



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105592849 A

(43) 申请公布日 2016. 05. 18

(21) 申请号 201380079011. 7

A61K 31/495(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 08. 21

A61P 25/00(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2016. 02. 19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/056011 2013. 08. 21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02015/026339 EN 2015. 02. 26

(71) 申请人 莫尔豪斯医学院

地址 美国乔治亚州

(72) 发明人 熊志刚 罗杰·P·西蒙

(74) 专利代理机构 北京金信知识产权代理有限公司

11225

代理人 朱梅 严彩霞

(51) Int. Cl.

A61K 31/4965(2006. 01)

A61K 31/496(2006. 01)

权利要求书3页 说明书27页 附图18页

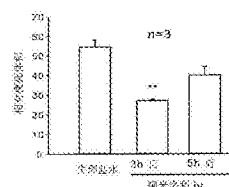
(54) 发明名称

用于减轻神经系统损伤的组合物及该组合物的制造方法和用途

(57) 摘要

本申请公开了可用于减轻受治者的神经损伤或神经系统损伤的包含阿米洛利和 / 或阿米洛利类似物的组合物。公开了此组合物的配方。本申请进一步涉及通过向受治者施用治疗有效量的含有阿米洛利、阿米洛利类似物或它们的药学上可接受的盐的药物组合物, 以治疗神经损伤或神经系统损伤的方法。

阿米洛利类似物
3h 后 5h 后



1. 一种用于减轻受治者神经损伤的方法,包括:向所述受治者施用治疗有效量的包含阿米洛利、阿米洛利类似物或它们的药学上可接受的盐的药物组合物。

2. 权利要求1所述的方法,其中,所述活性组分包括阿米洛利或其药学上可接受的盐。

3. 权利要求1所述的方法,其中,所述活性组分包括阿米洛利类似物或其药学上可接受的盐。

4. 权利要求3所述的方法,其中,所述阿米洛利类似物选自苯扎米尔、非那米尔、5-(N-乙基-N-异丁基)-阿米洛利(EIPA)、苄普地尔、KB-R7943、5-(N-甲基-N-异丁基)阿米洛利、5-(N,N-六亚甲基)阿米洛利和5-(N,N-二甲基)阿米洛利盐酸盐。

5. 权利要求4所述的方法,其中,所述阿米洛利类似物为苯扎米尔。

6. 权利要求3所述的方法,其中,所述阿米洛利类似物为苯扎米尔的甲基化类似物。

7. 权利要求3所述的方法,其中,所述阿米洛利类似物包含形成于胍基团上的环。

8. 权利要求3所述的方法,其中,所述阿米洛利类似物包含酰胍基。

9. 权利要求3所述的方法,其中,所述阿米洛利类似物包含形成于胍基团上的水增溶性基团,其中所述水增溶性基团为N,N-二甲基氨基或糖基。

10. 权利要求1所述的方法,其中,所述药物组合物通过静脉给药。

11. 权利要求1所述的方法,其中,所述药物组合物通过鞘内给药。

12. 权利要求1所述的方法,其中,所述药物组合物通过侧脑室给药。

13. 权利要求2所述的方法,其中,所述阿米洛利、阿米洛利类似物或它们的药学上可接受的盐以0.1mg-10mg/kg体重的剂量范围给药。

14. 权利要求1所述的方法,其中,在局部缺血事件开始的一小时内施用所述药物组合物。

15. 权利要求1所述的方法,其中,在局部缺血事件开始的五小时内施用所述物组合物。

16. 权利要求1所述的方法,其中,在局部缺血事件开始的一小时与五小时之间施用所述物组合物。

17. 权利要求1所述的方法,其中,所述神经损伤为神经系统损伤。

18. 权利要求1所述的方法,其中,所述神经损伤为脑损伤。

19. 一种治疗受治者脑损伤的方法,包括:向所述受治者施用治疗有效量的包含阿米洛利、阿米洛利类似物或它们的药学上可接受的盐的药物组合物。

20. 权利要求19所述的方法,其中,所述药物组合物通过静脉、鞘内或侧脑室给药。

21. 权利要求19所述的方法,其中,所述阿米洛利类似物选自苯扎米尔、非那米尔、EIPA、苄普地尔、KB-R7943、5-(N-甲基-N-异丁基)阿米洛利、5-(N,N-六亚甲基)阿米洛利和5-(N,N-二甲基)阿米洛利盐酸盐。

22. 权利要求19所述的方法,其中,所述阿米洛利类似物为苯扎米尔。

23. 权利要求19所述的方法,其中,所述阿米洛利类似物选自苯扎米尔的甲基化类似物、含有形成于胍基团上的环的阿米洛利类似物、含有酰胍基的阿米洛利类似物和含有形成于胍基团上的水增溶性基团的阿米洛利类似物,其中所述水增溶性基团为N,N-二甲基氨基或糖基。

24. 一种减轻由进入神经元的离子流的变化而导致的神经系统损伤的方法,包括:向需要此治疗的受治者施用治疗有效量的包含阿米洛利、阿米洛利类似物或它们的药学上可接

受的盐的药物组合物。

25. 权利要求24所述的方法, 其中, 所述药物组合物通过静脉、鞘内、侧脑室或肌肉给药。

26. 权利要求24所述的方法, 其中, 所述阿米洛利类似物选自苯扎米尔、非那米尔、EIPA、苄普地尔、KB-R7943、5-(N-甲基-N-异丁基)阿米洛利、5-(N,N-六亚甲基)阿米洛利和5-(N,N-二甲基)阿米洛利盐酸盐。

27. 权利要求24所述的方法, 其中, 所述阿米洛利类似物为苯扎米尔。

28. 权利要求24所述的方法, 其中, 所述阿米洛利类似物选自苯扎米尔的甲基化类似物、含有形成于胍基团上的环的阿米洛利类似物、含有酰胍基的阿米洛利类似物和含有形成于胍基团上的水增溶性基团的阿米洛利类似物, 其中所述水增溶性基团为N,N-二甲基氨基或糖基。

29. 一种减轻神经系统损伤的方法, 包括: 向需要此治疗的受治者施用治疗有效量的包含阿米洛利、阿米洛利类似物或它们的药学上可接受的盐的药物组合物。

30. 权利要求29所述的方法, 其中, 所述药物组合物通过静脉、鞘内、侧脑室或肌肉给药。

31. 权利要求29所述的方法, 其中, 所述阿米洛利类似物选自苯扎米尔、非那米尔、EIPA、苄普地尔、KB-R7943、5-(N-甲基-N-异丁基)阿米洛利、5-(N,N-六亚甲基)阿米洛利和5-(N,N-二甲基)阿米洛利盐酸盐。

32. 权利要求29所述的方法, 其中, 所述阿米洛利类似物为苯扎米尔。

33. 权利要求29所述的方法, 其中, 所述阿米洛利类似物选自苯扎米尔的甲基化类似物、含有形成于胍基团上的环的阿米洛利类似物、含有酰胍基的阿米洛利类似物和含有形成于胍基团上的水增溶性基团的阿米洛利类似物, 其中所述水增溶性基团为N,N-二甲基氨基或糖基。

34. 一种用于减轻神经系统损伤的药物组合物, 包含: 有效量的阿米洛利、阿米洛利类似物或它们的药学上可接受的盐; 以及药学上可接受的载体, 其中将所述药物组合物配制为用于静脉、鞘内或侧脑室注射。

35. 权利要求34所述的药物组合物, 其中, 所述阿米洛利类似物选自苯扎米尔、非那米尔、EIPA、苄普地尔、KB-R7943、5-(N-甲基-N-异丁基)阿米洛利、5-(N,N-六亚甲基)阿米洛利和5-(N,N-二甲基)阿米洛利盐酸盐。

36. 权利要求34所述的方法, 其中, 所述阿米洛利类似物选自苯扎米尔的甲基化类似物、含有形成于胍基团上的环的阿米洛利类似物、含有酰胍基的阿米洛利类似物和含有形成于胍基团上的水增溶性基团的阿米洛利类似物, 其中所述水增溶性基团为N,N-二甲基氨基或糖基。

37. 一种用于减轻神经系统损伤的药物组合物, 包含: 有效量的阿米洛利类似物或其药学上可接受的盐; 以及药学上可接受的载体。

38. 权利要求37所述的方法, 其中, 其中将所述药物组合物配制为用于静脉、鞘内、侧脑室或肌肉注射。

39. 权利要求37所述的药物组合物, 其中, 所述阿米洛利类似物为苯扎米尔的甲基化类似物。

40. 权利要求37所述的药物组合物,其中,所述阿米洛利类似物包含形成于胍基团上的环。

41. 权利要求37所述的药物组合物,其中,所述阿米洛利类似物包含酰胍基。

42. 权利要求37所述的药物组合物,其中,所述阿米洛利类似物包含形成于胍基团上的水增溶性基团,其中所述水增溶性基团为N,N-二甲基氨基或糖基。

用于减轻神经系统损伤的组合物及该组合物的制造方法和用途

技术领域

[0001] 本申请涉及神经病学领域。特别地，本申请针对包含能够用于减轻受治者的神经损伤或神经系统损伤的阿米洛利(amiloride)和/或阿米洛利类似物的组合物。

