

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200380105972.7

[51] Int. Cl.

A61K 31/00 (2006.01)

A61K 31/38 (2006.01)

A61K 31/444 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 1 月 25 日

[11] 公开号 CN 1726016A

[22] 申请日 2003.12.10

[21] 申请号 200380105972.7

[30] 优先权

[32] 2002.12.12 [33] FR [31] 0215722

[86] 国际申请 PCT/FR2003/003654 2003.12.10

[87] 国际公布 WO2004/062652 法 2004.7.29

[85] 进入国家阶段日期 2005.6.13

[71] 申请人 安万特医药股份有限公司

地址 法国安东尼

[72] 发明人 T·康东 L·普拉迭尔

J·贝纳维德 H·霍耶尔

H-L·舍费尔

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 隋晓平

权利要求书 4 页 说明书 10 页 附图 4 页

[54] 发明名称

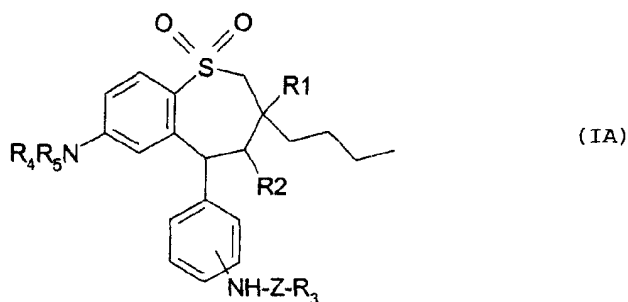
阿尔茨海默氏病的预防和治疗

[57] 摘要

本发明涉及胆汁酸肠再摄取抑制剂在预防和治疗阿尔茨海默氏病中的用途，所述抑制剂可以与 HMG-CoA 还原酶抑制剂、胆固醇摄取抑制剂、胆固醇合成抑制剂或 APP 促分泌酶抑制剂联合给药。

1、胆汁酸再摄取抑制剂化合物在制备用于预防或治疗阿尔茨海默氏病的药物中的用途。

- 5 2、权利要求1的用途，其中胆汁酸再摄取抑制剂是式(IA)化合物及其可药用盐：



其中：

R^1 表示甲基、乙基、丙基或丁基；

- 10 R^2 表示 H、OH、 NH_2 或 $NH-(C_1-C_6)$ 烷基；

R^3 是单糖、双糖、三糖或四糖，所述基团是未取代的或用保护糖的基团单-或多取代的；

R^4 是甲基、乙基、丙基或丁基；

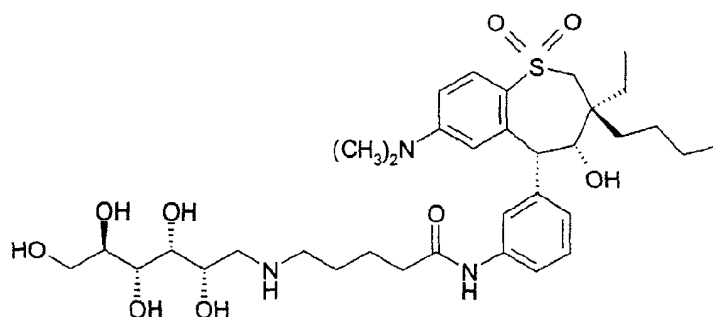
R^5 是甲基、乙基、丙基或丁基；

- 15 Z 是 $(C=O)_n-(C_0-C_{16})$ - 烷基； $(C=O)_n-(C_0-C_{16})$ - 烷基 -NH；
 $(C=O)_n-(C_0-C_{16})$ -烷基-O； $(C=O)_n-(C_0-C_{16})$ -烷基-(C=O)-； 或一个共价键；

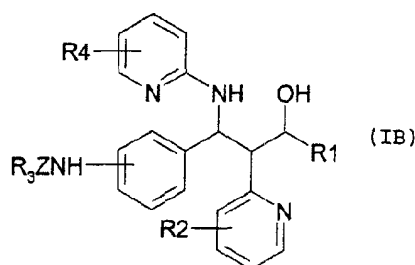
n 是 0 或 1；

m 是 0 或 1。

- 20 3、权利要求1或2的用途，其中胆汁酸再摄取抑制剂是下式(IA)化合物：



4、权利要求1的用途，其中胆汁酸再摄取抑制剂是式(1B)化合物及其可药用盐：



- 5 其中 R^1 是苯基或杂芳基，它们是未取代的或被 1-3 个独立的基团取代的，所述的基团选自 F、Cl、Br、I、-OH、-CF₃、-NO₂、-NHR⁹、-NR⁹R¹⁰、-CHO、-CO₂H、-CO₂R¹¹、-COR¹²、-(C₁-C₆)-烷基-OH、-(C₁-C₆)-烷基-OH-苯基、-(C₁-C₆)-烷基-CF₃、-(C₁-C₆)-烷基-NO₂、-(C₁-C₆)-烷基-CN、-(C₁-C₆)-烷基-NH₂、-(C₁-C₆)-烷基-NHR⁹、-(C₁-C₆)-烷基-NR⁹R¹⁰、-(C₁-C₆)-烷基-CHO、-(C₁-C₆)-烷基-CO₂H、-(C₁-C₆)-烷基-CO₂R¹¹、-(C₁-C₆)-烷基-COR¹²、-O-(C₁-C₆)-烷基-OH、-O-(C₁-C₆)-烷基(-OH)-苯基、-O-(C₁-C₆)-烷基-CF₃、-O-(C₁-C₆)-烷基-NO₂、-O-(C₁-C₆)-烷基-CN、-O-(C₁-C₆)-烷基-NH₂、-O-(C₁-C₆)-烷基-NHR⁹、-O-(C₁-C₆)-烷基-NR⁹R¹⁰、-O-(C₁-C₆)-烷基-CHO、-O-(C₁-C₆)-N-S₃H、-S₂-CH₃、-O-(C₁-C₆)-烷基-O-(C₁-C₆)-烷基苯基、-(C₁-C₆)-烷硫基或吡啶基，所述烷基基团未被取代或被一个或多个氟原子取代，并且苯基或吡啶基未被取代或被甲基、甲氧基或卤素单取代；

