



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111465400 A

(43)申请公布日 2020.07.28

(21)申请号	201780097512.6	(51)Int.Cl.	
(22)申请日	2017.12.07	A61K 35/64(2015.01)	
(85)PCT国际申请进入国家阶段日		C07H 13/08(2006.01)	
2020.06.05		C07H 1/08(2006.01)	
(86)PCT国际申请的申请数据		A61P 3/04(2006.01)	
PCT/CN2017/115000	2017.12.07	A61P 3/06(2006.01)	
(87)PCT国际申请的公布数据		A61P 3/10(2006.01)	
W02019/109300 EN	2019.06.13	A61P 25/00(2006.01)	
(71)申请人	心悦生医股份有限公司		
地址	中国台湾新北市		
(72)发明人	蔡果荃 王景正 谢天岚 毛怡文		
(74)专利代理机构	北京市柳沈律师事务所		
	11105		
代理人	涂滔		

权利要求书3页 说明书48页 附图17页

(54)发明名称

用于制备鞣酸组合物的改良的富集方法

(57)摘要

用于制备鞣酸组合物的改良的富集方法,所述鞣酸组合物具有优异的抑制D-氨基酸氧化酶的功效、优异的纯度与安全性概况。鞣酸组合物(例如,药物组合物、营养组合物或医疗食品组合物)可用于治疗CNS病症及肥胖症,包含糖尿病、高血糖症、高血脂症或高胆固醇血症。

1. 一种组合物,其包含(i)鞣酸或其可接受的盐的混合物,以及(ii)载体,其中在该组合物中大于等于98%的鞣酸具有4至12个没食子酰基部分,该组合物中大于等于97%的鞣酸具有5至12个没食子酰基部分;该组合物中大于等于90%的鞣酸具有6至12个没食子酰基部分;或者该组合物中大于等于60%的鞣酸具有8至12个没食子酰基部分。

2. 如权利要求1所述的组合物,其中在该组合物中,约4至20%的鞣酸具有5个没食子酰基部分,约10至35%的鞣酸具有6至7个没食子酰基部分,和/或约55至85%的鞣酸具有8至12个没食子酰基部分。

3. 如权利要求1或2所述的组合物,其中该组合物是药物组合物、营养组合物、保健食品或医疗食品。

4. 如权利要求3所述的组合物,其中该组合物是片剂、胶囊、软咀嚼物或凝胶。

5. 如权利要求1至4中任一项的组合物,用于在受试者中抑制D-氨基酸氧化酶(DAAO)。

6. 如权利要求1至4中任一项的组合物,用于在受试者中治疗中枢神经系统(CNS)病症或与肥胖相关的病症。

7. 如权利要求6使用的组合物,其中所述CNS病症选自精神分裂症、精神病、阿尔茨海默病、额颞痴呆、血管性痴呆、Lewy体痴呆、老年性痴呆、轻度认知障碍、良性健忘症、闭合性头部损伤、自闭症谱系病症、Asperger障碍、脆性X综合征、注意缺陷多动障碍、注意缺陷障碍、强迫症、抽动障碍、儿童期学习障碍、经前综合征、抑郁、严重抑郁障碍、兴趣缺失、自杀意念和/或自杀行为、双相型障碍、焦虑障碍、惊恐障碍、创伤后应激障碍、慢性轻度且不可预测的应激、进食障碍、成瘾症、人格障碍、帕金森氏症、亨廷顿氏症、多发性硬化、肌萎缩侧索硬化、Tourette综合征、夜间遗尿症、非癫痫发作、眼睑痉挛、杜氏肌营养不良、中风、慢性疼痛、神经性疼痛包括痛觉过敏和异常性疼痛、糖尿病性多神经病以及慢性疼痛综合征。

8. 如权利要求6使用的组合物,其中所述与肥胖相关的病症选自进食障碍、神经性厌食、神经性贪食、中风、冠状动脉心脏病、心脏病发作、充血性心力衰竭、先天性心脏病、高血压、非酒精性脂肪性肝炎、胰岛素抗性、高尿酸血症、甲状腺功能减退、骨关节炎、胆结石、不育、肥胖通气不足综合征、阻塞性睡眠呼吸暂停、慢性阻塞性肺病以及哮喘。

9. 如权利要求6使用的组合物,其中所述与肥胖相关的病症是选自糖尿病、高血糖症、高血脂症以及高胆固醇血症的肥胖病症。

10. 如权利要求6至9中任一项使用的组合物,其中所述组合物配制用于以一日三次至每两个月一次的频率施用至所述受试者。

11. 如权利要求6至10中任一项使用的组合物,其中所述组合物与一种或多种另外的药剂合并使用以治疗所述CNS病症或所述与肥胖相关的病症。

12. 如权利要求11使用的组合物,其中将所述组合物和所述一种或多种另外的药剂同时或序贯施用至所述受试者。

13. 一种用于制备鞣酸组合物的方法,该方法包括:

(i) 提供包含鞣酸的组合物;

(ii) 于20至80°C将多批次的该组合物序贯与第一溶剂孵育,以制备第一鞣酸萃取物;

(iii) 于20至80°C使该第一鞣酸萃取物与活性碳、碳酸金属盐类及硫酸金属盐类中的一种或多种接触,以除去吸附至该活性碳和/或碳酸金属盐类的物质,或者除去由该硫酸金属盐类除去的物质,由此制备第一鞣酸组合物;

(iv) 将该第一鞣酸组合物与第二溶剂混合以形成溶液；

(v) 于20至40℃将该溶液与二氯甲烷、二氯乙烷、戊烷、己烷、庚烷或其混合物接触，以使固体形式的鞣酸沉淀；以及

(vi) 收集该固体形式的鞣酸，由此制备第二鞣酸组合物，其中在该第二鞣酸组合物中小于等于2%的鞣酸具有1至4个没食子酰基部分。

14. 如权利要求13所述的方法，其中步骤(iii)通过以下来进行：(a) 于20至60℃使所述第一鞣酸萃取物与碳酸金属盐类接触以形成混合物；(b) 于20至50℃利用乙酸乙酯、乙酸甲酯、丙酮、甲乙酮、乙腈、乙醇、异丙醇、1,4-二噁烷、四氢呋喃或其组合萃取该混合物，以制备有机溶液；以及(c) 于20至60℃将该有机溶液同时或序贯与活性碳及硫酸金属盐类孵育。

15. 如权利要求13所述的方法，其中步骤(ii)通过以下来进行：(a) 将第一批的所述组合物与所述第一溶剂孵育；(b) 将第二批的所述组合物与在(a)中形成的混合物孵育；以及(c) 将第三批的所述组合物与在(b)中形成的混合物孵育，以制备所述第一鞣酸萃取物。

16. 如权利要求13所述的方法，还包括从所述第一或第二鞣酸组合物中除去糊精、胶及树脂的步骤。

17. 如权利要求16所述的方法，其中通过以下过程来进行除去步骤，该过程包括(a) 将所述第一鞣酸组合物或所述第二鞣酸组合物与极性溶剂混合，并收集由此形成的有机层。

18. 如权利要求17所述的方法，其中所述极性溶剂是乙酸乙酯、乙酸甲酯、丙酮、甲乙酮、乙腈、乙醇、异丙醇、1,4-二噁烷或四氢呋喃。

19. 如权利要求17所述的方法，其中除去步骤的过程还包括(b) 于10至70℃使所述有机层与烷基溶剂、氯化溶剂或其混合物接触，并收集由此形成的底部油层。

20. 如权利要求19所述的方法，其中所述烷基溶剂是戊烷、己烷或庚烷。

21. 如权利要求19所述的方法，其中所述氯化溶剂为二氯甲烷或二氯乙烷。

22. 如权利要求13所述的方法，还包括(a) 将所述第二鞣酸组合物与烷基溶剂、氯化溶剂或其组合混合，以及(b) 于10至70℃搅拌由此形成的混合物以除去溶剂残留物。

23. 如权利要求22所述的方法，其中所述烷基溶剂是戊烷、己烷或庚烷。

24. 如权利要求22所述的方法，其中所述氯化溶剂为二氯甲烷或二氯乙烷。

25. 如权利要求13所述的方法，其中在20至60℃的温度进行步骤(ii)。

26. 如权利要求13所述的方法，其中步骤(iii)还包括将所述混合物与二氧化硅接触。

27. 如权利要求13所述的方法，其中在步骤(i)的所述包含鞣酸的组合物为从植物的没食子取得的没食子粉末或没食子碎片。

28. 如权利要求27所述的方法，其中所述植物选自盐肤木、盐骨木、盐谷子、西西里漆树、青麸杨、红谷杨、山茶、浆果、胭脂树、葡萄、石榴、没食子栎、土耳其栎、黑荆、花旗松、刺云实、台湾水青冈以及猪脚楠。

29. 如权利要求27所述的方法，其中所述植物选自盐肤木、盐骨木、盐谷子、西西里漆树、青麸杨及红谷杨。

30. 如权利要求27所述的方法，其中所述没食子的直径介于1至8厘米之间。

31. 如权利要求27所述的方法，其中所述没食子为中国肚倍或角倍。

32. 如权利要求31所述的方法，其中所述没食子为中国角倍。

33. 如权利要求31所述的方法，其中所述中国角倍的直径介于1至8厘米之间。

34. 如权利要求33所述的方法,其中所述没食子的直径介于2至6厘米之间。
35. 如权利要求34所述的方法,其中所述没食子的直径介于3至5厘米之间。
36. 如权利要求13所述的方法,其中在步骤(iii)中,碳酸金属盐类为碳酸锂、碳酸钠或碳酸钾。
37. 如权利要求13所述的方法,其中在步骤(iii)中,硫酸金属盐类为硫酸钙或硫酸镁。
38. 如权利要求13所述的方法,其中步骤(ii)中的所述第一溶剂包含丙酮、乙腈、甲乙酮、乙酸乙酯、乙酸甲酯、乙醇、异丙醇、四氢呋喃、1,4-二噁烷、庚烷、己烷、水或其组合。
39. 如权利要求13所述的方法,其中步骤(v)的所述第二溶剂包含丙酮、乙腈、乙酸乙酯、乙酸甲酯、甲乙酮、乙醇、异丙醇、1,4-二噁烷、四氢呋喃或其组合。
40. 一种包含鞣酸的组合物,其中该组合物是通过如权利要求13至39中任一项所述的方法所制备。
41. 一种用于从鞣酸组合物除去糊精、胶和/或树脂的方法,包括:
- (i) 提供包含糊精、胶、树脂或其组合的鞣酸组合物;
 - (ii) 将所述鞣酸组合物与极性溶剂混合,以形成有机层;
 - (iii) 于10至70°C使该有机层与烷基溶剂、氯化溶剂或其组合接触;以及
 - (iv) 收集由此形成的底部油层。
42. 一种用于从鞣酸组合物除去溶剂残留物的方法,包括:
- (i) 提供鞣酸组合物,该鞣酸组合物包含至少一种溶剂的残留物;
 - (ii) 将该鞣酸组合物与烷基溶剂、氯化溶剂或其组合混合,以形成混合物;以及
 - (iii) 于10至70°C搅拌该混合物以除去该至少一种溶剂的残留物。

用于制备鞣酸组合物的改良的富集方法

背景技术

[0001] 鞣质(tannins)是一组存在于多种植物(例如盐肤木(*Rhus chinensis*)、盐骨木(*Rhus javanica*)、盐谷子(*Rhus semialata*)、西西里漆树(*Rhus coriaria*)、青麸杨(*Rhus potaninii*)、红谷杨(*Rhus punjabensis* var. *sinica* (Diels) Rehder&E.H.Wilson))、山茶(*Camellia sinensis*)、浆果、胭脂树(*Bixa orellana*)、葡萄(*Vitis vinifera*)、石榴(*Punica granatum*)、没食子栎(*Quercus infectoria*)、土耳其栎(*Quercus cerris*)、黑荆(*Acacia mearnsii*)、花旗松(*Pseudotsuga menziesii*)、刺云实(*Caesalpinia spinosa*)、台湾水青冈(*Fagus hayata* Palib.ex Hayata)或猪脚楠(*Machilus thunbergii* Sieb.& Zucc.)等)中的天然化合物。鞣质有三种主要的类别,包括含有没食子酸(gallic acid)作为基本单位的水解型鞣质(也称为鞣酸)、含有黄酮(flavone)作为基本单位的缩合鞣质以及含有间苯三酚(phloroglucinol)作为基本单位的褐藻多酚(phlorotannins)。鞣质广泛地用作一种工业颗粒板粘合剂且广泛地用来生产防蚀底漆或树脂。也提出鞣质可对人类健康具有各种影响。

[0002] D-氨基酸氧化酶(D-amino acid oxidase, DAAO)是一种将D-氨基酸氧化成相应的亚氨酸的过氧化物酶(peroxisomal enzyme)。据报道,DAAO与脑D-氨基酸(包含D-丝氨酸)的代谢以及谷氨酸能神经传导的调节有关。因此,DAAO是治疗与D-丝氨酸和/或谷氨酸能神经传导有关的中枢神经系统(central nervous system, CNS)疾病的靶标。

发明内容

[0003] 本公开至少基于制备具有增强的生物活性、安全性和纯度特征的鞣酸混合物的改良的富集方法的开发。据此,本公开提供用于制备鞣酸组合物的富集方法,和用于抑制DAAO活性及缓解与CNS及肥胖相关的疾病与病症的鞣酸组合物(例如,经本公开富集方法制备的鞣酸组合物)。

[0004] 据此,本公开一方面的特征在于一种用于制备鞣酸组合物的方法,该方法包括:(i)提供包含鞣酸的组合物;(ii)于20至80°C的温度将多批次的该组合物序贯与第一溶剂孵育,以制备第一鞣酸萃取物;(iii)于20至80°C的温度使该第一鞣酸萃取物与活性炭(charcoal)、碳酸金属盐类(例如,碳酸锂、碳酸钠或碳酸钾)及硫酸金属盐类(例如,硫酸钙或硫酸镁)中的一种或多种接触,以除去吸附至活性炭和/或碳酸金属盐类的物质,或者除去由该硫酸金属盐类除去的物质,由此制备第一鞣酸组合物;(iv)将该第一鞣酸组合物与第二溶剂混合以形成溶液;(v)于20至40°C的温度将该溶液与二氯甲烷、二氯乙烷、戊烷、己烷、庚烷或其混合物接触,以使固体形式的鞣酸沉淀;以及(vi)收集该固体形式的鞣酸,由此制备第二鞣酸组合物,其中在该第二鞣酸组合物中,小于等于2%的鞣酸具有1至4个没食子酰基部分(galloyl moieties)。在一些情况中,步骤(iii)还可以包含使该混合物与二氧化硅接触。

[0005] 合适的第一溶剂包括,但不限于:丙酮、乙腈、甲乙酮、乙酸乙酯、乙酸甲酯、乙醇、异丙醇、四氢呋喃、1,4-二噁烷、庚烷、己烷、水,或其组合。合适的第二溶剂包含,但不限于:

丙酮、乙腈、乙酸乙酯、乙酸甲酯、甲乙酮、乙醇、异丙醇、1,4-二噁烷、四氢呋喃及其组合。

[0006] 在该步骤(i)中,该含鞣酸的组合物可以是植物的没食子取得的没食子粉末或没食子碎片。示例性的植物包含,但不限于:盐肤木(*Rhus chinensis*)、盐骨木(*Rhus javanica*)、盐谷子(*Rhus semialata*)、西西里漆树(*Rhus coriaria*)、青麸杨(*Rhus potaninii*)、红谷杨(*Rhus punjabensis var. sinica* (Diels) Rehder&E.H.Wilson)、山茶(*Camellia sinensis*)、浆果、胭脂树(*Bixa orellana*)、葡萄(*Vitis vinifera*)、石榴(*Punica granatum*)、没食子栎(*Quercus infectoria*)、土耳其栎(*Quercus cerris*)、黑荆(*Acacia mearnsii*)、花旗松(*Pseudotsuga menziesii*)、刺云实(*Caesalpinia spinosa*)、台湾水青冈(*Fagus hayata* Palib.ex Hayata)以及猪脚楠(*Machilus thunbergii* Sieb.& Zucc.)。在一些情况中,植物为盐肤木、盐骨木、盐谷子、西西里漆树、青麸杨以及红谷杨。

[0007] 在一些实施方案中,该没食子的直径可介于1至8厘米之间。在一些实施方案中,没食子可为中国肚倍(Chinese belly-shaped gallnuts)或中国角倍(Chinese horned gallnuts)。当使用中国角倍时,所述没食子的直径可介于1至8厘米之间,例如介于2至6厘米之间或介于3至5厘米之间。

[0008] 在一些实施方案中,步骤(ii)可通过以下来进行:(a)将第一批的该组合物与该第一溶剂孵育;(b)将第二批的该组合物与(a)形成的该混合物孵育;以及(c)将第三批的该组合物与(b)形成的该混合物孵育,以制备该第一鞣酸萃取物。在一些实施方案中,步骤(ii)可在20至60°C的温度进行。

[0009] 在一些实施方案中,步骤(iii)可通过以下来进行:(a)于20至60°C使该第一鞣酸萃取物与碳酸金属盐类接触以形成混合物;(b)于20至50°C以乙酸乙酯、乙酸甲酯、丙酮、甲乙酮、乙腈、乙醇、异丙醇、1,4-二噁烷、四氢呋喃或其组合萃取该混合物,以制备有机溶液;以及(c)于20至60°C将该有机溶液同时或序贯地与活性碳及硫酸金属盐类孵育。

[0010] 在一些情况中,本文所述的方法可还包括从第一鞣酸组合物或第二鞣酸组合物除去糊精、胶(gum)及树脂的步骤。该除去步骤可通过以下过程来进行,该过程包含(a)将该第一鞣酸组合物或该第二鞣酸组合物与极性溶剂混合,并收集因此形成的有机层;并可任选地进行(b)于10至70°C使该有机层与烷基溶剂、氯化溶剂(chlorinated solvent)或其混合物接触,并收集因此形成的底部油层。在此除去步骤中使用的示例性的极性溶剂包含,但不限于:乙酸乙酯、乙酸甲酯、丙酮、甲乙酮、乙腈、乙醇、异丙醇、1,4-二噁烷或四氢呋喃。在此除去步骤中使用的示例性的烷基溶剂包含,但不限于:戊烷、己烷或庚烷。示例性的氯化溶剂包含,但不限于:二氯甲烷或二氯乙烷。

[0011] 或者/另外,本文所述的方法还可以包括以下步骤:(a)将该第二鞣酸组合物与烷基溶剂(例如,戊烷、己烷或庚烷)、氯化溶剂(例如,二氯甲烷或二氯乙烷)或其组合混合,以及(b)在10-70°C,搅拌如此形成的混合物,以除去溶剂残留物。

[0012] 另一方面,本公开提供一种用于从鞣酸组合物除去糊精、胶和/或树脂的方法,其包括(i)提供包含糊精、胶、树脂或其组合的鞣酸组合物;(ii)将该鞣酸组合物与极性溶剂混合,以形成有机层;(iii)于10-70°C将该有机层与烷基溶剂、氯化溶剂或其组合接触;以及(iv)收集因此形成的底部油层。

[0013] 又一方面,本公开提供一种用于从鞣酸组合物除去溶剂残留物的方法,其包括:(i)提供鞣酸组合物,该鞣酸组合物包含至少一种溶剂的残留物;(ii)将该鞣酸组合物与烷

基溶剂、氯化溶剂或其组合混合,以形成混合物;以及(iii)于10至70°C的温度搅拌该混合物以除去该至少一种溶剂的残留物。

[0014] 此外,本公开的特征在于组合物,其包含(i)鞣酸或其可接受的盐类的混合物,以及(ii)载体,其中在该组合物中,大于等于98%的鞣酸具有4至12个没食子酰基部分;组合物中大于等于97%的鞣酸具有5至12个没食子酰基部分;组合物中大于等于90%的鞣酸具有6至12个没食子酰基部分;或者组合物中大于等于60%的鞣酸具有8至12个没食子酰基部分。在一些实施方案中,该组合物含有约4至20%的具有5个没食子酰基部分的鞣酸、约10至35%的具有6至7个没食子酰基部分的鞣酸,和/或约55至85%的具有8至12个没食子酰基部分的鞣酸。以任何本文所述的富集方法所制备的含鞣酸组合物均涵盖于本公开的范围。

[0015] 本文所述的组合物可以为药物组合物、营养组合物、保健食品或医疗食品。可将组合物制备为片剂、胶囊、软咀嚼物或凝胶。

[0016] 本文所述的任何组合物可用于抑制受试者的D-氨基酸氧化酶(D-amino acid oxidase, DAAO)或可用于治疗受试者的中枢神经系统(CNS)病症或与肥胖相关的病症。示例性的CNS病症包含,但不限于:精神分裂症(schizophrenia)、精神病(psychotic disorders)、阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)、额颞痴呆(frontotemporal dementia)、血管性痴呆(vascular dementia)、Lewy体痴呆(dementia with Lewy bodies)、老年性痴呆(senile dementia)、轻度认知障碍(mild cognitive impairment)、良性健忘症(benign forgetfulness)、闭合性头部损伤(closed head injury)、自闭症谱系病症(autistic spectrum disorder)、Asperger障碍(Asperger's disorder)、脆性X综合征(fragile X syndrome)、注意缺陷多动障碍(attention deficit hyperactivity disorders, ADHD)、注意缺陷障碍(attention deficit disorder)、强迫症(obsessive compulsive disorder)、抽动障碍(tic disorders)、儿童期学习障碍(childhood learning disorders)、经前综合征(premenstrual syndrome)、抑郁(depression)、严重抑郁障碍(major depressive disorder)、兴趣缺失(anhedonia)、自杀意念和/或自杀行为(suicidal ideation and/or behaviors)、双相型障碍(bipolar disorder)、焦虑障碍(anxiety disorders)、惊恐障碍(panic disorder)、创伤后应激障碍(post-traumatic stress disorder)、慢性轻度且不可预测的应激(chronic mild and unpredictable stress)、进食障碍(eating disorders)、成瘾症(addiction disorders)、人格障碍(personality disorders)、帕金森氏症(Parkinson's disorder)、亨廷顿氏症(Huntington's disorder)、多发性硬化(multiple sclerosis)、肌萎缩侧索硬化(amyotrophic lateral sclerosis)、Tourette综合征(Tourette's syndrome)、夜间遗尿症(nocturnal enuresis)、非癫痫发作(non-epileptic seizures)、眼睑痉挛(blepharospasm)、杜氏肌营养不良(Duchenne muscular dystrophy)、中风(stroke)、慢性疼痛(chronic pain)、神经性疼痛(neuropathic pain)包括痛觉过敏(hyperalgesia)及异常性疼痛(allodynia)、糖尿病性多神经病(diabetic polyneuropathy)以及慢性疼痛综合征(chronic pain syndromes)。在一些情况中,例如,与肥胖相关的病症为进食障碍、神经性厌食(anorexia nervosa)、神经性贪食(bulimia nervosa)、中风、冠状动脉心脏病(coronary heart disease)、心脏病发作(heart attack)、充血性心力衰竭(congestive heart failure)、先天性心脏病(congenital heart disease)、高血压(hypertension)、非

酒精性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis)、胰岛素抗性 (insulin resistance)、高尿酸血症 (hyperuricemia)、甲状腺功能减退 (hypothyroidism)、骨关节炎 (osteoarthritis)、胆结石 (gallstones)、不育 (infertility)、肥胖通气不足综合征 (obesity hypoventilation syndrome)、阻塞性睡眠呼吸暂停 (obstructive sleep apnea)、慢性阻塞性肺病 (chronic obstructed pulmonary disease) 以及哮喘 (asthma)。其它实例则包含糖尿病、高血糖症 (hyperglycemia)、高血脂症 (hyperlipidemia) 以及高胆固醇血症 (hypercholesterolemia)。

[0017] 本文所述的组合物可配制用于对需要本文所述治疗的受试者以一日三次至每两个月一次的频率施用。在一些情况中,组合物与一种或多种另外的药剂合并使用以治疗CNS病症或该与肥胖相关的病症。可同时或序贯将组合物以及一种或多种另外的药剂施用至受试者。

[0018] 以下说明将详细阐明本发明的一个或多个实施方式。在参阅下文附图和数个实施方案的详细描述以及所附的权利要求书之后,本发明的其它技术特征或优点会是明显的。

附图说明

[0019] 以下的附图形成本说明书的一部分,且被包括在内以进一步说明本公开的一些方面,通过参考一个或多个这些附图,并结合本文所提出的具体实施方式的详细说明,可更好地理解本发明。

[0020] 图1是图表,其显示作为组的鞣酸抑制D-氨基酸氧化酶 (DAAO)。

[0021] 图2是图表,其显示300nM的具有不同没食子酰基部分数量的鞣酸的抗-DAAO活性。3个没食子酰基部分显示低活性。相较于具有3个没食子酰基部分的鞣酸,具有4个或更多没食子酰基部分的鞣酸对DAAO具有较高的抑制活性。没食子酰基部分的数目越多,抑制DAAO的功效越强。

[0022] 图3为示例性设计的示意图,其用于评估鞣酸在改善基础行为功能、焦虑、抑郁、记忆、感觉运动门控及认知行为上的活性。每隔一日对小鼠注射载体对照物或每千克10毫克或每千克30毫克的鞣酸。每隔一日测量经处理的小鼠的体重。在不进行注射给药的日子进行行为测试。

[0023] 图4是图表,其显示在给药处理的期间,以载体对照物及指定的不同剂量的鞣酸处理后,小鼠的体重变化。施用每千克10毫克的鞣酸会阻止体重增加,然而施用每千克30毫克的鞣酸则使体重下降。这是鞣酸可减轻体重且可治疗肥胖病症的实例。

[0024] 图5是图表,其显示小鼠在经过重复注射鞣酸或者载体对照物之后,其自发运动活动力的剂量依赖性下降。

[0025] 图6是图表,其显示小鼠在单一口服管饲法指定的各种剂量的鞣酸 (Merck Millipore, 德国) 之后,其运动活动力以剂量依赖性方式剂量依赖性地下降。

[0026] 图7包括图表,其显示相对于载体对照组,重复注射鞣酸会以剂量依赖性的方式改善小鼠的类焦虑行为。A小图:每一组的厌恶持续时间。B小图:每一组的厌恶距离比。C小图:每一组的风险评估数值。

[0027] 图8是图表,其显示相对于载体对照组,重复注射鞣酸会以剂量依赖性方式改善小鼠的空间记忆提取能力。以每千克30毫克处理的组别的动物表达好于以每千克10毫克处理

的组别的动物。

[0028] 图9为示例性实验设计的示意图,其用于评估鞣酸对MK-801处理小鼠的效果(如实施例3所描述)。通过开放场以及前脉冲抑制,分别检测经鞣酸或者载体对照物处理的每只小鼠的自发运动活动力以及感觉运动功能,每次试验之间至少间隔一周。在施用MK-801(或载体)之前20分钟,对每只小鼠施用鞣酸(或载体)。此外,在行为测试之前20分钟,对每只小鼠施用MK-801(或载体)。

[0029] 图10是图表,其显示通过单次口服施用鞣酸以剂量依赖性方式减少由MK-801诱导的过动的效果。

[0030] 图11是图表,其显示鞣酸以剂量依赖性方式改善前脉冲抑制的效果。相较于对照组,前脉冲抑制的改善更好。比起每千克15毫克、20毫克及30毫克组的各组,每千克10毫克的前脉冲抑制改善程度更小。

[0031] 图12是图表,其显示不同来源的鞣酸对于前脉冲抑制的改善功效。鞣酸来自Sigma-Aldrich(来源A)或Spectrum,USA(来源B)。前脉冲抑制的改善好于对照组。

[0032] 图13为示例性实验设计的示意图,其评估鞣酸对MK-801处理小鼠的效果(如实施例3所描述)。通过开放场、前脉冲抑制、巴恩斯迷宫(Barnes maze)、蔗糖偏好,分别对经鞣酸或载体对照物,及与MK-801处理的每只小鼠,试验其自发运动活动力以及感觉运动功能,每次试验之间至少间隔一周。在注射MK-801(或载体)前20分钟,通过腹腔内(i.p.)注射对每只小鼠施用鞣酸(或载体)。此外,在行为测试前20分钟,通过腹腔内注射对每只小鼠施用MK-801(或载体)。

[0033] 图14是图表,其显示鞣酸以剂量依赖性方式改善由MK-801诱导的过动性的效果。

[0034] 图15是图表,其显示鞣酸以剂量依赖性方式改善MK-801中断的前脉冲抑制的效果。

[0035] 图16是图表,其显示在巴恩斯迷宫中,鞣酸以剂量依赖性方式改善MK-801中断的工作记忆的效果。

[0036] 图17是图表,其显示鞣酸以剂量依赖性方式改善MK-801中断的蔗糖偏好的效果。

[0037] 图18为示例性实验设计的示意图,其利用von Frey测试(von Frey test)来评估鞣酸对小鼠的效果。通过腹腔内注射对每只小鼠施用鞣酸(或载体)。

[0038] 图19是图表,其显示在注射鞣酸或载体对照物(PBS)之后,脚爪缩回疼痛阈值随时间而有所改善。经鞣酸处理大幅改善了疼痛阈值。

[0039] 图20是图表,其显示含有源自没食子栎(*Quercus infectoria*)的鞣酸的组合物的HPLC色谱图。具有杂质及大量具有1至4个没食子酰基部分的鞣酸。

[0040] 图21包含两个图表,其显示含有来自盐肤木(*Rhus chinensis*)的鞣酸的组合物的HPLC色谱图。具有杂质及大量具有1至4个没食子酰基部分的鞣酸。

[0041] 图22包含两个图表,其显示含有来自盐肤木(*Rhus chinensis*)的鞣酸的组合物的HPLC色谱图。具有杂质及大量具有1至4个没食子酰基部分的鞣酸。

[0042] 图23是图表,其显示萃取自指定的各种植物或植物学来源的没食子的鞣酸对DAAO的抑制活性。相较于萃取自青麸杨(*Rhus potaninii*)或没食子栎(*Quercus infectoria*),萃取自盐肤木(*Rhus chinensis*)的没食子的鞣酸具有较高的抑制功效,且相较于直径6-7厘米的盐肤木(*Rhus chinensis*)没食子,直径3-4厘米的盐肤木没食子具有较高的抑制功

