚的组合疗法中所需的环糊精浓度降低10倍使得环糊精在LSD患者中的临床应用更为可行。而且, $\delta$ -生育酚很难溶解在水溶液中以便用于患者,其在组合疗法中可得以解决,因为环糊精可以促进 $\delta$ -生育酚溶解在溶液中。

[0216] 以下是表1,其显示了用于上述参考研究的细胞系。

[0217] 表1

疾病人名 名称	疾病命名	缩写	影响的 基因	蛋白质	聚积的脂类	基因型	Coriell 分 类#
	Batten 蜡样脂褐质贮 积症,神经元 2	CLN2	<i>TPP1</i>	三肽基肽酶 I	脂色素(脂褐质)	p.R127X, p.R208X	GM16485
	Fabry $\alpha$ -半乳糖苷酶 A 缺乏症		<i>GLA</i>	$\alpha$ -半乳糖苷酶 A	神经酰胺三己糖苷	p.W162X, rs2071397 rs2071228	GM00107
	Farber 脂肪肉芽肿病		<i>AC</i>	酸性神经酰胺酶(N- 酰基鞘氨醇酰胺水 解酶)	神经酰胺	p.Y36C, p.Y36C	GM20015
	尼曼-匹 克, C1 型	NPC1	<i>NPC1</i>	NPC1	未酯化的胆固醇	p.P237S, p.I1061T	GM03123
[0218]	尼曼-匹 克, C2 型	NPC2	<i>NPC2</i>	NPC2	未酯化的胆固醇	p.C93F, p.C93F	GM17910
	尼曼-匹 克, A 型	NPA	<i>ASM</i>	酸性鞘磷脂酶	鞘磷脂	p.L302P, p.L302P	GM16195
	Sanfilippo , B 型	MPS IIIB	<i>NAGLU</i>	N-乙酰基- $\alpha$ -D-氨基 葡萄糖苷酶	部分降解的硫酸乙 酰肝素	p.R297X, p.R643H	GM02552
	Tay-Sachs GM2 神经节苷 脂贮积症	TSD		$\beta$ 氨基己糖苷酶 A	GM2 神经节苷脂	c.1278insT ATC c.1278insT ATC	GM00221
	Wolman 溶酶体酸性脂 酶缺乏症		<i>LAL</i>	溶酶体酸性脂酶	胆固醇酯 & 甘油 三酯	未知	GM11851

[0219] 在此明确将本申请中引用的所有参考文献(包括文献参考文献、授权的专利、公开的专利申请、和共同未决的专利申请)的内容均全文并入作为参考。除非另外定义,本文使

