



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110121346 A

(43)申请公布日 2019.08.13

(21)申请号 201780063850.8

M.J.费沃拉 T.J.菲尔特瑞

(22)申请日 2017.08.15

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(30)优先权数据

62/375,676 2016.08.16 US

62/402,439 2016.09.30 US

15/354,114 2016.11.17 US

代理人 李进 黄登高

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.04.16

(51)Int.Cl.

A61K 31/57(2006.01)

A61K 9/127(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/046894 2017.08.15

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/035095 EN 2018.02.22

(71)申请人 詹森药业有限公司

地址 比利时.比尔斯.特恩豪特斯路30号

(72)发明人 T.M.迪毛洛 K.威尔德豪斯

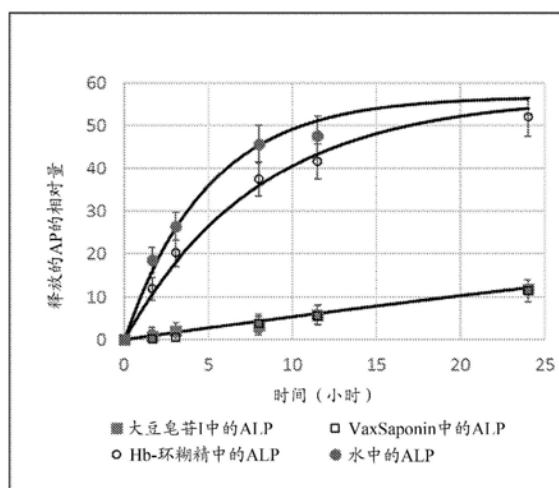
权利要求书1页 说明书39页 附图2页

(54)发明名称

神经类固醇组合物及其使用方法

(57)摘要

本发明提供了包含神经类固醇和皂苷的组合物、制备所述组合物的方法以及利用所述组合物来治疗或预防对其有需要的受试者的围产期抑郁症(PND)的方法。



1. 一种组合物,所述组合物包含:
 - a. 神经类固醇;以及
 - b. 皂苷,所述皂苷的含量使得能有效地形成掺有所述神经类固醇的自组装结构。
2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述自组装结构选自胶束、凝胶、脂质体、层状相和多层囊泡。
3. 根据权利要求2所述的组合物,其中所述自组装结构为胶束。
4. 根据权利要求3所述的组合物,其中所述皂苷选自大豆皂苷、皂树皂苷和人参皂苷。
5. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述神经类固醇选自别孕烯醇酮、四氢脱氧皮质酮(THDOC)和孕酮。
6. 根据权利要求5所述的组合物,其中所述神经类固醇为别孕烯醇酮。
7. 根据权利要求6所述的组合物,其中所述皂苷相对于所述组合物的所述总重量计为至少约0.1重量%。
8. 根据权利要求7所述的组合物,其中所述组合物包含至少约百万分之一百份的所述神经类固醇。
9. 根据权利要求8所述的组合物,其中所述组合物还包含药学上可接受的载体。
10. 根据权利要求9所述的组合物,其中所述组合物还包含辅助剂。
11. 根据权利要求10所述的组合物,其中所述组合物具有约0.01/小时至约0.05/小时的渗透系数P。
12. 根据权利要求11所述的组合物,其中所述组合物具有约0.01/小时的渗透系数P。
13. 一种治疗对其有需要的受试者的围产期抑郁症(PND)的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求12所述的组合物。
14. 根据权利要求13所述的方法,其中通过局部、口服、粘膜、静脉内或吸入的方式施用所述治疗有效量的所述组合物。
15. 根据权利要求14所述的方法,其中以单剂量施用所述治疗有效量的所述组合物。
16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述治疗有效量的所述组合物具有约0.01/小时至约0.05/小时的渗透系数P。
17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述治疗有效量的所述组合物具有约0.01/小时的渗透系数P。
18. 根据权利要求17所述的方法,其中所述治疗有效量的所述组合物的渗透系数P比包含单分子神经类固醇或环糊精神经类固醇复合物的组合物的渗透系数P低至少两倍。
19. 一种制备根据权利要求12所述的组合物的方法,所述方法包括在流动下将溶解在有机溶剂中的所述神经类固醇的溶液加入到皂苷溶液中,其中将所述神经类固醇掺入到所述自组装结构中。
20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述有机溶剂溶解至少0.1重量%的所述神经类固醇。
21. 根据权利要求20所述的方法,其中至少1重量%的所述有机溶剂能够溶于水。
22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述有机溶剂选自乙醇、甲醇、丙醇、丁醇、二醇、乙二醇、丙二醇、丁二醇、乙醚以及它们的混合物。
23. 根据权利要求22所述的方法,其中所述有机溶剂为乙醇。

神经类固醇组合物及其使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及包含神经类固醇和皂苷的组合物、制备所述组合物的方法,以及利用所述组合物治疗或预防对其有需要的受试者的围产期(PND)抑郁症的方法。

背景技术

[0002] 母亲与孩子之间的亲密联系是一种不仅可以在现在而且也可以在将来使孩子受益的特殊联系。这种联系使母亲和孩子更加亲密,并且这种积极的依恋关系可以增强婴儿的健康和以后的发育。由于母亲和新生儿之间的健康联系对于孩子的正常发育至关重要,因此,为加强这种联系而付出的努力受到高度重视。健康母亲能够表达对孩子的爱并促进这种联系的一些方式是通过孩子的微笑体验快乐和通过适当关注孩子的需求。

[0003] 据估计,美国每年有超过700,000名母亲患上产后抑郁症(PPD)。PPD被认为是一种主要的抑郁症,其具有标准的抑郁症特征。典型的PPD症状包括对婴儿需求无反应,以及通常不能从健康的亲子互动和依恋关系中获得快乐。由于出生的头几个月是婴儿正确认知和情绪发育的关键时期,因此PPD母亲对婴儿缺乏依恋和关注可能会对孩子的未来行为造成不良影响。

[0004] 在怀孕期间,健康孕妇的激素平衡使得她身体中的雌激素处于极高水平。孕妇的雌激素水平可高达正常水平的100倍。在孩子出生后,新妈妈的雌激素水平在几天内迅速降低,并恢复到正常的雌激素水平。已发现雌激素对许多正常神经元过程至关重要,并且与大脑中的5-羟色胺水平和大脑塑性呈正相关关系。因此,在不希望受理论束缚的情况下,认为PPD可能是由于新母亲对雌激素从母亲身体系统中快速撤出的超灵敏反应引起的。

[0005] 抗抑郁药通常是抗PPD的一线治疗方法之一。常规的抗抑郁药诸如三环素和选择性5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRI)通常用于PPD。然而,使用这些常规抗抑郁药来治疗PPD存在许多问题。首先,在服用这些常规抗抑郁药的患者中,缓解PPD病症的患者通常不超过约80%。其次,即使能成功缓解病症,这些常规抗抑郁药通常也需要长达8周才有效。再次,PPD母亲可能会遭受与三环素和SSRI相关的典型副作用。与三环素药物相关的副作用包括口干、鼻干、视力模糊、胃肠蠕动和分泌减少,从而导致便秘、尿潴留、认知和/或记忆障碍,以及体温升高。与SSRI使用相关的副作用包括失眠、体重增加和性功能障碍。

[0006] 此外,已发现几乎所有这些常规抗抑郁药都存在于母乳中,并且可在哺乳期间转移给婴儿。有关哺乳母亲的抗抑郁药物对儿童智力发育的影响的数据很少。文献没有证明抗抑郁药物的安全性,而是认为母亲使用抗抑郁药对哺乳儿童带来的风险远远超过未经治疗的PPD母亲带来的风险。然而,在一些情况下,某些特定抗抑郁药转移到母乳中的程度非常高,以至于一些研究人员得出结论,认为哺乳母亲应该避免使用这些特定的抗抑郁药。

[0007] 舍曲林(Zoloft)和帕罗西汀(Paxil)是治疗PPD的一线抗抑郁药(Berle, Curr.Womens Health Rev.,2011年2月,第7卷第1期,第28-34页)。没有对这些抗抑郁药对母乳喂养的婴儿的影响进行长期研究。

[0008] Sage Pharmaceuticals公司最近报道,他们生产的化合物SAGE-547在一个小型双

盲人体试验中显示出疗效。但是, SAGE-547必须通过静脉注射方法施用, 因此在日常依从性方面存在问题。

[0009] 因此, 当前的一个目标是提供可以非侵入性施用的GABA (A) δ 激动剂。

发明内容

[0010] 现已认识到, 自然界中存在几种具有自组装质量的GABA (A) 激动剂。该质量允许技术人员从天然GABA (A) δ 激动剂制备包括凝胶、胶束、层状囊泡、多层囊泡 (MLV) 和脂质体的自组装结构。由于MLV、胶束和脂质体可通过口腔、鼻内或肺部途径非侵入性施用, 因此本发明的组合物具有优于现有技术静脉用组合物的优点。

[0011] 在一些实施方案中, 天然GABA (A) δ 激动剂以胶束的形式存在。胶束提供的优点在于它们可以口服给药, 并且它们的小尺寸避免了被巨噬细胞检测, 这延长了在人体脉管系统中的循环时间。

[0012] 在一些实施方案中, 天然GABA (A) δ 激动剂以脂质体的形式存在。据信脂质体形式在GABA (A) δ 组合物的肺部给药期间提供了优势。脂质体通常为100-200纳米的数量级 (因此被归类为细颗粒), 而胶束为约10-20纳米, 比脂质体小得多 (因此被归类为超细颗粒)。由于相当大部分的胶束在肺部给药后被呼出, 因此脂质体提供了这样的优点 (优于胶束), 它们相对较大的尺寸提供了更有效的肺部给药。脂质体还可递送容纳在其水性核心中的亲水性分子。

[0013] 在一些实施方案中, 天然GABA (A) δ 激动剂以多层囊泡 (MLV) 的形式存在。据信MLV形式在GABA (A) δ 组合物的肺部给药期间提供了优势。MLV可被制成几微米数量级的尺寸。由于相当大部分的胶束和脂质体在肺部给药后被呼出, 因此MLV提供了这样的优点 (优于胶束和脂质体), 它们相对较大的尺寸提供了更有效的肺部给药。

[0014] 因此, 在一些实施方案中, 提供了包含多个混合自组装结构的组合物, 该混合自组装结构包含i) 至少50重量%的环状分子, 以及ii) 至少5重量%的嵌入其中的天然GABA (A) δ 激动剂。

[0015] 在其他实施方案中, 提供了包含多个混合自组装结构的组合物, 该混合自组装结构包含i) 至少50重量%的不带电分子, 以及ii) 至少5重量%的嵌入其中的天然GABA (A) δ 激动剂。

[0016] 在其他实施方案中, 提供了包含多个混合自组装结构的组合物, 该混合自组装结构包含i) 至少50重量%的糖基化分子, 以及ii) 至少5重量%的嵌入其中的天然GABA (A) δ 激动剂。优选地, 每个具有至少三个六环结构。

[0017] 在其他实施方案中, 提供了包含多个混合自组装结构的组合物, 该混合自组装结构包含i) 至少50重量%的酚类分子, 以及ii) 至少5重量%的嵌入其中的天然GABA (A) δ 激动剂。优选地, 每个都具有联苯基结构, 更优选具有双酚结构。

[0018] 在一些实施方案中, 提供了一种组合物, 该组合物包含(a) 神经类固醇; 以及(b) 皂苷, 该皂苷的含量使得能有效地形成结合有神经类固醇的自组装结构。自组装结构可例如选自胶束、凝胶、脂质体、层状相囊泡和多层囊泡。

[0019] 在某些实施方案中, 皂苷选自大豆皂苷、皂树皂苷和人参皂苷。皂苷可例如相对于组合物的总重量计为至少约0.1重量%、至少约0.5重量%或至少约1重量%。

[0020] 在某些实施方案中,神经类固醇选自别孕烯醇酮、四氢脱氧皮质酮 (THDOC) 和孕酮。组合物包含至少约100ppm、至少约200ppm或至少约300ppm的神经类固醇。

[0021] 在某些实施方案中,组合物还包含药学上可接受的载体或辅助剂。

[0022] 在某些实施方案中,组合物的渗透系数P为约0.01/小时至约0.05/小时,优选约0.01/小时。

[0023] 在其他实施方案中,提供了为有此需要的受试者治疗围产期抑郁症 (PND) 的方法。该方法包括向受试者施用治疗有效量的根据本发明实施方案的组合物。在某些实施方案中,通过局部、静脉内、口服、粘膜或吸入的方式施用治疗有效量的组合物。在某些实施方案中,以单剂量施用治疗有效量的组合物,每4小时一次,优选每8小时一次,更优选每12小时一次,最优选每24小时一次,或者隔更长的时间施用一次。

[0024] 在某些实施方案中,治疗有效量的组合物的渗透系数P为约0.01/小时至约0.05/小时,优选约0.01/小时。在某些实施方案中,治疗有效量的组合物的渗透系数P比包含单分子神经类固醇或环糊精神经类固醇复合物的组合物的渗透系数P低至少两倍、至少五倍或至少十倍。

[0025] 在其他实施方案中,提供了制备根据本发明实施方案的组合物的方法。该方法包括在流动下将溶解在有机溶剂中的神经类固醇的溶液加入皂苷溶液中,其中将神经类固醇结合到自组装结构中。在某些实施方案中,有机溶剂溶解至少0.1重量%、至少0.5重量%或至少1重量%的神经类固醇。在某些实施方案中,至少1重量%、至少2.5重量%或至少3重量%的有机溶剂可溶于水。在某些实施方案中,有机溶剂选自乙醇、甲醇、丙醇、丁醇、二醇、乙二醇、丙二醇、丁二醇、乙醚以及它们的混合物。

附图说明

[0026] 结合附图进行阅读时,能够更好地理解前述发明内容和以下对本专利申请的优选实施例的详细说明。但是,应当理解,本专利申请不限于附图中示出的精确实施方案。

[0027] 图1示出了不存在别孕烯醇酮晶体的样品(左)和存在晶体的样品(右)的对比图。左小瓶在去离子(DI)水中含有4.6重量% VaxSap皂苷,右小瓶在DI水中含有4.6重量% VaxSap皂苷和1600ppm别孕烯醇酮晶体。

[0028] 图2示出了Arbor Assays™ DetectX® Allopregnanolone Enzyme Immunoassay的别孕烯醇酮浓度的标准曲线。

[0029] 图3示出了具有(正方形符号)和不具有(圆形符号)皂苷的系统随时间推移释放的别孕烯醇酮的相对量的曲线图。针对数据使用公式1来拟合线条。

具体实施方式

[0030] 背景以及说明书全篇中引用或描述了各种出版物、文章和专利;这些参考文献中的每一者全文均以引用方式并入本文。本说明书中包括的对文件、行为、物质、设备、文章等的讨论旨在为本发明提供上下文。此类讨论并不是承认这些事项中的任一事项或全部事项均相对于所公开或受权利要求书保护的任何发明形成现有技术的一部分。

[0031] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语的含义与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同。否则,本文所用的某些术语具有本说明书中所述的

含义。

[0032] 应该注意的是,除非上下文清楚地指明,否则本文和所附权利要求中所用的单数形式“一个/一种”和“所述/该”包括复数引用物。

[0033] 除非另有说明,否则任何数值,例如本文所述的浓度或浓度范围,应理解为在所有情况下均由术语“约”修饰。因此,数值通常包括所述值的 $\pm 10\%$ 。例如,1mg/mL的浓度包括0.9mg/mL至1.1mg/mL。同样,1%至10% (w/v) 的浓度范围包括0.9% (w/v) 至11% (w/v)。如本文所用,数值范围的使用明确地包括所有可能的子范围、该范围内的所有单独数值、包括在这些范围内的整数和值的分数,除非上下文另有明确说明。

[0034] 除非另有说明,否则在一系列元素之前的术语“至少”应理解为指代系列中的每个元素。本领域的技术人员将会认识到、或仅使用常规实验就能够确定本文所述发明的具体实施例的多种等同物。此类等同物旨在由本发明所涵盖。

[0035] 如本文所用,术语“包含”、“包括”、“具有”或“含有”或其任何其他变型应被理解是指包括指定的整数或整数组,但不排除任何其他整数或整数组,并且是非排他性的或开放式的。例如,包含元素列表的组合物、混合物、过程、方法、制品或设备不一定仅限于那些元素,而是可以包括这些组合物、混合物、过程、方法、制品或设备未明确列出或固有的其他元素。此外,除非明确地指明相反,否则“或”是指包括性的“或”而不是排他性的“或”。例如,条件A或B由以下任一项满足:A为真(或存在)而B为假(或不存在),A为假(或不存在)而B为真(或存在),以及A和B均为真(或存在)。

[0036] 如本文所用,多个列举的元素之间的连接术语“和/或”被理解为包含单个和组合选项。例如,在两个元素由“和/或”连接的情况下,第一种选项是指在没有第二个元素的情况下适用第一个元素。第二种选项是指在没有第一个元素的情况下适用第二个元素。第三种选项是指适合一起使用第一元素和第二元素。这些选项中的任何一个均被理解为落在含义内,因此满足本文所用术语“和/或”的要求。多于一个选项的并行适用性也被理解为落在含义范围内,因此满足术语“和/或”的要求。

[0037] 如本文所用,在说明书和权利要求书中通篇使用的术语“由……组成”表示包括任何列举的整数或整数组,但不能将附加的整数或整数组添加到指定的方法、结构或组成中。

[0038] 如本文所用,在说明书和权利要求书中通篇使用的术语“基本上由……组成”表示包括任何列举的整数或整数组,并且任选地包括不会实质上改变指定方法、结构或组成的基本或新型特性的任何列举的整数或整数组。参见M.P.E.P. §2111.03。

[0039] 词汇“右”、“左”、“下”和“上”指定附图中的方向,以此作为参照。

[0040] 还应当理解,当提及优选发明的部件的尺寸或特性时,本文使用的“约”、“大约”、“大致”、“基本上”和类似的术语表示所描述的尺寸/特性不是严格的边界或参数,并且不排除在功能上相同或相似的微小变化,如本领域普通技术人员所理解的。至少,包括数值参数的这种参考将包括使用本领域已接受的数学和工业原理(例如,舍入、测量或其他系统误差、制造公差等)的变化,不会改变最低有效数字。

[0041] 如本文所用,“受试者”是指任何动物,优选哺乳动物,最优选人。如本文所用,术语“哺乳动物”涵盖任何哺乳动物。哺乳动物的示例包括但不限于奶牛、马、绵羊、猪、猫、狗、小鼠、大鼠、兔子、豚鼠、猴子、人等,更优选人。

[0042] 如本文所用,在向受试者施用治疗的背景下,术语“治疗有效量”是指具有预防和/

或治疗效果的组合物的量。在某些实施方案中,在向受试者施用组合物的背景下,“治疗有效量”是指组合物的量,其足以降低或改善受试者围产期抑郁症的严重性、缩短受试者围产期抑郁症的持续时间和/或预防受试者患上围产期抑郁症。在某些实施方案中,与未接受治疗的受试者相比,治疗有效量的组合物不能完全治愈受试者的围产期抑郁症,而是降低或改善受试者的围产期抑郁症的症状和严重性。