效。

[0043] 图24是图表,其显示通过单一口服给予不同来源的鞣酸可减少MK-801-诱导的过动的效果。以富集方法#10制得的鞣酸具有最高的抑制活性。

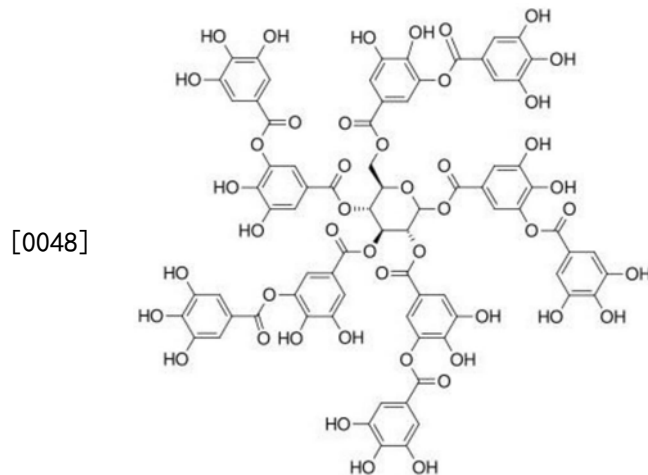
[0044] 图25是图表,其显示以富集方法#10萃取的鞣酸具有较高的改善MK-801中断的前脉冲抑制的能力(有上限效果,每千克50毫克动物组与每千克200毫克的动物组表现得一样好)。

[0045] 图26是图表,其显示从富集方法#10制备的鞣酸组合物、USP标准品及温州瓯海精细化工有限公司(Wenzhou Ouhai Fine Chemicals)的鞣酸组合物的HPLC-MS色谱图,其中从富集方法#10制备的鞣酸组合物含有少于0.35%的非鞣酸杂质,而USP标准品及温州瓯海精细化工有限公司所提供的鞣酸组合物分别含有15.99%及6.46%的高得多的非鞣酸杂质量。

[0046] 图27为制备本文所述鞣酸组合物的示例性富集方法的示意图。请参阅下述富集方法11。

具体实施方式

[0047] 鞣酸(tannic acids)是存在于多种植物中的鞣质亚群。从植物萃取的鞣酸是含有2至12个没食子酰基部分(galloyl moieties)的聚没食子酰基葡萄糖(polygalloyl glucose)或聚没食子酰基酰奎尼酸酯(polygalloyl quinic acid ester)的混合物。以下提供示例性的包含10个连接至葡萄糖部分的没食子酰基部分的鞣酸的结构:



[0049] 历史上曾有将鞣酸作为吸收毒物的解毒剂,以及用于治疗短期状况例如出血、疹以及其它疼痛状况。

[0050] 本公开提供的是一种用于制备鞣酸组合物的改良的富集方法,其中该鞣酸组合物实质上不包含小分子鞣酸(例如含有小于2重量%的具有少于4个没食子酰基部分的鞣酸),实质上不含糊精、胶和/或树脂,和/或实质上不含用于从适当来源(例如本文所述的植物来源)萃取鞣酸的溶剂的残留物。术语“实质上不含”(substantially free)一种成分的意思是指该成分不存在(即,以常规方法检测不到)或仅存在最小量、极微量的该成分,因而对如此含有该成分的组合物的性质没有任何实质的影响。在一些情况中,组合物“实质上不含”一种成分是指基于该组合物的重量,该成分在该组合物中的含量按重量计少于10%(例如,少于5%、少于4%、少于3%、少于2%、少于1%、少于0.5%、少于0.1%或更低)。本公开也提

供含有鞣酸混合物的鞣酸组合物,其实质上不含小分子鞣酸、实质上不含糊精、胶和/或树脂,和/或实质上不含用于从适当来源(例如本文所述的植物来源)萃取鞣酸的溶剂的残留物。可以任何本文所述的方法制备所述鞣酸混合物。本文所述的鞣酸混合物展现出强烈抑制DAAO的活性,而已知DAAO涉及多种疾病与病症,例如肥胖病症、高血脂症、高胆固醇血症、高血糖症、糖尿病以及CNS病症。该鞣酸混合物也显示出,在小鼠模型上,鞣酸成功地减少体重并改善基础行为功能、高活动性、焦虑、抑郁、感觉运动门控、疼痛阈值、记忆与认知行为。此外,在经MK-801(一种N-甲基-D-天门冬氨酸受体(NMDA受体)的拮抗剂)处理的小鼠上,鞣酸展现防护(rescue)及保护(protective)的效果。NMDA受体是一种表达在神经细胞上的谷氨酸受体及离子通道蛋白,同时,NMDA受体在控制突触可塑性、修复、神经发育、学习以及记忆功能中扮演重要的角色。多数CNS病症具有NMDA受体功能异常。因此,可预期本文描述的含有鞣酸混合物的组合物可用于治疗与NMDA受体功能异常相关的CNS病症。也可预期所述鞣酸组合物受益于肥胖以及与肥胖相关的疾病及病症的治疗。

[0051] I. 用于制备鞣酸组合物的改良的富集方法

[0052] 本文所述的改良的富集方法包含一种或多种以下特征:(i)多批次萃取(multiple-batch extraction)过程;(ii)糊精/胶/树脂除去过程,以及(iii)溶剂残留物除去过程。

[0053] (a) 多批次萃取

[0054] 在一些实施方案中,可使用合适的溶剂从含有鞣酸的组合物(例如,本文描述的没食子粉或碎片)中萃取鞣酸。该含鞣酸组合物可包含异质(heterogeneous)的鞣酸族群。在此萃取过程中可使用合适溶剂。本文使用的“溶剂”(solvent)一词是指能够溶解一种或多种溶质的液体。溶剂可包含溶解目标溶质的纯物质群。或者,本发明使用的溶剂可以是用于溶解溶质的多种物质的混合物。用于萃取鞣酸的合适溶剂包含丙酮、乙腈、甲乙酮、乙酸乙酯、乙酸甲酯、乙醇、异丙醇、四氢呋喃、1,4-二噁烷、戊烷、己烷、庚烷、水或其组合。

[0055] 可以多批次方式来进行萃取过程。简而言之,可将多批次的含鞣酸组合物序贯置于合适溶剂中,各自在合适溶剂中孵育(例如在搅拌下)一段合适时间(例如1至6小时)。例如,含鞣酸组合物的第一批可于合适溶剂中孵育一段合适时间(例如1至6小时或2至4小时)。可接着将含鞣酸组合物的第二批(可实质上与第一批的量相同)置于合适溶剂(已含有第一批)中并孵育一段合适时间(例如1至6小时或2至4小时)。接下来,将含鞣酸组合物的第三批(也可实质上与第一批和/或第二批具有相同量)置于相同的合适溶剂(含有第一批及第二批)中并孵育一段合适时间(例如,1至10小时、2至8小时或3至6小时)。如有需要,可以相似方式将其它批次的含鞣酸组合物与该合适溶剂孵育。接着,可过滤所形成的混合物的可溶部分,以除去不可溶物质,并在真空中浓缩以制备粗鞣酸萃取物。意料不到地发现,相较于使用单批式方式(同时将总量相同的含鞣酸组合物于相同量的溶剂中孵育),使用多批次方式获取的鞣酸产量比前者获得的鞣酸产量高至少两倍。请参阅以下富集方法11。

[0056] (b) 糊精/胶/树脂的除去

[0057] 从植物来源萃取的鞣酸(如本文记载者)通常含有糊精、胶和/或树脂,而这些成分会限制鞣酸组合物的治疗应用。当有需求时,本文所述的改良的富集方法可包含有效地除去糊精、胶,和/或树脂的过程。

[0058] 糊精/胶/树脂的除去过程可通过以下方式进行:混合含鞣酸组合物与适量的

烷基溶剂,在合适温度(例如室温)搅拌所形成的混合物一段合适时间(例如,1至4小时或2至3小时)。如果需要的话,可以合适溶剂(是指可溶解鞣酸的溶剂,例如丙酮)来稀释该含鞣酸组合物。烷基溶剂是指具有烷基链(例如C₁-C₁₀烷基链)的溶剂。实例包含但不限于:己烷、戊烷或庚烷。在搅拌过程之后,可将混合物静置一段时间以分成两层。可收集因此形成的底部油层。若有需要,可重复数次树脂除去步骤,例如重复2至4次。

[0059] 在以烷基溶剂处理之前,该含鞣酸组合物可先与极性溶剂混合一段合适时间,以形成有机层,接着收集有机层并以如本文所述的烷基溶剂进行后续处理。极性溶剂含有部分带电(具有大偶极矩)的分子,且通常在阴电性非常不同的原子(例如氧与氢)之间具有键结。在一些情况中,极性溶剂可以是质子性溶剂,其含有具有与氧或氮结合的氢原子的分子。实例包含甲酸、正丁醇、异丙醇(IPA)、硝基甲烷、乙醇(EtOH)、甲醇(MeOH)、乙酸及水。在其它情况中,极性溶剂可为非质子性溶剂,其缺乏酸性氢。实例包含N-甲基吡咯烷酮(N-methylpyrrolidone)、四氢呋喃(THF)、乙酸乙酯(EtOAc)、丙酮、二甲基甲酰胺(DMF)、乙腈(MeCN)、二甲亚砜(DMSO)以及碳酸丙烯酯(propylene carbonate,PC)。

[0060] 从本研究的结果可得知,相较于使用MgSO₄、Na₂CO₃,和/或K₂CO₃处理,进行前述的树脂除去步骤两次,可导致显著地增进树脂除去效率。请参阅以下的实例。

[0061] (c) 溶剂残留物的除去

[0062] 虽然通常会使用溶剂从天然来源萃取鞣酸,但是产出的鞣酸组合物通常会含有溶剂的残留物,而溶剂的残留物也会影响鞣酸组合物的治疗应用和/或治疗功效。当有需求时,本公开提供从鞣酸产物除去所述溶剂残留物的有效方法。

[0063] 可从遵照常规方法所获得,或从本文所述流程所获得的鞣酸固体中,除去溶剂的残留物。为了进行此除去步骤,使用合适量(例如,5至30x毫升,例如20x毫升)的合适溶剂,于合适温度(例如,40至70℃,例如60℃)将鞣酸固体浆化一段合适时间(例如,12至24小时,例如16小时)。接着可过滤产出的混合物并以合适温度(例如10至80℃,优选为60至80℃,例如70℃)于真空蒸发,以除去在制备过程中所使用的溶剂的残留物。在此步骤中使用的溶剂可以是烷基溶剂(例如,C₁-C₁₀烷基溶剂,例如己烷)、氯化溶剂如二氯甲烷或二氯乙烷,或其组合。若有需要,此步骤可重复数次(例如重复2至5次),以使溶剂的残留物可从最终鞣酸产物中实质除去。如下表所示,通过进行此步骤,可从其制备涉及溶剂萃取的鞣酸组合物中显著地除去溶剂的残留物。

[0064] 表1:除去溶剂残留物的效率

浆化	条件	溶剂残留物的%
无浆化	-	二氯甲烷: 2.0 % 丙酮: 5.0 %
[0065] 第一次浆化	1. 庚烷, 60°C, 16 小时 2. 干燥, 70°C, 8 小时	二氯甲烷: 1.0 % 丙酮: 1.2 % 庚烷: <0.2 %
第二次浆化	1. 庚烷, 60°C, 16 小时 2. 干燥, 70°C, 8 小时	二氯甲烷: 0.1 % 丙酮: 0.7 % 庚烷: <0.2 %
第三次浆化	1. 庚烷, 60°C, 16 小时 2. 干燥, 70°C, 8 小时	二氯甲烷: 0 % 丙酮: 0.4 % 庚烷: <0.2 %

[0066] (d) 示例性的富集方法

[0067] 以下提供的是一种用于制备鞣酸组合物的示例性富集方法, 其中该鞣酸组合物实质上不含小分子鞣酸(例如含有小于2重量%的具有少于4个没食子酰基部分的鞣酸), 实质上不含糊精、胶和/或树脂, 和/或实质上不含用于从适当来源(例如本文所述的植物来源)萃取鞣酸的溶剂残留物。

[0068] 在一些实施方案中, 本文描述的鞣酸组合物可以以下方式制备。通过常规方法取得来自合适植物或植物学来源(例如本文前述的那些)的没食子。将没食子研磨成没食子粉或没食子碎片。在一些实例中, 可使没食子粉通过具有合适尺寸的筛网(例如20网目、30网目、40网目、50网目或60网目), 以形成细没食子粉。

[0069] 合适的植物来源包含, 但不限于: 盐肤木(*Rhus chinensis*)、盐骨木(*Rhus javanica*)、盐谷子(*Rhus semialata*)、西西里漆树(*Rhus coriaria*)、青麸杨(*Rhus potaninii*)、红谷杨(*Rhus punjabensis var. sinica* (Diels) Rehder & E.H. Wilson)、山茶(*Camellia sinensis*)、浆果、胭脂树(*Bixa orellana*)、葡萄(*Vitis vinifera*)、石榴(*Punica granatum*)、没食子栎(*Quercus infectoria*)、土耳其栎(*Quercus cerris*)、黑荆(*Acacia mearnsii*)、花旗松(*Pseudotsuga menziesii*)、刺云实(*Caesalpinia spinosa*)、台湾水青冈(*Fagus hayata* Palib. ex Hayata), 或猪脚楠(*Machilus thunbergii* Sieb. & Zucc.)。在一些实施方案中, 本文的组合物中含有的鞣酸或鞣酸混合物是从盐肤木(*Rhus chinensis*)、盐骨木(*Rhus javanica*)、盐谷子(*Rhus semialata*)、西西里漆树(*Rhus coriaria*)、青麸杨(*Rhus potaninii*), 或者红谷杨(*Rhus punjabensis var. sinica* (Diels) Rehder & E.H. Wilson) 萃取得出。

[0070] 本文所述的植物来源可能需要筑巢昆虫, 该筑巢昆虫包括, 但不限于: 云石纹瘿蜂(*Andricus kollari*)、洋蓟瘿蜂(*Andricus fecundatrix*)、瘿栎瘿蜂(*Andricus quercuscalicis*)、瘿栎瘿蜂(*Andricus quercuscalicis*)、栎苹果瘿蜂(*Biorhiza pallida*)、亮片瘿蜂(*Neuroterus quercusbaccarum*)、平滑亮片瘿蜂(*Neuroterus albipes*)、丝钮扣瘿蜂(*Neuroterus numismalis*)、樱桃瘿蜂(*Cynips quercusfolii*)、角倍蚜(*Melaphis chinensis* (Bell))、倍蛋蚜(*Melaphis peitan* Tsai et Tang)、圆角倍蚜(*Nurudea sinica* Tsai et Tang)、倍花蚜(*Nurudea shiraii* Matsumura)、红倍花蚜(*Nurudea rosea* Matsumura)、红小铁枣蚜(*Meitanaphis elongallis* Tsai et Tang)、枣

铁倍蚜 (*Macrorhinarium ensigallis* Tsai et Tang)、蛋铁倍蚜 (*Macrorhinarium ovagallis* Tsai et Tang)、铁倍花蚜 (*Floraphis meitanensis* Tsai et Tang)、黄毛小铁枣蚜 (*Meitanaphis flavogallis* Tang)、肚倍蚜 (*Kaburagia rhusicola* Takagi)、蛋肚倍蚜 (*Kaburagia ovatihuicola* Xiang)、枣铁倍蚜 (*Kaburagia ensigallis* Tsai et Tang)、蛋铁倍蚜 (*Kaburagia ovogallis*)、肚倍蚜 (*Kaburagia thusicola* Takagi)、米倍蚜 (*Meitanaphis microgallis* Xiang), 及周氏倍花蚜 (*Floraphis choui* Xiang)。

[0071] 在一些实施方案中, 鞣酸或鞣酸混合物是从至少一种本文所述的需要筑巢昆虫的植物或植物学来源的没食子取得, 包括但不限于: 中国肚倍 (Chinese belly-shaped gallnut)、角倍 (horned gallnut)、硬剑倍 (hard ensiform gallnut)、蛋硬剑倍 (egg-hard ensiform gallnut), 以及倍花 (inflorescence gallnut)。用于制备鞣酸的没食子的直径范围可以介于1至8厘米之间 (例如, 1厘米、2厘米、3厘米、4厘米、5厘米、6厘米、7厘米或8厘米)。在一些实例中, 没食子可具有范围为2至6厘米 (例如, 3至5厘米) 的直径。

植物	筑巢昆虫	没食子
没食子栎 (<i>Quercus infectoria</i>)	云石纹瘦蜂 (<i>Andricus kollari</i>)	橡木没食子 ¹
[0072] 盐肤木 (<i>Rhus chinensis</i>)	角倍蚜 (<i>Melaphis chinensis</i> (Bell))	中国角倍 ²
青麸杨 (<i>Rhus potaninii</i>)	倍蛋蚜 (<i>Melaphis peitan</i> Tsai et Tang)	中国肚倍 ²

[0073] ¹The population biology of oak gall wasps (Hymenoptera:Cynipidae), Annual Review of Entomology.2002;47:633-68

[0074] ²Study on Chinese Gallnut, Forest Research, 2003, 16 (6) : 760-767

[0075] 可使用常规方法或本文所述的多批次方法从本文所述的没食子粉末和/或碎片萃取出粗制鞣酸萃取物。接着, 可以水、有机溶剂或其组合来溶解粗制鞣酸萃取物, 以形成鞣酸溶液, 该鞣酸溶液可同时或序贯与活性炭、碳酸金属盐类 (例如, Na_2CO_3 或 K_2CO_3), 以及硫酸金属盐类 (例如, CaSO_4 或 MgSO_4) 的一种或多种混合, 由此除去不需要的物质 (例如, 可被活性炭吸收, 或被碳酸金属盐类和/或硫酸金属盐类沉淀/除去的物质)。示例性的碳酸金属盐类包含, 但不限于: 碳酸锂、碳酸钠或碳酸钾。示例性的硫酸金属盐类可以是硫酸钙或硫酸镁。

[0076] 在一些实例中, 可先将本文所述的粗制鞣酸萃取物与活性炭混合一段合适时间 (例如在室温搅拌1至24小时)。接着再将碳酸金属盐类和/或硫酸金属盐类 (例如, Na_2CO_3 、 K_2CO_3 、 CaSO_4 和/或 MgSO_4) 加入前述混合物中, 于合适温度 (例如室温) 搅拌该混合物一段合适时间 (例如30分钟至6小时)。可通过例如Celite床过滤该混合物, 并以合适的溶剂 (例如丙酮、乙腈、甲乙酮、乙酸乙酯、乙醇或其组合) 洗涤, 进而通过常规方法浓缩以制备鞣酸组合物。

[0077] 在其它实例中, 可先将粗制鞣酸萃取物与活性炭混合一段合适时间 (例如在室温搅拌1至24小时, 例如6至12小时或12至18小时)。接着可将活性炭从混合物中除去, 以形成溶液。接着再将碳酸金属盐类和/或硫酸金属盐类 (例如, Na_2CO_3 、 K_2CO_3 、 CaSO_4 和/或 MgSO_4) 加入前述溶液中, 于合适温度 (例如室温) 搅拌该溶液一段合适时间 (例如30分钟至6小时, 例如, 30分钟至2小时或至1小时)。可通过例如Celite床过滤该混合物, 并以合适的溶剂 (例如

丙酮、乙腈、甲乙酮、乙酸乙酯、乙酸甲酯、乙醇或其组合)洗涤,并通过常规方法浓缩以生产鞣酸组合物。

[0078] 在一些实例中,在前述任一步骤中形成的鞣酸混合物可置于合适量(例如,3至8x毫升或6x毫升)的乙酸乙酯、乙酸甲酯和/或甲乙酮中,并于合适温度(例如室温)孵育一段合适时间(例如1至2小时)。接着收集因此形成的有机层,其包含鞣酸。

[0079] 在一些实例中,本文所述的粗制鞣酸萃取物可与碳酸金属盐类于合适温度(例如20至60°C,诸如30至40°C)孵育一段合适时间。接着可以合适量(例如,3至8x毫升或6x毫升)的乙酸乙酯、乙酸甲酯和/或甲乙酮对混合物进行萃取,并于合适温度(例如室温或20至50°C)孵育一段合适时间(例如1至2小时),以制备有机溶液。可将该有机溶液同时地或序贯地与活性炭及一种或多种硫酸金属盐类一起孵育,以除去被活性炭吸附的物质和/或除去由硫酸金属盐类沉淀的物质,由此制备富集的鞣酸混合物。若有需要,可通过例如Celite床过滤该鞣酸混合物,并以合适的溶剂(例如丙酮、乙腈、甲乙酮、乙酸乙酯、乙酸甲酯、乙醇或其组合)洗涤,并通过常规方法浓缩以生产鞣酸组合物。

[0080] 本文所述的任何鞣酸混合物也可与二氧化硅一并孵育一段合适时间以进一步除去不需要的物质。

[0081] 本文所述的任何粗制鞣酸萃取物或富集鞣酸混合物可进行本文所述的除去糊精/胶/树脂的过程。可以合适溶剂(例如,丙酮、乙腈、甲乙酮、乙酸乙酯、乙酸甲酯、戊烷、己烷、庚烷,或其组合)稀释生成的油性残留物。可以搅拌因此形成的溶液,且以缓慢滴定的方式在该溶液中添加氯化溶剂(例如二氯甲烷或二氯乙烷),以使目标鞣酸沉淀。接着可以通过常规方式收集固体(例如过滤和/或干燥)以制备富集的鞣酸组合物。

[0082] 接着,因此制备的鞣酸固体可以进行本文所述的溶剂残留物的除去过程。

[0083] 以下的实例仅是说明性的并且不应将本公开限于这些具体的实例。

[0084] 一种方法,其包含:(i)研磨合适植物的没食子以形成细粉或小碎片;(ii)以第一溶剂(例如本文所述者)通过本文所述的多批次过程萃取该细粉或该小碎片,以制备粗制鞣酸萃取物;(iii)以水溶解该粗制鞣酸萃取物,将因此形成的鞣酸溶液与K₂CO₃混合;(iv)以合适溶剂(例如乙酸乙酯)萃取步骤(iii)形成的混合物,并收集因此形成的有机层;(v)混合该有机层及活性炭,搅拌因此形成的混合物一段合适时间(例如,0.5小时);(vi)将该混合物与MgSO₄孵育一段合适时间;(vii)通过Celite过滤在步骤(vi)形成的混合物,并收集滤液;(viii)将滤液(可经稀释)与烷基溶剂(例如,己烷)混合,并收集因此形成的油性残留物;(ix)可任选重复步骤(viii);(x)收集生成的油性残留物,可任选以丙酮稀释该油性残留物,并将该油性残留物与CH₂Cl₂混合;(xi)搅拌因此形成的混合物一段合适时间,使固体鞣酸沉淀;(xii)收集固体鞣酸,若有必要,可在真空下干燥;(xiii)以烷基溶剂、氯化溶剂或其组合浆化该固体鞣酸;(xiv)可任选重复步骤(xiii);以及(xv)真空蒸发因此形成的混合物,由此制备鞣酸组合物。

[0085] 图27示出了前述制备方法的示意图。

[0086] II. 含有鞣酸的组合物以及含有该组合物的试剂盒

[0087] 本公开的一方面涉及组合物,例如,药物组合物、保健食品(例如营养组合物)以及医疗食品,该组合物包含一种或多种鞣酸及载体(例如药学上可接受的载体和/或可食用载体)。这类载体,不论是天然或非天然(合成),均可赋予组合物中的鞣酸各种效益,例如,改

善体外和/或体内的鞣酸稳定性、提高鞣酸的生物利用度、增加鞣酸的生物活性,和/或降低副作用。合适的载体包括,但不限于,稀释剂、填充剂、盐类、缓冲液、稳定剂、助溶剂、缓冲剂、防腐剂或其组合。在一些实施方案中,载体可包含苯甲酸盐例如苯甲酸钠。

[0088] (A) 鞣酸含量

[0089] 本文所述的组合物中的鞣酸族群可实质上不含小分子鞣酸(例如小于小于2重量%的具有少于4个没食子酰基部分的鞣酸),实质上不含糊精、胶和/或树脂,和/或实质上不含用于从适当来源(例如本文所述的植物来源)萃取鞣酸的溶剂的残留物。“实质上不含”一种成分的意思是指该成分不存在(即,以常规方法检测不到)或仅存在最小量、极微量的该成分,因而对含有该成分的组合物性质没有任何实质的影响。在一些情况中,组合物“实质上不含”一种成分,是指基于该组合物的重量,该成分按重量计少于10%(例如,少于5%、少于4%、少于3%、少于2%、少于1%、少于0.5%、少于0.1%或更低)。可以通过本文所述的任一改良的富集方法来制备所述鞣酸族群。

[0090] 尽管可以从合适的天然来源纯化鞣酸族群(不论是异质或实质上同质的),本文所述的含鞣酸组合物在许多方面不同于天然存在的鞣酸组合物。在一些实例中,组合物中的鞣酸混合物是实质上不含具有少于4个没食子酰基部分的鞣酸(其存在于天然形成的鞣酸混合物中)。将具有较少没食子酰基部分的鞣酸除去可增进生成的鞣酸混合物的生物活性(例如抑制DAAO)。在其它实例中,本文所述的组合物中,具有较多没食子酰基部分(例如,5至12个、6至12个、7至12个,或8至12个)的鞣酸的含量实质上高于天然形成的鞣酸混合物中的这类鞣酸。如本文中提供,相较于具有较少没食子酰基部分的鞣酸,本文所述的组合物中所含的鞣酸族群呈现增强的生物活性(例如,抑制DAAO)。在另一个实例中,与自然界中存在的异质鞣酸族群相反,组合物可包含实质上同质的鞣酸族群。

[0091] 在一些实施方案中,本文所述的组合物可包含大于等于98%(例如,98.5%、99%或99.5%)具有4至12个没食子酰基部分的鞣酸。在其它实施方案中,组合物可包含大于等于97%(例如,97.5%、98%、98.5%、99%或99.5%)具有5至12个没食子酰基部分的鞣酸。在另一个实施方案中,组合物可包含大于等于90%(例如,92%、95%、97%、98%或更高)具有6至12个没食子酰基部分的鞣酸。或者,本文所述的组合物可包含大于等于60%(例如,70%、75%、80%、85%、90%、95%或更高)具有8至12个没食子酰基部分的鞣酸。

[0092] 在特定实例中,本文所述的组合物可包含约4至20%(例如,约10至20%,例如约15%)具有5个没食子酰基部分的鞣酸、约10至35%(例如,约15至25%,例如约20%)具有6至7个没食子酰基部分的鞣酸,以及约55至85%(例如约55至65%,例如约60%或65%)具有8至12个没食子酰基部分的鞣酸。

[0093] 本文所述的鞣酸族群(例如以本文也描述的任一种改良的富集方法所制备的那些族群)或其药学上可接受的盐类,可与一种或多种载体(例如,药学上可接受的载体)混合以形成组合物。“药学上可接受的盐类”(pharmaceutically-acceptable salts)一词是指相对无毒的鞣酸的无机或有机碱加成盐。这些盐类可于制造给药载体或剂型过程中被原位制造,或者使一种或多种鞣酸分别与合适的有机或无机碱反应,再于后续纯化过程中将该盐类分离后而制得。合适的无机碱包含,但不限于,氢氧化钠、氢氧化钡、氢氧化铁(II)、氢氧化铁(III)、氢氧化镁、氢氧化钙、氢氧化铝、氢氧化铵、氢氧化钾、氢氧化铯或氢氧化锂。合适的有机碱包含,但不限于:吡啶、甲胺、咪唑、苯并咪唑、组氨酸、膦氮烯碱(phosphazene

base), 或有机阳离子的氢氧化物例如季氢氧化铵及氢氧化磷。例如, 可参阅Berge等人, (1977) J.Pharm.Sci.66:1-19)。

[0094] (B) 药物组合物

[0095] 本文所述的含鞣酸组合物(例如包含药学上可接受的载体的药物组合物)可用于治疗本文描述的任何目标疾病。在一些实施方案中, 在组合物中的鞣酸族群实质上不含缩合鞣质和/或褐藻多酚。“可接受的”(Acceptable)表示载体必须与组合物的活性成分相容(优选是能够稳定该活性成分)且不会对接受治疗的受试者造成危害。药学上可接受的赋形剂(载体)(包括缓冲剂)是本领域的公知常识。请参阅Remington:The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed.(2000)Lippincott Williams and Wilkins, Ed.K.E.Hoover。

[0096] 药学上可接受的载体包含稀释剂、填充剂、盐类、缓冲剂、稳定剂、助溶剂以及其它本技术领域已知的材料。具体来说, 美国专利号5,211,657已记载鞣酸或其盐类的示例性药学上可接受的载体。这类制剂一般可含有盐类、缓冲剂、防腐剂、相容载体以及任选地其它治疗剂。当用于药物时, 盐类应该是药学上可接受的盐类, 但也可利用非药学上可接受的盐类来简便地制备其药学上可接受的盐类, 因此这类非药学上可接受的盐类不应被排除在本发明范围外。这样的药理学上以及药学上可接受的盐类包括, 但不限于, 从合适的无机碱(例如, 氢氧化钠、氢氧化钡、氢氧化铁(II)、氢氧化铁(III)、氢氧化镁、氢氧化钙、氢氧化铝、氢氧化铵、氢氧化钾、氢氧化铯或氢氧化锂)或从合适的有机碱(例如, 吡啶、甲胺、咪唑、苯并咪唑、组氨酸、膦氮烯碱, 或有机阳离子的氢氧化物例如氢氧化季铵及氢氧化磷)所制备的盐类。药学上可接受的盐类也可制备成碱金属盐或碱土盐, 例如锂、钠、钾或钙盐。

[0097] 本文所述的含有鞣酸的药物组合物可包含冻干制剂或水性溶液形式的药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂。Remington:The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed.(2000)Lippincott Williams and Wilkins, Ed.K.E.Hoover。所述载体、赋形剂或稳定剂可增进本文所述组合物中有效成分(例如, 鞣酸)的一种或多种性质, 例如生物活性、稳定性、生物利用度以及其它药代动力学和/或生物活性。