用的所有科学和技术术语均符合本领域普通技术人员通常知晓的含义。

[0220] 本领域技术人员将会认识到或者仅使用常规实验能够确定出本文所述的本发明具体实施方式的许多等同方式。这些等同方式均包括在以下的权利要求中。

**总胆固醇（包括胆固醇酯和游离胆固醇）**

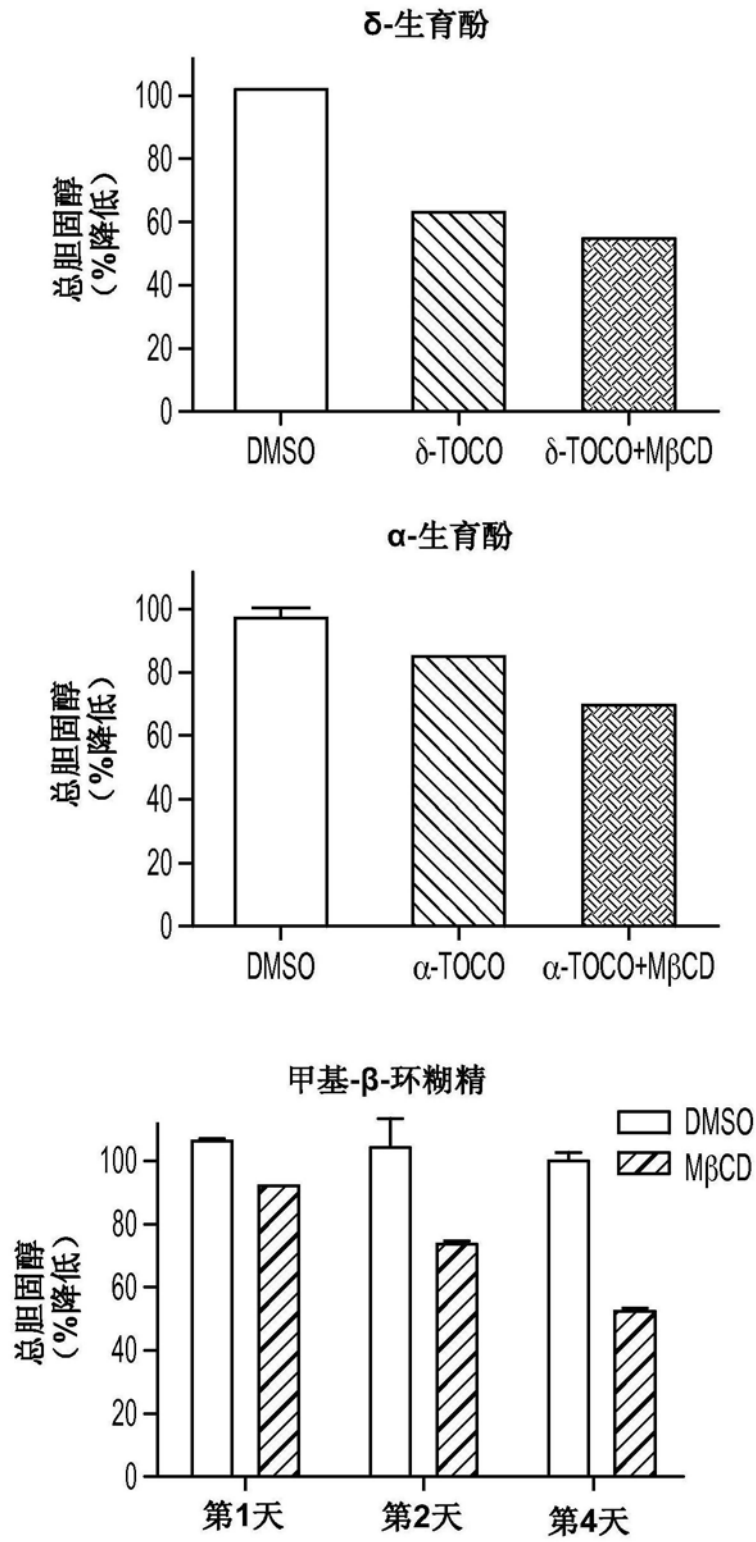


图1

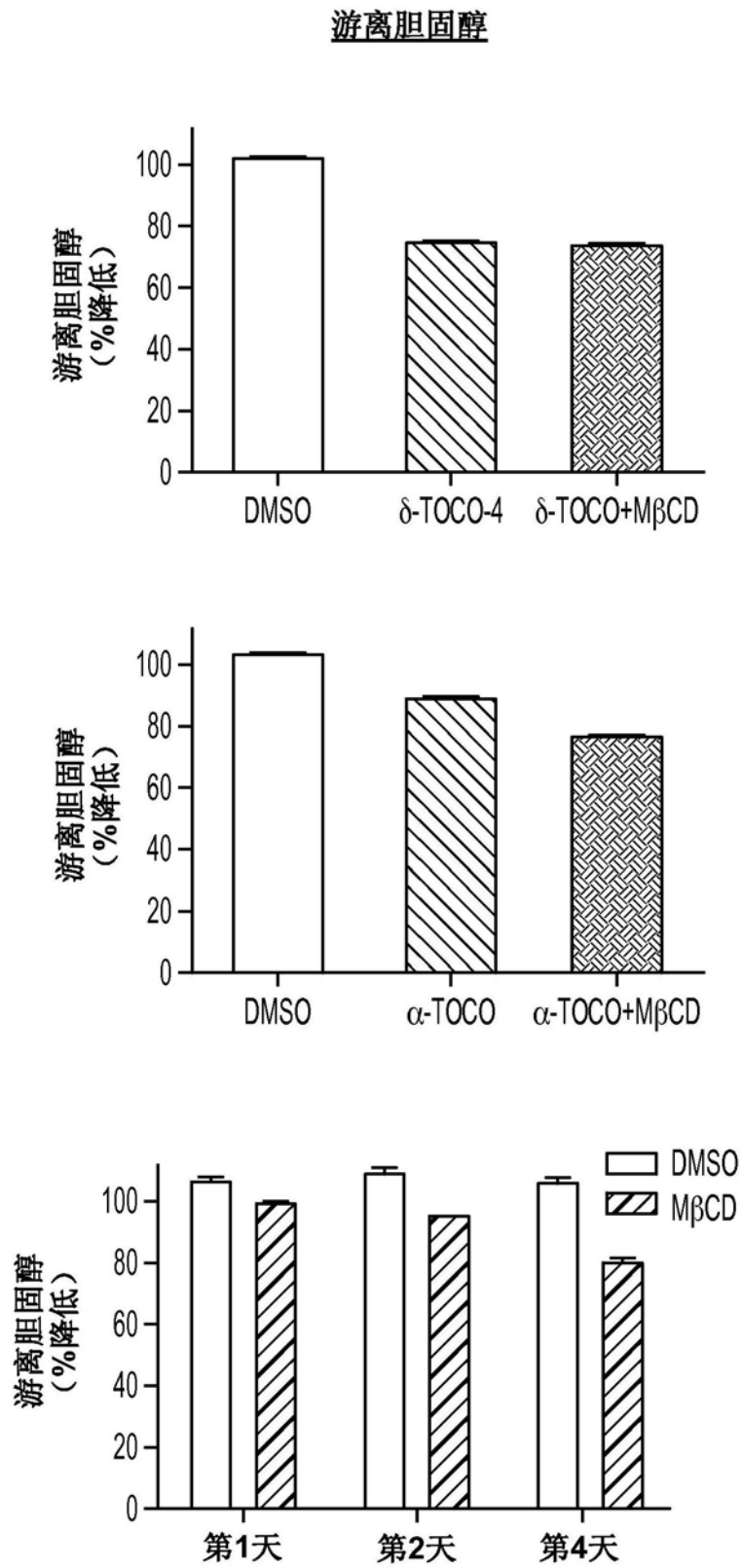


图1续

尼罗红染色

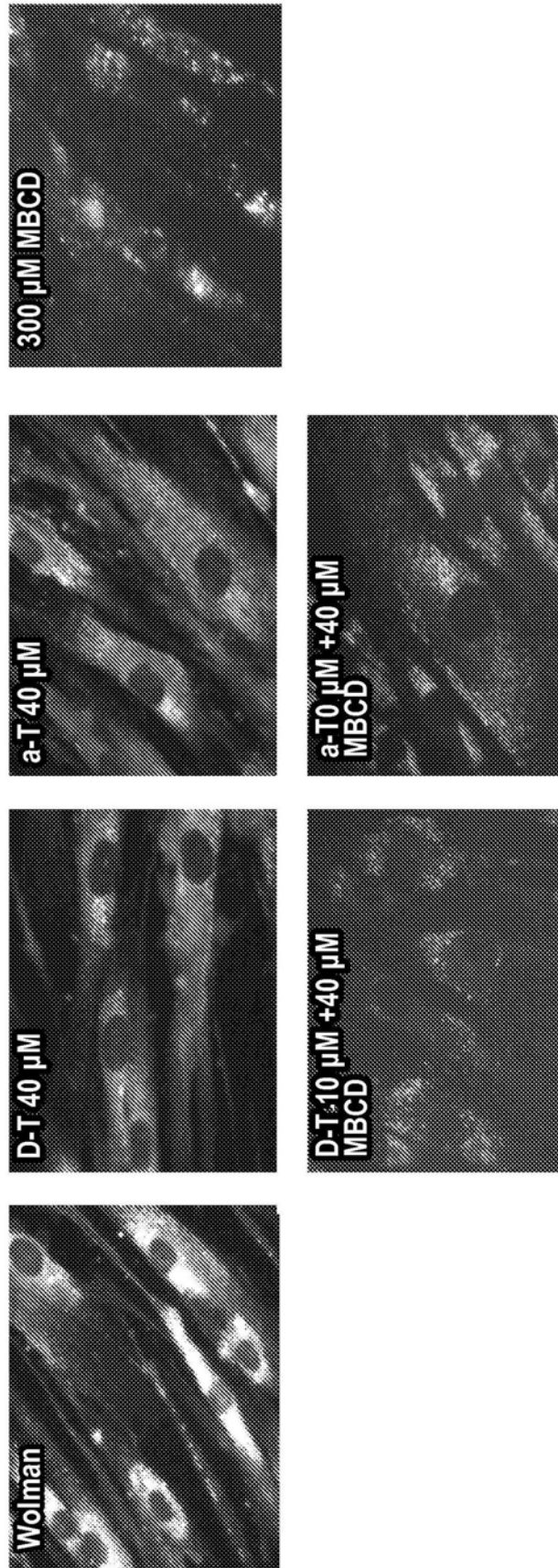


图2

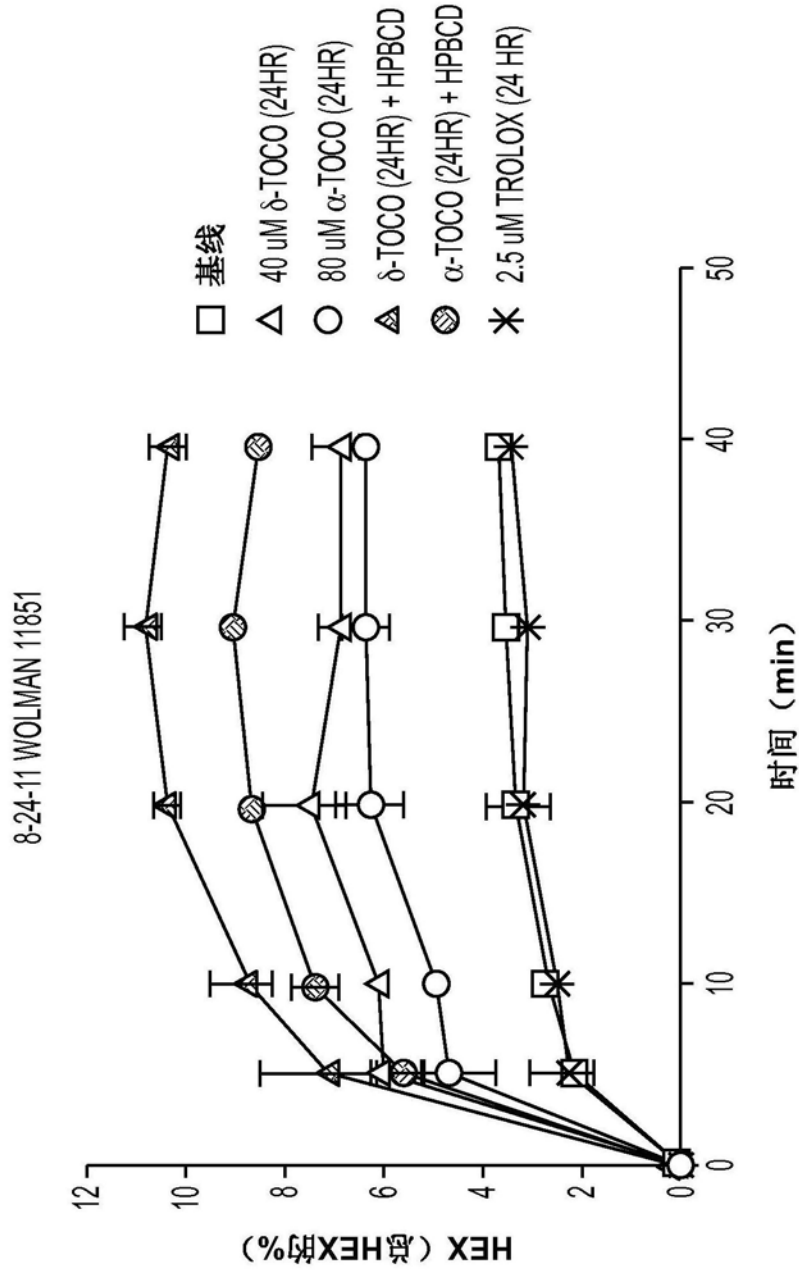


