

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 31/44 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480017197.4

[43] 公开日 2006年7月26日

[11] 公开号 CN 1809352A

[22] 申请日 2004.5.17

[21] 申请号 200480017197.4

[30] 优先权

[32] 2003.5.15 [33] US [31] 60/470,694

[86] 国际申请 PCT/US2004/015417 2004.5.17

[87] 国际公布 WO2004/110354 英 2004.12.23

[85] 进入国家阶段日期 2005.12.19

[71] 申请人 罗斯坎普研究有限公司

地址 美国佛罗里达州

[72] 发明人 M·J·马伦 D·帕里斯

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司
代理人 陈文青

权利要求书 4 页 说明书 10 页 附图 7 页

[54] 发明名称

减少淀粉样沉积、淀粉样神经毒性和小胶质增生的方法

[57] 摘要

本发明提供在患有大脑淀粉样原性疾病，如阿尔茨海默病(AD)的动物或人中，通过给予治疗有效量的二氢吡啶钙通道阻滞剂尼伐地平，减少 β -淀粉样沉积、 β -淀粉样神经毒性和小胶质增生的方法。本发明还提供在动物或人中，诊断大脑淀粉样原性疾病的方法。还提供在患有外伤性脑损伤的动物或人中，在外伤性脑损伤后立即给予尼伐地平并在其后的处方时间内继续治疗，减少 β -淀粉样沉积、 β -淀粉样神经毒性和小胶质增生的风险的方法。最后，提供在患有大脑淀粉样原性疾病如AD的动物或人的中枢神经系统中，通过在移植前给予神经元干细胞尼伐地平，治疗可移植神经元干细胞的方法。

1. 一种在患有大脑淀粉样原性疾病或病症的动物或人中，减少 β -淀粉样沉积、 β -淀粉样神经毒性和小胶质增生的方法，其包括给予动物或人单位剂量形式的治疗有效量的尼伐地平。

2. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述淀粉样原性疾病或病症选自：阿尔茨海默病、传染性海绵状脑病、瘙痒病、外伤性脑损伤、伤性脑损伤、大脑淀粉样血管病和格-施-沙综合征。

3. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述尼伐地平的治疗有效量约为0.05-20毫克/天。

4. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述尼伐地平的治疗有效量约为2-15毫克/天。

5. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述尼伐地平的治疗有效量约为4-12毫克/天。

6. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述尼伐地平的治疗有效量为8毫克/天。

7. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述尼伐地平的治疗持续时间延续达动物或人的终生。

8. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，通过胃肠道外、口服或腹膜内给予动物或人尼伐地平。

9. 如权利要求8所述的方法，其特征在于，所述口服给予的单位剂量形式选自：硬或软壳明胶胶囊、片剂、糖锭、囊剂、锭剂、酏剂、混悬剂、糖浆剂、糯米纸囊剂、粉末剂、颗粒剂、溶液和乳剂。

10. 如权利要求8所述的方法，其特征在于，所述胃肠外给药途径选自：静脉内；肌内；间质；动脉内；皮下；眼内；颅内；心室内；滑膜内；经上皮，包括经皮、肺部吸入、眼、舌下和颊；局部，包括眼、皮、眼睛、直肠、和通过吹入或喷雾的鼻腔吸入。

11. 如权利要求10所述的方法，其特征在于，所述尼伐地平的鼻腔给予选自：气雾剂、雾化剂和喷雾剂。

12. 一种在动物或人中诊断大脑淀粉样原性疾病的方法，所述方法包括：

第一次测定动物或人的外周循环中 β -淀粉样蛋白的血浆浓度；

给予动物或人单位剂量形式的治疗有效量的尼伐地平；

- 5 第二次测定动物或人的外周循环中 β -淀粉样蛋白的血浆浓度；和
 计算第一次测定和第二次测定间的差异，其中，第二次测定中 β -淀粉样蛋白血浆浓度与第一次测定相比的增加表明，在所述动物或人中大脑淀粉样原性疾病的可能诊断。

13. 如权利要求 12 所述的方法，其特征在于，所述淀粉样原性疾病选自：阿尔茨海默病、传染性海绵状脑病、瘙痒病、外伤性脑损伤、伤性脑损伤、大脑淀粉样血管病和格-施-沙综合征。

14. 如权利要求 12 所述的方法，其特征在于，所述尼伐地平的治疗有效量约为 0.05-20 毫克/天。

- 15 15. 如权利要求 12 所述的方法，其特征在于，所述尼伐地平的治疗有效量约为 2-15 毫克/天。

16. 如权利要求 12 所述的方法，其特征在于，所述尼伐地平的治疗有效量约为 4-12 毫克/天。

17. 如权利要求 12 所述的方法，其特征在于，所述尼伐地平的治疗有效量为 8 毫克/天。

- 20 18. 如权利要求 12 所述的方法，其特征在于，所述尼伐地平的治疗持续时间延续 1 天至 12 个月。

19. 如权利要求 12 所述的方法，其特征在于，所述尼伐地平的治疗持续时间延续 1 周至 6 个月。

- 25 20. 如权利要求 12 所述的方法，其特征在于，所述尼伐地平的治疗持续时间延续 2 周至 4 周。

21. 如权利要求 12 所述的方法，其特征在于，通过胃肠外、口服或腹膜内给予动物或人尼伐地平。

22. 如权利要求 21 所述的方法，其特征在于，所述口服给予的单位剂量形式选自：硬或软壳明胶胶囊、片剂、糖锭、囊剂、锭剂、酏剂、混悬剂、

糖浆剂、糯米纸囊剂、粉末剂、颗粒剂、溶液和乳剂。

23. 如权利要求 21 所述的方法，其特征在于，所述胃肠外给予途径选自下组：静脉内；肌内；间质；动脉内；皮下；眼内；颅内；心室内；滑膜内；经上皮，包括经皮、肺部吸入、眼、舌下和颊；局部，包括眼、皮、
5 眼睛、直肠、和通过吹入或喷雾的鼻腔吸入。

24. 如权利要求 23 所述的方法，其特征在于，所述尼伐地平的鼻腔给予选自：气雾剂、雾化剂和喷雾剂。

25. 一种在患有外伤性脑损伤的动物或人中减少 β -淀粉样沉积、 β -淀粉样神经毒性和小胶质增生的风险的方法，所述方法包括给予动物或人单位
10 剂量形式的治疗有效量的尼伐地平，其中，在急性颅脑损伤后立即开始给予尼伐地平。

26. 如权利要求 25 所述的方法，其特征在于，所述淀粉样原性疾病选自：阿尔茨海默病、传染性海绵状脑病、瘙痒病、外伤性脑损伤、伤性脑损伤、大脑淀粉样血管病和格-施-沙综合征。

15 27. 如权利要求 25 所述的方法，其特征在于，所述尼伐地平的治疗有效量约为 0.05-20 毫克/天。

28. 如权利要求 25 所述的方法，其特征在于，所述尼伐地平的治疗有效量约为 2-15 毫克/天。

20 29. 如权利要求 25 所述的方法，其特征在于，所述尼伐地平的治疗有效量约为 4-12 毫克/天。

30. 如权利要求 25 所述的方法，其特征在于，所述尼伐地平的治疗有效量为 8 毫克/天。

31. 如权利要求 25 所述的方法，其特征在于，所述尼伐地平的治疗持续时间延续 1 小时至 5 年。

25 32. 如权利要求 25 所述的方法，其特征在于，所述尼伐地平的治疗持续时间延续 2 周至 3 年。

33. 如权利要求 25 所述的方法，其特征在于，所述尼伐地平的治疗持续时间延续 6 个月至 12 个月。

34. 如权利要求 25 所述的方法，其特征在于，通过胃肠外、口服或腹

膜内给予动物或人尼伐地平。

35. 如权利要求 34 所述的方法，其特征在于，所述口服给予的单位剂量形式选自：硬或软壳明胶胶囊、片剂、糖锭、囊剂、锭剂、酞剂、混悬剂、糖浆剂、糯米纸囊剂、粉末剂、颗粒剂、溶液和乳剂。