背景技术

[0002] 神经损伤可由多种条件引起，如退行性神经疾病、中风、局部缺血、神经系统的化学和机械损伤。许多类型的神经损伤会引发进入神经元的离子流的变化，这反过来导致了神经细胞的死亡。因此，各种离子通道可以用以调解该变化的离子流的备选，因而减轻了神经损伤的程度。

发明内容

[0003] 本申请的一个方面涉及一种用于减轻受治者的神经损伤的方法。所述方法包括向所述受治者施用治疗有效量的含有选自阿米洛利和阿米洛利类似物的活性组分的药物组合物。在一些实施方式中，所述药物组合物是通过静脉、鞘内或侧脑室给药的。

[0004] 在一些实施方式中，所述活性组分包括阿米洛利或其药学上可接受的盐。

[0005] 在另外的实施方式中，所述活性组分包括阿米洛利类似物或其药学上可接受的盐。在相关实施方式中，所述阿米洛利类似物选自苯扎米尔(benzamil)、非那米尔(phenmil)、5-(N-乙基-N-异丁基)-阿米洛利(EIPA)、苄普地尔(bepidil)、KB-R7943、5-(N-甲基-N-异丁基)阿米洛利、5-(N,N-六亚甲基)阿米洛利和5-(N,N-二甲基)阿米洛利盐酸盐。在另外的相关实施方式中，所述阿米洛利类似物为苯扎米尔。在另外的相关实施方式中，所述阿米洛利类似物为苯扎米尔的甲基化类似物。在另外的相关实施方式中，所述阿米洛利类似物包含形成于胍基团上的环。在另外的相关实施方式中，所述阿米洛利类似物包含酰胍基。在另外的相关实施方式中，所述阿米洛利类似物包含形成于胍基团上的水增溶性基团，其中所述水增溶性基团为N,N-二甲基氨基或糖基。

[0006] 在一些实施方式中，所述阿米洛利、阿米洛利类似物或它们的药学上可接受的盐以0.1mg-10mg/kg体重的剂量范围给药。

[0007] 在一些实施方式中，在局部缺血事件开始的一小时内、在局部缺血事件开始的五小时内或在局部缺血事件开始的一小时与五小时之间施用所述药物组合物。

[0008] 在一些实施方式中，所述神经损伤为脑损伤。

[0009] 本申请的另一个方面涉及一种用于治疗受治者脑损伤的方法。所述方法包括向所述受治者施用治疗有效量的包含阿米洛利、阿米洛利类似物或它们的药学上可接受的盐的药物组合物。在一些实施方式中，所述药物组合物是通过静脉、鞘内或侧脑室给药的。

[0010] 在一些实施方式中，所述阿米洛利类似物选自苯扎米尔、非那米尔、EIPA、苄普地尔、KB-R7943、5-(N-甲基-N-异丁基)阿米洛利、5-(N,N-六亚甲基)阿米洛利和5-(N,N-二甲基)阿米洛利盐酸盐。在相关实施方式中，所述阿米洛利类似物为苯扎米尔。在另外的实施

方式中,所述阿米洛利类似物选自苯扎米尔的甲基化类似物、含有形成于胍基团上的环的阿米洛利类似物、含有酰胍基的阿米洛利类似物和含有形成于胍基团上的水增溶性基团的阿米洛利类似物,其中所述水增溶性基团为N,N-二甲基氨基或糖基。

[0011] 本申请的另一个方面涉及一种用于减轻由进入神经元的离子流的变化而导致的神经系统损伤的方法。所述方法包括向需要此治疗的受治者施用治疗有效量的包含阿米洛利、阿米洛利类似物或它们的药学上可接受的盐的药物组合物。

[0012] 在一些实施方式中,通过静脉、鞘内、侧脑室或肌肉施用所述药物组合物。

[0013] 在另外的实施方式中,所述阿米洛利类似物选自苯扎米尔、非那米尔、EIPA、苄普地尔、KB-R7943、5-(N-甲基-N-异丁基)阿米洛利、5-(N,N-六亚甲基)阿米洛利和5-(N,N-二甲基)阿米洛利盐酸盐。在相关实施方式中,所述阿米洛利类似物为苯扎米尔。在另外的实施方式中,所述阿米洛利类似物选自苯扎米尔的甲基化类似物、含有形成于胍基团上的环的阿米洛利类似物、含有酰胍基的阿米洛利类似物和含有形成于胍基团上的水增溶性基团的阿米洛利类似物,其中所述水增溶性基团为N,N-二甲基氨基或糖基。

[0014] 本申请的另一个方面涉及一种用于减轻神经系统损伤的方法。所述方法包括向需要此治疗的受治者施用治疗有效量的包含阿米洛利、阿米洛利类似物或它们的药学上可接受的盐的药物组合物。

[0015] 在一些实施方式中,通过静脉、鞘内、侧脑室或肌肉施用所述药物组合物。

[0016] 在另外的实施方式中,所述阿米洛利类似物选自苯扎米尔、非那米尔、EIPA、苄普地尔、KB-R7943、5-(N-甲基-N-异丁基)阿米洛利、5-(N,N-六亚甲基)阿米洛利和5-(N,N-二甲基)阿米洛利盐酸盐。在相关实施方式中,所述阿米洛利类似物为苯扎米尔。在另外的实施方式中,所述阿米洛利类似物选自苯扎米尔的甲基化类似物、含有形成于胍基团上的环的阿米洛利类似物、含有酰胍基的阿米洛利类似物和含有形成于胍基团上的水增溶性基团的阿米洛利类似物,其中所述水增溶性基团为N,N-二甲基氨基或糖基。

[0017] 本申请的另一个方面涉及一种用于减轻神经系统损伤的药物组合物。所述药物组合物包含有效量的阿米洛利、阿米洛利类似物或它们的药学上可接受的盐;以及药学上可接受的载体,其中将所述药物组合物配制为用于静脉、鞘内或侧脑室注射。

[0018] 在一些实施方式中,所述药物组合物包含阿米洛利类似物或其药学上可接受的盐,其中所述阿米洛利类似物选自苯扎米尔、非那米尔、EIPA、苄普地尔、KB-R7943、5-(N-甲基-N-异丁基)阿米洛利、5-(N,N-六亚甲基)阿米洛利和5-(N,N-二甲基)阿米洛利盐酸盐。

[0019] 在另外的实施方式中,所述药物组合物包含阿米洛利类似物或其药学上可接受的盐,其中所述阿米洛利类似物选自苯扎米尔的甲基化类似物、含有形成于胍基团上的环的阿米洛利类似物、含有酰胍基的阿米洛利类似物和含有形成于胍基团上的水增溶性基团的阿米洛利类似物,其中所述水增溶性基团为N,N-二甲基氨基或糖基。

[0020] 本申请的另一个方面涉及一种用于减轻神经系统损伤的药物组合物。所述药物组合物包含有效量的阿米洛利类似物或其药学上可接受的盐;以及药学上可接受的载体。

[0021] 在一些实施方式中,将所述药物组合物配制为用于静脉、鞘内、侧脑室或肌肉注射。

[0022] 在一实施方式中,所述阿米洛利类似物为苯扎米尔的甲基化类似物。在另外的实施方式中,所述阿米洛利类似物包含形成于胍基团上的环。在另外的实施方式中,所述阿米

洛利类似物包含酰胍基。在再一实施方式中,所述阿米洛利类似物包含形成于胍基团上的水增溶性基团,其中所述水增溶性基团为N,N-二甲基氨基或糖基。

附图说明

[0023] 图1为图示了减轻局部缺血性受治者神经损伤的示例性方法的流程图。

[0024] 图2为图示了鉴别用于治疗局部缺血性相关的神经损伤的药物的示例性方法的流程图。

[0025] 图3为展示了关于培养的小鼠皮层神经元的酸敏感离子通道(ASIC)蛋白的电生理学和药理学的示例性数据的一系列图表。

[0026] 图4为另外的展示了关于培养的小鼠皮层神经元的ASIC蛋白质的电生理学和药理学的示例性数据的系列图表。

[0027] 图5为根据本发明的各个方面的一系列展示了示例性数据的图表和曲线,所述示例性数据显示模拟的局部缺血可提高ASIC蛋白质的活性。

[0028] 图6和7为一系列展示了示例性数据的图表和曲线,所述示例性数据显示皮层神经元中的ASIC蛋白质可为 Ca^{2+} 可渗透的,且 Ca^{2+} 的渗透性可取决于ASIC1a。

[0029] 图8为一系列展示了示例性数据的图表,所述示例性数据显示酸孵育可导致通过ASIC阻滞保护的谷氨酸受体-独立神经元的损伤。

[0030] 图9为一系列展示了示例性数据的图表,所述示例性数据显示ASIC1a可能参与了体外的酸诱导损伤。

[0031] 图10为一系列包含数据的图表,所述数据显示了通过ASIC1a阻滞及通过ASIC1基因敲除的体内脑局部缺血的神经保护。

[0032] 图11为描绘了作为时间与治疗类型的函数的动物模型系统的因中风而产生的局部缺血性损害的百分比的示例性数据的图表。

[0033] 图12为具有所示的多种示例性肽特征的示例性胱氨酸结肽(cystine knot peptide)PcTx1的主要氨基酸序列(primary amino acid)的视图。