[0098] 可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所使用的剂量及浓度对接受者是无毒的, 且可包含缓冲剂, 例如磷酸盐、柠檬酸盐, 以及其它有机酸; 抗氧化剂(包括抗坏血酸以及甲硫氨酸); 防腐剂(例如, 十八烷二甲基苄基氯化铵(octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride)、氯化六甲双铵(hexamethonium chloride)、苯扎氯铵(benzalkonium chloride)、苄索氯铵(benzethonium chloride)、酚、丁基或苄基醇类); 烷基对羟基苯甲酸酯例如, 对羟基苯甲酸甲酯或丙酯; 儿茶酚; 间苯二酚(resorcinol); 环己醇(cyclohexanol); 3-戊醇(3-pentanol); 苯甲酸盐、山梨酸盐及间甲酚(m-cresol); 低分子量(小于约10个残基)的多肽; 蛋白质, 例如血清白蛋白、明胶, 或免疫球蛋白; 亲水性聚合物例如聚乙烯吡咯烷酮; 氨基酸例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸、丝氨酸、丙氨酸或赖氨酸; 单糖、双糖以及其它碳水化合物, 包括: 葡萄糖、甘露糖或葡聚糖; 螯合剂例如EDTA; 糖类例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇; 成盐抗衡离子, 例如钠; 金属复合物(例如, 锌-蛋白质(Zn-protein)复合物); 和/或非离子型表面活性剂, 例如TWEENTM(polysorbate)、PLURONICSTM(非离子性表面活性剂)或聚乙二醇(PEG)。

[0099] 在其它实例中, 可将本文所述的药物组合物配制成持续释放形式(sustained-

release format)。适当的持续释放制剂的实例包括含有鞣酸的固态疏水性聚合物的半通透性基质,其中该基质是以成型制品形式(例如膜,或微胶囊)存在。持续释放基质的实例包含聚酯、水凝胶(例如,聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯(poly(2-hydroxyethyl-methacrylate)),或聚(乙烯醇)(poly(vinylalcohol))、聚乳酸酯(poly lactides)(美国专利号:3,773,919))、L-谷氨酸与7乙基-L-谷氨酸的共聚物(copolymers of L-glutamic acid and 7ethyl-L-glutamate)、非降解型乙烯-乙酸乙烯酯(ethylene-vinyl acetate)、降解型乳酸-羟乙酸共聚物例如LUPRON DEPOT™(由乳酸-羟乙酸共聚物以及亮丙瑞林醋酸盐(leuprolide acetate)构成的可注射微球体)、蔗糖乙酸异丁酯(sucrose acetate isobutyrate),以及聚-D-(-)-3-羟丁酸(poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid)。

[0100] 用于体内给药的药物组合物必须为无菌。例如,这可通过无菌过滤膜过滤来完成。治疗组合物通常放置于具有无菌入口的容器中,例如,静脉内溶液袋或具有可被皮下注射针刺穿的塞的小瓶。

[0101] 本文所述的药物组合物可以是单位剂量形式,例如片剂、丸剂、胶囊、粉末、颗粒、溶液或悬浮液或栓剂,用于口服、肠胃外或直肠给药,或者通过吸入或吹药法(insufflation),或鞘内或脑内途径给药。

[0102] 为了制备固体的组合物(例如片剂),可混合主要的活性成分与药学载体以及其它药学稀释剂,以形成含有本发明的化合物的同质混合物或者其无毒性的药学上可接受盐的固体预配方组合物,其中所述药学载体例如为惯用的制造片剂的成分,例如玉米淀粉、乳糖、蔗糖、山梨醇、滑石、硬脂酸、硬脂酸镁、磷酸二钙,或胶类,并且所述的其它药学稀释剂例如为水。当提及这些预配方组合物为同质物时,是表示活性成分是平均地分散在组合物中,由此可容易地将组合物平分成相等的有效单位剂型,例如片剂、丸剂以及胶囊。固体预配方组合物接着可被平分成前述形式的单位形式,其含有约0.1mg至约500mg的本发明活性成分。该新颖组合物的片剂或丸剂可用包衣包覆或者以其它方式混配(compounded),以提供可给予延长活性的优势的剂型。例如,片剂或丸剂可包含内剂量以及外剂量组分,后者是覆盖前者的包封形式。可以利用肠溶层将两个组分隔开,肠溶层可用于在胃中抵抗崩解且允许内成分完整地穿过进入十二指肠或可推迟释放。各种材料可用于前述的肠溶层或肠溶包衣,这类的材料通常包含一些聚合酸以及聚合酸与虫胶、十六烷醇以及乙酸纤维素等材料的混合物。

[0103] 合适的表面活性剂特别包含非离子剂,例如聚氧乙烯脱水山梨糖醇(例如,Tween™ 20、40、60、80或85)以及其它脱水山梨糖醇(例如,Span™ 20、40、60、80或85)。具有表面活性剂的组合物通常包含介于0.05%与5%之间的表面活性剂,其可介于0.1%与2.5%之间。应当理解,必要时,可添加其它成分,例如甘露醇或其它药学上可接受的载体。

[0104] 可从市售的脂肪乳剂来制备合适的乳剂,该脂肪乳剂例如Intralipid™、Liposyn™、Infonutrol™、Lipofundin™以及Lipiphysan™。可将活性成分溶解在预先混合的乳剂组合物中或备选溶解于油(例如,大豆油、红花油、棉籽油、芝麻油、玉米油或杏仁油)中,当其再与磷脂(例如卵磷脂、大豆磷脂或大豆卵磷脂)以及水混合时,即可形成乳剂。应当理解的是,也可以加入其它成分,例如甘油或葡萄糖以调整乳剂的张力。合适的乳剂通常含有高达20%的油,例如介于5%至20%之间的油。脂肪乳剂可包含介于0.1与1.0μm之间的脂肪微滴,特别是介于0.1与0.5μm之间,且具有5.5至8.0之间的pH值。

[0105] 用于吸入或吹药的药物组合物包括在药学上可接受的水性或有机溶剂或其混合物中的溶液以及悬浮液,以及粉末。液体或固体组合物可含有前述的合适的药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,组合物通过口服或经鼻呼吸途径给药用于局部或全身性功效。

[0106] 可使用气体将在优选无菌的药学上可接受的溶剂中的组合物雾化。雾化溶液可从雾化装置直接吸入,或者雾化装置可与面罩(face mask)、气罩(tent)或者间歇性正压呼吸器连接。溶液、悬浮液或粉末组合物可从以合适方式递送制剂的装置施用,优选口服或经鼻。

[0107] 在一些实施方案中,任何含有鞣酸的药物组合物可基于该组合物的预期治疗用途而还包含第二治疗剂。

[0108] 在一些实例中,第二治疗剂是抗肥胖剂,其包含,但不限于:奥利司他(orlistat)、氯卡色林(lorcaserin)、西布曲明(sibutramine)、利莫那班(rimonabant)、二甲双胍(metformin)、依泽那太(exenatide)、普兰林肽(pramlintide)、苯丁胺(phentermine)、芬氟拉明(fenfluramine)、右芬氟拉明(dexfenfluramine)、托吡酯(topiramate)、二硝基苯酚(dinitrophenol)、安非他酮(bupropion)以及唑尼沙胺(zonisamide)。

[0109] 在其它实例中,第二治疗剂是用于治疗CNS疾病/病症的药剂。这样的治疗剂可以是抗精神病药。示例性抗精神病药包含(但不限于):丁酸酚酮(例如,氟哌啶醇(haloperidol)(HALDOL™)、吩噻嗪(例如,氯丙嗪(chlorpromazine)(THORAZINE™)、氟奋乃静(fluphenazine)(PROLIXIN™)、奋乃静(perphenazine)(TRILAFON™)、丙氯拉嗪(prochlorperazine)(COMPAZINE™)、硫利达嗪(thioridazine)(MELLARIL™)、三氟拉嗪(trifluoperazine)(STELAZINE™)、美索达嗪(mesoridazine)、丙嗪(promazine)、三氟丙嗪(triflupromazine)(VESPRIN™)、左美丙嗪(levomepromazine)(NOZINAN™)、异丙嗪(promethazine)(PHENERGAN™)、噻吨(thioxanthene)(例如,氯普噻吨(chlorprothixene)、氟哌噻吨(flupenthixol)(DEPIXOL™、FLUANXOL™)、替沃噻吨(thiothixene)(NAVANE™)、珠氯噻醇(zuclopenthixol)(CLOPIXOL™、ACUPHASE™)、氯氮平(clozapine)(CLOZARIL™)、奥氮平(olanzapine)(ZYPREXA™)、利培酮(risperidone)(RISPERDAL™、RISPERDAL CONSTA™)、喹硫平(quetiapine)(SEROQUEL™)、齐拉西酮(ziprasidone)(GEODON™)、氨磺必利(amisulpride)(SOLIAN™)、阿塞那平(asenapine)、帕潘立酮(paliperidone)(INVEGA®)、阿立哌唑(aripiprazole)(ABILIFY™)、多巴胺局部拮抗剂(BIFEPRUNOX™、NORCLOZAPINE™(ACP-104))、拉莫三嗪(lamotrigine)(LAMICTAL™)、丁苯那嗪(tetrabenazine)(NITOMAN™、XENAZINE™)、大麻二酚(cannabidiol)、LY2140023等)。

[0110] 或者,第二治疗剂可以是抗抑郁剂和/或情绪稳定剂。在一些实施方案中,抗抑郁剂包含单胺氧化酶抑制剂(MAOI)、三环抗抑郁剂(TCA)、四环抗抑郁剂(TeCA)、选择性血清素再摄取抑制剂(SSRI)、去甲肾上腺素能性及特异性血清素能性抗抑郁剂(NASSA)、去甲肾上腺素(正肾上腺素)再吸收抑制剂、去甲肾上腺素-多巴胺再吸收抑制剂,和/或血清素-去甲肾上腺素再吸收抑制剂(SNRI)。示例性SSRI包含氟西汀(flouxetine)(PROZAC™)、帕罗西汀(paroxetine)(PAXIL™、SEROXAT™)、依他普仑(escitalopram)(LEXAPRO™、ESIPRAM™)、西酞普兰(citalopram)(CELEXA™)、舍曲林(sertraline)(ZOLOFT™)、氟伏沙明(flvoxamine)(LUVOX™)。示例性SNRI包含文拉法辛(venlafaxine)(EFFEXOR™)、米那普仑

(milnacipram) 以及度洛西汀 (duloxetine) (CYMBALTA™)。另外的抗抑郁剂包含去甲肾上腺素能性及特异性血清素能性抗抑郁剂 (NASSA) (例如, 米氮平 (mirtazapine) (AVANZA™、ZISPIN™、REMERON™), 或米安色林 (mianserin)、去甲肾上腺素 (正肾上腺素) 再吸收抑制剂 (NRI) (例如, 瑞波西汀 (reboxetine) (EDRONAX™)、去甲肾上腺素-多巴胺再吸收抑制剂 (例如, 安非他酮 (bupropion) (WELLBUTRIN™、ZYBAN™))、阿米替林 (amitriptyline)、去甲替林 (nortriptyline)、普罗替林 (protriptyline)、地昔帕明 (desipramine)、丙咪嗪 (imipramine)、曲米帕明 (trimipramine)、阿莫沙平 (amoxapine)、安非他酮、安非他酮SR、氯米帕明 (clomipramine)、多塞平 (doxepin)、异卡波肼 (isocarboxazid)、文拉法辛XR (venlafaxine XR)、反苯环丙胺 (tranylcypromine)、曲唑酮 (trazodone)、奈法唑酮 (nefazodone)、苯乙肼 (phenelzine)、拉莫三嗪 (lamatrogine)、锂、托吡酯 (topiramate)、加巴喷丁 (gabapentin)、卡马西平 (carbamazepine)、奥卡西平 (oxacarbazepine)、丙戊酸盐 (valporate)、马普替林 (maprotiline)、米氮平 (mirtazapine)、溴法罗明 (brofaromine)、吉哌隆 (gepirone)、吗氯贝胺 (moclobemide)、异烟肼 (isoniazid)、异丙烟肼 (iproniazid) 等。

[0111] 在其它实例中, 第二治疗剂可以是用于治疗ADD和/或ADHD的药剂。合适的ADHD药品包含, 但不限于苯丙胺 (amphetamine)、莫达非尼 (modafinil)、右旋甲基苯丙胺 (desoxy)、甲基苯丙胺 (methamphetamine)、可卡因 (cocaine)、槟榔碱 (arecoline)、右哌甲酯 (dexamethylphenidate) (focalin、focalin XR)、右旋苯丙胺 (dextroamphetamine) (硫酸右苯丙胺 (dexedrine)、硫酸右苯丙胺胶囊 (dexedrine spansule)、右旋苯丙胺ER、dextrostat)、哌醋甲酯 (methylphenidate) (专注达 (concerta)、daytrana、metadate CD、metadate ER、methylin、methylin ER)、利他林 (ritalin)、持续型利他林 (ritalin-LA)、缓释利他林 (ritalin-SR)、二甲磺酸赖右苯丙胺 (lisdexamfetamine dimesylate) (Vyvanse)、苯丙胺混合盐类 (Adderall、Adderall XR)、阿托西汀 (atomoxetine) (择思达 (Strattera))、盐酸可乐定 (clonidine hydrochloride) (可乐宁 (Catapres))、盐酸胍法辛 (guanfacine hydrochloride) (Tenex)、槟榔碱以及匹莫林 (pemoline)。

[0112] 此外, 第二治疗剂可以是用于治疗认知障碍和/或特征在于神经退化的病症 (例如阿尔茨海默病或帕金森氏症) 的治疗剂。这类的治疗剂包括但不限于: 他克林 (tacrine)、利斯的明 (rivastigmine)、美金刚 (memantine) (AXURA™、AKATINOL™、NAMENDA™、EBIXA™、ABIXA™)、多奈哌齐 (donepezil) (Aricept™)、毒扁豆碱 (physostigmine)、尼古丁 (nicotine)、槟榔碱、石杉碱甲 (huperzine alpha)、司立吉林 (selegiline)、rilutek™ (利芦噻唑 (riluzole))、维生素C、维生素E、类胡萝卜素、银杏 (Ginkgo biloba) 等。

[0113] (C) 保健食品

[0114] 在一些实施方案中, 本文所述的含有鞣酸的组合物可为保健食品 (health food product), 其可为任何种类的可用于滋补人类及动物的液体及固体/半固体材料, 用于改善基础行为功能、过动、焦虑、抑郁、自杀意念和/或自杀行为、感觉运动门控、疼痛阈值、记忆和/或认知功能, 或用于促进本文所述任何目标疾病 (例如, 肥胖病症、高血脂症、高血糖症、糖尿病或CNS病症, 包括本文所述的那些) 的治疗。保健食品可为食品 (例如, 基于茶的饮料、果汁、软性饮料、咖啡、奶、果冻、饼干、谷物、巧克力、小吃、草药萃取物、乳制品 (例如冰淇淋和酸奶))、食品/饮食补充品, 或营养制剂。

[0115] 含有一种或多种鞣酸(例如,本文所述的鞣酸混合物,或具有如本文所述特定数目的没食子酰基部分的实质上同质族群的鞣酸)的本文所述的保健食品可包含一种或多种可食用载体,其给予本文所述的产物中的鞣酸一种或多种益处。可食用载体的实例包括淀粉、环糊精(cyclodextrin)、麦芽糊精(maltodextrin)、甲基纤维素(methylcellulose)、羧甲基纤维素(carbonmethoxy cellulose)、黄原胶(xanthan gum)以及其水性溶液。其它实例包含溶剂、分散介质、涂料、表面活性剂、抗氧化剂、防腐剂(例如抗细菌剂及抗真菌剂)、等张剂、吸收延迟剂、稳定剂、凝胶、粘合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、染料等材料及其组合,均为本领域技术人员所已知的。在一些实例中,本文所述的保健食品可还包含神经保护食品,例如鱼油、亚麻子油和/或苯甲酸盐。

[0116] 在一些实例中,保健食品是营养组合物,其指包含源自食物来源的组分且提供食物内发现的基本营养价值外的额外的健康益处的组合物。本文所述的营养组合物包含本文所述的鞣酸内容物(例如,如本文描述的鞣酸混合物或实质上同质的鞣酸族群)以及其它促进健康和/或增加该鞣酸的稳定性及生物活性的成分及补充剂。

[0117] 营养组合物的作用可为快速或/和短期的,或者可在例如患有DAAO相关疾病如CNS病症或具有DAAO相关疾病如CNS病症的风险的人类受试者,或者患有肥胖病症或具有肥胖病症风险的人类受试者中帮助实现长期健康目的(如本文所述的那些),例如改善基础行为功能、过动、焦虑、抑郁、感觉运动门控、疼痛阈值、记忆和/或认知功能。营养组合物可包含于可食用材料中,例如,作为膳食补充剂或药物制剂。作为膳食补充剂,可包含其它营养物质,例如维生素、矿物质或氨基酸。组合物也可是饮品或食品,例如茶、软饮料、果汁、牛奶、咖啡、饼干、谷物、巧克力及小吃。若有需要,可将组合物通过添加诸如山梨醇(sorbitol)、麦芽糖醇(maltitol)、氢化葡萄糖浆(hydrogenated glucose syrup)、氢化淀粉水解物(hydrogenated starch hydrolysate)、高果糖玉米糖浆(high fructose corn syrup)、蔗糖(cane sugar)、甜菜糖(beet sugar)、果胶(pectin)或三氯蔗糖(sucralose)的甜味剂来增甜。

[0118] 本文公开的营养组合物可为溶液形式。例如,可将营养制剂提供于介质中,例如缓冲液、溶剂、稀释剂、惰性载体、油或霜剂。在一些实例中,制剂存在于水性溶液中,其任选地包含非水性共溶剂,例如醇。营养组合物也可为粉末、糊剂、胶冻、胶囊或片剂的形式。乳糖及玉米淀粉通常作为稀释剂用于胶囊,并且作为载体用于片剂。通常添加润滑剂如硬脂酸镁以形成片剂。

[0119] 保健食品可配制用于适当的施用途径(例如,口服给药)。对于口服给药,组合物可为例如片剂或胶囊的形式,通过常规方法用可接受的赋形剂配制,所述赋形剂例如为粘合剂(例如,预胶化的玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素)、填充剂(例如,乳糖、微晶纤维素或磷酸氢钙)、润滑剂(例如,硬脂酸镁、滑石或二氧化硅)、崩解剂(例如,马铃薯淀粉或淀粉羟乙酸钠)或润湿剂(例如,月桂基硫酸钠)。片剂可通过本领域公知的方法来包覆。也包含条棒及其它可咀嚼制剂。

[0120] 在一些实例中,保健食品可为液体形式,且一种或多种可食用的载体可以是溶剂或分散介质,其包含,但不限于,乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇)、脂质(例如甘油三酯、植物油或脂质体)或其组合。可维持适当的流动性,例如,通过使用包衣如卵磷脂,通过分散于载体如液体多元醇或脂质中来维持需要的粒度,通过使用表面活性剂如羟

丙基纤维素,或者其组合。在许多情况中,适当的是包含等张剂,例如,糖、氯化钠或其组合。

[0121] 用于口服给药的液体剂型可以是例如溶液、糖浆或悬浮液的形式,或者它们可为使用前以水或其它适合的载体重建的干燥产物呈现。在一个实施方案中,液体制剂可配制用于与果汁一起给药。这种液体制剂可通过常规方法用药学上可接受的添加剂来制备,所述添加剂例如为悬浮剂(例如,山梨醇糖浆、纤维素衍生物或氢化食用脂肪)、乳化剂(例如,卵磷脂或阿拉伯胶)、非水性载体(例如,杏仁油、油酯(oily esters)、乙醇或经分馏的植物油),以及防腐剂(例如,对羟苯甲酸甲酯或对羟苯甲酸丙酯、苯甲酸酯或山梨酸酯)。

[0122] 本文所述的保健食品可还包含一种或多种第二治疗剂(包含本文所述的那些)。

[0123] (D) 医疗食品

[0124] 本公开也提供医疗食品的组合,用于改善基础行为功能、过动、焦虑、抑郁、感觉运动门控、疼痛阈值、记忆和/或认知功能,和/或用于治疗如本文所述的目标疾病(例如肥胖病症、高血脂症、高血糖症、糖尿病或CNS病症)。医疗食品是一种配制为可经肠内消耗或给药的食品。这种食品通常在医护人员监控下针对目标疾病(例如本文所述的疾病)的特定饮食管理使用。在一些情况下,该医疗食物组合是针对需要治疗的患者(例如患有疾病的人类患者,或需要使用产品作为主要活性剂用于通过特定饮食管理来减缓疾病或病症的人类患者)所特别配制及加工(相对于天然状态下使用的天然食物)的。在一些实例中,本文所述的医疗食品组合不是由医护人员简单推荐而作为管理症状或减少疾病或病症风险的整体饮食的一部分的那些之一。

[0125] 本文所述的包含一种或多种鞣酸分子或其盐类及至少一种载体(例如本文所述的这些载体)的任何医疗食品组合可为如下所述的液体溶液、粉末、条棒、薄片(wafer)或在适当液体或适当乳液中的悬浮液的形式。该至少一种载体(其可为天然存在的或合成的(非天然存在))将赋予组合中的鞣酸内容物一种或多种益处,例如,稳定性、生物利用度和/或生物活性。本文所述的任何载体可用于制备所述医疗食品组合。在一些实施方案中,医疗食品组合还可包含一种或多种另外的成分,其选自包含但不限于以下成分的组:天然香料、人造香料、主要微量及超微量矿物质、矿物质、维生素、燕麦、坚果、香料、奶、蛋、盐、面粉、卵磷脂、黄原胶和/或甜味剂。可将医疗食品组合置于适当的容器中,其可还包含至少一种另外的治疗剂(例如本文所述的治疗剂)。

[0126] (E) 试剂盒

[0127] 本公开也提供试剂盒,其用于改善基础行为功能、过动、焦虑、抑郁、感觉运动门控、疼痛阈值、记忆和/或认知功能,和/或用于治疗如本文所述的目标疾病(例如肥胖症、高血脂症、高血糖症、糖尿病或CNS病症)。这种试剂盒可包含一个或多个容器(其包含本文所述的含有鞣酸的组合),且任选地包含如本文所述的一种或多种第二治疗剂。

[0128] 在一些实施方案中,所述试剂盒可包含根据本文所述任何方法使用的说明书。所述包含的说明书可包含,例如,含有鞣酸的组合物的给药的描述,以及任选的第二治疗剂的给药的描述,以改善基础行为功能、过动、焦虑、抑郁、感觉运动门控、疼痛阈值、记忆和/或认知功能,或治疗如本文所述的目标疾病。试剂盒可还包含基于识别是否个体患有该疾病或者具有患有该疾病的风险挑选适于治疗的个体的描述。在其它实施方案中,所述说明书包含对具有患有该疾病风险的个体或需要改善基础行为功能、过动、焦虑、抑郁、感觉运动门控、疼痛阈值、记忆和/或认知功能的个体施用一种或多种本公开药剂的描述。

[0129] 关于使用含有鞣酸的组合物来实现目标治疗功效的说明书通常包含针对目标治疗的剂量、给药方案以及给药途径的信息。容器可以是单位剂量、定量包装(例如多剂量包装)或子单位剂量。本发明试剂盒中提供的说明书通常书写在标签或包装插页(例如,试剂盒内包含的纸片)上,但也可接受可机器读取的说明书(例如,携带在磁盘或光盘储存上的说明书)。

[0130] 标签或包装插页可指明所述组合物用于预期治疗用途。说明书可提供任何本文所述的方法的执行方式。

[0131] 本发明试剂盒是放在合适的包装内。合适的包装包括但不限于,小瓶、瓶、罐、软质包装(例如,密封Mylar或塑料袋)等。也涵盖可与特定装置如吸入器、鼻腔给药装置(例如喷雾器)或输液装置(例如微量泵)组合使用的包装。试剂盒可具有无菌入口(例如,容器可以是静脉注射溶液袋或具有可被皮下注射针刺穿的瓶塞的瓶)。容器也可具有无菌入口(例如,容器可以是静脉注射溶液袋或具有可被皮下注射针刺穿的塞的小瓶)。

[0132] 试剂盒可任选提供另外的成分,诸如,缓冲剂以及说明性信息。正常来说,试剂盒包含容器以及在该容器上或与容器相连的标签或者包装插页。在一些实施方案中,本发明提供含有前述试剂盒的内容物的制品。

[0133] III. 含有鞣酸的组合物的应用

[0134] 本文所述的任何含有鞣酸的组合物可用于改善需要治疗的受试者的基础行为功能、体重减少、多动、焦虑、抑郁、自杀意念和/或行为、感觉运动门控、疼痛阈值、记忆和/或认知功能。所述组合物也可用于治疗与DAAO相关的疾病或病症(诸如中枢神经系统疾病(例如本文所述的那些))。所述组合物也可用于治疗肥胖症。

[0135] 本文使用的术语“治疗”(treating)是指,以治疗、治愈、缓和、舒缓、改变、补救、改善、改进或影响病症、疾病的症状或该疾病或病症的体质为目的,将包含一种或多种活性剂的组合物应用或施用于需要治疗的受试者,例如,该受试者患有目标疾病或病症、具有该疾病/病症的症状,或有该疾病/病症的体质。

[0136] 缓和(alleviating)目标疾病/病症包括延迟该疾病的进程或发展,或降低疾病严重性。缓和疾病不一定需要治疗结果。本文使用的“延迟”(delaying)目标疾病或病症的发展是表示推迟(defer)、阻止(hinder)、减缓(slow)、迟缓(retard)、稳定(stabilize),和/或延长疾病的进程。这种延迟可具有改变的时间长度,这取决于被治疗的个体和/或疾病的病史。“延迟”或缓和疾病的发展的方法,或延迟该疾病发作的方法,是指在给定时间框架内减低疾病的一种或多种症状发展的几率和/或在给定时间框架内减低症状的程度的方法(相较于未使用该方法而言)。这种比较通常是基于使用足以提供统计学上显著的结果的数目的受试者所进行的临床研究来得到。

[0137] 疾病的“发展”(development)或“进程”(progression)表示疾病的初始表现和/或随后的发展。疾病的发展可通过本领域公知的标准临床技术来检测及评估。然而,所述发展也表示不可检测的进程。针对本公开的目的,疾病发展或者进程是指症状的生物演进。“发展”包括发生(occurrence)、复发(recurrence),以及发作(onset)。本文使用的目标疾病或病症的“发作”或者“发生”包含初始的发作和/或复发。

[0138] 为了实现本文所述的任何预期的治疗功效,可通过合适的途径将有效量的含鞣酸的组合物施用至需要治疗的受试者。

[0139] 在本文中，“受试者”(subject)、“个体”(individual)以及“患者”(patient)可互换使用，且是指正针对治疗进行评估和/或正进行治疗的哺乳动物。受试者可以是人类，但也包括其它哺乳动物，特别是那些可用作人类疾病的实验模型的哺乳动物(例如小鼠、大鼠、兔子、狗等)。

[0140] 需要治疗的人类受试者可以是患有目标疾病/病症、具有患有目标疾病/病症风险，或者疑似患有目标疾病/病症(例如CNS病症，或与肥胖有关的病症，如糖尿病、高血糖症、高胆固醇血症或高血脂症)的人类患者。患有目标疾病或病症的受试者可通过常规医学检测(例如实验室测试、器官功能检测，和/或行为测试)来识别。疑似患有任何这类目标疾病/病症的受试者会表现出该疾病/病症的一个或多个症状。具有患有该疾病/病症风险的受试者可以是具有该疾病/病症的一个或多个风险因素如遗传因素的受试者。在一些情况中，人类受试者为患有肥胖或与孩童相关的CNS疾病的孩童、疑似患有这些疾病的孩童，或者具有患有这些疾病风险的孩童，所述与孩童相关的CNS疾病例如为注意缺陷/多动障碍(ADHD)、自闭症、Asperger障碍、强迫症、抑郁障碍、精神病、慢性疼痛以及学习障碍。

[0141] 本文所述的方法及组合物可用于治疗CNS病症。可通过本文所述的方法及组合物治疗的示例性CNS病症包括注意缺陷/多动障碍(ADHD)、精神分裂症、疼痛、抑郁、自杀意念和/或行为、双相型障碍、抽动障碍、创伤后应激障碍、焦虑、社交焦虑障碍、惊恐障碍、自闭症、Asperger障碍、强迫症、学习障碍、Tourette综合征、轻度认知障碍、痴呆、血管性痴呆、神经退化性疾病(例如，阿尔茨海默病或帕金森氏症、额颞痴呆、亨廷顿氏症)、夜间遗尿症、眼睑痉挛、非癫痫发作、精神病、躁狂、脑型疟疾，以及痴呆的行为和心理症状(BPSD)。

[0142] 与肥胖相关的疾病包含导致肥胖的疾病及病症，以及在肥胖患者中有高发率的疾病及病症。肥胖是一种医疗病症，其特征在于过量体脂累积至可对健康有负面影响的程度。肥胖症可通过身体质量指数(body mass index, BMI)来测定，可将人的体重除以人的身高的平方来得到。例如，BMI超过 $30\text{kg}/\text{m}^2$ 可表示肥胖。示例性的与肥胖相关的病症包含，但不限于，进食障碍、神经性厌食、神经性贪食、中风、冠状动脉心脏病、心脏病发作、充血性心力衰竭、先天性心脏病、高血压、非酒精性脂肪性肝炎、胰岛素抗性、高尿酸血症、甲状腺功能减退、骨关节炎、胆结石、不育、肥胖通气不足综合征、阻塞性睡眠呼吸暂停、慢性阻塞性肺病以及哮喘。

[0143] 本文使用的“有效量”(an effective amount)是指给予受试者治疗功效所需要的每一种活性成分的量(例如本文所述的鞣酸混合物或者实质上同质的鞣酸族群)，不论是单独施用还是与一种或多种其它活性剂(例如本文所述的一种或多种第二治疗剂)组合施用。在一些实施方案中，治疗功效是抑制受试者中的DAAO活性(例如，至少抑制20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更高)。在一些实施方案中，治疗功效是改善基础行为功能、体重减轻、多动、焦虑、抑郁、感觉运动门控、疼痛阈值、记忆，和/或认知功能的改善。在一些实施方案中，治疗功效是缓和与本文所述的任何CNS病症相关的一个或多个症状。替代地或者另外地，治疗功效是维持或减少受试者的体重。