图3

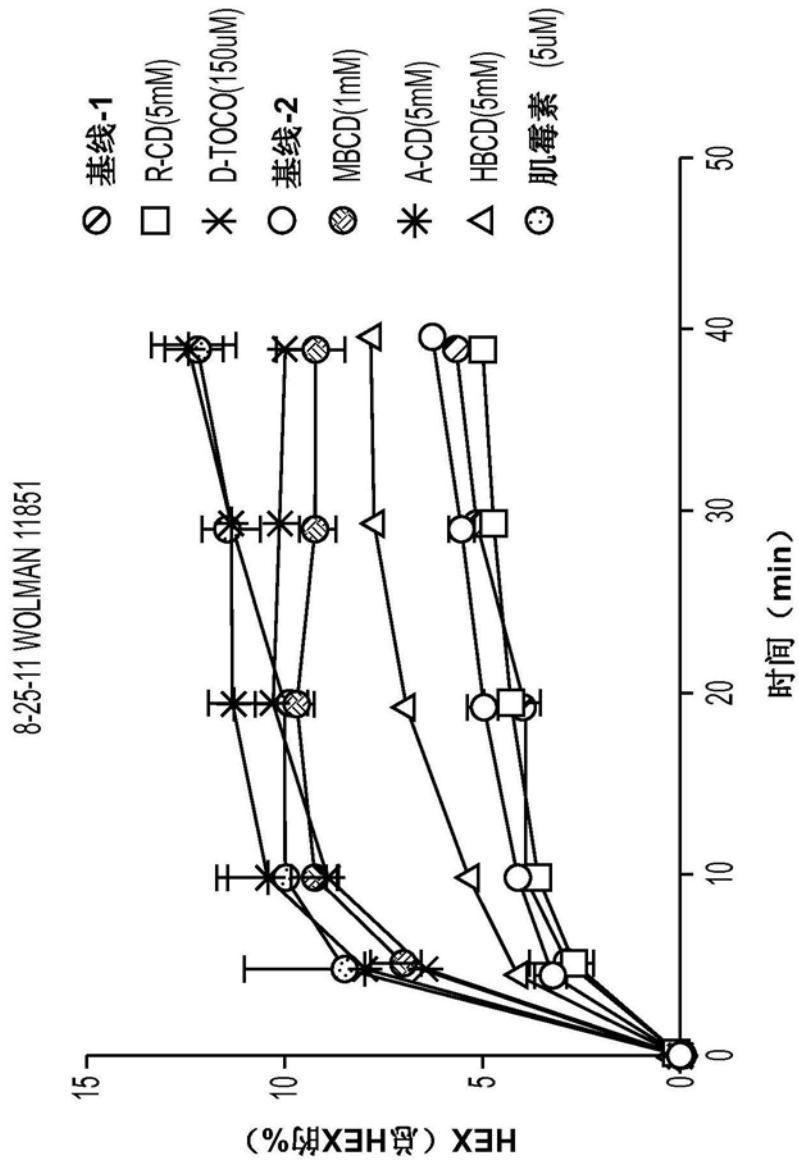


图3续

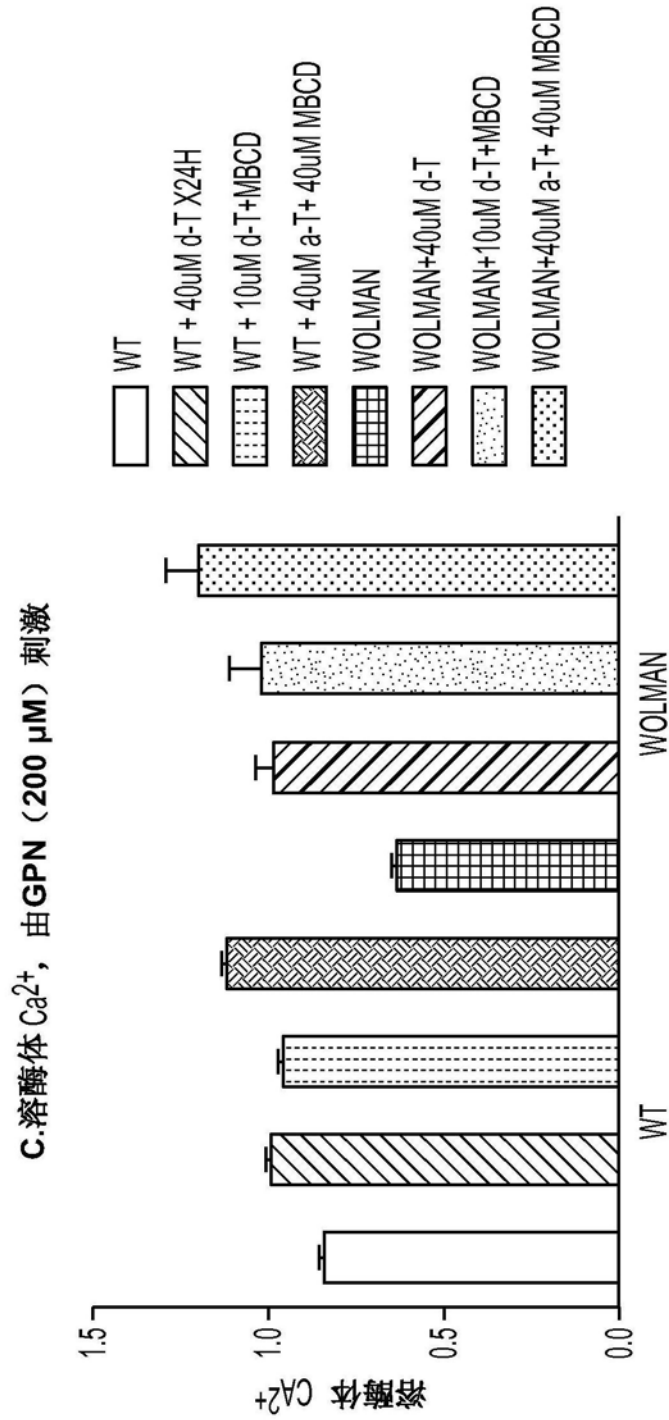


图4

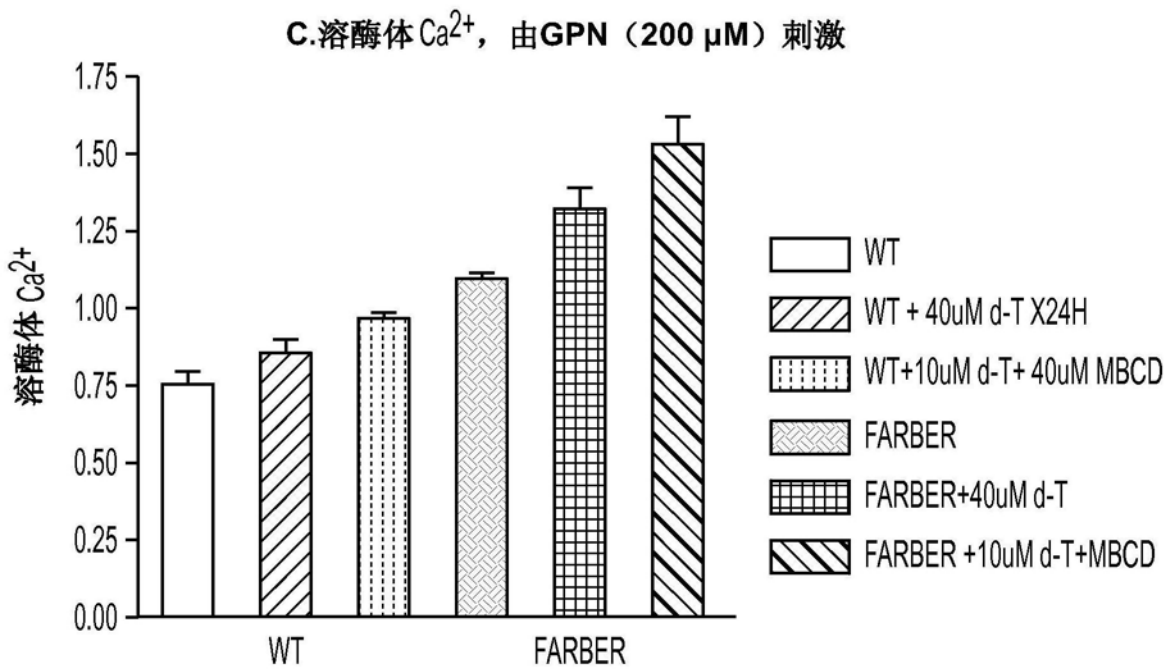
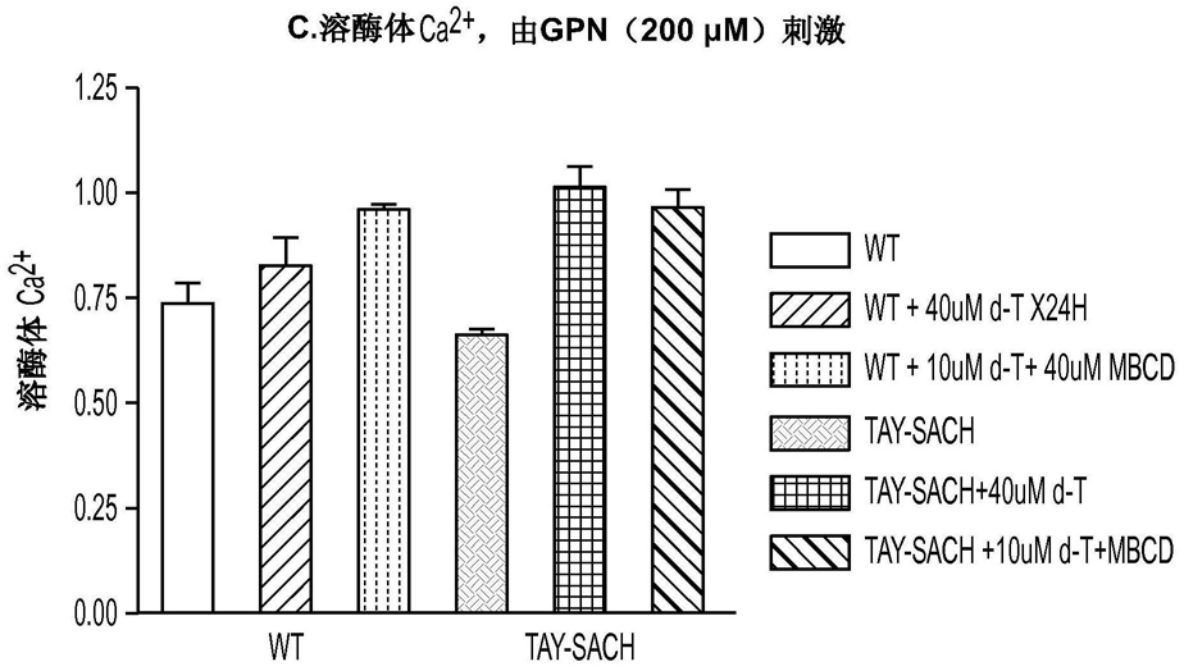


图4续

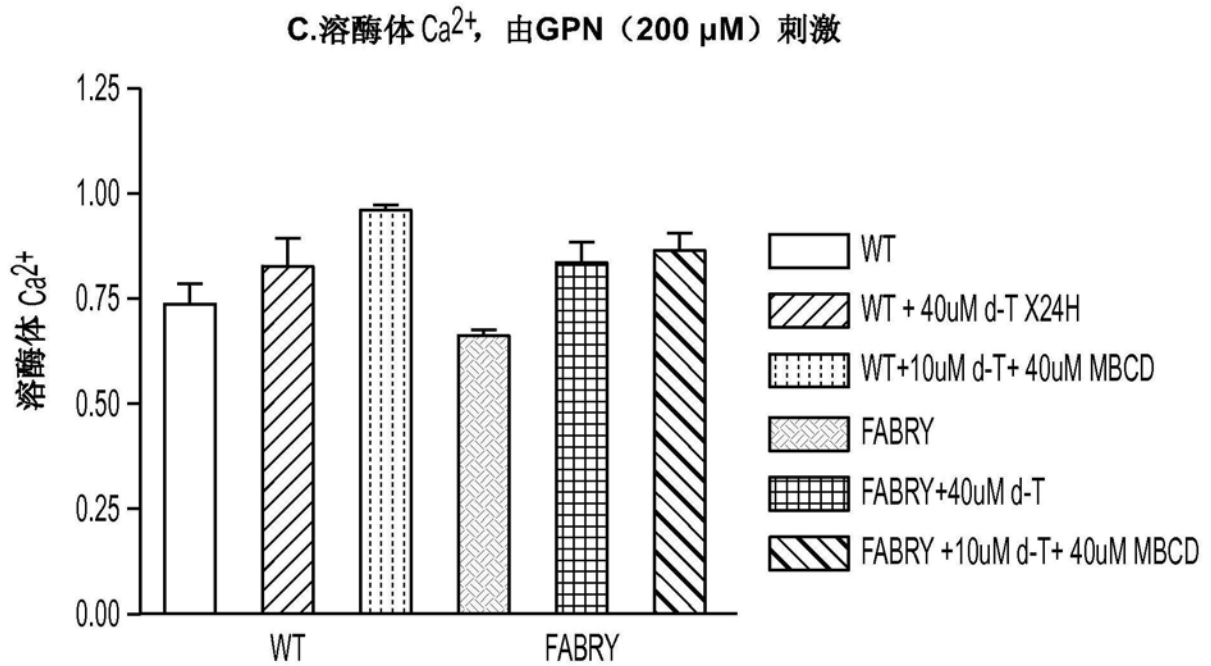
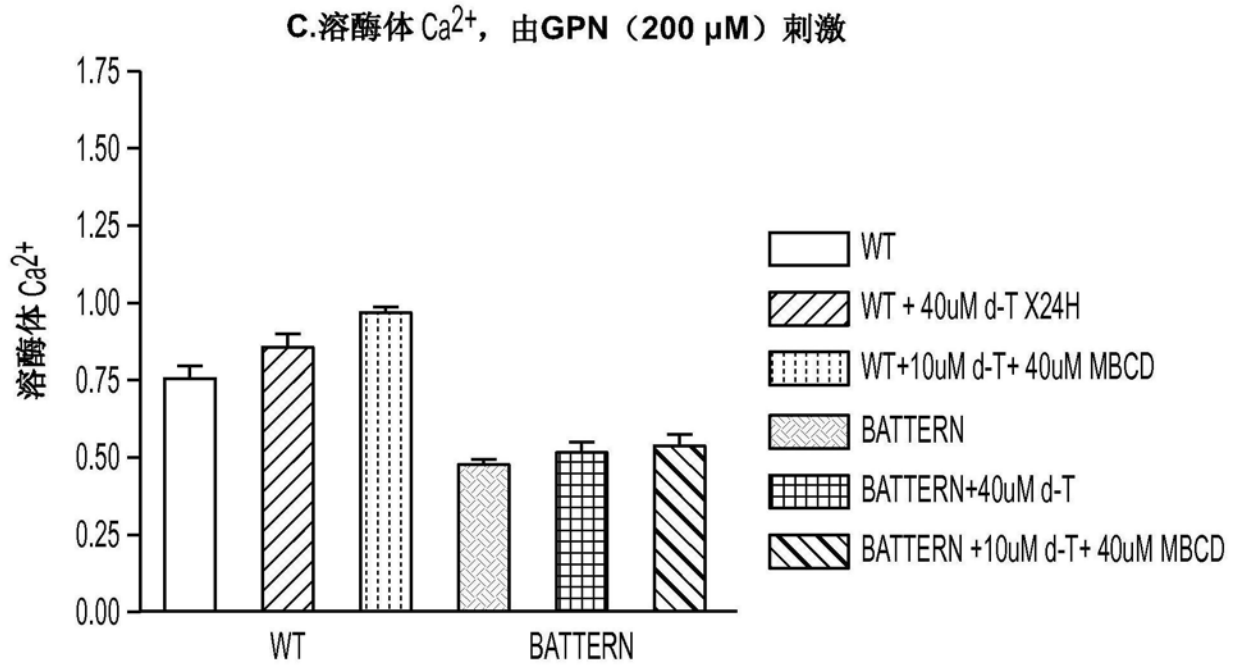
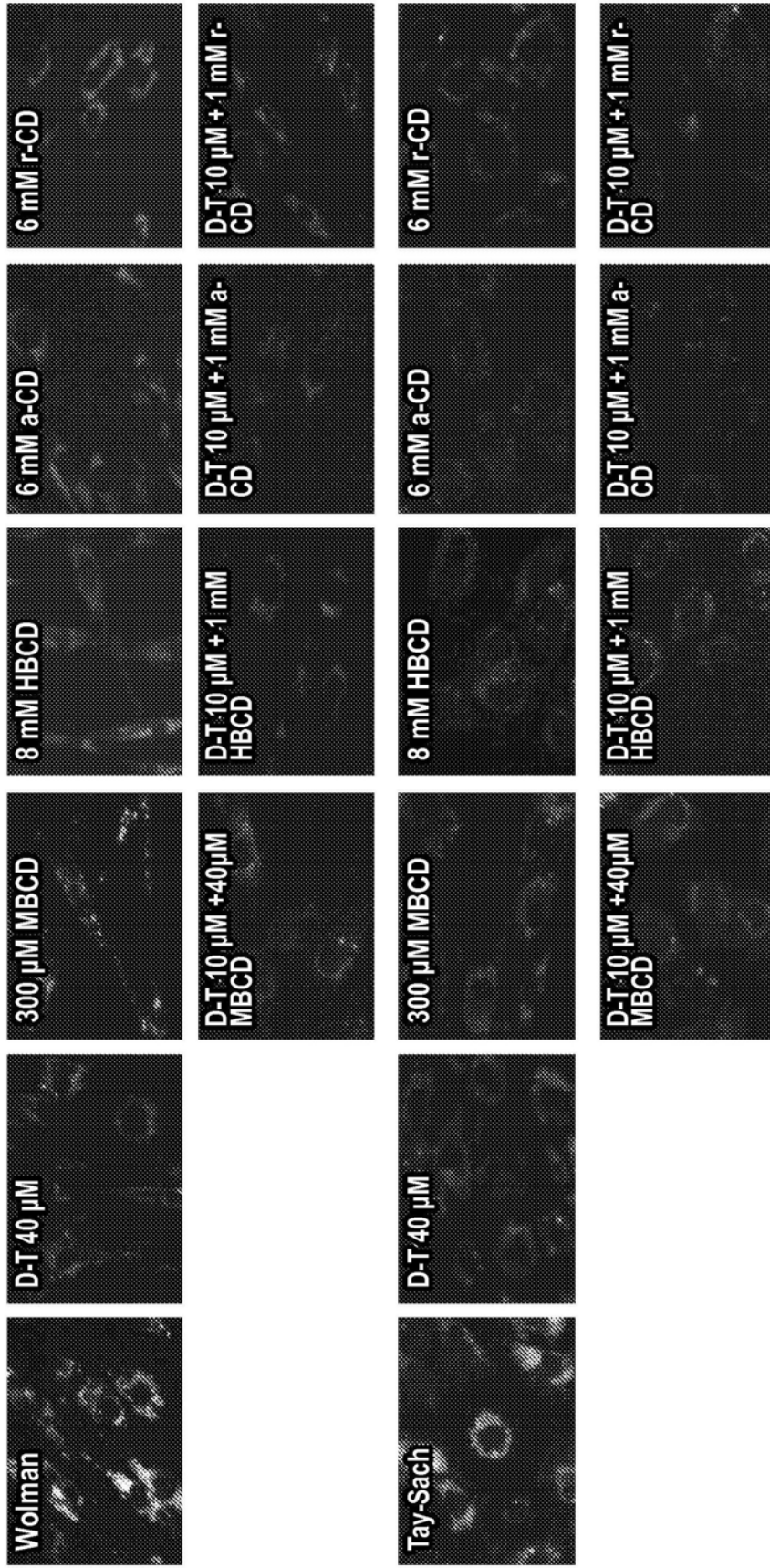


