



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 120239610 A

(43) 申请公布日 2025.07.01

(21) 申请号 202380067388.4

(22) 申请日 2023.09.25

(30) 优先权数据

22197562.6 2022.09.23 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2025.03.20

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2023/076387 2023.09.25

(87) PCT国际申请的公布数据

W02024/062135 EN 2024.03.28

(71) 申请人 导博药物公司

地址 意大利

(72) 发明人 马尔塞洛·阿莱格雷蒂

安德烈亚·阿拉米尼

劳拉·布兰多利尼

弗兰卡·卡塔尼

弗拉维奥·曼泰利

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

专利代理师 张珊珊 王莉

(51) Int. Cl.

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 21/02 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 47/02 (2006.01)

权利要求书1页 说明书11页

序列表(电子公布) 附图8页

(54) 发明名称

用于治疗痉挛的NGF

(57) 摘要

本发明涉及神经生长因子(NGF)或其突变蛋白,所述神经生长因子(NGF)或其突变蛋白用于在对象中预防或治疗痉挛,其中优选地,所述NGF或突变蛋白鼻内施用于所述对象。

1. 神经生长因子 (NGF) 或其突变蛋白, 所述突变蛋白具有 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列, 所述神经生长因子 (NGF) 或其突变蛋白用于在对象中预防或治疗痉挛, 其中所述 NGF 或突变蛋白鼻内施用于所述对象。

2. 根据权利要求 1 所述应用的 NGF 或突变蛋白, 其中所述痉挛是由选自以下的病症引起的: 脑性瘫痪、卒中、创伤性脑损伤、肌萎缩侧索硬化、原发性侧索硬化、多发性硬化 (MS) 和遗传性痉挛性截瘫 (HSP)。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述应用的 NGF 或突变蛋白, 其中所述 NGF 是人 NGF, 更优选地, 所述 NGF 是重组人 NGF。

4. 根据权利要求 3 所述应用的 NGF 或突变蛋白, 其中所述人 NGF 具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列。

5. 根据权利要求 1 至 4 所述应用的 NGF 或突变蛋白, 其中所述 NGF 或突变蛋白每天一至三次施用, 持续 7 至 300 天、优选 60 至 240 天、更优选 100 至 200 天的治疗期。

6. 根据权利要求 1 至 5 所述应用的 NGF 或突变蛋白, 其中 NGF 或突变蛋白每次施用的量为 5 μ g 至 1mg, 更优选 10 μ g 至 400 μ g, 甚至更优选 15 μ g 至 200 μ g。

7. 用于鼻内施用的药物组合物, 所述药物组合物包含 NGF 或其突变蛋白以及至少一种可药用赋形剂, 所述突变蛋白具有 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列, 所述药物组合物用于在对象中预防或治疗痉挛, 其中所述 NGF 或突变蛋白鼻内施用于所述对象。

8. 根据权利要求 7 所述应用的药物组合物, 其中所述痉挛是由选自以下的病症引起的: 脑性瘫痪、卒中、创伤性脑损伤、肌萎缩侧索硬化、原发性侧索硬化、多发性硬化 (MS) 和遗传性痉挛性截瘫 (HSP)。

9. 根据权利要求 7 或 8 所述应用的药物组合物, 其中所述 NGF 或其突变蛋白以 5 μ g/ml 至 1mg/ml、更优选 10 μ g/ml 至 400 μ g/ml、甚至更优选 15 μ g/ml 至 200 μ g/ml 的浓度存在于所述组合物中。

10. 根据权利要求 7 至 9 所述应用的药物组合物, 所述药物组合物包含 NGF 或其突变蛋白、氯化钠、磷酸盐缓冲剂和水, 优选由 NGF 或其突变蛋白、氯化钠、磷酸盐缓冲剂和水组成。

11. 根据权利要求 7 至 10 所述应用的药物组合物, 其中所述 NGF 是人 NGF, 更优选地, 所述 NGF 是重组人 NGF。

12. 根据权利要求 7 所述应用的药物组合物, 其中所述人 NGF 具有 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列。

13. 根据权利要求 1 至 6 所述应用的 NGF 或突变蛋白, 其中对象中的所述痉挛是由卒中或创伤性脑损伤引起的, 并且所述 NGF 或突变蛋白从所述卒中或创伤性脑损伤发生之后 6 至 10 个月、更优选 8 至 10 个月、更优选 9 至 10 个月、甚至更优选 9 个月开始施用于所述对象。

用于治疗痉挛的NGF

技术领域

[0001] 本发明涉及在对象中预防或治疗痉挛。

背景技术

[0002] 痉挛是这样的运动障碍,其特征在于肌张力的速度依赖性提高,伴有由肌牵张反射的过度兴奋引起的超常的肌腱抽搐(J.W.Lance,“Symposium synopsis,” in Spasticity:Disordered Motor Control,R.G.Feldman,R.R.Young,and W.P.Koella, Eds., pp.485-494,1980)。它可由于导致负责控制运动启动和调节的脑区域和神经束(nerve track)的破坏或功能障碍的创伤性损害、慢性神经退行性病症或遗传缺陷而引起。这些包括,例如,脑性瘫痪、卒中、创伤性脑损伤、肌萎缩侧索硬化、原发性侧索硬化、多发性硬化(multiple sclerosis,MS)和遗传性痉挛性截瘫(hereditary spastic paraplegia, HSP)(Mathewson et al,Phys Med Rehabil Clin N Am 2015,26(1):57-67;Khundadze et al,Autophagy 2021,17(11):3690-3706;Chang et al,Crit Rev Phys Rehabil Med 2013,25(1-2):11-22)。

[0003] 痉挛对于患者而言是高度使之无力的病症,因为其影响他们进行基本日常活动的的能力,例如卫生、穿衣、行走和睡眠。在没有治疗的情况下,长期的痉挛会导致疼痛、永久性关节畸形、尿路感染、慢性便秘、周围神经病变和压迫性溃疡。

[0004] 因此,治疗该病症对于提高生活品质和避免严重的医学并发症是必要的。

[0005] 目前可用的治疗选择是有限的,并且旨在仅减轻症状以允许个体在尽可能少的不适和限制下生活而没有大量的副作用。

[0006] 可用的治疗包括全身性药物和介入操作。

[0007] 全身性药物包括中枢作用剂(centrally acting agent),例如巴氯芬(baclofen);抗惊厥剂,例如苯二氮~~革~~类和加巴喷丁(gabapentin);以及外周作用剂(peripherally acting agent)例如丹曲林(dantrolene)。介入操作包括局灶注射肉毒杆菌毒素、苯酚或乙醇,以及插入鞘内巴氯芬泵。

[0008] 遗憾的是,所有可用治疗的特征都在于会超过其可提供的潜在益处的不良作用和风险。全身性药物可能对患有全面性痉挛的患者更好,但会引起许多不期望的作用,例如全身性肌肉松弛、镇静、疲劳,并且在一些情况下,产生耐受性和依赖性。

[0009] 如果患者依从并且操作正确进行,则介入治疗通常涉及较少的全身性副作用。然而,其需要由经适当培训的专业人员进行,因为其在操作性错误的情况下可导致严重的并发症,例如由于药物散布到身体的其他区域而引起的操作性错误。

[0010] 因此,强烈感到需要开发新的有效的、持久的和安全的治疗方法来预防或治疗痉挛。此外,感到需要找到不仅解决该病症的症状而且解决根本病理机制的新的治疗。

发明内容

[0011] 正如将在实验部分中描述的,本发明人已经发现,当鼻内施用NGF时,其以特别高

的浓度递送至患有痉挛的患者中受损的脑区域。

[0012] 本发明人还出乎意料地发现,鼻内施用NGF在恢复这些区域的活动方面是有效的,从而减少痉挛并因此改善患者的运动能力。

[0013] 此外,鼻内施用的NGF对痉挛的效力与诱发痉挛的根本原因的性质无关。事实上,本发明人已经发现,NGF恢复了经机械诱导的脑损伤的动物模型(TBI模型)以及相关神经元的生理病理性损伤的动物模型(化学遗传模型)二者中的运动活动。