[0144] 测定本文所述的组合物的量是否实现了治疗功效对于本领域技术人员而言是显而易见的。本领域技术人员理解的有效量，会根据治疗的特定病症、病症的严重程度、个体患者参数(包括年龄、物理状况、体型、性别和体重、治疗的持续时间、联合治疗的性质(如果有的话)、给药的特定途径、遗传因素，以及健康从业人员的公知常识及专业知识中的其它

类似因素而有所不同。这些因素对本领域技术人员而言是公知的,且不需过度实验就可以实施。通常优选的是使用个别成分或其组合的最大剂量,也就是根据合理医学判断的最高安全剂量。

[0145] 经验考量如半衰期通常将促成剂量的确定。可在治疗过程中测定及调整给药的频率,并且通常(但不是必须)基于目标疾病/病症的治疗和/或抑制和/或缓和和/或延迟。或者,本文所述的组合物的持续连续释放制剂可为适合的。用于实现缓释的各种制剂以及装置是本领域已知的。

[0146] 通常,对于给药任何组合物,示例性每日剂量可为从每千克约0.1微克起,至每千克3微克、至每千克30微克、至每千克300微克、至每千克3毫克、至每千克30毫克、至每千克100毫克或更多,取决于上述因素。对于在数天内或更长期间内重复给药,取决于病症,持续治疗直到出现希望的症状抑制为止,或者直到实现足够的治疗水平以缓和目标疾病或病症或其症状为止。示例性剂量方案包含在合适期间内以合适间隔施用一个或多个初始剂量。必要的话,可在合适期间内以合适间隔对受试者施用多个维持剂量。然而,可使用其它给药方案,这取决于医疗从业人员希望实现的药代动力学衰退模型。例如,涵盖一天一至四次或者一周一至四次的剂量。在一些实施方案中,可采用的剂量范围是从每毫克约3微克至每千克约2毫克(例如每毫克约3微克、每毫克约10微克、每毫克约30微克、每毫克约100微克、每毫克约300微克、每千克约1毫克以及每千克约2毫克)。在一些实施方案中,给药频率可为一日三次、一日两次、一日一次、每两日一次、每周一次、每二周一次、每四周一次、每两个月一次或每三个月一次。剂量方案可随着时间改变。

[0147] 在一些实施方案中,针对正常体重的成人患者,给药的剂量可从约每日每千克0.3毫克至50.00毫克(例如,每日每千克0.5毫克至40毫克、每日每千克1毫克至30毫克、每日每千克5毫克至30毫克,或每日每千克10毫克至20毫克)。特定的剂量方案(即,剂量、时间以及重复次数)取决于特定个体以及该特定个体的用药史,以及该个别药剂的性质(例如药剂的半衰期,以及本领域中公知的其它考虑)。

[0148] 为了本公开的目的,本文所述的鞣酸组合物的合适剂量将取决于特定的鞣酸或鞣酸混合物,和/或其它采用的活性成分、病症/疾病的种类与严重程度、是否为了预防或治疗的目的施用组合物、先前的治疗、患者的临床病史与对该DAAO抑制剂的应答,以及主治医师的判断。通常来说,临床人员将施用组合物,直到达到实现了希望的结果的剂量为止。

[0149] 可使用医学领域技术人员已知的常规方法对受试者施用该组合物(例如药物组合物、保健食品组合物、营养组合物或医疗食品组合物),其取决于被治疗的疾病种类或该疾病的位置。该组合物也可通过其它常规途径施用,例如,口服给药、肠胃外给药、喷雾吸入给药、局部给药、直肠给药、经鼻给药、含服给药、阴道给药或通过植入的药盒(implanted reservoir)给药。本文使用的术语“肠胃外”(parenteral)包括皮下、皮内、静脉内、肌内、关节内、动脉内、滑膜内、胸骨内、脊髓内、病灶内,以及颅内注射或输液技术。另外,可经由可注射的储存器给药途径施用于受试者,例如使用一周、半个月(或两周)、1个月、3个月,或6个月的可注射储存器或生物可降解材料及方法。在一些实施方案中,药物组合物是经眼内或玻璃体内施用。

[0150] 可注射的组合物可包含各种载体,例如蔬菜油、二甲基乙酰胺、二甲基甲酰胺、乳酸乙酯、碳酸乙酯、肉豆蔻酸异丙酯(isopropyl myristate)、乙醇,以及多元醇(甘油、丙二

醇、液体聚乙二醇等)。针对静脉内注射,可通过滴注法施用水溶性抗体,由此输注含有鞣酸及生理上可接受的赋形剂的药物制剂。生理上可接受的赋形剂可包含,例如,5%的右旋糖、0.9%的盐水、林格溶液或其它合适的赋形剂。肌内制剂(例如,鞣酸的合适可溶性盐形式的无菌制剂)可在药学赋形剂如注射用水(Water-for-Injection)、0.9%盐水或5%葡萄糖溶液中溶解和施用。

[0151] 在一个实施方案中,含有鞣酸的组合物是通过部位特异性或靶标性局部递药技术施用。部位特异性或靶标性局部递送技术的实例包含含有鞣酸的组合物的各种可植入储存器来源或局部递送导管,诸如输液导管、留置导管、针导管、合成植入物、外膜包装、分流器与支架或其它可植入装置、部位特异性载体、直接注射或直接施用。请参阅例如PCT公开号W000/53211以及美国专利号:5,981,568。

[0152] 针对目标疾病/病症的治疗功效可通过本领域中已知的方法进行评估。

[0153] IV. 联合治疗

[0154] 本申请还提供了联合治疗,其使用本文所述的任何含有鞣酸的组合物以及第二治疗剂,如本文所述的那些。本文使用的术语联合治疗包含序贯地施用这些治疗剂(例如,含有鞣酸的组合物以及抗CNS疾病治疗剂或抗肥胖治疗剂),也就是说,其中每个治疗剂是在不同时间点被施用,以及实质上同时施用这些治疗剂,或治疗剂中的至少两种。序贯地施用每一药剂或实质上同时施用每一药剂可受到任何适当的途径所影响,其包括但不限于:口服途径、静脉内途径、肌内、皮下途径以及通过粘膜组织的直接吸收。可通过相同途径或不同途径施用这些药剂。例如,第一药剂(例如含鞣酸的组合物)可经口服给药,而第二药剂(例如抗CNS病症药剂或抗肥胖药剂)可经静脉内给药。

[0155] 除非另有说明,否则本文使用的术语“序贯”(sequential)表示正常的顺序或次序,例如,如果剂量方案包括含有鞣酸的组合物及抗CNS病症药剂或抗肥胖药剂的给药,那么序贯剂量方案可包括在施用抗CNS病症药剂或抗肥胖药剂之前施用含鞣酸的组合物、同时施用含鞣酸的组合物、实质上同时施用含鞣酸的组合物,或之后施用含鞣酸的组合物,但两种药剂均以正常顺序或次序进行施用。除非另有说明,否则术语“分开、分离、隔开”(separate)是指保持一个与另一个分离的状态。除非另有说明,否则术语“同时”(simultaneously)是指在相同的时间发生或进行,即,本发明的药剂是在相同时间施用。术语“实质上同时”(substantially simultaneously)是指施用的药剂与彼此之间的差距在几分钟之内(例如在彼此的10分钟之内)且意图包含联合给药(joint administration)以及连贯给药(consecutive administration),但如果给药是连贯的话,是指在时间上间隔很短(例如,药物从业人员分别给予两种化合物所花的时间)。如本文使用的,同时给药以及实质上同时给药可互换使用。序贯给药是指在时间上分离地施用本文所述的药剂。

[0156] 联合治疗也可包含将本文所述的药剂(例如,含鞣酸组合物以及抗CNS病症或抗肥胖的药剂)进一步与其它生物活性成分(例如,不同的抗CNS病症的药剂)以及非药物疗法(例如,手术)组合施用。

[0157] 应当理解的是,可以任意顺序使用含鞣酸的组合物以及第二治疗剂(例如抗CNS病症或抗肥胖的药剂)的任意组合来治疗目标疾病。可根据一些因素挑选本文所述的组合,这些因素包括但不限于:抑制DAAO的有效性、改善基础行为功能、体重减少、过动、焦虑、抑郁、感觉运动门控、疼痛阈值、记忆或增强认知功能,和/或缓和与目标疾病相关的至少一种症

状,或减轻组合中另一药剂的副作用的功效。例如,本文所述的联合治疗可减低与组合中每一个别成分相关的任何副作用,例如,与第二治疗剂相关的副作用。

[0158] V. 通用技术

[0159] 除非另有说明,否则本发明的实施将采用神经科学、分子生物学(包含重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学以及免疫学的常规技术,其在本领域技术范围内。这些技术已在文献中被充分解释,诸如:Current protocol in Neuroscience (Developmental Editor:Eric Prager,Online ISBN:9780471142300,DOI:10.1002/0471142301); Molecular Cloning:A Laboratory Manual,second edition (Sambrook,等人,1989) Cold Spring Harbor Press;Oligonucleotide Synthesis (M.J.Gait,ed.,1984);Methods in Molecular Biology,Humana Press;Cell Biology:A Laboratory Notebook (J.E.Cellis, ed.,1998) Academic Press;Animal Cell Culture (R.I.Freshney,ed.,1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P.Mather and P.E.Roberts,1998) Plenum Press;Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures (A.Doyle, J.B.Griffiths,and D.G.Newell,eds.,1993-8) J.Wiley and sons;Methods in Enzymology (Academic Press,Inc.);Handbook of Experimental Immunology (D.M.Weir and C.C.Blackwell,eds.);Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M.Miller and M.P.Calos,eds.,1987);Current Protocols in Molecular Biology (F.M.Ausubel, 等人,eds.,1987);PCR:The Polymerase Chain Reaction, (Mullis,等人,eds.,1994); Current Protocols in Immunology (J.E.Coligan等人,eds.,1991);Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and sons,1999);Immunobiology (C.A.Janeway and P.Travers,1997);Antibodies (P.Finch,1997);Antibodies:a practical approach (D.Catty.,ed.,IRL Press,1988-1989);Monoclonal antibodies:a practical approach (P.Shepherd and C.Dean,eds.,Oxford University Press,2000);Using antibodies:a laboratory manual (E.Harlow and D.Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999);The Antibodies (M.Zanetti and J.D.Capra,eds.,Harwood Academic Publishers,1995)。

[0160] 无须进一步说明,据信本领域技术人员可根据上述描述最大限度地利用本发明。因此,本文提供的具体实施方案应被解释为仅仅是说明性的,而不以任何方式限制本公开的其余部分。本文引用的所有出版物出于本文引用的目的或主题通过参考并入。

[0161] 实施例1:鉴别鞣酸的有效部分并测定其用于治疗中枢神经系统 (CNS) 病症的有效性

[0162] 以下述方式测定鞣酸抑制D-氨基酸氧化酶 (DAAO) 的活性。

[0163] 在体外通过测量已知底物 (D-脯氨酸) 的分解代谢的抑制作用来测定DAAO的活性。首先将辅因子FAD (40 μ M) 加入DAAO储备溶液中。针对测定所需,将鞣酸的潜在抑制剂与含有磷酸盐缓冲盐水 (137mM的NaCl、3mM的KCl、10mM的Na₂HPO₄、2mM NaH₂PO₄, pH 7.4)、辣根过氧化物酶 (5U/ml)、邻苯二胺 (o-phenylenediamine (OPD, 0.03%)), 以及0.6 μ g的人类-(或猪的) DAAO的反应混合物混合,并孵育约5分钟。在预孵育期之后,加入40mM的D-脯氨酸做为底物并使反应持续10分钟。OPD被辣根过氧化物酶氧化形成2,3-二氨基吩嗪 (2,3-diaminophenazine, DAP)。以分光光度法测定DAP于波长453nm的吸光度。以经过连续稀释的

抑制剂来进行测试,以产生IC₅₀,并以Prism(Graphpad Software)分析。在该分析中,将分光光度计的读数套用标准公式以测定50%抑制作用的浓度(IC₅₀)。所有酶促测定均在室温以96孔板形式进行。

[0164] 如图1所示,粗制鞣酸作为族群对D-氨基酸氧化酶(DAAO)具有很强的抑制活性,其IC₅₀值为约5.47μM。

[0165] 以下则测试鞣酸的子群组(具有特定数目的没食子酰基部分)抑制DAAO活性的功效。通过反相柱(LiChroprep[®] RP-18)以乙腈及蒸馏水的梯度洗脱液的流动相将具有不同数目的没食子酰基部分的鞣酸馏分加以分离。通过前述的方法分析每个鞣酸馏分于80μM(表2)及300nM(图2,表2)下抑制DAAO活性的结果,其中蒸馏水及10%的DMSO水性溶液作为空白对照组,而苯甲酸钠作为阳性对照组。

[0166] 表2:个别鞣酸的DAAO抑制活性

样品(80 μM)	相对 DAAO 活性	
	(%)	SEM
H ₂ O	100.00	1.01
10% DMSO	100.00	1.97
苯甲酸钠	38.05	0.46
馏分部分 7 (2 个没食子酰基)	24.35	0.72
馏分部分 9 (2 个没食子酰基)	26.42	0.20
馏分部分 13 (3 个没食子酰基)	13.17	0.20
馏分部分 15 (4 个没食子酰基)	6.71	0.14
馏分部分 19 (5 个没食子酰基)	5.62	0.17
馏分部分 20 (6 个没食子酰基)	5.63	0.30
馏分部分 22 (7 个没食子酰基)	5.16	0.36
馏分部分 24 (8 至 9 个没食子酰基)	7.45	0.13

[0169] 表2显示了具有不同没食子酰基部分数目的鞣酸的抗DAAO活性。相较于具有少于4个没食子酰基部分的鞣酸,具有4个或更多没食子酰基部分的鞣酸对DAAO具有高得多的抑制活性。以80μM的鞣酸来进行所有的DAAO测定。

[0170] 表3:个别鞣酸对DAAO的抑制活性

样品 (300nM)	相对DAAO活性 (%)	SD
对照	100.00	4.74
3G	99.25	5.01
4G	83.67	4.55
5G	60.41	3.62
6G	54.19	1.81
7G	44.60	1.39
8G	48.23	1.17

9G	27.92	1.36
10G	19.25	5.13

[0172] 表3显示了300nM的具有不同没食子酰基部分数目的鞣酸的抗DAAO活性。3个没食子酰基部分活性弱,而较高的没食子酰基部分数目具有显著较高的DAAO抑制活性。(G=没食子酰基部分的数目)

[0173] 表4:个别鞣酸的功效

	3G	4G	5G	6G	7G	8G	9G	10G
[0174] IC ₅₀ (μM)	8.474	1.576	0.496	0.375	0.256	0.337	0.240	0.215
标准误差	0.031	0.020	0.019	0.014	0.014	0.012	0.011	0.008

[0175] 下表4显示了具有不同没食子酰基部分数目的鞣酸的抗DAAO活性的IC₅₀ (μM)。具有不同数目的没食子酰基部分的每个鞣酸均测定IC₅₀,其表明有效的鞣酸具有多于3个没食子酰基部分。相较于具有少于4个没食子酰基部分的鞣酸,具有4个或更多没食子酰基部分的鞣酸的IC₅₀较小且更有效地抑制DAAO。(G=没食子酰基部分的数目)

[0176] 表5:含有4至9个没食子酰基部分(4至9G)的鞣酸纯化的活性比鞣酸混合物更强

[0177] 样品	鞣酸	4至9G
IC ₅₀ (μg/ml)	0.515	0.361
标准误差	0.020	0.017

[0178] 因此,纯化具有多于3个没食子酰基部分的鞣酸会提高其功效(相较于鞣酸混合物),如较小IC₅₀所表明的(表5)。结果显示,相较于具有3个或更少没食子酰基部分的鞣酸,具有多于3个(例如4至10个)没食子酰基部分的鞣酸对DAAO具有更高的抑制功效。

[0179] 实施例2:鞣酸在基础行为功能及认知行为上的功效

[0180] 本研究的目的是在验证各种剂量的鞣酸在基础代谢、行为功能以及认知行为上的效果。在本实验中,接受重复的鞣酸注射或口服给药之后,测量每只小鼠的体重、自发运动活动力、类焦虑行为、空间学习和记忆、类抑郁行为以及感觉运动门控功能。已知这些活性是通过NMDA受体所介导的。(Wu等人,PNAS;110(36):14765-70(2013);Furuya等人,Eur J Pharmacol,364(2-3):133-140[1999];Lai等人,Curr Pharm Des,20(32):5139-5150[2014];McLamb等人,Pharmacol Biochem Behav,37(1):41-45[1990];Vardigan等人,Pharmacol Biochem Behav,95(2):223-229[2010];Wiley et al,Eur J Pharmacol,294(1):101-107[1995];Wu等人,Psychopharmacology (Berl),177(3):256-263[2005])。本研究的示例性说明显示于图3。

[0181] 材料与amp;方法

[0182] 动物以及饲养条件

[0183] 将C57BL/6J雄性小鼠分群圈养(每笼3-5只小鼠)于动物房内由聚砜制成的通风鼠笼(Alternative Design,AR,USA)中,使其可任意取用食物与水。群体维持在12/12小时的光/暗循环,且室内温度维持在22±2℃,而所有的行为实验均在暗循环期间进行。本实验使用的动物均为成鼠(至少2.5个月大)。

[0184] 重复注射鞣酸

[0185] 从Sigma (Sigma-Aldrich, USA) 购得鞣酸。将成鼠随机地区分成三组：(1) 对照组；(2) 鞣酸(每千克10毫克)组；以及(3) 鞣酸(每千克30毫克)组，其分别以载体对照物(PBS)、每千克10毫克的鞣酸以及每千克30毫克的鞣酸进行处理。于行为测试的两周前，所有的小鼠每隔一日接受腹腔内注射(i.p.)载体对照物或鞣酸。进行注射的每日，纪录每只小鼠的体重，该体重可做为其生理发育及代谢的指标。

[0186] 重复注射鞣酸对小鼠基础行为功能及认知行为的影响的测定

[0187] 不论经载体对照物处理或经鞣酸处理的所有前述小鼠，均序贯地进行以下五种行为实验：(1) 开放场任务，针对自发运动测试、(2) 通过高架十字迷宫(elevated plus maze)进行类焦虑行为试验、(3) 通过巴恩斯迷宫(Barnes maze)进行空间学习及记忆测试、(4) 通过尾部悬吊测试类抑郁行为测试，以及(5) 通过前脉冲抑制进行感觉运动功能试验。在进行不同任务之间至少间隔一周。为了最小化残留效果(carryover effect)，这些任务顺序排列以确保较有压力的任务不会排在压力较少的任务之前。这些流程已被阐明于Current protocol in Neuroscience (Developmental Editor: Eric Prager, Online ISBN: 9780471142300, DOI: 10.1002/0471142301)，其相关公开内容通过引用并入本文以达到预期目的。

[0188] 结果

[0189] 生理发育及体重减低

[0190] 在重复注射期间，接受每千克10毫克鞣酸注射的小鼠体重有增加，增加的幅度比对照组的小鼠所增加的体重要少；而接受每千克30毫克鞣酸注射的小鼠体重要比对照组小鼠的体重轻得多。见图4。

[0191] 自发性运动活动力

[0192] 开放场任务是用于检测小鼠及大鼠对于新奇诱导的探索行为与综合活动的常用试验方法。本实验是将小鼠放置在 PLEXIGLAS® 笼(37.5cm×21.5cm×18cm)中，并放置于光强度50-65流明(lux)照明下。使用EthoVision影像追踪系统(Noldus Information Technology, the Netherlands)测试小鼠的自发运动活动力60分钟。测量每只小鼠的移动距离做为运动活动力的指标。如图5所示，鞣酸以剂量依赖性方式降低经处理的小鼠的移动距离。

[0193] 另外执行类似的实验，其中小鼠是经口服施用每千克10毫克、每千克30毫克、每千克100毫克、每千克300毫克，以及每千克600毫克的单一剂量，且测试这些小鼠30分钟、60分钟、90分钟以及120分钟的运动活动力。所有测试剂量的鞣酸与用载体对照组处理的小鼠相比降低经处理小鼠的的活动力。该结果显示于图6。

[0194] 类焦虑行为

[0195] 利用由两个开臂与两个闭臂构成的高架十字迷宫来评定本能焦虑行为。将具有两开臂(每个长×宽为50厘米×10厘米)，及没有屋顶且包含45厘米高的墙的两闭臂(每个长×宽为50厘米×10厘米)，以及一正方形的中心平台(10厘米×10厘米)的迷宫抬至距离地板50厘米高。每只小鼠放置在中心平台中且面对其中一个闭臂，并在50-65流明光强度下观察5分钟。通过EthoVision影像追踪系统(Noldus Information Technology, the Netherlands)记录小鼠在迷宫的每一部分所逗留的时间及移动距离。

[0196] 图7的A小图显示每组小鼠的厌恶持续时间比(aversive duration ratio)。与对

照组相比,以每千克30毫克的鞣酸处理的小鼠组展现边缘的较高的厌恶持续时间比,然而每千克10毫克的鞣酸处理的小鼠组则不然。图7的B小图显示每一组的厌恶距离比(aversive distance ratio)。相对于对照组而言,以每千克30毫克的鞣酸处理的组展现显著较高的厌恶距离比。图7的C小图显示每组小鼠的风险评估的数字。相较于对照组,两个经鞣酸处理的组均展现显著较低的风险评估(所有的 $p < 0.05$)。

[0197] 空间学习及记忆

[0198] 在巴恩斯迷宫(Barnes maze)中测试小鼠的空间学习及记忆能力(方法如前人所述)(Barnes, *J Comp Physiol Psychol*, 93(1):74-104[1979])。此实验被普遍用来在小鼠模型中检测许多CNS病症,其包含,但不限于:精神分裂症、抑郁、强迫症、创伤后应激障碍、成瘾症、阿尔茨海默病、额颞痴呆、帕金森氏症、杜氏肌营养不良、中风以及脆性X综合征(请参阅Cook等人,2014;Götz and Ittner,2008;Hendriksen and Vles,2008;Conklin等人,2000;song等人,2006;Lai等人,2014;Vasterling等人,2002;Hyman,2005;Schaar等人,2010;Santos等人,2014;Zhu等人,2007;Deckersbach等人,2000)。实验装置是离地面50厘米高的圆形PLEXIGLAS®板,该板直径为100厘米,同时在PLEXIGLAS®板上沿着其周长平均分配有20个洞(直径7厘米,洞与洞之间间隔7厘米)。训练小鼠在板上找出藏在目标洞口后的脱逃箱(25厘米×8厘米×6厘米),其被设计为类似于在莫氏水迷宫(Morris water maze)测试中的隐藏平台。为每只小鼠选定目标洞口的位置,但不同小鼠之间则随机的挑选目标洞口的位置。一开始,将小鼠放置在圆形板的中心并以不透明圆筒盖住,接着,开启厌恶音频(aversive tone)(440Hz,85dB)以及开始光源(100流明),试验开始,在10秒钟之后,移开该不透明圆筒。经过连续三天每日三次训练试验,小鼠学会避开厌恶音频且根据周围视觉线索找到目标洞口的位置。接着通过“探测试验”(probe test)测试空间记忆力。用影像记录所有训练试验以及探测试验3分钟。接着,分析在训练试验中的逃脱逗留时间(escape latency)以及小鼠在探测试验期间待在不同象限(目标、左、右以及相反)中的时间百分比。如图8显示的,在探测试验中,以每千克30毫克的鞣酸处理的组别展现对目标区域有显著偏好,其它组别则不然。

[0199] 在实施例2所描述的实验中,研究多次注射不同剂量鞣酸的小鼠的基础代谢、行为功能,以及认知行为特征。总结来说,注意到三个主要的发现。

[0200] 首先,以每千克30毫克鞣酸处理的小鼠的体重减轻。这组的小鼠同样也在开放场中展现较低的自发运动活动力。开放场任务用来检测新奇诱导的运动活动力以及综合活动功能(Powell等人,*Biol Psychiatry*, 59(12):1198-1207[2006];van den Buuse, *Schizophr Bull*, 36(2):246-270[2010])。不受理论的约束,重复注射鞣酸的小鼠运动活动力减少可能归因于其能快速适应新环境。

[0201] 第二,在高架十字迷宫测试中,经鞣酸处理的小鼠类焦虑行为减少。高架十字迷宫任务是用于筛选潜在抗焦虑或致焦虑化合物的一种小鼠模型(Rodgers等人,*Braz J Med Biol Res*, 30(3):289-304[1997];Steimer,*Dialogues Clin Neurosci*, 13(4):495-506[2011])。在开臂中停留的时间比例增加表示在迷宫中的焦虑较低。在本实验中,重复注射鞣酸的小鼠不只展现较高的开臂停留时间比例,也展现较高的开臂移动距离比例以及较低的风险评估。这些结果支持重复注射鞣酸可减少在高架十字迷宫中的类焦虑行为。

[0202] 第三,重复注射鞣酸的小鼠在巴恩斯迷宫中展现增强的空间记忆提取能力

(spatial memory retrieval)。巴恩斯迷宫是一种用来评估小鼠认知功能的检测方式,特别是对空间学习及记忆能力的检测(Rosenfeld等人,J Vis Exp, (84):e51194[2014])。基于对特定认知功能领域的知识发展一日千里,聚焦于认知缺陷在许多精神疾病(包括精神分裂症、痴呆、阿尔茨海默病、抑郁以及强迫症(OCD)等)中产生的影响的临床研究日益增加(Kirova等人,Biomed Res Int,748212[2015];Lai等人,Curr Pharm Des,20(32):5139-5150[2014];Okasha等人,Acta Psychiatr Scand,101(4):281-285[2000];Rosenblat等人,Int J Neuropsychopharmacol,pii:pyv082[2015];Terry等人,Ann Neurol,30(4):572-580[1991])。在探测试验(记忆提取阶段(memory retrieval phase))中,以每千克30毫克处理的鞣酸的组展现对目标区域的偏好。此证据指出重复注射高剂量鞣酸能够增进普通小鼠的认知功能。此外,NMDA受体信号传导被认为在学习过程以及记忆稳固(memory consolidation)中扮演重要角色(Newcomer等人,Hippocampus,11(5):529-542[2001];Rezvani,Animal Models of Cognitive Impairment,1(4)[2006])。因此,重复注射鞣酸可在小鼠身上通过NMDA信号传导增进认知功能。

[0203] 因此,本研究的结果表示鞣酸可有效地减轻体重且改善基础行为功能、过动、焦虑、记忆和/或认知行为。例如,大部分患有ADHD的儿童同样也合并患有学习障碍,其也可通过鞣酸来改善,鉴于鞣酸对学习及记忆的功效。

[0204] 实施例3:注射鞣酸对MK-801处理小鼠的防护及保护功效

[0205] 本实验目的是通过已知的NMDA受体拮抗剂MK-801来评估鞣酸在治疗CNS病症中的潜在作用机制。在行为测试(即,开放场以及前脉冲抑制)之前通过腹腔内(i.p.)注射分别对小鼠施用鞣酸及MK-801。

[0206] 实验设计

[0207] 本实验设计是用来分析鞣酸作用的机制。MK-801也被称为地佐环平(dizocilpine),是一种NMDA受体的拮抗剂(Kovacic等人,Oxid Med Cell Longev,3(1):13-22[2010])。在NMDA功能不足诱导的中枢神经系统疾病的症状(其包括刻板化行为、兴趣缺失、学习及记忆缺陷、工作记忆受损以及感觉运动功能异常)的许多方面都有应用到它(Furuya等人,Eur J Pharmacol,364(2-3):133-140[1999];McLamb等人,Pharmacol Biochem Behav,37(1):41-45[1990];Vardigan等人,Pharmacol Biochem Behav,95(2):223-229[2010];White等人,Pharmacol Biochem Behav,59(3):613-617[1998];Wu等人,Psychopharmacology (Berl),177(3):256-263[2005])。这些实验的目的是用于评估鞣酸在NMDA受体功能低下的小鼠身上的功效。图9说明了示例性实验设计。

[0208] 材料与方法

[0209] 动物以及饲养条件

[0210] 将C57BL/6J雄性小鼠分群圈养(每笼3-5只小鼠)于动物房内由聚砜制成的通风鼠笼(Alternative Design,AR,USA)中,使其可任意取用食物与水。群体维持在12/12小时的光/暗循环,且室内温度维持在 $22 \pm 2^\circ\text{C}$,而所有的行为实验均在暗循环期间进行。本实验使用的动物均为成鼠(至少2.5个月大)。

[0211] 药物施用

[0212] 将小鼠随机地分成六组:

[0213] 第1组:PBS+盐水(对照组);

[0214] 第2组:PBS+MK-801;

[0215] 第3组:鞣酸(每千克10毫克)+MK-801;

[0216] 第4组:鞣酸(每千克15毫克)+MK-801;

[0217] 第5组:鞣酸(每千克20毫克)+MK-801;

[0218] 第6组:鞣酸(每千克30毫克)+MK-801。

[0219] 在行为测试之前20分钟,第2组至第6组的每只小鼠接受溶解于普通盐水的MK-801(Sigma-Aldrich,美国)的急性给药处理(每千克0.1毫克,i.p.)。在施用MK-801之前20分钟,第3组至第6组的每只小鼠接受溶于PBS的鞣酸(Sigma-Aldrich,美国)急性给药处理(每千克10、15、20或30毫克,i.p.)。

[0220] 检测鞣酸给药对MK-801处理小鼠的效果

[0221] 本实验的小鼠均以开放场任务以及前脉冲抑制任务来进行检测,两任务之间至少间隔一周。另外的小鼠同期组群则用来测试不同来源的鞣酸在前脉冲抑制中的效果。

[0222] 结果

[0223] 鞣酸对MK-801处理小鼠的运动能力的影响

[0224] 相比于对照组(第1组),MK-801组(第2组)展现高度运动活动力(hyperlocomotion activity)。10毫克的鞣酸组、20毫克的鞣酸组以及30毫克的鞣酸组(第3、5及6组)则展现比对照组还低的运动活动力(如图10所示)。相比于MK-801组(第2组),所有鞣酸组别均展现较低的运动活动力,如图10所示。

