



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116802174 A

(43) 申请公布日 2023. 09. 22

(21) 申请号 202180085815.2

(22) 申请日 2021.10.20

(30) 优先权数据

63/104,350 2020.10.22 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.06.19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/055908 2021.10.20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/087174 EN 2022.04.28

(71) 申请人 帕克斯医学有限公司

地址 美国纽约州

(72) 发明人 迈克尔·德比 扎卡里·罗梅

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

专利代理师 王旭 吴小明

(51) Int.Cl.

G07D 207/34 (2006.01)

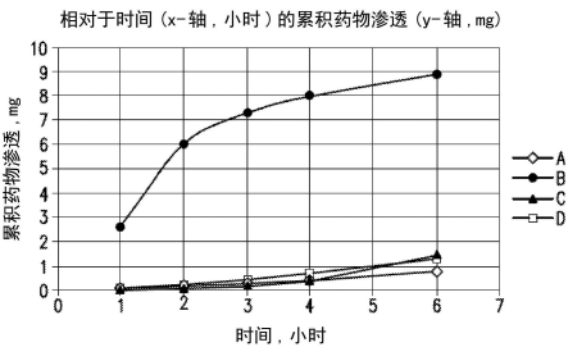
权利要求书3页 说明书48页 附图14页

(54) 发明名称

用于治疗神经系统病症的苏拉明的鼻内施用

(57) 摘要

本发明提供了用于鼻内 (IN) 治疗神经系统病症诸如认知、社交或行为障碍和神经发育障碍的方法和组合物。更具体地,本发明证明了鼻内施用苏拉明有效地减轻与这些障碍和病症有关的一种或多种症状或表现或在与这些障碍和病症有关的一种或多种症状或表现方面有效地提供改善。



1. 一种治疗有需要的人类患者中的神经系统病症的方法,所述方法包括向所述患者鼻内施用药物组合物,所述药物组合物包含有效量的苏拉明或其药用盐、酯、溶剂化物或前药,其中所述组合物在选自以下各项组成的组的神经病症的至少一种以下病症、症状或行为表现方面在所述患者中提供改善:

- a) 焦虑或焦虑样行为,
- b) 探索环境的意愿,
- c) 社交互动,
- d) 空间学习和记忆,
- e) 学习和记忆,
- f) 易怒、激动和/或哭泣,
- g) 嗜睡和/或社交退缩,
- h) 刻板行为,
- i) 多动和/或不顺从,或
- j) 限制性和/或重复性行为。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述组合物在选自以下各项组成的组的神经系统病症的至少一种以下病症、症状或行为表现方面在所述患者中提供改善:

- a) 焦虑或焦虑样行为,
- b) 探索环境的意愿,
- c) 社交互动,
- d) 空间学习和记忆,或
- e) 学习和记忆。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中苏拉明的有效量是治疗有效量。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述药用盐选自碱金属盐、碱土金属盐和铵盐。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述盐是钠盐。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述盐是六钠盐。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述神经系统病症选自以下各项组成的组:自闭症谱系障碍(ASD)、脆性X综合征(FXS)、脆性X相关震颤/共济失调综合征(FXTAS)、肌痛性脑脊髓炎/慢性疲劳综合征(ME/CFS)、创伤后应激综合征(PTSD)、图雷特综合征(TS)、帕金森病、快乐木偶综合征(AS)、以及常与莱姆病和其他蜱媒病有关的CNS病症表现、以及与COVID-19和其他病毒(例如Epstein Barr人类疱疹病毒6和7、单纯疱疹病毒、巨细胞病毒等等)有关的神经系统和中枢神经系统(CNS)病症,包括其长期影响。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述神经系统病症选自自闭症谱系障碍、FXS或FXTAS。

9. 根据权利要求7所述的方法,其中所述神经系统病症是自闭症谱系障碍。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述自闭症谱系障碍选自以下各项组成的组:自闭性障碍、儿童期崩解症、待分类的广泛性发育障碍(PDD-NOS)和阿斯伯格综合征。

11. 根据权利要求9所述的方法,其中所述自闭症谱系障碍表现出选自沟通困难、与他人互动困难和重复性行为的一种或多种症状。

12. 根据权利要求8所述的方法,其中所述神经系统病症是FXS。

13. 根据权利要求8所述的方法,其中所述神经系统病症是FXTAS。
14. 根据权利要求7所述的方法,其中所述神经系统病症是ME/CFS。
15. 根据权利要求7所述的方法,其中所述神经系统病症是PTSD。
16. 根据权利要求7所述的方法,其中所述神经系统病症是TS。
17. 根据权利要求7所述的方法,其中所述神经系统病症是PD。
18. 根据权利要求7所述的方法,其中所述神经系统病症是AS。
19. 根据权利要求7所述的方法,其中所述神经系统病症是与莱姆病和其他蜱媒病有关的中枢神经系统病症表现。
20. 根据权利要求7所述的方法,其中所述神经系统病症是与COVID-19或选自Epstein Barr人类疱疹病毒6和7、单纯疱疹病毒和巨细胞病毒的病毒有关的中枢神经系统病症表现,包括前述的其长期影响。
21. 根据权利要求1所述的方法,其中所述组合物至少每天一次、或至少每天两次、或至少每周一次、或至少每周两次、或至少每双周一次(即每两周一次)、或至少每月一次、或至少每4周一次施用(即递送或给药)。
22. 根据权利要求1所述的方法,其中所述组合物大约每41天至大约78天施用至少一次。
23. 根据权利要求1所述的方法,其中所述组合物大约每50天施用至少一次。
24. 根据权利要求1所述的方法,其中基于苏拉明的平均半衰期,每个时间间隔施用所述组合物至少一次。
25. 根据权利要求1所述的方法,其中基于苏拉明活性物质,所述组合物展现出即能够提供约1微克/cm²/小时至约200微克/cm²/小时的苏拉明穿过培养的人气道组织的渗透速率。
26. 根据权利要求1所述的方法,其中基于苏拉明活性物质,所述患者中苏拉明的血浆水平维持在低于约3微摩尔(μ M)、或低于约2.75微摩尔、或低于约2.5微摩尔、或低于约2微摩尔、或低于约1微摩尔、或低于约0.5微摩尔。
27. 根据权利要求1所述的方法,其中所述患者中的苏拉明的脑组织水平为约1ng/ml至约1000ng/ml。
28. 根据权利要求1所述的方法,其中所述患者中的苏拉明的脑组织水平为至少约1ng/ml,或至少约10ng/ml,或至少约50ng/ml,或至少约100ng/ml,或至少约250ng/ml,或至少约500ng/ml。
29. 根据权利要求1所述的方法,其中苏拉明的脑组织与血浆分配比为至少约0.05,或至少约0.1,或至少约0.25,或至少约0.50。
30. 根据权利要求1所述的方法,其中所述患者的苏拉明活性物质的血浆水平的AUC小于约80 μ g*天/L,或小于约75 μ g*天/L,或小于约50 μ g*天/L,或小于约25 μ g*天/L,或小于约10 μ g*天/L。
31. 根据权利要求1所述的方法,其中基于单次剂量,所述患者的苏拉明活性物质的血浆水平的C_{max}小于约75微摩尔,或小于约7.5微摩尔,或小于约0.1微摩尔,并且任选地为至少约0.01微摩尔。
32. 根据权利要求8所述的方法,其中治疗所述自闭症谱系障碍、FXS或FXTAS包括:相对

于所述患者在所述施用之前的症状,改善所述患者的一种或多种症状,其中所述一种或多种症状选自沟通困难、与他人互动困难和重复性行为。

33. 根据权利要求8所述的方法,其中治疗所述自闭症谱系障碍、FXS或FXTAS包括:相对于所述患者在所述施用之前的评分,提高所述患者的评估评分。

34. 根据权利要求33所述的方法,其中所述评估评分选自ABC、ADOS、ATEC、CARS CGI和SRS。

35. 根据权利要求1所述的方法,其中所述组合物是鼻喷雾。

36. 根据权利要求35所述的方法,其中所述组合物是水性组合物。

37. 根据权利要求35所述的方法,其中所述组合物是粉末组合物。

38. 根据权利要求35所述的方法,其中所述组合物是粘膜粘附可喷雾流体凝胶。

39. 一种治疗有需要的人类患者中的神经系统病症的方法,所述方法包括向所述患者鼻内施用药物组合物,所述药物组合物包含有效量的苏拉明或其药用盐、酯、溶剂化物或前药,其中当在动物模型中进行评价时,所述组合物在选自由以下各项组成的组的至少一种以下行为表现方面提供改善:

- a) 光/暗测试(LDT),
- b) 运动活动测试,
- c) 社交互动测试,
- d) Morris水迷宫测试(MWM),或
- e) 穿梭被动回避测试。

40. 根据权利要求39所述的方法,其中所述动物模型是转基因FMR-1小鼠模型。

41. 苏拉明或其药用盐、酯、溶剂化物或前药在制备药物中的用途,所述药物用于鼻内递送有效量的苏拉明,所述苏拉明用于治疗有需要的人类患者中的神经系统病症,其中所述组合物在选自由以下各项组成的组的神经系统病症的至少一种以下病症、症状或行为表现方面在所述患者中提供改善:

- a) 焦虑或焦虑样行为,
- b) 探索环境的意愿,
- c) 社交互动,
- d) 空间学习和记忆,
- e) 学习和记忆,
- f) 易怒、激动和/或哭泣,
- g) 嗜睡和/或社交退缩,
- h) 刻板行为,
- i) 多动和/或不顺从,或
- j) 限制性和/或重复性行为。

42. 一种用于执行根据权利要求1所述的方法的装置,所述装置包括用于鼻内施用所述药物组合物的鼻喷雾吸入器。

用于治疗神经系统病症的苏拉明的鼻内施用

发明领域

[0001] 本发明提供了用于治疗神经系统病症的方法和组合物,所述神经系统病症包括认知、社交或行为障碍、神经发育障碍、精神障碍、神经障碍和中枢神经系统病症。更具体地,本发明提供了用于鼻内(IN)递送治疗有效量的抗嘌呤能剂苏拉明及其药用盐、酯、溶剂化物和前药以治疗或改善与这些病症有关的症状和表现的鼻喷雾产品的方法和组合物。

[0002] 发明背景

[0003] 神经系统病症,无论其表现是轻度还是重度,都会影响美国和世界各地的许多个体。这些病症的影响超出个体患者的范围,并且影响家庭成员、护理人员和整个社会。

[0004] 神经系统病症包括认知、社会或行为障碍、神经发育障碍、精神障碍、神经障碍和中枢神经系统(CNS)病症。这些神经系统病症尤其包括自闭症谱系障碍(autism spectrum disorder,ASD)、脆性X综合征(fragile X syndrome,FXS)、脆性X相关震颤/共济失调综合征(fragile X-associated tremor/ataxia syndrome,FXTAS)、肌痛性脑脊髓炎/慢性疲劳综合征(myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome,ME/CFS)、创伤后应激综合征(post-traumatic stress syndrome,PTSD)、图雷特综合征(Parkinson's Disease,TS)、帕金森病(Parkinson's Disease)、快乐木偶综合征(Angelman syndrome,AS)、以及常与莱姆病(Lyme disease)和其他蜱媒病有关的神经系统和中枢神经系统病症表现、以及与COVID-19和其他病毒(例如Epstein Barr人类疱疹病毒6和7、单纯疱疹病毒、巨细胞病毒等等)有关的神经系统和中枢神经系统病症,包括它们的长期影响。请注意,该神经系统病症列表是示例性的,并且存在可以受益于本发明的许多其他病症。目前用于这些示例性病症的治疗是有限的,并且通常针对特定症状,诸如癫痫发作、焦虑、抑郁、注意力缺陷/多动、睡眠障碍、认知障碍等。尽管在该领域中存在很多研究以及用于这样的治疗的新型或已知治疗剂的潜力,但是如何安全且有效地施用这些药剂以及最佳剂量和给药方案可能是什么并不总是显而易见的。如实施例所述,本文证明可以根据事先未曾预测的药代动力学和药效学治疗方案施用抗嘌呤能剂来治疗这些病症。这些药剂以先前未在科学文献中公开或考虑过的剂量和频率施用,这导致发现药剂的功效与血液水平之间随着时间的动态非线性相关性。

[0005] 自闭症(autism)与遗传和环境因素的组合有关,并且据报道,在美国大约每60名儿童中就有1名患病。自闭症的全球患病率估计为约2500万人。自闭症也被称为自闭症谱系障碍(ASD),因为它包括范围广泛的症状,其特征在于社会技能、重复性行为、言语和非言语沟通方面的挑战。在2013年,美国精神病学协会(American Psychiatric Association)将四种不同的自闭症诊断合并为自闭症谱系障碍的单一诊断。这些诊断包括自闭性障碍、儿童期崩解症、待分类的广泛性发育障碍(PDD-NOS)和阿斯伯格综合征。自闭症的体征和症状通常在2或3岁时出现。自闭症谱系障碍是一种与大脑发育相关的病况,其影响人如何感知和与他人社交,从而导致社交互动和沟通方面的问题。该障碍还可能包括有限和重复的行为模式。

[0006] 研究表明,早期干预可以产生积极结果,如在以下文献中所述:Chaste P、Leboyer

M(2012).“自闭症风险因素:基因、环境和基因-环境相互作用(Autism risk factors: genes,environment,and gene-environment interactions)”.Dialogues in Clinical Neuroscience.14(3):281-92.PMC 3513682.PMID 23226953;以及疾病控制与预防中心发病率和死亡率周报,自闭症谱系障碍在8岁儿童中的患病率-自闭症和发育障碍监测网络,11个站点,美国,2014年监测摘要(Centers for Disease Control and Prevention Morbidity and Mortality Weekly Report,Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8Years—Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network,11Sites,United States,2014Surveillance Summaries)/2018年4月27日/67(6);1-23。

[0007] 目前不存在自闭症谱系障碍的治愈方法,并且不存在治疗核心症状的US FDA批准药物。根据美国精神病学协会(APA)的精神障碍诊断与统计手册(Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders,DSM-V)诊断标准,自闭症谱系障碍的核心症状包括:导致难以发展、维持和理解关系的社会情感交互方面的持续性缺陷;言语和非言语社会沟通方面的缺陷;以及受限、重复的行为、兴趣或活动模式。患有ASD的人类通常具有许多相关(即非核心)症状,包括对感官输入的高反应性或低反应性或者环境感官方面的异常兴趣;临床上显著的社交、职业或当前功能的其他重要领域的障碍;认知障碍;冲动;注意力缺陷和多动症状;睡眠障碍;胃肠道不适和食物/化学敏感性;异常饮食习惯;抑郁;情绪障碍;焦虑;癫痫发作;易怒;脾气暴躁;有时可能是针对自己或针对他人的暴力行为。

[0008] 尽管这些核心症状普遍存在,但是当前疗法的重点在于使用各种药物(诸如抗精神病药、抗焦虑药、抗抑郁药、兴奋剂或用于失眠的药物)治疗一些伴随的非核心症状。经常表现的非核心症状包括抑郁、癫痫发作、焦虑、睡眠障碍、多动和注意力不集中。此外,还采用行为、职业和言语疗法以及其他非药物干预。然而,自闭症的确切病因尚不完全清楚,从而加剧了新药开发计划的挑战。

[0009] 脆性X综合征(FXS)是一种罕见的遗传性神经发育障碍,在美国大约每4,000人中就有1人受其影响。其与高度可变的认知和行为表现有关,并且与ASD具有许多重叠的特征。其是一种X连锁病症,意味着基因突变发生在X染色体上。在FXS中,FMR1基因中存在三核苷酸重复扩增。三核苷酸扩增是一种特别的基因突变,其中三个核苷酸碱基对的序列不正确地重复自身多次。在FXS的情况下,重复的三核苷酸序列是胞嘧啶-鸟嘌呤-鸟嘌呤(CGG)。通常,这种DNA区段重复5至约40次。然而,在患有FXS的人类中,所述区段重复超过200次。这典型地导致不产生功能性FMR1 mRNA转录物,并且通常由该转录物编码的蛋白质(脆性X智力迟钝蛋白(fragile X mental retardation protein,FMRP))也不存在。

[0010] 脆性X相关震颤/共济失调(FXTAS)是一种不同的病症,但是其在遗传上与FXS相关。其是一种“成人发病”的罕见的遗传性神经退行性病症,通常影响超过50岁的男性。女性只占FXTAS群体的一小部分,并且她们的症状往往不那么严重。FXTAS影响神经系统,并且在不同个体中以不同的速度发展。

[0011] FXS患者在FMR1基因中具有“完全突变”(通常远超过200个CGG三核苷酸重复),但是FXTAS患者被认为是FMR1基因的前突变“携带者”,因为他们的CGG三核苷酸重复数在55-200的范围内。FMR1基因的功能是制造一种蛋白质(FMRP),其对大脑发育以及维持和调节神经元之间的突触连接很重要。研究人员认为(出于未知原因)具有前突变导致FMR1mRNA(含

有扩增的重复序列)的过量产生。研究人员还怀疑高水平的mRNA是导致FXTAS体征和症状的原因,但是需要更多的研究来证实这些假设。

[0012] 患有FXTAS的个体通常在55岁之后出现症状。随着前突变携带者的年龄增长,尤其是男性,出现症状的可能性升高。对于前突变男性,这种可能性在75岁时达到75%。症状的进展(包括记忆丧失、言语缓慢、震颤和曳步)是渐进的,其中在第一个症状发病后大约10年出现的震颤和跌倒会干扰日常活动。对拐杖或助行器的依赖发生在首次出现疾病症状后大约15年。一些患有FXTAS的人类表现出阶梯式进展(即,症状平稳一段时间单随后突然恶化),其中急性疾病、大手术或其他主要生活压力因素导致症状更快恶化。

[0013] FXTAS的患病率尚不清楚,尽管目前的估计表明,在已知具有脆性X患者的家庭中,约30%-40%的超过50岁的男性FMR1前突变携带者最终会表现出一些FXTAS特征。不存在FDA批准的FXTAS疗法,并且目前使用的治疗仅针对病况的症状,而不是针对病理生理学本身。

[0014] 肌痛性脑脊髓炎/慢性疲劳综合征(ME/CFS)可能使人衰弱。慢性疲劳综合征也被称为肌痛性脑脊髓炎(ME)或组合术语肌痛性脑脊髓炎/慢性疲劳综合征(ME/CFS),其是一种复杂、症状多变、令人疲劳的长期医疗状况。ME/CFS会在身体或精神活动后导致症状恶化,称为劳累后不适(post-exertional malaise, PEM)。ME/CFS患者还经常具有睡眠障碍、关节和肌肉疼痛、认知障碍和显著的静态平衡位(orthostasis)。患有ME/CFS的患者通常具有大大降低的完成日常生活的常规活动的功能能力。

[0015] 创伤后应激障碍(PTSD)被归类为焦虑症,并且也可能使人衰弱。PTSD可以在人暴露于创伤事件(诸如战争、性侵犯或其他重大创伤事件)之后发展。PTSD症状可能包括过度警觉、易怒、愤怒、抑郁、令人不安的想法、感觉、梦想或对创伤事件的其他侵入性回忆,以及对创伤相关线索的精神或身体痛苦。PTSD的症状可能长期持续,并且导致显著的功能障碍。

[0016] 图雷特综合征(TS)是一种神经发育障碍,其特征在于多种运动即运动性抽搐和至少一种发声(即声音)抽搐。TS通常在儿童期或青春期发病。抽搐之前通常是受影响的肌肉中的不想要的、无法控制的冲动或感觉。这些抽搐的实例包括眨眼、咳嗽、清嗓、吸气和面部运动。虽然确切病因未知,但是据信TS涉及遗传因素和环境因素的组合。更具体地,可能涉及基底神经节和大脑相关结构之间的神经回路的功能障碍。目前不存在用于TS的治愈方法。氟哌啶醇(haloperidol) (Haldol)、匹莫齐特(pimozide) (Orap) 和阿立哌唑(aripiprazole) (Abilify)是目前仅有的被美国食品和药物管理局(U.S. Food and Drug Administration, FDA)批准用于治疗抽搐的药物;然而,这些药物都具有明显的急性和长期副作用。

[0017] 帕金森病(PD)是一种影响运动系统的神经系统退行性病症。该病的确切病因尚不清楚,并且可能涉及遗传因素和环境因素二者。PD的运动症状包括震颤、僵硬、运动缓慢和行走困难。这些运动症状也被称为震颤麻痹(parkinsonism)或震颤麻痹综合征(parkinsonian syndrome)。此外,还可能存在认知、情绪和行为症状,包括抑郁、焦虑、冷漠、痴呆、睡眠障碍和感觉障碍。与PD有关的身体神经学变化与黑质中多巴胺能神经元的死亡有关(黑质是中脑的一个区域)。这种细胞死亡与多巴胺缺乏有关。

[0018] 快乐木偶综合征(AS),也称为Angelman综合征,是一种影响神经系统的遗传性病症。该综合征的身体特征包括小头畸形(即小头),除了身体特征诸如小头、内眦距过宽或眼

角变位(即眼睑内角之间的距离增加)、宽嘴和手具有锥形手指、异常皱痕和阔拇指。该综合征与严重的智力障碍、发育障碍(例如,缺乏功能性言语)、癫痫发作(例如痫性发作)、平衡和运动问题以及睡眠问题有关。此外,患有AS的个体的脑电图(EEG)通常不正常。然而,患有AS的个体性格开朗,充满感情,并且寻求人际交往。目前不存在可用于AS的治愈方法。可以通过使用一种或多种类型的抗惊厥药物来控制癫痫发作。然而,确定进行控制所需的抗惊厥药物的水平和类型存在困难,因为患有AS的人类通常具有多种类型的癫痫发作。

[0019] 莱姆病(有时缩写为LD)是一种由主要由黑腿蜱或鹿蜱携带的细菌伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)和马约氏疏螺旋体(*Borrelia mayonii*)引起的传染病。其通过受感染的蜱的叮咬而传播到血流中。可以作为螺旋体存在的革兰氏阴性菌物种伯氏疏螺旋体是该病的主要致病物种。莱姆病感染的一个常见体征是在蜱叮咬发生后大约一周出现在蜱叮咬部位处的扩大的红色圆形皮疹(被称为游走性红斑)。感染的早期症状可能包括发热、头痛和疲倦。如果不治疗,感染可能发展为更严重的神经障碍表现,诸如失去移动一侧或两侧面部的能力、关节痛、伴有颈部僵硬的严重头痛、心悸、刺痛感、射痛、记忆丧失和疲劳。

[0020] 2019冠状病毒病(也称为COVID-19)是由严重急性呼吸综合征冠状病毒2(Severe Acute Respiratory Syndrome Corona Virus 2,SARS-CoV-2)引起的传染病。冠状病毒感染的常见症状包括发热、咳嗽、疲劳、呼吸急促以及嗅觉和味觉丧失。尽管大多数病例产生轻微症状并且在2周内消退,但是一些病例可能进展为病毒性肺炎、多器官衰竭、细胞因子风暴和永久性组织和器官损伤(诸如肺损伤、心脏和肾脏损伤)以及死亡。对于大多数处于风险的人而言,该病可能是特别严重的,并且结果不佳。严重COVID-19疾病的一些更严重的风险因素包括哮喘、慢性肺病、糖尿病、严重的心脏病、正在进行透析治疗的慢性肾病、严重肥胖、65岁以上的人群、疗养院或长期护理机构中的人群和免疫功能低下者(诸如进行癌症化疗、免疫治疗的患者或移植接受者)。然而,越来越多的证据表明在既往COVID-19感染的患者中存在特征在于神经系统(CNS)受累、肺/心脏/肾功能损伤和神经表现的长期疾病。初始COVID-19感染的严重程度与随后的长期后遗症之间不存在直接关联。参见Ali AAsadi-Pooya和Leila Simani,COVID-19的中枢神经系统表现:系统综述(Central nervous system manifestations of COVID-19:Asystematic review),J Neurol Sci,2020年6月15日;413:116832.doi:10.1016/j.jns.2020.116832.Epub 2020年4月11日。这些症状中的许多症状与通常所说的“长期COVID”有关,其是特征在于在典型恢复期后出现或持续存在长期后遗症的病况。

[0021] 抗嘌呤能剂构成拮抗嘌呤能受体的化合物家族。这些受体是活生物体中最丰富的受体之一。它们出现在进化的早期,并且参与调节细胞功能。存在三种已知的不同类型的嘌呤能受体,称为P1、P2X和P2Y受体。此外,嘌呤能信号传导是细胞外信号传导的一种形式。该信号传导由嘌呤核苷酸和核苷(诸如腺苷和三磷酸腺苷(ATP))介导。该信号传导涉及激活细胞内和/或附近细胞内的嘌呤能受体,由此调节细胞功能。作为对三磷酸腺苷(ATP)或腺苷释放的反应,中枢神经系统中的嘌呤能受体在突触过程和介导神经元与神经胶质细胞之间的细胞间通讯中起着至关重要的作用。

[0022] 影响嘌呤能受体的化学化合物是已知的。其中之一是化合物苏拉明,其于二十世纪九十年代初首次合成,并且被发现具有抗嘌呤能活性。苏拉明是一种用于治疗寄生虫病锥虫病的药物,锥虫病是由布氏锥虫(*Trypanosoma brucei*)物种的原生动物引起的,并且

通常被称为非洲昏睡病。该药物还用于治疗盘尾丝虫病,其通常被称为河盲症。由于苏拉明的口服生物利用度差,所以通过注射到静脉中进行施用。然而,在治疗非洲昏睡病(锥虫病)所需的剂量下,苏拉明引起多种副作用。这些副作用包括恶心、呕吐、腹泻、腹痛和全身不适感。其他副作用包括皮肤感觉诸如皱缩或刺痛感、手掌和脚掌压痛、四肢麻木、泪溢、皮疹和畏光。另外,肾毒性是常见的,当药物以高剂量施用时,周围神经病变也是如此。关于其药代动力学,苏拉明的大约99-98%蛋白质结合在血清中,并且半衰期为41-78天(平均50天)。此外,苏拉明并未被广泛代谢,并且通过肾脏消除。苏拉明是一种大的聚阴离子羧基脲化合物,在生理pH下带有六个负电荷。由于这些因素,苏拉明不能轻易扩散穿过生物膜,这阻止其穿过血脑屏障或血脑脊液屏障。据估计,不到1%的苏拉明进入中枢神经系统。因此,有效利用苏拉明作为抗嘌呤能治疗存在许多挑战。

[0023] 综上,显然神经系统病症的治疗仍然具有挑战性。尽管一些早期动物和人体研究取得了有希望的结果,但是应认识到仍然需要进行大量研究以提供抗嘌呤能剂(诸如苏拉明)的安全且有效的施用方式。可能需要或希望将适当水平的药物递送至脑组织,同时还最大程度地降低血液和CNS以外的其他身体组织中的全身水平。然而,难以将药物递送穿过血脑屏障(“BBB”),其是包括人类在内的大多数哺乳动物的天然保护机制。血脑屏障是内皮细胞的高度选择性半透性边界,其防止循环血液中的溶质非选择性地进入神经元所在的中枢神经系统的细胞外液。这样的跨越血脑屏障的递送对于较高分子量或高电荷化合物甚至更具挑战性。例如,苏拉明的分子量为大约1300g/mol。

[0024] 在本发明中令人惊讶地发现,抗嘌呤能剂苏拉明可以潜在地安全且有效地鼻内施用以实现与诸如ASD、FXS、FXTAS、ME/CFS、PTSD、TS、PD、AS的病症有关的若干行为障碍以及与莱姆病、COVID-19和其他病毒(例如Epstein Barr人类疱疹病毒6和7、单纯疱疹病毒、巨细胞病毒等等)(包括它们的长期影响)有关的CNS病症表现中的改善。具体地,已出乎意料地发现,本文采用的施用苏拉明的方法显示出在以下方面的行为量度中的改善:焦虑或焦虑样行为,探索环境的意愿,社交互动,空间学习和记忆,易怒、激动和/或哭泣,嗜睡和/或社交退缩,刻板行为,多动和/或不顺从,以及限制性和/或重复性行为。此外,在本发明中令人惊讶地发现,当采用特定渗透促进剂时,抗嘌呤能剂苏拉明可以潜在地安全且有效地鼻内施用以在脑组织中达到适当的药物水平。具体地,已经令人惊讶地发现,渗透促进剂诸如甲基倍他环糊精(methyl Beta-cyclodextrin)、辛酸癸酸聚乙二醇-8甘油酯(caprylocaproyl macrogol-8glyceride)和2-(2-乙氧基乙氧基)乙醇特别可用于制备具有改善的粘膜组织渗透性的鼻内苏拉明制剂。这些组合物还具有靶向脑组织、同时最小化苏拉明活性物质的全身血液水平的进一步的出乎意料的益处。因此,这些组合物可用于治疗神经系统病症和与其有关的表现。

发明内容

[0025] 描述了用于治疗神经系统病症诸如认知、社交或行为障碍的方法和组合物。这些病症包括神经发育障碍诸如自闭症谱系障碍(ASD)、脆性X综合征(FXS)、脆性X相关震颤/共济失调综合征(FXTAS)、肌痛性脑脊髓炎/慢性疲劳综合征(ME/CFS)、创伤后应激综合征(PTSD)、图雷特综合征(TS)、帕金森病(PD)、快乐木偶综合征(AS)、以及常与莱姆病和其他蜱媒病有关的CNS病症表现、以及与COVID-19和其他病毒(例如Epstein Barr人类疱疹病毒