[0043] 如本文所用,“神经类固醇”是指通过与配体门控离子通道和其他细胞表面受体相互作用而快速改变神经元兴奋性的任何内源性或外源性类固醇。例如,神经类固醇可以是在大脑中合成的类固醇,或者是由内分泌腺合成然后最终通过血流到达大脑并对脑功能产生影响的类固醇。神经类固醇的示例包括但不限于孕烷(例如,二羟基孕酮、别孕烯醇酮、孕烷醇酮、二氢脱氧皮质酮和四氢脱氧皮质酮)、雄甾烷醇类(例如,雄甾醇、雄甾酮、雄甾烷二醇、本胆烷醇酮)和 3β -羟基类固醇(例如,硫化孕烯醇酮、脱氢表雄酮和硫酸脱氢表雄酮)和信息素。

[0044] 如本文所用,关于“结合神经类固醇的自组装结构”所使用的“结合”是指用于与神经类固醇组装的自组装结构的包封、包埋和任何其他方式。

[0045] GABA (A) δ 激动剂及其组合物

[0046] 出于本发明的目的,GABA (A) δ 激动剂在 $100\mu\text{Mol/L}$ 时使GABA (A) 电流增加至少10%。

[0047] 在一些实施方案中,GABA (A) δ 激动剂来源于植物。在其他情况下,激动剂是哺乳动物内源性的。在其他情况下,激动剂是人内源性的。

[0048] 在一些实施方案中,自组装结构选自胶束、凝胶、脂质体、层状相囊泡、多层囊泡(MLV)和固体脂质纳米颗粒。

[0049] 在一些实施方案中,环状结构和激动剂中的每一个包含联苯基结构。这些共同的芳族结构允许激动剂嵌套在环状超结构的相对联苯基内(即,激动剂的联苯基嵌入在环状超结构的联苯基之间)。这种嵌入是由于联苯基结构的芳族组分之间的 π - π 键合而进行的。

[0050] 在一些实施方案中,环状分子是鞣花酸、尿石素、punicalagin或其混合物。在一些实施方案中,环状分子是鞣花酸、尿石素或其混合物,并且激动剂是选自和厚朴酚、厚朴酚及其混合物的木酚素。优选地,环状分子是鞣花酸,并且激动剂是选自和厚朴酚、厚朴酚及其混合物的木酚素。

[0051] 在一些实施方案中,环状分子是不饱和的。在一些实施方案中,不饱和环状分子和激动剂中的每一个具有至少三个环己基环。这些共同环允许激动剂嵌套在不饱和环己基超结构的相对环内。

[0052] 在一些实施方案中,自组装结构包含至少15重量%的天然GABA (A) δ 激动剂。优选地,自组装结构包含至少30重量%的天然GABA (A) δ 激动剂。

[0053] 在一些实施方案中,自组装结构包含至少65重量%的环状分子,优选至少80重量%的环状分子。

[0054] 在一些实施方案中,环状分子至少是双环的(即,具有至少两个环)。

[0055] 在一些实施方案中,环状分子是皂苷,并且激动剂是神经类固醇。在一些实施方案中,提供了一种组合物,该组合物包含(a)神经类固醇;以及(b)皂苷,该皂苷的含量使得能有效地形成结合有神经类固醇的自组装结构。在某些实施方案中,皂苷选自大豆皂苷、皂树

皂苷和人参皂苷,并且神经类固醇选自别孕烯醇酮、四氢脱氧皮质酮(THDOC)和孕酮。

[0056] 在一些实施方案中,自组装结构选自胶束、凝胶、脂质体、层状相囊泡、多层囊泡(MLV)和固体脂质纳米颗粒。

[0057] 在一些实施方案中,皂苷相对于组合物的总重量计为至少约0.1重量%、至少约0.5重量%、至少约1重量%、至少约2重量%或至少约5重量%。皂苷可例如相对于组合物的总重量计为最多约50重量%、最多约20重量%、最多约10重量%、最多约5重量%或最多约1重量%。皂苷可例如相对于组合物的总重量计为约0.1重量%至约5重量%、约0.5重量%至约4重量%、约1重量%至约3重量%或其间的任何数量。

[0058] 在一些实施方案中,自组装结构包含至少5摩尔%的神经类固醇,优选至少10摩尔%,更优选至少20摩尔%,更优选至少30摩尔%,更优选至少40摩尔%。

[0059] 在一些实施方案中,组合物包含至少约100ppm,至少约200ppm,至少约300ppm,至少约500ppm,至少约1000ppm,或至少约5000ppm的神经类固醇。组合物中的神经类固醇可以是例如约100ppm至约5000ppm、约200ppm至约1000ppm、约300ppm至约500ppm或其间的任何数目。

[0060] 在一些实施方案中,组合物的渗透系数P为约0.001/小时至约0.5/小时、约0.005/小时至约0.1/小时、约0.01/小时至约0.05/小时,或其间的任何数目。在一些实施方案中,渗透系数P为约0.001/小时、约0.005/小时、约0.01/小时、约0.02/小时、约0.03/小时、约0.04/小时、约0.05/小时、约0.1/小时或约0.5/小时。在一些实施方案中,渗透系数P是包含单分子神经类固醇或环糊精神经类固醇复合物的组合物的渗透系数P的至少两倍、至少五倍、至少十倍或至少五十倍。

[0061] 别孕烯醇酮和THDOC是高效的GABA(A) δ 激动剂。在浓度为1Mol/L时, μ THDOC将GABA电流增加至少700%。参见例如Wohlfarth, *J. Neurosci.*, 2002年,第22卷第5期,第1541-9页。别孕烯醇酮可增强纳摩尔范围内的大鼠小脑GABA δ 亚基。Fodor, *Neurosci. Lett.*, 2005年,第383卷第1-2期,第127-130页。

[0062] 别孕烯醇酮是人内源性的,并且在怀孕期间血浆浓度从低于5ng/mL上升至约50ng/mL。Luisi, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2000年7月,第85卷第7期,第2429-33页。因此,可将其安全地施用给母亲,而不用担心影响母乳喂养婴儿的健康。

[0063] THDOC是人内源性的,并且其在人血浆中的浓度高达0.5ng/mL。Brambilla, *Psychiatry Research*, 2005年,第135卷,第185-190页。因此,可将其安全地施用给母亲,而不用担心影响母乳喂养婴儿的健康。

[0064] 孕酮是人内源性的,并且在怀孕期间血浆浓度从低于10ng/mL上升至约150ng/mL。Luisi, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2000年7月,第85卷第7期,第2429-33页。因此,可将其安全地施用给母亲,而不用担心影响母乳喂养婴儿的健康。

[0065] 在一个实施方案中,自组装的别孕烯醇酮/大豆皂苷混合胶束结构基本上根据制备人参皂苷胶束的配方(公开于Xiong, *Intern. J. Pharmaceutics*, 2008年,第360卷,第191-196页)制备。在一个此类假想实施方案中,通过将10摩尔%的别孕烯醇酮/90摩尔%大豆皂苷混合物溶解于水和生理盐水中以制备0.1-0.6mg/mL溶液来制备一系列工作溶液。然后将这些工作溶液通过0.8 μ m过滤器过滤。接着测量表面张力以确定临界胶束浓度CMC。再将胶束溶液蒸发以获得干燥的混合胶束。

[0066] 在一些实施方案中,本文提供了根据本发明实施方案制备组合物的方法。该方法基于对流驱动的溶剂-到-水络合(CSWC)方法。该方法包括在流动下将溶解在有机溶剂中的神经类固醇的溶液加入皂苷溶液中,其中将神经类固醇结合到皂苷自组装结构中。

[0067] 有机溶剂可以例如溶解至少0.01重量%,至少0.1重量%,至少0.5重量%,至少1重量%,至少5重量%,或至少10重量%的神经类固醇。有机溶剂可以例如溶解约0.01重量%至约10重量%,约0.1重量%至约5重量%,约0.5重量%至约1重量%,或其间的任何数量的神经类固醇。

[0068] 在一些实施方案中,至少0.1重量%,至少0.5重量%,至少1重量%,至少2.5重量%,至少3重量%,至少5重量%,或至少10重量%的有机溶剂可溶于水。约0.1重量%至约10重量%,约0.5重量%至约5重量%,约1重量%至约3重量%,或其间的任何量的有机溶剂可溶于水。

[0069] 在一些实施方案中,有机溶剂选自乙醇、甲醇、丙醇、丁醇、二醇、乙二醇、丙二醇、丁二醇、乙醚以及它们的混合物。

[0070] 在一些实施方案中,将别孕烯醇酮在与皂苷混合之前置于醇溶液(诸如95%乙醇)中,因为这样做增加了别孕烯醇酮在溶液中的溶解度,并允许其在皂苷自组装结构的制备过程中容易嵌入。

[0071] 在一个实施方案中,自组装的别孕烯醇酮/人参皂苷混合胶束结构基本上根据制备人参皂苷胶束的配方(公开于Xiong, *Intern. J. Pharmaceutics*, 2008年,第360卷,第191-196页)制备。在一个此类假想实施方案中,通过将10摩尔%的别孕烯醇酮/90摩尔%人参皂苷混合物溶解于水和生理盐水中以制备1-100mg/mL溶液来制备一系列工作溶液。然后将这些工作溶液通过0.8 μ m过滤器过滤。接着测量表面张力以确定临界胶束浓度CMC。再将胶束溶液蒸发以获得干燥的混合胶束。

[0072] 在一个实施方案中,自组装的别孕烯醇酮/皂树皂苷混合胶束结构基本上根据制备人参皂苷胶束的配方(公开于Xiong, *Intern. J. Pharmaceutics*, 2008年,第360卷,第191-196页)制备。在一个此类假想实施方案中,通过将10摩尔%的别孕烯醇酮/90摩尔%皂树皂苷混合物溶解于水和生理盐水中以制备1-100mg/mL溶液来制备一系列工作溶液。然后将这些工作溶液通过0.8 μ m过滤器过滤。接着测量表面张力以确定临界胶束浓度CMC。再将胶束溶液蒸发以获得干燥的混合胶束。

[0073] 在神经类固醇/皂苷实施方案中,薄膜水合方法可用于制备多层囊泡(MLV)和脂质体。

[0074] 为了制备自组装MLV,首先将DBC/TTC分散在旋转蒸发烧瓶中的有机溶剂中,并且蒸发溶剂,在烧瓶底部留下薄膜。然后用水水合该薄膜,并且轻轻搅动烧瓶以形成MLV。

[0075] 在另一个实施方案中,如上制备自组装的MLV,然后在溶液上进行剪切。在一些实施方案中,剪切由高速共混器产生。在其他实施方案中,剪切由市售的超声清洁器产生。

[0076] 自组装的别孕烯醇酮/人参皂苷混合自组装结构是有用的,因为也已知人参皂苷可用于治疗糖尿病。因此,使用单一结构,临床医生可对同一母亲治疗产后抑郁症和妊娠糖尿病。

[0077] 据报道,可以将自组装人参皂苷胶束的释放速率调节为数天至数月。Xiong, *Int. J. Pharm.*, 2008年8月6日,第360卷第1-2期,第191-6页。通过改变初始溶液中人参皂苷

的浓度来进行调节,其中较高的浓度导致释放速率变慢。不希望受理论束缚,据信基本上由糖基化皂苷(诸如大豆皂苷)组成的自组装囊泡同样可以将释放速率调节为数天到数月,其中通过改变初始溶液中局部麻醉剂的浓度来进行调节,较高的浓度导致释放速率变慢。

[0078] 因此,在提供延长释放速率的一些实施方案中,别孕烯醇酮/大豆皂苷的自组装胶束是通过将别孕烯醇酮/大豆皂苷以高于1mg/mL、优选高于5mg/mL、优选高于20mg/mL、优选高于30mg/mL、优选高于50mg/mL、优选高于70mg/mL、优选高于80mg/mL、优选高于90mg/mL、优选高于100mg/mL的浓度分散于水中制备的。

[0079] 同样,在提供延长释放速率的一些实施方案中,别孕烯醇酮/人参皂苷的自组装胶束是通过将别孕烯醇酮/人参皂苷以高于1mg/mL、优选高于5mg/mL、优选高于20mg/mL、优选高于30mg/mL、优选高于50mg/mL、优选高于70mg/mL、优选高于80mg/mL、优选高于90mg/mL、优选高于100mg/mL的浓度分散于水中制备的。

[0080] 熊教导说,负载决定了释放速率。在一些实施方案中,自组装结构的负载目标是提供对应于约24小时内约100%释放和约12小时50%释放的释放速率。这种负载和对应的速率将使得母亲可每天仅服用一剂(从而促进打破每日多剂量的惯例),同时使得形成每天服用一剂的例行习惯(从而促进打破每几天服用一剂的惯例)。

[0081] 根据Alexeev, *Neuropharmacology*, 2012年6月,第62卷第8期,第2507-14页,和厚朴酚和厚朴酚是非常有效的GABA (A) δ 激动剂,因为在约10 μ Mol/L的浓度下,每种增加GABA电流至少约800%。

[0082] 和厚朴酚和厚朴酚存在于木兰树的果实和树皮中。和厚朴酚被建议用于治疗婴儿的产后疼痛(Woodbury, *J Nat Prod.*, 2015年11月25日,第78卷第11期,第2531-6页)。因此,它似乎是母亲安全给药的良好候选剂,而不用太担心影响母乳喂养婴儿的健康。

[0083] 在一个实施方案中,和厚朴酚/鞣花酸自组装结构基本上根据制备鞣花酸自组装结构的配方(公开于Frayne, *Materials Express*, 2012年,第2卷第4期,第335-343页)制备。在一个此类假想实施方案中,在pH 7的水溶液中制备10%和厚朴酚/90%鞣花酸组装体。将50mL 9mM鞣花酸和1mM厚朴酚的储备溶液溶于0.1M NaOH中并过滤。向滤液中加入0.1M柠檬酸溶液,以将溶液的pH值调节至8。在制备细长夹层结构的一些实施方案中,使上述混合物生长最多15分钟(从而防止发生聚合)。将形成的组装体超声处理三十分钟,用水洗涤和去离子,并在进一步分析之前以15000rpm离心两次。

[0084] 自组装的和厚朴酚/鞣花酸混合胶束结构是有用的,因为也已知鞣花酸可用于治疗糖尿病。因此,使用单一结构,临床医生可对同一母亲治疗产后抑郁症和妊娠糖尿病。

[0085] 这些自组装组合可通过口腔、鼻内、颊或肺部途径施用。如上所述,肺部途径是优选的。

[0086] 还认识到,存在天然分子(植物化学物质和代谢物)的许多其他另外组合,其第一分子具有足够的类表面活性剂质量,以形成自组装的超结构,诸如胶束、MLV、大单层囊泡(LUV)、脂质体、圆柱体、纤维和圆盘,并且第二活性分子具有足够的结构以整齐地嵌套在超结构中,从而提供增强的粘结性并因此提供缓慢的释放速率。表1中提供了一些这些分子组合的列表。这些自组装组合可通过口腔、鼻内、颊或肺部途径施用。如上所述,肺部途径是优选的。

[0087] 桃金娘烯醇和马鞭草烯醇中的每一个也是100 μ M的GABA (A) δ 激动剂。Van

Brederode, *Neuroscience Letters*, 2016年, 第628卷, 第91-97页。桃金娘烯醇和马鞭草烯醇中的每一个均是 α -蒎烯(松子)的主要代谢物。Schmidt, *Arch.Toxicol.*, 2015年12月17日, 并且已被FDA确定为公认安全 (GRAS) (Duke, 2000)。

[0088] 在一个实施方案中, 自组装的马鞭草烯醇或桃金娘烯醇胶束基本上根据制备樟脑胶束的配方 (Turina, *Biophysical Chemistry*, 2006年, 第122卷, 第101-113页) 制备。在一个此类假想实施方案中, 将马鞭草烯醇以高于0.01mM的浓度分散在水中。

[0089] 在另一个实施方案中, 通过首先将马鞭草烯醇分散在有机溶剂中, 旋转蒸发溶剂以在烧瓶底部形成薄膜, 在搅拌下使膜水合以形成MLV, 从而制备自组装马鞭草烯醇脂质体。脂质体可以通过进一步在溶液上进行剪切来制备。在一些实施方案中, 剪切由高速共混器产生。在其他实施方案中, 剪切由市售的超声清洁剂产生。LUV可如上进行制备。

[0090] 还认识到, 存在许多其他另外的天然分子(植物化学物质和代谢物), 如马鞭草烯醇和桃金娘烯醇分子, 它们也具有足够的类表面活性剂质量, 可自己形成自组装结构, 诸如胶束、MLV、LUV、脂质体、圆柱体、纤维和圆盘。也就是说, 自组装结构基本上由天然分子组成。表2中提供了一些这些分子的列表。这些自组装结构可通过口服、鼻内、颊或肺部途径施用。如上所述, 肺部途径是优选的。在一些实施方案中, 自组装结构基本上由植物化学物质组成。在一些实施方案中, 自组装结构基本上由内源性分子组成。在一些实施方案中, 自组装结构基本上由人代谢物组成。

[0091] 薄膜水合方法可用于从表1和表2中所列的组合和分子制备MLV、大单层囊泡 (LUV) 和脂质体。

[0092] 为了制备自组装MLV, 首先将表面活性剂分散在旋转蒸发烧瓶中的有机溶剂中, 并且蒸发溶剂, 在烧瓶底部留下薄膜。然后用水水合该薄膜, 并且轻轻搅动烧瓶以形成MLV。

[0093] 在制备LUV的另一个实施方案中, 如上制备自组装MLV, 然后将MLV挤出通过适当尺寸的过滤器以形成LUV。

[0094] 在另一个实施方案中, 如上制备自组装的MLV, 然后在溶液上进行剪切以产生脂质体。在一些实施方案中, 剪切由高速混合器产生。在其他实施方案中, 剪切由市售的超声清洁剂产生。

[0095] 在一些实施方案中, 催产素或其类似物以有效治疗产后抑郁症 (PPD) 的量提供在脂质体的水核中。

[0096] 表1

[0097]

分子	作用方式	应用	自组装行为的基本原理
厚朴酚	GABA(A) δ 激动剂	产后抑郁症; 癌症 (HIF)	嵌入鞣花酸, 其形成夹层(1)
和厚朴酚	GABA(A) δ 激动剂	产后抑郁症; 癌症	嵌入鞣花酸, 其形成夹层(1)

[0098] (1) Barnaby, *Nanosci.Nanotech.* 9:7579-86 (2011)

[0099] 表2

[0100]