5 36. 如权利要求 34 所述的方法，其特征在于，所述胃肠外给予途径选自：静脉内；肌内；间质；动脉内；皮下；眼内；颅内；心室内；滑膜内；经上皮，包括经皮、肺部吸入、眼、舌下和颊；局部，包括眼、皮、眼睛、直肠、和通过吹入或喷雾的鼻腔吸入。

10 37. 如权利要求 36 所述的方法，其特征在于，所述尼伐地平的鼻腔给予选自：气雾剂、雾化剂和喷雾剂。

38. 一种治疗可移植神经元干细胞或胎儿细胞的方法，所述方法包括在患有大脑淀粉样原性疾病的动物或人的中枢神经系统中，干细胞或胎儿细胞移植前给予神经元干细胞或胎儿细胞治疗有效量的尼伐地平。

15 39. 如权利要求 38 所述的方法，其特征在于，所述淀粉样原性疾病选自：阿尔茨海默病、传染性海绵状脑病、瘙痒病、外伤性脑损伤、伤性脑损伤、大脑淀粉样血管病和格-施-沙综合征，其特征还在于，在干细胞或胎儿细胞移植后用有效量的尼伐地平治疗患者。

40. 如权利要求 38 所述的方法，其特征在于，所述尼伐地平的治療有效量约为 1nM-3 μ M。

20 41. 如权利要求 38 所述的方法，其特征在于，所述尼伐地平的治療有效量约为 10nM-2 μ M。

42. 如权利要求 38 所述的方法，其特征在于，所述尼伐地平的治療有效量约为 100nM-1 μ M。

减少淀粉样沉积、淀粉样神经毒性和小胶质增生的方法

5 发明背景

发明领域

本发明涉及治疗大脑淀粉样变原性疾病如阿尔茨海默病的病理生理学作用。更具体地说，本方法涉及给予特异性二氢吡啶拮抗剂钙通道阻滞剂，尼伐地平，在患有大脑淀粉样变相关疾病，如阿尔茨海默病的动物或人的
10 大脑中，对抗这种病理生理学作用。

现有技术的描述

阿尔茨海默病(AD)是老年人中最常见的神经变性疾病，大约1%的超过65岁的人口患有该疾病。该疾病的特征包括细胞内神经原纤维缠结细胞外实质老年斑和脑血管沉积物的进行性积聚。老年斑和脑血管沉积物的主要
15 成分是39-43个氨基酸 β -淀粉样肽(A β)，它是以一种跨膜糖蛋白—淀粉样前体蛋白(APP)蛋白水解得到的。

APP是具有590-680个氨基酸细胞外氨基末端区域和约55个氨基酸胞质尾区的单一跨膜蛋白。来自染色体21上APP基因的信使RNA经历选择性剪切以产生8个可能的同种型，其中3个同种型(695、751和770氨基
20 酸同种型)在脑中占优势。APP通过3个酶活性，称为 α -、 β -和 γ -分泌酶经历蛋白酶解加工。 α -分泌酶在A β 域的氨基酸17处切割APP，因而释放用于分泌的大的可溶性氨基末端片段 α -APP。因为 α -分泌酶在A β 域内切割，该切割排除了A β 的形成。或者，APP可被 β -分泌酶切割，确定A β 氨基末端并产生可溶性氨基末端片段 β -APP。接着， γ -分泌酶切割APP
25 的细胞内羧基末端域，导致多种肽的产生，两种最常见的是40-氨基酸A β (A β 40)和42-氨基酸A β (A β 42)。A β 40包含90-95%的分泌A β ，是脑脊液中获得的主要种类(Seubert等, Nature, 359: 325-7,1992)。相反，小于10%的分泌A β 是A β 42。尽管产生的A β 42较少，A β 42是在斑块中发现的主要种类，最初沉积，或许是由于其比A β 40能更快地形成不溶性淀粉样

聚集物(Jarrett 等, *Biochemistry*, 32: 4693-7,1993)。认为脑中 A β 的异常积聚是因为 APP 的过度表达或加工改变。

因此, 认为 A β 肽在 AD 的病理学中起着关键的作用, 因为所有与 AD 家族型相关的突变导致这些来自 APP 的肽的加工改变。确实, 脑中 A β 的不溶性沉积物、或聚集物、原纤维是所有形式的 AD 显著的神经病理特征, 5 不考虑对象的遗传倾向。

伴随着 A β 沉积, 在 AD 脑中存在炎性途径的强烈激活, 包括在 A β 沉积物中及周围产生促炎细胞因子和急性期反应物(McGeer 等, *J.Leukocyte Biol.*, 65: 409-15,1999)。认为脑中存在的先天免疫细胞, 小胶质细胞的激活 10 密切涉及该炎症级联。已证明, 反应性小胶质细胞产生促炎细胞因子如炎性蛋白和急性期反应物, 如 α -1-抗胰凝乳蛋白酶、转化生长因子、载脂蛋白 E 和补体因子, 已表明, 所有这些定位于 A β 斑块中, 并促进 A β 斑块“凝集”或成熟(Nilsson 等, *J Neurosci.* 21: 1444-5,2001), 并且, 在高浓度时促进神经变性。流行病学研究表明, 使用非甾体抗炎药(NSAIDS)的患者 15 患 AD 的风险减少多达 50%(Rogers 等, *Neurobiol. Aging* 17: 681-6,1996), 并且, 进行 NSAID 治疗的 AD 患者死后评价表明, 风险减少与活化小胶质细胞数量的减少有关(Mackenzie 等, *Neurology* 50: 986-90,1998)。而且, 当给予 Tg APP_{sw} 小鼠(一种阿尔茨海默病的小鼠模型)NSAID (布洛芬)时, 这些动物显示与小胶质细胞活性减少相关的 A β 沉积物减少、星形细胞增生、 20 营养不良性神经轴突(Lim 等, *J. Neurosci.* 20: 5709-14,2000)。

因此, 在 AD 脑中炎症过程的产物可加重 AD 病理。而且, 有证据表明, AD 脑中活化的小胶质细胞, 不是清除 A β , 而是通过促进 A β 原纤维形成并随之发生以老年斑形式沉积具有致病性(Wegiel 等, *Acta Neuropathol. (Berl.)* 100: 356-64,2000)。

25 还提示, AD 的发病机制是由于 A β 的神经毒特性。A β 的细胞毒性首先是在啮齿动物的原代细胞培养和人细胞培养中建立的。Mattson 等的工作(*J. Neurosci.*, 12: 376-389, 1992)表明, 在刺激性神经递质谷氨酸的存在下, A β 导致细胞内钙立即病理性增加, 认为通过其第二信使活性大大增加而对细胞的毒性非常高。

因此，需要预防成为 AD 标志的脑变性的无情进程，其中，预防可解决见于 AD 患者的 A β 沉积、A β 神经毒性、活化的小胶质细胞炎症和 APP 的改变或过度表达。

