



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103301094 A

(43) 申请公布日 2013. 09. 18

(21) 申请号 201310187455. 4

(22) 申请日 2005. 11. 17

(30) 优先权数据

60/628, 840 2004. 11. 17 US

(62) 分案原申请数据

200580046701. 8 2005. 11. 17

(71) 申请人 乔安妮·麦克劳林

地址 加拿大安大略省

(72) 发明人 乔安妮·麦克劳林

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 林毅斌 李炳爱

(51) Int. Cl.

A61K 31/047(2006. 01)

A61P 25/28(2006. 01)

权利要求书3页 说明书41页 附图15页

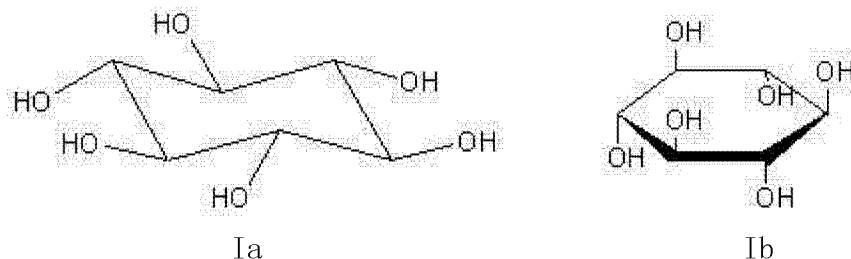
(54) 发明名称

用于治疗蛋白聚集疾病的含鲨肌醇衍生物的
组合物和方法

(57) 摘要

本发明提供了包含鲨-肌醇化合物的组合物、方法和用途,所述鲨-肌醇化合物在包括蛋白折叠和/或聚集紊乱、和/或淀粉样蛋白形成、沉积、蓄积或存留在内的疾病和/或病症的治疗中提供了有益的效果。

1. 一种药用组合物,所述组合物包含一种或多种治疗有效量的式 Ia 或式 Ib 的鲨-肌醇化合物



或其中一、二或三个羟基被取代基置换而构型保持不变的式 Ia 或式 Ib 化合物,或其药可接受盐,以在异常蛋白折叠和 / 或聚集,和 / 或淀粉样蛋白形成、沉积、蓄积或存留为特征的病症的治疗中提供有益的效果。

2. 权利要求 1 的药用组合物,所述组合物包含式 Ia 或式 Ib 的化合物,其中一、二或三个羟基被以下取代基置换:氢;烷基;酰基;烯基;环烷基;卤素; $-\text{NHR}^1$,其中 R^1 为氢、酰基、烷基或 $-\text{R}^2\text{R}^3$,其中 R^2 和 R^3 可相同或不同并表示酰基或烷基; $-\text{PO}_3\text{H}_2$; $-\text{SR}^4$,其中 R^4 为氢、烷基或 $-\text{O}_3\text{H}$;和 $-\text{OR}^3$,其中 R^3 为氢、烷基或 $-\text{SO}_3\text{H}$ 。

3. 权利要求 1 的药用组合物,所述组合物包含式 Ia 或式 Ib 的化合物,其中一个或多个羟基被以下取代基置换:烷基;酰基;烯基; $-\text{NHR}^1$,其中 R^1 为氢、酰基、烷基或 $-\text{R}^2\text{R}^3$,其中 R^2 和 R^3 可相同或不同并表示酰基或烷基; $-\text{SR}^4$,其中 R^4 为氢、烷基或 $-\text{O}_3\text{H}$,或 $-\text{OR}^3$,其中 R^3 为氢、烷基或 $-\text{SO}_3\text{H}$ 。

4. 权利要求 1 的药用组合物,所述组合物包含式 Ia 或式 Ib 的化合物,其中一个或多个羟基被 $-\text{SR}^4$ 置换,其中 R^4 为氢、烷基、 $-\text{O}_3\text{H}$ 或 $-\text{SO}_3\text{H}$ 。

5. 前述权利要求中任一项的药用组合物,其中所述化合物包含与该化合物相互作用的载体。

6. 前述权利要求中任一项的药用组合物,其中所述化合物为前药形式。

7. 前述权利要求中任一项的药用组合物,其中所述有益的效果包括一种或多种以下效果:降低、逆转或抑制 $\text{A}\beta$ 原纤维装配或聚集、 $\text{A}\beta$ 毒性、 $\text{A}\beta$ 42 水平、异常蛋白折叠、聚集、淀粉样蛋白形成、沉积、蓄积或存留,和 / 或淀粉样蛋白脂质相互作用,和 / 或加速预形成的原纤维的分解。

8. 前述权利要求中任一项的药用组合物,其中所述有益的效果包括一种或多种以下效果:破坏聚集的 $\text{A}\beta$ 或 $\text{A}\beta$ 寡聚体;提高或恢复长时程增强;保持突触的功能;抑制、降低或逆转 $\text{A}\beta$ 诱导的进行性认知衰退和脑淀粉样蛋白斑病变;改善认知;延长生命;减少脑 $\text{A}\beta$ 的蓄积;减少脑淀粉样蛋白斑的沉积;减少脑内可溶性 $\text{A}\beta$ 寡聚体;降低神经胶质活性;消炎;和 / 或减缓认知衰退。

9. 前述权利要求中任一项的药用组合物,其中所述疾病为导致 β -片层、原纤维和 / 或聚集体或寡聚体中蛋白、蛋白片段和肽沉积的中枢或外周神经系统病症或系统器官病症。

10. 权利要求 8 的药用组合物,其中所述疾病的特征为淀粉样蛋白沉积。

11. 权利要求 1 的药用组合物,其中所述疾病为 Alzheimer 氏病、Down 氏综合征、拳击员痴呆、多系统萎缩、包涵体肌炎、遗传性脑出血伴随 Dutch 型淀粉样变性、C 型 Nieman-Pick 病、脑 β -淀粉样蛋白血管病、痴呆伴随皮层基底变性、2 型糖尿病淀粉

样变性、慢性炎症的淀粉样变性、恶性及家族性地中海热的淀粉样变性、多发性骨髓瘤和 B 细胞恶液质的淀粉样变性、朊病毒蛋白病的淀粉样变性、Creutzfeldt-Jakob 病、Gerstmann-Straussler 病、库鲁病和瘙痒病、伴随腕挖掘综合征的淀粉样变性、老年心脏性淀粉样变性、家族淀粉样变性性多神经病或伴随内分泌腺肿瘤的淀粉样变性。

12. 前述权利要求中任一项的药用组合物,口服给药。

13. 前述权利要求中任一项的药用组合物,其中所述疾病是 Alzheimer 氏病。

14. 前述权利要求中任一项的药用组合物,用来口服给予一种或多种鲨 - 肌醇化合物以治疗 Alzheimer 氏病。

15. 前述权利要求中任一项的药用组合物,所述组合物包含药学可接受载体、赋形剂或溶媒。

16. 一种稳定的口服药用组合物,包含权利要求 1、2、3 或 4 中限定的基本纯的式 Ia 或式 Ib 的鲨 - 肌醇化合物,用于治疗具以下特征的疾病:异常蛋白折叠和 / 或聚集,和 / 或淀粉样蛋白形成、沉积、蓄积或存留。

17. 前述权利要求中任一项的药用组合物,所述组合物包含用微生物方法步骤生产的鲨 - 肌醇化合物。

18. 一种治疗受试者的疾病的方法,所述疾病的特征为异常蛋白折叠和 / 或聚集,和 / 或淀粉样蛋白形成、沉积、蓄积或存留,所述方法包括给予受试者治疗有效量的一种或多种前述权利要求中任一项限定的鲨 - 肌醇化合物以提供有益的效果,优选在治疗后还有持续的有益效果。

19. 权利要求 18 的方法,其中所述疾病的特征为淀粉样蛋白沉积。

20. 权利要求 18 的方法,其中所述有益的效果包括一种或多种以下的效果:破坏聚集的 A β 或 A β 寡聚体;提高或恢复长时程增强;保持突触的功能;抑制、降低或逆转 A β 诱导的进行性认知衰退和脑淀粉样蛋白斑病变;改善认知;延长生命;减少脑 A β 的蓄积;减少脑淀粉样蛋白斑的沉积;减少脑内可溶性 A β 寡聚体;降低神经胶质活性;消炎;和 / 或减缓认知衰退。

21. 一种延缓疾病发展的方法,所述疾病的特征为异常蛋白折叠和 / 或聚集,和 / 或淀粉样蛋白形成、沉积、蓄积或存留,所述方法包括给予治疗有效量的前述权利要求中任一项限定的鲨 - 肌醇化合物或前述权利要求中任一项的组合物。

22. 一种在受试者的认知缺陷和淀粉样蛋白斑神经病变开始后减少、逆转或抑制淀粉样蛋白沉积和神经病变的方法,所述方法包括给予受试者治疗有效量的前述权利要求中任一项限定的鲨 - 肌醇化合物或前述权利要求中任一项的组合物。

23. 一种改善患 Alzheimer 氏病受试者认知缺陷的方法,所述方法包括给予受试者治疗有效量的前述权利要求中任一项限定的鲨 - 肌醇化合物或前述权利要求中任一项的组合物。

24. 一种提高或保持受试者突触功能的方法,所述方法包括给予受试者治疗有效量的前述权利要求中任一项限定的一种或多种鲨 - 肌醇化合物、其药学可接受盐或前述权利要求中任一项的组合物。

25. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述组合物被配制成口服给药形式。

26. 前述权利要求中任一项限定的鲨 - 肌醇化合物或前述权利要求中任一项的组合物

在制备可预防和 / 或治疗以异常蛋白折叠和 / 或聚集, 和 / 或淀粉样蛋白形成、沉积、蓄积或存留为特征病症的药物中的用途。

27. 权利要求 26 中要求保护的用途, 其中所述药物提供一种或多种治疗后有益的效果。

28. 权利要求 27 中要求保护的用途, 其中所述有益的效果包括一种或多种以下的效果: 破坏聚集的 A β 或 A β 寡聚体; 提高或恢复长时程增强; 保持突触的功能; 抑制、降低或逆转 A β 诱导的进行性认知衰退和脑淀粉样蛋白斑病变; 改善认知; 延长生命; 减少脑 A β 的蓄积; 减少脑淀粉样蛋白斑的沉积; 减少脑内可溶性 A β 寡聚体; 降低神经胶质活性; 消炎; 和 / 或延缓认知衰退。

29. 前述权利要求中任一项限定的鲨 - 肌醇化合物或前述权利要求中任一项的组合物在制备预防和 / 或治疗以异常蛋白折叠和 / 或聚集, 和 / 或淀粉样蛋白形成、沉积、蓄积或存留为特征病症的可口服给药的药用组合物中的用途。

30. 前述权利要求中任一项的用途, 其中包括用微生物方法步骤制备的鲨 - 肌醇化合物。

31. 一种药盒, 包含一种或多种前述权利要求中任一项限定的鲨 - 肌醇化合物或前述权利要求中任一项的药用组合物、容器和使用说明。

用于治疗蛋白聚集疾病的含鲨肌醇衍生物的组合物和方法

[0001] 本申请是申请日为 2005 年 11 月 17 日、申请号为 200580046701.8、发明名称为“用于治疗蛋白聚集疾病的含鲨肌醇衍生物的组合物和方法”的发明专利申请的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明总体上涉及鲨肌醇化合物和组合物、该组合物的方法和用途,特别是治疗以异常蛋白折叠和 / 或聚集、或淀粉样蛋白形成、沉积、蓄积或存留为特征的病症的方法。

[0003] 发明背景

[0004] 多条证据表明,淀粉样蛋白 β -肽 ($A\beta$) 神经毒性寡聚 / 前原纤维聚集体的蓄积,是 Alzheimer 病 (AD) 发病机理中的核心事件 [1,2]。引导人们试图通过阻断 $A\beta$ 的产生 (用 β -或 γ -分泌酶抑制剂),加速其消除,或防止其聚集和毒性,来开发新疗法。抗 $A\beta$ 疗法来治疗 AD 的潜在用途,已从疫苗的临床试验中得到了试验性的支持,表明一小组的 AD 患者在临床上和神经病理学上得到改善 [3,4]。但是,抗 $A\beta$ 疫苗还在一些患者中诱导出 T 细胞介导的脑-脊髓膜炎,使得这种疫苗不适于广泛的临床应用 [5]。不仅如此, $A\beta$ 疫苗在一些小鼠模型中显示出能够通过抗体介导的对 $A\beta$ 原纤维形成和毒性的抑制起作用 [6,8]。因此,希望能够鉴别出小分子 $A\beta$ 抑制剂,从而避免免疫疗法的潜在风险。

[0005] 发明概述

[0006] 本发明提供了组合物,特别是药用组合物,其中包含的鲨肌醇化合物能在本文所述病症和 / 或疾病的治疗中提供有益的效果,特别是蛋白折叠和 / 或聚集,和 / 或淀粉样蛋白形成、沉积、蓄积或存留方面的病症。在一个方面,本发明提供了药用组合物,其中包含一种或多种鲨肌醇化合物,其提供有益的效果,特别是治疗后还有持续的有益效果。本发明组合物能够提供的有益的效果包括提高疗效,特别是持续的疗效。

[0007] 本发明同时提供了药用组合物,目的是用来给予患者以提供有益效果,特别是持续的有益效果,该组合物包含鲨肌醇化合物,特别是纯鲨肌醇化合物,尤其是基本纯的鲨肌醇化合物,任选包含一种或多种药学可接受载体、赋形剂或溶媒。

[0008] 本发明同时提供了用于治疗疾病和 / 或病症的药用组合物,该组合物包含治疗有效量的鲨肌醇化合物,以在药学可接受载体、赋形剂或溶媒中提供持续的有益效果。

[0009] 一方面,提供了含鲨肌醇的药用组合物,该组合物适于给予患者以提供持续的有益效果来治疗疾病和 / 或病症。在一个实施方案中,组合物以一定的形式给予患者,从而抑制、减轻或逆转患者的 $A\beta$ 原纤维装配或聚集、 $A\beta$ 毒性、异常蛋白折叠、聚集、淀粉样蛋白形成、沉积、蓄积或存留,和 / 或加速预先形成的原纤维解聚。具体而言,该组合物的形式能够破坏聚集的 $A\beta$ 或 $A\beta$ 寡聚体;提高或恢复长时程增强;保持突触的功能;抑制、降低或逆转 $A\beta$ 诱导的进行性认知衰退和脑淀粉样蛋白斑病变;改善认知;延长生命;减少脑 $A\beta$ 的蓄积;减少脑淀粉样蛋白斑的沉积;减少脑内可溶性 $A\beta$ 寡聚体;降低神经胶质活性;消炎;和 / 或延缓认知衰退,特别是能够在治疗结束后持续一段时间。

[0010] 本发明涉及包含鲨肌醇化合物的组合物,该组合物提供了有益的效果,特别是持续的有益效果,用于治疗疾病和 / 或病症,特别是以淀粉样蛋白沉积为特征的疾病和 / 或病

症,尤其是阿尔茨海默病。

[0011] 另一方面,本发明描绘了包含鲨肌醇化合物的组合物的特征,一定剂量的含鲨肌醇化合物能有效破坏聚集的 A β 或 A β 寡聚体;提高或恢复长时程增强;保持突触的功能;抑制、降低或逆转 A β 诱导的进行性认知衰退和脑淀粉样蛋白斑病变;改善认知;延长生命;减少脑 A β 的蓄积;减少脑淀粉样蛋白斑的沉积;减少脑内可溶性 A β 寡聚体;降低神经胶质活性;消炎;和/或延缓认知衰退,特别是在给药后还能持续一段时间。该组合物可以在药学可接受载体、赋形剂或溶媒中。

[0012] 本发明还提供了制备包含一种或多种鲨肌醇化合物的稳定组合物的方法,该组合物能够提供有益的效果,优选治疗后持续的有益效果。本发明还提供了制备包含一种或多种纯的,特别是基本纯的鲨肌醇化合物的稳定组合物的方法,该组合物能够提供有益的效果,优选治疗后持续的有益效果。组合物制备完成后,可以将其置于合适的容器中,并标示适应症。为了本发明组合物的给药,这类标签应标出用法、用量和给药频率。

[0013] 用于本发明的鲨肌醇化合物可以是前药形式,可在体内转化为活性化合物。举例而言,前药包含可裂解基团,给予受试者后裂解基团发生裂解,提供活性(如治疗活性)化合物,或中间体化合物,然后产生活性化合物。可裂解基团可以是酶法或非酶法去除的酯。

[0014] 用于本发明的鲨肌醇化合物可任选包含与化合物相互作用的载体。载体可包括聚合物、碳酸酯或肽,或其组合。该载体可被例如一个或多个烷基、卤素、巯基、羟基或氨基取代。

[0015] 一方面,本发明提供了饮食补充剂组合物,该组合物包含一种或多种鲨肌醇化合物或其营养学可接受的衍生物。一方面,本发明提供了供哺乳动物用,特别是供人用的用来改善记忆的饮食补充剂,该添加剂包含鲨肌醇化合物或其营养学可接受的衍生物。另一方面,本发明提供了一种添加剂,该添加剂包含鲨肌醇化合物或其营养学可接受的衍生物,以减缓受试者精神病进程的恶化,或改善其记忆,尤其是短时记忆。本发明饮食补充剂优选味道宜人,可被机体有效吸收,并提供实质性治疗效果。

[0016] 本发明同时提供制备包含鲨肌醇化合物的市售制剂的方法。

[0017] 一方面,以治疗或预防性目的给予受试者鲨肌醇化合物,特别是纯或基本纯的鲨肌醇化合物,以及本发明的组合物,以治疗本文公开的疾病和/或病症,特别是以淀粉样蛋白形成、聚集或沉积相关的疾病和/或病症。不希望被任何特定的理论束缚,所述化合物和组合物可用来改善疾病的病程,机理包括但不限于:预防、降低、逆转和/或抑制 A β 原纤维或 A β 寡聚体装配或聚集、A β 毒性、A β 42 水平、异常蛋白折叠或聚集、淀粉样蛋白形成、沉积、蓄积或存留,和/或淀粉样蛋白脂质相互作用;预防、降低、逆转和/或抑制 A β 诱导的神经变性或细胞毒性;加速预形成的原纤维的分解;破坏或解聚聚集的 A β 或 A β 寡聚体;提高或恢复长时程增强;保持突触的功能;提高 A β 从脑中的清除;增加 A β 的降解;和/或预防、降低、逆转和/或抑制脑 A β 的蓄积;减少脑淀粉样蛋白斑的沉积;减少脑内可溶性 A β 寡聚体;降低神经胶质活性;消炎;和/或延缓认知衰退。

[0018] 本发明还精心设计了包含至少一种鲨肌醇化合物的组合物的用途,用于制备预防和/或治疗疾病和/或病症的药物。本发明该提供了本发明的药用组合物在制备治疗和/或预防疾病和/或病症药物中的用途。

[0019] 本发明提供了治疗和/或预防疾病和/或病症的方法,包括给予受试者治疗有效

量的一种或多种鲨肌醇化合物以提供有益的效果。一方面,本发明提供了一种治疗,该治疗在治疗后还产生持续的有益效果。

[0020] 本发明还包括补充健康人饮食的方案,方法为给予人鲨肌醇化合物或包含鲨肌醇化合物的组合物或其营养学可接受衍生物和可接受载体的饮食补充剂。本发明还包括补充健康人饮食的方案,方法为每天给予人鲨肌醇化合物或其营养学可接受的衍生物。

[0021] 本发明同时提供包含一种或多种鲨肌醇化合物或本发明药用组合物的药盒。一方面,本发明提供预防和/或治疗疾病和/或病症的药盒,该药盒包含的组合物中含有一种或多种鲨肌醇化合物、载体和使用说明。该药盒的组合物中还可包含药学可接受载体、赋形剂或溶媒。

[0022] 本领域技术人员根据以下附图和详述应对本发明的这些以及其它方面、特征和优势了然于心。

[0023] 附图简述

[0024] 通过参考附图可以更好地理解本发明,其中:

[0025] 图 1. 取 5 月龄小鼠(每处理组 $n = 10$),处理 28 天后,于 6 个月龄时进行空间辨识记忆实验。表-肌醇处理的 TgCRND8 小鼠与未处理 TgCRND8 同窝小鼠没有差异($p = 0.27$;图 1A),但与非-Tg 同窝小鼠相比仍存在损害($F_{1,14} = 11.7$, $p = 0.004$;图 1C)。相反,鲨肌醇处理的 TgCRND8 小鼠显著优于未处理的 TgCRND8 同窝小鼠($p = 0.01$;图 1B),并且与非-Tg 同窝小鼠没有差异($F_{1,13} = 2.9$, $p = 0.11$;图 1D)。以环交叉指数(annulus crossing index)为指标的探测实验,表明鲨肌醇处理的小鼠与非-Tg 同窝小鼠没有统计学差异($p = 0.64$;图 1E)。竖直棒表示 s. e. m。一个月的鲨肌醇处理后,与对照动物相比,小鼠的斑负载降低(图 1F,图 1G),而对照动物海马中斑高负载。斑负载用抗-A β 抗体(棕色)鉴别,星形胶质细胞用抗-GFAP 抗体(红色)标记。比例尺 300 μm 。

[0026] 图 2. 鲨肌醇和表肌醇处理和未处理的 TgCRND8 小鼠(图 2A)中可溶性寡聚 A β 的点印迹分析。可溶性蛋白分离自 4 只代表性的 TgCRND8 小鼠:预防研究组 4 月龄和 6 月龄的处理和未处理小鼠,治疗组 5 月龄处理和未处理小鼠,将分离蛋白应用于硝基纤维素膜上并用寡聚体-特异性抗体探测,然后用 6E10 再探测。用合成 A β 42、单体(底行:泳道 1 和 2)和原纤维(泳道 3 和 4)作为寡聚体-特异性抗体的阴性对照,其仅识别可溶性聚集体。6E10 识别所有 A β 种类(底行,右 4 个泳道)。长时程增强可被可溶性 A β 寡聚体阻断(图 2B;绿方形)并被鲨肌醇治疗恢复(图 2B,蓝方形)。LTP 不受鲨肌醇处理的含 A β 寡聚体的 7PA2 培养基(图 2C;红方形;与图 2B 中数据相同)和不含寡聚体的普通 CHO 培养基(图 2C;蓝圆形)的影响。

[0027] 图 3 所示为 AZD103 对 A β -依赖性抑制诱导的长时程增强作用的影响。重复刺激后, (“强直电刺激(tetanus)”):多箭头),单次刺激(单箭头)后的场电位提高。可通过场电位斜率(EPSP)的变化百分率来定量。图 3 显示了,用以下物质对海马切片灌注后,EPSP 斜率随时间的百分率变化:1.25 μM AZD-103+CHO CM(条件培养基)(CHO 细胞不分泌 A β 寡聚体)预孵育混合物,或 1.25 μM AZD-103+7PA2CM(其确实分泌 A β 寡聚体)预孵育混合物以及单独的 7PA2 CM(在每种情况下,CM 和 AZD103 在灌注前一起预孵育 30min)(图 3A);用 7PA2CM 与表肌醇和手性肌醇的预孵育混合物对海马切片灌注后,EPSP 斜率随时间的百分率变化(图 3B);已用以下物质对海马切片灌注后,强直电刺激后 60min EPSP 斜率的百

分率变化比较:仅用 7PA2 CM,或与 1.25 μ MAZD-103、表肌醇和手性肌醇的预孵育混合物;以及 CHO CM 与 AZD103 和手性肌醇的预孵育混合物(图 3C)。

[0028] 图 4 为蛋白质印迹,表明将 AZD-103 应用于 7PA2CM 减少了 A β 三聚体的检出。

[0029] 图 5 为 AZD-103 的剂量反应曲线,用来评价其预防 A β 对 LTP 的诱导的抑制的能力。4 个不同浓度的 AZD-103 (0.125、0.5、1.25 和 5.0 μ M) 加入到 7PA2CM 中,然后用该混合物灌注海马切片。

[0030] 图 6A 证明了 AZD103 与 7PA2 CM 的预孵育时间对 LTP 的诱导的作用。该图显示了 4 个不同预孵育时间(15、30、120 和 240 分钟)的 EPSP 斜率随时间的百分率变化。

[0031] 图 6B 的棒图显示了已用以下物质对海马切片灌注后,强直电刺激后 60min EPSP 斜率的百分率变化:用 7PA2CM 预孵育 15、30、120 和 240 分钟的 0.5 μ MAZD-103。

[0032] 图 6C 显示了单用 7PA2 CM,20 分钟后再用 0.5 μ M AZD-103 对小鼠脑切片灌注后,EPSP 斜率随时间的百分率变化。

[0033] 图 7A 和 7B 为蛋白质印迹,显示当 AZD-103 在条件培养前直接加入到 7PA2 细胞本身时(条件培养前);和当 AZD-103 加入到 7PA2 CM 中(条件培养后)时 AZD103 对 A β 寡聚体的作用。

[0034] 图 7C 显示了直接测得的 AZD-103 对寡聚体的作用。

[0035] 图 7D 显示了归一化至 APP 水平的 AZD-103 对寡聚体的作用。

[0036] 图 7E 显示了归一化至 A β 单体水平的 AZD-103 对寡聚体的作用。

[0037] 图 8 显示了用 CM 对小鼠脑切片灌注后,本身用 0.5 μ M AZD-103(条件培养前)预孵育的 7PA2 细胞的 EPSP 斜率随时间的百分率变化。

[0038] 图 9 显示了 A β -诱导的认知障碍被用 AZD-103 对 A β 的预孵育所缓解。100%错误率根据基线时动物所犯的错误的数量来设置。显示了灌注以下物质后的错误率:单用 A β 、A β +AZD103 和单用 AZD103。

[0039] 图 10 显示了 A β -诱导的急性认知障碍被口服 AZD-103 缓解。100%错误率根据基线时动物所犯的错误的数量来设置。显示了口服 0、30、100 和 300mg/kg/天 AZD103 时,接受静脉灌注 A β 的动物所犯错误率。

[0040] 实施方案详述

[0041] 词汇

[0042] 本文述及的由端值限定的数值范围,包括归入该范围内的所用数值和分数(例如 1-5,包括 1、1.5、2、2.75、3、3.90、4 和 5)。同样可以理解,所有数值及其分数都推定受术语“约”的修饰。术语“约”是指将其参照的数值加或减 0.1-50%、5-50%或 10-40%,优选 10-20%,更优选 10%或 15%。此外,要理解“一”和“该”包括“多”,除非另有说明。因此,例如述及包含“一种化合物”的组合物时,包括两种或多种化合物的混合物。

[0043] 术语“给药”和“给予”,是指将本文精心设计的具有有效量的化合物或组合物递送受试者以起到预防和/或治疗目的的过程。组合物的给予要按照良好药品质量管理规范,同时要参考受试者的临床条件、给药位点和方法、剂量、患者年龄、性别、体重和医生所知的其它因素。

[0044] 术语“治疗”是指逆转、缓解或抑制所述述与述及的疾病和/或病症的发展,或这类疾病和/或病症的一种或多种症状。依赖于受试者的条件,该术语还指预防疾病,并包括

预防疾病的开始,或预防疾病的相关症状。治疗可以急性或慢性方式开展。还术语还指在疾病发作前减轻疾病或其相关症状的严重性。疾病发作前的这类预防或疾病严重性的减轻是指,给受试者本发明的化合物或组合物,而此时受试者的这类疾病尚未发作。“预防”还指预防疾病或这类疾病的一种或多种相关症状的复发。术语“治疗”和“医疗上的”是指治疗的作用,“治疗”定义见上。