[0014] 因此基于所获得的数据,与迄今为止可用的可用治疗选择相反,NGF能够减少受痉挛影响的患者的症状,并且至少部分地逆转与其相关的运动受损。

[0015] 因此,本发明的目的是NGF或其突变蛋白,所述NGF或其突变蛋白用于在对象中预防或治疗痉挛。

附图说明

[0016] 图1示出了在24小时内通过ELISA测量的在鼻内施用之后大鼠脑区域中的NGF生物分布,如在实施例1中所述。结果表示为在施用之后在大鼠脑中24小时内吸收的总量的百分比。

[0017] 图2示出了通过鼻内施用而用载剂(分别为ChAT关闭(ChAT off)和假手术(sham))或用rhNGF(分别为ChAT关闭+NGF和假手术+NGF)处理的胆碱能神经元被化学遗传地阻断(ChAT关闭)的大鼠或假手术大鼠(假手术)中的“转棒潜伏期时间(rotarod time latency)”(%vs假手术动物),如在实施例2中所述。

[0018] 图3示出了通过鼻内施用而用载剂(分别为TBI或假手术)或用rhNGF(分别为TBI+NGF和假手术+NGF)处理的患有创伤性脑损伤或通过假手术的小鼠中的“转棒潜伏期时间”(%vs假手术动物),如在实施例3中所述。

[0019] 图4示出了通过鼻内施用而用载剂(TBI/Veh)处理或者在TBI之后第1天(TBI/rhNGF d1)或第7天(TBI/rhNGF d7)开始用rhNGF处理的假手术小鼠(假手术)或患有创伤性脑损伤的小鼠从杆转向(图A)和下降(图B)所需的时间,以秒表示,如在实施例4中所述。相对于假手术,§P<0.05,§§P<0.01,§§§P<0.001以及§§§§P<0.0001,以及相对于TBI/载剂,*P<0.05,**P<0.01,****P<0.0001。数据表示为平均值±SEM(n=20/组)。

[0020] 图5示出了对通过鼻内施用而用载剂(TBI/Veh)处理或者在TBI之后第1天(TBI/rhNGF d1)或第7天(TBI/rhNGF d7)开始用rhNGF处理的假手术小鼠(假手术)或患有创伤性脑损伤的小鼠进行的旷场测试的结果,如在实施例4中所述。具体地,图A示出了代表性轨迹图;图B示出了行进的平均距离,以cm表示;图C示出了行进速度,以cm/秒表示。相对于假手术,§§P<0.01,§§§P<0.001以及§§§§P<0.0001,相对于TBI/载剂,**P<0.01,***P<0.001以及****P<0.0001。数据表示为平均值±SEM(n=20/组)。

[0021] 图6示出了在通过鼻内施用而用载剂(TBI/Veh)处理或者在TBI之后第1天(TBI/rhNGF d1)或第7天(TBI/rhNGF d7)开始用rhNGF处理的假手术小鼠(假手术)或患有创伤性脑损伤的小鼠中测量的机械性异常性疼痛,以爪退缩响应(g)表示,如在实施例4中所述。相对于假手术,§§P<0.01,§§§P<0.001以及§§§§P<0.0001,相对于TBI/载剂,*P<0.05,**P<0.01以及****P<0.0001。数据表示为平均值±SEM(n=20/组)。

[0022] 图7示出了对通过鼻内施用而用载剂(TBI/Veh)处理或者在TBI之后第1天(TBI/

rhNGF d1)或第7天(TBI/rhNGF d7)开始用rhNGF处理的假手术小鼠(假手术)或患有创伤性脑损伤的小鼠进行的足迹测试的结果,如在实施例4中所述。具体地,图A示出了足迹记录和足迹分析中测量的参数,其中虚线表示行走的前进方向(direction of progression, DoP):竖直的黑色箭头指示步幅长度分析,水平的黑色箭头指示摇摆长度,以及倾斜的黑色箭头指示重叠(overlap);图B为步幅长度,以cm测量;图C示出了摇摆长度,以cm测量;图D示出了重叠,以cm测量。相对于假手术, $P < 0.05$, $SSP < 0.01$, $SSSP < 0.001$ 以及 $SSSSP < 0.0001$,相对于TBI/载体, $P < 0.05$, $**P < 0.01$ 以及 $****P < 0.0001$ 。数据表示为平均值 \pm SEM(n=10/组)。

[0023] 图8示出了通过间歇性鼻内施用而用载体(TBI/Veh)处理或者从TBI之后第7天(TBI/rhNGF d7)起用rhNGF处理的假手术小鼠(假手术)或患有创伤性脑损伤的小鼠从杆下降所需的时间,以秒表示,如在实施例5中所述。

具体实施方式

[0024] 本发明的第一个目的是神经生长因子(nerve growth factor,NGF)或其突变蛋白,该神经生长因子(NGF)或其突变蛋白用于在对象中预防或治疗痉挛。

[0025] 优选地,所述NGF或突变蛋白鼻内施用于所述对象。

[0026] 优选地,所述痉挛是由选自以下的病症引起的痉挛:脑性瘫痪、卒中、创伤性脑损伤、肌萎缩侧索硬化、原发性侧索硬化、多发性硬化(MS)和遗传性痉挛性截瘫(HSP)。

[0027] 本文中使用的术语“治疗”和“预防”分别是指病症或与其相关的一种或更多种症状的根除/改善或者预防/延迟发作。

[0028] 优选地,所述对象是人对象。

[0029] 根据一个实施方案,所述对象已被诊断为患有由选自以下的病症引起的痉挛:脑性瘫痪、卒中、创伤性脑损伤、肌萎缩侧索硬化、原发性侧索硬化、多发性硬化(MS)和遗传性痉挛性截瘫(HSP),并且所述NGF或其突变蛋白用于在所述对象中治疗所述痉挛,优选通过鼻内施用于所述对象来进行。

[0030] 根据一个替代实施方案,所述对象已被鉴定为处于发生由选自以下的病症引起的痉挛的风险中:脑性瘫痪、卒中、创伤性脑损伤、肌萎缩侧索硬化、原发性侧索硬化、多发性硬化(MS)和遗传性痉挛性截瘫(HSP),并且所述NGF或其突变蛋白用于在所述痉挛发生之前在所述对象中预防所述痉挛,优选通过鼻内施用于所述对象来进行。

[0031] 优选地,所述NGF是人NGF。

[0032] 优选地,所述人NGF具有以下SEQ ID NO:1的氨基酸序列:

SEQ. ID NO:1:

SSSHPIFHRGEFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQYFFETKC
RDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTM DGKQA AWR FIRIDTACVCVLSRK
AVR

[0033] 或者,所述人NGF具有以下SEQ ID NO:2的氨基酸序列:

SEQ ID NO:2:

SSSHPIFHRGEFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQYFFETKC
RDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTM DGKQA AWR FIRIDTACVCVLSRK
AVRRA

[0034] 或者,所述人NGF是具有SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2序列的NGF的混合物。

[0035] SEQ ID NO:2的人NGF的氨基酸序列与SEQ ID NO:1的NGF的区别仅在于在C端处存在两个另外的氨基酸。两种形式的NGF都存在于人细胞中,并因此被认为是野生型人NGF。

[0036] 因此,当在本申请中提及“人NGF”或“野生型人NGF”时,其意指SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的人NGF。

[0037] 在两种形式的野生型NGF中,SEQ ID NO:1的人NGF是特别优选的。事实上,本发明人已经发现,与SEQ ID NO:2的NGF相比,这种特定形式的NGF具有特别有利的生物活性,显示出对神经元细胞更高的神经保护活性。

[0038] 优选地,所述NGF通过重组DNA技术产生,优选地,其是人重组NGF(rhNGF)。产生rhNGF的方法是本领域技术人员已知的,例如在W00022119A1和W02013092776A1中描述的那些。

[0039] 优选地,所述NGF的纯度高于70%,更优选高于80%、高于90%、高于95%、高于98%或高于99%。NGF的纯度可通过本领域技术人员已知的常规方法来确定,例如通过HPLC分析来确定。

[0040] 术语“NGF的突变蛋白”是指NGF的生物活性突变蛋白,意指这样的NGF蛋白:其具有带有一个或更多个氨基酸突变(优选替换)的氨基酸序列,使得野生型NGF的治疗活性得以保持。

[0041] 优选地,所述突变蛋白是如上所限定的野生型人NGF的突变蛋白。

[0042] 根据本发明特别优选使用的是这样的NGF的突变蛋白,其中该突变蛋白的特征在于与野生型人NGF具有超过80%、更优选超过90%、甚至更优选超过95%、并且最优选超过98%的序列同一性。