5 发明概述

为了满足上述需要，本发明首次提供在患有大脑淀粉样原性疾病，如阿尔茨海默病(AD)的动物或人中，通过给予治疗有效量的二氢吡啶钙通道阻滞剂，尼伐地平，减少 β -淀粉样沉积、 β -淀粉样神经毒性和小胶质增生的方法。

- 10 本发明还提供在动物或人中，诊断大脑淀粉样原性疾病如 AD，或确定动物或人是否有发展大脑淀粉样原性疾病的风险的方法，包括：首先测定动物或人的外周循环中 β -淀粉样蛋白的血浆浓度；给予动物或人单位剂量形式的治疗有效量的尼伐地平；在随后的时间，第二次测定动物或人的外周循环中 β -淀粉样蛋白的血浆浓度；计算 A β 血浆浓度的第一次测定和
- 15 第二次测定间的差异。第二次测定中 β -淀粉样蛋白的血浆浓度与第一次测定相比的增加表明，在动物或人中大脑淀粉样原性疾病的发展风险和/或可能的诊断。

- 本发明还提供在患有外伤性脑损伤的动物或人中，通过在头部损伤后立即给予动物或人单位剂量形式的治疗有效量的尼伐地平并在其后的处方时间
- 20 内继续尼伐地平治疗，减少 β -淀粉样沉积、 β -淀粉样神经毒性和小胶质增生的风险的方法。

本发明还提供治疗可移植神经元干细胞的方法，其包括在患有大脑淀粉样原性疾病如 AD 的动物或人的中枢神经系统中，干细胞移植之前给予神经元干细胞治疗有效量的尼伐地平。

25

附图简要说明

图 1 是表示使用 4G8 免疫染色技术，长期给予尼伐地平对 TgAPP^{sw} 小鼠脑的不同区域中的 A β 沉积(A β 负荷)的影响的柱状图；

图 2 是表示使用确定 CD45+小胶质细胞的数量 CD45 免疫染色技术，

长期给予尼伐地平在 TgAPPsw 小鼠脑的三个区中对小胶质细胞活性的影响的柱状图；

图 3 是表示在体外用脂多糖 (LPS)活化 24 小时的 N9 鼠小胶质细胞中，尼伐地平对小胶质细胞活性的影响的柱状图。ELISA 测定 TNF- α 的产生 (pg/ml)，确定的小胶质细胞活性；

图 4 是表示在用 30 μ M 的预聚集 A β 1-40(AgA β)处理 3 天的 HPNC 中，给予尼伐地平对 A β 神经毒性的影响的柱状图。通过测定从细胞释放的乳酸脱氢酶(LDH)的量来评价神经毒性；

图 5 是表示使用转染 APPsw 的人成胶质瘤细胞，尼伐地平对 APP 加工的影响的柱状图。用 50nM 和 250nM 尼伐地平处理细胞 24 小时(图 5A)和 48 小时(图 5B)。ELISA 法测定培养液中产生的 A β 1-40。

图 6 是表示在 2 岁龄 TgPS/APPsw 小鼠中，尼伐地平对血浆 A β 水平的影响的柱状图。用尼伐地平(1.5 毫克/公斤体重)每天腹膜内处理动物，持续三周半。

15

优选实施方式

本发明首次提供在动物和人中通过给予尼伐地平(异丙基-3-甲基-2-氰-1,4-二氢-6-甲基-4-(间硝基苯基)-3,5-吡啶-二羧酸酯；MW 385.4)，一种二氢吡啶类似的钙通道阻滞剂，是某些大脑淀粉样原性疾病如阿尔茨海默病 (AD)的标志的脑变性无情进程的预防方法。

具体地说，本发明的一个实施例提供了在患有大脑淀粉样原性疾病或病症的动物或人中，通过给予单位剂量形式的治疗有效量的尼伐地平，减少 β -淀粉样沉积、 β -淀粉样神经毒性和小胶质增生的方法。因为大多数大脑淀粉样原性疾病如 AD 是慢性、进行性、难治的脑痴呆，考虑尼伐地平治疗的持续时间将延续长达动物或人的终生。大脑淀粉样原性疾病或病症非限制性地包括：阿尔茨海默病、传染性海绵状脑病、瘙痒病、外伤性脑损伤、大脑淀粉样血管病和格-施-沙(Gerstmann-Straussler-Scheinker)综合征。

在本发明的另一个实施例中，提供了在患有外伤性脑损伤(TBI)的动物或人中，通过在 TBI 后立即给予动物或人单位剂量形式的治疗有效量的尼伐

地平并在其后的处方时间内继续尼伐地平治疗，减少 β -淀粉样沉积、 β -淀粉样神经毒性和小胶质增生的风险的方法。已表明，TBI增加AD发展的易感性，因而不被理论所约束，认为TBI加速脑A β 积聚和氧化应激，它们可协同作用，促进AD的开始或推进AD的进展。

5 在那些患有TBI的动物或人中，尼伐地平的治疗持续时间可延续约1小时-5年，优选与2周-3年，最优选约6个月-12个月。

在本发明的又一个实施例中，提供了在动物或人中，通过以下方法，
10 诊断或确定产生大脑淀粉样原性疾病如AD的风险的方法：首先测定动物或人的外周循环中 β -淀粉样蛋白的血浆浓度；给予动物或人单位剂量形式的
15 的治疗有效量的尼伐地平；在随后的时间，第二次测定动物或人的外周循环中 β -淀粉样蛋白的血浆浓度；然后，计算第一次测定和第二次测定间的差异。第二次测定中 β -淀粉样蛋白血浆浓度与第一次测定相比增加，提示在该动物或人中大脑淀粉样原性疾病的发展风险和/或可能的诊断。第一次和第二次测定血浆A β 浓度间给予尼伐地平的持续时间约为1天-12个月，
20 优选约为1周-6个月，最优选约为2周-4周。考虑到给予尼伐地平后，血浆A β 浓度的少量增加有发展AD的风险和/或诊断为AD开始阶段的征兆。给予尼伐地平后，血浆A β 浓度的较大增加则反映，较高浓度的A β 从脑释放进入外周循环，因而更有AD的阳性诊断的征兆。

根据本发明的方法，给予患有大脑淀粉样原性疾病或患有外伤性脑损伤的
20 动物或人单位剂量形式的治疗有效量的尼伐地平，以及为了在动物或人中确定发展大脑淀粉样原性疾病的风险和/或诊断淀粉样变疾病的目的所给予的治疗有效量，可约为0.05毫克-20毫克/天，优选约为2毫克-15毫克/天，更优选约为4毫克-12毫克/天，最优选约为8毫克/天。可每天以单一单位剂或分为二、三或四个单位剂量，给予日剂量。

25 在本发明的又一个实施例中，提供了通过在患有大脑淀粉样原性疾病如AD的动物或人的中枢神经系统中移植细胞之前，给予神经元干细胞治疗有效量的尼伐地平，预处理可移植人或异种神经元干细胞的方法。假定，神经元干细胞本身没有明显的A β 沉积。然而，如果神经元移植用于负荷A β 的环境，神经元干细胞的预处理可通过减少A β 浓度及A β 的

毒性，提高移植的神经元在其新环境中存活的能力。用于预处理神经元干细胞的单位剂量形式给予治疗有效量的尼伐地平约为 1 nM-3 uM，优选约为 10nM-2 μ M，最优选约为 100nM-1 μ M。已知，当干细胞直接分化为具体细胞类型如神经元细胞时，提供更替细胞和组织的可更新来源的可能性，