[0045] 术语“受试者”、“个体”或“患者”,在本文可相换使用,是指动物,包括温血动物如哺乳动物,其患有或易患本文所述疾病和 / 或病症。哺乳动物包括但不限于哺乳类的任何成员。本发明的一个方面中,该术语指人。该术语还包括食用家畜或宠物,包括马、牛、绵羊、家禽、鱼、猪、猫、狗,和动物园动物、山羊、猿(例如大猩猩或黑猩猩),以及啮齿类动物如大鼠和小鼠。典型的待治疗受试者包括已患、正患或易患本文所述疾病和 / 或病症的人。受试者可以具有也可以不具有本文所述的疾病和 / 或病症,例如阿尔茨海默病的遗传倾向。在某些方面,受试者显示出认知缺陷和淀粉样蛋白斑神经变性的迹象。在本发明的实施方案中,受试者患或易患阿尔茨海默病。

[0046] 本文所用的术语“健康受试者”是指,受试者,特别是哺乳动物,未患任何疾病和 / 或病症,特别是未诊断出疾病、病症、虚弱、或已知可损害或减弱记忆的其它疾患。

[0047] 术语“药学可接受载体、赋形剂或溶媒”是指,不影响活性成分的效力或活性的介质,和对服用其的宿主没有毒性的介质。载体、赋形剂或溶媒包括稀释剂、粘合剂、胶粘剂、润滑剂、崩解剂、膨胀剂、润湿剂或乳化剂、pH 调节剂,和其它材料如需要用来制备特定组合物的吸附剂。载体等的实例包括但不限于盐水、缓冲盐水、葡萄糖、水、甘油、乙醇及其组合。活性物质的这类介质和剂的用途为本领域所熟知。

[0048] 本文所用的术语“营养药学可接受的衍生物”是指,所述化学物质的衍生物和取代物,该物质以类似的反式产生所需的效果,并且结构上类似,而且生理学上相容。取代物的实例包括但不限于所述化合物的盐、酯、水合物和络合物。所述取代物还可以是所述化合物的前体和前药,其随后在体内反应生成所述化合物或其取代物。

[0049] 术语“纯”通常是指纯度大于 90%、92%、95%、97%、98% 或 99%，“基本纯”是指化合物经合成从而使该化合物与适于在本发明组合物或治疗剂型中考虑使用的特制的化合物一样,仅含有那些不易于或不能以合理的方式除去的杂质。

[0050] “药学可接受盐”是指药学上可接受的并且具有所需的药理学性质的盐。药学可接受盐是指那些适用于与受试者或患者的组织接触,但没有过度的毒性、刺激性、过敏反应等,并具有合理的收益 / 风险比的盐。药学可接受盐,例如在 S. M. Berge, et al., J. Pharmaceutical Sciences (药学科学), 1977, 66 : 1 中有描述。合适的盐包括化合物中的酸性质子能够与无机或有机碱反应所形成的盐。合适的无机盐包括与钠和钾等碱金属,以及与钙、镁和铝形成的盐。合适的有机盐包括与胺碱,例如乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、氨丁三醇、N- 甲基葡萄糖胺等有机碱形成的盐。合适的盐还包括与无机酸或有机酸形成的酸加成盐,所述无机酸有盐酸和氢溴酸,所述有机酸有乙酸、柠檬酸、马来酸和烷和芳磺酸如甲磺酸和苯磺酸。当有两个酸性基团存在时,药学可接受盐可以是单酸单盐或二盐;同样,当有两个以上基团存在时,部分或全部基团可被盐化。

[0051] “联合治疗”是指将活性成分同时给予待治疗的患者。当联用时,每种组分可同时或先后以任何次序在不同位点给予。因此,每种组分可分开给予,但在时间上应足够接近以

提供所需的疗效,特别是有益的、加合的或协同的疗效。第一化合物可在另外包含用第二化合物的治疗的方案中给予。在某些方面,该术语是指任选在一年内给予鲨肌醇化合物和第二治疗药,包括分开给予以及同时给予各自含有一种该化合物的药物,而不论该化合物存在于一种制剂中还是分属不同的制剂。

[0052] “可检测物质”包括但不限于放射性同位素(例如 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{125}I 、 ^{131}I),荧光标记(例如 FITC、蓝光硷性蕊香红、镧系元素、磷光剂),发光标记例如鲁米诺;酶标记(例如辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、萤虫素酶、碱性磷酸酯酶、乙酰胆碱酯酶),生物素基团(其可通过标记的抗生物素蛋白例如链霉抗生物素检测,其含有可被光学或比色法检测的发光标记或酶活性),被二级报告物识别的预先确定的抗原表位(例如亮氨酸拉链对序列、二级抗体的结合位点、金属结合域或表位标记)。在一些实施方案中,标记物经各种长度的间隔臂连接,以减少潜在的立体阻碍。

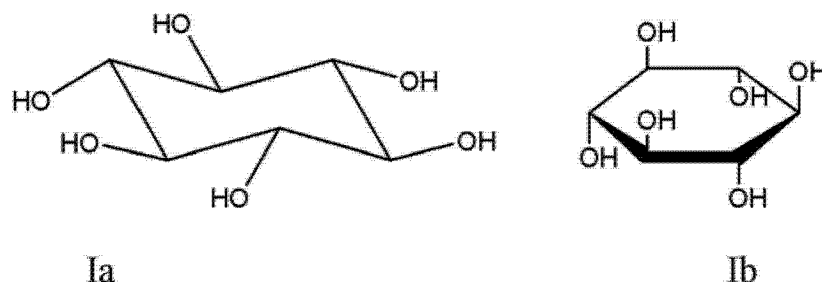
[0053] “有益的效果”是指本发明某些方面中本发明化合物或其组合物的效果,包括适宜的药理学和/或治疗效果,和/或改善的生物学活性。在本发明的一个方面,有益的效果包括但不限于降低、逆转或抑制 A β 原纤维装配或聚集、A β 毒性、A β 42 水平、异常蛋白折叠、聚集、淀粉样蛋白形成、沉积、蓄积或存留,和/或淀粉样蛋白脂质相互作用,和/或加速预形成的原纤维的分解。在本发明的一个特定的实施方案中,有益的效果包括但不限于一种或多种以下的作用:破坏聚集的 A β 或 A β 寡聚体;提高或恢复长时程增强;保持突触的功能;抑制、降低或逆转 A β 诱导的进行性认知衰退和脑淀粉样蛋白斑病变;改善认知;延长生命;减少脑 A β 的蓄积;减少脑淀粉样蛋白斑的沉积;减少脑内可溶性 A β (例如 A β 42)寡聚体;降低神经胶质活性;消炎;和/或延缓认知衰退。在一个方面,有益的效果是本发明组合物/制剂的适宜的特征,包括提高稳定性、延长生命,和/或增加通过血脑屏障的摄取和转运,特别是提高给药后 1-6、1-5、1-4、1-3 和 1-2 小时的脑透过率。

[0054] 有益的效果可以是,鲨肌醇化合物的效果与未使用所述化合物的效果进行统计学分析后认为具统计学显著性的效果。“统计学显著性”或“统计学差异”效果或水平可代表高于或低于标准的水平。在本发明的一个实施方案中,所述差异可以是没有给予鲨肌醇化合物所得效果的 1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25 或 50 倍或上述数值分之一。

[0055] “治疗有效量”是指能够提供或产生一种或多种所需有益效果,特别是一种或多种持续效果的本发明活性化合物或组合物的量或剂量。物质的治疗有效量可根据多种因素变化,其中有个体的疾病状态、年龄、性别和体重,以及该物质引起所述个体所需反应的能力。剂量方案可加以调整,以提供最佳的治疗反应,例如一种或多种有益的效果,特别是实质性有益的效果。例如,每天可给予几个分剂量,或根据治疗情况的紧急程度按比例增减剂量。

[0056] “鲨肌醇”化合物应理解为是指,全部或部分,直接或间接提供一种或多种本文所述有益效果的任何化合物。可用于本发明的鲨肌醇化合物具有式 Ia 或式 Ib 的基本结构:

[0057]



[0058] 鲨肌醇化合物包括式 Ia 或式 Ib 化合物的功能衍生物。“功能衍生物”是指具有与式 Ia 或式 Ib 的鲨肌醇的生物学活性基本类似的生物学活性（或者是功能性或者是结构性）的化合物。术语“功能衍生物”目的是包括鲨肌醇的“变异体”、“类似物”或“化学衍生物”。术语“变异体”是指结构和功能基本类似于鲨肌醇或其部分的分子。如果两个分子具有基本类似的结构或两个分子具有基本类似的生物活性，则该分子与鲨肌醇“基本类似”。术语“类似物”是指功能类似于鲨肌醇分子的分子。术语“化学衍生物”是指包含通常不是基本分子的一部分的附加的化学基团的分子。

[0059] 本发明的鲨肌醇化合物包括结晶形式的化合物，也可以是多晶型。与水或普通有机溶剂形成的化合物的溶剂合物也在本发明的范围内。此外，鲨肌醇化合物及其盐的水合物也包括于本发明的范围内。

[0060] 鲨肌醇化合物包括式 Ia 或式 Ib 的化合物，其中一、二或三个羟基被取代基置换，特别是被一价取代基置换而保持构型不变。合适的取代基包括但不限于氢；烷基；酰基；烯基；环烷基；卤素； $-\text{NHR}^1$ ，其中 R^1 为氢、酰基、烷基或 $-\text{R}^2\text{R}^3$ ，其中 R^2 和 R^3 可相同或不同并表示酰基或烷基； $-\text{PO}_3\text{H}_2$ ； $-\text{SR}^4$ ，其中 R^4 为氢、烷基或 $-\text{O}_3\text{H}$ ；和 $-\text{OR}^3$ ，其中 R^3 为氢、烷基或 $-\text{SO}_3\text{H}$ 。在本发明的一些方面，鲨肌醇化合物不包括被一种或多种磷酸基团取代的鲨肌醇。

[0061] 本发明的特定方面使用式 Ia 或式 Ib 的鲨肌醇化合物，其中一或多个羟基被以下取代基置换：烷基；酰基；烯基； $-\text{NHR}^1$ ，其中 R^1 为氢、酰基、烷基或 $-\text{R}^2\text{R}^3$ ，其中 R^2 和 R^3 可相同或不同并表示酰基或烷基； $-\text{SR}^4$ ，其中 R^4 为氢、烷基或 $-\text{O}_3\text{H}$ 。

[0062] 一个实施方案中，鲨肌醇，特别是纯或基本纯的鲨肌醇，可用于本文公开的组合物、方法和用途中。

[0063] 选为 1-6 个碳原子。该术语的实例有甲基、乙基、正丙基、正丁基、异丁基、正己基等。烷基可以是取代的烷基。

[0064] “取代烷基”是指优选具有 1-10 个碳原子的烷基基团，具有 1-5 个取代基，优选 1-3 个取代基，例如烷基、烷氧基、环烷基、酰基、氨基、氰基、卤素、羟基、羧基、羧基烷基、酮、硫酮、巯基、硫代烷氧基、芳基、羟基氨基、烷氧基氨基和硝基。

[0065] “烯基”是指优选具有 2-10 个碳原子且优选 2-6 个碳原子的烯基基团，具有至少 1 个且优选 1-2 个烯基不饱和位点。优选的烯基基团包括乙烯基 ($-\text{CH}=\text{CH}_2$)、正丙烯基 ($-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$)、异丙烯基 ($-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$) 等。

[0066] “取代的烯基”是指具有 1-3 个取代基的烯基基团，例如烷基、烷氧基、环烷基、环烷氧基、酰基、酰基氨基、酰氧基、氨基、氨基酰基、氨基酰氧基、氰基、卤素、羟基、羧基、羧基烷基、酮、硫酮、巯基、硫代烷氧基、芳基、羟基氨基、烷氧基氨基和硝基。

[0067] “酰基”是指烷基 $-\text{C}(\text{O})-$ 、取代的烷基 $-\text{C}(\text{O})-$ 、环烷基 $-\text{C}(\text{O})-$ 取代的环烷基 $-\text{C}(\text{O})-$ 、芳基 $-\text{C}(\text{O})-$ 、杂芳基 $-\text{C}(\text{O})-$ 和杂环基 $-\text{C}(\text{O})-$ ，其中烷基、取代烷基、环烷基、取代

环烷基、芳基、取代芳基、杂芳基和杂环基的定义见上述。

[0068] “芳基”是指不饱和芳香性含 6-14 个碳原子具有单环（苯基）或多个稠合的环（如萘或蒽）的碳环基团。优选的芳基包括苯基、萘基等。芳基可以是取代芳基，可包括具 1-8、1-6、1-4 或 1-3 个取代基的本文限定的芳基，所述取代基可以是烷基、烷氧基、环烷基、酰基、氨基、氰基、卤素、羟基、羧基、羧基烷基、酮、硫酮、巯基、硫代烷氧基、芳基羟基氨基、烷氧基氨基和硝基。

[0069] “环烷基”是指 3-12 个碳原子的具有单环或多稠环的环状烷基。环烷基的实例包括单环结构如环丙基、环丁基、环戊基、环辛基等,或多环结构如金刚烷基等。环烷基可以是取代的环烷基。

[0070] “取代环烷基”是指有 1-5 个（特别是 1-3 个）选自以下取代基的环烷基：烷氧基、环烷基、取代环烷基、环烯基、酰基、酰基氨基、酰基氧基、氨基、氨基酰基、氨基酰氧基、氰基、卤素、羟基、羧基、羧基烷基、酮、硫酮、巯基、硫代烷氧基、芳基、芳氧基、杂芳基、杂芳基氧基、杂环基、杂环基氧基、羟基氨基、烷氧基氨基和硝基。

[0071] “卤素”是指氟、氯、溴和碘,优选氟或氯。

[0072] “杂芳基”是指具有 1-15 个碳原子和在至少一个环中（如果存在一个以上的环）具有 1-4 个选自氧、氮和硫的杂原子的芳香族基团。这类杂芳基可任选被 1-5 个取代基取代，例如，酰基氧基、羟基、酰基、烷基、烷氧基、烯基、炔基、取代烷基、取代烯基、取代炔基、氨基、取代氨基、氨基酰基、酰基氨基、烷芳基、芳基、芳氧基、叠氮基、羧基、羧基烷基、氰基、卤素、硝基、杂芳基、杂环基、氨基酰氧基、氧基酰氨基、硫代烷氧基、取代硫代烷氧基、硫代芳氧基和硫代杂芳氧基。这类杂芳基可以具单环（例如吡啶基或呋喃基），也可以具多稠合环（如吲哚基或苯并噻吩基）。

[0073] “杂环”或“杂环的”是指具单环或多稠环的一价饱和 / 或不饱和基团, 环内有 1-15 个碳原子和 1-4 个选自氮、硫或氧的杂原子。

[0074] 杂环基团可具有单环或多稠环。杂环基团可任选被 1-5 个取代基取代,例如,烷氧基、环烷基、取代环烷基、环烯基、酰基、酰基氨基、酰基氧基、氨基、氨基酰基、氨基酰氧基、氰基、卤素、羟基、羧基、羧基烷基、酮、硫酮、巯基、硫代烷氧基、芳基、芳氧基、杂芳基、杂芳基氧基、杂环基、杂环基氧基、羟基氨基、烷氧基氨基和硝基。

[illegible]

[0076] 鲨肌醇化合物可用常规方法制备,或购买得到。鲨肌醇化合物可用化学和 / 或微生物方法制备。在本发明的某些发明,鲨肌醇化合物用文献 (M. Sarmah and Shashidhar, M., Carbohydrate Research(糖类研究),2003,338,999-1001 或 Husson, C., et al, Carbohydrate Research 307(1998)163-165) 或 W005035774(Hokko Chemical Industries) 中所述的方法步骤制备鲨肌醇来生产。在本发明的组合物和方法的特定方面,鲨肌醇化合物用化学方法 (Husson, C., et al, Carbohydrate Research(糖类研究)307(1998)163-165) 步骤来制备。在本发明组合物和方法的其它一些方面,鲨肌醇化合物用微生物方法步骤

(W005035774(Hokko Chemical Industries)) 制备。衍生物可由本领域技术人员用已知方法向鲨肌醇中引入取代基来制备。

[0077] 鲨肌醇化合物还可包含载体,包括但不限于一种或多种聚合物、糖类、肽或其衍生物。载体可被本文所述的取代基取代,包括但不限于一个或多个烷基、氨基、硝基、卤素、巯基、硫代烷基、硫酸基团、磺酰基、烷硫基(sulfenyl)、亚磺酰基、亚砷、羟基。载体可直接或间接共价连接于本发明的化合物。本发明的一个方面,载体为氨基酸,包括丙氨酸、甘氨酸、脯氨酸、甲硫氨酸、丝氨酸、苏氨酸或天冬氨酸。另一方面,载体为肽,包括丙氨酰-丙氨酰、脯氨酰-甲硫氨酰或甘氨酰-甘氨酰。

[0078] 载体还包括使本发明化合物靶向作用于特定组织或器官的分子。特别是,载体可促进或提高本发明化合物向脑的主动或被动转运。

[0079] 本文所用的“聚合物”是指包括两个或多个单体亚单位的分子,这些亚基可以是相同或不溶的重复亚单位。单体通常包含结构简单的低分子量含碳分子。聚合物可任选被取代。可用于本发明的聚合物的实例为乙烯基、丙烯基、苯乙烯、糖衍生的聚合物、聚乙二醇(PEG)、聚氧乙烯、聚亚甲基二醇、聚三甲基二醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段聚合物及其共聚物、盐和衍生物。在本发明的特定方面,聚合物为聚(2-丙烯酰氨基-2-甲基-1-丙磺酸-co-苯乙烯)、聚(乙烯磺酸);聚(4-苯乙烯磺酸钠);及其衍生的硫酸和磺酸盐或酯;聚(丙烯酸)、聚(甲基丙烯酸酯)、聚(甲基丙烯酸甲酯)和聚(乙烯醇)。

[0080] 本文所用的“糖类”是指多羟基醛或多羟基酮及其衍生物。最简单的糖是单糖,其为具有许多羟基的小直链醛和酮,通常除官能团外在每个碳原子上带有一个羟基。单糖的实例包括赤藓糖、阿拉伯糖、阿洛糖、阿卓糖、葡萄糖、甘露糖、苏阿糖、木糖、古洛糖、伊杜糖、半乳糖、塔罗糖、己醛糖、果糖、己酮糖、核糖和戊醛糖。其它糖由单糖单元组成,包括二糖、寡糖或多糖,视单糖单元的数目而定。二糖由两个通过共价糖苷键连接的单糖单元组成。二糖的实例有蔗糖、乳糖和麦芽糖。寡糖和多糖由通过糖苷键连接在一起的单糖单元的长链组成。寡糖通常含 3-9 个单糖单元,多糖通常含 10 个以上单糖单元。糖基可在 1-4 个不是与式 Ia 或式 Ib 的化合物连接位置的位置发生取代。例如,糖可被一个或多个任选取代的烷基、氨基、硝基、卤素、巯基、羧基或羟基取代。说明性的取代糖为葡萄糖胺或半乳糖胺。

[0081] 本发明的某些方面中,糖类即碳水化合物,是指糖,特别是己糖或戊糖,并且可以是醛糖或酮糖。糖可以是 D 或 L 型,可包括氨基糖、脱氧糖及其糖醛酸衍生物。在本发明的实施方案中,糖是指己糖,选自葡萄糖、半乳糖或甘露糖,或取代的己糖残基如氨基糖残基如己糖胺、半乳糖胺、葡萄糖胺,特别是 D-葡萄糖胺(2-氨基-2-脱氧-D-葡萄糖)或 D-半乳糖胺(2-氨基-2-脱氧-D-半乳糖)。合适的戊糖包括阿拉伯糖、岩藻糖和核糖。

[0082] 术语“糖类”还包括糖蛋白,例如凝集素(如,刀豆蛋白 A、麦芽凝集素、花生凝集素、血清粘蛋白和血清类粘蛋白)和糖脂如脑苷脂和神经节苷脂。

[0083] 在本发明实践中用作载体的“肽”包括 1、2、3、4、5 或更多个通过肽键共价连接在一起的氨基酸。肽可包含一种或多种天然存在的氨基酸及其类似物、衍生物和同系物。肽可经修饰而提高其稳定性、生物利用度、溶解度等。“肽类似物”和“肽衍生物”包括模拟肽的化学结构并保留的肽的功能的分子。本发明的某些方面中,载体是氨基酸,如丙氨酸、甘

氨酸、脯氨酸、甲硫氨酸、丝氨酸、苏氨酸、组氨酸或天冬氨酸。其它方面,载体是肽,如丙氨酰-丙氨酰、脯氨酰-甲硫氨酰或甘氨酰-甘氨酰。另外的方面,载体脂多肽,如白蛋白、抗胰蛋白酶、巨球蛋白、触珠蛋白、caeruloplasm、转铁蛋白、 α -或 β -脂蛋白、 β -或 γ -球蛋白或纤维蛋白原。

[0084] 肽类似物、衍生物和模拟物的设计方法在本领域已知。例如,参见 Farmer, P. S. in Drug Design (E. J. Ariens, ed.) Academic Press, New York, 1980, vol. 10, pp. 119-143; Ball, J. B. and Alewood, P. F. (1990) J Mol. Recognition 3 :55; Morgan, B. A. and Gainor, J. A. (1989) Ann. Rep. Med. Chem. 24 :243; and Freidinger, R. M. (1989) Trends Pharmacol. Sci. 10 :270. See also Sawyer, T. K. (1995) " Peptidomimetic Design and Chemical Approaches to Peptide Metabolism (肽模拟物设计和肽代谢的化学方法)" in Taylor, M. D. and Amidon, G. L. (eds.) Peptide-Based Drug Design :Controlling Transport and Metabolism (基于肽的药物设计:控制转运和代谢), Chapter 17; Smith, A. B. 3rd, et al. (1995) J. Am. Chem. Soc. 117 :11113-11123; Smith, A. B. 3rd, et al. (1994) J. Am. Chem. Soc. 116 :9947-9962; and Hirschman, R., et al. (1993) J. Am. Chem. Soc. 115 :12550-12568.

[0085] 肽类似物、衍生物和肽模拟物的实例包括被一个或多个苯并二氮杂葑分子取代的肽(参见,如 James, G. L. et al. (1993) Science 260 :1937-1942)、具甲基化酰胺键的肽和“反-转”肽(参见 Sisto 的 U. S. Pat. No. 4, 522, 752)。

[0086] 肽衍生物的实例包括氨基酸侧链、肽骨架或氨基或羧基末端被衍生化的肽(例如,具甲基化酰胺键的肽化合物)。

[0087] 术语模拟物,尤其是肽模拟物,包括电子等排物。术语“电子等排体”是指可被取代为第二种化学结构的化学结构,因为第一种结构的立体构型调整为适合第二种结构的结合特异性位点。该术语特别包括本领域技术人员熟知的肽骨架修饰(即酰胺键模拟物)。这类修饰包括酰胺氮、 α -碳、酰胺羰基的修饰,酰胺键的完全置换、延伸、删除或骨架交联。其它电子等排体的实例包括被一种或多种苯并二氮杂葑分子取代的肽(见, James, G. L. et al. (1993) Science 260 :1937-1942)。

[0088] 其它可能的修饰包括 N-烷基(或芳基)取代([CONR])、骨架交联构成内酰胺和其它环状结构、化合物内的所有 L-氨基酸取代为 D-氨基酸(“转型(inverso)”)或插入反-转氨基酸([NHCO])。“转型”是指用 D-氨基酸替代 L-氨基酸,“反-转”或“对-转”是指倒转氨基酸序列(反(retro))并用 D-氨基酸替代 L-氨基酸。例如,如果母体肽是 Thr-Ala-Tyr,反修饰形式是 Tyr-Ala-Thr,转修饰形式是 thr-ala-tyr,反-转修饰形式是 tyr-ala-thr(小写字母形式是指 D-氨基酸)。相比于母体肽,反-转肽具有反向骨架,同时基本保留了侧链的原始空间构象,从而产生拓扑学上非常类似于母体肽的反-转异构体。“反-转”肽的进一步描述,参见 Sisto 的 U. S. Pat. No. 4, 522, 752。

[0089] 肽可通过某些氨基酸(如丝氨酸)侧链上的官能团或其它合适的官能团连接于本发明化合物。在本发明的一个实施方案中,载体可包含四或多个氨基酸,基团通过侧链上的官能团连接于三或多个氨基酸上。在另一实施方案中,载体是一个氨基酸,特别是氨基酸的磺酸衍生物,例如磺基丙氨酸。

[0090] “疾病和/或病症”、“病症”和“疾病”在本文可互换使用,并且包括具以下特征的疾病:异常蛋白折叠和/或聚集,和/或淀粉样蛋白形成、沉积、蓄积或存留,或淀粉样蛋白

脂质相互作用。在一些方面,该术语包括具有以下特征的疾病:异常蛋白折叠和/或聚集,和/或淀粉样蛋白形成、沉积、蓄积或存留。在特定的方面,所述疾病为中枢或外周神经系统或系统器官疾病。在更特定的方面,该术语包括淀粉样蛋白或淀粉样蛋白原纤维形成、沉积、蓄积或存留相关的疾病,包括与A β 淀粉样蛋白、AA 淀粉样蛋白、AL 淀粉样蛋白、IAPP 淀粉样蛋白、PrP 淀粉样蛋白、 α_2 -微球蛋白淀粉样蛋白、运甲状腺素蛋白、前清蛋白和促降钙素、尤其是A β 淀粉样蛋白和IAPP 淀粉样蛋白相关的疾病。疾病和/或病症可以是需要解聚异常聚集的蛋白的疾病,和/或溶解和破坏预先形成的或预先沉积的淀粉样蛋白或淀粉样原纤维的疾病。

[0091] 在本发明的某些方面,所述疾病为淀粉样变性。“淀粉样变性”是指一类先天或后天疾病,特征为一种或多种不同类型的性质相似称为淀粉样蛋白的蛋白原纤维聚集。淀粉样蛋白可蓄积在单个器官中,或广泛分布于体内。该疾病可引发特定区域的严重问题,这些区域包括心、脑、肾和消化道。脑内和脑血管沉积主要由 β 淀粉样蛋白肽(β -AP)组成,是阿尔茨海默病的特征(家族型和偶发型);胰岛淀粉样蛋白肽(IAPP;淀粉不溶素)是胰岛细胞淀粉样蛋白沉积伴发II型糖尿病的原纤维的特征; β -2-微球蛋白淀粉样蛋白沉积的主要组分,其随后导致长时程血液透析治疗。朊蛋白-相关疾病,例如Creutzfeld-Jacob病、羊瘙痒病、牛海绵状脑病等的特征是抗蛋白酶形式的朊蛋白的蓄积(称为AScrro PrP-27)。