[0043] 优选地,突变蛋白是野生型人NGF的突变蛋白,其特征在于在野生型人NGF的序列中的至少一个突变,优选第61位的脯氨酸被另一个氨基酸进行的氨基酸替换。在一个特别优选的实施方案中,第61位的脯氨酸被丝氨酸替换。

[0044] 优选地,突变蛋白是人NGF的突变蛋白,其特征在于与降低的伤害感受活性相关的氨基酸序列的至少一个突变。更优选地,所述突变蛋白的特征在于野生型人NGF的第95至101位中任一者的至少一个突变,优选氨基酸替换。甚至更优选地,所述突变蛋白的特征在于野生型人NGF第100位的精氨酸被另一个氨基酸替换。更优选地,野生型人NGF第100位的精氨酸被谷氨酸替换。

[0045] 优选地,突变蛋白是野生型人NGF的突变蛋白,其特征在于至少在第61位的脯氨酸被另一个氨基酸(优选丝氨酸)进行氨基酸替换,并且野生型人NGF的第100位的精氨酸被另一个氨基酸(优选谷氨酸)替换。

[0046] 根据本发明特别优选的突变蛋白具有以下SEQ ID NO:3至6的氨基酸序列:

SEQ ID NO:3:

SSSHPIFHRGEFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQYFFETKC
RDPNPVDSGCRGIDSKHWSYCTTTHTFVKALTM DGKQA AWEFIRIDTACVCVLSRKA
VR

SEQ ID NO:4:

SSSHPIFHRGEFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQYFFETKC
RDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTMDGKQAAWEFIRIDTACVCVLSRKA
VRRRA

SEQ ID NO:5:

SSSHPIFHRGEFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQYFFETKC
RDSNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTMDGKQAAWEFIRIDTACVCVLSRKA
VR

SEQ ID NO:6:

SSSHPIFHRGEFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQYFFETKC
RDSNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTMDGKQAAWEFIRIDTACVCVLSRKA
VRRRA

[0047] 上述突变蛋白对于根据本发明所述应用是特别有利的,因为已描述了它们保持与野生型人NGF相同的生物活性,但与相应的野生型人NGF相比,能够诱导较低的伤害感受敏感性。优选地,所述人NGF的突变蛋白通过重组DNA技术产生。通过重组DNA技术产生根据本发明的rhNGF突变蛋白的方法是本领域技术人员已知的,例如在W02019/207106中描述的那些。

[0048] 优选地,根据本发明所述应用的NGF或突变蛋白在整个治疗期期间每天或每两天/三天施用于对象。

[0049] 优选地,所述治疗期为7至300天,优选60至240天,更优选100至200天。

[0050] 更优选地,根据本发明所述应用的NGF或突变蛋白每天一至三次施用于对象,持续7至300天、优选60至240天、更优选100至200天的治疗期。

[0051] 一个优选的施用方案是连续施用方案,其中所述NGF或突变蛋白根据所述治疗期的相同方案施用。

[0052] 或者,可进行数个治疗周期。据此,一个优选的施用方案是间歇施用方案,其具有两个或更多个周期的与清除期交替的治疗期。

[0053] 本发明人已观察到,出乎意料的是,在由创伤性事件(例如卒中或创伤性脑损伤)诱导的痉挛的情况下,如果一旦痉挛症状完全发生就开始用NGF治疗,则其更有效。

[0054] 因此,当所述神经生长因子(NGF)或其突变蛋白用于在对象中治疗由选自卒中或创伤性脑损伤的病症引起的痉挛时,所述NGF或突变蛋白优选从所述卒中或创伤性脑损伤发生之后6至10个月、更优选8至10个月、更优选9至10个月、甚至更优选9个月开始施用于对象。优选地,在所有上述优选的实施方案中,所述NGF或突变蛋白鼻内施用于所述对象。

[0055] 优选地,当鼻内施用NGF或其突变蛋白时,每次施用的NGF或其突变蛋白的量为5 μ g至1mg,更优选10 μ g至400 μ g,甚至更优选15 μ g至200 μ g。

[0056] 在每次施用中使用的所述NGF或突变蛋白的有效量、治疗的持续时间和每天的施用次数由技术人员基于待治疗对象的特征、痉挛的严重程度以及基于在治疗期间进行的评估测试来选择。

[0057] 本发明的另一个目的涉及用于鼻内施用的药物组合物,其包含如上所述的NGF或突变蛋白以及适于鼻内使用的至少一种可药用赋形剂。

[0058] 优选地,本发明的用于鼻内施用的药物组合物是液体鼻内组合物。

[0059] 优选地,根据本发明的药物组合物包含有效量的如上所述的NGF或突变蛋白以及适于鼻内使用的至少一种可药用赋形剂,所述可药用赋形剂优选地选自溶剂、增稠剂、黏膜黏附剂、缓冲剂、抗氧化剂、防腐剂 and 渗透增强剂。

[0060] 优选地,根据本发明的液体鼻内组合物中所述NGF或突变蛋白的浓度为5 μ g/ml至1mg/ml,更优选10 μ g/ml至400 μ g/ml,甚至更优选15 μ g/ml至200 μ g/ml。

[0061] 优选地,所述溶剂是水。

[0062] 优选地,所述黏膜黏附剂是甘油,更优选地,其浓度为0.05%w/v至0.2%w/v,更优选0.1%w/v。

[0063] 优选地,所述抗氧化剂是甲硫氨酸,更优选地,其浓度为0.005mg/ml至0.02mg/ml,更优选0.01mg/ml。

[0064] 优选地,所述表面活性剂是Kolliphor P188,更优选地,其浓度为0.05%w/v至0.2%w/v,更优选0.1%w/v。

[0065] 优选地,所述缓冲剂是磷酸盐缓冲剂。

[0066] 优选地,所述渗透增强剂是正十二烷基- β -D-麦芽糖苷,更优选地,其浓度为0.1%w/v至1%w/v,更优选0.5%w/v。

[0067] 根据本发明的一种特别优选的液体鼻内组合物包含所述NGF或突变蛋白、氯化钠、磷酸盐缓冲剂和水,优选由所述NGF或突变蛋白、氯化钠、磷酸盐缓冲剂和水组成。

[0068] 根据本发明的另一种特别优选的液体鼻内组合物包含如上所述的所述NGF或突变蛋白、氯化钠、磷酸盐缓冲剂、Kolliphor P188、L-甲硫氨酸和水,优选由如上所述的所述NGF或突变蛋白、氯化钠、磷酸盐缓冲剂、Kolliphor P188、L-甲硫氨酸和水组成。

[0069] 根据本发明的另一种特别优选的液体鼻内组合物包含所述NGF或突变蛋白、氯化钠、磷酸盐缓冲剂、Kolliphor P188、L-甲硫氨酸、甘油、正十二烷基- β -D-麦芽糖苷和水,优选由所述NGF或突变蛋白、氯化钠、磷酸盐缓冲剂、Kolliphor P188、L-甲硫氨酸、甘油、正十二烷基- β -D-麦芽糖苷和水组成。

[0070] 优选地,根据本发明的液体鼻内组合物包含以下组分,优选由以下组分组成:

-NGF或其突变蛋白,如上所述,优选浓度为0.3至2mg/ml,更优选0.5至1.5mg/ml,

-NaH₂PO₄*H₂O,优选浓度为5至8mg/ml,更优选6.9mg/mL,

-NaCl,优选浓度为5至6.5mg/ml,更优选5.84mg/mL,

-Kolliphor P188,优选浓度为0.05%w/v至0.2%w/v,更优选0.1%w/v,

-L-甲硫氨酸,优选浓度为0.05mg/ml至0.2mg/ml,更优选0.1mg/ml,

-任选的,正十二烷基- β -D-麦芽糖苷和/或甘油,优选地所述正十二烷基- β -D-麦芽糖苷的浓度为0.1%w/v至1%w/v、更优选0.5%w/v,优选地所述甘油的浓度为0.05%w/v至0.2%w/v、更优选0.1%w/v,

-水。

[0071] 根据本发明的药物组合物可使用本领域已知的合适方法或通过Remington's Pharmaceutical Science (最新版),Mack Publishing Company,Easton Pa中所公开的方法适当地配制。