5 以治疗疾病和病症，如阿尔茨海默病，帕金森病或脊髓损伤。当这种细胞被移植/植入进入患者时，不仅要适当地用尼伐地平预处理细胞，而且还要移植后开始用尼伐地平治疗患者。

考虑到本发明方法可用于 AD 的转基因动物模型，如 PDAPP 和 TgAPPsw 小鼠模型，该方法可最终在所述动物或人的中枢神经系统中用于

10 治疗、防止和/或抑制与淀粉样沉积、β-淀粉样神经毒性、和小胶质增生相关的病症。因此，本发明提供 AD 的转基因动物模型，使用本领域已知的标准方法构建该模型，如美国专利 5,487,992、5,464,764、5,387,742、5,360,735、5,347,075、5,298,422、5,288,846、5,221,778、5,175,385、5,175,384、5,175,383 和 4,736,866 所述。

15 可通过多种途径，包括胃肠外、口服或腹膜内给予患者尼伐地平。胃肠外给药包括以下途径：静脉内；肌内；间质；动脉内；皮下；眼内；颅内；心室内；滑膜内；经上皮，包括经皮、肺部吸入、眼、舌下和颊；局部，包括眼、皮、眼睛、直肠、或通过吹入或喷雾的鼻腔吸入。

口服给予的尼伐地平可包载于硬或软壳明胶胶囊中，或压制成片剂。

20 尼伐地平也可与赋形剂混合，以可吸收片剂、口含片、糖锭、胶囊、囊剂、锭剂、酞剂、混悬剂、糖浆剂、糯米纸囊剂等形式使用。尼伐地平还可以粉末或颗粒、在水性液体或非水液体中的溶液或悬浮液、水包油或油包水乳剂的形式。

片剂、糖锭、小丸、胶囊等还可包含，例如粘合剂如西黄蓍胶、阿拉伯

25 胶、玉米淀粉；凝胶赋形剂如磷酸二钙；崩解剂如玉米淀粉、马铃薯淀粉、海藻酸等；润滑剂如硬脂酸镁；甜味剂如蔗糖、乳糖或糖精；或矫味剂。当剂量单位形式是胶囊时，除上述物质外，可包含液体载体。多种其它物质可作为包衣或用于改进剂量单位的物理形式。例如，片剂、小丸或胶囊可用虫胶、糖或两者包衣。糖浆剂或酞剂可含有尼伐地平，甜味剂蔗糖、防腐剂对羟基

苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯，染料和芳香剂。此外，尼伐地平可掺入缓释制剂和剂型。

尼伐地平可给予 CNS，胃肠外或腹膜内。可在水与合适的表面活性剂如羟丙基纤维素的混合物中制备作为游离碱或药学上可接受的盐的尼伐地平溶液。也可在甘油、液体聚乙二醇及其混合物中，以及油中制备分散体。在普通储存和使用条件下，这些制剂可含有防腐剂和/或抗氧化剂，以防止微生物的生长或化学降解。

将在下面的非限制性实施例中具体描述本发明减少 A β 在患有淀粉样变相关疾病如 AD 的动物或人中的病理学作用的方法。

10

实施例 1：长期给予尼伐地平对 A β 沉积的影响(淀粉样蛋白负荷)

在 TgAPP^{sw} 小鼠的脑的不同区域，使用 4G8 抗 A β 单克隆抗体免疫染色技术，测定长期给予尼伐地平对 A β 沉积(淀粉样蛋白负荷)的影响。选择 4G8 免疫染色技术测定 A β 负荷，因为其对 A β 沉积定量分析的信号强且结果较佳。简单地说，如上所述，对石蜡切片进行免疫组织化学测定 (Nakagawa, Y 等, *Exp. Neurol.*, 163: 244- 252,2000)。在二甲苯中使切片去石蜡化，在一系列乙醇和去离子水中水化，通过将切片在 88%甲酸中浸渍 60 分钟进行抗原回收步骤，然后对 A β 进行免疫组化测定。水中清洗切片，用新鲜配制的甲醇(150 毫升)加过氧化氢(33%, 30 毫升)混合液终止内源性过氧化酶作用。根据商家说明书(Vector Laboratories, Burlingame, CA)，使用亲和素-生物素复合物法。通过确定 A β 染色阳性的脑区百分比来评价淀粉样蛋白负荷。阴性对照包括对切片应用相同的免疫组化方案，除了应用免疫前血清代替第一抗体。将 TgAPP^{sw} 小鼠分成接受有效量的尼伐地平的实验组(n=7)和接受载体的对照组(n=5)。

25 如图 1 所示，用尼伐地平治疗减少了 A β 负荷，在视皮层中与对照相比减少约 62%，在顶叶皮层中与对照相比减少约 65%，在运动皮层中与对照相比减少约 58%，在梨状皮层中与对照相比减少约 58%，在海马的 CA1 区中与对照相比减少约 52%，在海马的 CA2-CA3 区中与对照相比减少约 50%。

实施例 2: 长期给予尼伐地平对小胶质细胞活性的影响

使用 CD45 免疫染色技术, 其中, 已确定 CD45+小胶质细胞的数量, 在小鼠脑的三个区中, 测定长期给予尼伐地平对 TgAPPsw 小鼠的小胶质细胞活性的影响。

5 简单地说, 在冷冻脑切片上, 对 CD45(一种粒细胞的特异性标识)进行免疫组化测定。通过与小鼠抗 CD45 单克隆抗体(Chemicon International)在 4°C 下孵育过夜, 然后应用生物素化的兔抗鼠第二抗体 30 分钟, 使 CD45-阳性小胶质细胞免疫定位。用二氨基联苯胺色原体底物使 CD45-阳性小胶质细胞上产生褐色细胞表面染色, 完成 CD45 的检测。

10 如图 2 所示, 与对照相比, 以有效剂量给予的尼伐地平治疗减少海马中的小胶质细胞活性约为 33%, 顶叶皮层中约 43%, 运动皮层中约 27%。

实施例 3: 给予尼伐地平对小胶质细胞活性的影响

在体外用脂多糖 (LPS)活化 24 小时的 N9 鼠小胶质细胞中, 测定尼伐地平对小胶质细胞活性的影响。N9 鼠小胶质细胞的特征在于, 很好地清除了来源于胚胎鼠脑的鼠小胶质细胞克隆。ELISA 测定 TNF- α 的产生(pg/ml), 确定小胶质细胞活化的程度。如图 3 所示, 不用小胶质细胞活化的 LPS(对照细胞)产生约 40 pg/ml 的 TNF- α 。在 50 nM 尼伐地平的存在下, 小胶质细胞产生约 40 pg/ml TNF- α 。增加给予尼伐地平 10 倍(500nM), 不改变 TNF- α 的产生。在 1 μ g/ml LPS 的存在下, 小胶质细胞产生约 820pg/ml TNF- α , 从对照细胞和给予尼伐地平的细胞增加约 95%。在 1 μ g/ml LPS 加 50nM 尼伐地平的存在下, 小胶质细胞产生约 670pg/ml TNF- α 。给予 LPS 加 500nM 尼伐地平减少 TNF- α 产生至约 610 pg/ml。因此, 尼伐地平对抗 LPS-诱导的小胶质细胞活性约 20-25%。