[0092] 某些疾病被认为是原发性淀粉样变性,其中没有先前存在或共存疾病的证据。原发性淀粉样变性的典型特征是“淀粉样蛋白轻链-型”(AL-型)蛋白原纤维的存在。在继发性淀粉样变性中,有慢性炎性或感染性疾病的存在(例如,风湿病样关节炎、少年型慢性关节炎、僵硬型脊椎炎、银屑病、Reiter's 综合征、Adult Still's 疾病、Behcet's 综合征、Crohn's 疾病、慢性微生物感染如骨髓炎、结核病和麻疯病,恶性肿瘤如Hodgkin's 淋巴瘤、肾癌、肠癌、肺癌和泌尿生殖道癌,基底细胞癌和发细胞癌)。继发性淀粉样变性的特征在于衍生自血清淀粉样蛋白A蛋白(ApoSSA)的AA型原纤维的沉积。家族遗传性的淀粉样变性可伴发ATTR 运甲状腺蛋白型神经病性、肾性或心血管性沉积,并且它们包括具有不同淀粉样蛋白成分的其它综合征(例如,以AA原纤维为特征的家族性地中海热)。其它形式的淀粉样变性包括局部型,以病灶为特征,通常是发生于分离的器官中的肿瘤样沉积。此外,淀粉样变性伴随着老化,并且常常在心或脑中形成特征性斑。淀粉样变性包括系统性疾病,例如成年发病的糖尿病、长时程血液透析的并发症和慢性炎症或血浆细胞恶液质的后遗症。

[0093] 可用本发明化合物、组合物和方法治疗和/或预防的淀粉样变性疾病包括但不限于:Alzheimer 氏病、Down 氏综合征、拳击员痴呆、多系统萎缩、包涵体肌炎、遗传性脑出血伴随Dutch型淀粉样变性、C型Nieman-Pick病、脑 β -淀粉样蛋白血管病、痴呆伴随皮层基底变性、2型糖尿病淀粉样变性、慢性炎症的淀粉样变性、恶性及家族性地中海热的淀粉样变性、多发性骨髓瘤和B细胞恶液质的淀粉样变性、肾病伴发荨麻疹和耳聋(Muckle-Wells 综合征)、系统性炎症伴发的淀粉样变性、伴随骨髓瘤或巨球蛋白血症的特发原发性淀粉样变性;伴随免疫细胞恶液质的淀粉样变性;单克隆丙种球蛋白病;隐性恶液质;伴随慢性炎症的局部结节性淀粉样变性;伴随几种免疫细胞恶液质的淀粉样变性;家族性淀粉样蛋白多神经病;遗传性脑出血伴发淀粉样变性 Alzheimer 病和其它神经变性疾病;慢性血液透析伴随的淀粉样变性;II型糖尿病;胰岛瘤;朊病毒蛋白病的淀粉样变性、(传播性海绵型

脑朊蛋白病)、Creutzfeldt-Jakob 病、Gerstmann-Straussler 病、库鲁病和瘙痒病、伴随腕挖掘综合征的淀粉样变性、老年心脏性淀粉样变性、家族淀粉样变性性多神经病或伴随内分泌腺肿瘤的淀粉样变性,特别是阿尔茨海默症和 II 型糖尿病。

[0094] 本发明的一个方面,疾病和 / 或病症包括与淀粉样蛋白原纤维形成、沉积、蓄积或存留相关的疾病,特别是与选自以下淀粉样蛋白原纤维相关的疾病: A β 淀粉样蛋白、AA 淀粉样蛋白、AL 淀粉样蛋白、IAPP 淀粉样蛋白、PrP 淀粉样蛋白、 α_2 -微球蛋白淀粉样蛋白、运甲状腺素蛋白、前清蛋白和促降钙素,特别是 A β 淀粉样蛋白和 IAPP 淀粉样蛋白。所述疾病的实例包括 Alzheimer 氏病、Down 氏综合征、拳击员痴呆、多系统萎缩、包涵体肌炎、遗传性脑出血伴随 Dutch 型淀粉样变性、C 型 Nieman-Pick 病、脑 β -淀粉样蛋白血管病、痴呆伴随皮层基底变性、2 型糖尿病淀粉样变性、慢性炎症的淀粉样变性、恶性及家族性地中海热的淀粉样变性、多发性骨髓瘤和 B 细胞恶液质的淀粉样变性,朊病毒蛋白病的淀粉样变性、Creutzfeldt-Jakob 病、Gerstmann-Straussler 病、库鲁病和瘙痒病、伴随腕挖掘综合征的淀粉样变性、老年心脏性淀粉样变性、家族淀粉样变性性多神经病或伴随内分泌腺肿瘤的淀粉样变性,特别是阿尔茨海默症和 II 型糖尿病。

[0095] 本发明的另一方面,可利用本发明的化合物、组合物和方法治疗和预防的疾病和 / 或病症包括导致 β -片层、原纤维和 / 或聚集体或寡聚体中的蛋白、蛋白片段和肽发生沉积的中枢或外周神经系统病症或系统器官病症。特别是早老型和老年型 Alzheimer 氏病;淀粉样蛋白血管病;轻度认知功能损伤;Alzheimer 氏病相关性痴呆(如血管性痴呆症或阿尔茨海默氏痴呆);tau 疾病(如嗜银颗粒性痴呆、皮质基底节变性、拳击家痴呆症);弥漫性神经原纤维缠结伴钙化症,额颞叶型痴呆症伴随帕金森病,朊病毒相关疾病,哈勒沃登-施帕茨病,强直性肌营养不良, C 型尼曼-匹克病,非关岛运动神经元疾病伴随神经纤维缠结,皮克氏病,脑炎后帕金森综合征,淀粉样脑血管病,进行性皮质下胶质细胞增生,进行性上眼神经核麻痹症,亚急性硬化性全脑炎,和单纯缠结性痴呆(tangle only dementia), α -突触核蛋白病[如路易体痴呆,多系统萎缩伴随胶质细胞包涵体,夏-德综合征,脊髓小脑性共济失调(例如,齿状核红核苍白球路易核萎缩 DRPLA 或马查多-约瑟夫病);纹状体黑质变性,橄榄桥脑小脑萎缩,脑内铁沉积性神经变性病 I 型,嗅觉障碍(olfactory dysfunction),和肌萎缩性侧索硬化];帕金森氏症(如,家族性和非家族性);肌萎缩性脊髓侧索硬化症;痉挛性截瘫(如,伴侣蛋白和 / 或三联 A 蛋白);亨廷顿舞蹈病,脊髓小脑性共济失调,弗立特里希氏共济失调;神经退化性疾病伴随由相应基因中三核苷酸或四核苷酸片段病理性扩增而产生的富含多聚谷氨酰胺或聚丙氨酸或其它重复片段的蛋白细胞内和 / 或细胞外聚集;脑血管疾病;唐氏综合症;头外伤伴随创伤后淀粉样蛋白 β 肽聚集;朊病毒相关疾病(Creutzfeld-Jakob 病、Gerstmann-Straussler-Scheinker 病和变异型 Creutzfeldt-Jakob 病);家族性英国型痴呆;家族性丹麦型痴呆;早老型痴呆伴随痉挛性共济失调;淀粉样脑血管病(英国型);早老型痴呆伴随痉挛性共济失调淀粉样脑血管病(丹麦型);神经抑丝酶包含体家族性脑病(FENIB);淀粉样变多发性神经病(如,老年淀粉样多神经病或系统性淀粉样变性病);淀粉样 β 肽导致的包涵体肌炎;家族性和芬兰性淀粉样变性病;发性骨髓瘤伴系统性淀粉样变性病;地中海热;急性感染和炎症;II 型糖尿病伴随胰岛淀粉样多肽(IAPP)。

[0096] 本发明的一个方面,特别是联合治疗方面,其中所述的疾病和 / 或病症为一种

神经元疾病（如 Alzheimer's 病，唐氏综合症，帕金森病，亨廷顿舞蹈病，致病性精神病（pathogenic psychotic conditions），精神分裂症，食物摄入受损，睡眠 - 清醒周期紊乱，能量代谢调节受损，自主功能受损，激素平衡受损，调节受损，体液失衡，高血压，发烧，睡眠失调，食欲减退，包括抑郁等焦虑相关的病症，包括癫痫、戒毒和酒精中毒等发作，包括认知功能障碍和痴呆相关的神经系统退变性疾病）。

[0097] 本发明的化合物也可以抑制或阻止 α -突触核蛋白 / 非淀粉样 (NAC) 原纤维的形成和生长，和 / 或引起其解体，分裂，和 / 或使预形成的 α -突触核蛋白 / 非淀粉样 (NAC) 原纤维和 α -突触核蛋白 / 非淀粉样 (NAC) 原纤维相关蛋白沉积物解聚。适合应用本发明的化合物和组合物治疗突触核蛋白疾病或突触核蛋白病的实例为突触核蛋白形成、沉积、蓄积或体内存留相关的疾病，包括而不限于 Parkinson's 病、家族性 Parkinson's 病、路易小体病、阿尔茨海默病路易体变异型、路易体痴呆、多系统萎缩症、橄榄桥小脑萎缩、脑内铁沉积性神经变性病 I 型、嗅觉障碍、关岛帕金森痴呆综合征。

[0098] 本发明的一个方面，所述的疾病为与神经丝、神经丝集聚和 / 或超氧化物歧化酶蛋白相关的运动神经元病，或伴随伴侣蛋白和 / 或三联 A 蛋白功能缺陷的痉挛性截瘫，或 DRPLA 或 Machado-Joseph 病等脊髓小脑共济失调症。

[0099] 本发明另一方面，所述的疾病为朊病毒疾病，包括 Creutzfeldt-Jakob 病、Gerstmann-Strausler-Scheinker 病、变异型 Creutzfeldt-Jakob 病，或为一种淀粉样多神经病，包括老年淀粉样多神经病或系统性淀粉样变性。

[0100] 本发明的一个实施方案中，所述疾病为阿尔茨海默症或 Parkinson 病，包括家族性或非家族性。

[0101] 本发明的某一方面，所述疾病可以被描述为因巨噬细胞存在由淀粉样化的蛋白或肽而导致的炎症过程。本发明的一个方法为抑制巨噬细胞活化和 / 或抑制炎症过程。该方法包括降低、减缓、缓解或逆转病人巨噬细胞侵染或炎症的进程或程度。

[0102] 所述疾病可为一种与分子相互作用相关的病症，所述相互作用可以被本发明的化合物所破坏或离解。所述的“可以被本发明的化合物所破坏或离解的分子相互作用”包括涉及淀粉样蛋白与蛋白或糖蛋白的相互作用。所述涉及淀粉样蛋白的相互作用包括淀粉样蛋白 - 淀粉样蛋白的相互作用、淀粉样蛋白 - 蛋白聚糖的相互作用、淀粉样蛋白 - 蛋白聚糖 / 粘多糖 (GAG) 和 / 或淀粉样蛋白 - 粘多糖相互作用。相互作用蛋白可以为细胞表面蛋白、分泌蛋白或细胞外蛋白。

[0103] 可利用本发明的化合物或组合物治疗或预防的疾病包括得益于分子相互作用的破坏或解离的疾病，所述分子相互作用涉及淀粉样蛋白与包括蛋白或糖蛋白在内的相互作用化合物。可用本发明化合物或组合物治疗或预防的疾病例子包括细菌、病毒、朊病毒和真菌引起的疾病。这种疾病和病症的例子涉及的病原体包括单纯性疱疹病毒 (Herpes simplex virus)、假狂犬病病毒 (Pseudorabies virus)、人巨细胞病毒 (human cytomegalovirus)、人免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus)、百日咳博德特氏菌 (Bordetella pertussis)、沙眼衣原体 (Chlamydia trachomatis)、流感嗜血杆菌 (Haemophilus influenzae)、幽门螺杆菌 (Helicobacter pylori)、博氏疏螺旋体 (Borrelia burgdorferi)、淋病奈瑟球菌 (Neisseria gonorrhoeae)、结核分支杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)、金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)、突变链球

菌 (*Streptococcus mutans*)、猪链球菌 (*Streptococcus suis*)、恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*)、巴西利什曼原虫 (*Leishmania amazonensi*)、克氏锥虫 (*Trypanozoma cruzi*)、单核细胞增多性李斯特杆菌 (*Listeria monocytogenes*)、肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*)、肠毒素大肠杆菌 (*enterotoxigenic E. coli*)、尿路致病性大肠埃希菌 (*uropathogenic E. coli*) 和铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)。

[0104] 组合物

[0105] 鲨肌醇化合物可以制成供受试者使用的药用组合物或饮食补充剂的形式。本发明的药用组合物或其部分通常包括合适的药学可接受的载体、赋形剂和溶媒,这要依据给药的目的形式来决定,并要与常规的制剂操作相一致。本发明的特定组合物包含纯的和基本纯的鲨肌醇化合物。

[0106] 在如下标准教科书中表述了适合的药物载体、赋形剂和溶媒,雷明登氏药学的理论与实践(第二十一版),费城科技大学(编者),Mack 出版公司 (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition. University of the Sciences in Philadelphia(Editor), Mack Publishing Company)。通过举例的方式,对以胶囊或药片形式的口服给药而言,活性成分可以与可口服的、非毒性、药学可接受的惰性载体合并应用,如乳糖、淀粉、甲基纤维素、硬脂酸镁、葡萄糖、硫酸钙、磷酸二钙、甘露醇、山梨醇等等。对以液体形式的口服给药而言,药物成分可与任何可口服、无毒性、药学可接受的载体合并应用,如乙醇甘油、水等等。适合的粘合剂(如白明胶、淀粉、玉米甜浆、天然糖包括葡萄糖、天然或合成树脂,和蜡)、润滑剂(如油酸钠、硬脂酸钠、硬脂酸镁、安息香酸钠、乙酸钠和氯化钠)、崩解剂(如淀粉、甲基纤维素、琼脂、膨润土、黄原胶),调味剂和着色剂也可合并入组合物或其成分中。本文描述的组合物可进一步包括润湿剂、乳化剂和 pH 缓冲剂。

[0107] 本发明提供了一种商业化的制剂,包括而但不限于丸剂、片剂、胶囊形片剂、软和硬明胶胶囊、锭剂、小囊剂、扁囊剂、植物胶囊、液滴剂、酏剂、悬浮剂、乳剂、溶液剂、糖浆剂、气雾剂(以固体形式或在液体介质中)、栓剂、无菌注射液,和/或灭菌包装粉末,上述剂型含有一种肌醇化合物,特别是纯的或基本纯的肌醇化合物。

[0108] 组合物可以为液体溶液、悬浮液、乳化液、丸剂、片剂、胶囊形片剂、缓释制剂,或粉末形式。组合物可以用传统的粘合剂和载体如甘油三酸酯制成栓剂。口服剂型包括标准的载体,如药用级别的甘露糖、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。各种递释系统为人们所熟知,可以用来递释本发明组合物,如包于脂质体、微粒、微胶囊中等等。

[0109] 本发明一方面,提供了一种口服一种或多种肌醇化合物治疗疾病和/或病症的药用组合物。在特定方面,提供了一种稳定的可口服的药用组合物,以治疗以异常蛋白折叠和/或聚集,和/或淀粉样蛋白形成、沉积、聚集或存留(如阿尔茨海默症)为特征的疾病和/或病症。所述组合物包括一种基本纯的式 Ia 或 Ib 化合物。

[0110] 非胃肠道给药制剂可包括水溶液、糖浆、水或油混悬液以及用食用油乳化的乳液,食用油包括棉花子油、杏仁油或花生油。可用于水悬浮液的分散剂或悬浮剂包括合成或自然的胶,如黄蓍胶、藻酸盐、阿拉伯胶、右旋糖酐、羧甲基纤维素钠、明胶、甲基纤维素和聚乙烯吡咯烷酮。

[0111] 非肠道给药制剂可包括无菌水溶液和非水溶剂,如水、等渗盐水、等渗葡萄糖溶液、缓冲溶液,或其它便于治疗活性药物非肠道给药的溶剂。意欲非肠道给药的组合物还包

括传统的添加剂如稳定剂,缓冲溶液,或防腐剂,如抗氧化剂,如羟基苯甲酸甲酯或相似的添加剂。

[0112] 本发明组合物可被配制成如下描述的药学可接受盐。

[0113] 本发明一方面,所述组合物包括而不少于至少一种缓冲剂或溶液。缓冲剂的例子包括但不限于盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、磷酸、甲酸、乙酸、丙酸、琥珀酸、乙二酸、葡萄糖醛酸、马来酸、糠酸、枸橼酸、谷氨酸、苯甲酸、邻氨基苯甲酸、水杨酸、苯乙酸、扁桃酸、扑酸、双羟萘酸、甲磺酸、乙磺酸、泛酸、苯磺酸、硬脂酸、对氨基苯磺酸、海藻酸、半乳糖醛酸和其混合物。可包括其它物质,如一种或多种预胶化玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮、羟丙甲纤维素、乳糖、微晶纤维素、磷酸氢钙、硬脂酸镁、滑石粉、二氧化硅、马铃薯淀粉、淀粉羟乙酸钠、十二烷基硫酸钠、山梨糖醇浆、纤维素衍生物、氢化食用油脂、卵磷脂、阿拉伯树胶、杏仁油、油性酯、乙醇、分馏植物油、木精、对羟基苯甲酸丙酯、山梨酸和其混合物。缓冲剂可另外包括一种或多种如下试剂,包括二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、克立氟烷、二氧化碳、聚(N-乙烯基吡咯烷酮)、聚甲基丙烯酸甲酯、聚交酯、聚羟基乙酸和其混合物。在一实施方案中,缓冲剂另包括一种配方剂,包括而不仅限于药学可接受的载体、赋形剂、悬浮剂或分散剂。

[0114] 本发明的组合物可以用如下方法灭菌,如用细菌截留滤器过滤,在组合物中加入灭菌剂,辐照组合物或加热组合物。做为一种选择,本发明的化合物或组合物可以以无菌液体制剂形式提供,如冻干粉末,很容易在使用前立刻溶解到无菌溶液中。

[0115] 药用组合物制备完毕后,它们可被放入到适当的容器中,并被标示用于治疗一种适应症。为服用本发明的组合物,这种标识应包括用量、频率和服用方法。

[0116] 做为饮食补充剂,鲨肌醇化合物可制成适合服用的形式。本发明的补充剂可包含有任选的非活性成分,如稀释液或填充物、粘性调节剂、防腐剂、矫味剂、着色剂,或其它本领域传统的添加剂。仅做为举例,常规的成分,如蜂蜡、卵磷脂、白明胶、甘油、焦糖、胭脂红也可包含在其中。

[0117] 本发明的饮食补充剂可包含任选的第二种活性成分。在一个实施方案中,第二种活性成分为松醇或其活性的衍生物或代谢物。松醇产自植物,包括而不少于紫花苜蓿、九重葛属叶、鹰嘴豆、松树和黄豆。松醇也是商业化的产品,例如 Inzitol™(Humanetics Corporation, Min)。松醇衍生物或代谢物的例子包括而不少于松醇糖苷、松醇磷脂、松醇酯化物、脂质结合的松醇、磷酸松醇、松醇肌醇六磷酸和松醇水解物,如 d-手性-肌醇。

[0118] 食品补充剂可以液体饮食补充剂形式提供(如,一次性液体形式(dispensable liquid)),或做为一种选择可以做成颗粒剂、胶囊或栓剂,液体补充剂可以包括许多合适的载体和添加剂,包括水、二醇类、油、醇类、调味剂、防腐剂、着色剂等等。本发明的组合物与药学可接受的载体混合,制成胶囊、颗粒剂或栓剂。

[0119] 一方面,本发明的饮食补充剂可以做成饮料形式,也可以制剂成颗粒剂、胶囊或栓剂形式。

[0120] 饮食补充剂可以根据传统的方法做成软胶囊形式。软胶囊通常包括一层白明胶,内包裹少量补充剂。补充剂也可以用传统方法做成液体灌装,白明胶密封的胶囊形式。

[0121] 为将本发明的饮食补充剂组合物做成胶囊、颗粒剂或栓剂形式,根据传统的制剂技术,将一种或多种本发明的组合物与药学可接受的载体均匀混合。对固体口服制剂,如胶囊和颗粒剂,选用适合的载体和添加剂如淀粉、糖、稀释剂、粒化剂、润滑剂、粘合剂、崩解剂

等等。

[0122] 本发明的另一方面,提供了一个药盒。一方面,该药盒包括本发明的化合物或药用组合物。该药盒可以为一个包装,内有一个容器,容器内含有本发明的组合物,并且内有指导给受试者服药的说明书。

[0123] 本发明的一个实施方案中,提供了一个药用包装或药盒,其中包括一个或多个容器,盛有一种或多种本发明的药用组合物成分,以提供有益作用,特别是持续的有益作用。与容器在一起的是各种书面材料,如使用说明书,或由负责管理药品或生物制品标识、生产、使用或销售的政府机关规定格式的注意事项,该注意事项反映了政府机关以人用为目的的对生产、使用 and 销售的批准。

[0124] 应用

[0125] 本发明涉及应用一种或者多种鲨肌醇化合物,以提供有益效果的组合物和方法。特别是,本发明致力于应用本发明的组合物治疗本文提及的疾病和 / 或病症,特别是预防和 / 或改善疾病的严重程度,疾病症状,和 / 或本文提及的疾病和 / 或病症的复发周期。本发明还致力于应用本发明的组合物和处理方法预防和 / 或治疗哺乳动物疾病和 / 或病症。本发明实施方案可提供组合物,所述组合物包括能够提供有益效果的化合物,所述的有益效果包括更好的溶解度、稳定性、效能、效价和 / 或实用性,特别是较好的溶解度和稳定性。

[0126] 在一个方面,本发明通过给予一种或多种有效剂量的鲨肌醇化合物,或其组合物,提供了一种可以改善健康受试者记忆和老年性记忆损伤受试者记忆的方法。其中所述的组合物包含一种或多种鲨肌醇类化合物,及其药学可接受载体、赋形剂或溶媒。

[0127] 在另一方面,本发明进一步涉及了改善记忆的方法,特别是短期记忆和其它与衰老过程相关的心理功能障碍。所述方法包括给予一种或多种有效剂量的鲨肌醇化合物,及其药学可接受盐;或包含一种或多种鲨肌醇化合物组合物,及其药学可接受载体、赋形剂或溶媒。

[0128] 在一个实施方案中,提供了一种治疗需要增强记忆的哺乳动物的方法,其中所述的哺乳动物没有诊断出疾病、病症、虚弱、或已知可损害或减弱记忆的其它疾患。所述方法包括给药哺乳动物有效改善记忆剂量的一种或多种鲨肌醇化合物,或其药学可接受的盐,或饮食补充剂,所述的饮食补充剂包括一种或多种鲨肌醇化合物或其营养学可接受的衍生物

[0129] 本发明的另一方面,提供了一种受试者中枢或外周神经系统或系统器官疾病的治疗方法。所述疾病与蛋白折叠和 / 或聚集紊乱、淀粉样蛋白形成、沉积、蓄积或存留在内的疾病和 / 或病症有关。所述方法包括给予一种或多种有效剂量的鲨肌醇化合物,及其药学可接受盐;或包含一种或多种鲨肌醇化合物的组合物,及其药学可接受载体、赋形剂或溶媒。

[0130] 另一方面,本发明提供了一种涉及给予受试者治疗化合物的方法。所述方法包括给予一种或多种有效剂量的鲨肌醇化合物,及其药学可接受盐;或包含一种或多种鲨肌醇化合物及其药学可接受载体、赋形剂或溶媒的组合物。所述化合物和组合物可抑制淀粉样蛋白形成、沉积、蓄积或在内存留,和 / 或引起分解 / 破坏已有的淀粉样蛋白。所以,本发明的化合物和组合物可以用来抑制发生淀粉样蛋白沉积的淀粉样变性病。

[0131] 另一方面,本发明提供一种治疗与淀粉样蛋白相互作用有关病症的方法。所述的

淀粉样蛋白相互作用可被本发明的一个化合物所破坏或离解。所述方法包括给予受试者有效量的一种或多种鲨肌醇化合物或药学可接受盐,或组合物,所述组合物包括一种或多种鲨肌醇化合物和药学可接受的载体、赋形剂或溶媒。

[0132] 一个方面,本发明提供了一种在受试者体内抑制、逆转、降低或抑制淀粉样蛋白集聚,提高了淀粉样蛋白沉积物清除率,或减缓淀粉样蛋白沉积物沉积的方法。所述方法包括给予受试者有效量的一种或多种鲨肌醇化合物或药学可接受盐,或一种组合物,所述组合物包括一种或多种鲨肌醇化合物和药学可接受的载体、赋形剂或溶媒。

[0133] 一方面,本发明提供一种在受试者体内抑制,逆转,降低或抑制淀粉样蛋白原纤维形成,器官功能障碍(如神经退化疾病),或细胞毒性的方法。所述方法包括给予受试者治疗有效量的一种或多种鲨肌醇化合物或药学可接受盐,或一种组合物,所述组合物包括一种或多种鲨肌醇化合物和一种药学可接受的载体、赋形剂或溶媒。

[0134] 另一方面,本发明提供了一种动物体内抑制或逆转构象改变蛋白的组装或集聚,所述方法包括对构象改变蛋白引入一种或多种鲨肌醇化合物,其中包括其类似物,衍生物。

[0135] 本发明另一方面,提供了一种动物体内抑制或逆转构象改变蛋白组装或集聚的方法,所述方法包括对构象改变蛋白引入一种或多种鲨肌醇化合物。

[0136] 本发明的另一方面,提供了一种动物体内治疗构象改变蛋白组装或集聚的方法,所述方法包括给予治疗有效量的本发明的组合物。

[0137] 一方面,本发明提供一种增加或保持受试者突触功能的方法。所述方法包括给予受试者治疗有效量的一种或多种鲨肌醇化合物或药学可接受盐,或一种组合物,所述组合物包括一种或多种鲨肌醇化合物和一种药学可接受的载体、赋形剂或溶媒。

[0138] 本发明特别应用于治疗以淀粉样蛋白沉积,特别是淀粉样变性为表征的疾病和/或病症,尤其是阿尔茨海默症。所以,本发明与一种治疗方法有关,所述方法包括给予受试者治疗有效量的一种或多种鲨肌醇化合物或药学可接受盐,或一种组合物,所述组合物包括一种或多种鲨肌醇化合物和一种药学可接受的载体、赋形剂或溶媒。该方法中,对以淀粉样蛋白沉积为表征的受试者,尤其是阿尔茨海默症患者,给予本发明的化合物或组合物,将产生有益效果,更为理想的是持续的有益效果。在一实施方案中,如下一条或多条内容确证了有益效应的存在:聚集的A β 和A β 寡聚体的破坏;长时程增强效应增强或恢复;和/或突触功能的保持或增强;和/或A β 脑聚集水平,脑淀粉样蛋白斑沉积,脑可溶性A β 水平,神经胶质活性降低,消炎;和/或认知功能衰退。

[0139] 在一方面,本发明为患病受试者(如阿尔茨海默症)提供了一种改善疾病和/或症状进程,或使疾病处于较低严重程度阶段的方法,所述方法包括给予治疗有效量的一种或多种鲨肌醇化合物或药学可接受盐,或一种组合物,所述组合物包括一种或多种鲨肌醇化合物和一种药学可接受的载体、赋形剂或溶媒。

[0140] 在另一方面,本发明与一种延迟疾病和/或症状进程(如阿尔茨海默症)的方法,所述方法包括给予治疗有效量的一种或多种鲨肌醇化合物或药学可接受盐,或一种组合物,所述组合物包括一种或多种鲨肌醇化合物和一种药学可接受的载体、赋形剂或溶媒。

[0141] 在另一方面,本发明与一种增加患病受试者生存时间的方法,所述方法包括给予治疗有效量的一种或多种鲨肌醇化合物或药学可接受盐,或一种组合物,所述组合物包括一种或多种鲨肌醇化合物和一种药学可接受的载体、赋形剂或溶媒。