[0225] MK-801产生的过动症状通常可应用到包括但不限于:精神分裂症、双相型障碍、注意缺陷过动症、强迫症、Tourette综合征、自闭症谱系病症、脆性X综合征、帕金森氏症、Lewy体痴呆以及老年性痴呆的小鼠模型上(请参阅Rubia等人,2010;Sheppard and Bradshaw,1999;Bent等人,2014;Powell and Miyakawa,2006;Nestler and Hyman,2010;Bubenl'kova'-Vales'ova等人,2008;Gobira等人,2013;Lai等人,2014;Maio等人,2014;Sontag等人,2010;Ding等人,2014;Walitza等人,2007;Finestone等人,1982;Golimstok等人,2011)。

[0226] 鞣酸对MK-801处理小鼠的前脉冲抑制功效——感觉运动功能

[0227] 前注意处理程序(pre-attentive process)通常是自动且快速、同时不是在清醒意识下运作,反之,需要意识参与的注意程序(deliberate attention process)的资源有限,需要花更多力气、且是以更慢的速度在运作。一种普遍用于检测前注意处理程序的方法是前脉冲抑制。此实验被普遍用于许多CNS病症(其包含,但不限于:精神分裂症、严重抑郁障碍、双相型障碍、注意缺陷障碍、注意缺陷多动障碍、抽动障碍、强迫症、Tourette综合征、眼睑痉挛、创伤后应激障碍、惊恐障碍、自闭症谱系病症、Asperger障碍、阿尔茨海默病、阿尔茨海默病的轻微痴呆、Lewy体痴呆、亨廷顿氏症、人格障碍、夜间遗尿症以及非癫痫发作)的小鼠模型进行检测,这是由于这些小鼠的缺损表达与人类症状极为类似的缘故(请参阅:McAlonan等人,2002;Braff等人,2001;Giakoumaki等人,2007;Ueki等人,2006;Perriol等人,2005;Ludewig等人,2002;Castellanos等人,1996;Cadenhead等人,2000;Matsuo等人,2017;Lai等人,2014;McCool等人,2003;Arguello&Gogos,2006)。

[0228] 通过SR-LAB惊吓孵育测试装置(San Diego Instruments, San Diego, CA, 美国)检测作为感觉运动门控指标的前脉冲抑制。在音量为72dB(分贝)的背景噪音之下,每一节实

验 (session) 是由5分钟的累计期间 (accumulation period) 组成,紧接着在四个区段 (block) 的64次试验 (trail)。单脉冲 (PA) 试验是40ms、120dB的白噪音爆发 (white noise burst)。在前脉冲 (pp)+脉冲试验中,先给予78dB (pp6)、82dB (pp10) 及90dB (pp18) 的20ms白噪音刺激,100ms后,再给予40ms的120dB脉冲。无刺激 (NS) 试验则是仅存有背景噪音。初始及最后区段是分别由六个PA试验组成。中间两个区段是由PA、pp+脉冲以及NS试验所组成。这些试验是以伪随机方式 (pseudo-randomly) 进行,且各试验之间的间隔平均为15秒 (从10秒至20秒不等)。前脉冲抑制的百分比是以下列公式计算: $\%PPI = 100 \times [(PA \text{ 分数}) - (pp\text{-}P \text{ 分数})] / (PA \text{ 分数})$,其中PA分数是中间区段的平均PA值。如图11及图12所示,鞣酸会改善前脉冲抑制,图11显示鞣酸的改善效果会随着剂量而变化。

[0229] 在78dB的前脉冲强度测试,六个组别均没有显著差异。在82dB的前脉冲强度中,MK-801及鞣酸 (每千克10毫克) 组相对于对照组没有差异。另一方面,相对于对照组,鞣酸 (每千克15毫克) 组展现稍微高一点的前脉冲抑制百分比,且鞣酸 (每千克20毫克) 组以及鞣酸 (每千克30毫克) 组明显具有较高百分比的前脉冲抑制。在90dB前脉冲强度中,相较于对照组,鞣酸 (每千克15毫克) 组、鞣酸 (每千克20毫克) 组以及鞣酸 (每千克30毫克) 组显著地展现显著较高的前脉冲抑制百分比,然而在MK-801组以及鞣酸 (每千克10毫克) 组的小鼠上,没有观察到类似结果,如图11所示。

[0230] 不同来源的鞣酸对MK-801处理小鼠的前脉冲抑制的效果

[0231] 本实验的目的在于评估不同来源的鞣酸对于前脉冲抑制的功效。在本实验中分别使用每千克15毫克从Sigma-Aldrich购买的鞣酸 (来源A) 以及从美国Spectrum购买的鞣酸 (来源B)。来源A及来源B的鞣酸的抗DAAO活性,其 IC_{50} (μM) 值分别为0.291及0.636。

[0232] 关于78dB及82dB的前脉冲强度,在经两个来源的鞣酸处理的小鼠以及对照组或MK-801组之间没有观察到明显的差异。在90dB的前脉冲强度中,相比于对照组,两个鞣酸组均展现出显著较高的前脉冲抑制百分比,而在MK-801组别中并没有观察到这样的结果。如图12显示,经来源A (Sigma-Aldrich, USA) 的鞣酸以及来源B (Spectrum, USA) 的鞣酸处理的小鼠所得的结果相似。

[0233] 虽然在动物模型中要观察及测量其精神病症状具有相当挑战性,但可被测试的精神病相关的行为可包括心理动作性激躁 (psychomotor agitation)、兴奋症状、感觉门控以及对拟精神病的药物 (psychotomimetic drugs) (诸如MK-801) 的敏感性 (Arguello等人, *Neuron*, 52 (1) :179-196 [2006];Lai等人, *Curr Pharm Des*, 20 (32) :5139-5150 [2014])。在小鼠中,可分别使用在开放场任务中与高度运动活动力,及与新奇诱导的运动活动力 (novelty-induced locomotion activity) 的变化 (对于习惯新事物或者增加探索方面的损害) 有关的参数,分别测量心理动作性激躁以及兴奋症状 (Lai等人, *Curr Pharm Des*, 20 (32) :5139-5150 [2014];Powell等人, *Biol Psychiatry*, 59 (12) :1198-1207 [2006];Vardigan等人, *Pharmacol Biochem Behav*, 95 (2) :223-229 [2010])。在本研究中的开放场中,通过i.p.途径或经口 (p.o) 途径给予的鞣酸均可逆转/保护被MK-801诱导产生的高度运动活动力。结果指出鞣酸是可用于治疗精神病症状 (例如妄想及幻觉) 的潜在治疗剂。

[0234] 在前脉冲抑制试验中,每千克15毫克的鞣酸就足够增进经MK-801处理的小鼠的感觉运动门控功能。此外,不同来源的鞣酸也不影响在前脉冲抑制任务中感觉运动功能的增强功效。前脉冲抑制的缺陷已经普遍被认为是小鼠模型中的精神分裂内在表型

(schizophrenic endophenotype), 因为已确认该缺陷表达与人类的相似 (Arguello 等人, *Neuron*, 52 (1) :179-196 [2006]; Geyer 等人, *Schizophr Bull*, 13 (4) :643-668 [1987]; Lai 等人, *Curr Pharm Des*, 20 (32) :5139-5150 [2014])。前脉冲抑制的缺陷也发生在其它中枢神经系统疾病中, 包括自闭症谱系病症 (McAlonan 等人, *Brain*, 125 (Pt 7) :1594-1606 [2002])、强迫症、亨廷顿氏症、夜间遗尿症、注意缺陷、Tourette 综合征、眼睑痉挛、非癫痫发作、创伤后应激障碍 (Braff 等人, *Psychopharmacology (Berl)*, 156 (2-3) :234-258 [2001])、惊恐障碍、双相型障碍、阿尔茨海默病的轻微痴呆、Lewy 体痴呆, 以及注意缺陷多动及抽动障碍的合并症 (Giakoumaki 等人, *Biol Psychiatry*, 62 (12) :1418-1422 [2007]; Ludewig 等人, *Depress Anxiety*, 15 (2) :55-60 [2002]; Perriol 等人, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 76 (1) :106-108 [2005]; Ueki 等人, *Psychiatry Clin Neurosci*, 60 (1) :55-62 [2006])。

[0235] 由此, 鞣酸有望可成为适用于多种 CNS 病症的治疗剂。此外, 鞣酸同时可降低自发及 MK-801 诱导的高度运动活动力, 这暗示鞣酸可做治疗剂, 以改善 ADHD 及其相关疾病的症状。

[0236] 同时, 观察到鞣酸可维持和/或减轻受其治疗的小鼠体重, 表示鞣酸可有效地控制体重和/或治疗肥胖和与其相关病症, 这些病症包含进食障碍、神经性厌食、神经性贪食、中风、冠状动脉心脏病、心脏病发作、充血性心力衰竭、先天性心脏病、高血压、非酒精性脂肪性肝炎、胰岛素抗性、高尿酸血症、甲状腺功能减退、骨关节炎、胆结石、不育 (性腺机能减退 (hypogonadism) 及雄激素过多症 (hyperandrogenism))、肥胖性通气不足综合征、阻塞性睡眠呼吸暂停、慢性阻塞性肺病以及哮喘。

[0237] 实施例 4: 口服给予鞣酸对 MK-801 处理小鼠的防护及保护效果

[0238] 本实验目的是通过已知的 NMDA 受体拮抗剂 MK-801 来评估鞣酸在治疗 CNS 病症中的潜在作用机制。在行为测试 (也即, 开放场、前脉冲抑制、巴恩斯迷宫以及蔗糖偏好测试) 之前, 分别以口服管饲法 (p.o.) 以及腹腔内 (i.p.) 注射的方式对小鼠施用鞣酸及 MK-801。

[0239] 实验设计

[0240] 本实验是设计用来分析鞣酸作用的机制。MK-801 也被称为地佐环平 (dizocilpine), 是一种 NMDA 受体的拮抗剂 (Kovacic 等人, *Oxid Med Cell Longev*, 3 (1) :13-22 [2010])。在 NMDA 功能不足诱导的中枢神经系统疾病的症状 (其包括刻板化行为、兴趣缺失 (anhedonia)、学习及记忆缺陷、工作记忆受损以及感觉运动功能异常) 的许多方面都有应用到它 (Furuya 等人, *Eur J Pharmacol*, 364 (2-3) :133-140 [1999]; McLamb 等人, *Pharmacol Biochem Behav*, 37 (1) :41-45 [1990]; Vardigan 等人, *Pharmacol Biochem Behav*, 95 (2) :223-229 [2010]; White 等人, *Pharmacol Biochem Behav*, 59 (3) :613-617 [1998]; Wu 等人, *Psychopharmacology (Berl)*, 177 (3) :256-263 [2005])。这些实验的目的是用于评估鞣酸在 NMDA 受体功能低下的小鼠身上的功效。图 13 示例性的说明本实验设计。

[0241] 材料与amp;方法

[0242] 动物以及饲养条件

[0243] 将 C57BL/6J 雄性小鼠分群圈养 (每笼 3-5 只小鼠) 于动物房内由聚砜制成的通风鼠笼 (Alternative Design, AR, 美国) 中, 使其可任意取用食物与水。群体维持在 12/12 小时的光/暗循环, 且室内温度维持在 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 而所有的行为实验均在暗循环期间进行。本实验使

用的动物均为成鼠(至少2.5个月大)。

[0244] 药物施用

[0245] 将小鼠随机地分成五组:

[0246] 第1组:PBS+盐水(对照组);

[0247] 第2组:PBS+MK-801;

[0248] 第3组:鞣酸(每千克10毫克)+MK-801;

[0249] 第4组:鞣酸(每千克30毫克)+MK-801;以及

[0250] 第5组:鞣酸(每千克100毫克)+MK-801。

[0251] 在行为测试前20分钟,通过i.p.注射对第2组至第5组的每一只小鼠急性施用溶于普通盐水的MK-801(Sigma-Aldrich,美国),用于开放场与巴恩斯迷宫的小鼠剂量为每千克0.1毫克、用于前脉冲抑制以及蔗糖偏好测试的小鼠剂量则是每千克0.2毫克。在施用MK-801之前20分钟,第3组至第6组的每只小鼠则是急性口服给予溶于PBS的鞣酸(Merck Millipore,德国)(每千克10、30或100毫克,p.o.)。

[0252] 结果

[0253] 检测鞣酸施用对MK-801处理小鼠的效果

[0254] 本实验的小鼠均以开放场任务、前脉冲抑制任务、巴恩斯迷宫以及蔗糖偏好测试来进行检测,两任务之间至少间隔一周。

[0255] 口服施用鞣酸对MK-801处理小鼠运动能力的影响

[0256] 在本测试中,在注射MK-801(每千克0.1毫克)前20分钟,先口服施用鞣酸。如图14所示,MK-801会诱发过动,而鞣酸以剂量依赖性方式防护MK-801所诱发的过动。

[0257] 鞣酸对MK-801处理小鼠的前脉冲抑制的效果

[0258] 相比于对照组,MK-801(每千克0.2毫克)会诱发强烈的前脉冲抑制缺损。在78dB及82dB的前脉冲强度下,鞣酸(每千克10、30以及100毫克)无法防护/保护被MK-801诱导的前脉冲抑制缺损。至于在90dB的前脉冲强度下,相比于MK-801组,鞣酸(每千克30毫克)组以及鞣酸(每千克100毫克)组则可显著地防护/保护MK-801诱导的前脉冲抑制缺损。然而在MK-801及鞣酸(每千克10毫克)组中,则没有观察到这样的结果,参见图15所示。

[0259] 鞣酸对MK-801处理小鼠的空间学习及记忆的功效

[0260] 如图16所示,鞣酸以剂量依赖性方式改善经MK-801处理小鼠在巴恩斯迷宫任务中的记忆提取(memory retrieval)。

[0261] 鞣酸对MK-801处理小鼠的类抑郁行为(兴趣缺失)的功效

[0262] 相较于对照组,MK-801组的小鼠并没有展现对蔗糖溶液(2%)的偏好。相比于MK-801群组,以每千克30毫克及每千克100毫克的鞣酸处理的小鼠对被MK-801诱导的类抑郁行为(兴趣缺失)展现防护/保护效果,参见图17。蔗糖偏好测试实验在小鼠模型中普遍被用来检测许多心理疾病,这些心理疾病包含,但不限于:抑郁障碍、严重抑郁障碍、兴趣缺失、精神分裂症的负性症状(negative symptoms of schizophrenia)、慢性轻度且不可预测的应激(请参阅Anderson等人,2006;Carvalho等人,2013;Briones等人,2011;Der-Avakian and Markou,2012;Tye等人,2013;Edwards and Koob,2012;Brigman等人,2010;Koo and Duman,2007;Nestler and Hyman,2010;Overstreet,2012;Papp等人,1991;Santiago等人,2010;Skalisz等人,2002;Szczyepka等人,2001;Taylor等人,2010;Vardigan等人,2010;

Willner等人,1987;You等人,2011)。

[0263] 实施例5:鞣酸在小鼠中的镇痛功效

[0264] 本实验目的在于评估鞣酸在小鼠中的镇痛功效。在行为测试(也即von Frey测试)之前通过腹腔内(i.p.)注射对小鼠施用鞣酸。

[0265] 实验设计

[0266] 在von Frey测试(其是痛觉的典型试验)中使用了另一组小鼠。在药物注射之前,以及药物注射之后30分钟、60分钟、90分钟以及120分钟分别量取每只小鼠的脚爪缩回阈值(如图22显示)。

[0267] 材料与方法

[0268] 动物以及饲养条件

[0269] 将C57BL/6J雄性小鼠分群圈养(每笼5只小鼠)于动物房内由聚砜制成的通风鼠笼(Alternative Design,AR,美国)中,其可任意取用食物与饮水。群体维持在12/12小时的光/暗循环,且室内温度维持在 $22 \pm 2^\circ\text{C}$,而所有的行为实验均在暗循环期间进行。本实验使用的动物均为成鼠(至少8周大)。

[0270] 药物施用

[0271] 将小鼠随机地分成两组:

[0272] 第1组:PBS对照组;以及

[0273] 第2组:鞣酸组(每千克15毫克)。

[0274] 通过腹腔内注射急性给予第1组中的每只小鼠作为载体对照物的PBS。第2组中的每一只小鼠则接受鞣酸(Merck Millipore,德国;溶于PBS中,并通过i.p.给予每千克15毫克)的急性给药。

[0275] 结果

[0276] 对小鼠注射鞣酸的镇痛功效

[0277] 在基线(baseline),不同组别之间没有差异。相比于PBS对照组,第2组在药物注射后30分钟、60分钟以及90分钟的阈值,明显高于对照组的阈值(如图19显示)。von Frey测试在小鼠模型中被普遍用来检测许多CNS病症,其包括但不限于:神经性疼痛(包括痛觉过敏及异常性疼痛)、糖尿病性多神经病的感觉迟钝症(hypoesthesia in diabetic polyneuropathy)、慢性疼痛综合征(请参阅Park等人,2015;Savage and Ma,2015;Caterha等人,2000;Nicotra等人,2014;Keizer等人,2007;Chakrabarty等人,2011;Obrosova等人,2007;Orita等人,2011;Reeve等人,2000)。

[0278] 实施例6:不同鞣酸组合物的比较

[0279] 比较由不同供货商提供的三种市售鞣酸的组成以及其抑制D-氨基酸氧化酶(DAAO)的活性。

[0280] 实验设计

[0281] 通过HPLC测定三种市售的鞣酸的组成,且通过在实施例1所描述的方法测定所述鞣酸抑制DAAO活性的能力。

[0282] 材料与方法

[0283] HPLC条件

[0284] -仪器:Agilent 1260柱:Atlantis T3 150*4.6mm,30 μm

- [0285] -流动相A:水+0.1%的三氟乙酸
 [0286] -流动相B:甲醇:乙腈为2:8 (v/v)
 [0287] -柱温度:25℃
 [0288] -检测器:DAD 280nm
 [0289] -流速:1.5mL/分钟
 [0290] -样品制品:10mg/mL
 [0291] -注射体积:10μL
 [0292] -稀释剂:水
 [0293] -梯度:

[0294] 时间 (min)	0	10	25	26	34	36	40
A%	100	81	78	75	73	5	5
B%	0	19	22	25	27	95	95

[0295] 结果

[0296] 组成:

[0297] 来自不同植物或植物学来源的三种鞣酸的HPLC色谱图示于图20至22。

[0298] 抑制DAAO活性的功效:

[0299] 三种市售鞣酸抑制DAAO活性的活性以及其组成列于表6。

[0300] 表6:来自不同植物或植物学来源的三种市售鞣酸的抑制活性

植物来源	没食子栎 (<i>Quercus infectoria</i>)	盐肤木 (<i>Rhus chinensis</i>)	盐肤木 (<i>Rhus chinensis</i>)
供货商	供货商#1	供货商#2	供货商#3
[0301] IC ₅₀ (μg/ml)	0.601	0.424	0.336
IC ₅₀ 标准误差	0.007	0.005	0.006
2-5G%	50.86%	16.32%	7.25%
6-12G%	49.14%	83.68%	92.76%
8-12G%	21.17%	61.19%	78.16%

[0302] 相较于从没食子栎 (*Quercus infectoria*) 萃取的鞣酸,从盐肤木 (*Rhus chinensis*) 萃取的鞣酸具有较高比例的6至12G及较少比例的2至5G,因此比其它两者具有较高的DAAO抑制能力。

[0303] 实施例7:从不同植物或植物学来源的没食子萃取鞣酸以进行比较

[0304] 探查了从自指定的不同植物或植物学来源的没食子萃取的鞣酸以及其抑制D-氨基酸氧化酶 (DAAO) 的活性。

[0305] 方法

[0306] 没食子研磨方法

[0307] 以机械研磨器研磨适当植物或植物学来源的可产生鞣酸的没食子(列于下表6),再使其通过40网目筛网,以产生细没食子粉末。

[0308] 细没食子粉末的萃取方法

[0309] 将细没食子粉末(20.0克)置于200.0毫升的合适溶剂(例如,丙酮、乙腈、甲乙酮(MEK)、乙酸乙酯(EtOAc)、乙醇(EtOH)、异丙醇、四氢呋喃,或1,4-二噁烷)中。在室温或者在

40℃的温度,将所形成的混合物搅拌过夜。接着过滤该产物溶液,且在真空下浓缩该滤液以产生含有鞣酸的组合物。

[0310] 结果

[0311] 抑制DAAO活性的功效:

[0312] 遵照前述方法,自不同植物或植物学来源的没食子萃取鞣酸,其抑制DAAO活性的功效总结于表7。不同直径的没食子及其抑制DAAO的IC₅₀的比较结果图示于图23。

[0313] 表7:从不同植物或植物学来源的没食子所萃取的鞣酸的抑制活性

植物来源	没食子栎 (<i>Quercus infectoria</i>)	盐肤木(<i>Rhus chinensis</i>)	盐肤木(<i>Rhus chinensis</i>)	青麸杨(<i>Rhus potaninii</i>)	青麸杨(<i>Rhus potaninii</i>)
没食子形状	多刺球型	角型	角型	肚型	肚型
没食子直径	3-4 厘米	3-4 厘米	6-7 厘米	4-5 厘米	6-7 厘米
萃取溶剂	MEK	MEK	MEK	MEK	MEK
萃取温度	室温(RT)	室温(RT)	室温(RT)	室温(RT)	室温(RT)
IC ₅₀ (µg/ml)	0.679	0.393-0.424	0.441-0.553	0.560-0.724	0.718

[0314] 如表6及图23显示的,相较于自没食子栎(*Quercus infectoria*)的没食子所获得的鞣酸,自盐肤木(*Rhus chinensis*)或青麸杨(*Rhus potaninii*)的没食子萃取而得的鞣酸,其抑制DAAO活性的IC₅₀数值较低(代表其具有较强的抑制功效)。此外,相较于相同植物或植物学来源的较大尺寸没食子(直径6-7厘米),来自盐肤木(*Rhus chinensis*)的较小尺寸的没食子(直径3-4厘米)及来自青麸杨(*Rhus potaninii*)的较小尺寸的没食子(直径4-5厘米)具有较小的IC₅₀值。

[0315] 实施例8:从不同植物或植物学来源的没食子萃取的鞣酸的富集方法

[0316] 将本文披露的每种植物或植物学来源的没食子所萃取的鞣酸通过以下方法进行富集。评估其抑制DAAO活性的能力。

[0317] 富集方法1

[0318] 将细没食子粉末(20.0克)置于200.0毫升的合适溶剂(丙酮、甲乙酮、乙酸乙酯或乙醇)并在室温或20至60℃搅拌该混合物12小时。接着过滤该产物溶液,且在真空下浓缩该滤液以形成含有鞣酸的组合物。将组合物与50.0毫升的50%或30%的甲乙酮/己烷溶液(在己烷中有50%或30%的甲乙酮)混合。接着,将由此形成的混合物在室温搅拌12小时,并将所得的两个有机层分离。在真空中浓缩油层(下层)以产生粗固体。将该固体溶于50.0毫升的合适溶剂(丙酮、甲乙酮、乙酸乙酯、乙酸甲酯或乙醇)中且将所产生的溶液与活性碳(1.6克)进行混合。将所产生的混合物在室温搅拌12小时并将CaSO₄或MgSO₄(2.5克)加入混合物中。接着将前述步骤形成的混合物进一步于室温搅拌30分钟,并通过Celite床过滤,并以合适溶剂(丙酮、甲乙酮、乙酸乙酯、乙酸甲酯或乙醇)(100毫升,2次)洗涤,并在真空下浓缩。将产物固体(含有鞣酸)溶解于丙酮或乙酸乙酯(12.0毫升)中,接着搅拌所形成的溶液并逐滴与CH₂Cl₂(72.0毫升)混合。通过过滤收集前述所形成的固体,以及在40℃真空干燥2小时,以制备富集后鞣酸固体。

[0319] 富集方法2

[0320] 将细没食子粉末(20.0克)置于200.0毫升的合适溶剂(丙酮、甲乙酮、乙酸乙酯、乙酸甲酯、乙醇)中并于室温搅拌12小时。所形成的溶液进行过滤,并将收集的滤液与200.0毫

升的己烷混合。接着将混合物在室温搅拌12小时,并将所得的两个有机层分离。在真空中浓缩油层(下层),且将所得的固体溶于50.0毫升的合适溶剂(丙酮、甲乙酮、乙酸乙酯、乙酸甲酯、乙醇等)中。将所得的溶液与活性碳(1.6克)混合并进一步在室温搅拌12小时。接着将所获得的混合物进一步与CaSO₄或MgSO₄(2.5克)混合,并于室温搅拌30分钟。混合物通过Celite床进行过滤,并以(丙酮、甲乙酮、乙酸乙酯、乙酸甲酯、乙醇等)溶液洗涤(100毫升,2次),并在真空中浓缩。所得的粗残留物溶于丙酮或乙酸乙酯(12.0毫升)中,所形成的溶液则与CH₂Cl₂(72.0毫升)搅拌缓慢混合。通过过滤收集前述所形成的固体,以及在40℃真空干燥2小时,以制备富集后鞣酸组合物。

[0322] 富集方法3

[0323] 将细没食子粉末(20.0克)置于200.0毫升的溶剂(丙酮、甲乙酮、乙酸乙酯、乙酸甲酯、乙酸甲酯或者乙醇)中并于室温搅拌12小时。过滤产物溶液,且收集滤液。接着将滤液加入200.0毫升的己烷中。接着将由此形成的混合物在室温搅拌12小时,并将所得的两个有机层分离。收集油层(下层),并与40.0毫升的溶剂(丙酮、甲乙酮、乙酸乙酯、乙酸甲酯或乙醇)以及活性碳(1.6克)进行混合,并于室温搅拌所得的混合物12小时。混合物进一步与CaSO₄或MgSO₄(2.5克)混合,并在室温搅拌30分钟,通过Celite床进行过滤,并以溶剂(丙酮、甲乙酮、乙酸乙酯、乙酸甲酯或乙醇)(100毫升,2次)洗涤。接着在真空中浓缩所收集的滤液,并将所得固体物质溶于丙酮或乙酸乙酯(12.0毫升)。将前述形成的溶液搅拌并逐滴与CH₂Cl₂(72.0毫升)混合。通过过滤收集前述所形成的固体,以及在40℃真空干燥2小时,以制备富集后鞣酸组合物。

[0324] 富集方法4

[0325] 将细没食子粉末(20.0克)置于200.0毫升的溶剂(丙酮、甲乙酮、乙酸乙酯、乙酸甲酯或乙醇)中以形成混合物,并于室温搅拌12小时。将混合物与活性碳(1.6克)混合并于室温搅拌12小时。所得混合物进一步与CaSO₄或MgSO₄(2.5克)混合,并在室温搅拌30分钟,通过Celite床进行过滤,并以溶剂(丙酮、甲乙酮、乙酸乙酯、乙酸甲酯或乙醇)(100毫升,2次)洗涤。接着在真空中浓缩滤液,将所得的残留物溶于丙酮或乙酸乙酯(12.0毫升),且所形成的溶液与CH₂Cl₂(72.0毫升)缓慢搅拌混合。通过过滤收集前述所形成的固体,以及在40℃真空干燥2小时,以制备富集后鞣酸组合物。

[0326] 富集方法5

[0327] 将细没食子粉末(20.0克)置于200.0毫升的溶剂(丙酮、甲乙酮、乙酸乙酯、乙酸甲酯或乙醇)中并在室温搅拌该混合物12小时。将混合物与活性碳(1.6克)混合并于室温搅拌12小时。将混合物进一步与CaSO₄或MgSO₄(2.5克)混合,并在室温搅拌30分钟。该混合物通过Celite床进行过滤,并以溶剂(丙酮、甲乙酮、乙酸乙酯、乙酸甲酯或乙醇)(100毫升,2次)洗涤。将滤液浓缩至约10~15毫升,且将所得溶液逐滴与CH₂Cl₂(60~90毫升)混合。通过过滤收集前述所形成的固体,以及在40℃真空干燥2小时,以制备富集后鞣酸组合物。

[0328] 富集方法6

[0329] 将细没食子粉末(20.0克)置于200.0毫升的溶剂(丙酮、甲乙酮、乙酸乙酯、乙酸甲酯或乙醇)中并在室温搅拌该形成的溶液12小时,之后过滤。收集滤液,将滤液与活性碳(1.6克)混合并于室温搅拌12小时。将混合物进一步与CaSO₄或MgSO₄(2.5克)混合,并在室温搅拌30分钟。将所得混合物通过Celite床进行过滤,并以溶剂(丙酮、甲乙酮、乙酸乙酯、乙

酸甲酯或乙醇) (100毫升, 2次) 洗涤, 且混合的滤液可通过真空蒸发进行浓缩。所形成的粗固体溶于丙酮或乙酸乙酯 (12.0毫升) 中, 所形成的溶液则与 CH_2Cl_2 (72.0毫升) 缓慢搅拌混合。通过过滤收集前述方法形成的固体, 以及在 40°C 真空干燥2小时, 以制备富集后鞣酸组合物。

[0330] 富集方法7

[0331] 将细没食子粉末 (20.0克) 放置于50.0毫升的50%或30%的甲乙酮/己烷中, 并于室温搅拌12小时。过滤所得的混合物且收集固体。接着将固体与200.0毫升的溶剂(丙酮、甲乙酮、乙酸乙酯、乙酸甲酯或乙醇) 混合。所形成的混合物在室温搅拌12小时, 接着过滤并收集滤液。将滤液与活性炭 (1.6克) 混合并于室温搅拌12小时。将所得的混合物进一步与 CaSO_4 或 MgSO_4 (2.5克) 混合, 并在室温搅拌30分钟。该混合物通过Celite床进行过滤, 并以溶剂(丙酮、甲乙酮、乙酸乙酯、乙酸甲酯或乙醇) (100毫升, 2次) 洗涤, 且滤液通过真空蒸发进行浓缩。所获得的残留物溶于丙酮或乙酸乙酯 (12毫升) 中, 且接着将该溶液逐滴与 CH_2Cl_2 (72.0毫升) 搅拌混合。通过过滤收集前述所形成的固体, 以及在 40°C 真空干燥2小时, 以制备富集后鞣酸组合物。