[0072] 优选地,本发明的药物组合物用于在对象中预防或治疗痉挛,如上所述,其中所述组合物鼻内施用于对象。

[0073] 在另一个方面中,本发明涉及用于在对象中预防或治疗痉挛的方法。优选地,所述方法包括以治疗有效量如上所述向对象鼻内施用NGF或其突变蛋白。

[0074] 优选地,在根据本发明的方法中,所述NGF或突变蛋白如上所述地施用。

[0075] 优选地,在本发明的方法中使用的所述NGF或突变蛋白呈药物组合物的形式,如上所述。

[0076] 本发明将在以下实施例中进一步描述,这些实施例不限制权利要求书中所述的本发明的范围。

实验部分

实施例1

[0077] 评价了单次鼻内施用之后NGF在大鼠脑区域中的生物分布。

[0078] 将含有1.2mg/ml rhNGF的制剂鼻内施用于大鼠一次。

[0079] 在对应于处理之后2小时、4小时、8小时和24小时的不同时间点处死大鼠。

[0080] 收集来自顶叶皮质、下丘脑、丘脑、纹状体、海马、脑干、额叶皮质和内侧隔(medial septum)的样品,以用于通过ELISA进行rhNGF定量确定,并计算累积吸收(2至24小时)。

[0081] 在分析之前,将脑样品通过ultraturrax在冰中均质化,并离心以进行上清液回收。根据供应商提供的说明使用商业ELISA试剂盒(RayBiotech,目录ELH-BNGF)。用于NGF确定的校准曲线范围被确立为20.5至5000pg/mL。

[0082] 如图1所示,NGF吸收在所有脑组织中都是明显的,但该蛋白质特别集中在涉及运动活动的区域,尤其是在下丘脑和丘脑中。

实施例2

[0083] 在代表HSP中观察到的神经元缺陷的大鼠化学遗传模型中评价了NGF在抵抗痉挛及相关的平衡和运动协调丧失中的作用。简言之,通过将Cre依赖性腺相关病毒(AAV-hSynDIO-hM4Di-mCherry)体视学地注射到相关脑区域中来实现胆碱能纹状体神经元的选择性阻断,并且通过作用于用来选择性调节胆碱能纹状体神经元功能的特定启动子的氯氮平-N-氧化物(clozapine-N-oxide,CNO)处理来实现神经元失活,如Aldrin-Kirk et al, Neurobiology of Disease 2018(109),第148至162页中所述。

[0084] 在本实验中,通过转棒测试来评价胆碱能神经元在运动功能障碍的发生中的选择性促成作用。另外,表明了通过鼻内施用rhNGF(50µg/kg,持续3天)可促进皮质-纹状体连接恢复的功能相关性。

[0085] 如图2所示,胆碱能神经元的阻断(ChAT关闭)使转棒潜伏期时间降低至对假手术动物测量的转棒潜伏期时间的约50%。用NGF(ChAT关闭+NGF)的处理使运动平衡恢复到对假手术动物测量的运动平衡的约75%。在用NGF处理的假手术动物(假手术+NGF)中没有观察到相关的活动性变化。在末次处理之后24小时进行测量。

实施例3

[0086] 还在TBI小鼠模型中评价了NGF的作用。动物护理根据意大利(D.L.116/92)和欧洲委员会(European Commission)(O.J.of E.C.L358/118/12/86)关于保护实验动物的规定进行。在实验期间,做出了所有努力以降低动物数目和痛苦二者。

[0087] 将重18至20g的雄性C57BL/6小鼠(Envigo,Italy)用异氟烷轻度麻醉,并以俯卧姿势置于海绵状支持物上。头部没有固定。为了建立TBI,使120g的重物从25cm的高度落在小

鼠颅骨上,以在脑中诱导能够建立严重运动功能障碍的一致的损伤。使假手术小鼠经受与对于TBI小鼠所述的相同的操作,但不释放重物。

[0088] 目视观察小鼠的肢体的痉挛症状的体征,例如阵挛(重复肌肉抽搐)、长期痉挛(spasm)、颤搐(快速的非自主性收缩)和反射亢进。

[0089] 当痉挛症状充分建立时,开始用NGF进行处理(50 μ g/kg/天,持续3天)。

[0090] 通过转棒测试,以对运动协调受损的改善来评价NGF减轻痉挛和恢复肌肉功能的能力。测试包括两个在旋转圆柱体上行走的环节(session),间隔有1小时的暂停。在30秒的适应之后,转速从3rpm逐渐提高至30rpm,最大测试持续时间为5分钟。记录掉落的潜伏期(秒),并将最终数据表示为相比于假手术的潜伏期时间百分比。如图3中报道的,TBI的诱导(TBI)使转棒潜伏期时间降低至假手术动物的转棒潜伏期时间的约60%。采用NGF的处理(TBI+NGF)能够使运动平衡恢复到假手术动物的运动平衡的约80%。在假手术动物的处理(假手术+NGF)中没有观察到NGF本身的作用。在末次处理之后24小时进行测量。

实施例4

[0091] 在开始实验之前,将重18至20g的雄性C57BL/6小鼠(Envigo,Italy)在受控照明(12小时光/暗循环;上午6:00光照)和标准环境条件(环境温度20至22 $^{\circ}$ C,湿度55%至60%)下以每笼三只饲养至少1周。小鼠饲料和自来水是可随意获得的。动物护理根据意大利(D.L.116/92)和欧洲委员会(O.J.of E.C.L358/1 18/12/86)关于保护实验动物的规定进行。在实验期间,做出了所有努力以降低动物数目和痛苦二者。

[0092] 根据以下方案通过Marmarou的重物坠落模型诱导严重的TBI,其通常与痉挛症状相关。

[0093] 将小鼠用异氟烷轻度麻醉,并以俯卧姿势置于海绵状支持物上。头部没有固定。在中线纵向切开之后,使颅骨暴露以定位撞击区域,并将其置于金属管装置下,其中开口正好位于动物头部上方。基于Khalin和同事的方法(Khalin I et al.,(2016),Neural Regen Res 11(4):630-635.),通过使圆柱形金属重物(250g)经由竖直金属导管从2cm的高度掉落来诱导损伤。撞击点在前冠状缝(前囟(Bregma))与后冠状缝(后囟(Lambda))之间。损伤之后立即用手术创口夹(surgical wound clip)闭合皮肤,并将小鼠放回其笼中,以使其从麻醉中恢复。使假手术小鼠经受与对于TBI所述的相同的操作,但不释放重物。

[0094] 目视观察小鼠的痉挛症状的体征,例如阵挛(重复肌肉抽搐)、长期痉挛(spasm)、颤搐(快速的非自主性收缩)和反射亢进。小鼠从损伤之后24至48小时起开始表现出痉挛性肌张力过高。

[0095] 每天用载剂或用rhNGF(在TBI之后的第1天或第7天开始直至第28天,通过鼻内途径每天一次施用)处理小鼠。

[0096] 具体地,将动物分为以下组:

-假手术(n=20),

-TBI+载剂:每天用20 μ l载剂处理(TBI/载剂;n=20),

-TBI+rhNGF:于TBI之后1天开始,每天用rhNGF以50 μ g/Kg进行处理(TBI/rhNGF d1;n=20),

-TBI+rhNGF:于TBI之后7天开始,每天用rhNGF以50 μ g/Kg进行处理(TBI/rhNGF d7;n=20),

[0097] 如下进行载剂或rhNGF的施用。使用优势手(dominant hand),将10 μ l化合物或载剂引入微量移液器P20。将填充的移液器的尖端以45度角置于小鼠的左鼻孔附近。将液滴放置得离小鼠的鼻孔足够近,以便小鼠可吸入液滴。在小鼠吸入该小滴之后,立即推出移液器尖端中的剩余液体以形成另一小液滴,以用于小鼠在约2至3秒后通过同一鼻孔吸入。在施用之后,使小鼠以该姿势保持15秒。

[0098] 如下所述,进行不同的行为测试,以评估在TBI诱导之后不同时间点的运动和移动受损。

[0099] 使用GraphPad Prism 8.04版(GraphPad软件)分析数据。将来自行为实验的数据表示为平均值 \pm SEM。使用双因素ANOVA及随后的Tukey事后检验以分析组间差异,使用处理(药物或载剂)和测试时间(TBI之后1、3、7、14、21和28天)作为分析中的因素。