[0142] 在一实施方案中,本发明与一种提高患病受试者(如阿尔茨海默症)寿命的方法有关。所述方法包括给予治疗有效量的一种或多种鲨肌醇化合物或药学可接受盐,或一种组合物,所述组合物包括一种或多种鲨肌醇化合物和一种药学可接受的载体、赋形剂或溶媒。

[0143] 本发明一方面,提供了一种治疗轻度认知损害的方法,所述方法包括给予治疗有效量的一种或多种鲨肌醇化合物或药学可接受盐,或一种组合物,所述组合物包括一种或多种鲨肌醇化合物和一种药学可接受的载体、赋形剂或溶媒。

[0144] 在一实施方案中,本发明提供了一种受试者认知缺陷和淀粉样蛋白斑病理学症状早期降低或逆转淀粉样蛋白沉积或神经病理学症状的方法。所述方法包括给予受试者治疗有效量的一种或多种鲨肌醇化合物或药学可接受盐,或一种组合物,所述组合物包括一种或多种鲨肌醇化合物和一种药学可接受的载体、赋形剂或溶媒。

[0145] 在另一实施方案中,本发明提供了一种受试者认知缺陷和淀粉样蛋白斑病理学症状早期降低或逆转淀粉样蛋白沉积或神经病理学症状的方法。所述方法包括给予受试者治疗有效量的一种或多种鲨肌醇化合物或药学可接受盐,或一种组合物,所述组合物包括一种或多种鲨肌醇化合物和一种药学可接受的载体、赋形剂或溶媒,以在认知缺陷和淀粉样蛋白斑病理学症状早期有效降低或逆转淀粉样蛋白沉积或神经病理学症状。

[0146] 本发明一方面,提供了利用一种或多种鲨肌醇化合物持续治疗疾病和/或病症(如阿尔茨海默症)的改良方法和化合物组合。本发明的一个实施方案中提供了组合物,所述组合物包括一种或多种鲨肌醇化合物,可以取得更好的效能,效价和实用性。如,阿尔茨海默症患者停止治疗后仍可获得持续的认知功能衰退的改善和生存时间的提高,这都可表明该方法和组合物具有更好的效果。

[0147] 本发明的一个方面,式 Ia 或 Ib 的化合物可被用于治疗阿尔茨海默症。因此,可用治疗有效剂量的式 Ia 或 Ib 化合物治疗阿尔茨海默症。这种治疗方法可有效延缓阿尔茨海默症的退化效应,尤其包括,而不仅限于,中枢神经系统退化,智力丧失,短时记忆丧失和方向知觉丧失。

[0148] 在一实施方案中,其中所述疾病为阿尔茨海默病,其中所述本发明的化合物或组合物或治疗方法的有益效果可至少表现为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 种,或如下所有有益效果,进一步讲是 5 或 10 种或更多有益效果,更进一层是如下 15 种或更多有益效果。

[0149] a) 具有阿尔茨海默症状的受试者接受本文公开的化合物治疗后,与未服用化合物的水平比较,其长时程增强作用增强或恢复。本发明一方面,化合物引起受试者长时程增强作用至少提高约 0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、5%、10%、15%、20%、30%、33%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、95%,或 99%。

[0150] b) 具有阿尔茨海默症状的受试者接受本文公开的化合物治疗后,与未服用化合物的突触功能水平比较,其突触功能得到增强和/或保持。本发明一方面,化合物引起受试者突触功能至少增强约 0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、5%、10%、15%、20%、30%、33%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、100%、125%、150%、175% 或 200%。

[0151] c) 突触小泡蛋白水平增加。本发明的一个方面,突触小泡蛋白水平至少增加约

2%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、100%、125%、150%、175%或200%。

[0152] d) 突触小泡蛋白反应扣结和细胞小体增加,本发明的一个方面,突触小泡蛋白反应扣结和细胞小体至少增加约2%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、100%、125%、150%、175%或200%,尤其是约100-150%或140-150%。

[0153] e) 给予具有阿尔茨海默症症状的受试者药物治疗后,炎症症状降低或消失,尤其是A β 诱导的炎症反应。

[0154] f) 与未接受鲨肌醇化合物治疗的阿尔茨海默症受试者比较,治疗者脑 β -淀粉样蛋白聚集减少。本发明的一个方面,所述化合物引起脑 β -淀粉样蛋白聚集至少减少约2%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。

[0155] g) 与未接受鲨肌醇化合物治疗的阿尔茨海默症受试者比较,治疗者脑 β -淀粉样蛋白斑沉积减少。本发明的一个方面,所述化合物引起 β -淀粉样蛋白斑沉积至少减少约2%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。

[0156] h) 蛋白斑数目减少。本发明的一个方面,所述化合物引起斑数目至少减少约2%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。本发明特定的方面,所述化合物引起蛋白斑数目减少5-15%和10-15%。

[0157] i) 蛋白斑尺寸的降低。本发明的一个方面,所述化合物引起蛋白斑尺寸最少降低约2%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。本发明特定的方面,所述化合物引起蛋白斑尺寸减少5-15%和10-15%。

[0158] j) 蛋白斑覆盖脑面积百分数降低。本发明的一个方面,所述化合物引起蛋白斑覆盖脑面积百分数至少降低约2%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。本发明特定的方面,所述化合物引起蛋白斑覆盖脑面积百分数降低5-15%或10-15%。

[0159] K) 与未接受鲨肌醇化合物治疗的阿尔茨海默症受试者比较,治疗者脑可溶性A β 寡聚体水平降低。本发明的一个方面,所述化合物引起脑可溶性A β 寡聚体至少降低约2%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。

[0160] l) 脑A β 40水平降低。本发明的一个方面,所述化合物引起脑A β 40水平至少降低约2%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。本发明特定的方面,所述化合物引起脑A β 40水平降低10-50%,20-45%或25-35%。

[0161] m) 脑A β 42水平降低。本发明的一个方面,所述化合物引起脑A β 42水平至少降低约2%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。本发明更具体的方面,所述化合物引起脑A β 42水平降低10-50%、15-40%或20-25%。

[0162] N) 与未接受鲨肌醇化合物治疗的阿尔茨海默症受试者比较,治疗者脑神经胶质活性降低。优选地,所述化合物引起脑神经胶质活性至少降低约2%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。

[0163] o) 在延长的一段时间内,使突触功能保持在正常水平。特别是治疗后至少5星期、6星期、8星期、10星期、12星期、14星期、16星期、20星期、24星期、30星期、40星期、52星期、or 78星期、更具体讲、2到4星期、2到5星期、3到5星期、2到6星期、2到8星期、2到

10 星期、2 到 12 星期、2 到 16 星期、2 到 20 星期、2 到 24 星期、2 星期到 12 月,或 2 星期到 24 月。

[0164] p) 降低或减缓阿尔茨海默症受试者疾病进程的速度,特别是降低或减缓阿尔茨海默症受试者认知功能衰退。

[0165] q) 降低或减缓认知功能障碍

[0166] r) 降低或减缓淀粉样蛋白血管病。

[0167] s) 降低加速的死亡率

[0168] t) 阿尔茨海默症受试者生存时间增加

[0169] 本发明的一个方面,本发明的组合物或治疗方法的有益效果可表现为 (a) 和 (b); (a)、(b) 和 (c); (a)、(b)、(e)、(f) 和 (g); (a)、(b)、(e)、(f) 到 (h); (a)、(b)、(e)、(f) 到 (i); (a)、(b)、(e)、(f) 到 (j); (a)、(b)、(e)、(f) 到 (k); (a)、(b)、(e)、(f) 到 (l); (a)、(b)、(e)、(f) 到 (m); (a)、(b)、(e)、(f) 到 (n); (a)、(b)、(e)、(f) 到 (o); (a)、(b)、(e)、(f) 到 (p); (a)、(b)、(e)、(f) 到 (q); (a)、(b)、(e)、(f) 到 (r); (a)、(b)、(e)、(f) 到 (s); (a)、(b)、(e)、(f) 到 (t); (a) 到 (d); (a) 到 (e); (a) 到 (f); (a) 到 (g); (a) 到 (h); (a) 到 (i); (a) 到 (j); (a) 到 (k); (a) 到 (l); (a) 到 (m); (a) 到 (n); (a) 到 (o); (a) 到 (p); (a) 到 (q); (a) 到 (r); (a) 到 (s); 和 (a)-(t)。

[0170] 本发明可选择的化合物,制剂和方法具有统计学显著的有益效果,特别是上述 (a) 到 (t) 的一种或多种有益效果。本发明可选择的化合物,制剂和方法具有持续的有益效果,特别是具有统计学显著的持续有益效果。在一实施方案中,提供了一种药用组合物,具有统计学显著的持续有益效果,特别是如上述 (a) 到 (t) 的一种或多种持续有益效果,所述的药用组合物包括一种或多种鲨肌醇化合物。本发明一方面,一种或多种有益效果比传统的治疗方法能提供更好的治疗效果。

[0171] 在某些方面,本发明治疗方法具有较大效能和效价可提高治疗的治愈率,降低很多麻烦的副作用和毒性。本发明选择的方法也可改善长期存在的阿尔茨海默症,即使治疗开始于症状显现后很长时间。根据本发明服用本发明的化合物或组合物可以获得持久的有效的治疗。

[0172] 一方面,本发明有涉及一种利用一种或多种肌醇化合物或包括一种肌醇化合物的组合物治疗阿尔茨海默症受试者的方法,所述方法将 A β , A β 聚集体, A β 寡聚体,特别是 A β 40 或 A β 40 聚集体或寡聚体,和 / 或 A β 42 或 A β 42 聚集体或寡聚体

[0173] 在另一方面,本发明提供一种应用组合物治疗阿尔茨海默症的方法,所述组合物包括一种或多种鲨肌醇化合物,采用剂量足以在服用后破坏 A β 或 A β 寡聚物并在给药后持续维持较长一段时间。

[0174] 另一方面,本发明提供一种治疗阿尔茨海默症迫切患者的方法,所述方法包括给予病人一种包含一种或多种鲨肌醇化合物的组合物,采用剂量足以增强或恢复长时程增强作用,和 / 或保持突触功能。另一方面,本发明提供了一种治疗阿尔茨海默症的方法,所述方法包括给予哺乳动物,优选口服或全身给药,一定量的鲨肌醇化合物,以降低脑 A β 聚集体、脑淀粉样蛋白斑沉积、脑可溶性 A β 寡聚体、神经胶质活性,和 / 或炎症并在给药后维持较长一段时间。

[0175] 本发明的一个实施方案中,提供了一种治疗阿尔茨海默症的方法,所述方法包括

给予需治疗哺乳动物一种组合物。所述组合物包括一种或多种鲨肌醇化合物的组合物,采用剂量足以减缓认知功能衰退,特别在给药后一段较长的时间内。因此,可用于治疗阿尔茨海默症。

[0176] 在本发明的一个实施方案中,提供了一种治疗阿尔茨海默症的方法,所述方法包括给予需治疗哺乳动物一种组合物。所述组合物包括一种或多种鲨肌醇化合物的组合物,采用剂量足以增强或保持突触功能,特别在给药后一段较长的时间内。因此,可用于治疗阿尔茨海默症。

[0177] 一方面,本发明提供了一种预防和/或治疗阿尔茨海默症的方法,所述方法包括给予需治疗哺乳动物一种组合物。所述组合物包括一种或多种鲨肌醇化合物的组合物,采用剂量足以破坏聚集的 A β 或 A β 寡聚体并维持给药后一段较长的时间。可用 A β 特异性抗体或可检测物标记的鲨肌醇检测聚集的 A β 或 A β 寡聚体水平。

[0178] 本发明还包括用本发明的组合物与一种或多种其它治疗药物联合用药的方法。其中所述的其它治疗药物包括而限于 β -分泌酶抑制剂、 γ -分泌酶抑制剂、 ϵ -分泌酶抑制剂、其它 β -片层聚集/原纤维发生/ADDL 生成(如 Alzhemed)的抑制剂、NMDA 拮抗剂(如美金刚)、非甾体抗炎化合物(如布洛芬、塞来考昔)、抗氧化剂(维他命 E)、激素(如雌激素)、营养剂和食物增补剂(如银杏)、他汀类和其它降胆固醇药物(如洛伐他汀和斯伐他汀)、乙酰胆碱酯酶抑制剂(如 donezepil)、毒蕈碱激动剂[如 AF102B(Cevimeline, EVOXAC)、AF 150(S) 和 AF267B]、抗精神病药(氟哌啶醇、氯氮平、奥氮平)、抗抑郁药包括三环和 5-羟色胺重摄取抑制剂(如舍曲林和西酞普兰)、他汀类和其它降胆固醇药物(如洛伐他汀和斯伐他汀)、免疫疗法和 A β 抗体(如 ELAN AN-1792)、疫苗、负责 Tau 蛋白磷酸化的激酶(CDK5, GSK3 α , GSK3 β)抑制剂(如氯化锂)、调节 A β 产生酶(GSK3 α , GSK3 β , Rho/ROCK 激酶)的抑制剂(氯化锂和布洛芬)、上调脑啡肽酶的药物(降解 A β 的酶)、上调胰岛素降解酶(降解 A β 的酶)的药物,用于治疗某一疾病导致的或与之相关并发症的药物,或治疗或阻止副反应的常规药物疗法。本发明同样还包括用本发明的组合物与一种或多种其它治疗方法联合治疗的方法,其中所述的其它治疗方法包括而不仅限于基因治疗和/或以药物为基础的上调脑啡肽酶(降解 A β 的酶)的方法,基因治疗和/或以药物为基础的上调胰岛素降解酶的方法,或干细胞和其它以细胞为基础的疗法。

[0179] 选择鲨肌醇化合物和其它治疗药物或治疗方法联合治疗可产生出乎意料的相加效应,甚至大于相加效应。如协同效应。其它治疗药物和方法可以通过一种不同的机制发挥作用,和本发明产生相加/协同效应。

[0180] 一种组合物或方法(如联合治疗),可提高治疗耐受力,降低单药治疗时(如每个化合物单独治疗)较高剂量和较长时间产生副作用的风险。其中所述的联合治疗包括一种或多种鲨肌醇化合物和具有不同机制的治疗药物,以获得最大的治疗效果。联合治疗时可对每一化合物采用较低剂量,从而降低每种化合物的毒副作用。最优剂量以下的剂量可提高安全性,也可降低达到预防和治疗效果所必须的药物费用。另外,联合用药仅采用单个合并给药单元,可以增加便利和提高顺应性。另外,联合治疗的其它优点还包括抵抗降解和代谢的较高稳定性,作用时间长,和/或即使在特别低的剂量下,也具有作用时间长,效力持久的优点。

[0181] 一方面,本发明精心设计了包含至少一种鲨肌醇化合物的组合物的用途,用于制

备药物,以治疗疾病和 / 或病症。本发明精心设计了包含至少一种鲨肌醇化合物的组合物的用途,用于制备药物,以预防和 / 或治疗疾病和 / 或病症。本发明另提供了本发明的药用组合物的用途,用于制备药物,以治疗疾病和 / 或病症。所述药物提供有益效果,最优为治疗后的持续有益效果。所述药物可以以病人可消费的形式,如丸剂、片剂、胶囊形片剂、软和硬明胶胶囊、锭剂、小囊剂、扁囊剂、植物胶囊、液滴剂、酏剂、悬浮剂、乳剂、溶液剂、糖浆剂、气雾剂(以固体形式或在液体介质中)、栓剂、无菌注射液,和 / 或灭菌包装粉末,抑制淀粉样蛋白的形成、沉积、蓄积和 / 或存留,而不用考虑其临床环境。

[0182] 在一实施方案中,本发明涉及了包含至少一种本发明的治疗有效剂量的鲨肌醇化合物或组合物的用途,用于制药物治疗疾病 / 或病症,提供治疗效应,尤其是有益效应,最优为持续的有益效应。

[0183] 在另一实施方案中,本发明提供了本发明的一种或多种肌醇化合物或组合物的用途,用来制备药物,用以长久或持续治疗阿尔茨海默症。

[0184] 在另一实施方案中,本发明提供了利用肌醇化合物制备药用组合物,以可通过口服给药治疗蛋白异常折叠和 / 或聚集,和 / 或淀粉样蛋白形成、沉积、蓄积或存留为特征的病症的方法。

[0185] 本发明的治疗效果和毒性可以在细胞培养中用标准药物规程进行测定,或用实验动物如计算统计学参数测定,如 ED_{50} (群体 50% 有效的剂量) 或 LD_{50} (群体 50% 致死的剂量)。治疗指数为有效剂量和毒性剂量的比率,可以表示为 ED_{50}/LD_{50} 比。具有较大治疗指数的药用组合物是优选的。可以在受试者和疾病模型中论证一种或多种治疗效果,特别是本文公开的有益效应。例如,在本文的例子的描述中,采用模型论证有益效果,具体的说是在具有阿尔茨海默症症状的 TgCRND8 鼠中论证有益效应。

[0186] 本发明的方法另包括测定 A β 做为指示物的方法。一方面,本发明与评价以淀粉样沉积为特征的疾病,具体讲是阿尔茨海默症受试者的治疗效果的方法有关。所述方法包括药物治疗前用标记有可测定物质的鲨肌醇化合物测定受试者来源样品中 A β 40 和 / 或 A β 42 水平,药物治疗后受试者来源样品中 A β 40 和 / 或 A β 42 水平与 A β 40 和 / 或 A β 42 基础水平进行比较,治疗后 A β 40 和 / 或 A β 42 水平较治疗前基础水平降低,提示为阳性治疗结果。可以在服用治疗药物后,逐步增大间隔测定 A β 40 和 / 或 A β 42 水平。如 A β 40 和 / 或 A β 42 水平持续性降低(如,持续 3、6、12、18 或 24 月),提示治疗药物具有持续的有益效果。受试者样品中 A β 40 和 / 或 A β 42 水平也可以与由于药物治疗而症状改善或消失的人群的 A β 40 和 / 或 A β 42 对照值比较,如与对照值至少相等,提示治疗阳性反应。

[0187] 给药

[0188] 本发明的化合物和组合物可以能使活性药物在受试者或病人体内与药物作用位点发生相互接触的任何方式给药,以产生治疗效应,特别是有益效应,更具体说是持续有益效应。活性成分可以同时给药,也可以在不同时间点按任何顺序依次给药,以产生预期的有益效应。本发明的化合物和组合物可以做成缓释制剂,以实现局部或系统递释。选择合适的给药途径和形式,以优化本发明化组合物和治疗的效应,以产生治疗效应,特别使有益效应,更具体说是持续的有益效应,这取决于熟练医师和兽医的能力。

[0189] 可以口服制剂形式服用该化合物和组合物,如片剂、胶囊(每个都包括缓释或定时释放片)、丸剂、粉末、颗粒剂、酏剂、酊剂、悬浮剂、糖浆剂和乳剂。它们也可以通过静脉注

射（推注或输注）、腹腔注射、皮下注射、或肌肉注射，这些给药途径所采用的剂型都是药学领域的技术人员所熟知的剂型。本发明的组合物可以局部应用合适的鼻内介质，或通过经皮途径实现鼻内给药，如应用方便的经皮贴膜。经皮递释系统的给药方案应为连续的而不是断断续续的。还可以采用缓释制剂给药。

[0190] 本发明一方面，所述的化合物和组合物可以通过外周给药，特别是静脉给药、腹腔给药、皮下给药、肌肉给药、口服给药、局部给药、鼻内给药或肺部给药。

[0191] 本发明的剂量方案可根据已知因素加以改变，如药物的药动学特性，它们的给药模式和途径、种群、年龄、性别、健康状况、医疗条件、患者体重、症状的本性和程度、同步治疗的种类、治疗的频率、给药途径、病人肝肾功能状况，和预期效果。

[0192] 鲨肌醇化合物或组合物可有效治疗特定疾病和 / 或病症，以提供效应，特别是有益效果，进一步讲是持续有益效果。其剂量决定于疾病和 / 或病症本性，可以用标准的临床技术测定。制剂中采用的准确剂量也决定于给药途径，疾病严重程度，并且要根据从业者的判断和每个病人的情况来决定。

[0193] 选择合适的给药剂量范围，以获得治疗效果，特别是有益效果，进一步讲是持续的有益效果。这一剂量范围一般可有效引发目的生物响应。这一剂量范围通常约为 0.5mg 到约 2g 每公斤、约 1mg 到约 1g 每公斤、约 1mg 到约 200mg 每公斤、约 1mg 到约 100mg 每公斤、约 1mg 到约 50mg 每公斤、约 10mg 到约 100mg 每公斤，或约 30mg 到约 70mg 每公斤患者体重。

[0194] 本发明的组合物或治疗方法包括含有至少一种鲨肌醇化合物的单元剂量，以提供有益效果，特别是本文陈述的 (a) 到 (t) 的一种或多种有益效果。“单元剂量”或“剂量单元”指一个整体，就是能够给病人服用的单一剂量，并且很容易被处理和包装，保持物理和化学稳定的单元剂量，包括这些活性药物或包含一种多种固体或液体药学赋形剂，载体或溶媒。

[0195] 受试者可基本上根据目的时间服用鲨肌醇化合物或组合物或制剂接受治疗。本发明的组合物可以每天服用治疗 1 到多次，特别是每天 1 或 2 次，每周 1 次，每月 1 次或连续服用。但，受试者也可以以更低频率服用接受治疗，如隔日服用，或每周 1 次，或更高频率服用。

[0196] 本发明的一种肌醇化合物，组合物或制剂可被周期性或连续性给予受试者服用至少 1 周、2 周到 4 周、2 周到 6 周、2 周到 8 周、2 周到 10 周、2 周到 12 周、2 周到 14 周、2 周到 16 周、2 周到 6 月、2 周到 12 月、2 周到 18 月，或 2 周到 24 月。

[0197] 一方面，本发明提供了补充人类饮食的方案，所述方案为给予包括鲨肌醇化合物或其营养学可接受的衍生物的一种补充剂。受试者可每天至少接受一次饮食补充剂治疗，或更低频率，如每隔一天或每星期一次。可每天服用食品添加剂，但如果降低频率，如每星期几次，或即使单独一次服用，也会有有益效果。

[0198] 本发明的一个特定方面，提供了补充人类饮食的方案，所述方案包括每天给予人 25 到约 200mg 的式 Ia 或 Ib 化合物，或其营养学可接受的衍生物。另一方面，每天给予人 50-100mg 的式 Ia 或 Ib 化合物。

[0199] 本发明的添加剂可在进餐期间或餐后被吸收。所以，可以在早餐，和 / 或午餐期间服用添加剂。可在早餐前不久，早餐中或早餐后不久服用一份添加剂。在午餐前不久，午餐中或午餐后不久服用第二份添加剂。中餐和午餐添加剂可提供同量的肌醇化合物。本文描述的添加剂和方案如配合根据公众认可营养指导原则制定的平衡饮食，和每星期几次的适

度至中等的锻炼计划,可取得最大效果。

[0200] 在一实施方案中,提供了一人类饮食补充剂方案,所述方案为给予人食品添加剂,所述添加剂每克含有 5 到约 30mg 一种或多种肌醇化合物,或影响学可接受的衍生物。在一实施方案中,在早餐时服用一份添加剂,在午餐时服用第二份添加剂。

[0201] 将通过特定实施例对本发明进行更详细的描述。提供下列实施例是以说明为目的,而非意欲以任何方式限制该发明。本领域技术人员能够很容易的领会其中多种非关键参数,从而对其加以改变或修改,得到本质相同的结果。,

[0202] 实施例 1

[0203] 实施例所描述的研究采用了下述方法。

[0204] 小鼠 实验组选用具有 C3H/B6 杂交背景的 TgCRND8 小鼠 [17,18]。实验组小鼠按每天 30mg 初治剂量给予表肌醇或鲨肌醇。初治剂量是根据肌肌醇临床上治疗各种精神障碍患者的常规剂量 (6-18mg/ 天 / 成人,或 86-257mg/Kg/ 天) 选定的 [36]。

[0205] 该剂量水平的肌肌醇对人和动物都无毒性反应。选用 5mg/Kg/ 天 -100mg/Kg/ 天的剂量,重复进行了本文所描述的研究,各剂量都得到了同样的无毒性试验结果 (数据未显示)。选用 5 月龄小鼠 (每组 10 只) 入组试验,治疗 1 个月后分析实验结果。监控记录动物的体重,皮毛特性和笼内行为。考虑,实验选用甘露醇作为热量摄入潜在改变的阴性对照。所有实验操作遵守《加拿大动物保护协会的指导原则》(Canadian Council on Animal Care guidelines)。

[0206] 行为学检验:据前述实验方法 [18],进行 Morris 水迷宫测试。小鼠先进行非空间预训练后,再进行 5 天的定位航行实验 (空间识别训练),每天训练 4 次,然后通过提示的可见平板排除一般动机缺陷,学习能力缺陷和运动能力问题,通过空间探索实验评价小鼠的记忆力。

[0207] 以各处理方法 (未处理组,表肌醇组或鲨肌醇组) 和基因型 (TgCRND8 组与非转基因组比较) 作为组间因素,用重复测量混合模型对数据进行方差分析 (ANOVA)。根据前述方法 [41],进行开场实验,以小鼠行走持续时间,静止时间和洗毛时间作为小鼠自发性运动能力的指标,测试小鼠运动活动能力。根据前述方法 [42],用 Economex™ 加速旋转棒 (Columbus Instruments, Columbus, OH) 检测小鼠的感觉运动功能,旋转棒从 5r. p. m/s 初始恒定速度以 0. 2r. p. m. /s 加速,记录小鼠在旋转杆上的潜伏时间,每天测试 4 次,2 次测试之间间隔 30min。各小鼠在测试前训练 7 天,测试日各小鼠 4 次从旋转棒上滑落的潜伏时间之和为小鼠的最终得分。

[0208] 脑淀粉样蛋白斑负载 取小鼠大脑,用 4% 多聚甲醛固定一脑半球,从正中矢状面方向用固体石蜡包埋。为得到系统的均匀随机切片组,对整个脑半球进行厚度为 5 μ m 的连续切片。选择间隔 50 μ m 的切片组用于分析 (10-14 片 / 组)。脑淀粉样蛋白斑的鉴定如下进行:用甲酸对切片上的抗原进行提取,先与 A β 一抗 (Dako M-0872) 进行孵育,然后与二抗 (Dako StreptABCcomplex/horseradish kit) 进行孵育。最后用 DAB 染色显象并用劳克坚牢蓝反染。

[0209] 用连接莱卡显微镜和日立 KP-M1U CCD 摄影机的 Leco IA-3001 图象分析软件评价脑淀粉样蛋白斑负载水平。然后用 Openlab 图象软件 (Improvision, Lexington, MA) 将显微照片转化为二进制图象,测定斑点数目和面积。起源于血管或血管周围的淀粉样蛋白定

义为血管性淀粉样蛋白负载,也可用同样的方法进行分析。

[0210] 血浆和大脑中淀粉样蛋白 A β 的含量 在蔗糖缓冲溶液中匀浆半脑组织样品,然后用 0.4%二乙胺/100mM NaCl 提取可溶性 A β ,或用冰甲酸分离提取总 A β 。提取液中和后,稀释,用商品化的试剂盒(BIOSOURCE International)测定 A β 40 和 A β 42 水平。每脑半球测定三份样品,报告 $x \pm \text{SEM}$ 数据。用尿素胶电泳分离样品,用蛋白质印迹分析各组分 A β 种群[43]。用 6E10 抗体(BIOSOURCE International)和增强荧光化学法(Amersham)检测分析 A β 水平。

