



(10) 授权公告号 CN 113473993 B

(45) 授权公告日 2024. 06. 04

(21) 申请号 202080017084.3

(22) 申请日 2020.02.25

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113473993 A

(43) 申请公布日 2021.10.01

(30) 优先权数据
62/810,728 2019.02.26 US
62/892,754 2019.08.28 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.08.26

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/019600 2020.02.25

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/176445 EN 2020.09.03

(73) 专利权人 巴伦西亚大学
地址 西班牙巴伦西亚
专利权人 益力舒健康公司

(72) 发明人 J·M·埃斯特雷拉阿里盖尔
M·E·奥夫拉多尔帕拉
R·萨尔瓦多 R·W·德林格尔

(74) 专利代理机构 深圳市百瑞专利商标事务所
(普通合伙) 44240
专利代理师 金辉

(51) Int.Cl.
A61K 31/706 (2006.01)
A61K 31/09 (2006.01)

A61K 31/198 (2006.01)

A61K 31/437 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 107849083 A, 2018.03.27

US 2017267709 A1, 2017.09.21

US 2018362570 A1, 2018.12.20

WO 2018058109 A1, 2018.03.29

WO 2018039207 A1, 2018.03.01

WO 2018213420 A1, 2018.11.22

WO 2009009529 A1, 2009.01.15

Ryan W Dellinger等.Repeat dose NRPT
(nicotinamide riboside and pterostilbene)
increases NAD+ levels in humans safely
and sustainably: a randomized, double-
blind, placebo-controlled study.《NPJ
Aging Mech Dis》.2017,第1-9页.

张伟等.异丁司特的临床安全性及体内药物
浓度研究.《海峡药学》.2013,第25卷(第04期),
277-279.

黄世杰.新药研究与开发.《国际药学研究杂
志》.2017,第44卷(第1期), 81. (续)

审查员 杨玥

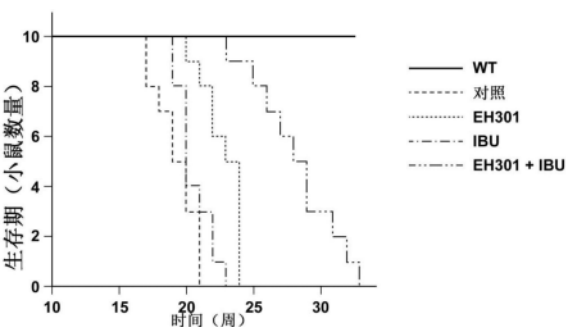
权利要求书1页 说明书24页 附图6页

(54) 发明名称

治疗运动神经元疾病的方法和组合物

(57) 摘要

本文提供了涉及通过向受试者施用(例如, 向受试者口服施用)包含烟酰胺核苷、紫檀芪和磷酸二酯酶(PDE)抑制剂(包括PDE4抑制剂,例如异丁司特)的组合物来治疗受试者的运动神经元疾病(例如ALS)的方法和组合物,该组合物还包括硫醇/半胱氨酸供体,例如乙酰半胱氨酸。



CN 113473993 B

[接上页]

(56) 对比文件

O A Andreassen等.N-acetyl-L-cysteine improves survival and preserves motor performance in an animal model of familial amyotrophic lateral sclerosis.《Neuroreport》.2000,第11卷(第11期),摘要部分.

黄世杰.新药研究与开发.《国际药学研究杂志》.2017,第44卷(第1期),81.

O A Andreassen等.N-acetyl-L-cysteine improves survival and preserves motor performance in an animal model of familial amyotrophic lateral sclerosis.《Neuroreport》.2000,第11卷(第11期),摘要部分.

1. 烟酰胺核苷与紫檀芪和异丁司特的组合在制备用于治疗有需要的受试者的肌萎缩侧索硬化 (ALS) 的药物中的用途, 其中相比于烟酰胺核苷与紫檀芪的组合以及相比于单独的异丁司特, 所述烟酰胺核苷与紫檀芪和异丁司特的组合导致生存期显著提高。

2. 根据权利要求1所述的用途, 其还包括向受试者施用脂肪酸补充剂。

3. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述烟酰胺核苷与紫檀芪和异丁司特的组合包含在药学上可接受的组合物中, 所述药学上可接受的组合物包括与一种或多种药学上可接受的载体和/或稀释剂一起配制的治疗有效量的烟酰胺核苷、紫檀芪和异丁司特。

4. 根据权利要求1所述的用途, 其中烟酰胺核苷和紫檀芪与一种或多种药学上可接受的载体和/或稀释剂一起配制, 分开地, 异丁司特与一种或多种药学上可接受的载体和/或稀释剂配制。

5. 根据权利要求1所述的用途, 其中烟酰胺核苷、紫檀芪和异丁司特, 各自分开地与一种或多种药学上可接受的载体和/或稀释剂配制。

6. 根据权利要求1所述的用途, 其中口服施用所述烟酰胺核苷与紫檀芪和异丁司特的组合。

7. 根据权利要求1所述的用途, 还包括硫醇/半胱氨酸供体, 其中所述硫醇/半胱氨酸供体是乙酰半胱氨酸。

8. 一种药学上可接受的组合物, 包括与一种或多种药学上可接受的载体和/或稀释剂一起配制的治疗有效量的烟酰胺核苷、紫檀芪和异丁司特。

9. 根据权利要求8所述的药学上可接受的组合物, 其中紫檀芪以50mg存在, 并且其中烟酰胺核苷以250mg存在。

10. 根据权利要求8所述的药学上可接受的组合物, 还包括硫醇/半胱氨酸供体, 其中所述硫醇/半胱氨酸供体是乙酰半胱氨酸。

11. 一种组合物在制备用于治疗有需要的受试者的肌萎缩侧索硬化 (ALS) 的药物中的用途, 其包括向所述受试者依次或同时施用包含200mg至1000mg量的烟酰胺核苷、50mg至200mg量的紫檀芪和异丁司特的组合物, 其中

相比于单独的烟酰胺核苷和紫檀芪的组合或相比于单独的异丁司特, 烟酰胺核苷、紫檀芪和异丁司特的组合导致生存期显著提高。

治疗运动神经元疾病的方法和组合物

技术领域

[0001] 本文提供了与通过向受试者施用(例如,向受试者口服施用)包含烟酰胺核苷、紫檀芪和磷酸二酯酶(PDE)抑制剂(包括PDE4抑制剂,例如异丁司特(ibudilast))的组合物来治疗受试者的运动神经元疾病(例如ALS)相关的方法和组合物。在另外的实施例中,硫醇/半胱氨酸供体,例如乙酰半胱氨酸也可以添加到组合物中和/或施用于受试者以进一步增强治疗。

背景技术

[0002] 最近评估肌萎缩侧索硬化症(ALS)模型中运动功能的实验表明,联合使用烟酰胺核苷(NR)和紫檀芪PT会产生积极效果(PCT/US 18/32932)。Cheng Y, Di S, Fan C, Cai L, Gao C, Jiang P, Hu W, Ma Z, Jiang S, Dong Y, Li T, Wu G, Lv J, Yang Y. 紫檀芪激活SIRT1可减轻缺血再灌注损伤引起的骨骼肌氧化应激损伤和线粒体功能障碍。Apoptosis. 2016 Aug; 21(8):905-16表明,紫檀芪激活SIRT1可减轻缺血再灌注损伤引起的骨骼肌氧化应激损伤和线粒体功能障碍。Mendelsohn和Larrick(2014)表明,用烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)前体烟酰胺单核苷酸(NMN)治疗中老年小鼠(第一阶段OXPHOS缺陷)1周可恢复骨骼肌中的氧化磷酸化活性和其他线粒体功能标志物。此外,已经表明NAD⁺体内平衡的丧失会导致骨骼肌的进行性和可逆性变性(Frederick DW, Loro E, Liu L, Davila A Jr, Chellappa K, Silverman IM, Quinn WJ 3rd, Gosai SJ, Tichy ED, Davis JG, Mourkioti F, Gregory BD, Dellinger RW, Redpath P, Migaud ME, Nakamaru-Ogiso E, Rabinowitz JD, Khurana TS, Baur JA. Loss of NAD Homeostasis Leads to Progressive and Reversible Degeneration of Skeletal Muscle. Cell Metab. 2016 Aug 9; 24(2):269-82),以及补充NAD⁺可能有益于患有肌肉萎缩症或其他以PARP/NNMT基因表达特征为特征的神经肌肉退行性疾病的患者(Ryu D, Zhang H, Ropelle ER, Sorrentino V, Mázala DA, Mouchiroud L, Marshall PL, Campbell MD, Ali AS, Knowels GM, Bellemin S, Iyer SR, Wang X, Gariani K, Sauve AA, Cantó C, Conley KE, Walter L, Lovering RM, Chin ER, Jasmin BJ, Marcinek DJ, Menzies KJ, Auwerx J. NAD⁺ repletion improves muscle function in muscular dystrophy and counters global PARylation. Sci Transl Med. 2016 Oct 19; 8(361):361ra139)。

[0003] ALS相关的运动神经元退变涉及轴突损伤、神经胶质细胞活化和炎症细胞的存在。越来越多的证据表明神经炎症会导致神经退行性疾病(Ransohoff RM. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. Science 2016; 353:777-783),这是ALS的标志。神经炎症的特征在于反应性星形胶质细胞和小胶质细胞的存在、外周免疫细胞的中度浸润和炎症介质水平升高,并且在散发性ALS和家族性ALS的CNS运动区域中一直观察到,构成了疾病的标志(Liu J, Wang F. Role of Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Cellular Mechanisms and Therapeutic Implications. Front Immunol. 2017 Aug 21; 8:1005)。

[0004] 多项临床试验测试了各种抗炎药对ALS的作用(例如糖皮质激素或环氧合酶-2抑制剂)(<https://clinicaltrials.gov>)。然而,尽管专业人士和患者对使用糖皮质激素作为抗ALS疗法存在很多争议(参见例如不同的ALS相关论坛https://www.als.net/forum/yaf_postst49865_dexamethasone.aspx),这些试验都没有发现可以证明其转化为临床实践的治疗益处。然而,一些有趣的观察表明潜在的积极效果。例如,已经证明靶向CNS的抗炎剂2B3-201(甲基强的松龙脂质体)具有治疗潜力,减少ALS小鼠模型SOD1G93A中的脑干病理(brainstem pathology)(Evans MC,Gaillard PJ,de Boer M,Appeldoorn C,Dorland R,Sibson NR,Turner MR,Anthony DC,Stolp HB.CNS-targeted glucocorticoid reduces pathology in mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.Acta Neuropathol Commun.2014 Jun 13;2:66);或用青霉素G和氢化可的松治疗可减轻ALS相关症状(三名患者的病例系列)(Tuk B,Jousma H,Gaillard PJ.Treatment with penicillin G and hydrocortisone reduces ALS-associated symptoms:a case series of three patients)。比较口服糖皮质激素效力表明地塞米松显示出最高效力(Chrousos G,Pavlaki AN,Magiakou MA(2011).“Glucocorticoid Therapy and Adrenal Suppression”.PMID 25905379)。

[0005] 异丁司特(研发代码:AV-411或MN-166)是主要在日本使用的抗炎药,作为磷酸二酯酶抑制剂,最大程度抑制PDE4亚型,同时对其他PDE亚型也表现出显著抑制作用。异丁司特具有支气管扩张剂、血管扩张剂和神经保护作用,主要用于治疗哮喘和中风。它抑制血小板聚集,也可用于治疗多发性硬化。有趣的是,展现抗神经炎症特性的异丁司特也被提议用于治疗ALS(Kalafer et al.,2014,美国专利9,314,452B2)。

发明内容

[0006] 根据某些方面,本文提供了与通过向受试者施用(例如,向受试者口服施用)式I或式II化合物(例如烟酰胺核苷)、式III化合物(例如紫檀芪)和磷酸二酯酶(PDE)抑制剂(例如异丁司特)来治疗受试者的运动神经元疾病(例如,肌萎缩侧索硬化症或ALS)相关的方法和组合物。在某些实施例中,运动神经元疾病是ALS、遗传性痉挛性截瘫(HSP)、原发性侧索硬化(PLS)、进行性肌萎缩(PMA)、进行性延髓性麻痹(PBP)、假性延髓性麻痹或脊髓性肌萎缩。在另外的实施例中,可以将乙酰半胱氨酸添加到组合物中和/或向受试者施用以增强治疗。

[0007] 在某些方面,本文提供的方法和组合物涉及通过向受试者施用(例如,向受试者口服施用)式I或式II的化合物(例如烟酰胺核苷)、式III化合物(例如紫檀芪)和磷酸二酯酶(PDE)抑制剂(包括PDE1、PDE2、PDE3、PDE4、PDE5、PDE7、PDE9、PDE10和PDE11抑制剂,并且在示例性实施例中PDE4抑制剂例如异丁司特)来减缓或逆转受试者的运动神经元变性。在一些实施例中,受试者患有运动神经元疾病(例如,ALS、HSP、PLS、PMA、PBP、假性延髓性麻痹或脊髓性肌萎缩)。在另外的实施例中,可以将乙酰半胱氨酸添加到组合物中和/或向受试者施用以增强治疗。

附图说明

[0008] 图1说明了用不同组合物处理的SOD1 G93A小鼠的生存期分析。WT,野生型。口服施

用EH301[烟酰胺核苷(NR)和紫檀芪(PT)]:185mg烟酰胺核苷和/或30mg紫檀芪/Kg×天。口服施用异丁司特(ibu):12mg/Kg×天。在该图中,示出了EH301和异丁司特组合增加了SOD1^{G93A} ALS小鼠的生存期。

[0009] 图2A-2C说明了个体研究参与者在(A)ALSFRS-R评分、(B)FVC(%)和(C)MRC量表指数中相对于基线的4个月变化的总结。参加试验的所有参与者在至少一项结果测量中表现出积极的反应。