R^2 表示 H、OH、-CH₂OH、-OMe、-CHO 或-NH₂；

R^3 是单糖、双糖、三糖或四糖残基，所述基团是未取代的或被保护糖

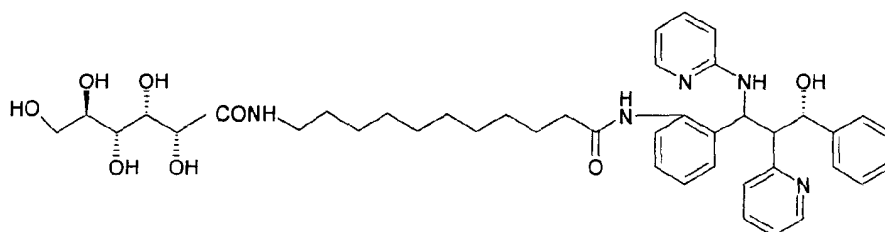
的基团 HO-SO_2 -或 $(\text{HO})_2\text{-PO}$ -单-或多取代的;

R^4 是 H、甲基、F 或 -OMe;

$\text{R}^9\text{-R}^{12}$ 相互独立地表示 H 或 $-(\text{C}_1\text{-C}_8)$ -烷基;

Z 表示一个共价键或基团 $-\text{NH}-(\text{C}_0\text{-C}_{36})$ -烷基 $-\text{CO}-$ 、 $-\text{O}-(\text{C}_0\text{-C}_{36})$ -烷基
5 $-\text{CO}-$ 、 $-(\text{CO})_m-(\text{C}_0\text{-C}_{36})$ -烷基 $-(\text{CO})_n-$ 、氨基酸残基、二氨基酸残基,可理解
的是所述氨基酸残基或二氨基酸残基可以是被氨基酸保护基单-或多取代
的。

5、权利要求 1 或 4 的用途,其中胆汁酸再摄取抑制剂是下式(IB)化合物:



10

6、权利要求 1-5 中任一项的用途,其中胆汁酸再摄取抑制剂是口服
给药的药物组合物的形式。

7、权利要求 6 的用途,其中可口服给药的药物组合物含有 0.02-50mg
的胆汁酸再摄取抑制剂。

15 8、权利要求 1-7 中任一项的用途,其中一种或多种胆汁酸再摄取抑
制剂与一种或多种选自 HMG-CoA 还原酶抑制剂、胆固醇摄取抑制剂、胆
固醇合成抑制剂或 γ 和 β APP 促分泌酶抑制剂联合给药。

9、权利要求 8 的用途,其中同时、分别或间隔一定时间给予各种活
性组分。

20 10、在口服后降低血浆胆固醇水平但不需要吸收到体内的化合物在制
备用于预防或治疗阿尔茨海默氏病的药物中的用途。

11、一种预防或治疗处于阿尔茨海默氏病恶化危险或恶化过程中患者
的方法,该方法包括给予这种患者治疗有效量的口服后具有降低胆固醇血
活性但不渗透到体内的化合物。

25 12、权利要求 11 的预防或治疗阿尔茨海默氏病的方法,其中所述具有

降低胆固醇血活性但不渗透到体内的化合物是胆汁酸再摄取抑制剂。

13、权利要求 12 的预防或治疗阿尔茨海默氏病的方法，其中所述胆汁酸再摄取抑制剂是权利要求 2 - 5 中任一项定义的化合物。

14、权利要求12或13的预防或治疗阿尔茨海默氏病的方法，其中所述
5 胆汁酸再摄取抑制剂与一种或多种选自HMG-CoA还原酶抑制剂、胆固醇摄取抑制剂、胆固醇合成抑制剂或 γ 和 β APP促分泌酶抑制剂联合给药。

阿尔茨海默氏病的预防和治疗

5 本发明的主题是肠胆汁酸再摄取抑制剂在预防和治疗阿尔茨海默氏病中的用途。

阿尔茨海默氏病(AD)是影响大部分老年人的进行性神经退化性疾病。这种疾病在临床上的特点是记忆丧失和认知功能衰退,并且在神经病理学上是在脑细胞内存在有 β -淀粉样(A- β)肽的神经元纤维沉积并且在细胞外
10 沉积形成淀粉样斑(Yankner BA(1996) *Neuron* 16: 921-932)。除这些症状外,还存在有大量的其它异常变化包括免疫和炎性系统损害并且线粒体功能损伤,它们可导致氧化性紧张增加、细胞程序死亡和最终导致细胞死亡的机制激活。

