



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102762573 B

(45) 授权公告日 2015. 09. 16

(21) 申请号 201080042939. 4

*A61P 25/28*(2006. 01)

(22) 申请日 2010. 07. 23

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

61/228374 2009. 07. 24 US

WO 2006022502 A1, 2006. 03. 02,

WO 2006127832 A2, 2006. 11. 30,

JP 2009102288 A, 2009. 05. 14,

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 03. 22

审查员 高宁馨

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/043107 2010. 07. 23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/011721 EN 2011. 01. 27

(73) 专利权人 阿马曾提斯公司

地址 瑞士埃居布朗

(72) 发明人 C·林施 P·V·L·杜普拉斯

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 李进 李炳爱

(51) Int. Cl.

*C07D 493/04*(2006. 01)

*C07D 407/10*(2006. 01)

*A61K 31/357*(2006. 01)

权利要求书1页 说明书48页 附图28页

(54) 发明名称

用于在神经退行性障碍中保护脑部健康的化合物、组合物和方法

(57) 摘要

本发明的各方面涉及化合物、提取物及其组合物,以及使用化合物、提取物及其组合物以治疗神经退行性障碍和/或改善脑部健康的方法。在某些实施方案中,所述化合物是石榴黄酮类。

1. 石榴皮鞣素、安石榴苷或其药学上可接受的盐在制备治疗或预防受试者的选自以下病症的药物中的用途：认知障碍、神经退行性障碍和淀粉样变性相关病症。

2. 根据权利要求 1 所述的用途，其中石榴皮鞣素、安石榴苷或其药学上可接受的盐是纯的和分离的。

3. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述药物为营养组合物。

4. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述药物为药物组合物。

5. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述药物为功能食品或功能营养品。

6. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述药物为医用食品或医用营养品。

7. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述药物为膳食补充剂。

8. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述药物为植物药。

9. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述受试者是哺乳动物。

10. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述受试者是人。

11. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述受试者是兽医学动物。

12. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述受试者的普通认知被改善。

13. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述受试者的记忆被改善。

14. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述受试者的普通认知被维持。

15. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述受试者的记忆被维持。

16. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述受试者的神经元被保护。

17. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述药物治疗或预防认知障碍。

18. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述药物治疗或预防神经退行性障碍。

19. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述药物治疗或预防所述受试者的与淀粉样变性相关的病症。

20. 根据权利要求 19 所述的用途，其中所述药物治疗或预防阿尔茨海默症。

21. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述药物治疗人的认知损伤。

22. 根据权利要求 21 所述的用途，其中人的记忆被改善。

23. 根据权利要求 22 所述的用途，其中所述记忆的改善是选自下述的至少一种测量的改善：短期记忆、长期记忆、记忆巩固、程序性记忆和陈述性记忆的改善。

24. 根据权利要求 21 所述的用途，其中人的注意力被改善。

25. 根据权利要求 21 所述的用途，其中人的反应时间被改善。

26. 根据权利要求 21 所述的用途，其中人的学习被改善。

## 用于在神经退行性障碍中保护脑部健康的化合物、组合物 和方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2009 年 7 月 24 日提交的美国临时专利申请序列号 61/228,374 的优先权的利益;将其内容通过引用并入文中。

### 背景技术

[0003] 神经退行性障碍和脑部健康是我们老龄化社会所面临的主要的新兴公共健康的挑战之一。到目前为止,阿尔茨海默症(AD)是最普遍的神经退行性障碍。已知,几种老化性病征(如帕金森氏症、亨廷顿氏症和 ALS)与阿尔茨海默症共有一些病理生理学,包括异常的蛋白质折叠和氧化应激。Sayre, L. M., G. Perry, 等人(2008). “Oxidative stress and neurotoxicity(氧化应激和神经毒性)” Chem Res Toxicol 21(1):172-88。

[0004] 除了选择性的神经元退化以外,AD 的病理学特征在于脑部存在两个标志性损伤:细胞外老年斑(SP)和神经元内神经原纤维缠结(NFT)。SP 包含  $\beta$ -淀粉样肽(A $\beta$ ),主要是 A $\beta$ (1-42);然而,NFT 主要由以成对的螺旋丝形式存在的微管相关蛋白 Tau 组成。AD 的病理生理学特征还在于增加  $\beta$ -淀粉样肽 A $\beta$ (1-40) 和 A $\beta$ (1-42) 的可溶性肽的产生。一些最新发现表明,神经元毒性和受损的突触传递可能归因于 A $\beta$  的可溶性寡聚体产生的增加。

[0005] 需要有治疗神经退行性障碍和/或改善脑部健康的化合物和组合物。理想地,这种化合物将具有良好的药学性质,如溶解度、生物利用度和/或很少的副作用。

### 发明内容

[0006] 本发明的某些方面涉及化合物、提取物及其组合物,以及使用它们以治疗神经退行性障碍和/或改善脑部健康的方法。在某些实施方案中,所述化合物是石榴黄酮类。在某些实施方案中,所述化合物、提取物、和/或组合物可以被用于治疗、控制或预防与原纤维形成诱导的损伤或原纤维形成风险增加相关的疾病或病症。

[0007] 一方面,本发明涉及包含本发明的化合物或提取物的组合物,如包含一种或多种本发明的抗聚集化合物的药物组合物、营养制剂、医用食品(也被称为用于特殊医疗目的的食品)、功能食品、食品添加剂、或膳食补充剂(也被称为植物药产品)。所述组合物还可以包含额外的治疗剂,或者可以与另一种治疗化合物联合施用。本发明的其他方面涉及包含上述的组合物和标签和/或说明书的包装产品,所述包装产品用于预防处于风险的患者中的聚集、治疗与脑部损伤(与典型的老化疾病有关)相关的疾病或病症和/或预防和/或控制相关的细胞死亡。

[0008] 在下文中详细讨论本发明的其他方面、实施方案、和优点。此外,上文中的信息和下文中的详细说明仅仅作为本发明各种方面和实施方案的说明性实例,并且旨在提供用于理解要求保护的方面和实施方案的本质和特征的概述或框架。附图被包括在内以进一步理解各种方面和实施方案,将所述附图并入并且构成本说明书的一部分。所述附图,连同说明

书的剩余部分用于解释所描述的和要求保护的方面和实施方案的原理和操作。参考所述附图,在下文中讨论至少一个实施方案的各个方面。提供的所述附图用于说明和解释的目的而并非作为本发明的范围的定义。

#### 附图说明

- [0009] 图 1 描述了本发明选出的化合物。
- [0010] 图 2 描述了安石榴苷的  $^1\text{H}$  NMR 谱。
- [0011] 图 3 描述了安石榴苷的质谱。
- [0012] 图 4 描述了石榴皮鞣素的  $^1\text{H}$  NMR 谱。
- [0013] 图 5 描述了石榴皮鞣素的质谱。
- [0014] 图 6 描述了特里马素的  $^1\text{H}$  NMR 谱。
- [0015] 图 7 描述了特里马素的质谱。
- [0016] 图 8 描述了化合物 A 的  $^1\text{H}$  NMR 谱。
- [0017] 图 9 描述了化合物 A 的质谱。
- [0018] 图 10 描述了长梗马兜铃素 (Pedunculagin) 的质谱。
- [0019] 图 11 描述了抑制聚集的筛选分析的结果,其中使用  $\text{A}\beta_{25-35}$  和采用不同的提取溶剂分离的各种级分的 ThT 荧光。
- [0020] 图 12 描述了在提取物中鉴定的作为生物活性物质的分子以及它们的抑制  $\text{A}\beta_{25-35}$  聚集的  $\text{IC}_{50}$  值。
- [0021] 图 13 描述了在对于  $\text{A}\beta_{25-35}$  的剂量效应荧光体外分析中使用石榴皮鞣素的结果。
- [0022] 图 14 描述了在对于  $\text{A}\beta_{25-35}$  的剂量效应荧光体外分析中使用长梗马兜铃素的结果。
- [0023] 图 15 描述了在对于  $\text{A}\beta_{25-35}$  的剂量效应荧光体外分析中使用安石榴苷的结果。
- [0024] 图 16 描述了在对于  $\text{A}\beta_{25-35}$  的剂量效应荧光体外分析中使用化合物 A (3I) 的结果。
- [0025] 图 17 描述了在对于  $\text{A}\beta_{25-35}$  的剂量效应荧光体外分析中使用特里马素的结果。
- [0026] 图 18 描述了在对于  $\text{A}\beta_{25-35}$  的剂量效应荧光体外分析中使用鞣料云实素的结果。
- [0027] 图 19 描述了使用来自表现出包含安石榴苷 (剂量为  $500 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的石榴外皮的级分,表现出抑制由  $\text{A}\beta$  诱导的神经元毒性的 PC12 细胞分析的结果。
- [0028] 图 20 描述了本发明的几种石榴提取物的 HPLC 图谱 (254nm)。
- [0029] 图 21 描述了 PC12 细胞中  $\beta$ -淀粉样蛋白诱导的细胞死亡分析。
- [0030] 图 22 描述了提取物 1767 的几种细分级分的 HPLC 图谱。这些图谱通过装备有二极管阵列检测器 (DAD) 的使用  $250\text{mm} \times 4.6\text{mm} \text{ } \varnothing -0.5 \mu\text{m}$  Varian “XRS C18” 柱的 Varian 分析型 HPLC 获得。所使用的溶剂和梯度示于图 23。
- [0031] 图 23 描述了用于获得 HPLC 图谱的溶剂和梯度;和表现出有关抵抗  $\text{A}\beta$  毒性的 PC12 细胞存活的 1767 细分级分的生物活性的图表。所有细分级分以  $30 \mu\text{g}/\text{mL}$  来分析。细分级分 1767-2 和 1767-3 显示出最高的活性;因为它们还展示出它们的 HPLC 图谱的高度相似性,所以将它们合并用于进一步分馏和分析。
- [0032] 图 24 描述了在小鼠 AD 模型中 (四个月时开始施用) 采用石榴提取物 31008 的 3 个月治疗期结束时莫里斯水迷宫探测测试的结果。

[0033] 图 25 描述了在小鼠 AD 模型中（四个月时开始施用）采用石榴提取物 31008 的 3 个月治疗期结束时进行弥漫性淀粉样斑块染色的小鼠脑部切片的结果。

[0034] 图 26 描述了在小鼠 AD 模型中（两个月时开始施用）采用安石榴苷或石榴提取物 31008（以两种不同的剂量，低和高）、提取物 61109 和提取物 71109 的 3 个月治疗期结束时莫里斯水迷宫探测测试的结果。

[0035] 图 27 描述了采用年老的大鼠的社会认知研究的结果（其中提取物是 31008）。

[0036] 图 28 描述了采用年老的大鼠的莫里斯水迷宫反向测试的结果（其中提取物是 31008 并且剂量是 30  $\mu$ g/mL）。

[0037] 图 29 描述了化合物 A。

[0038] 图 30 描述了表现出通过被赋予渐增的极性的各种溶剂的超声辅助的连续石榴外皮提取的流程图；和由此产生的提取物的 HPLC 图谱。这些图谱通过装备有二极管阵列检测器 (DAD) 的使用 250mm x 4.6mm  $\text{Ø}0.5$  mm “XRS pursuit” 二苯基柱的 Varian 分析型 HPLC 获得。所使用的溶剂和梯度示于图 31。

[0039] 图 31 描述了用于获得 HPLC 图谱的溶剂和梯度；和表现出有关抵抗 A $\beta$  毒性的 PC12 细胞存活的外皮细分级分的生物活性的图表。所有细分级分以 500  $\mu$ g/mL 来分析。级分 1776 显示出最高的活性和非常有趣的 HPLC 图谱，有别于主峰看起来像安石榴苷的 1777 和 1778 的图谱。本结果可以表明与安石榴苷不同的另一种化合物能够保护 PC12 细胞免受 A $\beta$  诱导的毒性。因此选出 1776 以用于进一步分馏。在提取物级分 1776 中鉴定出特里马素。

[0040] 发明详述

[0041] 本发明的某些方面涉及化合物（以及含有所述化合物的提取物和组合物）和用于给有其需要的受试者有效施用所述化合物、提取物或组合物的方法。

[0042] 淀粉样变性

[0043] 在某些实施方案中，所述化合物抑制导致 A $\beta$  肽聚集（即淀粉样斑块形成）的蛋白质折叠。

[0044] 许多不能治愈的、与老化相关的或退行性的疾病已与一个被称作“淀粉样变性”的蛋白质或肽的错误折叠和聚集的通用的和基本的发病过程联系起来。这些疾病包括阿尔茨海默症、帕金森氏症和亨廷顿氏症以及 II 型糖尿病。出现在这些疾病中的淀粉样沉积物由这些疾病中每一种疾病所特有的特殊的肽组成，但是不管其序列如何，淀粉样原纤维都具有特征性的  $\beta$ -片层结构并且都有共同的聚集途径。在每一种疾病中，特异性蛋白质或肽错误折叠、采用  $\beta$ -片层结构和寡聚化以形成原纤维形成过程中的可溶性聚集中间体，最终形成不溶性淀粉样纤维、斑块或包结物。聚集的蛋白质或肽的这些不溶性形式通过从  $\beta$ -折叠链到  $\beta$ -片层的分子间缔合来形成。最近的证据表明，可溶性淀粉样寡聚体可能是神经毒性的主要成因。

[0045] 淀粉样变性被定义为疾病，其中通常可溶性蛋白质在各种组织中积累成为富含  $\beta$ -片层结构并且具有特征性的染料结合特性的原纤维的不溶性沉积物。尽管包含沉积物的特异性多肽的淀粉样变性各有不同，这些障碍具有几个共同的主要特征。其中最突出的是可高度溶解于生物流体中的蛋白质逐步被转换成富含  $\beta$ -折叠片层构象的不溶性丝状聚合物的能力。

[0046] 此外,它们倾向于通过类似的分子机制形成(通过从 $\beta$ -折叠链到扩展的 $\beta$ -片层的分子间缔合),因此其倾向于共有类似的分子结构和共同的结合特定染料(如刚果红和硫黄素 T) 的能力。

[0047] 本文被共同称为“淀粉样蛋白相关疾病”的这些疾病和障碍主要分为两类:(a) 影响脑部和中枢神经系统其他部位的疾病和障碍;和(b) 影响周身其他器官或组织的疾病和障碍。

[0048] 被归为这两类的淀粉样蛋白相关疾病的实例在下面两部分中列举;然而,许多已知的罕见、遗传性淀粉样蛋白相关疾病的其他实例不包括在内,并且今后有可能发现淀粉样蛋白相关疾病的另外的形式。

[0049] 与淀粉样变性相关的神经退行性疾病

[0050] 取决于具体的疾病,许多不同的神经退行性疾病与脑部特定部位或中枢神经系统其他部位中特异性蛋白质或肽的错误折叠和聚集有关。该类疾病的实例如下。

[0051] 不同形式的阿尔茨海默症(AD)以及唐氏综合征、伴有淀粉样变性的遗传性脑出血(HCHWA,荷兰型)、脑淀粉样血管病、以及可能的轻度认知损伤和其他形式的痴呆症与名为 $\beta$ -淀粉样肽的40/42个残基的肽即 $A\beta$ (1-40)或 $A\beta$ (1-42)的聚集相关,取决于具体的疾病,所述聚集在大脑皮层、海马区或脑部的其他部位中形成不溶性淀粉样纤维和斑块。阿尔茨海默症还与名为tau的高度磷酸化蛋白质的聚集导致的神经原纤维缠结的形成相关,其还出现在额颞叶型痴呆症(皮克病)中。

[0052] 帕金森氏症(PD)、路易体痴呆症(DLB)、和多系统性萎缩(MSA)与名为 $\alpha$ -突触核蛋白的蛋白质的聚集相关,其导致名为“路易体”的不溶性包结物的形成。亨廷顿氏症(HD)、脊髓和延髓肌肉萎缩(SBMA,也被称为肯尼迪氏症)、齿状核红核苍白球丘脑底核萎缩(DRPLA)、不同形式的脊髓小脑萎缩(SCA,1、2、3、6和7型)、和其他几种可能的可遗传的神经退行性疾病与包含异常扩展的谷氨酰胺重复(多聚谷氨酰胺的扩展束(extended tract))的多种蛋白质和肽的聚集相关。克雅二氏症(CJD)、牛的疯牛病(BSE)、绵羊的羊瘙痒症、库鲁病、GSS三氏症(Gerstmann-Straussler-Scheinker disease, GSS)、致命性家族性失眠症、和所有其他形式的可能的传播性脑病与朊蛋白的自传输错误折叠和聚集相关。

[0053] 肌萎缩性脊髓侧索硬化症(ALS)和某些其他形式的可能的运动神经元疾病(MND)与名为超氧化物歧化酶的蛋白质的聚集相关。

[0054] 家族性英国型痴呆症(FBD)和家族性丹麦型痴呆症(FDD)分别与源自BRI蛋白质的ABri和ADan肽序列的聚集相关。

[0055] 伴有淀粉样变性的遗传性脑出血(HCHWA,冰岛型)与名为胱抑素C的蛋白质的聚集相关。

[0056] 与淀粉样变性相关的系统性疾病

[0057] 除了上述所列的神经退行性疾病以外,许多系统性与老化相关的或退行性的疾病与周身其他各种组织(即脑部以外)中特定的蛋白质或肽的错误折叠和聚集相关。该类疾病的实例如下。

[0058] II型糖尿病(也被称为成年发病型糖尿病或非胰岛素依赖型糖尿病)与名为胰岛淀粉样多肽(IAPP,或“胰淀素”)的37个残基的肽的聚集相关,所述聚集形成不溶性沉积物,所述不溶性沉积物与胰腺的胰岛中产生胰岛素的 $\beta$ 细胞的逐步破坏相关。

[0059] 与透析相关的淀粉样变性 (DRA) 和前列腺淀粉样蛋白与名为  $\beta_2$ -微球蛋白的蛋白质的聚集相关,所述聚集或者在长期的血液透析中出现在患有 DRA 的骨骼、关节和肌腱中,或者在前列腺淀粉样蛋白情况下出现在前列腺中。

[0060] 原发性系统性淀粉样变性、系统性 AL 淀粉样变性和与骨髓瘤相关的淀粉样变性与免疫球蛋白的轻链(或者在某些情况下是免疫球蛋白的重链)聚集成不溶性淀粉样沉积物相关,所述沉积物逐渐在多种主要器官如肝脏、肾脏、心脏和胃肠道 (GI) 中积累。

[0061] 反应性的系统性 AA 淀粉样变性、继发性的系统性淀粉样变性、家族性地中海热以及慢性炎症疾病与血清淀粉样蛋白 A 的聚集相关,所述聚集形成不溶性淀粉样沉积物,所述沉积物在主要器官如肝脏、肾脏和脾脏中积累;老年性的系统性淀粉样变性 (SSA)、家族性淀粉样变性多发性神经病 (FAP) 以及家族性淀粉样变性心肌病 (FAC) 与转甲状腺素蛋白 (TTR) 的不同突变体的错误折叠和聚集相关,所述错误折叠和聚集在各种器官和组织如心脏(特别是在 FAC 中)、外周神经(特别是在 FAP 中)和胃肠道 (GI) 中形成不溶性包结物。家族性淀粉样变性多发性神经病 (FAP, II 型) 的另一种形式与所述外周神经中载脂蛋白 AI 的聚集相关;家族性内脏淀粉样变性和遗传性非神经病性系统性淀粉样变性与溶菌酶的各种突变体的错误折叠和聚集相关,所述错误折叠和聚集在主要的器官如肝脏、肾脏和脾脏中形成不溶性沉积物。

[0062] 芬兰型遗传性系统性淀粉样变性与眼中(尤其是角膜中)名为凝溶胶蛋白的蛋白质的聚集相关。

[0063] 纤维蛋白原  $\alpha$  链淀粉样变性与纤维蛋白原 A 的  $\alpha$  链的聚集相关,所述聚集在各种器官如肝脏和肾脏中形成不溶性淀粉样沉积物。

[0064] 与胰岛素相关的淀粉样变性通过胰岛素的聚集出现在糖尿病患者的注射位点中。

[0065] 甲状腺髓样癌与周围组织中降钙素的聚集相关。

[0066] 孤立性心房淀粉样变性与心脏中心房钠尿肽 (ANP) 的聚集相关。

[0067] 各种形式的白内障与眼的晶状体中  $\gamma$ -晶体蛋白的聚集相关。

[0068] 与淀粉样蛋白相关的疾病的发病机制

[0069] 虽然与淀粉样蛋白相关的所有疾病共有淀粉样变性的共同的发病过程,但是精确的分子机制是不清楚的,通过所述分子机制,该蛋白质/肽的错误折叠和聚集的普通过程关系到受感染组织的逐步退化。在一些情况下,包括许多与淀粉样蛋白相关的系统性疾病,人们认为不溶性蛋白质或肽的纯粹质量 (sheer mass) 仅充斥于被感染的组织中,最终导致急性器官衰竭。在其他情况下,包括大部分上述所列的神经退行性疾病,疾病的症状伴随仅仅非常小的聚集体的出现而发展。因此,已表明所述不溶性沉积物本身是有毒性的并且可能引起细胞的逐步破坏,例如通过引起炎症和氧化应激,或通过直接干扰细胞膜或其他细胞成分或过程。

[0070] 近来,已经接受的是,涉及至少一些的这些与淀粉样蛋白相关的疾病的特异性蛋白质和肽在它们的聚集过程中形成各种可溶性寡聚体种类,所述寡聚体种类的大小范围从二聚体和三聚体至包含数十个或者甚至数百个或数千个蛋白质或肽的单体的更大得多的种类。此外,对于不含不溶性聚集体的体外细胞而言,所述寡聚体本身是有毒性的,并且它们似乎共有共同的结构特征,因为虽然它们可以通过含有极其不同的氨基酸序列的蛋白质或肽形成,但是它们都能够被相同的抗体识别。

[0071] 这些有毒的可溶性寡聚体的分子结构是未知的并且它们杀灭细胞的精确的机制也是不清楚的,但是人们已经提出几种理论。根据一种名为“通道假说(channel hypothesis)”的理论,所述寡聚体形成不均匀的孔和有漏洞的离子通道,其允许离子自由流动穿过细胞膜,从而破坏它们的完整性,最终引起细胞死亡。可选择地,或额外地,所述寡聚体可以形成原纤维,所述原纤维通过类似的或不同的机制杀灭细胞。

[0072] 然而,不论所述精确的发病机制如何,已积累有压倒性数量的证据表明蛋白质/肽的聚集的普通过程是这些以及其他可能的与淀粉样蛋白相关的疾病的主要成因。

[0073] 本发明涉及化合物、提取物和组合物,所述化合物、提取物和组合物是与淀粉样蛋白相关的毒性的抑制剂并且它们本身在与淀粉样蛋白相关的疾病和障碍的治疗中是有用的。

[0074] 与淀粉样蛋白相关的疾病和障碍的早期检测

[0075] 在发病过程的早期检测疾病通常是合乎需要的。早期检测能够实现早期治疗,通常已被证明会在治疗各种疾病中产生较高的成功率。近来,已发现分析人们的眼,并且特别是眼的晶状体,能够产生各种类型的疾病的指征。例如,对眼中光散射进行的测量已表现出提供有用的诊断信息以检测和监控如阿尔茨海默症的疾病的进程。美国专利申请公开号 2008/0088795 和美国专利号 7,107,092 ;将二者通过全文引用并入文中。此外,采用 MRI 和 PET 扫描、ELISA 分析、和衍射增强成像 (DEI) 测量的脑部中的变化,独立地或与记忆测试和体液中风险蛋白的检测联合地,也可以获得阿尔茨海默症的更早的和更准确的诊断。

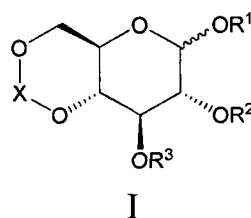
[0076] 本发明的化合物

[0077] 本发明的一个方面涉及化合物,当被施用,所述化合物导致神经退行性障碍的治疗或预防和 / 或脑部健康的改善。如在下面更加详细地讨论的,在某些实施方案中,所述化合物的施用导致采用包含一种或多种本发明的化合物的组合物喂养的动物的脑中淀粉样原纤维的较少沉积 ;和导致采用包含一种或多种本发明的化合物的组合物喂养的动物的记忆的增加或恢复。

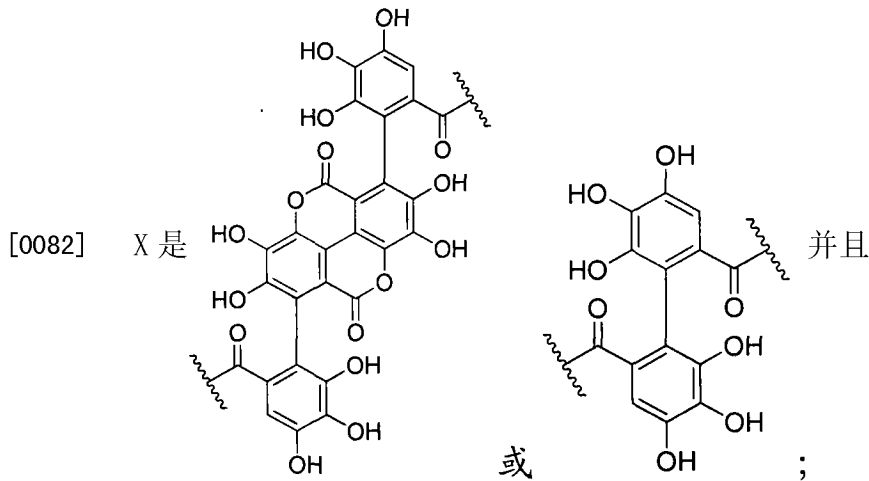
[0078] 例如,本发明的化合物包括石榴皮鞣素、安石榴苷、长梗马兜铃素、特里马素、鞣料云实素、石榴皮亭 A、石榴皮亭 B、特米纳素 (Terminalin)、没食子酰双内酯、和化合物 A、及其药学上可接受的盐、生物学活性代谢物、溶剂化物、水合物、前药、对映异构体或立体异构体。

[0079] 本发明还涉及纯的和分离的化合物,或其药学上可接受的盐、生物学活性代谢物、溶剂化物、水合物、前药、对映异构体或立体异构体 ;其中所述化合物由式 I 表示 :

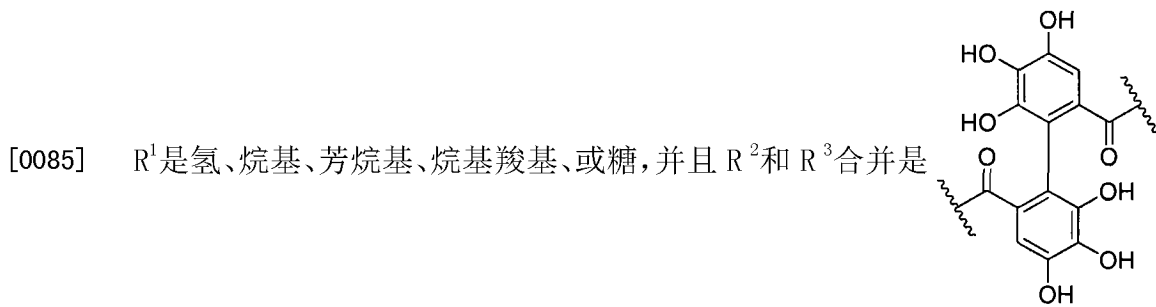
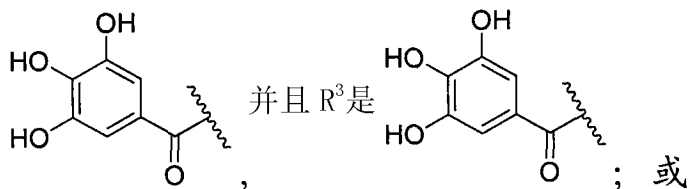
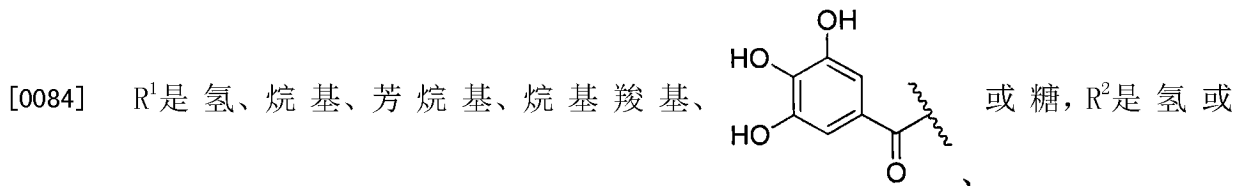
[0080]



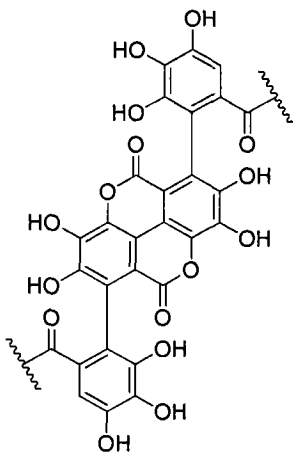
[0081] 其中对于每一种出现独立地



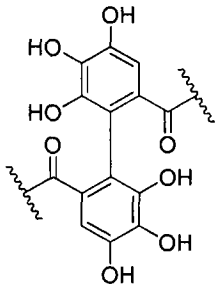
[0083] R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>和 R<sup>3</sup>各自独立地是氢、烷基、芳烷基、烷基羧基、或糖；或



[0086] 在某些实施方案中，本发明涉及上述化合物中的任一种，其中 X 是



[0087] 在某些实施方案中，本发明涉及上述化合物中的任一种，其中 X 是



[0088] 在某些实施方案中,本发明涉及上述化合物中的任一种,其中  $R^1$  是氢。

[0089] 在某些实施方案中,本发明涉及上述化合物中的任一种,其中  $R^1$  是选自阿洛糖 (“All”)、阿卓糖 (“Alt”)、阿拉伯糖 (“Ara”)、赤藓糖、赤藓酮糖、果糖 (“Fru”)、岩藻糖胺 (“FucN”)、岩藻糖 (“Fuc”)、半乳糖胺 (“GalN”)、半乳糖 (“Gal”)、没食子酰- $\beta$ -葡萄糖、葡萄糖胺 (“GlcN”)、葡萄糖胺醇 (glucosaminitol, “GlcN-ol”)、葡萄糖 (“Glc”)、甘油醛、2,3-二羟基丙醛、甘油 (“Gro”)、丙烷-1,2,3-三醇、甘油酮 (“1,3-二羟基丙酮”)、1,3-二羟基丙酮、古洛糖 (“Gul”)、艾杜糖 (“Ido”)、来苏糖 (“Lyx”)、甘露糖胺 (“ManN”)、甘露糖 (“Man”)、阿洛酮糖 (“Psi”)、异鼠李糖 (“Qui”)、异鼠李糖胺、鼠李糖醇 (“Rha-ol”)、鼠李糖胺 (“RhaN”)、鼠李糖 (“Rha”)、核糖 (“Rib”)、核酮糖 (“Rul”)、芸香糖、唾液酸 (“Sia”或“Neu”)、山梨糖 (“Sor”)、塔格糖 (“Tag”)、塔罗糖 (“Tal”)、酒石酸、赤藓糖/苏阿糖酸、苏阿糖、木糖 (“Xyl”)、或木酮糖 (“Xul”) 的糖。

[0090] 在某些实施方案中,本发明涉及上述化合物中的任一种,其中  $R^2$  是氢。

[0091] 在某些实施方案中,本发明涉及上述化合物中的任一种,其中  $R^2$  是选自阿洛糖 (“All”)、阿卓糖 (“Alt”)、阿拉伯糖 (“Ara”)、赤藓糖、赤藓酮糖、果糖 (“Fru”)、岩藻糖胺 (“FucN”)、岩藻糖 (“Fuc”)、半乳糖胺 (“GalN”)、半乳糖 (“Gal”)、没食子酰- $\beta$ -葡萄糖、葡萄糖胺 (“GlcN”)、葡萄糖胺醇 (“GlcN-ol”)、葡萄糖 (“Glc”)、甘油醛、2,3-二羟基丙醛、甘油 (“Gro”)、丙烷-1,2,3-三醇、甘油酮 (“1,3-二羟基丙酮”)、1,3-二羟基丙酮、古洛糖 (“Gul”)、艾杜糖 (“Ido”)、来苏糖 (“Lyx”)、甘露糖胺 (“ManN”)、甘露糖 (“Man”)、阿洛酮糖 (“Psi”)、异鼠李糖 (“Qui”)、异鼠李糖胺、鼠李糖醇 (“Rha-ol”)、鼠李糖胺 (“RhaN”)、鼠李糖 (“Rha”)、核糖 (“Rib”)、核酮糖 (“Rul”)、芸香糖、唾液酸 (“Sia”或“Neu”)、山梨糖 (“Sor”)、塔格糖 (“Tag”)、塔罗糖 (“Tal”)、酒石酸、赤藓糖/苏阿糖酸、苏阿糖、木糖 (“Xyl”)、或木酮糖 (“Xul”) 的糖。