[0034] 图13为图12的胱氨酸结肽与该肽的多种示例性缺失衍生物的比较图。

[0035] 图14为描绘了作为细胞内表达的ASIC家族成员的函数的细胞内测得的钙流的幅度的示例性图表。

[0036] 图15为展示了关于鼻腔给药的PcTx毒素在动物模型系统中减轻局部缺血性损伤的效力的示例性数据的图表。

[0037] 图16为显示了用苯扎米尔(A组)或5-(N-乙基-N-异丁基)阿米洛利(EIPA)(B组),以及凭借阿米洛利和阿米洛利类似物而剂量依赖地阻滞在CHO细胞中表达的ASIC 1a电流(C组)治疗的CHO细胞中代表性的ASIC 1a电流的曲线的组合图。

[0038] 图17为显示了用苯扎米尔(A组)或阿米洛利(B组),以及凭借阿米洛利和阿米洛利类似物而剂量依赖地阻滞在CHO细胞中表达的ASIC 2a电流(C组)治疗的CHO细胞中代表性的ASIC 2a电流的曲线的组合图。

[0039] 图18为显示了通过侧脑室注射阿米洛利或阿米洛利类似物减少了小鼠梗死体积的图表。

[0040] 图19为显示了MCAO后60分钟通过静脉注射生理盐水或阿米洛利减少了小鼠皮层

组织中的梗死体积的组合图。

[0041] 图20为显示了MCAO后3小时或5小时通过静脉注射生理盐水或阿米洛利减少了小鼠皮层组织中的梗死体积的组合图。

[0042] 图21显示了疏水性的阿米洛利类似物在各种通道上的结构活性关系(SAR)。

具体实施方式

[0043] 本申请提供了用于减轻神经损伤的方法和组合物。神经损伤可由退行性神经疾病、中风、局部缺血、外伤、神经系统的化学和机械损伤所导致。如在本文中所用的,术语“神经系统”包括中枢神经系统和周围神经系统。术语“中枢神经系统”或“CNS”包括脊椎动物的脑和脊髓的所有细胞和组织。术语“周围神经系统”指的是除了脑和脊髓之外的神经系统部分的所有细胞和组织,如调节自主运动的运动神经元,包括交感神经系统和副交感神经系统并管理非自主功能的自主神经系统,以及控制胃肠系统的肠神经系统。因此,术语“神经系统”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)中的细胞,组织间隙中的细胞,脊髓的保护层中的细胞,硬脑膜外细胞(例如,硬脑膜外面的细胞),临近神经组织或与之联络或受其支配的非神经组织中的细胞,神经外膜、神经束膜、神经内膜、精索、束等中的细胞。

[0044] 在一些实施方式中,所述神经损伤为神经系统损伤。在另外的实施方式中,所述神经损伤为脑损伤。在一些实施方式中,所述神经损伤为由进入神经元的离子流的变化而导致的神经系统损伤。例如,中风/脑局部缺血是发病和死亡的主要原因。突触后的谷氨酸受体的过激活及随后的 Ca^{2+} 毒性在局部缺血性脑损伤中扮演了关键性的角色。本申请证实了可渗透 Ca^{2+} 的酸敏感离子通道(ASIC)的激活参与了酸中毒诱导的、与谷氨酸受体无关的局部缺血性脑损伤,并提供了靶向ASIC家族成员(ASICs)的神经保护的新方向。本申请进一步提供了新的ASICs抑制剂,其具有对于同源的ASICs通道的更强的效力,以及更高的水溶性。在一些实施方式中,本申请提供了通过抑制ASIC1a通道而减轻神经损伤的药物组合物和方法。

[0045] 本申请的一个方面涉及一种用于减轻受治者的神经损伤的方法。所述方法包括向所述受治者施用治疗有效量的含有选自阿米洛利和阿米洛利类似物的活性组分的药物组合物。在一些实施方式中,通过静脉、鞘内或侧脑室施用所述药物组合物。

[0046] 在一些实施方式中,所述活性组分包括阿米洛利或其药学上可接受的盐。在另外的实施方式中,所述活性组分包括阿米洛利类似物或其药学上可接受的盐。在相关实施方式中,所述阿米洛利类似物选自苯扎米尔、非那米尔、5-(N-乙基-N-异丁基)-阿米洛利(EIPA)、苄普地尔、KB-R7943、5-(N-甲基-N-异丁基)阿米洛利、5-(N,N-六亚甲基)阿米洛利和5-(N,N-二甲基)阿米洛利盐酸盐。在另外的相关实施方式中,所述阿米洛利类似物为苯扎米尔。在另外的相关实施方式中,所述阿米洛利类似物为苯扎米尔的甲基化类似物。在另外的相关实施方式中,所述阿米洛利类似物包含形成于胍基团上的环。在另外的相关实施方式中,所述阿米洛利类似物包含酰胍基。在另外的相关实施方式中,所述阿米洛利类似物包含形成于胍基团上的水增溶性基团,其中所述水增溶性基团为N,N-二甲基氨基或糖基。

[0047] 在一些实施方式中,所述阿米洛利、阿米洛利类似物或它们的药学上可接受的盐以0.1mg-10mg/kg体重的剂量范围给药。在另外的实施方式中,在局部缺血事件开始的一小

时内、在局部缺血事件开始的五小时内或在局部缺血事件开始的一小时与五小时之间施用所述药物组合物。

[0048] 本申请的另一个方面涉及一种用于治疗受治者脑损伤的方法。所述方法包括向所述受治者施用治疗有效量的包含阿米洛利、阿米洛利类似物或它们的药学上可接受的盐的药物组合物。在一些实施方式中,通过静脉、鞘内或侧脑室施用所述药物组合物。

[0049] 在一些实施方式中,所述阿米洛利类似物选自苯扎米尔、非那米尔、EIPA、苄普地尔、KB-R7943、5-(N-甲基-N-异丁基)阿米洛利、5-(N,N-六亚甲基)阿米洛利和5-(N,N-二甲基)阿米洛利盐酸盐。在相关实施方式中,所述阿米洛利类似物为苯扎米尔。在另外的相关实施方式中,所述阿米洛利类似物选自苯扎米尔的甲基化类似物、含有形成于胍基团上的环的阿米洛利类似物、含有酰胍基的阿米洛利类似物和含有形成于胍基上的水增溶性基团的阿米洛利类似物,其中所述水增溶性基团为N,N-二甲基氨基或糖基。

[0050] 本申请的另一个方面涉及一种用于减轻由进入神经元的离子流的变化而导致的神经系统损伤的方法。所述方法包括向需要此治疗的受治者施用治疗有效量的包含阿米洛利、阿米洛利类似物或它们的药学上可接受的盐的药物组合物。

[0051] 本申请的另一个方面提供了一种用于治疗局部缺血或减轻由局部缺血导致的损伤的组合物。方法包括通过静脉或鞘内向需要此治疗的受治者施用治疗有效量的选自阿米洛利、阿米洛利类似物和它们的盐的活性组分。本申请的方法可比其它的局部缺血治疗方法具有一个或多个优点。其中,这些优点可包括:(1)较小的局部缺血导致的损伤,(2)更少的治疗副作用(例如,归因于更明确的治疗标靶的选择),和/或(3)供有效治疗的更长的时间窗。

[0052] 图1显示了包括可在用于减轻局部缺血的受治者的神经损伤的方法中进行的示例性步骤22、24的流程图20。所述步骤可以任何适宜的次数和任何适宜的组合进行。在所述方法中,可选择局部缺血的受治者(或受治者们)以供治疗,以22示出。之后可向所述局部缺血的受治者(们)施用ASIC选择性抑制剂,以24示出。可以治疗有效量向所述局部缺血的受治者施用所述抑制剂,以减轻受治者局部缺血导致的损伤,例如,降低由中风导致的脑损伤的程度。

[0053] 图1的针对局部缺血性治疗的功效的潜在性的解释可由本发明的数据所提供(例如,参见实施例1)。特别地,局部缺血的破坏效果并不等同于酸中毒,即通过局部缺血的组织/细胞的酸化可能并不足以产生局部缺血导致的损伤。换句话说,在很多情况下,局部缺血导致的损伤可能是由经ASIC家族成员,尤其是ASIC1a介导的进入细胞的钙流所导致的。因此,选择性抑制ASIC1a的通道活性可减少此有害的钙流,因而减轻了局部缺血导致的损伤。

[0054] 图2显示了包括可在鉴别用于治疗局部缺血的药物的方法中进行的示例性步骤32、34的流程图30。所述步骤可以任何适宜的次数和任何适宜的组合进行。在所述方法中,可获得一种或多种ASIC选择性抑制剂,以32示出。之后可在局部缺血的受治者上测试所述抑制剂对局部缺血导致的损伤的效果,以34示出。