6和7、单纯疱疹病毒、巨细胞病毒等等)有关的神经系统和中枢神经系统(CNS)病症,包括它们的长期影响。更具体地,本发明提供了用于鼻内施用(即通过经鼻途径诸如鼻喷雾剂递送)的方法和组合物,其包含治疗有效量的抗嘌呤能剂苏拉明及其药用盐、酯、溶剂化物和前药。可用的鼻内组合物的实例包含治疗有效量的苏拉明和用于将治疗有效水平的苏拉明活性物质递送至脑以治疗神经系统病症或其症状或行为表现的渗透助剂。这些组合物被认为使苏拉明的全身水平最小化,同时靶向脑组织中的较高水平,从而有助于使潜在的药物毒性和不希望的副作用最小化。

[0026] 在一些实施方案中,本发明提供了通过鼻内施用以在鼻粘膜处提供较高水平的药物、使苏拉明穿过血脑屏障的递送最大化的方法。本发明表明,如在体外测定中确定的,当从包含各种渗透促进剂(诸如甲基倍他环糊精、辛酸癸酸聚乙二醇-8甘油酯和2-(2-乙氧基乙氧基)乙醇)的制剂递送时,苏拉明的跨粘膜渗透显著更高。当施用至小鼠时,发现本发明的组合物有效地将苏拉明递送至脑组织,并且证实了脑组织与血浆分配比。这些组合物被设计成将苏拉明活性物质递送穿过血脑屏障至脑组织,同时使全身水平最小化至低于约3微摩尔血浆水平和低于约0.5微摩尔。本发明还基于这样的发现:在若干动物模型中鼻内施用苏拉明,在递送与这些神经系统病症有关的研究终点或行为表现方面的改善中提供益处。

[0027] 在其他实施方案中,本发明的方法可以通过鼻内施用一个或多个剂量的苏拉明活性成分来实现。可以根据各种治疗方案施用一个或多个剂量。

[0028] 在其他实施方案中,本发明提供了一种用于苏拉明活性成分的患者施用或自我施用的装置,所述装置包括含有抗嘌呤能剂的气溶胶喷雾组合物的鼻喷雾吸入器。该组合物可以包含苏拉明活性成分和药用分散剂或溶剂体系,其中所述装置被设计(或备选地计量)以通过形成含有一定剂量的苏拉明活性成分的喷雾来分散一定量的气溶胶制剂。在其他实施方案中,吸入器可以包含作为细粉的苏拉明活性成分,并且进一步与颗粒状分散剂和稀释剂组合,或者备选地其中苏拉明活性成分被组合以掺入分散剂粒子内或涂覆颗粒状分散剂。

[0029] 在其他实施方案中,本发明提供了一种治疗有需要的人类患者中的神经系统病症(诸如认知、社交或行为障碍或神经发育障碍)的方法,所述方法包括向所述患者鼻内施用药物组合物,所述药物组合物包含有效量的苏拉明或其药用盐、酯、溶剂化物或前药,其中所述组合物在选自由以下各项组成的组的神经系统病症的至少一种以下病症、症状或行为表现方面在所述患者中提供改善:

- [0030] a) 焦虑或焦虑样行为,
- [0031] b) 探索环境的意愿,
- [0032] c) 社交互动,
- [0033] d) 空间学习和记忆,
- [0034] e) 学习和记忆,
- [0035] f) 易怒、激动和/或哭泣,
- [0036] g) 嗜睡和/或社交退缩,
- [0037] h) 刻板行为,
- [0038] i) 多动和/或不顺从,或

[0039] j) 限制性和/或重复性行为。

[0040] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中所述组合物在选自以下各项组成的组的神经系统病症的至少一种以下病症、症状或行为表现方面在所述患者中提供改善:

[0041] a) 焦虑或焦虑样行为,

[0042] b) 探索环境的意愿,

[0043] c) 社交互动,

[0044] d) 空间学习和记忆,或

[0045] e) 学习和记忆。

[0046] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中有效量的苏拉明是治疗有效量。

[0047] 在其他实施方案中,本发明提供了其中药用盐选自碱金属盐、碱土金属盐和铵盐。

[0048] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中所述盐是钠盐。

[0049] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中所述盐是六钠盐。

[0050] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中神经系统病症选自认知、社交或行为障碍以及神经发育障碍。

[0051] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中神经系统病症选自以下各项组成的组:自闭症谱系障碍(ASD)、脆性X综合征(FXS)、脆性X相关震颤/共济失调综合征(FXTAS)、肌痛性脑脊髓炎/慢性疲劳综合征(ME/CFS)、创伤后应激综合征(PTSD)、图雷特综合征(TS)、帕金森病(PD)、快乐木偶综合征(AS)、以及常与莱姆病和其他蜱媒病有关的CNS病症表现、以及与COVID-19和其他病毒(例如Epstein Barr人类疱疹病毒6和7、单纯疱疹病毒、巨细胞病毒等等)有关的神经系统和中枢神经系统(CNS)病症,包括它们的长期影响。

[0052] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中神经系统病症选自自闭症谱系障碍、FXS或FXTAS。

[0053] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中神经系统病症是自闭症谱系障碍。

[0054] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中所述自闭症谱系障碍选自以下各项组成的组:自闭性障碍(autistic disorder)、儿童期崩解症(childhood disintegrative disorder)、待分类的广泛性发育障碍(pervasive developmental disorder-not otherwise specified,PDD-NOS)和阿斯伯格综合征(Asperger syndrome)。

[0055] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中所述自闭症谱系障碍表现出选自沟通困难、与他人互动困难和重复性行为的一种或多种症状或表现。

[0056] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中神经系统病症是FXS。

[0057] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中神经系统病症是FXTAS。

[0058] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中神经系统病症是ME/CFS。

[0059] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中神经系统病症是PTSD。

[0060] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中神经系统病症是TS。

[0061] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中神经系统病症是PD。

[0062] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中神经系统病症是AS。

[0063] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中神经系统病症是与莱姆病和其他蜱媒病有关的中枢神经系统病症表现。

[0064] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中神经系统病症是与COVID-19和其他病毒(例如Epstein Barr人类疱疹病毒6和7、单纯疱疹病毒、巨细胞病毒等等)有关的神经系统或中枢神经系统(CNS)病症,包括它们的长期影响。

[0065] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中组合物至少每天一次、或至少每天两次、或至少每周一次、或至少每周两次、或至少每双周一次(即每两周一次)、或至少每月一次、或至少每4周一次施用或递送(即给药)。

[0066] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中组合物大约每41天至大约78天施用或递送(即给药)至少一次。

[0067] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中组合物大约每50天施用或递送(即给药)至少一次。

[0068] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中基于苏拉明的平均半衰期,每个时间间隔施用或递送(即给药)所述组合物至少一次。

[0069] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中基于苏拉明活性物质,组合物展现出(即能够提供)约1微克/cm²/小时至约200微克/cm²/小时的苏拉明穿过培养的人气道组织的渗透速率。

[0070] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中基于苏拉明活性物质,患者中苏拉明的血浆水平维持在低于约3微摩尔(μ M)、或低于约2.75微摩尔、或低于约2.5微摩尔、或低于约2微摩尔、或低于约1微摩尔、或低于约0.5微摩尔。

[0071] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中患者中的苏拉明的脑组织水平为约1ng/ml至约1000ng/ml。

[0072] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中患者中的苏拉明的脑组织水平为至少约1ng/ml,或至少约10ng/ml,或至少约50ng/ml,或至少约100ng/ml,或至少约250ng/ml,或至少约500ng/ml。

[0073] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中苏拉明的脑组织与血浆分配比为至少约0.05,或至少约0.1,或至少约0.25,或至少约0.50。

[0074] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中患者的苏拉明活性物质的血浆水平的AUC小于约80 μ g*天/L,或小于约75 μ g*天/L,或小于约50 μ g*天/L,或小于约25 μ g*天/L,或小于约10 μ g*天/L。

[0075] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中基于单次剂量,患者的苏拉明活性物质的血浆水平的C_{max}小于约75微摩尔,或小于约7.5微摩尔,或小于约0.1微摩尔,并且任选地为至少约0.01微摩尔。

[0076] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中治疗所述自闭症谱系障碍、FXS或FXTAS包括:相对于所述患者在所述施用之前的症状或表现,改善所述患者的一种或多种症状或表现,其中所述一种或多种症状或表现选自沟通困难、与他人互动困难和重复性行为。

[0077] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中治疗所述自闭症谱系障碍、FXS或FXTAS包括相对于所述患者在所述施用之前的评分提高所述患者的评估评分。

[0078] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中相对于所述患者在所述施用之前的评分,所述患者的所述评估评分提高10%以上。

[0079] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中评估评分选自ABC、ADOS、ATEC、CARS CGI和SRS。这些评估评分首字母缩略词在下面的定义部分中定义。

[0080] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中组合物是鼻喷雾。

[0081] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中组合物是水性组合物。

[0082] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中组合物是粉末组合物。

[0083] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中组合物是粘膜粘附可喷雾流体凝胶。

[0084] 在其他实施方案中,本发明提供了一种治疗有需要的人类患者中的神经系统病症(诸如认知、社交或行为障碍或神经发育障碍)的方法,所述方法包括向所述患者鼻内施用药物组合物,所述药物组合物包含有效量的苏拉明或其药用盐、酯、溶剂化物或前药,其中当在动物模型中进行评价时,所述组合物在选自由以下各项组成的组的至少一种以下行为表现方面提供改善:

[0085] a) 光/暗测试(LDT),

[0086] b) 运动活动测试,

[0087] c) 社交互动测试(social interaction test),

[0088] d) Morris水迷宫测试(MWM),或

[0089] e) 穿梭被动回避测试。

[0090] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中所述动物模型是转基因FMR-1小鼠模型。

[0091] 在其他实施方案中,本发明提供了苏拉明或其药用盐、酯、溶剂化物或前药在制备药物中的用途,所述药物用于鼻内递送有效量的苏拉明,所述苏拉明用于治疗有需要的人类患者中的神经系统病症(诸如认知、社交或行为障碍或神经发育障碍),其中所述组合物在选自由以下各项组成的组的神经病症的至少一种以下病症、症状或行为表现方面在所述患者中提供改善:

[0092] a) 焦虑或焦虑样行为,

[0093] b) 探索环境的意愿,

[0094] c) 社交互动,

[0095] d) 空间学习和记忆,

[0096] e) 学习和记忆,

[0097] f) 易怒、激动和/或哭泣,

[0098] g) 嗜睡和/或社交退缩,

[0099] h) 刻板行为,

[0100] i) 多动和/或不顺从,或

[0101] j) 限制性和/或重复性行为。

[0102] 在其他实施方案中,本发明提供了一种用于执行本发明的方法的装置,所述装置包括用于鼻内施用所述药物组合物的鼻喷雾吸入器。

[0103] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法和组合物,其中苏拉明的量是基于

苏拉明活性成分(即化学实体),使用1297.26克/摩尔或大约1300克/摩尔的分子量(即摩尔质量)。

[0104] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中基于苏拉明活性物质,组合物包含约0.01mg至约200mg/单位剂量的苏拉明。

[0105] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中基于苏拉明活性物质,组合物包含约0.01mg至约100mg/单位剂量的苏拉明。

[0106] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中基于苏拉明活性物质,组合物包含约0.01mg至约50mg/单位剂量的苏拉明。

[0107] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中基于苏拉明活性物质,组合物包含约0.01mg至约25mg/单位剂量的苏拉明。

[0108] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中基于苏拉明活性物质,组合物包含约0.01mg至约10mg/单位剂量的苏拉明。

[0109] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中基于苏拉明活性物质和患者体重,组合物包含约0.1mg/kg/周至约20mg/kg/周的苏拉明。

[0110] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中基于苏拉明活性物质和患者体重,组合物包含约0.025mg/kg/单位剂量至约10mg/kg/单位剂量的苏拉明。

[0111] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中基于苏拉明活性物质和患者体重,组合物包含约0.05mg/kg/单位剂量至约6mg/kg/单位剂量的苏拉明。

[0112] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中基于苏拉明活性物质和患者体重(质量),组合物包含约0.0476mg/kg/单位剂量至约5.720mg/kg/单位剂量的苏拉明。

[0113] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中基于苏拉明活性物质和患者体重,组合物包含小于约1mg/kg/单位剂量的苏拉明。

[0114] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中基于苏拉明活性物质和患者体重,组合物包含小于约0.5mg/kg/单位剂量的苏拉明。

[0115] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中基于苏拉明活性物质和患者体重,组合物包含小于约0.25mg/kg/单位剂量的苏拉明。

[0116] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中基于苏拉明活性物质和患者体重,组合物包含小于约0.1mg/kg/单位剂量的苏拉明。

[0117] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中基于苏拉明活性物质和患者的体表面积(BSA),组合物包含小于约400mg/m²/单位剂量的苏拉明。

[0118] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中基于苏拉明活性物质和患者的体表面积(BSA),组合物包含小于约200mg/m²/单位剂量的苏拉明。

[0119] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中基于苏拉明活性物质和患者的体表面积(BSA),组合物包含小于约100mg/m²/单位剂量的苏拉明。

[0120] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中基于苏拉明活性物质和患者的体表面积(BSA),组合物包含小于约50mg/m²/单位剂量的苏拉明。

[0121] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中基于苏拉明活性物质和患者的体表面积(BSA),组合物包含小于约25mg/m²/单位剂量的苏拉明。

[0122] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中基于苏拉明活性物质和患者

的体表面积(BSA),组合物包含约 $10\text{mg}/\text{m}^2$ /单位剂量至约 $300\text{mg}/\text{m}^2$ /单位剂量的苏拉明。

[0123] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中患者的苏拉明活性物质的血浆水平的AUC小于约 $80\mu\text{g}\cdot\text{天}/\text{L}$ 。

[0124] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中患者的苏拉明活性物质的血浆水平的AUC小于约 $75\mu\text{g}\cdot\text{天}/\text{L}$ 。

[0125] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中患者的苏拉明活性物质的血浆水平的AUC小于约 $50\mu\text{g}\cdot\text{天}/\text{L}$ 。

[0126] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中患者的苏拉明活性物质的血浆水平的AUC小于约 $25\mu\text{g}\cdot\text{天}/\text{L}$ 。

[0127] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中患者的苏拉明活性物质的血浆水平的AUC小于约 $10\mu\text{g}\cdot\text{天}/\text{L}$ 。

[0128] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中患者的苏拉明活性物质的血浆水平的 C_{max} 小于约75微摩尔/剂药物组合物。

[0129] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中患者的苏拉明活性物质的血浆水平的 C_{max} 小于约7.5微摩尔/剂药物组合物。

[0130] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中患者的苏拉明活性物质的血浆水平的 C_{max} 小于约0.1微摩尔。虽然不存在最小 C_{max} ,但是量通常可以高于约0.01微摩尔/剂药物组合物。

[0131] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中每个单位剂量包含约0.01ml至约0.5ml的液体。

[0132] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中每个单位剂量包含约0.1ml的液体。

[0133] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中基于苏拉明活性物质,组合物展现出(即能够提供)约 $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ /小时至约 $200\mu\text{g}/\text{cm}^2$ /小时的苏拉明穿过培养的人气道组织的渗透速率。

[0134] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中组合物还包含选择用于渗透压控制的试剂。

[0135] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中组合物还包含选择用于渗透压控制的试剂,其中所述试剂选自盐,诸如例如氯化钠。

[0136] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中组合物还包含增稠剂。

[0137] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中所述自闭症谱系障碍包括选自沟通困难、与他人互动困难和重复性行为的一种或多种症状。

[0138] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中治疗所述ASD、FXS、FXTAS、ME/CFS、PTSD、TS、PD、AS或与莱姆病、COVID-19、其他病毒(例如Epstein Barr人类疱疹病毒6或7、单纯疱疹病毒、巨细胞病毒等等)有关的CNS病症表现(包括它们的长期影响)包括相对于所述患者在所述施用之前的症状改善一种或多种症状,其中所述一种或多种症状选自沟通困难、与他人互动困难和重复性行为。

[0139] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中治疗所述ASD、FXS、FXTAS、ME/CFS、PTSD、TS、PD、AS或与莱姆病、COVID-19、其他病毒(例如Epstein Barr人类疱疹病毒6或

7、单纯疱疹病毒、巨细胞病毒等等)有关的CNS病症表现(包括它们的长期影响)包括相对于所述患者在所述施用之前的评分提高所述患者的评估评分。

[0140] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中相对于所述患者在所述施用之前的评分,所述患者的评估评分提高10%以上。

[0141] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中评估评分选自ABC、ADOS、ATEC、CARS CGI和SRS。

[0142] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中患者的ADOS评分相对于所述施用之前的评分提高了1.6以上,或者在类似测试中具有相应的表现改善。

[0143] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中所述ADOS评分或类似测试的改善的p值为0.05以下。

[0144] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中所述ADOS评分或类似测试的改善的尺寸效应为约1以上。

[0145] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中所述ADOS评分或类似测试的改善的尺寸效应为约2.9以上。

[0146] 在其他实施方案中,本发明提供了一种用于治疗神经系统病症的鼻内递送药物组合物,其包含:

[0147] (a)治疗有效量的苏拉明或其药用盐、酯、溶剂化物或前药,以及

[0148] (b)渗透促进剂。

[0149] 在其他实施方案中,本发明提供这样的组合物,其进一步包含(c)水。

[0150] 在其他实施方案中,本发明提供了一种用于患者施用(包括选自自我施用和由除患者以外的个体向患者施用的施用)的装置,所述装置包括用于施用包含苏拉明或其药用盐、酯、溶剂化物或前药的组合物的鼻喷雾吸入器,其中所述装置被设计(或备选地计量)以分散一定量的苏拉明用于治疗有需要的患者中的神经系统病症。

[0151] 在其他实施方案中,本发明提供了这样的装置,其中抗嘌呤能剂包括选自溶液、乳液或粉末的组合物。

[0152] 本发明的这些和其它实施方案根据本文中的公开内容将是显而易见的。

附图说明

[0153] 图1示出了具有三种不同渗透促进剂的水性苏拉明组合物相较于不具有渗透促进剂的对照组合物的累积药物渗透(以mg计)相对于时间(以小时计)的图。

[0154] 图2示出了具有五种不同渗透促进剂的水性苏拉明组合物相较于不具有渗透促进剂的对照组合物的累积药物渗透(以mg计)相对于时间(以小时计)的图。

[0155] 图3示出了当通过腹膜内(IP)注射每周施用20mg/kg至小鼠(从9周龄开始并且持续四周)(即在9、10、11和12周龄时给予)时在小鼠中血浆相对于脑组织的苏拉明总浓度(以ng/ml计)的图。

[0156] 图4示出了比较了当每天鼻内(IN)施用持续28天时在小鼠中血浆相对于脑组织的苏拉明总浓度(以ng/ml计)的图。包含IN苏拉明(浓度为100mg/mL×6mL/喷雾)的本发明组合物以每鼻孔喷雾一次的形式每天施用一次(每次施用的间隔为大约2分钟以确保吸收),持续28天(在28天时间段内总计56次喷雾),从9周龄开始(即,在9、10、11和12周龄期间每天

给予)。

[0157] 图5示出了比较了当每隔一天鼻内 (IN) 施用持续28天时在小鼠中血浆相对于脑组织的苏拉明总浓度 (以ng/ml计) 的图。包含IN苏拉明 (浓度为100mg/mL×6mL/喷雾) 的本发明组合物以每鼻孔喷雾一次的形式每隔一天施用一次 (每次施用的间隔为大约2分钟以确保吸收), 持续28天 (在28天时间段内总计28次喷雾), 从9周龄开始 (即, 在9、10、11和12周龄期间每天给予)。

[0158] 图6示出了比较了当每周一次鼻内 (IN) 施用持续4周时在小鼠中血浆相对于脑组织的苏拉明总浓度 (以ng/ml计) 的图。包含IN苏拉明 (浓度为100mg/mL×6mL/喷雾) 的本发明组合物以每鼻孔喷雾一次的形式每周施用一次 (每次施用的间隔为大约2分钟以确保吸收), 持续4周 (28天) (在28天时间段内总计8次喷雾), 从9周龄开始 (即, 在9、10、11和12周龄期间每天给予)。

[0159] 图7示出了比较了当通过腹膜内 (IP) 注射 (每周一次持续4周 (28天))、鼻内 (IN) (每天一次持续28天)、鼻内 (IN) (每隔一天持续28天) 和鼻内 (IN) (每周一次持续4周 (28天)) 施用时在小鼠中血浆的苏拉明总百分比的图。

[0160] 图8示出了比较了当通过腹膜内 (IP) 注射 (每周一次持续4周 (28天))、鼻内 (IN) (每天一次持续28天)、鼻内 (IN) (每隔一天持续28天) 和鼻内 (IN) (每周一次持续4周 (28天)) 施用时在小鼠中脑组织的苏拉明总百分比的图。

[0161] 图9示出了比较了当通过腹膜内 (IP) 注射 (每周一次持续4周 (28天))、鼻内 (IN) (每天一次持续28天)、鼻内 (IN) (每隔一天持续28天) 和鼻内 (IN) (每周一次持续4周 (28天)) 施用时在小鼠中血浆相对于脑组织的苏拉明总百分比的图。

[0162] 图10示出了比较了当通过腹膜内 (IP) 注射 (每周一次持续4周 (28天))、鼻内 (IN) (每天一次持续28天)、鼻内 (IN) (每隔一天持续28天) 和鼻内 (IN) (每周一次持续4周 (28天)) 施用时在小鼠中苏拉明的脑组织与血浆分配比的图。

[0163] 图11示出了比较了当通过腹膜内 (IP) 注射 (每周一次持续4周 (28天))、鼻内 (IN) (每天一次持续28天)、鼻内 (IN) (每隔一天持续28天) 和鼻内 (IN) (每周一次持续4周 (28天)) 施用时当用苏拉明治疗时在小鼠中光/暗偏好测试的进入暗区的时间的图。此外, 示出了盐水和野生型对照的数据。

[0164] 图12A和12B示出了当通过腹膜内 (IP) 注射 (每周一次持续4周 (28天))、鼻内 (IN) (每天一次持续28天)、鼻内 (IN) (每隔一天持续28天) 和鼻内 (IN) (每周一次持续4周 (28天)) 施用时当用苏拉明治疗时在小鼠中光/暗偏好测试的在光区中花费的时间的图。图12A示出了以分钟测量的时间。图12B示出了以百分比表示的时间。此外, 示出了盐水和野生型对照的数据。

[0165] 图13示出了当通过腹膜内 (IP) 注射 (每周一次持续4周 (28天))、鼻内 (IN) (每天一次持续28天)、鼻内 (IN) (每隔一天持续28天) 和鼻内 (IN) (每周一次持续4周 (28天)) 施用时当用苏拉明治疗时在小鼠中光/暗偏好测试的光区进入数的图。此外, 示出了盐水和野生型对照的数据。

[0166] 图14示出了当通过腹膜内 (IP) 注射 (每周一次持续4周 (28天))、鼻内 (IN) (每天一次持续28天)、鼻内 (IN) (每隔一天持续28天) 和鼻内 (IN) (每周一次持续4周 (28天)) 施用时当用苏拉明治疗时在小鼠中运动活动测试的活动时间 (以分钟计) / 小时的图。图中的灰色

区域示出了当动物处于模拟“暗”阶段或夜间阶段时的时间段。此外，示出了盐水和野生型对照的数据。

[0167] 图15示出了当通过腹膜内 (IP) 注射 (每周一次持续4周 (28天))、鼻内 (IN) (每天一次持续28天)、鼻内 (IN) (每隔一天持续28天) 和鼻内 (IN) (每周一次持续4周 (28天)) 施用当用苏拉明治疗时在小鼠中运动活动测试的行进距离 (以厘米计) / 小时的图。图中的灰色区域示出了当动物处于模拟“暗”阶段或夜间阶段时的时间段。此外，示出了盐水和野生型对照的数据。

[0168] 图16示出了当通过腹膜内 (IP) 注射 (每周一次持续4周 (28天))、鼻内 (IN) (每天一次持续28天)、鼻内 (IN) (每隔一天持续28天) 和鼻内 (IN) (每周一次持续4周 (28天)) 施用当用苏拉明治疗时在小鼠中运动活动测试的直立计数 (后肢站立) / 小时的图。图中的灰色区域示出了当动物处于模拟“暗”阶段或夜间阶段时的时间段。此外，示出了盐水和野生型对照的数据。

[0169] 图17示出了当通过腹膜内 (IP) 注射 (每周一次持续4周 (28天))、鼻内 (IN) (每天一次持续28天)、鼻内 (IN) (每隔一天持续28天) 和鼻内 (IN) (每周一次持续4周 (28天)) 施用当用苏拉明治疗时在小鼠中社交互动研究的0至5分钟的习惯化和0至5分钟的占用时间的图。此外，示出了盐水和野生型对照的数据。条形图从左到右为：IP苏拉明，IP盐水，IN苏拉明-每天，IN苏拉明-每2天，IN苏拉明-每周和WT-C57BL/6+盐水。

[0170] 图18示出了描绘了当通过腹膜内 (IP) 注射 (每周一次持续4周 (28天))、鼻内 (IN) (每天一次持续28天)、鼻内 (IN) (每隔一天持续28天) 和鼻内 (IN) (每周一次持续4周 (28天)) 施用当用苏拉明治疗时在小鼠中社交互动研究的陌生人隔室1和2的占用时间 (以分钟计) 的社交性分析 (0至5分钟) 的图。此外，示出了盐水和野生型对照的数据。条形图从左到右为：IP苏拉明，IP盐水，IN苏拉明-每天，IN苏拉明-每2天，IN苏拉明-每周和WT-C57BL/6+盐水。

[0171] 图19示出了社交新奇性的图，测量当通过腹膜内 (IP) 注射 (每周一次持续4周 (28天))、鼻内 (IN) (每天一次持续28天)、鼻内 (IN) (每隔一天持续28天) 和鼻内 (IN) (每周一次持续4周 (28天)) 施用当用苏拉明治疗时在小鼠中社交互动研究的引入新小鼠后每个隔室中的占用时间 (以分钟计)。此外，示出了盐水和野生型对照的数据。条形图从左到右为：IP苏拉明，IP盐水，IN苏拉明-每天，IN苏拉明-每2天，IN苏拉明-每周和WT-C57BL/6+盐水。

[0172] 图20示出了当通过腹膜内 (IP) 注射 (每周一次持续4周 (28天))、鼻内 (IN) (每天一次持续28天)、鼻内 (IN) (每隔一天持续28天) 和鼻内 (IN) (每周一次持续4周 (28天)) 施用当用苏拉明治疗时在小鼠中Morris水迷宫测试的获取测试逃避潜伏期 (以秒计) 的图。此外，示出了盐水和野生型对照的数据。在图表的第一个条目 (第1天) 中图表线从上到下为：IP盐水，WT，IN苏拉明-每2天，IP苏拉明，IN苏拉明-每周和IN苏拉明-每天。

[0173] 图21示出了当通过腹膜内 (IP) 注射 (每周一次持续4周 (28天))、鼻内 (IN) (每天一次持续28天)、鼻内 (IN) (每隔一天持续28天) 和鼻内 (IN) (每周一次持续4周 (28天)) 施用当用苏拉明治疗时在小鼠中在Morris水迷宫测试中定位逃逸平台的探索测试 (以秒计) 的图。此外，示出了盐水和野生型对照的数据。

[0174] 图22示出了当通过腹膜内 (IP) 注射 (每周一次持续4周 (28天))、鼻内 (IN) (每天一次持续28天)、鼻内 (IN) (每隔一天持续28天) 和鼻内 (IN) (每周一次持续4周 (28天)) 施用当

在评价苏拉明的穿梭被动回避测试中在小鼠中训练日和测试日(24小时后)测试学习和记忆的暗区潜伏期(以秒计)的图。此外,示出了盐水和野生型对照的数据。条形图从左到右为:IP苏拉明,IP盐水,IN苏拉明-每天,IN苏拉明-每2天,IN苏拉明-每周和WT-C57BL/6+盐水。

[0175] 图23A和23B示出了当通过腹膜内(IP)注射(每周一次持续4周(28天))、鼻内(IN)(每天一次持续28天)、鼻内(IN)(每隔一天持续28天)和鼻内(IN)(每周一次持续4周(28天))施用时在评价苏拉明的小鼠中穿梭被动回避测试的在光区中花费的时间的图。图23A示出了以分钟测量的时间。图23B示出了以百分比表示的时间。此外,示出了盐水和野生型对照的数据。

[0176] 图24示出了当通过腹膜内(IP)注射(每周一次持续4周(28天))、鼻内(IN)(每天一次持续28天)、鼻内(IN)(每隔一天持续28天)和鼻内(IN)(每周一次持续4周(28天))施用时在评价苏拉明的小鼠中穿梭被动回避测试的暗区进入数的图。此外,示出了盐水和野生型对照的数据。

[0177] 图25示出了当通过腹膜内(IP)注射(每周一次持续4周(28天))、鼻内(IN)(每天一次持续28天)、鼻内(IN)(每隔一天持续28天)和鼻内(IN)(每周一次持续4周(28天))施用时在评价苏拉明的小鼠中穿梭被动回避测试的光区进入数的图。此外,示出了盐水和野生型对照的数据。

[0178] 发明详述

[0179] 定义

[0180] 如本文中使用的,以下术语和缩写具有指定的含义,除非具有明确的相反指示。

[0181] 如本文中使用的,术语“ABC”也称为“异常行为检查表(Aberrant Behavior Checklist)”,并且是用于评价自闭症的评级量表。

[0182] 如本文中使用的,术语“ADOS”也称为“自闭症诊断观察表(Autism Diagnostic Observation Schedule)”,并且是用于诊断和评估自闭症的工具。方案由一系列结构化和半结构化任务组成,所述任务涉及检查者和被评估人员之间的社交互动。

[0183] 如本文中使用的,术语“AS”也称为快乐木偶综合征(Angelman syndrome)。

[0184] 如本文中使用的,术语“ASD”也称为自闭症谱系障碍。

[0185] 如本文中使用的,术语“ATEC”也称为“自闭症治疗评价检查表(Autism Treatment Evaluation Checklist)”,其是自闭症研究所(Autism Research Institute)开发的77项诊断评估工具。ATEC最初旨在评价自闭症治疗的有效性,但是也用作筛查工具。