淀粉样斑主要由含 40 或 42 残基的 A- β 肽组成,它们是在 β -淀粉样肽
15 前体蛋白(APP)的蛋白水解过程中产生的。A- β 细胞外沉积是 AD 和相关疾病的一个非常显著的特征。它们代表了所有形式的 AD 的一个不变特征,包括家族型 AD(FAD)。该疾病的早期家族型(出现在 40 到 60 岁之间)是由于 APP 基因和早衰-1(préséniline-1, PS1)及早衰-2(PS2)基因的突变引起的。这三个基因的突变诱导 APP 蛋白水解发生改变,导致 A β 的过量产生和病
20 理及症状的早期出现,类似于个类 AD(Czech C.,等人(2000) *神经生物学进展*(*Progress in Neurobiology*) 60: 361-382)。

也已经通过流行病学研究和近来的生物化学及细胞生物学研究确立了胆固醇和阿尔茨海默氏病之间的联系(参见 Hartmann, T. 的评论(2001) *TINS* 24: S45-48)。成年人高胆固醇和高血压显著增加阿尔茨海默氏病的
25 患病危险(Kivipelto 等人, 2001 *Br Med J.* 322: 1447)。

然而,有报道表明用抑制素类型的降低胆固醇血活性剂进行治疗的人群会大大降低患病的危险(Wolozin 等人(2000) *Arch Neurol.* 57: 1439; Jick 等人(2000) *Lancet* 356: 1627)。

分子水平上的相关性似乎在最近已经确立。体外和体内的高胆固醇水

平增加 A- β 肽的产生并加速淀粉样斑出现(Sparks 等人(1994) *Exp. Neurol.* 126: 88-94; Refolo 等人(2000) *Neurobiol. Dis.* 7: 321-331; Puglielli 等人(2001) *Nat. Cell Biol.* 3: 905; Shie 等人(2002). *Neuroreport* 13: 455), 同时胆固醇合成途径抑制剂减少淀粉样斑(Simons 等人(1998) *PNAS USA* 95: 6460-6464; Faßbender 等人(2001) *PNAS USA* 98: 5856, Refolo 等人, (2001) *Neurobiol. Dis.* 8: 890-899).

所以, 为了降低体内 β -淀粉样肽的水平并治疗、预防或减缓阿尔茨海默氏病的恶化, 建议使用胆固醇合成抑制剂如 3-羟基-3-甲基戊二酰基辅酶 A 还原酶(HMG CoA 还原酶), 该酶是一种在胆固醇生物合成中起作用的酶(参见 WO 00/28981), 特别是抑制素如辛伐他汀(Hartman, 2001 *TINS* 24: S45-48).

迄今为止, 还没有确定抑制素的治疗作用是由于对中枢神经系统直接作用还是由于降低血浆胆固醇的作用。当然, 仅仅是对血浆胆固醇水平的作用似乎不太可能, 因为通常都认为脑胆固醇不依赖于血浆胆固醇(Dietschy 和 Turley(2001) *Curr. Opin. Lipidol.* 12: 105-112).

申请人已证明, 特定的药理学类物质胆汁酸再摄取抑制剂(BARI)可通过阻断胆汁酸在肠中的再摄取降低血浆胆固醇的水平, 也可降低脑中 β -淀粉样肽的水平。

胆汁酸再摄取抑制剂不被吸收, 并且其作用部位是在小肠, 在该部位阻断分泌的胆汁酸被再摄取, 它是胆固醇前体的主要来源。

下文实验部分所获得的和描述的结果可表明只降低血浆胆固醇水平以便降低脑中 β -淀粉样肽水平。

而令人惊奇的是, 已表明胆汁酸再摄取抑制剂(BARI)在阿尔茨海默氏病动物模型中是有效的, 其作用仅仅是通过调节血浆胆固醇水平, 并且特别是没有渗透到脑中, 因为它们不被身体所吸收。

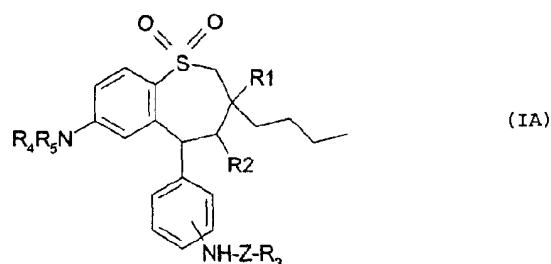
所述的阿尔茨海默氏病的预防或治疗理解为意指预防或延迟阿尔茨海默氏病出现和/或恶化的可能性。

所以, 本发明的主题是胆汁酸再摄取抑制剂化合物在制备可预防或治疗阿尔茨海默氏病药物中的用途。

进一步来说,本发明的主题是口服后降低血浆胆固醇水平而不需要被吸收到体内的化合物或者化合物的混合物在预防或治疗阿尔茨海默氏病中的用途。

具有胆汁酸再摄取抑制剂活性(BARI)的分子具体描述在美国专利 5 6,221,897 和美国专利 6,245,744 中。

所以,更具体来说,本发明的主题是胆汁酸再摄取抑制剂化合物在制备可预防或治疗阿尔茨海默氏病的药物中的用途,其中胆汁酸再摄取抑制剂是式(IA)化合物及其可药用盐:



10 其中:

R^1 表示甲基、乙基、丙基或丁基;

R^2 表示 H、OH、 NH_2 或 $NH-(C_1-C_6)$ 烷基;

R^3 是单糖、双糖、三糖或四糖,所述基团是未取代的或用保护糖的基团单-或多取代的;

15 R^4 是甲基、乙基、丙基或丁基;

R^5 是甲基、乙基、丙基或丁基;