25

实施例 4: 给予尼伐地平对 A β 神经毒性的影响

在用 30 μ M 的预聚集 A β 1-40(AgA β)处理 3 天的人神经元祖细胞 (HPNC)中, 测定给予尼伐地平(10nM 和 100nM)对 A β 神经毒性的影响。在用环 AMP 处理时, HPNC 细胞容易分化为神经元。将环 AMP(1mM)(Sigma)

加入到培养液中，在不含血清条件下，37℃孵育 HPNC 细胞 48 小时或更长时间。该培养液使祖细胞分化为神经元细胞系，如大多数具有抗微管相关蛋白 MAP-2 的抗体的细胞的染色所证明。通过测定从细胞释放的乳酸脱氢酶 (LDH; 一种所有细胞中发现的细胞内酶) 的量，评价神经毒性。

5 如图 4 所示，与用尼伐地平处理细胞相比，用 AgA β 处理的细胞产生 LDH 释放增加约 44%。当加入 10 nM 尼伐地平和 AgA β 时，LDH 释放不变。然而，当尼伐地平的剂量增加 10 倍至 100nM 时，LDH 释放量减少约 44%。

10 实施例 5: 给予尼伐地平对 APP 加工的影响

使用转染 APP^{sw} 的人成胶质瘤细胞测定尼伐地平对 APP 加工的影响。用 50nM 和 250nM 尼伐地平处理细胞 24 和 48 小时，使用市售人 A β 1-40 ELISA (Biosource, CA) 测定培养液中产生的 A β 1-40。

15 如图 5A 所示，处理 24 小时后，50nM 的尼伐地平减少 A β 1-40 产生约 9%，250 nM 的尼伐地平减少 A β 1-40 产生约 15%。处理 48 小时后(图 5B)，50nM 的尼伐地平减少 A β 1-40 的产生约 18%，250nM 的尼伐地平减少 A β 1-40 产生约 5%。

20 实施例 6: 给予尼伐地平对血浆 A β 水平的影响

25 使用 2 岁龄 TgPS/APP^{sw} 小鼠，测定给予尼伐地平对血浆 A β 水平 (pg/ml) 的影响。用尼伐地平(1.5 毫克/公斤体重; n = 10)或仅载体(50% DMSO 的 PBS 溶液; n = 12)每天腹膜内(I.P.)处理动物，持续三周半。处理后，使用 EDTA (4%) 作为抗凝血剂，从动物尾静脉收集 100 μ l 血。血样在 4000g 下离心 1 分钟，收集血浆，稀释四倍后，使用市售人 A β 1-40 ELISA (Biosource, CA) 测定人 A β 1-40。

如图 6 所示，I.P. 给予 TgPS/APP^{sw} 小鼠剂量为 1.5 毫克/公斤体重的尼伐地平，持续 3 个半周，导致 A β 血浆水平(pg/ml) 与对照动物相比，增加约 42%。

总的结论

长期给予尼伐地平显著性减少转基因小鼠的大脑皮层和海马的不同区域中存在的 A β 的量，并且显著性减少小胶质细胞活性。当用 LPS 活化 N9 鼠小胶质细胞时，给予尼伐地平显著性减少 LPS-诱导的小胶质细胞活性。

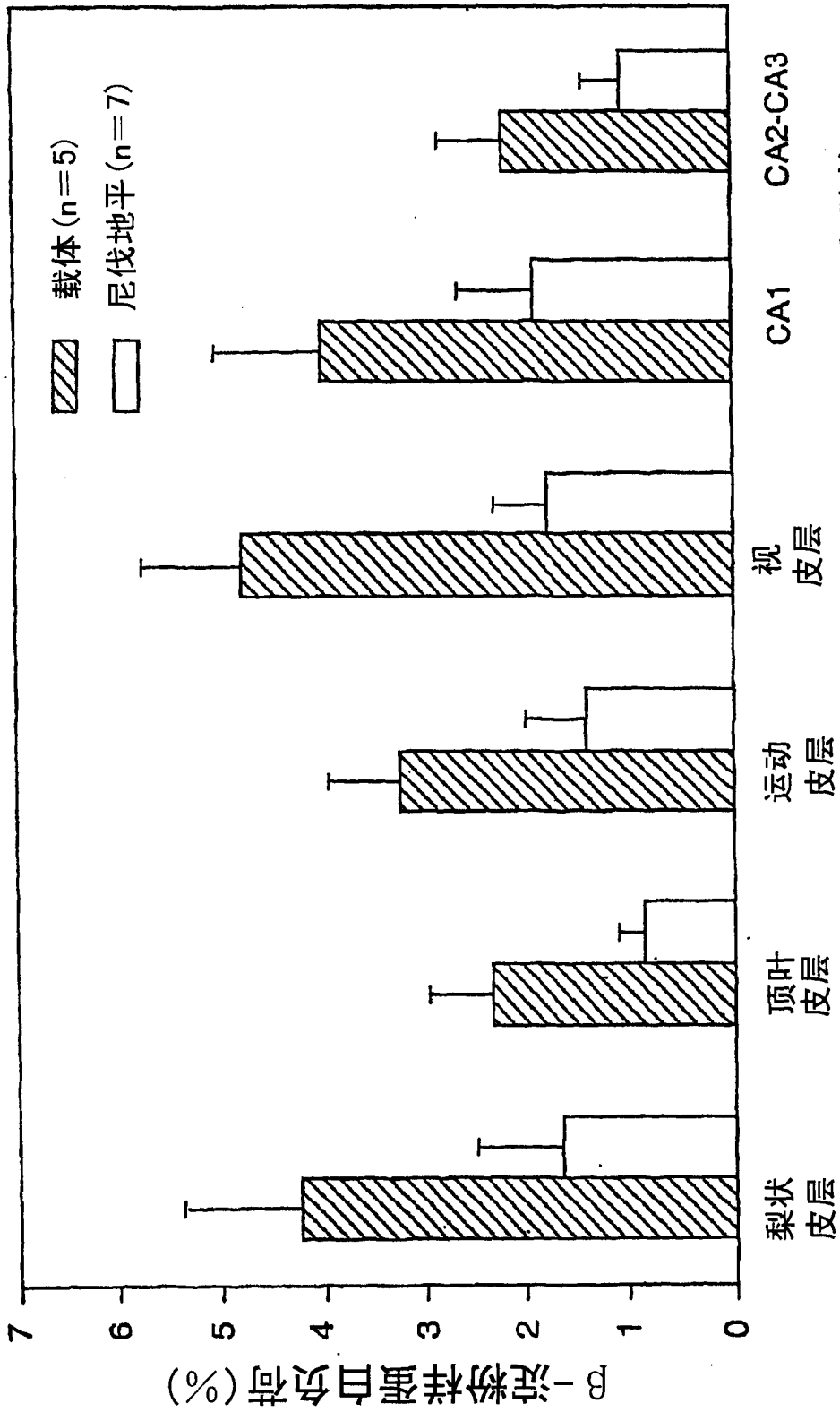
5 而且，尼伐地平有效地对抗 AgA β 对人前体神经元细胞系的神经毒性作用。虽然尼伐地平治疗没有明显减少 A β 1-40 的产生，但给予尼伐地平后有减少 A β 1-40 产生的趋势。这种 A β 1-40 的减少潜在地反映出产生的减少，但是其它与 A β 1-40 减少有关的机制非限制性地包括：吞噬作用或其它破坏作用、或防止积聚和检测的细胞作用。然而，不考虑机制，数据提示尼伐地平