[0186] 如本文中使用的,术语“AUC”也称为“曲线下面积(Area Under the Curve)”,其是药理学(特别是药代动力学)中的标准术语。该术语是指描述血浆中药物浓度随时间变化的曲线的定积分。在实践中,药物浓度在特定离散时间点测量,并且梯形法用于估算AUC。AUC给出了生物利用度的量度,并且是指被全身吸收的药物的分数。了解这一点,还可以确定药物的清除率。AUC反映了施用一剂药物后对药物的实际身体暴露,并且通常以 $\text{mg}\cdot\text{h}/\text{L}$ 或 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$ 表示(其中“h”代表小时)。备选地,AUC可以以 $\text{mg}\cdot\text{天}/\text{L}$ 或 $\mu\text{g}\cdot\text{天}/\text{L}$ 表示。请注意,AUC单位中的星号“*”表示乘法,并且在替代符号中使用点“·”或乘法符号“×”。

[0187] 如本文中使用的,术语“基于苏拉明活性物质”意指提供用于基于1297.26克/摩尔的苏拉明分子量(即,摩尔质量)确定或计算苏拉明的量的基础。这是一个重要的考虑因素,

用于当其以具有不同的总分子量的盐或其他形式(诸如例如具有1429.15克/摩尔的分子量(即,摩尔质量)的六钠盐)递送时来确定苏拉明的量。

[0188] 如本文中使用的,术语“CARS”也称为“儿童自闭症评级量表(Childhood Autism Rating Scale)”,并且是旨在帮助诊断和评价自闭症的行为评级量表。

[0189] 如本文中使用的,术语“CGI”也称为“临床总体印象(Clinical Global Impression)”评级量表,并且是心理障碍患者的治疗研究中症状严重程度、治疗反应和治疗效果的量度。

[0190] 如本文中使用的,术语“ $C_{\max}$ ”是药理学(特别是药代动力学)中的标准术语,用于定义在已经施用药物之后并且在施用第二剂量之前药物在身体的指定区室或测试区域中达到的最大(或峰值)血清浓度。

[0191] 如本文中使用的,术语“FXS”意指脆性X综合征。

[0192] 如本文中使用的,术语“FXTAS”意指脆性X相关震颤/共济失调综合征。

[0193] 如本文中使用的,术语“IN”意指鼻内。

[0194] 如本文中使用的,术语“长期COVID综合征”意指COVID-19感染后的症状持续存在,其自初次感染后持续超过约12周。

[0195] 如本文中使用的,术语“ME/CFS”也称为肌痛性脑脊髓炎/慢性疲劳综合征(ME/CFS)。

[0196] 如本文中使用的,术语“鼻喷雾”意指旨在从喷雾或雾化装置递送的产品,其可以例如是液体、粉末、凝胶、泡沫、乳膏、软膏或其他可喷雾组合物的形式。

[0197] 如本文中使用的,术语“PD”也称为帕金森病。

[0198] 关于本发明的组合物(换言之制剂),并且还关于苏拉明的药用盐、酯、溶剂化物和前药,在本文中使用术语“药用”。本发明的药物组合物包含治疗有效量的苏拉明和药用载体。这些载体可以包含广泛范围的赋形剂。药用载体是通常已知的具有可接受的安全特性的那些。组合物是使用常规配制技术制备的。参见例如雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences),第17版,Alfonso R.Gennaro编辑,Mack Publishing Company,Easton,PA,第17版,1985。关于药用盐,这些如下所述。

[0199] 如本文中使用的,术语“PTSD”也称为“创伤后应激障碍或综合征”。

[0200] 如本文中使用的,术语“SRS”也称为“社交反应量表(Social Responsiveness Scale)”,其在本文中用作自闭症谱系障碍的量度。

[0201] 术语“受试者”意指需要神经系统病症的治疗或干预的人类患者或动物。

[0202] 术语“治疗有效”意指如执业医师所理解的,向需要治疗的受试者(诸如人类患者)提供有意义或可证明的益处所需的苏拉明的量。旨在治疗的病况包括例自闭性障碍、儿童期崩解症、待分类的广泛性发育障碍(PDD-NOS)和阿斯伯格综合征。例如,可以使用各种临床参数评估或量化有意义或可证明的益处。益处的证明还可以包括模型提供的那些,所述模型包括但不限于体外模型、体内模型和动物模型。这样的体外模型的实例是使用培养的人气道组织(EpiAirway AIR-100)模拟跨鼻粘膜渗透来研究的药物活性物质的渗透。

[0203] 如本文中使用的,术语“TS”也称为“图雷特综合征”。

[0204] 如本文中使用的,关于药物组合物和其中的活性物质,术语“鼻内”(“IN”)意指施用至鼻或通过鼻施用以递送穿过鼻腔内的粘膜的组合物。该膜是血管化良好的薄粘膜。此

外,这种粘膜非常靠近大脑,并且提供了一种最大限度地穿过血脑屏障运输药物的方式,在一些情况下,经由不同的神经并且沿着它们的神经鞘(包括嗅觉和三叉神经)。血脑屏障是一种高度选择性的半透性边界,其将循环血液与中枢神经系统中的大脑和细胞外液分离。将治疗剂递送至大脑的特定区域对于治疗许多脑部病症提出了挑战。应当注意,经粘膜施用不同于局部施用和经皮施用。美国食品药品监督管理局已为广泛的药物施用途径提供了标准,即“施用途径”。FDA提供了例如药物施用的鼻窦内、脑内、鼻内、经鼻、局部、经皮和经粘膜途径的以下定义。可用于本发明的施用途径包括鼻窦内、鼻内和经鼻,认识到还旨在通过鼻粘膜的经粘膜递送。这些施用途径区别于旨在将药物递送到肺和支气管中的吸入。参见例如2014年7月22日授予Charney等人的美国专利号8,785,500,其公开了用于鼻内施用药物活性物质的方法和组合物的实例。

[0205]	名称	定义	简称	FDA 代码	NCI* 概念 编号
	鼻窦内	头部的鼻窦内施用。	E-SINUS	133	C38206
	脑内	大脑内施用。	I-CERE	404	C38232
	窦内	在鼻窦或眶周窦内施用。	I-SINAL	010	C38262
	经鼻	施用至鼻; 通过鼻施用。	NASAL	014	C38284
	局部	施用至身体外表面的特定点。	TOPIC	011	C38304
	经皮	经由扩散通过皮肤真皮层施用至体循环。	T-DERMAL	358	C38305
	经粘膜	跨粘膜施用。	T-MUCOS	122	C38283

[0206] *国家癌症研究所(National Cancer Institute)

[0207] 参见 www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/FormsSubmissionRequirements/ElectronicSubmissions/DataStandardsManualmonographs/ucm071667.htm。

[0208] 如本文中使用的,术语“治疗(treat/treating/treatment)”包括减轻、消除或改善病况,例如自闭症和其他神经系统病症,或者预防或降低患上病况或表现出病况的症状的风险,改善或预防症状的潜在病因,抑制病况,阻止病况的发展,缓解病况,导致病况消退,或停止病况的症状,无论是预防性的还是治疗性的。

[0209] 缩写“WT”意指野生型,其是与突变形式相比在自然群体中占优势的表型、基因型或基因。

[0210] 本发明的使用苏拉明或其药用盐、酯、溶剂化物或前药或者药物组合物的治疗方法在各种实施方案中还包括苏拉明或其药用盐、酯、溶剂化物或前药在制备用于所需治疗诸如用于神经系统病症的药物中的用途。

[0211] 苏拉明

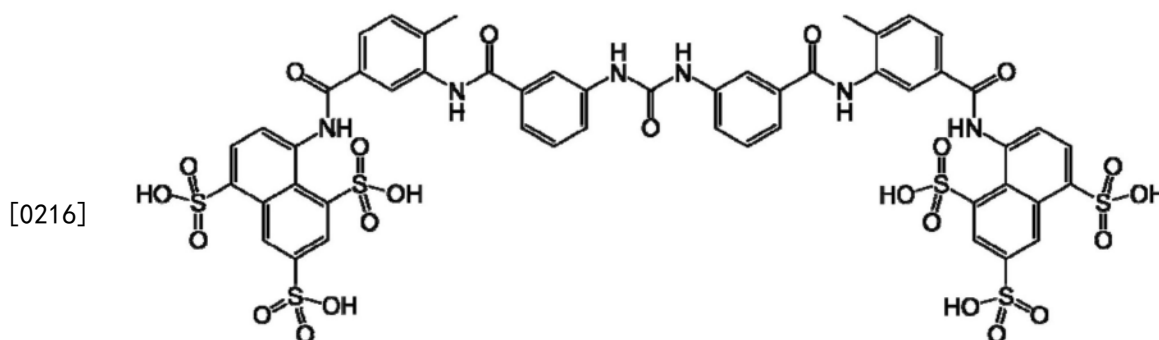
[0212] 本发明利用治疗有效量的抗嘌呤能剂苏拉明或其药用盐、酯、溶剂化物或前药来治疗神经系统病症。一些实施方案中还包含渗透促进剂,以及用于提供鼻内施用的药用载体。

[0213] 苏拉明是磺酸药物化合物,对应于CAS登记号145-63-1和ChemSpider ID 5168。苏拉明的化学名称之一是:8,8'-[羰基双[亚氨基-3,1-亚苯基羰基亚氨基(4-甲基-3,1-亚苯

基)羰基亚氨基]]双-1,3,5-萘三磺酸。该化合物是用于治疗非洲昏睡病(锥虫病)和河盲症(盘尾丝虫病)的药物,并且以商品名Antrypol、309F、309Fourneau、Bayer 205、Germanin、Moranyl、Naganin和Naganine而为人所知。然而,该药物并未获得US FDA的批准。该药物通过静脉注射施用。据报道,苏拉明已在自闭症的小鼠模型和I/II期人体试验中进行了研究。参见Naviaux,J.C.等人“使用单剂量抗嘌呤能疗法逆转成年小鼠的自闭症样行为和代谢(Reversal of autism-like behaviors and metabolism in adult mice with single-dose antipurinergic therapy)”,*Translational Psychiatry*.4(6):e400(2014)。还参见Naviaux,R.K.等人“自闭症谱系障碍中的低剂量苏拉明:小型I/II期随机临床试验(Low-dose suramin in autism spectrum disorder:a small,phase I/II,randomized clinical trial)”,*Annals of Clinical and Translational Neurology*,2017年5月,26:4(7):491-505。

[0214] 据报道,苏拉明的半衰期为约41至78天,平均为50天。参见Phillips,Margaret A.;Stanley,Jr,Samuel L.(2011)。“第50章:原生动物感染的化疗:阿米巴病、贾第虫病、毛滴虫病、锥虫病、利什曼病和其他原生动物感染(Chapter 50:Chemotherapy of Protozoal Infections:Amebiasis,Giardiasis,Trichomoniasis,Trypanosomiasis,Leishmaniasis, and Other Protozoal Infections”,于Brunton,Laurence L.Chabner,Bruce A.;Knollmann,Bjorn Christian(eds.).*Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*(第12版).McGraw Hill.pp.1437-1438。

[0215] 苏拉明的化学式为 $C_{51}H_{40}N_6O_{23}S_6$ 。因此,苏拉明具有1297.26克/摩尔的分子量(即,摩尔质量)。苏拉明通常以磺酸钠盐的形式递送,诸如六钠盐,其具有1429.15克/摩尔的分子量(即,摩尔质量)。请注意,这些分子量值将根据用于计算的原子量值而略有不同。苏拉明的化学结构如下所示。



苏拉明

[0217] 苏拉明的药用盐、酯、溶剂化物和前药可用于本发明的方法和组合物。如本文中使用的,“药用盐、酯、溶剂化物和前药”是指苏拉明的衍生物。药用盐的实例包括但不限于碱金属盐、碱土金属盐和铵盐。碱金属盐的实例包括锂盐、钠盐和钾盐。碱土金属盐的实例包括钙盐和镁盐。可以制备铵盐 NH_4^+ 本身,以及各种单烷基、二烷基、三烷基和四烷基铵盐。此外,这样的铵盐的一个或多个烷基可以被诸如羟基的基团进一步取代,以提供烷醇胺的铵盐。本文考虑衍生自二胺诸如1,2-二氨基乙烷的铵盐。苏拉明的六钠盐在本文中是可用的。

[0218] 苏拉明的药用盐、酯、溶剂化物和前药可以通过常规化学方法由母体化合物制备。通常,盐可以通过在水中或在有机溶剂中或在两者的混合物中使游离酸形式的化合物与化

学计算量的适当的碱反应来制备;通常,非水性介质如乙醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈是优选的。苏拉明的酯可以通过使母体化合物与醇反应并且移除反应所形成的水来制备。备选地,可以使用其他方法。苏拉明的一个到所有六个磺酸盐基团的任何地方都可以被酯化以形成单酯到六酯磺酸盐。

[0219] 苏拉明的溶剂化物意指一个或多个溶剂分子与一个或多个苏拉明分子缔合,包括分数溶剂化物,诸如例如0.5和2.5溶剂化物。溶剂可以选自广泛范围的溶剂,包括水、乙醇、异丙醇等。苏拉明的前药可以使用常规化学方法制备,这取决于所选择的前药。前药是在施用后代谢(即,在体内转化)成具有药理学活性的药物的药物或化合物。当药物本身从胃肠道吸收不良时,可以设计前药以改善生物利用度。前药旨在包括共价键合的载体,其在施用这样的前药时在体内释放本发明的活性母体药物。在一些分类中,酯被视作前药,诸如本文所述的苏拉明的酯。其他类型的前药可以包括磺胺衍生物和酸酐。

[0220] 此外,各种酯和前药可以包括进一步衍生化以制备聚乙二醇(PEG)和聚丙二醇(PPG)衍生物和混合衍生物,其实例是聚乙二醇化衍生物。

[0221] 转基因小鼠模型的相关性

[0222] 使用转基因小鼠模型研究神经系统病症诸如脆性X综合征和自闭症谱系障碍是确立已久的。

[0223] 脆性X综合征(FXS)是一种神经发育障碍,其中男性患病率为1/4000并且女性患病率为1/8000。FXS是由X染色体上脆性X智力迟钝1(Fragile X Mental Retardation 1, Fmr1)基因中的CGG三联体重复的扩增引起的。该链编码脆性X智力迟钝蛋白(FMRP)。如果存在>200次CGG重复,则这会导致Fmr1 mRNA的超甲基化和FMRP表达减少,从而导致各种各样的认知和行为问题以及异常的身体特征。FXS的典型特征在于轻度至中度智力障碍、焦虑、多动、癫痫发作、社交恐惧症和自闭症特征。身体特征可能包括拉长的脸、大或突出的耳朵、高腭穹、易弯曲的指关节和增大的睾丸(男性)和卵巢早衰(女性)。FXS是自闭症谱系障碍的主要遗传原因之一。

[0224] 脆性X相关震颤/共济失调综合征(FXTAS)是一种与FXS相关的罕见的遗传性神经退行性病症。FXTAS的患病率尚不清楚,但是其通常影响超过50岁的男性,而女性仅占FXTAS群体的一小部分。患有FXTAS的个体具有Fmr1基因CGG三联体重复方面的突变。通常,这种CGG三联体重复5至约40次。然而,在患有FXTAS的人类中,CGG区段重复55至200次。这种突变被称为FMR1基因前突变。FXTAS影响神经系统并且进展是可变的。症状可能包括记忆丧失、言语缓慢、震颤和曳步。一些患有FXTAS的人类表现出阶梯式进展(即,症状平稳一段时间单随后突然恶化),其中急性疾病、大手术或其他主要生活压力因素导致症状更快恶化。

[0225] 自闭症谱系障碍(ASD)是一组具有多种症状的神经发育障碍。ASD是最常见的广泛性发育障碍之一,其中全球患病率为大约1%。ASD具有很强的遗传组分,但是其是一种非常异质的疾病,其中不存在导致超过1-2%的病例的单一基因突变。其特征在于跨多种情境的社交互动和沟通障碍以及受限和重复的行为模式。其通常伴有感觉和运动异常、睡眠障碍、焦虑、注意力缺陷多动障碍(ADHD)、智力障碍和攻击性。

[0226] 在1994年,一个由荷兰和比利时科学家组成的联盟开发了一种FXS小鼠模型,其中使Fmr1基因灭活。这些Fmr1敲除小鼠缺乏正常的Fmr1RNA和正常水平的FMRP,其对于正常的大脑发育至关重要。小鼠表现出认知功能受损,包括学习问题(特别是空间学习和联想学

习)、异常社交行为、运动活动增加,并且雄性小鼠睾丸增大。Fmr1敲除小鼠与诊断为FXS和ASD的人表现出许多表型和解剖学相似性。患有FXS和ASD的人类以及Fmr1敲除小鼠都表现出高度水平的焦虑样行为、认知和学习障碍、感觉门控缺陷以及癫痫发作的易感性增加和睡眠问题。已提议FMRP调节昼夜节律周期的长度,并且在Fmr1敲除小鼠以及患有FXS和ASD的人类中观察到异常睡眠模式。另外,雄性Fmr1敲除小鼠表现出睾丸增大,这在患有FXS的雄性中经常观察到。最后,小鼠神经元树突棘形态也存在异常,就像在患有FXS的人类中观察到的那样。

[0227] Fmr1敲除小鼠模型展示了许多相同认知和行为表型以及在FXS和ASD中常见的一些解剖学特征。这种小鼠模型的开发推进了我们对FXS背后的几种分子和突触缺陷的理解,包括树突棘形态异常、蛋白质调节异常和神经传递。其是一种更好地了解FXS和ASD的病因学和基础机制的优异模型,并且是一种用于测试新药理治疗的宝贵工具。虽然所有动物模型都有一些局限性,但是这个模型密切复制了FXS和ASD二者的认知表型、行为表型以及在一些情况下的解剖学表型。对于从事神经发育障碍工作的研究人员和科学家来说,其是一个确立已久且广为接受的模型。

[0228] 参见,

[0229] Fmr1敲除小鼠:研究脆性X智力迟钝的模型(Fmr1 knockout mice:a model to study fragile X mental retardation).The Dutch-Belgian Fragile X Consortium.Cell.1994;78(1):23-33;

[0230] Comery TA、Harris JB、Willems PJ等人,脆性X敲除小鼠中的异常树突棘:成熟和修剪缺陷(Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice:maturation and pruning deficits).Proc Natl Acad Sci U S A.1997;94(10):5401-5404.Doi:10.1073/pnas.94.10.5401;

[0231] Kazdoba TM、Leach PT、Silverman JL、Crawley JN,Fmr1敲除小鼠中的脆性X综合征建模(Modeling fragile X syndrome in the Fmr1 knockout mouse).Intractable Rare Dis Res.2014;3(4):118-133.doi:10.5582/irdr.2014.01024;

[0232] Won H、Mah W、Kim E,自闭症谱系障碍的病因、机制和治疗:关注神经元突触(Autism spectrum disorder causes,mechanisms,and treatments:focus on neuronal synapses).Front Mol Neurosci.2013;6:19.2013年8月5日公开.Doi:10.3389/fnmol.2013.00019;以及

[0233] Zafarullah M、Tassone F,脆性X相关震颤/共济失调综合征(FXTAS)(Fragile X-Associated Tremor/Ataxia Syndrome(FXTAS)).Methods Mol Biol.2019;1942:173-189.doi:10.1007/978-1-4939-9080-1_15。

[0234] 剂量

[0235] 对于用于治疗神经系统病症的本发明,基于苏拉明活性物质,施用的组合物中的苏拉明的剂量将在每剂(诸如鼻喷雾剂量)约0.01mg至约200mg或每剂约0.01mg至约100mg的范围内,其中每次施用的喷雾剂量将包含约0.1ml的液体。

[0236] 也可以基于重量确定组合物。在一个实施方案中,此处可用的组合物包含约0.01重量%至约60重量%的苏拉明或其药用盐、酯、溶剂化物或前药(基于苏拉明活性物质的重量)。在另一个实施方案中,此处的这些组合物包含约0.1重量%至约25重量%的苏拉明或

其药用盐、酯、溶剂化物或前药(基于苏拉明活性物质的重量)。

[0237] 对于包含指定量或重量百分比的苏拉明的这些前述组合物,基于苏拉明部分(摩尔质量为1297.26克/摩尔)的实际量来确定或计算苏拉明,并且不包括任何抗衡离子或者酯、溶剂化物或前药部分所提供的另外的重量(当使用苏拉明盐、酯、溶剂化物或前药时)。换言之,组合物基于苏拉明化学部分的量或重量百分比。

[0238] 此外,由于本发明涉及鼻内递送组合物并且由于非常希望限制全身暴露,所以可以配制单位剂量以限制苏拉明的全身血浆水平。通常,需要将苏拉明血浆水平维持在低于约3微摩尔的浓度。在另外的实施方案中,需要将苏拉明血浆水平维持在低于约2微摩尔的浓度。在另外的实施方案中,需要将苏拉明血浆水平维持在低于约1微摩尔的浓度。在另外的实施方案中,需要将苏拉明血浆水平维持在低于约0.1微摩尔的浓度。在另外的实施方案中,需要将苏拉明血浆水平维持在低于约0.05微摩尔的浓度。在另外的实施方案中,需要将苏拉明血浆水平维持在低于约0.01微摩尔的浓度。尽管在维持适当的脑血和组织水平的情况下可能不需要最低全身苏拉明血浆水平,但是通常可能需要苏拉明血浆水平大于约1纳摩尔。

[0239] 此外,由于本发明涉及鼻内组合物和治疗方法,所以非常希望限制苏拉明的全身暴露以使药物毒性和不希望的副作用的可能性最小化并且维持适当的安全窗。这种全身水平的限制可以通过控制PK/PD特性来实现。在一些实施方案中,单位剂量应显示出用于递送该单位剂量的以下血浆药代动力学参数中的至少一者: C_{max} 小于约75微摩尔(即 μM),或小于约7.5微摩尔,或小于约0.1微摩尔,或者AUC小于约80 $\mu g \cdot \text{天}/L$,或小于约75 $\mu g \cdot \text{天}/L$,或小于约50 $\mu g \cdot \text{天}/L$,或小于约25 $\mu g \cdot \text{天}/L$,或小于约10 $\mu g \cdot \text{天}/L$ 。 C_{max} 可以高于至少约0.01微摩尔。 C_{max} 值可以从微摩尔转换为 ng/ml (基于苏拉明活性物质,使用1297.26克/摩尔的分子量),意味着1微摩尔相当于1297.26 ng/ml 。如果想要基于六钠盐的量,则1429.15克/摩尔的值可以用于转换计算。

[0240] 治疗方法和给药方案

[0241] 本发明利用治疗有效量的苏拉明或其药用盐以及用于鼻内施用苏拉明的药用载体来治疗神经系统病症诸如ASD、FXS、FXTAS、ME/CFS、PTSD、TS、PD、AS或与莱姆病、COVID-19、其他病毒(例如Epstein Barr人类疱疹病毒6或7、单纯疱疹病毒、巨细胞病毒等等)有关的大脑病症表现,包括它们的长期影响。

[0242] 所述方法包括向有需要的人类患者鼻内施用治疗有效量的苏拉明或其药用盐、酯、溶剂化物或前药。

[0243] 可以基于医生或其他从业者的技能和知识规定和使用各种给药方案。在一些实施方案中,如本文所述的组合物的单位剂量可以每天施用至少一次。在其他实施方案中,组合物的单位剂量可以每天施用至少两次,或每周施用至少一次,或每周施用至少两次。基于苏拉明的药代动力学和药效学参数,可以适当地改变给药量和给药方案。苏拉明的大约99-98%的蛋白质结合在血清中,并且半衰期为41-78天(平均50天)。

[0244] 可以根据医生或从业者的判断继续治疗,直到达到所需的治疗益处。在一些情况下,可能需要继续长期疗法或维持疗法。

[0245] 治疗评价

[0246] 本发明提供了这样的方法,其中神经系统病症诸如ASD、FXS、FXTAS、ME/CFS、PTSD、

TS、PD、AS或与莱姆病、COVID-19、其他病毒(例如Epstein Barr人类疱疹病毒6或7、单纯疱疹病毒、巨细胞病毒等等)有关的中枢神经系统病症表现(包括它们的长期影响)包括选自沟通困难、与他人互动困难、破坏性和重复性行为、运动性抽搐和语音性抽搐的一种或多种症状。在这些病症的情况下,患者通常会表现出一种或多种症状或行为表现,或者选自由以下各项组成的组的研究终点:

[0247] a) 焦虑或焦虑样行为,

[0248] b) 探索环境的意愿,

[0249] c) 社交互动,

[0250] d) 空间学习和记忆,

[0251] e) 学习和记忆,

[0252] f) 易怒、激动和/或哭泣,

[0253] g) 嗜睡和/或社交退缩,

[0254] h) 刻板行为,

[0255] i) 多动和/或不顺从,或

[0256] j) 限制性和/或重复性行为。

[0257] 具有ASD、FXS、FXTAS、ME/CFS、PTSD、TS、PD、AS或与莱姆病、COVID-19、其他病毒(例如Epstein Barr人类疱疹病毒6或7、单纯疱疹病毒、巨细胞病毒等等)有关的中枢神经系统病症表现(包括它们的长期影响)的患者可以使用各种评级量表来评价,以确定其病症的严重程度以及施用治疗后的任何改善或变化。

[0258] 例如,本发明提供了这样的方法,其中治疗ASD、FXS、FXTAS、ME/CFS、PTSD、TS、PD、AS或与莱姆病、COVID-19、其他病毒(例如Epstein Barr人类疱疹病毒6或7、单纯疱疹病毒、巨细胞病毒等等)有关的中枢神经系统病症表现(包括它们的长期影响)包括相对于治疗前的症状改善患者的一种或多种症状。可以通过比较患者症状的评估评分与所述施用之前的患者症状的评分来确定改善。期望提供相对于施用治疗之前的患者评分的改善。在一些实施方案中,期望提供相对于施用治疗之前的患者评分的10%以上的改善。

[0259] 用于评价自闭症谱系障碍的评估量表的实例包括选自ABC、ADOS、ATEC、CARS CGI和SRS的那些。

[0260] 术语“ABC”也称为“异常行为检查表”,并且是用于评价自闭症的评级量表。术语“ADOS”也称为“自闭症诊断观察表”。方案由一系列结构化和半结构化任务组成,所述任务涉及检查者和被评估人员之间的社交互动。术语“ATEC”也称为“自闭症治疗评价量表(Autism Treatment Evaluation Scale)”,并且其是自闭症研究所开发的77项诊断评估工具。ATEC最初旨在评价自闭症治疗的有效性,但是也用作筛查工具。术语“CARS”也称为“儿童自闭症评级量表”,并且是旨在帮助诊断和评价自闭症的行为评级量表。术语“CGI”也称为“临床总体印象”评级量表,并且是心理障碍患者的治疗研究中症状严重程度、治疗反应和治疗效果的量度。术语“SRS”也称为本文所使用的“社交反应量表”,并且其是自闭症谱系障碍的量度。

[0261] 例如,本发明提供了这样的方法,其中患者的ADOS评分相对于施用治疗之前的评分提高了1.6以上,或者在类似测试中具有相应的表现改善。此外,本发明提供了这样的方法,其中ADOS评分或类似测试的改善的p值为0.05以下。在另一个方面,本发明提供了这样

的方法,其中ADOS评分或类似测试的改善的尺寸效应为约1以上,或者高达约2.9以上。

[0262] 用于鼻内施用的制剂和渗透促进剂

[0263] 本发明组合物的目标适应症是神经系统病症诸如ASD、FXS、FXTAS、ME/CFS、PTSD、TS、PD、AS或与莱姆病、COVID-19、其他病毒(例如Epstein Barr人类疱疹病毒6或7、单纯疱疹病毒、巨细胞病毒等等)有关的中枢神经系统病症表现,包括它们的长期影响。因此,努力提供可以通过穿过血脑屏障而容易地到达大脑区域的制剂。可行的施用途径是通过经鼻药物递送体系(即鼻内(IN)制剂)经由鼻腔递送。

[0264] 可用于鼻内递送的组合物可以是鼻喷雾、液体、粉末、凝胶、软膏、乳膏、泡沫、气溶胶和喷雾器的形式以及其他可能的形式。这些组合物可以具有水性组合物形式的活性物质。在其他实施方案中,活性剂可以是细粉,并且进一步与颗粒状分散剂和稀释剂组合,或者备选地组合以形成或涂覆颗粒状分散剂。当组合物为液体鼻喷雾剂形式时,这些组合物将通常约为约0.01ml至约0.5ml,其中目标体积为约0.1ml/喷雾。可以施用一次至两次喷雾以提供单位剂量。

[0265] 本文中的药物组合物可以包含渗透促进剂。令人惊讶地,已发现以下渗透促进剂增加苏拉明的跨粘膜组织渗透:甲基倍他环糊精、辛酸癸酸聚乙二醇-8甘油酯(caprylocaproyl macrogol-8glyceride)和2-(2-乙氧基乙氧基)乙醇。材料甲基倍他环糊精(甲基-β-环糊精)也称为CAS登记号128446-36-6和商品名methyl betadex。材料辛酸癸酸聚乙二醇-8甘油酯也称为辛酸癸酸聚氧乙烯-8甘油酯(caprylocaproyl polyoxyl-8glyceride)和PEG-8辛酸/癸酸甘油酯(CAS登记号85536-07-8和商品名Labrasol[®])。材料2-(2-乙氧基乙氧基)乙醇也称为二乙二醇乙基醚(CAS登记号111-90-0以及商品名Carbitol[™]和Transcutol[®]P)。

[0266] 渗透促进剂通常以组合物的约40重量%使用。其他可用范围是组合物的约0.1重量%至约90重量%,或组合物的约1重量%至约80重量%,或组合物的约10重量%至约75重量%,或组合物的约25重量%至约50重量%。