图4续

使用LYSOTRACKER红确定单独的d-生育酚以及d-生育酚与环糊精组合的效果（WOLMAN和TAY-SACH成纤维细胞系）



LYSOTRACKER染色表明在WOLMAN和TAY SACH成纤维细胞中溶酶体增大。单独使用40 μM ΔT和MBCD进行处理降低了脂类累积。然而，其它的环糊精不具有该显著效果。环糊精与ΔT的组合显著降低了溶酶体尺寸。

图5A

使用LYSOTRACKER红确定单独的d-生育酚以及d-生育酚与环糊精组合的效果 (WT和FABRY成纤维细胞系)

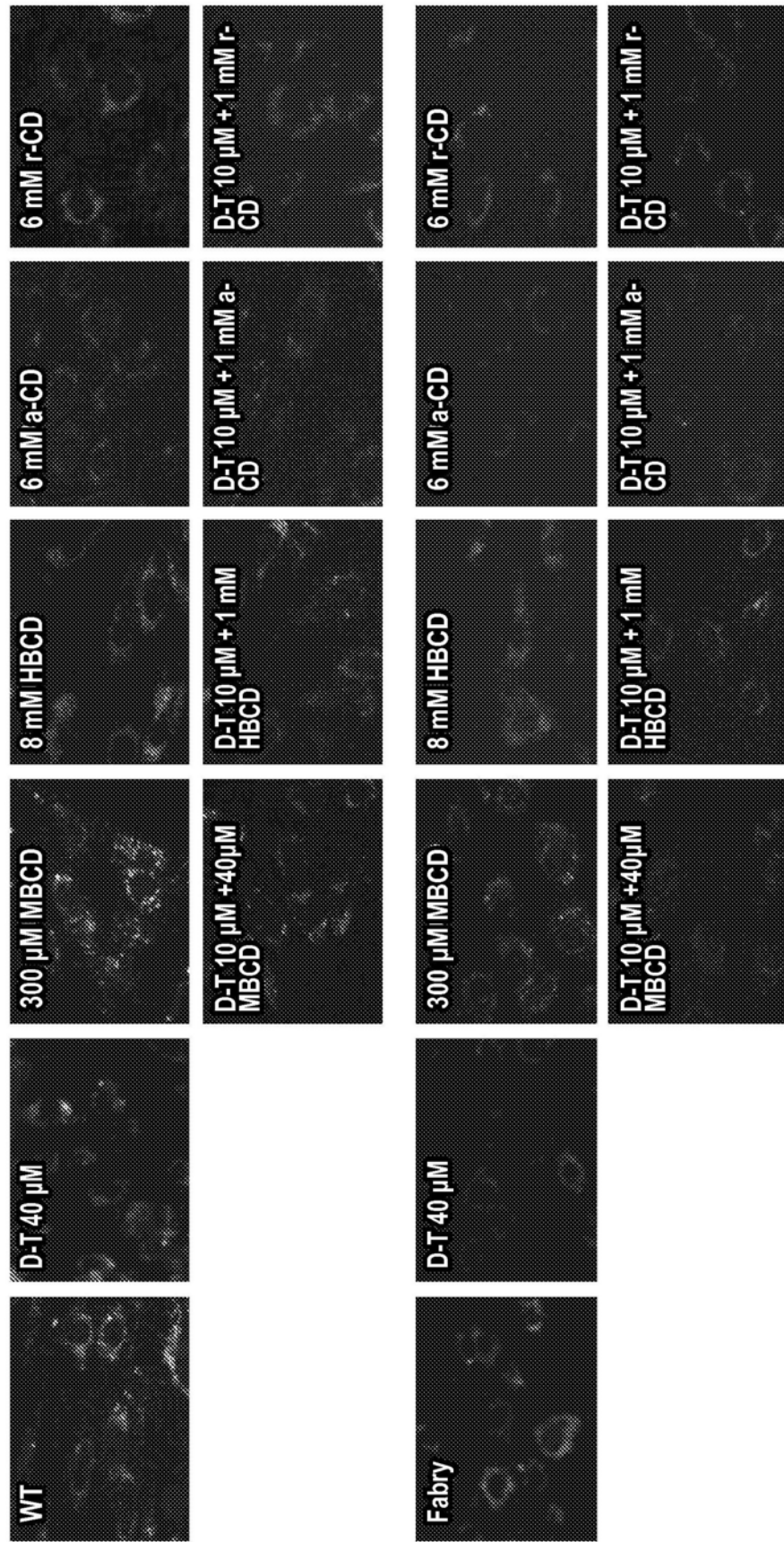


图5B

使用LYSOTRACKER红确定单独的 $\Delta$ 生育酚以及 $\Delta$ 生育酚与环糊精组合的效果 (FARBER和MPSIIIB成纤维细胞系)