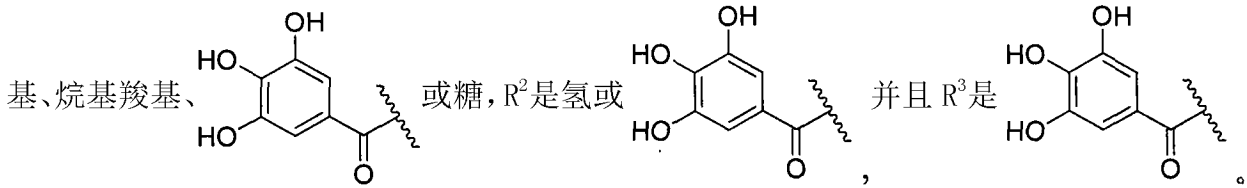
[0092] 在某些实施方案中,本发明涉及上述化合物中的任一种,其中  $R^3$  是氢。

[0093] 在某些实施方案中,本发明涉及上述化合物中的任一种,其中  $R^3$  是选自阿洛糖 (“All”)、阿卓糖 (“Alt”)、阿拉伯糖 (“Ara”)、赤藓糖、赤藓酮糖、果糖 (“Fru”)、岩藻糖胺 (“FucN”)、岩藻糖 (“Fuc”)、半乳糖胺 (“GalN”)、半乳糖 (“Gal”)、没食子酰- $\beta$ -葡萄糖、葡萄糖胺 (“GlcN”)、葡萄糖胺醇 (“GlcN-ol”)、葡萄糖 (“Glc”)、甘油醛、2,3-二羟基丙醛、甘油 (“Gro”)、丙烷-1,2,3-三醇、甘油酮 (“1,3-二羟基丙酮”)、1,3-二羟基丙酮、古洛糖 (“Gul”)、艾杜糖 (“Ido”)、来苏糖 (“Lyx”)、甘露糖胺 (“ManN”)、甘露糖 (“Man”)、阿洛酮糖 (“Psi”)、异鼠李糖 (“Qui”)、异鼠李糖胺、鼠李糖醇 (“Rha-ol”)、鼠李糖胺 (“RhaN”)、鼠李糖 (“Rha”)、核糖 (“Rib”)、核酮糖 (“Rul”)、芸香糖、唾液酸 (“Sia”或“Neu”)、山梨糖 (“Sor”)、塔格糖 (“Tag”)、塔罗糖 (“Tal”)、酒石酸、赤藓糖/苏阿糖酸、苏阿糖、木糖 (“Xyl”)、或木酮糖 (“Xul”) 的糖。

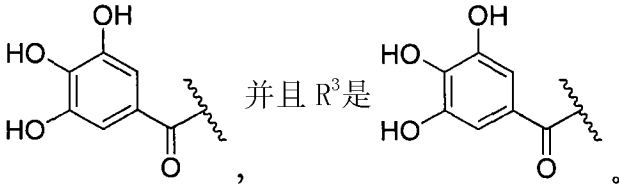
[0094] 在某些实施方案中,本发明涉及上述化合物中的任一种,其中  $R^1$ 、 $R^2$ 和  $R^3$ 各自独立地是氢、烷基、芳烷基、烷基羧基、或糖。

[0095] 在某些实施方案中,本发明涉及上述化合物中的任一种,其中  $R^1$ 、 $R^2$ 和  $R^3$ 是氢。

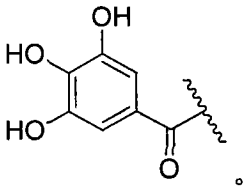
[0096] 在某些实施方案中,本发明涉及上述化合物中的任一种,其中  $R^1$ 是氢、烷基、芳烷基、烷基羧基、或糖,  $R^2$ 是氢或



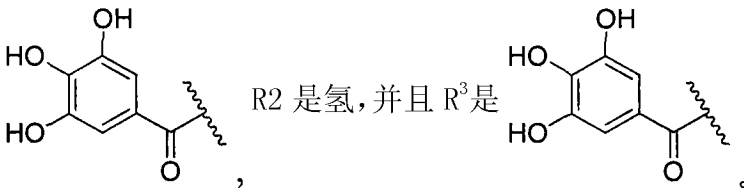
[0097] 在某些实施方案中,本发明涉及上述化合物中的任一种,其中  $R^1$ 是氢,  $R^2$ 是



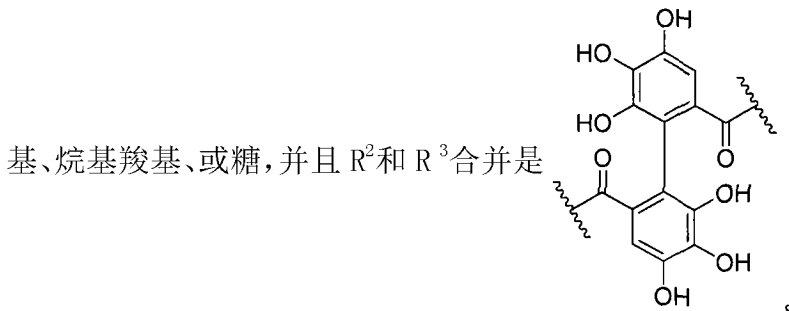
[0098] 在某些实施方案中,本发明涉及上述化合物中的任一种,其中  $R^1$ 是



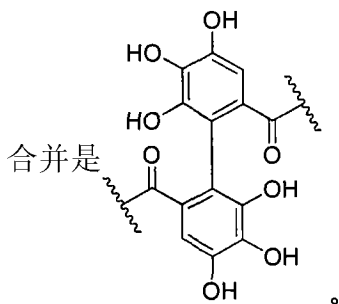
[0099] 在某些实施方案中,本发明涉及上述化合物中的任一种,其中  $R^1$ 是



[0100] 在某些实施方案中,本发明涉及上述化合物中的任一种,其中  $R^1$ 是氢、烷基、芳烷基、烷基羧基、或糖,并且  $R^2$ 和  $R^3$ 合并是



[0101] 在某些实施方案中,本发明涉及上述化合物中的任一种,其中  $R^1$ 是氢,并且  $R^2$ 和  $R^3$



[0102] 本发明还涵盖式 I 的多聚体,比如二聚体,其中所述式的两个单体被结合在一起,

如Reed, J. D., C. G. Krueger, 等人, (2005). “MALDI-TOF mass spectrometry of oligomeric food polyphenols (寡聚食品多酚的MALDI-TOF质谱法)” *Phytochemistry* 66(18): 2248-63 所描述。所述二聚体是天然存在的鞣花单宁的二聚体;它们的详细结构没有完全被解析,但是它们包含本发明中定义的基本结构骨架。三聚体、四聚体和更大的寡聚体也涵盖于本发明中。换言之,例如含有二、三、四、五、六、七、八、九、十、或更多个重复的多聚体涵盖于本发明中。

[0103] 含有酸性取代基的本发明的某些化合物可以作为含有药学上可接受的酸或碱的盐而存在。本发明的所述化合物中的一些可以作为含有药学上兼容的抗衡离子的盐(即,药学上可接受的盐)而被提供。“药学上可接受的盐”是指,施用给接受者后,能够直接或间接地提供本发明的化合物或化合物的前药的任何无毒性的盐。“药学上可接受的抗衡离子”是,施用给接受者后,从所述盐中被释放时是无毒性的盐的离子部分。药学上相容的盐可以由一些酸形成,所述酸包括但不限于盐酸、硫酸、乙酸、乳酸、酒石酸、苹果酸、琥珀酸、等。盐与其相应的游离碱的形式相比,倾向于更加可溶解于水性的或其他质子的溶剂中。

[0104] 通常用于形成药学上可接受的盐的酸包括无机酸如氢硫酸、盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸和磷酸,以及有机酸如对甲苯磺酸、水杨酸、酒石酸、双酒石酸、抗坏血酸、马来酸、苯磺酸、富马酸、葡萄糖酸、葡萄糖醛酸、甲酸、谷氨酸、甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、乳酸、草酸、对溴苯磺酸、碳酸、琥珀酸、枸橼酸、苯甲酸和乙酸,和相关的无机酸和有机酸。所述药学上可接受的盐由此包括硫酸盐、焦硫酸盐、氢硫酸盐、亚硫酸盐、亚硫酸氢盐、磷酸盐、磷酸一氢盐、磷酸二氢盐、偏磷酸盐、焦磷酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、乙酸盐、丙酸盐、癸酸盐、辛酸盐、丙烯酸盐、甲酸盐、异丁酸盐、癸酸盐、庚酸盐、丙炔酸盐、草酸盐、丙二酸盐、琥珀酸盐、辛二酸盐、癸二酸盐、富马酸盐、马来酸盐、丁炔-1,4-二酸盐、己炔-1,6-二酸盐、苯甲酸盐、氯苯甲酸盐、甲基苯甲酸盐、二硝基苯甲酸盐、羟基苯甲酸盐、甲氧基苯甲酸盐、邻苯二甲酸盐、对苯二甲酸盐、磺酸盐、二甲苯磺酸盐、苯乙酸盐、苯丙酸盐、苯丁酸盐、枸橼酸盐、乳酸盐、 $\beta$ -羟基丁酸盐、甘醇酸盐、马来酸盐、酒石酸盐、甲磺酸盐、丙磺酸盐、1-萘磺酸盐、2-萘磺酸盐、扁桃酸盐等等。示例性的药学上可接受的酸加成盐包括采用矿物酸如盐酸和氢溴酸所形成的那些盐,和特别是采用有机酸如马来酸所形成的那些盐。

[0105] 用于与酸性官能团形成药学上可接受的盐的适合的碱包括,但不限于,碱金属如钠、钾、和锂的氢氧化物;碱土金属如钙和镁的氢氧化物;其他金属,如铝和锌的氢氧化物;氨,和有机胺,如无取代的或羟基取代的单、二、或三烷基胺;双环己基胺;三丁基胺;吡啶;N-甲基、N-乙基胺;二乙基胺;三乙基胺;单、双、或三-(2-羟基-低级烷基胺),如单、双、或三-(2-羟基乙基)胺、2-羟基叔丁基胺、或三-(羟基甲基)甲基胺,N,N-二烷基-N-(羟基烷基)-胺,如N,N-二甲基-N-(2-羟基乙基)胺、或三-(2-羟基乙基)胺;N-甲基-D-葡萄糖胺;和氨基酸如精氨酸、赖氨酸、等等。

[0106] 本发明的某些化合物及其盐可以以多于一种的晶型存在并且本发明包括每一种单独的晶型及其混合物。

[0107] 本发明的某些化合物及其盐也可以以溶剂化物的形式存在,例如水合物,并且本发明包括每一种溶剂化物及其混合物。

[0108] 本发明的某些化合物可以包含一个或多个手性中心,并且以不同的光学活性形式存在。当本发明的化合物包含一个手性中心时,所述化合物存在两种对映异构形式并且本

发明不但包括对映异构体而且包括对映异构体的混合物,如外消旋混合物。所述对映异构体可以通过本领域技术人员已知的方法被拆分,例如通过可以被分离的非对映异构的盐的形成,例如,通过结晶化;可以被分离的非对映异构的衍生物或复合物的形成,例如,通过结晶化、气-液或液相色谱法;一种对映异构体与对映异构体特异性试剂的选择性反应,例如酶的酯化反应;或者手性环境中的气-液或液相色谱法,例如在含有结合手性配体的手性载体例如二氧化硅上或在存在手性溶剂的情况下。可以理解的是,在所需的对映异构体通过上述的分离过程之一被转换为另一种化学实体的情况下,进一步的步骤可以用于释放所需的对映异构形式。可选择地,特异性对映异构体可以通过使用光学活性的试剂、底物、催化剂或溶剂的不对称合成,或者通过不对称转换将一种对映异构体转换为另一种来合成。

[0109] 当本发明的化合物包含多于一个的手性中心时,它可以以非对映异构形式存在。所述非对映异构化合物可以通过本领域技术人员已知的方法进行分离,例如色谱法或结晶化并且单独的对映异构体可以如上所述地进行分离。本发明包括本发明的化合物的每一种非对映异构体及其混合物。

[0110] 本发明的某些化合物可以以不同的互变异构形式或作为不同的几何异构体存在,并且本发明包括本发明的化合物的每一种互变异构体和/或几何异构体及其混合物。

[0111] 本发明的某些化合物可以以可以被分离的不同的稳定构象形式存在。由于围绕不对称单键的受限制的旋转,例如由于空间位阻或环张力,扭转的不对称性可以允许不同的构象异构体的分离。本发明包括本发明的化合物的每一种构象异构体及其混合物。

[0112] 本发明的某些化合物可以以两性离子形式存在并且本发明包括本发明的化合物的每一种两性离子形式及其混合物。

[0113] 本文中使用的术语“前药”是指通过一些生理学的化学过程在体内被转换为原药的药剂(例如,经引导至生理学 pH 的前药被转换为所需的药物形式)。在一些情况下,前药通常是有用的,因为与所述原药相比,它们可以更加容易地施用。例如,它们可以通过口服施用而生物可利用的,然而所述原药则不可以。与所述原药相比,所述前药在药物组合中还可以具有改善的溶解度。不受限制地,前药的例子将是本发明的化合物,其中它作为酯(所述“前药”)施用以促进跨越细胞膜(在那里水溶性是不利的)的传输,但是一旦进入所述细胞(在那里水溶性是有利的)内部,它随后被代谢性地水解为羧酸。前药具有许多有用的性质。例如,前药比所述最终药物的水溶性高,从而促进所述药物的静脉内施用。与所述最终药物相比,前药还可以具有较高水平的口服生物利用度。施用后,通过酶或化学的方法切割所述前药以便在血液或组织中递送最终药物。

[0114] 经切割,示例性的前药释放出相应的游离酸,并且本发明的化合物的所述可水解的成酯残基包括但不限于羧基取代基(例如,  $-C(O)_2H$  或包含羧酸的部分),其中游离氢被  $(C_1-C_4)$  烷基、 $(C_2-C_{12})$  烷酰氧基甲基、 $(C_4-C_9)$  1-(烷酰氧基)乙基、含有 5 至 10 个碳原子的 1-甲基-1-(烷酰氧基)-乙基、含有 3 至 6 个碳原子的烷氧羰基氧基甲基、含有 4 至 7 个碳原子的 1-(烷氧羰基氧基)乙基、含有 5 至 8 个碳原子的 1-甲基-1-(烷氧羰基氧基)乙基、含有 3 至 9 个碳原子的 N-(烷氧羰基)氨基甲基、含有 4 至 10 个碳原子的 1-(N-(烷氧羰基)氨基)乙基、3-酞基、4-巴豆酸内酯基、 $\gamma$ -丁内酯-4-基、二-N, N- $(C_1-C_2)$  烷基  $(C_2-C_3)$  烷基(如  $\beta$ -二甲基氨基乙基)、氨基甲酰基- $(C_1-C_2)$  烷基、N, N-二  $(C_1-C_2)$ -烷基氨基甲酰基- $(C_1-C_2)$  烷基和哌啶-、吡咯烷-或吗啉  $(C_2-C_3)$  烷基代替。

[0115] 示例性的前药释放出本发明的化合物的羟基,其中羟基的游离氢被(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷酰氧基甲基、1-((C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷酰氧基)乙基、1-甲基-1-((C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷酰氧基)乙基、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷氧羰基-氧基甲基、N-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷氧羰基氨基-甲基、琥珀酰基、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷酰基、 $\alpha$ -氨基(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)烷酰基、芳酰基和 $\alpha$ -氨酰基、或 $\alpha$ -氨酰基- $\alpha$ -氨酰基代替,其中所述 $\alpha$ -氨酰基部分独立地是在蛋白质中发现的任何天然存在的L-氨基酸、-P(O)(OH)<sub>2</sub>、-P(O)(O(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基)<sub>2</sub>或糖基(糖的半缩醛羟基的分离产生的基团)。

[0116] 可以分离和提取化合物(即,从和它一起天然存在的化合物中分离),或者它可以合成制备(即,使用工艺合成生产)以便在任何情况下,污染化合物或杂质的水平均无法减弱本发明的化合物的有效性或对所述有效性产生不利的影响。

[0117] 本发明的某些化合物可以从天然来源中提取,所述天然来源如石榴(*Punica granatum*)的汁液、树叶、树皮、果皮、或皮。Lansky, E. P. 和 R. A. Newman (2007). " *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer (石榴及其用于预防和治疗炎症和癌症的潜能). " *J Ethnopharmacol* 109(2):177-206. 所述化合物中的一些还可以从核桃、野鸭椿(*Euscaphis japonica*)、柔毛水杨梅(*Geum japonicum* Thunb. var. *chinense*)、黑莓(悬钩子属(*Rubus* sp.))、胡桃(*Juglans regia*)、多香果(*Pimenta dioica*)、麻栎树、槭树、山茱萸(*Cornus officinalis*)、印度硬毛猕猴桃(*Embllica officinalis*) (印度醋栗)、诃子(*Terminalia chebula* Retz)、和榄仁树(*Terminalia catappa* L),以及其他类似的物种中分离。

[0118] 例如,石榴皮鞣素、安石榴苷、长梗马兜铃素和特里马素之前已被分离和表征。Tanaka, K., G. Nonaka, 等人.(1986). " Tannins and Related Compounds. XLI. 1) Isolation and Characterization of Novel Ellagitannins, Punicacorteins A, B, C, and Punigluconin from the bark of *Punica granatum* L. " *Chem. Pharm. Bull* 34(2):656-663; Tanaka, K., G. Nonaka, 等人.(1986). " Tannins and Related Compounds. XLI. 1). Revision of the Structures of Punicalin and Punicalagin, and Isolation and Characterization of 2-O-Galloylpunicalin from the Bark of *Punica granatum* L. " *Chem. Pharm. Bull* 34(2):650-655; 和 Satomi, H., K. Umemura, 等人.(1993). " Carbonic anhydrase inhibitors from the pericarps of *Punica granatum* L. " *Biol Pharm Bull* 16(8):787-90.

[0119] 在某些实施方案中,本发明的化合物为至少大约1%纯的高达大约99%纯的。在某些实施方案中,本发明的化合物为至少大约10%纯的。在某些实施方案中,所述化合物为至少大约20%纯的。在某些实施方案中,所述化合物为至少大约30%纯的。在某些实施方案中,所述化合物为至少大约40%纯的。在某些实施方案中,所述化合物为至少大约50%纯的。在某些实施方案中,所述化合物为至少大约60%纯的。在某些实施方案中,所述化合物为至少大约70%纯的。在某些实施方案中,所述化合物为至少大约80%纯的。在某些实施方案中,所述化合物为至少大约90%纯的。在某些实施方案中,所述化合物为至少大约95%纯的。在某些实施方案中,所述化合物为至少大约99%纯的。在某些实施方案中,包含具有任何上述纯度的一种或多种本发明的化合物的所述提取物还可以适合于用作功能食品和膳食补充剂或在所述功能食品和膳食补充剂中使用。下文中将更加充分地讨论所述提取物。

[0120] 本发明的一个方面涉及化合物、或其药学上可接受的盐、生物学活性代谢物、溶剂化物、水合物、前药、对映异构体或立体异构体,所述化合物产生了图 2 和图 3 中的图谱。

[0121] 本发明的一个方面涉及化合物、或其药学上可接受的盐、生物学活性代谢物、溶剂化物、水合物、前药、对映异构体或立体异构体,所述化合物产生了图 4 和图 5 中的图谱。

[0122] 本发明的一个方面涉及化合物、或其药学上可接受的盐、生物学活性代谢物、溶剂化物、水合物、前药、对映异构体或立体异构体,所述化合物产生了图 6 和图 7 中的图谱。

[0123] 本发明的一个方面涉及化合物、或其药学上可接受的盐、生物学活性代谢物、溶剂化物、水合物、前药、对映异构体或立体异构体,所述化合物产生了图 8 和图 9 中的图谱。

[0124] 本发明的一个方面涉及化合物、或其药学上可接受的盐、生物学活性代谢物、溶剂化物、水合物、前药、对映异构体或立体异构体,所述化合物产生了图 10 中的图谱。

[0125] 在某些实施方案中,本发明涉及任何前述的化合物,其中所述化合物、或其药学上可接受的盐、生物学活性代谢物、溶剂化物、水合物、前药、对映异构体或立体异构体通过从本文中所描述的植物材料中提取而制备。例如,本发明的一个方面涉及通过包括下述步骤的工艺制备的化合物:使用吸附剂以结合所述化合物;和将所述被结合的化合物从所述吸附剂中洗脱。

[0126] 分离 / 制备

[0127] 如上所述,富含一种或多种本发明的化合物的提取物可以从植物材料中回收,所述植物材料可以包括果实、外皮、汁液、叶、树干、等等。适合于提取的植物包括石榴。纯化方法在 Seeram 等人的美国专利申请公开号 US2008/0318877 有所描述,将其通过整体引用并入文中。

[0128] 来自所述植物材料材料悬浮液可以通过各种本领域已知的方法制备,例如混合和水提取。所述植物材料可以接受酶处理,包括但不限于提取酶(extractase)、果胶酶等等。将包含本发明的化合物的水性溶液应用于聚合物吸附剂柱,随后用水性缓冲液洗涤所述吸附剂柱以除去未被结合的材料。目标化合物结合在树脂上,并且可以被极性溶剂洗脱,所述极性溶剂例如,水、乙醇、甲醇、和丙酮。

[0129] 所述树脂具有吸附所述化合物的表面。一类吸附树脂是由苯乙烯和二乙烯基苯组成的聚合物交联树脂如,例如,AMBERLITE 系列树脂,例如,AMBERLITE XAD-16,可以从 Rohm & Haas Co., Philadelphia, PA 处商购得到。适合于根据本发明使用的其他聚合物交联苯乙烯和二乙烯基苯吸附树脂是 XFS-4257、XFS-4022、XUS-40323 和 XUS-40322,均由 The Dow Chemical Company, Midland, Michigan 生产。

[0130] 人们可以商购得到的、FDA 批准的、苯乙烯 - 二乙烯基 - 苯 (SDVB) 交联共聚物树脂, (例如, AMBERLITE XAD-16, 如美国专利号 4, 297, 220 中所描述, 将其通过引用并入文中)。这种树脂是非离子型疏水性的、交联的聚苯乙烯二乙烯基苯吸附剂树脂。AMBERLITE XAD-16 具有大孔结构,既含有连续的聚合物相 (polymer phase) 又含有连续的孔相 (pore phase)。在某些实施方案中,本发明所使用的树脂具有范围为 100-200 微米的粒度。

[0131] 其他吸附剂,如包含疏水性大孔树脂珠的,具有在 100-200 微米范围内粒度的 AMBERLITE XAD 吸附剂系列中的那些吸附剂,在本发明的方法中也可以是有效的。此外,不同种类的 AMBERLITES,如具有在 100-200 微米范围内粒度的 AMERCHROM CG 系列吸附剂,也可以适合于在本发明中使用。

[0132] 例如,采用水或水性缓冲液洗涤所述树脂以便从所述提取物中除去未被结合的物质。溶剂能够用于除去被吸附的化合物,如乙酸乙酯或丁醇。

[0133] 相对于起始材料,被洗脱的化合物基本上是纯的,并且可以被进一步纯化,例如,通过色谱法等,或者直接用于目标制剂中。使用本领域已知的方法,最终组合物可以被富集、过滤、透析等。

[0134] 在某些实施方案中,本发明提供了本发明的化合物、或其药学上可接受的盐、生物学活性代谢物、溶剂化物、水合物、前药、对映异构体或立体异构体,基本上不含有提取出所述化合物的植物材料中发现的其他化合物。本文中使用的术语“基本上不含有”是指与在提取出所述化合物的植物材料中发现的化合物或其提取物相比,所述化合物由显著更大比例的本发明的化合物、或其药学上可接受的盐、生物学活性代谢物、溶剂化物、水合物、前药、对映异构体或立体异构体组成。

[0135] 在一些实施方案中,本发明提供了本发明的化合物、或其药学上可接受的盐、生物学活性代谢物、溶剂化物、水合物、前药、对映异构体或立体异构体,量为大约 1 重量%至大约 99 重量%。

[0136] 在某些实施方案中,本发明的化合物以大于大约 2%的化学纯度提供。在某些实施方案中,本发明的化合物以大于大约 10%的化学纯度提供。在某些实施方案中,本发明的化合物以大于大约 20%的化学纯度提供。在某些实施方案中,本发明的化合物以大于大约 30%的化学纯度提供。在某些实施方案中,本发明的化合物以大于大约 40%的化学纯度提供。在某些实施方案中,本发明的化合物以大于大约 50%的化学纯度提供。在某些实施方案中,本发明的化合物以大于大约 75%的化学纯度提供。在某些实施方案中,本发明的化合物以大于大约 80%的化学纯度提供。在某些实施方案中,本发明的化合物以大于大约 85%的化学纯度提供。在某些实施方案中,本发明的化合物以大于大约 90%的化学纯度提供。

[0137] 在某些实施方案中,本发明的化合物以大约 2%的化学纯度至 10%的化学纯度提供。在某些实施方案中,本发明的化合物以大约 10%的化学纯度至 30%的化学纯度提供。在某些实施方案中,本发明的化合物以大约 20%的化学纯度至大约 40%的化学纯度之间提供。在某些实施方案中,本发明的化合物以大约 30%的化学纯度至大约 50%的化学纯度提供。在某些实施方案中,本发明的化合物以大约 40%的化学纯度至大约 60%的化学纯度提供。在某些实施方案中,本发明的化合物以大约 50%的化学纯度至大约 70%的化学纯度之间提供。在某些实施方案中,本发明的化合物以大约 75%的化学纯度至 95%的化学纯度提供。

[0138] 在其他实施方案中,相对于 HPLC 色谱图的总面积,本发明的化合物、或其药学上可接受的盐、生物学活性代谢物、溶剂化物、水合物、前药、对映异构体或立体异构体,包含提取出所述化合物的植物材料的其他组分的至多大约 50%面积的 HPLC。在其他实施方案中,相对于 HPLC 色谱图的总面积,本发明的化合物、或其药学上可接受的盐、生物学活性代谢物、溶剂化物、水合物、前药、对映异构体或立体异构体,包含提取出所述化合物的植物材料的其他组分的至多大约 25%面积的 HPLC。在其他实施方案中,相对于 HPLC 色谱图的总面积,本发明的化合物、或其药学上可接受的盐、生物学活性代谢物、溶剂化物、水合物、前药、对映异构体或立体异构体,包含提取出所述化合物的植物材料的其他组分的至多大约 20%面积的 HPLC。在其他实施方案中,相对于 HPLC 色谱图的总面积,本发明的化合物、或

其药学上可接受的盐、生物学活性代谢物、溶剂化物、水合物、前药、对映异构体或立体异构体,包含提取出所述化合物的植物材料的其他组分的至多大约 15% 面积的 HPLC。在其他实施方案中,相对于 HPLC 色谱图的总面积,本发明的化合物、或其药学上可接受的盐、生物学活性代谢物、溶剂化物、水合物、前药、对映异构体或立体异构体,包含提取出所述化合物的植物材料的其他组分的至多大约 10% 面积的 HPLC。在其他实施方案中,相对于 HPLC 色谱图的总面积,本发明的化合物、或其药学上可接受的盐、生物学活性代谢物、溶剂化物、水合物、前药、对映异构体或立体异构体,包含提取出所述化合物的植物材料的其他组分的至多大约 9% 面积的 HPLC。在其他实施方案中,相对于 HPLC 色谱图的总面积,本发明的化合物、或其药学上可接受的盐、生物学活性代谢物、溶剂化物、水合物、前药、对映异构体或立体异构体,包含提取出所述化合物的植物材料的其他组分的至多大约 8% 面积的 HPLC。在其他实施方案中,相对于 HPLC 色谱图的总面积,本发明的化合物、或其药学上可接受的盐、生物学活性代谢物、溶剂化物、水合物、前药、对映异构体或立体异构体,包含提取出所述化合物的植物材料的其他组分的至多大约 7% 面积的 HPLC。在其他实施方案中,相对于 HPLC 色谱图的总面积,本发明的化合物、或其药学上可接受的盐、生物学活性代谢物、溶剂化物、水合物、前药、对映异构体或立体异构体,包含提取出所述化合物的植物材料的其他组分的至多大约 6% 面积的 HPLC。在其他实施方案中,相对于 HPLC 色谱图的总面积,本发明的化合物、或其药学上可接受的盐、生物学活性代谢物、溶剂化物、水合物、前药、对映异构体或立体异构体,包含提取出所述化合物的植物材料的其他组分的至多大约 5% 峰面积的 HPLC。在某些实施方案中,所述植物来源是石榴。

[0139] 此外,本发明的化合物可以通过起始于在提取物中发现的其他化合物的半合成方法制备。这也可以通过已分离的化合物或提取物级分或化合物的混合物的化学或生物学转化来完成。化学转化可以通过,但不限于,温度、pH、和 / 或采用各种溶剂的处理的操作来完成。生物学转化可以通过,但不限于,采用植物组织、植物组织提取物、其他微生物或来自任何生物体的已分离的酶对已分离的化合物或提取物部分或化合物的混合物进行处理来完成。

[0140] 提取物

[0141] 本发明的一个方面涉及包含上述化合物、或其药学上可接受的盐、生物学活性代谢物、溶剂化物、水合物、前药、对映异构体或立体异构体的提取物。

[0142] 本发明的另一个方面涉及包含大约 1% 至大约 10% 的上述化合物、或其药学上可接受的盐、生物学活性代谢物、溶剂化物、水合物、前药、对映异构体或立体异构体的提取物。

[0143] 本发明的另一个方面涉及包含大约 10% 至大约 20% 的上述化合物、或其药学上可接受的盐、生物学活性代谢物、溶剂化物、水合物、前药、对映异构体或立体异构体的提取物。

[0144] 本发明的另一个方面涉及包含大约 20% 至大约 30% 的上述化合物、或其药学上可接受的盐、生物学活性代谢物、溶剂化物、水合物、前药、对映异构体或立体异构体的提取物。

[0145] 本发明的另一个方面涉及包含大约 30% 至大约 40% 的上述化合物、或其药学上可接受的盐、生物学活性代谢物、溶剂化物、水合物、前药、对映异构体或立体异构体的提取

物或组合物。

[0146] 本发明的另一个方面涉及包含大约 40% 至大约 50% 的上述化合物、或其药学上可接受的盐、生物学活性代谢物、溶剂化物、水合物、前药、对映异构体或立体异构体的提取物或组合物。

[0147] 本发明的另一个方面涉及包含大约 50% 至大约 60% 的上述化合物、或其药学上可接受的盐、生物学活性代谢物、溶剂化物、水合物、前药、对映异构体或立体异构体的提取物或组合物。

[0148] 本发明的另一个方面涉及包含大约 60% 至大约 70% 的上述化合物、或其药学上可接受的盐、生物学活性代谢物、溶剂化物、水合物、前药、对映异构体或立体异构体的提取物或组合物。

[0149] 本发明的另一个方面涉及包含大约 70% 至大约 80% 的上述化合物、或其药学上可接受的盐、生物学活性代谢物、溶剂化物、水合物、前药、对映异构体或立体异构体的提取物或组合物。

[0150] 本发明的另一个方面涉及包含大约 80% 至大约 90% 的上述化合物、或其药学上可接受的盐、生物学活性代谢物、溶剂化物、水合物、前药、对映异构体或立体异构体的提取物或组合物。

[0151] 本发明的另一个方面涉及包含大约 90% 至大约 95% 的上述化合物、或其药学上可接受的盐、生物学活性代谢物、溶剂化物、水合物、前药、对映异构体或立体异构体的提取物或组合物。

[0152] 本发明的另一个方面涉及包含大约 95% 至大约 99% 的上述化合物、或其药学上可接受的盐、生物学活性代谢物、溶剂化物、水合物、前药、对映异构体或立体异构体的提取物或组合物。

[0153] 在某些实施方案中,所述提取物是石榴提取物。

[0154] 组合物

[0155] 本发明的化合物和提取物可以用于配制药剂、营养物质、植物药、草药、食品添加剂、功能食品、医用食品、营养品、化妆品、饮料等等。

[0156] 本发明的化合物和 / 或提取物可以作为含有药学上可接受的载体的组合物提供。所述剂型涵盖生理学上可接受的载体,所述载体本身是无毒性的和非治疗性的。所述载体的实例包括植物蛋白、大豆蛋白、离子交换剂、软凝胶、油、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白(如人血清白蛋白)、缓冲物质如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和的植物脂肪酸的部分甘油酯的混合物、水、盐、或电解质如鱼精蛋白硫酸盐、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、胶体二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、基于纤维素的物质、和 PEG。用于局部的或基于凝胶的形式的载体包括多糖如羧甲基纤维素钠或甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酸酯、聚氧乙烯-聚氧丙烯-嵌段聚合物、PEG、和木蜡醇。对于所有施用而言,常规的储存形式适合于使用。所述形式包括,例如,微囊、纳米囊、脂质体、膏药、吸入剂、鼻喷雾剂、舌下片剂、和缓释制剂。

[0157] 在某些实施方案中,所述化合物和 / 或提取物可以在所述载体中被配制成为大约 0.01  $\mu\text{g/mL}$  至大约 200mg/mL 的浓度。在某些实施方案中,所述化合物和 / 或提取物可以在所述载体中被配制成为大约 1  $\mu\text{g/mL}$  至大约 250  $\mu\text{g/mL}$  的浓度。在某些实施方案中,所述化