[0267] 组合物中的水通常是Q.S.。缩写QS代表足量(Quantum Satis),并且意指添加尽可能多的成分(在这种情况下是水)以实现所需结果,但是不能更多。

[0268] 其他成分可以包括用于渗透压控制的各种盐以及增稠剂。

[0269] 在一些实施方案中,组合物可以包含以下功能成分:

[0270] 1. 活性成分:苏拉明,浓度为10至200mg/mL

[0271] 2. 溶剂/载体,例如水

[0272] 3. 组织渗透促进剂

[0273] 4. 一种或多种防腐剂

[0274] 5. 改变喷雾溶液粘度的增稠剂,以及

[0275] 6. 缓冲剂(pH调节剂)或渗透压剂。

[0276] 这些制剂可以使用制药和制剂领域的普通技术人员所熟悉的标准配制和混合技术来制备。

[0277] 在一个实施方案中,本发明的组合物或制剂包含苏拉明或其药用盐、酯、溶剂化物或前药以及药用载体。这些制剂可以使用制药和制剂领域的普通技术人员所熟悉的标准配制和混合技术来制备。

[0278] 在一个方面,药物组合物选自用于作为喷雾剂或气溶胶施用的溶液剂、混悬剂或分散体。在其他方面,制剂可以通过滴鼻器作为滴剂递送或直接施用于鼻腔。其他药物组合物选自由以下各项组成的组:凝胶、软膏、洗剂、乳剂、乳膏、泡沫、摩丝、液体、糊剂、胶状物或胶带,其施用于鼻腔。

[0279] 可用于本文的是其中药用载体选自水或水与其它水混溶性组分的混合物的组合物。在乳剂的情况下,组分不必与水混溶。

[0280] 在其他实施方案中,组合物可以包含维持药物制剂的pH的缓冲剂、药用增稠剂、湿润剂和表面活性剂。适用于本发明的缓冲剂包括例如盐酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、碳酸盐和磷酸盐缓冲剂。

[0281] 可以使用药用增稠剂将本发明的组合物的粘度维持在所需水平。可以根据本发明使用的增稠剂包括例如黄原胶、卡波姆、聚乙烯醇、藻酸盐、阿拉伯胶、壳聚糖、羧甲基纤维素钠(Na CMC)以及它们的混合物。增稠剂的浓度将取决于所选择的试剂和所需的粘度。

[0282] 在其他实施方案中,组合物可以是粘膜粘附可喷雾凝胶的形式。尽管鼻粘膜代表了苏拉明的极佳施用途径,但是粘液分泌的保护特性可能使递送具有挑战性。因此发现可以作为喷雾制剂施用的粘膜粘附凝胶提供了递送方式。然而,凝胶必须具有适当的流体特性以被包装到喷雾装置中并且从喷雾装置中递送,诸如以显示出剪切稀化。所得凝胶还必须具有适当的粘度和胶凝能力。特别可用于递送适当的喷雾特性的是高酰基结冷胶(gellan gum)。结冷胶是由细菌Sphingomonas elodea产生并且指定为CAS登记号71010-52-1的水溶性阴离子多糖。也可以采用其他胶凝剂材料,条件是它们提供所需的流变性能。高酰基结冷胶可作为结冷胶LT100(来自Modernist Pantry)、结冷胶E418高酰基(HA)(来自Cinogel Biotech)和Kelcogel™(来自CP Kelco(USA))商购获得。

[0283] 本发明的组合物还包含耐受增强剂以减少或防止粘膜干燥(湿润剂)以及防止其刺激。可以用于本发明的合适的耐受增强剂包括例如湿润剂(山梨糖醇、丙二醇、矿物油、植物油和甘油);舒缓剂(soothing agent)、膜调节剂、甜味剂以及它们的混合物。本发明组合物中的一种或多种耐受增强剂的浓度也将随着所选择的试剂而变化。

[0284] 为了增强药物通过鼻粘膜的吸收,可以将治疗上可接受的表面活性剂添加到鼻内制剂中。可以根据本发明使用的合适的表面活性剂包括例如山梨糖醇酸酐的脂肪酸偏酯的聚氧乙烯衍生物,诸如例如吐温80、聚氧乙烯40硬脂酸酯、聚氧乙烯50硬脂酸酯、夫西地酸盐、胆汁盐和辛基酚聚醚(Octoxynol)。合适的表面活性剂包括非离子、阴离子和阳离子表面活性剂。这些表面活性剂可以以约0.001重量%至约20重量%的浓度存在于鼻内制剂中。

[0285] 在本发明中,其他任选的成分也可以掺入鼻递送体系中,条件是它们不干扰药物的作用或显著降低药物跨鼻粘膜的吸收。这样的成分可以包括例如药用赋形剂和防腐剂。可以根据本发明使用的赋形剂包括例如生物粘合剂和/或溶胀剂/增稠剂。

[0286] 在本发明中,也可以使用本领域已知的任何其他合适的吸收促进剂。

[0287] 防腐剂也可以添加到本发明组合物中。可以与本发明组合物一起使用的合适的防腐剂包括例如苯甲醇、对羟基苯甲酸酯、硫柳汞、氯丁醇和苯甲羟胺,其中苯扎氯胺是优选的。典型地,防腐剂将以高达约2重量%的浓度存在于本发明组合物中。然而,防腐剂的确切浓度将根据预期用途而变化并且本领域技术人员可以容易地确定。

[0288] 吸收促进剂包括:(i)表面活性剂;(ii)胆汁盐(包括牛磺胆酸钠);(iii)磷脂添加

剂、混合胶束或脂质体；(iv) 醇（包括如上所讨论的多元醇，例如丙二醇或聚乙二醇，诸如 PEG 3000 等）；(v) 烯胺；(vi) 一氧化氮供体化合物；(vii) 长链两亲性分子；(viii) 小的疏水性摄取增强剂；(ix) 钠或水杨酸衍生物；(x) 乙酰乙酸的甘油酯；(xi) 环糊精或环糊精衍生物；(xii) 中链或短链（例如 C1 至 C12）脂肪酸；以及 (xiii) 螯合剂；(xiv) 氨基酸或其盐；以及 (xv) N-乙酰氨基酸或其盐。

[0289] 增溶剂可以增加制剂中药物或其药用盐的浓度。可用的增溶剂包括例如醇和多元醇。

[0290] 等渗剂可以改善制剂在鼻腔中的耐受性。常见的等渗剂是 NaCl。优选地，当制剂是等渗鼻内剂量制剂时，其在液体载体的水性部分中包含约 0.9% NaCl (v/v)。

[0291] 增稠剂可以改善组合物的整体粘度，优选地到接近鼻粘膜粘度的值。合适的增稠剂包括甲基纤维素、羧甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、藻酸钠、羟丙基甲基纤维素和壳聚糖。

[0292] 湿润剂或抗刺激剂改善组合物在重复施用中的耐受性。合适的化合物包括例如甘油、生育酚、矿物油和壳聚糖。

[0293] 各种另外的成分可以用于本发明的组合物。组合物可以包含一种或多种选自防腐剂、抗氧化剂、乳化剂、表面活性剂或润湿剂、润肤剂、成膜剂或粘度调节剂的另外的成分。基于制药和制剂领域的普通技术人员的知识，这些组分可以以适合制剂的水平采用和使用。量可以在低于 1 重量% 至高达 90 重量% 或甚至超过 99 重量% 的范围内。

[0294] 在一个方面，可以包含防腐剂。在另一个方面，可以包含抗氧化剂。在另一个方面，可以包含乳化剂。在另一个方面，可以包含润肤剂。在另一个方面，可以包含粘度调节剂。在另一个方面，可以包含表面活性剂或润湿剂。在另一个方面，可以包含成膜剂。在另一个方面，药物组合物的形式选自由以下各项组成的组：凝胶、软膏、洗剂、乳剂、乳膏、液体、喷雾、混悬剂、胶状物、泡沫、摩丝、糊剂、胶带、分散体、气溶胶。基于制药和制剂领域的普通技术人员的知识，这些组分可以以适合制剂的水平采用和使用。

[0295] 已经令人惊奇地发现，渗透促进剂诸如甲基倍他环糊精、辛酸癸酸聚乙二醇-8 甘油酯和 2-(2-乙氧基乙氧基) 乙醇特别可用于制备具有改善的粘膜组织渗透性的鼻内苏拉明制剂。

[0296] 在另一个方面，至少一种防腐剂可以选自由以下各项组成的组：对羟基苯甲酸酯（包括对羟基苯甲酸丁酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯）、丙酮亚硫酸氢钠、醇、苯扎氯铵、苄索氯铵、苯甲酸、苯甲醇、硼酸、溴硝丙二醇、丁羟茴醚、丁二醇、乙酸钙、氯化钙、乳酸钙、溴化十六烷基三甲铵 (cetrimide)、西吡氯铵、氯己定、氯丁醇、氯甲酚、氯二甲苯酚、甲酚、依地酸、甘油、海克替啶 (hexetidine)、咪脲 (imidurea)、异丙醇、硫代甘油、喷替酸、苯酚、苯氧乙醇、苯乙醇、乙酸苯汞、硼酸苯汞、硝酸苯汞、苯甲酸钾、焦亚硫酸钾、硝酸钾、山梨酸钾、丙酸、没食子酸丙酯、丙二醇、对羟基苯甲酸丙酯钠、乙酸钠、苯甲酸钠、硼酸钠、乳酸钠、焦亚硫酸钠、丙酸钠、亚硫酸钠、山梨酸、二氧化硫、硫柳汞、氧化锌和 N-乙酰半胱氨酸或者它们的组合。基于制药和制剂领域的普通技术人员的知识，这些组分可以以适合制剂的水平采用和使用。量可以在低于 1 重量% 至高达 30 重量% 的范围内。

[0297] 在另一个方面，至少一种抗氧化剂可以选自由以下各项组成的组：丙酮亚硫酸氢钠、 α -生育酚、抗坏血酸、抗坏血酸棕榈酸酯、丁羟茴醚、丁羟甲苯、柠檬酸一水合物、没食子

酸十二烷基酯、异抗坏血酸、富马酸、苹果酸、甘露醇、山梨糖醇、硫代甘油、没食子酸辛酯、焦亚硫酸钾、丙酸、没食子酸丙酯、抗坏血酸钠、甲醛次硫酸钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠、硫代硫酸钠、二氧化硫、百里酚、维生素E聚乙二醇琥珀酸酯和N-乙酰半胱氨酸或者它们的组合。基于制药和制剂领域的普通技术人员知识,这些组分可以以适合制剂的水平采用和使用。量可以在低于1重量%至高达30重量%的范围内。

[0298] 在另一个方面,至少一种乳化剂可以选自由以下各项组成的组:阿拉伯胶、琼脂、藻酸铵、藻酸钙、卡波姆、羧甲基纤维素钠、鲸蜡硬脂醇、鲸蜡醇、胆固醇、二乙醇胺、单油酸甘油酯、单硬脂酸甘油酯、锂蒙脱石、羟丙基纤维素、羟丙基淀粉、羟丙甲纤维素、羊毛脂、羊毛脂醇、月桂酸、卵磷脂、亚油酸、氧化镁、中链甘油三酯、甲基纤维素、矿物油、单乙醇胺、肉豆蔻酸、辛基十二烷醇、油酸、油醇、棕榈油、棕榈酸、果胶、磷脂、泊洛沙姆、聚卡波非、聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯蓖麻油衍生物、聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯、聚氧乙烯硬脂酸酯、聚氧乙烯15羟基硬脂酸酯、聚氧甘油酯(polyoxyglyceride)、藻酸钾、藻酸丙二醇酯、二月桂酸丙二醇酯、单月桂酸丙二醇酯、皂石、硼酸钠、脱水柠檬酸钠、乳酸钠、十二烷基硫酸钠、硬脂酸钠、脱水山梨糖醇酯、淀粉、硬脂酸、蔗糖硬脂酸酯、黄蓍胶、三乙醇胺、氨丁三醇、维生素E聚乙二醇琥珀酸酯、蜡和黄原胶或者它们的组合。基于制药和制剂领域的普通技术人员知识,这些组分可以以适合制剂的水平采用和使用。量可以在低于1重量%至高达30重量%的范围内。

[0299] 在另一个方面,至少一种润肤剂可以选自由以下各项组成的组:杏仁油、单硬脂酸铝、硬脂酸丁酯、芥花油(canola oil)、蓖麻油、鲸蜡硬脂醇、鲸蜡醇、棕榈酸鲸蜡酯、胆固醇、椰子油、环甲硅油、油酸癸酯、癸二酸二乙酯、二甲硅油(dimethicone)、硬脂酸乙二醇酯、甘油、单油酸甘油酯、单硬脂酸甘油酯、异硬脂酸异丙酯、肉豆蔻酸异丙酯、棕榈酸异丙酯、羊毛脂、羊毛脂醇、卵磷脂、矿物油、肉豆蔻醇、辛基十二烷醇、油醇、棕榈仁油、棕榈油、凡士林、聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯、二月桂酸丙二醇酯、单月桂酸丙二醇酯、红花油、角鲨烯、向日葵油、三辛精、三油精、蜡、木糖醇、乙酸锌或它们的组合。基于制药和制剂领域的普通技术人员知识,这些组分可以以适合制剂的水平采用和使用。量可以在低于1重量%至高达60重量%的范围内。

[0300] 在另一个方面,至少一种粘度调节剂可以选自由以下各项组成的组:阿拉伯胶、琼脂、藻酸、单硬脂酸铝、藻酸铵、硅镁土(attapulgitite)、膨润土、藻酸钙、乳酸钙、卡波姆、羧甲基纤维素钙、羧甲基纤维素钠、角叉菜胶、纤维素、角豆胶(ceratonia)、地蜡、鲸蜡硬脂醇、棕榈酸鲸蜡酯、壳聚糖、胶体二氧化硅、玉米糖浆固体、环甲硅油、乙基纤维素、明胶、山萘酸甘油酯、瓜尔胶、锂蒙脱石、疏水胶体二氧化硅、羟乙基纤维素、羟乙基甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基淀粉、羟丙甲纤维素、硅酸铝镁、麦芽糖糊精、甲基纤维素、肉豆蔻醇、辛基十二烷醇、棕榈油、果胶、聚卡波非、聚葡萄糖、聚氧化乙烯、聚氧乙烯烷基醚、聚乙烯醇、藻酸钾、藻酸丙二醇酯、支链淀粉、皂石、藻酸钠、淀粉、蔗糖、糖、磺丁基醚 β -环糊精(sulfoburylether β -cyclodextrin)、黄蓍胶、海藻糖和黄原胶或者它们的组合。基于制药和制剂领域的普通技术人员知识,这些组分可以以适合制剂的水平采用和使用。量可以在低于1重量%至高达60%的范围内。

[0301] 在另一个方面,至少一种成膜剂可以选自由以下各项组成的组:藻酸铵、壳聚糖、松香、共聚维酮、乙二醇和乙烯醇接枝共聚物、明胶、羟丙基纤维素、羟丙甲纤维素、乙酸琥

珀酸羟丙甲纤维素、聚甲基丙烯酸酯、聚(甲基乙烯基醚/马来酸酐)、聚乙酸乙烯酯分散体、聚醋酸乙烯邻苯二甲酸酯(polyvinyl acetate phthalate)、聚乙烯醇、聚维酮、支链淀粉、火棉和虫胶或者它们的组合。基于制药和制剂领域的普通技术人员的知识,这些组分可以以适合制剂的水平采用和使用。量可以在低于1重量%至高达约90重量%或甚至超过99重量%的范围内。

[0302] 在另一个方面,至少一种表面活性剂或润湿剂可以选自由以下各项组成的组:多库酯钠、磷脂、十二烷基硫酸钠、苯扎氯铵、溴化十六烷基三甲铵、西吡氯铵、 α 生育酚、单油酸甘油酯、肉豆蔻醇、泊洛沙姆、聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯蓖麻油衍生物、聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯、聚氧乙烯硬脂酸酯、聚氧乙烯15羟基硬脂酸酯、聚氧甘油酯、二月桂酸丙二醇酯、单月桂酸丙二醇酯、脱水山梨糖醇酯、蔗糖硬脂酸酯、三辛精和维生素E聚乙二醇琥珀酸酯或者它们的组合。基于制药和制剂领域的普通技术人员的知识,这些组分可以以适合制剂的水平采用和使用。量可以在低于1重量%至高达30重量%的范围内。

[0303] 在另一个方面,可以包含缓冲剂。在另一个方面,可以包含润肤剂。在另一个方面,可以包含乳化剂。在另一个方面,可以包含乳液稳定剂。在另一个方面,可以包含胶凝剂。在另一个方面,可以包含湿润剂。在另一个方面,可以包含软膏基质或油质载体。在另一个方面,可以包含悬浮剂。在另一个方面,可以包含酸化剂。在另一个方面,可以包含碱化剂。在另一个方面,可以包含生物粘附材料。在另一个方面,可以包含着色剂。在另一个方面,可以包含微囊化剂。在另一个方面,可以包含硬化剂。基于制药和制剂领域的普通技术人员的知识,这些组分可以以适合制剂的水平采用和使用。量可以在低于1重量%至高达90重量%或甚至超过99重量的范围内。

[0304] 当活性成分以粉末形式提供时,粉末状材料通常与粉末状分散剂组合。在其他实施方案中,活性物质可以与分散剂组合以形成含有活性物质和分散剂二者的粒子。在其他实施方案中,活性物质可以被涂覆到分散剂的表面上。分散剂的实例包括各种成分,包括糖,诸如乳糖、葡萄糖和蔗糖。

[0305] 制药和制剂领域的普通技术人员可以确定本发明的组合物的必要和任选组分的适当水平。

[0306] 制备组合物的方法也旨在作为本发明的一部分,并且对于使用标准配方和混合技术的制药和制剂领域的普通技术人员来说将是显而易见的。

[0307] 本发明还提供了一种用于抗嘌呤能剂的患者施用或自我施用的装置,所述装置包括含有抗嘌呤能剂的气溶胶喷雾制剂和药用分散剂或溶剂体系的鼻喷雾吸入器,其中所述装置被设计(或备选地计量)以通过形成含有一定剂量的抗嘌呤能剂的喷雾来分散一定量的气溶胶制剂。在其他实施方案中,吸入器可以包含作为细粉的抗嘌呤能剂,并且进一步与颗粒状分散剂和稀释剂组合,或者备选地组合以形成或涂覆颗粒状分散剂。

实施例

[0308] 以下实施例进一步描述和证明本发明范围内的实施方案。这些实施例仅出于说明目的而给出,并且不应被解释为限制本发明,因为在不脱离本发明的精神和范围的情况下,其许多变化是可能的。

[0309] 实施例1:用于鼻内递送的组合物

[0310] 使用标准混合设备和程序制备以下组合物。

成分	量
苏拉明六钠盐	10-200 mg/ml*
甲基倍他环糊精(methyl betadex)	40%重量
水	QS 以达到成分的指定水平

[0312] *基于分子量为1429.15克/摩尔的苏拉明六钠盐

[0313] 在温和混合下将苏拉明钠盐溶解在水中。在混合下添加环糊精直至溶解。使所得溶剂在使用前静置2小时。

[0314] 可以将组合物包装在用于鼻内施用的喷雾瓶中。

[0315] 备选地,用等重量的辛酸癸酸聚乙二醇-8甘油酯或2-(2-乙氧基乙氧基)乙醇代替甲基倍他环糊精来制备组合物。

[0316] 组合物可用于治疗神经系统病症。

[0317] 实施例2:用于鼻内递送的组合物

[0318] 使用标准混合设备和程序制备以下组合物。

成分	量
苏拉明六钠盐	10-200 mg/ml*
甲基倍他环糊精(methyl betadex)	40%重量
氯化钠	0.75%重量
羟丙基甲基纤维素	0.1%重量
水	QS 以达到成分的指定水平

[0320] *基于分子量为1429.15克/摩尔的苏拉明六钠盐

[0321] 在温和混合下将苏拉明钠盐溶解在水中。在混合下添加氯化钠和羟丙基甲基纤维素。在混合下添加环糊精直至溶解。使所得溶剂在使用前静置2小时。

[0322] 可以将组合物包装在用于鼻内施用的喷雾瓶中。

[0323] 备选地,用等重量的辛酸癸酸聚乙二醇-8甘油酯或2-(2-乙氧基乙氧基)乙醇代替甲基倍他环糊精来制备组合物。

[0324] 组合物可用于治疗神经系统病症。

[0325] 实施例3:粘膜粘附可喷雾凝胶制剂

[0326] 使用标准混合设备和程序制备以下组合物。

成分	量
苏拉明六钠盐	10-200 mg/ml*
高酰基结冷胶	0.1-1%重量
水	QS 以达到成分的指定水平

[0328] *基于分子量为1429.15克/摩尔的苏拉明六钠盐

[0329] 在温和混合下将苏拉明钠盐溶解在水中。将混合物加热至约40至90℃,并且在温和混合下添加高酰基高酰基结冷胶。然后将混合物冷却至室温,并且可以将其包装在喷雾瓶中用于鼻内施用。

[0330] 组合物可用于治疗神经系统病症。

[0331] 实施例4: 苏拉明的组织渗透

[0332] 使用实施例1和2的方法制备四种制剂A-D, 并且发现它们在25℃和60%相对湿度下稳定至少4周(三个月)。

[0333] 制剂A-100mg/mL的苏拉明六钠盐, 于水中(无赋形剂)

[0334] 制剂B-100mg/mL的苏拉明六钠盐, 于水中, 具有40%甲基β-环糊精(methyl betadex)

[0335] 制剂C-100mg/mL的苏拉明六钠盐, 于水中, 具有40%HP(羟丙基)-环糊精

[0336] 制剂D-160mg/mL的苏拉明六钠盐, 于水中(无赋形剂)

[0337] 制剂还含有0.1%的羟丙基甲基纤维素(即, HPMC E5, 来自Dow Chemicals)作为溶液增稠剂; 以及0.75%的氯化钠作为渗透压剂。

[0338] 按照确定的药物渗透方案(EpiAirway™药物渗透方案, MatTek Corporation, 2014), 使用培养的人气道组织(EpiAirway AIR-100, 购自MatTek Corporation), 在体外渗透研究中对这四种制剂进行评价。EpiAirway是从气管延伸到主支气管的上呼吸道的代表, 因此其用于测量经鼻制剂的药物递送。

[0339] 对于接收液制备, 将EpiAirway测定培养基预热至37℃。使用无菌技术, 将0.3mL培养基用移液管移入无菌24孔板的每个孔中。标记孔。在组织上使用0.2mL的供体溶液。

[0340] 渗透实验: 过夜平衡后, 将细胞培养插入物移至1小时孔, 并且将供体溶液用移液管移至组织上。将板放回培养箱。经过30分钟的渗透时间后, 将组织移至2小时孔。类似地, 在2.0、3.0、4.0和6.0小时的总经过时间后移动组织。无需补充供体溶液。可以在适当的时间完全移除接收溶液, 并且用新鲜的预温热的接收液替换。使用HPLC和238nm处的检测分析溶液。

[0341] 下表1提供了随着时间变化已渗透的苏拉明的平均累积量(以mg计)。

表 1	总累积苏拉明(mg)			
	制剂			
时间 (小时)	A	B	C	D
1	0.047	2.629	0.000	0.082
2	0.145	6.011	0.055	0.249
3	0.258	7.276	0.171	0.436
4	0.391	7.969	0.386	0.692
5	0.773	8.863	1.443	1.278
6	0.047	2.629	0.000	0.082

[0342] 研究的结果也以图形方式在图1中示出, 其中渗透的药物的累积量(mg)相对于时间(以小时计)作图。

[0343] 这些数据表明, 在组织渗透测定中, 相对于制剂A、C和D, 含有甲基β-环糊精(methyl betadex)的制剂B提供明显更好的渗透。此外, 从制剂A和D的比较可以看出, 具有较高的药物浓度可能有利于增加渗透。

[0345] 实施例5: 苏拉明的组织渗透

[0346] 使用实施例1和2的方法制备六种制剂A-F, 并且发现它们在环境条件下稳定至少4周。

[0347] 制剂A-200mg/mL的苏拉明, 于水中(无赋形剂)

[0348] 制剂B-140mg/mL的苏拉明, 于水中, 具有40%聚山梨酯80(Tween80)

[0349] 制剂C-140mg/mL的苏拉明, 于水中, 具有40%甲基倍他环糊精(methyl betadex)

[0350] 制剂D-140mg/mL的苏拉明, 于水中, 具有40%磺丁基醚 β -环糊精(Captisol)

[0351] 制剂E-140mg/mL的苏拉明, 于水中, 具有40%2-(2-乙氧基乙氧基)乙醇(Transcutol P)。

[0352] 制剂F-140mg/mL的苏拉明, 于水中(Labrasol)

[0353] 使用实施例3的方法进行组织渗透研究。

[0354] 下表2提供了随着时间变化已渗透的苏拉明的平均累积量(以mg计)。

[0355]	表 2	总累积苏拉明(mg)					
		制剂					
	时间 (小时)	A	B	C	D	E	F
	1	0.09	0.05	3.69	0.05	1.47	3.20
	2	0.40	0.39	12.22	0.45	5.03	6.77
	3	1.01	0.65	15.57	1.12	8.67	8.23
	4	2.16	1.08	19.11	2.41	13.32	9.74
	6	5.93	1.88	22.24	5.63	17.90	13.17

[0356] 研究的结果也以图形方式在图2中示出, 其中渗透的药物的累积量(mg)相对于时间(以小时计)作图。这些数据表明, 在组织渗透测定中, 相对于制剂A、B和D, 含有甲基倍他环糊精(methyl betadex)的制剂C、含有2-(2-乙氧基乙氧基)乙醇(Transcutol P)的制剂E和含有辛酸癸酸聚乙二醇-8甘油酯(Labrasol)的制剂F提供明显更好的渗透。

[0357] 此外, 来自实施例3和4的结果是令人惊讶的。

[0358] 环糊精是以各种尺寸的环结合在一起的糖分子。具体地, 糖单元被称为吡喃葡萄糖苷-以吡喃糖(六元)环构型存在的葡萄糖分子。6个、8个或10个吡喃葡萄糖苷相互结合以分别形成 α -、 β -和 γ -环糊精。环糊精形成环面(截锥)构型, 每端具有多个羟基基团。这使得它们能够囊封疏水性化合物而不会失去其在水中的溶解性。在其他应用中, 作为组织渗透促进剂, 环糊精可以用于将疏水性药物分子携带到生物系统中。据报道, 环糊精与多种疏水性药物形成包合物, 从而增加它们在组织膜中的分配和溶解度。甲基倍他环糊精(betadex)是一类环糊精。Methyl betadex用于至少一种市售鼻内产品雌二醇(Aerodiol)以增强药物分子雌二醇(MW=272.4)的跨组织渗透。由于其尺寸较小(MW=272.4), 雌二醇分子可以容易地囊封到环糊精环中, 并且由此实现向生物组织中递送的增强。

[0359] 然而, 我们发现了一种甲基倍他环糊精也能够囊封苏拉明的方法, 而苏拉明是比通常认为相容的分子大得多的分子。令人惊讶的是发现methyl betadex对苏拉明有效。本领域的普通技术人员不会预期如此大的分子可以被囊封到环糊精环中。

[0360] 另一种可用的渗透促进剂是Transcutol P(二乙二醇单乙基醚)。据报道,这是一种赋形剂,增强各种局部/经皮制剂中一些小分子药物化合物的皮肤渗透性。尽管如此,它尚未用作鼻内产品的赋形剂。此外,它不常用于增强大分子(诸如苏拉明)。

[0361] 另一种可用的渗透促进剂是Labrasol(辛酸癸酸聚乙二醇-8甘油酯)。据报道,这是一种赋形剂,增强一些局部/经皮制剂中一些药物化合物的皮肤渗透性。它尚未用作鼻内产品的赋形剂。

[0362] 实施例6:血浆和脑组织中的苏拉明的测定

[0363] 以下实施例描述了一项小鼠研究,进行所述研究以测定当根据不同治疗方案腹膜内(IP)或鼻内(IN)施用苏拉明向血浆和脑组织的递送。对于所述研究,雄性Fmr1敲除B6.129P2-Fmr1tm1Cgr/J TG小鼠购自Jackson Laboratories,Bar Harbor,缅因州。这些小鼠为大约8周龄。这些小鼠在大脑的多个区域中表现出树突棘异常。这些小鼠中FMRP的缺失诱导RAC1的过度激活,RAC1是Rho GTP酶亚家族的一种蛋白质,其在树突形态和突触功能中起到关键作用。这些B6.129P2-Fmr1tm1Cgr/J TG小鼠提供了认知障碍和神经发育障碍的动物模型。

[0364] 在标准的12小时光照/12小时黑暗的照明周期下(06:00亮灯),将小鼠饲养在受控环境(温度:21.5±4.5℃和相对湿度:35-55%)中的组笼中(基于治疗组,每笼6只小鼠)。小鼠被安置在研究设施中大约一周。记录所有小鼠的体重以用于健康监测目的。

[0365] 将小鼠分为以下5个测试组,每组6只小鼠。

[0366] 第1组:腹膜内(IP)注射苏拉明(20mg/kg),每周施用至动物,从9周龄开始并且持续四周(即,在9、10、11和12周龄时给予)。苏拉明在生理盐水溶液中配制。

[0367] 第2组:腹膜内(IP)注射盐水(5mL/g),每周施用至动物,从9周龄开始并且持续四周(即,在9、10、11和12周龄时给予)。这是对照组。

[0368] 第3组:鼻内(IN)施用如下所述的苏拉明制剂(浓度为100mg/mL×6mL/喷雾),以每鼻孔喷雾一次的形式每天施用一次(每次施用的间隔为大约2分钟以确保吸收),持续28天(在28天时间段内总计56次喷雾),从9周龄开始(即,在9、10、11和12周龄期间每天给予)。