Z 是 $(C=O)_n-(C_0-C_{16})$ - 烷基; $(C=O)_n-(C_0-C_{16})$ - 烷基 -NH; $(C=O)_n-(C_0-C_{16})$ -烷基-O; $(C=O)_n-(C_0-C_{16})$ -烷基-(C=O)-; 或一个共价键;

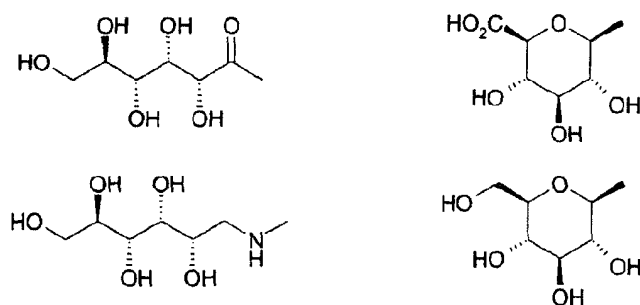
n 是 0 或 1;

20 m 是 0 或 1.

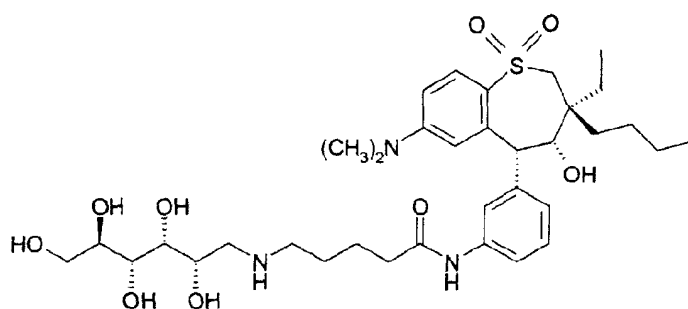
所述的单糖基团被理解为意指含有 5、6、7 或 8 碳原子的多元醇,也包含羰基(酮或醛),大多数情况下它们不以游离状态存在而与同一分子中的一个或多个羟基结合,其形式是半酮缩醇或环半酮缩醇。可包括含有 5 个碳原子的糖如 L-阿拉伯糖、D-核糖、2-脱氧-D-核糖和 D-木糖。

25 这些糖形成戊糖(或戊醛糖)系列部分。

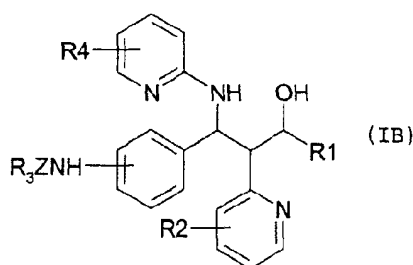
也可包括含有 6 个碳原子的糖, 如 D-葡萄糖、D-果糖、D-半乳糖和 D-甘露糖。也可包括赤藓糖、甘油醛、景天庚酮糖、葡糖胺、半乳糖胺、葡萄糖醛酸(glucuronic acid)、半乳糖醛酸、葡糖酸、半乳糖酸、甘露糖酸、还原葡萄糖胺、3-氨基-1,2-丙二醇、葡糖二酸和甘露糖二酸(galactaric acid)。优选的碳水化合物中, 可提及下列基团:



本发明最具体的主题是胆汁酸再摄取抑制剂化合物在制备可预防或治疗阿尔茨海默氏病药物中的用途, 其中胆汁酸再摄取抑制剂是下式化合物 (IA)(产物 A):



更具体来说, 本发明的主题也是胆汁酸再摄取抑制剂化合物在制备可预防或治疗阿尔茨海默氏病药物中的用途, 其中胆汁酸再摄取抑制剂是下式化合物(II) 及其可药用盐:



其中 R^1 是苯基或杂芳基, 它们是未取代的或被 1-3 个独立的基团取代的, 所述的基团选自 F、Cl、Br、I、-OH、-CF₃、-NO₂、-NHR⁹、-NR⁹R¹⁰、-CHO、-CO₂H、-CO₂R¹¹、-COR¹²、-(C₁-C₆)-烷基-OH、-(C₁-C₆)-烷基-OH-苯基、-(C₁-C₆)-烷基-CF₃、-(C₁-C₆)-烷基-NO₂、-(C₁-C₆)-烷基-CN、-(C₁-C₆)-烷基-NH₂、-(C₁-C₆)-烷基-NHR⁹、-(C₁-C₆)-烷基-NR⁹R¹⁰、-(C₁-C₆)-烷基-CHO、-(C₁-C₆)-烷基-CO₂H、-(C₁-C₆)-烷基-CO₂R¹¹、-(C₁-C₆)-烷基-COR¹²、-O-(C₁-C₆)-烷基-OH、-O-(C₁-C₆)-烷基(-OH)-苯基、-O-(C₁-C₆)-烷基-CF₃、-O-(C₁-C₆)-烷基-NO₂、-O-(C₁-C₆)-烷基-CN、-O-(C₁-C₆)-烷基-NH₂、-O-(C₁-C₆)-烷基-NHR⁹、-O-(C₁-C₆)-烷基-NR⁹R¹⁰、-O-(C₁-C₆)-烷基-CHO、-O-(C₁-C₆)-N-S₃H、-S₂-CH₃、-O-(C₁-C₆)-烷基-O-(C₁-C₆)-烷基苯基、-(C₁-C₆)-烷硫基或吡啶基, 所述烷基衍生物可被一个或多个氟原子取代, 并且苯基或吡啶基可被甲基、甲氧基或卤素单取代;