合物和 / 或提取物可以在所述载体中被配制成大约 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  至大约 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度。在某些实施方案中,所述化合物和 / 或提取物可以在所述载体中被配制成大约 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  至大约 750  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度。在某些实施方案中,所述化合物和 / 或提取物可以在所述载体中被配制成大约 750  $\mu\text{g}/\text{mL}$  至大约 1mg/mL 的浓度。在某些实施方案中,所述化合物和 / 或提取物可以在所述载体中被配制成大约 1mg/mL 至大约 25mg/mL 的浓度。在某些实施方案中,所述化合物和 / 或提取物可以在所述载体中被配制成大约 25mg/mL 至大约 50mg/mL 的浓度。在某些实施方案中,所述化合物和 / 或提取物可以在所述载体中被配制成大约 50mg/mL 至大约 100mg/mL 的浓度。在某些实施方案中,所述化合物和 / 或提取物可以在所述载体中被配制成大约 100mg/mL 至大约 125mg/mL 的浓度。在某些实施方案中,所述化合物和 / 或提取物可以在所述载体中被配制成大约 125mg/mL 至大约 150mg/mL 的浓度。在某些实施方案中,所述化合物和 / 或提取物可以在所述载体中被配制成大约 150mg/mL 至大约 175mg/mL 的浓度。在某些实施方案中,所述化合物和 / 或提取物可以在所述载体中被配制成大约 175mg/mL 至大约 200mg/mL 的浓度。

[0158] 在某些实施方案中,本发明的化合物、组合物和 / 或提取物可以与草药组合。目标草药包括,但不限于,来自某些草药制剂,如荨麻 (*Urtica dioica*)-姜黄 (*Curcuma longa*)、茶的活性部分;海洋或陆地动物产品,例如,来自青边贻贝 (*Perna canaliculus*) 或鸚鵡 (*Dromaius nova hollandiae*) 的生物活性脂类。

[0159] 在某些实施方案中,本发明的化合物、组合物和 / 或提取物可以被配制成植物药。本文中使用的“植物药”是由植物材料组成的产品,所述产品可以包括植物材料、藻类、肉眼可见的真菌、或其组合,旨在用于诊断、治愈、缓解、治疗或预防人的疾病。在某些实施方案中,所述植物药产品作为(但不限于)溶液剂(例如,茶)、散剂、片剂、胶囊剂、酏剂、局部制剂、或注射剂可以是可获得的。

[0160] 在某些实施方案中,本发明的化合物、组合物和 / 或提取物可以被配制成营养物质。目标营养制剂包括兽用或人用的食品,包括保健食品条、饮料和饮料补充剂等等。通过包含具有生物活性的本发明的化合物、组合物和 / 或提取物来增强这些食品。例如,在神经退行性疾病(如阿尔茨海默症)的治疗中,可以通过定期服用营养制剂来补充患者的正常饮食。所述营养物质可以或可以不包含热量。

[0161] 本文中使用的术语营养组合物包括食物产品、食料、膳食补充剂、营养补充剂或用于食物产品或食料的补充剂组合物。因此,在另一个实施方案中,本发明涉及营养物质,其中所述营养物质是食物产品、食料、膳食补充剂、营养补充剂或用于食物产品或食料的补充剂组合物。

[0162] 本文中使用的术语食物产品是指适合于人或动物食用的任何食品或饲料。所述食物产品可以是已制备和已包装的食品(例如,蛋黄酱、沙拉酱、面包、或奶酪)或动物饲料(例如,已压制和已制粒的动物饲料、粗糙的混合饲料或宠物食品组合物)。本文中使用的术语食料是指适合于人或动物食用的任何物质。食物产品或食料例如是饮料如不含酒精的和含酒精的饮料以及被添加到饮用水或液体食品中的液体制剂,不含酒精的饮料例如是软饮料、运动饮料、果汁,如例如橙汁、苹果汁和葡萄汁;柠檬水、茶、近似于水的饮料(near-water drinks)、牛奶、牛奶替代品、和其他乳品饮料如例如酸奶饮料、和膳食饮料。在另一个实施方案中,食物产品或食料是指包含根据本发明的所述组合物的固体或半固体

食品。这些形式可以包括,但不限于烘焙食品如条、蛋糕、曲奇、布丁、乳制品、糖食、快餐食品、或冷冻糖食或产品(例如,冰淇淋、奶昔)、成品冷冻食品、糖果、快餐产品(例如,薯条)、液体食品如汤、涂抹食品、酱汁、沙拉酱、成品肉制品、奶酪、酸奶和包含食品、和食品成分(例如,小麦粉)的任何其他脂肪或油。术语食物产品或食料还包括功能食品和成品食物产品,后者是指被批准用于人食用的任何预先包装的食品。

[0163] 在某些实施方案中,所述营养制剂可以进一步包含姜黄素或茶叶儿茶素,如 EGCG、L-茶氨酸、和白藜芦醇。在某些实施方案中,所述营养制剂可以包含巴西莓、蓝莓、蔓越莓、黑莓、覆盆子、接骨木莓、圣-约翰斯草(St-Johns Wort)、银杏(ginkgo biloba)、卡瓦胡椒、可可、酿酒葡萄的提取物、葡萄籽提取物、大豆提取物、大豆植物雌激素、或其组合。

[0164] 在某些实施方案中,本发明的化合物、组合物和/或提取物可以被配制成膳食补充剂。本发明的膳食补充剂可以以任何适合的形式递送。在某些实施方案中,膳食补充剂被配制用于口服递送。本发明的所述膳食补充剂的成分包含在用于口服食用的可接受的赋形剂和/或载体之中。所述载体和由此的所述膳食补充剂本身的实际形式并不是关键的。所述载体可以是液体、凝胶、凝胶胶囊、胶囊、粉末、固体片(包衣的或不包衣的)、茶等等。所述膳食补充剂优选以片剂或胶囊剂的形式,最优选以硬(壳)明胶胶囊的形式。适合的赋形剂和/或载体包括麦芽糊精、碳酸钙、磷酸二钙、磷酸三钙、微晶纤维素、右旋糖、米粉、硬脂酸镁、硬脂酸、交联羧甲基纤维素钠、甘醇酸淀粉钠、交联聚维酮、蔗糖、植物胶、乳糖、甲基纤维素、聚维酮、羧甲基纤维素、玉米淀粉等等(包括其混合物)。示例性的载体包括碳酸钙、硬脂酸镁、麦芽糊精、及其混合物。使用常规的技术,各种成分和赋形剂和/或载体被混合和形成所需的形式。本发明的所述片剂或胶囊剂可以用肠溶衣进行包衣,所述肠溶衣在 pH 为大约 6.0 至 7.0 时溶解。在小肠中而并非在胃中溶解的适合的肠溶衣是邻苯二甲酸乙酸纤维素。有关用于制剂和用于施用的技术的进一步细节可以见于最新版本本的 Remington's Pharmaceutical Sciences(Maack Publishing Co., Easton, Pa.)。

[0165] 在其他实施方案中,所述膳食补充剂作为适合于被食用者添加到食品或饮料中的粉末或液体而被提供。例如,在某些实施方案中,所述膳食补充剂能够以粉末的形式施用于个体,例如通过混合到饮料中,或通过搅拌到半固体食品如布丁、糕点装饰配料、酱汁、果泥、熟麦片、或沙拉酱中,例如,或另外通过添加到食品中使用;例如,被密封在食品或饮料容器的盖子中以用于在食用前立即释放。所述膳食补充剂可以包含一种或多种惰性成分,特别是如果限制通过膳食补充剂添加到饮食中的热量是合乎需要的话。例如,本发明的所述膳食补充剂还可以包含任意的成分包括,例如,草本植物、维生素、矿物质、强化剂、着色剂、甜味剂、调味剂、惰性成分等等。

[0166] 在一些实施方案中,所述膳食补充剂进一步包含维生素和矿物质包括,但不限于,磷酸钙或乙酸钙,三碱式;磷酸钾,二碱式;硫酸镁或氧化镁;盐(氯化钠);氯化钾或乙酸钾;抗坏血酸;正磷酸铁;烟酸、烟酰胺;硫酸锌或氧化锌;泛酸钙;葡萄糖酸铜;核黄素; $\beta$ -胡萝卜素;盐酸吡哆醇;单硝酸硫胺素;叶酸;生物素;氯化铬或吡啶羧酸铬;碘化钾;硒酸钠;钼酸钠;叶绿醌;维生素 D3;氰钴胺;亚硒酸钠;硫酸铜;维生素 A;维生素 C;肌醇;碘化钾;L-色氨酸;烟酸;烟酰胺;烟酰胺核糖苷; $\Omega$ -3 脂肪酸(如 DHA、EPA 和 ALA);花色苷;异黄酮;胆碱;UMP;大豆磷脂;磷脂酰丝氨酸;S-腺苷-蛋氨酸(SAM);乙酰基-L-肉毒碱(ALCAR);镁盐;乙酸镁;氯化镁;枸橼酸镁;乳酸镁;葡萄糖酸镁;和吡咯烷酮酸镁。

[0167] 在其他实施方案中,本发明提供包含根据本发明的化合物、组合物和/或提取物的营养补充剂(例如,能量条或代餐条或饮料)。所述营养补充剂可以用作正餐或快餐的替代品并且通常提供营养热量。然而,如上所述,也可以使用不包含热量的补充剂。在某些实施方案中,所述营养补充剂提供量均衡的碳水化合物、蛋白质、和脂肪。所述营养补充剂能够进一步包括简单的、中等链长度的碳水化合物、或多糖、或其组合。能够按照所需的感官可觉察的性质选出简单的糖。未烹煮的玉米淀粉是复合的碳水化合物的一个实例。如果需要它应该维持它的高分子量结构,它应该仅被包括在食品配方或其部分中,所述食品配方或其部分未被烹煮的或未被加热处理,因为加热会将所述复合的碳水化合物分解成简单的碳水化合物,其中简单的碳水化合物是单-或二糖。在一个实施方案中,所述营养补充剂包含三种链长度水平的(简单的、中等的和复合的;例如,蔗糖、麦芽糊精、和未烹煮的玉米淀粉)碳水化合物的来源的组合。

[0168] 加入本发明的所述营养补充剂的蛋白质的来源可以是在营养制剂中使用的任何适合的蛋白质并且可以包括乳清蛋白、乳清蛋白浓缩物、乳清粉、鸡蛋、大豆粉、大豆乳大豆蛋白、大豆分离蛋白、酪蛋白酸盐(例如,酪蛋白酸钠、酪蛋白酸钙钠、酪蛋白酸钙、酪蛋白酸钾)、动物和植物蛋白及其水解物或混合物。大豆蛋白具有几乎完美的 PDCAA、蛋白质消化率校正的氨基酸评分(PDCAAS),并且通过这个标准,大豆蛋白对于人生长和健康而言是肉类和蛋类的营养等价物。这些蛋白质的生物学价值高;即,它们含有高比例的必需氨基酸。参看《健康和疾病的现代营养学(Modern Nutrition in Health and Disease)》,第八版,Lea & Febiger 出版社,1986,特别是第1卷,第30-32页。所述营养补充剂还可以包含其他成分,如其他维生素、矿物质、抗氧化剂、纤维以及其他膳食补充剂(例如,蛋白质、氨基酸、胆碱、卵磷脂、 $\Omega$ -3 脂肪酸、和本文中所描述的其他膳食补充剂)中的一种或组合。这些成分中的一种或几种的选择关乎制剂、设计、消费者偏好和最终使用者。被添加到本发明的所述膳食补充剂中的这些成分的量是本领域技术人员容易已知的。可以被添加的另外的维生素和矿物质包括,但不限于,磷酸钙或乙酸钙,三碱式;磷酸钾,二碱式;硫酸镁或氧化镁;盐(氯化钠);氯化钾或乙酸钾;抗坏血酸;正磷酸铁;花色苷;烟酰胺核糖苷;镁盐;烟酰胺;硫酸锌或氧化锌;泛酸钙;葡萄糖酸铜;核黄素; $\beta$ -胡萝卜素;盐酸吡哆醇;单硝酸硫胺素;叶酸;生物素;氯化铬或吡啶羧酸铬;碘化钾;硒酸钠;钼酸钠;叶绿醌;维生素 D3;氰钴胺;亚硒酸钠;硫酸铜;维生素 A;维生素 C;肌醇;碘化钾。

[0169] 所述营养补充剂可以以各种形式,和通过各种生产方法提供。在一个实施方案中,为了生产食品条,烹煮液体成分;将干燥成分和液体成分一起添加到混合器中并且混合直至形成面团相;将所述面团放入挤压机中,然后挤压;将所述被挤压的面团切成适当的长度;以及冷却所述产品。除了本文中具体列举的成分以外,所述条可以包含其他营养素和填料以增强口感。

[0170] 本领域技术人员可以理解的是,其他成分可以被添加到本文中所描述的那些营养补充剂中,所述其他成分例如,填料、乳化剂、防腐剂,用于营养补充剂的加工或生产。

[0171] 此外,调味剂、着色剂、调味料、坚果等等可以被加入本文中所描述的制剂中。调味剂可以是调味提取物、挥发油、巧克力调味剂、花生黄油调味剂、曲奇屑、锅巴、香草或任何可商购得到的调味剂的形式。有用的调味剂的实例包括,但不限于,纯的茴香提取物、仿制的香蕉提取物、仿制的樱桃提取物、巧克力提取物、纯的柠檬提取物、纯的橙子提取物、纯的

胡椒薄荷提取物、仿制的菠萝提取物、仿制的朗姆酒提取物、仿制的草莓提取物、或纯的香草提取物；或挥发油，如香脂草油、月桂油、佛手油、雪松木油、核桃油、樱桃油、肉桂油、丁香油、或胡椒薄荷油。

[0172] 乳化剂可以被添加用于所述制剂的稳定性。适合的乳化剂的实例包括，但不限于，卵磷脂（例如，来自鸡蛋或大豆）、和 / 或单 - 和二 - 甘油酯。其他乳化剂对于技术人员而言是显而易见的，并且适合的乳化剂的选择将部分取决于剂型和最终产品。防腐剂也可以被添加到所述制剂中以延长产品保质期。例如，使用如山梨酸钾、山梨酸钠、苯甲酸钾、苯甲酸钠或 EDTA 二钠钙的防腐剂。

[0173] 除了如上所述的碳水化合物以外，所述制剂可以包含天然的或人造的（优选低热量的）甜味剂，例如，糖、甜蜜素、天冬酰胺、阿斯巴甜、安赛蜜 K、和 / 或山梨糖醇。如果所述营养补充剂旨在被超重或肥胖个体、或患有 II 型糖尿病的倾向于高血糖症的个体食用，所述人造的甜味剂可以是合乎需要的。

[0174] 此外，多种维生素和矿物质补充剂可以被添加到本发明的所述制剂中以获得在一些膳食中流失的足量的必需营养素。还可以将所述多种维生素和矿物质补充剂用于疾病预防和针对归因于生活方式的营养损失和营养不良的防护。

[0175] 通过所述制剂施用的本发明的化合物的剂量和比例，当然会随着已知的因素而变化，所述因素如特定组合物的生理学特性和它的施用模式和途径；接受者的年龄、健康状况和体重；症状的本质和程度；同步治疗的种类；治疗的频率；和可以通过本领域专家采用正常试验或根据有关营养组合物制剂的普通注意事项而确定的所需的效果。

[0176] 在某些实施方案中，每一份所述制剂含量为 1mg 至 10,000mg 的活性成分，所述活性成分例如，一种或多种本发明的化合物。在某些实施方案中，每一份所述制剂含量为 1mg 至 2,500mg 的活性成分。在某些实施方案中，每一份所述制剂含量为 2500mg 至 5000mg 的活性成分。在某些实施方案中，每一份所述制剂含量为 5000mg 至 7500mg 的活性成分。在某些实施方案中，每一份所述制剂含量为 7500mg 至 10000mg 的活性成分。

[0177] 对于化妆品制剂而言，本发明的化合物、组合物和 / 或提取物可以任选地包含有益于皮肤的物质。这些物质包括雌二醇；黄体酮；孕烯醇酮；辅酶 Q10；甲基茄碱甲烷 (MSM)；铜肽（铜提取物）；浮游生物提取物（植磷脂体）；甘醇酸；曲酸；抗坏血酸棕榈酸酯；全反式视黄醇；杜鹃花酸；水杨酸；溴帕雌烯；雌酮；雄烯二酮；雄烷二醇；等。类固醇通常将会以小于大约 2% 的以重量计的所述组合物的总计存在，然而其他有益于皮肤的物质可以以更高的水平存在，例如多达大约 10 至 15%。

[0178] 本发明的化合物、组合物和 / 或提取物可以包含化妆品上可接受的媒介物以充当稀释剂、分散剂或载体，以便当所述组合物被应用于皮肤时促进它的分布。不同于水或者除了水以外的媒介物可以包括液体或固体的润肤剂、溶剂、保湿剂、增稠剂和粉末。

[0179] 所述化妆品上可接受的媒介物通常将构成所述组合物的以重量计的 0.1% 或 5% 至 99.9%，优选 25% 至 80%，并且在不含其他化妆品附属物的情况下，可以构成所述组合物的剩余部分。

[0180] 依照本发明，本发明的化合物、组合物和 / 或提取物可以制备成药物组合物，如可以特别有益于治疗神经退行性疾病的那些药物组合物。所述组合物包含本发明的化合物或其药学上可接受的盐、生物学活性代谢物、溶剂化物、水合物、前药、对映异构体或立体异构

体、和药学上可接受的载体和 / 或赋形剂。

[0181] 正如本领域公知的, 取决于它们的预期用途, 本发明的所述组合物可以通过各种手段施用。例如, 如果本发明的组合物通过口服施用, 它们可以被配制成片剂、胶囊剂、颗粒剂、散剂或糖浆剂。可选择地, 本发明的制剂可以作为注射剂 ( 静脉内的、肌肉内的或皮下的 )、输液制剂或栓剂通过非胃肠道的方式施用。对于通过眼粘膜途径的应用而言, 本发明的组合物可以被配制成滴眼液或眼药膏。这些制剂可以通过常规的手段制备, 并且, 如果需要, 所述组合物可以与任何常规的添加剂混合, 所述添加剂如赋形剂、粘合剂、崩解剂、润滑剂、矫味剂、增溶剂、助悬剂、乳化剂或包衣剂。

[0182] 在本发明的制剂中, 湿润剂、乳化剂和润滑剂, 如月桂基硫酸钠和硬脂酸镁, 以及着色剂、释放剂、包衣剂、甜味剂、调味剂和芳香剂、防腐剂 and 抗氧化剂可以存在于所述配制的药剂中。

[0183] 主题制剂 (subject formulation) 可以适合于口服的、鼻的、局部的 ( 包括口腔的或舌下的 )、直肠的、阴道的、喷雾的和 / 或非胃肠道的施用。所述制剂可以便利地存在于单位剂型中并且可以通过药学领域公知的任何方法制备。可以与载体材料组合以生产单剂量的组合物的量随着接受治疗的受试者、和特定的施用模式而变化。

[0184] 制备这些制剂的方法包括将本发明的组合物与所述载体和任选的一种或多种助剂进行关联的步骤。通常, 所述制剂通过将试剂与液体载体、或精细粉碎的固体载体、或二者均一地或紧密地进行关联, 然后, 如果需要, 使所述产品成形而制备。

[0185] 适合于口服施用的制剂可以是胶囊剂、扁囊剂、丸剂、片剂、含片剂 ( 使用已调味基质, 通常是蔗糖和阿拉伯胶或黄耆胶 )、散剂、颗粒剂的形式, 或者作为水性或非水性液体中的溶液剂或悬浮剂, 或者作为水包油或油包水的液体乳剂, 或者作为酏剂或糖浆剂, 或者作为锭剂 ( 使用惰性基质, 如明胶和甘油, 或蔗糖和阿拉伯胶 ), 每一种都包含作为活性成分的预确定量的主题组合物 (subject composition)。本发明的组合物还可以作为大药丸剂、药糖剂、或糊剂施用。

[0186] 在用于口服施用的固体剂型 ( 胶囊剂、片剂、丸剂、糖衣丸剂、散剂、颗粒剂等等 ) 中, 主题组合物与一种或多种药学上可接受的载体混合, 如枸橼酸钠或磷酸二钙, 和 / 或任何下列物质: (1) 填料或填充剂, 如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇、和 / 或硅酸; (2) 粘合剂, 如, 例如, 羧甲基纤维素、海藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和 / 或阿拉伯胶; (3) 保湿剂, 如甘油; (4) 崩解剂, 如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐、和碳酸钠; (5) 溶解阻滞剂, 如石蜡; (6) 吸收加速剂, 如季铵化合物; (7) 湿润剂, 如, 例如, 乙酰基醇和单硬脂酸甘油酯; (8) 吸收剂, 如高岭土和膨润土粘土; (9) 润滑剂, 如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠、及其混合物; 和 (10) 着色剂。在胶囊剂、片剂和丸剂的情况下, 所述组合物还可以包含缓冲剂。类似的类型的固体组合物还可以作为使用如乳糖或乳糖以及高分子量聚乙二醇等等的赋形剂的软和硬填充明胶胶囊中的填料而被使用。

[0187] 片剂可以通过压缩或模塑制备, 任选地含有一种或多种助剂。压缩片剂可以通过使用粘合剂 ( 例如, 明胶或羟丙基甲基纤维素 )、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂 ( 例如, 甘醇酸淀粉钠或交联的羧甲基纤维素钠 )、表面活性或分散剂而制备。模塑片剂可以通过在适合的机器中将采用惰性液体稀释剂润湿的主题组合物的混合物进行模塑而制备。片

剂,和其他固体剂型,如糖衣丸剂、胶囊剂、丸剂和颗粒剂,可以任选地与包衣和包囊,如肠溶衣和药物制剂领域公知的其他包衣,一起获得或制备。

[0188] 用于口服施用的液体剂型包括药学上可接受的乳剂、微乳剂、溶液剂、悬浮剂、糖浆剂和酞剂。除了主题组合物以外,所述液体剂型可以包含本领域常用的惰性稀释剂,如,例如,水或其他溶剂,增溶剂和乳化剂,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、油(特别是,棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和脱水山梨糖醇的脂肪酸酯、及其混合物。

[0189] 除了主题组合物以外,悬浮剂可以包含助悬剂如,例如,乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨糖醇酯和脱水山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏铝酸、膨润土、琼脂和黄耆胶、及其混合物。

[0190] 用于直肠或阴道施用的剂型可以作为栓剂提供,所述栓剂可以通过将主题组合物与一种或多种适合的无刺激性赋形剂或载体混合而制备,所述赋形剂或载体包括,例如,可可脂、聚乙二醇、栓剂蜡或水杨酸盐,并且所述栓剂在室温下是固体,但是在体温下是液体,并且因此将在体腔中融化并且释放活性剂。适合于阴道施用的制剂还包括包含本领域已知的适当的所述载体的阴道栓、卫生棉条、霜剂、凝胶剂、糊剂、泡沫剂或喷雾剂。

[0191] 用于主题组合物的透皮施用的剂型包括散剂、喷雾剂、软膏剂、糊剂、霜剂、洗剂、凝胶剂、溶液剂、贴剂和吸入剂。所述活性成分可以在无菌条件下与药学上可接受的载体,和与可能需要的任何防腐剂、缓冲剂、或推进剂混合。

[0192] 除了主题组合物以外,所述软膏剂、糊剂、霜剂和凝胶剂可以包含赋形剂,如动物和植物脂肪、油、蜡、石蜡、淀粉、黄耆胶、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。

[0193] 除了主题组合物以外,散剂和喷雾剂可以包含赋形剂如乳糖、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。喷雾剂可以额外地包含常用的推进剂,如氯氟烃和挥发性无取代的烃,如丁烷和丙烷。

[0194] 可选择地,本发明的组合物可以通过气雾剂施用。这通过制备包含所述化合物的水性气雾剂、脂质体制剂或固体颗粒来完成。可以使用非水性(例如,氟碳推进剂)悬浮剂。可以使用音速喷雾剂,因为它们使所述试剂暴露于切变最小化,所述切变可以导致主题组合物中包含的所述化合物的降解。

[0195] 通常,水性气雾剂通过将主题组合物的水性溶液或悬浮液连同常规的药学上可接受的载体和稳定剂一起配制而制备。所述载体和稳定剂随着特定的主题组合物的需要而变化,但是典型地包括非离子型表面活性剂(吐温、Pluronic<sup>®</sup>、或聚乙二醇)、无害的蛋白质如血清白蛋白、脱水山梨糖醇酯、油酸、卵磷脂、氨基酸如甘氨酸、缓冲剂、盐、糖或糖醇。气雾剂通常由等渗溶液制备。

[0196] 适合于非胃肠道施用的本发明的组合物包括与一种或多种药学上可接受的无菌的等渗的水性或非水性溶液、分散体、悬浮液或乳液、或无菌的粉末(可以恰好在使用之前被重构成无菌的注射用溶液或分散体)组合的主题组合物,所述组合物可以包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、使所述制剂与预期接受者的血液等渗的溶质或者助悬或增稠剂。

[0197] 可以用于本发明的所述组合物的适合的水性和非水性载体的实例包括水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等等)、及其适合的混合物、植物油(如橄榄油)、和注射

用有机酯,如油酸乙酯。可以维持适当的流动性,例如,通过使用包衣材料如卵磷脂,在分散体的情况下通过维持所需粒度,和通过使用表面活性剂。

[0198] 在某些实施方案中,所述组合物被配制成片剂、丸剂、胶囊剂或其他适当的可吸收制剂,以提供在 10 个或更少的可吸收制剂中的治疗剂量。在另一个实例中,治疗剂量在 20、15、10、5 或 3 个可吸收制剂中提供。

[0199] 本发明的所述组合物可以是用于肺部递送的可分散的干燥粉末的形式。干燥粉末组合物可以通过本领域已知的方法制备,如冻干和喷射研磨,如国际专利公开号 WO 91/16038 和美国专利号 6,921,527 中所公开,将二者通过引用并入。本发明的所述组合物可以以足以给受试者提供单位剂量治疗的量被置于适合的剂量容器中。所述剂量容器可以是一种适配于适合的吸入装置内的容器,以允许所述干燥粉末组合物雾化,所述雾化通过将所述干燥粉末分散至气流中以形成气溶胶、然后在室中捕获如此产生的所述气溶胶来完成,所述室具有附接的用于需要治疗的受试者随后吸入的接口。所述剂量容器包括密封有所述组合物的本领域已知的任何容器,如带有可除去部分的明胶或塑料胶囊,所述可除去部分允许气流(例如,空气)被导向至所述容器中以分散所述干燥粉末组合物。所述容器通过在美国专利号 4,227,522;美国专利号 4,192,309;和美国专利号 4,105,027 中展示的那些容器示例。适合的容器还包括连同 Glaxo 的 Ventolin<sup>®</sup> Rotohaler 牌粉末吸入器或 Fison 的 Spinhaler<sup>®</sup> 牌粉末吸入器而使用的那些容器。提供优越的防潮层的另一种适合的单剂量容器由铝箔塑料层压板形成。以药物为基础的粉末以重量计或以体积计地被填充至成型箔的凹孔中并且采用掩盖的箔-塑料层压板密封。与粉末吸入装置一起使用的所述容器描述于美国专利号 4,778,054 中并且与 Glaxo 的 Diskhaler<sup>®</sup> (美国专利号 4,627,432;4,811,731;和 5,035,237) 一起使用;将本句中所引用的四个美国专利全部通过引用并入本文。

[0200] 术语“透皮递送系统”、“透皮贴剂”、或“贴剂”是指被置于皮肤上来递送延时释放剂量的药物的粘附性系统,所述递送通过所述剂型穿过皮肤进行从而可用于经由体循环分布。透皮贴剂是用于递送各种各样的药物的公认的技术,所述药物包括,但不限于,用于晕动症的东莨菪碱、用于心绞痛治疗的硝酸甘油、用于高血压的可乐定、用于绝经后适应症的雌二醇、和用于戒烟的尼古丁。适合于在本发明中使用的贴剂包括,但不限于,(1) 基质型贴剂(matrix patch);(2) 储库型贴剂(reservoir patch);(3) 多层含药粘附性贴剂(multi-laminate drug-in-adhesive patch);和(4) 单片含药粘附性贴剂(monolithic drug-in-adhesive patch);《透皮和局部药物递送系统(TRANSDERMAL AND TOPICAL DRUG DELIVERY SYSTEMS)》, pp. 249-297(Tapash K. Ghosh 等人编辑,1997),通过引用并入文中。这些贴剂是本领域公知的和通常可商购得到的。

[0201] 在某些实施方案中,所述药物组合物的特征在于,以下述量提供的任何主题化合物(subject compound)、和/或提取物:当通过标准化表现测试评估时,所述量足以治疗轻度认知损伤、阿尔茨海默症,以统计学上有意义的量提高患者的长期记忆、短期记忆、陈述性记忆、程序性记忆或认知过程如注意力、执行功能、反应时间或学习。

[0202] 在某些实施方案中,所述药物组合物的特征在于,以下述量提供的一种或多种主题化合物、和/或提取物:当通过雷伊听觉和语言学习测试(Rey Auditory and Verbal Learning Test, RAVLT)、剑桥神经心理学测试自动化套件(Cambridge

Neuropsychological Test Automated Battery, CANTAB); 儿童记忆量表 (Children' s Memory Scale, CMS); 语境记忆测试 (Contextual Memory Test); 连续性认知记忆测试 (Continuous Recognition Memory Test, CMRT); 登曼神经心理学记忆量表 (Denman Neuropsychology Memory Scale); 富尔德对象记忆评价 (Fuld Object Memory Evaluation, FOME); 格雷厄姆 - 肯德尔图案记忆测试 (Graham-Kendall Memory for Designs Test); 引导记忆测试 (Guild Memory Test); 学习和记忆套件 (Learning and Memory Battery, LAMB); 记忆评价临床自我评定量表 (Memory Assessment Clinic Self-Rating Scale, MAC-S); 记忆评价量表 (Memory Assessment Scales, MAS); 兰德记忆测试 (Randt Memory Test); 认知记忆测试 (Recognition Memory Test, RMT); 瑞弗米德行为记忆测试 (Rivermead Behavioral Memory Test); 罗素版韦氏记忆量表 (Russell' s Version of the Wechsler Memory Scale, RWMS); 记忆和学习的测试 (Test of Memory and Learning, TOMAL); 佛蒙特记忆量表 (Vermont Memory Scale, VMS); 韦氏记忆量表 (Wechsler Memory Scale); 和记忆和学习的宽量程评价 (Wide Range Assessment of Memory and Learning, WRAML); 首 - 末名称结合 (First-Last Name Association, Youngjohn J. R., 等人, Archives of Clinical Neuropsychology 6 :287-300(1991)); 姓名 - 面容结合 (Name-Face Association); 韦氏记忆量表 - 修订版 (Wechsler Memory Scale-Revised, (Wechsler, D., Wechsler Memory Scale-Revised Manual, NY, N. Y., The Psychological Corp. (1987)); 加利福尼亚语言学习测试 -- 第二版 (California Verbal Learning Test--Second Edition, Delis, D. C., 等人, The Californian Verbal Learning Test, Second Edition, Adult Version, Manual, San Antonio, Tex. :The Psychological Corporation(2000)); 面部识别 (Facial Recognition) (与样品不匹配的延时性); 认知药物研究 (CDR) 计算机化评价套件 - 维斯尼斯 (Cognitive Drug Research(CDR) Computerized Assessment Battery-Wesnes); 布氏选择性提醒测试 (Buschke' s Selective Reminder Test, Buschke, H., 等人, Neurology 24 :1019-1025(1974)); 电话拨号测试 (Telephone Dialing Test); 和简明视觉空间记忆测试 - 修订版 (Brief Visuospatial Memory Test-Revised) 中的一种或多种评估时, 所述量以统计学上有意义的量提高患者的长期记忆。

#### [0203] 试剂盒

[0204] 本发明还提供用于方便和有效地执行本发明的方法的试剂盒。所述试剂盒包含任何主题化合物、组合物和 / 或提取物, 和用于促进对本发明方法的依从性的手段。所述试剂盒提供用于保证待治疗的所述受试者以正确的方式服用正确剂量的适当的活性物质的方便和有效的手段。所述试剂盒的依从性手段包括根据本发明的方法促进施用所述活性物质的任何手段。所述依从性手段包括说明书、包装、和分配手段、及其组合。可以包装试剂盒成分以进行手工的或者部分或全部自动地实践上述方法。在涉及试剂盒的其他实施方案中, 本发明涵盖包括本发明的组合物, 和任选的用于它们的使用的说明书的试剂盒。

[0205] 例如, 本发明还提供包含至少一个剂量的主题化合物、组合物和 / 或提取物, 并且通常包含一些剂量, 和用于治疗方案的其他材料的试剂盒。例如, 在一个实施方案中, 本发明的试剂盒包含足够五至三十天使用的主题组合物和任选地用于测量与所述治疗方案相关的一种或多种指数的必要的仪器和供应品。在另一个实施方案中, 本发明的试剂盒包含

所有的材料和供应品,包括用于实施任何本发明的方法的主题组合物。在其他另一个实施方案中,如上所述的本发明的试剂盒额外地包括用于主题组合物的使用和施用的说明书。

[0206] 在一个实施方案中,本发明是包含足以增强患者的长期记忆的量的一种或多种主题化合物、组合物和 / 或提取物、药学上可接受的载体、和描述主题化合物、组合物和 / 或提取物用于增强记忆的用途的说明书(文字和 / 或图片)的药物试剂盒。

[0207] 剂量

[0208] 本发明的任何化合物、组合物和 / 或提取物的剂量将随着所述患者的症状、年龄和体重、待治疗的所述障碍的本质和严重程度、施用途径、和主题组合物的形式而变化。任何所述制剂可以以单剂量或分剂量施用。用于本发明的所述组合物的有效剂量可以通过本领域技术人员已知的或文中教导的技术而容易地确定。可以选出所述剂量以若不能完全减轻则至少提供部分减轻的方式提供,来缓和受试者的所述障碍。技术人员可以如文中所提供的以及通过使用本领域已知的其他方法鉴定该量。