[0055] 神经损伤

[0056] 本申请针对用于减轻受治者的神经损伤的药物组合物和方法。如在本文中所用的,术语“神经损伤”指的是由物理事件或外伤、挫伤或压迫或手术损伤、包括失血性或局部

缺血性损害的血管药理学损害,或者由神经退行性的或任何其它神经系统的疾病,或任何其它的引发神经系统组织或细胞的损伤或不利状况的因素所导致的神经系统组织或细胞的急性或慢性损伤或不利状况。在一些实施方式中,所述神经损伤由认知失调、精神失调、神经递质介导的失调或神经元失调所导致。神经损伤包括对神经系统的损伤(即神经系统损伤)和脑损伤。

[0057] 如在本文中所用的,术语“认知失调”是指和意指相信涉及或确实涉及神经元的结构和/或功能的进行性丧失(包括神经元的死亡),或相信与之相关或确实与之相关的疾病或状况,其中所述失调的首要特征可为认知(例如,记忆、注意力、感知和/或思维)障碍。这些失调包括病原体引发的认知障碍,例如,HIV相关的认知障碍或莱姆病(Lyme disease)相关的认知障碍。在一些实施方式中,所述认知失调为退行性认知失调。所述退行性认知失调的实例包括阿尔茨海默氏症(Alzheimer's Disease)、亨廷顿氏舞蹈症(Huntington's Disease)、帕金森氏症(Parkinson's Disease)、肌萎缩性侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis,ALS)、自闭症、轻度认知障碍(MCI)、中风、创伤性脑损伤(TBI)、年龄相关的记忆障碍(AAMI)和癫痫。

[0058] 如在本文中所用的,术语“精神失调”是指和意指相信导致了或确实导致了反常的思维和感知的精神疾病或状况。精神失调的特征在于现实性的缺失,这可伴随着妄想、幻觉(在外部刺激的缺失下的具有真实感知性质的有意识的和清醒状态的感知,在其中它们是生动的、具体的,并位于外部的目标空间)、人格改变和/或思维紊乱。其它的常见症状包括异常的和古怪的举止,以及社交困难和在进行日常生活活动方面的障碍。示例性的精神失调为精神分裂症、双相型精神障碍(bipolar disorders)、精神病(psychosis)、焦虑症、抑郁症和慢性疼痛。

[0059] 如在本文中所用的,术语“神经递质介导的失调”是指和意指相信涉及或确实涉及神经递质(如组织胺、谷氨酸、5-羟色胺、多巴胺、去甲肾上腺素)的异常水平或胺类的G蛋白偶联受体(aminergic G protein-coupled receptors)的受损功能,或相信与之相关或确实与之相关的疾病或状况。示例性的神经递质介导的失调包括脊髓损伤、糖尿病性神经病、过敏性疾病和涉及老化保护活动的疾病(如与年龄相关的脱发(脱发)、与年龄相关的体重减轻和与年龄相关的视觉障碍(白内障))。异常的神经递质水平与多种疾病和状况有关,所述疾病和状况包括但不限于:阿尔茨海默氏症、帕金森氏症、自闭症、格林-巴利综合征(Guillain-Barre syndrome)、轻度认知障碍、精神分裂症、焦虑症、多发性硬化症(multiple sclerosis)、中风、外伤性脑损伤、脊髓损伤、糖尿病性神经病、纤维肌痛(fibromyalgia)、双相型精神障碍、精神病、抑郁症和各种过敏性疾病。

[0060] 如在本文中所用的,术语“神经元失调”是指和意指相信涉及或确实涉及神经元细胞死亡和/或神经元功能受损或神经元功能降低,或相信与之相关或确实与之相关的疾病或状况。示例性的神经元适应症包括神经退行性疾病和失调,如阿尔茨海默氏症,亨廷顿氏舞蹈症,肌萎缩性侧索硬化症(ALS),帕金森氏症,犬认知功能障碍综合征(canine cognitive dysfunction syndrome,CCDS),路易体症(Lewy body disease),门克斯病(Menkes disease),威尔森病(Wilson disease),克雅氏病(Creutzfeldt-Jakob disease),基底节钙化症(Fahr disease),涉及脑循环的急性或慢性失调(如局部缺血性或出血性中风,或其它脑出血性损害),与年龄相关的记忆障碍(AAMI),轻度认知障碍(MCI),

与损伤相关的轻度认知障碍(MCI),脑震荡后综合征,创伤后应激障碍,辅助化疗,外伤性脑损伤(TBI),神经元死亡介导的眼部疾病,黄斑变性(macular degeneration),与年龄相关的黄斑变性,自闭症(包括自闭症谱系障碍(autism spectrum disorder)、阿斯伯格综合征(Asperger syndrome)和雷特综合征(Rett syndrome)),撕脱伤,脊髓损伤,重症肌无力,格林-巴利综合征,多发性硬化症,糖尿病性神经病,纤维肌痛,与脊髓损伤、精神分裂症、双相型精神障碍、精神病、焦虑症或抑郁症相关的神经病,以及慢性疼痛。

[0061] 在一些实施方式中,所述神经损伤或神经系统损伤由进入神经元或神经系统组织的离子流的变化所导致。如在本文中所用的,术语“神经系统组织”是指包括神经细胞、神经纤维网(neuropil)、神经胶质(glia)、神经炎性细胞(neural inflammatory cell)以及及“神经系统组织”相接触的内皮细胞的动物组织。“神经细胞”可以是本领域技术人员所知的任何类型的神经细胞,包括但不限于神经元。如在本文中所用的,术语“神经元”表示源自动物的神经系统的任何部分的外胚层胚胎起源细胞。神经元表达了已充分特征化的神经元特异性标记物,包括神经丝蛋白(neurofilament protein)、NeuN(神经元核标记物, Neuronal Nuclei marker)、MAP2和III级微管蛋白(class III tubulin)。作为神经元被包括的是,例如,海马(hippocampal)神经元、皮层(cortical)神经元、中脑多巴胺能(midbrain dopaminergic)神经元、脊髓运动(spinal motor)神经元、感觉(sensory)神经元、肠(enteric)神经元、交感(sympathetic)神经元、副交感(parasympathetic)神经元、隔膜胆碱能(septal cholinergic)神经元、中枢神经系统和小脑神经元。本发明中所用的“神经胶质细胞”包括但不限于:星形胶质细胞、雪旺细胞(Schwan cell)和少突神经胶质细胞(oligodendrocytes)。本发明中所用的“神经炎性细胞”包括但不限于:包括巨噬细胞和小神经胶质细胞的骨髓起源细胞。

[0062] 在一些实施方式中,本申请的药物组合物和方法涉及减轻由局部缺血或与局部缺血相关状况导致的神经损伤。在本文中所用的局部缺血为流入器官和/或组织的血流减少。所述血流减少可能是由多种机制所导致,其包括但不限于:向器官和/或组织供血的一个或多个血管的部分或完全阻塞(梗阻)、变窄(缩窄)和/或泄漏/破裂。局部缺血可能由血栓形成、栓塞、动脉粥样硬化、高血压、出血、动脉瘤、手术、外伤、药物治疗等产生。因而所述血流减少可能会是慢性的、短暂的、急性的或偶发性的。

[0063] 任何的器官或组织可能会经历血流减少,并需要针对局部缺血的治疗。示例性的器官和/或组织包括但不限于:脑、动脉、心脏、肠和眼(例如,视神经)。其中,局部缺血导致的损伤(即各种类型的局部缺血所引起的疾病和/或损害)包括但不限于:缺血性脊髓病、缺血性视神经病变、缺血性结肠炎、冠心病和/或心脏疾病(例如,心绞痛、心脏麻痹(heart attack)等)。因而局部缺血导致的损伤可损害和/或杀死细胞和/或组织,例如,在躯体受影响的位置产生坏死(梗死)组织、发炎和/或组织重塑。根据本申请的各个方面的治疗可降低此损伤的发生率、程度和/或严重性。

[0064] 与局部缺血相关的状况可以是局部缺血的任何后果。所述后果可大体上与局部缺血的发作同时发生(例如,所述局部缺血的直接后果),和/或可大体上在局部缺血的发作之后和/或甚至在局部缺血结束之后发生(例如,所述局部缺血的间接的、随之产生的后果,局部缺血结束后组织的这样的再灌注)。示例性的与局部缺血相关的状况可包括以上所列的症状(和/或状况)的任意组合。或者(或加之),所述症状可包括局部的和/或全身的酸中毒