分子	作用方式	应用	自组装行为的基本原理
冰片	GABA(A) δ 激动剂	抑郁症	看起来像樟脑
萝卜硫素	Nrf2	自闭症；乳腺癌转移；COPD	与辛基甲基亚砷相似(2)
紫苏醇	Ras 抑制剂	多形性成胶质细胞瘤	与薄荷醇相似
蒜素	抗生素	耳部感染	与蓖麻酸钠相似(3)
2-花生四烯酰甘油(2-AG)	内源性大麻素	产后抑郁症	与形成脂质体的神经酰胺相似(4)
花生四烯酰乙醇酰胺	内源性大麻素	产后抑郁症	与神经酰胺相似
油酸酰胺	内源性大麻素	产后睡眠	与神经酰胺相似
17-羟基二十二碳六烯酸	神经保护素的前体	产后抑郁症；糖尿病	与 DHA 相似(5)；与蓖麻油酸相似
橘皮苷	上调 BDNF	产后抑郁症；糖尿病	糖基化类黄酮
1,8-桉叶油素	脑波	情绪提高	(6)
神经节苷脂 GM3	容纳有催产素的自组装脂质体	产后抑郁症	与卵磷脂相似
金丝桃苷	抗抑郁药； β 2-肾上腺素能阻滞剂 (β -受	产后抑郁症；转移性乳腺癌	糖基化类黄酮

[0101]

	体阻滞剂)		
槲皮素-3-葡萄糖苷酸(Q3G)	β 2-肾上腺素能阻滞剂 (β -受体阻滞剂)	转移性乳腺癌	与金丝桃苷相似
芦丁	金丝桃苷的前体	转移性乳腺癌	双糖基化类黄酮
普萘洛尔	β 2-肾上腺素能阻滞剂 (β -受体阻滞剂)	转移性乳腺癌; 高血压	经典极性阳离子头和亲脂尾
藏红花酸/藏红花素	抗抑郁药	产后抑郁症	具有类似二酸结构的双头基两亲分子(7)
10-羟基癸烯酸	促进神经干细胞的神经发生	抗抑郁药; 癌症	羟基和羧基端
红没药醇氧化物 A			用大豆皂苷/人参皂苷嵌入
鞘氨醇-1-磷酸酯(S1P)	干细胞趋化剂	用于 DDD 的椎间盘内注射; 融合剂	与卵磷脂相似
2-羟基油酸	抗癌剂	胶质瘤; 白血病; 乳腺癌; 以及结肠癌	经典极性头疏水尾表面活性剂结构
橄榄苦苷	抗癌	乳腺癌	经典糖基化头疏水尾表面活性剂结构

[0102] (2) Ioyota等人, Colloid Interface Sci.299 (1) :428-34 (2006)

[0103] (3) Shinde等人, Phys.Chem.96:5160-5 (1992)

[0104] (4) Park等人, Biochem.Biophys.Res.Commun.435 (3) :361-6 (2013)

[0105] (5) Mooibroek等人, Int.J.Radiat.Biol.Relat.Stud.Phys.Chem.Med.42 (6) :601-9 (1982) .

[0106] (6) Turina等人, Biophys.Chem.122 (2) :101-13 (2006) .

[0107] (7) Zhang等人, J.Colloid Interface Sci.261 (2) :417-22 (2003) .

[0108] 不希望受理论束缚, 据信围产期抑郁症 (PND) 不是单一病症, 而是由至少六种不同表型组成的异质性失调。本文提供了一系列新型产品, 每种产品为六种PND表型中的至少一种提供定制的药物。由于对通过母乳喂养将这些产品转移给婴儿的可能性敏感, 因此定制的溶液仅使用安全性特征极高的分子 (即营养物质、其代谢物或内源性分子)。

[0109] 表3提供了对至少一些假设表型以及针对表型的定制解决方案的描述。

[0110] 表3

[0111]

表型	具体实施方式	定制解决方案
1a	产后: GABA δ 受体表达在分娩后没有	别孕烯醇酮/大豆皂苷混合自组

[0112]

	充分反弹	装结构
1b	产前: GABA δ 受体表达在怀孕期间发育过于不良	和厚朴酚/鞣花酸混合自组装结构
2	产后: 分娩后未能调节雌激素水平	雌马酚/大豆皂苷混合自组装结构
3	产后: 不希望受理论束缚, 据信催产素水平不会如期望的那样产后随着皮质醇的相应减少而增加。据推测, 升高的皮质醇水平阻断了催产素的有益效果, 因此一种解决方案是降低压力水平以使催产素起作用	锌螯合催产素胶束
4a	产前: 潜在的炎症导致疼痛、睡眠不佳、焦虑和沉思 妊娠期糖尿病通常与产前抑郁症表型一起出现	浓缩 17-OH DHA 17-OH DHA 对预防或控制妊娠期糖尿病也有效
4b	产后: 源于复杂分娩的炎症无法消退, 从而导致疼痛、睡眠不佳、焦虑和沉思, 但比表型 4a 更剧烈和强烈	用螯合的 Trkb-激动的羟基黄酮和/或 Trkb-激动的混合自组装结构进行治疗

[0113] 别孕烯醇酮/大豆皂苷混合自组装结构:最近,Sage Pharmaceuticals公司公布了针对产后抑郁症(PPD)母亲静脉注射别孕烯醇酮(SG-547)的II期试验的非常积极的结果。虽然令人鼓舞,但静脉内给药的要求使得Sage治疗最不方便,并且可能经常不符合要求。

[0114] 我们开发了一种涉及别孕烯醇酮和大豆皂苷混合胶束的治疗方法。存在于大豆婴儿配方食品中的大豆皂苷(Fonseca,Food Chem.,2014年1月15日,第143卷,第492-8页)具有已证明的安全性特征,也是能够形成胶束超结构的表面活性剂(DeCroos,Food Chemsitry,2007年,第101卷,第324-323页)。我们已进行了新的观察,发现别孕烯醇酮和大豆皂苷具有共同的结构。由于这种结构的共性,据信别孕烯醇酮将嵌入大豆皂苷超结构中。这种嵌入将在别孕烯醇酮和大豆皂苷超结构之间产生增强的结合力,从而导致别孕烯醇酮以非常慢的速率从胶束释放,这将允许每天一次给药。

[0115] 和厚朴酚/鞣花酸混合自组装结构:产后抑郁症(PPD)的一个假设是,母亲的大脑GABA δ 受体在生产后未能反弹(Maguire,Pyschoneuroendocrinology,2009年12月,34(Supp1)S84-S90),随后的PPD可以通过施用GABA δ 激动剂来改善(Maguire,Neuron,2008年7月31日,第59卷第2期,第207-213页)。我们已经开发出涉及嵌入和厚朴酚的鞣花酸自组装结构的用于这种表型的治疗方法。存在于木兰树皮中并且已被提议用于治疗婴儿疼痛(Woodbury,J Nat Prod.,2015年11月25日,第78卷第11期,第2531-6页)的和厚朴酚是一种高效的GABA δ 激动剂,其在10 μ M时体外GABA电流增加约900%(Alexeev,Neuropharmacology,2012年6月,第62卷第8期,第2507-2514页)。存在于草莓中并且已被FDA宣布为GRAS的鞣花酸是一种联苯基结构,其可与其他鞣花酸分子形成强烈的 π - π 键(Frayne,Mater.Express,2012年,第2卷第4期,第335-343页),因此可自组装(Barnaby,J.Nanosci.Nanotechnol.,2011年9月,第11卷第9期,第7579-86页)。我们已进行了新的观察,发现和厚朴酚和鞣花酸共享具有多个从其延伸的羟基的共同联苯基结构。由于这种共

性,据信和厚朴酚将嵌入鞣花酸超结构中,从而以非常慢的速率从鞣花酸自组装结构中释放出来。

[0116] 雌马酚/大豆皂苷混合自组装结构:据报道,与PPD风险相关的DNA甲基化与雌激素诱导的DNA甲基化变化显著相关,表明有PPD风险的人群对基于雌激素的DNA甲基化重编程的敏感性增强(Guintivano,Mol.Psychiatry,2014年5月,第19卷第5期,第560-7页),并进一步表明雌激素可以治疗一些患有这种PPD表型的母亲。然而,对雌激素可能与癌症相关的副作用的担忧阻碍了它的使用。异黄烷醇雌马酚是一种大豆代谢物,其对 β 雌激素(非癌症)受体(ER β)具有选择性(Sareddy,Chin.J.Nat.Med.,2015年11月,第13卷第11期,第801-7页),因此不会带来癌症风险。雌马酚通过摄入豆制品产生,并且被认为具有极好的安全性特征。我们已进行了新的观察,发现雌马酚和大豆皂苷具有共同的结构,因此推测雌马酚会嵌入大豆皂苷超结构中,从而以非常慢的速率从胶束中释放出来。

[0117] 锌螯合催产素:虽然一些研究报告了催产素对PPD母亲的益处,但其不能穿过血脑屏障(Chapman,Pharm Res.,2013年10月,第30卷第10期,第2475-84页)(因此需要鼻内给药途径),并且其半衰期短(~ 6.8 分钟)(Paccamonti,Equine VetJ.,1999年7月,第31卷第4期,第285-8页),因此需要每天多次给药,这阻碍了其更广泛的使用。虽然催产素不被认为是两亲性的,但是本文进行了一些新的观察,发现几篇期刊文章显示锌螯合催产素的图表看起来具有亲水性和疏水性位点的表面活性剂样分布。这些文章包括:(a)Wytttenbach,J.Am.Chem.Soc.,2008年,第130卷,第5993-6000页。注意,在Wytttenbach的图9c中,螯合物上部的Ile、Tyr、Leu和Pro疏水残基的聚集以及螯合物下部的Asn和Gln亲水残基的聚集;(b)Fuller,J.Am.Soc.Mass Spectrom.,2016年,第27卷,第1376-82页。注意,在Fuller的图4中,图的右下部分周围的Pro、Leu、Tyr和Ile疏水残基的聚集,以及图的左上部分的亲水性Glu和Asn残基的聚集;以及(c)Liu,J.Am.Chem.Soc.,2005年,第127卷第7期,第2024-5页。注意,在Liu的图2c中,图的右上部分周围的Ile、Tyr和Leu疏水残基的聚集,以及图的左下部分周围的Glu、Asn和Gly-NH₂残基的聚集。

[0118] 此外,据报道,这种锌螯合催产素比催产素自身更好地与OXT受体结合(Liu,J.Am.Chem.Soc.,2005年2月23日,第127卷第7期,第2024-5页)。我们开发了一种基于磷脂酰胆碱的缓释装置,该装置利用锌螯合催产素的类似表面活性剂的性质,其中锌螯合催产素嵌入标准磷脂酰胆碱胶束中。由于锌螯合催产素具有分别与磷脂酰胆碱胶束的亲水部分和疏水部分结合的亲水区域和疏水区域,因此它将极大地增强与胶束超结构的结合,从而提供较慢的释放速率。

[0119] 在其他实施方案中,锌螯合催产素形成选自胶束、脂质体或多层囊泡的自组装结构。

[0120] 浓缩17-OH DHA:17-羟基二十二碳六烯酸(17-OH DHA)是一种高度亲脂性的鱼油代谢物和神经保护素的代谢前体(Basselin,J Lipid Res.,2010年5月,第51卷第5期,第1049-56页),神经保护素是一种有效的抗炎剂,可强烈上调神经元中的bcl-2(Bazan,J.Lipid Research,2010年,第51卷,第2018-2031页,以及Mukherjee,PNAS U S A.,2004年1月1日,第101卷第22期)。因为bcl-2上调被认为可以增强突触可塑性(Manji,Biol Psychiatry.,2003年4月15日,第53卷第8期,第707-42页)并且炎症是PND的一种产前表型的一种生物标记(Roomruangwong,Mol.Neurobiol.,2016年2月5日),给产前抑郁的母亲施

用17-OH DHA应该有利于减轻该孕妇的产前抑郁症。此外,大鼠研究显示17-OH DHA可以缓解糖尿病的症状(Neuhofer,*Diabetes.*,2013年6月,第62卷第6期,第1945-56页)。最后,在母乳中发现了17-OH DHA(Weiss,*Lipids Health Disease*,2013年,第12卷,第89页),从而验证了其安全性。因此,17-OH DHA似乎是对产前抑郁的母亲(尤其是患有妊娠糖尿病的母亲)的最佳候选剂。

[0121] A. 锌17-OH DHA螯合物:我们开发了一种从牛乳中浓缩17-OH DHA的新方法。首先,我们从广泛可获得的乳脂肪部分(其是脱脂乳生产的副产品)开始。接下来,我们进行了新的观察,发现17-OH DHA与蓖麻油酸具有很大的结构相似性,并且我们认为螯合的复合蓖麻油酸锌具有增强的水中溶解度。因此,我们认为17-OH DHA与锌形成螯合物基本上与蓖麻油酸与锌形成螯合物的方式相同,并且螯合的17-OH DHA复合物同样具有增强的水中溶解度。因此,我们建议通过其锌螯合作用和随后螯合物向水相中的运动来浓缩来自脂肪部分的17-OH DHA。所得水相的新型组分(其可能还含有抗炎剂、可螯合的消退素和脂氧素)可作为富含17-OH DHA的产品销售。

[0122] B. 环糊精-17-OH DHA复合物:提供了第二种从牛乳中浓缩17-OH DHA的新方法。该方法从广泛可获得的乳脂部分(其是脱脂乳生产的副产品)开始。在其他实施方案中,起始流体是海洋油,例如鱼油、磷虾油或藻油。在其他实施方案中,起始流体是藻类衍生的油。接下来,观察到长链脂肪酸的熔点基本上受分子中顺式双键的数目的控制,如表4所示。由于17-OH DHA具有五个双键,因此它可能是熔点最低的乳脂中的脂肪酸中的一者。可以利用该特征将17-OH DHA浓缩在乳脂中。因此,在一个实施方案中,将乳脂部分在约-20℃至-40℃的温度范围内进行选择冷冻,从而将最低熔点分子(即,那些具有4-6个顺式键的脂肪酸)与脂肪部分的其余部分分离。据信该步骤除去了乳脂肪部分中约95%的脂肪组分,因此将17-OH DHA浓缩约19倍。

[0123] 表4

[0124]

组分	顺式双键	浓度	熔点(℃)
棕榈酸	0	23.96%	64
硬脂酸	0	6.91%	70
油酸	1	46.29%	13
棕榈油酸	1	3.35%	1
亚油酸	2	14.42%	-5
γ-亚麻酸	3	0.09%	-11
α-亚麻酸	3	1.07%	-12

[0125]

花生四烯酸	4	2.09%	-49
二十二碳六烯酸	6	1.15%	-44
二十碳五烯酸	5	0.08%	-65
脂氧素 A4	1	15.55ng/mL	?
消退素 E1	2	4.24ng/mL	?
消退素 D1	3	9.42ng/mL	?
17-OH DHA	5	53.38ng/mL	?

[0126] Weiss等人, *Lipids Health Disease*, 2013年, 第12卷, 第89页, 表1-3

[0127] 接下来, 我们观察到单羟基脂肪类物质被细胞快速吸收并酯化成甘油三酯 (Stenson, *Prostaglandins*, 1983年8月, 第26卷第2期, 第253-64页, 以及Brezinski, *PNAS USA*, 1990年8月, 第87卷第16期, 第6248-52页), 并且由于脂肪细胞广泛存在于乳房中, 因此可以合理地推断母乳中的脂肪酸也以甘油三酯形式存在。然后我们观察到可通过PLA2从甘油三酯中选择性地释放羟基脂肪酸, 而不从甘油三酯中释放非羟基化脂肪酸物质 (van Kuijk, *Trends in Biochem.Sci.*, 1987年, 第12卷, 第31-34页; Bayon, *Plant Physiology*, 2015年4月, 第167卷, 第1259-70页; 以及Bafor, *Biochem.J.*, 1991年, 第280卷, 第507-514页)。因此, 我们可通过使低MP乳脂部分与固定的PLA2接触来选择性地从其亲本甘油三酯中释放羟基脂肪酸。

[0128] 一旦羟基脂肪酸 (和尤其是17-OH DHA) 以其游离形式存在, 则它们可通过使溶液与环糊精接触而从溶液中选择性地移除。 β -环糊精是具有约7埃的内部孔径的亲脂性管 (US 4902788), 因此 β -环糊精可用于移除/浓缩尺寸小于7埃的亲脂性分子。由于DHA的顺式键驱动折叠使其具有约5埃的径向尺寸 (Yonezawa, *Int.J.Mol.Med.*, 2006年10月, 第18卷第4期, 第583-8页, 表1), 并且17-OH DHA在结构上非常相似, 因此可以合理地得出结论, 17-OH DHA具有约7埃的径向尺寸, 因此同样可以进入并因此浓缩在环糊精中。此外, 非羟基化脂肪酸诸如DHA保持甘油三酯形式。因为DHA甘油三酯中存在3个DHA分子, 所以甘油三酯的尺寸可能为约15埃, 因此太大而不能被 β -环糊精捕获。因此, 环糊精可选择性地浓缩从甘油三酯游离的17-OH DHA。

[0129] 在一个实施方案中, 环糊精作为环糊精碳酸盐纳米颗粒存在, 如Zhang, *Intl.J.Nanomedicine*, 2015年, 第10卷, 第3291-3302页所述。据信环糊精和碳酸盐组分对于婴儿都是完全安全的。由于Zhang的环糊精-碳酸盐纳米颗粒的孔径为约136-242埃, 17-OH DHA (尺寸为5埃) 可以容易地扩散穿过其孔系, 最终被环糊精捕获。此外, 环糊精碳酸盐纳米颗粒可用于构建过滤柱, 通过该过滤柱可使游离的羟基化脂肪酸溶液通过。一旦进入环糊精碳酸盐纳米颗粒柱, 游离羟基化脂肪酸 (包括17-OH DHA) 将进入环糊精的孔并由此被捕获。

[0130] 在另一个实施方案中, 环糊精被沸石代替。几个世纪以来, 孕妇以粘土的形式摄取沸石, 以捕获粘土的营养矿物质含量, 缓解呕吐和恶心, 并保护消化道。沸石的孔径为约10埃 (Du, *J.Physics Chem.Solids*, 2007年, 第68卷, 第1692-99页), 因此沸石可用于移除/浓缩尺寸小于10埃的分子。由于DHA的顺式键驱动折叠使其具有约5埃的径向尺寸 (Yonezawa, *Int.J.Mol.Med.*, 2006年10月, 第18卷第4期, 第583-8页, 表1), 并且17-OH DHA在结构上非

常相似,因此可以合理地得出结论,17-OH DHA同样可以浓缩在沸石中。

[0131] 在另一个实施方案中,环糊精被中孔二氧化硅代替。中孔材料的孔径为20-500埃(维基百科),因此它们可用于移除/浓缩尺寸小于50-300埃的亲脂性分子。因为DHA的尺寸为5埃,并且17-OH DHA在结构上非常相似,所以可以合理地得出结论,17-OH DHA同样可以在中孔二氧化硅中浓缩。