[0211] 神经胶质增生的定量 对处理组和对照组小鼠脑半球进行多聚甲醛固定,冷冻,矢状向切片,从中随机选取间隔均匀的 5 张切片。在切片上用抗鼠胶质纤维酸性蛋白(GFAP) IgG2a(Dako ;1 : 50 稀释)免疫标记星形胶质细胞,用抗鼠 CD68 IgG_{2b}(Dako ;1 : 50 稀释)标记小胶质细胞。用安装在 Zeiss Axioscope 2 Plus 显微镜上的 Coolsnap 数码相机抓拍数码相片。用 Openlab 3.08 图像软件(Improvision, Lexington MA)对相片进行分析。

[0212] 存活普查 本研究采用 Kaplan-Meier 法[44]评估小鼠治疗的生存概率,因 Kaplan-Meier 法可根据每一死亡事件的发生计算生存概率,所以适合小样本研究。在本存活分析实验中,每治疗组采用 35 只小鼠,用 Tarone-Ware 检验法评估治疗的效果。

[0213] 脑中淀粉样前体蛋白(APP)的分析 在缓冲液中(20mM Tris pH7.4,0.25M 蔗糖,1mM EDTA,1mM EGTA,混合有 0.4% DEA(二乙胺)/100mM NaCl 的蛋白酶抑制剂混合物,)匀浆半脑组织,109,000 $\times$ g 离心。如前述方法[17,18],用单克隆抗体 22C11 进行蛋白质印迹分析上清中淀粉样前体蛋白(APP)水平,用单克隆抗体 C1/6.1 分析沉淀中 APP 全蛋白水平。

[0214] 可溶性 A β 寡聚体分析 本研究用一种抗 A β 寡聚体特异性抗体进行斑点杂交实验分析样品中可溶性 A β 寡聚体[24]。简述如下:在蛋白酶抑制剂混合物(Sigma)的存在下,将 A β 寡聚体从脑半球组织溶解到 PBS 缓冲溶液中,4 $^{\circ}\text{C}$,78,500 $\times$ g 离心 1h,对上清进行分析。用 BCA 蛋白质分析法(Pierce)测定上清中蛋白含量。将 2 μ g 总蛋白点样到硝化纤维膜上,用 10%的脱脂牛奶 TBS 溶液封闭膜,然后与生物素化的 A β 寡聚体特异性抗体进行孵育。印迹与链亲合素-HRP 孵育后,用增强化学发光试剂盒检测可溶性 A β 寡聚体水平。本研究用可溶性,纤维状的 A β 42 做阴性对照,采用合成的 A β 42 寡聚体做阳性对照[23]。所用对照样品在寡聚体抗体洗脱后,用抗 A β 抗体 6E10 进行再探测予以鉴定。

[0215] 长时程增强效应 按标准操作方法[45,46],记录小鼠海马 CA1 区的场电位。选用 P16 到 P26 年龄的 Swiss Webster 小鼠,用异氟醚麻醉。快速取出脑组织,放入冰冷的富氧的蔗糖-脑脊液中(单位 mM:248 蔗糖,2KCl,2MgSO₄,1.24 NaH₂PO₄,1 CaCl₂,1 MgCl₂,26 NaHCO₃,10D-葡萄糖,pH 7.4,~315mOsmol[47])。分离各脑半球的海马区,以 350 μ m 厚度做冠状切片。切片转移到盛有 NaCl-脑脊液(单位 mM:124 NaCl,2 KCl,2MgSO₄,1.25 NaH₂PO₄,2 CaCl₂,26 NaHCO₃,10 D-葡萄糖,pH 7.4,~310mOsmol)的保持室中,使其活性恢复 1h 以上。切片转移至保持室后,立刻在 15ml 人工脑脊液闭合回路中连续灌流,以保持 A β 寡聚体活性。基线稳定 20min 后,在灌流回路中加入 1ml 含或不含 1.25 μ M 鲨肌醇的 15 $\times$ 浓 7PA2 条件培养基。将一双极刺激电极(World Precision Inst.)埋置于谢弗侧枝以传递基础刺激和强直电刺激。将一灌有人工脑脊液的硼硅酸盐玻璃记录电极(2-4M Ω)安置于刺激电极 75-200 μ m 附近。以能获得 25-40%的最大场电位响应设置刺激强度(通常设置为 10-20 微安培),测试刺激频率为 0.05HZ。每间隔 5min,以 4 次强直电刺激(100HZ,坚

持 1s) 诱导 LTP 发生。场电位响应值被 Axopatch 200B 放大 10 倍后,在 10KHz 频率下收集数据,在 2kHz 频率下筛选数据。用 pClamp 9.2 软件跟踪分析轨迹。用总响应约 10-60% 的数据评估场电位响应的斜率。

[0216] 突触小泡蛋白的定量 从处理组和对照组多聚甲醛固定的鼠脑半球矢向切片中,选取间隔均匀的 3 张切片进行突触小泡蛋白免疫化学染色分析。用抗突触小泡蛋白抗体 IgG(1 : 40 ;Roche, Laval, PQ) 免疫标记切片。按上述方法进行数码拍照和分析。每一切片随机选取海马 CA1 区 $100\ \mu\text{m}^2$ 的面积,计算突触小泡蛋白反应小体和扣结的数目。结果以 $100\ \mu\text{m}^2$ 面积含有多少反应小体和扣结表示 [48,49]。

[0217] 结果

[0218] 给阿尔茨海默病模型小鼠 (TgCRND8) 饲以肌醇类化合物 [17,18],以评价该类化合物的体内效果。TgCRND8 小鼠可表达人淀粉样前体蛋白的转基因 (APP₆₉₅),该基因含有两个错义突变 (KM670/671NL 和 V717F),可导致人 AD。具有该基因的 3 月龄小鼠,表现为渐进型空间学习能力缺陷,并伴随脑 A β 水平升高和脑细胞外淀粉样蛋白斑数目的增加 [17]。6 月龄 TgCRND8 小鼠,脑内 A β 水平,淀粉样蛋白斑形态,密度和分布与已确诊的 AD 患者脑部情况非常相近。与 AD 患者相似,模型小鼠生化学,行为学和神经病理学特征的恶化也伴随着死亡率的增加。

[0219] 将 TgCRND8 小鼠和同窝出生的非转基因小鼠,分成性别和年龄相匹配的群别,用以测试肌醇立体异构体做为治疗药物的效果(因实验推迟至 5 月龄开始,持续 1 个月时间,到 6 月龄结束)。小鼠随机分组口服给药如下活性化合物(1,2,3,4,5/6- 表肌醇或 1,3,5/2,4,6- 鲨肌醇),另安排安慰治疗组(甘露醇)和未处理组。实验终点是对认知功能,脑 A β 水平和神经病理学的研究分析。1,2,3,5/4,6- 肌肌醇未被包括在本研究中,因前述体外实验表明,肌肌醇仅仅具有较弱的活性,体内初步研究也表明没有显著效应(数据未显示)。实验过程中,观察者不了解基因型和处理组的信息。

[0220] 肌醇立体异构体逆转已形成脑淀粉样蛋白沉积

[0221] 多数 AD 患者只有当出现症状时才会寻求治疗,如 A β 低聚化,沉积,毒性,斑形成等发展到相当严重的程度的时候。为评价肌醇立体异构体能否消除已形成的 AD 样表型,将 TgCRND8 小鼠实验推迟到 5 月龄,该年龄段的小鼠具有明显的行为缺陷,伴有大量的 A β 肽和斑负载 [17]。用表肌醇,或鲨肌醇处理 TgCRND8 小鼠和 / 或非转基因同窝小鼠(10 只每组)28 天,并设置未处理对照组。该实验中活性化合物的给药剂量,口服给药方式,及神经化学物质和神经病理的分析方法,都与前述的预防性实验采用的方法一致。本次动物实验并未给出死亡率曲线,因实验时间很短,TgCRND8 小鼠未处理组死亡动物很少,不能提供有意义的数据。

[0222] 本研究比较了表肌醇或鲨肌醇处理 28 天或未处理组 6 月龄小鼠空间学习能力。表肌醇处理 28 天的 TgCRND8 6 月龄小鼠与未处理 TgCRND8 同窝小鼠比较无显著性差异 ($F_{1,15} = 3.02$; $p = 0.27$; 图 1A),而显著性差于同窝非转基因小鼠 ($F_{1,14} = 11.7$, $p = 0.004$; 图 1C)。进一步讲,探针实验也确证了表肌醇处理的 TgCRND8 小鼠与未处理 TgCRND8 小鼠比较,在统计学上无显著性差异 ($p = 0.52$; 图 1E)。表肌醇处理对已患疾病动物脑部 A β 40 和 / 或 A β 42 水平,脑部 A β 斑覆盖面积和斑数目无明显影响(表 1)。

[0223] 用鲨肌醇处理 28 天的 TgCRND8 5 月龄小鼠的行为表现明显优于未处理 TgCRND8 同

窝小鼠 ($p = 0.01$)。实际上, 鲨肌醇处理的 TgCRND8 小鼠的认知行为与其非转基因同窝小鼠已无区别 ($F_{1,13} = 2.9, p = 0.11$; 图 1B, D)。这种有益效果不能归于鲨肌醇对行为系统, 运动系统和感知系统的非特异性作用, 因为肌醇处理对非转基因小鼠的认知行为无有益作用 ($F_{2,19} = 0.98; p = 0.39$)。在探针实验中, 环形交叉指数也表明鲨肌醇处理 TgCRND8 小鼠记忆力明显得到提高, 统计学上已与非转基因同窝小鼠无差异 ($p = 0.64$; 图 1E)。

[0224] 在另一组独立的小鼠实验中, 选用小鼠在目标象限滞留的时间百分数做为另一可选的量度标准。鲨肌醇处理的 TgCRND8 小鼠与非转基因同窝小鼠已无显著性差异 ($p = 0.28$; 数据未显示), 这种有益效果并不归因于感觉运动行为的改变。在开场实验中 (补充的数据), 鲨肌醇处理对 TgCRND8 小鼠洗刷行为或其活动, 与未处理组 ($F_{1,9} = 0.25; p = 0.63$) 和非转基因同窝小鼠 ($F_{1,12} = 0.02; p = 0.89$) 比较, 都没有差异。同样, 转棒实验也表明在感觉运动功能方面, 鲨肌醇处理 TgCRND8 小鼠与未处理 TgCRND8 小鼠比较 ($p = 0.42$), 处理 TgCRND8 小鼠与处理或未处理的非转基因小鼠之间比较 ($p = 0.79$), 也都没有差异。

[0225] 与前述预防性实验研究结果相一致, 一项鲨肌醇处理 5 月龄小鼠的 28 天实验结果如下: 1) 脑 A β 40 和 A β 42 水平降低 (如不溶性 A β 40 降低 $29 \pm 2.3\%$, $p < 0.05$; 不溶性 A β 42 降低 $23 \pm 1.4\%$, $p < 0.05$); 2) 淀粉样蛋白斑数目, 尺寸和斑脑内覆盖面积百分数显著性降低 (斑数目降低 $13 \pm 0.3\%$, $p < 0.05$; 斑尺寸降低 $16 \pm 0.4\%$, $p = 0.05$; 斑脑内覆盖面积百分数降低 $14 \pm 0.5\%$; 表格 1; 图 1C-D)。这些结果在有效性上可与 6 个月的预防性实验结果相媲美。

[0226] 总之, 数据表明鲨肌醇, 更低一些要求说, 包括表肌醇, 能预防或逆转 TgCRND8 小鼠 AD 样表型, 如降低或减轻认知缺陷, 淀粉样蛋白斑, 淀粉样蛋白血管疾病, A β 诱导的炎症反应, 加速的死亡进程等。这些效果可能是该类化合物在中枢神经系统的直接作用, 因为: 1) 该类化合物能通过易化转运穿过血脑屏障 [20, 22]; 2) 用气相-质谱分析可以证明该类化合物在处理小鼠脑组织内的存在 (数据未显示)。

[0227] 处理组和未处理组 TgCRND8 小鼠脑匀浆中 APP 全蛋白, 糖基化 APP, APPs- α 或 APPs- β , 或 A β 新型 (如 A β 1-38 水平) 都没有变化 (数据未显示)。同样, 反映 A β 外周分布的血浆 A β 42 水平测定结果表明, 处理组和未处理组 TgCRND8 小鼠 A β 的外周分布也无差异。肌醇处理 5 月龄 TgCRND8 小鼠 28 天后, 血浆中的 A β 42 水平如下: 未处理组 = $1144 \pm 76 \text{ pg/ml}$; 表肌醇组 = $1079 \pm 79 \text{ pg/ml}$; 鲨肌醇组 = $990 \pm 73 \text{ pg/ml}$; $p = 0.87$ 。外周/血浆中的 A β 42 未发生变化, 可能与 A β 有关, 因 AD 患者接受 A β 免疫治疗后, 发生强烈的抗体反应, 并取得明显的临床改善, 但血浆中 A β 水平也无变化 [4]。

[0228] 为直接证实肌醇立体异构体在脑内可能具有体外实验中已明确的抑制 A β 寡聚化的活性 [15, 16], 研究采用斑点印迹免疫分析 [24] 测定处理和未处理 TgCRND8 小鼠脑 A β 寡聚体水平。这项研究选用特异性识别寡聚 A β 种属的抗体 [24]。处理组脑可溶性 A β 寡聚体水平显著性降低, 降低水平与该类化合物引起的行为学和神经病理学的改善程度是相称的 (图 2)。

[0229] 用表肌醇处理已有病理学改变的 5 月龄 TgCRND8 小鼠 1 个月, A β 水平与未处理组比较, 无显著性降低 (未处理组 56 ± 4 像素, 对应表肌醇处理组 47 ± 2 像素, $p = 0.12$)。而鲨肌醇延迟处理 5 月龄 TgCRND8 小鼠 28 天, 引起可溶性 A β 寡聚体降低 30% (未处理

组 63 ± 3 象素, 对应处理组 45 ± 2 象素, $p = 0.008$)。斑点印迹实验对 Tau 蛋白, α -共核蛋白和微管蛋白交叉反应结果为阴性, 证明采用的抗体对 TgCRND8 脑匀浆中 A β 是特异的。这一结果直接阐明鲨肌醇, 而非表肌醇, 能降低脑组织可溶性 A β 寡聚体的含量。

[0230] 为证实鲨肌醇有可能抑制 A β 寡聚体诱导的神经毒性, 通过分析鼠海马切片长时程增强作用 (LTP) 和 TgCRND8 鼠脑突触小泡蛋白免疫反应活性所代表的突触密度来确定鲨肌醇的作用。海马 LTP 是突触可塑性的量度标准, 现已发现, 天然细胞来源的 A β 寡聚体种群可破坏海马 LTP [26]。此前的大鼠有关报道 [26, 27] 中, 稳定转染人 APPV717F (7PA2 细胞) 的 CHO 细胞分泌到条件培养基的可溶性 A β 寡聚体, 抑制了野生型鼠海马切片的 LTP (图 2B)。然而, 如果 7PA2 条件培养基体外用鲨肌醇预处理, 与单独使用 7PA2CM 组比较, 可明显恢复 LTP ($p = 0.003$; 图 2B)。鲨肌醇对 LTP 没有直接作用, 因为鲨肌醇处理的未转染人 APP 的普通 CHO 细胞培养液 (图 2C), 及其未处理培养液与鲨肌醇处理的 7PA2 培养液一样, 三种样品都有 LTP 发生。鲨肌醇导致的 LTP 恢复效应并非基线传送 (transmission) 改变的结果, 因为如果不强化强直电刺激, 鲨肌醇并不能改变突触响应 (数据未显示)。为将鲨肌醇对脑片培养中 LTP 保护作用和对体内突触功能的效用联系起来, 测定了鲨肌醇处理组和未处理组鼠脑海马 CA1 区突触小泡蛋白的免疫反应活性。突触小泡蛋白的免疫反应活性是突触密度的量度标准, 与突触功能有密切关系。结果, 突触小泡蛋白水平显著性增加。预防性研究中, 鲨肌醇可使海马 CA1 区突触小泡蛋白反应扣结和细胞小体增加至 148% (未处理组 TgCRND8 鼠 $1610 \pm 176/100 \mu m^2$, 对应的鲨肌醇处理组 TgCRND8 鼠 $2384 \pm 232/100 \mu m^2$; $p = 0.03$), 延迟治疗研究中, 相应数值为 150% (未处理组 TgCRND8 鼠 $1750 \pm 84/100 \mu m^2$, 对应的鲨肌醇处理组 TgCRND8 鼠 $2625 \pm 124/100 \mu m^2$; $p < 0.001$)。总之, LTP 和突触小泡蛋白研究结果表明, 在脑内鲨肌醇可以解除天然分泌的人 A β 寡聚体对 LTP 的抑制, 并保持突触功能。

[0231] 在另一实验中, 还将鲨肌醇处理 TgCRND8 鼠两个月, 到 7 月龄结束, 观察了其对外理动物认知功能和病理学的持续改善效果。

[0232] 实施例 2

[0233] 研究 AZD-103 对细胞来源的 A β 寡聚体的效应及对海马长时程增强作用的影响

[0234] 本研究的目的是: A β 寡聚体被认为在阿尔茨海默病发病过程中起重要作用, 本实验拟研究 AZD-103 是否可通过中和可溶性 A β 寡聚体在 AD 疾病治疗中发挥潜在的治疗作用。本研究考察了一种鲨-肌醇化合物 (如, AZD-103 一种鲨肌醇) 对来源于一种稳定过量表达 APP751_{V717F} 的 CHO 细胞系 - “7PA2”细胞的, 小的, 可溶性的 A β 寡聚体的中和作用。如蛋白质印迹法检测所证明, 证明该细胞可表达一系列 A β 寡聚体。

[0235] 该系列 A β 寡聚体被证明可强效抑制啮齿类动物海马长时程增强作用 (采用动物实验中一种量度突触效能和可塑性的方法)。因而, 本研究的主要目的是用蛋白质印迹法研究 AZD-103 是否影响了 A β 寡聚体的模式 (或者表现为解聚或者表现为表位掩闭), 二是考察 AZD-103 是否能克服 A β 寡聚体的副作用恢复 LTP。

[0236] 目的:

[0237] 1) 进行 LTP 实验前, 考察在 7PA2 的条件培养基中快速加入 $1.25 \mu M$ AZD-103 产生的效用。该实验的目的是考察 AZD-103 能否解除完整组装的 A β 寡聚体对 LTP 的抑制作用。

[0238] 2) 考察快速加入 $1.25 \mu M$ AZD-103 手性和表对映异构体产生的效应。该实验目的

是确定这种效用是否是 AZD-103 特有的,而不是其它较低活性或无活性化合物所具备的。

[0239] 3) 在 LTP 实验范式中,建立 AZD-103 的剂量响应曲线。该实验目的是估算 AZD-103 在 7PA2 条件培养基中的 IC₅₀。

[0240] 4) 在 LTP 实验范式中,建立低浓度的 AZD-103 孵育时间曲线。该实验目的是确定 AZD-103 和 7PA2 条件培养基共孵育更长时间是否可以更好提高 AZD-103 对 LTP 的恢复效果。

[0241] 5) 考察高水平的 AZD-103 是否仍然能够恢复已暴露于 7PA2 条件培养基海马切片的 LTP。该研究的目的是确定 AZD-103 是否能逆转 A β 寡聚体侵染的脑组织切片的 LTP 抑制效应。

[0242] 6) 在 7PA2 CM 中加入系列稀释的 AZD-103 (培养后),并对其进行免疫沉淀蛋白质印迹分析。或将 AZD-103 直接加入到条件培养前的 7PA2 细胞中 (培养前),同样方法进行免疫沉淀蛋白质印迹分析。本实验的目的是比较 AZD-103 对寡聚体稳定和寡聚体生产的效应。

[0243] 7) 考察是否相对低水平的 AZD-103 在培养前加入比培养后加入能更有效恢复 LTP。

[0244] 方法

[0245] 电生理学:Walsh 等的出版物中详细的描述了电生理学的实验方法 (Journal of Neuroscience 25:2455-2462)。主要如下:制备 p16-p28 年龄 Swiss Webster 小鼠脑的 350 μ m 冠状切片。当刺激谢弗侧枝时,记录海马区 CA1 区的场电位。在人工脑脊液中 (ACSF) 中记录 20min,至基线平稳。

[0246] 在实验间隙,取 1ml 15x 浓 7PA2CM,于 37 $^{\circ}$ C 解冻,5min 后在该条件培养基中加入 18.75 μ M AZD-103,混合,放回 37 $^{\circ}$ C 孵育,15min 后,用 15ml ACSF 稀释 7PA2 CM 和 AZD-103 混合物,得到终浓度为 1x7PA2 CM 和 1.25 μ M AZD-103 的溶液。该溶液循环流过脑片 20min,使 A β 能侵染入脑组织中。为诱导 LTP,每 5min 施加 4 次 100Hz 强直电刺激,跟踪强直刺激后激发的 EPSP 斜率 1h。该 1h 时间点的数据是分析的关键部分,因为这是 LTP 的开始阶段,而 LTP 受 A β 寡聚体的影响巨大。

[0247] 条件培养基的制备:当 CHO- 或 7PA2 细胞长到 $\sim$ 90% 融汇时,细胞用 1x 无血清 DMEM 培养基洗涤,然后在无血清 DMEM 培养基 (青霉素 / 链霉素, L- 谷氨酸,有 / 无 AZD-103),4ml/10cm 盘中培养过夜 (约 15h)。第二天,收集条件培养基 (CM),1000xg 离心,用生化实验用蛋白酶完全抑制剂 (单位 mg/ml 1 亮氨酸酶素,1 抑肽素,0.1 抑肽酶,40EDTA 和 2mM 1/10 二氮菲) 或细胞培养配套的蛋白酶抑制剂 (Sigma P18601 : 1000) 处理培养基 (CM),为电生理实验备用。

[0248] 条件培养置于 -80 $^{\circ}$ C 冻存至收集足够体积以完成一“批”次实验 - 通常为 300ml。样品在 YM-3 centricon 离心过滤装置中浓缩至 15x。收集最终浓缩产物,1ml 分装,保存于 -80 $^{\circ}$ C。7PA2 CM 批和批之间可能存在变异性 (通常抑制状况为基线的 120% -150%,而对照 CHO- 细胞为基线的 200% -220%),可能来源于几个因素,例如细胞融汇度的微小区别,传代次数不同等,所以对某一组实验而言 (如剂量响应曲线,时间曲线等等),仅制备一个批次并与该批的单独应用的 7PA2 相比较。

[0249] 免疫沉淀蛋白质印迹:用 40 μ l 蛋白 A 琼脂糖珠子处理 8ml 7PA2CM30min (以除去

IgG 抗体)。珠子旋转除去,上清中加入 60 μ l 多克隆抗 A β 抗体 R1282,另加入 40 μ l 蛋白 A 琼脂糖珠子。样品在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,用一系列缓冲溶液,包括 0.5STEN(氯化钠, tris, EDTA, NP-40),SDSSTEN, STEN 洗涤珠子。在洗涤过的珠子中加入 2 $\times$ N-[三(羟甲基)甲基]甘氨酸(tricine)样品缓冲溶液,然后沸水浴,离心,上清在 10-20% tricine 胶上样,蛋白转移到硝化纤维上,用抗 A β 抗体 6E10 进行探针实验。

[0250] 结果

[0251] 在条件培养基应用于脑片孵育前 15min,1.25 μ M AZD-103 直接加入到培养基中(培养后),可完全解除 A β 寡聚体对 LTP 的抑制作用(图 3A,3B and 3C,表 2)。120min 时(强直电刺激 60min 后),CHO-/AZD-103 对照中 EPSP 斜率为基线的 218%(这是单独应用未处理 CHO 细胞培养基的典型行为)。正如所料,强直电刺激 60min 后,7PA2CM 明显抑制了 LTP(EPSP 斜率为基线的 150%)。然而,1.25 μ M AZD-103 和 7PA2CM 共孵育 15min,足以完全解除 7PA2CM 对 LTP 的抑制作用。AZD-103 表-对映异构体也被发现具有恢复 LTP 效用(尽管结果没有显著的统计学意义,可能因为 n 值较小),而 1.25 μ M 的手性对映异构体没有作用。

[0252] 初步的实验表明,AZD-103 加入 CM 中(处理后)可降低 CM 蛋白质印迹上 A β 三聚体的检测量(图 4),而对二聚体似乎影响不大(实验 1,图 4),在第一次实验中,测试了两个剂量的 AZD-103,高剂量组(1.25 μ M)AZD-103 能降低 A β 三聚体水平,增加了一条纤细的条带,降低单体的水平,而二聚体水平不受影响(实验 2,图 4)。在第二次实验中,1.25 μ M 的 AZD-103 也可降低三聚体水平,而二聚体和单体不受影响。因化合物 RS0406 先前被证明培养前加入可降低寡聚体的水平,被用做阳性对照。

[0253] 本研究建立了 AZD-103 剂量响应曲线,以确定 AZD-103 有效恢复 LTP 效应的浓度范围(图 5,表 3)。在 7PA2CM 中加入 4 个浓度的 AZD-103(0.125,0.5,1.25 和 5.0 μ M)(培养后)。需要注意的是,本批 7PA2CM 较前面研究中采用的批次对 LTP(7PA2 单独使用时 EPSP 斜率为基线的 113%)抑制作用稍强,所以 1.25 μ M AZD-103 也不如较前研究有效,但仍可以得到明确的剂量响应关系,IC₅₀ 约为 1 μ M(需要注意的是这可能因 7PA2CM 批次不同而有所变化)。

[0254] 研究发现,延长 AZD-103/7PA2CM 共孵育时间并未改变对 LTP 的恢复效果(图 6A 和 6B,表 4)。选择相对较低剂量的 AZD-103(0.5 μ M)以确定是否更长的孵育时间(15,30,120,240min)能够得到更好的 LTP 恢复效果。结果表明,更长时间的孵育与 15min 或者 PA2 单独使用无显著性差异。但,与 CHO- 比较时,除 15min,其它时间点无显著性差异。这与 0.5 μ M AZD-103 仅具有缓解 LTP 抑制的部分效果相吻合,如图 5 所示。

[0255] 一旦脑切片被完整的 A β 寡聚体预灌注过,AZD-103 便失去了逆转 A β 寡聚体抑制 LTP 的效用(图 6C)。鼠脑切片用 7PA2CM 灌注 20min 后,选用较高浓度的 AZD-103(10 μ M)加入到切片上。该切片用 AZD-103/7PA2CM 再灌注 10min。强直电刺激 60min 后,LTP 与 7PA2 对照无显著性差异。不过,选用相对较低浓度的 AZD-103(0.5 μ M)直接处理 7PA2 细胞(培养前)却成功解除了该细胞培养基对鼠脑切片的 LTP 抑制。因此,证明 AZD-103 培养前加入比培养后加入更能有效的恢复 LTP。

[0256] 本研究建立了 AZD-103 剂量响应曲线,以确定蛋白质印迹法分析 AZD-103 有效降低 A β 寡聚体水平的浓度范围(图 7A-7E)。实验中,AZD-103 直接加入到 7PA2 细胞中(培

养前)和 7PA2CM 中(培养后)。培养前和培养后加入都有效降低了 A β 寡聚体水平。实验操作的一个挑战是在免疫沉淀实验洗涤过程如何降低样品间的变异。因此对 A β 二聚体和三聚体的绝对值测量是必须的(图 7C),也需要归一化折算成 APP 或 A β 单体水平(图 7D 和图 7E)。以绝对测量值或者归一化折算到单体水平计算,似乎所有浓度的 AZD103 都可以降低 A β 二聚体或三聚体水平。如归一化折算成 APP, AZD103 的作用呈现剂量效应。