[0332] 富集方法8

[0333] 将细没食子粉末 (20.0克) 放置于50.0毫升的50%或30%的甲乙酮/己烷中, 并于室温搅拌12小时。接着将溶液过滤并将所收集得的固体与200.0毫升的溶剂(丙酮、甲乙酮、乙酸乙酯、乙酸甲酯或乙醇) 混合。混合物在室温搅拌12小时并过滤, 接着收集滤液并与活性炭 (1.6克) 混合, 并在室温搅拌12小时。将所得的混合物进一步与 CaSO_4 或 MgSO_4 (2.5克) 混合, 并在室温搅拌30分钟。该混合物通过Celite床进行过滤, 并以溶剂(丙酮、甲乙酮、乙酸乙酯、乙酸甲酯或乙醇) (100毫升, 2次) 洗涤, 且滤液浓缩成约10至15毫升的体积。将残余溶液与 CH_2Cl_2 (60至90毫升) 缓慢地混合并过滤以收集所形成的固体, 并在 40°C 真空干燥2小时以制备富集后鞣酸组合物。

[0334] 富集方法9

[0335] 将细没食子粉末 (20.0克) 置于200.0毫升的溶剂(丙酮、甲乙酮、乙酸乙酯或乙醇) 中并于 20 至 60°C 搅拌12小时。过滤溶液并将收集的滤液置于200.0毫升的己烷中。接着将因此形成的混合物在室温搅拌12小时, 并将所得的两个有机层分离。所收集的油层(下层) 与40.0毫升的溶剂(丙酮、甲乙酮、乙酸乙酯、乙酸甲酯或乙醇) 混合, 且所形成的溶液与活性炭 (1.6克) 混合并于室温搅拌12小时。将所得的混合物进一步与 CaSO_4 或 MgSO_4 (2.5克) 混合, 并在室温搅拌30分钟。该混合物通过Celite床进行过滤, 并以溶剂(丙酮、甲乙酮、乙酸乙酯、乙酸甲酯或乙醇) (100毫升, 2次) 洗涤, 且滤液在真空下浓缩。将所获得的残留物溶于丙酮或乙酸乙酯 (12毫升) 中, 且接着将该溶液逐滴与 CH_2Cl_2 (72.0毫升) 搅拌混合。通过过滤收集前述所形成的固体, 以及在 40 至 45°C 真空干燥2小时, 以制备富集后鞣酸组合物。

[0336] 富集方法10

[0337] 来自市售或从没食子粉末或小碎片萃取的粗萃取物的固体鞣酸 (100克) 溶于250毫升的水, 在室温搅拌该溶液直到该固体完全溶解, 接着于该溶液中添加 K_2CO_3 (3.0克溶于50毫升的水)。接着将该混合物用600毫升的溶剂(包含乙酸乙酯、乙酸甲酯, 或甲乙酮) 在室温萃取1小时, 并将有机层分离。接着在有机层中加入20克的 MgSO_4 , 并于室温搅拌0.5小时。该混合物通过20克的Celite床进行过滤, 并以溶剂(乙酸乙酯、乙酸甲酯或甲乙酮, 100毫

升)洗涤,并在真空下浓缩该滤液。将所得残留物以溶剂(包含丙酮、乙酸乙酯、乙酸甲酯或甲乙酮,110毫升)稀释,接着将所得溶液与660毫升的另一溶剂于室温混合,并搅拌直到加入完成。在室温搅拌该混合物12至18小时。过滤以收集所形成的固体并于45°C的温度真空干燥12小时。以高效液相色谱法质谱仪(HPLC-MS)(图26)及核磁共振仪(¹H-NMR)分析所得的鞣酸组合物。图26示出了通过富集方法#10制备鞣酸组合物的HPLC-MS色谱图的结果,其呈现该鞣酸组合物含有少于0.35%的非鞣酸杂质,与此相比,USP标准品及温州瓯海精细化工有限公司(Wenzhou Ouhai Fine Chemicals)所提供的鞣酸组合物分别含有15.99%及6.46%的非鞣酸杂质,含量高许多。以富集方法#10制备的鞣酸组合物的¹H-NMR图谱仅呈现没食子酰基及葡萄糖部分的峰,然而USP标准品及温州瓯海精细化工有限公司所提供的鞣酸组合物的图谱却还呈现没食子酰基及葡萄糖部分以外的数个峰。表8则列出以富集方法#10制备的鞣酸组合物、USP标准品以及温州瓯海精细化工有限公司的鞣酸组合物的HPLC-MS分析结果。表9则列出以富集方法#10制备的鞣酸组合物、USP标准品以及温州瓯海精细化工有限公司的鞣酸组合物的¹H-NMR分析结果。因此证明了相较于USP标准品与温州瓯海精细化工有限公司的鞣酸,经本发明的富集方法#10制成的鞣酸组合物有较高的纯度。

[0338] 表8:以富集方法#10制备的鞣酸组合物、UPS标准品以及温州瓯海精细化工有限公司的鞣酸组合物的HPLC-MS分析结果

不同的鞣酸来源	杂质			
	保留时间 (分钟)	LC-MS (负), 基峰 m/z	HPLC (UV 280), 面积% (>0.10%)	总面积 (%)
富集方法#10 (纯度: >99.65%)	0 - 9.5	ND	ND	<0.35

[0339]

[0340]

USP 标准品 (纯度: 84.01 %)	2.74	191	0.15	15.99
	4.30	343	2.27	
	5.05	343	2.05	
	5.36	687	0.25	
	5.62	343	0.12	
	6.10	325	0.12	
	6.56	325	0.14	
	6.84	495	0.26	
	7.52	495	1.10	
	7.69	991	1.89	
	7.78	991	1.66	
	7.93	495	0.57	
	8.26	643	1.29	
	8.34	643	0.73	
	8.50	643	0.17	
	8.77	477	0.49	
9.00	647	2.73		
温州瓯海精细化工有 限公司 (纯度: 93.54%)	2.74	347	0.96	6.46
	4.01	337	0.18	
	4.34	339	1.14	
	5.07	339	1.37	
	7.74	643	0.43	
	7.97	643	0.28	
	8.37	643	2.10	

[0341] 表9:以富集方法#10制备的鞣酸组合物、USP标准品与温州瓯海精细化工有限公司的鞣酸组合物的¹H-NMR (400MHz, 丙酮-d₆/D₂O (9:1, v/v)) 分析结果

[0342]

不同的鞣酸来源	富集方法 10	USP 标准品	温州瓯海精细化工有 限公司
取代基	δ_{H} (H, mult)		
葡萄糖	4.31-4.32 (1H, m)	4.31-4.33 (1H, m)	4.31-4.33 (1H, m)

	4.57 (2H, m)	4.55-4.56 (2H, m)	4.58 (2H, m)
	5.60-5.72 (2H, m)	5.64-5.70 (2H, m)	5.64-5.70 (2H, m)
	5.98-6.04 (1H, m)	5.98-6.12 (1H, m)	6.02-6.07 (1H, m)
	6.26-6.31 (1H, m)	6.27-6.31 (1H, m)	6.30-6.36 (1H, m)
没食子酰基	6.97-7.60 (15H, m)	6.98-7.60 (10H, m)	6.98-7.50 (15H, m)
[0343] 杂质	N/A	1.95	2.20
		2.22-2.38	2.62-2.68
		2.51-2.55	3.71
		4.05-4.10	4.38
		4.15-4.19	6.73
		4.44	
		4.64-4.69	
		5.22-5.29	
		5.42-5.56	
		5.72-5.78	
		6.98-7.60	

[0344] 浆化方法

[0345] 于35至60℃的温度,以2000毫升的溶剂(包含庚烷、CH₂Cl₂或庚烷/CH₂Cl₂(1:9至9:1))浆化从前述任何富集方法获得的固体8至16小时,接着过滤所形成的固体,并于60至70℃的温度真空蒸发8小时。接着于35至60℃的温度,以2000毫升的溶剂(包含庚烷、CH₂Cl₂或庚烷/CH₂Cl₂(1:9至9:1))浆化该固体8至16小时,接着,过滤该固体,并于60至70℃的温度真空蒸发8小时。最后于35至60℃的温度,以2000毫升的溶剂(包含庚烷,CH₂Cl₂或庚烷/CH₂Cl₂(1:9至9:1))再次浆化前述固体8至16小时,接着过滤该固体,并于60至70℃的温度真空蒸发8小时以获得鞣酸固体(产率:80%)。

[0346] 富集方法11-没食子的萃取

[0347] 可将没食子完全磨碎成细粉末,或者先大致磨成小碎片。将没食子粉末或小碎片(10.0克)放置于60至100毫升溶剂(包含乙酸乙酯、乙酸甲酯、甲乙酮、乙醇或水)中,于35至60℃的温度搅拌3小时,接着将第二批的没食子粉末或小碎片(10.0克)加入该溶液中,持续在35至60℃的温度搅拌3小时。将第三批的没食子粉末或小碎片(10.0克)加置该溶液中,并于35至60℃的温度搅拌8至14小时。结束搅拌后,过滤该溶液并收集滤液于真空下浓缩,以制备粗制鞣酸固体(产率:54至60%)。

[0348] 结果发现,这种多批次方法会显著地增进粗制鞣酸萃取物的产率。请参考下列表10所呈现的比较结果。

[0349] 表10:不同萃取方法的比较

[0350]	单一批次方法	多批次方法
--------	--------	-------

没食子总量	30克粉末	30克粉末/每批次10克
总时间	9小时	9小时/每批次3小时
溶剂(乙酸乙酯)	100毫升	100毫升
温度	45℃	45℃
产率	19%	37%

[0351] 结果也发现,不论使用细没食子粉末或没食子碎片,所获得的鞣酸萃取效率是相似的(如表11所列)。

[0352] 表11:没食子粉末及没食子粗碎片的萃取条件

没食子	粉末	碎片
粒径	≤420 微米	0.4 至 0.7 厘米
萃取方法	每次以 10 克的没食子粉末进行 3 小时萃取, 进行 3 次	每次以 10 克的没食子碎片进行 3 小时萃取, 进行 3 次
没食子总量	30 克	30 克
萃取溶剂(乙酸乙酯)	60 毫升	100 毫升
温度	45℃	45℃
总时间	14 小时	14 小时
产率	54 %	52 %

[0353] 富集方法11-再富集鞣酸

[0355] 将前述制得的粗制鞣酸固体(80克)溶于700毫升的水中,于室温搅拌直到固体完全溶解,接着加入K₂CO₃(2.4克溶于100毫升的水)至该溶液中。接着将前述混合物以1600毫升的溶剂(包含乙酸乙酯、乙酸甲酯,或甲乙酮)在室温萃取1小时,使有机层分离。接着在有机层中加入16克MgSO₄,并于室温再搅拌0.5小时。该混合物通过16克的Celite床进行过滤,并以溶剂(包含乙酸乙酯、乙酸甲酯或甲乙酮,80毫升)洗涤,并在真空下浓缩该滤液。以溶剂(包含丙酮、乙酸乙酯、乙酸甲酯或甲乙酮,240毫升)稀释前述残留物,接着于该溶液中加入己烷(720毫升),并于室温搅拌2小时,然后分离有机层。以溶剂(包含丙酮、乙酸乙酯、乙酸甲酯或甲乙酮,240毫升)稀释所得的油性残留物(oily residue),接着于该溶液中加入720毫升的己烷,并于室温搅拌2小时,然后将有机层分离。所得的油性残留物以溶剂(包含丙酮、乙酸乙酯、乙酸甲酯或甲乙酮,100毫升)稀释,接着与660毫升的另一溶剂于室温混合,并搅拌直到完全加入。在室温再搅拌该混合物12至18小时。过滤收集所形成的固体并于45℃的温度真空干燥6小时。于35至60℃的温度,以1600毫升的溶剂(包含庚烷、CH₂Cl₂或庚烷/CH₂Cl₂(1:9至9:1))浆化该固体16小时,接着过滤该固体,并于60至70℃的温度真空蒸发8小时。然后于35至60℃的温度,以1600毫升的溶剂(包含庚烷、CH₂Cl₂或庚烷/CH₂Cl₂(1:9至9:1))浆化该固体8至16小时,接着过滤该固体,并于60至70℃真空蒸发8小时。最后于35至60℃的温度,以1600毫升的溶剂(包含庚烷,CH₂Cl₂或庚烷/CH₂Cl₂(1:9至9:1))再次浆化前述固体8至16小时,然后过滤该固体,并于60至70℃的温度真空蒸发8小时以获得期望的鞣酸(产率:62%)。

[0356] 下表12显示以HPLC测定本文所述的富集方法11制备的鞣酸组合物中的鞣酸含量。

以此方法制备的鞣酸组合物实质上不含小鞣酸(例如具有少于4个没食子酰基部分的鞣酸),且具有相当一部分的大鞣酸(例如具有多于8个没食子酰基部分的鞣酸)。如本文所述,可预期这种鞣酸组合物具有较优异的治疗功效。

[0357] 表12:以富集方法11制备的鞣酸组合物中的鞣酸含量

	保留时间(分钟)	面积	面积(%)
[0358] 1G	2.09	66461	0.05
2-3G	9.95	158862	0.11
4G	12.13	2295939	1.58
5G	15.68	21937982	15.06
6-7G	25.75	32048656	21.99
[0359] 8-12G	28.28	89210765	61.22
总量		145718665	100

[0360] 图27示出了前述制备方法的示意图。

[0361] 结果

[0362] 抑制DAAO活性的功效:

[0363] 表13及表14总结了从不同植物或植物学来源的没食子萃取且以不同方式富集的鞣酸抑制DAAO活性的功效。

[0364] 表13:从不同植物或植物学来源的没食子所萃取的富集后鞣酸的抑制活性-1

植物或植物学来源	没食子栎	没食子栎	盐肤木	盐肤木	盐肤木	盐肤木	盐肤木	盐肤木
[0365] 没食子直径	3-4 厘米	3-4 厘米	4-5 厘米	4-5 厘米	4-5 厘米	4-5 厘米	4-5 厘米	4-5 厘米
萃取溶剂	MEK	MEK	MEK	MEK	MEK	MEK	MEK	EtOH
萃取温度	室温(RT)	室温(RT)	室温(RT)	室温(RT)	室温(RT)	室温(RT)	室温(RT)	室温(RT)
富集方法	无	1	无	1	2	3	7	1
IC ₅₀ (μg/ml)	0.679	0.626	0.428	0.373	0.338	0.319	0.389	0.384

[0366] 如表13所示,相较于未经富集(仅直接萃取、没有除去具1至5个没食子酰基部分的鞣酸、不经与活性碳及CaSO₄或MgSO₄处理,和/或不用第二溶剂以及二氯甲烷处理)的鞣酸而言,以本文描述的任一制备方法所获得的富集后鞣酸均具有较低的IC₅₀值(代表其具有较强的抑制活性)。此外,与前述富集方法1及7所提供的富集后鞣酸相比,前述富集方法2及3所提供的富集后鞣酸具有最低IC₅₀的抗DAAO的活性,且富集方法3所提供的富集后鞣酸的IC₅₀

值又比富集方法2提供的富集后鞣酸要更低。如本文所示,比起在富集方法1后以MEK萃取的鞣酸而言,在相同富集方法后以EtOH萃取的鞣酸抑制DAAO的能力稍微较弱。

[0367] 表14:从不同植物或植物学来源的没食子所萃取的富集后鞣酸的抑制活性-2

[0368]	植物来源	盐肤木	盐肤木	盐肤木	盐肤木
	没食子直径	4-5 厘米	4-5 厘米	4-5 厘米	4-5 厘米

[0369]	萃取溶剂	MEK	MEK	MEK	EtOAc
	萃取温度	室温(RT)	40°C	40°C	40°C
	富集方法	无	无	3	3
	IC ₅₀ (µg/ml)	0.428	0.449	0.361	0.337

[0370] 如表14所列,比起分别在室温以MEK萃取、在40°C以MEK萃取,以及在富集方法3后在40°C的温度以MEK萃取所得的富集后鞣酸,在富集方法3后在40°C的萃取温度以乙酸乙酯(EtOAc)所萃取的富集后鞣酸具有显著较低的抗DAAO的IC₅₀值。此外,如表13及表14所示,盐肤木(*Rhus chinensis*)的直径不超过6厘米的没食子的IC₅₀值低于直径超过6厘米的没食子的IC₅₀值。

[0371] 表15:不同鞣酸的抑制活性

[0372]	鞣酸	通过富集方法 10 制得的鞣酸	Merck	Sigma	温州瓯海精细化工有限公司
	分级		USP 标准品	ACS	医疗级
	DAAO (IC ₅₀ , µM)	0.227	0.534	0.291	0.257
	1-4G (%)	1.76	25.08	8.75	11.84
	4-12G (%)	99.65	91.46	92.94	91.69
	5-12G (%)	98.24	74.92	91.26	88.16
	6-12G (%)	92.48	51.13	88.35	82.50
	8-12G (%)	61.51	24.99	68.46	51.57

[0373] 如表15所列,经富集方法10所得的鞣酸的组成具有最少量的1至4G以及最高量的5至12G,而呈现最低的DAAO IC₅₀值。

[0374] 残留溶剂(residual solvent):

[0375] 表16列出以¹H-NMR测定残留溶剂的结果。

[0376] 表16:来自进一步浆化方法的残留溶剂

[0377]	残留溶剂	方法			
		不浆化	第一次浆化	第二次浆化	第三次浆化
	丙酮	4.7 %	1.1 %	0.7 %	0.4 %
	二氯甲烷	2.5 %	0.3 %	0.0 %	0.0 %

[0378] 如表所列,在三次浆化之后残留溶剂(也就是丙酮及二氯甲烷)可进一步减少。

[0379] 实施例9:经富集方法#10精制后的鞣酸对MK-801处理小鼠的防护及保护效果

[0380] 本实验目的是通过使用已知的NMDA受体拮抗剂MK-801来评估经富集方法#10精制后的鞣酸在治疗CNS病症的功效。在行为测试(也即,开放场及前脉冲抑制)之前,分别以口服管饲法(p.o.)以及腹腔内(i.p.)注射的方式对小鼠施用鞣酸及MK-801。

[0381] 材料与amp;方法

[0382] 动物以及饲养条件

[0383] 将C57BL/6J雄性小鼠分群圈养(每笼3-5只小鼠)于动物房内由聚砜制成的通风鼠笼(Alternative Design,AR,美国)中,使其可任意取用食物与水。群体维持在12/12小时的光/暗循环,且室内温度维持在 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$,而所有的行为实验均在暗循环期间进行。本实验使用的动物均为成鼠(至少2.5个月大)。

[0384] 进行运动测试的给药

[0385] 将小鼠随机地分成五组:

[0386] 第1组:ddH₂O+盐水(对照组);

[0387] 第2组:ddH₂O+MK-801;

[0388] 第3组:Merck鞣酸(每千克50毫克)+MK-801;

[0389] 第4组:CCBiotech鞣酸(每千克50毫克)+MK-801;以及

[0390] 第5组:以富集方法#10精制后鞣酸(每千克50毫克)+MK-801。

[0391] 在运动活性测试前20分钟,通过腹腔内注射对第2组至第5组的每一只小鼠急性施用溶于普通盐水的MK-801(剂量为:每千克0.2毫克,购自Sigma-Aldrich,美国)。在施用MK-801之前20分钟,第3组至第6组的每只小鼠则是急性口服给予溶于ddH₂O的鞣酸(剂量:每千克50毫克)。在本实验中分别使用从供货商Merck Millipore(Merck鞣酸)及从供货商五峰赤诚生物科技股份有限公司(Wufeng Chicheng Biotech,CCBiotech鞣酸)购买的鞣酸,以及以本发明富集方法10制得的鞣酸(剂量:每千克50毫克)。

[0392] 进行前脉冲抑制测试的给药

[0393] 将小鼠随机地分成四组:

[0394] 第1组:ddH₂O+盐水(对照组);

[0395] 第2组:ddH₂O+MK-801;

[0396] 第3组:以富集方法#10精制后鞣酸(每千克50毫克)+MK-801;以及

[0397] 第4组:以富集方法#10精制后鞣酸(每千克200毫克)+MK-801。

[0398] 在前脉冲抑制测试前20分钟,通过腹腔内注射对第2组至第4组的每一只小鼠急性施用溶于普通盐水的MK-801(剂量为:每千克0.3毫克,购自Sigma-Aldrich,美国)。在施用MK-801之前20分钟,通过p.o.口服方式对第3组至第4组的每只小鼠急性施用溶于ddH₂O的以富集方法#10精制后鞣酸(剂量:每千克50毫克或每千克200毫克)。

[0399] 结果

[0400] 富集方法#10精制后的鞣酸对MK-801处理小鼠的运动活动力的影响

[0401] 开放场任务是用于检测小鼠及大鼠对于新奇诱导的探索行为与综合活动的常用试验方法。本实验是将小鼠放置**PLEXIGLAS**[®]鼠笼(尺寸:37.5厘米×21.5厘米×18厘米)中,并放置于光强度50-65流明(lux)照明下。使用SMART影像追踪系统(Panlab,Harvard Apparatus)测试小鼠的自发运动活动力30分钟。测量每只小鼠的移动距离做为运动活动力的指标。

[0402] 本实验目的在于评估不同来源的鞣酸对运动活动力的影响。相比于对照组(第1组),MK-801组(第2组)展现高度运动活动力(hyper-locomotion activity)。相比于MK-801组(第2组),从供货商五峰赤诚生物科技(CCBiotech鞣酸;第4组)购得的鞣酸与经富集方法10精制的鞣酸(富集鞣酸10;第5组)均显著地展现较低的运动活动力,然而从供货商Merck Millipore(Merck鞣酸;第3组)购得的鞣酸则非如此。此外,富集#10(第5组)展现出比第4组(CCBiotech鞣酸)还要低的运动活动力,如图24所示。

[0403] 富集方法10精制后的鞣酸对MK-801处理小鼠的前脉冲抑制的影响

[0404] 通过SR-LAB惊吓测试装置(San Diego Instruments, San Diego, CA, 美国)检测作为感觉运动门控指标的前脉冲抑制。在音量为65dB(分贝)的背景噪音之下,每一节实验(session)的组成是先有5分钟的累计期间(accumulation period),紧接着在四个区段(block)进行64次试验(trial)。单脉冲(PA)试验是40ms、120dB的白噪音爆发(white noise burst)。在前脉冲(pp)+脉冲试验中,71dB(pp6)、75dB(pp10)及83dB(pp18)的20ms白噪音刺激100ms后,给予40ms的120dB脉冲。无刺激(NS)试验则是仅存有背景噪音。初始及最后区段是分别由六个PA试验组成。中间两个区段是由PA、pp+脉冲以及NS试验所组成。这些试验是以伪随机方式(pseudo-randomly)进行,且各试验之间的间隔平均为15秒(从10秒至20秒不等)。前脉冲抑制的百分比是以下列公式计算: $\%PPI = 100 \times [(PA \text{ 分数}) - (pp\text{-}P \text{ 分数})] / (PA \text{ 分数})$,其中PA分数是中间区段的平均PA值。

[0405] 相较于对照组,MK-801(每千克0.3毫克)在所有前脉冲强度下都会诱发强烈的前脉冲抑制缺损。在71dB的前脉冲强度下,鞣酸(每千克50与200毫克)无法防护/保护被MK-801诱导的前脉冲抑制缺损。至于在75dB及83dB的前脉冲强度下,相比于MK-801组,鞣酸(每千克50毫克)组以及鞣酸(每千克200毫克)组则可显著地防护/保护MK-801诱导的前脉冲抑制缺损。以经富集方法#10精制后的鞣酸(每千克50毫克及每千克200毫克)处理的小鼠具有相似的结果,如图25所示。该结果表明,经富集方法#10精制后的鞣酸在相对低剂量(每千克50毫克)时有上限效果(ceiling effect)。

[0406] 实施例10:不同来源的鞣酸的急性毒性研究

[0407] 本实验目的在于,通过管饲法(p.o.)施用从供货商Sigma取得的鞣酸(Sigma鞣酸)及经富集方法10精制后的鞣酸(富集#10)的单一剂量后,经7天观察期之后,评估这些鞣酸的副作用及测定最大耐受剂量(maximum tolerated dose,MTD)。

[0408] 材料与amp;方法

[0409] 动物以及饲养条件

[0410] 将C57BL/6J雄性小鼠分群圈养(每笼3-5只小鼠)于动物房内由聚砜制成的通风鼠笼(Alternative Design,AR,美国)中,使其可任意取用食物与水。群体维持在12/12小时的光/暗循环,且室内温度维持在 $22 \pm 2^\circ\text{C}$,而所有的行为实验均在暗循环期间进行。本实验使用的动物均为成鼠(至少2.5个月大)。

[0411] 药物施用

[0412] 鞣酸为从供货商Sigma取得的鞣酸(Sigma鞣酸)或以本发明富集方法10精制后的鞣酸(富集#10)。针对Sigma鞣酸,先将成鼠随机地分成四组:(1)对照组;(2)鞣酸(每千克500毫克);(3)鞣酸(每千克750毫克);以及(4)鞣酸(每千克1000毫克),且这些组别分别以载体对照物(ddH₂O)、剂量为每千克500毫克的鞣酸、剂量为每千克750毫克的鞣酸以及剂量

为每千克1000毫克的鞣酸处理。针对富集#10鞣酸,先将成鼠随机地分成五组:(1)对照组;(2)鞣酸(每千克200毫克);(3)鞣酸(每千克500毫克);(4)鞣酸(每千克1000毫克);以及(5)鞣酸(每千克2000毫克),这些组别分别以载体对照物(ddH₂O)、剂量为每千克200毫克的鞣酸、剂量为每千克500毫克的鞣酸、剂量为每千克1000毫克的鞣酸以及剂量为每千克2000毫克的鞣酸处理。通过管饲法(p.o)对所有小鼠施用载体对照物或鞣酸。在实验期间,以一天两次(早,晚)的频率或根据需要而频繁观察动物死亡、发病、呼吸、排泄、粪便以及摄取食物与水的能力的迹象。进行本实验的整个过程中,每日纪录每只小鼠的体重,该体重做为其生理发育及代谢的指标。

[0413] 结果

[0414] 在Sigma鞣酸组别的实验中,接受剂量为每千克1000毫克的Sigma鞣酸处理的所有小鼠在给药35分钟之后呈现活性低落、胸骨躺卧式休息(sternal recumbency)以及呼吸频率改变,且第2天呈现濒死状态(moribund)。症状在研究过程中是不可逆的。在给药之后35分钟内,接受剂量每千克500毫克或750毫克的剂量的小鼠有三分之一展现胸骨躺卧式休息姿势。接受每千克500毫克或750毫克的剂量的所有小鼠在本实验中均存活。Sigma鞣酸组的最大耐受剂量为每千克750毫克。在富集#10鞣酸的实验中,所有接受每千克2000毫克的剂量的小鼠在接受鞣酸之后随即发生活力降低、弓背(arching back)以及呼吸困难的现象,且在10分钟内恢复。所有组别均未观察到副作用,且以肉眼进行尸检观察(gross autopsy)没有重大发现。富集#10鞣酸的最大耐受剂量为至少每千克2000毫克。总结来说,富集#10鞣酸相较于Sigma鞣酸具有显著较高的最大耐受剂量,可更安全地用于CNS病症及肥胖病症的治疗。

[0415] 其它实施方案

[0416] 本说明书所公开的所有特征可以以任何组合方式进行组合。本说明书披露的每一个特征可以被出自于相同、等同或相似目的可替换特征取代。因此,除非另有说明,本发明所公开的各个特征只是一系列等同或相似特征中的一个实例。

[0417] 本领域技术人员可从以上叙述轻易地确定本文所述的必要技术特征,在不偏离本发明精神和范围的基础上,可以对本公开做出各种改变及修正以及使其适应多种用途和情况,因此,其它实施方式也包含于权利要求中。

[0418] 等同方案

[0419] 虽然本文已经描述和图示了若干发明实施方式,但是本领域技术人员可容易预想到用于执行本文所描述的功能和/或获得本文所描述的结果和/或一个或多个优点的各种手段和/或结构,且每一个这样的变化和/或修正仍被视为在本公开描述的发明实施方式的范围内。更普遍地情况是,本领域技术人员将容易理解本文描述的所有参数、尺寸、材料以及配置旨在示例性地说明,而实际的参数、尺寸、材料和/或配置将取决于发明教导中所使用的具体应用。本领域技术人员将会认识到本公开描述的具体实施例的许多同等方案,或者能够仅使用例行常规的实验就可确定。因此,要理解的是,前述实施方式仅通过示例的方式呈现,并且在附录的权利要求及其同等方案的范围内,也可用除了如具体描述和要求保护之外的其它方式来实践本发明的实施方式。本文所述的发明实施方式涉及本文所描述的每个独特特征、系统、制品、材料、试剂盒和/或方法。此外,如果这样的特征、系统、制品、材料、试剂盒和/或方法不相互矛盾的话,任意两个或更多这样的特征、系统、制品、材料、试剂

盒和/或方法的组合都包括在本公开中的发明范围内。

[0420] 本公开界定及使用的所有定义应当被理解是优先于(control over)字典定义、通过引用并入本文的文件中的定义,和/或有定义的字词的普通涵义。

[0421] 通过引用,将本文披露的所有参考文献、专利案以及专利申请案中每个被引用的目标在此纳入本文,在一些情况下可以包含该文件的全文。

[0422] 除非意思明显相反,否则本文在说明书及权利要求中使用的不定冠词“一”(“a”及“an”)应当理解成意指“至少一”(at least one)。

[0423] 如本文在说明书中和权利要求中使用的词语“和/或”(and/or)应当理解成意指被链接的组件中的“任一个或两者均”(either or both),也即,在一些情况下结合存在并且在其它情况下分开存在的组件。通过“和/或”(and/or)列出的多个组件应当以相同方式来解读,也即,被链接的组件中的“一个或多个”(one or more)。除了通过“和/或”子句具体界定的组件之外,其它组件无论与具体界定的那些组件相关或无关,均可可选地存在。由此,作为非限制性实施例,当与诸如“包含、包括”(comprising)之类的开放式语言结合使用时,对“A和/或B”(A and/or B)的引用可以在一个实施方式中仅指A(可选地包含除了B之外的组件);在另一实施方式中是仅指B(可选地包含除了A之外的组件);在又一实施方式中是指A和B二者(可选地包括其它组件)等。