[0369] 第4组:鼻内(IN)施用如下所述的苏拉明制剂(浓度为100mg/mL×6mL/喷雾),以每鼻孔喷雾一次的形式每隔一天施用一次,持续28天(在28天时间段内总计28次喷雾),从9周龄开始(即,在9、10、11和12周龄期间每隔一天给予一次)。

[0370] 第5组:鼻内(IN)施用如下所述的苏拉明制剂(浓度为100mg/mL×6mL/喷雾),以每鼻孔喷雾一次的形式每周施用一次,持续4周(28天)(在8天时间段内总计28次喷雾),从9周龄开始(即,在9、10、11和12周龄期间每周给予一次)。

[0371] 施用至上述第3、4和5组的苏拉明鼻内(IN)制剂如下所示。

[0372]

	重量(克)	组合物百分比
苏拉明六钠盐	16.6	10.3%
甲基倍他环糊精	50	30.9%
苯扎氯铵(50%水溶液)	0.04	0.012%
HPMC E5*	5.6	3.46%
柠檬酸	0.3	0.19%
亚硫酸钠	0.15	0.093%

水	89.13	55.1%
总计	161.82	100%

[0373] *HPMC E5是可从DuPont获得的水溶性纤维素醚聚合物[羟丙基甲基纤维素(HPMC)]。

[0374] 上述制剂通过在温和混合下将苏拉明钠盐溶解在水中来制备。除了环糊精以外的其余成分在混合下添加。然后在混合下添加环糊精直至溶解。使所得溶液在使用前静置2小时。

[0375] 在12周龄结束时从所有小鼠中采集血样。在13-14周龄处死时从所有小鼠中采集脑组织。使用标准样品制备和分析技术来获取数据。

[0376] 该研究的结果在表3中示出。数据表示为每个动物组的平均血浆浓度(以ng/ml和 μ M计)和平均脑组织浓度(以ng/g和mmol/g计)。还提供了每组的平均脑组织与血浆分配比。请注意,这样的计算不适用于施用盐水对照的组(第2组),因为在脑组织中未检测到苏拉明,并且小的血浆水平基本上是来自分析方法的噪声。

表 3					
组	平均血浆浓度		平均脑组织浓度		平均脑组织与血浆分配比 ¹
	ng/ml	μ M	ng/g	mmol/g	
1	18733	14.440	550	0.424	0.030
2	88.3	0.068	BQL ²	BQL ²	NA ³
3	1637	1.262	115.2	0.089	0.069
4	1578	1.217	127.5	0.098	0.089
5	278.7	0.215	91.3	0.070	0.235

[0378] ¹BQL意指低于可量化限。

[0379] ²NA意指不适用。

[0380] ³分配比直接根据原始数据(而不是表中给出的平均值)计算。

[0381] 该研究的结果也在图3至10的图表中示出。

[0382] 图3示出了当通过腹膜内(IP)注射每周施用20mg/kg至小鼠(从9周龄开始并且持续四周)(即在9、10、11和12周龄时给予)时在小鼠中血浆相对于脑组织的苏拉明总浓度(以ng/ml计)的图。

[0383] 图4示出了比较了当每天鼻内(IN)施用持续28天时在小鼠中血浆相对于脑组织的苏拉明总浓度(以ng/ml计)的图。包含IN苏拉明(浓度为100mg/mL $\times$ 6mL/喷雾)的本发明组合物以每鼻孔喷雾一次的形式每天施用一次(每次施用的间隔为大约2分钟以确保吸收),持续28天(在28天时间段内总计56次喷雾),从9周龄开始(即,在9、10、11和12周龄期间每天给予)。

[0384] 图5示出了比较了当每隔一天鼻内(IN)施用持续28天时在小鼠中血浆相对于脑组织的苏拉明总浓度(以ng/ml计)的图。包含IN苏拉明(浓度为100mg/mL $\times$ 6mL/喷雾)的本发明组合物以每鼻孔喷雾一次的形式每隔一天施用一次(每次施用的间隔为大约2分钟以确保吸收),持续28天(在28天时间段内总计28次喷雾),从9周龄开始(即,在9、10、11和12周龄

期间每天给予)。

[0385] 图6示出了比较了当每周一次鼻内 (IN) 施用持续4周时在小鼠中血浆相对于脑组织的苏拉明总浓度 (以ng/ml计) 的图。包含IN苏拉明 (浓度为100mg/mL×6mL/喷雾) 的本发明组合物以每鼻孔喷雾一次的形式每周施用一次 (每次施用的间隔为大约2分钟以确保吸收), 持续4周 (28天) (在28天时间段内总计8次喷雾), 从9周龄开始 (即, 在9、10、11和12周龄期间每天给予)。

[0386] 图7示出了比较了当通过腹膜内 (IP) 注射 (每周一次持续4周 (28天))、鼻内 (IN) (每天一次持续28天)、鼻内 (IN) (每隔一天持续28天) 和鼻内 (IN) (每周一次持续4周 (28天)) 施用在小鼠中血浆的苏拉明总百分比的图。

[0387] 图8示出了比较了当通过腹膜内 (IP) 注射 (每周一次持续4周 (28天))、鼻内 (IN) (每天一次持续28天)、鼻内 (IN) (每隔一天持续28天) 和鼻内 (IN) (每周一次持续4周 (28天)) 施用在小鼠中脑组织的苏拉明总百分比的图。

[0388] 图9示出了比较了当通过腹膜内 (IP) 注射 (每周一次持续4周 (28天))、鼻内 (IN) (每天一次持续28天)、鼻内 (IN) (每隔一天持续28天) 和鼻内 (IN) (每周一次持续4周 (28天)) 施用在小鼠中血浆相对于脑组织的苏拉明总百分比的图。

[0389] 图10示出了比较了当通过腹膜内 (IP) 注射 (每周一次持续4周 (28天))、鼻内 (IN) (每天一次持续28天)、鼻内 (IN) (每隔一天持续28天) 和鼻内 (IN) (每周一次持续4周 (28天)) 施用在小鼠中苏拉明的脑组织与血浆分配比的图。

[0390] 这些结果表明, 可以鼻内递送抗嘌呤能剂诸如苏拉明以达到血浆和脑组织水平, 并且可以观察到脑组织与血浆分配比的变化。这些结果表明, 抗嘌呤能剂诸如苏拉明可以通过鼻内 (IN) 施用递送至哺乳动物的大脑。

[0391] 实施例7: 光/暗偏好测试 (LDT) 中的苏拉明的评价: 焦虑样行为

[0392] 目标

[0393] 这项光/暗研究的目的是在B6.129P2-Fmr1tm1Cgr/J转基因 (TG) 小鼠中测试各种苏拉明制剂以及治疗途径和方案以确定与作为对照的野生小鼠和用IP盐水治疗的TG小鼠相比, 这些药剂是否对改善非条件性焦虑样行为有影响。

[0394] 背景:

[0395] 光/暗偏好测试 (light/dark preference test, LDT) 是药理学中最广泛使用的测试之一, 以测量小鼠中的非条件性焦虑样行为。所述测试基于小鼠对明亮照明区域的自然厌恶以及它们响应于新环境和光线的自发探索行为。参见Takao, K. 等人, 小鼠的光/暗穿箱测试 (Light/dark Transition Test for Mice). J. Vis. Exp. (1), e104, doi:10.3791/104 (2006)。

[0396] 本研究使用SmartCage™系统, 这是一种自动化的非侵入性啮齿动物行为监测系统, 其使得生物医学研究人员能够通过一致且准确地监测啮齿动物家居笼活动和行为来进行各种神经行为测定。参见Xie X.S. 等人 (2012) 使用SmartCage™系统在家居笼中进行啮齿动物行为评估 (Rodent Behavioral Assessment in the Home Cage Using the SmartCage™ System). 于: Chen J., Xu X.M., Xu Z., Zhang J. (编辑) Animal Models of Acute Neurological Injuries II. Springer Protocols Handbooks. Humana Press, Totowa, NJ。

[0397] 材料和方法:

[0398] 实验臂(治疗组):

[0399] 1.N=6只小鼠/组。

[0400] 2.所有行为测试包括一组未经治疗的野生型对照。

[0401] 3.各组的给药如下所示:

[0402] a.第1组:腹膜内(IP)苏拉明(20mg/kg),每周施用至动物,从9周龄开始并且继续四周(即,在9、10、11和12周龄时给予)。

[0403] b.第2组:IP盐水(5mL/g),每周施用至动物,从9周龄开始并且继续四周(即,在9、10、11和12周龄时给予)。

[0404] c.第3组:鼻内(IN)苏拉明制剂(浓度为100mg/mL×6μL/喷雾),以每鼻孔喷雾一次的形式每天施用一次(每次施用的间隔为大约2分钟以确保吸收),持续28天(在28天时间段内总计56次喷雾),从9周龄开始(即,在9、10、11和12周龄期间每天给予)。

[0405] d.第4组:IN苏拉明制剂(浓度为100mg/mL×6μL/喷雾),以每鼻孔喷雾一次的形式每隔一天施用一次,持续28天(在28天时间段内总计28次喷雾),从9周龄开始(即,在9、10、11和12周龄期间每隔一天给予一次)。

[0406] e.第5组:IN苏拉明制剂(浓度为100mg/mL×6μL/喷雾),以每鼻孔喷雾一次的形式每周施用一次,持续4周(28天)(在8天时间段内总计28次喷雾),从9周龄开始(即,在9、10、11和12周龄期间每周给予一次)。

[0407] 4.所有组(第1-5组)的行为测试在IN给药最后一天后的第二天开始(13-14周龄)。

[0408] 5.正好在第13周开始行为测试之前,在12周龄结束时从所有小鼠中采集血样(PK测试)。

[0409] 6.在13-14周龄结束时,在所有行为测试结束时,从处死后的所有小鼠中采集脑组织(用于生化测试)。

[0410] 动物

[0411] 雄性B6.129P2-Fmr1tm1Cgr/J TG小鼠购自Jackson Laboratories,Bar Harbor,缅因州。这些小鼠为大约8(±1)周龄。在标准的12小时光照/12小时黑暗的照明周期下(06:00亮灯),将小鼠饲养在受控环境(温度:21.5±4.5℃/相对湿度:35-55%)中的组笼中(基于治疗组,每笼6只小鼠)。在一周的剩余时间里,小鼠被安置在研究设施中。下周一开始给药。记录所有小鼠的体重以用于健康监测目的。

[0412] 实验方法:

[0413] 如研究发起人所指示的,在28天内进行给药。

[0414] 1.在光/暗测试开始之前,将暗箱(红色透明外壳,带有供小鼠进入的开口)放置在SmartCage™中。

[0415] 2.将单独的小鼠放置在开放/非暗箱侧(“光区”),其头部背对暗箱。

[0416] 3.然后允许小鼠在10分钟的跨度内自由探索SmartCage™并且自行决定进入暗箱“暗区”。

[0417] 4.基于SmartCage™监测在光区中花费的时间、光区进入数和在光区中花费的%时间,对焦虑样行为进行评估。

[0418] 5.基于治疗组(IP苏拉明、IP盐水、IN苏拉明-每天、IN苏拉明-每隔一天、IN苏拉

明-每周),将数据分组在一起。

[0419] 6.将野生型对照数据(在开始B6.129P2-Fmr1tm1Cgr/J TG小鼠的给药之前分开收集)添加到最终数据分析中,以作为首次接受试验的雄性C57BL/6小鼠的比较。

[0420] 光/暗测试不需要任何事先训练。没有食物或水被保留,并且仅使用自然压力因素诸如光。四个类似校准的SmartCages™用于同时记录四只小鼠(示例笼如下所示)。所有光/暗测试都在一天内完成。

[0421] 光/暗测试设置-暗箱放置在透明家居笼中;家居笼放置在SmartCage™监测系统中。

[0422] 结果:

[0423] 暗区进入潜伏期:

[0424] 图11示出了进入暗区的时间(以秒测量)。小鼠可以在SmartCage™中漫游,以及自行决定进出暗箱。如果小鼠并未进入暗箱,则该小鼠被分配600秒的进入潜伏期(实验允许的10分钟截止时间)用于统计目的。

[0425] 光区时间&在光区中花费的时间(%):

[0426] 图12A示出了在光区中花费的总时间(以分钟测量),并且图12B示出了在光区中花费的时间(以百分比表示)。在图12A中,用IN苏拉明-每周治疗的TG小鼠显示出在光区中的时间最长(约6.5分钟)。在评估在光区中花费的时间的总百分比时(图12B),用IN苏拉明-每周治疗的TG小鼠显示出在光区中花费的时间的百分比较高。所有其他治疗组在总时间和在光区中花费的时间百分比方面与WT小鼠相当(约5-6分钟和约50-60%的时间)。

[0427] 光区进入:

[0428] 图13示出了光区进入数。所有治疗组都显示出与WT小鼠相比相当或增加的光区进入数。

[0429] 讨论:

[0430] 暗区进入潜伏期:

[0431] 首次接受试验的WT小鼠偏好环境中较暗的区域而不是较亮的区域。然而,当出现新环境时,WT小鼠倾向于探索。这两种相互矛盾的倾向导致可观察到的焦虑样症状。在评估图11中的暗区进入潜伏期时,WT小鼠几乎立即(7.5秒)进入暗箱,这与WT小鼠对黑暗环境的偏好一致(甚至在新环境中)。

[0432] TG动物在进入暗区时表现出潜伏期,并且在亮区花费更多时间,这可能是由于研究药物治疗减少了焦虑。由于所有IN苏拉明组都显示出相当的进入潜伏期(约60-65秒),这表明给药频率不会显著影响TG小鼠中的焦虑样反应。然而,IN苏拉明治疗的TG小鼠表现出暗区进入潜伏期是IP苏拉明和IP盐水组的潜伏期(约30-40秒)的几乎两倍,意味着施用途径影响结果。

[0433] 光区时间和在光区中花费的时间(%):

[0434] 在焦虑模型诸如光/暗测试中,WT小鼠在光/暗装置的光区中花费的时间较少。然而,用抗焦虑治疗剂治疗的WT小鼠通常表现出在光区花费的时间增加。在评估在光区中花费的总时间时(图12A),观察到用各种治疗剂治疗的TG小鼠都具有与WT对照组相当的在光区中花费的总时间,其中三组显示处在光区中的时间增加。用IN苏拉明(每周)治疗的TG小鼠显示出在光区中的时间量显著增加(约6.5分钟)。

[0435] 光区进入:光区进入的评估是衡量风险规避的间接方法,因为其与焦虑有关。鉴于WT小鼠偏好黑暗外壳,小鼠将“冒险”通过离开暗箱并且重新进入光区来使自己处于不太理想/不太舒适的环境中。一般而言,与WT相比,TG治疗小鼠表现出相当或更大的重新进入光区的意愿。这不仅表明将自身暴露于光区的意愿,而且考虑到这两组在光区中花费的总时间为5至6分钟,这也同样显示出探索整个室的倾向(暗区和光区二者)。

[0436] 结论:

[0437] 在这项研究中,用苏拉明治疗的TG动物表现出与在WT小鼠中观察到的那些相比更长的暗区进入潜伏期,但是总时间和在光区中花费的时间百分比以及光区进入数类似。在用IN苏拉明(每周)治疗的TG小鼠中观察到最实质和显著的效果(显示出在光区中的时间量增加)。本研究中的观察结果表明,苏拉明的鼻内施用可以导致焦虑样行为的减少和正常探索活动的恢复。

[0438] 实施例8:运动活动测试中的苏拉明的评价

[0439] 目标

[0440] 这项运动活动研究的目的是在B6.129P2-Fmr1^{tm1Cgr}/J转基因(TG)小鼠中测试各种苏拉明制剂以及治疗途径和方案以确定与作为对照的野生小鼠和用IP盐水治疗的TG小鼠相比,这些制剂是否对运动活动、唤醒和探索意愿有影响。

[0441] 背景:

[0442] 运动活动测试是一种在啮齿动物中建立自发运动活动、唤醒和探索意愿的方法。其是最常见的啮齿动物测试之一,可以用于测试各种药物对野生动物和遗传改造动物二者中动物行为的影响。参见Seibenhener ML、Wooten MC.使用开阔地迷宫测量小鼠中的运动和焦虑样行为(Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice).JVis Exp.2015;(96):E52434.2015年2月6日公开.Doi:10.3791/52434。

[0443] 本研究使用SmartCageTM系统,这是一种自动化的非侵入性啮齿动物行为监测系统,其使得生物医学研究人员能够通过一致且准确地监测啮齿动物家居笼活动和行为来进行各种神经行为测定。参见Xie等人,2012(同上)。

[0444] 材料和方法:

[0445] 实验臂(治疗组):

[0446] 1.N=6只小鼠/组。

[0447] 2.所有行为测试包括一组未经治疗的野生型对照。

[0448] 3.各组的给药如下所示:

[0449] a.第1组:IP苏拉明(20mg/kg),每周施用至动物,从9周龄开始并且继续四周(即,在9、10、11和12周龄时给予)。

[0450] b.第2组:IP盐水(5mL/g),每周施用至动物,从9周龄开始并且继续四周(即,在9、10、11和12周龄时给予)。

[0451] c.第3组:IN苏拉明制剂(浓度为100mg/mL×6μL/喷雾),以每鼻孔喷雾一次的形式每天施用一次(每次施用的间隔为大约2分钟以确保吸收),持续28天(在28天时间段内总计56次喷雾),从9周龄开始(即,在9、10、11和12周龄期间每天给予)。

[0452] d.第4组:IN苏拉明制剂(浓度为100mg/mL×6μL/喷雾),以每鼻孔喷雾一次的形式

每隔一天施用一次,持续28天(在28天时间段内总计28次喷雾),从9周龄开始(即,在9、10、11和12周龄期间每隔一天给予一次)。

[0453] e. 第5组:IN苏拉明制剂(浓度为100mg/mL×6μL/喷雾),以每鼻孔喷雾一次的形式每周施用一次,持续4周(28天)(在8天时间段内总计28次喷雾),从9周龄开始(即,在9、10、11和12周龄期间每周给予一次)。

[0454] 4. 所有组(第1-5组)的行为测试在IN给药最后一天后的第二天开始(13-14周龄)。

[0455] 5. 正好在13周龄开始行为测试之前,在12周龄结束时从所有小鼠中采集血样(用于PK测试)。

[0456] 6. 在13-14周龄结束时,在所有行为测试结束时,从处死后的所有小鼠中采集脑组织(用于生化测试)。

[0457] 动物:

[0458] 雄性B6.129P2-Fmr1tm1Cgr/J TG(TG)小鼠购自Jackson Laboratories,Bar Harbor,缅因州。这些小鼠为大约8(±1)周龄。在标准的12小时光照/12小时黑暗的照明周期下(06:00亮灯),将小鼠饲养在受控环境(温度:21.5±4.5℃/相对湿度:35-55%)中的组笼中(基于治疗组,每笼6只小鼠)。在一周的剩余时间里,小鼠被安置在研究设施中。下周一开始给药。记录所有小鼠的体重以用于健康监测目的。

[0459] 实验方法:

[0460] 如研究发起人所指示的,在28天内进行给药。如下进行第二项行为测试,即SmartCage™运动监测:在第一批32只小鼠中从第一天的12小时黑暗周期开始(约5:00PM)到第二天早晨,以及在第二批32只小鼠中从第二天的12小时黑暗周期开始到第三天早晨。

[0461] 1. 第1天至第2天:使用SmartCage™评估运动活动记录。

[0462] 2. B6.129P2-Fmr1tm1Cgr/J TG小鼠在放置于SmartCage™之前大约30分钟接受IP注射和IN给药。

[0463] 3. 在4:00PM(12小时:12小时暗/光周期的黑暗阶段开始之前1小时),将小鼠放置于SmartCage™。

[0464] 4. 对在SmartCage™中自由移动的小鼠进行约24小时的运动记录。

[0465] 5. 每幅图的前12小时(灰色阴影框)代表暗/光周期的黑暗阶段。

[0466] 6. 将野生型(WT)对照数据(在开始B6.129P2-Fmr1tm1Cgr/J TG小鼠的给药之前分开收集)添加到最终数据分析中,以作为首次接受试验的雄性C57BL/6小鼠的比较。

[0467] 将每只小鼠放置在SmartCage™内的干净塑料透明家居笼中。每个家居笼都包含垫料薄层(Sani Chips,7090A;Envigo)。将啮齿动物饲料(Teklab Diet 2018,Envigo)和水凝胶(Hydrogel,Teklab)直接放置在家居笼中。在SmartCage™运动记录的整个持续时间(约24小时)内,小鼠在它们的家居笼内自由漫游。评估每只小鼠的活动时间、行进距离和直立活动。基于治疗组分析数据。

[0468] 结果:

[0469] 活动时间:图14示出了小鼠活动时间(以分钟计)/小时时间块。来自所有治疗组的小鼠在黑暗周期期间表现出更高的活动,而在光照周期期间表现出更低的活动水平。

[0470] 与WT对照组相比,所有IN苏拉明(每天、每周和每2天)治疗组都显示出更大的活动。相比之下,IP盐水组显示出与WT对照组相当的活动时间,并且在一些时间块中显示出低

于WT对照组的活性时间。

[0471] 行进距离:图15示出了每小时时间块绘制的行进距离(以厘米计)。与WT和IP盐水对照组相比,来自所有药物治疗组的小鼠显示出显著更大的行进距离。这一发现在黑暗时间段期间特别明显,而在光照时间段期间不太一致。

[0472] 直立计数:图16示出了直立计数/小时时间快。与WT对照组和IP盐水组相比,来自IN和IP施用药物治疗组的药物治疗小鼠表现出更大和更频繁的直立活动。用IN苏拉明(每2天)治疗的TG小鼠表现出与WT对照组相当的直立活动。

[0473] 讨论:

[0474] 活动时间:活动时间量化小鼠活动多长时间,包括行走/奔跑、直立和/或旋转所花费的时间。来自所有治疗组的小鼠在黑暗周期期间表现出更高的活动,而在光照周期期间表现出最少的活动(图14),这与其活动的自然模式一致。鉴于小鼠是夜间活动的啮齿动物,这是意料之中的。由于监测是在黑暗周期开始时开始的,大多数活动发生在运动记录的前12小时内。一般来说,如果在运动记录开始前不久进行,则经由各种施用途径给药会影响运动活动。活动的早期峰值可能是由于最近注射所导致的多动,而活动的突然减少可能是由于小鼠的身体障碍(如果药物施用途径导致身体不适)。

[0475] 与WT对照组相比,所有IN苏拉明(每天、每周和每2天)治疗组都显示出更大的活动。相比之下,IP盐水组显示出与WT对照组相当的活动(如果不是略低的话)。总之,这些结果表明实际给药本身并不直接引起运动活动的变化。结果表明积极治疗干预导致运动反应增加。

[0476] 行进距离:行进距离量化小鼠在漫游和探索各自的家居笼时在x轴和y轴上覆盖的总距离(以cm计)。与WT和IP盐水对照组相比,来自所有药物治疗组的小鼠显示出显著更大的行进距离(图15)。鉴于来自所有药物治疗组的小鼠(无论药物施用途径如何)都表现出增加的行进距离,这表明药物治疗均不损害运动活动或增加焦虑。相比之下,药物治疗小鼠显示出增加的探索其家居笼的意愿。这一发现与在光/暗测试中观察到的焦虑减轻的迹象一致(参见焦虑样行为的光/暗测试的报告)。

[0477] 直立计数:直立活动测量小鼠从其后肢向上伸展以到达其家居笼顶部的次数。直立活动由SmartCage™的Z轴上的红外传感器测量。鉴于食物和水(水凝胶)均直接放在每只小鼠家居笼的地板上,小鼠无需伸手获取食物和/或水。因此,由SmartCage™测量的直立计数用作小鼠一般活动和探索行为的指示。如在活动时间和行进距离图中观察到的,与WT对照组和IP盐水组相比,来自IN和IP施用组的药物治疗小鼠通常表现出更频繁的直立活动。当这些结果与活动时间和行进距离数据相结合时,直立活动数据一致地显示出所有苏拉明治疗组的活动、唤醒和探索意愿增加。

[0478] 结论:

[0479] 总之,这项运动活动的发现表明,与用IP盐水治疗的TG小鼠或野生型小鼠相比,用研究药物治疗的雄性B6.129P2-Fmr1tm1Cgr/J TG小鼠表现出增加的活动和更大的探索其环境的意愿。当结合光/暗数据查看运动活动数据时,可合理地表明:使用抗嘌呤能药物进行治疗导致在黑暗阶段中动物环境探索更多,这可能是由于焦虑减轻。在光照阶段期间,治疗均不改变小鼠的非活动状态(或完全睡眠)。

[0480] 实施例9:社交互动研究中的苏拉明的评价

[0481] 目标

[0482] 这项社交互动活动研究的目的是在B6.129P2-Fmr1tm1Cgr/J转基因(TG)小鼠中测试各种苏拉明制剂以及治疗途径和方案以确定与作为对照的野生小鼠和用IP盐水治疗的TG小鼠相比,这些药剂是否对社交行为有影响。

[0483] 背景:

[0484] 社交互动是众多物种(包括小鼠和大鼠)的生物学的基本和适应性组分。社会认可对于定义社会的网络和关系的结构和稳定性至关重要。多种神经精神障碍的特征在于社交行为和社会认可的中断,包括抑郁、自闭症谱系障碍、双相障碍(bipolar disorder)、强迫症(obsessive-compulsive disorder)和精神分裂症(schizophrenia)。

[0485] 小鼠社交互动研究采用三室范式测试(被称为Crawley社交性),并且对社交新奇性方案的偏好已成功用于研究几个近交和突变小鼠系的社会归属(social affiliation)和社会记忆。测试是基于受试小鼠在两次实验环节期间自由选择三个箱的隔室中的任何一个中度过时间的原则,包括与一只或两只不熟悉的小鼠间接接触。为了量化实验小鼠的社会倾向,主要任务是测量a)与新小鼠一起度过的时间和b)对新小鼠与熟悉小鼠的偏好。因此,该测试的实验设计允许评价社交行为的两个关键但可区分的方面:社会归属/动机,以及社交记忆和新奇性。在这种情况下,“社交性”被定义为相比于在相同但空旷的室内单独度过的时间的与另一只小鼠共度时光的倾向。参见Moy SS、Nadler JJ、Perez A、Barbaro RP、Johns JM、Magnuson TR、Piven J、Crawley JN.五种近交品系的社交性和对社交新奇性的偏好:一种评估小鼠自闭症样行为的方法(Sociability and preference for social novelty in five inbred strains:an approach to assess autistic-like behavior in mice).Genes,brain,and behavior.2004;3:287-302;以及Kaidanovich-Beilin O、Lipina TV、Takao K、Eede Mvan、Hattori S、Laliberte C、Khan M、Okamoto K、Chambers JW、Fletcher PJ、Macaulay K、Doble BW、Henkelman M、Miyakawa T、Roder J、Woodgett JR.GSK-3 α 突变小鼠的大脑结构和行为异常(Abnormalities in brain structure and behavior in GSK-3 α mutant mice).Molecular brain.2009;2:35-35。

[0486] 本研究使用SmartCageTM系统,这是一种自动化的非侵入性啮齿动物行为监测系统,其使得生物医学研究人员能够通过一致且准确地监测啮齿动物家居笼活动和行为来进行各种神经行为测定。参见Xie等人,2012(同上)。

[0487] 材料和方法:

[0488] 实验臂(治疗组):

[0489] 1.N=6只小鼠/组。

[0490] 2.所有行为测试包括一组未经治疗的野生型对照。

[0491] 3.各组的给药如下所示:

[0492] a.第1组:IP苏拉明(20mg/kg),每周施用至动物,从9周龄开始并且继续四周(即,在9、10、11和12周龄时给予)。

[0493] b.第2组:IP盐水(5mL/g),每周施用至动物,从9周龄开始并且继续四周(即,在9、10、11和12周龄时给予)。

[0494] c.第3组:IN苏拉明制剂(浓度为100mg/mL $\times$ 6 μ L/喷雾),以每鼻孔喷雾一次的形式每天施用一次(每次施用的间隔为大约2分钟以确保吸收),持续28天(在28天时间段内总计

56次喷雾),从9周龄开始(即,在9、10、11和12周龄期间每天给予)。

[0495] d.第4组:IN苏拉明制剂(浓度为100mg/mL×6μL/喷雾),以每鼻孔喷雾一次的形式每隔一天施用一次,持续28天(在28天时间段内总计28次喷雾),从9周龄开始(即,在9、10、11和12周龄期间每隔一天给予一次)。

[0496] e.第5组:IN苏拉明制剂(浓度为100mg/mL×6μL/喷雾),以每鼻孔喷雾一次的形式每周施用一次,持续4周(28天)(在8天时间段内总计28次喷雾),从9周龄开始(即,在9、10、11和12周龄期间每周给予一次)。

[0497] 4.所有组(第1-5组)的行为测试在IN给药最后一天后的第二天开始(13-14周龄)。

[0498] 5.正好在13周龄开始行为测试之前,在12周龄结束时从所有小鼠中采集血样(用于PK测试)。

[0499] 6.在13-14周龄结束时,在所有行为测试结束时,从处死后的所有小鼠中采集脑组织(用于生化测试)。

[0500] 动物:

[0501] 雄性B6.129P2-Fmr1tm1Cgr/J TG(TG)小鼠购自Jackson Laboratories,Bar Harbor,缅因州。这些小鼠为大约8(±1)周龄。在标准的12小时光照/12小时黑暗的照明周期下(06:00亮灯),将小鼠饲养在受控环境(温度:21.5±4.5℃/相对湿度:35-55%)中的组笼中(基于治疗组,每笼6只小鼠)。在一周的剩余时间里,小鼠被安置在研究设施中。下周一开始给药。记录所有小鼠的体重以用于健康监测目的。