[0257] 图 7 中, AZD103 直接加入到 7PA2 细胞中(培养前),与 AZD103 和 7PA2CM 孵育法(培养后)比较,二种方法对 A β 二聚体的作用无显著性区别。本研究考察了 AZD-103 培养前处理细胞(培养前),其 7PA2CM 对 LTP 范式的作用。实验选用了一相对较低的浓度(0.5 μ M),该浓度在培养后方法中被证明仅具有部分效用。0.5 μ M AZD103 直接加入到细胞中(培养前),对 CM 抑制 LTP 有深远影响。120min 时 EPSP 斜率变化百分数与无 A β 寡聚体存在的情况相近似(CHO-)(图 8;c 与图 6, 0.5 μ M AZD103 处理后组比较)。这些结果表明,当 AZD-103 以较低浓度直接加入到产生 A β 寡聚体的细胞中的效果优于加入到处理后的培养基中时的效果。

[0258] 结论:

[0259] 本研究的主要结论是:证明了 AZD-103 具有较强中和 A β 寡聚体对鼠海马突触功能短期效用的作用(图 3)。

[0260] 长时程增强作用实验的标准分析方法已在文献中被广泛描述,也被广泛认可可是测量脑突触效率和可塑性的一种方法。LTP 细胞和分子机制被认为与人学习记忆功能所必须的机制为同一机制。所以, A β 寡聚体对 LTP 的干扰可能与阿尔茨海默症病人记忆损害过程相似。基于上述假定, AZD-103 的主要作用是恢复鼠海马中 LTP,这与 AZD-103 可能对阿尔茨海默症病人具有相似的功能或提供相似的效应的假设是一致的。

[0261] 本研究的第二个兴趣点是:深入的研究了 AZD-103 如何改变 A β 寡聚体使其不能抑制 LTP。初步研究(其中的部分包含在图 4 中)表明, AZD-103 可能掩闭或解聚了可强效抑制 LTP 的 A β 三聚体。滴定实验结果见图 7,基本支持了这一结果。

[0262] 已证明, AZD-103 加入到 7PA2 细胞中(处理前)比加入到 7PA2CM 中(处理后)能更有效恢复 LTP。虽然 AZD103 可以直接降低二聚体和三聚体水平,但当与分泌寡聚体的细胞孵育时,具有更高/进一步的效应。

[0263] 对 7PA2CM 灌注过的脑切片, AZD-103 不能恢复其 LTP(图 6)。但是,即使 AZD-103 不能逆转已经存在的脑部损伤,仍可有效中和新产生的 A β 寡聚体,并且阻止额外损伤。这可能需要其他恢复机制以便更有效的操作,并在甚至在本实验无法测量的更长的一段时间内提高预后质量。

[0264] 该研究中,采用了 WT 小鼠和细胞来源的外源性 A β 寡聚体。该实验方法的一个优点是,可以研究 A β 对突触功能的急性效应,并降低抵抗 A β 毒性的补偿效应和 A β 初始损伤带来的次级和三级损伤。

[0265] 第二个优点是细胞来源的 CM 包含类别丰富的高度稳定的 A β 寡聚体,这是合成 A β 法不能比拟的。最后, A β 削弱 LTP 所需的水平非常低(初步估计为稍高的微微摩尔范围),这与阿尔茨海默症患者中 A β 大致水平非常接近。因此,这是一个可以检测 AZD-103 干涉 A β 寡聚体对突触功能有害作用的辨识系统。

[0266] 研究未发现 AZD-103 毒性反应的直接证据(AZD-103 存在下 7PA2 细胞看起来更健

康)。即使 A β 三聚体降低后, APPs 的表达未受到影响, 并且在 CHO-/AZD-103 条件下, 也未发现对 LTP 的负作用 (图 3)。

[0267] 总结

[0268] 天然的细胞来源的人 A β 寡聚体体内能强效抑制啮齿动物海马长时程增强作用 (LTP)。这些寡聚体也可损伤大鼠对学习行为的回忆, 这一发现支持了如下假设: 可溶性的, 低聚合值 (n) 的 A β 寡聚体可损伤记忆, 并可导致阿尔茨海默症患者早期症状。

[0269] 本研究的主要目的是确定肌醇, AZD-103 是否可通过中和 A β 寡聚体对突触功能的抑制, 提供有益的治疗效果。用 AZD-103 处理过的含有分泌的 A β 寡聚体的条件培养基 (CM) (较低的 nM 浓度水平) 灌流野生型鼠海马切片, $\sim 1-2 \mu\text{M}$ 浓度的 AZD-103, 能完全恢复 LTP 作用, 而无活性的对映体被确认为无有益效应。当 AZD-103 直接加入到分泌 A β 的细胞中时, 即使低浓度的也具有有益效果。免疫沉淀蛋白质杂交分析 CM 中 A β 寡聚体表明, AZD-103 降低了 A β 水平。

[0270] AZD-103 通过降低预形成的寡聚体水平, 发挥其解除可溶性 A β 对 LTP 抑制的效应。所以, AZD-103 可以干预 AD 早期发病阶段。

[0271] 实施例 3

[0272] AZD103 对 β 淀粉样蛋白寡聚体诱导的认知缺陷的效应

[0273] 目的:

[0274] 以阿尔茨海默症 ALCR (Alternating Lever Cyclic Ratio) 鼠模型测试各化合物, 其中包括 AZD103。ALCR 鼠模型非常灵敏, 可检测鼠脑部注射 A β 寡聚体引起的认知缺陷。A β 寡聚体被认为可负向影响认知功能, 小分子化合物和 A β 寡聚体一起给药大鼠, 评价它们对 A β 寡聚体诱导认知能力衰减的中和作用。

[0275] A β 寡聚体正常分泌自淀粉样前体蛋白 (APP) 过量表达基因转染的细胞。APP 被分泌酶切割, 在细胞内 A β 寡聚体被组装成 2-12 单位的淀粉样蛋白 (2 到 12 单位), 并分泌到培养细胞的培养基中 [5]。另外, A β 寡聚体也可从 Swedish APP 突变体转染的转基因小鼠 (Tg2576) 脑匀浆中提取 [51]。

[0276] A β 寡聚体是可溶性的, 并未形成原纤维 / 斑, 并在溶液中是稳定的。无论来自 CM 还是脑匀浆的 A β 寡聚体, 都采用分子排阻色谱 (SEC) 分离纯化, 得到具有负向影响认知功能的特定分子量范围的组分 [50]。在动物清醒及活动状态下, 将与 AD 患者生理浓度相当的, 纯化的 A β 寡聚体通过留置管注射到大鼠侧脑室中, 注射 2h 后, 用灵敏的认知分析方法检测大鼠。

[0277] ALCR 测试法被证明较以前发表的研究药物对认知功能作用的方法 [52, 53] 具有更高的灵敏度。该实验中, 须使大鼠学习按压杠杆需求的复杂顺序, 以使大鼠在双杠杆实验箱中接受食物强化刺激。测试大鼠必须按压第一杠杆后, 转而按压另一杠杆, 从而在两杠杆之间交替轮换按压达到足够次数, 以获取食物奖赏。获得食物奖赏的准确按压次数, 从开始时的 2 次 / 食物丸增加到 56 次 / 食物丸, 然后减少到 2 次 / 食物丸。中间值按照二次方程, $x^2 - x$ 计算。

[0278] 按压杠杆要求实验的上升和下降顺序组成一个循环 (如, 2, 6, 12, 20, 30, 42, 56, 56, 42, 30, 20, 12, 6, 2 次按压 / 食物奖赏)。每天进行 6 个全循环测试。如测试大鼠经过充分按压获取食物后, 仍滞留在某一杠杆上, 记录为错误, 即不交替按压 (一种固执错误), 或

测试大鼠未完成在某杠杆上响应要求而进行杠杆切换（一种切换错误）。

[0279] 方法

[0280] A β 寡聚体：本研究从转染的中国仓鼠卵巢细胞（7PA2 细胞）中制备 A β 寡聚体，该细胞可将生理水平的 A β 分泌培养基中（CM）。A β 寡聚体也可从 Tg2576 鼠脑匀浆中利用分子排阻色谱分离制备。采用蛋白质杂交分析描述样品中的 A β 寡聚体特性。生产相应的对照化合物以检测各种活性的 A β 寡聚体的构型。

[0281] 大鼠：训练 40 只大鼠 ALCR 实验约 3 个月时间，直到它们的错误率比较稳定。训练期间，每周训练 5 天。

[0282] 外科手术：训练结束，所有大鼠都接受安装一个永久性贴附于头骨的 28 号套管，套管通向侧脑室（处于左右脑室正中间）。大鼠手术后恢复 5 天。

[0283] 给药：将 AZD103 溶解于饮用水中，以大鼠饮用方式进行体内给药。制备不同浓度样品，根据每天平均水摄入量来确定具体的每天平均剂量。因此，剂量水平是近似的数值。

[0284] 测试：测试 AZD 103 抵抗已知的具有破坏认知功能的 A β 寡聚体的作用。实验方法对两种常规的操作进行了整合。

[0285] 1. AZD 103 与含有 A β 寡聚体的注射溶媒进行预孵育，然后评估其对 ALCR 效应。相应的注射对照组为脑室注射未预先孵育（未处理）的 A β 寡聚体和 AZD 103。

[0286] 2. 在测试 ICV 注射被公认的在 ALCR 实验中可影响认知功能的 A β 寡聚体制剂前，大鼠以溶有 AZD 103 的饮用水饲喂处理至少 3-4 天。

[0287] 按如下顺序评价各种处理：

[0288] 1. 单独脑室注射 7PA2CM

[0289] 2. 单独脑室注射 AZD 103

[0290] 3. 离体脑室注射用 AZD 103 孵育的 7PA2CM

[0291] 大鼠随机顺序接受上述 1-3 处理方式

[0292] 1. 口服 AZD103 30mg/kg/ 天 4 日后，脑室注射 ICV 7PA2 培养基

[0293] 2. 口服 AZD103 100mg/kg/ 天 4 日后，脑室注射 ICV 7PA2 培养基

[0294] 3. 口服 AZD103 300mg/kg/ 天 4 日后，脑室注射 ICV 7PA2 培养基

[0295] 4. 未做处理 4 日后，脑室注射 ICV 7PA2 培养基

[0296] 错误率分析：将 AZD 103 处理后的错误率与注射 AZD 103 前至少 3-4 天的基础错误率进行比较。本研究在试验设计内重复测量，可最大限度测定错误率的改变。

[0297] 组织学：实验完毕后，立刻取 20 只大鼠脑并进行保存，其余 20 只脑进行组织学分析，评价其炎症发生，神经胶质增生和留置管放置的情况。20 只灌注固定的大鼠脑组织在福尔马林中进行液滴固定（drop fixed），并将左半右半球分开处理。从一半脑组织选择连续的苏木精和曙红染色的切片评价留置管的放置情况。同一半脑组织采用标准苏木精和曙红染色法，或为评价神经胶质增生采用特异性标记物法，分析炎症发生（嗜中性粒细胞 / 淋巴细胞 / 巨噬细胞），神经胶质增生（微神经胶质和星形胶质细胞）和神经元损失情况。

[0298] 如果 H&E 分析认为炎性变化显著，则另一半脑组织保存在福尔马林中，用于共聚焦免疫组化荧光显微照片分析（神经胶质元纤维，和神经元特异性核蛋白，DAPI，碘化丙啶）。

[0299] 结果

[0300] 实验结果列于表 5, A β 寡聚体注射后两种类型的错误都增加 (切换错误和固执错误分别为基础错误的 120% 和 135% ($p = 0.011$ 和 0.007)). A β 寡聚体注射前与先与 AZD103 进行孵育, 错误率恢复到基础水平 (切换错误和固执错误分别为基础错误的 95% 和 100% ($p = 0.50$ 和 0.99)). 所以, AZD103 可以阻止 A β 寡聚体引发的认知功能紊乱。AZD103 不与 A β 寡聚体并用, 对大鼠行为无影响, 这说明该药物并非非特异性增强认知功能 (图 9)。

[0301] 研究了口服给药 AZD103 抑制淀粉样蛋白诱导的急性认知功能紊乱的能力。大鼠给药 AZD 103, 每个剂量水平给药 4 天 (按 30, 100, 和 300mg/kg/ 天, 以饮用水形式饲喂)。将 A β 通过留置管注射到脑中, 2h 后进行 ALCR 测试。A β 寡聚体明显引起未治疗组动物错误增加 (切换错误为基础错误的 130%, $p = 0.003$; 固执错误为基础错误的 169%, $p = 0.009$)。而 AZD103 各剂量组都将错误率恢复到基线水平 (30, 100 和 300mg/kg/ 天剂量, 切换错误分别为基础错误的 109%, 100%, 109%; 固执错误分别为基础错误的 120%, 120%, 99%) (图 10)。

[0302] 因而 AZD103 可有效减轻鼠脑急性暴露于淀粉样蛋白引起的认知功能紊乱。回体孵育实验表明, AZD103 在大鼠内能够中和 A β 的认知衰退作用。因此, 体内给药的数据表明, AZD103 口服给药后, 可充分侵入脑组织, 发挥治疗潜能。本研究表明, AZD103 具有治疗淀粉样蛋白引起的认知功能紊乱的潜在疗效。

[0303] 本发明不限于本文所述具体实施方案的范围, 因为这类实施方案仅用来说明本发明的一个方面, 并且任何起作用的等价的实施方案都包含在本发明范围内。实际上, 除本文所述之外的对本发明的各种修改, 对本领域技术人员来说是显而易见的, 可以从上述说明和附图中得到启示。这类修改也落在所附权利要求书的范围内。

[0304] 所有出版物、专利和专利申请都通过引用以其整体并入本文, 其程度与各出版物、专利或专利申请单独而具体地表明通过引用以其整体并入本文的程度相同。本文中对任何参考文献的引用, 都不表示承认该参考文献可以用作本发明的现有技术。

[0305] 表 1

[0306] 肌醇治疗 28 天降低 6 月龄鼠脑 A β 40, A β 42 水平和淀粉样蛋白斑

[0307]

	A β 40 (ng/gm 脑湿重 $\pm$ sem)		A β 42 (ng/gm 脑湿重 $\pm$ sem)		总斑数	斑总面 积	斑平均 尺寸
	可溶性	不可溶性	可溶性	不可溶性	计数	面 (μm^2)	积 (μm^2)
对照组	204 $\pm$ 4	4965 $\pm$ 457	426 $\pm$ 14	14503 $\pm$ 1071	1441 $\pm$ 29	486002 $\pm$ 16156	401 $\pm$ 14
表肌醇组	264 $\pm$ 11	3637 $\pm$ 113*	540 $\pm$ 14	12830 $\pm$ 330	1342 $\pm$ 114	459706 $\pm$ 49966	346 $\pm$ 6
鲨肌醇组	178 $\pm$ 11	3527 $\pm$ 241*	374 $\pm$ 23	11115 $\pm$ 647*	1260 $\pm$ 27*	420027 $\pm$ 14986*	336 $\pm$ 6*

[0308] ANOVA, 采用 Fisher' s PLSD 法,

[0309] *p < 0.05.

[0310] 表 2

[0311] 如图 3C 所示, 脑切片用提及的 CM 和测试药物预先共孵育的混合液灌流后, 强直电刺激 60min, EPSP 斜率变化百分数。

[0312]

条件培养基	AZD 浓度	Avg	SEM	n
CHO-	1.25 μ M	217.785	16.0585	8
7PA2		150.325	9.55269	10
7PA2	1.25 μ M	217.76	14.6745	8
鲨肌醇浓度				
7PA2	1.25 μ M	202.3289	15.15965	4
表肌醇浓度				
7PA2	1.25 μ M	125.6881	9.247232	6
CHO-	1.25 μ M	186.1729	14.70473	4

[0313] “Avg”为 EPSP 斜率变化百分数

[0314] 表 3

[0315] 如图 5 所示, 脑切片用提及的 CM 和测试药物预先共孵育的混合液灌流后, 强直电刺激 60min, EPSP 斜率变化百分数。

[0316]

	AZD 浓度,	Avg	SEM	
7PA2 无强直电刺激	1.25 μ M	93.02933	10.57167	
7PA2	0 μ M	112.8484	10.4064	
7PA2	0.125 μ M	120.8265	10.55792	
7PA2	0.5 μ M	128.8802	7.659222	
7PA2	1.25 μ M	171.8655	7.830088	
7PA2	5 μ M	189.1206	5.765952	
CHO-	1.25 μ M	201.0366	13.20049	

[0317] “Avg”为 EPSP 斜率变化百分数

[0318] 表 4

[0319] 如图 6B 所示, 将提及的 CM 和测试药物预先共孵育一定时间后 (CHO CM 和 AZD103 孵育 30min), 灌流脑切片, 强直电刺激 60min, EPSP 斜率变化百分数。“Avg”为 EPSP 斜率变化百分数。

[0320]

	AZD 浓度	AVG	SEM	n
CHO	0.5 μ M	208.3086	11.21214	6
7PA2	0.5 μ M	131.4844	9.260153	6
15min	0.5 μ M	132.824	10.24573	7
30min	0.5 μ M	154.605	14.18698	9
2hrs	0.5 μ M	151.8599	16.98528	7
4hrs	0.5 μ M	147.7836	15.60832	4

[0321] 表 5

[0322] AZD103 与 A β 寡聚体体外预先孵育或口服给药 AZD103 情况下,大鼠注射 A β 寡聚体后的错误率

	切换错误		固执错误	
	% 错误百分数	P=	% 错误百分数	P=
体外孵育				
1 基础错误	100		100	
2 寡聚体单独给药	120	0.011	135	0.007
3. AZD103 单独给药	99	0.89	99	0.94
[0323] 4.A β 寡聚体 + AZD103 给药	95	0.50	100	0.99
体内给药				
基础错误	100		100	
7A β 寡聚体单独给药	130	0.003	169	0.009
4 A β 寡聚体+ 30 mg/kg	109	0.2	120	0.15
5 A β 寡聚体+ 100 mg/kg	100	0.9	120	0.3
6 A β 寡聚体+ 300 mg/kg	109	0.26	99	0.97

[0324] 以下是引用的参考文献。

[0325] 1.Selkoe, D. J. Deciphering the genesis and fate of amyloid beta-protein yields novel therapies for Alzheimer disease(对淀粉样蛋白 β 蛋白的产生和结果分析产生了阿尔茨海默病的新疗法). J. Clin Invest. 110,1375-1381(2002).

[0326] 2. Wong, P. C. , Cai, I. T. , Borchelt, D. R. &Price, D. L. Genetically engineered mouse models of neurodegenerative diseases(神经变性疾病的基因工程小鼠模型). Nat. Neurosci. 5,633-639(2002).

[0327] 3. Nicoll, J. A. R. , Wilkinson, D. , Holmes, C. , Steart, P. , Markham, H. &Weller, R. O. Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid- β peptide:a case report(阿尔茨海默病 β -淀粉样肽免疫后的神经病理学:一则病例报告). Nat. Med. 9,448-452(2003).

[0328] 4. Hock C. et al.. Antibodies against beta-amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease(抗 β -淀粉样蛋白抗体减缓阿尔茨海默病认知功能的衰退). Neuron 38,547-554(2003).

[0329] 5. Orgogozo, J. M. , et al. , Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after A β 42 immunization(少数 AD 患者 A β 42 免疫后出现的亚急性脑膜炎反应). Neurology 61,46-54(2003).

[0330] 6. Schenk D, et al. , Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. (PDAPP 鼠 β -淀粉样蛋白免疫减轻了阿尔茨海默病样病理学) Nature 400,173-177(1999).

[0331] 7. McLaurin, J. et al. , Therapeutically effective antibodies against amyloid-beta peptide target amyloid-beta residues 4-10 and inhibit cytotoxicity and fibrillogenesis(以 β -淀粉样蛋白 4-10 残基为靶点的具有治疗效用的抗体抑制毒

性产生和 A β 原纤维形成). Nat. Med. 8, 1263-1269 (2002).

[0332] 8. Golde, T. E. Alzheimer disease therapy: Can the amyloid cascade be halted? (淀粉样蛋白引发的级联反应可以被停止吗?) J. Clin. Invest. 111, 11-18 (2003).

[0333] 9. McLaurin, J. & Chakrabartty, A. Membrane disruption by Alzheimer beta-amyloid peptides mediated through specific binding to either phospholipids or gangliosides. Implications for neurotoxicity (阿尔茨海默病 β -淀粉样肽通过与磷脂或神经节苷脂结合介导的膜破坏: 关于神经毒性的暗示). J. Biol. Chem. 271, 26482-26489 (1996).

[0334] 10. McLaurin, J. & Chakrabartty, A. Characterization of the interactions of Alzheimer beta-amyloid peptides with phospholipid membranes (阿尔茨海默病 β -淀粉样肽与磷脂膜相互作用的描述). Eur. J. Biochem. 245, 355-363 (1997).

[0335] 11. Koppaka, V. & Axelson, P. H. Accelerated accumulation of amyloid beta proteins on oxidatively damaged lipid membranes (β -淀粉样蛋白在氧化破坏的脂膜上加速积聚). Biochemistry 39, 10011-10016 (2000).

[0336] 12. Mizuno, T. et al., Cholesterol-dependent generation of a seeding amyloid beta-protein in cell culture (培养细胞中播种的 β -淀粉样蛋白呈胆固醇依赖性增长). J. Biol. Chem. 274, 15110-15114 (1999).

[0337] 13. Choo-Smith, L. P. & Surewicz, W. K. The interaction between Alzheimer amyloid beta(1-40) peptide and ganglioside GM1-containing membranes (阿尔茨海默病 β -淀粉样 (1-40) 肽和含神经节苷脂 GM1 膜的相互作用). FEBS Lett 402, 95-98 (1997).

[0338] 14. Yanagisawa, K. et al., GM1 ganglioside-bound amyloid beta-protein (A β): a possible form of preamyloid in Alzheimer's disease (神经节苷脂 GM1 结合的 β -淀粉样蛋白: 阿尔茨海默病中 β 淀粉样前体蛋白一种可能的存在形式). Nat. Med. 1, 1062-1066 (1995).

[0339] 15. McLaurin, J. Franklin, T. Chakrabartty, A. & Fraser, P. E. Phosphatidylinositol and inositol involvement in Alzheimer amyloid-beta fibril growth and arrest (磷脂酰肌醇和肌醇可能介入阿尔茨海默病中 β 淀粉样蛋白原纤维成长和俘获). J. Mol. Biol. 278, 183-194 (1998).

[0340] 16. McLaurin, J., Goloumb, R., Jurewicz, A., Antel, J. P. & Fraser, P. E. Inositol stereoisomers stabilize an oligomeric aggregate of Alzheimer amyloid beta peptide and inhibit A β -induced toxicity (肌醇立体异构体对阿尔茨海默病 β 淀粉样蛋白寡聚物聚积的稳定及其对 β 淀粉样蛋白诱导毒性反应的抑制). J. Biol. Chem. 275, 18495-18502 (2000).

[0341] 17. Chishti, M. A. et al., Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695 (表达双突变淀粉样前体蛋白 695 的转基因小鼠呈现淀粉样蛋白沉积前期症状和认知缺陷现象). J. Biol. Chem. 276, 21562-21570 (2001).

- [0342] 18. Janus, C. et al., A β peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease(阿尔茨海默病模型中 A β 肽免疫降低了行为损伤和斑数目). Nature 408, 979-982(2000).
- [0343] 19. Morris, R. Development of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat(制定一套水迷宫实验的操作程序以研究大鼠的空间学习能力). J. Neurosci Methods 11, 47-60(1984).
- [0344] 20. Spector, R. Myo-inositol transport through the blood-brain barrier(肌肌醇血脑屏障转移). Neurochemical Research 13, 785-787(1988).
- [0345] 21. Uldry, M. et al., Identification of a mammalian H(+)-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain(一种脑中优势表达的哺乳动物 H(+)-肌肌醇同向转运体的鉴定). EMBO 20, 4467-4477(2001).
- [0346] 22. Uldry, M. & Thorens B. The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters(己糖和多羟基化合物易化转运载体的 SLC2 家族). Pflugers Acta, 447, 480-489(2004).
- [0347] 23. Shetty, H. U. & Hollway, H. W. Assay of myo-inositol in cerebrospinal fluid and plasma by chemical ionization mass spectrometry of the hexaacetate derivative(通过化学电离质谱分析肌肌醇 6 乙酸酯衍生物方法分析其在脑脊液和血液中的含量). Biol. Mass Spec. 23, 440-444(1994).
- [0348] 24. Kaye, R. et al., Common Structure of Soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis(可溶性淀粉样蛋白寡聚体的相同结构暗示着相同的发病机理). Science 300, 486-489(2003).
- [0349] 25. Klein, W. L. A β toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as a new vaccine and drug targets(阿尔茨海默病 A β 毒性: 球形寡聚体 - 一种疫苗和药物的新靶位). Neurochem. Int. 41, 345-352(2002).
- [0350] 26. Walsh, D. M. et al., Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo(正常分泌的 β 淀粉样蛋白寡聚物体内强效抑制海马长时程增强作用). Nature 416, 535-539(2002a).
- [0351] 27. Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Rowan, M. J. & Selkoe, D. J. Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition(β 淀粉样蛋白寡聚物: 产生, 毒性和抑制治疗). Biochem Soc. Trans. 30, 552-557(2002b).
- [0352] 28. Lambert, M. P. et al., Diffusible, non-fibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins(来自 Abeta1-42 的可扩散的非纤维状配基是强效的中枢神经系统毒素). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 6448-6453(1998).
- [0353] 29. McLean, C. A. et al., Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease(溶解性 β 淀粉样蛋白库: 阿尔茨海默病神经病变恶化程度的决定因素). Ann Neurol. 46, 860-866(1999).
- [0354] 30. Kirkitadze, M. D. et al., Paradigms shifts in Alzheimer's disease

and other neurodegenerative disorders:the emerging role of oligomeric assemblies(阿尔茨海默病和其它神经退化性疾病范式的改变:寡聚体的聚集日渐显现出其重要作用). J. Neurosci. Res. 69,567-577(2002).

[0355] 31.Lombardo, J. A., et al., Amyloid-beta antibody treatment leads to rapid normalization of plaque-induced neuritic alterations(β 淀粉样蛋白抗体治疗使斑诱导的神经炎改变快速正常化). J. Neurosci. 23,10879-10883(2003).

[0356] 32.Hsaio, K. K. et al., Age-related CNS disorder and early death in transgenic FVB/N mice overexpressing Alzheimer amyloid precursor proteins(过度表达 β 淀粉样前体蛋白的转基因 FVB/N 鼠出现年龄相关性中枢神经系统紊乱和早期死亡现象). Neuron 15,1203-1218(1995).

[0357] 33.Moechars D., et al., Early Phenotypic Changes in Transgenic Mice That Overexpress Different Mutants of Amyloid Precursor Protein in Brain(脑部过度表达不同 β 淀粉样前体蛋白突变体的转基因鼠早期表型发生改变) J. Biol. Chem., 274, 6483-6492(1999).

[0358] 34.Leissring, M. A. et al., Enhanced proteolysis of β -amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology and premature death(APP 转基因鼠具有较高的 β 淀粉样蛋白水解特性,可阻止斑形成,次级病理学症状和早期死亡等现象). Neuron 40,1087-1093(2003).