10 的存在伴随着 A β 1-40 的减少。最后，2 岁龄 TgPS/APP^{sw} 小鼠 I.P. 长期给予尼伐地平显著地增加 A β 的血浆水平，提示，尼伐地平除了能减少脑中 A β 沉积外，尼伐地平治疗还可减少已在患者脑中沉积的 A β 。

鉴于上述数据，可推断，对患有大脑淀粉样原性疾病如 AD 的动物或人给予尼伐地平，可显著地减少特异性富含这种病理学沉积物的脑的临界

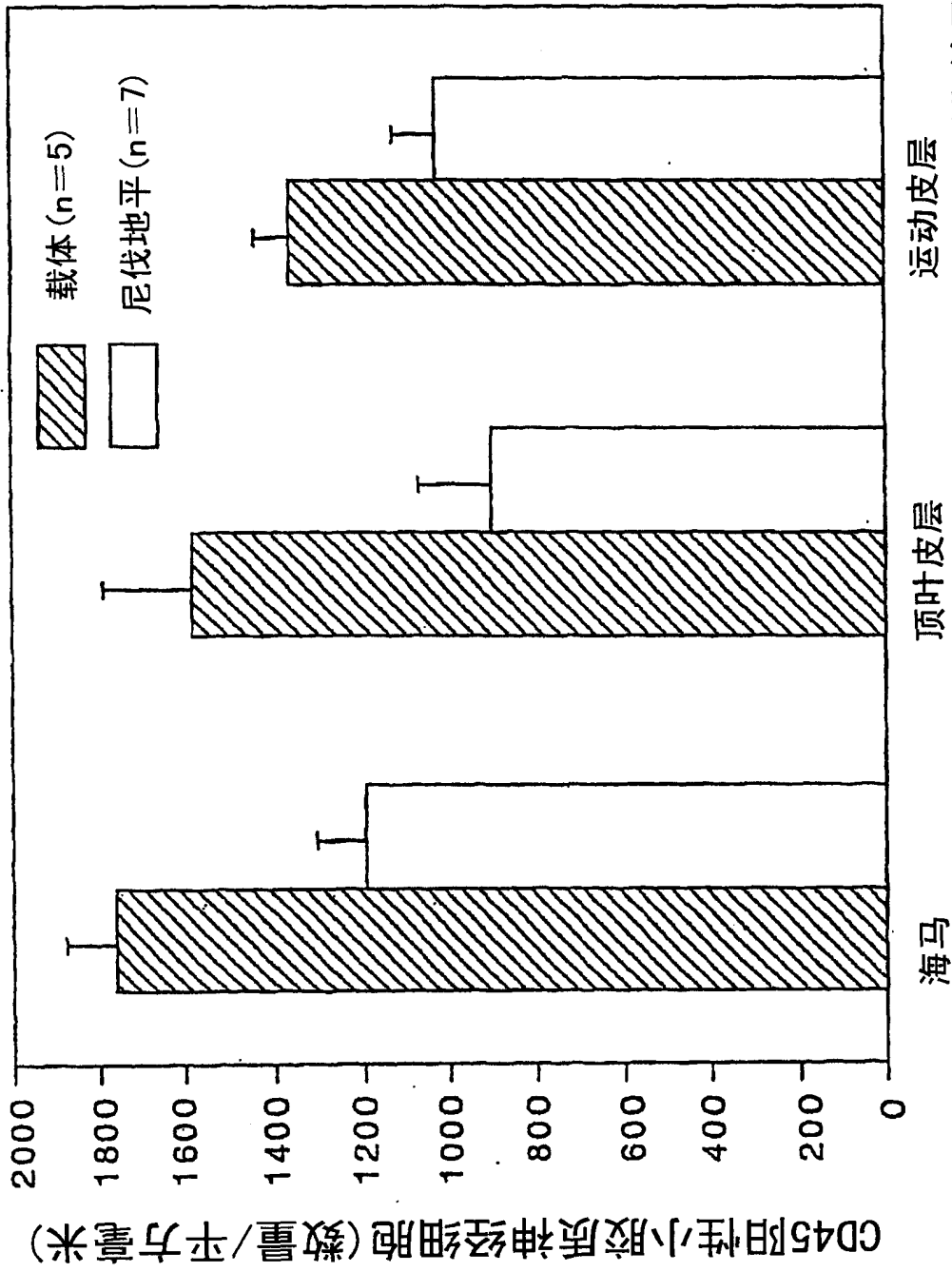
15 区域中 A β 的量，并减少已在脑中沉积的 A β 。另外，给予尼伐地平可对抗 A β 的神经毒性作用，认为神经毒性作用引起 AD 中所见的广泛且破坏性神经元破裂、以及小胶质细胞活性降低，小胶质细胞活性降低导致 AD 患者脑中所见的特异性炎症反应。最后，尼伐地平治疗可降低在患有大脑淀粉样原性疾病如 AD 的动物或人的脑中已沉积的 A β 的浓度。

20 本领域技术人员将明白，可对本发明方法进行各种改进和变化而不背离本发明精神或范围。因此，本发明包括在所附权利要求及其等价物的范围内的改进和变化。



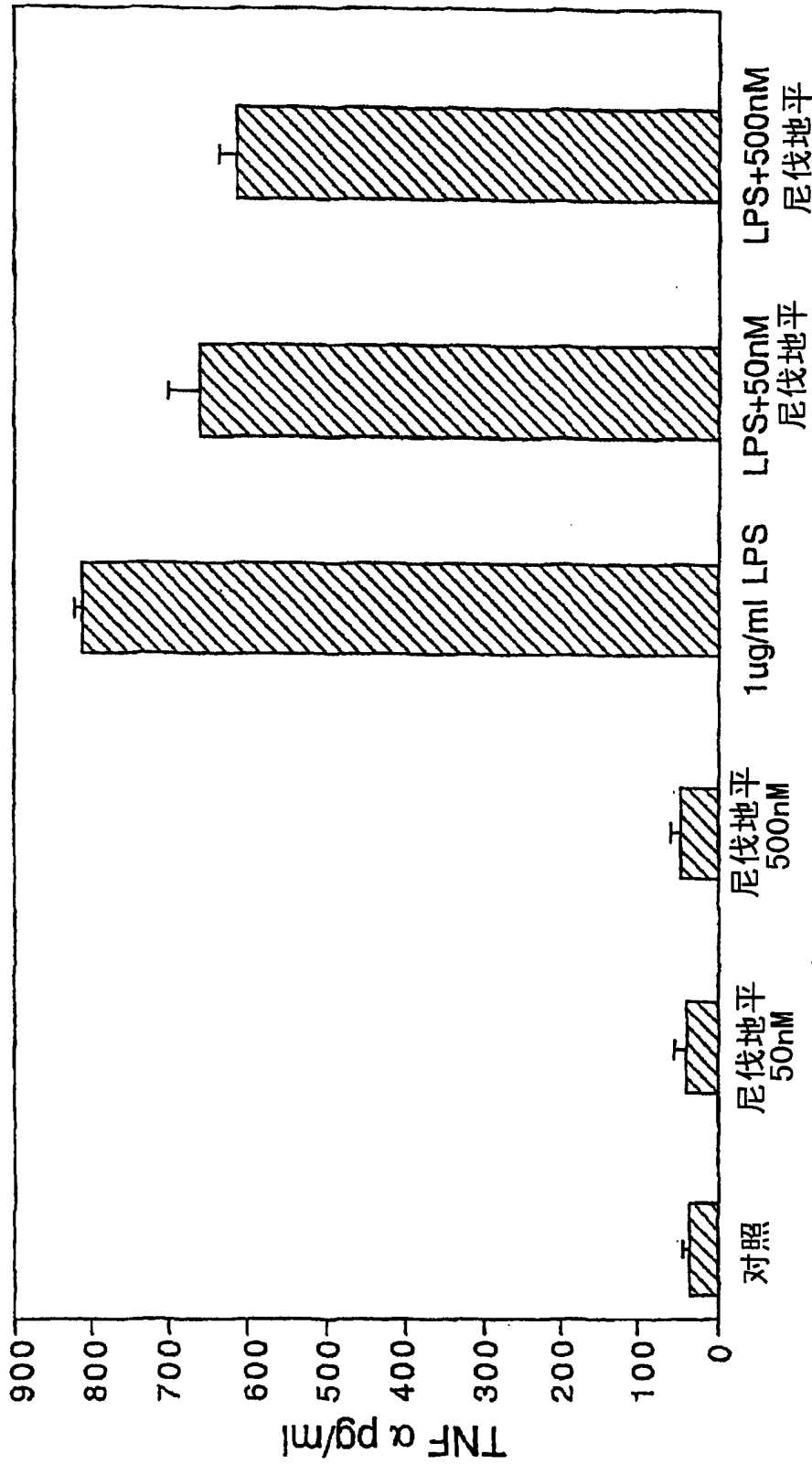
使用4G8免疫染色技术, 长期给予尼伐地平对TgAPP^{sw}小鼠脑的不同区域的A β 沉积(A β 负荷)的影响