[0132] 在另一个实施方案中,环糊精被十八烷基甲硅烷基二氧化硅(OSS)代替。OSS已被用于从磷脂中选择性地移除/浓缩羟基化分子(即前列腺素)(Powell, *Prostaglandins*, 1980年11月,第20卷第5期,第947-57页)。由于17-OH DHA同样是羟基化的,因此可以合理地得出结论,17-OH DHA同样可以在OSS中浓缩。

[0133] 总之,可通过以下步骤制备17-OH DHA浓缩的乳部分:(a)从乳中除去脂肪部分,(b)在约-30℃冷冻脂肪部分,以从较高熔点的脂肪酸中分离出低熔点脂肪酸,(c)使低熔点分子与固定的PLA2接触以选择性地从甘油三酯中除去羟基脂肪酸,以及(d)使游离羟基脂肪酸与环糊精(或上述取代基)接触以选择性捕获游离羟基脂肪酸而不捕获甘油三酯。

[0134] 然后可使患者口服施用17-OH DHA/环糊精复合物,其中17-OH DHA被环糊精缓慢释放。

[0135] 因此,提供了一种由含DHA的流体制备浓缩的羟基脂肪酸部分的方法,所述流体包含i)低熔点脂肪酸和ii)高熔点脂肪酸,其中两种酸均存在于甘油三酯中,所述方法包括以下步骤:(a)冷冻流体以从其中包含的高熔点脂肪酸中分离出低熔点脂肪酸,从而产生包含亲本甘油三酯的低熔点富集流体,(b)使富含低熔点脂肪酸的流体与PLA2体外接触,以使羟基脂肪酸从其甘油三酯中选择性地游离出来,从而产生富含游离羟基脂肪酸的流体,以及(c)使富含游离羟基脂肪酸的流体与浓缩物体外接触,以在浓缩物内选择性地捕获游离的羟基脂肪酸,从而产生其上吸附有羟基脂肪酸的浓缩物。

[0136] 优选地,冷冻步骤在约-20℃至-40℃下进行。起始流体可选自海洋油、藻油和乳。在一些实施方案中,在步骤a)之前执行从乳中分离出脂肪部分的步骤,并且对分离的脂肪部分执行步骤b)。

[0137] 在一些实施方案中,浓缩物以环糊精碳酸盐纳米颗粒的形式存在。在另一些实施方案中,浓缩物选自环糊精、沸石、中孔二氧化硅和十八烷基甲硅烷基二氧化硅(OSS)。

[0138] 在一些实施方案中,所述方法还包括步骤(d)向人施用其上吸附有羟基脂肪酸的浓缩物。

[0139] 在一些实施方案中,其上吸附有羟基脂肪酸的浓缩物富含吸附的17-OH DHA。

[0140] 在一些实施方案中,浓缩物为固体多孔体,并且羟基脂肪酸被吸附在浓缩物的孔隙内。

[0141] 在一些实施方案中,PLA2是固定的PLA2。

[0142] 在一些实施方案中,所述方法还包括以下步骤:(d)从浓缩物中释放羟基脂肪酸,以产生富含羟基脂肪酸的溶液,以及(e)向人施用富含羟基脂肪酸的溶液。

[0143] 还提供了一种由含DHA的流体制备浓缩的羟基脂肪酸部分的方法,所述流体包含含有羟基脂肪酸的甘油三酯,所述方法包括以下步骤:(a)使流体与PLA2体外接触,以使羟基脂肪酸从其甘油三酯中选择性地游离出来,从而产生富含游离羟基脂肪酸的流体,以及(b)使富含游离羟基脂肪酸的流体与浓缩物体外接触,以在浓缩物内选择性地捕获游离的

羟基脂肪酸,从而产生其上吸附有具有羟基脂肪酸的浓缩物。该方法还可包括步骤(c)向人施用其上吸附有具有羟基脂肪酸的浓缩物。

[0144] 该方法还可另选地包括以下步骤:(c)从浓缩物中释放羟基脂肪酸,以产生富含羟基脂肪酸的溶液,以及(d)向人施用富含羟基脂肪酸的溶液。

[0145] 在一些实施方案中,从富含游离羟基脂肪酸的流体中选择性地移除其上吸附有羟基脂肪酸的浓缩物。

[0146] 在一些实施方案中,该方法还可包括将其上吸附有羟基脂肪酸的浓缩物与流体分离。

[0147] 在一些实施方案中,所述方法还包括步骤(c)向人施用分离的其上吸附有羟基脂肪酸的浓缩物,其中每天施用一次。

[0148] 还提供了一种由含DHA的流体制备浓缩的羟基脂肪酸部分的方法,所述流体包含含有羟基脂肪酸的酯,所述方法包括以下步骤:(a)使流体与酶体外接触,以使羟基脂肪酸从其酯中选择性地游离出来,从而产生富含游离羟基脂肪酸的流体,以及(b)使富含游离羟基脂肪酸的流体与浓缩物体外接触,以在浓缩物内选择性地捕获游离的羟基脂肪酸,从而产生其上吸附有具有羟基脂肪酸的浓缩物。

[0149] 螯合厚朴酚复合物:厚朴酚是和厚朴酚的异构体,也来自木兰树皮。此外,厚朴酚同样是GABA δ 激动剂,在10 μ M浓度下GABA电流增加约900%(Alexeev, *Neuropharmacology*, 2012年6月,第62卷第8期,第2507-2514页)。因此,厚朴酚被认为是上文讨论的和厚朴酚/鞣花酸组装体中和厚朴酚的合适替代物。

[0150] 此外,对厚朴酚结构的研究揭示了厚朴酚的另一个有趣特征。具体地讲,已观察到如果厚朴酚的苯环适当旋转,则位于不同环上的两个羟基彼此接近。当羟基处于这种“紧密接近”构象时,据信厚朴酚可与金属离子形成螯合的复合物。

[0151] 从多种观点来看,螯合的厚朴酚复合物很有意思。首先,与纯厚朴酚的极差的水中溶解度相反,螯合的厚朴酚复合物可能是高度水溶性的。螯合的厚朴酚复合物的高水溶性通过提供高分散性增强厚朴酚接近胃肠道中的上皮细胞的能力,并因此增加其在口服给药中的生物利用度。

[0152] 螯合的7,8二羟基黄酮复合物:7,8二羟基黄酮(7,8DHF)是一种存在于*Godmania aesculifolia*、长柄菊和报春花树叶中的天然类黄酮化合物。它也可作为补充剂获得。Liu报道7,8-DHF(可口服且可BBB渗透)可特异性激活小鼠海马体中的TrkB受体(以250nM的低浓度)及其下游PI3K/Akt和MAPK受体。7,8-DHF可保护神经元免受兴奋毒性和氧化应激诱导的细胞凋亡和细胞死亡。此外,7,8-DHF可促进创伤性脑损伤皮质神经元的存活并减少细胞凋亡(Liu, *Trans. Neurodegener.*, 2016年,第5卷,第2页)。因此,7,8DHF作为抗抑郁药受到关注。

[0153] 对7,8DHF分子的检测揭示了与芳环连接的相邻羟基。已知这种结构具有与金属形成螯合复合物的能力。

[0154] 据信,7,8DHF的螯合复合物具有高水溶性,因此允许其均匀分散在胃肠道的水相中,从而提高其生物利用度。一旦充分分散的7,8DHF螯合复合物进入胃中,其中的高酸含量将从其与7,8DHF的复合物释放金属离子,从而在溶液中留下充分分散的游离7,8DHF。

[0155] 同样根据Liu,还已知7,8,2'DHF和7,8,3'三羟基黄酮(THF)也是有效的Trkb激动

剂,使Akt磷酸化增加超过150%。Liu, *J. Med. Chem.*, 2010年12月9日,第53期第23卷,第8274-86页。因为这些分子还具有与芳环连接的相邻羟基的结构,所以同样认为这种结构具有与金属形成螯合复合物的能力。因此,据信7,8DHF、7,8,2'THF或7,8,3'THF (以及在6位和7位均具有羟基的其他TrkB活性羟基黄酮)的螯合物复合物将具有高水溶性,因此允许其均匀分散在胃肠道的水相中,从而提高其生物利用度。

[0156] 一旦充分分散的羟基类黄酮螯合复合物进入胃中,其中的高酸含量将从其与羟基类黄酮的复合物释放金属离子,从而在溶液中留下充分分散的游离羟基类黄酮。

[0157] 由于已经显示这些在6,7或7,8位具有羟基的羟基黄酮是Trkb激动剂,并且TrkB是BDNF的主要受体,因此认为,这些植物化学物质将为用于被诊断为患有PND的母亲的良好治疗候选药物,其中被诊断为患有PND的母亲具有低血清BDNF水平,因为植物化学物质将用于增强前所未有的不足以激活TrkB受体的血清BDNF水平。此外,据报道,妊娠早期期间的低血清BDNF水平与产前抑郁症之间存在关联 (Fung, *BMC Psychiatry*, 2015年3月10日,第15,43页)。因此,据信,这些螯合物对于在妊娠早期具有低血清BDNF水平的母亲来说是良好的候选药物,以便预防产前抑郁症在这些母亲中的发作。

[0158] c. 7,8二羟基黄酮/橙皮素葡萄糖苷酸混合的自组装结构:橘皮苷是在柑橘中发现的天然类黄酮糖苷。它的去糖基化类黄酮代谢物(橙皮素)通常在人母乳中大量存在(高达微摩尔水平) (Song, *Nutrition*, 2013年1月;29 (1):195-202)。还已知,施用橘皮苷可提高慢性抑郁大鼠中的BDNF水平 (Donato, *Brain Res. Bull.*, 2014年5月;104:19-26)。此外,它的代谢物橙皮素诱导BDNF (Hwang, *J. Agric. Food Chem.*, 2011年5月25日;59 (10):5779-85)。另一种代谢物橙皮素葡萄糖苷酸的log P为0.12 (Chemspider),因此,可合理地假设,橙皮素葡萄糖苷酸将用作表面活性剂,从而具有形成胶束、脂质体和MLV的能力。

[0159] 还观察到,黄烷酮橙皮素葡萄糖苷酸与黄酮醇7,8DHF共享相同的基本类黄酮结构(除双键之外)。因此,据信,7,8DHF可嵌入橙皮素葡萄糖苷酸自组装结构内以形成将从其中缓慢释放7,8DHF的混合结构。

[0160] 已经发现,该相同的橙皮素葡萄糖苷酸分子激活PPAR- γ 受体 ($EC \sim 100 \mu M$),并且因此可能具有作为抗糖尿病剂的用途 (Gamo, *Chem. Pharm. Bull.*, 62 (5), 491-493 (2014))。因此,据信,这种7,8-二羟基黄酮/橙皮素葡萄糖苷酸混合的自组装结构可以用于治疗上述第4a组表型。

[0161] d. 橙皮素/橙皮素葡萄糖苷酸混合的自组装结构:如上所述,已知在母乳中大量存在橙皮素,并且已知其可诱导BDNF。因此,它是用作PND的抗抑郁药的有吸引力候选药物。然而,它的高亲脂性 ($\log P = 2.90$) 使得其在水中具有低分散性并因此具有低生物利用度。还观察到,橙皮素与其代谢物橙皮素葡萄糖苷酸共享相同的类黄酮结构。如上文所讨论,橙皮素葡萄糖苷酸的两亲性log P使得人们认为它可以自组装。因此,据信,橙皮素可以嵌入橙皮素葡萄糖苷酸自组装结构内以形成将良好地分散在水中(因此具有高生物利用度)的混合结构,并且还可能提供从其中缓慢释放橙皮素的效果。

[0162] e. 乔松素/橘皮苷葡萄糖苷酸混合的自组装结构:据报道,瑞士蜂蜜中的主要类黄酮乔松素可抑制神经细胞的凋亡,其 EC_{50} 仅为100nM (Jang, *PNAS*, 107, 6, 2687-92)。还观察到,橘皮苷葡萄糖苷酸与乔松素共享相同的黄烷酮结构。因此,据信,乔松素可嵌入橘皮苷葡萄糖苷酸自组装结构内以形成将从其中缓慢释放乔松素的混合结构。

[0163] 同样地,由于它们的结构相似性,据信,乔松素可嵌入皂苷自组装结构(诸如,大豆皂苷自组装结构)内以形成将从其中缓慢释放乔松素的混合结构。

[0164] f.7,8二羟基黄酮/7,8二羟基黄酮葡萄糖苷酸混合的自组装结构:如上所述,7,8二羟基黄酮是作为PND抗抑郁药的有吸引力候选药物,因为它是高效的TrkB激动剂。现在观察到,它的代谢物7,8二羟基黄酮葡萄糖苷酸与橙皮素葡萄糖苷酸共享相同的结构,并且因此可能具有与橙皮素葡萄糖苷酸类似的两亲性log P。这种两亲性特性使得7,8二羟基黄酮葡萄糖苷酸成为自组装结构的良好候选者。

[0165] 还观察到,7,8-二羟基黄酮葡萄糖苷酸与7,8-二羟基黄酮共享相同的类黄酮结构。因此,据信,7,8-二羟基黄酮可嵌入7,8-二羟基黄酮葡萄糖苷酸自组装结构内以形成混合结构,该混合结构将提供7,8二羟基黄酮的高生物利用度并且将从其中缓慢释放7,8二羟基黄酮。

[0166] 对于上述螯合物,据信,这些增强BDNF或激活TrkB的自组装结构对于在妊娠早期具有低血清BDNF水平的孕妇来说是良好的候选药物,以便预防产前抑郁症在这些母亲中的发作。

[0167] g. 金丝桃苷/G-芦丁 (SJW) 混合的自组装结构:圣约翰草 (SJW) 是被诊断为患有PND的哺乳母亲可用的少数抗抑郁制剂之一,有证据证明,圣约翰草是安全的和有效的。据报道,体内大鼠实验表明,SJW中的金丝桃苷(0.6mg/kg)和槲皮素-3-葡萄糖苷酸(0.6mg/kg)成分(与贯叶金丝桃素一起)似乎为SJW抗抑郁效果的活性成分,其通过将ACTH和皮质醇的血浆水平降低40%至70%来减少HPA轴作用,从而起到抗抑郁的作用(Butterweck, *Planta Med.*, 2000年2月, 66 (1) 3-6)。由于对SJW及其副作用存在一些担忧,特别是SJW中的贯叶金丝桃素与血压药物之间的有害相互作用(Narhstedt, *J. Nat. Prod.*, 2010年5月, 73 (5) 1015-21),向PND母亲仅提供SJW的有益成分似乎是一个有吸引力的选择。在这方面,特别是金丝桃苷似乎有希望成为PND治疗的选择,因为已经证明,它可以提高PC12细胞中的BDNF转录(Zheng, *Phytomedicine*, 2012年1月15日, 19 (2) 145-9)。此外,富含金丝桃苷的制剂(Venetron)可在美国商购获得,并且在临床上已经被证明可改善抑郁症的症状。Maypro, “Venetron: A Promising New and Efficacious Dietary Ingredient for mood support and sleep”。

[0168] 然而,还观察到,金丝桃苷是相当亲脂的,具有1.75的log P (Chemspider)。由于这种高亲脂性,金丝桃苷可能不是非常易溶于水,并且因此很难获得高的口服生物利用度。此外,作为多羟基黄酮,金丝桃苷可能经历严重的首渡代谢,从而降低其效力。因此,在递送包装中提供可增大其生物利用度和释放曲线的金丝桃苷是一个目标。

[0169] 为了克服该口服生物利用度问题,提出将金丝桃苷容纳在糖基化芦丁(G-芦丁)的自组装结构中。G-芦丁是存在于荞麦和日本槐树中的天然两亲植物化学物质(Morita, *Cereal Chem.*, 1996年, 73 (1) 99-104)。它目前作为Eucerin[®]皮肤乳液中的活性成分在美国销售,并且对太阳过敏的消费者对其特别感兴趣。令人感兴趣的是,据报道,G-芦丁可自组装成胶束聚集体(Tozuka, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2012年9月; 82 (1) : 120-6)。这些胶束应具有高水溶性,因此应具有高口服生物利用度。

[0170] 还应理解,金丝桃苷和G-芦丁因其几乎相同的结构而具有特殊的关系。具体地讲,金丝桃苷和G-芦丁中的每一者均具有基于槲皮素的亲脂性部分和与基础槲皮素分子的相

同3-OH连接的葡萄糖部分。

[0171] 由于它们的化学构型几乎相同,因此认为金丝桃苷将整齐地嵌入到胶束的G-芦丁超结构内。这种整齐的嵌入将导致槲皮素基础分子的亲脂部分之间、基础槲皮素分子的羟基之间以及附着于槲皮素分子的3-OH部分的葡萄糖结构之间的结合增强。这种增强的结合可能导致金丝桃苷从自组装结构中释放的时间延长,这可使循环中的金丝桃苷半衰期更长,从而提高金丝桃苷的生物利用度。因此,将金丝桃苷/G-芦丁混合自组装结构视为磷脂复合物可能是合适的。

[0172] 在一些实施方案中,金丝桃苷/G-芦丁自组装结构本身体现为胶束。在其他实施方案中,金丝桃苷/G-芦丁混合自组装结构本身体现为脂质体。在其他实施方案中,金丝桃苷/G-芦丁自组装结构本身体现为多层囊泡(MLV)。

[0173] h.Q3G/G-芦丁混合自组装结构:进一步观察到Q3G是相当亲脂的,具有2.10的对数P(Chempider)。由于这种高亲脂性,Q3G不是非常水溶性的,因此可能难以获得较高的口服生物利用度。此外,据报道,Q3G的血浆消除半衰期仅为2.33小时(Mullen,Br.J.Nutr.,2006年7月,第96卷第1期,第107-16页)。Mullen还报道,尿液中排泄的代谢物的特征与血浆的代谢物的特征显著不同,其中包括槲皮素-3'-葡萄糖苷酸、两种槲皮素葡萄糖苷硫酸盐和甲基槲皮素二葡萄糖苷酸的许多主要的尿液成分不存在或仅以微量存在于血液中,表明实质上的II期代谢。

[0174] 因此,本发明的目的是提高Q3G的生物利用度和延长半衰期。

[0175] 为了解决这种口服生物利用度问题,建议将Q3G置于糖基化芦丁(G-芦丁)的自组装结构中。G-芦丁是一种两亲分子,据报道它可以自组装成胶束聚集体(Tozuka,Eur.J.Pharm.Biopharm.,2012年9月,第82卷第1期,第120-6页)。这些胶束应具有高水溶性,因此应具有较高的口服生物利用度。因此,G-芦丁应该能够将Q3G从胃肠道充分递送到循环系统中。

[0176] 还应当理解,Q3G和G-芦丁由于其高度相似的结构而具有特殊的关系。具体地讲,Q3G和G-芦丁中的每一种均具有基于槲皮素的亲脂性部分和与基础槲皮素分子的相同3-OH连接的葡萄糖样部分。