-爬杆测试

[0100] 在测试中使用了置于笼中并用胶带覆盖以产生粗糙表面的50cm竖直钢杆。将动物头朝上置于杆的顶部。测量向下取向的时间和下降的总时间。

[0101] 结果在图4a和4b中示出。可以看出,与假手术相比,TBI/载剂小鼠需要更多的时间来转向,并且需要更少的时间来从杆下降。

[0102] 在TBI之后1天或7天施用的鼻内rhNGF(50 μ g/Kg)二者都以时间依赖性方式显著改善了爬杆测试表现,其中对下降的时间的作用更显著。

[0103] 出乎意料的是,当在第7天开始处理时,其与在第1天的早期处理相比产生了更大的改善,使下降的时间(这是评估与痉挛相关的运动活动受损的最重要的参数)完全正常化。鉴于普遍的共识是早期处理应该更有效地阻止TBI的二次损伤和痉挛的建立,因此这是意想不到的。这些数据支持了,如果当痉挛症状完全发生时开始用NGF处理,则其更有效。在小鼠中的该时间点对应于在人对象的情况中在创伤事件之后约6至10个月(Dutta et al, Life Sciences 2016(152),第244至248页)。

-旷场测试

[0104] 旷场测试装置是大的立方体盒子,尺寸为1m长 \times 1m宽 \times 1m高,其中立方体的顶部未被覆盖。将动物置于底部表面的中间,并且当它四处移动并探索其环境时,记录它在数分钟至数小时的过程中的运动。实验完成之后,计算机跟踪程序分析动物随时间的运动。确定行进速度和行进的总距离以作为动物运动受损的量度。

[0105] 与假手术小鼠(4995.9 ± 1066.04 cm和 7.63 ± 1.27 cm/秒)相比,TBI/载剂小鼠显示出行进距离(1504.1 ± 451.32 cm, $p < 0.0001$,在TBI之后第28天)和行进速度(2.5 ± 0.86 cm/秒, $p < 0.0001$,在TBI之后第28天)显著降低(图5A、B和C)。

[0106] 相比之下,与TBI/载剂小鼠相比,TBI/rhNGF d1(在TBI之后第28天,对于行进距离, 3837.75 ± 1161.4 cm, $p < 0.0001$;对于行进速度, 4.79 ± 1.27 cm/秒, $p < 0.0001$)和TBI/rhNGF d7小鼠(在TBI之后第28天,对于行进距离, 4779.05 ± 1479.1 cm, $p < 0.0001$;对于行进速度, 6.19 ± 0.99 cm/秒, $p < 0.0001$)显示出在行走活动方面的显著改善(图5A、B和C)。

[0107] 同样在该测试中,在第7天开始的处理出乎意料地产生了与在第1天的早期处理相比更大的改善,使测试参数恢复到与在假手术动物中观察到的基本上相同的值。

-Von Frey

[0108] 通过使用改编自Chaplan等人(Chaplan et al., (1994), J.Neurosci.Methods

53,55-63)的上下法(up-down method)的修改版本,用一系列经校准的0.002至2g的von Frey尼龙丝(Stoelting,Wood Dale,IL,USA)测量机械性异常性疼痛。

[0109] 在测试中使用的用于机械性异常性疼痛的高架网状平台是大的测试表面(穿孔金属平台),其带有用于动物在行为分析之前适应环境的有机玻璃盒。

[0110] 用于机械性异常性疼痛的手动使用的von Frey丝是尼龙单丝,其提供实际力的近似对数标度和感知强度的线性标度。当给定长度和直径的纤维的尖端以直角压在皮肤上时,只要研究人员继续推进探针直到纤维弯曲,施加的力就会增加。

[0111] 图6中报道的结果表明,与假手术组($1.29 \pm 0.49\text{g}$)相比,在创伤诱导之后7至28天,在TBI/载剂小鼠中观察到爪退缩响应(g)的显著降低($0.26 \pm 0.28\text{g}$, $p < 0.0001$,在TBI之后第28天);令人感兴趣的是,与TBI/载剂动物相比,在TBI/rhNGF d1($0.98 \pm 0.55\text{g}$, $p = 0.0001$)和TBI/rhNGF d7($1.35 \pm 0.49\text{g}$, $p < 0.0001$)中,机械性异常性疼痛显著降低。

-足迹测试

[0112] 足迹装置由跑道构成,跑道通常为50至60cm长,末端处有暗的目标盒(goal-box)。施用药物之后,将小鼠的前爪和后爪涂上不同的颜色(例如,前爪涂上红色,以及后爪涂上绿色)。然后使小鼠在吸墨纸(blottingpaper)上行走。

[0113] TBI/载剂小鼠在步幅长度方面($3.19 \pm 1.15\text{cm}$, $p = 0.069$,在TBI之后第28天)(图7A和B)、摇摆长度方面($1.03 \pm 0.51\text{cm}$, $p < 0.0001$,在TBI之后第28天)(图7A和C)和重叠方面($0.26 \pm 0.18\text{cm}$, $p = 0.001$,在TBI之后第28天)(图7A和D)显示出异常模式。这些步伐顺序不规则性是干扰正常步态进展的痉挛性收缩的结果。

[0114] 在TBI/载剂小鼠中,关节运动出现僵硬,以及在摆动阶段频繁改变轨迹,并且步伐短,以及前爪频繁交叉放置。

[0115] 相比之下,对小鼠在第7天开始的处理(TBI/rhNGF d7)使步态模式完全正常化,并且提高了步幅长度($5.59 \pm 1.58\text{cm}$, $p = 0.0064$,在TBI之后第28天)、摇摆长度($2.76 \pm 0.69\text{cm}$, $p < 0.0001$,在TBI之后第28天)以及改善了重叠($1.05 \pm 0.19\text{cm}$, $p < 0.0001$,在TBI之后第28天)(图7A至D)。

[0116] 出乎意料地,在该测试中,在TBI之后第1天开始用NGF进行早期处理(TBI/rhNGF d)的情况下没有观察到显著改善(图7A至D)。

实施例5

[0117] 为了评估间歇性鼻内施用NGF对由创伤事件诱导的痉挛相关运动受损的效力并探索较长处理期的作用,在另外的实验中使用了在实施例4中描述的同样严重的TBI小鼠模型。

[0118] 用载剂或用在TBI之后第7天开始的通过鼻内途径施用的rhNGF(50ug/Kg)对小鼠进行持续61天的处理,连续三天的间歇处理期与7天的清除期交替进行,直至TBI之后第61天。

[0119] 具体地,将动物分为以下组:

- 假手术:(假手术/Veh;n=20),
- 假手术+NGF:(50ug/Kg)在TBI之后7天开始(假手术/rhNGF;n=20),
- TBI+载剂:(20 μl)(TBI/veh;n=20),
- TBI+rhNGF:(50ug/Kg)在TBI之后7天开始(TBI/rhNGF d7;n=20)。

[0120] 如实施例4中所述进行rhNGF和载剂的鼻内施用。进行与实施例4中所述相同的行为测试。在所有的测试中,用rhNGF的间歇性处理导致了在长至约40天的所有时间点的测试参数的改善。然而,在该时间点之后,观察到该动物模型中与痉挛相关的运动活动受损相对于基础水平自发恢复,并因此结果失去显著性。