[0209] 本发明的化合物的治疗有效量(即,剂量)能够通过本领域已知的方法确定。所述治疗有效数量将取决于所述患者的年龄和总体生理状况、所使用的施用途径和药物制剂。在某些实施方案中,所述治疗剂量可以为大约 10mg/天至 10,000mg/天,大约 100mg/天至 2,500mg/天,或 250mg 至大约 1,000mg/天。在其他实施方案中,可以使用其他范围,包括,例如,50-250mg/天、250-500mg/天、和 500-750mg/天。用于预防性治疗所需的所述化合物的量,是指作为预防有效的剂量,通常与如用于治疗性治疗所描述者相同。

[0210] 在某些实施方案中,施用治疗低剂量的本发明的化合物或组合物。在某些实施方案中,所述治疗有效剂量为大约 50mg/天至大约 150mg/天。在某些实施方案中,所述治疗剂量为大约 10mg/天至大约 20mg/天。在某些实施方案中,所述治疗剂量为大约 20mg/天至大约 30mg/天。在某些实施方案中,所述治疗剂量为大约 30mg/天至大约 40mg/天。在某些实施方案中,所述治疗剂量为大约 40mg/天至大约 50mg/天。在某些实施方案中,所述治疗剂量为大约 50mg/天至大约 60mg/天。在某些实施方案中,所述治疗剂量为大约 60mg/天至大约 70mg/天。在某些实施方案中,所述治疗剂量为大约 70mg/天至大约 80mg/天。在某些实施方案中,所述治疗剂量为大约 80mg/天至大约 90mg/天。在某些实施方案中,所述治疗剂量为大约 90mg/天至大约 100mg/天。在某些实施方案中,所述治疗剂量为大约 100mg/天至大约 110mg/天。在某些实施方案中,所述治疗剂量为大约 110mg/天至大约 120mg/天。在某些实施方案中,所述治疗剂量为大约 120mg/天至大约 130mg/天。在某些实施方案中,所述治疗剂量为大约 130mg/天至大约 140mg/天。在某些实施方案中,所述治疗剂量为大约 140mg/天至大约 150mg/天。施用可以是每天一次、每天两次、或更多,并且在疾病或障碍的治疗维持期内可以减少,例如,每二或三天一次而不是每天一次或每天两次。所述剂量和施用频率将取决于临床症状,所述临床症状确定缓解期的维持,所述缓解期伴有至少一种或多种本领域技术人员已知的急性期临床症状的减少或消除。

[0211] 对于任何特定的本发明的组合物而言,有效剂量或量,和对于制剂的施用时机任何可能的影响,可能都需要鉴定。这可以通过文中所描述的使用一组或多组动物的或者如果适当的话在人体试验中的常用的实验来完成。任何主题组合物和治疗方法的有效性可以通过施用所述组合物和评价所述施用的效果而评价,其中通过测量一项或多项适用的指数,并且比较这些指数的治疗后数值与相同指数的治疗前数值来评价所述施用的效果。

[0212] 在给定的患者中将产生最佳疗效的任何特定的主题组合物的精确的施用时间和量将取决于主题组合物的活性、药代动力学、和生物利用度,所述患者的生理状况(包括年龄、性别、疾病类型和阶段、总体身体状况、对于药物治疗的给定剂量和类型的应答性),施用途径等等。

[0213] 在所述受试者接受治疗的时候,他或她的健康可以通过在所述治疗期内的预先确定的时间测量一项或多项相关的指数进行监控。治疗,包括组合物、量、施用时间和制剂,可以根据所述监控的结果进行优化。所述患者可以通过测量相同参数定期地进行再评估以测定改善的程度。对于所施用的主题组合物的量和可能地对于施用时间的调整可以基于这些再评估结果而进行。

[0214] 治疗可以起始于小于所述化合物的最佳剂量的较小的剂量。此后,所述剂量可以以少量增量增加直至达到最佳治疗剂量。

[0215] 主题组合物的使用可以减少组合物中包含的任何单独的试剂的所需剂量,因为不同药剂的效果的开始和持续时间可以是互补的。

[0216] 主题组合物的毒性和治疗效果可以通过细胞培养物或实验动物的标准药理学过程进行检测,例如,用于测定 LD<sub>50</sub> 和 ED<sub>50</sub>。

[0217] 从所述细胞培养物分析和动物研究中获得的数据可以用于配制用于人使用的一系列剂量。任何主题组合物的剂量典型地依赖于一系列循环浓度,所述循环浓度包括几乎无毒性的或无毒性的 ED<sub>50</sub>。所述剂量可以在取决于所使用的剂型和所利用的施用途径的该范围内变化。

[0218] 使用方法

[0219] 本发明的某些方面涉及治疗患有记忆和/或认知损伤的受试者。所述受试者可以患有记忆巩固(在长期记忆中储存新信息的过程)损伤、短期记忆过程损伤、长期记忆损伤、陈述性记忆损伤或程序性记忆损伤。所述受试者采用文中所描述的化合物进行治疗以增强、预防和/或恢复长期记忆功能和表现,例如,以改善在人的长期记忆中储存新信息的过程(记忆巩固)或改善短期记忆。

[0220] 本发明的一个方面涉及一种方法,其包括给受试者施用一定量的石榴提取物的步骤;其中

[0221] 所述提取物含有包含至少一种多酚的活性级分;并且

[0222] 已经通过下述过程制备所述提取物:

[0223] 榨汁和生产过程,任选地随后进行离心和/或超滤分级(fractionalization),然后干燥;

[0224] 榨汁和生产过程,任选地随后进行离心和/或超滤分级,然后吸附至色谱用聚合物树脂,用水洗涤,以及用溶剂洗脱;或

[0225] 榨汁和生产过程,任选地随后进行离心和/或超滤分级,然后吸附至色谱用聚合物树脂,用水洗涤,用溶剂洗脱,并且随后干燥。

[0226] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述提取物已经通过榨汁和生产过程、任选地随后进行离心和/或超滤分级、然后干燥来制备。

[0227] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述提取物已经通过榨汁和生产过程,任选地随后进行离心和/或超滤分级、然后吸附至色谱用聚合物树脂、用

水洗涤、以及用溶剂洗脱来制备。

[0228] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述提取物已经通过榨汁和生产过程、任选地随后进行离心和 / 或超滤分级、然后吸附至色谱用聚合物树脂、用水水洗涤、用溶剂洗脱、并且随后干燥来制备。

[0229] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述提取物通过喷雾干燥进行干燥。

[0230] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述提取物在真空环境(例如,50mbar 下 40°C)下干燥。

[0231] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述提取物通过离心分级。

[0232] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述提取物通过超滤分级。

[0233] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述溶剂是醇(例如,乙醇)。

[0234] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述树脂是聚乙烯基-苯乙烯二乙烯基苯树脂。在某些实施方案中,所述树脂上的富集能够通过常在常压或真空条件下在水中的吸附,随后采用水大量地洗涤以除去强极性成分如糖、纤维、和矿物质来实现。所述洗涤步骤中的糖洗脱采用标准折射计并且作为白利度常数测量。然后通过将缓冲液替换为极性更强的溶剂如乙醇、甲醇或乙醇在水中的混合物,开始洗脱。此外,在一些实施方案中,完整的分子洗脱能够跟随有例如 205nm 下的 UV 检测。参看,例如,美国专利号 7,638,640 的“鞣花单宁的纯化”部分,将所述部分及其整体通过引用并入文中。

[0235] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述树脂是 Amberlite XAD-16 (Rohm&Haas)。

[0236] 本发明的另一个方面涉及一种方法,所述方法包括给受试者施用本发明的化合物的步骤。

[0237] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述化合物是纯的和分离的。

[0238] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述化合物作为提取物的一部分施用。

[0239] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述化合物作为提取物的一部分施用;并且除了所述化合物以外,所述提取物基本上不含多酚。

[0240] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述化合物作为提取物的一部分施用;并且所述提取物中化合物的摩尔与多酚的总摩尔的摩尔比大于大约 0.99。在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述化合物作为提取物的一部分施用;并且所述提取物中化合物的摩尔与多酚的总摩尔的摩尔比大于大约 0.9。在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述化合物作为提取物的一部分施用;并且所述提取物中化合物的摩尔与多酚的总摩尔的摩尔比大于大约 0.85。在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述化合物作为提取物的一部分施用;并且所述提取物中化合物的摩尔与多酚的总摩尔的摩尔比大于大约 0.8。在某些实施方案中,

本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述化合物作为提取物的一部分施用;并且所述提取物中化合物的摩尔与多酚的总摩尔的摩尔比大于大约 0.75。

[0241] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述提取物是全果提取物 1766。

[0242] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述提取物是外皮提取物 1767。

[0243] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述提取物是提取物 31008。

[0244] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述提取物是提取物 31008-L 或 31008-H。

[0245] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述提取物是提取物 61109。

[0246] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述提取物是提取物 71109。

[0247] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述提取物是提取物 1767-1。

[0248] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述提取物是提取物 1767-2。

[0249] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述提取物是提取物 1767-3。

[0250] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述提取物是提取物 1767-4。

[0251] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述提取物是提取物 1767-5。

[0252] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述提取物是提取物 1767-6。

[0253] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述化合物作为营养组合物的一部分施用。

[0254] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述化合物作为功能食品或功能营养品的一部分施用。

[0255] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述化合物作为医用食品或医用营养品的一部分施用。

[0256] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述化合物作为膳食补充剂的一部分施用。

[0257] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述化合物作为药物组合物的一部分施用。

[0258] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述受试者是人。

[0259] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述人是年老的。

[0260] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述人不是年老的。

- [0261] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述人小于 20 岁。
- [0262] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述人为 20 至 40 岁。
- [0263] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述人为 40 至 60 岁。
- [0264] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述人为 60 至 80 岁。
- [0265] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述人为 80 至 100 岁。
- [0266] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述人为 100 至 120 岁。
- [0267] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述人是健康的。
- [0268] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述人是不健康的。
- [0269] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述受试者是哺乳动物。
- [0270] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述哺乳动物是兽医学动物。
- [0271] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述受试者的普通认知被改善。
- [0272] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述受试者的记忆被改善。
- [0273] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述受试者的普通认知被维持。
- [0274] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述受试者的记忆被维持。
- [0275] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述受试者的一个或多个神经元被保护。
- [0276] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述受试者的神经元部分地或全部地被保护。
- [0277] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述方法治疗或预防神经退行性障碍。
- [0278] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述神经退行性障碍的发展速率被降低。
- [0279] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述神经退行性障碍的发作被延迟。
- [0280] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述方法治疗或预防代谢综合征、II 型糖尿病、血脂异常、或肥胖症。
- [0281] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述方法治疗或预防所述受试者的与淀粉样变性相关的病症。
- [0282] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述与淀粉样变性相关的病症是 MCI 或 AAMI。
- [0283] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述方法治疗或预防 ALS、亨廷顿氏症、帕金森氏症、或唐氏综合征。

[0284] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述方法治疗或预防阿尔茨海默症。

[0285] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述方法治疗人的记忆损伤。

[0286] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述记忆损伤起因于一种或多种的与年龄相关的记忆损伤、最小认知损伤、健忘症、痴呆症、学习障碍、与接触毒物相关的记忆损伤、脑损伤、脑动脉瘤、帕金森氏症、头外伤、亨廷顿氏症、皮克病、克雅二氏症、中风、精神分裂症、癫痫症、智力迟钝、阿尔茨海默症、年龄、与年龄相关的记忆损伤、轻度认知损伤、注意力缺陷障碍、注意力缺陷多动症、多发性硬化症、前交通动脉综合征或与 AIDS 相关的痴呆症。

[0287] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述施用后人的记忆被改善。

[0288] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述记忆的改善是选自下述的至少一种测量的改善:短期记忆、长期记忆、记忆巩固、程序性记忆和陈述性记忆的改善。

[0289] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述施用后人的注意力被改善。

[0290] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述施用后人的执行功能被改善。

[0291] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述施用后人的反应时间被改善。

[0292] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述施用后人的学习被改善。

[0293] 本领域技术人员将能够预想到能够获益于如文中所描述的方法的受试者。例如,所述受试者包括患有阿尔茨海默症型疑似性记忆损伤、MCI、AAMI、帕金森氏症、或 ALS 的人。表现出认知损伤症状的健康的年老的受试者也可以获益于本发明的化合物预防性效果。本领域技术人员将承认从业者可以应用不同标准来测定记忆损伤的症状。所述标准包括,但不限于,智力障碍诊断和统计手册,第三版(Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, third edition(DSM-III)),阿尔茨海默症诊断和治疗中心(Alzheimer's Disease Diagnostic and Treatment Center(ADDTC));国际疾病统计分类,第10次修订版(International Statistical Classification of Diseases, 10<sup>th</sup> Revision(ICD-10)),国立神经学障碍和中风研究所-国际神经科学研究和教育协会(National Institute of Neurological Disorders and Stroke-Association Internationale pour la Recherche et Enseignement en Neurosciences,NINDS-AIREN);和智力障碍诊断和统计手册,第四版(Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition(DSM-IV))。参看 Pohjasvaara 等人,Stroke 2000,31,2952-2957。轻度认知损伤患者的临床表征正是所述从业者的技能。用于解析所述症状的患者的所述测试涉及进行一系列智力测试。用于临床诊断的所述方法在,例如,Petersen 等人,Arch. Neurol. 1999,56,303-308 中被广泛地评议和讨论。

[0294] 此外,越来越多的证据表明,对于人们而言,II型糖尿病是发展成阿尔茨海默症的风险因素;因此,具有II型糖尿病发病倾向的人可以获益于预防性治疗,所述预防性治疗将减缓神经退行性障碍的进程。Ho, L., W. Qin, 等人.(2004). " Diet-induced insulin resistance promotes amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer' s disease. " FASEB J 18(7) :902-4; 和 Kojro, E. 和 R.Postina(2009). " Regulated Proteolysis of RAGE and AbetaPP as Possible Link Between Type 2Diabetes Mellitus and Alzheimer' s Disease. " J Alzheimers Dis 16(4) :865-78。

[0295] 本发明的另一个方面涉及抑制肽或蛋白质的聚集的方法,所述方法包括使所述肽或蛋白质接触有效量的本发明的化合物的步骤。

[0296] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述化合物是本发明的化合物、或其药学上可接受的盐、生物学活性代谢物、溶剂化物、水合物、前药、对映异构体或立体异构体。

[0297] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述化合物是纯的和分离的。

[0298] 在某些实施方案中,本发明涉及上述方法中的任一种,其中所述化合物在提取物中。

[0299] 联合疗法

[0300] 在本发明的一个方面中,本发明的化合物,或其药学上可接受的盐、生物学活性代谢物、溶剂化物、水合物、前药、对映异构体或立体异构体,或包含所述化合物的提取物或组合物,能够被单独使用或者与另一种治疗剂联合使用以治疗疾病。可以理解的是,本发明的所述化合物能够被单独使用或者与额外的药剂联合使用,例如治疗剂,所述额外的药剂通过技术人员选出以用于它的预期目的。例如,所述额外的药剂可以是治疗剂,所述治疗剂是领域公知的可用于治疗通过本发明的所述化合物治疗的疾病或症状。所述额外的药剂还可以是赋予所述治疗组合物有益属性的药剂,例如,影响所述组合物的粘度的药剂。

[0301] 本发明所涵盖的联合疗法包括,例如,在单一的药物制剂中的本发明的化合物、或其药学上可接受的盐、和额外的药剂的施用,以及在独立的药物制剂中的本发明的化合物、或其药学上可接受的盐、和额外的试剂的施用。换言之,共施用将意味着给受试者的至少两种药剂的施用以便提供两种药剂联合的有益效果。例如,所述药剂可以同时地或间隔一段时间相继地施用。

[0302] 可以进一步理解的是,本发明中包括的所述联合是有益于它们的预期目的的那些联合。所述联合还可以包括多于一种的额外的药剂,例如,两种或三种额外的药剂,如果所述联合使得所形成的组合物可以实现它的预期功能。在一些实施方案中,所述额外的药剂可以是本发明的另一种化合物、或其药学上可接受的盐、生物学活性代谢物、溶剂化物、水合物、前药、对映异构体或立体异构体。

[0303] 在某些实施方案中,本发明的所述化合物、组合物和 / 或提取物可以与处方药联合至少每天一次地施用。例如,本发明的所述组合物可以连同现在作为阿尔茨海默症处方药的现有的抗胆碱酯酶药,连同各种抗炎药,或者连同他汀类施用。在某些实施方案中,所述处方药是胆碱酯酶抑制剂。在某些实施方案中,所述处方药选自 Namenda® (美金刚)、Reminyl® (加兰他敏)、Exelon® (斯的明)、Aricept® (多奈哌齐)、Cognex® (他克

林)、Carbex®(司来吉兰)和 Eldepryl®(司来吉兰)。

[0304] 在另一个方面中,本发明的所述组合物与被认为具有有益的健康效果的膳食或营养补充剂联合至少每天一次地施用。可以与化合物、组合物和/或提取物联合的膳食或营养补充剂的实例如下。

[0305] 辅酶 Q10(也被称为 CoQ10、Q10、维生素 Q10、泛醌和泛癸利酮),通过人体天然合成的苯醌化合物,被氧化代谢或细胞呼吸中的身体细胞使用和作为内源性抗氧化剂。“抗氧化剂”是至少部分地保护细胞避免自由基的物质,所述自由基是通常包含氧原子的高反应性化学品,能够破坏重要的细胞成分,如 DNA 和脂类。CoQ10 的血浆水平作为氧化应激的衡量标准已被用于研究,所述氧化应激是其中正常的抗氧化剂水平被降低的情况。各种调查已经探索了 CoQ10 作为疾病疗法的有效性,所述疾病包括,但不限于,癌症和心血管疾病。

[0306] 艾地苯,CoQ10 的合成类似物,已在患有痴呆症的年老的患者中进行调查。研究证明,它可以减少由于缺血造成的神经细胞损伤并且促进记忆和学习。

[0307] 哈伯因 A,源自中草药蛇足石杉(*Huperzia serrata*)的天然乙酰胆碱酯酶抑制剂,具有抗氧化和神经保护性质,并且已被提议作为用于 AD 的疾病调节疗法。

[0308] 加兰他敏,乙酰胆碱酯酶抑制剂,用于治疗 AD 的症状。

[0309] 长春胺和长春西汀,长春胺的半合成衍生物,源自植物长春花(*Vina minor L*)的生物碱,在欧洲、日本和墨西哥作为用于治疗脑血管和认知障碍的药物使用。

[0310] 乙酰基-L-肉毒碱,肉毒碱的乙酰化衍生物,已经被证明用于促进肝脏中脂肪酸的 $\beta$ -氧化和预防糖尿病大鼠的运动神经传导速度减慢。

[0311] 脱氢表雄酮(DHEA),类固醇,被研究用于预防癌症。在体内,它是由肾上腺产生的前体,并且被转换为睾酮或雌激素。

[0312] 磷脂酰胆碱,作为细胞膜主要成分的磷脂,作为认知强化剂和细胞膜修复中具有推定的活性。

[0313] 银杏,草药,作为神经保护剂、抗氧化剂、自由基清除剂、膜稳定剂、和血小板活化因子抑制剂具有推定的活性。Sherpina, V. S., 等人, *American Family Physician* 68(5)923-926(2003)。银杏提取物也已经被证明用于抑制 $\beta$ -淀粉样蛋白沉积。同上。

[0314] 姜黄素,咖喱中的姜黄的活性成分,据称具有抗炎和降低胆固醇的性质。

[0315] 小檗碱,来自异喹啉生物碱组别的季铵盐。它在如小檗、北美黄连(*Hydrastis canadensis*)、和黄连(*Coptis chinensis*)的植物中被发现,通常在根、根茎、茎、和树皮中。作为传统药物或膳食补充剂,小檗碱已经表现出对抗真菌感染,白色念珠菌、酵母菌、寄生虫、和细菌/病毒感染的一些活性。

[0316] 人参,中草药,作为用于许多疾病的疗法在亚洲已被使用数百年。

[0317] 研究已经证明,维生素 E(DL- $\alpha$ -生育酚),作为抗氧化剂发挥功能的必需维生素,能够有助于预防心血管疾病和增强免疫应答。人们已经假设,维生素 E 和它的类似物以及衍生物通过摧毁有毒性的自由基可以预防脑细胞损伤。术语“生育酚”通常是指 2-甲基-2-(4,8,12-三甲基十三烷基)色满-6-醇;术语“生育酚”通常是指所有的单、二、和三甲基生育酚,包括,但不限于, $\alpha$ -生育酚(5,7,8-三甲基生育酚), $\beta$ -生育酚(5,8-二甲基生育酚), $\gamma$ -生育酚(7,8-二甲基生育酚), $\delta$ -生育酚(8-甲基生育酚),术语“生育三烯酚”是指 2-甲基-2-(4,8,12-三甲基十三烷基)-3,7,11-三烯基)色满-6-酚;并且术语

“维生素 E”通常是指定性地显示出  $\alpha$ -生育酚的生物学活性的所有母育酚和生育三烯酚衍生物。

[0318] 公知, N-乙酰基-半胱氨酸 (NAC) 促进细胞的谷胱甘肽的产生, 并由此降低, 乃至预防, 氧化剂介导的损伤。采用 NAC 的治疗在一系列呼吸、心血管、内分泌、感染、和其他疾病环境中提供有益效果。

[0319] B 族维生素, 如叶酸, 已知用于降低同型半胱氨酸的水平, 所述同型半胱氨酸是已经与心脏病发作、中风和阿尔茨海默症的增加的风险高度相关的氨基酸。

[0320] 卵磷脂, 由胆碱和肌醇组成的脂类物质, 是细胞膜的主要成分。如用于商业用途的卵磷脂的生产商所使用的, 术语“卵磷脂”是指磷脂和包含磷脂酰胆碱的其他物质的复杂混合物。

[0321] 胆碱 (三甲基乙醇胺), 被医学研究所食品和营养品委员会 (Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine) 分类为必需营养素的饱和季铵, 是卵磷脂的成分。胆碱是人体所需的以产生神经递质乙酰胆碱。

[0322]  $\Omega$ -3 脂肪酸是在 n-3 位置处共同含有最后的碳-碳双键的一系列不饱和脂肪酸; 所述 n-3 位置即, 从所述脂肪酸的甲基末端起的第三个键。营养学上重要的 n-3 脂肪酸包括  $\alpha$ -亚麻酸 (ALA)、二十碳五烯酸 (EPA)、和二十二碳六烯酸 (DHA), 所有的 n-3 脂肪酸都是多不饱和的。一些专家认为这些化合物能够有助于调节体内的胆固醇。它们还可以有助于保护脑部免受与阿尔茨海默症相关的认知问题。

[0323]  $\Omega$ -6 脂肪酸是在 n-6 位置处共同含有最后的碳-碳双键的一系列不饱和脂肪酸, 所述 n-6 位置即, 从与羧基基团相反的末端数起的第六个键。所述 n-6 脂肪酸的生物学效应在很大程度上由它们向 n-6 二十烷类的转换介导, 所述 n-6 二十烷类结合至在体内每一种组织中发现的不同受体上。组织花生四烯酸 (20:4n-6) 向 n-6 前列腺素和 n-6 白三烯激素的转换提供许多靶标, 所述靶标用于药物开发和在动脉粥样硬化、哮喘、关节炎、血管病、血栓症、免疫炎症过程、和肿瘤增生中降低过多的 n-6 活力的治疗。与所述 n-3 脂肪酸的竞争性相互作用影响所述 n-3 和 n-6 二十烷前体的相关存储、调动、转换和作用。

[0324] 塞利吉林 (司来吉兰, Eldepryl<sup>®</sup>), 单胺氧化酶抑制剂, 被作为用于早期帕金森氏症和老年痴呆症治疗的处方。

[0325] 本发明的所述制剂可以被单独使用或者与其他药物或草药联合使用以延长心理健康, 以维持或增强认知功能或记忆, 或者以保持心理和生理的幸福感和健康。所述制剂还可以被用于预防或治疗一些疾病的影响, 所述疾病包括, 但不限于, 阿尔茨海默症; 帕金森氏症; 心脏病; 关节炎; 与年龄相关的退化; 功能性损伤; 糖尿病; 癌症; 和对认知功能有影响的其他疾病。

[0326] 本发明的所述组合物和方法的有效性可以通过各种方法进行分析。增加人受试者认知功能的效果可以通过本领域技术人员常用的方法检测, 所述方法包括, 但不限于, 既有纸笔测试, 又有计算机测试。本领域技术人员还可以直接测量 PP2A 甲基化水平, tau 蛋白磷酸化水平、动物模型中神经原纤维缠结的形成和神经退化。

[0327] 本发明所涵盖的所述联合疗法包括, 例如, 在单一的制剂中本发明的化合物和额外的药剂的施用以及在独立的制剂中本发明的化合物和额外的药剂的施用。换言之, 共施用将意味着给受试者的至少两种药剂的施用以便提供两种药剂的联合的有益效果。例如,

所述药剂可以同时地或间隔一段时间相继地施用。

[0328] 可以进一步理解的是,本发明中包括的所述联合是有益于它们的预期目的的那些联合。所述联合还可以包括多于一种的额外的药剂,例如,两种或三种额外的药剂,如果所述联合使得所形成的组合物可以实现它的预期功能。

[0329] 用于认知功能的示例性测试

[0330] 存在用于认知功能,特别是学习和记忆测试的各种测试(参看,例如,美国专利申请公开号 2010/0010097)。学习和/或记忆测试包括,例如,抑制回避测试(Inhibitory Avoidance Test,本文中也是指“被动回避测试(Passive Avoidance Test)”)、语境恐惧调节(contextual fear conditioning)、与样品不匹配的视觉延迟(visual delay non-match to sample)、与样品不匹配的空间延迟(spatial delay non-match to sample)、视觉辨别(visual discrimination)、巴尼斯圆形迷宫(Barnes circular maze)、莫里斯水迷宫(Morris water maze)、径向迷宫测试(radial arm maze tests)、雷听觉-视觉学习测试(Ray Auditory-Visual Learning Tests)、韦氏逻辑记忆测试(Wechsler Logical Memory Test)、和普罗维登斯认知记忆测试(Providence Recognition Memory Test)。

[0331] 示例性的抑制回避测试利用由明室组成的设备,所述明室能够通过滑动门与暗室分开。训练时,将动物置于所述明室中一段时间,然后打开所述门。在短暂停留(避暗潜伏期,记录所述短暂停留)之后,所述动物移动至所述暗室。一旦进入所述暗室,关闭所述门且传递足部震动。通过重复所述测试和记录所述潜伏期,在多个时间间隔(例如 24 或 48 小时)之后,测定经验的保留情况。所述方法是所述被动回避过程的许多变体之一(关于回顾,参看 Rush (1988) Behav. Neural. Biol. 50 :255)。

[0332] 示例性的迷宫测试实施方案是水迷宫工作记忆测试。通常,所述方法利用由圆形水箱组成的设备。通过加入奶粉将箱中的水变浑浊。将由置于箱底的可移动的平台支承的洁净的有机玻璃站台浸没至刚好低于水平面。通常地,正在游泳的大鼠不能感知所述站台的位置,但是它可以从之前的经验和训练中回忆起来,除非它遭受一些记忆损伤。测量花费在定位所述站台上的时间,将其称作潜伏期。在所述实验中,所有定位性线索如顶灯等保持不变。它们的记忆具有一些损伤的大鼠通常观察到较长的潜伏期。

[0333] 另一种记忆测试包括眨眼调节测试,所述测试涉及在柔和的喷气之前施用白噪音或不变的音调,所述喷气刺激所述受试者眨眼。经过训练,所述听觉刺激足以刺激所述眨眼应答。此应答在存在记忆缺陷的情况下受到影响。

[0334] 其他另一种可以使用的记忆测试是恐惧调节,例如,或者“有线索的”或者“语境的”恐惧调节。在一个实施方案中,僵硬监控器施用一系列的刺激(声音、震动),然后记录一系列的潜伏期,所述潜伏期测量从由震动诱导的所述动物的僵硬中的恢复。

[0335] 用于受损伤动物的另一种记忆测试是孔板测试,所述孔板测试利用在测试密封件的底板上包含(四个)以 4 角构型排列的开孔的旋转孔板设备。小鼠被训练成在每一次试验中将它的头伸进孔中并且从包含奖励的“诱饵”孔中得到食物奖励。在每一个暴露的孔中都有食物奖励(例如, Fruit Loops®),所述暴露的孔通过被置于挡板下而无法接近。所述挡板允许所述奖励的气味从孔中散发出来,但是不允许接近强化剂。当个别的孔被投放诱饵时,奖励被置于所述挡板的顶部,那里是可以接近的。所述整体设备处于转盘上以便它

可以被轻易旋转以消除对近似（例如，味道的）线索的信任。起始管被置于所述设备的中心。将所述受试者从所述管中放出并且使其允许探索所述投放诱饵的（“正确的”）孔。此分析中的所述小鼠的表现受到记忆损伤的影响。

[0336] 用于测量记忆损伤的另一种模型利用穹窿受损的动物来测试化合物用于调节记忆巩固、以及用于副作用和毒性的能力。通常，本方法利用已被操作产生穹窿介导的通向海马的信号传导的至少部分破坏的动物，所述破坏影响动物的记忆巩固和学习行为。所述动物被学习或记忆方案调节，所述方案导致不存在所述穹窿损伤的哺乳动物的学习行为。化合物被施用于所述动物以便评价它们对记忆巩固的影响。相对于不存在所述测试药剂的情况，学习行为的增加表明被施用的联合增强记忆巩固。

[0337] 特别被开发用于药物研究的另一种记忆测试是普罗维登斯认知记忆测试。此测试由关于长期陈述性记忆的一项图片的和一项言语的评价组成。在所述两种模式的每一种中，患者观察计算机屏幕上的刺激并且随后被要求以两种可选择的强迫选择形式识别那些刺激。所述图片评价模式由两部分组成：学习阶段和识别阶段。在所述学习阶段中，患者观察一系列的 120 张图片，每张用 3 秒钟。他们被告知观看所述图片并且记住它们，以便他们能够随后识别它们。在所述识别阶段中，患者一次观察两张图片并且被要求通过按键指出他们在学习阶段中看到的所述两张图片。在所述学习阶段结束之后十分钟、一小时、和 24 小时时，进行识别记忆测试。所述言语评价模式由两部分组成：学习阶段和识别阶段。在所述学习阶段中，患者观察一系列的 60 个句子，每次一个。他们被要求大声地阅读所述句子并且记住它们，以便他们能够随后识别它们。每一个句子在计算机屏幕上保持直至所述患者大声地将它读完。如果患者读错单词，检验员则提供正确的单词。在所述识别阶段中，患者一次观察两个句子并且被要求通过按键指出他们在学习阶段中看到的所述两个句子。在所述学习阶段结束之后十分钟、一小时、和 24 小时时，进行识别记忆测试。

[0338] 在本发明的所述方法中，可以测定所述学习行为的保留，例如，在所述学习阶段完成之后的至少大约 12-24 小时、14-22 小时、16-20 小时和或 18-19 小时之后测定所述药剂是否促进记忆巩固。在一个具体实施方案中，在所述学习阶段完成之后的 24 小时，可以测定所述学习行为的保留。

[0339] 除了用于研究记忆巩固的模型以外，已经利用了用于评价安非他命化合物对行为的副作用的模型，包括运动活性模型。示例性的运动活性测试利用由光电活动笼组成的设备，所述光电活性笼配有被置于所述笼周围的光电射束网格。在试剂施用之前，将所述动物置于单独的活性笼中一段时间。在给定的一段时间期间，通过所述光电射束的中断次数测量运动活性。

[0340] 本文中使用的“对照哺乳动物”可以是未治疗的受损哺乳动物（即，未接受或接受与待评价的联合不同的药剂的受损动物）、接受训练的对照哺乳动物（即，经历训练以证明没有任何损伤的学习行为的哺乳动物）和 / 或未接受训练的对照哺乳动物（即，有或没有损伤的动物，所述动物未接受训练以证明学习行为）。

[0341] 定义

[0342] 如本文中所定义和使用的的所有定义应该被理解为包括词典定义、通过引用并入的文献中的定义、和 / 或已定义术语的普通含义。

[0343] 除非明确地表明相反，本说明书和权利要求书中使用的不定冠词“一个 (a)”和

“一个 (an)”应该被理解为是指“至少一个”。

[0344] 本说明书和权利要求书中使用的词组“和 / 或”应该被理解为是指如此连结的元素的“任何一个或二者全都”，即，在一些情况下结合地存在和在其他情况下分离地存在的元素。采用“和 / 或”列举的多个元素应该以相同的方式被解释，即，如此连结的所述元素的“一个或多个”。除了由所述“和 / 或”条款特异性地指出的元素以外，可以任选地存在其他元素，与那些被特异性地指出的元素相关或无关。因此，作为非限制性实例，当连同开放式语言如“包含”使用时，所提及的“A 和 / 或 B”，在一个实施方案中，可以仅仅是指 A（任选地包括除了 B 以外的元素）；在另一个实施方案中，仅仅是指 B（任选地包括除了 A 以外的元素）；在其他另一个实施方案中，是指 A 和 B 二者（任选地包括其他元素）等。