[0502] 实验方法:

[0503] 如研究发起人所指示的,在28天内进行给药。第三项行为测试即社交互动测试在4天后进行并完成。每只受试小鼠都与来自不同家居笼的陌生小鼠配对。这确保每只受试小鼠与陌生小鼠不具有任何先前互动,从而最大限度地减少潜在偏差。

[0504] 1.使用SmartCage™的社交互动-将社交互动啮齿动物隔室连接到小鼠SmartCage™室的远端。

[0505] 2.习惯化-对于0-5分钟,受试小鼠可以在室内自由漫游,而两个社交互动隔室都是空的。

[0506] 3.对任一区域(区域1-陌生人1隔室;区域3-陌生人2隔室)显示出强烈偏好的小鼠应被弃用;显示出约50:50探索的小鼠展示出无偏见的探索。

[0507] 4.社交性-在5-10分钟,将陌生人1小鼠放置于区域1中的陌生人1隔室;允许受试小鼠自由探索。

[0508] 5.社交新奇性-在10-15分钟,将陌生人2小鼠放置于区域2中的陌生人4隔室;允许小鼠自由探索。

[0509] 6.分析区域1和区域3中的占用时间,并且用于评估受试小鼠对任一只陌生小鼠的偏好程度(如果有的话)。

[0510] 7.理想地,陌生小鼠的年龄/体重和性别应与受试小鼠类似,但是不应来自同一个家居笼。

[0511] 8.将野生型对照数据(在开始B6.129P2-Fmr1tm1Cgr/J TG小鼠的给药之前分开收集)添加到最终数据分析中,以作为首次接受试验的雄性C57BL/6小鼠的比较。

[0512] 在每次社交互动测试之间,用浸泡0.05%漂白剂的轻毛巾彻底擦拭整个社交互动

室和陌生人隔室。这减少了先前试验中的气味影响测试对象行为的可能性。另外,社交互动测试是在荧光顶灯下进行的,所述荧光顶灯为整个社交互动室(包括两个社交互动隔室)提供相同的照明。

[0513] 结果:

[0514] 习惯化:

[0515] 在社交互动测试(习惯化阶段)的前五分钟,每只受试小鼠都可以自由探索社交互动室。此时,两个“陌生人”隔室是空的。一般来说,首次接受试验的WT小鼠会平等地探索和侦查两个陌生人隔室。SmartCage™的占用时间评估直接测量每只受试小鼠花费多少时间探索和侦查每个陌生人隔室。

[0516] 图17示出了0-5分钟的习惯化和每个陌生人隔室的占用时间(分钟)。所有药物治疗组以及WT对照组都显示出探索两个陌生人隔室所花费的时间相同。该习惯化阶段确保WT对照小鼠以及TG小鼠在引入陌生小鼠之前并未显示出对社交互动室的任一侧的固有偏见。

[0517] 每个隔室的每个TG治疗组的活动水平和占用时间与从WT对照组观察到的相当。

[0518] 社交性:

[0519] 图18示出了社交性分析(5-10分钟),其描绘了陌生人隔室1和2的每个治疗组的占用时间(以分钟计)。随着陌生人1小鼠的引入,受试小鼠的关注点转向陌生人1隔室。陌生人1隔室的占用时间长于陌生人2隔室的占用时间。与TG小鼠相比,WT小鼠在陌生人1隔室中花费的时间更多。值得注意的是,TG小鼠在陌生人隔室2中的占用时间全都长于WT小鼠,即使其是空的。

[0520] 社交新奇性:

[0521] 图19示出了具有在陌生人隔室2中引入新小鼠后在每个隔室中测量的占用时间(分钟)的社交新奇性。随着陌生人2小鼠的引入,受试小鼠的关注点转向陌生人2隔室。来自所有药物治疗TG组以及WT对照组的小鼠在社交新奇性阶段(10-15分钟)期间在陌生人2隔室中显示出更长的占用时间,其中WT小鼠显示出最长的占用时间。

[0522] 讨论:

[0523] 如社交互动测试的习惯化阶段所证明的,所有TG小鼠药物治疗组以及WT对照组都具有良好的习惯化,并且显示出探索两个陌生人隔室所花费的时间量相等。

[0524] 在社交性阶段中,与WT小鼠相比,用研究药物治疗的TG小鼠与陌生人1小鼠一起度过的时间更少,并且没有建立明确的社交性。

[0525] 同样,当引入陌生人2小鼠时,这些相同的组都将其注意力明显转移到陌生人2隔室。然而,WT小鼠仍然显示出最长的与陌生人2小鼠的占用时间,表明与用研究药物治疗的TG小鼠相比更高水平的社交性。对这种差异的一个可能解释可能是,WT小鼠并未经受相同的给药范式,也并未像TG小鼠一样长时间与笼伙伴一起居住。因此,由于社交互动的独创性,WT小鼠可能表现出更强的社交性。

[0526] 与WT小鼠相比,TG小鼠典型地显示出更少的社交性。如在光/暗测试数据和运动活动测试数据中观察到的,药物治疗的TG小鼠显示出焦虑减轻和探索倾向,这可能导致社交性增强。该测试还需要完整的短期记忆,因为当引入陌生人2小鼠时,小鼠必须回忆起它们先前与陌生人1小鼠进行过社交。完整的短期记忆允许社交新奇性/社交区分。这些发现表明,药物治疗的TG小鼠显示出改善的社交性和完整的短期记忆,尽管这些能力并未完全恢

复,如在WT小鼠中观察到的。

[0527] 结论:

[0528] 与本研究中的其他行为评估一致,B6.129P2-Fmr1tm1Cgr/J TG小鼠在社交性和对社交新奇性的反应方面表现出缺陷。这项社交互动研究的发现表明,用研究药物治疗的B6.129P2-Fmr1tm1Cgr/J TG小鼠展现出社交活动增加、焦虑减轻以及更大的探索其环境的意愿。总之,其还表明抗嘌呤能受体药物可以恢复正常的短期记忆和社交活动,而这在这种TG小鼠模型中通常是不存在的。

[0529] 实施例10:空间学习和记忆研究中的苏拉明的评价

[0530] 目标

[0531] Morris水迷宫研究的目的是在B6.129P2-Fmr1tm1Cgr/J转基因(TG)小鼠中测试各种苏拉明制剂以及治疗途径和方案以确定与作为对照的野生小鼠和用IP盐水治疗的TG小鼠相比,这些药剂是否对空间学习和记忆有影响。

[0532] 背景:

[0533] Morris水迷宫测试(MWM)是行为神经科学中最广泛使用的任务之一,用于研究空间学习和记忆的心理过程和神经机制。MWM是空间学习的啮齿动物测试,其依赖于远端线索以从围绕开放游泳场周边的起点导航以定位水下逃逸平台。空间学习通过重复试验来评估,并且参考记忆由平台不存在时对平台区域的偏好决定。在其中平台被移除的探索试验期间评估空间记忆,并且测量动物在平台先前定位的空间位置(目标象限)中搜索所花费的时间百分比。人类的空间学习是陈述性记忆的一种形式。若干研究使用具有虚拟迷宫和导航任务的计算机系统来评估人类空间学习和记忆。

[0534] MWM已被证实是一种稳健且可靠的测试,其与海马突触可塑性和NMDA受体功能密切相关。参见Vorhees,C.、Williams,M.Morris水迷宫:用于评估空间和相关形式的学习和记忆的程序(M.Morris water maze:procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory).Nat Protoc 1,848-858(2006)。

[0535] 本研究使用SmartCage™系统,这是一种自动化的非侵入性啮齿动物行为监测系统,其使得生物医学研究人员能够通过一致且准确地监测啮齿动物家居笼活动和行为来进行各种神经行为测定。参见Xie等人,2012(同上)。

[0536] 材料和方法:

[0537] 实验臂(治疗组):

[0538] 1.N=6只小鼠/组。

[0539] 2.所有行为测试包括一组未经治疗的野生型(WT)对照。

[0540] 3.各组的给药如下所示:

[0541] a.第1组:IP苏拉明(20mg/kg),每周施用至动物,从9周龄开始并且继续四周(即,在9、10、11和12周龄时给予)。

[0542] b.第2组:IP盐水(5mL/g),每周施用至动物,从9周龄开始并且继续四周(即,在9、10、11和12周龄时给予)。

[0543] c.第3组:IN苏拉明制剂(浓度为100mg/mL×6μL/喷雾),以每鼻孔喷雾一次的形式每天施用一次(每次施用的间隔为大约2分钟以确保吸收),持续28天(在28天时间段内总计56次喷雾),从9周龄开始(即,在9、10、11和12周龄期间每天给予)。

[0544] d.第4组:IN苏拉明制剂(浓度为100mg/mL×6μL/喷雾),以每鼻孔喷雾一次的形式每隔一天施用一次,持续28天(在28天时间段内总计28次喷雾),从9周龄开始(即,在9、10、11和12周龄期间每隔一天给予一次)。

[0545] e.第5组:IN苏拉明制剂(浓度为100mg/mL×6μL/喷雾),以每鼻孔喷雾一次的形式每周施用一次,持续4周(28天)(在8天时间段内总计28次喷雾),从9周龄开始(即,在9、10、11和12周龄期间每周给予一次)。

[0546] 4.所有组(第1-5组)的行为测试在IN给药最后一天后的第二天开始(13-14周龄)。

[0547] 5.正好在13周龄开始行为测试之前,在12周龄结束时从所有小鼠中采集血样(用于PK测试)。

[0548] 6.在13-14周龄结束时,在所有行为测试结束时,从处死后的所有小鼠中采集脑组织(用于生化测试)。

[0549] 动物:

[0550] 雄性B6.129P2-Fmr1tm1Cgr/J TG(TG)小鼠购自Jackson Laboratories,Bar Harbor,缅因州。这些小鼠为大约8(±1)周龄。在标准的12小时光照/12小时黑暗的照明周期下(06:00亮灯),将小鼠饲养在受控环境(温度:21.5±4.5℃/相对湿度:35-55%)中的组笼中(基于治疗组,每笼6只小鼠)。在一周的剩余时间里,小鼠被安置在研究设施中。下周一开始给药。记录所有小鼠的体重以用于健康监测目的。

[0551] 实验方法:

[0552] 如研究发起人所指示的,在28天内进行给药。第四项行为测试即Morris水迷宫在第33天至第37天的五天内进行。在前四天,每只小鼠在Morris水迷宫中进行四次试验。在每次试验中,每只小鼠都有60秒的时间来定位并且使自己位于目标平台上。如果小鼠在60秒后仍未定位目标平台,则测试人员手动地将小鼠放置在平台上并且使小鼠在平台上停留至少20秒。在第5天,每只小鼠在探索测试之前进行两次试验运行。完成两次第5天试验运行后,将目标平台从Morris水迷宫箱中移除。在探索测试中,每只小鼠被释放到水箱中并且允许在箱中自由漫游。记录每只小鼠在目标平台最初所在区域中花费的时间量。

[0553] 1.Morris水迷宫:水池直径为105cm;用可洗的白漆使水着色;水温为21-22摄氏度;平台具有8.5cm×13.5cm的尺寸并且位于水下1.5cm深。

[0554] 2.水迷宫训练开始之前,将每只小鼠在平台顶部上放置20秒。

[0555] 3.小鼠从箱的不同位置释放以寻找平台;使用ANY-迷宫行为跟踪软件自动记录小鼠到达平台的延潜伏期。

[0556] 4.获取:5天的训练。前4天是每天4次试验,并且第5天训练是探索测试前的2次试验。如果动物无法找到平台,则将小鼠在平台上放置20秒。

[0557] 5.到达平台后,立即将小鼠从平台移除并且放回其家居笼中,由此完成获取训练。

[0558] 6.探索测试:训练后,将小鼠从水箱的不同位置释放,以寻找从水中移除的原平台。

[0559] 7.小鼠可以自由探索平台达1分钟,并且Any-迷宫行为跟踪软件记录在目标象限中花费的时间。

[0560] 8.空间学习和记忆行为是基于在目标象限中花费的时间的软件监测、目标象限进入数和在目标象限中花费的%时间来评估的。

[0561] 基于治疗组(野生型、IP苏拉明、IP盐水、IN苏拉明-每天、IN苏拉明-每隔一天和IN苏拉明-每周),将数据分组在一起。Morris水迷宫箱用被染成乳白色的水填充。这允许MWM软件以更高的分辨率跟踪黑色小鼠,同时在视频播放中提供小鼠和水之间的更大的对比度。每次试验后,手动地将每只小鼠从水中移除,并且由测试人员使用软毛巾手动擦干技术轻轻擦干。然后将受试小鼠放置在加热灯下以确保干燥,同时也降低体温过低的可能性。在每天的多次试验运行中,没有小鼠显示出任何不良反应。

[0562] MWM测试分两个阶段进行:获取和探索。在获取阶段,使用参考记忆方案,其中平台在几天内相对于房间线索处于固定位置。在试验中,动物被放置在水池侧壁处并面向水池侧壁的水中,并且处于不同的起始位置。它们很快学会以减少的逃逸潜伏期和更直接的游泳路径游到正确位置。

[0563] 跟踪系统测量试验中逐渐减少的逃逸潜伏期和与平台位置相关参数诸如路径长度、游泳速度和方向性。对动物的观察表明,爬上逃逸平台后,它们经常直立并且四处张望,就好像试图确定它们在空间中的位置。在试验中直立习惯化,但是如果隐藏平台移动到新位置或完全移除(如在探索测试中),则不习惯化。

[0564] 在训练期间或训练完成后,实验者进行探索测试,其中将逃逸平台从水池中移除,并且使动物游泳60秒。典型地,良好训练的小鼠会游到水池的目标象限,然后在开始搜索其他地方之前反复游过先前的平台位置。以各种方式测量的这种空间偏向构成空间记忆的证据。具有海马和齿状回病变、下脚病变或联合病变的小鼠在训练后探索测试中表现不佳。

[0565] 结果:

[0566] 获取测试

[0567] 图20示出了每个治疗组在第1-5天的获取测试逃逸潜伏期(秒)。从第1天到第5天,所有小鼠都显示出减少的逃避潜伏期,因此展现出对Morris水迷宫箱的空间参数的一致但渐进的学习。无论治疗组如何,所有TG小鼠都显示出与WT小鼠相当的空间意识获取过程。WT对照组需要17秒来获取目标平台。到训练的最后一天时,所有其他TG小鼠治疗组在20-27秒内定位平台。

[0568] 探索测试:

[0569] 来自探索测试的图21示出了在目标象限中尝试定位逃逸平台所花费的时间(秒)。WT对照组在目标象限中显示出最长的占用时间(大约52.53%)。所有TG小鼠在目标象限中花费的时间明显少于WT对照组。用一些形式的苏拉明治疗的所有TG小鼠在目标象限中花费了其探索试验时间的28%-32%。

[0570] 讨论:

[0571] 获取阶段:无论治疗组如何,WT和TG小鼠都表现出相当的学习、空间意识和空间识别。

[0572] 探索阶段:没有一只治疗的TG小鼠在目标象限中花费的时间与WT小鼠一样长。

[0573] 结论:

[0574] WT小鼠和治疗的TG小鼠显示出逃逸潜伏期随着时间的稳步下降,展现出对Morris水迷宫箱的空间参数的一致但渐进的学习。在探索阶段期间,与TG小鼠相比,WT小鼠在目标象限中的总占用时间更长。这表明TG小鼠中的研究治疗对正常认知功能或者空间学习和记忆没有任何负面或削弱作用。

[0575] 实施例11:学习和记忆的情境条件记忆测试中的苏拉明的评价

[0576] 目标

[0577] 穿梭被动回避测试的目的是在B6.129P2-Fmr1tm1Cgr/J转基因 (TG) 小鼠中测试各种苏拉明制剂以及治疗途径和方案以确定与作为对照的野生小鼠和用IP盐水治疗的TG小鼠相比,这些药剂是否对学习和记忆有影响。

[0578] 背景:

[0579] 被动回避任务可用于评价新型化学实体对学习和记忆的影响,以及研究CNS病症的啮齿动物模型所涉及的机制。在该测试中,测试室分为光照隔室和黑暗隔室,两者之间具有门。测试动物在第一天探索两个隔室。第二天,它们在黑暗隔室中接受轻微的足部电击,并且它们将学会将黑暗隔室与足部电击联系起来。为了测试它们的学习和记忆,然后将小鼠放回光照隔室中。啮齿动物的被动回避行为被定义为抑制它们对黑暗隔室的先天偏好。学习和记忆正常的小鼠会避免进入黑暗隔室。前一天的学习和记忆是通过记录穿过两个隔室之间的门的潜伏期来测量的。参见J.David Sweatt,第4章:啮齿动物行为学习和记忆模型(Chapter 4:Rodent Behavioral Learning and Memory Models),编辑:J.David Sweatt.Mechanisms of Memory(第2版),Academic Press,2010,第76-103页,ISBN9780123749512。

[0580] 本研究使用SmartCage™系统,这是一种自动化的非侵入性啮齿动物行为监测系统,其使得生物医学研究人员能够通过一致且准确地监测啮齿动物家居笼活动和行为来进行各种神经行为测定。参见Xie等人,2012。

[0581] 材料和方法:

[0582] 实验臂(治疗组):

[0583] 1.N=6只小鼠/组。

[0584] 2.所有行为测试包括一组未经治疗的野生型(WT)对照。

[0585] 3.各组的给药如下所示:

[0586] a.第1组:IP苏拉明(20mg/kg),每周施用至动物,从9周龄开始并且继续四周(即,在9、10、11和12周龄时给予)。

[0587] b.第2组:IP盐水(5mL/g),每周施用至动物,从9周龄开始并且继续四周(即,在9、10、11和12周龄时给予)。

[0588] c.第3组:IN苏拉明制剂(浓度为100mg/mL×6μL/喷雾),以每鼻孔喷雾一次的形式每天施用一次(每次施用的间隔为大约2分钟以确保吸收),持续28天(在28天时间段内总计56次喷雾),从9周龄开始(即,在9、10、11和12周龄期间每天给予)。

[0589] d.第4组:IN苏拉明制剂(浓度为100mg/mL×6μL/喷雾),以每鼻孔喷雾一次的形式每隔一天施用一次,持续28天(在28天时间段内总计28次喷雾),从9周龄开始(即,在9、10、11和12周龄期间每隔一天给予一次)。

[0590] e.第5组:IN苏拉明制剂(浓度为100mg/mL×6μL/喷雾),以每鼻孔喷雾一次的形式每周施用一次,持续4周(28天)(在8天时间段内总计28次喷雾),从9周龄开始(即,在9、10、11和12周龄期间每周给予一次)。

[0591] 4.所有组(第1-5组)的行为测试在IN给药最后一天后的第二天开始(13-14周龄)。

[0592] 5.正好在13周龄开始行为测试之前,在12周龄结束时从所有小鼠中采集血样(用

于PK测试)。

[0593] 6. 在13-14周龄结束时,在所有行为测试结束时,从处死后的所有小鼠中采集脑组织(用于生化测试)。

[0594] 动物:

[0595] 雄性B6.129P2-Fmr1tm1Cgr/J TG (TG) 小鼠购自Jackson Laboratories, Bar Harbor, 缅因州。这些小鼠为大约8($\pm$ 1)周龄。在标准的12小时光照/12小时黑暗的照明周期下(06:00亮灯),将小鼠饲养在受控环境(温度: $21.5 \pm 4.5^\circ\text{C}$ /相对湿度:35-55%)中的组笼中(基于治疗组,每笼6只小鼠)。在一周的剩余时间里,小鼠被安置在研究设施中。下周一开始给药。记录所有小鼠的体重以用于健康监测目的。

[0596] 实验方法:

[0597] 如研究发起人所指示的,在28天内进行给药。第五项(最后一项)行为测试即穿梭(ST)被动回避测试在两天(第38和39天)内进行,其中第一天作为训练日并且第二天作为测试日。被动回避是一种恐惧驱动的测试,典型地用于评估啮齿动物的短期或长期记忆。被动回避范式要求受试者的行为与它们偏好黑暗区域和避免明亮区域的先天倾向相反。ST测试中使用的暗箱(红色透明外壳,带有供小鼠进入的开口)与“光-暗”测试中使用的暗箱相同;在ST测试中,暗箱被放置在金属足部电击网格的顶部,一旦小鼠进入暗箱,其就对小鼠进行电击。每只小鼠单独地训练,一次一只。一旦小鼠进入暗箱,小鼠的后爪就受到直接电击。受到足部电击后,实验者手动地将小鼠从SmartCage™中移除并且放回其家居笼。在每次训练环节之间,用0.05%漂白剂轻轻擦拭金属网格和暗箱。这最大限度地减少了由于先前训练环节中残留的气味或碎屑(毛发、垫料、食物颗粒)而可能发生的任何潜在偏差。

[0598] 1. 在穿梭(ST)训练开始之前,将暗箱(红色透明外壳,带有供小鼠进入的开口)放置在SmartCage™内的金属足部电击网格的顶部上。

[0599] 2. 将单独的小鼠放置在开放/非暗箱侧(“光区”),其头部背对暗箱。

[0600] 3. 然后允许小鼠自由探索SmartCage™并且自行决定进入暗箱“暗区”;自动记录暗箱进入潜伏期。

[0601] 4. 一旦小鼠进入暗箱并且在黑暗外壳中停留至少1秒,小鼠就会受到持续2秒的足部电击(经由金属网格)。

[0602] 5. 受到足部电击后,立即将小鼠从SmartCage™移除并且放回其家居笼中,由此完成穿梭训练。

[0603] 6. ST训练后24小时,将小鼠放置于与前一天相同的SmartCage™装置中;将小鼠放置在开放/非暗箱侧。

[0604] 7. 小鼠可以自由探索SmartCage™达5分钟,并且评估由情境恐惧关联导致的暗箱回避。

[0605] 8. 基于在光区中花费的时间、光区进入数和在光区中花费的%时间的SmartCage™监测,对情境恐惧条件行为进行评估。

[0606] 9. 另外,比较训练日(足部电击前)和训练后24小时(测试日)之间的暗箱进入潜伏期。

[0607] 10. 基于治疗组(IP苏拉明、IP盐水、IN苏拉明-每天、IN苏拉明-每隔一天、IN苏拉明-每周),将数据分组在一起。

[0608] 结果:

[0609] 图22示出了每个治疗组在训练日和24小时后的测试日的暗区进入潜伏期(秒)。比较训练日和测试日(足部电击后24小时)之间的每只小鼠进入暗箱的潜伏期。所有治疗组在训练日都在不到50秒的时间内进入黑暗隔室。在24小时后的测试日,所有治疗组都保留对轻度足部电击的记忆,并且与训练日相比在更长时间内回避进入黑暗隔室。IP苏拉明组具有最短的进入黑暗隔室的潜伏期,并且所有其他治疗组具有较长的潜伏期,其与在WT小鼠中观察到的类似。

[0610] 图23A示出了总光区时间(分钟),并且图23B示出了在测试日在光区中花费的时间百分比。WT小鼠和用IN苏拉明和IN盐水治疗的TG小鼠都显示出在光区中花费的总时间类似,以及在光区中花费的时间超过70%。IP苏拉明显显示出较短的总时间和大约50%的在光区中的时间。

[0611] 图24示出了暗区进入总数/治疗组。IP盐水TG小鼠显示出最多的进入数,而WT小鼠和大多数苏拉明治疗TG小鼠显示出类似的进入数。

[0612] 图25示出了光区进入总数/治疗组。

[0613] 讨论:

[0614] 暗区进入潜伏期:在WT和TG小鼠治疗组中,训练日和测试日之间的暗区进入潜伏期存在实质且显著的差异。这表明所有实验组都可以学习并且记得电击引起的恐惧反应。

[0615] 光区总时间和在光区中的时间百分比:在光区中花费的时间量(包括总时间(分钟)和在光区中花费的时间相对于在暗区中花费的时间的百分比(%))提供关于每个治疗组的一般行为活动和活动水平的数据,并且排除潜在假阳性影响。

[0616] 大多数TG小鼠治疗组表现出与WT对照组类似的行为。这表明这些TG小鼠的治疗对其学习和联想记忆没有显著的负面影响。

[0617] 暗区进入数:暗区进入数反映了小鼠对与暗区有关的轻度足部电击的条件恐惧。一旦它们进入暗箱,重新进入暗区的次数就是它们对进入暗箱的恐惧的保留程度的指标。与IP盐水TG小鼠相比,使用苏拉明和其他比较物的WT和TG治疗组显示出更少的暗区进入,这表明它们的记忆比前一天的条件有所改善。

[0618] 结论:

[0619] 穿梭被动回避测试的结果表明,所有治疗组都具有完整的短期记忆,可以学习回避与暗区有关的负面刺激,并且将这种条件记忆保留至少24小时。

[0620] 通过引用的结合

[0621] 每个专利文件(包括更正证明书、专利申请文件、科学文章、政府报告、网站和本文提及的其他参考文献)的全部公开内容出于所有目的通过引用整体结合于此。在术语冲突的情况下,以本说明书为准。

[0622] 等同物

[0623] 在不脱离其精神或本质特征的情况下,本发明可以以其他特定形式实施。前述实施方案在所有方面都被认为是说明性的,而不是对本文描述的发明的限制。在本发明的方法和组合物的各种实施方案中,当术语包含用于方法的叙述步骤或组合物的组分时,还涉及方法和组合物基本上由叙述步骤或组分组成或由叙述步骤或组分组成。此外,步骤的顺序或进行特定动作的顺序并不重要,只要本发明保持可操作即可。此外,可以同时进行的两个

或更多个步骤或动作。

[0624] 在说明书中,单数形式也包括复数形式,除非上下文另有明确规定。除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属的技术领域的普通技术人员通常理解的相同含义。在冲突的情况下,将以本说明书为准。

[0625] 此外,应认识到,在特定情况下,组合物可以被描述为由混合前的组分构成,因为在混合时特定组分可以进一步反应或转化为另外的材料。

[0626] 除非另有说明,本文使用的所有百分比和比率均按重量计。应认识到,物体的质量在日常使用和最常见的科学目的中通常是指其重量,但是质量在技术上是指物体的物质的量,而重量是指物体因重力而受到的力。此外,在通常使用中,物体的“重量”(质量)是在秤或天平上“称重”(称量)物体时所确定的。