[0359] 35.Phinney, A. L, et al., In vivo reduction of amyloid-beta by a mutant copper transporter(体内通过一种突变的铜转运载体降低 β 淀粉样蛋白水平). Proc Natl Acad Sci USA. 100,14193-14198(2003).

[0360] 36.Levine, J. Controlled trials of inositol in psychiatry(一项肌醇治疗精神病的对照试验). Eur. Neuropsychopharmacology 7,147-155(1997).

[0361] 37.Kofman, O. et al., The effect of peripheral inositol injection on rat motor activity models of depression(肌醇外周给药对抑郁模型鼠运动行为的作用) Isr. J. Med. Sci. 29,580-586(1993).

[0362] 38.Agam, R. et al., High-dose peripheral inositol raises brain inositol levels and reverses behavioral effects of inositol depletion by lithium(高剂量肌醇外周给药能提高脑内肌醇水平,并恢复锂引发的肌醇耗竭而导致的行效果) Pharmaol. Biochem. Behav. 49,341-343(1994).

[0363] 39.Richards, M. H. &Belmaker, R. H. Epi-inositol is biochemically active in reversing lithium effects on cytidine monophosphorylphosphatidate(CMP-PA)(表肌醇为生物活性化合物,能恢复锂对 CMP-PA 的作用) J. Neural Transm 103, 1281-1285(1996).

[0364] 40.Tanaka, M. et al., Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease(海藻糖减轻亨廷顿舞蹈病模型鼠聚谷氨酸介导的病理症状). Nat. Med. 10,148-154(2004).

[0365] 41.Vaucher, E. et al., Object Recognition Memory and Cholinergic Parameters in Mice Expressing Human Presenilin 1 Transgenes(表达衰老因子转基因

鼠物体再认知记忆能力和类胆碱能参数的研究,). *Exp. Neurol.* 175, 398-406 (2002).

[0366] 42. Mount, H. T. J., Progressive sensorimotor impairment is not associated with reduced dopamine and high energy phosphate donors in a model of ataxia-telangiectasia(在共济失调-毛细血管扩张模型中,感觉运动损害的进展与多巴胺和高能磷酸供体的减少无关). *J Neurochem* 88:1449-1454.

[0367] 43. Wiltfang, J. et al., Highly conserved and disease-specific patterns of carboxyterminally truncated Abeta peptides 1-37/38/39 in addition to 1-40/42 in Alzheimer's disease and in patients with chronic neuroinflammation(阿尔茨海默病患者和神经炎患者脑中除淀粉样肽 1-40/42 外,还有高度保守的、疾病特异性的、C 末端删节的肽 1-37/38/39) *J Neurochem* 81, 481-496 (2002)

[0368] 44. Haccou, P., & Mellis, E., Statistical Analysis of Behavioural Data(行为数据的统计分析), pg 120-186, Oxford University Press, Oxford (1995).

[0369] 45. Sarvey JM, Burgard EC & Decker G. Long-term potentiation: studies in the hippocampal slice(长时程增强作用:海马切片的研究). *J Neurosci Methods* 28, 109-124 (1989).

[0370] 46. Stanton PK & Sarvey JM. Norepinephrine regulates long-term potentiation of both the population spike and dendritic EPSP in hippocampal dentate gyrus(去甲肾上腺素对海马齿状回群体锋电位和树状兴奋性突触后电位的长时程增强作用的调节). *Brain Res Bull.* 18, 115-119 (1987).

[0371] 47. Moyer JR Jr, & Brown TH. Methods for whole-cell recording from visually preselected neurons of perirhinal cortex in brain slices from young and aging rats(一种适合年轻大鼠到老年大鼠脑切片中嗅旁皮质视觉预选神经元的全细胞记录方法). *J Neurosci Methods.* 86, 35-54 (1998).

[0372] 48. Phinney, A. et al., No hippocampal neuron or synaptic bouton loss in learning-impaired aged β -amyloid precursor protein-null mice(学习能力损伤, β 淀粉样前体蛋白失效的老年小鼠中海马神经元的和 / 或突触扣结的降低). *Neuroscience* 90, 1207-1216 (1999).

[0373] 49. Hu, L. et al., The impact of $A\beta$ -plaques on Cortical Cholinergic and Non-cholinergic Presynaptic boutons in Alzheimer's Disease-like Transgenic mice(阿尔茨海默病样转基因小鼠 $A\beta$ 斑对皮层类胆碱能和非类胆碱能突触扣结的影响). *Neuroscience* 121, 421-432 (2003).

[0374] 50. Cleary, J. P., Walsh, D. M., Hofmeister, J. J., Shankar, G. M., Kuskowski, M. A., Selkoe, D. J., & Ashe, K. H. (2005) Natural oligomers of the amyloid- β protein specifically disrupt cognitive function(正常分泌的 β -淀粉样蛋白寡聚体对认知功能的特异性破坏作用). *Nature Neuroscience*, 8:79-84.

[0375] 51. Hsiao, K. K.; Chapman, P.; Nilsen, S.; Eckman, C. B.; Harigaya, Y.; Younkin, S. G.; Yang, F.; Cole, G. M. Correlative memory deficits, $A\beta$ elevation, and amyloid plaques in transgenic mice(转基因鼠相关联的记忆缺陷, $A\beta$ 水平升高和淀粉样蛋白斑现象). *Science* 274:99-102;1996.

[0376] 52. O' Hare, E. , Levine, A. S. , Semotuk, M. T. , Tierney, K. J. , Shephard, R. , Grace, M. & Cleary, J. (1996) Utilization of an operant model of food reinforced behavior involving neuropeptide Y, insulin, 2-deoxy-d-glucose, and naloxone (一种涉及神经肽 Y, 胰岛素, 2-脱氧-D-葡萄糖和纳络酮的食物强化行为的操作模型的利用). Behavioral Pharmacology, 7 :742-753.

[0377] 53. Richardson, R. L. , Kim, E-M. , Shephard, R. A. , Gardiner, T. , Cleary, J. , & O' Hare, E. (2002) Behavioral and histopathological analyses of ibuprofen treatment on the effect of aggregated A β 1-42 injections in the rat (布洛芬治疗对聚集 A β 1-42 注射大鼠的行为学和组织病理学分析). Brain Research, 54 :1-10.

[0378] 54. Walsh, D. M. , Klyubin, I. , Fadeeva, J. , Cullen, W. , Anwyl, R. , Wolfe, M. , Rowan, M. , Selkoe, D. J. (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid- β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo (正常分泌的 β 淀粉样蛋白寡聚体体内可有效抑制海马的长时程增强作用) Nature 516 :535-539.