[0345] 本说明书和权利要求书中使用的“或”应该被理解为具有与如上所定义的“和 / 或”相同的含义。例如，当在列表中分离项目时，“或”或者“和 / 或”将被理解为是相容的，即，包括一些或一系列元素中的至少一个，但是还包括多于一个，和，任选地，额外的未列举的项目。除了明确地表明相反的术语以外，如“只有一个”或“确切的一个”，或者，权利要求中使用的“由……组成”将是指包括一些或一系列元素中确切的一个。通常，当前面冠以互斥性术语，如“或者”、“一个”、“只有一个”、或“确切的一个”时，本文中使用的术语“或”将仅被理解为表明互斥的替代项（即，“一个或其他但不是二者兼有”）。权利要求中使用的“基本上由……组成”，将具有它在专利法领域中使用的普通含义。

[0346] 本说明书和权利要求书中使用的关于一系列的一个或多个元素的词组“至少一个”，应该被理解为是指选自所述元素列表中任何一个或多个所述元素的至少一个元素，但是不一定包括在所述元素列表中被特异性地列举的每一种元素中的至少一个并且不排除所述元素列表中任何元素组合。此定义还允许除了所述元素列表中被特异性地指出的所述元素以外，可以任选地存在所述词组“至少一个”所涉及的元素，与那些被特异性地指出的元素或者相关或者无关。因此，作为非限制性实例，“A 和 B 中至少一个”（或，相当地，“A 或 B 中至少一个”，或，相当地“A 和 / 或 B 中至少一个”），在一个实施方案中，可以是指至少一个，任选地包括多于一个，A，不包含 B（并且任选地包括除了 B 以外的元素）；在另一个实施方案中，是指至少一个，任选地包括多于一个，B，不包含 A（并且任选地包括除了 A 以外的元素）；在其他另一个实施方案中，是指至少一个，任选地包括多于一个，A，和至少一个，任选地包括多于一个，B（并且任选地包括其他元素）；等。

[0347] 应该理解的是，除非明确地表明相反，在本文中要求保护的包括多于一个步骤或行动的任何方法中，所述方法的所述步骤或行动的顺序不一定受限于所叙述的方法的所述步骤或行为的顺序。

[0348] 在权利要求书中，以及在上面的说明书中，所有转换词组如“包含”、“包括”、“携带有”、“具有”、“含有”、“涉及”、“保持有”、“由……构成”等等被理解为是开放式的，即，是指包括但不限于。只有所述转换词组“由……组成”和“基本上由……组成”将分别是封闭式或半封闭式的转换词组，如美国专利局专利审查程序手册 (United States Patent Office Manual of Patent Examining Procedures) 中的规定。

[0349] 出于本发明的目的，所述化学元素依照 1986-87 年第 67 版的 CAS 版本化学和物理手册 (CAS version, Handbook of Chemistry and Physics, 67th Ed., 1986-87) 的内封面的元素周期表被鉴定。

[0350] 本文中使用的术语“抗聚集化合物”是指显示抗聚集性质的化合物,即,抑制蛋白质或肽的体外和/或体内可溶性或不溶性聚集物的形成。出于此定义的目的,所述影响能够在体外被量化和测试,这是本领域已知的,例如,如下列参考文献中的实例中所描述的,将其每一个通过引用并入文中。Ono, K., Y. Yoshiike, 等人.(2003). "Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease." *J Neurochem* 87(1):172-81; Riviere, C., T. Richard, 等人.(2007). "Inhibitory activity of stilbenes on Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro." *Bioorg Med Chem* 15(2):1160-7; 和 Riviere, C., T. Richard, 等人.(2008). "New polyphenols active on beta-amyloid aggregation." *Bioorg Med Chem Lett* 18(2):828-31。

[0351] 本文中使用的“治疗”是指对于受试者障碍或疾病的任何治疗、或预防、或抑制并且通过实例包括:(a) 预防受试者发生所述疾病或障碍,所述受试者可能具有所述疾病或障碍的发病倾向,但是尚未被诊断出患病;(b) 抑制所述疾病或障碍,即,阻断或延迟它的进程;或(c) 减轻或缓解所述疾病或障碍,即,引起恢复。

[0352] 本文中使用的术语“杂原子”是领域公知的并且是指除了碳或氢以外的任何元素的原子。示例性的杂原子包括硼、氮、氧、磷、硫和硒。

[0353] 术语“烷基”是指包含 1 至 12 个碳原子的脂肪族或环状的烃基。烷基的代表性实例包括,但不限于,甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、新戊基、正己基、2-甲基环戊基、和 1-环己基乙基。

[0354] 术语“亚烷基”是领域公知的,并且在本文中属于通过除去如上所定义的烷基的两个氢原子获得的双齿部分。

[0355] 本文中使用的术语“烯基”是指包含 2 至 10 个碳并且包含至少一个通过两个氢的除去而形成的碳-碳双键的直链或支链的烃。烯基的代表性实例包括,但不限于,乙烯基、2-丙烯基、2-甲基-2-丙烯基、3-丁烯基、4-戊烯基、5-己烯基、2-庚烯基、2-甲基-1-庚烯基、和 3-癸烯基。

[0356] 本文中使用的术语“炔基”是指包含 2 至 10 个碳并且包含至少一个碳-碳三键的直链或支链的烃基团。炔基的代表性实例包括,但不限于,乙炔基、1-丙炔基、2-丙炔基、3-丁炔基、2-戊炔基、和 1-丁炔基。

[0357] 本文中使用的术语“碳环基”是指包含 3 至 12 个碳原子的完全饱和的或具有一个或多个不饱和键的单环或多环(例如,双环、三环等)的烃,并且为了免生疑问,所述不饱和度不导致芳香环系统(例如苯基)。碳环基的实例包括 1-环丙基、1-环丁基、2-环戊基、1-环戊烯基、3-环己基、1-环己烯基和 2-环戊烯基甲基。

[0358] 本文中使用的术语“杂环基”包括非芳香环系统,包括,但不限于,单环、双环和三环的环,所述环可以是完全饱和的或者可以包含一个或多个不饱和单元,为了免生疑问,所述不饱和度不导致芳香环系统,并且具有包括至少一个杂原子的 3 至 12 个原子,所述杂原子如氮、氧、或硫。出于示范的目的,不应该被理解为限制本发明的范围,杂环的实例如下:吡啶、氮杂环丁基、吗啉基、氧代哌啶基、氧代吡咯烷基、哌嗪基、哌啶基、吡咯烷基、奎宁环基、硫代吗啉基、四氢吡喃基和四氢呋喃基。本发明的杂环基被 0、1、2、3、4 或 5 个独立地选自烷基、烯基、炔基、卤基(halo)、卤代烷基、氟烷基、羟基、烷氧基、烯氧基、炔氧基、碳环

氧基、杂环氧基、卤代烷氧基、氟烷氧基、巯基、烷硫基、卤代烷硫基、氟烷硫基、烯硫基、炔硫基、磺酸基、烷基磺酰基、卤代烷基磺酰基、氟烷基磺酰基、烯基磺酰基、炔基磺酰基、烷氧基磺酰基、卤代烷氧基磺酰基、氟烷氧基磺酰基、烯氧基磺酰基、炔氧基磺酰基、氨基磺酰基、亚磺酸基、烷基亚磺酰基、卤代烷基亚磺酰基、氟烷基亚磺酰基、烯基亚磺酰基、炔基亚磺酰基、烷氧基亚磺酰基、卤代烷氧基亚磺酰基、氟烷氧基亚磺酰基、烯氧基亚磺酰基、炔氧基亚磺酰基、氨基亚磺酰基、甲酰基、烷基羰基、卤代烷基羰基、氟烷基羰基、烯基羰基、炔基羰基、羧基、烷氧羰基、卤代烷氧羰基、氟烷氧羰基、烯氧羰基、炔氧羰基、烷基羰基氧基、卤代烷基羰基氧基、氟烷基羰基氧基、烯基羰基氧基、炔基羰基氧基、烷基磺酰氧基、卤代烷基磺酰氧基、氟烷基磺酰氧基、烯基磺酰氧基、炔基磺酰氧基、卤代烷氧基磺酰氧基、氟烷氧基磺酰氧基、烯氧基磺酰氧基、炔氧基磺酰氧基、烷氧基亚磺酰氧基、卤代烷氧基亚磺酰氧基、氟烷氧基亚磺酰氧基、烯氧基亚磺酰氧基、炔氧基亚磺酰氧基、氨基亚磺酰氧基、氨基、酰胺基、氨基磺酰基、氨基亚磺酰基、氰基、硝基、叠氮基、膦基、磷酰基、硅烷基、硅烷氧基的取代基，和通过亚烷基部分（例如亚甲基）结合至所述杂环基的任何所述取代基取代。

[0359] 本文中使用的术语“芳基”是指苯基、萘基或蒽基。本发明的所述芳基基团可以任选地被 1、2、3、4 或 5 个独立地选自烷基、烯基、炔基、卤基、卤代烷基、氟烷基、羟基、烷氧基、烯氧基、炔氧基、碳环氧基、杂环氧基、卤代烷氧基、氟烷氧基、巯基、烷硫基、卤代烷硫基、氟烷硫基、烯硫基、炔硫基、磺酸基、烷基磺酰基、卤代烷基磺酰基、氟烷基磺酰基、烯基磺酰基、炔基磺酰基、烷氧基磺酰基、卤代烷氧基磺酰基、氟烷氧基磺酰基、烯氧基磺酰基、炔氧基磺酰基、氨基磺酰基、亚磺酸基、烷基亚磺酰基、卤代烷基亚磺酰基、氟烷基亚磺酰基、烯基亚磺酰基、炔基亚磺酰基、烷氧基亚磺酰基、卤代烷氧基亚磺酰基、氟烷氧基亚磺酰基、烯氧基亚磺酰基、炔氧基亚磺酰基、氨基亚磺酰基、甲酰基、烷基羰基、卤代烷基羰基、氟烷基羰基、烯基羰基、炔基羰基、羧基、烷氧羰基、卤代烷氧羰基、氟烷氧羰基、烯氧羰基、炔氧羰基、烷基羰基氧基、卤代烷基羰基氧基、氟烷基羰基氧基、烯基羰基氧基、炔基羰基氧基、烷基磺酰氧基、卤代烷基磺酰氧基、氟烷基磺酰氧基、烯基磺酰氧基、炔基磺酰氧基、卤代烷氧基磺酰氧基、氟烷氧基磺酰氧基、烯氧基磺酰氧基、炔氧基磺酰氧基、烷氧基亚磺酰氧基、卤代烷氧基亚磺酰氧基、氟烷氧基亚磺酰氧基、烯氧基亚磺酰氧基、炔氧基亚磺酰氧基、氨基亚磺酰氧基、氨基、酰胺基、氨基磺酰基、氨基亚磺酰基、氰基、硝基、叠氮基、膦基、磷酰基、硅烷基、硅烷氧基的取代基，和通过亚甲基、亚乙基或亚丙基部分结合至所述芳基的任何所述取代基取代。

[0360] 术语“亚芳基”是领域公知的，并且在本文中属于通过从如上所定义的芳环的相邻原子上除去两个氢原子获得的双齿部分。

[0361] 本文中使用的术语“芳基烷基”或“芳烷基”是指通过如本文中所定义的烷基附加至母体分子部分的如本文中所定义的芳基。芳烷基的代表性实例包括，但不限于，苄基、2-苯基乙基、3-苯基丙基、和 2-萘-2-基乙基。

[0362] 本文中使用的术语“杂芳基”包括芳香环系统，包括，但不限于，单环、双环和三环的环，并且具有包括至少一个杂原子的 3 至 12 个原子，所述杂原子如氮、氧、或硫。出于示例的目的，不应该被理解为限制本发明的范围：氮杂吡啶基、苯并 (b) 噻吩基、苯并咪唑基、

苯并呋喃基、苯并噁唑基、苯并噻唑基、苯并噻二唑基、苯并三唑基、苯并噁二唑基、呋喃基、咪唑基、咪唑并吡啶基、吡啶基、吡啶啉基、吡啶基、异吡啶啉基、异噁唑基、异噻唑基、异噻啉基、噁二唑基、噁唑基、噁吩基、吡喃基、吡嗪基、吡啶基、吡啶基、嘧啶基、吡咯基、吡咯并[2,3-d]嘧啶基、吡啶并[3,4-d]嘧啶基、喹啉基、喹啉基、三唑基、噻唑基、苯硫基、四氢吡啶基、四唑基、噻二唑基、噻吩基、硫代吗啉基、三唑基或托派烷基。本发明的所述杂芳基被0、1、2、3、4或5个独立地选自烷基、烯基、炔基、卤基、卤代烷基、氟烷基、羟基、烷氧基、烯氧基、炔氧基、碳环氧基、杂环氧基、卤代烷氧基、氟烷氧基、巯基、烷硫基、卤代烷硫基、氟烷硫基、烯硫基、炔硫基、磺酸基、烷基磺酰基、卤代烷基磺酰基、氟烷基磺酰基、烯基磺酰基、炔基磺酰基、烷氧基磺酰基、卤代烷氧基磺酰基、氟烷氧基磺酰基、烯基磺酰基、炔基磺酰基、氨基磺酰基、亚磺酸基、烷基亚磺酰基、卤代烷基亚磺酰基、氟烷基亚磺酰基、烯基亚磺酰基、炔基亚磺酰基、烷氧基亚磺酰基、卤代烷氧基亚磺酰基、氟烷氧基亚磺酰基、烯基亚磺酰基、炔基亚磺酰基、氨基亚磺酰基、甲酰基、烷基羰基、卤代烷基羰基、氟烷基羰基、烯基羰基、炔基羰基、羧基、烷氧羰基、卤代烷氧羰基、氟烷氧羰基、烯基羰基、炔基羰基、烷基羰基氧基、卤代烷基羰基氧基、氟烷基羰基氧基、烯基羰基氧基、炔基羰基氧基、烷基磺酰氧基、卤代烷基磺酰氧基、氟烷基磺酰氧基、烯基磺酰氧基、炔基磺酰氧基、卤代烷氧基磺酰氧基、氟烷氧基磺酰氧基、烯基磺酰氧基、炔基磺酰氧基、烷氧基亚磺酰氧基、卤代烷氧基亚磺酰氧基、氟烷氧基亚磺酰氧基、烯基亚磺酰氧基、炔基亚磺酰氧基、烷氧基亚磺酰氧基、卤代烷氧基亚磺酰氧基、氟烷氧基亚磺酰氧基、烯基亚磺酰氧基、炔基亚磺酰氧基、氨基亚磺酰氧基、氨基、酰胺基、氨基磺酰基、氨基亚磺酰基、氰基、硝基、叠氮基、膦基、磷酰基、硅烷基、硅烷氧基的取代基,和通过亚烷基部分(例如亚甲基)结合至所述杂芳基的任何所述取代基取代。

[0363] 术语“杂亚芳基”是领域公知的,并且在本文中属于通过从如上所定义的杂芳环的相邻原子上除去两个氢原子获得的双齿部分。

[0364] 本文中使用的术语“杂芳基烷基”或“杂芳烷基”是指通过如本文中所定义的烷基附加至母体分子部分的如本文中所定义的杂芳基。杂芳基烷基的代表性实例包括,但不限于,吡啶-3-基甲基和2-(噻吩-2-基)乙基。

[0365] 术语“卤基”或“卤素”是指-Cl、-Br、-I或-F。

[0366] 术语“卤代烷基”是指如本文中所定义的烷基,其中至少一个氢被如本文中所定义的卤素代替。卤代烷基的代表性实例包括,但不限于,氯甲基、2-氟乙基、三氟甲基、五氟乙基、和2-氯-3-氟戊基。

[0367] 术语“氟烷基”是指如本文中所定义的烷基,其中所有氢被氟代替。

[0368] 本文中使用的术语“羟基”是指-OH基团。

[0369] 本文中使用的术语“烷氧基”是指通过氧原子附加至母体分子部分的如本文中所定义的烷基。烷氧基的代表性实例包括,但不限于,甲氧基、乙氧基、丙氧基、2-丙氧基、丁氧基、叔丁氧基、戊氧基、和己氧基。术语“烯氧基”、“炔氧基”、“碳环氧基”、和“杂环氧基”被同样地定义。

[0370] 本文中使用的术语“卤代烷氧基”是指如本文中所定义的烷氧基,其中至少一个氢被如本文中所定义的卤素代替。卤代烷氧基的代表性实例包括,但不限于,氯甲氧基、2-氟乙氧基、三氟甲氧基、和五氟乙氧基。术语“氟烷氧基”被同样地定义。

[0371] 本文中使用的术语“芳氧基”是指通过氧附加至母体分子部分的如本文中所定义的芳基。本文中使用的术语“杂芳氧基”是指通过氧附加至母体分子部分的如本文中所定义的杂芳基。术语“杂芳氧基”被同样地定义。

[0372] 本文中使用的术语“芳基烷氧基”或“芳基烷基氧基”是指通过氧附加至母体分子部分的如本文中所定义的芳基烷基。术语“杂芳基烷氧基”被同样地定义。芳氧基和杂芳基烷氧基的代表性实例包括,但不限于,2-氯苯基甲氧基、3-三氟甲基-苯基乙氧基、和2,3-二甲基吡啶基甲氧基。

[0373] 本文中使用的术语“巯基”或“硫”是指-SH基团。

[0374] 本文中使用的术语“烷硫基”是指通过硫附加至母体分子部分的如本文中所定义的烷基。烷硫基的代表性实例包括,但不限于,甲硫基、乙硫基、叔丁硫基、和己硫基。术语“卤代烷硫基”、“氟烷硫基”、“烯硫基”、“炔硫基”、“碳环硫基”、和“杂环硫基”被同样地定义。

[0375] 本文中使用的术语“芳硫基”是指通过硫附加至母体分子部分的如本文中所定义的芳基。术语“杂芳硫基”被同样地定义。

[0376] 本文中使用的术语“芳基烷硫基”或“芳烷硫基”是指通过硫附加至母体分子部分的如本文中所定义的芳基烷基基团。术语“杂芳基烷硫基”被同样地定义。

[0377] 本文中使用的术语“磺酰基”是指-S(=O)<sub>2</sub>-基团。

[0378] 本文中使用的术语“磺酸基”是指-S(=O)<sub>2</sub>OH。

[0379] 本文中使用的术语“烷基磺酰基”是指通过如本文中所定义的磺酰基附加至母体分子部分的如本文中所定义的烷基。烷基磺酰基的代表性实例包括,但不限于,甲基磺酰基和乙基磺酰基。术语“卤代烷基磺酰基”、“氟烷基磺酰基”、“烯基磺酰基”、“炔基磺酰基”、“碳环基磺酰基”、“杂环基磺酰基”、“芳基磺酰基”、“芳烷基磺酰基”、“杂芳基磺酰基”和“杂芳烷基磺酰基”被同样地定义。

[0380] 本文中使用的术语“烷氧基磺酰基”是指通过如本文中所定义的磺酰基附加至母体分子部分的如本文中所定义的烷氧基。烷氧基磺酰基的代表性实例包括,但不限于,甲氧基磺酰基、乙氧基磺酰基和丙氧基磺酰基。术语“卤代烷氧基磺酰基”、“氟烷氧基磺酰基”、“烯氧基磺酰基”、“炔氧基磺酰基”、“碳环氧基磺酰基”、“杂环氧基磺酰基”、“芳氧基磺酰基”、“芳烷氧基磺酰基”、“杂芳氧基磺酰基”和“杂芳烷氧基磺酰基”被同样地定义。

[0381] 术语三氟甲磺酰基、甲苯磺酰基、甲磺酰基、和九氟丁磺酰基是领域公知的并且分别是指三氟甲基磺酰基、对甲基苯磺酰基、甲基磺酰基、和九氟丁基磺酰基基团。术语三氟甲磺酸酯、甲苯磺酸酯、甲磺酸酯、和九氟丁磺酸酯是领域公知的并且分别是指三氟甲基磺酸酯、对甲基苯磺酸酯、甲基磺酸酯、和九氟丁基磺酸酯官能团和包含所述基团的分子。

[0382] 本文中使用的术语“氨基磺酰基”是指通过磺酰基附加至母体分子部分的如本文中所定义的氨基。

[0383] 本文中使用的术语“亚磺酰基”是指-S(=O)-基团。亚磺酰基如用于磺酰基的上述定义所定义。本文中使用的术语“亚磺酸基”是指-S(=O)OH。

[0384] 术语“氧”是指-O-基团。

[0385] 本文中使用的术语“羰基”是指-C(=O)-基团。

[0386] 本文中使用的术语“硫代羰基”是指-C(=S)-基团。

[0387] 本文中使用的术语“甲酰基”是指-C(=O)H基团。

[0388] 本文中使用的术语“烷基羰基”是指通过如本文中所定义的羰基附加至母体分子部分的如本文中所定义的烷基。烷基羰基的代表性实例包括,但不限于,乙酰基、1-氧代丙基、2,2-二甲基-1-氧代丙基、1-氧代丁基、和1-氧代戊基。术语“卤代烷基羰基”、“氟烷基羰基”、“烯基羰基”、“炔基羰基”、“碳环基羰基”、“杂环基羰基”、“芳基羰基”、“芳烷基羰基”、“杂芳基羰基”、和“杂芳烷基羰基”被同样地定义。

[0389] 本文中使用的术语“羧基”是指 $-\text{CO}_2\text{H}$ 基团。

[0390] 本文中使用的术语“烷氧基羰基”是指通过如本文中所定义的羰基附加至母体分子部分的如本文中所定义的烷氧基。烷氧基羰基的代表性实例包括,但不限于,甲氧基羰基、乙氧基羰基、和叔丁氧基羰基。术语“卤代烷氧基羰基”、“氟烷氧基羰基”、“烯氧基羰基”、“炔氧基羰基”、“碳环氧基羰基”、“杂环氧基羰基”、“芳氧基羰基”、“芳烷氧基羰基”、“杂芳氧基羰基”、和“杂芳烷氧基羰基”被同样地定义。

[0391] 本文中使用的术语“烷基羰基氧基”是指通过氧原子附加至母体分子部分的如本文中所定义的烷基羰基基团。烷基羰基氧基的代表性实例包括,但不限于,乙酰氧基、乙基羰基氧基、和叔丁基羰基氧基。术语“卤代烷基羰基氧基”、“氟烷基羰基氧基”、“烯基羰基氧基”、“炔基羰基氧基”、“碳环基羰基氧基”、“杂环基羰基氧基”、“芳基羰基氧基”、“芳烷基羰基氧基”、“杂芳基羰基氧基”、和“杂芳烷基羰基氧基”被同样地定义。

[0392] 本文中使用的术语“烷基磺酰氧基”是指通过氧原子附加至母体分子部分的如本文中所定义的烷基磺酰基。术语“卤代烷基磺酰氧基”、“氟烷基磺酰氧基”、“烯基磺酰氧基”、“炔基磺酰氧基”、“碳环基磺酰氧基”、“杂环基磺酰氧基”、“芳基磺酰氧基”、“芳烷基磺酰氧基”、“杂芳基磺酰氧基”、“杂芳烷基磺酰氧基”、“卤代烷氧基磺酰氧基”、“氟烷氧基磺酰氧基”、“烯氧基磺酰氧基”、“炔氧基磺酰氧基”、“碳环氧基磺酰氧基”、“杂环氧基磺酰氧基”、“芳氧基磺酰氧基”、“芳烷氧基磺酰氧基”、“杂芳氧基磺酰氧基”和“杂芳烷氧基磺酰氧基”是其实例。

[0393] 本文中使用的术语“氨基”是指 $-\text{NH}_2$ 及其取代的衍生物,所述衍生物中一个或两个氢独立地被选自如上定义的烷基、卤代烷基、氟烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、烷基羰基、卤代烷基羰基、氟烷基羰基、烯基羰基、炔基羰基、碳环基羰基、杂环基羰基、芳基羰基、芳烷基羰基、杂芳基羰基、杂芳烷基羰基和磺酰基以及亚磺酰基的取代基代替;或者两个氢一起被亚烷基代替(以形成包含氮的环)。代表性实例包括,但不限于甲基氨基、乙酰氨基、和二甲基氨基。

[0394] 本文中使用的术语“酰胺基”是指通过羰基附加至母体分子部分的如本文中所定义的氨基。

[0395] 本文中使用的术语“氰基”是指 $-\text{C}\equiv\text{N}$ 基团。

[0396] 本文中使用的术语“硝基”是指 $-\text{NO}_2$ 基团。

[0397] 本文中使用的术语“叠氮基”是指 $-\text{N}_3$ 基团。

[0398] 本文中使用的术语“膦基”包括 $-\text{PH}_3$ 及其取代的衍生物,所述衍生物中一个、两个或三个氢独立地被选自烷基、卤代烷基、氟烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、烷氧基、卤代烷氧基、氟烷氧基、烯氧基、炔氧基、碳环氧基、杂环氧基、芳氧基、芳烷氧基、杂芳氧基、杂芳烷氧基、和氨基的取代基代替。

[0399] 本文中使用的术语“磷酸基”是指 $-\text{P}(=\text{O})\text{OH}_2$ 及其取代的衍生物,所述衍生物中

一个或两个羟基独立地被选自烷基、卤代烷基、氟烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、烷氧基、卤代烷氧基、氟烷氧基、烯氧基、炔氧基、碳环氧基、杂环氧基、芳氧基、芳烷氧基、杂芳氧基、杂芳烷氧基、和氨基的取代基代替。

[0400] 本文中使用的术语“硅烷基”包括  $\text{H}_3\text{Si}$ - 及其取代的衍生物, 所述衍生物中一个、两个或三个氢独立地被选自烷基、卤代烷基、氟烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基、芳烷基、杂芳基、和杂芳烷基的取代基代替。代表性实例包括三甲基硅烷基 (TMS)、叔丁基二苯基硅烷基 (TBDPS)、叔丁基二甲基硅烷基 (TBS/TBDMS)、三异丙基硅烷基 (TIPS)、和 [2-(三甲基硅烷基) 乙氧基] 甲基 (SEM)。

[0401] 本文中使用的术语“硅烷氧基”是指通过氧原子附加至母体分子的如本文中所定义的硅烷基。

[0402] 缩略语 Me、Et、Ph、Tf、Nf、Ts、和 Ms 分别代表甲基、乙基、苯基、三氟甲基磺酰基、九氟丁基磺酰基、对甲基苯磺酰基和甲基磺酰基。由具有本领域普通技术的有机化学家利用的更全面的缩略语列表出现在 *Journal of Organic Chemistry* 每一卷的第一期中; 此列表典型地在名为缩略语标准列表 (Standard List of Abbreviations) 的表格中提供。

[0403] 本文中使用的“碳水化合物”(或, 相当地, “糖”) 是糖类 (包括单糖、寡糖和多糖) 和/或源自一种或多种单糖的分子 (包括寡聚体或多聚体), 例如, 通过羰基的还原, 通过将一个或多个末端基团氧化成羧基, 通过将一个或多个羟基替换为氢原子、氨基、硫醇基或类似的杂芳香性基团等。术语“碳水化合物”还包括这些化合物的衍生物。在一些情况下, 所述碳水化合物可以是戊糖 (即, 含有 5 个碳) 或己糖 (即, 含有 6 个碳); 并且在某些例子中, 所述碳水化合物可以是包含戊糖和/或己糖单元的寡糖, 例如, 包括如上所述的那些。

[0404] 本文中使用的“碳水化合物”和“糖”还包括拟糖和类糖部分。对于本领域普通技术人员而言, 拟糖是熟知的并且包括那些在“*Essentials of Glycobiology*” (由 Varki, A., 等人编辑, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. 2002) 中详细描述的那些。例如, 本发明所涵盖的拟糖基团包括环醇, 如在三个或更多个成环原子的每一个上面都包含一个羟基的环烷烃, 如 IUPAC 规定所定义的。在其他实施方案中, 所述环醇部分包括肌醇如鲨肌醇。适合的类糖部分包括无环糖基团。所述基团包括线性的酵母糖醇 (alkytol) 和赤藓糖醇, 仅仅列举几个例子。可以理解的是, 糖基团能够以或者成环或者无环的形式存在。因此, 糖基团的无环形式作为适合的类糖部分被涵盖于本发明中。

[0405] 术语“没食子酸当量”是本领域公知的术语, 是指作为采用 Folin-Ciocalteu 分析法的各种分析物中酚含量的量化标准的没食子酸的用途。

[0406] 本文中使用的术语“提取物”或“植物提取物”是指通过采用化学或物理方法从无活性或惰性成分中分离出药用活性部分而制备的产物。

[0407] 本文中使用的术语“认知功能”是指进行智力活动的的能力, 如思考、学习、判断、回忆、计算、控制运动功能等等。“认知功能的恢复力”的表述是指认知功能的功能元素随着时间的流逝抵制恶化的能力。

[0408] 本文中使用的术语“治疗有效量”、“记忆增强量”、和“认知增强量”被互换地用来指代, 在将它施用于受试者之后, 导致治疗或有益效果的本发明的所述组合物的量, 所述效果包括受试者的健康感或总体幸福感。

[0409] 特别地, “认知功能增强量”是指将显著影响进行智力活动的的能力的本发明的所述

组合物的量,如通过用于记忆、计算、注意力、或其他智力或认知属性的测试所测量的,或如通过他或她在这些领域中的能力的个人感觉所表明的。

[0410] 本文中互换使用的术语“膳食补充剂”和“营养补充剂”是指(1)旨在补充膳食的产品,所述产品具有或包含一种或多种下列膳食成分:(A) 维生素、(B) 矿物质、(C) 草药或其他植物药、(D) 氨基酸、(E) 人通过增加总体膳食摄入以补充膳食的膳食物质;和/或(F) 在条款(A)、(B)、(C)、(D)、或(E)中描述的任何成分的浓缩物、代谢物、组分、提取物、或组合;和(2)这样的产品:所述产品(A)(i)旨在吸收;(B)不代表作为常规食品或者正餐或所述膳食的唯一项目;和(C)被标记为膳食补充剂。

[0411] 本文中使用的术语“食品”是指(1)用作人或其他动物的食物或饮料的物品;(2)口香糖;和(3)用作任何所述物品的成分的物品。术语“功能食品”或“功能营养品”是指在销售时(例如在超市中或在线)没有任何限制的食品或营养品。术语“医用食品”或“医用营养品”是指由医生开具的食品或营养品。食品或营养品可以是固体、液体、凝胶、粉末、或气体。固体的实例是水果基饮料、咖啡基饮料、茶基饮料、运动饮料、营养条、零食、树胶、谷物、糖果、婴儿配方、能量饮料、成人营养饮料、健康饮料、和其他食物产品。术语“运动饮料”是指被提供用于补充运动员水分、以及恢复电解质、糖和其他营养素的饮料,例如,佳得乐(Gatorade)、动乐(POWERAde)、和AU运动饮料(AU Sport)。本文中使用的术语“能量饮料”是指这样的饮料:所述饮料包括,但不限于,摇晃可乐(Jolt Cola)、红牛(Red Bull)和类似的产品,所述饮料包含法定的兴奋剂、维生素和矿物质;这些产品被配制成用于为使用者提供爆发的能量。本文中使用的术语“成人营养饮料”是指所述产品如按需(Ensure)、Longetics®或类似的产品。术语“健康饮料”是指声称具有有益健康效果的任何饮料,所述效果包括,但不限于,降低炎症;支持免疫系统;中和感染性病原;预防动脉阻塞,保持认知功能和抑制恶性肿瘤增长。

### 具体实施方式

[0412] 通过参考下列实施例将更加容易理解本发明,所述实施例被包括在其中,仅用于说明本发明的某些方面和实施方案的目的,而并非旨在限制本发明。

[0413] 实施例1:用于抑制A $\beta$ (25-35)聚集的石榴化合物的筛选分析

[0414] 将购买自Bachem Pharma的单体A $\beta$ (25-35)于4°C溶解于蒸馏无菌水中,然后进行超声处理大约1分钟。然后等分所述肽储备溶液并于-20°C储存。所有步骤于4°C下进行以避免A $\beta$ (25-35)的聚合。

[0415] 在被评价并于-20°C储存之前,多酚级分都被定量至10mg/mL。抑制的测量通过遵循本领域过程已知的在包含70 $\mu$ L磷酸盐缓冲液、10 $\mu$ L硫黄素-T(100 $\mu$ M的储备溶液)、10 $\mu$ L pH 7.2的MeOH(最终浓度为10mM)和10 $\mu$ L的A $\beta$ (25-35)(最终浓度为100 $\mu$ M)的反应混合物中A $\beta$ (25-35)聚合的动力学来进行。LeVine, H., 3rd(1993). "Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution." *Protein Sci.* 2(3):404-10。当A $\beta$ (25-35)被加入到所述缓冲溶液中时,将所述溶液进行额外一分钟的超声处理。

[0416] 为了研究所述级分的抑制活性,在MeOH中稀释所述提取物至所述最终浓度并且将10 $\mu$ L于4°C加入到所述混合物中。记录450nm下激发态和490nm下发射态的荧光光谱。

监控 0 至 120 分钟的 25°C 下聚合动力学。通过使用最小二乘拟合技术计算  $IC_{50}$  以匹配所述实验数据和 S 型曲线。所述  $IC_{50}$  是化合物将 A $\beta$  原纤维的形成抑制至对照值的 50% 的有效浓度剂量。

[0417] 使用三种不同的缓冲液提取石榴 (*Punica granatum*, Wonderful 变种) 以产生富含极性增强分子的级分。混合石榴并用水、丁醇、和乙酸乙酯缓冲液提取。在如实施例 1 中所描述的分析中,所述三种级分的每一种以 10mg/mL 进行测试。结果表明,乙酸乙酯级分包含最高的活性,能够抑制超过 65% 的所述聚集(图 11)。