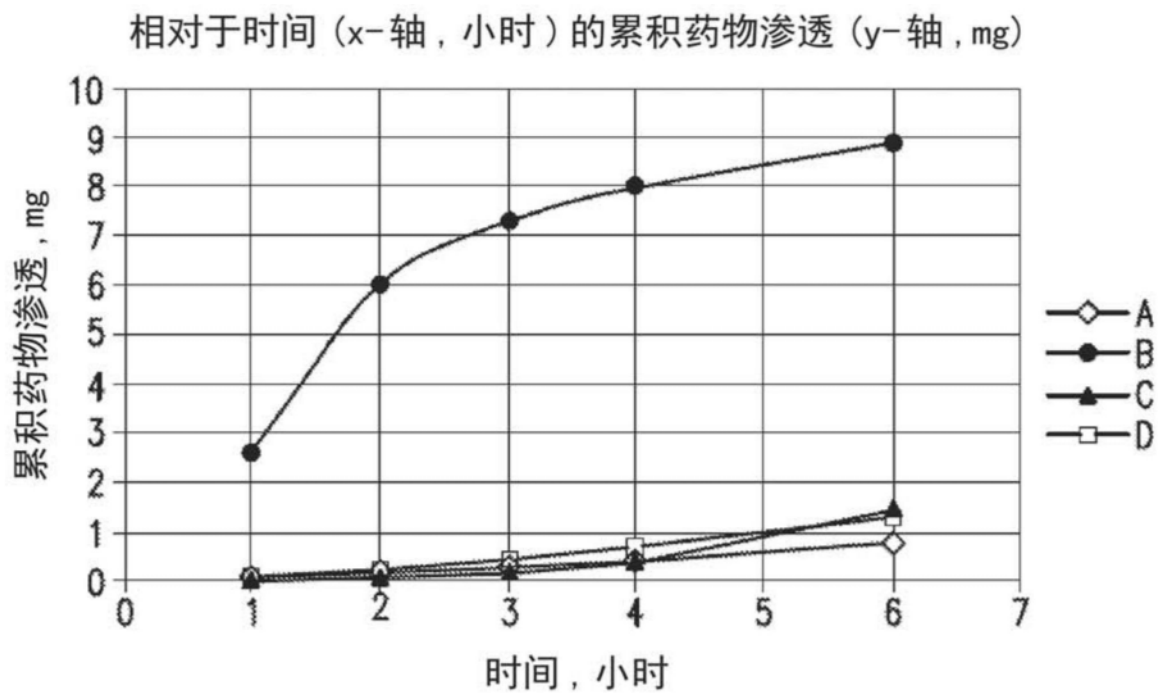


图1

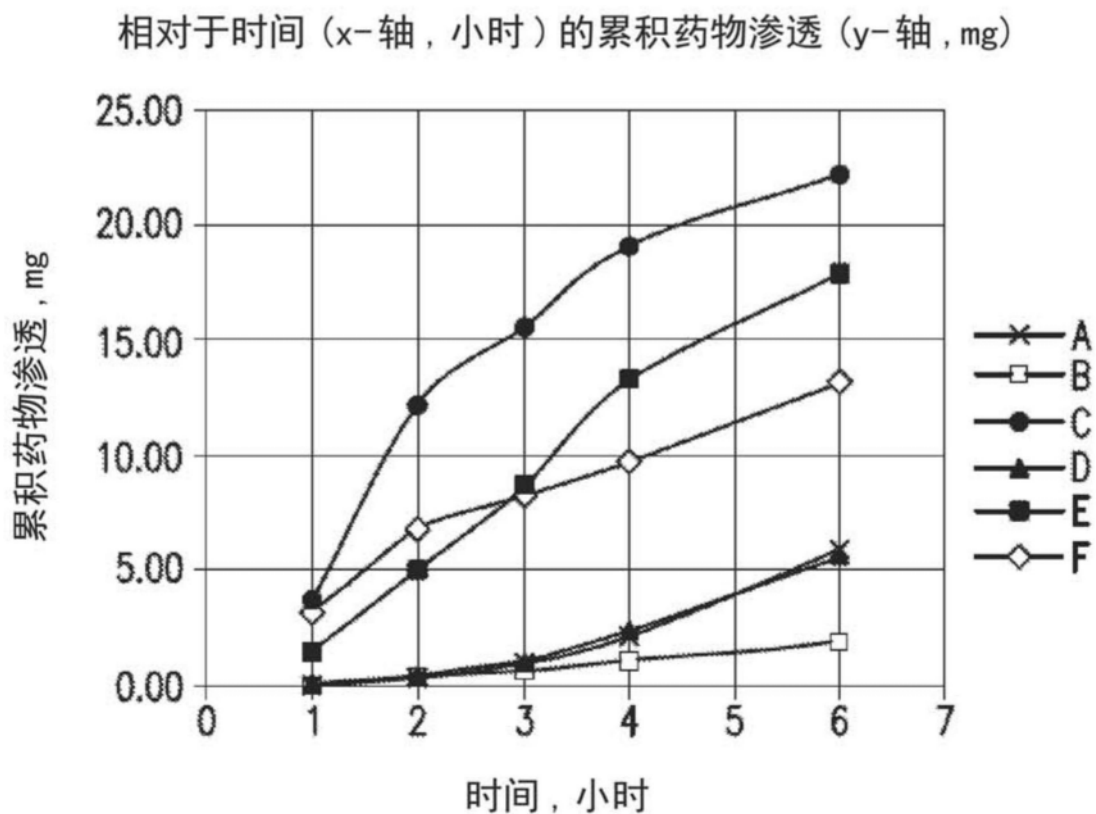


图2

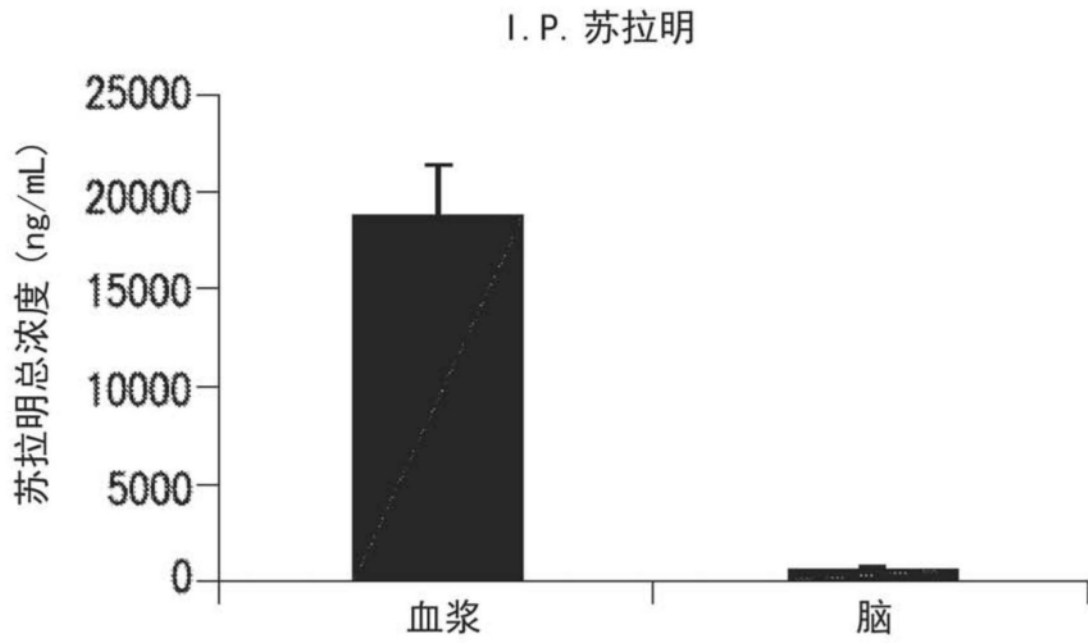


图3

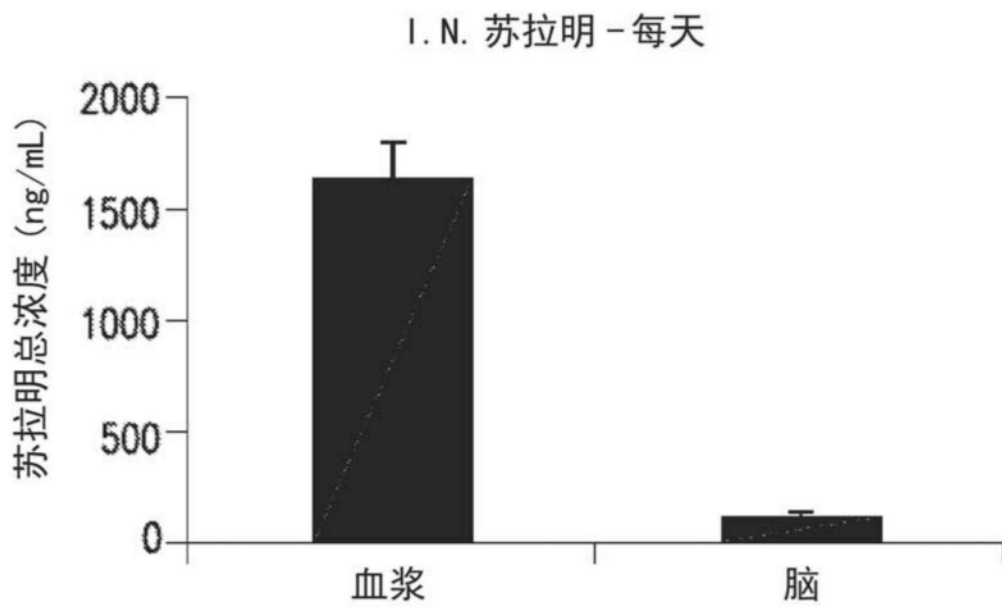


图4

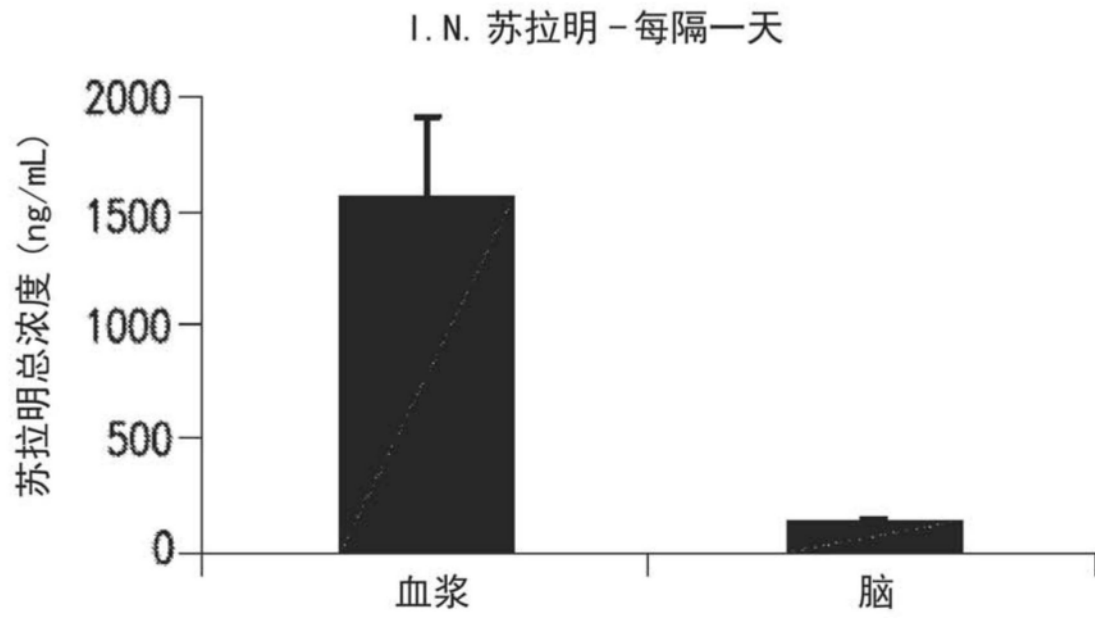


图5

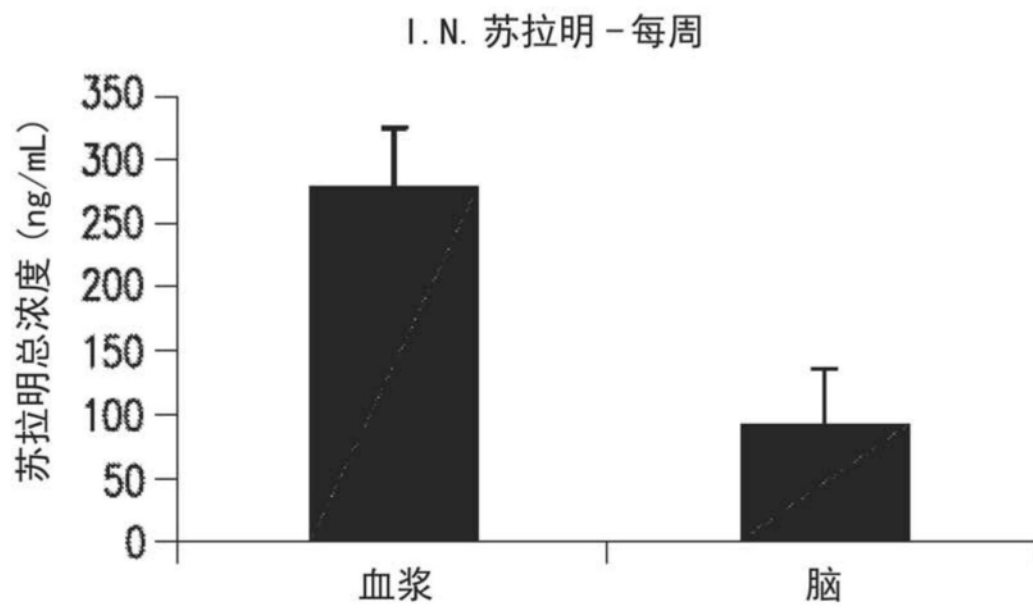


图6

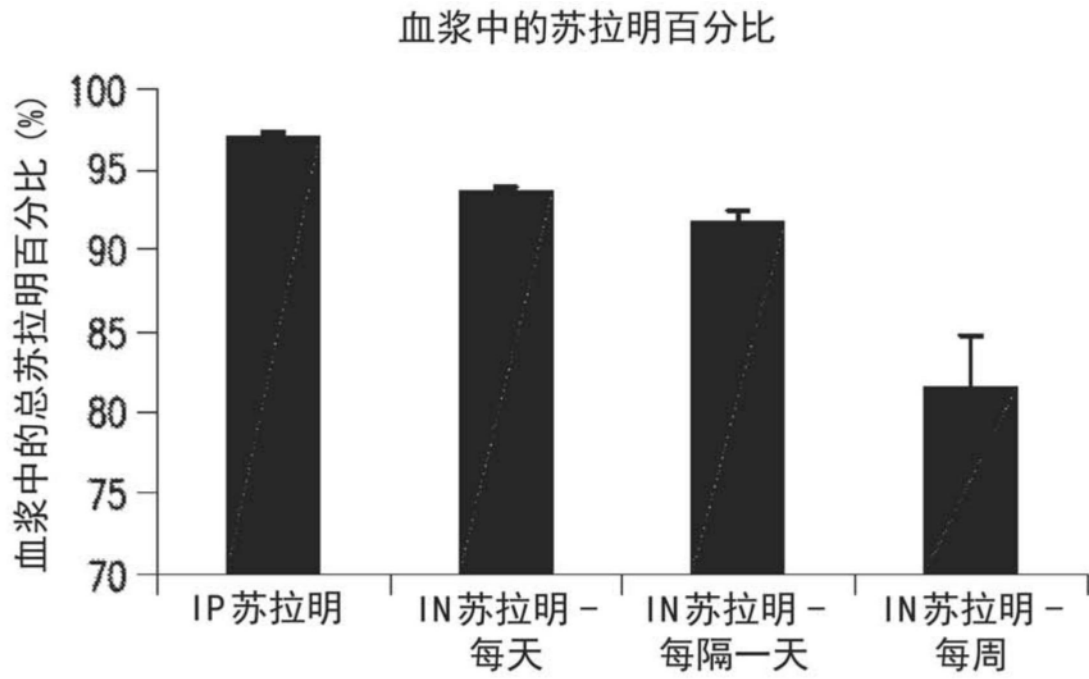


图7

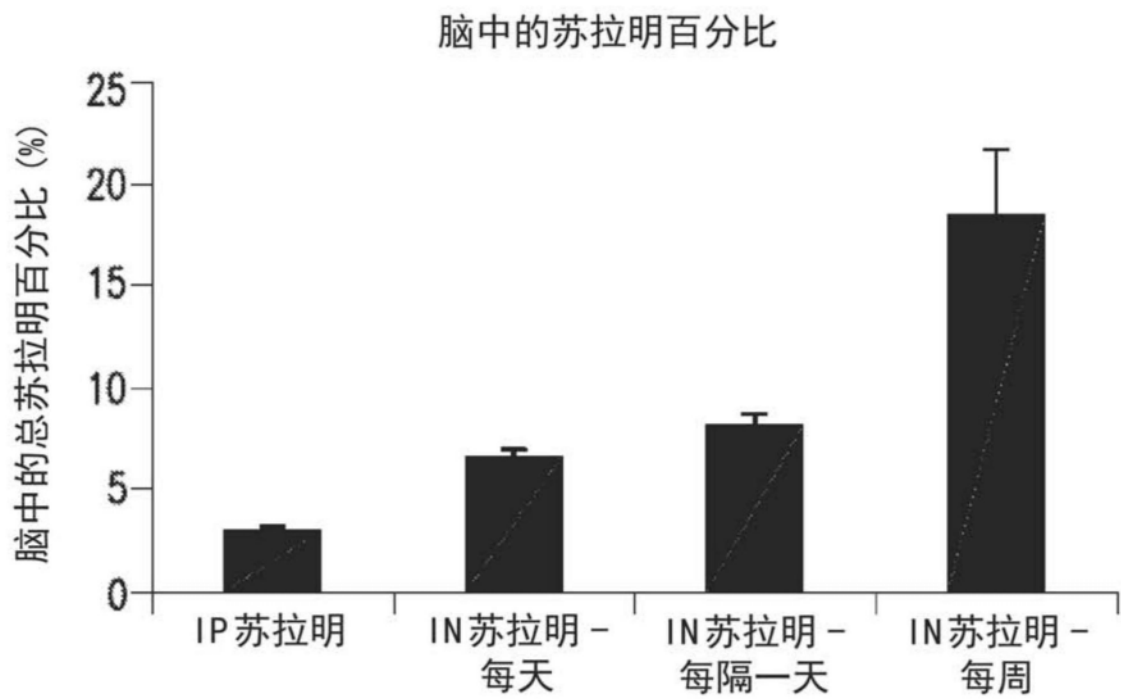


图8

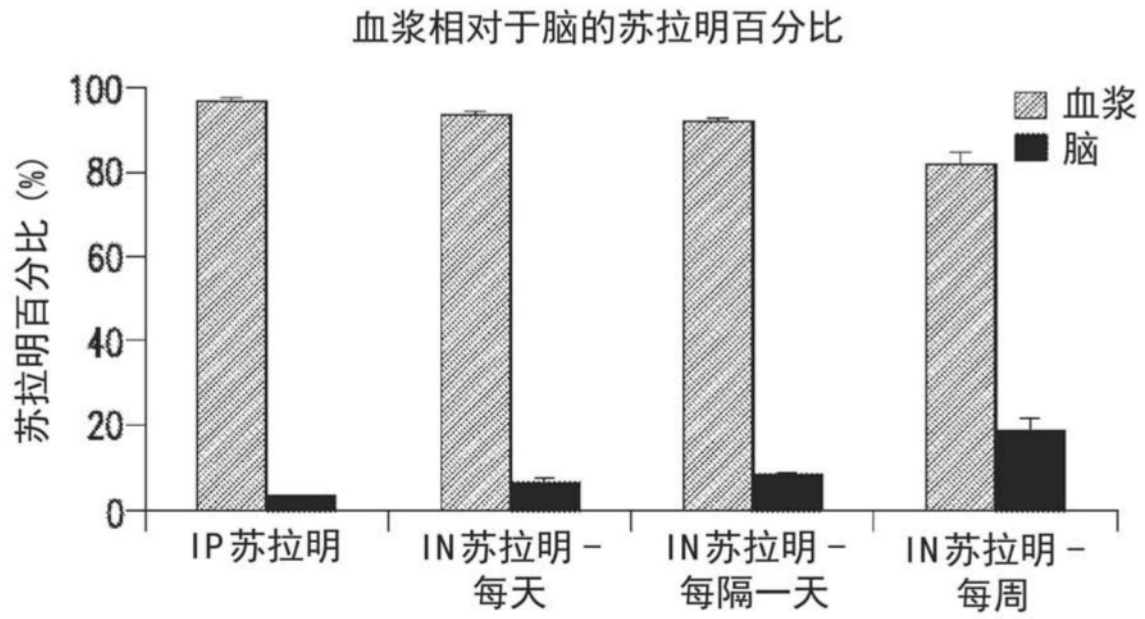


图9

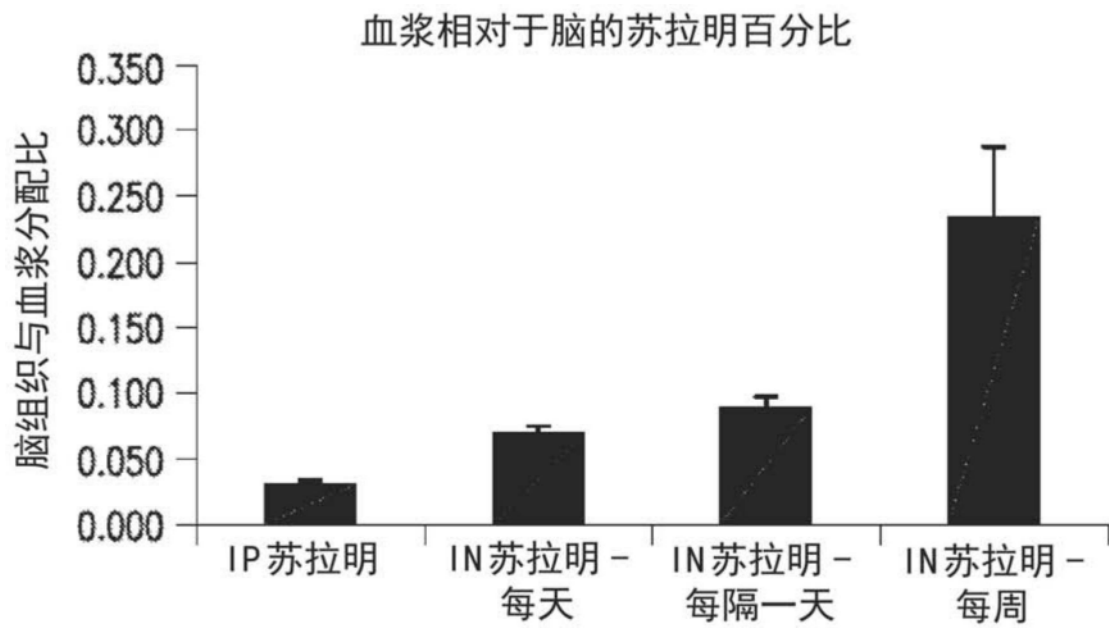


图10

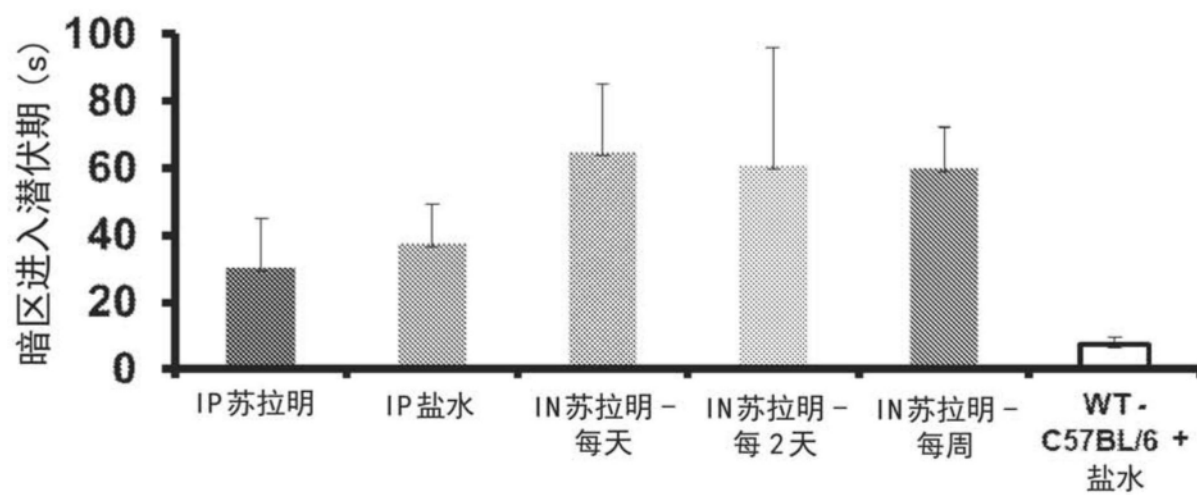
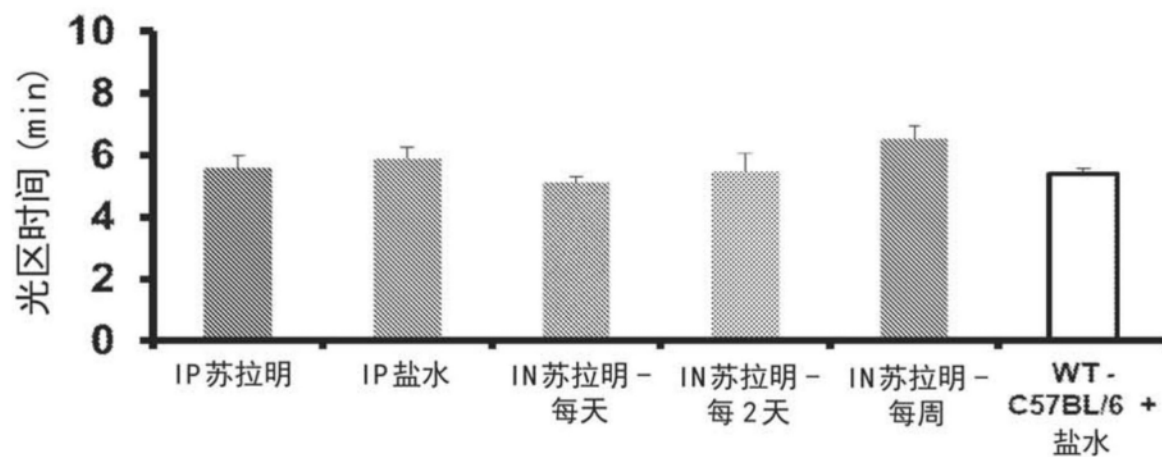