[0010] 图3A-3C说明了用烟酰胺核苷(NR)、紫檀芪(PT)、异丁司特和N-乙酰半胱氨酸(NAC)处理的FUS R521C小鼠的生存期。

[0011] 图4示出了NAC衍生物的合成。

具体实施方式

[0012] 定义

[0013] 在详细描述本发明之前,需要了解的是,本发明不限于特定的施用方式、患者群体等,因为它们可能有所不同,从附带的说明和附图中可以明显看出这一点。

[0014] 必须注意的是,正如本说明书和预期权利要求所使用的,除非上下文明确另有规定,否则单数形式“一(a)”、“一(an)”和“所述”包括复数引用。因此,例如,提到“药物(a drug)”包括单一药物以及两种或更多种相同或不同药物,提及“可选赋形剂”是指单一可选赋形剂以及两种或更多种相同或不同的可选赋形剂等。

[0015] 在描述和要求保护本发明时,将按照下文所述的定义使用以下术语。

[0016] “药学上可接受的赋形剂或载体”是指可选地包含在本发明成分中,不会对患者造成重大不良毒理学效应的赋形剂。

[0017] “药学上可接受的盐”包括但不限于氨基酸盐、用无机酸制备的盐(例如氯化物、硫酸盐、磷酸盐、二磷酸盐、溴化物和硝酸盐)或从上述任何一种的相应无机酸形式(例如氢氯化物等)中制备的盐、或用有机酸制备的盐(例如苹果酸盐、马来酸盐、富马酸盐、酒石酸盐、琥珀酸盐、乙基琥珀酸酯(ethylsuccinate)、柠檬酸盐、乙酸盐、乳酸盐、甲磺酸盐、苯甲酸盐、抗坏血酸盐、对甲苯磺酸盐、棕榈酸酯、水杨酸盐和硬脂酸盐、以及丙酸酯月桂硫酸酯、葡庚糖酸盐和乳糖酸盐)。类似地,含有药学上可接受的阳离子的盐包括但不限于钠、钾、钙、铝、锂和铵(包括取代铵)。

[0018] 如本文所述的“活性分子”或“活性剂”至少包括紫檀芪、烟酰胺核苷和磷酸二酯酶(PDE)抑制剂(包括异丁司特)。

[0019] “大体上”或“基本上”是指几乎全部或完全,例如,某些给定数量的95%或更多。

[0020] “可选的”或“可选地”是指后续描述的情况可能发生也可能不发生,因此该描述包括该情况发生的情况和不发生的情况。

[0021] 术语“中枢神经系统”或“CNS”包括脊椎动物大脑和脊髓的所有细胞和组织。因此,该术语包括但不限于神经元细胞、神经胶质细胞、星形胶质细胞、脑脊液(CSF)、间质空间(interstitial spaces)等。

[0022] “神经胶质细胞”是指CNS中的各种细胞,也已知为小胶质细胞、星形胶质细胞和少突胶质细胞。

[0023] 术语“受试者”、“个体”或“患者”在本文中可互换使用并且是指脊椎动物,优选地

哺乳动物。哺乳动物包括但不限于鼠类、啮齿类、类人猿、人类、农场动物、运动动物和宠物。如本文所提供,术语组合物或药剂的“药理学有效量”或“治疗有效量”是指无毒但足以提供所需反应的组合物或药剂的量,例如减少或逆转ALS。确切的所需量因受试者而异,取决于受试者的物种、年龄和一般状况、所治疗状况的严重程度、所采用的一种或多种特定药物、施用方式等。基于本文所提供的信息,本领域普通技术人员可以使用常规实验确定任何个别情况下的适当“有效”量。

[0024] 术语“约”,特别是在提及给定数量时,是指包括正负百分之五的偏差。

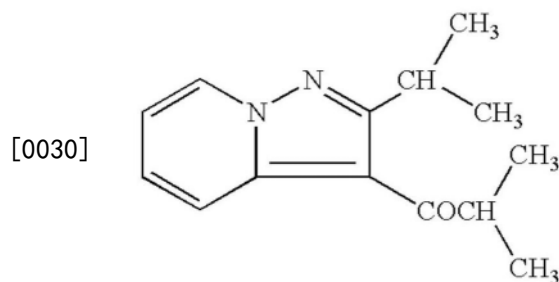
[0025] “治疗(treatment)”或“治疗(treating)”进行性神经变性疾病包括阻止进行性神经变性疾病的发展或逆转其症状。

[0026] 本发明用于治疗进行性神经变性疾病的方法基于以下分子的施用:紫檀芪、烟酰胺核苷和磷酸二酯酶(PDE)抑制剂(例如异丁司特)。

[0027] “磷酸二酯酶(PDE)抑制剂”是指催化3'-碳上的磷酸酯键水解以产生相应的5'-核苷酸单磷酸的一类化合物。因此,它们调节环核苷酸的细胞浓度。由于许多激素和神经递质的细胞外受体利用环核苷酸作为第二信使,因此PDE还调节细胞对这些细胞外信号的反应。至少有八类PDE:Ca²⁺/钙调蛋白依赖性PDE(PDE1);cGMP刺激的PDE(PDE2);cGMP抑制的PDEs(PDE3);cAMP特异性PDE(PDE4);cGMP结合的PDE(PDE5);光感受器PDE(PDE6);高亲和力,cAMP特异性PDE(PDE7);和高亲和力,cGMP特异性PDE(PDE9)。PDE抑制剂还可以根据它们对环核苷酸的催化选择性分为三大类:环AMP特异性PDE(PDE4、PDE7和PDE8)、环GMP特异性PDE(PDE5、PDE6和PDE9),以及缺乏特异性、水解两种环核苷酸的PDE(PDE1、PDE2、PDE3、PDE10和PDE11)。

[0028] 在实施例中,可用于本文描述的方法和组合物中的PDE抑制剂是PDE1、PDE2、PDE3、PDE4、PDE5、PDE7、PDE9、PDE10或PDE11抑制剂。PDE4抑制剂是阻断磷酸二酯酶4对环磷酸腺苷(cAMP)降解作用的化合物。PDE4作为中枢神经系统中细胞环AMP的主要负调节因子,它们在维持环AMP信号区域化方面发挥关键作用,并与多种神经疾病和损伤有关。

[0029] 异丁司特是一种小分子药物(分子量为230.3),其结构如下所示。



[0031] 异丁司特也可在ChemBank ID3227、CAS#50847-11-5和Beilstein手册参考编号5-24-03-00396下找到。其分子式对应于C₁₄H₁₈N₂O。异丁司特也有多种化学名称,包括2-甲基-1-[2-(1-甲基乙基)吡唑啉[1,5-a]吡啶-3-基]-1-丙酮;3-异丁酰-2-异丙基吡唑并[1,5-a]吡啶;和1-(2-异丙基-吡唑并[1,5-a]吡啶-3-基)-2-甲基-丙烷-1-酮。异丁司特的其他同义词包括Ibudilastum(拉丁语)、BRN 0656579、KC-404和MN-166。其商标名称为Ketas®。如本文所指,本文所指异丁司特旨在包括其任何和所有药学上可接受的盐形式、前药形式(例如,相应的缩酮)、溶剂化物等,视情况适用于其预定的施用制剂。

[0032] 异丁司特是环核苷酸磷酸二酯酶(PDE)3A、4、10A1和11A1的选择性抑制剂(Gibson

et al., Eur J Pharmacol 538:39-42, 2006), 并且还报道具有白三烯D4和PAF拮抗活性。异丁司特通过作用于炎症细胞(例如神经胶质细胞)来抑制炎症,从而抑制促炎介质和神经活性介质的释放。异丁司特还可抑制促炎细胞因子(IL-1 β 、TNF- α)的产生,并可能增加抗炎细胞因子(IL-4、IL-10)的产生。与上述相关的参考资料包括:Obernolte, R., et al. (1993) "The cDNA of a human lymphocyte cyclic-AMP phosphodiesterase (PDE IV) reveals a multigene family" Gene 129:239-247; Rile, G., et al. (2001) "Potentiation of ibudilast inhibition of platelet aggregation in the presence of endothelial cells" Thromb. Res. 102:239-246; Souness, J. E., et al. (1994) "Possible role of cyclic AMP phosphodiesterases in the actions of ibudilast on eosinophil thromboxane generation and airways smooth muscle tone" Br. J. Pharmacol. 111: 1081-1088; Suzumura, A., et al. (1999) "Ibudilast suppresses TNF.alpha. production by glial cells functioning mainly as type III phosphodiesterase inhibitor in CNS" Brain Res. 837:203-212; Takuma, K., et al. (2001) "Ibudilast attenuates astrocyte apoptosis via cyclic GMP signaling pathway in an in vitro reperfusion model" Br. J. Pharmacol. 133:841-848.

[0033] 可用于本文所述方法的其他PDE抑制剂包括但不限于:

[0034] • PDE1抑制剂长春西汀、IC224、IC86340、IC295、Diocleins、尼卡地平、吩噻嗪类(Phenethiazines)、Calimidazolium、SCH51866、尼莫地平和金刚烷胺;

[0035] • PDE2抑制剂木犀草素、Exisulind、羟吡啶、IC933、BAY60-7550和EHNA;

[0036] • PDE3抑制剂西洛他唑、米力农、西洛他胺、匹莫苯丹、IBMX、Tresquinsin、扎达维林、Siguzodan、依诺昔酮和PQ-10;

[0037] • PDE4抑制剂阿普斯特、西洛司特、克立硼罗、地西泮、木犀草素、松叶菊酮碱、Piclamilast、罗氟司特、咯利普兰、己酮可可碱、Etazolate、olafentrine、Oglemilast、GSK256066、IBMX、松叶菊碱、AWD12-281、SCH351591、V-11294A、HT0712、登布茶碱(Denbufylline)、RO 20-1724、BPN14770、IC486051、Etazolate、GEBR-7b、GSK356278、MK-0952和L-454560;

[0038] • PDE5抑制剂米罗那非、dildenafil、他达拉非、伐地那非和阿伐那非、西地那非、枸橼酸西地那非、他达拉非、淫羊藿苷、乌地那非、DA-8159、SK&F 96231、扎普司特和西洛司特;

[0039] • PDE7抑制剂包括喹唑啉、BRL 50481、双嘧达莫、噻二唑、ASB16165、S14和VP1.15;

[0040] • PDE9抑制剂SCH81566、扎普司特、BAY 73-6691和PF-04447943;

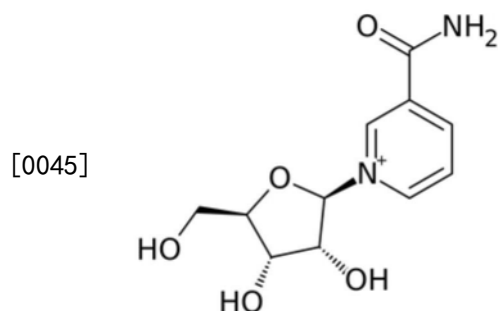
[0041] • PDE10抑制剂TAK-063、扎普司特、双嘧达莫、罂粟碱、PQ-10、TP-10和PF-02545920;

[0042] • PDE11抑制剂他达拉非、BC 11-38、扎普司特和双嘧达莫。

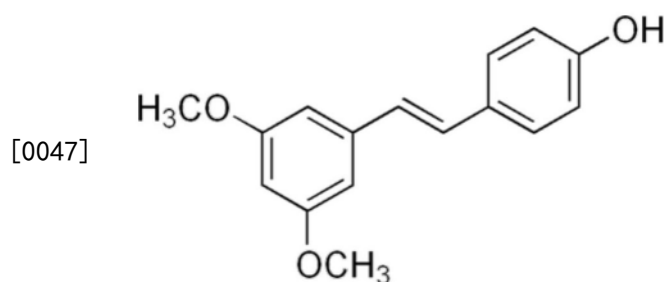
[0043] 对许多这些PDE抑制剂及其在治疗神经变性疾病中的用途的讨论见Umar and Hoda, "Selective inhibitors of phosphodiesterases: therapeutic promise for neurodegenerative disorders," Med. Chem. Commun. 6:2063-2080 (2015); 和Knott et al., "Phosphodiesterase Inhibitors as a Therapeutic Approach to Neuroprotection

and Repair,”International Journal of Molecular Sciences 18:696(2017) (其各自的公开内容通过引用整体并入本文,特别是用于治疗神经变性疾病的示例性PDE抑制剂的公开内容)。

[0044] 烟酰胺核苷是烟酸(即维生素B3)的吡啶核苷形式,作为烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD^+)的前体。如本文所使用的,“烟酰胺核苷”也包括烟酰胺核苷盐,例如烟酰胺核糖氯化物。烟酰胺核苷的化学结构如下:



[0046] 紫檀芪是一种芪类化合物,是多酚白藜芦醇的类似物,由于存在两个甲氧基,因此具有更好的生物利用度,可增加亲脂性和口服吸收,并且由于减少氧化而具有更长的半衰期。紫檀芪的化学结构如下:



[0048] 如前所述,提及本文所述的任何一种或多种药物,特别是紫檀芪、烟酰胺核苷和异丁司特,在适用的情况下,旨在涵盖任何和所有对映异构体、对映异构体的混合物(包括外消旋混合物)、前药、药学上可接受的盐形式、水合物(例如一水合物、二水合物等)、溶剂化物和不同的物理形式。