[0418] 通过离心分配色谱法进一步细分乙酸乙酯、丁醇和水级分并且使用标准 HPLC 方法分离纯的化合物。所述分子使用 HPLC/MS 和 NMR 研究进行鉴定。每一种分子以 90% 以上的纯度在用于如实施例 1 中所描述的聚集的所述分析中使用。所述结果描述于图 12-18 中并概括如下。

[0419] 级分 A3J 以 10  $\mu$ M 的  $IC_{50}$  抑制聚集并且 NMR 确认所述分子的种类为石榴皮鞣素;级分 A1D 以 11  $\mu$ M 的  $IC_{50}$  抑制聚集。MS 数据确认所述分子的种类为长梗马兜铃素;级分 W12 以 6  $\mu$ M 的  $IC_{50}$  抑制聚集并且确认为安石榴苷;并且级分 A3I 以 9.3  $\mu$ M 的  $IC_{50}$  抑制聚集。最后,级分 A3G 以 6.8  $\mu$ M 的  $IC_{50}$  抑制聚集并且 NMR 和 MS 数据确认所述分子的种类为特里马素。鞣料云实素以 65  $\mu$ M 的  $IC_{50}$  抑制聚集。

[0420] 实施例 2:测量 A $\beta$ -寡聚体诱导的神经元细胞死亡的抑制

[0421] 能够抑制寡聚体形成的所述级分也被用于使用 P12 细胞测试它们抑制 A $\beta$ -寡聚体诱导的神经元细胞死亡的能力,所述 P12 细胞是神经元细胞培养的公知的和可接受的模型。

[0422]  $\beta$  淀粉样肽 (A $\beta$ )<sub>25-35</sub> 三氟乙酸盐(参考号 H-1192, 批次 2000718) 购买自 Bachem(Bubendorf, Switzerland)。溴化噻唑蓝四氮唑 (MTT, 参考号 M2128) 购买自 Sigma-Aldrich(Saint-Quentin Fallvier, France)。牛白蛋白组分 V (BSA, 参考号 160069) 购买自 MPBio(Irvine, USA)。

[0423] 细胞:将大鼠嗜铬细胞瘤细胞 (PC 12) 在 5% CO<sub>2</sub> 下于 37°C 保持在补充有 10% 马血清 (HS)、5% 胎牛血清 (FCS) 和 100U/mL 青霉素以及 100  $\mu$ g/mL 链霉素的 DMEM (4.5g/L 葡萄糖) 中。

[0424] A $\beta$  (25-35) 的制备:据报道,相比于单体而言, A $\beta$  寡聚体对神经元的毒性更大。因此,用于此研究的所述 A $\beta$  (25-35) 在使用之前被预聚集。将 A $\beta$  溶解于水中至 1mM 并于 -20°C 储存。恰好在使用之前将 A $\beta$  (25-35) 于 37°C 孵育 3 天以诱导聚集。

[0425] 水-醇石榴提取物保护 PC12 细胞免受 A $\beta$  损害的能力的检测:通过测量 MTT 至 MTT 甲瓚的还原来测定石榴提取物保护 PC12 免受 A $\beta$  (25-35) 寡聚体诱导的毒性的能力,所述还原反映细胞活力。PC12 细胞被置于 96 孔培养板中并且一旦汇合,就用不同浓度的石榴提取物 (0.1% DMSO) 在 0.1% BSA 的 DMEM 中预处理 1h。然后将所述细胞用或不用 10  $\mu$ M 的预聚集的 A $\beta$  (25-35) 孵育额外的 24h。24h 后,将 300  $\mu$ g/mL 的在细胞培养基中的 MTT 溶液 (3mg/mL 的在 PBS 中的储备溶液) 于 37°C 加入共计 2h。然后所述培养基被除去并将所述甲瓚结晶溶解于 100  $\mu$ L 的 DMSO 中。通过使用微孔板读取仪 (BioTek EL808) 于 595nm 测量光密度的比色分析来测定 MTT 还原水平和由此的细胞活力。

[0426] 如图 24 所示,提取物 1766 和 1767 能够保护 PC 12 神经元细胞免受 A $\beta$  (25-35)

寡聚体的毒性。提取物 1766 是整个石榴果实的水-醇提取物,提取物 1767 是石榴外皮的水-醇提取物。并且对于所述提取而言,整个果实和外皮被分离和切割、压碎和放置于搅拌器中。将由此产生的块状物在水-醇溶液(乙醇/水),80/20)中孵育并且应用于室温搅拌 4 小时。在避光环境中的额外浸渍之后,过滤所述溶液并在真空下干燥(50mbar 下 40°C),然后于 -20°C 储存直至进一步分馏使用。进行提取物 1767 的细分并测试它们在 PC12 细胞中抵抗 Aβ 引导的细胞毒性的能力。级分 1767-2 和 1767-3 表现出最高的活性。对于这两个级分的进一步分析、浓缩和测试导致安石榴苷被鉴定为对观察到的活性负责的天然化合物。DMSO 被用作载体并且未对所述分析表现出干扰作用。

#### [0427] 实施例 4:提取过程

[0428] 使用提取过程制备包含特异性分子的石榴提取物 31008,所述提取过程基于在所述标准聚合物吸附柱中多酚的吸附。在作为纯果汁被吸附至所述聚合物色谱树脂之前,使用标准榨汁和生产过程将石榴(例如, Mollar 变种)榨汁并通过离心澄清。Amberlite XAD-16 树脂(Rohm&Haas)被装进半制备柱中并将所述提取的果汁上样。用水洗涤所述柱子以除去糖直至完成(白利度水平低于 0.1%)。用 100%乙醇洗脱所述多酚。剩余的乙醇在真空下被蒸发以制备每升中包含 4.5g 总多酚的浓缩提取物,所述浓度通过使用用于总多酚含量的 Folin 分析法进行测定。

[0429] 使用用于如上所述的化合物的 HPLC-MS 鉴定,提取物 31008 表现出包含所述安石榴苷、石榴皮鞣素、特里马素、和长梗马兜铃素分子。

[0430] 此技术是本领域已知方法的修改,所述已知方法如用于来自各种植物和浆果的多酚的纯化的几个已公开方法所描述的。Tuck, K. L. 和 P. J. Hayball (2002). " Major phenolic compounds in olive oil :metabolism and health effects. " J Nutr Biochem 13(11) :636-644 ; 和 Schieber, A., P.Hilt, 等人.(2003). " A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace. " Innovations Food Sci. Emerging Technol. 4 :99-107。

#### [0431] 实施例 4 动物测试—莫里斯水迷宫

[0432] 所述提取物 31008 在表达淀粉样突变的伦敦突变和 prenilin-1 人突变二者的阿尔茨海默症动物模型中进行测试。此模型中的动物在 4 个月时产生斑块并且在 6 个月时产生记忆缺陷。在 7 个月之后能够看到密集的斑块沉积。

[0433] 在一组实验中,四月龄的 APP-PS1 转基因小鼠用固定剂量的大约 97mg 总多酚/kg/天的提取物通过它们的饮用水被喂养。在喂养 3 个月之后,在莫里斯水迷宫空间测试中测试所述小鼠(当时为 7 月龄)。

[0434] 在治疗的 84-87 天期间进行所述莫里斯水迷宫。水池(白色的圆形容器,直径为 1m)包含含有作为无臭、无毒的添加剂以隐藏所述逃生站台(在水平面以下 1cm)的二氧化钛的 20°C 的水。每只小鼠的游泳情况被记录到录像带上并分析(Ethovision, Noldus information Technology, Wageningen, the Netherlands)。在训练之前,每只小鼠被置于所述站台的顶部 15 秒。对于位置导航测试而言,在三个连续作业日结束时小鼠被训练成在三个试验的五个模块中定位所述隐藏的站台。每项试验由最长 120 秒的强迫游泳测试组成,随后是 60 秒的休息。在用于测定每只小鼠的学习曲线的五个连续性训练模块中,测量每只小鼠用于定位所述站台所需的时间。

[0435] 在最终训练之后的 24 小时,每只动物经历除去所述站台的探测试验。小鼠被允许搜索所述消失的站台 60 秒,并且测量花费在所述水池的每个象限上的搜索时间,以及穿越原始站台位置的次数。如图 24 所示,用提取物 31008 喂养的所述小鼠在所述探测测试中表现出提高的表现,所述表现通过穿越所述站台从形式上被定位的区域的频率增加而被阐明。

[0436] 实施例 5 :动物测试 - 淀粉样斑块沉积

[0437] 因为淀粉样斑块沉积的水平已经被证明与以淀粉样蛋白为基础的疾病进程相关,考察了采用提取物 31008 的治疗效果。将小鼠处死并且将它们的脑部收集并使用标准方法制备用于免疫组织化学。切割矢状切片 (40  $\mu$ m) 用于自由浮动孵育并于 4°C 储存直至在 PBS 中用 0.1% 叠氮化钠染色。选择在下托区域中每个脑部的三十个连续切片用于染色 (侧面为 2.18 至 1.08mm)。切片 1、7、13、19、25 采用 A $\beta$  的 IHC (抗淀粉样蛋白) 染色。所使用的所有动物的切片被随机化处理用于染色和双盲量化。

[0438] 将自由浮动切片在 Nett-wells 中孵育以便在一个单一的分析中染色所有切片并且使强度变化最小化。切片在 PBS 中被洗涤两次并且在 1.5% 过氧化氢的 PBS 和甲醇 (1 : 1) 中孵育 15 分钟以除去内源性过氧化物酶活性。将所述切片在包含 0.1% Triton X100 (PBST) 的 PBS 中洗涤三次之后,所述切片在含有 10% 胎牛血清 (FCS) 的 PBST 中被封闭 30 分钟,然后用含有 10% FCS 的 PBST 中的生物素化的第一抗体 (对抗 A $\beta$  的 N 末端的抗淀粉样蛋白,用生物素标记,使用 1 : 2800 的稀释液) 孵育过夜。在漂洗之后,将所述切片在含有 0.01% 胰蛋白酶的 PBS 中于 37°C 孵育 15 分钟,然后用亲和素-生物素过氧化物酶复合物 (Vectastain Elite ABC, Vector, Burlingame, CA) 孵育。所述信号采用 3,3'-二氨基联苯胺四盐酸片 (DAB, ICN, 1 片 /10mL Tris-HCl, 每 10mL 含有 3  $\mu$ L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 显示。切片采用 Mayers 苏木精复染,在乙醇和二甲苯 (Merck Eurolab) 的五个步骤中 (50、70、95 和 2x 100%) 脱水并且在 Depex (Depex 封片液, BDH Laboratory) 中封片。

[0439] 如图 25 所示,采用所述提取物喂养的小鼠脑中的淀粉样斑块沉积显著下降,与所述已鉴定分子对聚集的影响一致。

[0440] 在第二组实验中,二月龄的 APP-PS1 转基因小鼠用固定剂量的大约 90mg (提取物 31008-L-) 和 800mg (提取物 31008-H-) 总多酚 /kg/ 天的高度富集的石榴提取物,提取物 31008,通过它们的饮用水喂养。另一组同样用高度富集的石榴提取物,提取物 61109,以 468mg/kg/ 天的剂量喂养。最后一组用源自石榴外皮的提取物 71109,以 120mg/kg/ 天的剂量喂养。在喂养 4 个月之后,在所述莫里斯水迷宫空间记忆测试中测试所述小鼠 (此时大约为 6.5 月龄)。

[0441] 如图 26 所示,用提取物 31008,以 97mg/ 天的剂量喂养的所述小鼠在所述探测测试过程中表现出提高的表现,如花费在所述站台地带的时间的增加所示。另一方面,相对于被施用等热量的空白对照的转基因对照组而言,用提取物 31008,以 828mg/ 天的剂量喂养的小鼠未表现出表现上的变化。此结果阐明所使用的石榴提取物对记忆改善的剂量影响。接受提取物 61109 和 71109 的小鼠在所述探测测试中表现出显著提高的表现 (P < 0.05 采用相对于空白对照 hAPP-Tg 的 Tukey 氏多重比较检验)。

[0442] 实施例 6 :动物测试 - 一年老的大鼠

[0443] 研究了来自石榴提取物的多酚的口服施用对年老的大鼠的认知表现的影响。选

择此模型系统以评价作为老化过程的结果显示出受损的脑部功能的动物的治疗效果以便凸显潜在的益处,所述益处是在正常的年轻个体中可能是不可检测的。治疗起始于 19 月龄的雄性 Sprague-Dawley 大鼠,大约相当于认知损伤的发作(参看 Martínez-Serrano A, Björklund A. “Ex vivo nerve growth factor gene transfer to the basal forebrain in presymptomatic middle-aged rats prevents the development of cholinergic neuron atrophy and cognitive impairment during aging” Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Feb 17 ;95(4) :1858-63 ;和 Bisson JF, Nejd A, Rozan P, Hidalgo S, Lalonde R, Messaoudi M. “Effects of long-term administration of a cocoa polyphenolic extract (Acticoa powder) on cognitive performances in aged rats” Br J Nutr. 2008 Jul ;100(1) :94-101, Epub 2008 Jan 8)。动物表现主要使用用于游泳任务学习和社会认知记忆的行为测试进行监控。

[0444] 通过在饮用水中稀释,多酚被口服施用以重现最终靶向性的递送模式。实验比较了两个剂量的来自石榴的富含多酚的提取物。

[0445] a) 社会认知。在社会认知辨别任务中,每只年老的大鼠连同一只年幼的雄性 Sprague-Dawley 大鼠 (< 5 周龄) 被置于它的家笼中 5 分钟。三十分钟以后,采用同一只幼体重复完全相同的过程以第二次测定所述两只动物之间的相互作用程度。在具有适当功能记忆的动物中,因为所述两只动物之前已有相互作用,所以预计有较少的接触。在第二次暴露之后的三十分钟,新的年幼的大鼠连同所述年老的大鼠被放置在一起 5 分钟,以测量所述动物是否能够辨别所述两只不同的年幼个体。在所述两只动物之间的每一个相互作用期中,测量总的接触时间以评价社会认知。在 2.5 至 3 个月的治疗之后进行此测试。

[0446] 如图 27 所示,在用低剂量的提取物 31008 (15mg 没食子酸当量 /kg/ 天) 喂养的年老的大鼠中,所观察到的在第二次暴露过程中花费在幼体 #1 上的时间的减少表明作为治疗的结果的认知记忆的表现的提高。当随后暴露于所述新的年幼的大鼠 #2 时,用 15mg 没食子酸当量 /kg/ 天的提取物治疗的年老的大鼠的相互作用时间增加,表明接受治疗的年老的大鼠能够区别所述两只不同的年幼的大鼠并且具有功能性记忆。另一方面,接受等热量的对照治疗的年老的大鼠具有对于第一次和第二次暴露于年幼的大鼠 #1 的可比的相互作用时间,表明它们认知记忆的损伤。暴露于幼体 #2 的对照组年老的大鼠表现出与所有之前相对于幼体 #1 的暴露可比的相互作用时间,表明所述对照组动物不能辨别这些相互作用,即降低的认知的标志和记忆的衰退。(对于等热量的对照组 N = 12,对于接受提取物治疗的组 N = 14)。与用 15mg GAE 治疗的大鼠不同,当第二次暴露于年幼的大鼠 #1 或暴露于新的年幼的大鼠 #2 时,用 75mg 没食子酸当量 /kg/ 天的剂量的所述提取物治疗的年老的大鼠 (N = 10) 具有与所述等热量的对照组类似的表现,由此证明此效果中剂量的重要性。

[0447] b) 莫里斯水迷宫:反向测试。用提取物 31008 (15mg 没食子酸当量 /kg/ 天) 或等热量的对照对年老的大鼠进行始于 19 月龄的为期 3 个月的连续治疗。测试年老的大鼠在所述反向任务中的表现:随着训练和探测测试,所述站台被置于相反的象限中(西→东)并且所述动物接受三种训练项目。在此测试中,在类似的任务中重新适应新的站台位置的速度进一步评价所述动物的学习能力。

[0448] 如图 28 所示,与所述等热量的对照组年老的大鼠相比,用 15mg 没食子酸当量 /kg/ 天的提取物治疗的年老的大鼠显著更有效地在所述反向测试中定位所述站台(单因素方

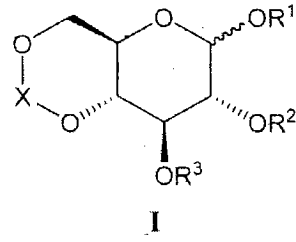
差分析,  $P < 0.02$ ; 等热量的对照组  $N = 11$ ; 提取物组:  $N = 14$ )。这说明低剂量的提取物对于相对于在对照组即非治疗年老的大鼠中观察到的天然记忆衰退的记忆改善和保护的有益效果。15mg 没食子酸当量 /kg/ 天的剂量所观察到的效果与社会认知记忆评价和用于实现记忆改善的适当剂量的重要性中的观察是一致的。

[0449] 通过引用并入

[0450] 将本文中引用的所有美国专利和美国专利申请公开都通过引用并入。

[0451] 等同物

[0452] 仅仅使用常用的实验过程, 本领域技术人员将认识到或能够确定本发明所描述的具体实施方案的许多等同物。所述等同物旨在被此公开所涵盖。



名称	X	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
石榴皮鞣素		<b>H</b>	<b>H</b>	<b>H</b>
安石榴苷				
长梗马兜铃素				
特里马素				