(pH降低)、缺氧(氧降低)、自由基的生成,等等。

[0065] 在一些实施方式中,所述与局部缺血相关的状况为中风。在本文中所用的中风为脑的一部分(或全部)供血减少所引起的脑局部缺血。中风产生的症状可能是突发性的(如意识丧失)或可在几小时或几天内逐步发作。此外,所述中风可能是严重的缺血性侵袭(完全中风)或除此之外更加轻微的、短暂的缺血性侵袭。中风产生的症状可包括,例如,轻偏瘫(hemiparesis)、半身不遂、单侧麻木、单侧虚弱、单侧瘫痪、暂时四肢无力、四肢发麻、神志不清、说话困难、理解话语困难、单眼或双眼视力困难、视觉模糊、视觉丧失、行走困难、头晕、易跌倒、丧失协调性、突发剧烈头痛、呼吸噪音和/或意识丧失。或者(或加之),所述症状可更易于或仅能通过检测和/或仪器被查出,例如,缺血性血液测试(例如,测试变化的白蛋白,特别是蛋白质异构体、受损的蛋白质等)、心电图、脑电图、运动负荷测试、脑CT或MRI扫描,等等。

[0066] 酸碱平衡对于生物系统来说是很重要的。正常的脑功能依赖于葡萄糖的完全氧化,生成最终产物CO₂和H₂O以供其能量需求。局部缺血期间,由于缺乏供氧而引发的无氧糖酵解的增加导致了乳酸蓄积。乳酸的蓄积,伴随着自ATP水解的H⁺释放的增加,导致了组织的pH的下降。细胞外的pH(pH_o)在局部缺血期间通常会降至6.5,且其在严重局部缺血期间或血糖过多的状况下可降至6.0之下。

[0067] 神经损伤的受治者

[0068] 本申请的方法和药物组合物可被用于存在神经损伤或神经损伤历史和/或在治疗开始后及治疗仍旧起效的一段时期存在发展中的神经损伤的显著变化的任何的受治者。在一些实施方式中,所述受治者为局部缺血的受治者。在本文中所用的局部缺血的受治者为存在局部缺血、与局部缺血相关的状况、局部缺血历史和/或在治疗开始后及治疗仍旧起效的一段时期存在发展中的局部缺血的显著变化的任何人(人类受治者)或动物(动物受治者)。

[0069] 所述受治者可以是动物。如在本文中所用的,术语“动物”是指除人类之外的任何的动物。示例性的可能适宜的动物包括具有血流的任何的动物,如啮齿动物(小鼠、大鼠等)、犬、猫、鸟、绵羊、山羊、除人类之外的灵长类等。所述动物可因其自身的缘故被治疗,例如,兽医的目的(如宠物的治疗)。或者,所述动物可提供神经损伤(如局部缺血)的动物模型,以便于测试供人类使用的候选药物,如以确定候选物的效力、功效窗口、副反应等。

[0070] 可以任何适当的标准选择供治疗的局部缺血的受治者。示例性的标准可包括局部缺血的任何的可检测的症状、局部缺血历史、增加局部缺血风险(或诱导局部缺血)的事件(如外科手术、外伤、服用药物等)等。局部缺血历史可包括一次或多次既往的局部缺血的发作。在一些实施例,选择以供治疗的受治者可能会存在治疗开始前的至少约一、二或三小时出现的局部缺血的发病,或治疗开始前的不到约一天、十二小时或六小时出现的多次局部缺血的发作(如短暂的缺血性侵袭)。

[0071] ASIC抑制剂、阿米洛利和阿米洛利类似物

[0072] ASIC家族成员的抑制剂,如在本文中所用的,为降低(部分地、大体上或完全阻滞)所述ASIC家族的一个或多个成员(除了别的以外,即ASIC1a、ASIC1b、ASIC2a、ASIC2b、ASIC3和ASIC4)的活性的物质。在一些实施例,所述抑制剂可降低一个或多个成员的通道活性,如所述成员使离子(除了别的以外,例如,钠、钙和/或钾离子)流动而透过细胞膜(进入和/

或离开细胞)的能力。其中,所述物质可以是化合物(小于约10kDa的小分子、肽、核酸、脂质等)、两种以上的化合物的复合物,和/或混合物。另外,所述物质可通过任何适当的机制来抑制ASIC家族成员,除了别的以外,其包括竞争性、非竞争性、无竞争性和/或混合的抑制作用。

[0073] 所述抑制剂可以是抑制酸敏感离子通道1a(ASIC1a)的ASIC1a抑制剂。ASIC1a,如在本文中所用的,是指来自任何物种的ASIC1a蛋白或通道。例如,在Waldmann, R., et al. 1997, Nature 386, pp. 173-177中描述了示例性的人类ASIC1a蛋白/通道,其以引用的方式并入本申请中。

[0074] 表述“ASIC1a抑制剂”可指的是在合理的药理学判断范围内,潜在的或实际的在药理学上用作ASIC1a的抑制剂,并包含含有药理学活性剂并作为ASIC1a抑制剂而被描述、宣传或认可的参考物质的产品。

[0075] ASIC1a抑制剂可以是在ASIC家族内有选择性的。如在本文中所用的,ASIC1a的选择性抑制作用为在各自接触同样(次最大)浓度的抑制剂之后进行比较时(例如在培养细胞中),对于ASIC1a比对于另外的ASIC家族成员明显更强的抑制作用。所述抑制剂可相对于至少一种另外的ASIC家族成员(ASIC1b、ASIC2a、ASIC2b、ASIC3、ASIC 4等)选择性地和/或相对于所有另外的ASIC家族成员选择性地抑制ASIC1a。选择性抑制剂的抑制作用的强度可通过相对于不同的ASIC家族成员,抑制作用发生时的抑制剂的浓度(例如,IC₅₀(产生最大抑制作用的50%的抑制剂的浓度)或K_i值(抑制常数或解离常数))来描述。ASIC1a选择性抑制剂可在低于用以抑制至少一种另外的或所有另外的ASIC家族成员的至少约二倍、四倍或十倍(浓度的二分之一、四分之一或十分之一或更低)的浓度下抑制ASIC1a活性。因此,ASIC1a选择性抑制剂可具有低于用以抑制至少一种另外的ASIC家族成员和/或用以抑制所有另外的ASIC家族成员的至少约二倍、四倍或十倍(二分之一、四分之一或十分之一或更低)的用以抑制ASIC1a的IC₅₀和/或K_i。

[0076] 除了存在选择性之外,ASIC1a选择性抑制剂还可以是对ASIC1a特异性的。如在本文中所用的,ASIC1a特异性抑制作用为相对于所有另外的ASIC家族成员(如ASIC2a和ASIC3a),大体上专属于ASIC1a的抑制作用。ASIC1a特异性抑制剂可在低于用以抑制所有另外的ASIC家族成员的至少约二十倍(浓度的5%以下)的抑制剂浓度下抑制ASIC1a。因此,ASIC1a特异性抑制剂可具有相对于所有另外的ASIC家族成员低至少约二十倍(百分之五以下)的针对ASIC1a的IC₅₀和/或K_i,以致于,例如,另外的ASIC家族成员的抑制作用至少大体上(或完全)检测不到。在一些实施方式中,相比于市售可用的阿米洛利相关的ASIC1a抑制剂,如阿米洛利、苯扎米尔、非那米尔、5-(N-乙基-N-异丁基)-阿米洛利(EIPA)、苄普地尔、KB-R7943、5-(N-甲基-N-异丁基)阿米洛利、5-(N,N-六亚甲基)阿米洛利和5-(N,N-二甲基)阿米洛利盐酸盐,所述ASIC1a选择性抑制剂具有对于同源的ASIC1a通道的更强的效力,以及更高的水溶性。

[0077] 可以使用任何适宜的ASIC抑制剂或抑制剂的组合。例如,可用ASIC1a选择性抑制剂和非选择性ASIC抑制剂,或用ASIC1a选择性抑制剂和对于非ASIC通道蛋白(如非ASIC的钙通道)的抑制剂来治疗受治者。在一些实施例中,可用ASIC1a选择性抑制剂和NMDA受体的抑制剂(如谷氨酸拮抗剂)来治疗受治者。

[0078] 所述抑制剂可以是肽或包含肽。所述肽可具有任意适宜数量的氨基酸亚单位,通

常为至少约十个至低于约一千个亚单位。在一些实施例中,所述肽可具有胱氨酸结模体(cystine knot motif)。胱氨酸结,如本文中所用的,通常包含六个以上的胱氨酸的排列。含有这些胱氨酸的肽可产生“结(knot)”,所述“结”包括(1)由两个双硫键和他们连接的主链部分形成的环,以及(2)穿过所述环的第三双硫键。在一些实施例中,所述肽可以是来自蛛形纲动物(arachnid)和/或芋螺(cone snail)物种的芋螺毒素(conotoxin)。例如,所述肽可以是PcTx1(psalmotoxin 1),来自狼蛛(tarantula)(千里达老虎尾蜘蛛(Psalmopoeus cambridgei(Pc)))的毒素。

[0079] 在一些实施例中,所述肽可在结构上与PcTx1相关,从而所述肽与PcTx1因一个或多个氨基酸的至少一个缺失、嵌入和/或替换而不同。例如,所述肽可具有至少约25%或至少约50%的序列一致性,以及与PcTx1的至少约25%或至少约50%的序列相似性(见下文)。可能适于作为抑制剂的肽的进一步的特征将在以下实施例3中描述。