[0049] 在另外的实施例中,可以将硫醇/半胱氨酸供体,例如乙酰半胱氨酸添加到组合物中和/或向受试者施用以增强治疗。

具体实施方式

[0050] NAD^+ 依赖性组蛋白去乙酰化酶sirtuin正在成为ALS的治疗靶点。Sirtuin调节与ALS相关的细胞过程,特别是线粒体功能的维持。重要的是,在ALS小鼠模型和ALS患者组织中观察到了改变的Sirtuin水平,导致对线粒体生物发生、功能和周转(turnover)的有害影响。因此,维持sirtuin调节蛋白活性的方法代表了有希望的ALS治疗策略。Elysium Health开发了EH301,含有两种活性成分——烟酰胺核苷(250mg)和紫檀芪(50mg)——可提高 NAD^+ 水平并支持sirtuin活性。EH301在ALS患者的安慰剂对照、双盲、人体初步研究中是有效的。在治疗4个月后,与安慰剂相比,EH301治疗组的所有ALS特异性结果指标均在4个月时显著改善(图2),包括:

[0051] -ALSFRS-R评分:EH301组改善2.5分,而安慰剂组下降5.5分(安慰剂和EH301在4个月时间点的差异=6.1分)

[0052] -FVC:EH301组改善2.5%,而安慰剂组下降16.6%(安慰剂和EH301在4个月时间点的差异=19.4%)

[0053] -MRC量表指数:EH301组提高17分,而安慰剂组降低11分(安慰剂和EH301在4个月时间点的差异=23分)

[0054] 这些结果都伴随着肱三头肌内肌肉活动显著改进,通过肌电图测量。在这项试验中,所有参与者也服用利鲁唑。在该剂量的任何研究参与者中均未观察到归因于研究产品的副作用。

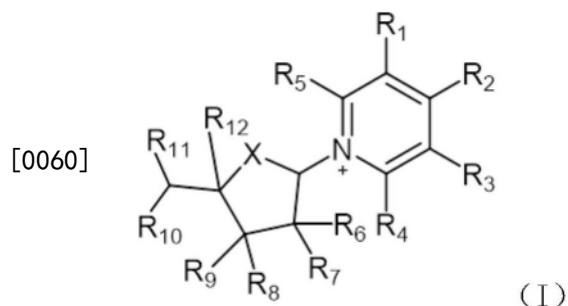
[0055] 如本文提及所公开的组合物和方法时所描述,通过添加磷酸二酯酶(PDE)抑制剂,包括PDE1、PDE2、PDE3、PDE4、PDE5、PDE7、PDE9、PDE10和PDE11抑制剂和在实施例例中PDE4抑制剂(例如异丁司特),EH301的治疗益处进一步改进。异丁司特被认为是一种相对非特异性的PDE,尽管它最大程度地抑制了PDE4亚型。事实上,相对于用EH301(平均生存期=153天)或异丁司特(平均生存期=137天)治疗的小鼠,从第50天起用烟酰胺核苷和紫檀芪(EH301)加异丁司特(平均生存期=191天)治疗的SOD1-G93A小鼠的生存期显著提高($P<0.01$)(见图1和表1)。如图1所示,这些发现证明了EH301和异丁司特之间的协同相互作用,使平均生存期比单独的EH301增加了38天,比单独的异丁司特增加了54天。这些结果是令人惊讶和出乎意料的,并且表现了本发明提供的优于用于治疗ALS的现有疗法的独特优势。

[0056] EH301——包含两种活性成分烟酰胺核苷和紫檀芪——与PDE抑制剂的组合(包括PDE1、PDE2、PDE3、PDE4、PDE5、PDE7、PDE9、PDE10和PDE11抑制剂,在示例性实施例例中,PDE4抑制剂)代表一种独特的ALS治疗策略,提供改善的生存期、治疗和/或预防运动神经元疾病和障碍(例如,ALS)和/或减缓或逆转运动神经元变性。

[0057] 因此,本文提供了与治疗 and/或预防运动神经元疾病和病症(例如,ALS)和/或用于减缓或逆转运动神经元变性相关的方法和组合物,其通过向有需要的受试者(例如,患有ALS的受试者)施用包含式I或式II化合物(例如烟酰胺核苷)、式III化合物(例如紫檀芪)和磷酸二酯酶(PDE)抑制剂(包括PDE1、PDE2、PDE3、PDE4、PDE5、PDE7、PDE9、PDE10或PDE11抑制剂)的组合物,合适的是PDE4抑制剂,例如异丁司特。

[0058] 因此,这种联合疗法(conjunctive therapy)包括依次、同时和分开或共同施用上述本发明的化合物。在实施例例中,当施用后续化合物时,首先施用化合物的治疗效果并未完全消失。即,式I和/或式II化合物(单独或组合)的治疗效果在施用包括PDE抑制剂的后续化合物时并未完全消失。

[0059] 如本文所提供,包含由式(I)表示的化合物或其药学上可接受的盐的药物组合物包含具有以下一般化学结构的化合物:



[0061] 其中,每次出现独立地:

[0062] R_1 、 R_2 和 R_3 选自氢、卤素、-CN、-NO₂、-OR₁₄、-N(R₁₄)_m、-R₁₃、取代或未取代的(C₁-C₆)烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、芳烷基和杂芳烷基；

[0063] R_4 和 R_5 选自氢、卤素、-CN、-NO₂、-OR₁₄、-N(R₁₄)_m、取代和未取代的(C₁-C₆)烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、芳烷基和杂芳烷基；

[0064] R_6 、 R_8 、 R_{11} 和 R_{12} 选自氢、(C₁-C₆)烷基、-((C₁-C₆)亚烷基)N(R₁₄)_m、-C(O)((C₁-C₆)亚烷基)N(R₁₄)_m、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、芳烷基和杂芳烷基、-OR₁₄和-N(R₁₄)_m；

[0065] R_7 、 R_9 和 R_{10} 选自-((C₁-C₆)亚烷基)N(R₁₄)_m、-OR₁₄和-N(R₁₄)_m；

[0066] R_{13} 选自-OR₁₄、-N(R₁₄)_m、-C(O)(R₁₄)、-C(O)(OR₁₄)、-C(O)N(R₁₄)_m、-S(O)₂(OR₁₄)、-S(O)OR₁₄和-S(O)₂N(R₁₄)_m；

[0067] R_{14} 选自氢、(C₁-C₆)烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、芳烷基和杂芳烷基；和

[0068] X是O、S或N(R₁₄)；

[0069] m是2或3；

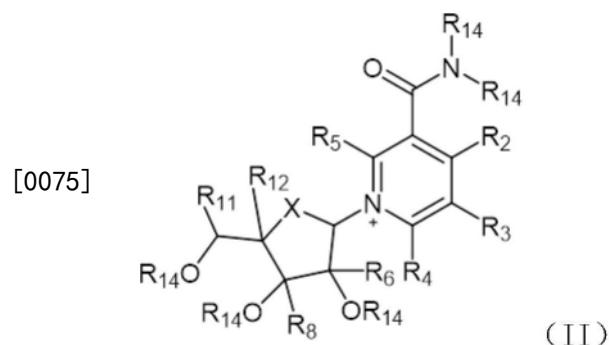
[0070] 条件是 R_1 、 R_2 和 R_3 中的至少一个是 R_{13} 。

[0071] 在一些实施例中， R_1 是 R_{13} 。在一些实施例中， R_2 是 R_{13} 。在一些实施例中， R_3 是 R_{13} 。

[0072] 在一些实施例中， R_3 选自-OR₁₄、-N(R₁₄)_m、-C(O)(R₁₄)和-C(O)(OR₁₄)。在一些实施例中， R_{13} 选自-C(O)(R₁₄)、-C(O)(OR₁₄)和-C(O)N(R₁₄)_m。在一些实施例中， R_{13} 是-C(O)N(R₁₄)_m。

[0073] 在一些实施例中， R_7 、 R_9 和 R_{10} 各自独立地是-OR₁₄或-N(R₁₄)_m。在一些实施例中， R_7 、 R_9 和 R_{10} 是-OR₁₄。

[0074] 在一些实施例中，式(I)的化合物是由式(II)或其药学上可接受的盐表示：



[0076] 其中，每次出现独立地：

[0077] R_2 和 R_3 选自氢、卤素、-CN、-NO₂、-OR₁₄、-N(R₁₄)_m、-R₁₃、取代或未取代的(C₁-C₆)烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、芳烷基和杂芳烷基；

[0078] R_4 和 R_5 选自氢、卤素、-CN、-NO₂、-OR₁₄、-N(R₁₄)_m、取代和未取代的(C₁-C₆)烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、芳烷基和杂芳烷基；

[0079] R_6 、 R_8 、 R_{11} 和 R_{12} 选自氢、-OR₁₄、-N(R₁₄)_m、取代或未取代的(C₁-C₆)烷基、-((C₁-C₆)亚烷基)N(R₁₄)_m、-C(O)((C₁-C₆)亚烷基)N(R₁₄)_m、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、芳烷基和杂芳烷基；

[0080] R_{13} 选自-OR₁₄、-N(R₁₄)_m、-C(O)(R₁₄)、-C(O)(OR₁₄)、-C(O)N(R₁₄)_m、-S(O)₂(OR₁₄)、-S(O)OR₁₄和-S(O)₂N(R₁₄)_m；

[0081] R_{14} 选自氢、(C₁-C₆)烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、芳烷基和杂芳烷基；和

[0082] m是2或3。

[0083] 在式(I)或(II)化合物的一些实施例中, R_1 、 R_2 和 R_3 各自独立,如果存在,选自氢、卤素、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{OR}_{14}$ 、 $-\text{N}(\text{R}_{14})_m$ 、 $-\text{R}_{13}$ 和取代或未取代的 (C_1-C_6) 烷基。在一些实施例中, R_1 、 R_2 和 R_3 各自独立,如果存在,选自氢、 $-\text{OR}_{14}$ 、 $-\text{N}(\text{R}_{14})_m$ 和取代或未取代的 (C_1-C_6) 烷基。在一些实施例中, R_1 、 R_2 和 R_3 各自独立,如果存在,选自取代或未取代的 (C_1-C_6) 烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、芳烷基和杂芳烷基。在一些实施例中, R_1 、 R_2 和 R_3 各自独立,如果存在,是氢。

[0084] 在式(I)或(II)化合物的一些实施例中, R_4 和 R_5 各自独立地选自氢、卤素、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{OR}_{14}$ 、 $-\text{N}(\text{R}_{14})_m$ 和取代或未取代的 (C_1-C_6) 烷基。在一些实施例中, R_4 和 R_5 各自独立地选自氢、 $-\text{OR}_{14}$ 、 $-\text{N}(\text{R}_{14})_m$ 和未取代的 (C_1-C_6) 烷基。在一些实施例中, R_4 和 R_5 各自独立地选自取代或未取代的 (C_1-C_6) 烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、芳烷基和杂芳烷基。在一些实施例中, R_4 和 R_5 各自是氢。

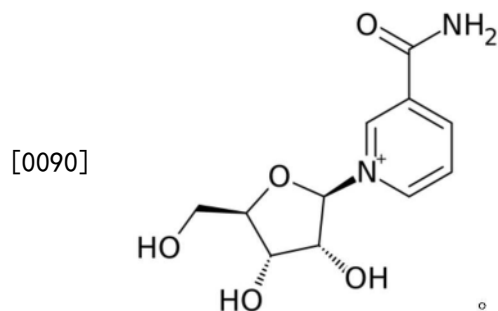
[0085] 在式(I)或(II)化合物的一些实施例中, R_6 、 R_8 、 R_{11} 和 R_{12} 选自氢、 $-\text{OR}_{14}$ 、 $-\text{N}(\text{R}_{14})_m$ 、未取代的 (C_1-C_6) 烷基、 $-(\text{C}_1-\text{C}_6)$ 亚烷基 $\text{N}(\text{R}_{14})_m$ 、 $-\text{C}(\text{O})((\text{C}_1-\text{C}_6)$ 亚烷基 $\text{N}(\text{R}_{14})_m)$ 、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、芳烷基和杂芳烷基。在一些实施例中, R_6 、 R_8 、 R_{11} 和 R_{12} 各自独立地选自氢、 $-\text{OR}_{14}$ 、 $-\text{N}(\text{R}_{14})_m$ 、未取代的 (C_1-C_6) 烷基、 $-(\text{C}_1-\text{C}_6)$ 亚烷基 $\text{N}(\text{R}_{14})_m$ 和 $-\text{C}(\text{O})((\text{C}_1-\text{C}_6)$ 亚烷基 $\text{N}(\text{R}_{14})_m)$ 。在一些实施例中, R_6 、 R_8 、 R_{11} 和 R_{12} 各自独立地选自氢、 $-\text{OR}_{14}$ 和 $-\text{N}(\text{R}_{14})_m$ 。在一些实施例中, R_6 、 R_8 、 R_{11} 和 R_{12} 各自独立地选自未取代的 (C_1-C_6) 烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、芳烷基和杂芳烷基。在一些实施例中, R_6 、 R_8 、 R_{11} 和 R_{12} 各自是氢。

[0086] 在一些实施例中, R_7 、 R_9 和 R_{10} 各自独立地选自 $-\text{OR}_{14}$ 或 $-\text{N}(\text{R}_{14})_m$ 。在一些实施例中, R_7 、 R_9 和 R_{10} 各自是 $-\text{OR}_{14}$ 。在一些实施例中, R_7 、 R_9 和 R_{10} 各自是 $-\text{OH}$ 。

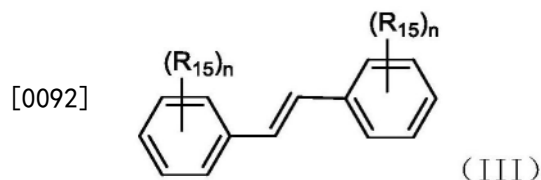
[0087] 在式(I)或(II)化合物的一些实施例中, R_{14} 是氢或 (C_1-C_6) 烷基。

[0088] 在式(I)或(II)化合物的一些实施例中, X 是 O 或 $\text{N}(\text{R}_{14})$ 。在一些实施例中, X 是 O 。

[0089] 在式(I)或(II)化合物的一些实施例中,化合物是



[0091] 在一些实施例中,本文提供了包含由式(III)或其药学上可接受的盐表示的化合物的药物组合物:



[0093] 其中,每次出现独立地:

[0094] R_{15} 选自氢、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{OR}_{16}$ 、 $-\text{N}(\text{R}_{16})_p$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2(\text{OR}_{16})$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{OR}_{16}$ 、取代或未取代的 (C_1-C_6) 烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、芳烷基和杂芳烷基;

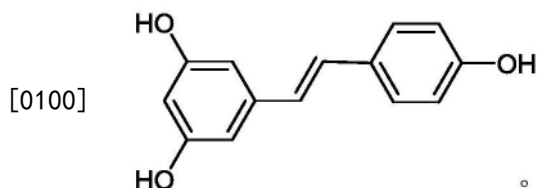
[0095] R_{16} 选自氢、 (C_1-C_6) 烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、芳烷基和杂芳烷基;

[0096] n是0至5之间的整数;和

[0097] p是2或3;

[0098] 条件是至少一个n是1;以及至少一个 R_{15} 是 $-OR_{16}$;

[0099] 条件是式(III)的化合物不是



[0101] 在式(III)化合物的一些实施例中, R_{15} 选自卤素、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-OR_{16}$ 、 $-N(R_{16})_p$ 和取代或未取代的 (C_1-C_6) 烷基。在一些实施例中, R_{15} 选自 $-OR_{16}$ 、 $-N(R_{16})_p$ 和未取代的 (C_1-C_6) 烷基。在一些实施例中, R_{15} 选自取代或未取代的 (C_1-C_6) 烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、芳烷基和杂芳烷基。在一些实施例中, R_{15} 是 $-OR_{16}$ 。在一些实施例中, R_{15} 是 $-OR_{16}$;以及 R_{16} 是氢或 (C_1-C_6) 烷基。在一些实施例中, R_{15} 是 $-OR_{16}$;以及 R_{16} 是 (C_1-C_6) 烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、芳烷基和杂芳烷基。在一些实施例中, R_{15} 是 $-OR_{16}$;以及 R_{16} 是 (C_1-C_6) 烷基。在一些实施例中, R_{15} 是 $-OR_{16}$;以及 R_{16} 是 (C_1-C_6) 烷基、环烷基或杂环烷基。

[0102] 在一些实施例中,n是1、2或3。在一些实施例中,n是1或2。

[0103] 在一些实施例中,p是2。在一些实施例中,p是3。

[0104] 因此,需要注意的是,本发明涉及药学上可接受的组合物,其包含与一种或多种药学上可接受的载体(添加剂)和/或稀释剂一起配制的治疗有效量的式I或式II化合物(例如,烟酰胺核苷)、式III化合物(例如,紫檀芪)和磷酸二酯酶(PDE)抑制剂,例如PDE1、PDE2、PDE3、PDE4、PDE5、PDE7、PDE9、PDE10或PDE11抑制剂,包括PDE4抑制剂,例如异丁司特。在另一方面,本发明涉及一种成套试剂盒,其中所述试剂盒包含:药学上可接受的组合物,其包含与一种或多种药学上可接受的载体(添加剂)和/或稀释剂一起配制的治疗有效量的式I或式II化合物(例如,烟酰胺核苷)和式III化合物(例如,紫檀芪);以及另一种药学上可接受的组合物,其包含治疗有效量的磷酸二酯酶(PDE)抑制剂,例如PDE1、PDE2、PDE3、PDE4、PDE5、PDE7、PDE9、PDE10或PDE11抑制剂,包括PDE4抑制剂,例如异丁司特,和一种或多种药学上可接受的载体(添加剂)和/或稀释剂。在另一方面,本发明涉及一种成套试剂盒,其中所述试剂盒包含:第一药学上可接受的组合物,其包含治疗有效量的式I或式II化合物(例如,烟酰胺核苷)和一种或多种药学上可接受的载体(添加剂)和/或稀释剂;第二药学上可接受的组合物,其包含治疗有效量的式III化合物(例如紫檀芪)与一种或多种药学上可接受的载体(添加剂)和/或稀释剂;和第三药学上可接受的组合物,其包含治疗有效量的磷酸二酯酶(PDE)抑制剂,例如PDE1、PDE2、PDE3、PDE4、PDE5、PDE7、PDE9、PDE10或PDE11抑制剂,包括PDE4抑制剂,例如异丁司特,与一种或多种药学上可接受的载体(添加剂)和/或稀释剂。

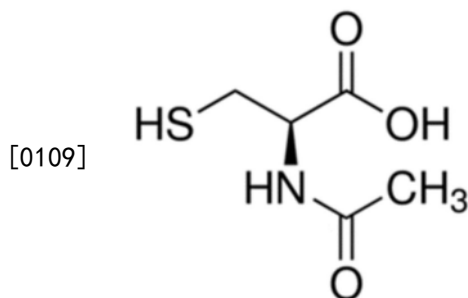
[0105] 因此,需要注意的是,本文所述的药剂,优选烟酰胺核苷、紫檀芪和PDE抑制剂例如异丁司特,可以就这样施用,或与药学上可接受的载体混合施用,也可以与其他药剂联合施用。因此,联合疗法包括依次、同时和分开或共同施用本发明的上述化合物。在实施例中,当施用后续化合物时,第一施用化合物的治疗效果并未完全消失。这包括当烟酰胺核苷和紫檀芪分别或一起施用时的实施例,以及PDE抑制剂与烟酰胺核苷和紫檀芪一起或分别施用

的实施例。

[0106] 如下详述,本文所述的药学上可接受的组合物可以专门配制用于以固体或液体形式施用,包括适用于下列的那些:(1)口服施用,例如,顿服药(drench)(水性或非水性的溶液或悬浮液)、片剂(例如那些针对口腔、舌下和全身吸收的片剂)、大丸剂(bolus)、粉剂、颗粒剂、应用于舌部的膏剂;(2)胃肠外施用,例如,通过皮下、肌内、静脉或硬膜外注射,例如无菌溶液或悬浮液,或缓释制剂;或(3)舌下。

[0107] 在一些实施例中,组合物包括额外的药剂。例如,组合物可包括营养剂,例如抗氧化剂。药学上可接受的抗氧化剂包括:(1)水溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸、半胱氨酸盐酸盐、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠等;(2)油溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基羟基茴香醚(BHA)、二丁基羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、倍丙酯(propyl gallate)、 α -生育酚等;和(3)金属螯合剂,例如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸等。

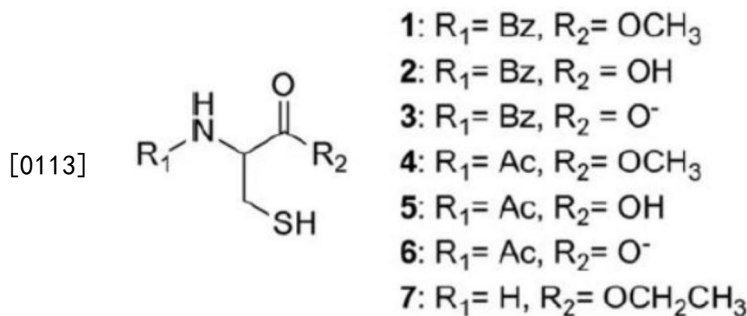
[0108] 在示例性实施例中,本文所述的组合物可进一步包括硫醇/半胱氨酸供体。在实施例中,可包括额外的硫醇/半胱氨酸供体乙酰半胱氨酸。乙酰半胱氨酸,也称为N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)或N-乙酰半胱氨酸,是氨基酸L-半胱氨酸(Cys)具有附接到氨基的乙酰基,具有以下结构:



[0110] 额外的乙酰基使得Cys更易溶于水,并具有加速口服摄入Cys吸收和分散的功能。乙酰基还减少了巯基(-SH)的反应性,使得NAC比Cys毒性更小,更不受抗氧化剂的影响。NAC是安全的,即使大剂量使用,并且比起Cys本身是更好的Cys源。已经发现口服补充NAC通过升高的细胞内Cys促进细胞内谷胱甘肽(GSH)。NAC在口服后迅速被吸收,并在2至3小时达到最高血浆水平,半衰期约为6小时。NAC迅速进入细胞并水解成半胱氨酸。

[0111] 本文所述的组合物和方法还包括各种NAC衍生物和其药学上可接受的盐,包括例如NAC酰胺、NAC乙酯和其他。例如,硫醇/半胱氨酸供体可以是N-乙酰半胱氨酸酰胺(NACA),例如公开于Patel et al., "N-acetylcysteineamide Preserves Mitochondrial Bioenergetics and Improves Functional Recovery Following Spinal Trauma," Exp. Neurol. 257:95-105 (2014), 其公开内容通过引用整体并入本文。

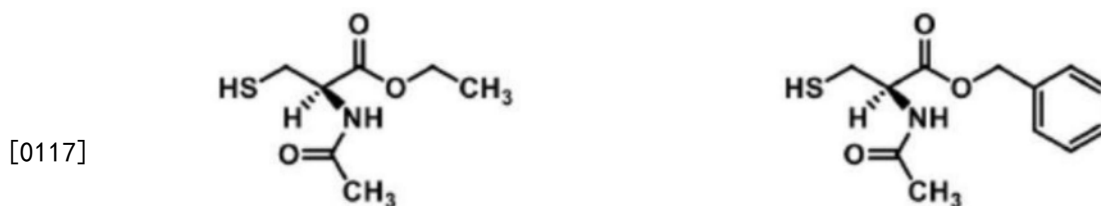
[0112] 可用于本文所述的组合物、制剂和方法的另外合适的半胱氨酸衍生物描述于Miura et al., "Antioxidant activities of cysteine derivatives against lipid oxidation in anhydrous media," Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 78: 1452-1455 (2014), 其公开内容通过引用并入本文,包括以下结构:



[0114] 另一种N-乙酰半胱氨酸衍生物公开于Liu et al., “Identification of novel N-acetylcysteine derivatives for the treatment of hepatocellular injury,” Med.Chem.Comm. 8:2238-2247 (2017), 其公开内容通过引用整体并入本文。Liu等人公开了多种NAC衍生物,在图4的示意图中概述。

[0115] 特别地,化合物6a、6b和7a可以用于本文所述的化合物和方法中。化合物6a-(R)-2-乙酰氨基-N-环己基-3-(甲硫基)丙烯酰胺;化合物6b-(R)-N-环己基-3-(甲硫基)-2-丙酰胺基丙酰胺;和化合物7a-(R)-2-乙酰氨基-3-(甲硫基)-N-苯丙酰胺。制备这些化合物的方法在Liu et al.中进行了充分概述。

[0116] 在另一实施例中,硫醇/半胱氨酸供体可以是N-乙酰半胱氨酸苄酯或N-乙酰半胱氨酸乙醚,例如公开于Uemura et al., “Protective Effects of Brain Infarction by N-Acetylcysteine Derivatives,” Stroke 49:1727-1733 (2018), 其公开内容通过引用整体并入本文。这些NAC衍生物的合成公开于Uemura et al.中。NAC衍生物的结构在下面说明:



N-乙酰乙基半胱氨酸(NACet)

N-乙酰苯基半胱氨酸(NACBn)

[0118] 本文所述的化合物包含的硫醇/半胱氨酸供体,适宜地乙酰半胱氨酸或其衍生物的含量由本领域普通技术人员确定,并且通常范围为约25mg至约1000mg,约100mg至约1000mg,约25mg至约500mg,约25mg至约200mg,约25mg至约250mg,约30mg至约225mg,约40mg至约200mg,约45mg至约250mg或约25mg、约30mg、约40mg、约50mg、约60mg、约70mg、约80mg、约90mg、约100mg、约110mg、约120mg、约130mg、约140mg或约150mg。

[0119] 本文所述的组合物和制剂可包含的另外的化合物是,例如阿坎酸(acamprosate)、巴氯芬、西那卡塞(cinacalcet)、美西律、磺胺异噁唑、托拉塞米和利鲁唑。

[0120] 本文所述的化合物的制剂可以单位剂量形式存在并且可以通过药学领域众所周知的任何方法制备。可与载体材料组合以产生单剂形式的活性成分的含量将根据被治疗的宿主和特定的施用方式而变化。可与载体材料组合以产生单剂形式的活性成分的含量将通常是产生治疗效果的药剂的含量。

[0121] 在某些实施例中,本文所述的制剂包括赋形剂,包括但不限于环糊精、脂质体、胶束形成剂(例如胆汁酸)和聚合物载体(例如聚酯和聚酸酐);和本发明的药剂。在一些实施

例中,上述制剂使得本发明的药剂可口服生物利用。制备这些制剂或组合物的方法可包括将本发明的化合物与载体和可选的一种或多种辅助成分结合的步骤。

[0122] 本文所提供的用于口服制剂的液体剂型包括药学上可接受的乳液、微乳液、溶液、悬浮液、糖浆剂和酏剂(elixir)。除活性成分外,液体剂型还可包括本领域通常使用的惰性稀释剂,例如水或其他溶剂、增溶剂和乳化剂,例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油(特别地,棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和脱水山梨糖醇的脂肪酸酯(fatty acid esters of sorbitan)及其混合物。

[0123] 除了惰性稀释剂,口服组合物还可包括佐剂,例如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、调味剂(flavoring agent)、着色剂、芳香剂(perfuming agent)和防腐剂。

[0124] 悬浮液,除了活性化合物外,还可包含悬浮剂,例如,乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨糖醇和脱水山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂和黄芪胶及其混合物。

[0125] 本文所提供的适于口服施用的制剂可以是胶囊剂、扁囊剂、丸剂、片剂、锭剂(使用调味基质,通常是蔗糖和阿拉伯胶或黄芪胶)、粉剂、颗粒剂的形式,或作为在水性液体或非水性液体中的溶液或悬浮液,或作为水包油或油包水液体乳液,或作为酏剂或糖浆剂,或作为锭剂(pastill)(使用惰性基质,例如明胶和甘油,或蔗糖和阿拉伯胶)和/或作为漱口剂等,各自含有预定含量的本发明化合物作为活性成分。本发明的化合物也可以作为大丸剂、煎膏剂(electuary)或膏剂施用。