[0177] 由于它们的化学构型几乎相同,因此认为Q3G将整齐地嵌入胶束的G-芦丁超结构内。这种整齐的嵌入将导致槲皮素基础分子的亲脂部分之间、基础槲皮素分子的羟基之间以及附着于槲皮素分子的3-OH部分的葡萄糖样结构之间的结合增强。这种增强的结合可能导致Q3G从自组装结构中释放的时间延长,这可使循环中的Q3G半衰期更长,从而提高Q3G的生物利用度。因此,将Q3G/G-芦丁组装结构视为磷脂复合物可能是合适的。

[0178] 在一些实施方案中,G-芦丁/Q3G自组装结构本身体现为胶束。在其他实施方案中,G-芦丁/Q3G自组装结构本身体现为脂质体。在其他实施方案中,G-芦丁/Q3G自组装结构本身体现为多层囊泡(MLV)。

[0179] 由于金丝桃苷和Q3G二者似乎通过降低ACTH和皮质醇水平来促进抗抑郁状态(参见上文的Butterweck),并且上述提出的表型3中表明了高皮质醇水平,似乎本文提出的金丝桃苷/G-芦丁自组装结构和Q3G/G-芦丁自组装结构特别适用于被诊断为患有上述3型表型的母亲。

[0180] i.人参皂苷脂质体和MLV:已经报告,人参皂苷Rg3在几种动物模型中发挥了抗抑

郁作用 (Cui, *J. Psychopharmacol.*, 2012年5月; 26 (5) 697-713)。研究人员还报告, 人参皂苷 Rg2 逆转了应激诱导的抑郁样行为以及前额皮质内的BDNF表达 (Zhu X, *Eur J Neurosci.* 2016年7月; 44 (2) : 1878-85); 人参皂苷Rg1对慢性应激诱导的抑郁样行为、BDNF表达以及PKA和CREB磷酸化的有益作用 (Liu Z, *Neuroscience.* 2016年5月13日; 322: 358-69); 人参皂苷Re对重复制动诱导的抑郁和焦虑样行为的有益作用 (Lee B, *J Microbiol Biotechnol.* 2012年5月; 22 (5) : 708-20); 以及人参皂苷Rg1由于激活海马体中的BDNF信号传导和神经形成来发挥抗抑郁作用 (Jiang, *Br J Pharmacol.* 2012年7月; 166 (6) : 1872-87)。

[0181] 因此, 在一些实施方案中, 向被诊断为患有产前或产后PND的母亲施用人参皂苷自组装结构 (特别是脂质体和MLV)。

[0182] 如上文所讨论, 据报道, 人参皂苷自组装到胶束中, 并且可以将自组装人参皂苷胶束的释放速率调节为数天乃至数月。Xiong, *Int. J. Pharm.* 2008年8月6日; 360 (1-2) : 191-6。通过改变初始溶液中人参皂苷的浓度来进行调节, 其中较高的浓度导致释放速率变慢。熊公开了, 负载决定释放速率。在一些实施方案中, 人参皂苷自组装结构 (特别是Rg3) 的负载目标是提供对应于约24小时内基本上完成释放和在约12小时处50%释放速率的释放速率。这种负载和对应的速率将使得母亲可每天仅服用一剂 (从而促进打破每日多剂量的惯例), 同时使得形成每天服用一剂的例行习惯 (从而促进打破每几天服用一剂的惯例)。

[0183] 在一些实施方案中, 人参皂苷自组装 (特别是Rg3自组装) 结构以脂质体的形式存在。据信, 脂质体形式在经肺部施用人参皂苷自组装 (特别是Rg3自组装) 结构期间具有优势。脂质体通常为100-200纳米的数量级 (因此被归类为细颗粒), 而胶束为约10-20纳米, 比脂质体小得多 (因此被归类为超细颗粒)。由于相当大部分的胶束在经肺部施用后被呼出, 因此脂质体相较于胶束具有以下优点: 它们相对较大的尺寸提供了更有效的经肺部施用。脂质体还可递送容纳在其水性核心中的亲水性分子。

[0184] 在一些实施方案中, 人参皂苷自组装 (特别是Rg3自组装) 结构以多层囊泡 (MLV) 的形式存在。据信, MLV形式在经肺部施用人参皂苷自组装 (特别是Rg3自组装) 结构期间具有优势。MLV可被制成几微米数量级的尺寸。由于相当大部分的胶束和脂质体在经肺部施用后被呼出, 因此MLV相较于胶束和脂质体具有以下优点: MLV相对较大的尺寸提供了更有效的经肺部给药。因此, MLV具有在气溶胶递送到肺泡区域所需的粒径范围内的粒径 (Zaru, *Eur. J. Pharmaceutics Biopharm.*, 67 (2007) 655-666, 在663处)。这些人参皂苷发明比常规的载药脂质体具有更缓慢的释放, 因为该药物形成胶束/脂质体/MLV的超结构的一部分, 并且因此具有增强的分子间键合。

[0185] 总之, 上述公开内容提供了许多广泛的概念, 这些概念涉及将自组装两亲性物质与能够嵌入自组装结构内的活性剂匹配。这些示例中的一些列于表5中。

[0186] 表5

[0187]

活性物质类别	活性物质示例	两亲性物质类别	两亲性物质示例
黄酮	7,8 二羟基黄酮	黄酮-7-O-葡萄糖苷酸	7,8 二羟基黄酮-7-O-葡萄糖苷酸
黄酮-3-O-葡萄糖苷酸	半乳糖苷;	黄酮-3-O-糖苷	G-芦丁
黄酮-3-O-糖苷	金丝桃苷	黄酮-3-O-糖苷	G-芦丁
黄烷酮	橙皮素; 乔松素	皂苷	大豆皂苷; 皂树
黄酮	7,8 二羟基黄酮	黄酮-3-O-糖苷	G-芦丁
异黄酮	雌马酚	皂苷	大豆皂苷; 皂树
异黄酮	雌马酚	异黄酮糖苷	二素嗪
类固醇	别孕烯醇酮	皂苷	大豆皂苷; 皂树
黄烷酮	橙皮素; 乔松素	黄烷酮-7-O-葡萄糖苷酸	橙皮素-7-O-葡萄糖苷酸

[0188] 因此,一般来讲,本文提供了混合自组装结构,其包含(a)羟基化类黄酮-7-O-葡萄糖苷酸自组装结构(优选羟基化黄烷酮-7-O-葡萄糖苷酸自组装结构),以及(b)嵌入在自组装结构内的羟基化类黄酮(优选羟基化黄烷酮)。

[0189] 因此,一般来讲,本文提供了混合自组装结构,其包含(a)羟基化类黄酮-3-O-糖基自组装结构(优选羟基化黄酮醇-3-O-糖基自组装结构),以及(b)嵌入在自组装结构内的羟基化类黄酮(优选羟基化黄酮醇)。

[0190] 因此,一般来讲,本文提供了具有相邻羟基基团的羟基黄酮,其通过与两个羟基形成复合的金属(优选锌)来螯合。优选地,羟基黄酮螯合物与其他类似的复合物形成自组装结构。

[0191] 黄芩苷

[0192] 据信,从两个方面来看,具有足够的孕酮对孕妇非常重要。首先,据报道,在第二妊娠期中孕酮较低与该妊娠期间对压力出现更大的负面情绪反应有关(Crowley, *Psychopharmacology*, 2016年4月, 233 (7), 1299-310)。其次,已多次报道,预防性施用孕酮可以降低早产的几率(Saccone, *Ultrasound Obstet Gynecol.*, 2016年8月22日)。据信,早产与PND的症状正相关。例如,据报道,严重早产儿、中度早产儿和轻度早产儿的母亲在离开NICU一个月之后具有类似的抑郁可能性几率(分别为20%、22%和18%)(Hawes, *J. Pediatr.*, 2016年8月5日, pii: S0022-3476 (16) 30531-5)。与早产相关的这些抑郁几率略高于通常报道的10%至15%的PPD几率。此外,另一个研究小组报告说,三个月大的早产儿表现出更多的戒断行为,并且与足月出生的组相比,这些早产儿的母亲具有更多的产后抑郁症状。据报道,在12个月时,早产儿的母亲表现出更多的儿童内化行为(Moe, *Infant Behav. Dev.*, 2016年8月; 44: 159-68)。因此,正确提供孕酮对于具有低孕酮水平或存在早产风险的孕妇似乎是有利的。然而,孕酮具有相对较短的循环半衰期(Anand Kumar, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1982年7月; 79 (13): 4185-9)。因此,帮助增大孕酮的循环半衰期的疗法可能是有用的。

[0193] 黄芩苷是在中国黄芩提取物中发现的葡萄糖醛酸化类黄酮,其已经应用于用于流产和先兆流产的中药中(Chen, *Evidence-based Compl. Alter. Med.*, 第2011卷, 408714)。黄

芩苷可以通过降低IFN- γ 水平和提高孕酮水平来发挥保胎作用(Ma, *Am. J. Chin. Med.*, 2009年, 37(1) 85-95; 以及Chen, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2015年5月; 149:11-6 (黄芩苷提高孕酮水平))。在黄芩苷对蜕膜细胞作用的体外研究中, 黄芩苷在提高孕酮水平方面未表现出明显的作用(Wang, *J. Immunol. Research*, 第2014卷, 859812, 图6)。黄芩苷表现出抑制宫缩的特性, 这意味着它可以延迟分娩, 研究人员将黄芩苷抑制宫缩的特性归因于其增大孕酮水平的能力(Chen, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2015年5月; 149:11-6)。黄芩苷似乎是比其苷元黄芩素更好的宫缩抑制剂(Chen, citing Ma, *Chin. J. Vet. Sci.* 27 (2007) 412-415 (中文))。

[0194] 因此, 不希望受理论束缚, 似乎向孕妇施用黄芩苷可用于提高母亲的孕酮水平, 从而提升情绪并降低早产风险。

[0195] 还需注意, 黄芩苷在结构上类似于灯盏花素(存在单个羟基的差异), 因为每个均为羟基化的类黄酮-7-O-葡萄糖苷酸。因此, 预期它们的药理学特征应该相当类似是合理的。

[0196] 似乎羟基化类黄酮-7-O-葡萄糖苷酸诸如灯盏花素口服效果不佳, 口服的生物利用度低于3% (Liu, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2008年11月, 70 (30845-52))。由于灯盏花素和黄芩苷的结构相似性, 可以合理地得出以下结论: 黄芩苷具有类似的不良口服生物利用度。然而, Liu进一步报道了, 通过肺部施用提供喷雾干燥的灯盏花素纳米颗粒使得灯盏花素的生物利用度提高至约77%, 并且向制剂中添加粘膜粘附赋形剂使得其生物利用度提高至95%以上。

[0197] 由于黄芩苷在结构上与灯盏花素相似, 因此可以合理地得出以下结论: 同样地, 通过肺部施用提供喷雾干燥的黄芩苷纳米颗粒可以将其生物利用度从小于3%的水平提高至约77%, 并且向制剂中添加粘膜粘附赋形剂可以将其生物利用度提高至95%以上。

[0198] 因此, 提供了一种治疗孕妇(优选具有早产风险的孕妇)的方法, 该方法包括以下步骤: (a) 提供容纳包含喷雾干燥的黄芩苷纳米颗粒和粘膜粘附赋形剂的制剂的吸入器, (b) 以肺部施用的方式向孕妇施用制剂。

[0199] Liu, *supra*报道了其实验中灯盏花素的血浆浓度在约1小时内降低了约10倍, 从而表明灯盏花素(并且暗示其他羟基化类黄酮-7-O-葡萄糖苷酸诸如黄芩苷)具有短的循环半衰期。据报道, 黄芩苷具有1.27的log P (Liang, *J. Agric. Food Chem.*, 2009年8月12日; 57 (15): 7118-24), 并且因此可以被认为是两亲性的。因此, 在优选的实施方案中, 利用这种两亲性性质来提供自组装形式的黄芩苷, 诸如脂质体或MLV, 该自组装形式可以提供黄芩苷的延长释放。

[0200] 脑苷脂和bcl-2

[0201] 在一些实施方案中, 将两亲性脑苷脂制备成脂质体或MLV形式的自组装结构, 并且(优选通过口服或肺部途径)递送给被诊断患有PND的母亲。脑苷脂是已知存在于人乳中的内源性分子(Newburg, *Lipids*, 1992年11月; 27 (11): 923-7)。据报道, 某些水生脑苷脂可以显著提高B细胞淋巴瘤2 (Bcl-2) 的基因表达(Wu, *J. Oleo Sci.*, 2013年; 62 (9): 717-27)。Bcl-2是一种抗细胞凋亡的基因, 其涉及调节神经元的可塑性(Manji, *Psychopharmacol. Bull.*, 2001年春天; 35 (2): 5-49)。因此, 预计, 向被诊断患有PND的母亲施用脑苷脂应该会增大其神经元的可塑性, 从而减轻其抑郁的症状。

[0202] 癌症应用

[0203] 除植物化学自组装结构针对产妇抑郁症的应用之外,据信,这些植物化学自组装结构还可以针对某些形式的癌症。

[0204] a. 金丝桃苷和Q3G混合胶束:还观察到,金丝桃苷和Q3G均为 β -肾上腺素拮抗剂。这种特性是相关的,因为至少有六项回顾性研究一致证明 β 受体阻滞剂(特别是 β -2拮抗剂普萘洛尔)的使用与转移性乳腺癌(并且特别是三阴性乳腺癌(TNBC))发病率约50%的降低相关(参见,例如,a) Melhem-Bertrandt, “Beta-blocker use is associated with improved relapse-free survival in patients with triple-negative breast cancer”, *J Clin Oncol*, 29:2645-2652, 2011年; b) Barron, “Beta blockers and breast cancer mortality: A population-based study”, *J Clin Oncol*, 29:2635-2644, 2011年; c) Powe, “Beta-blocker drug therapy reduces secondary cancer formation in breast cancer and improves cancer specific survival”, *Oncotarget*, 1:628-638, 2010年; d) Botteri, “Therapeutic effect of β -blockers in triple-negative breast cancer postmenopausal women”, *Breast Cancer Res. Treat.* 2013年8月; 140 (3):567-75; 以及 e) Choy, “Inhibition of β 2-adrenergic receptor reduces triple-negative breast cancer brain metastases: The potential benefit of perioperative β -blockade”, *Oncology Reports*, 35, 2016年, 3135-42; 以及 f) Parada-Huerta, “Metastasis Risk Reduction Related with Beta-Blocker Treatment in Mexican Women with Breast Cancer”, *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2016年; 17 (6):2953-7)。

[0205] 此外, β 受体阻滞剂似乎还提高了卵巢癌患者的存活率(Sood, “Clinical impact of selective and nonselective beta-blockers on survival in patients with ovarian cancer”, *Cancer*, 121, 2015年)。目前,正在MD安德森癌症中心进行一项干预性研究,以检查非选择性 β -受体阻滞剂和标准化疗(紫杉醇和卡铂或可能为多西紫杉醇)治疗卵巢癌的效果。“Feasability Study: Therapeutic Targeting of Stress Factors in Ovarian cancer Patients”。NCT01504126

[0206] 据报道,槲皮素-3-O-葡萄糖苷酸(Q3G)是植物化学槲皮素的代谢物,也是 β -肾上腺素拮抗剂(Yamazaki, *Arch. Biochem. Biophys.* 2014年9月1日; 557:18-27)。Yamazaki报道了,Q3G (0.1 μ M)抑制MDA-MB-231乳腺癌细胞(TNBC细胞)的侵袭和MMP-9的诱导,并抑制[(3)H]-NA与 β 2-AR的结合。Yamazaki得出以下结论:Q3G可以通过控制 β 2-肾上腺素信号传导来抑制乳腺癌细胞的侵袭,并且可以是与压力相关的乳腺癌的饮食化学预防因子。基于其作为 β -肾上腺素拮抗剂的行为及其基本上没有副作用的示例性安全性特征,本文提出,在上述自组装结构中使用Q3G和/或金丝桃苷作为用于已经被诊断为患有TNBC和卵巢癌的患者化学治疗剂,以便预防转移性乳腺癌或卵巢癌。

[0207] b. 普萘洛尔脂质体和MLV:还进一步观察到,上述关于 β -阻断剂的癌症流行病学研究中的阳性结果似乎与普萘洛尔的特定使用密切相关。尽管普萘洛尔已被成功用于治疗高血压并且已列入WHO的基本药物清单,但它仍存在一些缺点,即,其相对快速的代谢通常要求每天服用2至4次且其不同患者中的代谢程度不同,因此,需要在治疗开始时进行漫长的滴定过程。因此,改善普萘洛尔的代谢和药代动力学特征是另一个目标。

[0208] 为此,观察到,文献已经报道普萘洛尔具有足够的两亲性以形成胶束,其具有约0.13mol/L的临界胶束浓度(CMC) (Ruso, *J. Chem. Eng. Data*, 2003年, 48 (6), 第1597-1602

页)。还参见,普蔡洛尔胶束的报告,Schreier,Biochimica et Biophysica Acta,1508 (2000) 210-234。普蔡洛尔的这种两亲性质使得有理由期望技术人员也可以制备自组装普蔡洛尔结构,包括凝胶、多层囊泡(MLV)和脂质体。然后,这些复合的自组装普蔡洛尔结构可以用于治疗TNBC和卵巢癌患者,并且因此可预防转移性癌症。

[0209] c. 人参皂苷脂质体和MLV:还报告了,人参皂苷似乎在治疗癌症尤其是在治疗肺癌方面是有效的。具体地讲,一组研究人员报告了,向肺癌患者施用一种特殊的人参皂苷(Rg3)显著增长了这些患者的术后寿命,并且Rg3的效果与标准化疗基本相当(Lu, Chin.J.Integr.Med.,2008年3月,14(1) 33-6)。Lu还报告了Rg3对具有“阳性VEGF表达”表型的患者的特殊功效。另一组研究人员报告,人参皂苷Rg3与EGFR-TKI化学疗法的组合使得肺癌患者的无进展生存期延长了20%(Li, Oncotarget,2016年9月16日)。因此,在一些实施方案中,将上文所讨论的自组装的复合人参皂苷自组装结构施用于肺癌患者,优选通过肺部途径来施用。

[0210] d. 黄芩苷和COPD:还证明,黄芩苷是脯氨酰寡肽酶(POP)的抑制剂(Tarrago, Bioorg.Med.Chem.,2008年8月1日;16(15):7516-24)。Tarrago报告了,黄芩苷以剂量依赖性方式抑制脯氨酰寡肽酶,使用黄芩苷类似物的抑制实验表明糖部分并非活性所必需的。黄芩苷及其苷元衍生物黄芩素的IC₅₀非常类似,这表明糖部分不参与黄芩苷与POP的相互作用。