R^2 表示 H、OH、-CH₂OH、-OMe、-CHO 或 -NH₂;

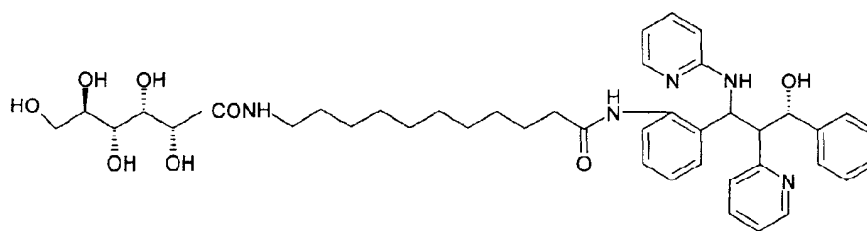
R^3 是单糖、双糖、三糖或四糖残基, 所述基团是未取代的或被保护糖的基团 HO-SO₂-或(HO)₂-PO-单-或多取代的;

R^4 是 H、甲基、F 或 -OMe;

R^9 - R^{12} 相互独立地表示 H 或 -(C₁-C₈)-烷基;

Z 表示一个共价键或基团 -NH-(C₀-C₃₆)-烷基-CO-、-O-(C₀-C₃₆)-烷基-CO-、-(CO)_m-(C₀-C₃₆)-烷基-(CO)_n-、氨基酸残基、二氨基酸残基, 可理解的是所述氨基酸残基或二氨基酸残基可以是被氨基酸保护基单-或多取代的。

更具体来说, 本发明的主题是胆汁酸再摄取抑制剂化合物在制备可预防或治疗阿尔茨海默氏病药物中的用途, 其中胆汁酸再摄取抑制剂是下式化合物(1B)(产物 B):



在上文引用的专利中描述了这些化合物的制备方法。

本发明中使用的胆汁酸再摄取抑制剂可以单独给药或与一种或多种选自下列的其它化合物联合给药：

- 5 - HMG-CoA 还原酶抑制剂，如抑制素，
- 胆固醇摄取抑制剂，
- 胆固醇合成抑制剂和任何其它降低血浆和/或大脑胆固醇水平的活性剂，
- γ 和 β APP 促分泌酶(促分泌酶)抑制剂。

- 10 胆固醇摄取抑制剂中可提及的是依泽替米贝。 γ 和 β APP 促分泌酶抑制剂，可提及的是 H. Josien(2002, Current Opinion in Drug Disc. & dev 5: 513-525)或 M.S. Wolfe 一般性论文(2002, Nat. Rev. Drug. Discov. 1: 859-866)中描述的化合物。

15 所以，本发明的主题也是胆汁酸再摄取抑制剂化合物在制备可预防或治疗阿尔茨海默氏病药物中的用途，其中胆汁酸再摄取抑制剂与一种或多种选自下列的其它化合物联合使用：

- a) HMG-CoA 还原酶抑制剂，或
- b)胆固醇摄取抑制剂，或
- c)胆固醇合成抑制剂，或
- 20 d) APP 促分泌酶抑制剂。

所以，本发明的主题也是胆汁酸再摄取抑制剂化合物在制备可预防或治疗阿尔茨海默氏病药物中的用途，其中胆汁酸再摄取抑制剂与 HMG-CoA 还原酶抑制剂、胆固醇摄取抑制剂、胆固醇合成抑制剂或 γ 和 β APP 促分泌酶抑制剂同时、分别或间隔一定时间给药来联合使用。

- 25 本发明的主题也是一种预防或治疗处于阿尔茨海默氏病恶化危险或恶

化过程中患者的方法，该方法包括给予这种患者治疗有效量的化合物，所述化合物具有降低胆固醇血的活性但在口服后不会渗透到体内。

更准确来说，本发明的主题是如上定义的预防或治疗阿尔茨海默氏病的方法，其中具有降低胆固醇血的活性但不会渗透到体内的化合物是胆汁酸再摄取抑制剂。

最具体地讲，本发明的主题是一种预防或治疗处于阿尔茨海默氏病恶化危险或恶化过程中患者的方法，该方法包括给予这种患者治疗有效量的上文所述的式(IA)和(IB)胆汁酸再摄取抑制剂，特别是化合物 A 或化合物 B。

而且，本发明的主题是如上定义的预防或治疗阿尔茨海默氏病的方法，其中将胆汁酸再摄取抑制剂与一种或多种选自 HMG-CoA 还原酶抑制剂、胆固醇摄取抑制剂、胆固醇合成抑制剂或 γ 和 β APP 促分泌酶抑制剂联合给药。

胆汁酸再摄取抑制剂可以药物制剂(药物组合物)的形式给药，所述药物制剂允许口服或经口(如舌下)给药。

所以，本发明的主题是胆汁酸再摄取抑制剂在制备可预防或治疗阿尔茨海默氏病药物中的用途，其中胆汁酸再摄取抑制剂是可以口服给药的药物组合物的形式。

更具体来说，本发明的主题是上文所述的用途，其中药物组合物含有有效剂量的至少一种胆汁酸再摄取抑制剂化合物和一种或多种药用惰性载体，和/或一种或多种口服或经口给药常用的添加剂。

本发明的药物组合物通常含有 0.01 到 100mg，并且优选 0.02 到 50mg 的胆汁酸再摄取抑制剂。

所以，更具体来说本发明的主题是胆汁酸再摄取抑制剂在制备可预防或治疗阿尔茨海默氏病药物中的用途，其中可口服给药的药物组合物含有 0.02 到 50mg 的胆汁酸再摄取抑制剂。