[0080] 供一致性和相似性评分的比较和产生的氨基酸序列的对齐方法是本领域公知的。示例性的可能适宜的对齐方法包括:Smith&Waterman对齐方法(Best Fit)、Needleman&Wunsch同源性比对算法(GAP)、Pearson&Lipman相似性法(Tfasta和Fasta),等等。可能适宜的这些和其它的方法的计算机算法包括但不限于:CLUSTAL、GAP、BESTFIT、BLASTP、FASTA和TFASTA。

[0081] 如在本文中所用的,两个肽在上下文中的“序列一致性”或“一致性”涉及当以最大限度的对应性来对齐时,对应的相同的肽序列中的残基的百分比。在一些实施例中,不相同的肽残基位置可通过保守性氨基酸替换而不同,其中氨基酸残基被替换为具有类似的化学性质(例如,电荷和疏水性)的其它的氨基酸残基,因而预期对分子的功能特性产生较小的(或不产生)影响。其中序列在保守性替换方面不同,可将序列一致性百分比向上调,而产生序列的“相似性”,这会校正所述替换的保守性。例如,各个保守性替换可被评分为部分而非全部的错配,因而校正了所述序列一致性百分比以提供相似性评分。评分保守性替换以获得相似性评分是本领域公知的,且可通过任何适宜的方法,例如,根据Meyers and Miller, Computer Applic. Biol. Sci., 4:11-17(1988)的算法(例如,在程序PC/GENE(Intelligenetics, Mountain View, Calif., USA)中执行时)来计算。

[0082] 阿米洛利(含胍基团的吡嗪衍生物)已被用于轻微高血压的治疗,其很少报道有副作用。阿米洛利通过直接阻滞上皮钠通道(ENaC)起效,因而抑制肾的最近的远曲小管、连接小管和集合管中的钠的再吸收。这促进了钠和水从身体的流失,但不会消耗钾。如在本文中所用的,术语“阿米洛利”是指阿米洛利和阿米洛利的盐,如阿米洛利盐酸盐。

[0083] 阿米洛利类似物,如在本文中所用的,是指具有与阿米洛利类似的生物活性但存在稍有变化的化学结构的化合物。阿米洛利类似物的实例包括但不限于苯扎米尔、非那米尔、5-(N-乙基-N-异丁基)-阿米洛利(EIPA)、苄普地尔、KB-R7943、5-(N-甲基-N-异丁基)阿米洛利、5-(N,N-六亚甲基)阿米洛利和5-(N,N-二甲基)阿米洛利盐酸盐。其它的实例包括:在C₅-NH₂位置处和/或在胍基上(如图21所示)具有疏水性取代基的阿米洛利类似物,以及苯扎米尔的甲基化类似物、含有形成于胍基团上的环的阿米洛利类似物、含有酰胍基的阿米洛利类似物和含有形成于胍基团上的水增溶性基团的阿米洛利类似物,其中所述水增溶性基团为N,N-二甲基氨基或糖基。在一些实施方式中,所述阿米洛利类似物并不阻滞人类的Na⁺/Ca²⁺离子交换器。在另外的实施方式中,所述阿米洛利类似物为Na⁺/Ca²⁺离子交换

器的弱抑制剂,并帮助维持较低水平的细胞内 Ca^{2+} 。在另外的实施方式中,所述阿米洛利类似物为 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 离子交换器的非常弱的抑制剂,具有1.1mM以下的 IC_{50} 。在一些另外的实施方式中,所述阿米洛利类似物并不阻滞ASIC2a和/或ASIC3通道。在一些实施方式中,所述阿米洛利类似物具有比ASIC3通道和/或ASIC2通道更高的针对ASIC1a的选择性。

[0084] 如在本文中所用的,术语“阿米洛利类似物”是指阿米洛利类似物和阿米洛利类似物的盐,如5-(N,N-二甲基)阿米洛利盐酸盐。

[0085] 在一些实施方式中,阿米洛利和/或阿米洛利类似物与其它的ASIC抑制剂,如PcTx1及其衍生物结合使用。

[0086] 抑制剂的给药

[0087] 给药(或施用),如在本文中所用的,包括以任何适宜的次数,在任何适宜的条件下,受治者接触抑制剂的任何的路径。给药可以是自主给药或通过他人,如医疗人员(例如,医生、护士等)给药。给药可通过注射(除了别的以外,例如,静脉、肌肉、皮下、脑内、侧脑室、硬膜外和/或鞘内)、口服(例如,采用胶囊、锭剂、流体组分等)、吸入(例如,鼻内和/或口内吸入的气雾剂(小于约10微米的平均液滴直径))、经皮肤(例如,采用皮肤贴剂)和/或粘膜(除了别的以外,例如,经过口腔、鼻腔和/或肺粘膜)吸收等进行。粘膜给药可以,例如,利用喷剂(如鼻喷剂)、吸入的气雾剂等来实现。喷剂可以是表面喷剂(液滴平均直径大于约50微米)和/或空间喷剂(液滴平均直径为约10-50微米)。在一些实施例中,局部缺血可使局部缺血受治者的血脑障壁产生变化,由此提高了功效,导入(例如,通过注射和/或吸收)受治者血流的抑制剂借此可抵达脑部。给药可进行一次或多次,并可以与局部缺血诊断有关的任何适宜的次数进行,以提供治疗。因此,给药可在局部缺血被发现之前(例如,预防性地)、轻微的局部缺血发作之后、慢性局部缺血期间、完全中风之后等进行。在一些实施方式中,阿米洛利或阿米洛利类似物通过静脉给药。在另外的实施方式中,阿米洛利或阿米洛利类似物通过脑内给药。在另外的实施方式中,阿米洛利或阿米洛利类似物通过侧脑室给药。在另外的实施方式中,阿米洛利或阿米洛利类似物通过肌肉给药。在另外的实施方式中,阿米洛利或阿米洛利类似物通过鞘内给药。

[0088] 可施用治疗有效量(或简称“有效量”)的抑制剂。抑制剂的治疗有效量或有效量,如在本文中所用的,为当向受治者给药时,在大量的受治者中降低了受治者的局部缺血导致的损伤的程度、发生率和/或范围的所述抑制剂的任意的量。因此,治疗有效量可在,例如,将各种量的所述抑制剂给药至测试的受治者的临床研究中确定(并且,通常会与对照组的受治者相比较)。抑制剂的治疗有效量可通过一次注射或以0.1-50mL每针的体积的多次注射来给药。

[0089] 在一些实施方式中,所述抑制剂为阿米洛利、阿米洛利类似物或它们的盐,并以以下范围内的一日量(作为单次剂量或多次剂量)给药:0.01-30mg/kg体重、0.01-10mg/kg体重、0.01-3mg/kg体重、0.01-1mg/kg体重、0.01-0.3mg/kg体重、0.01-0.1mg/kg体重、0.01-0.03mg/kg体重、0.03-30mg/kg体重、0.03-10mg/kg体重、0.03-3mg/kg体重、0.03-1mg/kg体重、0.03-0.3mg/kg体重、0.03-0.1mg/kg体重、0.1-30mg/kg体重、0.1-10mg/kg体重、0.1-3mg/kg体重、0.1-1mg/kg体重、0.1-0.3mg/kg体重、0.3-30mg/kg体重、0.3-10mg/kg体重、0.3-3mg/kg体重、0.3-1mg/kg体重、1-30mg/kg体重、1-10mg/kg体重、1-3mg/kg体重、3-30mg/kg体重、3-10mg/kg体重或10-30mg/kg体重。在一个实施方式中,所述阿米洛利类似物

选自苯扎米爾、非那米爾、EIPA、苄普地爾、KB-R7943、5-(N-甲基-N-異丁基)阿米洛利、5-(N,N-六亞甲基)阿米洛利和5-(N,N-二甲基)阿米洛利鹽酸鹽。在另外的實施方式中,所述阿米洛利類似物具有在C₅-NH₂位置處和/或在胍基上的疏水性取代基。在另外的實施方式中,所述阿米洛利類似物选自以下組中的阿米洛利類似物:苯扎米爾的甲基化類似物、含有形成于胍基團上的環的阿米洛利類似物、含有酰胍基的阿米洛利類似物和含有形成于胍基團上的水增溶性基團的阿米洛利類似物,其中所述水增溶性基團為N,N-二甲基氨基或糖基。