图 1



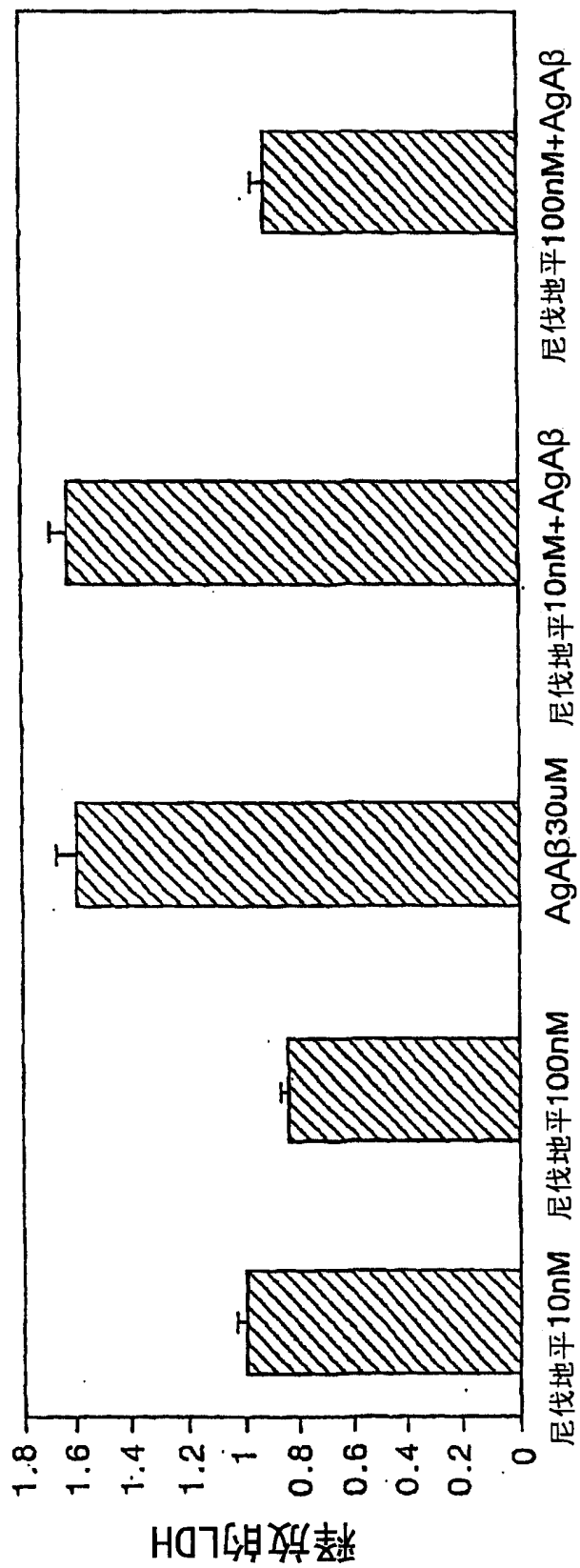
使用确定CD45+小胶质细胞的数量
尼伐地平在TgAPP^{sw}小鼠脑中对小胶质细胞活性的影响

图 2



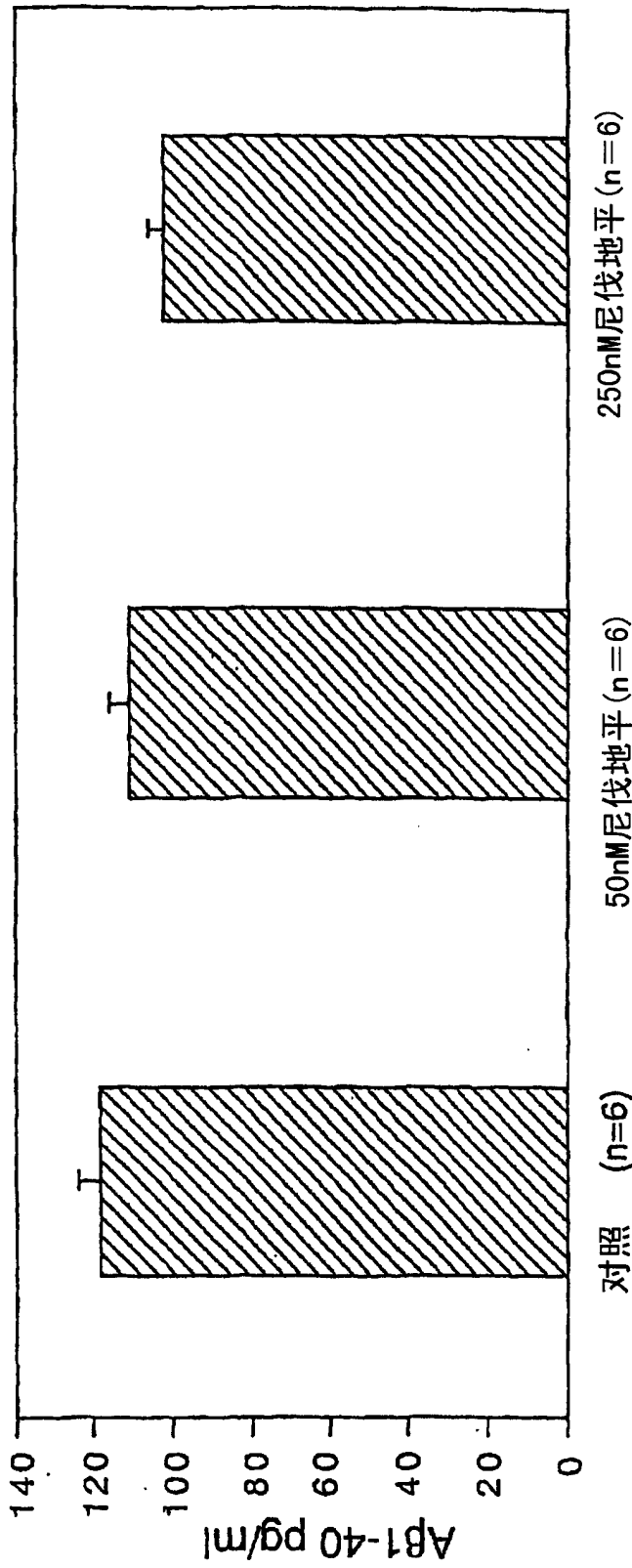
在体外用脂多糖 (LPS)活化24小时的N9鼠小胶质细胞中，
尼伐地平对小胶质细胞活性的影响。ELISA
测定TNF-α的产生(pg/ml)，确定小胶质细胞活性。