[0121] 获得的结果表明,通过间歇性施用进行的rhNGF的长期施用在处理痉挛方面是有效的。

[0122] 图8示出了在爬杆测试中获得的代表性结果。

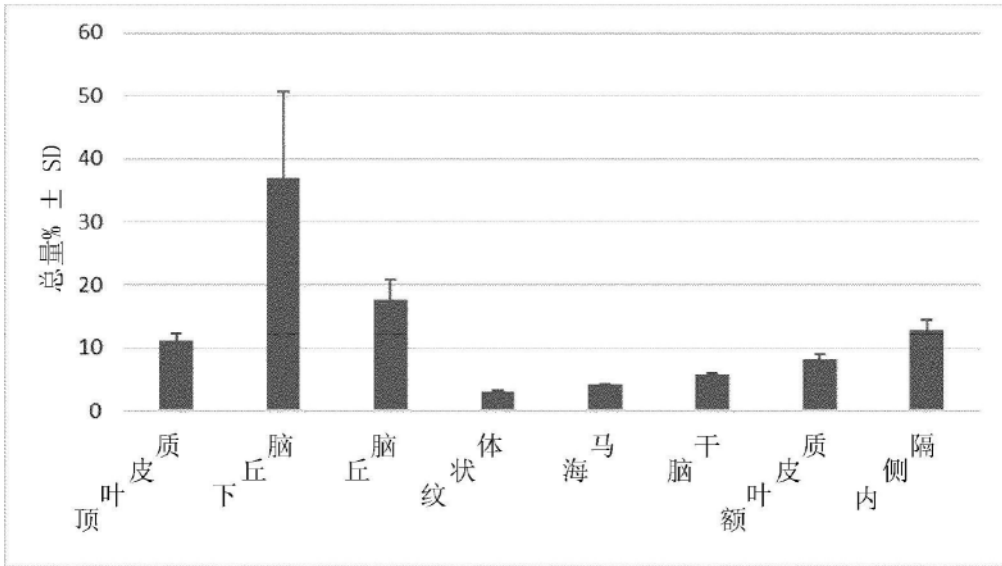


图1

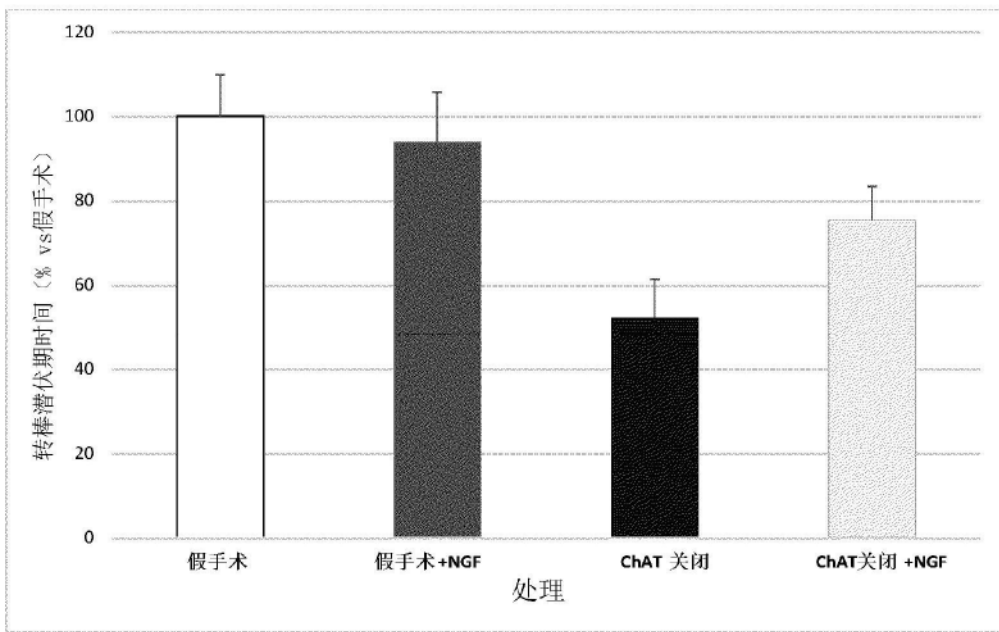


图2

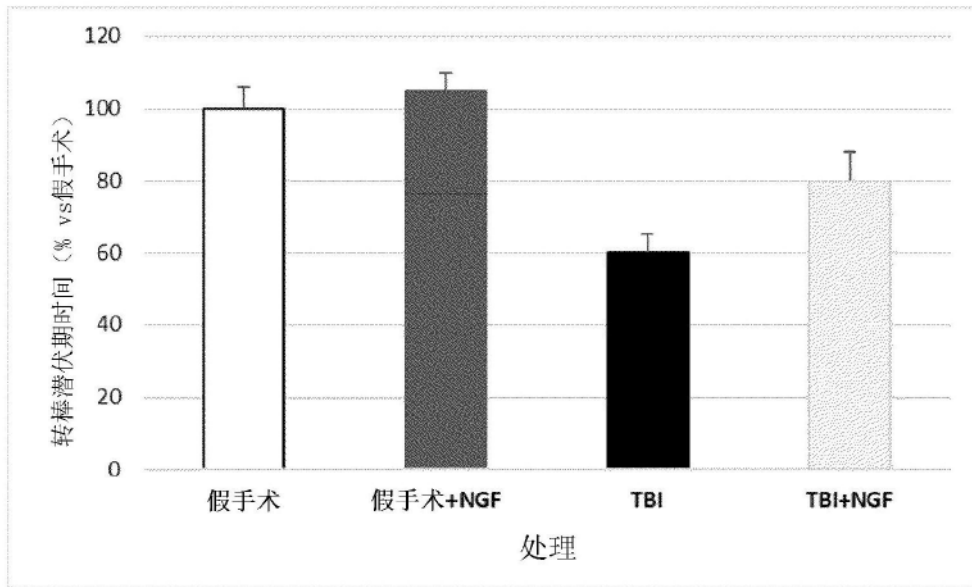
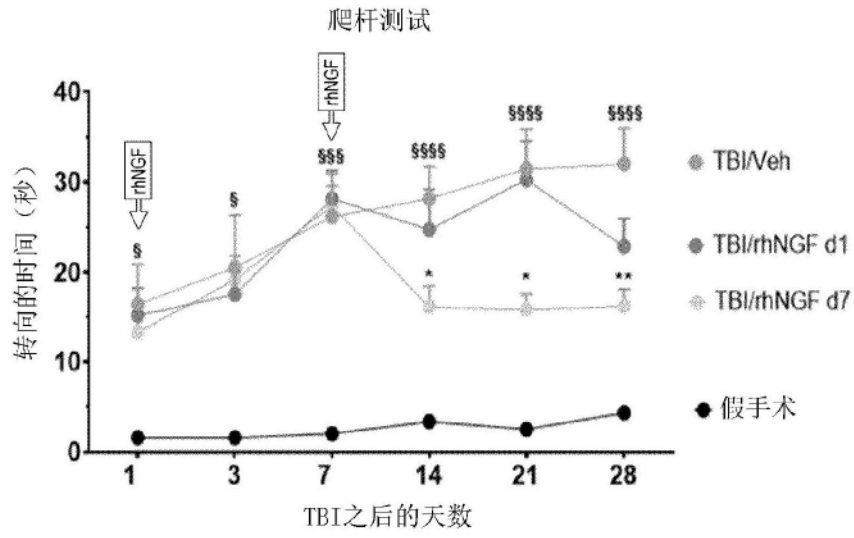