[0211] 黄芩苷的这种抗POP特性可以表明黄芩苷在预防肺癌方面的作用,因为据报道,小鼠中香烟烟雾引起的肺气肿与POP相关,POP是与胶原蛋白分解相关的酶(Braber, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.2011年2月;300(2):L255-65)。向COPD患者提供POP抑制剂(罗氟司特)的一项临床试验报告了通过降低脯氨酰内肽酶活性和AcPGP来减少肺部炎症。研究人员将较低的AcPGP水平与中性粒细胞炎症的迟钝标记物相关联,并得出结论,抑制这种自我感染途径可减轻整体的炎症负担,这可能改变COPD的自然病程(包括恶化风险)(Wells, Am.J.Respir.Crit.Care Med.,2015年10月15日;192(8):934-42) (NCT 01572948)。

[0212] 因此,提供了一种治疗患有COPD的患者(优选患有COPD的吸烟者)的方法,该方法包括以下步骤:(a)提供容纳包含喷雾干燥的黄芩苷纳米颗粒和粘膜粘附赋形剂的制剂的吸入器,以及(b)以肺部施用的方式向患者施用制剂。

[0213] 含有神经节苷脂的囊泡

[0214] 在一些实施方案中,自组装结构可以涂覆有一层粘膜粘附剂(诸如,果胶),以便增强自组装结构与GI道或肺的壁的结合。

[0215] 脂质体通常用于以口服方式将药物递送到循环体系中(Ahmad, Curr Drug Metab.,2015;16(8):633-44)。口服脂质体通常由两亲性卵磷脂制成,两亲性卵磷脂含有亲水性头部基团和疏水性尾部。卵磷脂通常为磷脂,由磷酸与胆碱、甘油或脂肪酸组成,通常由糖脂或甘油三酯组成。卵磷脂中的甘油磷脂包括磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸和磷脂酸。

[0216] 尽管基于卵磷脂的脂质体已经常规地用于口服递送药物,但使用基于卵磷脂的脂质体造成了三项挑战。第一,基于卵磷脂的脂质体在胃肠道中存在的酸性和胆汁环境中无法稳定地保持(Taira, Drug Delivery,11,2;123-128(2004))。第二,基于卵磷脂的脂质体

通常会非常快速地释放其内容物,以至于,对于具有短半衰期的分子,需要每天多次给药。第三,进入循环体系的基于卵磷脂的脂质体通常容易被RES摄取快速去除 (Litzinger, *Biochim.Biophys.Acta*,1992年2月17日,1104 (1) 179-87)。

[0217] 神经节苷脂是内源性两亲分子,并且存在于人乳中。最近,已经发现神经节苷脂是免疫学中非常重要的分子。天然和半合成神经节苷脂被认为是神经退化性失调的可能治疗剂。参见,例如,Mocchetti I (2005). “Exogenous gangliosides, neuronal plasticity and repair, and the neurotrophins”, *Cell Mol Life Sci.* 62 (19-20):2283-94。因此,口服递送的神经节苷脂应被认为是安全的,甚至对母亲和婴儿也是有益的。实际上,甚至已经为2230名患有脑性麻痹的儿童提供了神经节苷脂,据报告,其神经学症状得到改善 (Xu, *Chin.J.Clin.Rehab.*,2005年,9,122-123)。

[0218] 最近发现,在常规的卵磷脂样脂质体中加入神经节苷脂有助于向患者递送该活性成分。第一,它们提高了脂质体在GI道中的稳定性:“该研究表明,在用作口服药物载体的制剂中,含有GM1和GM III型的那些制剂在通过胃肠道时具有更高的幸存可能性”(Taira, *Drug Delivery*,11,2;123-128 (2004))。第二,进入循环体系的含神经节苷脂的卵磷脂脂质体不易被RES摄取快速去除,从而延长它们在循环体系中的寿命 (Chonn, *J.Liposome Research*,2 (3),397-410,1992)。第三,将神经节苷脂加入到常规的脂质体中可以将葡萄糖-6-磷酸 (G6P) 从脂质体到血浆中的通量降低至约5%/小时的水平 (参见Taira的图2),从而允许在一天之中从脂质体中几乎恒定地释放G6P。因此,据信,神经节苷脂有利地减少了脂质体结构中的间隙,以降低低分子量亲水性分子如G6P在其中的通量。

[0219] G6P具有约260道尔顿的分子量和-3.24的log P。据信,同样亲水的其他低MW分子应以相当的通量通过含有神经节苷脂的卵磷脂基脂质体,从而允许每天一次给药和血浆浓度恒定。

[0220] 具体地讲,据信,分子量在约100道尔顿和400道尔顿之间且同样亲水 (优选log P<0) 的分子应该以与G6P相当的通量通过含有神经节苷脂的卵磷脂基脂质体,从而允许每天一次给药和血浆浓度恒定。

[0221] 优选地,据信,分子量在约200道尔顿和400道尔顿之间,在一些实施方案中在200道尔顿和300道尔顿之间,在其他实施方案中在225道尔顿和275道尔顿之间,并且同样非常亲水 (logP<-1) 的分子应当以与G6P相当的通量通过含有神经节苷脂的卵磷脂基脂质体,从而允许每天一次给药和血浆浓度恒定。

[0222] 更优选地,据信,分子量在约100道尔顿和400道尔顿之间、具有环状组分且非常亲水 (logP<0) 的分子应该以与G6P相当的通量通过含有神经节苷脂的卵磷脂基脂质体,从而允许每天一次给药和血浆浓度恒定。

[0223] 表现出期望通量的Taira实施方案以1:1:1:0.14摩尔比使用卵磷脂、胆固醇、鞘磷脂和神经节苷脂。因此,在一些实施方案中,含神经节苷脂的卵磷脂基脂质体包含10摩尔%至50摩尔%的卵磷脂。在一些实施方案中,含神经节苷脂的卵磷脂基脂质体包含1摩尔%至10摩尔%的神经节苷脂。在一些实施方案中,含神经节苷脂的卵磷脂基脂质体包含10摩尔%至50摩尔%的卵磷脂和1摩尔%至10摩尔%的神经节苷脂。

[0224] 在一些实施方案中,含神经节苷脂的卵磷脂基脂质体包含 (a) 10摩尔%至50摩尔% (优选20摩尔%至30摩尔%) 的卵磷脂, (b) 10摩尔%至50摩尔% (优选20摩尔%至30摩

尔%)的胆固醇,(c) 10摩尔%至50摩尔%(优选20摩尔%至30摩尔%)的鞘磷脂,(d) 1摩尔%至10摩尔%的神经节苷脂,以及(e)抗抑郁药。

[0225] 优选地,抗抑郁药的特征在于,(a)分子量在约100道尔顿至400道尔顿之间,优选在200道尔顿至400道尔顿之间,更优选在200道尔顿至300道尔顿之间,(b)亲水性(优选 $\log P < 0$,更优选 $\log P < -1$),以及(c) (任选地)环状组分。

[0226] 在一些实施方案中,神经节苷脂选自GM1和GM III型。这些是Taira用于在血浆中获得良好GI稳定性和最佳G6P通量的神经节苷脂。在母乳中发现GM1的浓度为总脂质结合唾液酸的0.02%至0.77%。GM1通过BDNF信号级联在小鼠中产生抗抑郁作用(Jiang, *Int. J. Neuropsychopharmacology*, 2016年, 19 (9) 1-13)。据信,GM III型是20%唾液酸与等摩尔量的GM1和GD1a神经节苷脂的混合物。

[0227] 甲状腺释放激素 (TRH)

[0228] 在一个实施方案中,活性剂为TRH。TRH可以作为补充剂获得(Abaris)。在临床上,它被证明是泌乳增强剂(US 4125605;美国作为受让人),并且因此对于母乳喂养婴儿是安全的。已经证明,对于患有双相I型和双相II型重度抑郁症的患者,在夜间施用TRH之后,其出现快速的抗抑郁响应(Szuba, *J. Clin. Psychopharmacol.* 2005年8月; 25 (4) : 325-30)。因此,TRH对于围产期抑郁的母亲应该是有益的。TRH具有约362道尔顿的分子量,非常亲水($\log P = -2.46$),并且其具有短的半衰期(7.6分钟)。参见Duntas, *Thyroidology*. 1991年5月; 3 (2) : 51-7。还可参见Bassiri, *J. Clin. Invest.*, 52, 1973年7月, 1616-19。因此,其简单的每日一次口服递送不会使其自身在一天之中保持相对恒定的血浆浓度。

[0229] 因此,TRH应该以相当于G6P的通量通过含神经节苷脂的卵磷脂基脂质体进入血浆中,从而允许每天一次给药和血浆浓度恒定。

[0230] 环组氨酸-脯氨酸二肽

[0231] 在另一个实施方案中,适用于通过含神经节苷脂的卵磷脂基脂质体每天给药一次的活性剂为环组氨酸-脯氨酸二肽。环组氨酸-脯氨酸二肽是主要的TRH代谢物。它被称为“an important new tool in counteracting neuroinflammation-based degenerative pathologies”, Grotelli, *Intl. J. Molec. Sci.*, 2016年, 17, 1332。因此,它对于其病症以炎症相关表型为特征的患围产期抑郁症的产妇应该是有益的。它还可用于治疗妊娠糖尿病,因为它(用组氨酸)降低了2型糖尿病小鼠的血糖浓度(Hwang, *Diabetes Obes. Metab.*, 2003年9月, 5 (5) , 317-24),并且保护胰腺细胞免于凋亡(Koo, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2011年2月, 21 (2) 218-27)。环组氨酸-脯氨酸二肽具有约为234道尔顿的分子量,非常亲水($\log P = -1.48$),并且具有1分钟和33分钟的短双相半衰期(Koch, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 104 (2) , 1982年, 823-9)。因此,简单的每日一次口服递送不会使其自身在一天之中保持相对恒定的血浆浓度。

[0232] 因此,环组氨酸-脯氨酸二肽应该以相当于G6P的通量通过含神经节苷脂的卵磷脂基脂质体进入血浆中,从而允许每天一次给药和血浆浓度恒定。

[0233] 牛磺酸

[0234] 牛磺酸是流行能量饮料的主要成分,并且添加到许多婴儿配方食品中(维基百科)。牛磺酸是早产新生儿必需的氨基酸(Lourenco, *Nutr. Hosp.*, 2002年, XVII, 6, 262-270)。它非常亲水($\log P = -3.36$),并且其在健康志愿者中的口服施用的特征在于,半衰期

短,为1小时 (Ghandforoush-Sattari, *J. Amino Acids*, 卷2010, 346237)。因此,简单的每日一次口服递送不会使其自身在一天之中保持相对恒定的血浆浓度。最后,已经在大鼠中证实了慢性牛磺酸施用的抗抑郁作用 (Toyoda, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2013年, 775, 29-43)。因此,它对于围产期抑郁的母亲应该是有益的。

[0235] 因此,牛磺酸应该以相当于G6P的通量通过含神经节苷脂的卵磷脂基脂质体进入血浆中,从而允许每天一次给药和血浆浓度恒定。

[0236] 焦谷氨酰亮氨酸 (PGL)

[0237] PGL是小麦水解物,因此对于婴儿应该是安全的。PGL通过增强海马神经形成来在小鼠中发挥抗抑郁作用 (Yamamoto, *Neuropeptides*, 2015年6月, 51, 25-9), 因此可用于围产期抑郁的母亲。PGL还是抗炎的 (Hirai, *Life Sci.*, 2014年11月4日, 117 (1) 1-6), 因此应该特别用于具有炎症表型的围产期抑郁的母亲。小分子中大量的氮和COOH基团使得可合理地得出以下结论:PGL是非常亲水的。根据它是一种受强烈的酰胺酶活性影响的肽这一事实,可以合理地得出以下结论:PGL具有短的半衰期。因此,简单的每日一次口服递送不会使其自身在一天之中保持相对恒定的血浆浓度。

[0238] 因此,PGL应该以相当于G6P的通量通过含神经节苷脂的卵磷脂基脂质体进入血浆中,从而允许每天一次给药和血浆浓度恒定。

[0239] 肌肽

[0240] 肌肽可作为补充剂获得,并且高度集中于大脑中。肌肽是非常亲水的,具有 $\log p = -1.19$ 。它在人血浆中具有<5分钟的短半衰期 (Gardner, *J. Physiology*, 1991年, 439, 411-422)。因此,简单的每日一次口服递送不会使其自身在一天之中保持相对恒定的血浆浓度。肌肽因其对大鼠中的鸡胸肉提取物的抗抑郁作用而闻名 (Tomonaga, *Pharmacol Biochem Behav.*, 2008年6月, 89, 4, 627-32)。因此,它对于围产期抑郁的母亲应该是有益的。肌肽还明显改善了儿童自闭症的症状 (Chez, *J. Child Neurol.*, 2002年11月, 17 (11), 833-7)。

[0241] 由于其相对较低的分子量和较高的亲水性,肌肽应该以相当于G6P的通量通过含神经节苷脂的卵磷脂基脂质体进入血浆中,从而允许每天一次给药和血浆浓度恒定。

[0242] 丙氨酰-谷氨酰胺 (AG)

[0243] AG可以作为补充剂获得 (Sustamine™)。AG通过上调bcl-2来保护免受缺血-再灌注损伤 (Jia, *World J. Gastroenterol.*, 2006年3月7日, 12 (9), 1373-8)。它提高bcl-2的能力使得可合理地得出以下结论:AG将有助于增大神经元突触可塑性,因此这使AG成为抗抑郁治疗的有吸引力的候选者。AG在ICU患者中的血浆半衰期为0.26小时 (Berg, *Amino Acids*. 2005年11月; 29 (3): 221-8.), 因此不会在血液中保留很久。因此,简单的每日一次口服递送不会使其自身在一天之中保持相对恒定的血浆浓度。这导致人们得出以下结论:它需要每天多次给药。AG具有 $\log P = -2.15$, 因此非常亲脂。AG已用于婴儿的双盲试验中 (Struijs, *Clin Nutr.* 2013年6月; 32 (3): 331-7), 因此对于婴儿可能是安全的。分子中的三个氮原子使得人们可以合理地得出以下结论:它非常亲水。

[0244] 由于其相对较低的分子量和较高的亲水性,AG应该以相当于G6P的通量通过含神经节苷脂的卵磷脂基脂质体进入血浆中,从而允许每天一次给药和血浆浓度恒定。

[0245] 磺乙谷酰胺 (γ -谷氨酰基牛磺酸) (GGT)

[0246] GGT是非常亲水的,具有 $\log P = -3.36$ 。GGT是杏仁核点燃大鼠中的高效抗癫痫药

(Uemura, *Brain Res.*, 1992年10月, 594 (2), 347-50), 并且它在体外调节兴奋性神经传递 (Varga, *Neurochem. Res.*, 1994年3月, 19 (3), 243-8)。因此, GGT对于患有癫痫症的母亲而言是有吸引力的候选者。GGT可以作为补充剂从匈牙利获得 (Litoralon)。GGT被认为会影响情绪激发, 并且被认为是一种抗冲突分子 (Bittner, *Amino Acids*, 2005年6月, 28 (4), 343-56)。

[0247] 由于其相对较低的分子量和较高的亲水性, A-G应该以相当于G6P的通量通过含神经节苷脂的卵磷脂基脂质体进入血浆中, 从而允许每天一次给药和血浆浓度恒定。

[0248] 非PND分子

[0249] 阿糖胞苷: 阿糖胞苷主要用于治疗白血病和淋巴瘤, 在其中, 它为诱导化学疗法的骨干。它在世界卫生组织的基本药物清单上。皮下递送的阿糖胞苷的半衰期为18分钟, 而通过连续输注在血浆中的半衰期为2.1小时 (Liliemark, *Semin. Oncol.*, 1987年6月, 14 (2suppl) 167-71)。Harris报告, 其静脉递送的半衰期为7分钟至107分钟 (Harris, *Br. J. Pharmacol.*, 1979年9月, 8 (3) 219-27)。因此, 其简单的每日一次口服递送不会使其自身在一天之中保持相对恒定的血浆浓度。阿糖胞苷是非常亲水的, 具有 $\log p = -2.8$ 。

[0250] 由于其相对较低的分子量、环状结构和较高的亲水性, 阿糖胞苷应该以相当于G6P的通量通过含神经节苷脂的卵磷脂基脂质体进入血浆中, 从而允许每天一次给药和血浆浓度相对恒定。

[0251] 阿糖胞苷为胞苷。根据维基百科, 胞苷是当胞嘧啶经由 β -N-糖苷键连接到核糖环时形成的核苷分子。胞苷是RNA的组分。如果胞嘧啶与脱氧核糖环连接, 则将其称为脱氧胞苷。因此, 在一些实施方案中, 提供了含神经节苷脂的卵磷脂基脂质体, 其包含 (a) 10摩尔%至50摩尔% (优选20摩尔%至30摩尔%) 的卵磷脂, (b) 10摩尔%至50摩尔% (优选20摩尔%至30摩尔%) 的胆固醇, (c) 10摩尔%至50摩尔% (优选20摩尔%至30摩尔%) 的鞘磷脂, (d) 1摩尔%至10摩尔%的神经节苷脂, 以及 (e) 阿糖胞苷。

[0252] 组合物及治疗方法

[0253] 本发明还涉及在利用GABA (A) δ 激动剂治疗受试者 (优选患有围产期抑郁症受试者) 中使用的治疗有效量的组合物。该方法包括向受试者施用治疗有效量的根据本发明实施方案的组合物。组合物优选还包含药学上可接受的载体。在本发明的上下文中, 术语“药学上可接受的”意指, 在所用剂量和浓度下, 载体不会对施用其的受试者带来非期望的或有害的影响。此类药学上可接受的载体和赋形剂是本领域熟知的 (参见Remington的 *Pharmaceutical Sciences*, 第18版, A.R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company [1990]; *Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins*, S. Frokjaer和L. Hovgaard编辑, Taylor&Francis [2000]; 以及 *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 第3版, A. Kibbe编辑, Pharmaceutical Press出版 [2000])。术语“载体”是指与组合物一起施用的稀释剂、辅助剂、赋形剂或介质。盐水溶液和右旋糖水溶液以及甘油溶液可以例如用作液体载体, 尤其是注射溶液。具体制剂应与施用方式相适应。优选以无菌溶液的形式配制和施用组合物。通过无菌过滤或者通过本领域本身已知的其他方法来制备无菌溶液。然后, 可以将溶液冻干或填充到药物剂量容器中。溶液的pH通常在3.0至9.5的范围内, 例如pH 5.0至pH 7.5。

[0254] 可以使用标准施用途径施用根据本发明的组合物。非限制性示例包括：口服施用；经肺部施用；非肠道施用，诸如静脉内施用、真皮内施用、透皮施用、肌肉注射施用或皮下施用；吸入施用；以及经粘膜施用，诸如鼻内施用途径、阴道施用途径、直肠施用途径或舌下施用途径。可以为每种施用途径配制组合物，参见例如，国际公布No. WO 1993/25221 (Berstein等人) 和No. WO1994/17784 (Pitt等人)，其相关内容以引用方式并入本文。