[0424] 如本文在说明书中和权利要求中所使用的“或”(or)应当理解成具有与以上“和/或”的定义相同的含义。例如,当在列表中罗列项目时,“或”或者“和/或”应当解释为包括性的,也即,包括至少一个,但是也包括数个组件或组件列表中一个以上的,以及可选地,另外未列出的项目。除非有明显指示相反的词语,否则例如“唯一”(only one of)或“就那一”(exactly one of),或在权利要求中使用时的“由……组成”(consisting of),将是指包括数个组件或组件列表中的就那一个组件。一般而言,当前面有诸如“任一个”(either)、“的一”(one of)、“唯一”,或“就那一”之类的排他性词语时,本文使用的词语“或”应当仅被解释为指示排他性的可替换方案(也即:“一个或另一个但非二者”(one or the other but not both))。当在权利要求中使用时,“基本上由……构成”(consisting essentially of)应当具有如其在专利法领域中使用的普通含义。

[0425] 如本文在说明书中和权利要求中使用的,参考一个或多个组件的列表的词语“至少一”应当理解成意旨从组件列表中的任何一个或多个组件选择的至少一个组件,但是不一定包括在组件列表内具体列出的每一个组件中的至少一个,并且不排除组件列表中的组件之间的任何组合。该定义还允许可以可选地存在除了词语“至少一个”所指的组件列表内具体界定的组件之外的组件,无论该组件与具体界定的那些组件相关还是无关。因此,作为非限制性的实施例,“A和B中的至少一”(at least one of A and B)(或等同“A或B中的至少一”(at least one of A or B),或等同“A和/或B中的至少一”(at least one of A and/or B))在一个实施例中可以是指至少一个,可选地包括多于一个A,且没有B存在(并且可选地包括除了B之外的组件);在另一实施例中是指至少一个,可选地包括多于一个B,且没有A(并且可选地包括除了A之外的组件);在又一实施例中是指至少一个,可选地包括多于一个A,以及至少一个,可选地包括多于一个B(并且可选地包括其它组件)等。

[0426] 应当理解的是,除非明显相反地指明,否则在包括多于一个步骤或动作的本文所述的权利要求保护的任何方法中,方法的步骤或动作的次序不必限于以其叙述该方法的步

骤或动作的顺序。

$IC_{50} = 5.47 \text{ uM}$, $R^2 = 0.9866$
反应10分钟

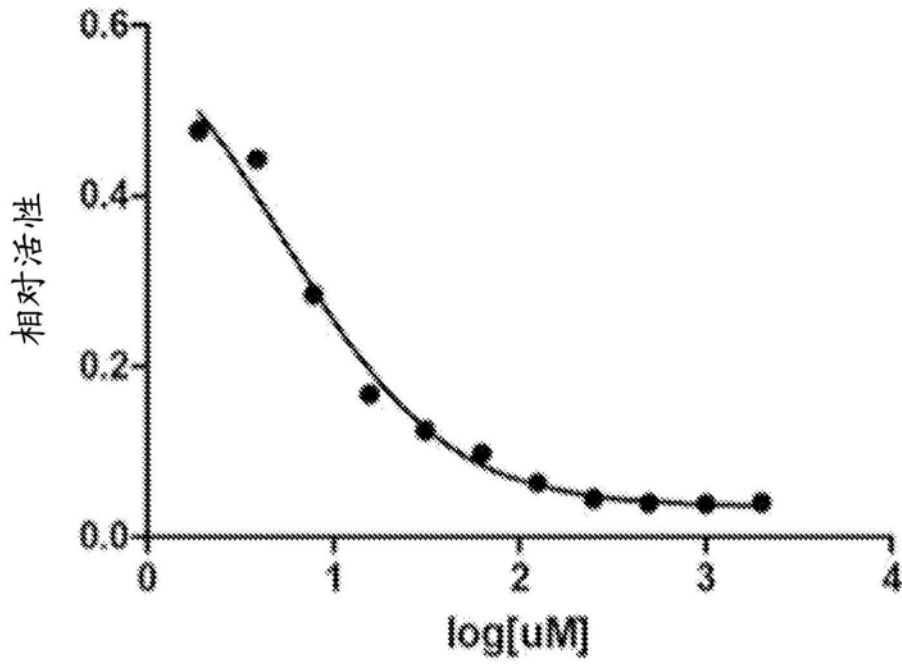


图1

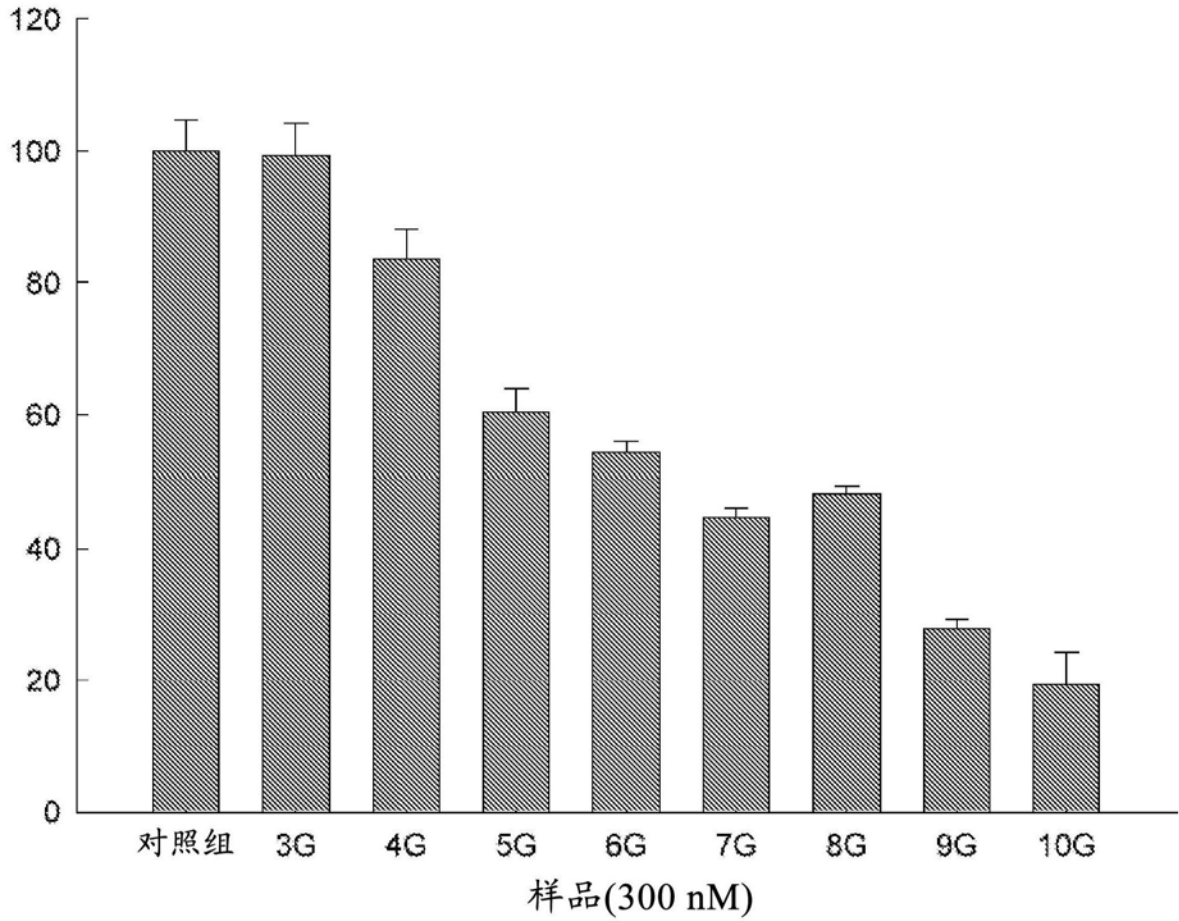
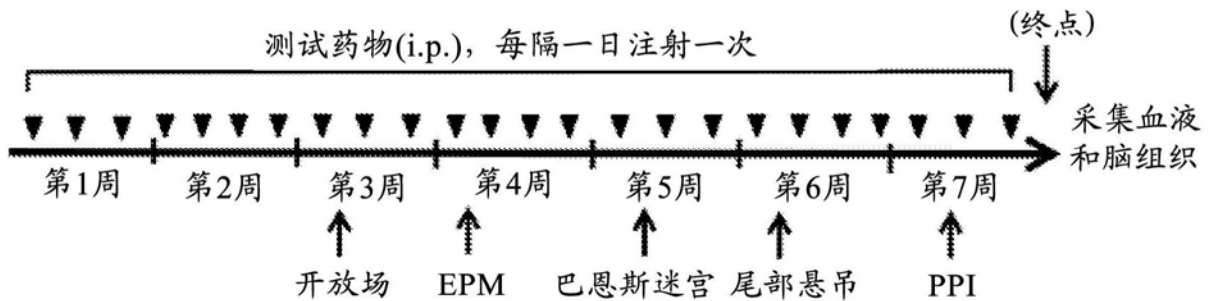


图2

实验设计

- 1.对照组
- 2.鞣酸_10 mg/kg
- 3.鞣酸_30 mg/kg

C57BL/6 ♂



运动活动力 类焦虑行为 空间记忆 类忧郁行为 感觉运动门控

图3

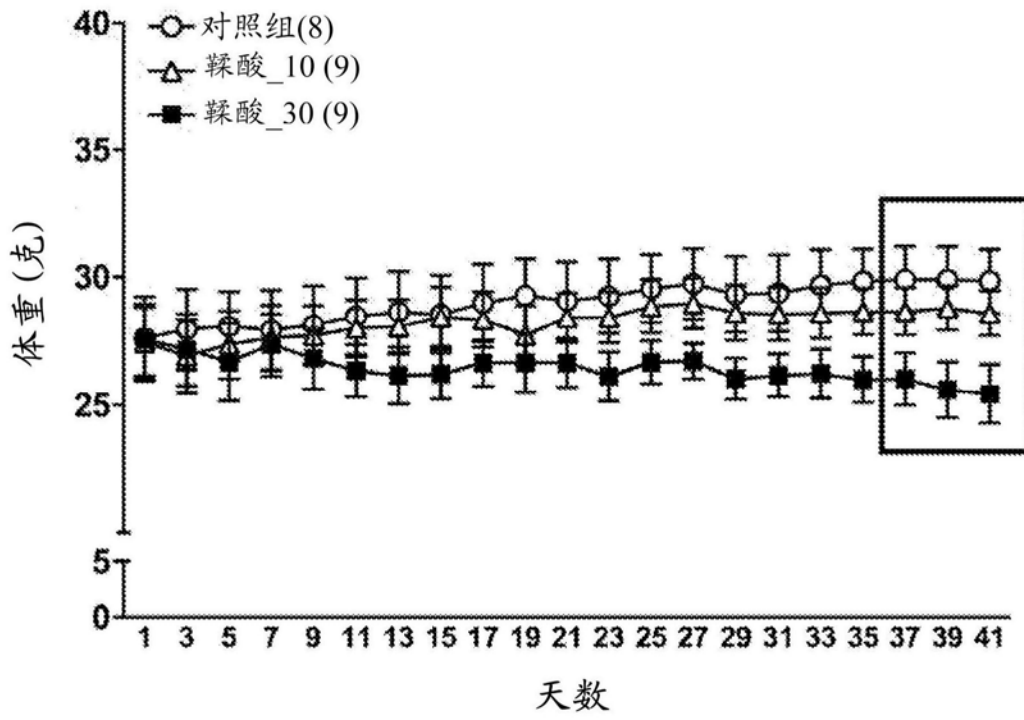


图4

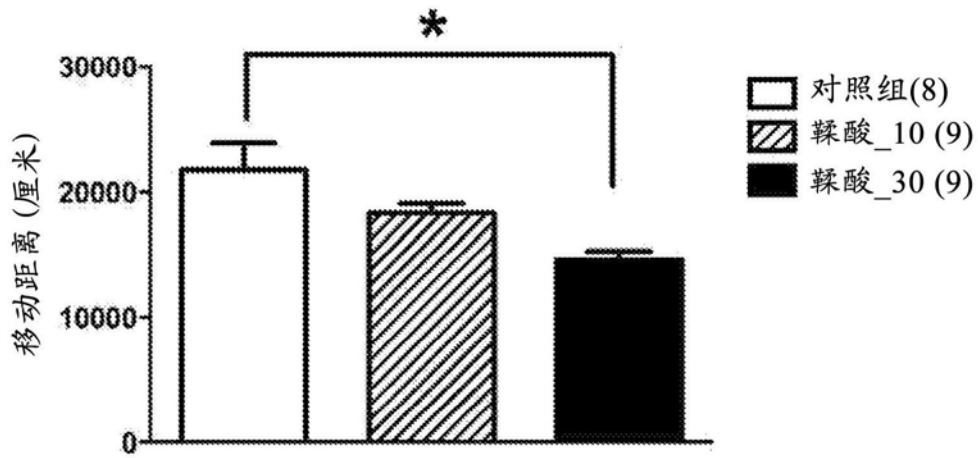


图5

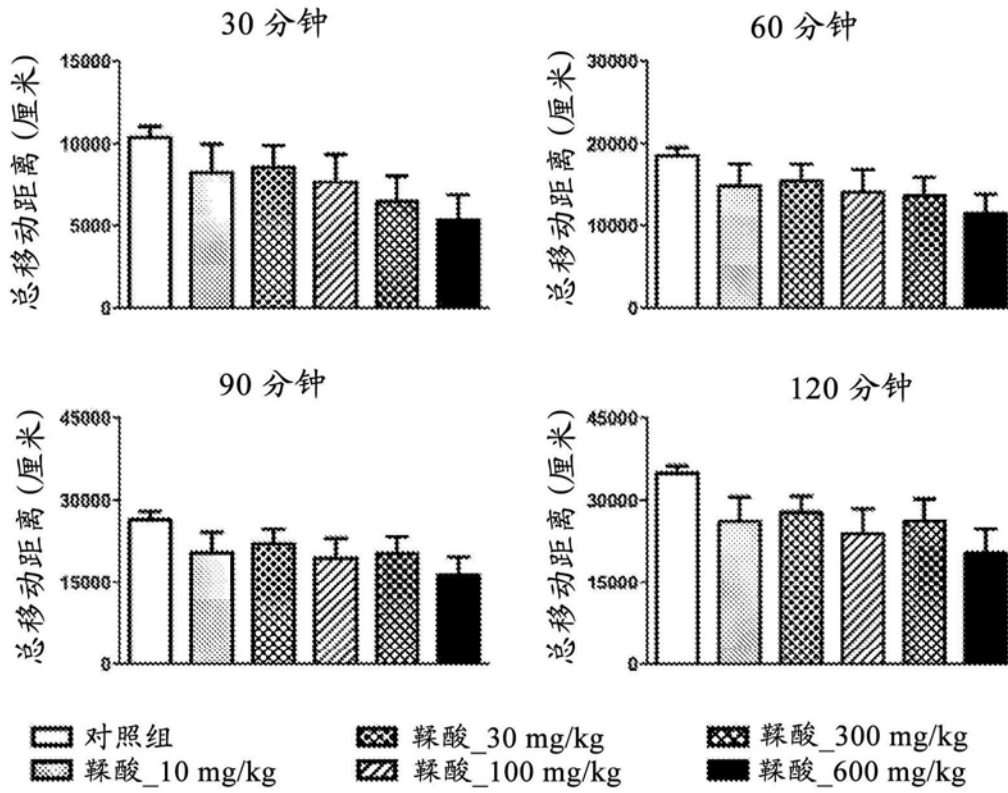


图6

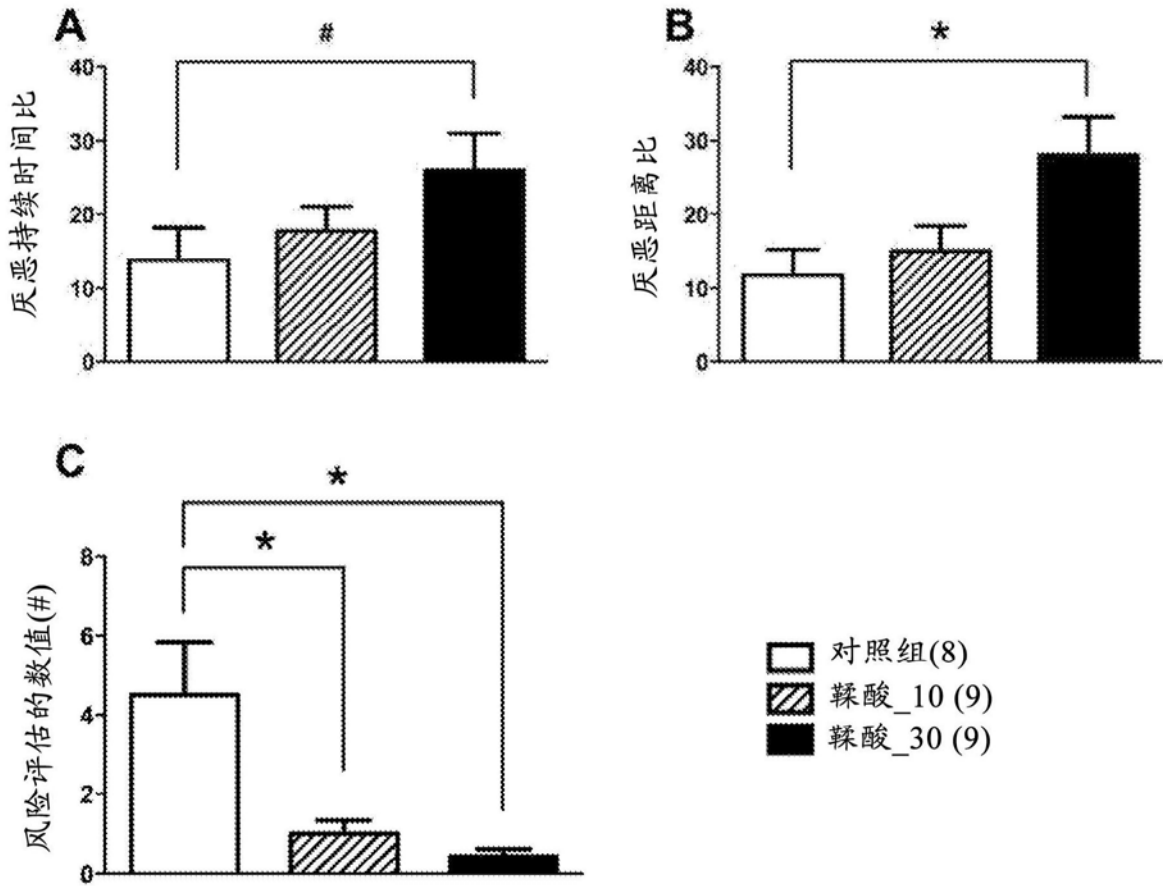


图7

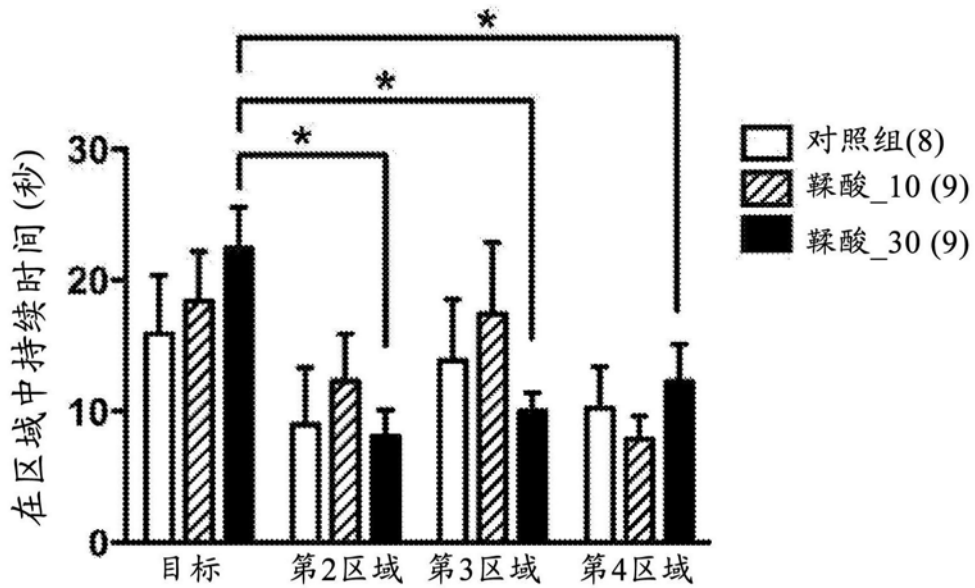


图8

实验设计

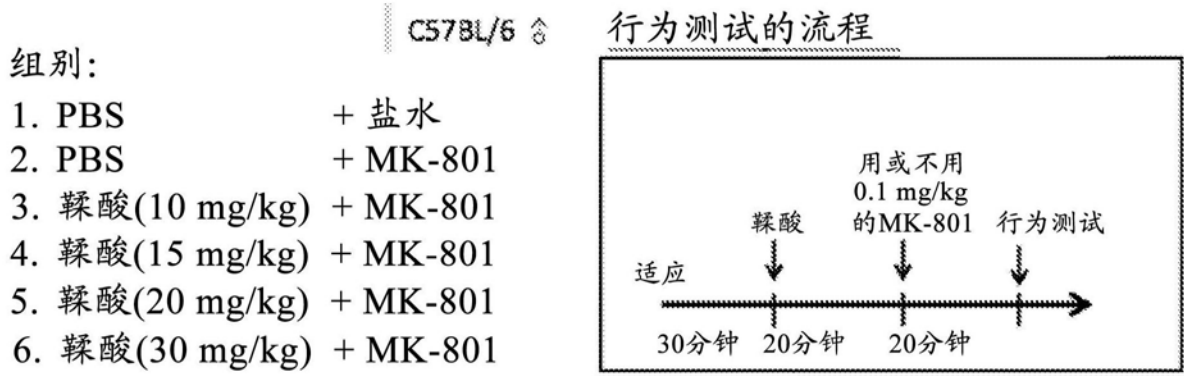


图9

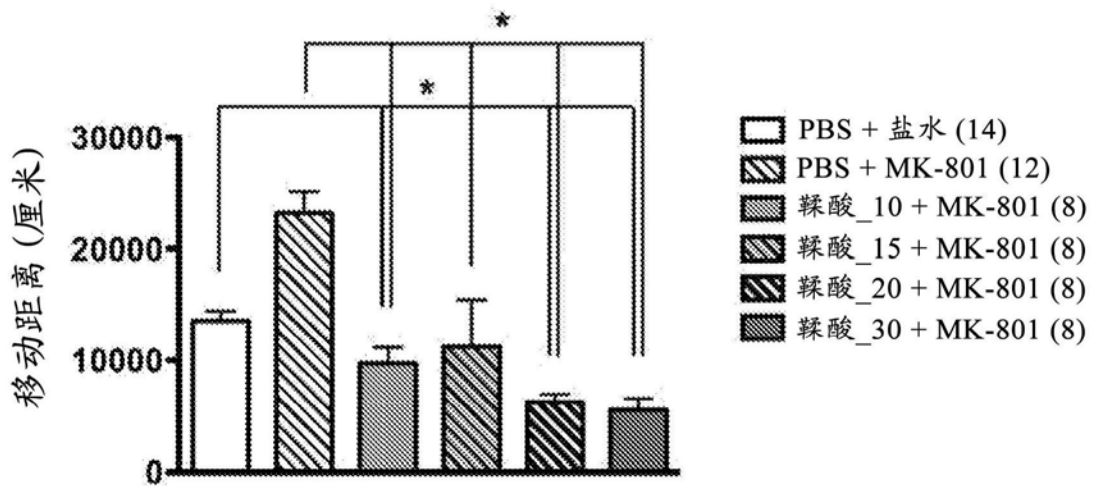


图10

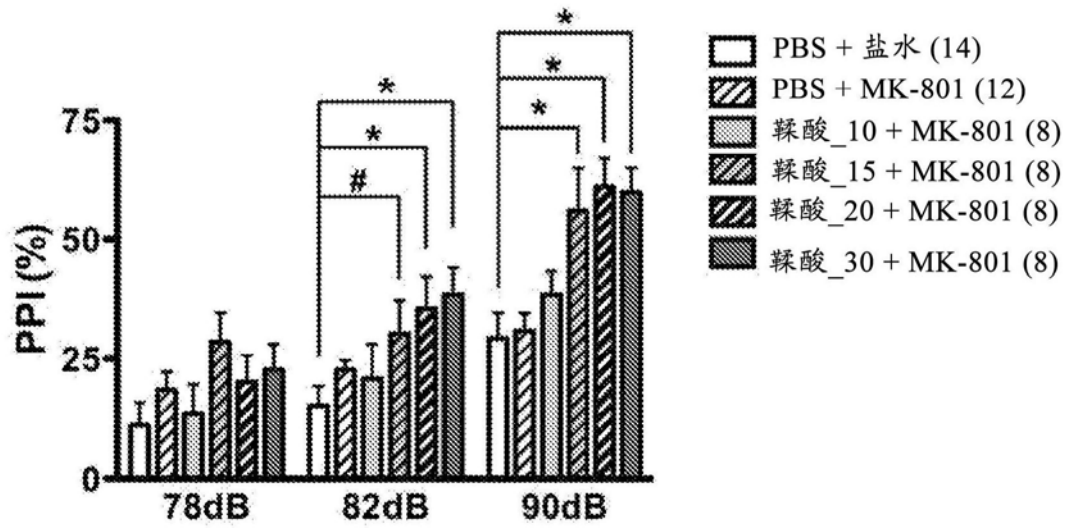


图11

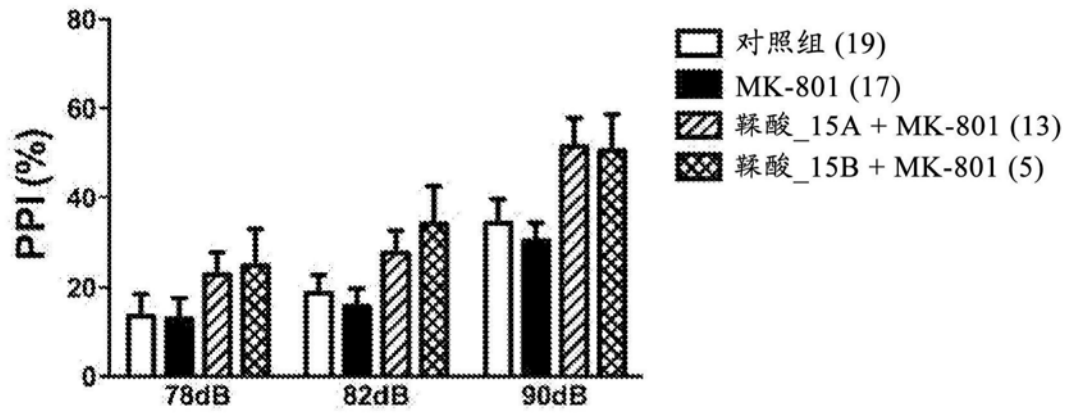


图12

实验设计

组别:

- 1. 载体 + 盐水
- 2. 载体 + MK-801
- 3. 鞣酸10 mg/kg + MK-801
- 4. 鞣酸30 mg/kg + MK-801
- 5. 鞣酸100 mg/kg + MK-801

C57BL/6J

行为测试的流程

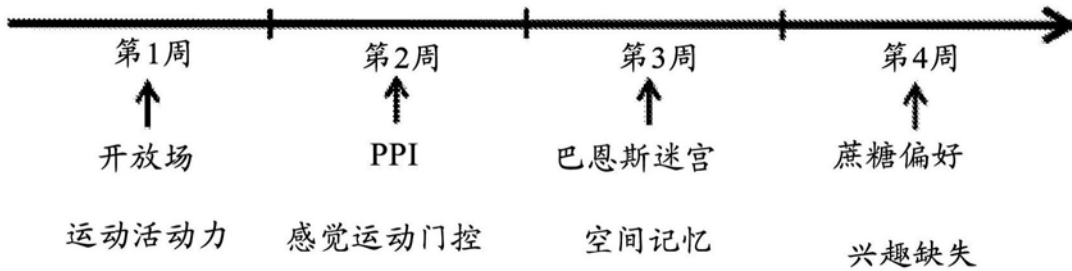
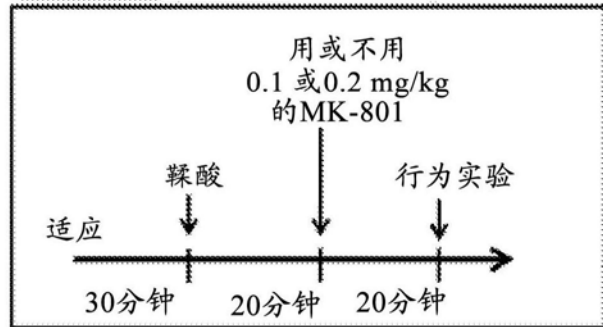