[0090] 在另外的實施方式中,所述抑制劑為阿米洛利、阿米洛利類似物或它們的鹽,並作為配制為以下範圍內的單次劑量的藥物組合物給藥:0.1-1000mg/劑、0.1-300mg/劑、0.1-100mg/劑、0.1-30mg/劑、0.1-10mg/劑、0.1-3mg/劑、0.1-1mg/劑、0.1-0.3mg/劑、0.3-1000mg/劑、0.3-300mg/劑、0.3-100mg/劑、0.3-30mg/劑、0.3-10mg/劑、0.3-3mg/劑、0.3-1mg/劑、1-1000mg/劑、1-300mg/劑、1-100mg/劑、1-30mg/劑、1-10mg/劑、1-3mg/劑、3-1000mg/劑、3-300mg/劑、3-100mg/劑、3-30mg/劑、3-10mg/劑、10-1000mg/劑、10-300mg/劑、10-100mg/劑、10-30mg/劑、30-1000mg/劑、30-300mg/劑、30-100mg/劑、100-1000mg/劑、100-300mg/劑或300-1000mg/劑。在一個實施方式中,所述阿米洛利類似物选自苯扎米爾、非那米爾、EIPA、苄普地爾、KB-R7943、5-(N-甲基-N-異丁基)阿米洛利、5-(N,N-六亞甲基)阿米洛利和5-(N,N-二甲基)阿米洛利鹽酸鹽。在另外的實施方式中,所述阿米洛利類似物具有在C₅-NH₂位置處和/或在胍基上的疏水性取代基。在另外的實施方式中,所述阿米洛利類似物选自以下組中的阿米洛利類似物:苯扎米爾的甲基化類似物、含有形成于胍基團上的環的阿米洛利類似物、含有酰胍基的阿米洛利類似物和含有形成于胍基團上的水增溶性基團的阿米洛利類似物,其中所述水增溶性基團為N,N-二甲基氨基或糖基。在一些實施方式中,配制所述藥物組合物以用於靜脈注射、腦內注射、側腦室注射、鞘內注射或肌肉注射。

[0091] 所述抑制劑可以任意適宜的形式和以任意適宜的組合物被給藥至受治者。在一些實施例中,所述抑制劑可被配制為藥學上可接受的鹽。可配制所述組合物以包括,例如,液體載體/溶劑(媒介)、防腐劑、一種或多種賦形劑、着色劑、調味劑、鹽、消泡劑等。所述抑制劑可在媒介中以在給藥至局部缺血的受治者時提供用於治療局部缺血的治療有效量的所述抑制劑的濃度而存在。

[0092] 在一些實施方式中,制得了具有更高水溶性或脂溶性的阿米洛利類似物。在某些實施方式中,所述阿米洛利類似物在胍基處包含水增溶性基團(如N,N-二甲基氨基或糖基)以改善水溶性(式13-16,圖24)。在一些實施方式中,所述阿米洛利類似物具有5mM、10mM、20mM、30mM、40mM、50mM、60mM、70mM、80mM、90mM、100mM或更高的水溶性。在另外的實施方式中,所述阿米洛利類似物具有允許在單次10mL注射液將10mg、25mg、50mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg或500mg的劑量靜脈給藥至人體的溶解度。在再另外的實施方式中,所述阿米洛利類似物具有允許在單次2mL注射液將10mg、25mg、50mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg或500mg的劑量通過側腦室給藥至人體的溶解度。

[0093] 阿米洛利類似物的合成與篩選

[0094] 本申請的另一個方面涉及新的阿米洛利類似物的合成與篩選。阿米洛利類似物的合成路線是基于所需的類似物結構而設計的。之后篩選新合成的阿米洛利類似物對於ASIC家族成員(如ASIC1a和ASIC2a)的抑制效果。可獲得一種或多種ASIC抑制劑,特別是如上所

述的ASIC1a抑制剂。可以任意适宜的方式获得所述抑制剂,其中,如通过筛选一组候选抑制剂(例如,两个以上化合物的库)和/或通过的合理设计。

[0095] 筛选可包括任意适宜的测定ASIC蛋白与所述组的候选抑制剂之间的相互作用的检测系统。其中,示例性的检测系统可包括利用培养基中生长的细胞(“培养的细胞”)和/或利用有机体的生化测定(例如,结合法(binding assay))。

[0096] 在一些实施方式中,基于细胞的测定系统被用于测定在细胞中各个候选抑制剂对离子流(例如,酸敏感离子流)的效果。在一些实施方式中,所述离子流为钙和/或钠的流。在一些实施方式中,所述测定系统采用表达ASIC家族成员(如ASIC1a或ASIC2a)的细胞或表达两种以上的不同的ASIC家族成员(如ASIC1a和另外的ASIC家族成员)的两种以上的不同组的细胞,以确定各个抑制剂对此家族成员的选择性。所述细胞可内源性地或通过引入外来的核酸来表达各个ASIC家族成员。在一些实施例中,除了别的以外,所述测定系统可利用离子敏感或膜电势敏感染料(例如,钙敏感染料,如Fura-2),或凭借对膜电势和/或细胞内离子(例如,钙)浓度的变化敏感的基于基因的报告系统,来电生理学地测定离子流(如通过膜片钳)。所述测定系统可被用于测试候选抑制剂对ASIC家族成员(尤其是ASIC1a)的选择性和/或特异性抑制作用。

[0097] 可向具有神经损伤的受治者(如局部缺血的受治者)施用一种或多种ASIC抑制剂,以测试用于治疗神经损伤的所述抑制剂的效力。所述局部缺血的受治者可以是人或动物。在一些实施例中,所述局部缺血的受治者可提供局部缺血和/或中风的动物模型系统。示例性的动物模型系统包括具有实验引发的局部缺血的啮齿动物(除了别的以外,小鼠和/或大鼠)。除了别的以外,所述局部缺血可以是机械性(例如,外科手术)和/或通过药物的给药而引发的。在一些实施例中,所述局部缺血可由血管阻塞,如由大脑中动脉阻塞而引发。

[0098] 本申请的另一个方面涉及用于减轻神经系统损伤的药物组合物。所述药物组合物包含有效量的阿米洛利、阿米洛利类似物或它们的药学上可接受的盐;以及药学上可接受的载体,其中将所述药物组合物配制为用于静脉、鞘内或侧脑室注射。

[0099] 在一些实施方式中,所述药物组合物包含阿米洛利类似物或其药学上可接受的盐,其中所述阿米洛利类似物选自苯扎米利、非那米利、EIPA、苄普地尔、KB-R7943、5-(N-甲基-N-异丁基)阿米洛利、5-(N,N-六亚甲基)阿米洛利和5-(N,N-二甲基)阿米洛利盐酸盐。

[0100] 在另外的实施方式中,所述药物组合物包含阿米洛利类似物或其药学上可接受的盐,其中所述阿米洛利类似物选自苯扎米利的甲基化类似物、含有形成于胍基团上的环的阿米洛利类似物、含有酰胍基的阿米洛利类似物和含有形成于胍基团上的水增溶性基团的阿米洛利类似物,其中所述水增溶性基团为N,N-二甲基氨基或糖基。

[0101] 在另外的实施方式中,所述药物组合物进一步包含一种或多种其它的ASIC抑制剂。在一个实施方式中,所述一种或多种其它的ASIC抑制剂包括PcTx1或PcTx1衍生物。

[0102] 本申请的另一个方面涉及一种用于减轻神经系统损伤的药物组合物。所述药物组合物包含有效量的阿米洛利类似物或其药学上可接受的盐;以及药学上可接受的载体。

[0103] 在一些实施方式中,将所述药物组合物配制为用于静脉、鞘内、侧脑室或肌肉注射。

[0104] 在一个实施方式中,所述阿米洛利类似物为苯扎米利的甲基化类似物。在另一个实施方式中,所述阿米洛利类似物包含形成于胍基团上的环。在另一个实施方式中,所述阿

米洛利类似物包含酰胍基。在再一个实施方式中,所述阿米洛利类似物包含形成于胍基团上的水增溶性基团,其中所述水增溶性基团为N,N-二甲基氨基或糖基。

[0105] 在另外的实施方式中,所述药物组合物进一步包含一种或多种其它的ASIC抑制剂。在一个实施方式中,所述一种或多种其它的ASIC抑制剂包括PcTx1或PcTx1衍生物。

[0106] 如在本文中所述的,“药学上可接受的载体”包括任意和全部的溶剂、分散介质、包膜、抗菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂、甜味剂等。所述药学上可接受的载体可由广泛的材料来制备,所述材料包括但不限于:调味剂,甜味剂,以及其它的材料,如为了制备特定的治疗组合物而可能会需要的缓冲剂和吸收剂。这些具有药学活性物质的介质和药剂的使用是本领域公知的。除了任何常规介质或药剂与活性组分不相容之外,其在所述治疗组合物中的用途是可预期的。可选地,可将阿米洛利和/或阿米洛利类似物混合于包含不与所述阿米洛利和/或阿米洛利类似物相忌的补充活性组分的药物组合物中。

[0107] 在一些实施方式中,将所述药物组合物配制为用于静脉注射。在另外的实施方式中,所述药物组合物包含配制为用于静脉注射的阿米洛利和/或阿米洛利类似物。在另外的实施方式中,所述药物组合物包含配制为用于侧脑室注射的阿米洛利和/或阿米洛利类似物。在另外的实施方式中,所述药物组合物包含配制为用于鞘内注射的阿米洛利和/或阿米洛利类似物。在另外的实施方式中,所述药物组合物包含配制为用于肌肉注射的阿米洛利和/或阿米洛利类似物。适于注射用途的药物组合物包括无菌水溶液(水溶性的情况下)或分散液及供无菌注射用溶液或分散液的临时配制的无菌粉剂。对于静脉给药,适宜的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™(BASF, Parsippany, NJ)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有的情况下,注射用组合物为无菌的,且为达到易于以注射液存在的程度的液体。所述注射用组合物在制造和储存的条件下必须是稳定的,且必须防微生物(如细菌和真菌)的污染行为而保留下来。所述载体可以是含有,例如,水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇及液态聚乙二醇等)和它们的适宜的混合物的溶液或分散介质。例如,通过包膜(如卵磷脂)的使用,在分散液的情况下通过维持所需的粒度,以及通过表面活性剂的使用,可保持适当的流动性。可通过各种抗菌剂和抗真菌剂(例如,对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、酚、抗坏血酸、硫柳汞等)来实现对微生物作用的防范。在许多情况下,优选在所述组合物中包含等渗剂,例如,糖类、多元醇(如甘露醇、山梨醇)、氯化钠。所述注射用组合物的持久吸收可通过在所述组合物中包含延迟吸收的药剂,例如,单硬脂酸铝和明胶而实现。