图 1

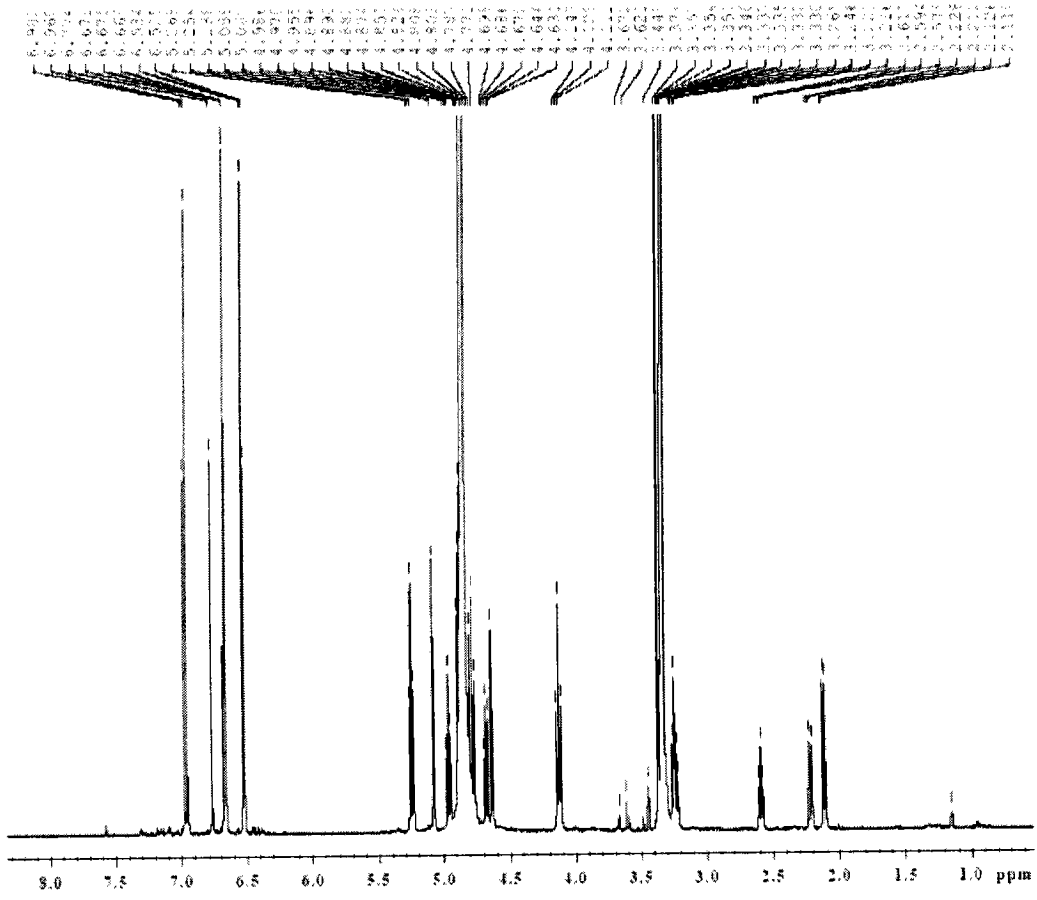


图 2

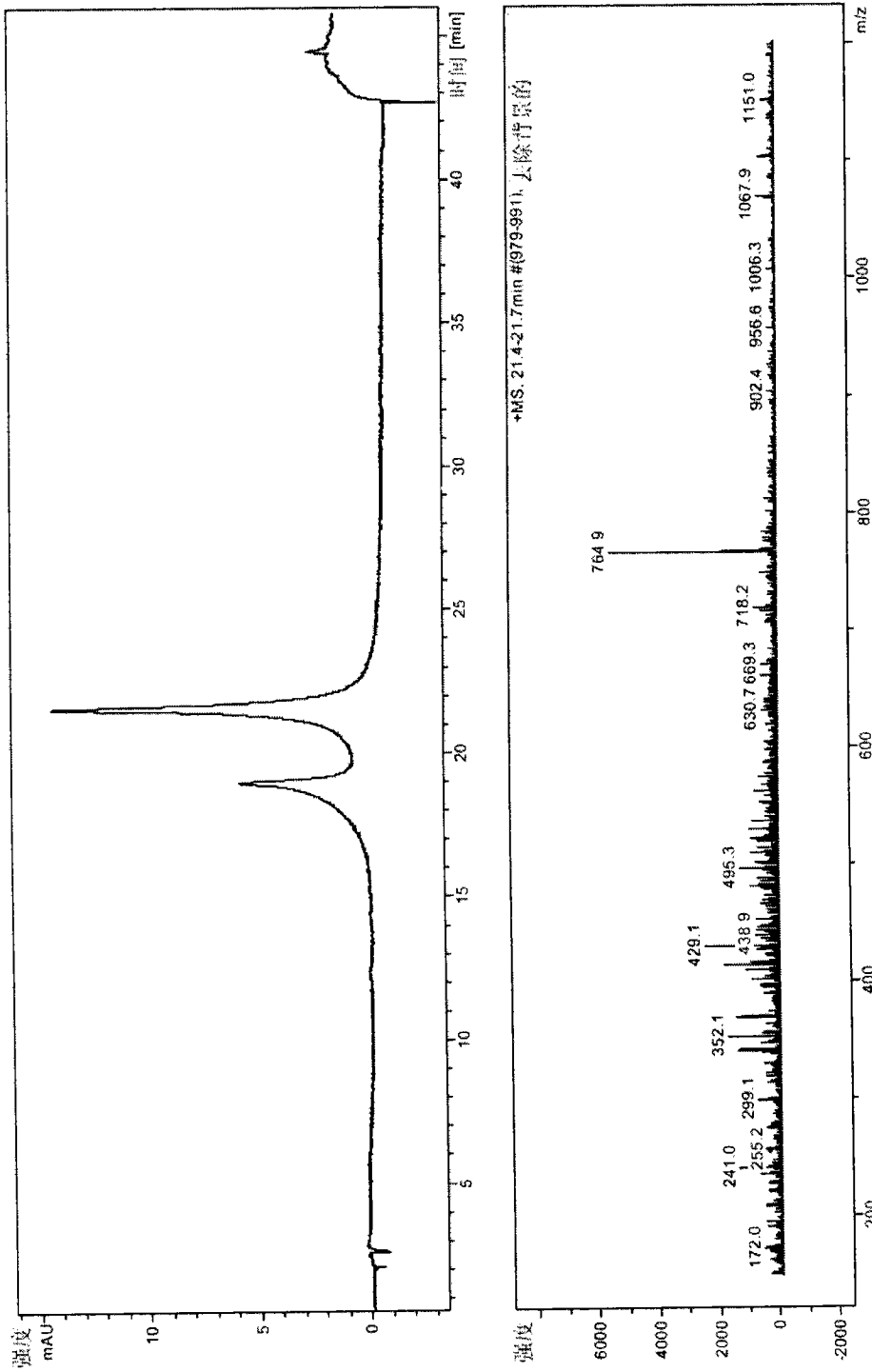


图 3

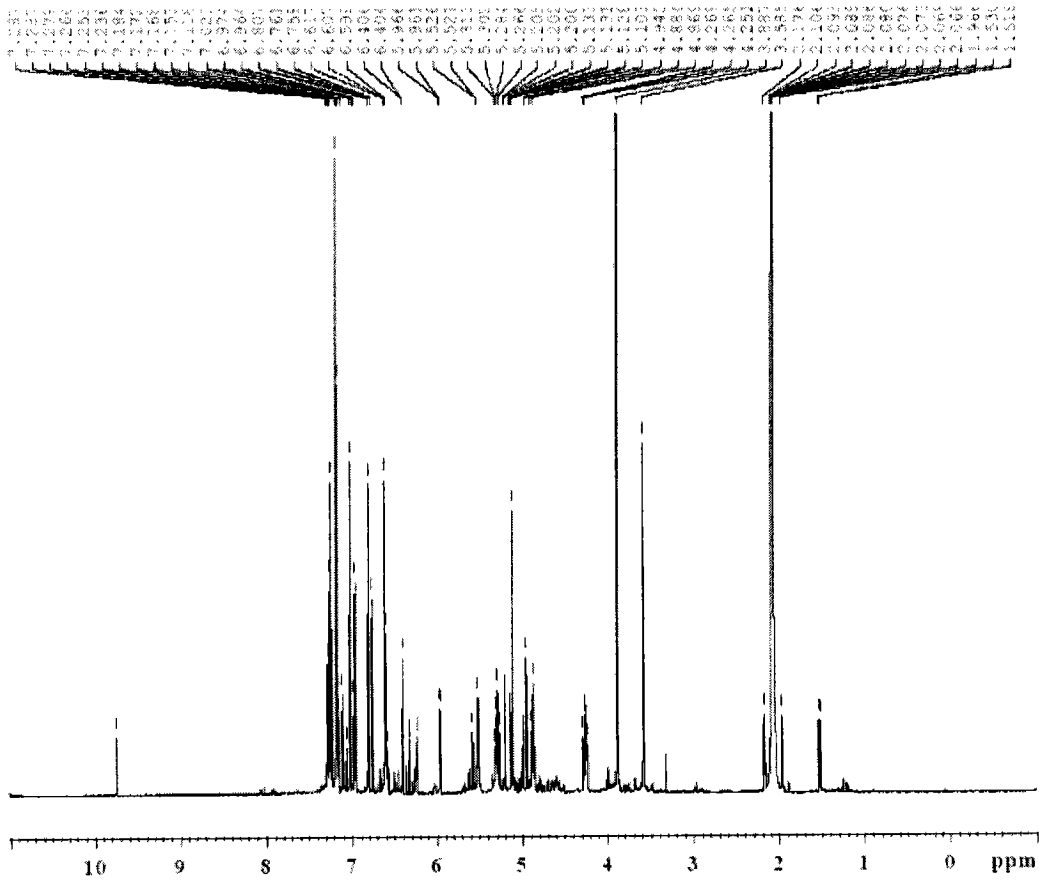


图 4

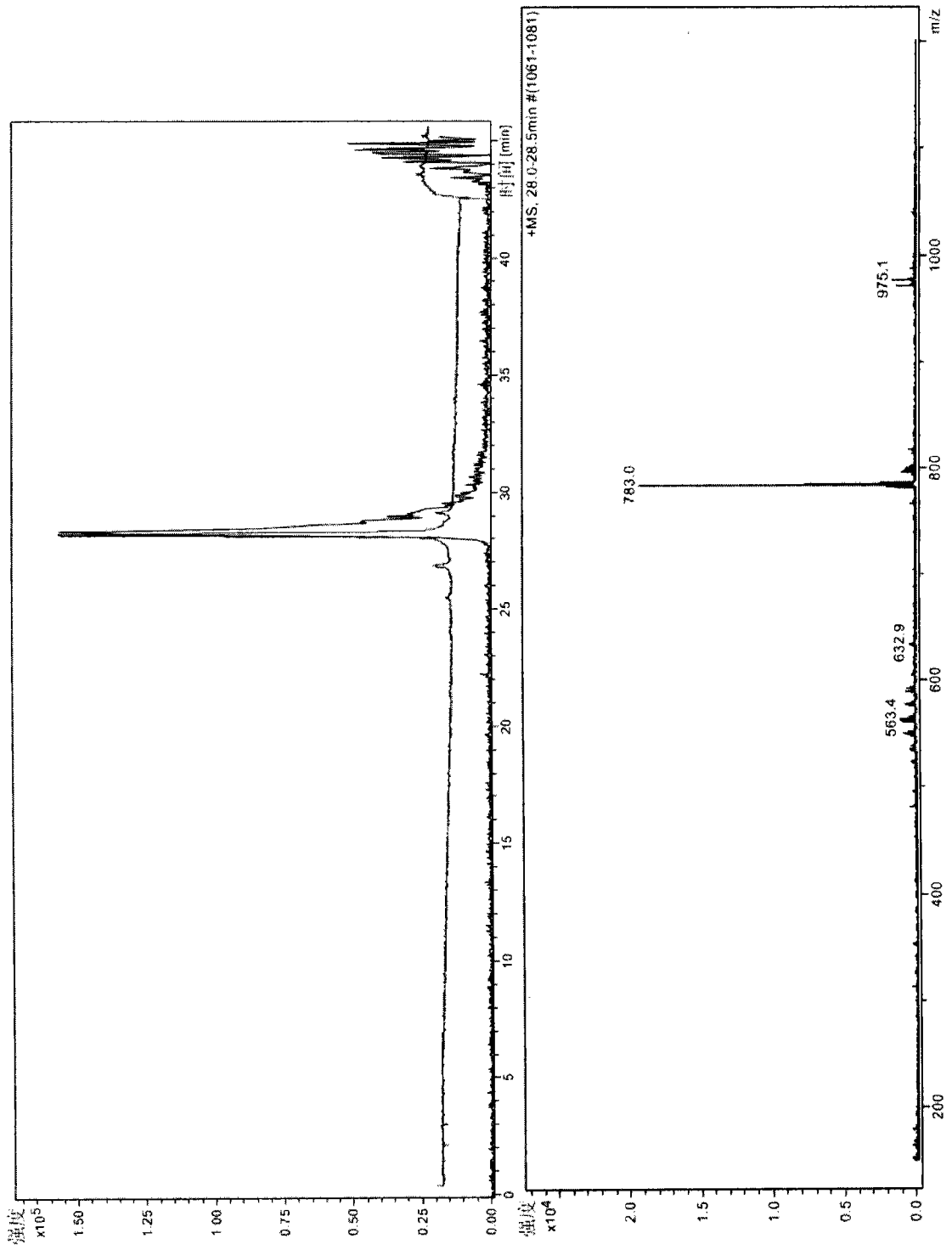


图 5



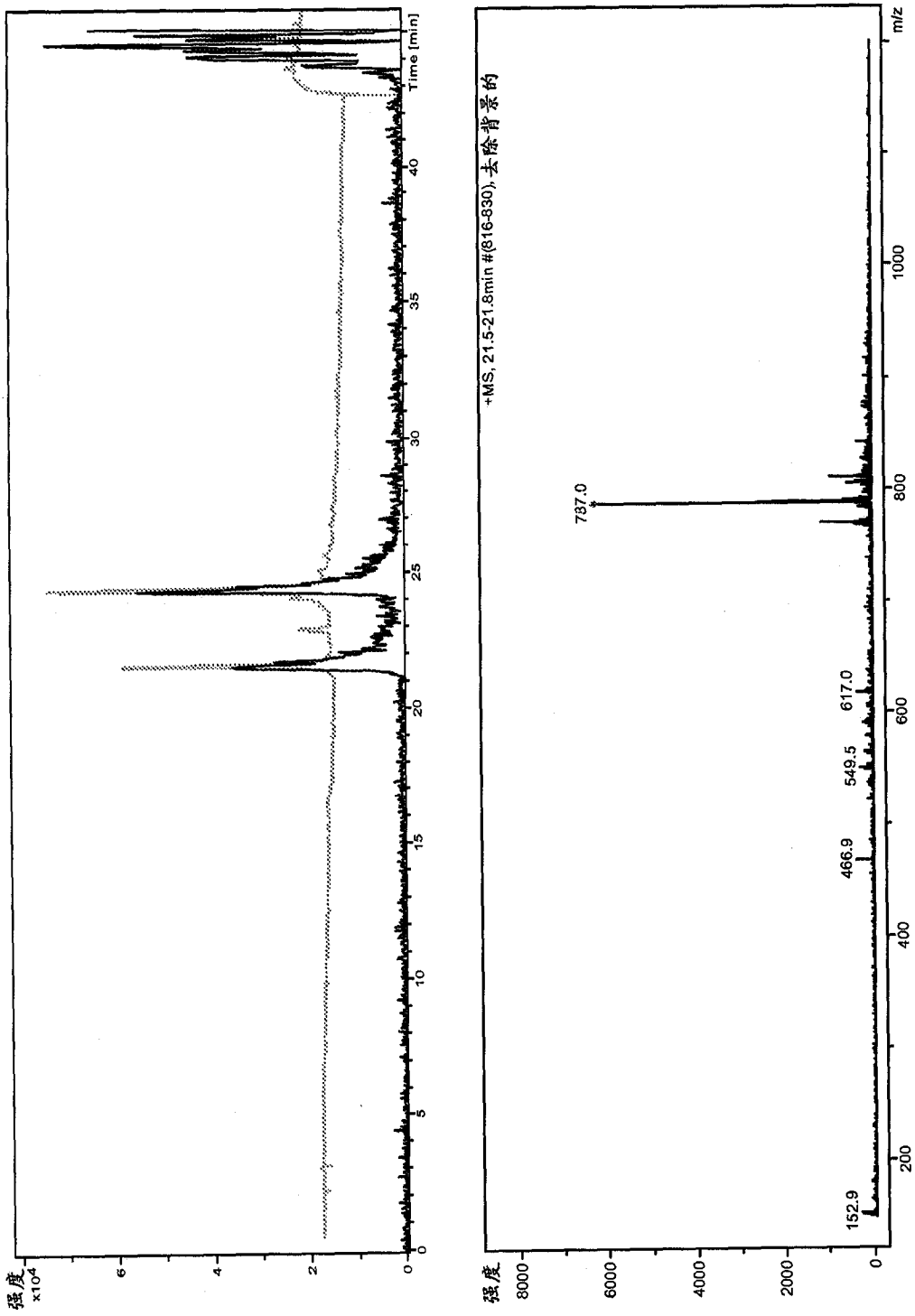


图 7

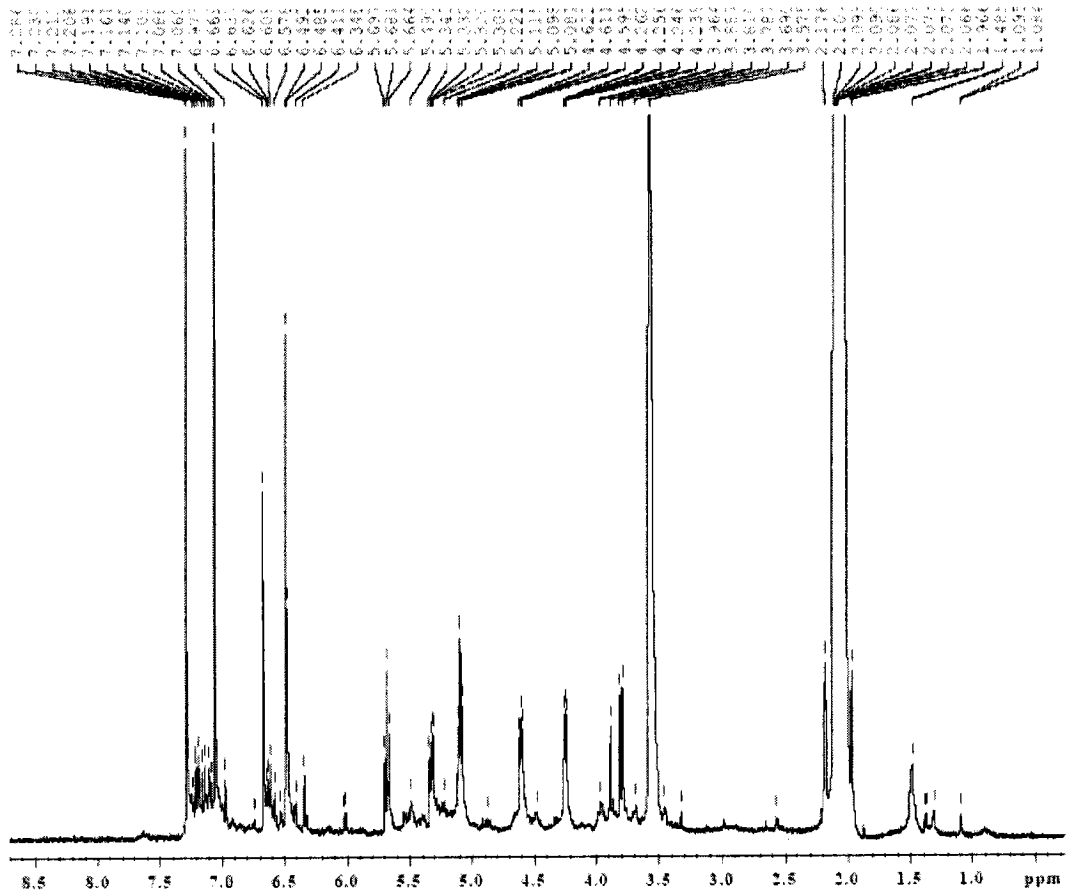


图 8

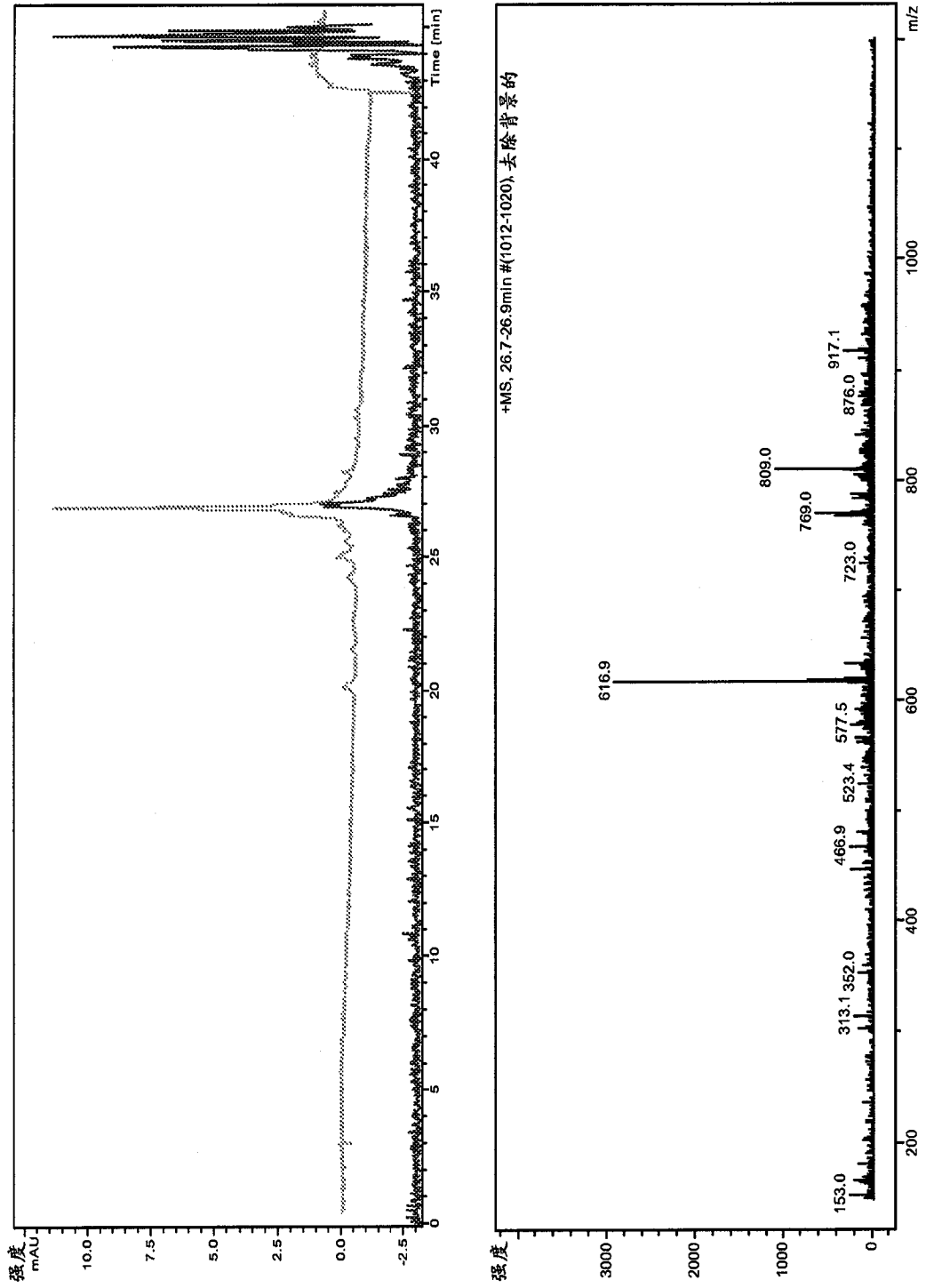


图 9

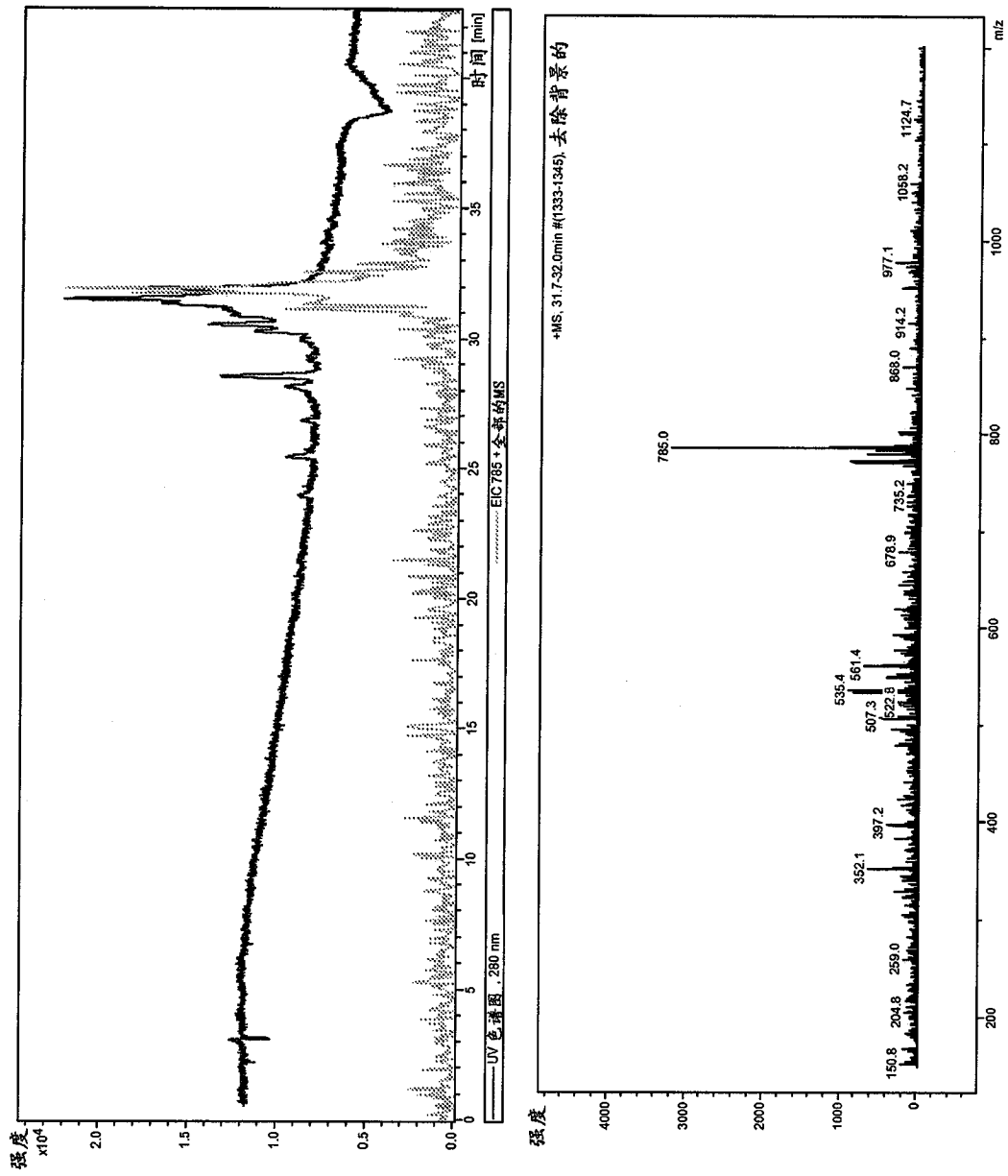


图 10

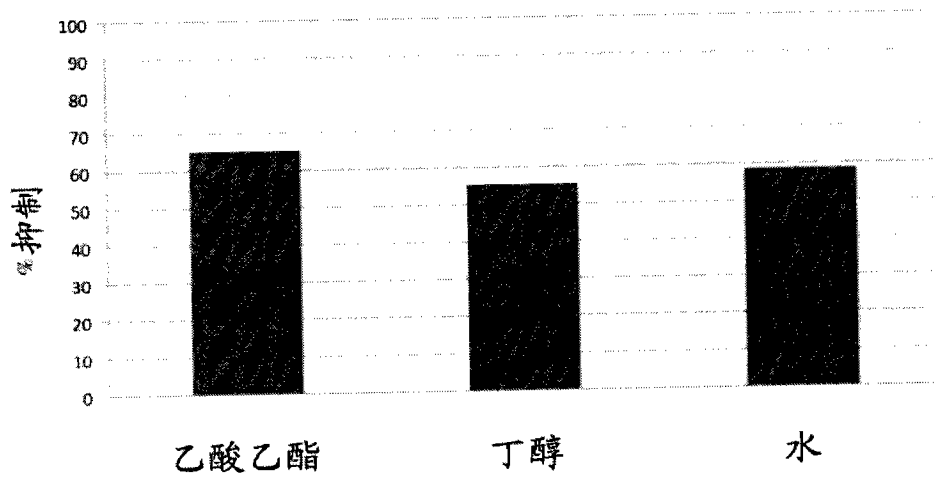


图 11

级分	分子量 (Da)	IC <sub>50</sub> (μM)	名称
A3J	783	10	石榴皮鞣素
A1D	785	11	长梗马兜铃素
W12	1084	6	安石榴苷
A3I	786	9.3	化合物 A
A3G	786	6.8	特里马素
	368	65	鞣料云实素

图 12

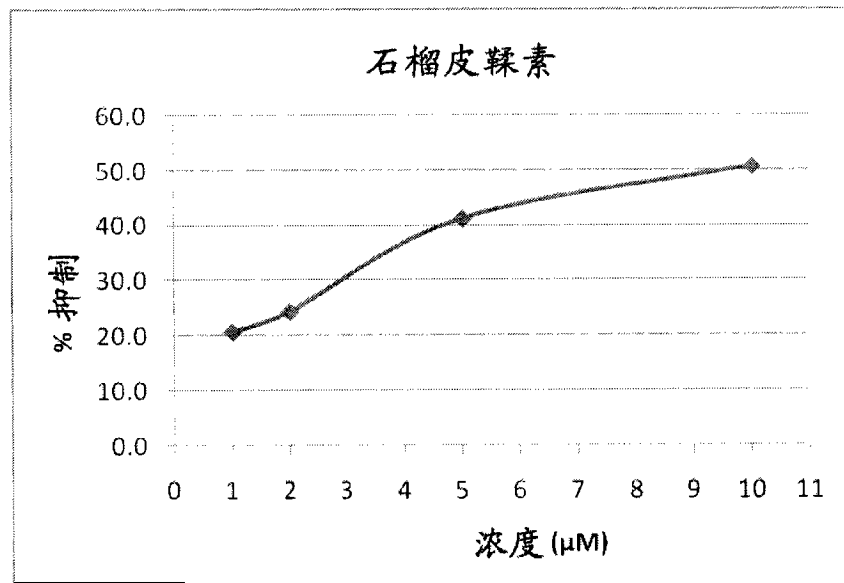
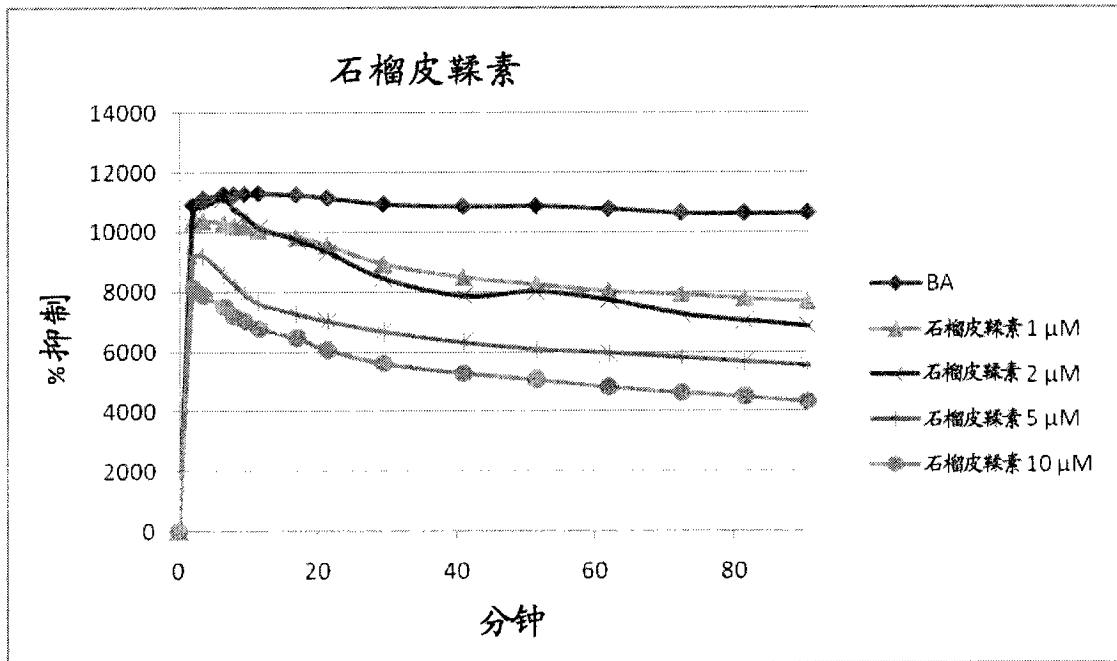


图 13

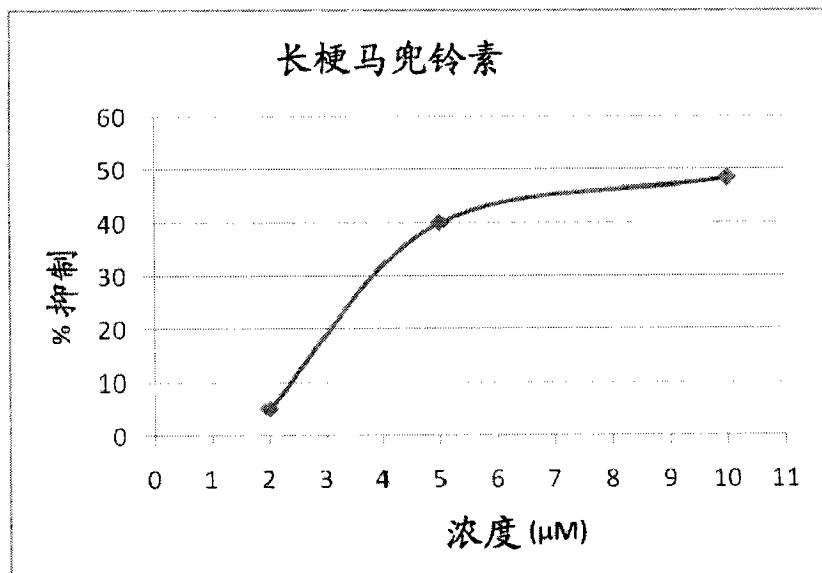
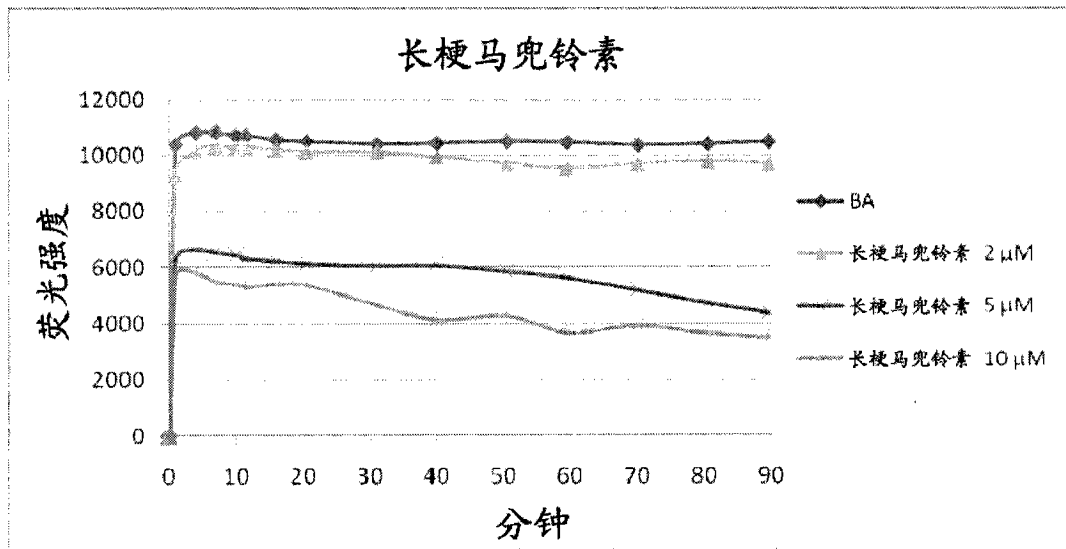


图 14

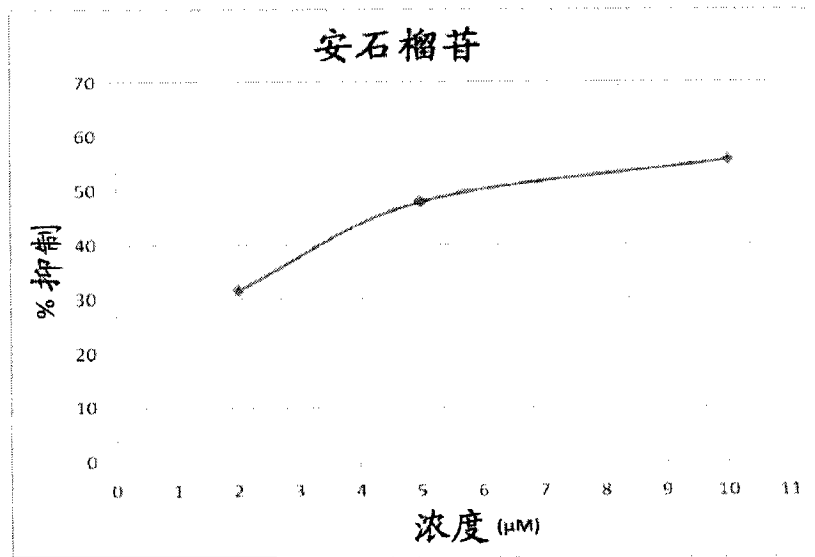
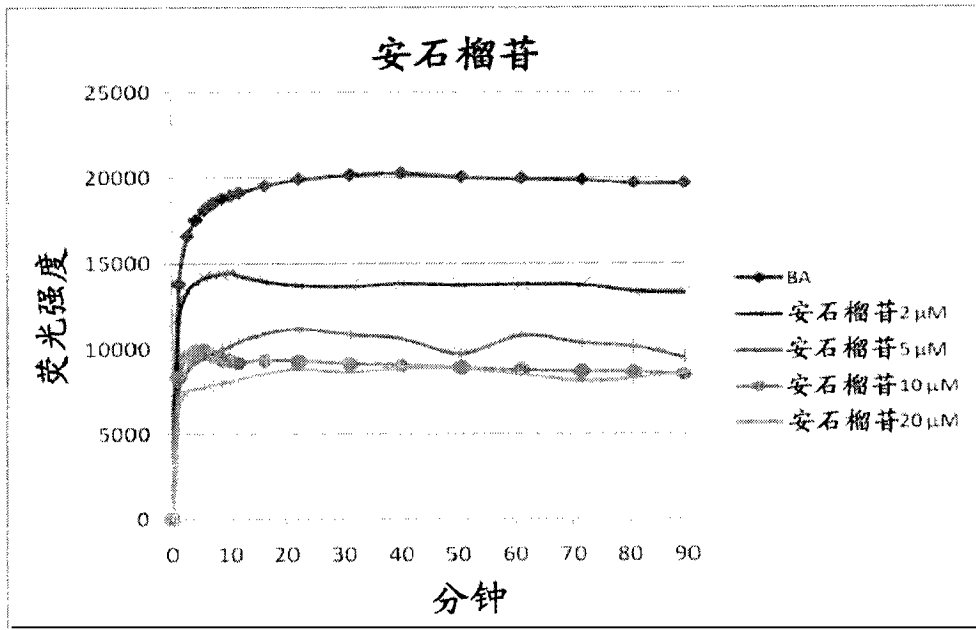


图 15

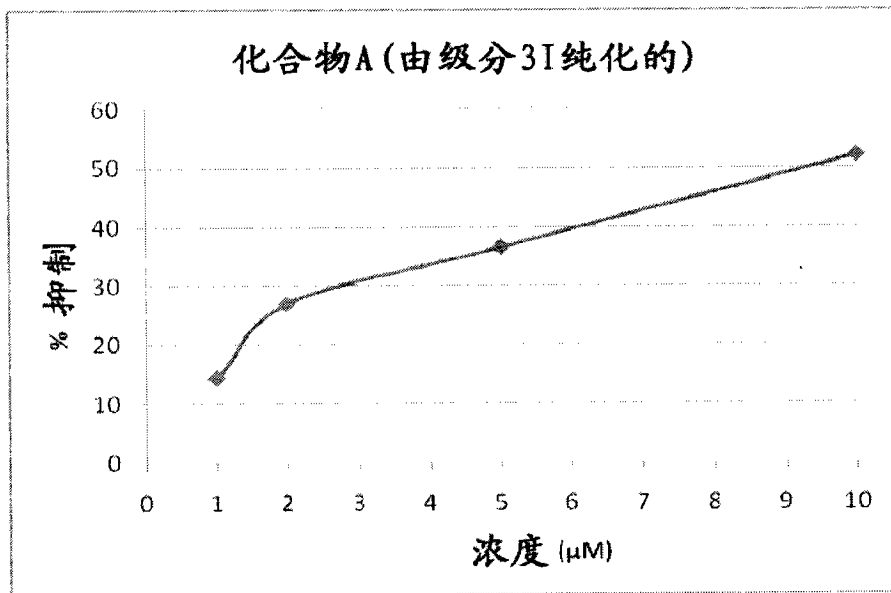
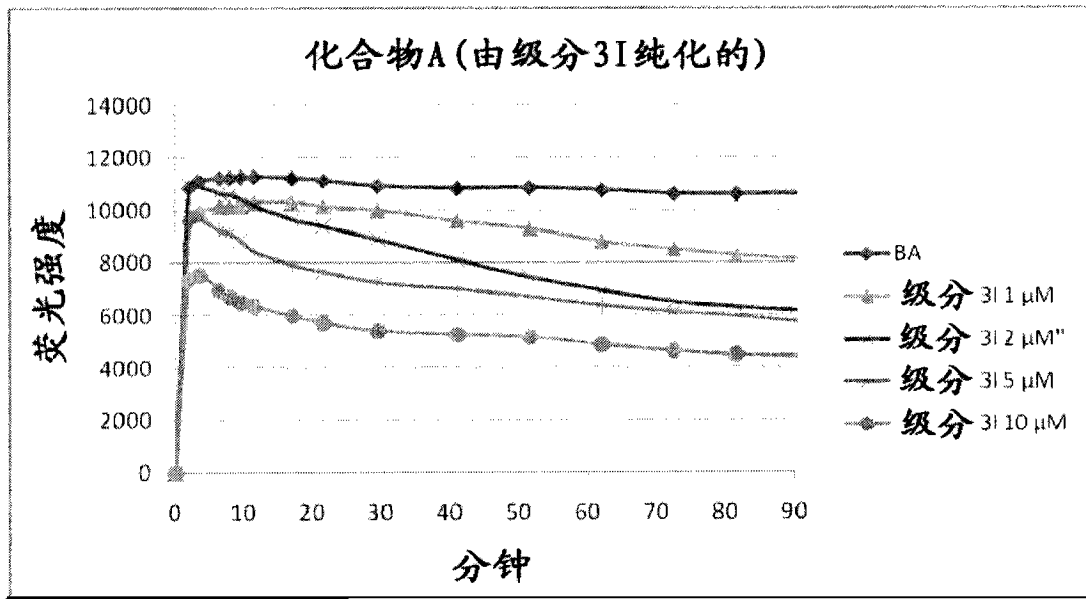


图 16

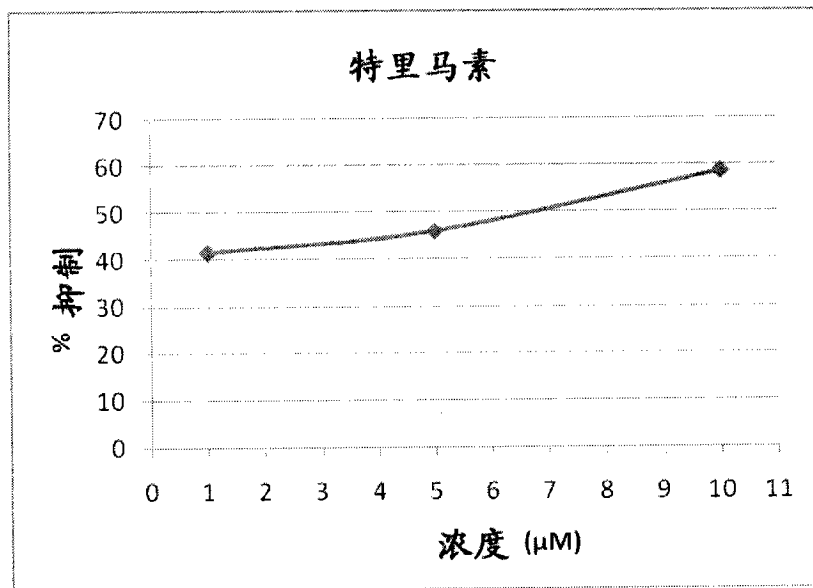
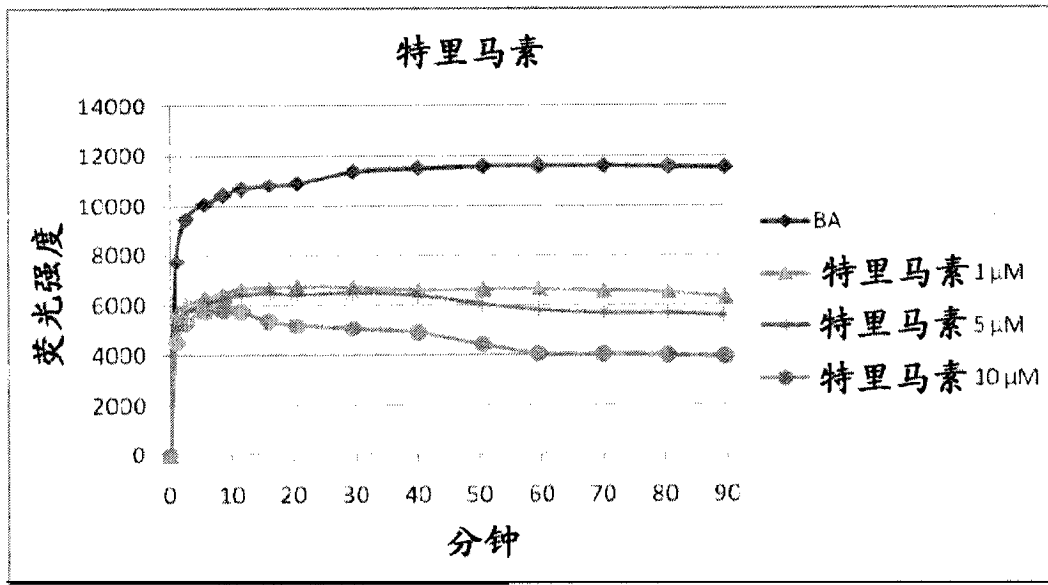


图 17

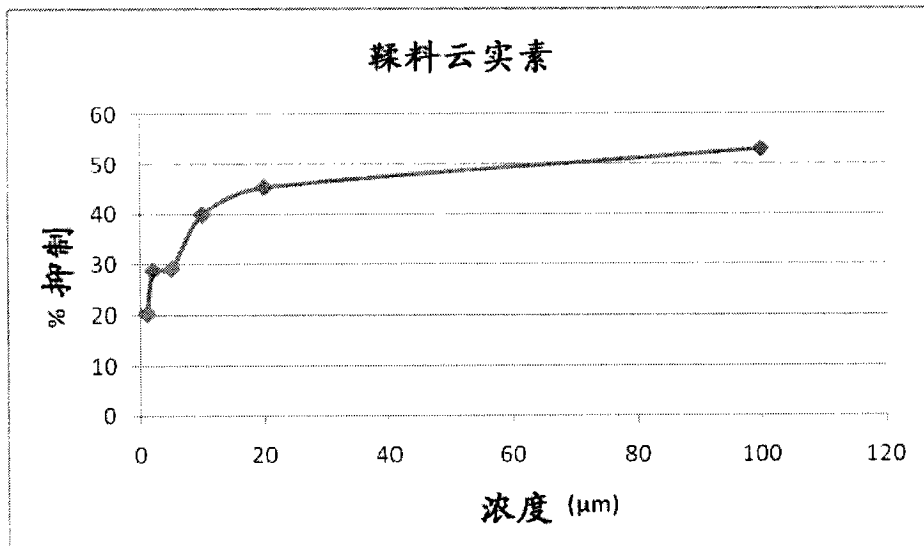
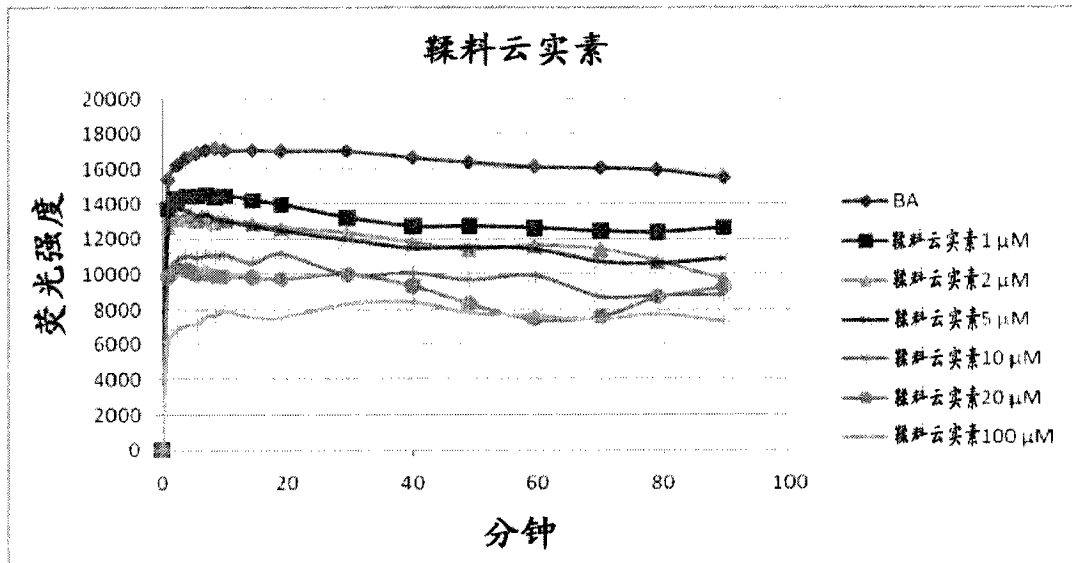