图3

A



B

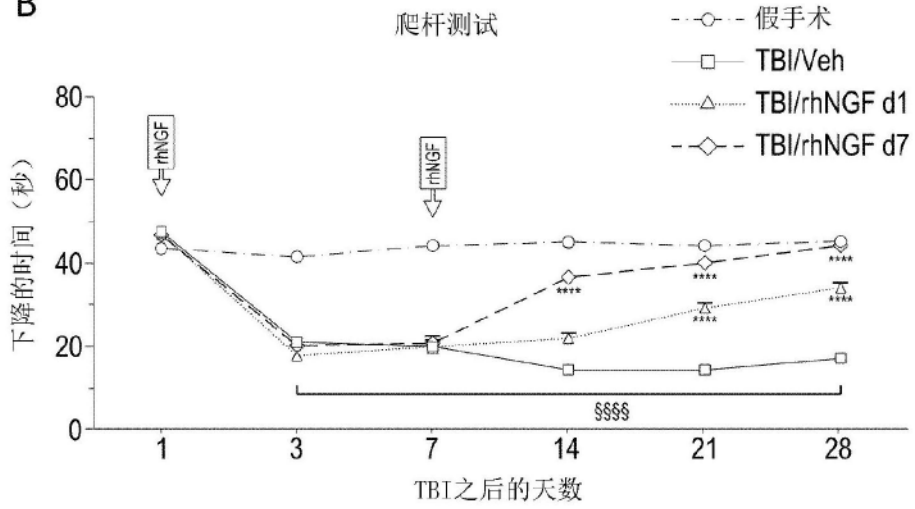


图4

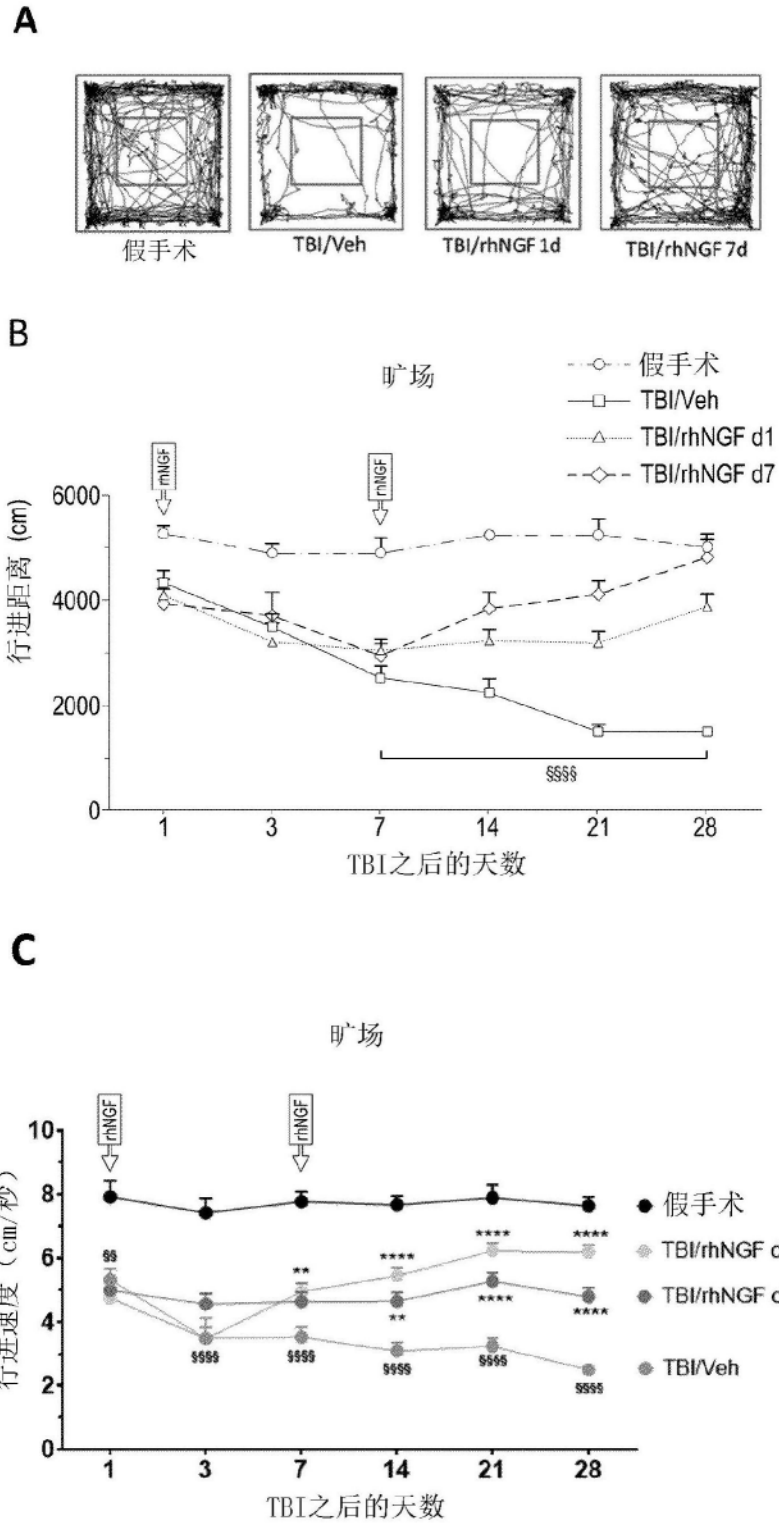


图5

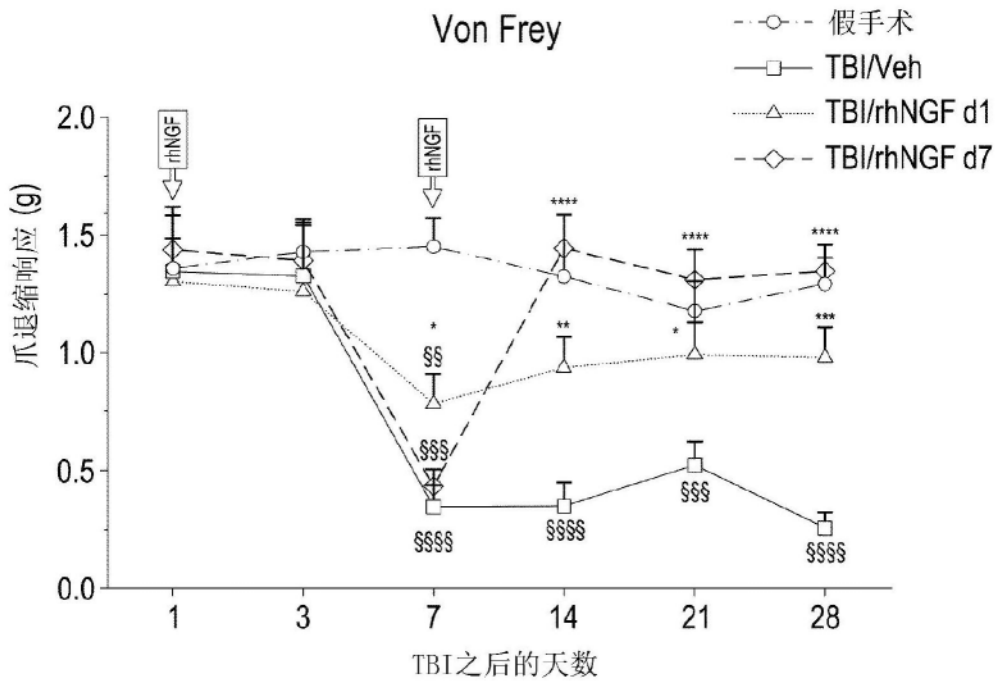


图6

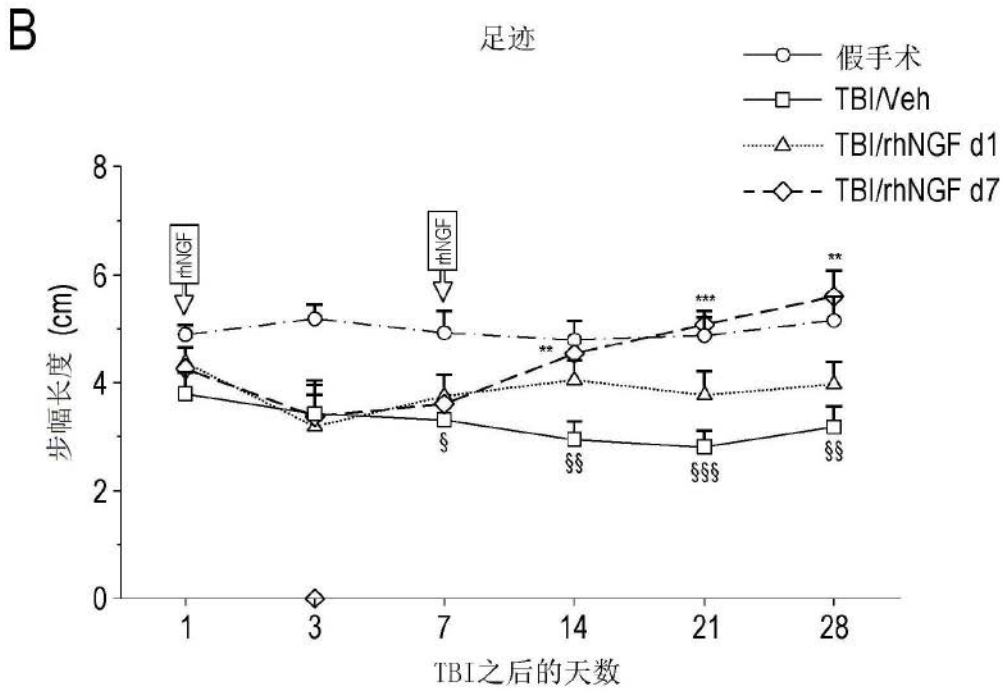
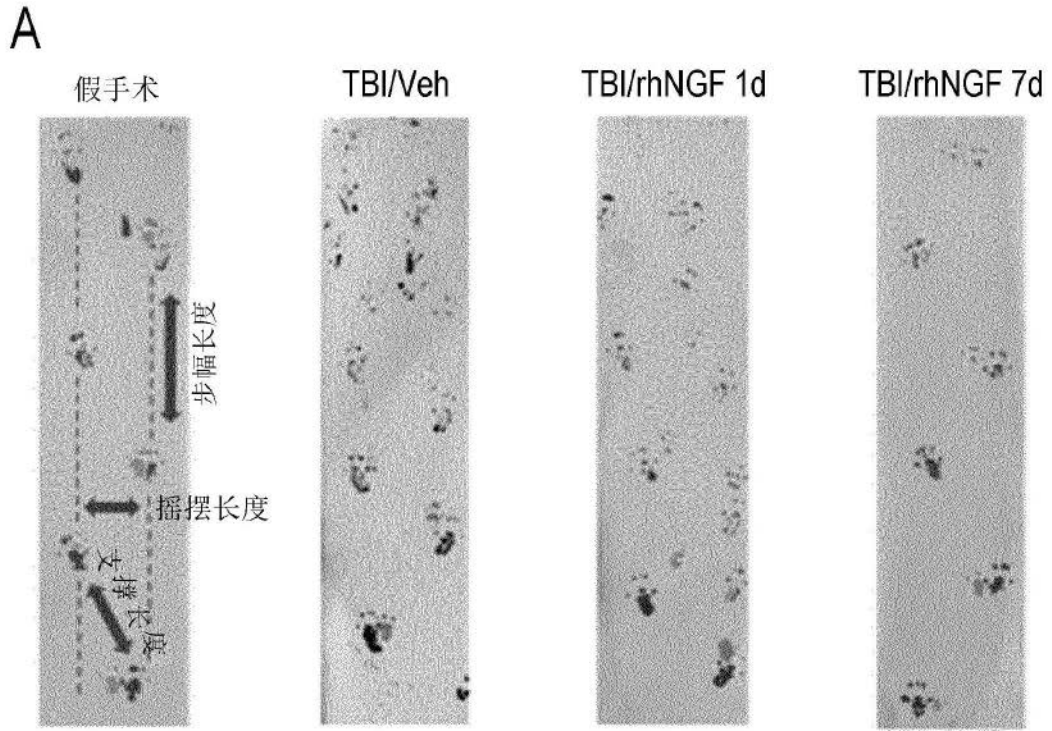