[0255] 用于口服的固体剂型包括胶囊剂、片剂、丸剂、粉剂和颗粒剂。在此类固体剂型中，将活性化合物与至少一种药学上可接受的载体（诸如蔗糖、乳糖或淀粉）掺合。正如在通常的实践中那样，这种剂型还可以包含不同于惰性稀释剂的附加物质，如润滑剂（例如硬脂酸镁）。在胶囊剂、片剂和丸剂的情况下，剂型还可以包含缓冲剂。另外，可以制备具有肠溶衣的片剂和丸剂。

[0256] 用于口服施用的液体剂型包括药学上可接受的乳剂、溶液剂、混悬剂、糖浆剂，其中酞剂含有通常用于本领域的惰性稀释剂，诸如水。除了此类惰性稀释剂外，组合物还可以包含其他试剂，诸如湿润剂、乳化剂和助悬剂，以及甜味剂、调味剂，以及芳香剂。

[0257] 非肠道施用的制剂包括无菌水溶液剂或非水溶液剂、混悬剂或乳剂。非水溶剂或载体的实施例是丙二醇、聚乙二醇、植物油（例如橄榄油和玉米油）、明胶和可注射有机酯（例如油酸乙酯）。此类剂型还可以包含其他试剂，诸如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。它们可以通过例如滤过阻菌过滤器、通过将灭菌剂掺入到组合物中、通过辐射组合物或通过加热组合物来灭菌。它们也可以在使用前即刻用无菌水或其他无菌注射用介质来制备。

[0258] 本文所公开的组合物的施用通常是局部施用、口服施用、经粘膜施用，或者通过吸入施用。通常，施用出于以下治疗和/或预防目的：治疗或预防对其有需要的受试者的围产期抑郁症。在治疗应用中，向已经患有围产期抑郁症的受试者施用组合物，施用量足以治愈围产期抑郁症症状或至少部分地减轻围产期抑郁症的症状。在预防性应用中，向易患围产期抑郁症或有风险患围产期抑郁症的受试者（即，在妊娠晚期或者在受试者分娩之后不久）施用组合物。在这些情况的每一者中，组合物的量将取决于受试者的状态（例如，围产期抑郁症症状的严重程度）和受试者的身体特征（例如，身高、体重等）。

[0259] 实际施用量，以及施用速率和时间过程将取决于被治疗疾病的性质和严重性。治疗处方（例如，剂量决策等）由全科医生和其他医生负责，或者在兽医学的情况下，由兽医负责，并且通常考虑待治疗的疾病、个体患者的状况、递送部位、施用方法和医生已知的其他因素。可以在Remington的Pharmaceutical Sciences（第16版，Osol, A. 编辑，1980年）中找到上述技术和方案的示例。

[0260] 实施方案

[0261] 本发明还提供了以下非限制性实施方案。

[0262] 实施方案1是包含以下物质的组合物：(a) 神经类固醇；以及 (b) 皂苷，该皂苷的含量使得能有效地形成掺有神经类固醇的自组装结构。

[0263] 实施方案2是根据实施方案1所述的组合物，其中自组装结构为胶束、凝胶、脂质体、层状相和多层囊泡。

[0264] 实施方案3是根据实施方案1或2所述的组合物，其中自组装结构为胶束。

[0265] 实施方案4是根据实施方案1至3中任一项所述的组合物，其中皂苷选自大豆皂苷、皂树皂苷和人参皂苷。

[0266] 实施方案5是根据实施方案1至4中任一项所述的组合物,其中神经类固醇选自别孕烯醇酮、四氢脱氧皮质酮 (THDOC) 和孕酮。

[0267] 实施方案6是根据实施方案5所述的组合物,其中神经类固醇为别孕烯醇酮。

[0268] 实施方案7是根据实施方案1至6中任一项所述的组合物,其中皂苷表面活性剂相对于组合物的总重量计为至少约0.1重量%、至少约0.5重量%或至少约1重量%。

[0269] 实施方案8是根据实施方案1至7中任一项所述的组合物,其中组合物包含至少约100ppm、至少约200ppm或至少约300ppm的神经类固醇。

[0270] 实施方案9是根据实施方案1至8中任一项所述的组合物,其中组合物还包含药学上可接受的载体。

[0271] 实施方案10是根据实施方案1至9中任一项所述的组合物,其中组合物还包含辅助剂。

[0272] 实施方案11是根据实施方案1至10中任一项所述的组合物,其中组合物具有约0.01/小时至约0.05/小时的渗透系数P。

[0273] 实施方案12是根据实施方案11所述的组合物,其中组合物具有约0.01/小时的渗透系数P。

[0274] 实施方案13是治疗受试者的方法,其中优选需要治疗围产期抑郁症 (PND) 的受试者,该方法包括向受试者施用治疗有效量的根据实施方案1至12中任一项所述的组合物。

[0275] 实施方案14是根据实施方案13所述的方法,其中通过局部、静脉内、口服、粘膜或吸入的方式施用治疗有效量的组合物。

[0276] 实施方案15是根据实施方案13或14所述的方法,其中以单剂量施用治疗有效量的组合物,每4小时一次,优选每8小时一次,更优选每12小时一次,最优选每24小时一次,或者隔更长的时间施用一次。

[0277] 实施方案16是根据实施方案13至15中任一项所述的方法,其中治疗有效量的组合物具有约0.01/小时至约0.05/小时的渗透系数P。

[0278] 实施方案17是根据实施方案16所述的方法,其中治疗有效量的组合物具有约0.01/小时的渗透系数P。

[0279] 实施方案18是根据实施方案13至17中任一项所述的方法,其中治疗有效量的组合物的渗透系数P比包含单分子神经类固醇或环糊精神经类固醇复合物的组合物的渗透系数P低至少两倍、至少五倍或至少十倍。

[0280] 实施方案19是制备根据实施方案1至12所述的组合物的方法,该方法包括在流动下将溶解在有机溶剂中的神经类固醇的溶液加入到皂苷溶液中,其中将神经类固醇掺入到自组装结构中。

[0281] 实施方案20是根据实施方案19所述的方法,其中有机溶剂溶解至少0.1重量%、至少0.5重量%或至少1重量%的神经类固醇。

[0282] 实施方案21是根据实施方案19或20所述的方法,其中至少1重量%、至少2.5重量%或至少3重量%的有机溶剂可溶于水。

[0283] 实施方案22是根据实施方案19至21中一项所述的方法,其中有机溶剂选自乙醇、甲醇、丙醇、丁醇、二醇、乙二醇、丙二醇、丁二醇、乙醚以及它们的混合物。

[0284] 实施方案23是根据实施方案22所述的方法,其中有机溶剂为乙醇。

[0285] 实施方案24是由含DHA的流体制备浓缩的羟基脂肪酸部分的方法,该含DHA的流体包含i) 低熔点脂肪酸和ii) 高熔点脂肪酸,其中两种酸均存在于甘油三酯中,该方法包括以下步骤:

[0286] a) 冷冻流体以从其中含有的高熔点脂肪酸中分离出低熔点脂肪酸,从而产生包含母本甘油三酯的低熔点富集流体,

[0287] b) 使富含低熔点脂肪酸的流体与PLA2体外接触,以使羟基脂肪酸从其甘油三酯中选择性地游离出来,从而产生富含游离羟基脂肪酸的流体,以及

[0288] c) 使富含游离羟基脂肪酸的流体与浓缩物体外接触,以在浓缩物内选择性地捕获游离的羟基脂肪酸,从而产生其上吸附有羟基脂肪酸的浓缩物。

[0289] 实施方案25是根据实施方案24所述的方法,其中冷冻步骤在约-20℃至-40℃下进行。

[0290] 实施方案26是根据实施方案24所述的方法,其中流体为海洋油。

[0291] 实施方案27是根据实施方案24所述的方法,其中流体为海藻油。

[0292] 实施方案28是根据实施方案24所述的方法,其中流体来源于乳。

[0293] 实施方案29是根据实施方案28所述的方法,其中在步骤a) 之前执行从乳中分离出脂肪部分的步骤,并且对分离的脂肪部分执行步骤b)。

[0294] 实施方案30是根据实施方案24所述的方法,其中浓缩物作为环糊精碳酸盐纳米颗粒存在。

[0295] 实施方案31是根据实施方案24所述的方法,其中浓缩物选自环糊精、沸石、中孔二氧化硅和十八烷基甲硅烷基二氧化硅(OSS)。

[0296] 实施方案32是根据实施方案24所述的方法,其中浓缩物为环糊精。

[0297] 实施方案33是根据实施方案24所述的方法,其中浓缩物为沸石。

[0298] 实施方案34是根据实施方案24所述的方法,其中浓缩物为中孔二氧化硅。

[0299] 实施方案35是根据实施方案24所述的方法,其中浓缩物为十八烷基甲硅烷基二氧化硅(OSS)。

[0300] 实施方案36是根据实施方案24所述的方法,该方法还包括以下步骤:

[0301] d) 向人施用其上吸附有具有羟基脂肪酸的浓缩物。

[0302] 实施方案37是根据实施方案36所述的方法,其中其上吸附有具有羟基脂肪酸的浓缩物富含吸附的17-OH DHA。

[0303] 实施方案38是根据实施方案24所述的方法,其中浓缩物为固体多孔体,并且羟基脂肪酸被吸附在浓缩物的孔隙内。

[0304] 实施方案39是根据实施方案24所述的方法,其中PLA2为固定的PLA2。

[0305] 实施方案40是根据实施方案24所述的方法,该方法还包括以下步骤:

[0306] d) 从浓缩物中释放羟基脂肪酸,以产生富含羟基脂肪酸的溶液,以及

[0307] e) 向人施用富含羟基脂肪酸的溶液。

[0308] 实施方案41是从含DHA的流体中制备浓缩的羟基脂肪酸部分的方法,该含DHA流体包含含有羟基脂肪酸的甘油三酯,该方法包括以下步骤:

[0309] a) 使流体与PLA2体外接触,以使羟基脂肪酸从其甘油三酯中选择性地游离出来,从而产生富含游离羟基脂肪酸的流体,以及

[0310] b) 使富含游离羟基脂肪酸的流体与浓缩物体外接触,以在浓缩物内选择性地捕获游离的羟基脂肪酸,从而产生其上吸附有具有羟基脂肪酸的浓缩物。

[0311] 实施方案42是根据实施方案41所述的方法,该方法还包括以下步骤:

[0312] c) 向人施用其上吸附有具有羟基脂肪酸的浓缩物。

[0313] 实施方案43是根据实施方案41所述的方法,该方法还包括以下步骤:

[0314] c) 从浓缩物中释放羟基脂肪酸,以产生富含羟基脂肪酸的溶液,以及

[0315] d) 向人施用富含羟基脂肪酸的溶液。

[0316] 实施方案44是根据实施方案41所述的方法,其中PLA2是固定的。

[0317] 实施方案45是根据实施方案41所述的方法,其中从富含游离羟基脂肪酸的流体中选择性地移除其上吸附有具有羟基脂肪酸的浓缩物。

[0318] 实施方案46是根据实施方案41所述的方法,其中浓缩物选自环糊精、沸石、中孔二氧化硅和十八烷基甲硅烷基二氧化硅(OSS)。

[0319] 实施方案47是根据实施方案41所述的方法,该方法还包括:

[0320] c) 从流体中分离其上吸附有具有羟基脂肪酸的浓缩物。

[0321] 实施方案48是根据实施方案47所述的方法,该方法还包括以下步骤:

[0322] d) 向人施用分离的其上吸附有具有羟基脂肪酸的浓缩物。

[0323] 实施方案49是根据实施方案48所述的方法,其中每天施用一次。

[0324] 实施方案50是从含DHA的流体中制备浓缩的羟基脂肪酸部分的方法,该含DHA流体包含含有羟基脂肪酸的酯,该方法包括以下步骤:

[0325] a) 使流体与酶体外接触,以使羟基脂肪酸从其酯中选择性地游离出来,从而产生富含游离羟基脂肪酸的流体,以及

[0326] b) 使富含游离羟基脂肪酸的流体与浓缩物体外接触,以在浓缩物内选择性地捕获游离的羟基脂肪酸,从而产生其上吸附有具有羟基脂肪酸的浓缩物。

[0327] 实施例

[0328] 本发明实施例和比较例的制备

[0329] 使用不同类型的制剂成分(即,来自各个供应商的原料)制备本发明实施例和比较例。这些材料,以及INCI/物质名称、CAS/品目号和供应商如下:

[0330] 别孕烯醇酮(AP):

[0331] 从英国伯克郡的CarboSynth LLC(CS)获得AP CS,即,3 β -羟基-5 α -孕烷-20-一别孕烯醇酮,CAS#516-55-2。

[0332] 从美国纽波特的Steraloids Inc.(ST)获得AP ST,即,3 α -羟基-5 α -孕烷-20-一别孕烯醇酮,CAS#516-54-1。

[0333] 皂苷:

[0334] 从美国加利福尼亚州圣地亚哥的Desert King International获得VaxSap皂苷,即,Vax-Sap(皂苷),纯化的皂树皮精华,项目#20-2-100-005。

[0335] 从美国密苏里州圣路易斯的Sigma-Aldrich Co.LLC获得大豆皂苷I,CAS#51330-27-9,项目#S9951;以及人参皂苷Rb1,CAS#41753-43-9,项目#00170580;以及人参皂苷Rg1,CAS#22427-39-0,项目#1291672。

[0336] 其他:

[0337] 从Sigma-Aldrich Co.LLC获得H-b-环糊精,即,(2-羟丙基)- β -环糊精,CAS#128446-35-5,项目#C0926,Mw=1396g/mol。

[0338] 从Sigma-Aldrich Co.LLC获得蓖麻油,CAS#8001-79-4,项目#18722。

[0339] 从美国伊利诺伊州芝加哥的阿奇尔丹尼斯米德兰公司(Archer Daniels Midland Company;Chicago,IL,USA)获得乙醇,即,Pure 190乙醇,USP赋形剂,项目#017635;

[0340] 从Sigma-Aldrich Co.LLC获得丙二醇,USP,CAS#57-55-6,项目#1576708。

[0341] 从配有Progard™2过滤器的Millipore Direct-Q™系统获得去离子水(DI水)。

[0342] 组合物及其制备方法

[0343] 对流驱动的溶剂到水络合(CSWC)方法:发现,通过在流动下向皂苷表面活性剂的水溶液中加入别孕烯醇酮溶剂溶液,不溶于水的别孕烯醇酮能够掺入到皂苷表面活性剂胶束中。溶剂溶液包括乙醇;然而,可以使用另外的有机溶剂诸如但不限于甲醇、丙醇、丁醇、乙二醇、丙二醇、乙醚或它们的混合物作为溶剂溶液,使得溶解足够量的别孕烯醇酮。水中的皂苷表面活性剂浓度高于临界胶束浓度(cmc)。向别孕烯醇酮溶剂溶液中加入皂苷表面活性剂溶液,并且快速混合,使得相比于别孕烯醇酮结晶,别孕烯醇酮更倾向于扩散驱动掺入到皂苷胶束中。

[0344] 本发明实施例E1至E7以及比较实施例C1至C7的制备

[0345] 如下制备本发明实施例E1至E7:在22+/-1摄氏度下,在用磁力搅拌器以200rpm的速度搅拌的情况下,向放置在20mL的闪烁小瓶中的10g表面活性剂DI水溶液中滴加适量的别孕烯醇酮乙醇溶液。加入后盖上小瓶,搅拌溶液30分钟。

[0346] 如下制备比较实施例C1和C2:在22+/-1摄氏度下,在用磁力搅拌器以200rpm的速度搅拌的情况下,向放置在20mL的闪烁小瓶中的10g的DI水溶液或表面活性剂DI水溶液中加入适量的别孕烯醇酮晶体。加入后盖上小瓶,搅拌溶液24小时。

[0347] 如下制备比较实施例C3和C4:在22+/-1摄氏度下,在用磁力搅拌器以200rpm的速度搅拌的情况下,向放置在20mL的闪烁小瓶中的10g DI水溶液中滴加适量的别孕烯醇酮乙醇溶液。加入后盖上小瓶,搅拌溶液30分钟。

[0348] 如下制备比较实施例C5和C6:在22+/-1摄氏度下,在用磁力搅拌器以200rpm的速度搅拌的情况下,向放置在20mL的闪烁小瓶中的10g H-b-环糊精DI水溶液中滴加适量的别孕烯醇酮乙醇溶液。加入后盖上小瓶,搅拌溶液30分钟。

[0349] 如下制备比较实施例C7:在22+/-1摄氏度下,在用磁力搅拌器以200rpm的速度搅拌的情况下,向放置在20mL的闪烁小瓶中的10g丙二醇中滴加适量的别孕烯醇酮乙醇溶液。加入后盖上小瓶,搅拌溶液30分钟。

[0350] 本发明实施例(E1-E3)和比较实施例(C1-C4)的溶解行为

[0351] 结晶测试:观察通过样品溶液的测试网格,目测确定测试溶液中晶体的存在情况。样品溶液对测试网格造成的变化,使得出现由晶体的存在指示的模糊且朦胧的外观。图1示出了不存在晶体的样品(左)和存在晶体的样品(右)的示例。

[0352] 表6中列出了比较实施例C1至C4和本发明实施例E1至E3,以及结晶评估的结果(如根据上文所述的结晶测试测量的结果)。

[0353] C1的结果表明,别孕烯醇酮晶体保留且无法溶解,因此未掺入到水中。C2的结果表明,别孕烯醇酮晶体保留且无法溶解,因此未掺入到具有5重量%的VaxSap皂苷表面活性剂

的VaxSap皂苷水溶液中。C3和C4的结果表明,当在搅拌下将别孕烯醇酮乙醇溶液加入到水中时,形成别孕烯醇酮晶体,因此,利用别孕烯醇酮溶剂溶液,无法溶解别孕烯醇酮并无法将其掺入到水中。1600ppm和400ppm的别孕烯醇酮均形成晶体。

[0354] E1、E2和E3的结果表明,当根据CSWC方法将别孕烯醇酮乙醇溶液加入到VaxSap皂苷表面活性剂的水溶液中时,未出现别孕烯醇酮晶体。因此,使用CSWC方法别孕烯醇酮被掺入到VaxSap皂苷表面活性剂水溶液中。

[0355] 表6:对比样品1至4 (C1-C4) 和本发明样品1至3 (E1-E3) 中晶体形成情况的评估。

[0356]

	C1	C2	C3	C4	E1	E2	E3
表面活性剂重量%:							
VaxSap 皂苷		5			4.2	4.2	1
去离子水	适量	适量	适量	适量	适量	适量	适量
AP 源(CarboSynth, Steraloids)	CS	CS	CS	CS	CS	CS	CS
作为晶体添加的 AP ppm	1600	1600					
EtOH 中的 AP 重量%			1.6	1.6	1.6	1	1
最终组合物中的 AP ppm			1600	400	1600	1250	400
EtOH 重量%			10	2.5	10	12.5	2.5
可见晶体	是	是	是	是	否	否	否