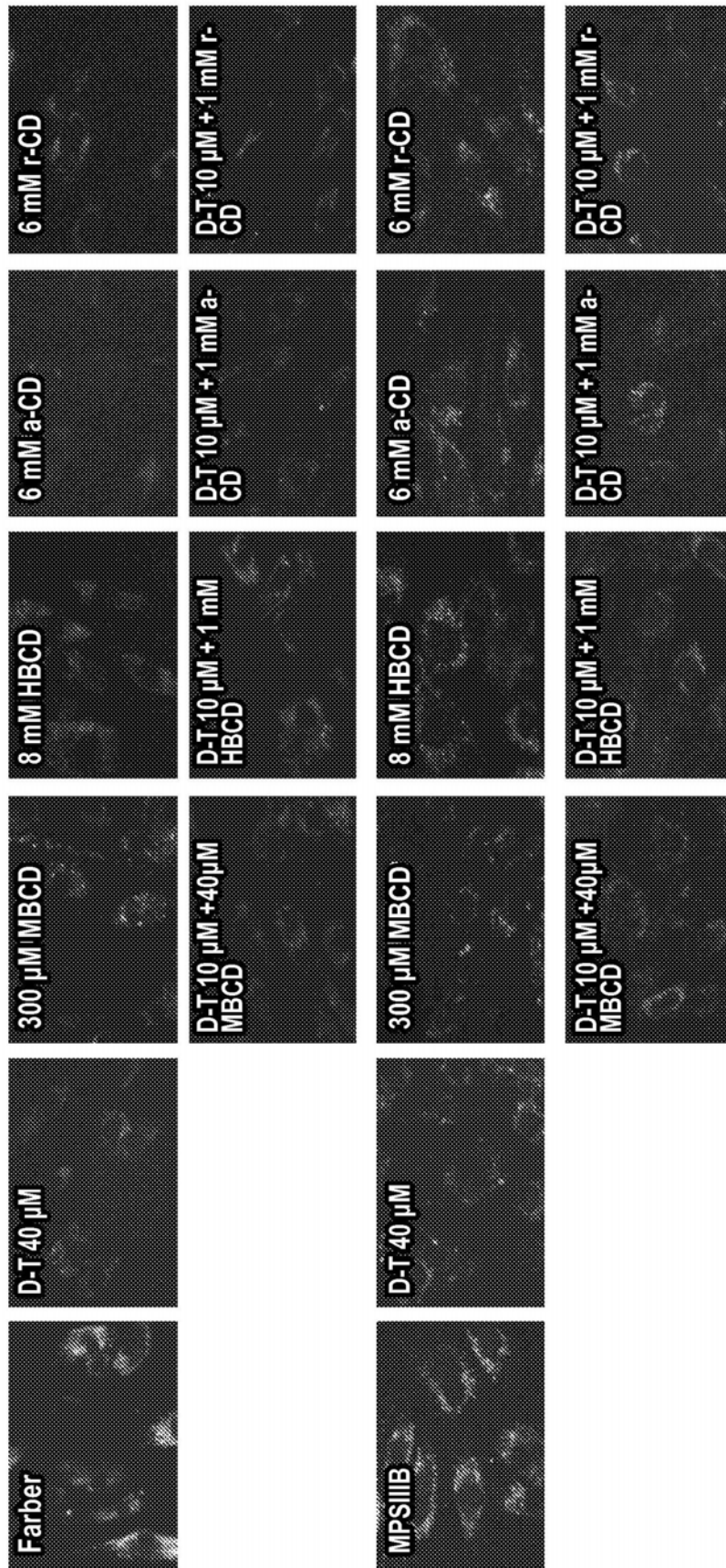


图5C

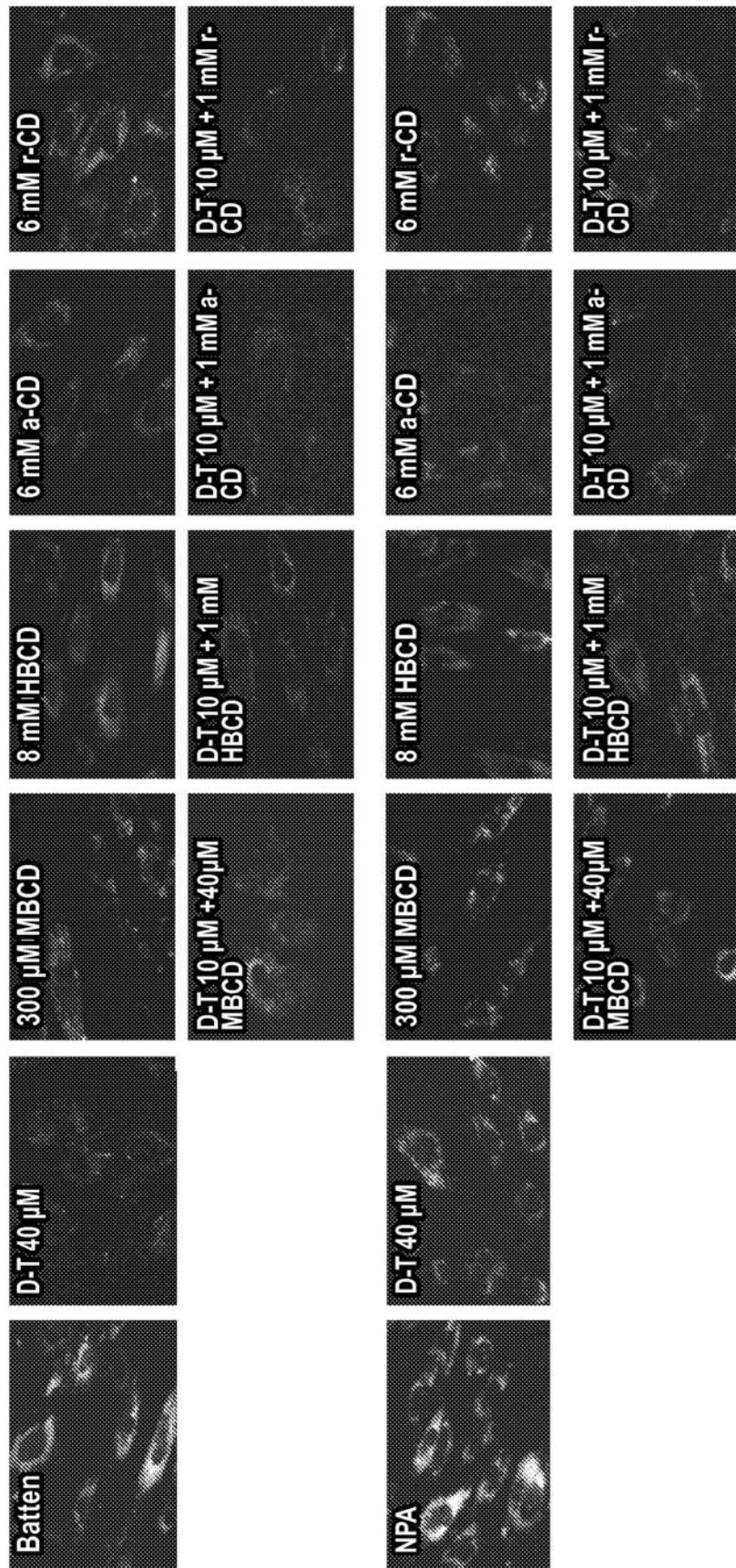


图5D

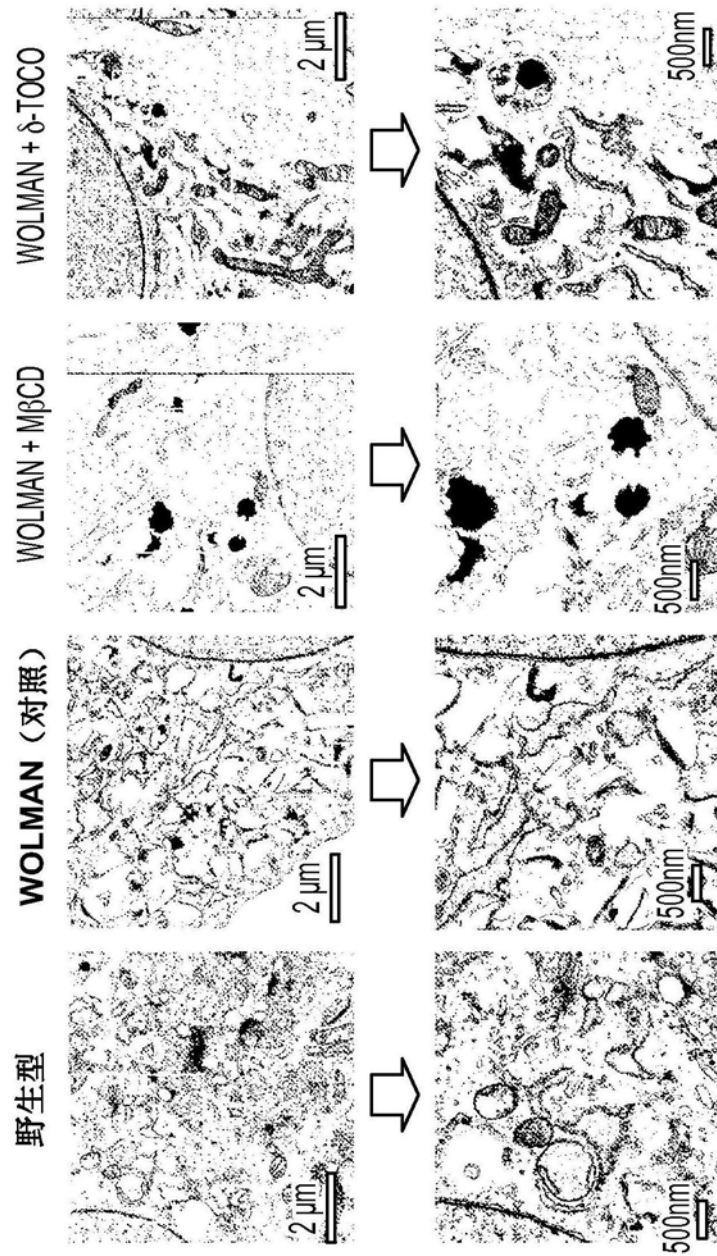


图6

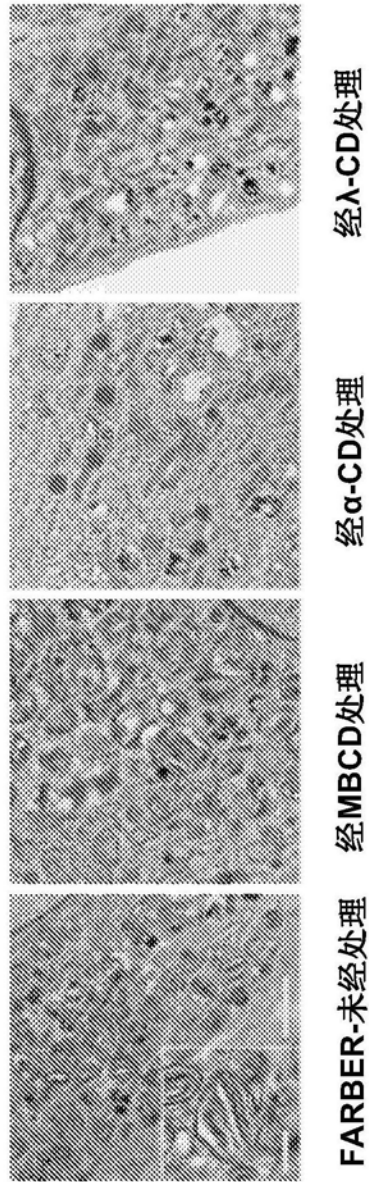
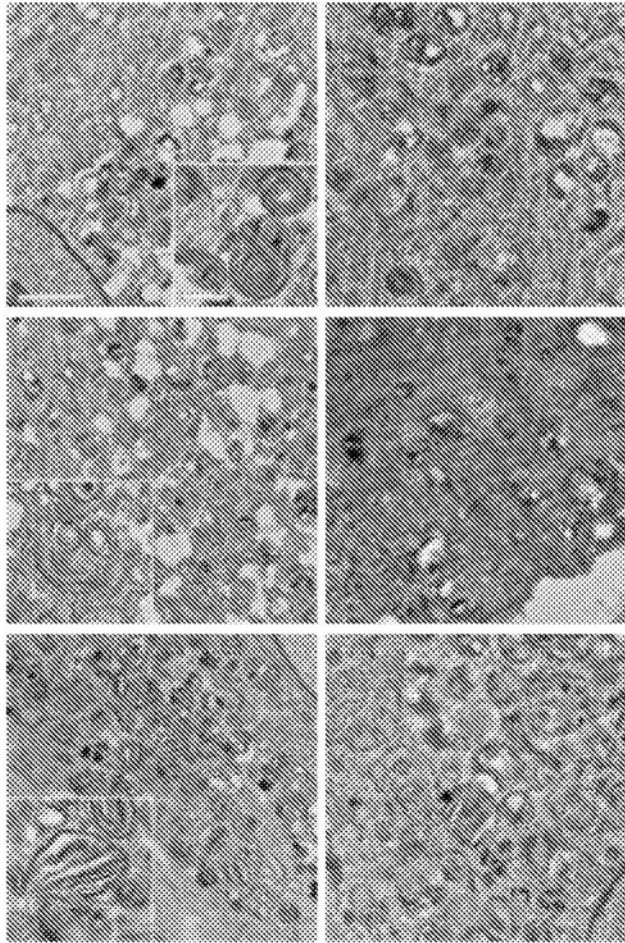