药物组合物可口服给药，例如以丸剂、片剂、包衣片、膜包衣片、颗粒、硬明胶胶囊和软明胶胶囊、溶液剂、糖浆、乳液、悬浮液或气雾剂混合物的形式给药。

药物组合物可通过已知的方法，将可药用惰性有机或无机载体加到胆汁酸再摄取抑制剂中来制备。

为了制备丸剂、片剂、包衣片和硬明胶胶囊，可以使用如乳糖、玉米淀粉及其衍生物、滑石粉、硬脂酸或其盐等。

- 5 适于制备溶液剂如乳剂或糖浆剂的赋形剂是如水、醇、甘油、多元醇、蔗糖、转化糖、葡萄糖、植物油等。药物制剂通常含有 0.05 到 90%重量比的胆汁酸再摄取抑制剂。

- 除了活性组分和载体之外，药物制剂可含有添加剂如稀释剂、崩解剂、粘合剂、润滑剂、湿润剂、稳定剂、乳化剂、防腐剂、甜味剂、着色剂、10 芳香剂、增稠剂、缓冲剂，并且也可含有溶剂或增溶剂或用于获得延迟作用的添加剂，也包括调节渗透压的盐、包衣剂或抗氧剂。

- 药物制剂也可含有两种或两种以上胆汁酸再摄取抑制剂。而且，除至少一种或多种胆汁酸再摄取抑制剂外，它们可以含有至少一种或多种其它可用于治疗或预防的活性组分如 HMG-CoA 还原酶抑制剂、胆固醇摄取抑15 制剂、胆固醇合成抑制剂或 γ 和 β APP 促分泌酶抑制剂。

使用胆汁酸再摄取抑制剂时，剂量可以在宽的范围内变化并且应该根据被治疗的个体来调整。这取决于如所使用的化合物或被治疗疾病的性质和严重性以及是否存在严重的或慢性的疾病或是否用于预防性治疗。

- 口服给药时，日剂量通常在 0.1 到 100mg/kg 变化，并且优选 0.1 到20 50mg/kg，特别是 0.1 到 5mg/kg。例如，75kg 体重的成年人日剂量可以为 0.3 到 0.5mg/kg。

日剂量可以被分成数份使用，特别是在给予大量活性组分的情况下，可以分为几份，例如 2、3 或 4 份。合适时，根据个体情况，可能需要以递增或递减量来给予不同的剂量。

- 25 以下列方式在转基因小鼠模型中进行产物 A 对淀粉样肽产生的体内试验：

a) 实验 1(附图 1)

- 动物治疗

将粉末形式的产物 A 以 0.01%(重量/重量)剂量与粉末形式的标准饲料

混合。

将8-10周龄雌性转基因小鼠Tg53(过度表达人APP转基因,进行了“瑞典”和“伦敦”突变, (2002 Wirths 等人(2002). *Brain Pathol.* 12, 275-286), 治疗3周。小鼠被分别被圈养在单独的笼中,可以自由饮水。每天每个笼
5 中分配6克的粉末食物(补充有或没有补充产物A)。使用11到12只的两组动物(对照组或补充有产物A的组)。治疗结束时,收集血样并使用生物分析自动化装置测定血浆胆固醇的水平。

- 大脑提取物的制备

人工杀死动物后,取出并称重小鼠脑组织。使用Potter装置在10倍
10 体积(重量/体积)的缓冲液中于冰上将组织分别匀化,缓冲液为: 0.32 M 蔗糖、4 mM Tris-HCl、pH 7.4, 含有蛋白酶抑制剂的混合物(Complete™, Roche Diagnostics)。然后,将匀化物在4℃温度下以50000×g离心2小时并收集上清液以制得溶解的(可溶Aβ)脑组织部分并储存在-80℃温度下。

为了测量Aβ的总量,将匀化物的等分试样用6M盐酸胍(最终浓度)
15 变性,然后在4℃温度下进行3次超声(Bandelin Electronique Sonorex Super RK 102K-德国),每次15分钟,以便溶解所有的Aβ肽形式(总体部分)。

- 通过免疫电化学发光方法测定淀粉样肽。

通过免疫电化学发光方法(Yang 等人(1994). *Biotechnology(NY)* 12(2),
20 193-194)使用两种小鼠单克隆抗体抗-Aβ肽(4G8和6E10)和读数Origen M8分析仪(IGEN Europe Inc. Oxford)、然后按Khorkova 等人(*J. Neurosci. Methods* 82, 159-166(1998))改良后的方案,测定转基因小鼠可溶或可溶与不可溶脑组织部分中Aβ肽的浓度。

按照供应商提供的方案(IGEN Europe Inc., Oxford)通过酯TAG-NHS
25 方法钌基化(ruthénylé)单克隆抗体4G8(Senetek PLC),它识别Aβ肽抗原决定部位残基17-24。将Ru-4G8和生物素化的抗体6E10、Aβ肽抗原决定部位1-10(Senetek PLC)暴露于可溶脑组织部分或总体脑组织部分并通过Origen读数仪对三份复合的Ru-4G8/Aβ/6E10-biot进行定量。对于总体部分,将盐酸胍浓度预先稀释到0.3M用于Aβ肽测定。一定范围的合成Aβ

肽(Bachem)用于校准每次实验。A β 肽浓度以每克脑组织起始重量所含的毫微克量来计算。

- 结果

与对照组相比, 补充有产物 A 的组(0.01%的产物 A, 在附图 1 中称为 BARI)显示脑组织中可溶 A β 肽降低 18% [$15.45 \pm 0.71 \text{ ng/克组织 (n=11)}$], 对照组为 $18.85 \pm 0.96 \text{ ng/克组织 (n=12)}$, 不成对 t 检验, $p=0.0103$].