图11

12A



12B

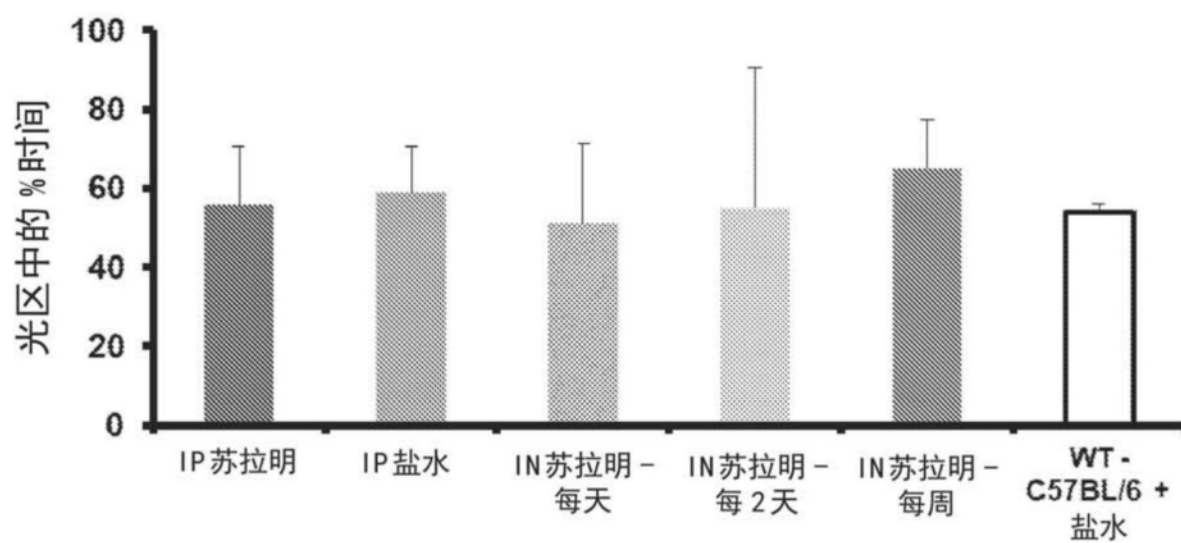


图12A和12B

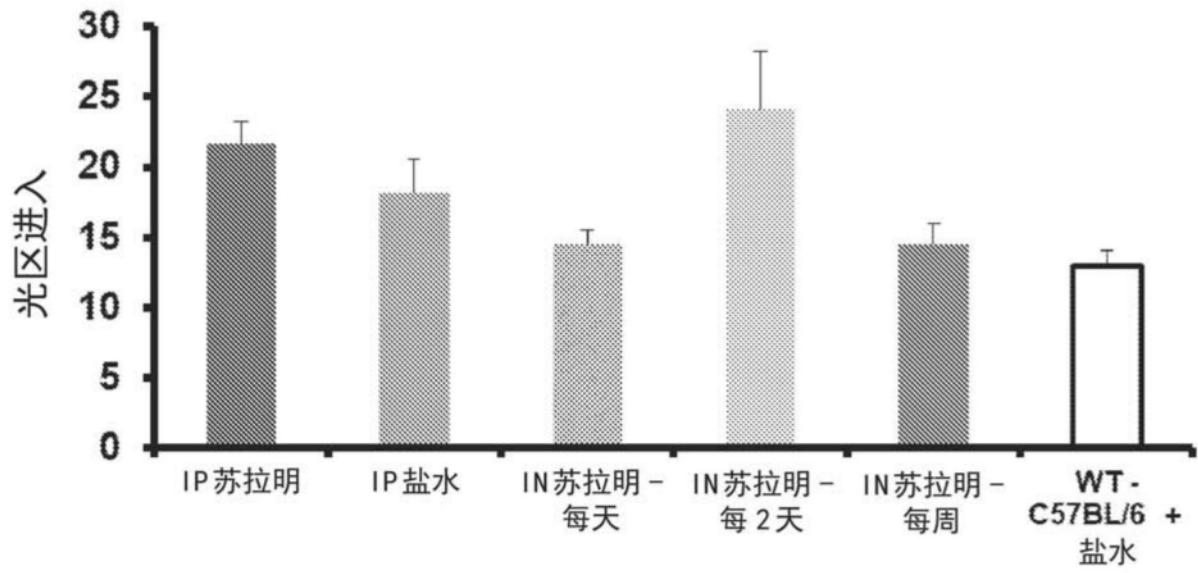


图13

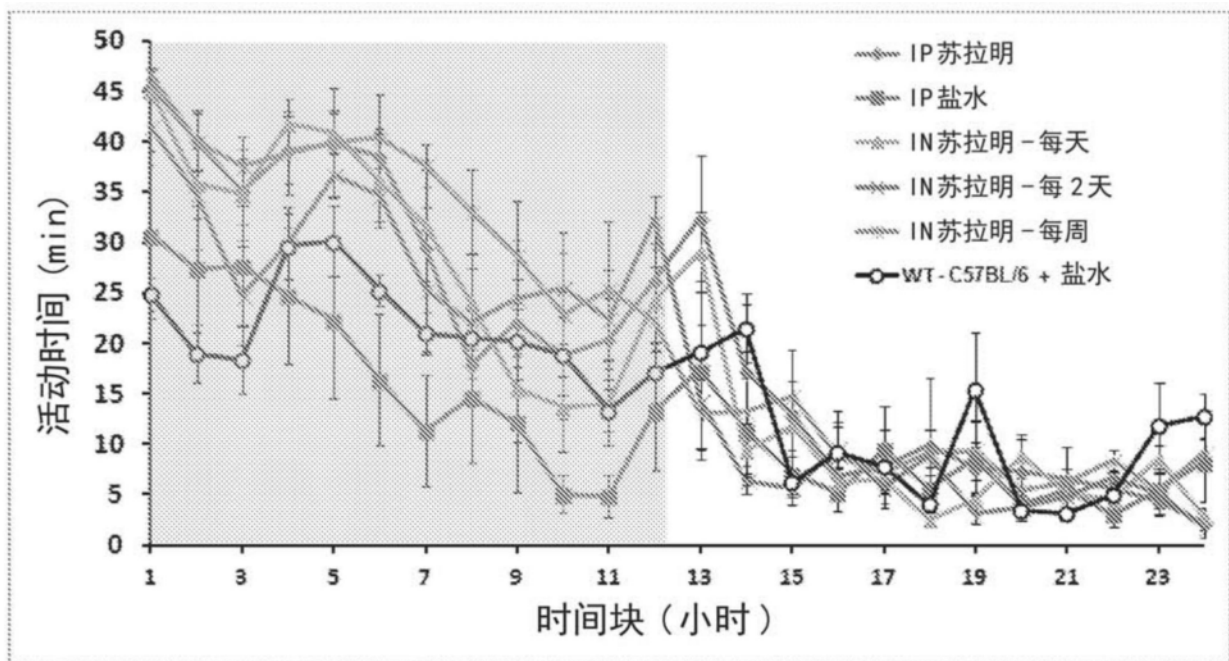


图14

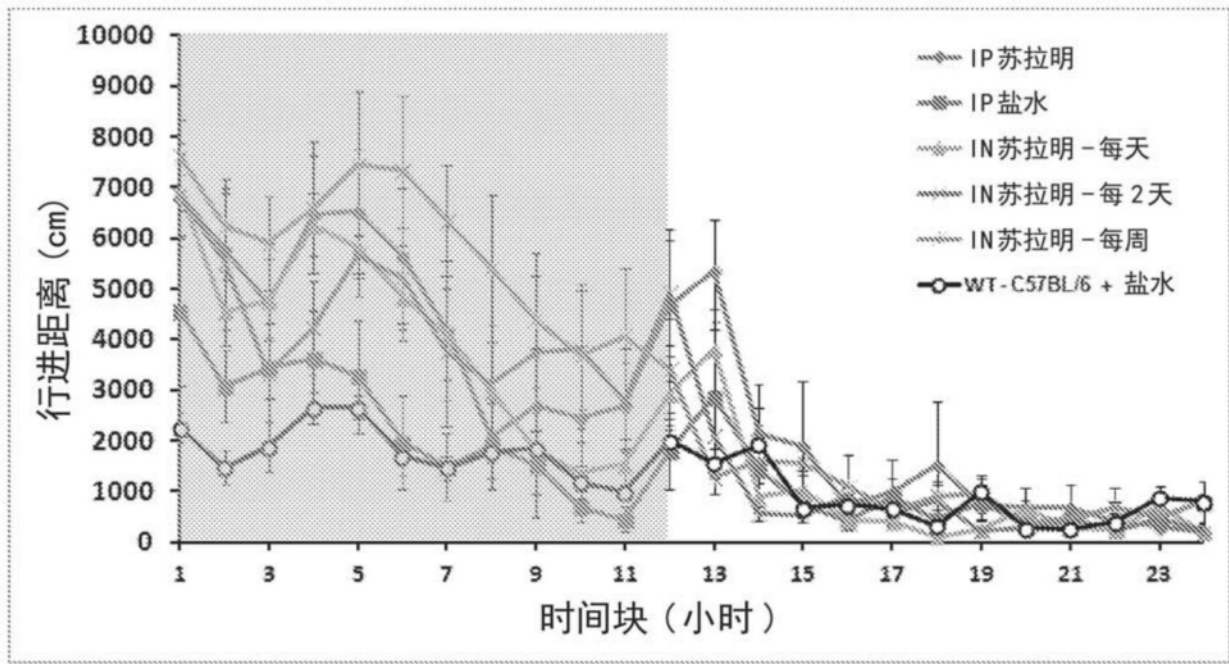


图15

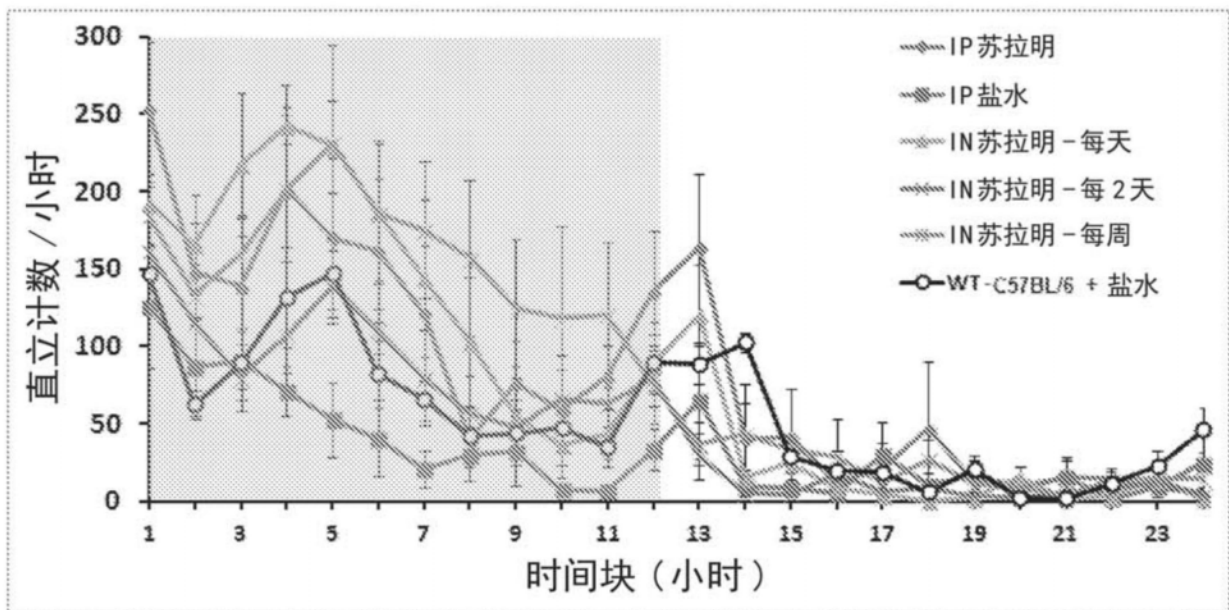


图16

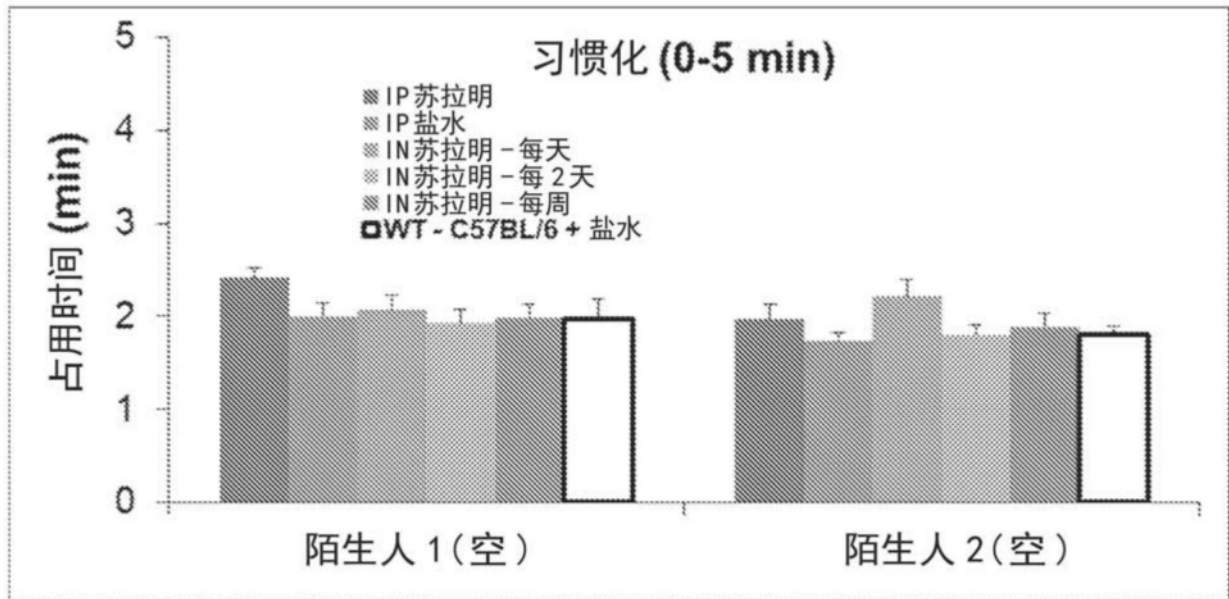


图17

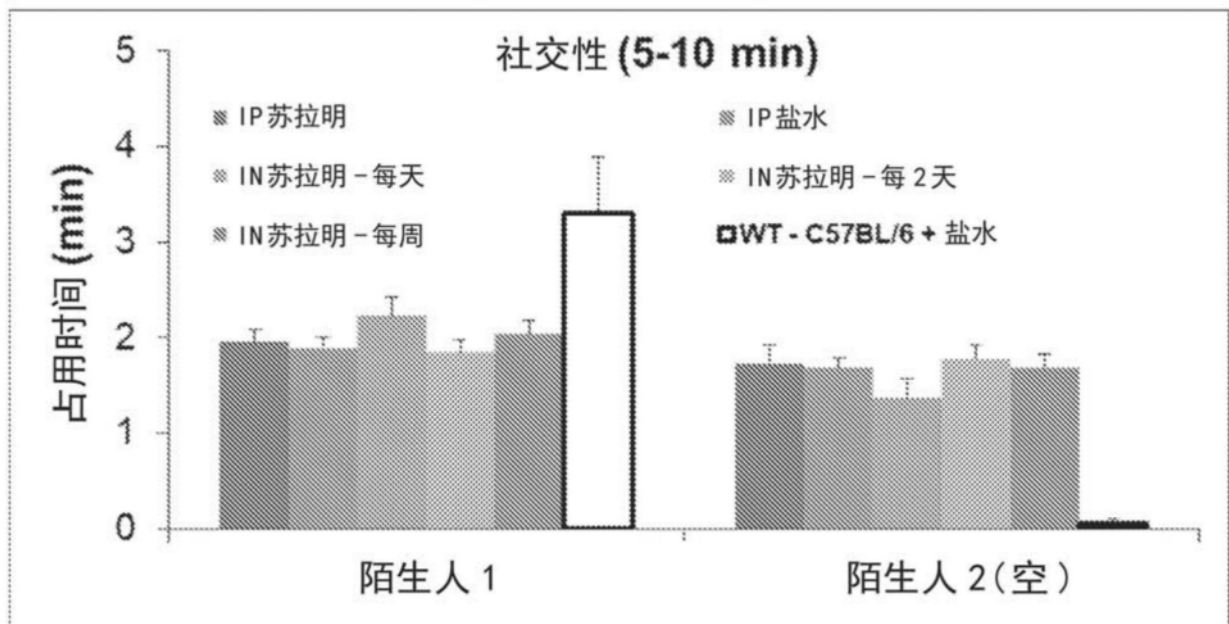


图18

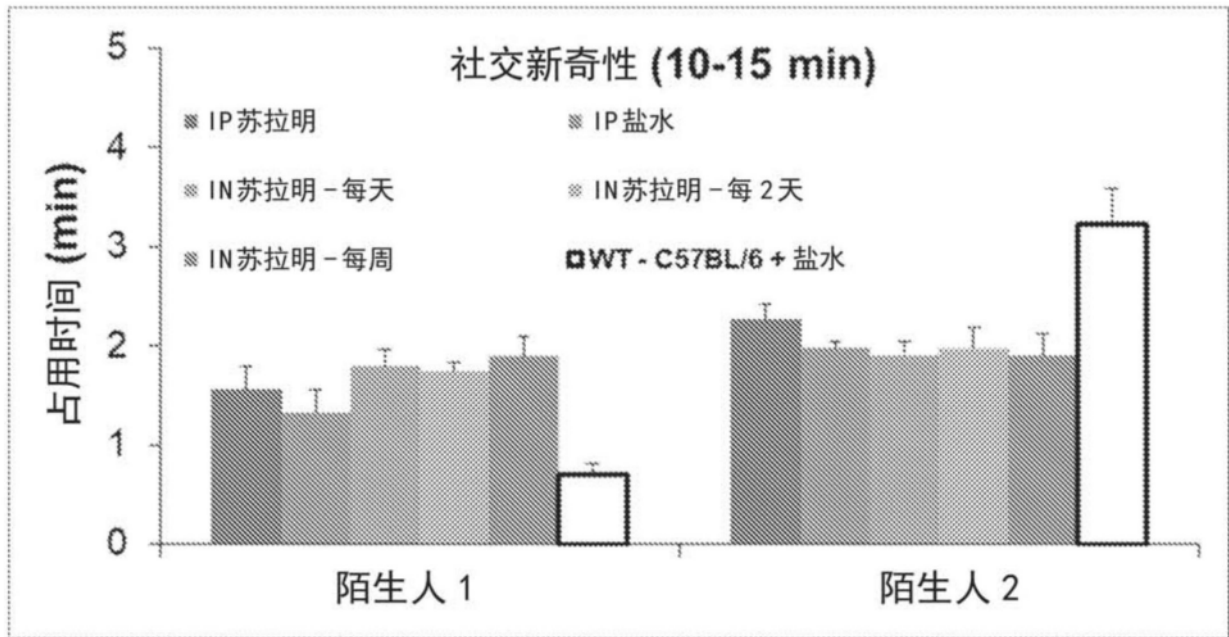


图19

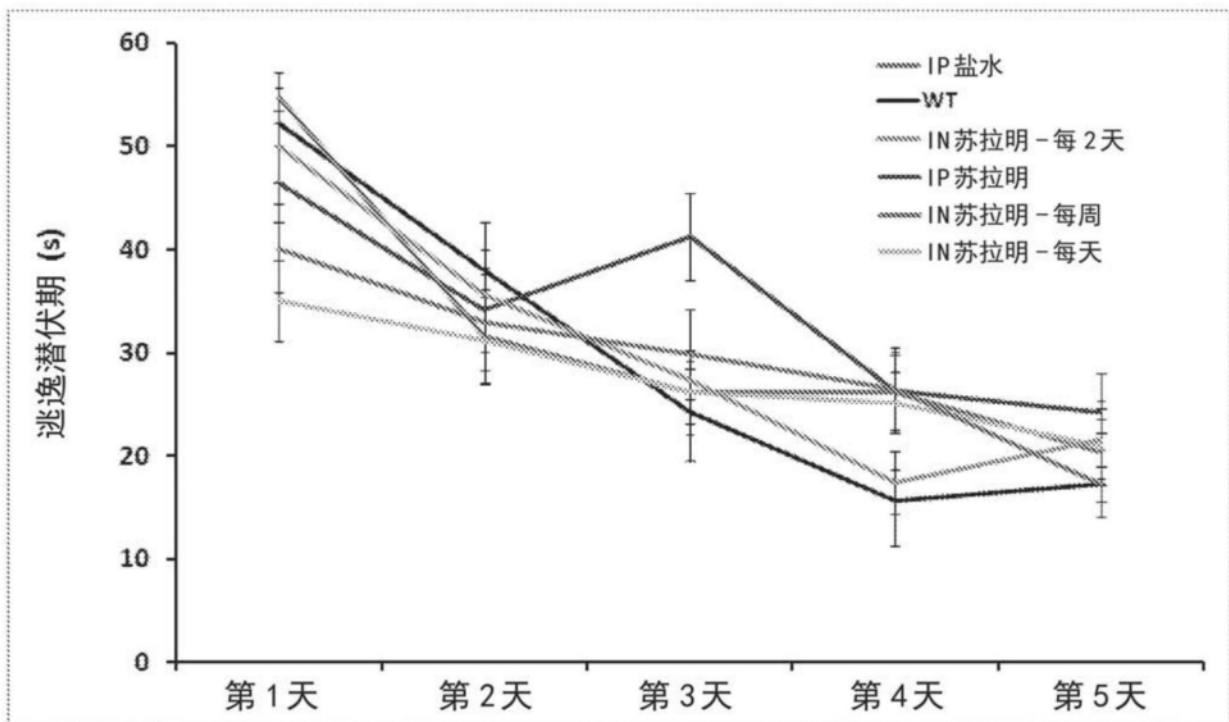


图20

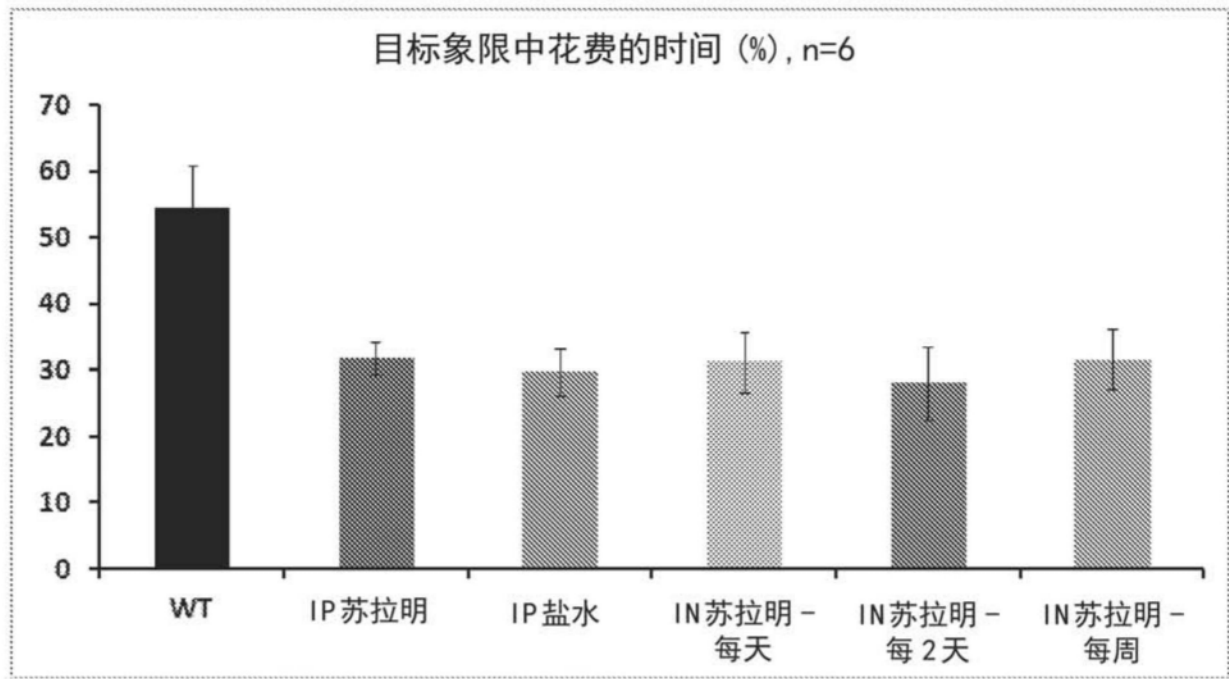


图21

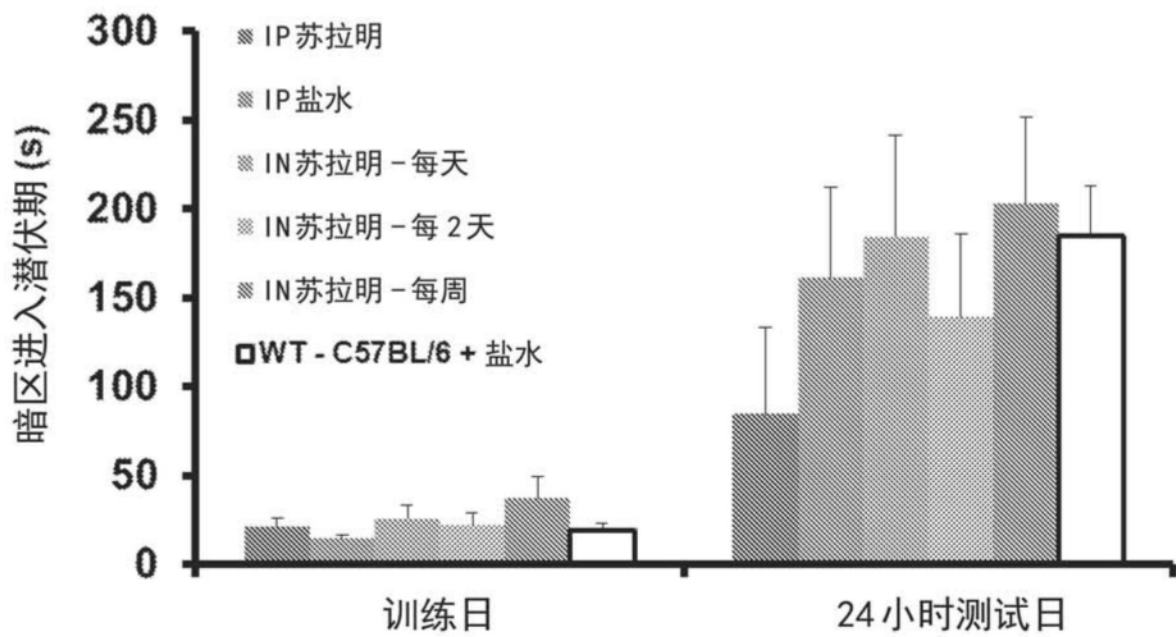
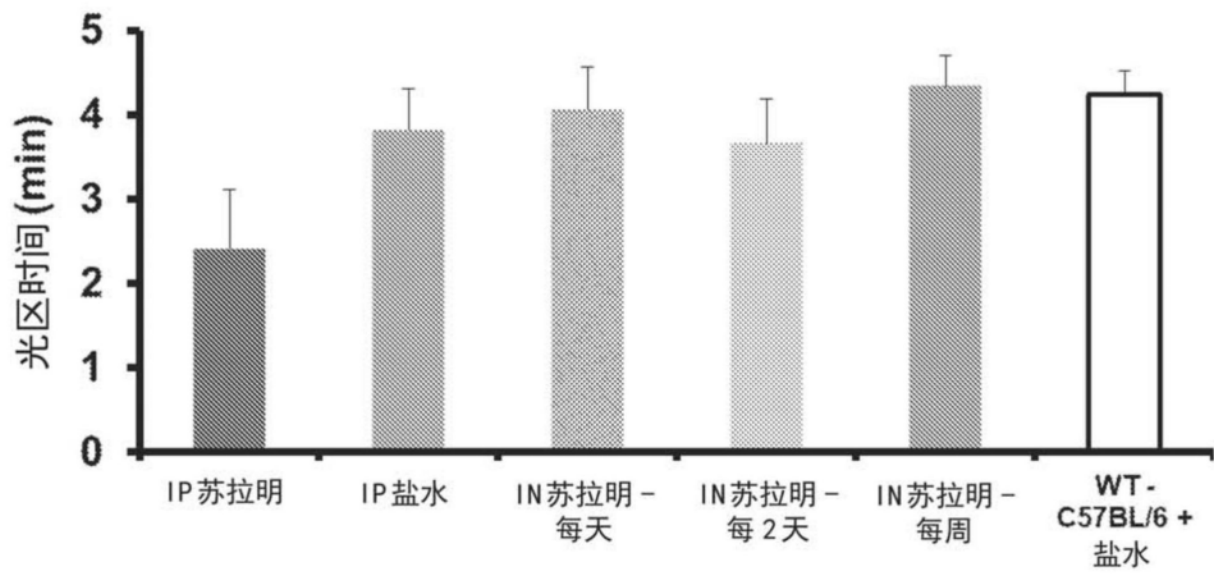


图22

23A



23B

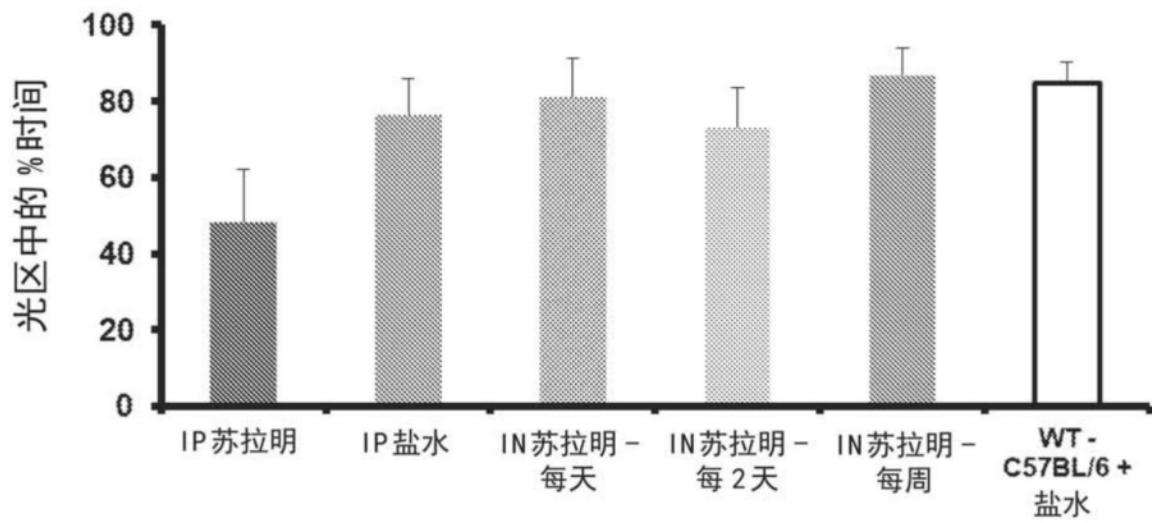


图23A和23B

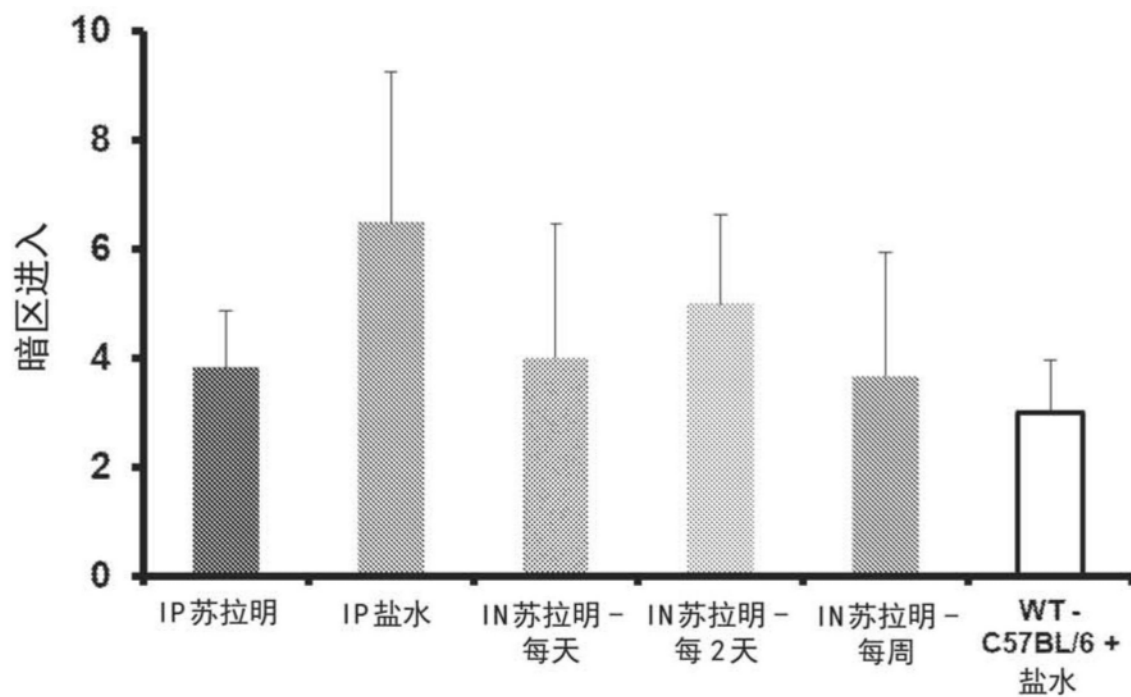


图24

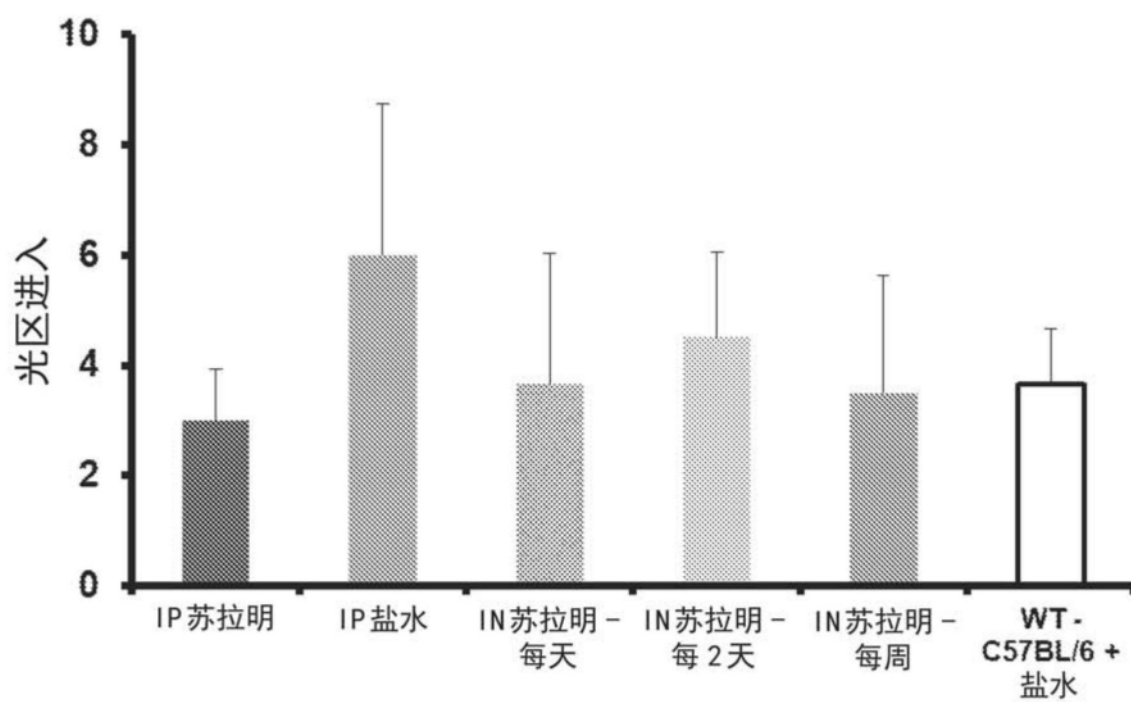


图25