图7

**TAY-SACHS-未经处理和经MBCD处理**



**FARBER-  
未经处理和  
经MBCD处理**

**FARBER-未经处理和经MBCD处理**

图8

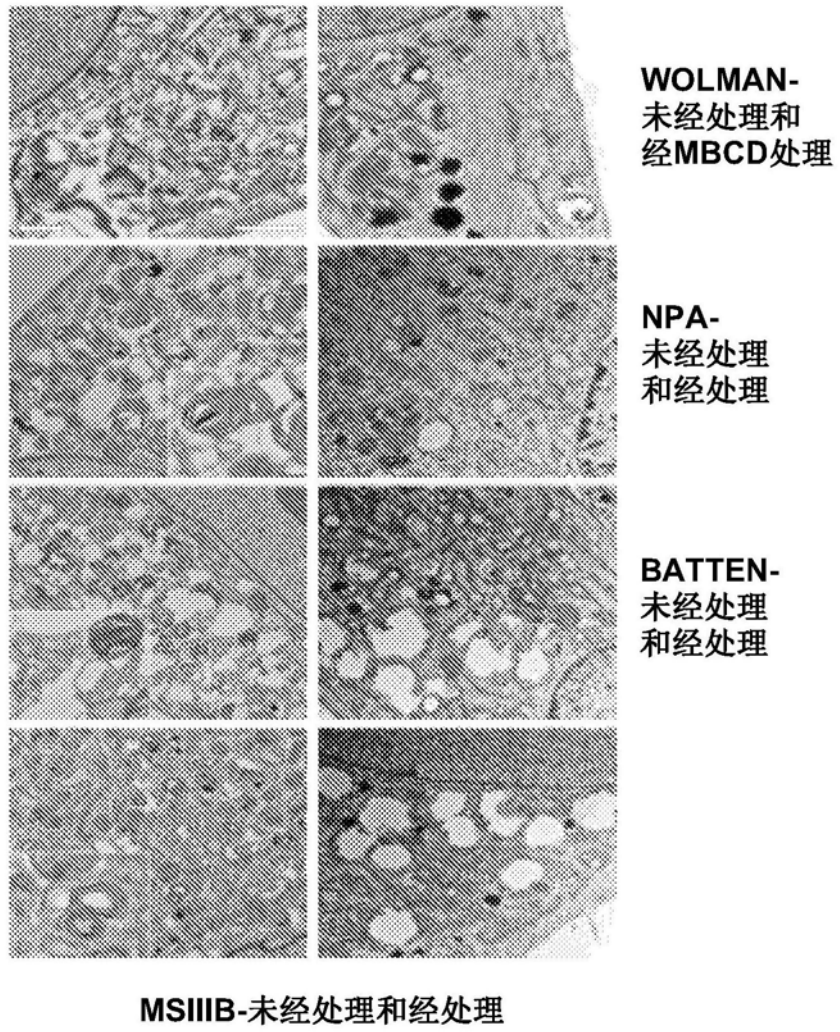


图9

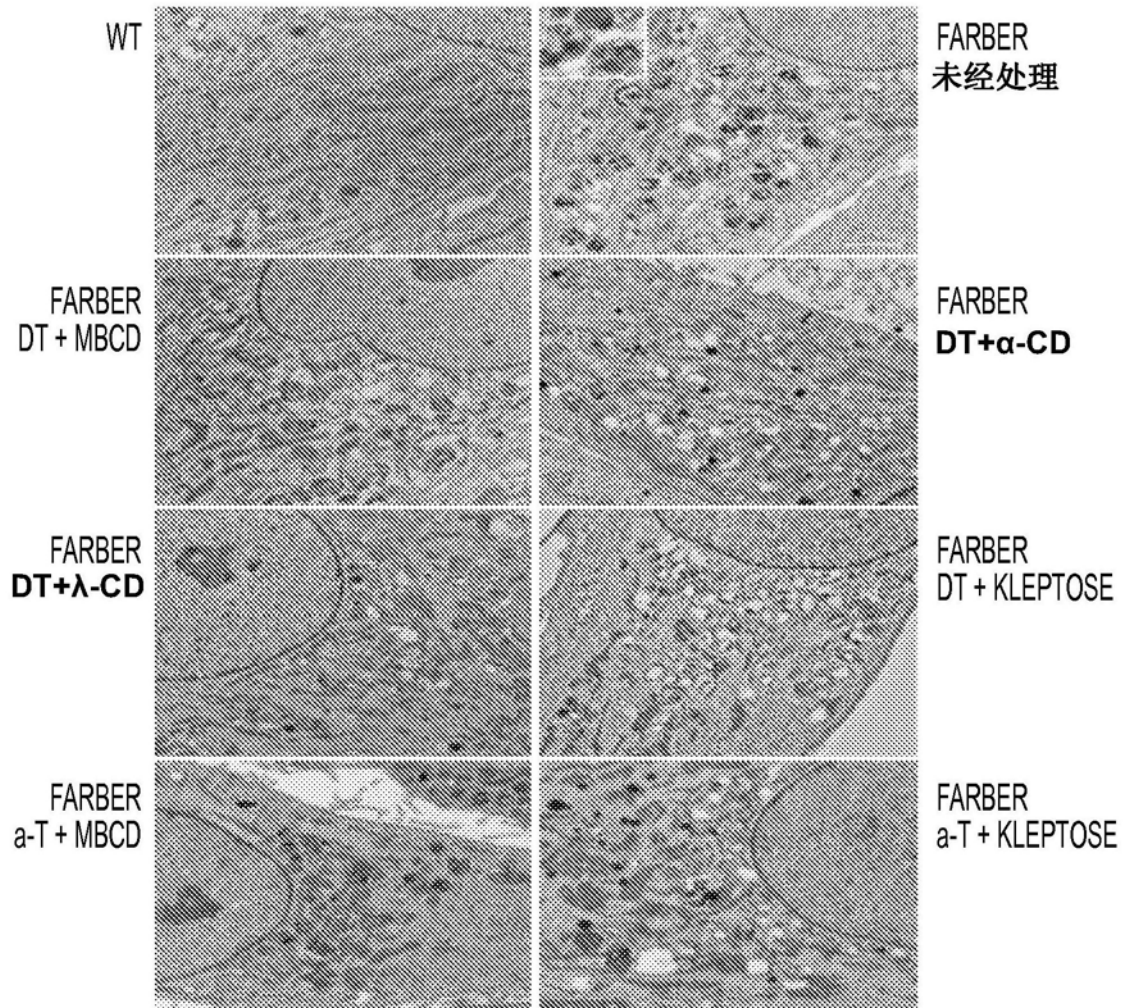


图10

HBPCD +  $\delta$ -T

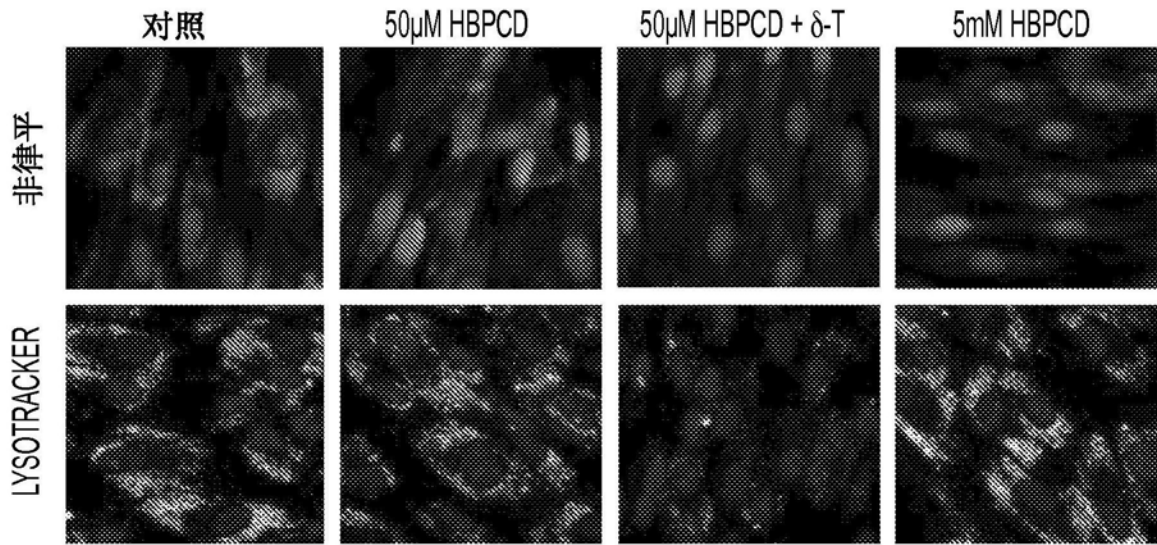


图11A

MBCD +  $\delta$ -T

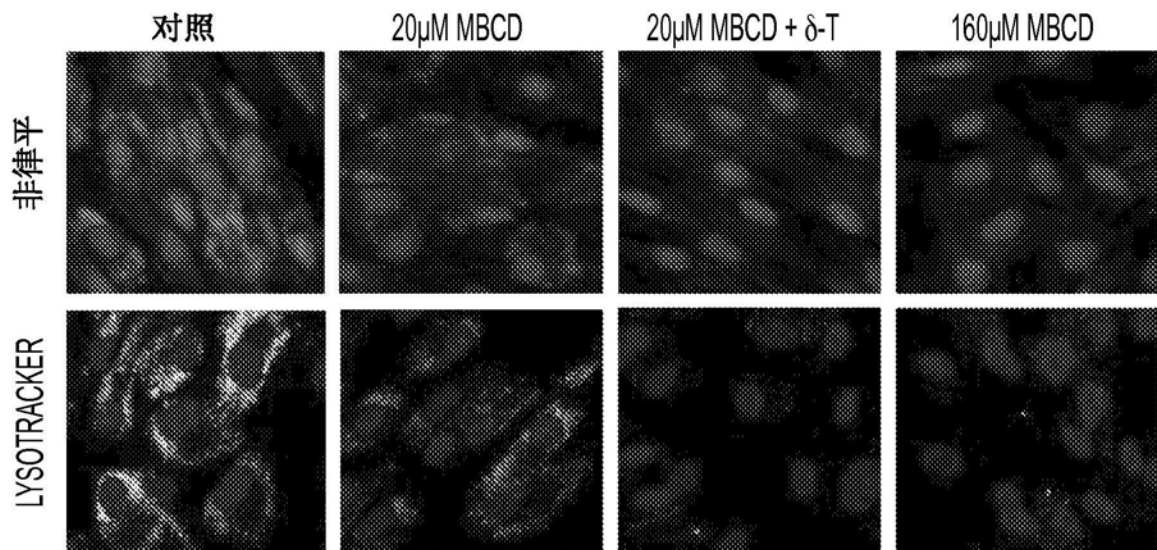


图11B