作为组成部分的血浆胆固醇浓度也降低 14%[补充有产物 A 的组: $0.62 \pm 0.030 \text{ g/l (n=11)}$, 对照组: $0.72 \pm 0.023 \text{ g/l (n=12)}$; 不成对 t 检验 $p=0.0154$](参见附图 1)

10 b) 实验 2(附图 2 和 3)

治疗结束时使用 15.5-周龄的雌性转基因小鼠进行实验并由于周龄增大而具有较高的 A β 水平, 与对照组相比, 补充有产物 A 的组(0.01%, 附图 2 到 4 中称为 BARI)显示脑组织中可溶 A β 肽更为明显的降低, 为 40% [$24.5 \pm 1.2 \text{ ng/克组织 (n=8)}$], 对照组: $40.8 \pm 2.5 \text{ ng/克组织 (n=7)}$, 不成对 t 检验, $p=0.0001$](图 2)。脑组织中总体 A β 肽(包括 A β 肽的可溶形式和膜或凝聚形式)比其部分有大的降低, 为 46%[$196.3 \pm 17.8 \text{ ng/克组织 (n=8)}$], 对照组: $364.2 \pm 40.9 \text{ ng/克组织 (n=7)}$, 不成对 t 检验, $p=0.0017$](图 3)。对所有形式 A β 蓄积的这种影响对于治疗患有阿尔茨海默氏病和具有非常高浓度凝聚 A β 肽老年斑的患者来说是重要的。

20 如上所述, 血浆胆固醇水平本身降低 18%[补充有产物 A 的组: $0.70 \pm 0.03 \text{ g/l (n=8)}$], 对照组: $0.85 \pm 0.03 \text{ g/l (n=7)}$; 不成对 t 检验, $p=0.0037$]

c) 实验 3(附图 4)

在相同实验条件下, 用各种剂量的产物 A 进行治疗, 在至少 100 分之一产物 A 的剂量时显示可能的降低作用(是补充有 0.0001%产物 A 的组)同时保持对总 A β 肽脑组织水平的降低作用。的确, 总 A β 水平在 0.0001%的产物 A 时降低 21%[$85.4 \pm 4.1 \text{ ng/克组织 (n=8)}$], 对照组为 $108.1 \pm 8.5 \text{ ng/克组织 (n=10)}$, 不成对 t 检验, $p=0.04$], 在 0.001%的产物 A 时降低 20%[$86.5 \pm 5.9 \text{ ng/克组织 (n=10)}$], $p=0.050$]并且在 0.01%的产物 A 时为 16%[$90.5 \pm 6.9 \text{ ng/克组织 (n=10)}$], $p=0.123$, ns](图 4)。

图 1

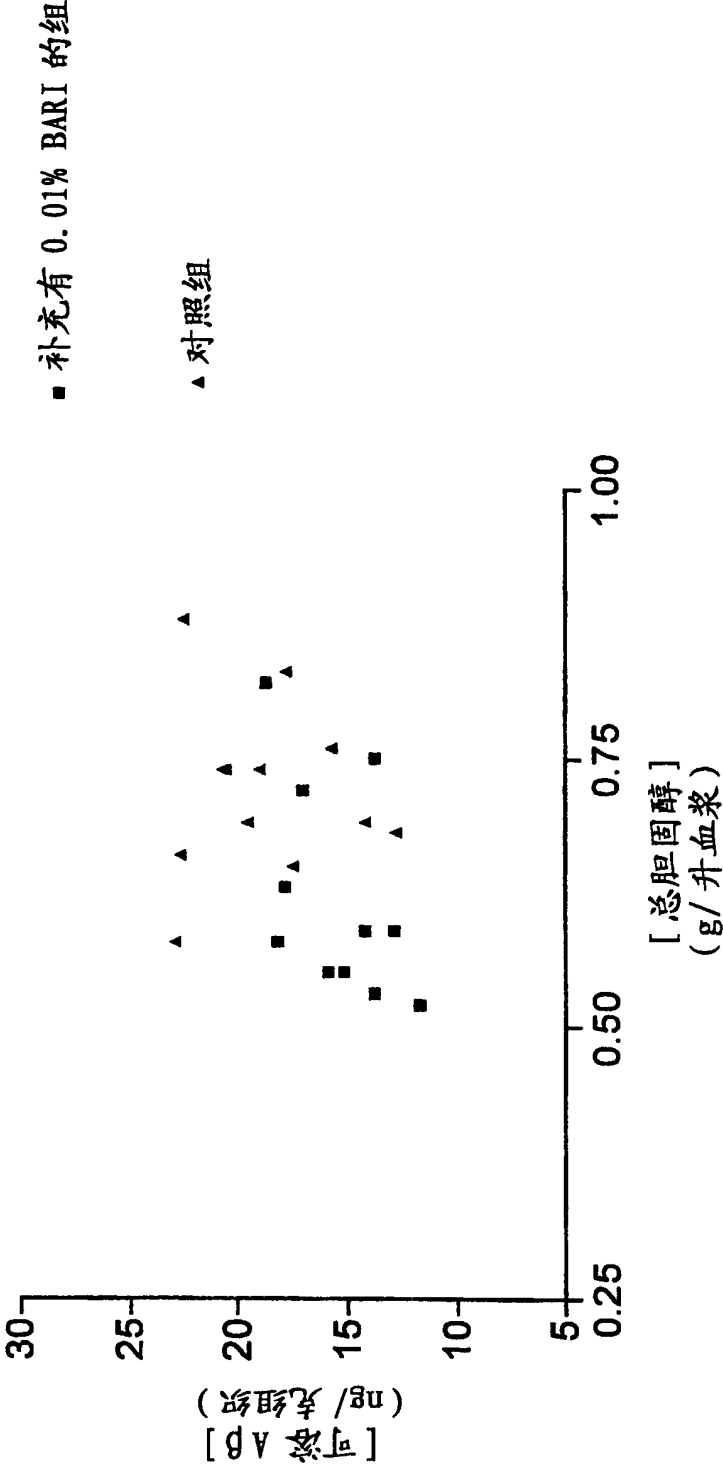
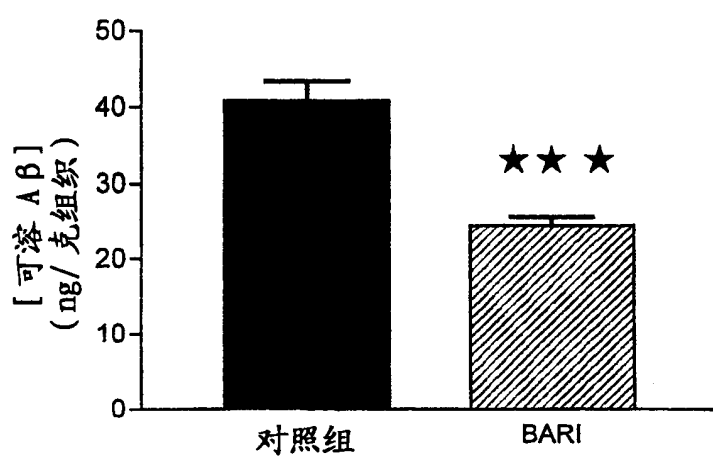