图 3



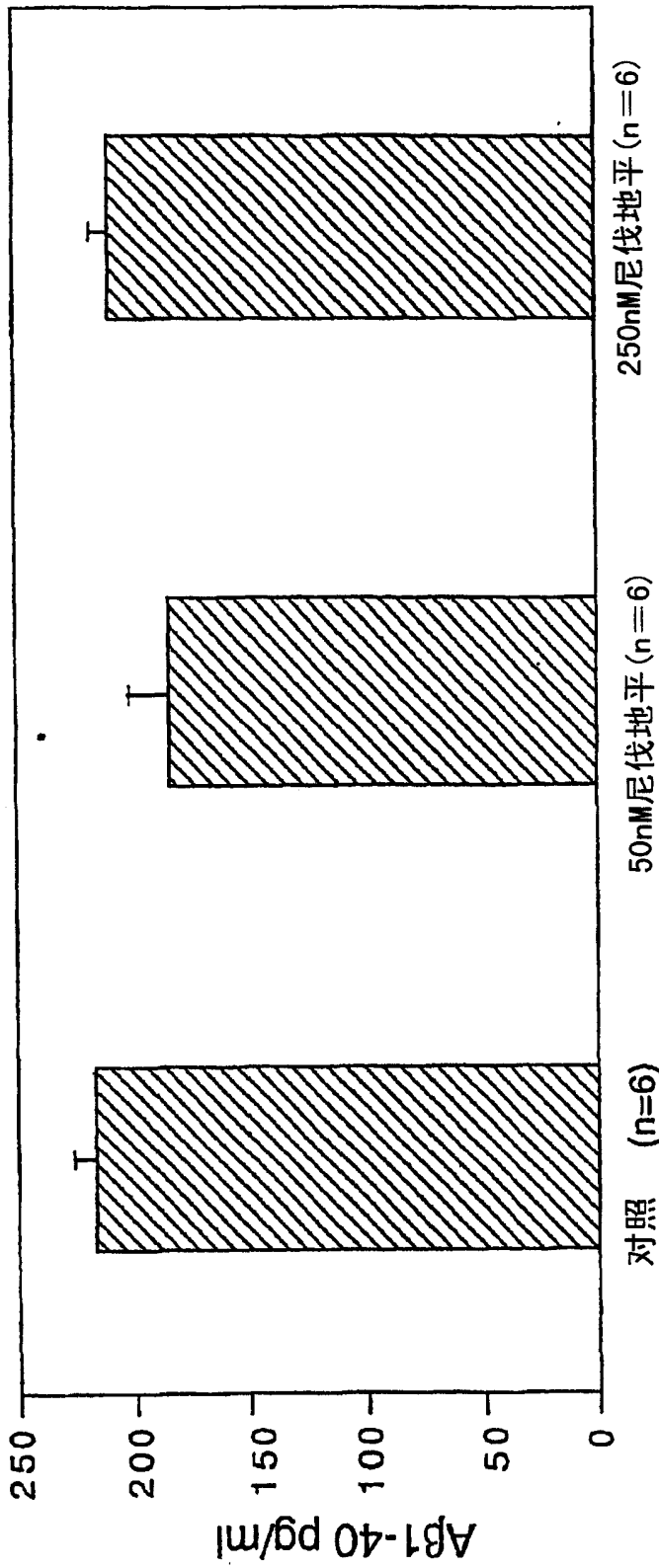
在用30μM的预聚集Aβ1-40(AgAβ)处理3天的HPNC中，给予尼伐地平对Aβ神经毒性的影响。通过测定细胞释放的乳酸脱氢酶(LDH)的量，评价神经毒性

图 4



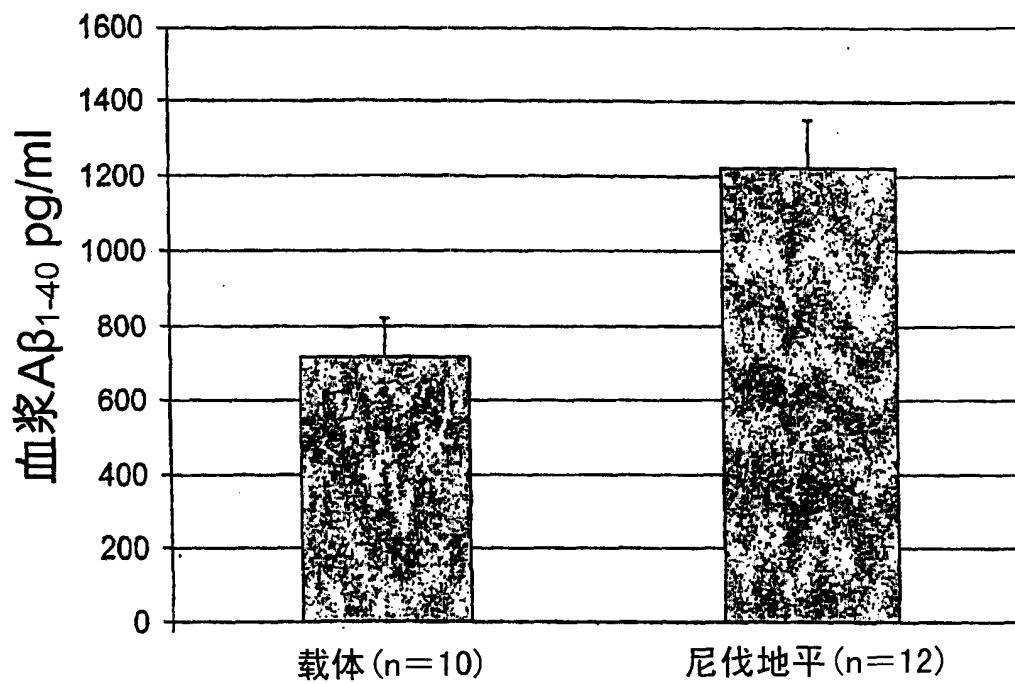
使用转染APPsw的人成胶质瘤细胞，尼伐地平对APP加工的影响。
用50nM和250nM尼伐地平处理细胞(A)24小时和(B)48小时。
ELISA法测定培养液中产生的Aβ1-40。

图 5A



使用转染APPsw的人成胶质瘤细胞，尼伐地平对APP加工的影响。
用50nM和250nM尼伐地平处理细胞(A)24小时和(B)48小时。
ELISA法测定培养液中产生的Aβ1-40。

图 5B



在2岁龄TgPS/APPsw小鼠中，尼伐地平对血浆A β 水平的影响。用尼伐地平(1.5毫克/公斤体重)每天腹膜内处理动物，持续三周半。

图 6