[0126] 在用于口服施用的本发明固体剂型(例如,胶囊剂、片剂、丸剂、糖衣丸剂(dragee)、粉剂、颗粒剂等)中,活性成分与一种或多种药学上可接受的载体混合,例如柠檬酸钠或磷酸二钙,和/或以下任何一种:(1)填充剂或增量剂,例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和/或硅酸;(2)粘合剂,例如,羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯胶;(3)保湿剂,例如甘油;(4)崩解剂,例如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠;(5)溶解阻滞剂(solution retarding agent),例如石蜡;(6)吸收促进剂,例如季胺化合物;(7)润湿剂,例如鲸蜡醇、单硬脂酸甘油酯和非离子型表面活性剂;(8)吸收剂,例如高岭土和膨润土粘土;(9)润滑剂,例如云母、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂醇硫酸钠及其混合物;和(10)着色剂。在胶囊剂、片剂和丸剂的情况下,药物组合物还可包括缓冲剂。相似类型的固体组合物还可用作软壳和硬壳明胶胶囊剂的填充剂,使用如乳糖或牛奶糖等赋形剂以及高分子量聚乙二醇等。

[0127] 片剂可通过压制或模制,可选地与一种或多种辅助成分制备。压制片剂可使用粘合剂(例如明胶或羟丙基甲基纤维素)、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂(例如羟基乙酸淀粉钠或交联的羧甲基纤维素钠)、表面活性剂或分散剂制备。模制片剂可通过在合适的机器中模塑使用惰性液体稀释剂润湿的粉末化合物的混合物来制备。

[0128] 本文所述的药物组合物的片剂和其他固体剂型,例如糖衣丸剂、胶囊剂、丸剂和颗粒剂,可选地使用包衣和外壳,例如肠溶衣和药物制剂领域众所周知的其他包衣获得或制备。它们还可以配制以提供其中活性成分的缓慢或受控释放,例如使用不同比例的羟丙基甲基纤维素以提供所需的释放曲线、其他聚合物基质、脂质体和/或微球。本文所述的组合物还可配制为迅速释放,例如冷冻干燥。它们可以通过例如通过细菌截留过滤器(bacteria-retaining filter)的过滤或通过加入无菌固体组合物形式的杀菌剂进行灭

菌,该无菌固体组合物可以在使用前不久溶解在无菌水或无菌注射介质。这些组合物还可以可选地包含乳浊剂(opacifying agent)并且可以是仅或优选地在胃肠道的特定部分中,可选地以延迟方式释放活性成分的组合物。可以使用的包埋组合物的示例包括高分子物质和蜡。如果合适的话,活性成分也可以是以微胶囊形式,其中含有一种或多种上述赋形剂。

[0129] 本文所提供的适用于肠胃外施用的药物组合物包含一种或多种本发明的化合物与一种或多种药学上可接受的无菌等渗水性溶液或非水性溶液、分散液、悬浮液或乳液、或无菌粉剂相结合,该无菌粉剂在使用前可复溶为无菌可注射溶液或分散液,可包含糖类、乙醇、抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、使得制剂与预期接收者的血液等渗的溶质、或悬浮剂或增稠剂。

[0130] 可用于本发明的药物组合物的合适的水性和非水性载体的示例包括水、乙醇、多元醇(例如丙三醇、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物、椰子油、植物油(例如橄榄油)和可注射的有机酯(例如油酸乙酯)。例如,可以通过使用包衣材料(如卵磷脂)、在分散液的情况下保持所需的粒径以及使用表面活性剂来保持适当的流动性。

[0131] 治疗方法

[0132] 本文提供治疗受试者的运动神经元疾病或病症的方法,该方法通过向受试者(例如有此需要的受试者)施用治疗有效量的式I或式II化合物(例如烟酰胺核苷)、式III化合物(例如紫檀芪)和磷酸二酯酶(PDE)抑制剂,例如PDE1、PDE2、PDE3、PDE4、PDE5、PDE7、PDE9、PDE10或PDE11抑制剂,包括PDE4抑制剂,例如异丁司特。在另一实施例中,另外的化合物,包括例如硫醇/半胱氨酸供体(例如乙酰半胱氨酸)也可以与NR、PT和PDE4抑制剂一起施用。因此,这种施用应该是指联合疗法,包括本发明的上述化合物的依次、同时和单独或共同施用。在实施例中,当施用后续组合物时,首先施用化合物的治疗效果没有完全消失。

[0133] 在一些方面,本文提供减缓或逆转受试者中运动神经元变性的方法,包括向受试者(例如有此需要的受试者)施用治疗有效量的式I或式II的化合物(例如烟酰胺核苷)、式III的化合物(例如紫檀芪)和PDE抑制剂,例如PDE1、PDE2、PDE3、PDE4、PDE5、PDE7、PDE9、PDE10或PDE11抑制剂,包括PDE4抑制剂,例如异丁司特。在一些实施例中,运动神经元变性是指神经元的死亡和/或神经元功能的丧失。

[0134] 在一些实施例中,受试者可能患有或易患运动神经元疾病(例如肌萎缩侧索硬化(ALS),例如髓质ALS或脑干ALS)。运动神经元疾病或病症可以是影响运动神经元功能或结构的任何疾病或病症。如本文所使用的,运动神经元疾病包括导致大脑中或脊髓中运动神经元或神经的功能丧失的进行性疾病。运动神经元疾病的示例包括肌萎缩侧索硬化(ALS)、遗传性痉挛性截瘫(HSP)、原发性侧索硬化(PLS)、进行性肌萎缩(PMA)、进行性球麻痹(PBP)、假性球麻痹或脊髓性肌萎缩。运动神经元疾病可能影响上运动神经元或下运动神经元。

[0135] 本文所公开的组合物的实际剂量水平和施用方案可以变化以获得一定量的式I或式II化合物(例如烟酰胺核苷)、式III化合物(例如紫檀芪)和磷酸二酯酶(PDE)抑制剂,例如PDE1、PDE2、PDE3、PDE4、PDE5、PDE7、PDE9、PDE10或PDE11,包括PDE4抑制剂,例如异丁司特,对于特定的患者、组合物和施用方式,有效实现所需的治疗反应,而对患者没有毒性。可施用的硫醇/半胱氨酸供体(例如乙酰半胱氨酸)的剂量,对于特定的患者、组合物和施用方式,也是有效的以实现所需的治疗反应,而对患者没有毒性,通常范围为约50-200mg/kg,适

当地约80-150mg/kg或约100mg/kg。

[0136] 在一些实施例中,组合物的施用包括以一剂或多剂施用组合物。在一些实施例中,组合物的施用包括以一剂或更多剂、五剂或更多剂、十剂或更多剂、二十剂或更多剂、三十剂或更多剂、四十剂或更多剂、五十剂或更多剂、一百剂或更多剂或一千剂或更多剂施用组合物。在一些实施例中,剂量包括至少100mg、至少200mg、至少300mg、至少400mg、至少500mg、至少600mg、至少700mg、至少800mg、至少900mg、至少1000mg、至少1100mg、至少1200mg、至少1300mg、至少1400mg、至少1500mg、至少1600mg、至少1700mg、至少1800mg、至少1900mg、至少2000mg、至少2100mg、至少2200mg、至少2300mg、至少2400mg、至少2500mg、至少2600mg、至少2700mg、至少2800mg、至少2900mg或至少3000mg的式I或式II的化合物(例如烟酰胺核苷)。在一些实施例中,剂量包括至少5mg、至少10mg、至少20mg、至少30mg、至少40mg、至少50mg、至少60mg、至少80mg、至少100mg、至少120mg、至少140mg、至少160mg、至少180mg、至少200mg、至少220mg、至少240mg、至少260mg、至少280mg、至少300mg、至少320mg、至少340mg、至少360mg、至少380mg、至少400mg、至少500mg、至少600mg、至少700mg、至少800mg、至少900mg或至少1000mg的式III的化合物(例如紫檀芪)。

[0137] 在示例性实施例中,烟酰胺核苷或其等效物(equivalent),单独或与紫檀芪或其等效物结合,以约50mg至约1500mg、约100mg至约1500mg、约100mg至约1000mg、约125mg至约900mg、约150mg至约850mg、约200mg至约700mg、约200mg至约500mg、约1000mg至约1500mg或约100mg、约150mg、约200mg、约250mg、约300mg、约350mg、约400mg、约450mg、约500mg、约550mg、约600mg、约650mg或约700mg的含量施用给患者(通过单一组合物或多种、分离的组合物)。适当地,这些含量以单一组合物或多种组合物的形式每天施用给患者。

[0138] 在示例性实施例中,紫檀芪或其等效物,单独或与烟酰胺核苷或其等效物结合,以约25mg至约1000mg、约100mg至约1000mg、约25mg至约500mg、约25mg至约200mg、约25mg至约250mg、约30mg至约225mg、约40mg至约200mg、约45mg至250mg或约25mg、约30mg、约40mg、约50mg、约60mg、约70mg、约80mg、约90mg、约100mg、约110mg、约120mg、约130mg、约140mg或约150mg的含量施用给患者(通过单一组合物或多种、分离的组合物)。适当地,这些含量以单一组合物或多种组合物的形式每天施用给患者。

[0139] 在一些实施例中,剂量包括含量范围为30mg至240mg、或30mg至180mg、60mg至120mg、或20至80mg的磷酸二酯酶(PDE)抑制剂,例如PDE1、PDE2、PDE3、PDE4、PDE5、PDE7、PDE9、PDE10或PDE11抑制剂,包括PDE4抑制剂,例如异丁司特。例如,PDE抑制剂,包括PDE1、PDE2、PDE3、PDE4、PDE5、PDE7、PDE9、PDE10或PDE11抑制剂,例如本文所述的那些,可以以约10mg至500mg、约20mg至约400mg、约30mg至约300mg、约40mg至约200mg、约50mg至约100mg、约20mg至约200mg、约20mg至约100mg、约20mg至约50mg、或约10mg、约20mg、约30mg、约40mg、约50mg、约60mg、约70mg、约80mg、约90mg、约100mg、约110mg、约120mg、约130mg、约140mg、约150mg、约160mg、约170mg、约180mg、约190mg、约200mg(包括这些范围内的值和范围)的含量施用。

[0140] 在一些实施方案中,剂量包括约30mg至240mg、或约30mg至180mg、60mg至120mg、或20mg至80mg的硫醇/半胱氨酸供体(例如乙酰半胱氨酸)的含量。

[0141] 本文公开的组合物可以在任何时间段内施用,以有效实现特定的患者、组合物和施用方式的所需治疗反应,而对患者没有毒性。时间段可以是至少1天、至少10天、至少20

天、至少30天、至少60天、至少三个月、至少六个月、至少一年、至少三年、至少五年或者至少十年。该剂量可在需要时、偶尔或定期施用。例如,剂量可以每月、每周、每两周、每三周、每天一次或每天两次施用。

[0142] 在一些实施例中,对受试者进行测试以测量运动神经元疾病的一般进展或症状进展。在一些实施例中,对受试者进行运动功能测试和/或认知和行为(conduct)功能测试。运动功能测试可以是修订版肌萎缩侧索硬化功能评定量表(ALSFRS-R)。认知和行为测试可以是康普顿词语学习测试(Complutense Verbal Learning Test)(TAVEC)、符号数字模态测试(SDMT)、语言流畅性测试、数字跨度(韦氏记忆量表III)、D2注意力测试、用于字母和数字的韦氏记忆量表III、伦敦塔测试、史楚普 Stroop)测试、额叶系统行为量表(FrSBe)和/或简要测试(主观行为)。在一些实施例中,对受试者进行运动功能和认知功能测试。可以对受试者进行一次或多次运动功能或认知功能测试。

[0143] 在一些实施例中,该方法进一步包括测量受试者的特征(例如,与炎症相关的特征)。在一些实施例中,在血液测试中测量该特征。可测试的特征示例包括细胞因子水平、淀粉样蛋白A水平、巨噬细胞活化标志物新蝶呤水平、肌酸磷酸激酶(CPK)水平、红细胞沉降率水平、C反应蛋白水平、血浆粘度和/或白细胞计数。在一些实施例中,细胞因子是促炎细胞因子。在一些实施例中,细胞因子是抗炎细胞因子。细胞因子的实例包括但不限于 $TNF\alpha$ 、 $IFN\gamma$ 、IL-1、IL-6、IL-8或 $TGF\beta$ 。

[0144] 在一些实施例中,该方法进一步包括向受试者施用脂肪酸补充剂。在一些实施例中,脂肪酸补充剂包含油。油可以被加工(例如,精炼、漂白或除臭)。在其他实施例中,油是未加工的或初榨油。在一些实施例中,脂肪酸补充剂是从来源衍生或分馏以产生分离的脂肪酸。在一些实施例中,油是椰子油。如本文所用,椰子油可包括由椰子树的坚果产生的任何油。在本文公开的补充剂中发现的脂肪酸可以是短链脂肪酸、中链脂肪酸或长链脂肪酸。可在补充剂中发现的示例性脂肪酸包括但不限于己酸、辛酸、癸酸、月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、棕榈油酸、硬脂酸、油酸、亚油酸和/或亚麻酸。本文公开的脂肪酸补充剂可包含饱和脂肪酸、不饱和脂肪酸、单不饱和脂肪酸和/或多不饱和脂肪酸。在一些实施例中,脂肪酸补充剂可包含氢化油。脂肪酸补充剂可包含一种或多种脂肪酸。本文所公开的脂肪酸补充剂的实际剂量水平和施用方案可以改变,以获得对特定的患者、组合物和施用方式有效实现所需的治疗反应,而对患者没有毒性。