图13

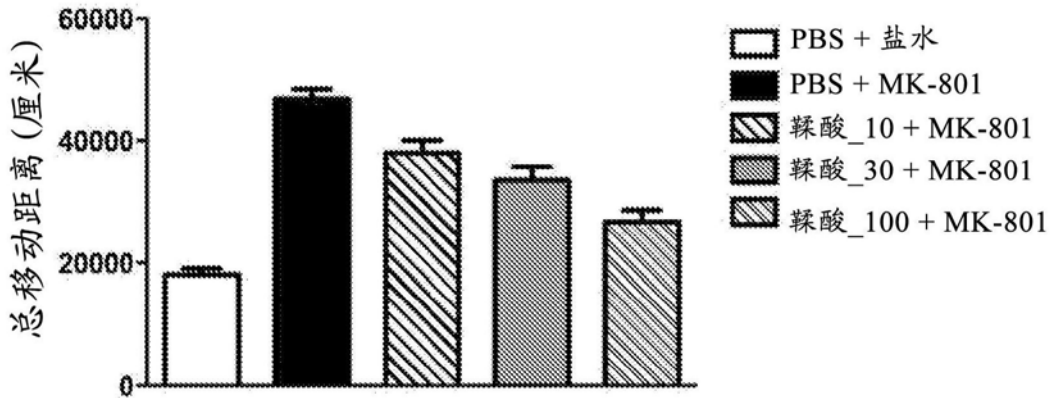


图14

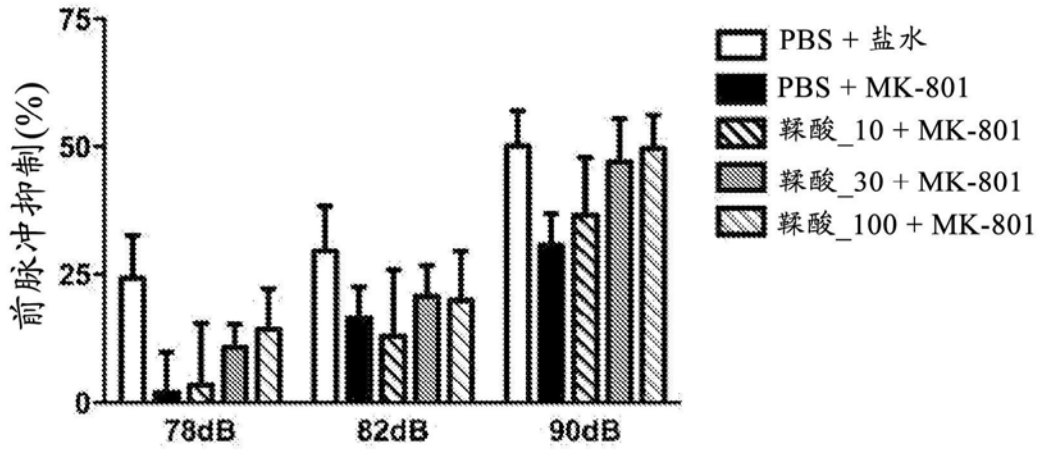


图15

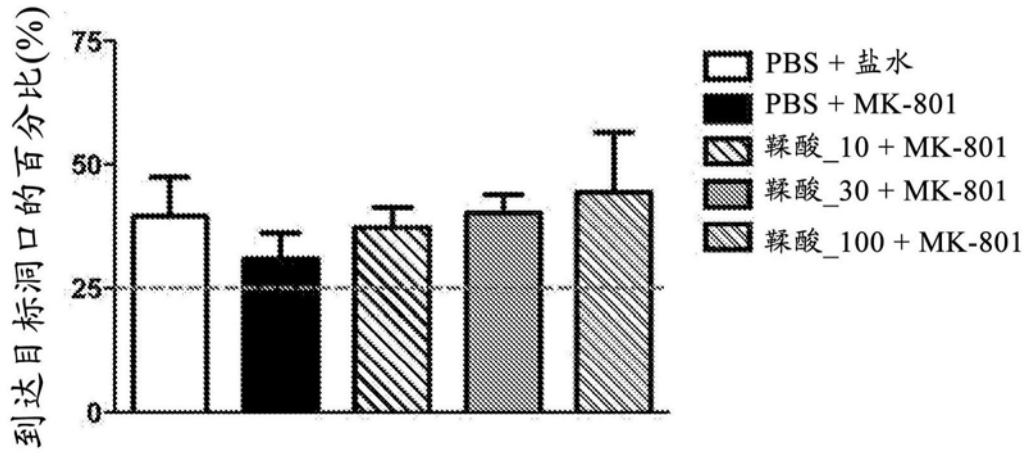


图16

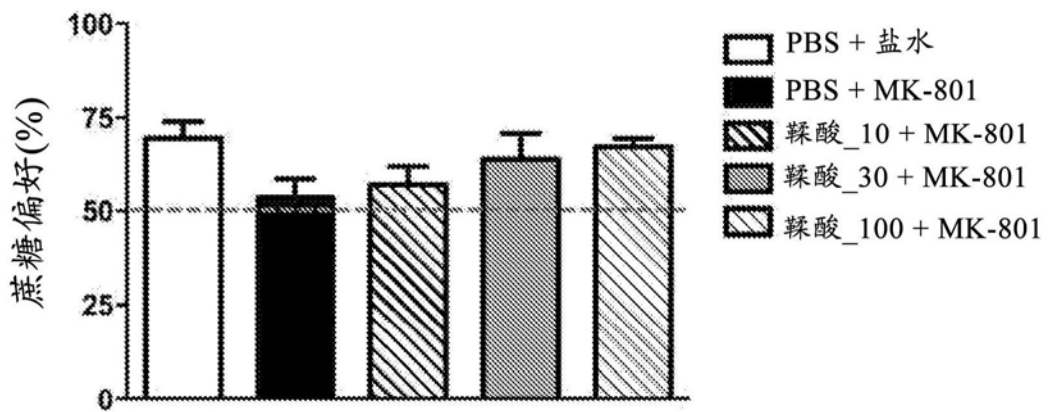


图17

实验设计

动物：8周龄的C57BL/6J雄性小鼠

组别：每组10只雄性

1. PBS对照组 2. 鞣酸_15 mg/kg

药物施用途径：腹腔内注射

急性疼痛测试：von Frey测试

热板及von Frey测试的流程：

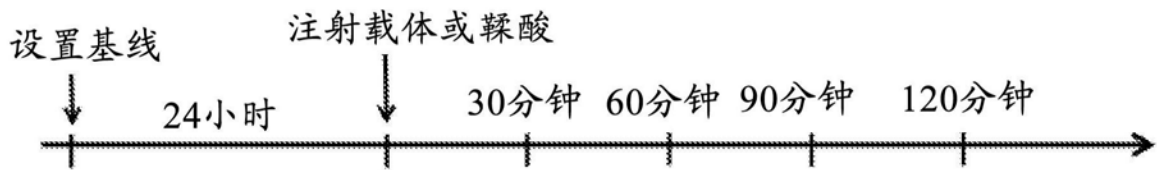


图18

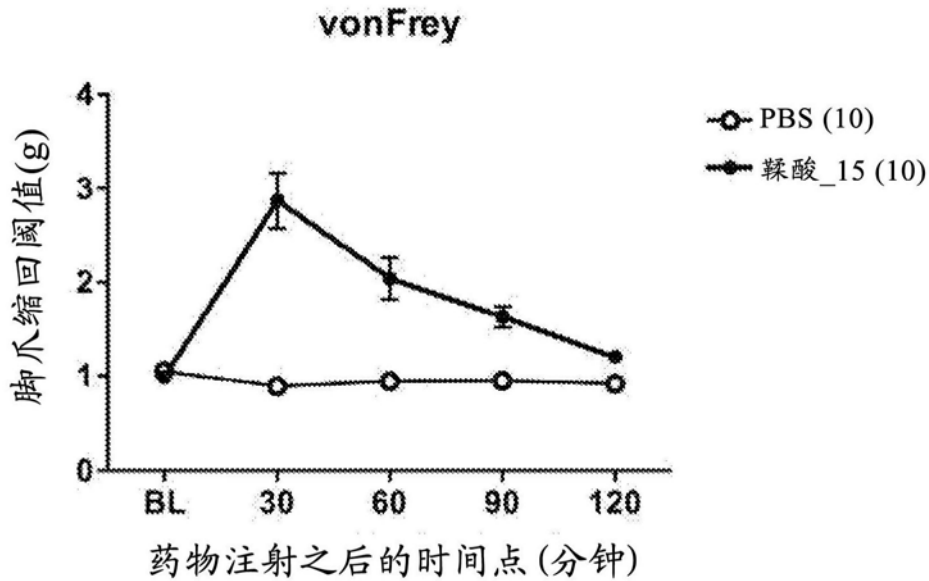


图19

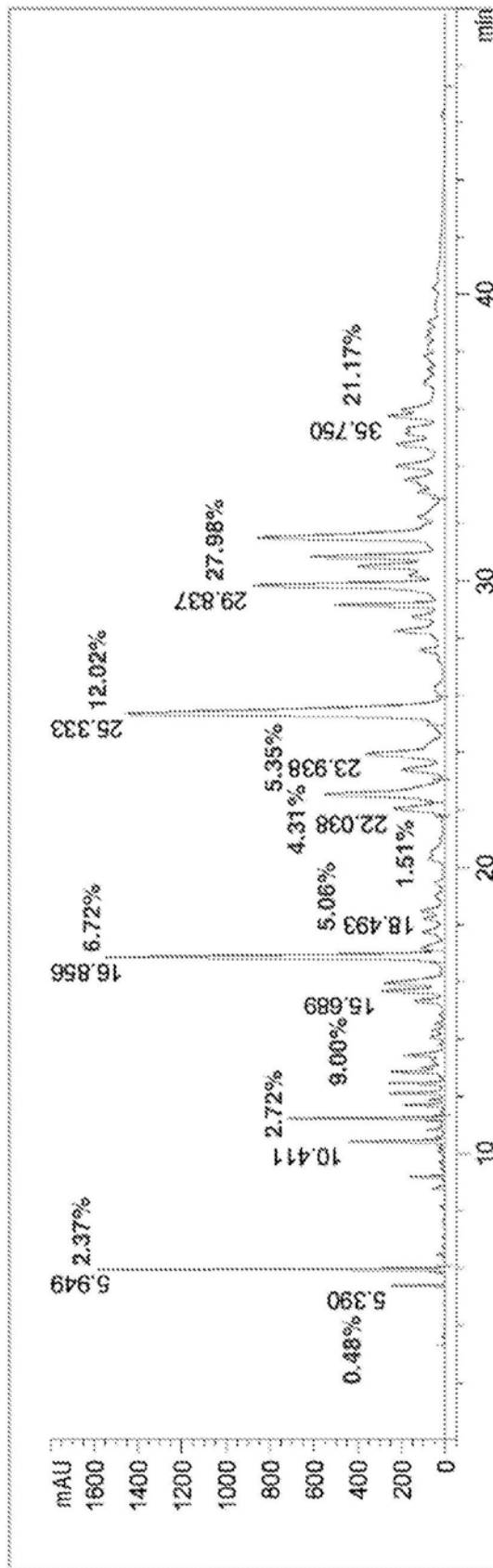


图20

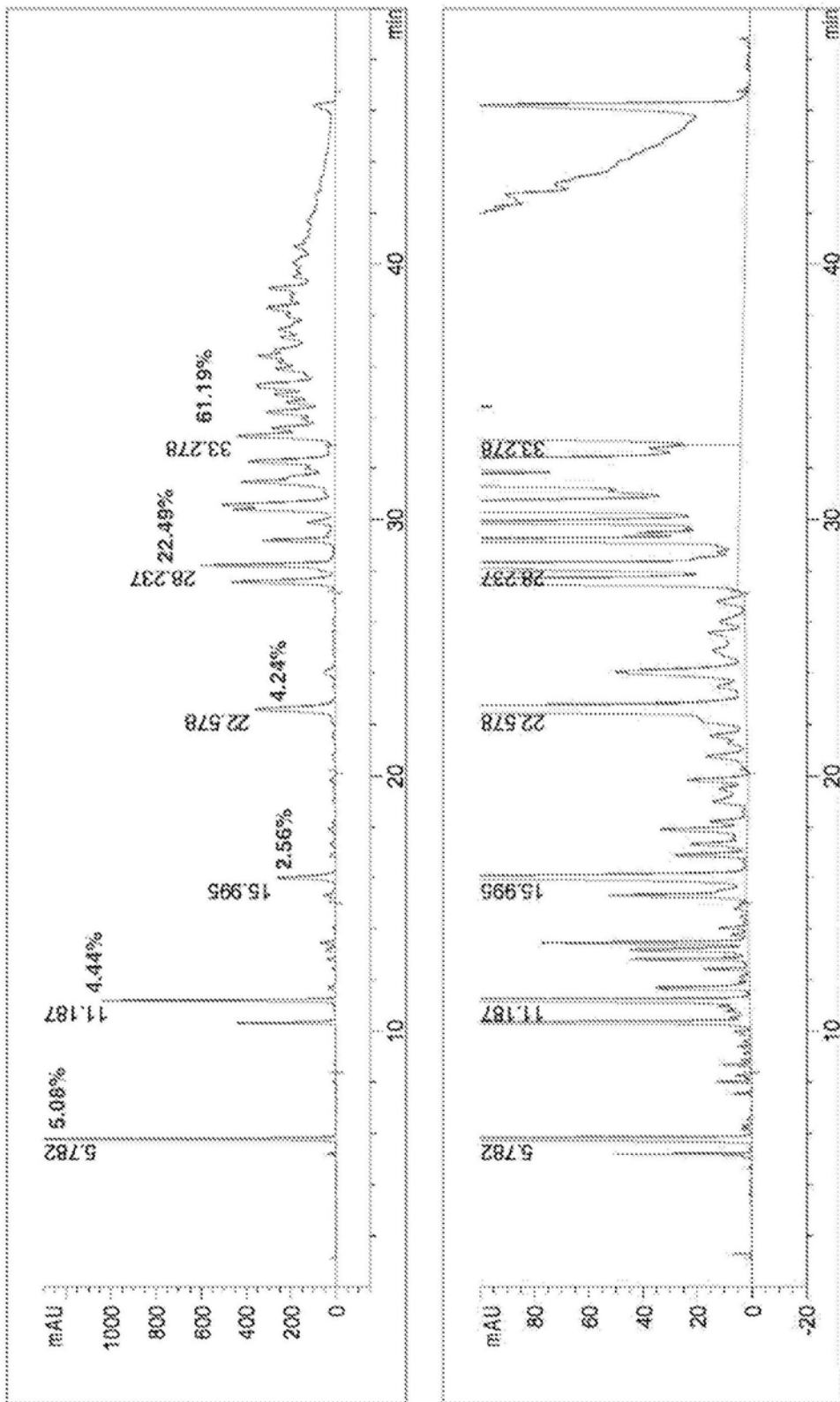


图21

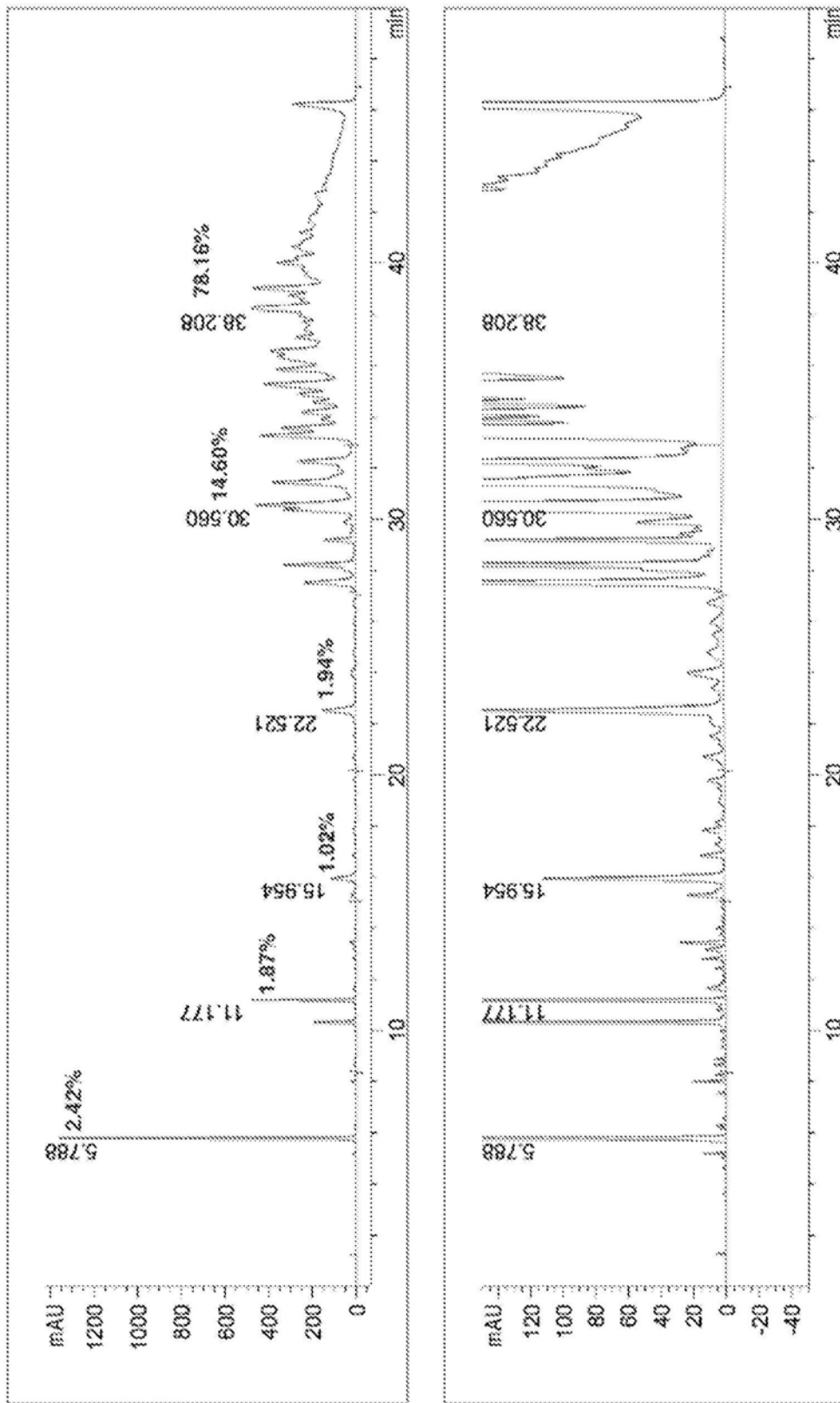


图22

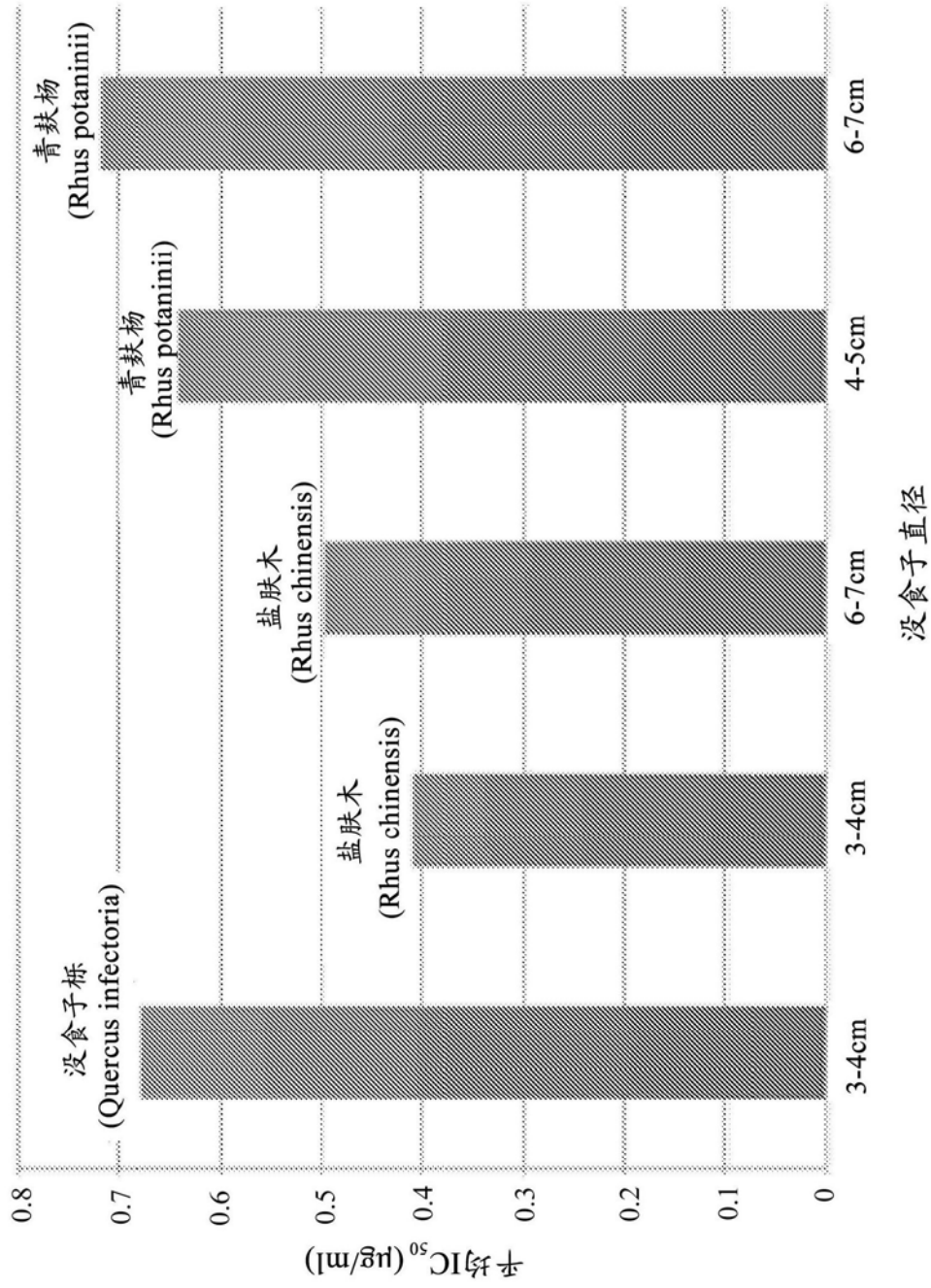


图23

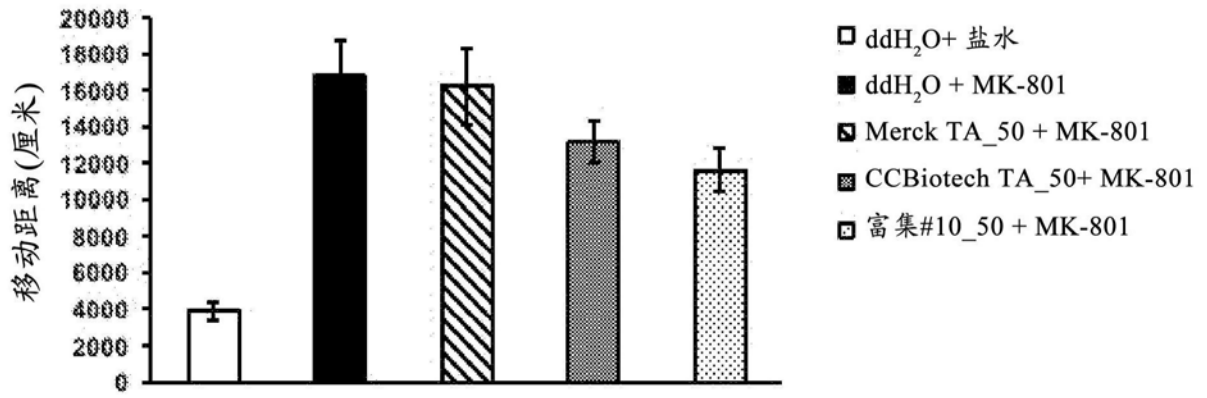


图24

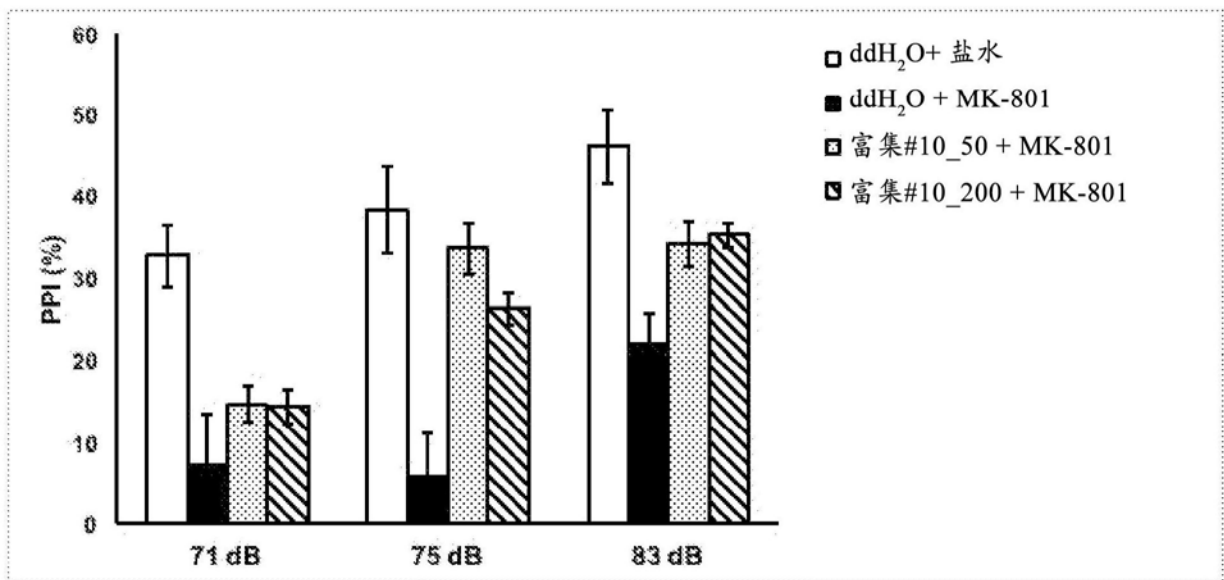
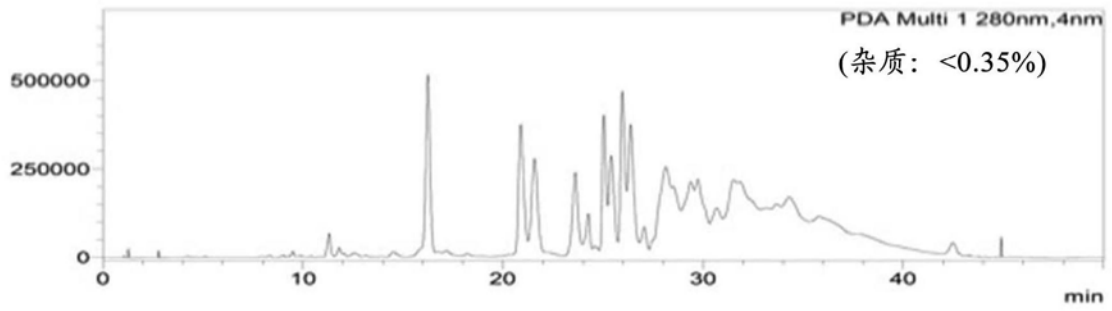
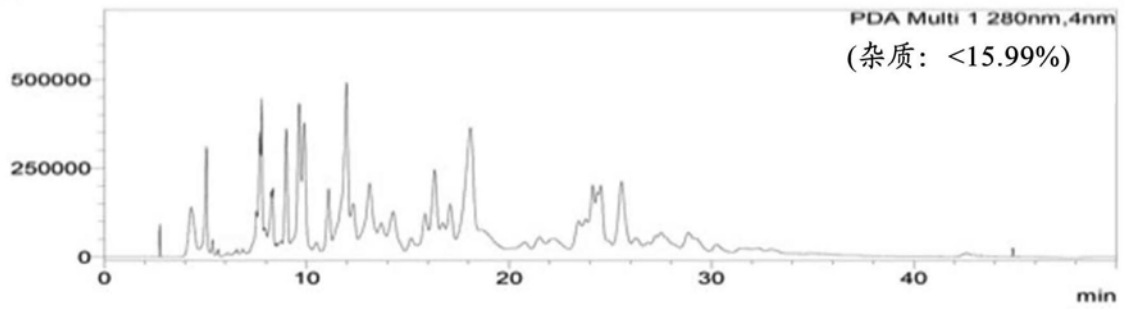


图25

(A)富集方法#10



(B)USP标准品



(C)温州瓯海精细化工有限公司

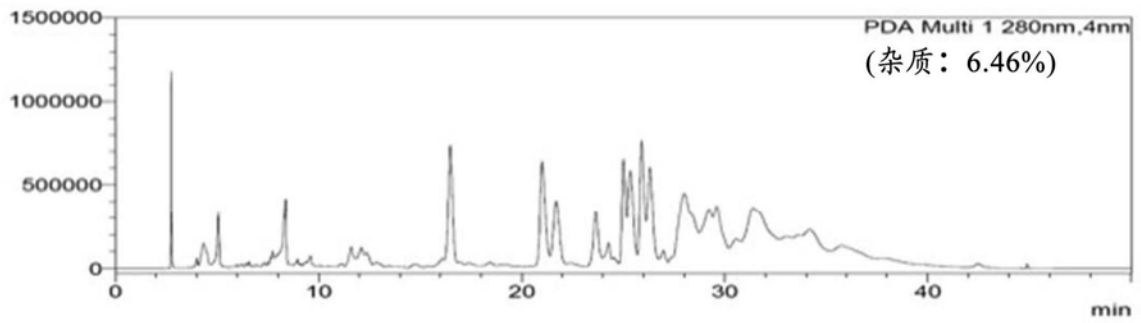


图26

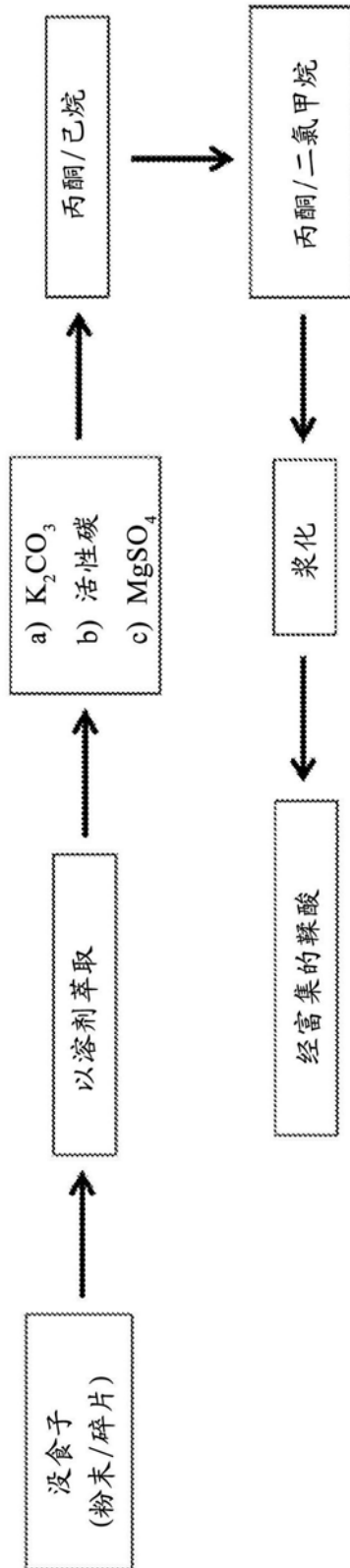


图27