图7

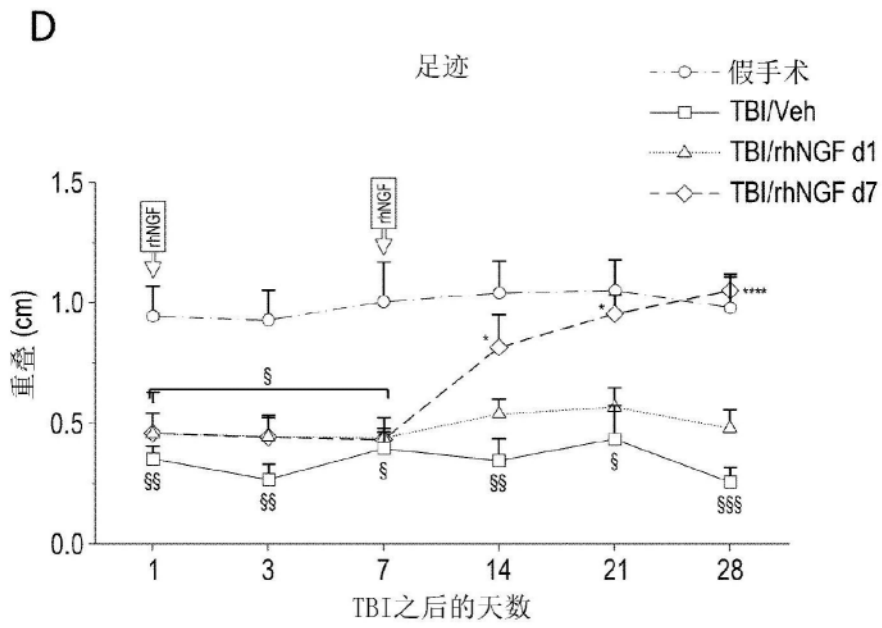
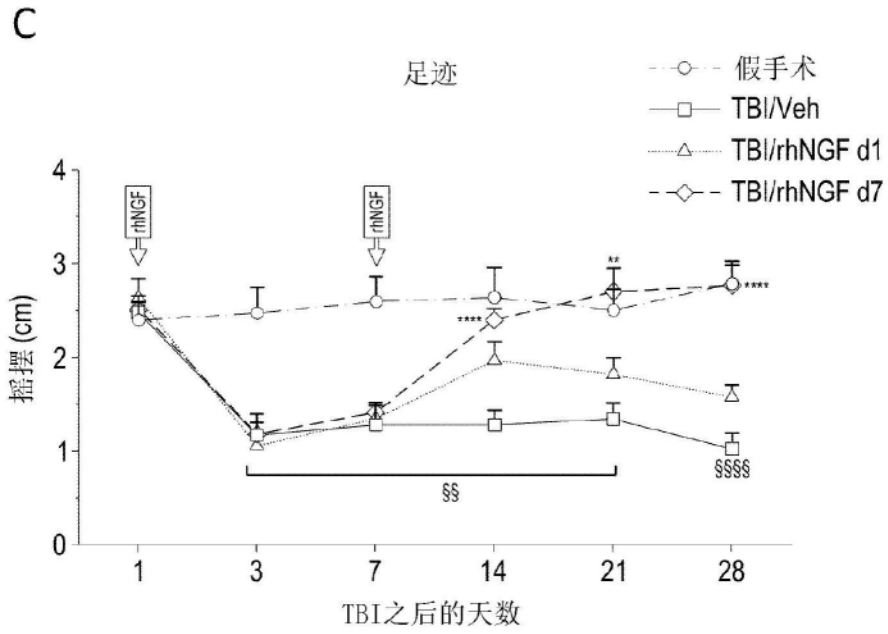


图7 (续)

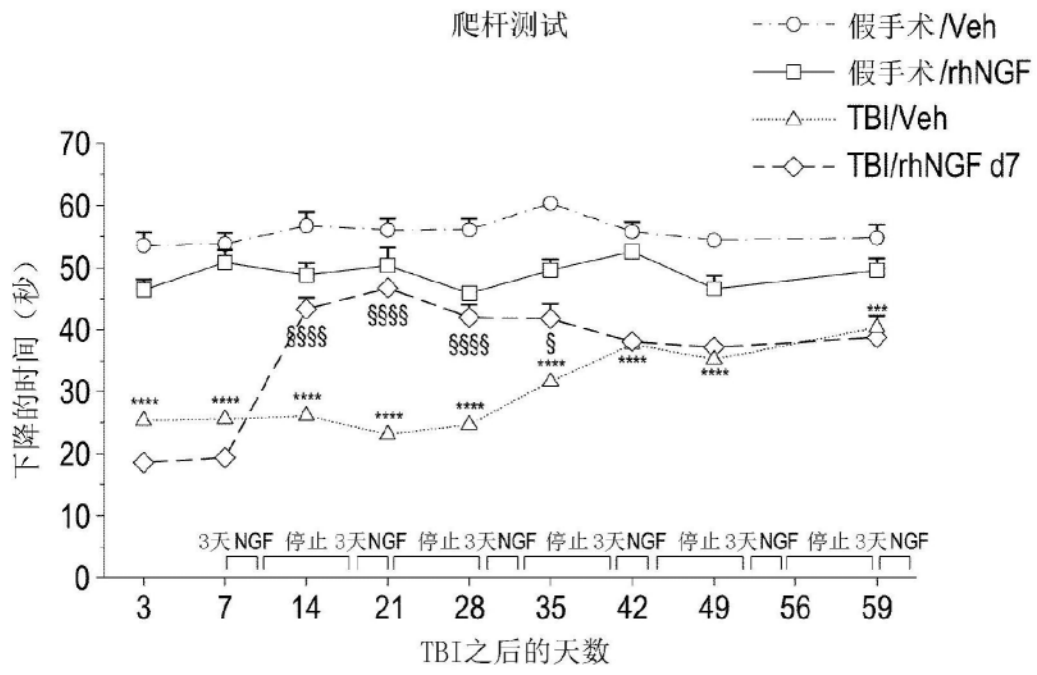


图8