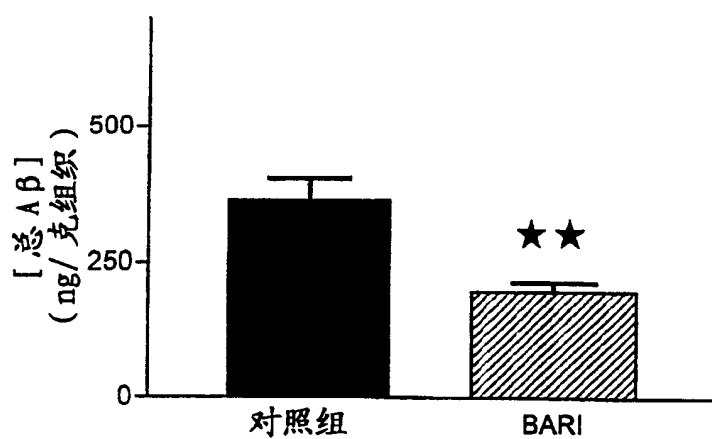
图 2



[可溶 Aβ] 平均值 ± ESM

对照组: 40.84 ± 2.47 ng/克组织 (n=7)
BARI 0.01%: 24.48 ± 1.23 ng/克组织 (n=8)
不成对 t 检验 $p < 0.0001$ ***

图 3



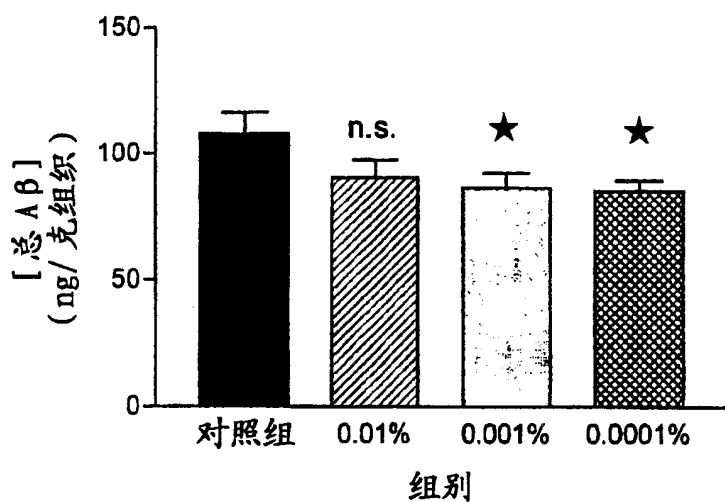
[总 Aβ] 平均值 ± ESM

对照组: 364.2 ± 40.87 ng/克组织 (n=7)

BARI 0.01%: 196.3 ± 17.84 ng/克组织 (n=8)

不成对 t 检验 p= 0.0017 ★★

图 4

**[总AB]平均值 ± ESM**

对照组: 108.1 ± 8.5 ng/克组织 (n=10)

BARI 0.01%: 90.5 ± 6.9 ng/克组织 (n=10)

与对照组相比: 不成对 t 检验 P=0.123 N.S.

BARI 0.001%: 86.5 ± 5.9 ng/克组织 (n=10)

与对照组相比: 不成对 t 检验 P=0.050 *

BARI 0.0001%: 85.4 ± 4.1 ng/克组织 (n=8)

与对照组相比: 不成对 t 检验 P=0.040 *