图 18

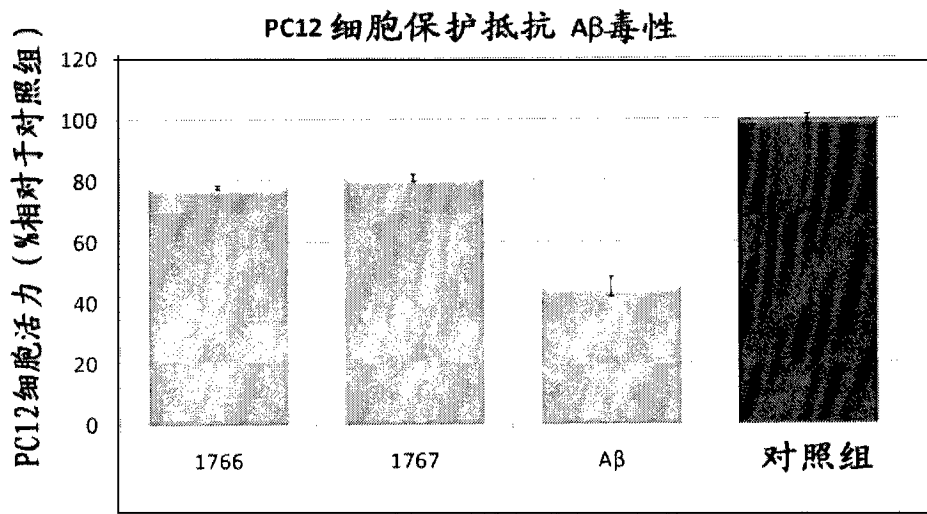
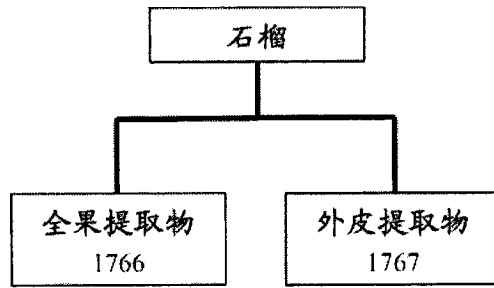


图 19

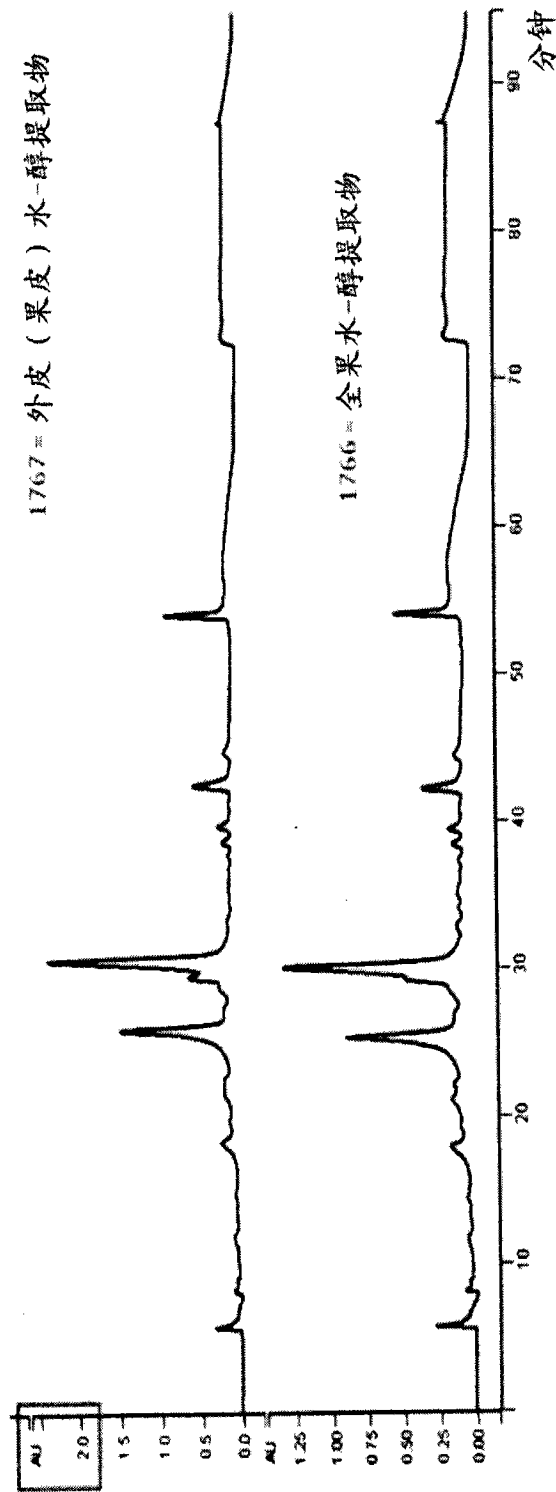


图 20

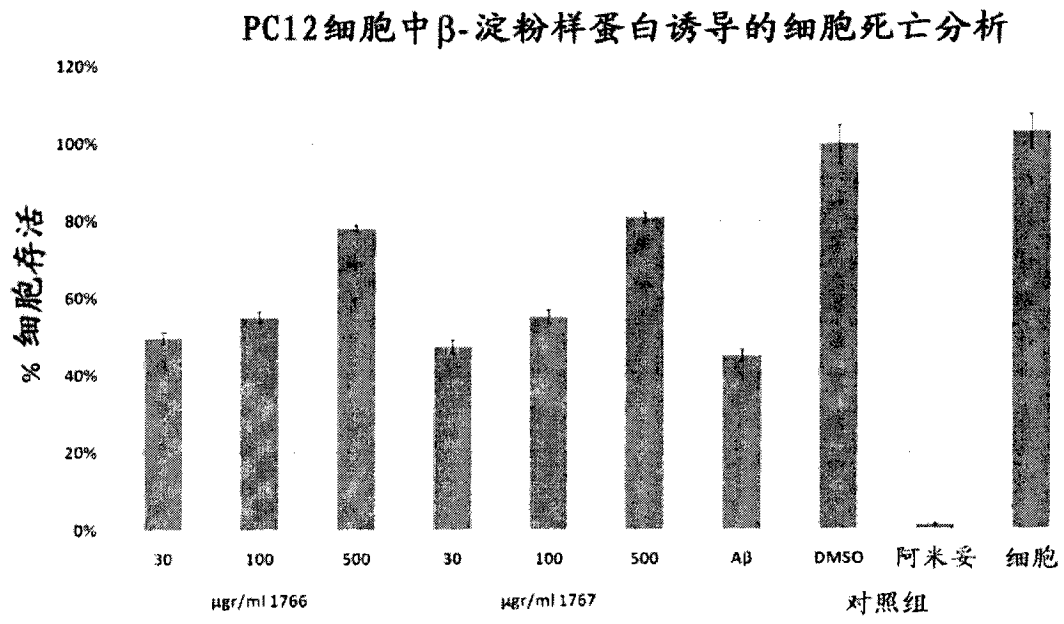
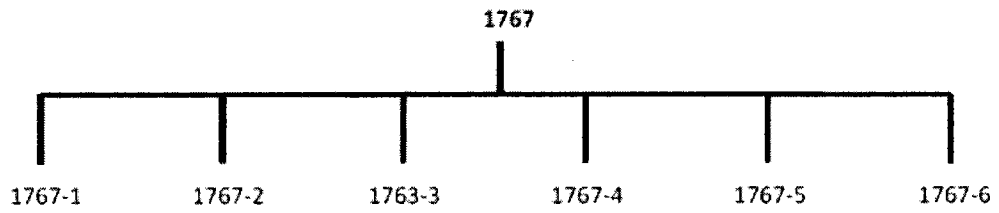


图 21



洗脱液	体积	级分	流速 (ml/min)
水	1.5 L	1767-1	15 - 20
水/甲醇 8:2	400 ml	1767-2	
水/甲醇 6:4	400 ml	1767-3	
水/甲醇 4:6	400 ml	1767-4	
水/甲醇 2:8	400 ml	1767-5	
甲醇	200 ml	1767-6	

提取物 1767 细分级分的 HPLC 图谱

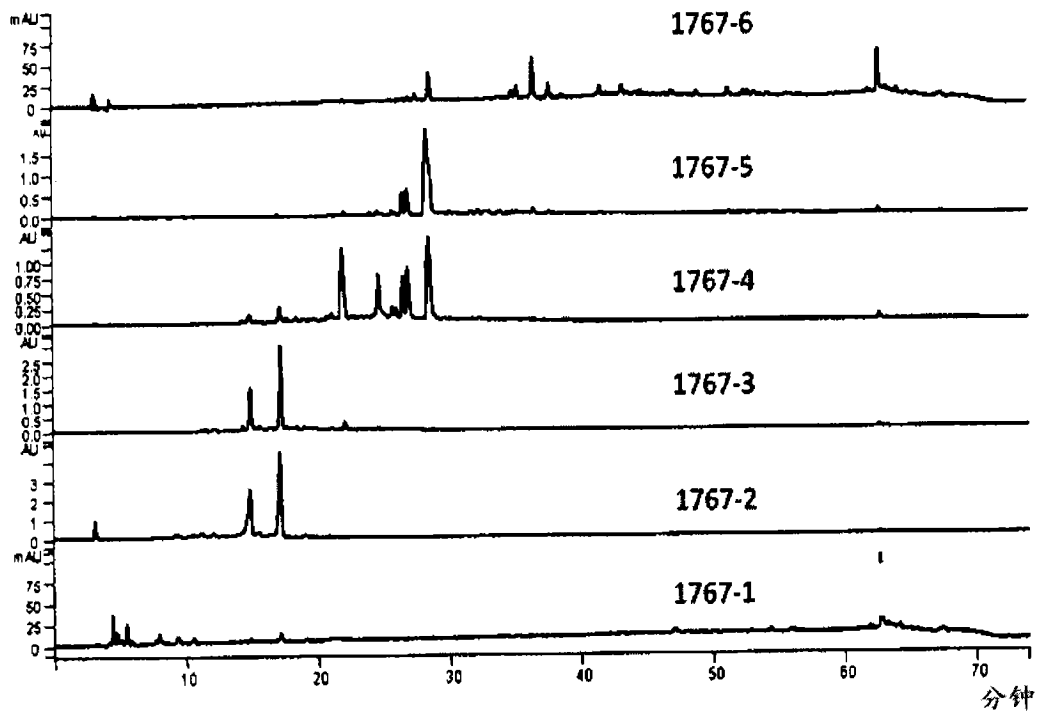


图 22

时间 (秒)	%水 +0.1% 三 氟乙酸 (TFA)	%乙腈	流速 (ml/min)
0:00	95	5	1
35:00	70	30	
50:00	40	60	
55:00	40	60	
60:00	0	100	
63:00	0	100	
65:00	95	5	
74:00	95	5	

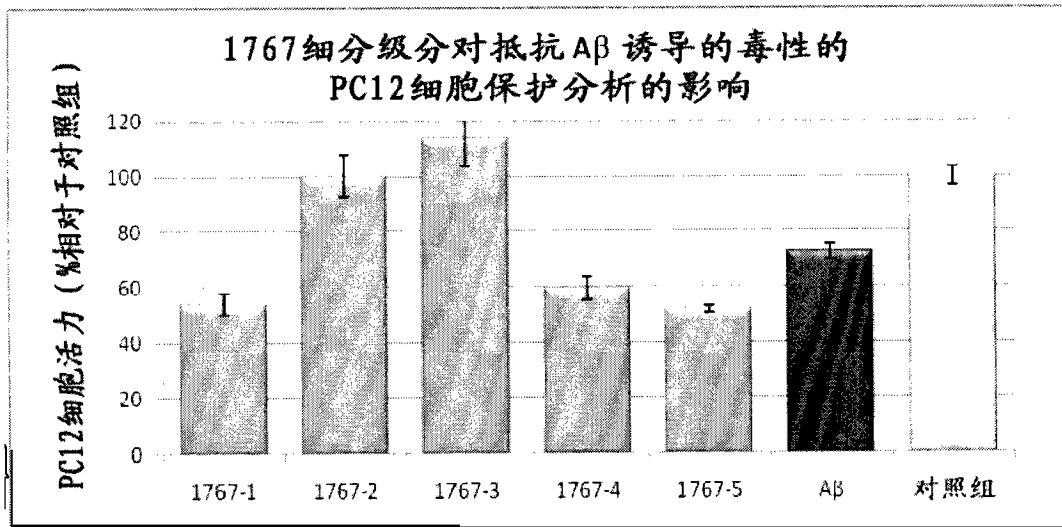


图 23

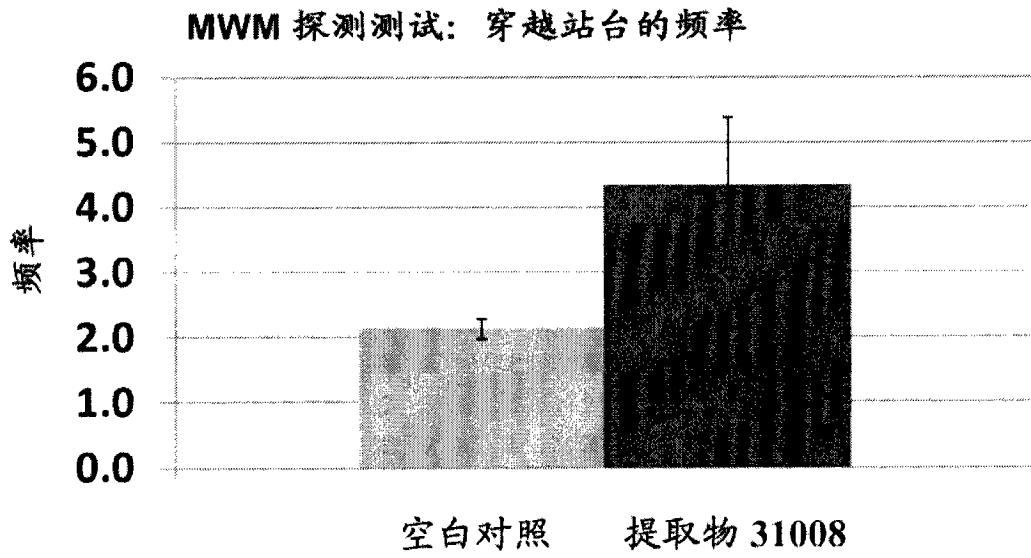
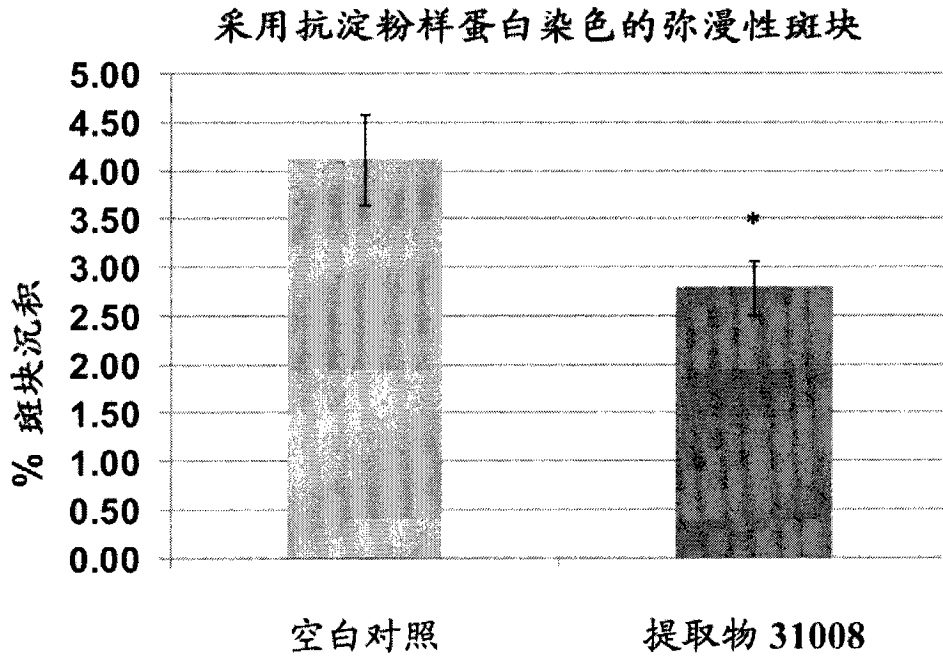


图 24



\*  $p < 0.05$ , 提取物 31008 相对于空白对照

图 25

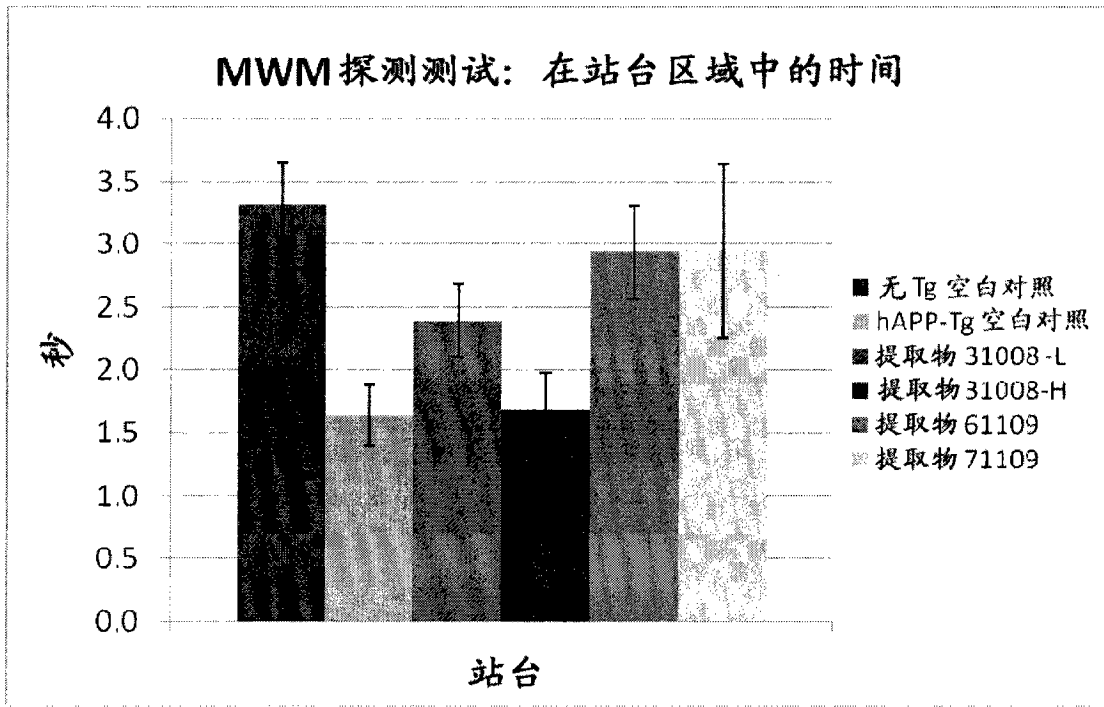


图 26

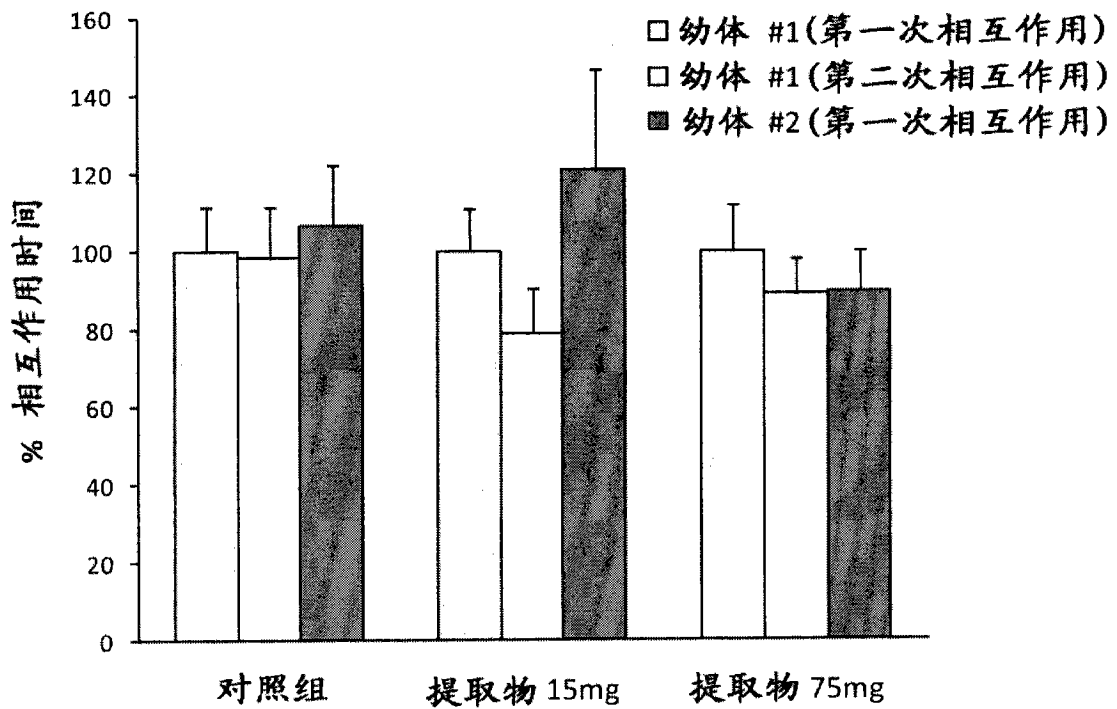


图 27

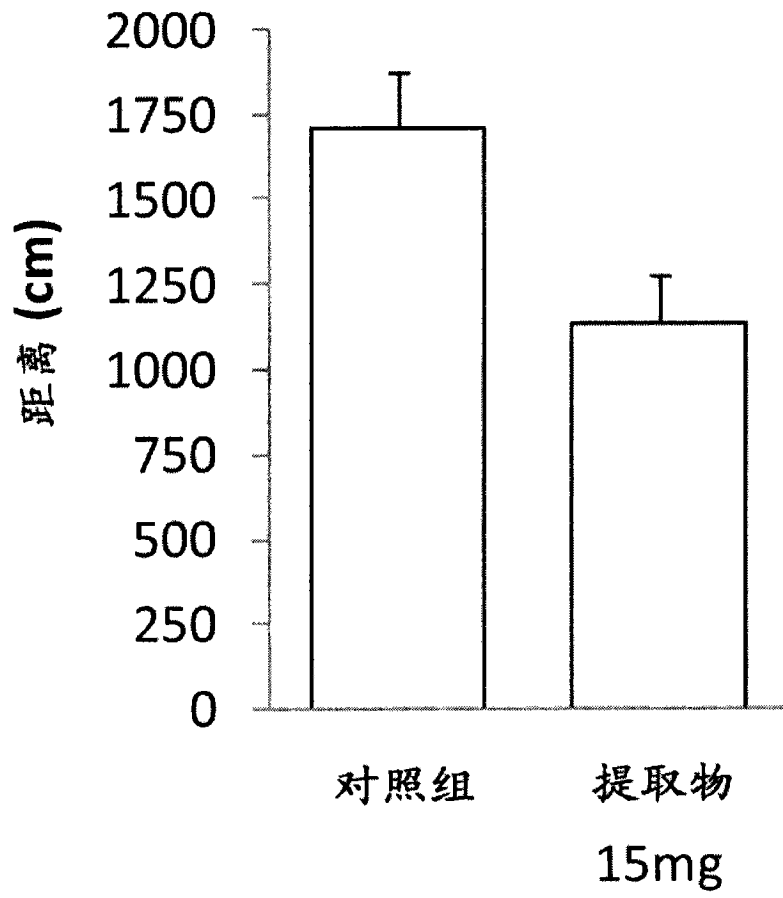
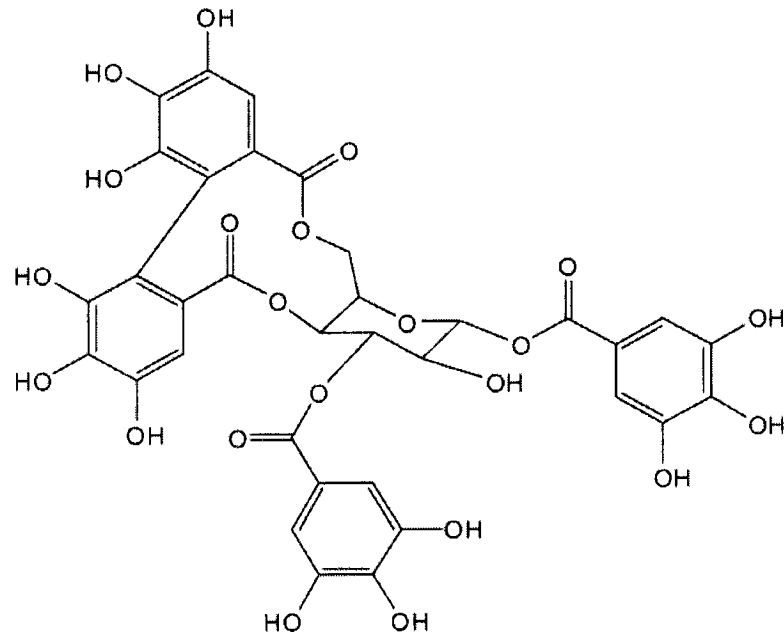


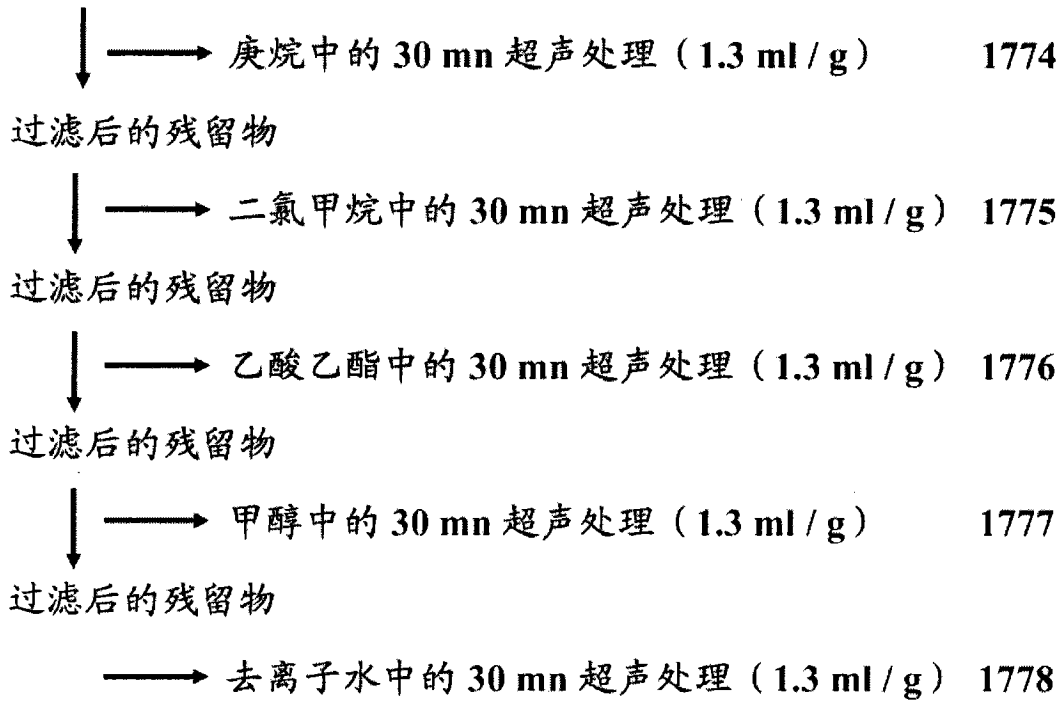
图 28

化合物 A

化学式:  $C_{34}H_{26}O_{22}$   
分子量: 786,56

图 29

外皮“果泥”



产生的提取物的 HPLC 图谱

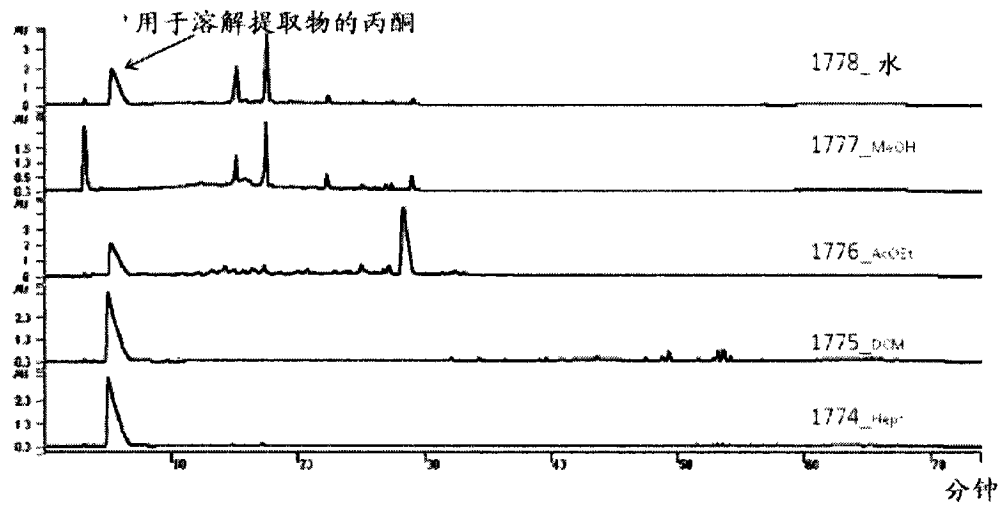


图 30

时间 (秒)	%水+0.1% 三氟乙酸 (TFA)	%乙腈	流速 (ml/min)
0:00	95	5	1
35:00	70	30	
50:00	40	60	
55:00	40	60	
60:00	0	100	
63:00	0	100	
65:00	95	5	
74:00	95	5	

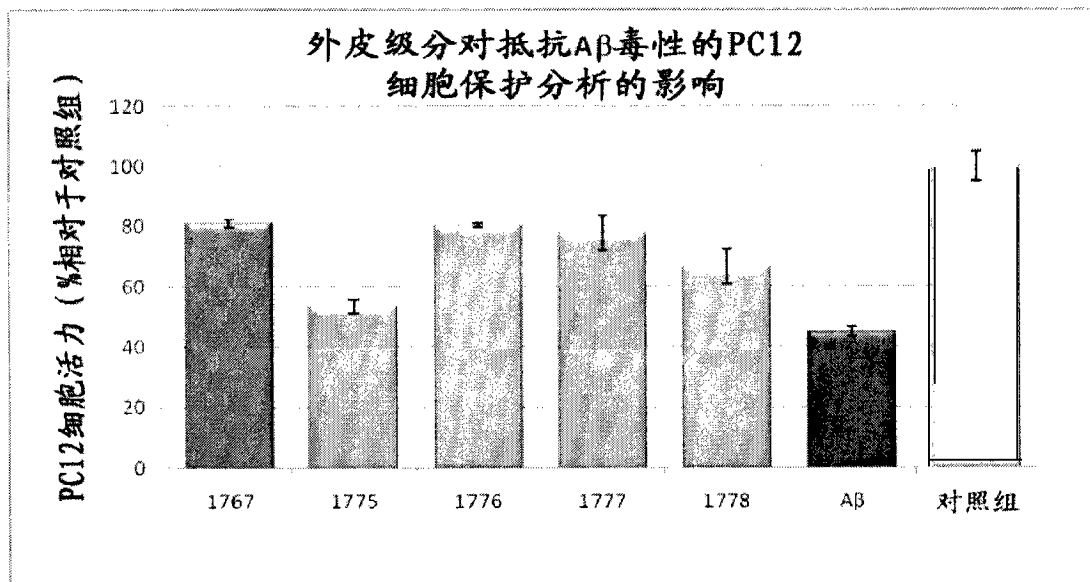


图 31