[0145] 如本文所述,在另外的实施例中,组合物和方法还包括施用硫醇/半胱氨酸供体(例如乙酰半胱氨酸)。如实施例中所示,人们惊讶地发现,添加硫醇/半胱氨酸供体(例如乙酰半胱氨酸)提供了运动神经元疾病治疗的一般进展或症状进展的增强改善,高于任何单独的化合物(即烟酰胺核苷、紫檀芪)、磷酸二酯酶(PDE)抑制剂和/或乙酰半胱氨酸,单独或组合使用的情况。这种协同发现是本文所述的组合物和方法的令人惊讶和出乎意料的优点。

[0146] 以下实施例仅用于说明目的,并不限制本发明。

[0147] 实施例

[0148] 术语表

[0149] 紫檀芪(PT);烟酰胺核苷(NR);EH301[烟酰胺核苷(NR)和紫檀芪(PT)];地塞米松(DXM);和异丁司特(IB)。

[0150] 目的

[0151] 这些实施例的目的是研究潜在的抗神经炎症药物(例如地塞米松或异丁司特)是否可以进一步改善或增强烟酰胺核苷(NR)和紫檀芪(PT)在ALS小鼠模型中的运动功能的效果。

[0152] 材料/方法和结果

[0153] 小鼠

[0154] 1. B6.Cg-Tg(SOD1*G93A)1Gur/J(<https://www.jax.org/strain/004435>)

[0155] SOD1-G93A(也称为G93A-SOD1)转基因半合子的小鼠是有活力的和可生育的,转基因表达人SOD1的G93A突变形式。据报道,该始祖系(通常称为G1H)具有高转基因拷贝数。半合子表现出类似于人类的肌萎缩侧索硬化(ALS)的表型;由于脊髓运动神经元的丧失而导致一个或多个肢体瘫痪。运动神经元变性与星形胶质细胞的功能和/或变性有关,星形胶质细胞是神经系统的主要神经胶质细胞类型。转基因小鼠具有短的寿命:50%在157.1+/-9.3天存活(与混合的B6SJL背景相反,在128.9+/-9.1天观察到50%存活)。雌性半合子的繁殖能力差,在发病前很少生产超过一窝。与LPS诱导的小胶质细胞和激活的M1/M2巨噬细胞相反,由疾病进展激活的脊髓小胶质细胞不会上调显示偏向M1(神经毒性)表型或M2(保护性)表型的基因。SOD1G93A激活的小胶质细胞中的基因表达模式代表了独特的ALS特异性特征。这些SOD1-G93A(也称为G93A-SOD1)转基因小鼠因此可用于研究神经肌肉疾病,包括肌萎缩侧索硬化。

[0156] SOD1-G93A转基因设计为具有突变的人类SOD1基因(具有在密码子93处将甘氨酸替换为丙氨酸),由其内源性人类SOD1启动子驱动。该转基因被注射到受精的B6SJL F1小鼠卵中,并获得了始祖动物。混合的B6SJL遗传背景的转基因小鼠被送到杰克逊实验室(The Jackson Laboratory,库存编号002726)。到达后,一些小鼠与C57BL/6J回交至少10代以产生这种同类品系(库存编号004435)。回交于2002年7月完成。

[0157] 2. FUS-R521C小鼠

[0158] FUS-R521C小鼠(ALS模型;转基因注入B6SJL卵母细胞。在C57BL/6上维持,因此后代具有更高比例的C57BL/6)被选择用于研究添加乙酰半胱氨酸影响的方法。

[0159] 对照/无载体

[0160] B6SJL F1/J(<https://www.jax.org/strain/100012>)。由C57BL/6J(B6)雌性与SJL/J(SJL)雄性杂交产生。B6SJL F1/J小鼠在其基因组中的所有位点的B6和SJL等位基因都是杂合的。该品系常用于生产转基因小鼠。

[0161] 治疗

[0162] EH301[烟酰胺核苷(NR)和紫檀芪(PT)]口服施用:185mg烟酰胺核苷和30mg紫檀芪/Kg×天(Estrela JM, De La Rubia JE, Dellinger RW. Treating and preventing motor neuron disease using nicotinamide riboside. PCT/US 18/32932, 2018)。

[0163] 地塞米松(DXM)在实验时间,按照连续4周的周期,进行腹膜内注射:1mg/Kg×天(第一周),0.5mg/Kg×天(第二周),0.25mg/Kg×天(第三周),0.0mg/Kg×天(第四周)。1mg/Kg的剂量选择基于Kurkowska-Jastrzebska I, Litwin T, Joniec I, Ciesielska A, Przybylowski A, Czlonkowski A, Czlonkowska A. Dexamethasone protects against dopaminergic neurons damage in a mouse model of Parkinson's disease. Int

Immunopharmacol.2004 Oct;4(10-11):1307-18。周期性剂量方案旨在优化治疗益处,从而将可能的副作用降至最低。

[0164] 口服施用异丁司特 (IB):12mg/Kg×天 (Wang H,Mei Zl,Zhong KL,Hu M,Long Y,Miao MX,Li N,Yan TH,Hong H.Pretreatment with antiasthmatic drug ibudilast ameliorates Aβ1-42-induced memory impairment and neurotoxicity in mice.Pharmacol Biochem Behav.2014Sep;124:373-9)。

[0165] 在研究添加NAC效果的实验中,从第30周开始,腹膜内 (IP) 施用乙酰半胱氨酸 (NAC):每天100mg/kg。

[0166] 将日剂量的NR、DXM和IB一起溶解在75uL生理盐水中施用。实验室动物的食物中存在PT。根据动物体重和每天摄入的食物量调整PT剂量。

[0167] 表1.生存期。

[0168] 比较小鼠组间存活时间的Kaplan-Meier曲线。

周	WT	SOD1						
		对照	EH301	DXM	IBU	EH301+DXM	EH301+IBU	DXM+IBU
10	10	10	10	10	10	10	10	10
11	10	10	10	10	10	10	10	10
12	10	10	10	9	10	10	10	10
13	10	10	10	9	10	10	10	10
14	10	10	10	9	10	10	10	10
15	10	10	10	9	10	10	10	10
16	10	10	10	9	10	10	10	10
17	10	8	10	9	10	10	10	10
18	10	7	10	9	10	10	10	9
19	10	5	10	9	8	10	10	9
20	10	3	9	7	4	10	10	7
21	10	0	8	4	3	7	10	5
22	10		6	1	1	3	10	2
23	10		5	0	0	2	9	0
24	10		0			1	9	
25	10					0	8	
26	10						7	
27	10						6	
28	10						5	
29	10						3	
30	10						3	
31	10						2	
32	10						1	
33	10						0	

[0170] 表2.神经系统评分。

[0171]

SOD1									
周	WT	对照	EH301	DXM	IBU	EH301+DXM	EH301+IBU	DXM+IBU	
10	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
11	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
12	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
13	0±0	0.60±0.30**	0±0**	0±0**	0±0**	0±0**	0±0	0±0**	0±0**
14	0±0	1±0**	0±0**	0.50±0.25***	0±0**	0±0**	0±0**	0±0**	0±0**
15	0±0	1±0**	0±0**	0.70±0.30**	0.30±0.20***	0±0**	0±0**	0±0**	0±0**
16	0±0	1.25±0.50**	0.50±0.20***	1±0**	0.75±0.60**	0±0**	0±0**	0±0**	0±0**
17	0±0	1.70±0.45**	0.75±0.30***	1±0***	1±0***	0.35±0.20***+bbcc	0±0**	0.70±0.60***	0.70±0.60***
18	0±0	2.50±0.60**	1±0***	1.60±0.40***	1.50±0.40***	0.80±0.45**	0±0**	1.20±0.55***	1.20±0.55***
19	0±0	2.75±0.50**	1.70±0.40**	2.50±0.50**	2.20±0.65**	1±0***+bbcc	0±0**	2.40±0.70**	2.40±0.70**
20	0±0	4±0**	2.20±0.50***	3±0***	3±0***	1.50±0.40***+bbcc	0±0**	2.80±0.60***	2.80±0.60***
21	0±0		3±0**	3.40±0.50**	3.70±0.50**	2.60±0.75**	0±0**	3±0**	3±0**
22	0±0		3.50±0.50**	4±0**	4±0**	3±0**+bbcc	0.45±0.15***+aabbcc	4±0**	4±0**
23	0±0		4±0**			3.50±0.50**	0.70±0.40***+aa		
24	0±0					4±0**	1±0**		
25	0±0						1.25±0.60**		
26	0±0						1.74±0.38**		
27	0±0						2±0**		
28	0±0						2.45±0.75**		
29	0±0						2.70±0.50**		
30	0±0						3±0**		
31	0±0						3±0**		
32	0±0						4±0**		

[0172] 该神经系统评分基于Weydt等人的量表(Weydt,P.,Hong,S.Y.,Kliot,M.,Moller,T.,2003.Assessing disease onset and progression in the SOD1 mouse model of ALS.NeuroReport 14,1051-1054)。从“0”到“5”的分数定义如下:“0”表示没有典型的ALS迹象的健康小鼠;“1”表示在疾病早期出现后腿颤抖;“2”表示小鼠用尾巴悬空时后腿难以分开,这表明肌肉无力;“3”表示小鼠行走困难,要么是跌跌撞撞,要么是摇晃;“4”表示小鼠无法用全部四条腿走路和拖后腿;当小鼠在30秒后无法自行站立时,给出“5”。当动物达到“4”分时,将食物颗粒(pellet)放置在所有转基因小鼠的笼底上,将有助于获得食物和水。达到“5”分,动物将出于伦理原因进行安乐死。发病定义为小鼠出现症状(分数<4)的最早时间。

每周监测不同组随时间的变化。每周测试的动物数量与表1中显示的每组动物数量相同。

[0173] 表3.转棒(Rotarod)测试。

[0174]

SOD1									
周	WT	对照	EH301	DXM	IBU	EH301+DXM	EH301+IBU	DXM+IBU	
10	1200 ± 0	1200 ± 0	1200 ± 0	1200 ± 0	1200 ± 0	1200 ± 0	1200 ± 0	1200 ± 0	
11	1200 ± 0	1114 ± 59*	1200 ± 0**	1200 ± 0**	1200 ± 0**	1200 ± 0**	1200 ± 0**	1200 ± 0**	
12	1200 ± 0	1010 ± 110**	1200 ± 0**	1200 ± 0**	1200 ± 0**	1200 ± 0**	1200 ± 0**	1200 ± 0**	
13	1200 ± 0	955 ± 131**	1200 ± 0**	1200 ± 0**	1200 ± 0**	1200 ± 0**	1200 ± 0**	1200 ± 0**	
14	1200 ± 0	860 ± 114**	1200 ± 0**	1200 ± 0**	1200 ± 0**	1200 ± 0**	1200 ± 0**	1200 ± 0**	
15	1200 ± 0	720 ± 94**	1200 ± 0**	1130 ± 70**	1200 ± 0**	1200 ± 0**	1200 ± 0**	1200 ± 0**	
16	1200 ± 0	580 ± 120**	1200 ± 0**	1045 ± 116**	1200 ± 0**	1200 ± 0**	1200 ± 0**	1200 ± 0**	
17	1200 ± 0	317 ± 77**	1033 ± 126***	820 ± 164***	926 ± 106***	1170 ± 61***	1200 ± 0**aabbcc	1200 ± 0**	
18	1200 ± 0	145 ± 68**	860 ± 177***	336 ± 107***	544 ± 132***	1014 ± 127***	1200 ± 0**aabbcc	914 ± 117***	
19	1200 ± 0	20 ± 10**	596 ± 144***	225 ± 80***	197 ± 101***	780 ± 149***	1200 ± 0**aabbcc	328 ± 184***	
20	1200 ± 0	0 ± 0**	233 ± 105***	161 ± 74***	102 ± 47***	260 ± 113***	1200 ± 0**aabbcc	184 ± 71***	
21	1200 ± 0		126 ± 76**	52 ± 25**	30 ± 16**	110 ± 61***	1200 ± 0**aabbcc	67 ± 39**	
22	1200 ± 0		44 ± 23**	0 ± 0**	0 ± 0**	32 ± 18***	1040 ± 66***aabbcc	12 ± 7**	
23	1200 ± 0		16 ± 7**			0 ± 0***	860 ± 93***		
24	1200 ± 0					0 ± 0**	714 ± 155**		
25	1200 ± 0						502 ± 160**		
26	1200 ± 0						320 ± 177**		
27	1200 ± 0						210 ± 84**		
28	1200 ± 0						96 ± 55**		
29	1200 ± 0						55 ± 23**		
30	1200 ± 0						25 ± 14**		
31	1200 ± 0						7 ± 4**		
32	1200 ± 0						0 ± 0**		

[0175] 测试的功能包括评估受试者的平衡、握力和运动协调能力;尤其是在测试实验药物的效果方面。在这个测试中(Rota Rod,Harvard Apparatus,Holliston,MA),每只动物进行三次试验,测量动物能够在旋转轴(直径3.5cm;旋转速度:15rpm)上保持而不倒下的最长时间(秒)。每只小鼠在1200秒的任意限制内最多进行3次尝试,并记录最长的时间。每周监测不同组随时间的变化。每周测试的动物数量与表1中显示的每组动物数量相同。

[0176] 用烟酰胺核苷(NR)、紫檀芪(PT)、异丁司特(IBU)和N-乙酰-半胱氨酸(NAC)治疗的FUS-R521C小鼠的生存期在图3A-3C中说明。如图3A所示,NR和PT的组合治疗将生存期延长至约35周,单独使用任一药物将生存期延长至约28-32周。如图3B所示,NR、PT和异丁司特的组合将生存期延长至约45周,单独使用异丁司特的生存期约为30周。在图3C中,NR、PT、异丁