在AMPLEX-红胆固醇检定中测定的浓度-效应

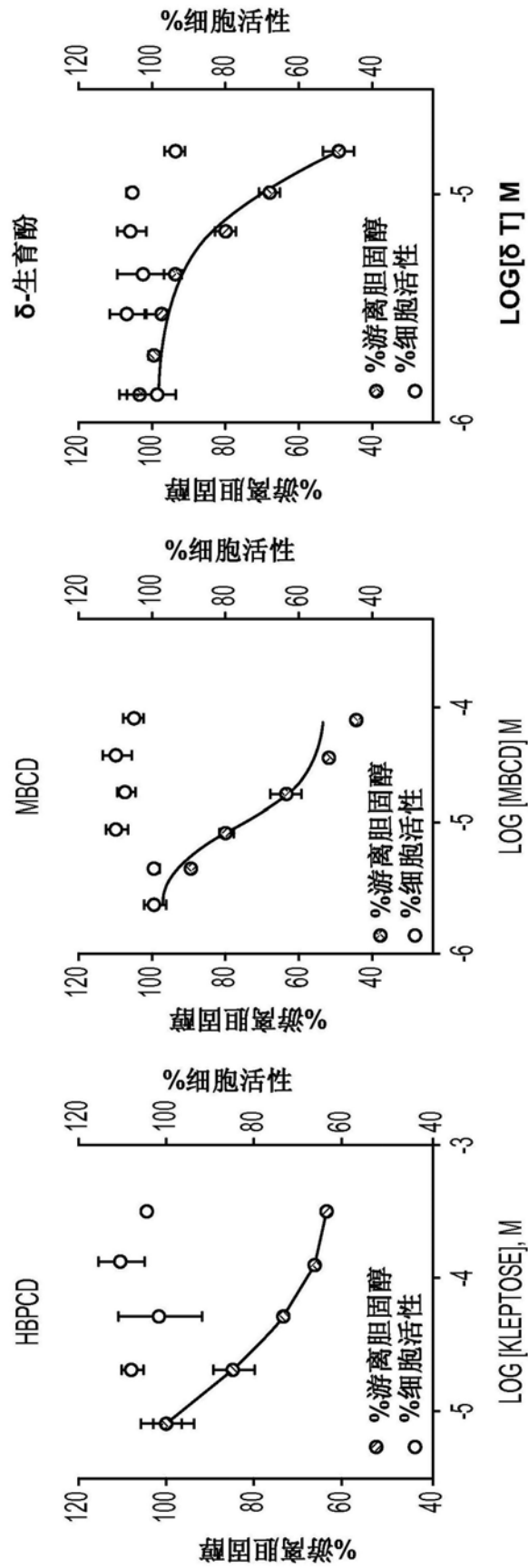


图12A

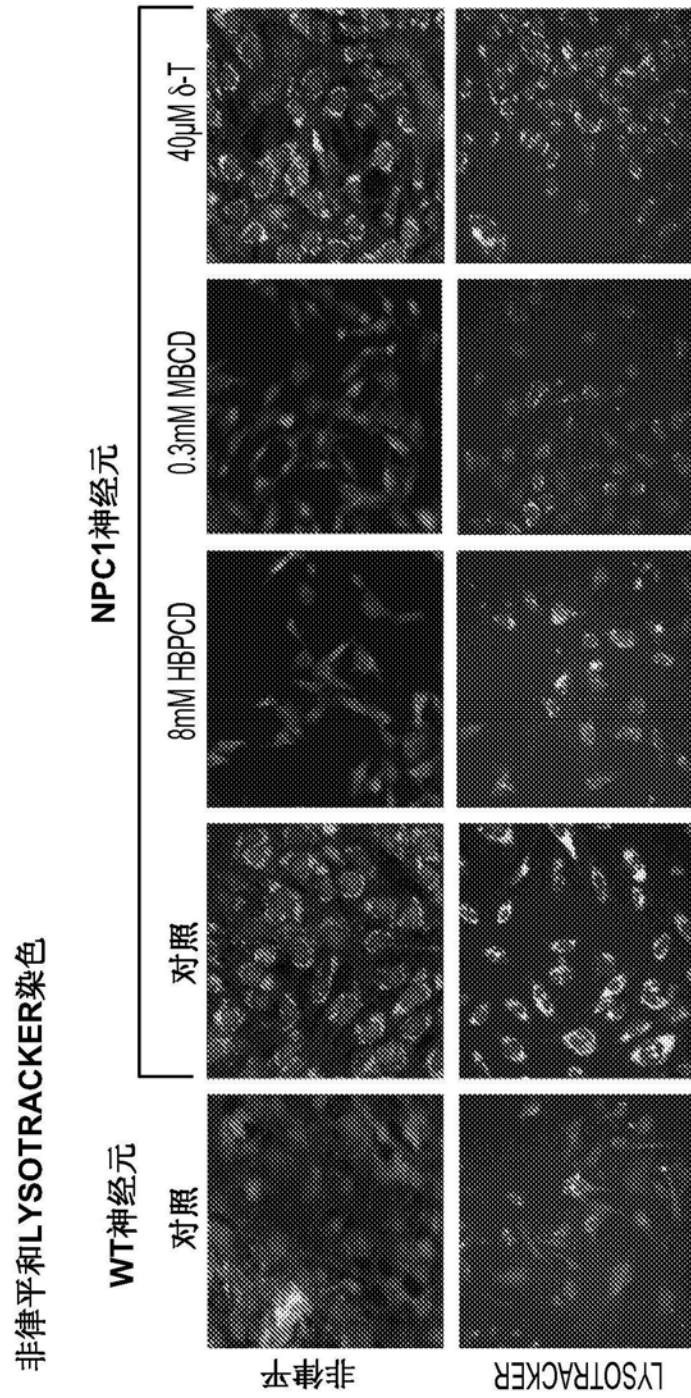


图12B

HBPCD +  $\delta$ -T

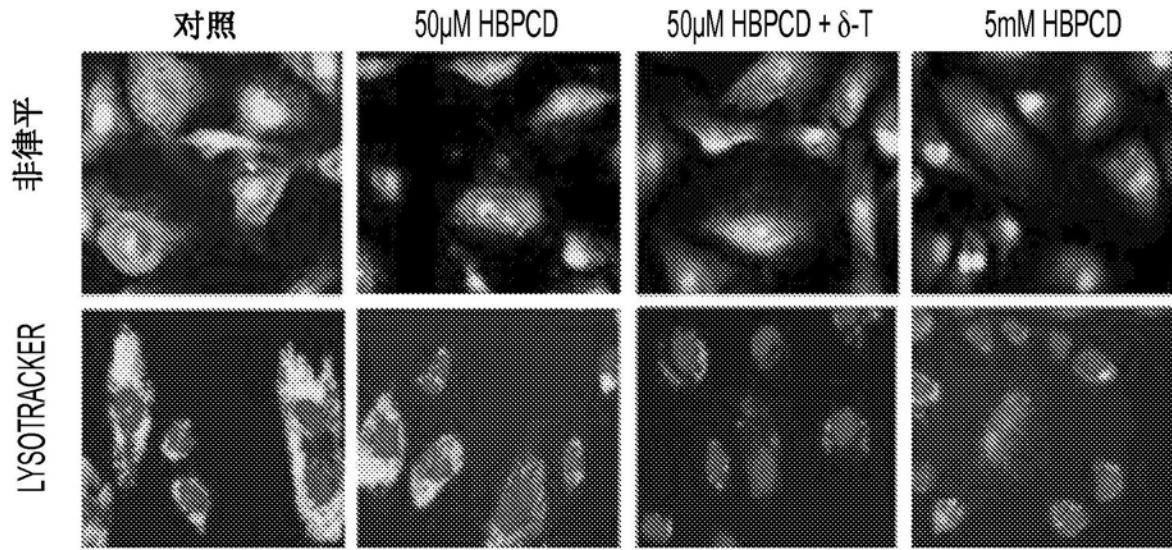


图13A

MBCD +  $\delta$ -T

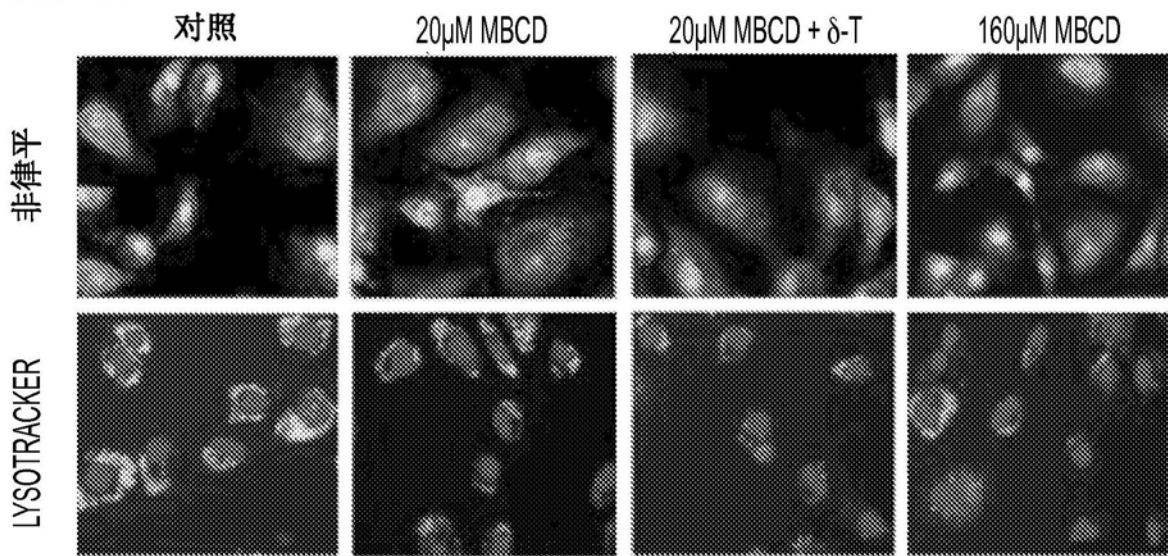
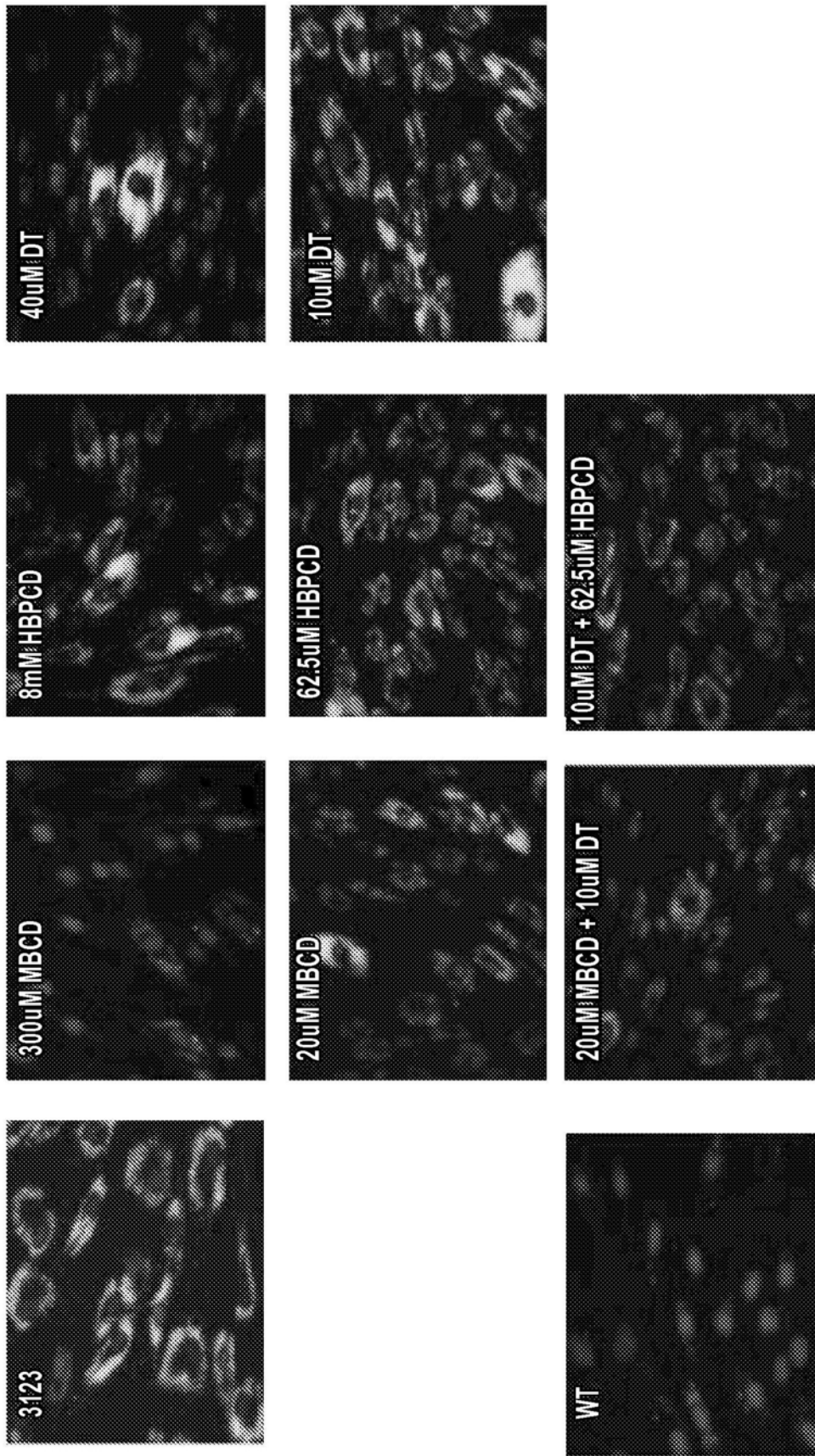
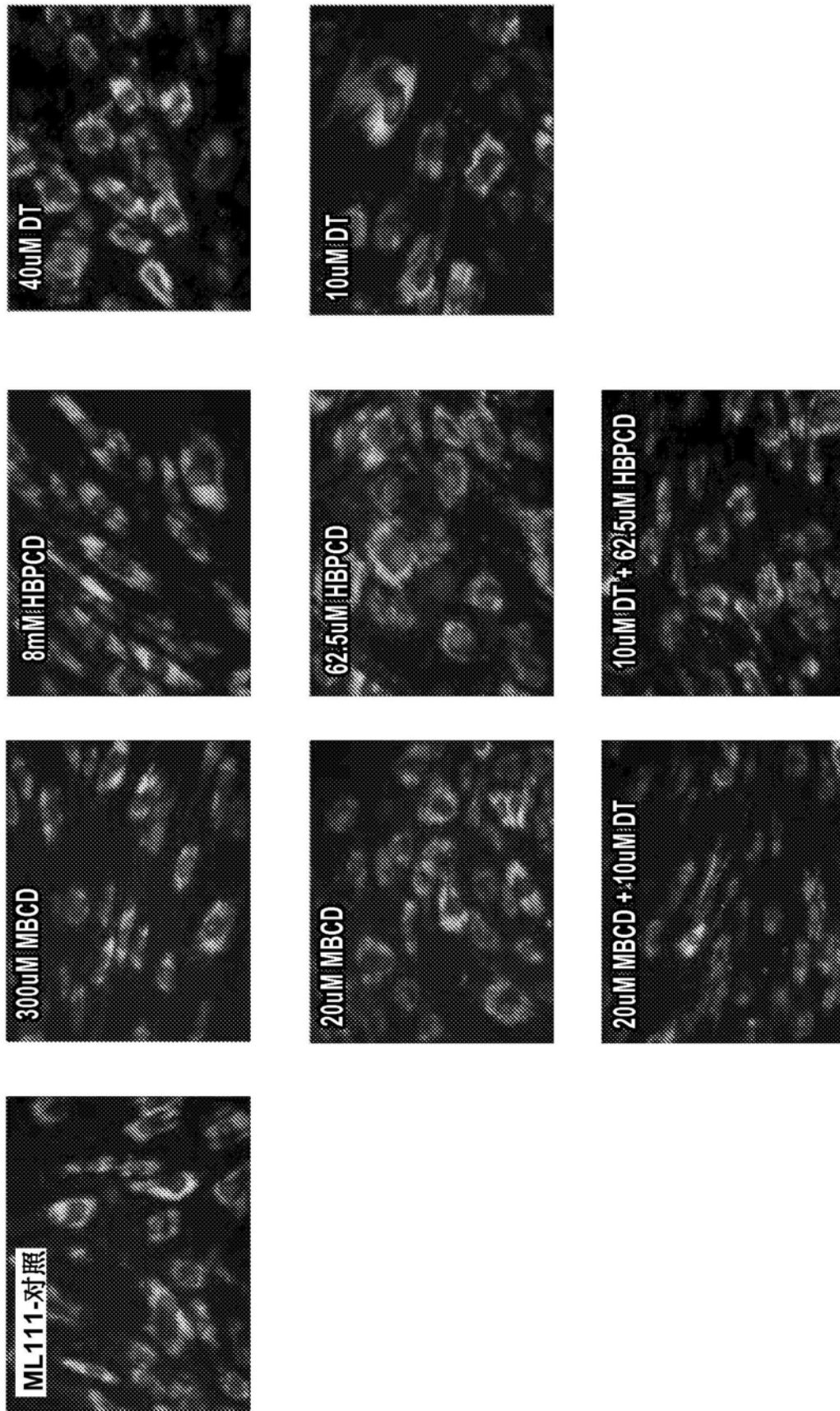