[0357] AP: 别孕烯醇酮; DI: 去离子的; ppm: 每一百万份中的份数; EtOH: 乙醇; wt: 重量; CS: CarboSynth LLC

[0358] 本发明实施例 (E4-E7) 的溶解行为

[0359] 表7中列出了本发明实施例E4至E7, 以及结晶评估的结果 (如根据上文所述的结晶测试测量的结果)。

[0360] E4、E5、E6和E7的结果表明,当根据CSWC方法将别孕烯醇酮乙醇溶液添加到不同类型的皂苷表面活性剂的水溶液中时,未出现别孕烯醇酮晶体。具体地讲,使用VaxSap皂苷 (E4)、大豆皂苷I (E5)、人参皂苷Rg1 (E6) 和人参皂苷 (E7)。因此,别孕烯醇酮被掺入到各种皂苷表面活性剂类型和来源的皂苷表面活性剂水溶液中。

[0361] 表7:对比样品5至8 (C5-C8) 和本发明样品4至7 (E4-E7) 中晶体形成情况的评估

[0362]

	E4	E5	E6	E7	C5	C6	C7	C8
皂苷表面活性剂重量%								
VaxSap 皂苷	1							
大豆皂苷 I		0.49						
人参皂苷 Rg1			1					
人参皂苷 Rb1				1				
H-b-环糊精重量%					3	1		
去离子水	适量	适量	适量	适量	适量	适量	-	-
丙二醇	-	-	-	-	-	-	适量	-
蓖麻油	-	-	-	-	-	-	-	适量
AP 源(CarboSynth, Steraloids)	ST	ST	CS	CS	CS	CS	CS/ST	CS
EtOH 中的 AP 重量%	1	1	1	1	1	1	1	1
最终组合物中的 AP ppm	317	296	340	314	320	330	303	313
EtOH 重量%	3.1	2.9	3.4	3.1	3.2	3.2	3	3
可见晶体	否	否	否	否	否	是	否	否

[0363] AP: 别孕烯醇酮; DI: 去离子的; ppm: 每一百万份中的份数; EtOH: 乙醇; wt: 重量; CS: CarboSynth LLC (UK); ST: Steraloids Inc. (USA)

[0364] 比较实施例 (C5和C6) 的溶解行为

[0365] 表7中列出了比较实施例C5和C6, 以及结晶评估的结果 (如根据上文所述的结晶测试测量的结果)。

[0366] C5的结果证实了文献中关于h-b-环糊精使得别孕烯醇酮溶于水的能力的报告 (Irwin, RW等人, “Allopregnanolone Preclinical Acute Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Studies to Predict Tolerability and Efficacy for Alzheimer’s Disease”, PLoS ONE 10 (6): e0128313 (2015); Frontiers in Cellular Neuroscience中的 “New Perspectives in Neurosteroids Action: a Special Player allopregnanolone”, 2015年由Valerio Magnaghi、Giulia Puja编辑)。C5含有3重量%的h-b-环糊精和320ppm的别孕烯醇酮, 未观察到晶体。C6中晶体存在情况的结果表明, 1重量%的h-b-环糊精不足以溶解约300ppm的别孕烯醇酮。与发明实施例E3至E7的比较表明, 与h-b-环糊精相比, 皂苷表面活性剂在使得别孕烯醇酮溶解在水溶液中方面更有效。C5中环糊精与别孕烯醇酮的重量比为94:1、在C6中, 该重量比为30:1。C6中晶体的存在情况表明, 环糊精与别孕烯醇酮的比例必须高于30:1, 才能成功地利用h-b-环糊精将别孕烯醇酮溶解在水溶液中。对于E3至E7, 皂苷表面活性剂与别孕烯醇酮的重量比为25:1、32:1、34:1、29:1和32:1, 并且在其中每一者中, 均未出现晶体。

[0367] 比较实施例 (C7和C8) 的溶解行为

[0368] 表2中列出了比较实施例C7和C8,以及结晶评估的结果(如根据本文所述的结晶测试测量的结果)。

[0369] C7和C8的结果证实了文献中关于丙二醇和蓖麻油溶解别孕烯醇酮的能力的报告。在C7和C8中,均未出现晶体。

[0370] 通过膜从组合物中释放别孕烯醇酮

[0371] 已经发现,与以单分子方式掺入到溶剂中的别孕烯醇酮相比,并且与水中的h-b-环糊精-别孕烯醇酮(CD-AP)复合物相比,掺入到皂苷胶束中的别孕烯醇酮明显释放得更缓慢。(单分子方式是指溶剂通过分离固体的分子并在溶剂分子基质中生成单个固体分子的澄清且稳定的溶液来溶解固体的能力)。

[0372] 根据文献(Irwin和Brinton,“Allopregnanolone as regenerative therapeutic for alzheimer’s disease:Translational development and clinical promise”,Progress in Neurobiology 113:40-55(2014);Irwin等人,“Frontiers in therapeutic development of allopregnanolone for Alzheimer’s disease and other neurological disorders”,Frontiers in Cellular Neuroscience 8:203(2014)),每个CD-AP复合物由2分子环糊精和1分子别孕烯醇酮组成。因此,此类复合物具有约2,700g/mol的分子量,以及与环糊精和别孕烯醇酮的 R_h 类似的流体动力学半径 R_h 。

[0373] 与别孕烯醇酮分子相比,并且与CD-AP复合物相比,皂苷胶束更大,因此具有更大的 R_h (R_h 约3nm)和更大的分子量(>50,000g/mol)。本领域技术人员将理解,与单分子别孕烯醇酮和CD-AP复合物相比,皂苷胶束内的别孕烯醇酮具有明显更低的扩散系数(由于其具有更大的 R_h),并且重要的是,将别孕烯醇酮从胶束内部释放到水相中的速度较慢。因此,含有别孕烯醇酮的皂苷胶束可以被视为别孕烯醇酮的储库,其允许递送相对大量的别孕烯醇酮并延长释放,但不存在释放的别孕烯醇酮的高峰值浓度。

[0374] 比较实施例C9至C10的制备

[0375] 如下制备比较实施例C9:在22+/-1摄氏度下,在用磁力搅拌器以200rpm的速度搅拌的情况下,向放置在20mL的闪烁小瓶中的2g H-b-环糊精DI水溶液中滴加适量的别孕烯醇酮乙醇溶液。加入后盖上小瓶,搅拌溶液30分钟。

[0376] 如下制备比较实施例C10:在22+/-1摄氏度下,在用磁力搅拌器以200rpm的速度搅拌的情况下,向放置在4盎司的玻璃广口瓶中的79.6g的DI水溶液中滴加适量的别孕烯醇酮乙醇溶液。加入后盖上广口瓶,搅拌溶液30分钟。

[0377] 本发明实施例(E4、E5)和比较实施例(C9和C10)的渗析行为

[0378] 渗析测试

[0379] 使用Spectra/Por[®] 32 毫米(mm)膜管(来自Spectrum[®] Laboratories, Inc.(加利福尼亚州的兰乔多明格斯(Rancho Dominguez, CA))的订单#08-667D)进行渗析,其中截留分子量MWC0:12,000至14,000。将1克(g)供体溶液吸移到预润湿的渗析袋中,并且放置在100g的DI水浴(接收溶液)中。使用磁力搅拌器以10rpm的速度搅拌水浴,并在22+/-1摄氏度下保持24小时。对于具有皂苷表面活性剂和环糊精的样品,在1.66、3.08、8、11.5和24小时之后取0.5g渗析接收溶液的等分试样。将渗析接收溶液样品储存在-18摄氏度下,直到进一步制备以用于别孕烯醇酮定量测试。解冻之后,用DI水预稀释所有渗析接收溶液样品,并用

Arbor Assay[®] 缓冲液X067-28以1:3的比例(溶液:缓冲液)充分稀释所有渗析接收溶液样品,以将估计的别孕烯醇酮浓度调整为别孕烯醇酮定量测试标准曲线浓度的中间值。在解冻后的1小时内,将溶液用于别孕烯醇酮定量测试。

[0380] 为了确定通过渗析膜释放别孕烯醇酮的动力学,分析所获得的溶液中别孕烯醇酮随时间的相对浓度。在供体和接收溶液中具有恒定的扩散系数和可忽略的浓度梯度的情况下,应用一级动力学。因此,使用下式1来拟合数据:

$$[0381] \quad C_{\text{相对,溶液}} = 1 - C_{\text{相对,供体}} \cdot e^{-P \cdot \text{时间}},$$

[0382] 其中,在时间=0处,溶液(接收溶液)中的相对别孕烯醇酮浓度 $C_{\text{相对,溶液}}$ 、供体溶液中的相对别孕烯醇酮浓度 $C_{\text{相对,供体}}$,作为可调参数的渗透系数P,以及时间。

[0383] 别孕烯醇酮定量测试

[0384] 使用来自Arbor Assays[™](密歇根州安娜堡)的DetectX[®]别孕烯醇酮酶免疫检测试剂盒K044-H5来确定渗析和组织渗透接收溶液中别孕烯醇酮的浓度。DetectX[®]别孕烯醇酮酶免疫检测试剂盒被设计用于定量地测量从稀释的尿液和组织培养基样品中提取的血清、血浆或干燥粪便样品中存在的别孕烯醇酮。遵循K044-H1/H5,160829,2016中描述的Arbor Assays[™]方案。

[0385] 在室温下初步振荡温育2小时。在温育期结束时,洗涤平板并加入底物。底物与结合的别孕烯醇酮过氧化物酶缀合物反应。在短暂的温育之后,停止反应,并在能够测量450纳米(nm)波长的微量读板器中检测生成的颜色的强度。计算样品中别孕烯醇酮的浓度。将在组合物、渗析和组织渗透实验中使用的别孕烯醇酮材料用作别孕烯醇酮标准品。制备并使用具有50、25、12.5、6.26、3.13、1.56、0.78和0.39纳克/毫升(ng/mL)的浓度的标准溶液。

[0386] 使用的测定方案如下:(1)使用背页上的板布局表来进行合适样品和标准品的鉴定。确定待使用的孔的数量,并且使未使用的孔返回到具有干燥剂的金属箔袋中。密封ziploc平板袋并将其存储在4°C下。(2)将50微升(μL)的样品或标准品吸移到平板中的孔中。(3)将75μL的测定缓冲液吸移到非特异性结合(NSB)孔中。(4)将50μL的测定缓冲液吸移到最大结合(零标准品)孔中。(5)使用重复吸移管向每个孔中加入25μL的DetectX[®]别孕烯醇酮-缀合物。(6)使用重复吸移管向除NSB孔的每个孔中加入25μL的DetectX[®]别孕烯醇酮抗体。(7)轻轻敲打平板的侧面以确保试剂充分混合。用平板密封器覆盖平板。(8)在室温下振摇平板2小时。(9)在温育时间结束时,吸出平板中的液体,并用300μL洗涤缓冲液洗涤各孔4次。在干净的吸收巾上轻拍平板进行干燥。(10)使用重复吸移管向每个孔中加入100μL的TMB底物。(11)在不振摇的情况下,在室温下温育平板30分钟。(12)使用重复吸移管向每个孔中加入50μL的终止液。(13)在能够在450nm处读数的读板器中读取从每个孔生成的光密度。(14)使用由标准溶液生成的标准曲线来计算每个样品的别孕烯醇酮浓度。

[0387] 对所有样品均进行两次重复测量。图2示出了所用的标准曲线。利用线性回归拟合来计算溶液浓度。图中符号的大小表示标准偏差。

[0388] 比较实施例C9和C10,以及发明实施例E4和E5列于表8中,其中还列出了渗透系数P的结果(如渗析测试中所定义的那样来确定)。

[0389] 表8:

[0390]

	E4	E5	C9	C10
供体液体:				
表面活性剂重量%:				
VaxSap 皂苷	1			
大豆皂苷 I		0.49		
H-b-环糊精重量%			3.0	
去离子水	适量	适量	适量	适量
AP 源(Steraloids)	ST	ST	ST	ST
在以下条件下溶解于 EtOH 中的 AP:	1 重量%	1 重量%	1 重量%	1 重量%

[0391]

最终组合物中的 AP	317ppm	296ppm	290ppm	4.8ppm
EtOH	3.1 重量%	2.9 重量%	2.9 重量%	0.05 重量%
渗析:				
供体液体(g)	1	1.03	1.01	1.01
浴液质量(g), DI 水	100.87	100.69	100.62	100.59
渗透系数 P (1/h)	0.01	0.01	0.125	0.2

[0392] 与纯水和环糊精-水体系相比,在皂苷-水溶液中获得别孕烯醇酮的渗透系数P明显更低,即,别孕烯醇酮明显更慢地渗透通过膜。图3中提供了具有或不具有皂苷的体系中随时间释放的别孕烯醇酮的相对量。

[0393] 本领域的技术人员应当理解,在不脱离本发明的广义的发明构思的情况下,可对上述实施方案作出修改。因此,应当理解,本发明不局限于所公开的特定实施方案,但本发明旨在涵盖在本发明实质和范围内的修改,如本说明书所定义。

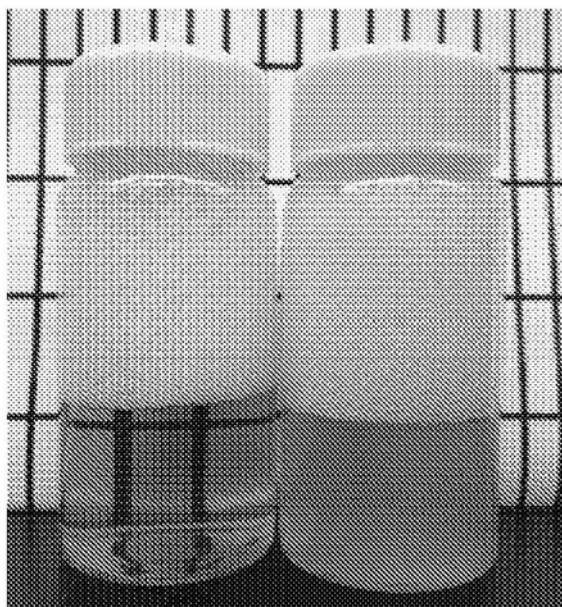


图1

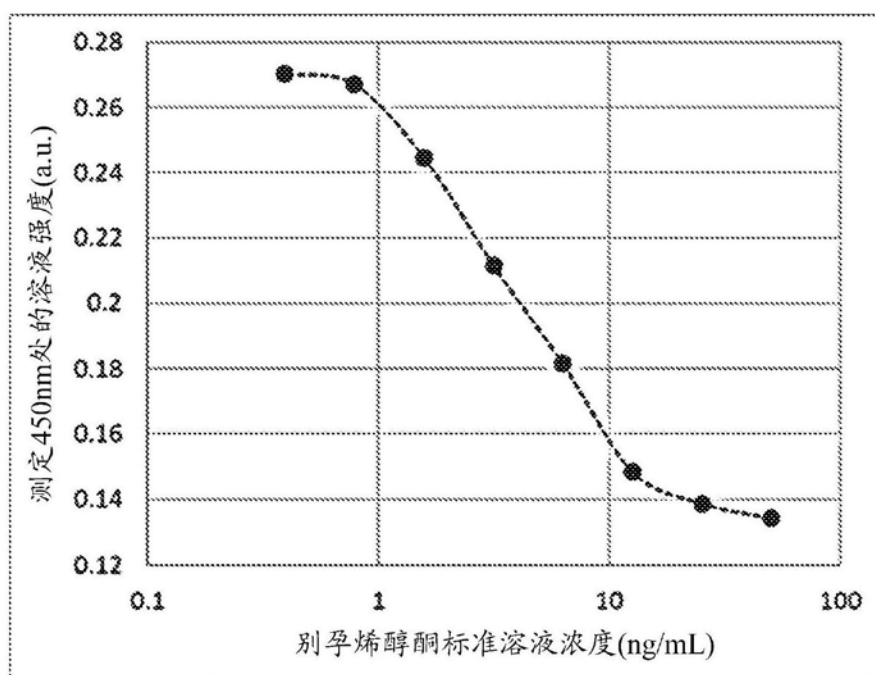


图2

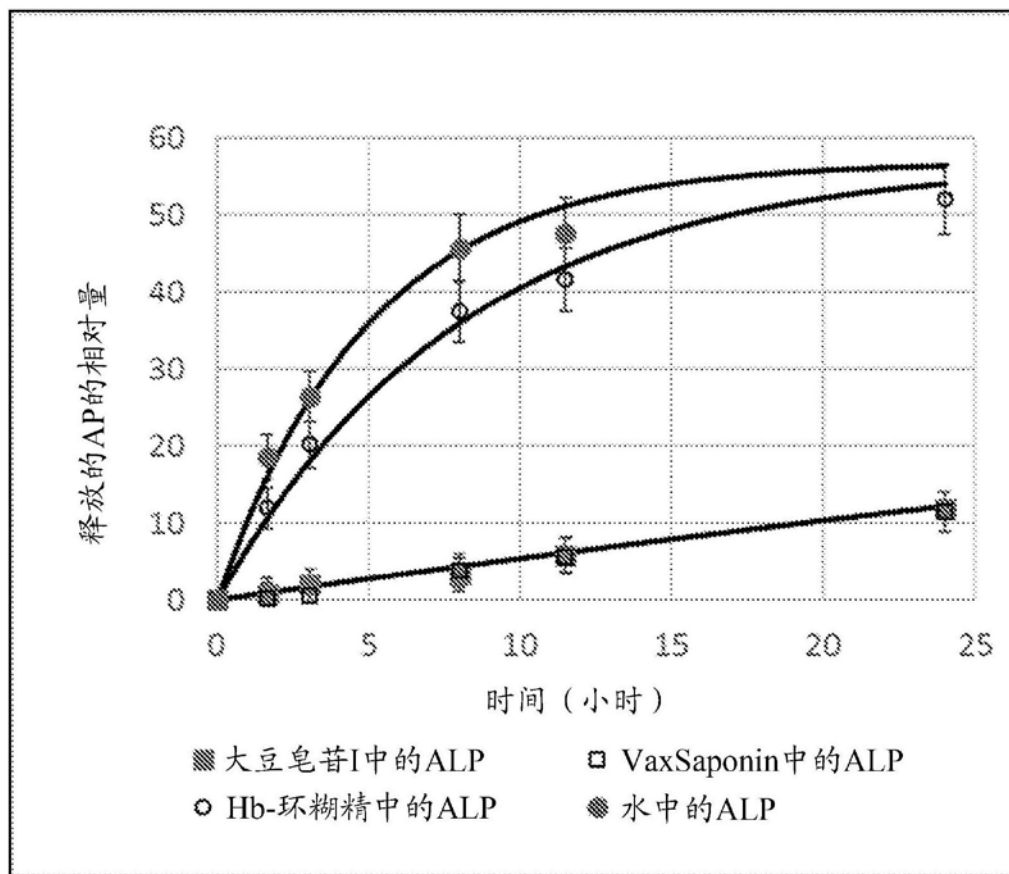


图3