司特和N-乙酰半胱氨酸(NAC)的组合说明了超过45周(研究结束)的生存期,大约2/3的小鼠在整个研究期间存活。NR、PT和NAC的组合证明生存期为约39-40天,而单独NAC的生存期为约32天。这些结果是令人惊讶和出人意料的,说明了NR、PT、IBU和NAC的组合显著延长了小鼠模型的生存期,明显超过任何其他组合和任何其他单一化合物。

[0177] 统计

[0178] 数据表示为不同实验次数的平均值 $\pm$ SD。使用Student's t检验进行统计分析。

[0179] 比较所有SOD1组与WT(野生型), $^*P<0.05$ 和 $^{**}P<0.01$ 。

[0180] 比较用EH301、DXM、IB或其组合处理的所有SOD1组与未处理的SOD1对照, $^+P<0.05$ 和 $^{++}P<0.01$ 。

[0181] 比较SOD1+EH301+DXM或SOD1+EH301+IB组与SOD1+EH301, $^aP<0.05$ 和 $^{aa}P<0.01$ 。

[0182] 比较SOD1+EH301+DXM或SOD1+EH301+IB组与SOD1+DXM, $^bP<0.05$ 和 $^{bb}P<0.01$ 。

[0183] 比较SOD1+EH301+DXM或SOD1+EH301+IB组与SOD1+IB, $^cP<0.05$ 和 $^{cc}P<0.01$ 。

[0184] 结论

[0185] 本文中呈现的结果证实了PCT/US 18/32932中呈现的观察结果,表明EH301显著增加了SOD1小鼠的生存期并改善了运动神经元依赖性功能。另一方面,与对照未处理的SOD1-G93A小鼠相比,DXM或IB的施用显示出生存期和运动协调性的一些改善。与DXM或IB相比,用EH301处理产生更好的结果。

[0186] 与单独使用EH301相比,使用EH301和DXM组合的结果没有明显差异。然而,值得注意的是,如本实施例所示,使用EH301和IB组合的结果明显优于单独使用EH301。

[0187] 如图1所示,相对于用EH301(平均生存期=153天)或异丁司特(平均生存期=137天)治疗的小鼠,从第50天起用EH301加异丁司特治疗的SOD1-G93A小鼠的生存期(平均生存期=191天)明显提高($P<0.01$)。

[0188] 应该强调的是,本文中呈现的结果清楚地表明EH301和IB的协同作用,远远优于任何其他选项(无论是目前对患者施用还是在实验中进行测试的)。考虑到ALS的特殊性(没有治愈、有效的治疗方法,甚至没有办法停止或大大减缓其致命的进展),EH301和IB的联合可能代表和鼓励治疗这种疾病的新的和有效的疗法。

[0189] 用PDE抑制剂治疗

[0190] 口服施用EH301[烟酰胺核苷(NR)和紫檀芪(PT)]:185mg烟酰胺核苷和30mg紫檀芪/Kg $\times$ 天。

[0191] 以约1mg至50mg/Kg $\times$ 天的量口服或腹膜内施用(取决于化合物的类型)PDE抑制剂(包括PDE1、PDE2、PDE3、PDE4、PDE5、PDE7、PDE9、PDE10或PDE11抑制剂)。

[0192] 将日剂量的NR和PDE抑制剂一起溶解在生理盐水中施用。实验动物的饲料中存在PT。PT剂量根据动物体重和每天摄入的食物量进行调整。

[0193] 其他实验旨在检查在单一组合物中NR和PT的施用,以及PDE抑制剂的单独施用。在另外的实验中,NR、PT和PDE抑制剂可以包含在同一组合物中并同时施用。

[0194] 在NR和PT在单一组合物中施用的实施例中,向患者施用包含由200mg至约700mg烟酰胺核苷和约25mg至约200mg的紫檀芪组合的组合物,包括含有500mg的烟酰胺核苷和约100mg的紫檀芪的组合物。

[0195] 在其他实施例中,向患者施用包括约250mg的烟酰胺核苷和约50mg的紫檀芪组合

的组合物。在另外的实施例中,可以施用两个或更多个剂量的此类组合物,使得每天向患者施用总共约500mg烟酰胺核苷和约100mg紫檀芪。

[0196] 口服或腹膜内施用(取决于化合物的类型)PDE抑制剂,包括PDE1、PDE2、PDE3、PDE4、PDE5、PDE7、PDE9、PDE10或PDE11抑制剂,用量从大约1mg到50mg/Kg×天。

[0197] 健康志愿者和ALS患者脑脊液中促炎细胞因子的水平已被确定为单独使用EH301和EH301与异丁司特组合治疗的结果。在程序开始时,健康志愿者和ALS患者的平均年龄分别为 51.7 ± 3.6 岁和 55.4 ± 4.8 岁。健康志愿者和ALS患者的性别分布(男/女)为8/4(健康志愿者),6/4(用安慰剂治疗的对照组ALS患者),5/2(用EH301治疗的ALS患者),4/3(用EH301和异丁司特治疗的ALS患者)。ALS患者随机分布在不同的组中。所有ALS患者都有腰椎病发作。在程序开始时,ALS患者的症状持续时间为15-24个月。在程序开始时,所有病例的ALSFRS-R(修订版ALS功能评定量表)得分均为30-40。在开始治疗之前(第0个月)和第6个月采集脑脊液样本。

[0198] 下表4中表示的数据是志愿者或患者数量的平均值 $\pm$ SD。数据采用双向方差分析(ANOVA)(用于Windows的SPSS 9.0软件;SPSS公司,芝加哥,伊利诺伊州(SPSS Inc., Chicago, IL))。通过Levene检验分析方差的同质性。对于在 $P > 0.05$ 时F值不显著的所有检验值,均接受无效假设。在 $P < 0.05$ 时,通过Tukey检验测试F值显著的数据。行内不同字母表示差别, $P < 0.05$ (a>b>c)。

[0199] 表4:健康志愿者和ALS患者脑脊液中促炎细胞因子的水平。

[0203] 虽然上面已经描述了各种实施例,但是应当理解,它们仅作为本技术的说明和实施例被呈现,而不是作为限制。对于相关领域的技术人员来说显而易见的是,在不脱离本技术的精神和范围的情况下,可以在形式和细节上进行各种改变。因此,本技术的广度和范围不应受上述实施例中的任一限制,而应仅根据所附权利要求及其等效物来定义。还将理解,本文讨论的每个实施例的每个特征以及本文引用的每个参考文献的每个特征可以与任何其他实施例的特征组合使用。本文中讨论的所有专利和出版物均通过引用整体并入本文。