图13B



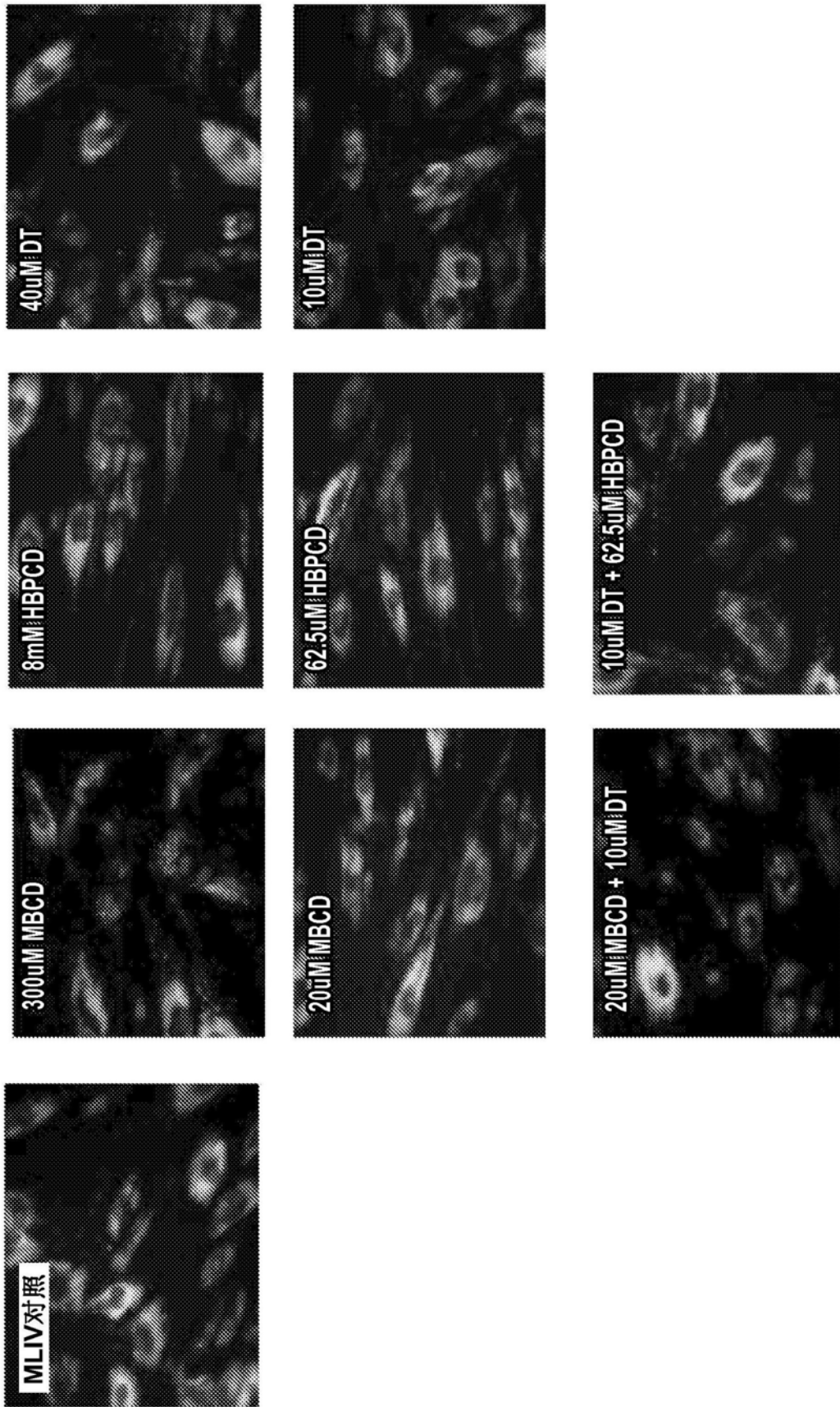
在3123 (NPC1) 中的LYSOTRACKER染色

图14



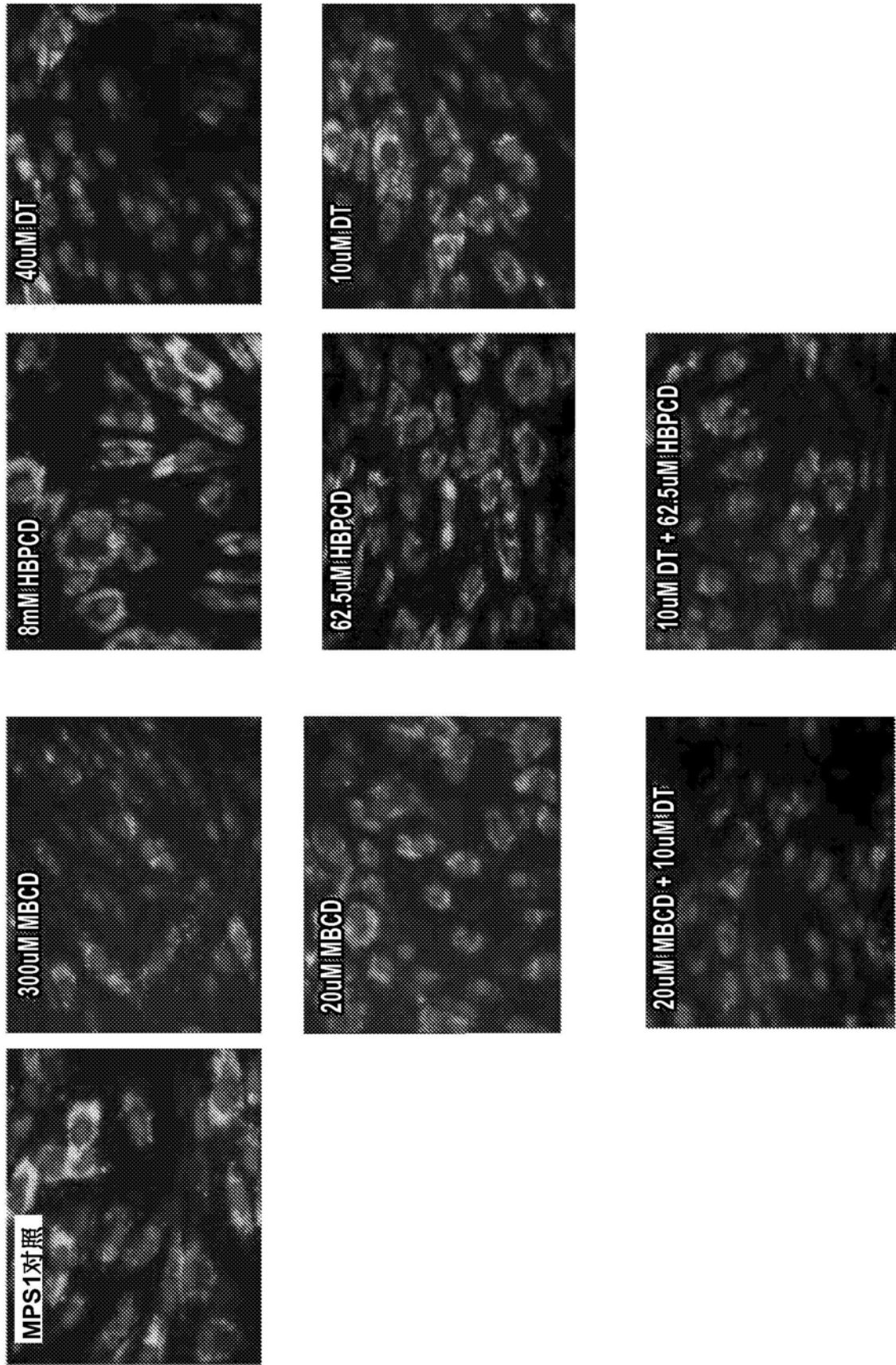
在ML111中的LYSOTRACKER染色

图15



在MLIV (8月) 中的LYSOTRACKER染色

图16



在MPS1中的LYSOTRACKER染色

图17

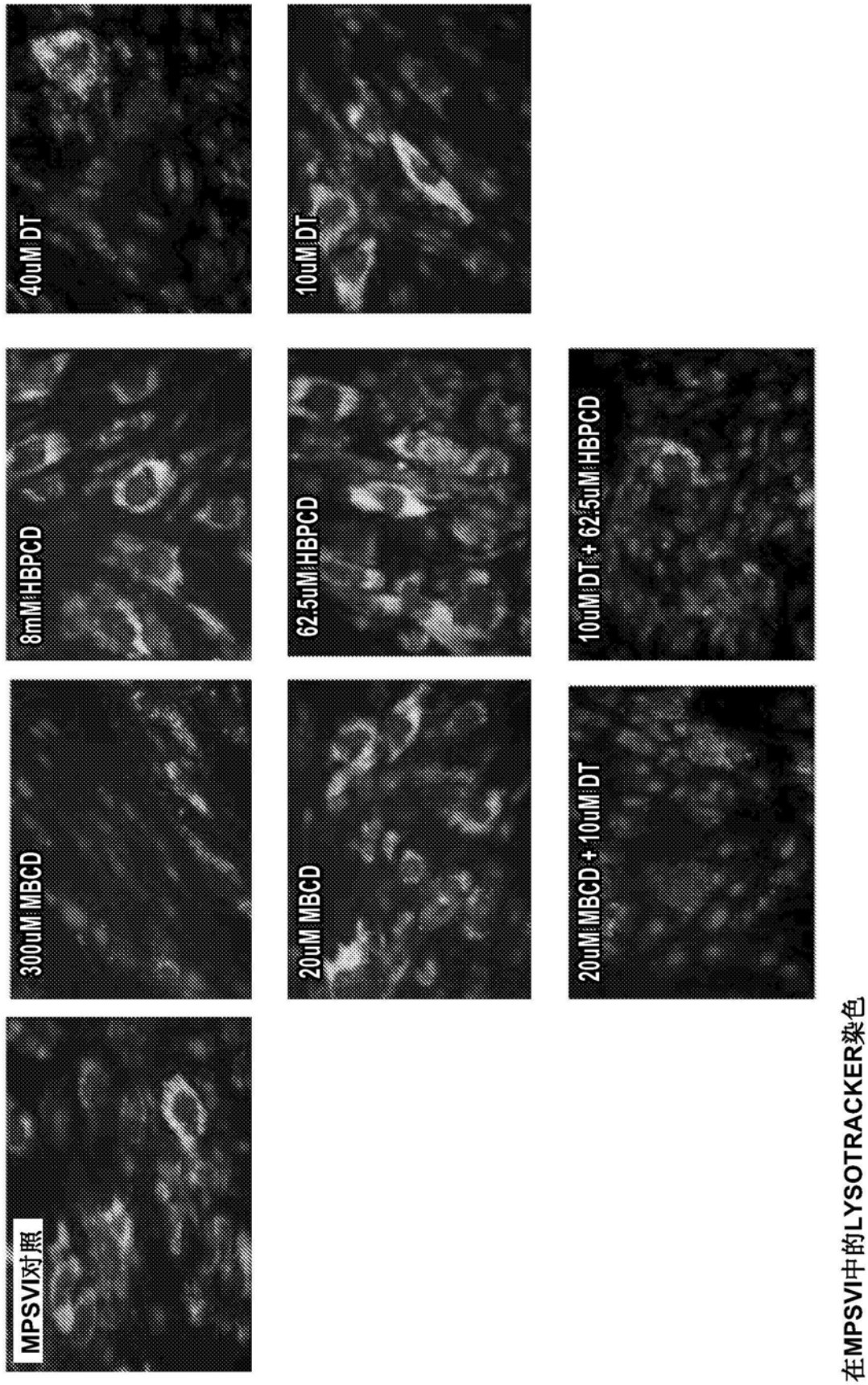


图18