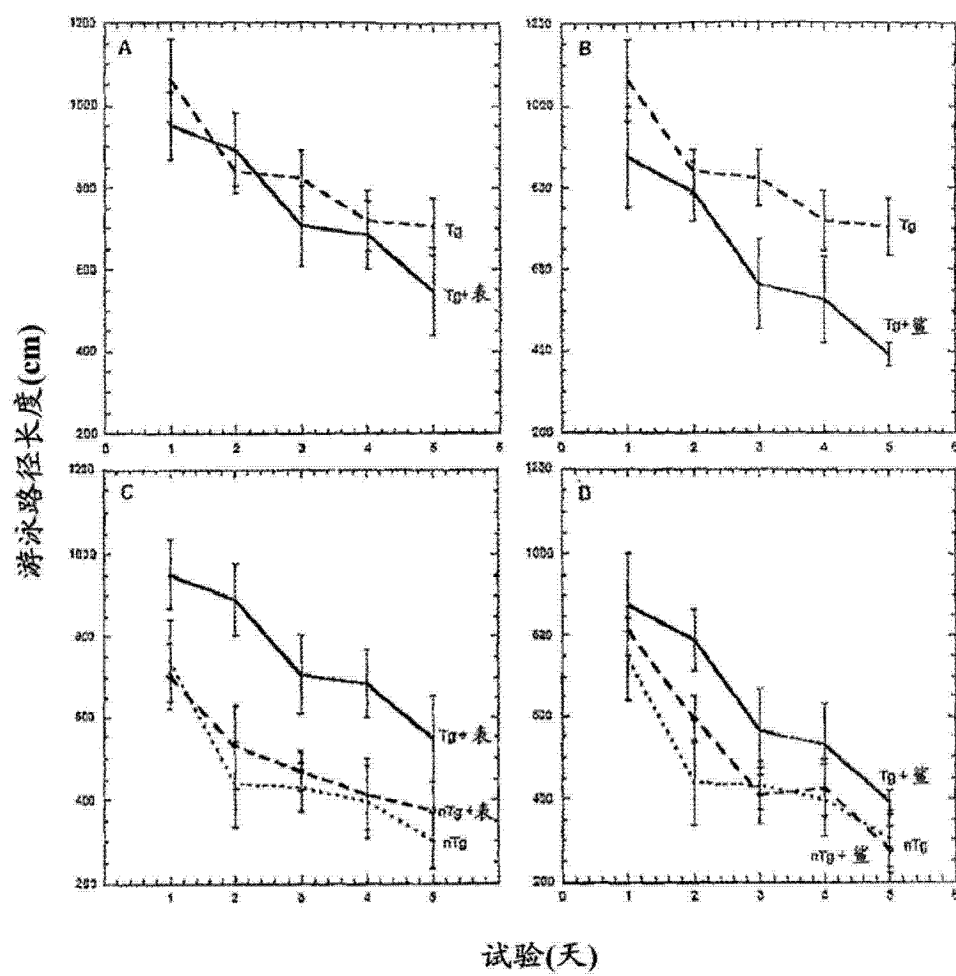


图 1A, B, C, D

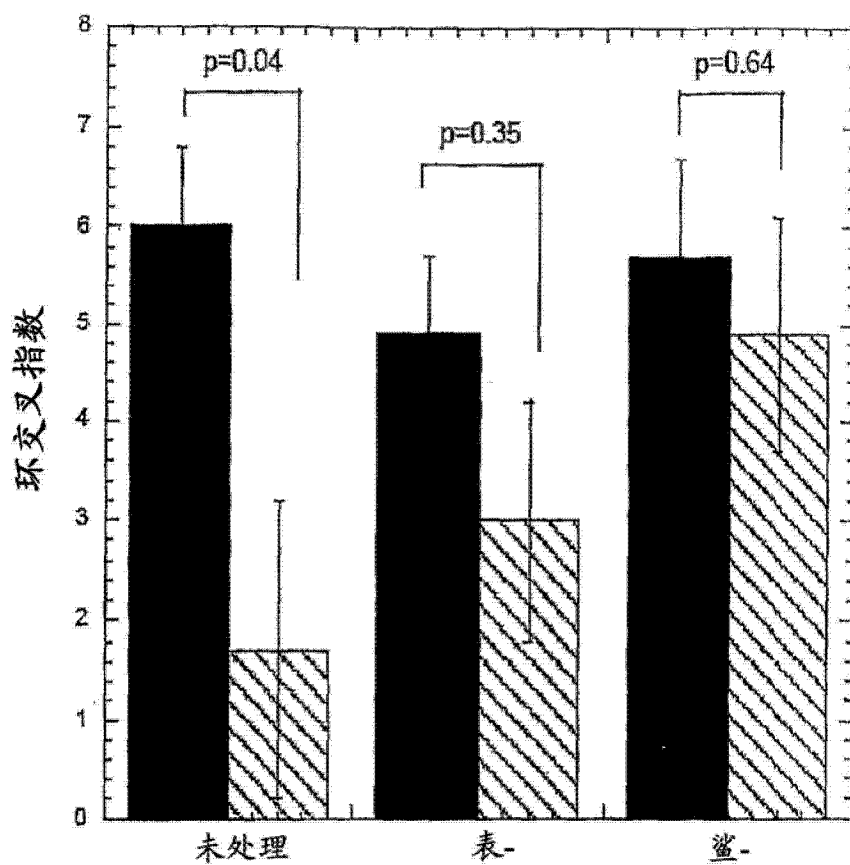


图 1E

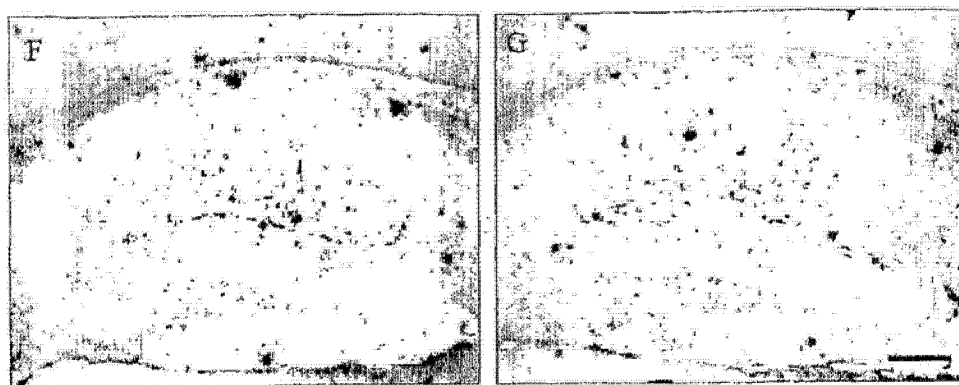


图 1F, G

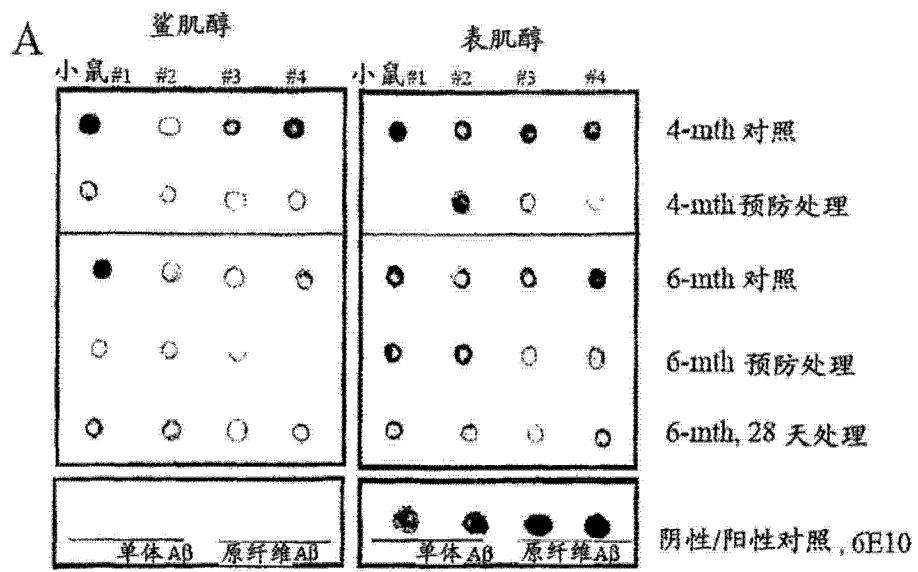


图 2A

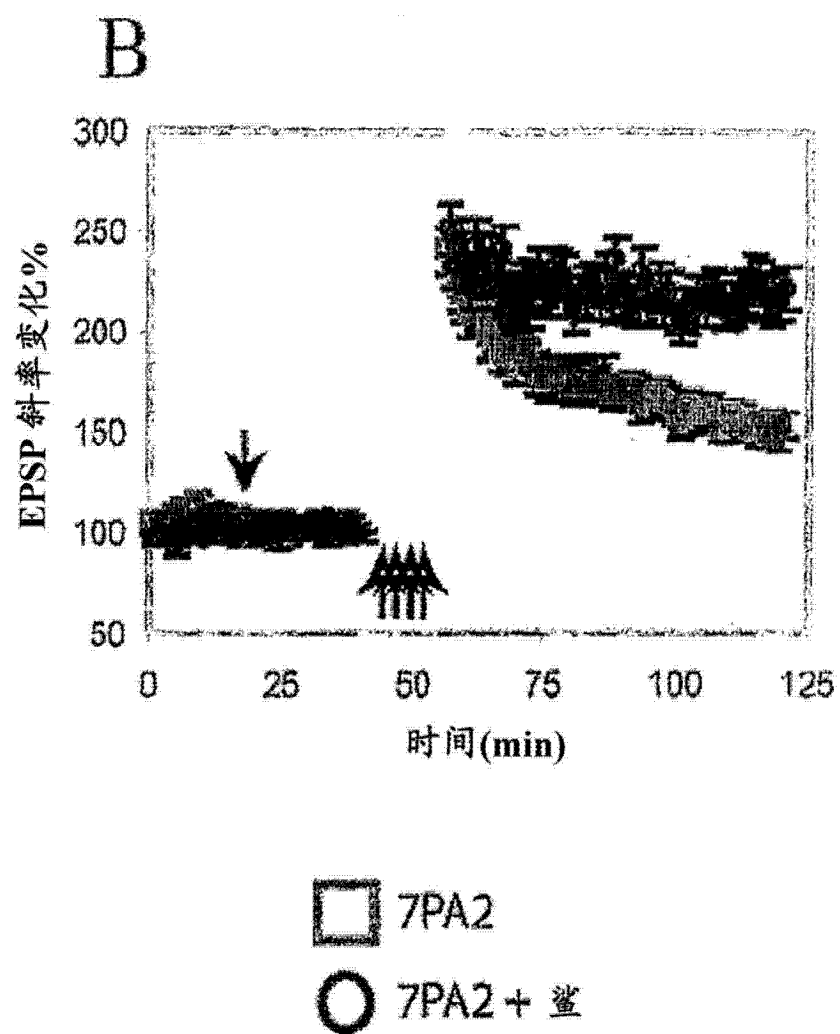


图 2B

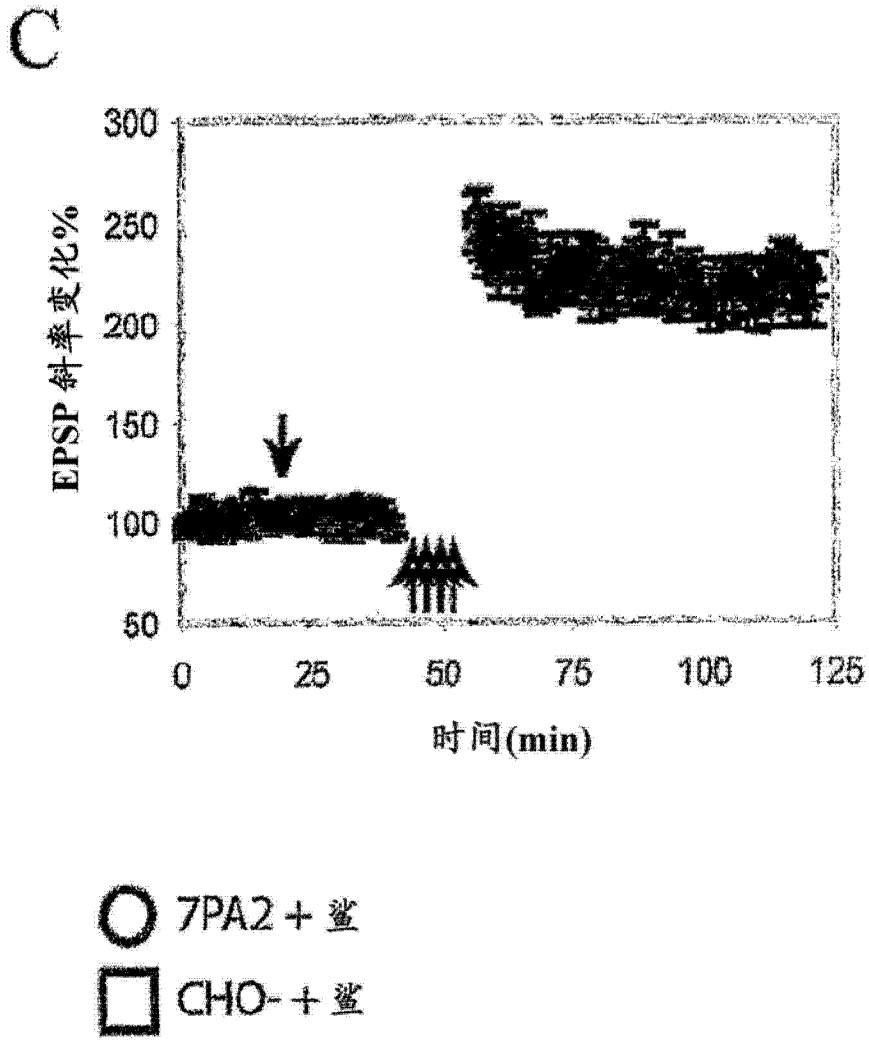


图 2C

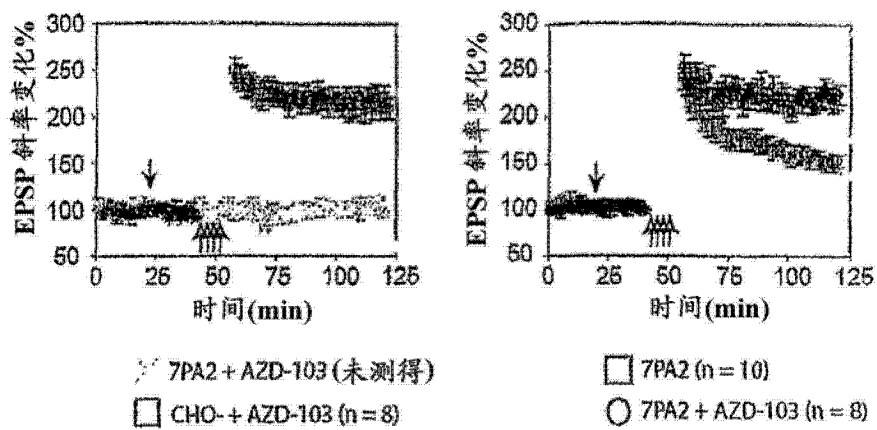


图 3A

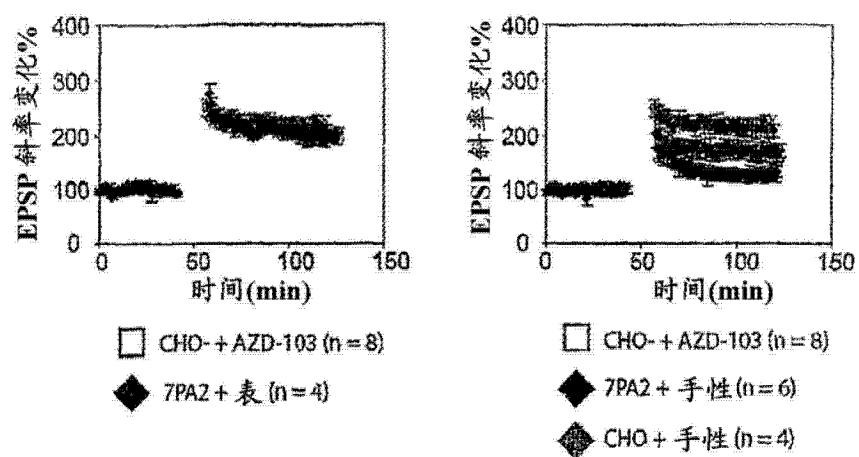


图 3B

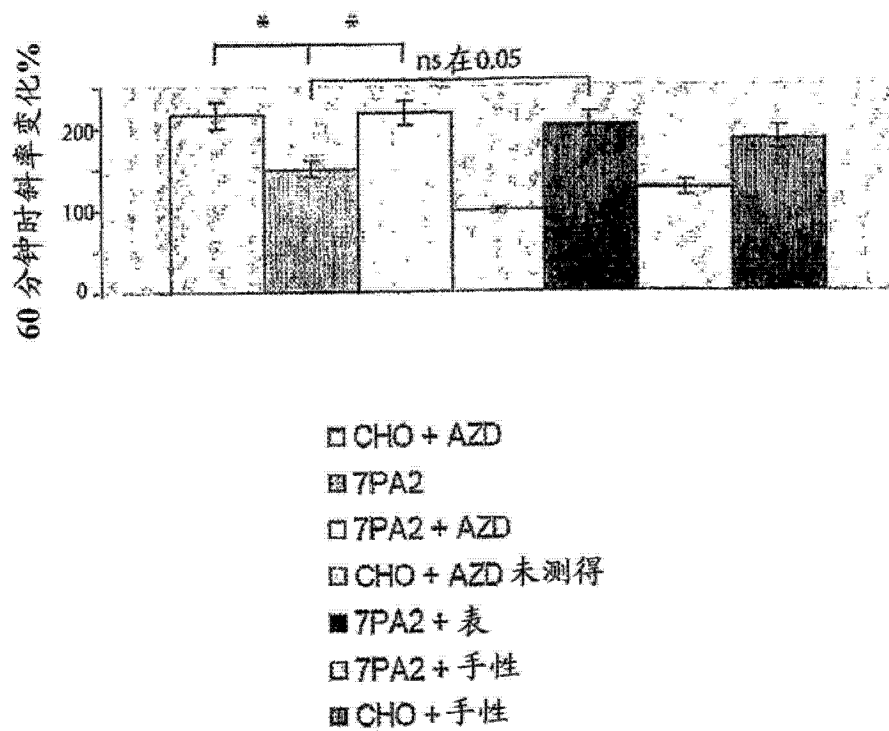


图 3C

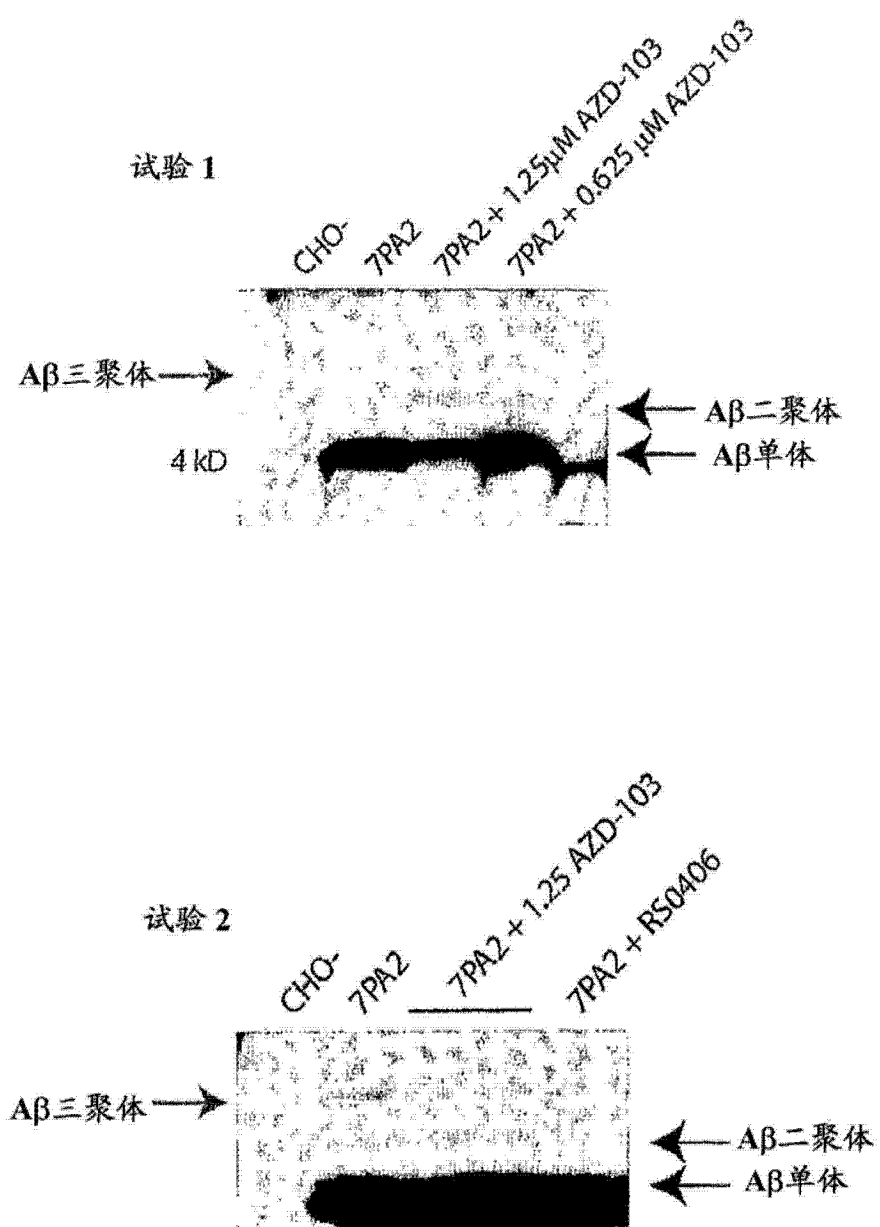


图 4

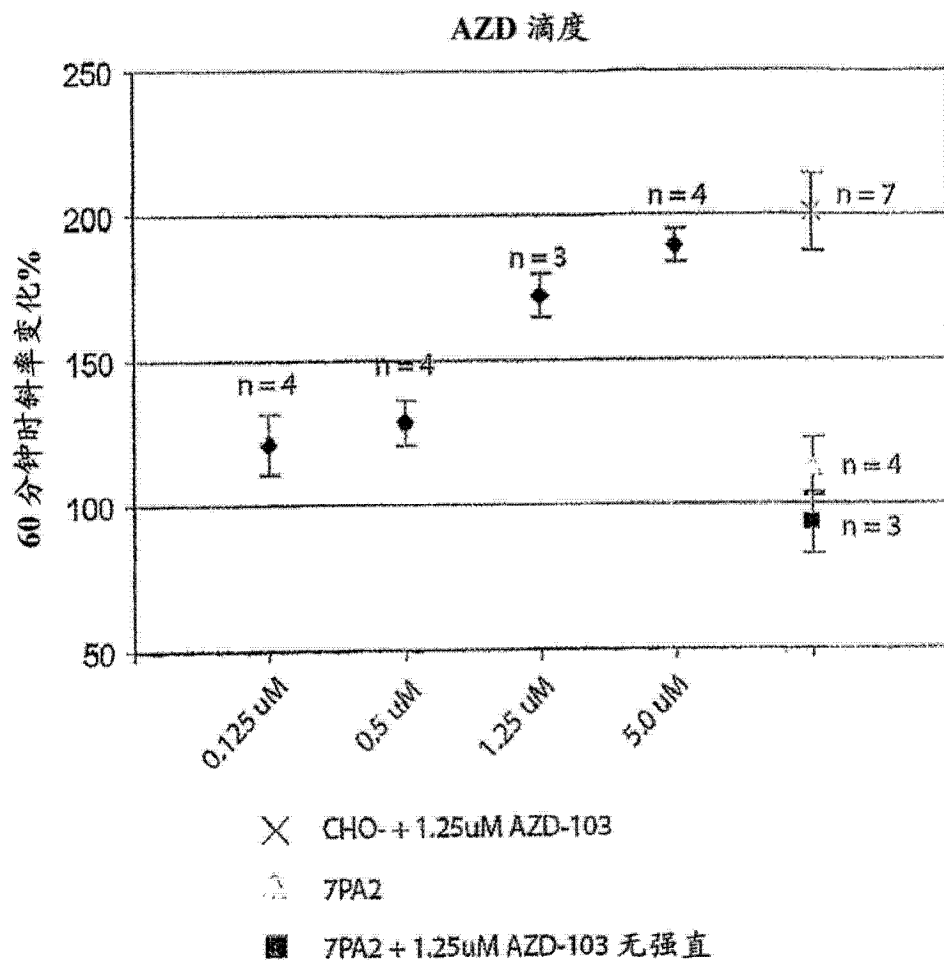


图 5

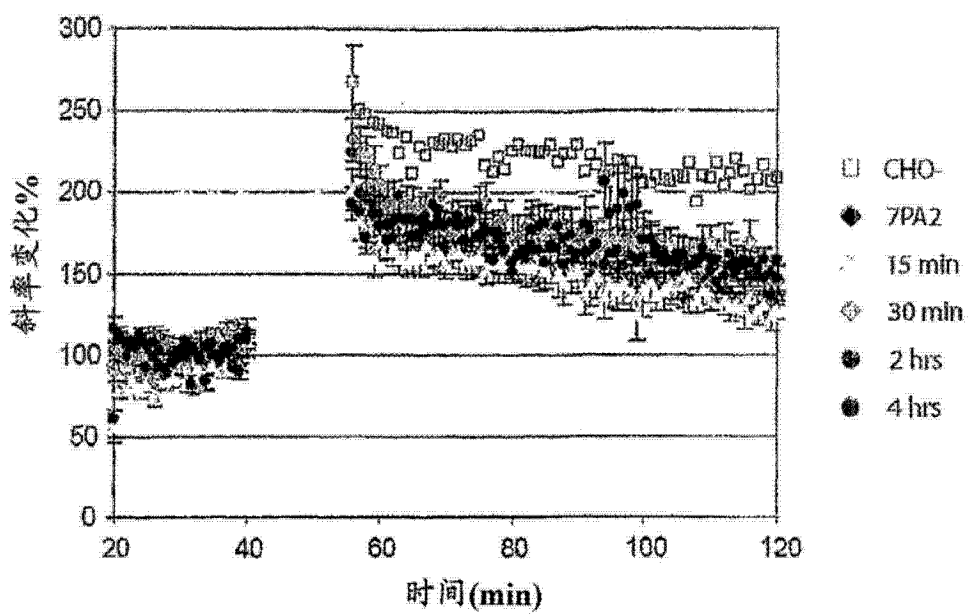


图 6A

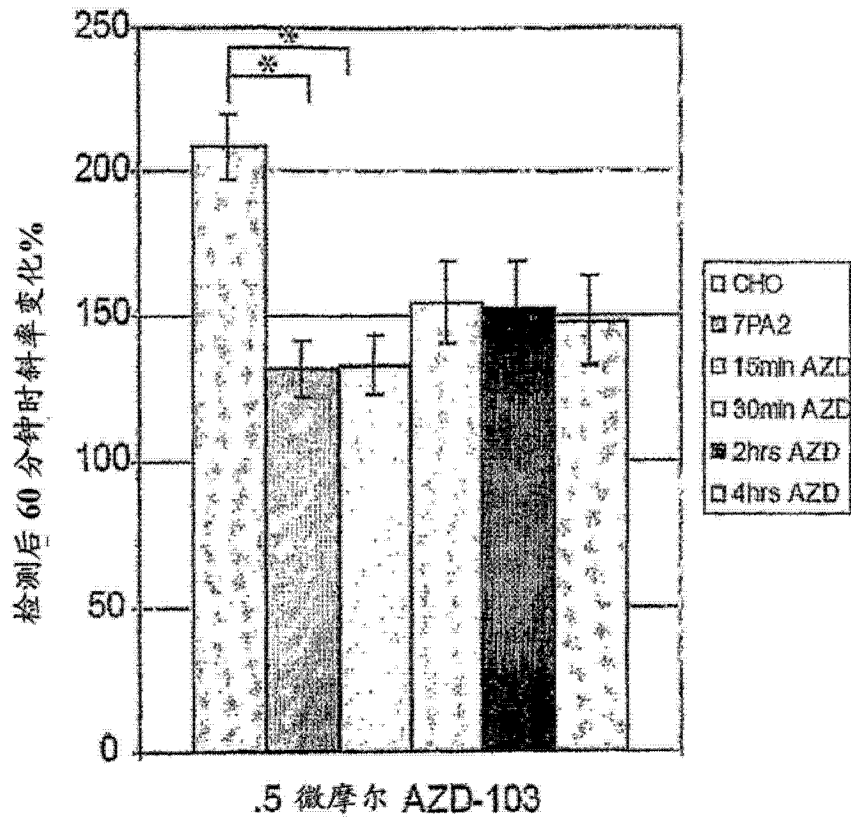


图 6B

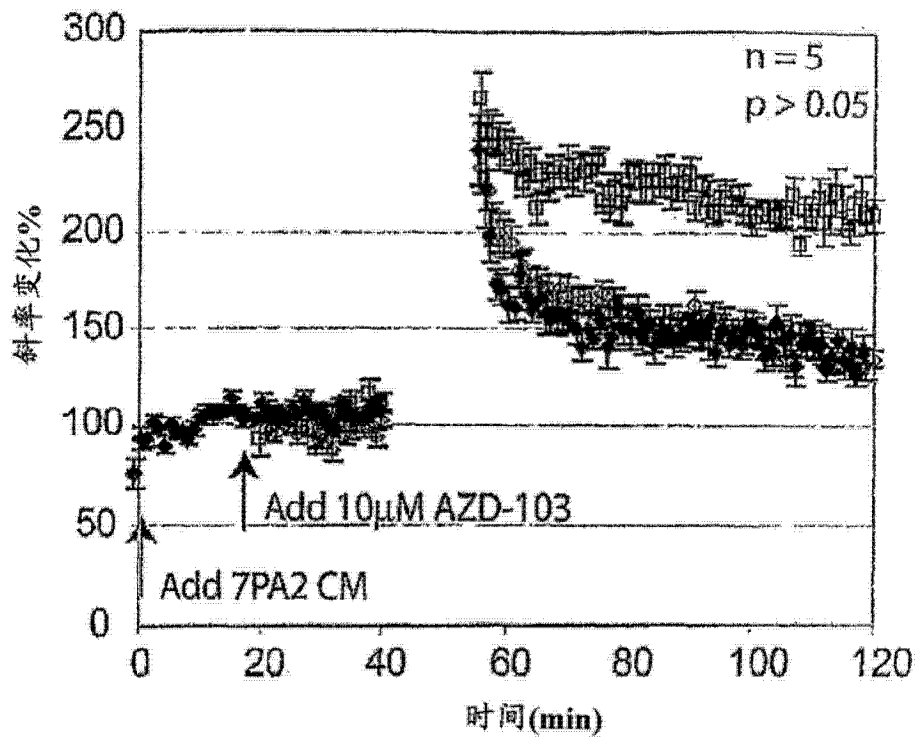


图 6C

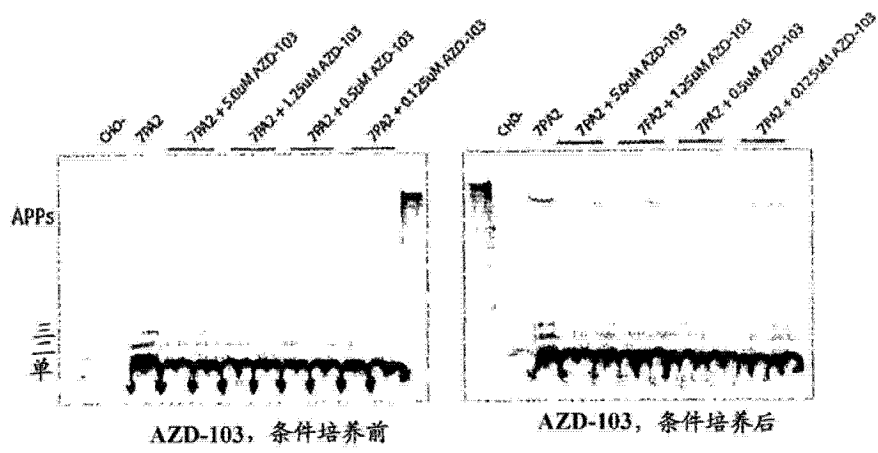


图 7A

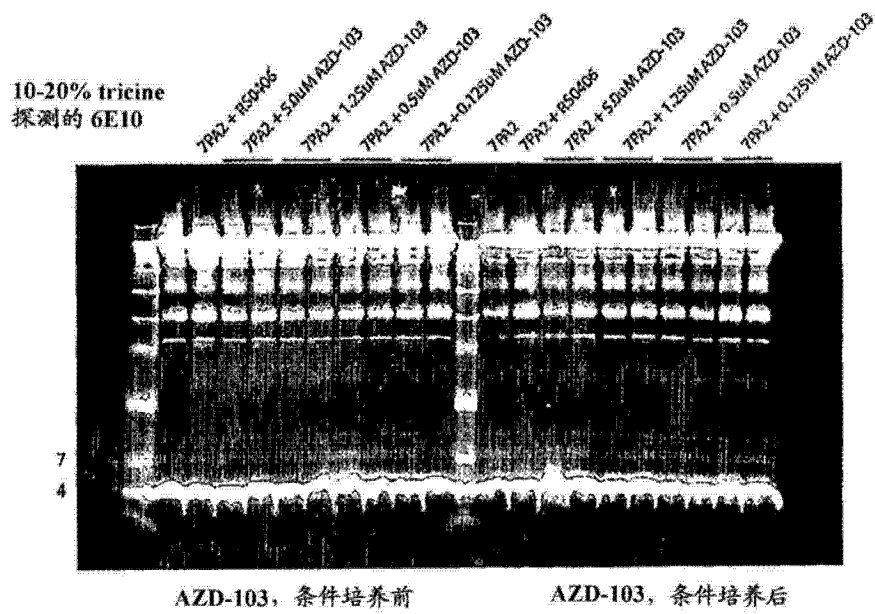


图 7B

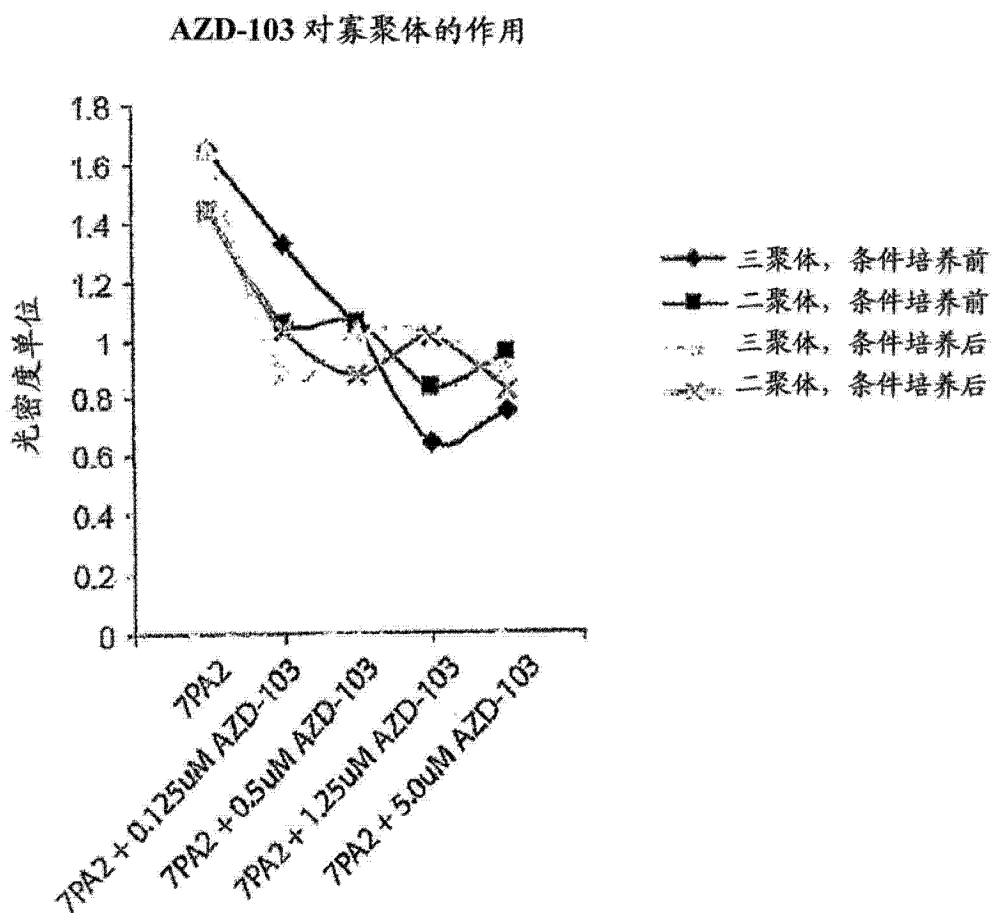


图 7C

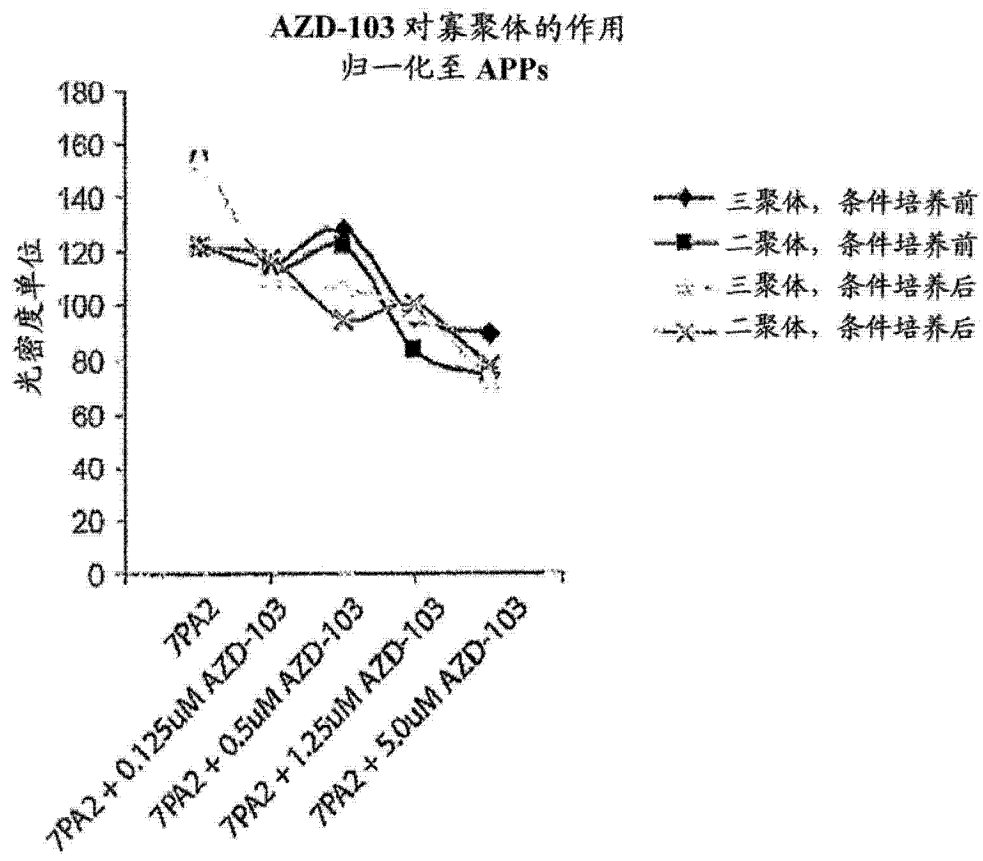


图 7D

AZD-103 对寡聚体的作用归一化至单体

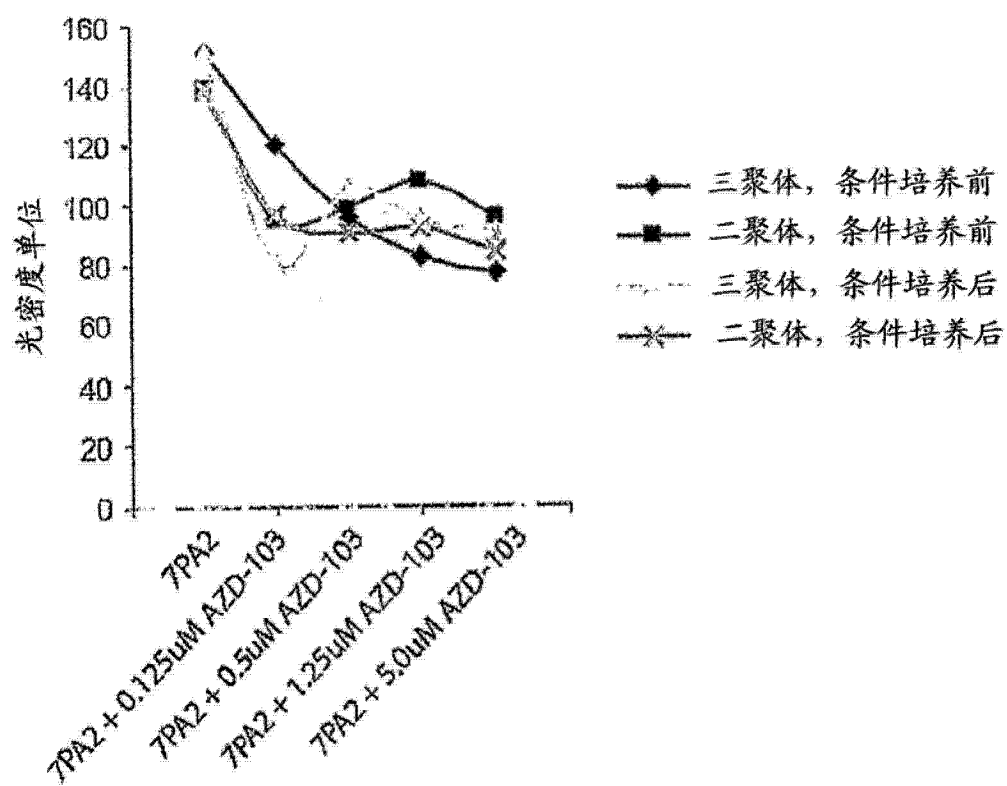


图 7E

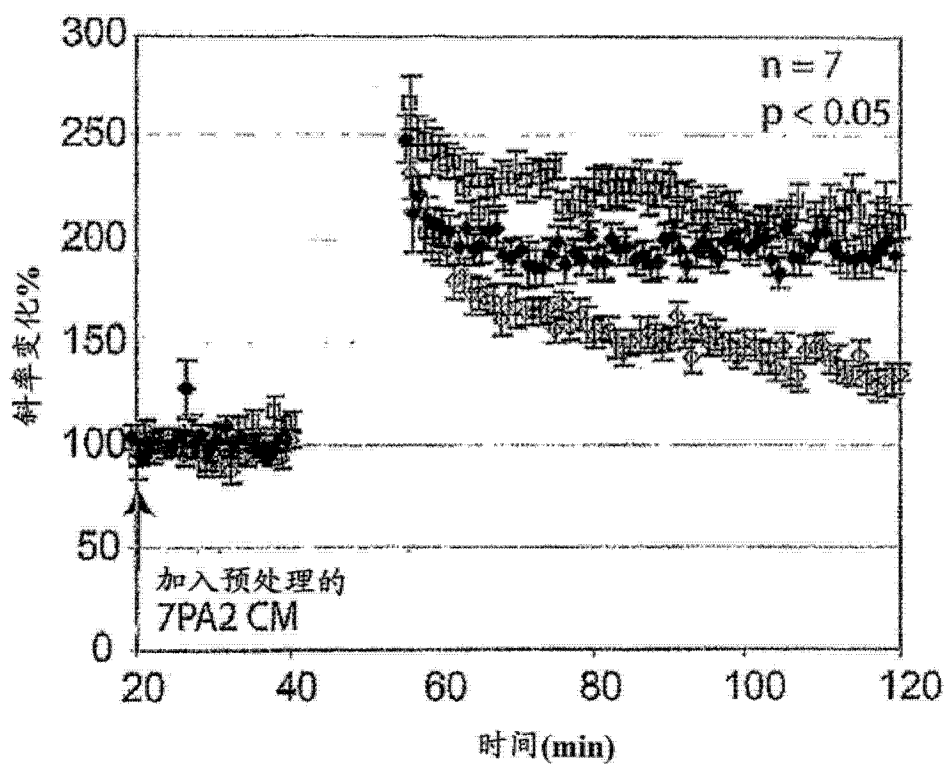


图 8

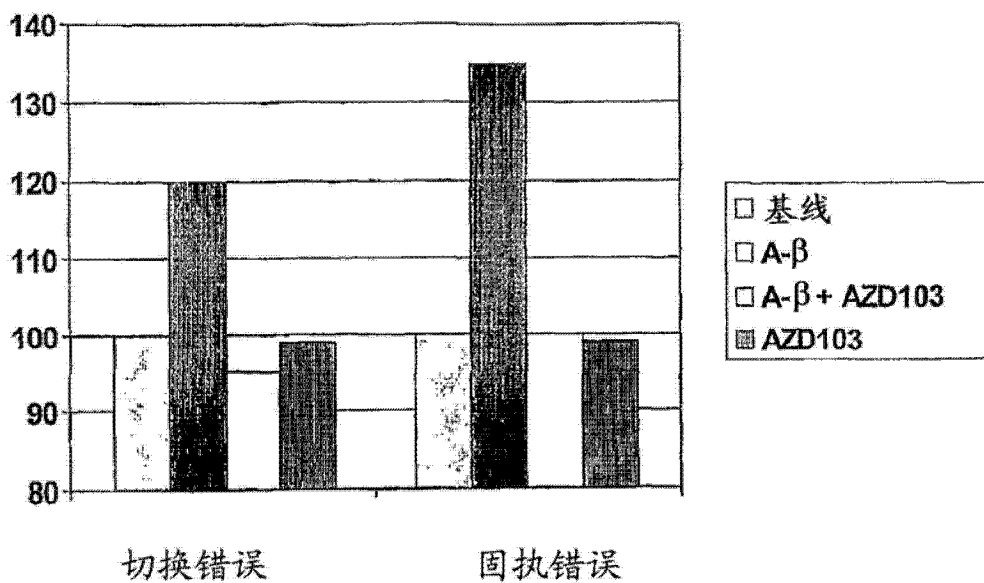


图 9

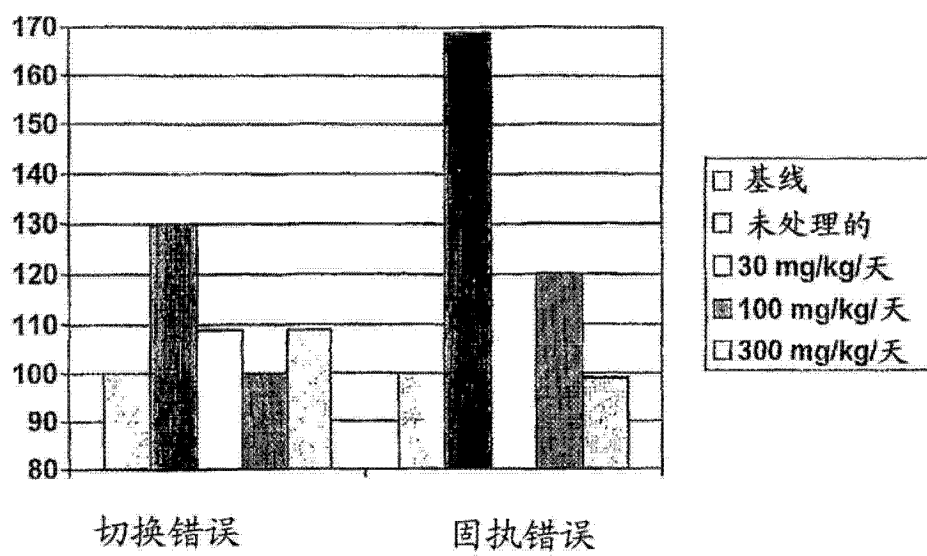


图 10