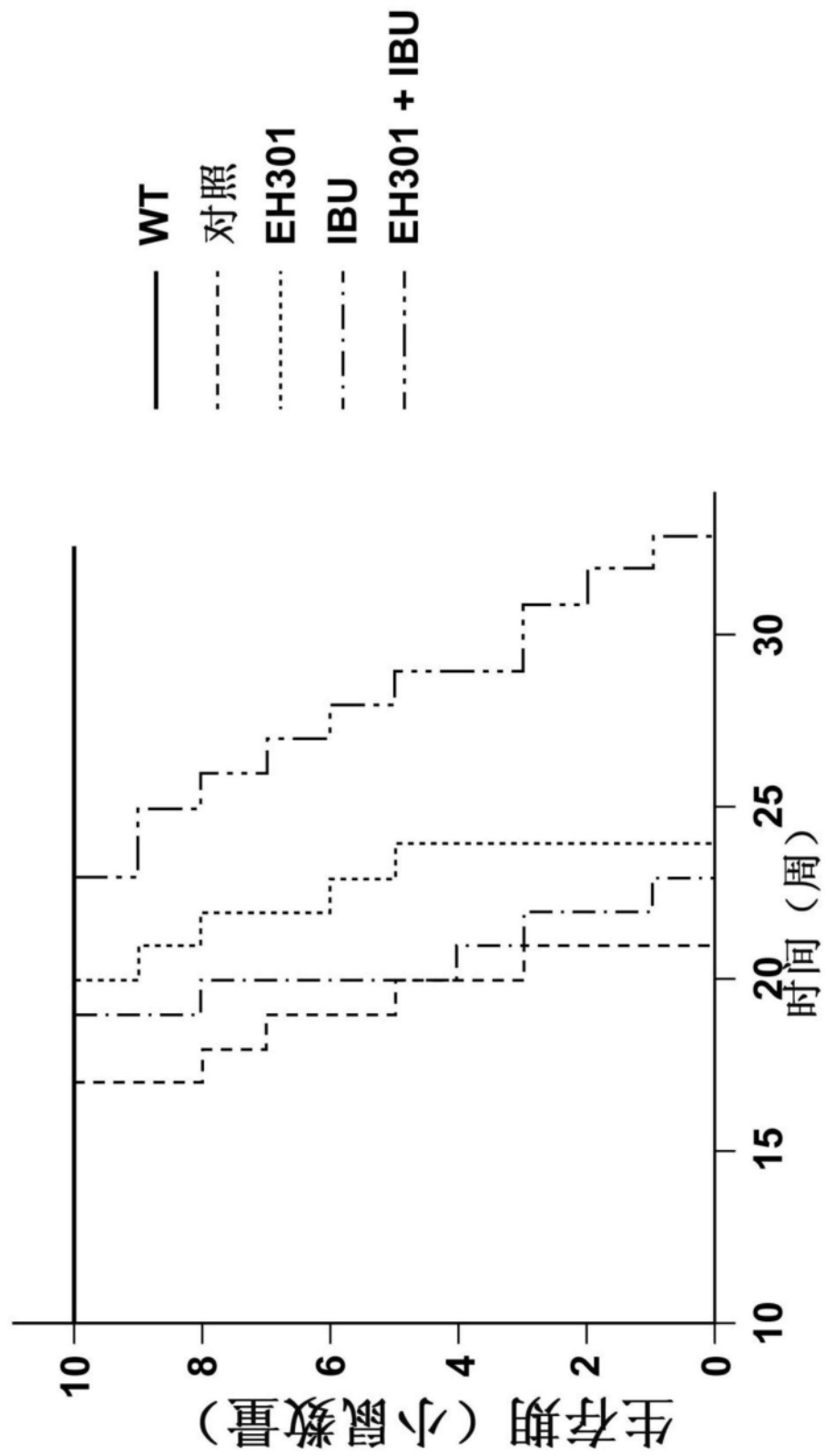


图1

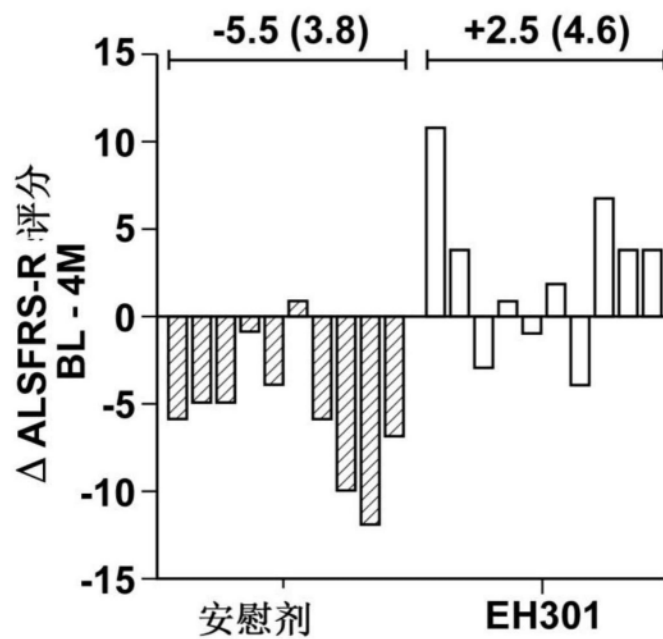


图2A

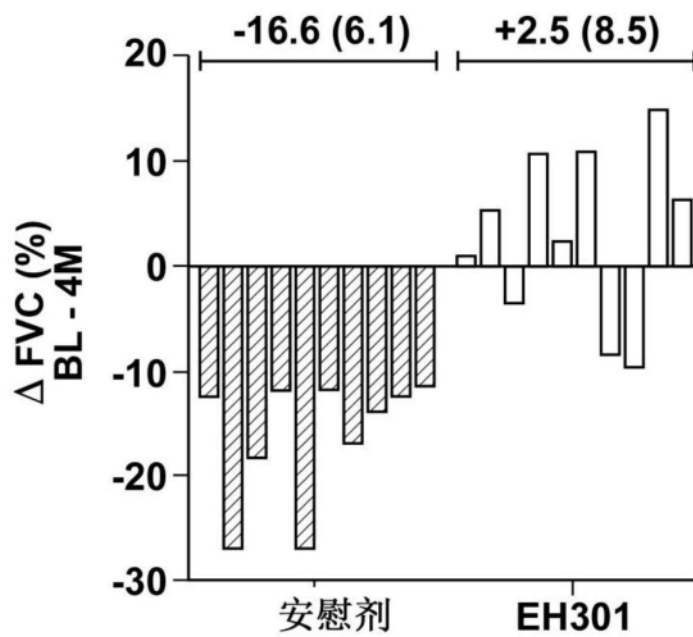


图2B

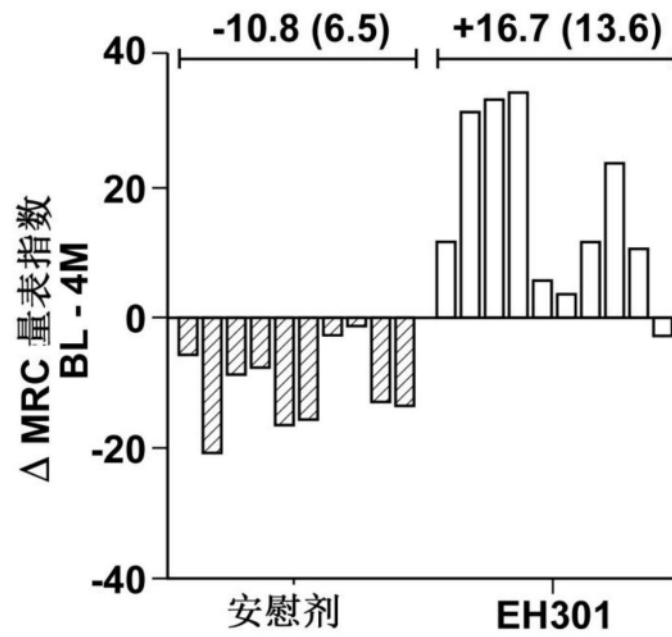


图2C

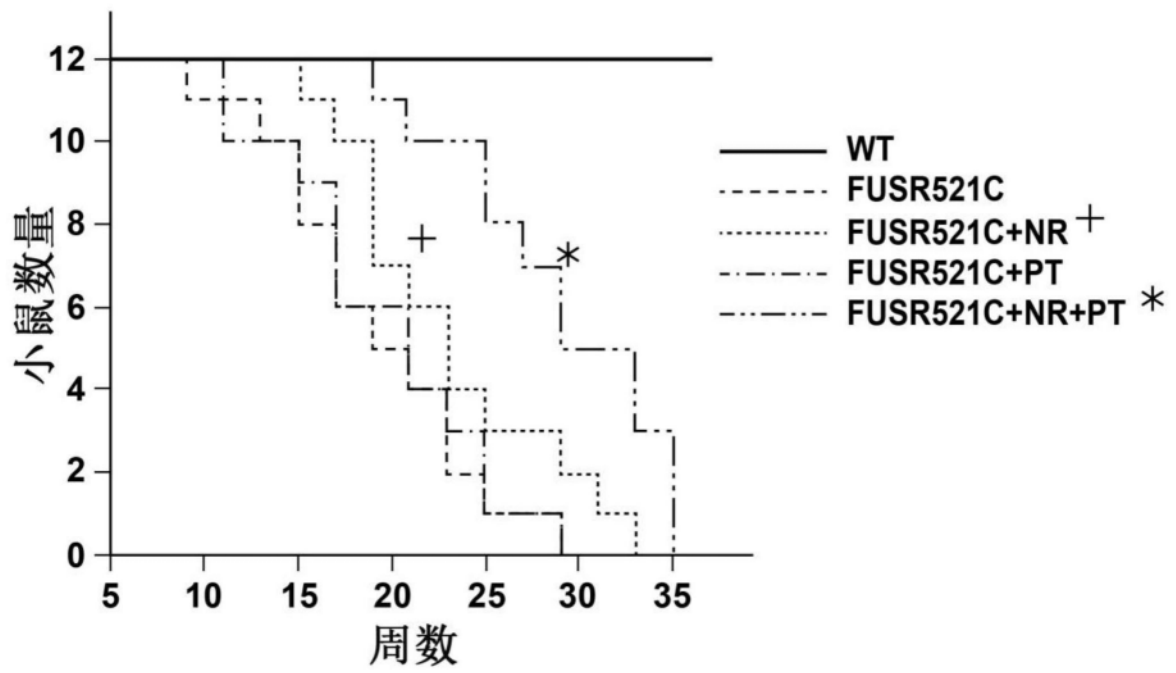


图3A

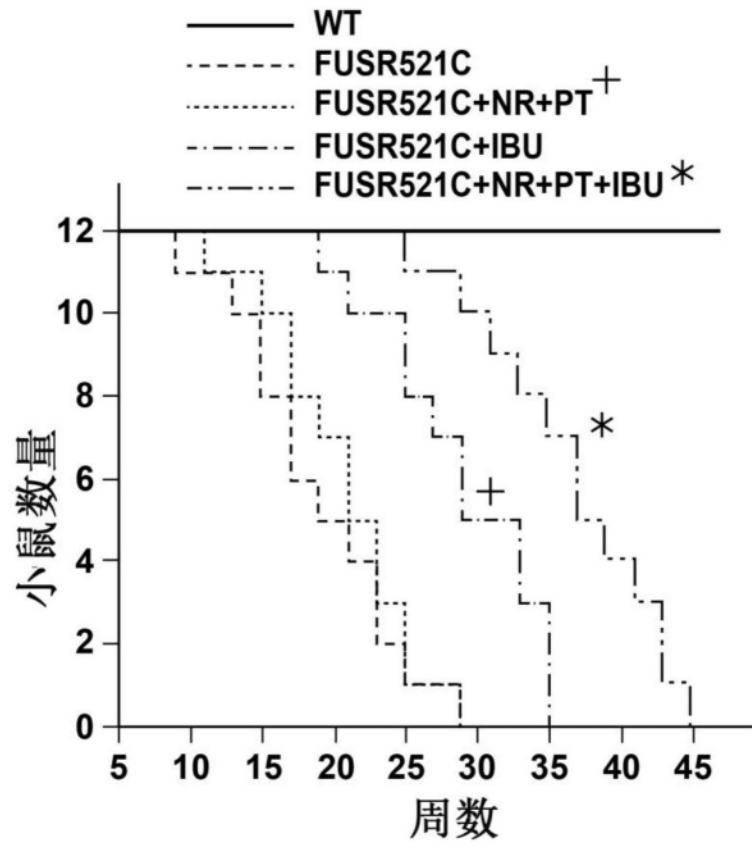


图3B

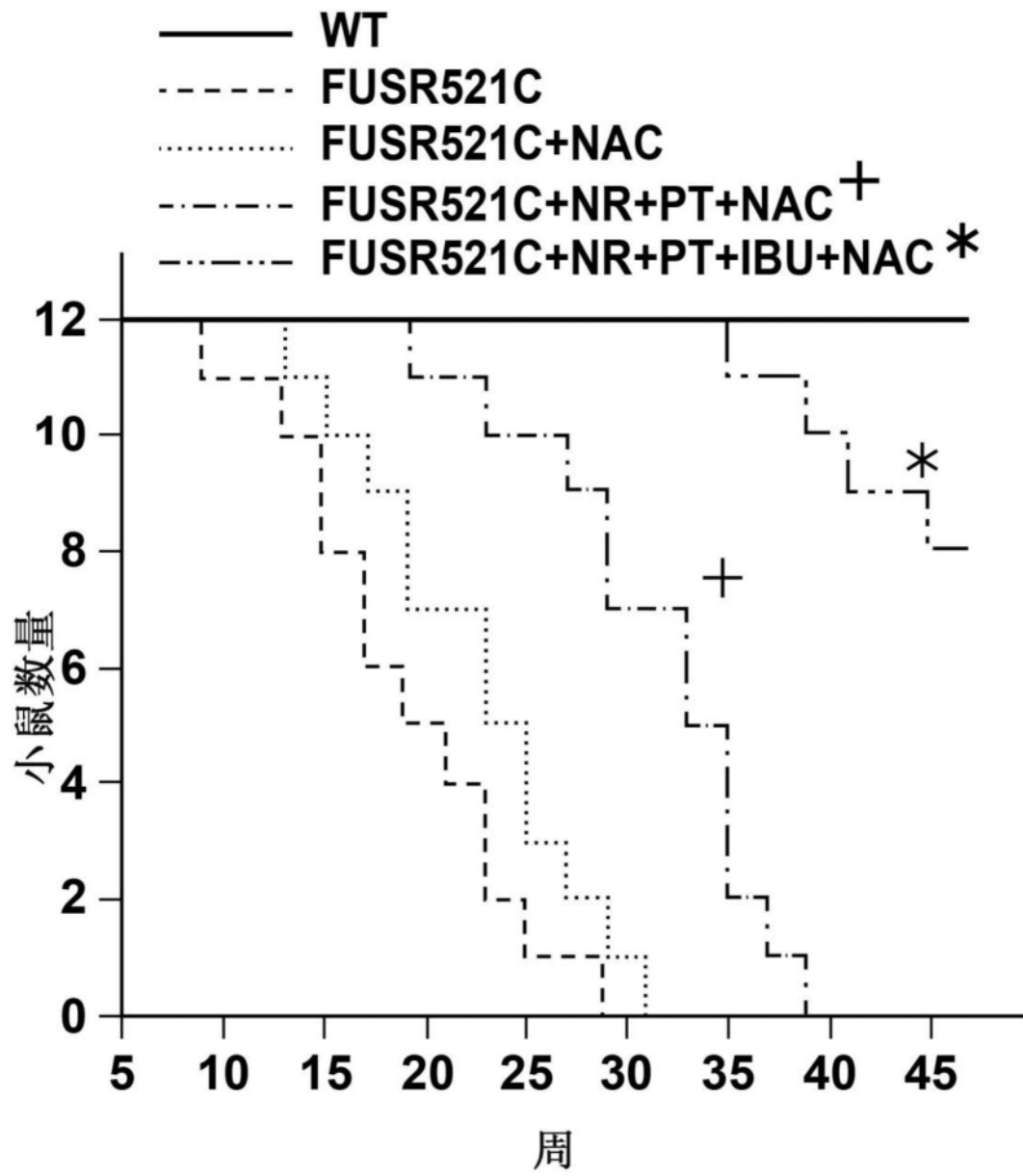
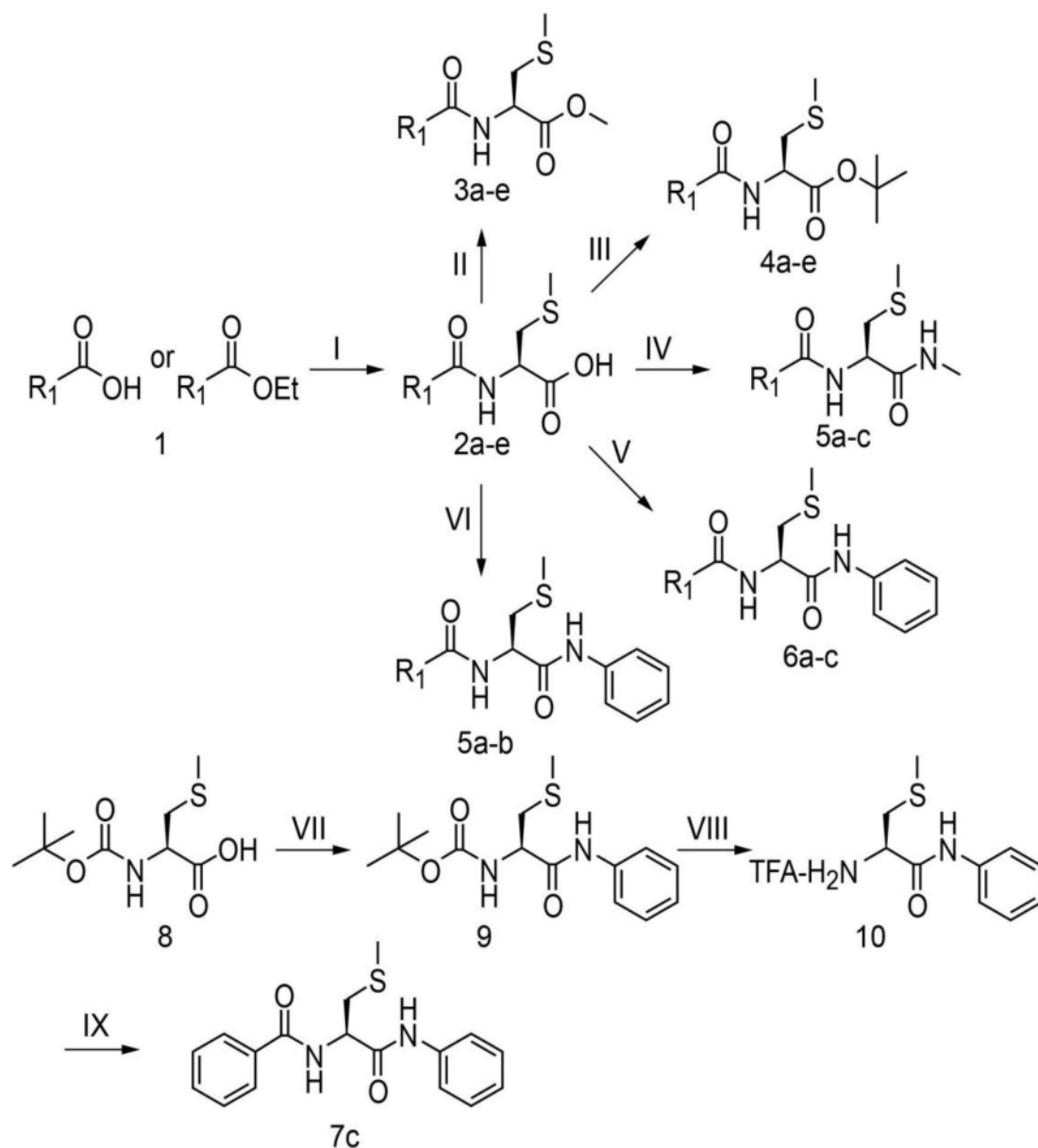


图3C



2a, 3a, 4a, 6a, 7a R_1 = 甲基 2b, 3b, 4b, 5a, 6b, 7b R_1 = 乙基 2c, 3c, 4c, 5b R_1 = 环己基
 2d, 3d, 4d, 5c, 6c, 7c R_1 = 苯基 2e, 3e, 4e R_1 = 4-氟苯基

方案1目标化合物2a-e、3a-e、4a-e、5a-c、6a-c和7a-c的合成。试剂和条件：
 (I) DIE A. Fmoc-Cys(Me)-OH, NMM, DMF, DCM, rt; (II) HCl, MeOH, 15°C; (III) 2-叔丁基-1, 3-二异丙-异脲, DCM, 80°C to rt; (IV) 甲胺盐酸盐, EDCI, HOBT, DMF, DIEA, 15°C; (v) NMM, IBCF, THF, 0°C; (VI) 苯胺, HATU, DMF, 15°C 或苯胺, EDCI, 吡啶, 15°C; (VIII) TFA, DCM, 15°C (IX) 氯化苯甲酰, NaHCO_3 , THF, H_2O , 0°C.

图4