[0108] 无菌注射溶液可通过将所需量的阿米洛利和/或阿米洛利类似物混入适当的溶剂中,然后过滤灭菌来制备。通常地,分散液通过将活性化合物混入含有基本的分散介质和所需的以上所列举的那些其它成分的无菌载体来制备。在供无菌注射溶液的制备的无菌粉剂的情况下,优选的制备方法为真空干燥和冷冻干燥,其由之前的无菌过滤溶液生成活性组分加任意额外的所需组分的粉剂。

[0109] 在一些实施方式中,所述药物组合物以干燥的形式被提供,并被配制为片剂或胶囊的形式。可根据常规工序采用本领域公知的固态载体来配制片剂。本发明中使用的硬和软胶囊可由任何药学上可接受的材料,如明胶或纤维素衍生物来制备。

[0110] 在某些实施方式中,将所述药物组合物配制为即刻释放、缓释、延迟释放或它们的组合。缓释,又称持久释放、延时释放或长效释放、控释(CR)、改良释放(MR)或者持续释放(CR或Contin),是用于医用片剂或胶囊以缓慢溶解并随着时间的推移释放所述活性组分的

机制。持久释放的片剂或胶囊的优点在于其通常可比同样药物的立刻释放的剂型吸收少,以及在于其保持了药物在血流中更稳定的水平,因而延长了药物活性的持续时间。

[0111] 在一个实施方式中,通过在不溶物(如丙烯酸类或甲壳素)的基质中包埋所述活性组分来将所述药物组合物配制为用于缓释。设计缓释形式以通过维持恒定的药物水平特定的时间段而在预定的速率下释放活性成分。这可通过多种剂型而实现,包括但不限于脂质体及药物-聚合物的结合物,如水凝胶。

[0112] 在另一个实施方式中,将所述药物组合物配制为用于延迟释放,从而使得所述活性组分在给药时并不立即释放。延迟释放载体的非限定性实例为在肠中而非胃中溶解的肠溶衣口服药物。

[0113] 在另外的实施方式中,将所述药物组合物配制为一部分所述活性组分即刻释放,剩余活性组分随后缓释。在一个实施方式中,所述药物组合物被配制为可被服用以使所述活性组分快速释放的粉剂。在另一个实施方式中,所述药物组合物被配制为液体、胶体、液态的悬浮液或乳剂的形式。所述液体、胶体、悬浮液或乳剂可以裸剂的形式或包含于胶囊中而被受治者服下。

[0114] 在再一个实施方式中,所述药物组合物可被提供为皮肤或透皮贴剂以控制和/或持久地局部施用所述活性组分。

[0115] 实施例

[0116] 以下实施例描述了本发明选择的方面和实施方式,尤其是描述了ASIC抑制作用的体外和体内效果的数据,以及示例性的用作抑制剂的胱氨酸结肽。这些实施例用于说明的目的,而不应当被理解为限定本发明的范围。

[0117] 实施例1:通过阻塞可渗透钙的酸敏感离子通道的局部缺血的神经保护

[0118] 参见图2-10,此实施例描述了显示ASIC1a在调解局部缺血性损伤中的作用以及ASIC1a抑制剂减轻局部缺血性损伤的能力的实验。 Ca^{2+} 毒性在局部缺血性脑损伤中扮演了关键性的角色。由于谷氨酸拮抗剂的大量人体试验显示在中风中不能有效的保护神经,在局部缺血的脑部中发生细胞的毒性 Ca^{2+} 负载的机理变得尚不明朗。酸中毒是局部缺血的常见特征,并在脑损伤中扮演了关键性的角色。此实施例证实:酸中毒激活了可导致与谷氨酸受体无关的、与 Ca^{2+} 有关的神经元损伤的可渗透 Ca^{2+} 的酸敏感离子通道(ASIC)。因此,缺乏内源性的ASIC的细胞可抵御酸的损害,而可渗透 Ca^{2+} 的ASIC1a的转染则可建立敏感性。在局灶性缺血中,侧脑室注射ASIC1a阻滞剂或敲除ASIC1a基因可保护大脑免遭局部缺血性损伤,并可比谷氨酸拮抗作用产生更大的效力。

[0119] 正常的大脑需要葡萄糖的完全氧化以满足其能量需求。在局部缺血期间,氧气耗尽迫使大脑切换到无氧糖酵解。作为糖酵解的副产物的乳酸与ATP水解产生的质子的积累会导致局部缺血的大脑中的pH的下降并加剧局部缺血性脑损伤。

[0120] 酸敏感离子通道(ASIC)为一类在哺乳动物中枢和周围神经系统的各处神经元表达的配体门控通道。迄今为止,已克隆了六种ASIC亚单位。这些亚单位中的四种形成由酸性pH激活的功能性的同源多聚(homomultimeric)通道,以传导钠选择性的、阿米洛利敏感的阳离子电流。所述ASIC亚单位中的两种(ASIC1a和ASIC2a亚单位)已被证明富含于大脑中。

[0121] 实验过程

[0122] 神经元的培养

[0123] 氟烷麻醉之后,从E16瑞士小鼠(Swiss mice)或PIASIC1^{+/+}和ASIC1^{-/-}小鼠身上解剖出大脑皮层,并在37℃下用0.05%的胰蛋白酶-EDTA孵育10分钟。然后用火焰抛光的玻璃吸管将组织捣碎,以 2×10^5 细胞/孔或 10^6 细胞/盖玻片的密度放置于聚-L-鸟氨酸涂覆的24孔培养板或25×25mm玻璃盖玻片上。神经元用补充了10%马血清的MEM(用于E16的培养)或补充了B27的神经基质培养基(Neurobasal medium)(用于P1的培养)来培养,并在12天之后用作电生理学和毒性的研究。通过添加5-氟-2-脱氧尿苷和尿苷来抑制神经胶质的生长,制得了含90%神经元(由NeuN和GFAP染色法(数据未显示)所测定)的培养细胞。

[0124] 电生理学

[0125] ASIC的电流用全细胞膜片钳(whole-cell patch-clamp)和快速灌注技术(fast-perfusion technique)来记录。正常的细胞外溶液(ECF)包含(单位mM):140NaCl、5.4KCl、25HEPES、20葡萄糖、1.3CaCl₂、1.0MgCl₂、0.0005TTX(pH 7.4)、320-335mOsm。为生成低pH溶液,加入了各种不同量的HCl。对于pH<6.0的溶液,采用MES代替HEPES以更可靠地缓冲pH。贴片电极包含(单位mM):140CsF、2.0MgCl₂、1.0CaCl₂、10HEPES、11EGTA、4MgATP(pH 7.3)、300mOsm。无Na⁺的溶液由10mM CaCl₂、25mM HEPES组成,并以等渗的NMDG或蔗糖来替代NaCl(Chu et al., 2002)。利用多管灌注系统(SF-77B, Warner Instrument公司)以供溶液的快速交换。

[0126] 细胞损伤试验——LDH测定

[0127] 将细胞用ECF洗涤三次,随机分为治疗组。在所有组中加入MK801(10μM)、CNQX(20μM)和尼莫地平(nimodipine)(5μM)以消除谷氨酸受体和电压门控Ca²⁺通道的潜在的二次激活。之后是酸孵育,37℃下在神经基质培养基中洗涤和孵育神经元。利用LDH测定工具(Roche Molecular Biochemicals公司)在培养基中测定了LDH的释放。将介质(100μL)由培养孔转移至96孔培养板中,并与所述工具所提供的100μL的反应溶液混合。30分钟后,利用酶标仪(Spectra Max Plus, Molecular Devices公司)在492nm处测定了光密度。减去在620处的背景吸收。通过在各个实验的结尾用1%的Triton X-100的孵育15分钟,在各个孔中获得了最大释放的LDH。

[0128] Ca²⁺成像

[0129] 将在25×25mm玻璃盖玻片上生长的皮层神经元用ECF洗涤三次,并在22℃下用5μM的Fura-2乙酰氧基甲基酯孵育40分钟,洗涤三次,再在常规ECF中孵育30分钟。在倒置显微镜(Nikon TE300)上将盖玻片转移至灌注室中。用氙灯照亮细胞,并用40x UV的萤石油浸物镜观察,并利用冷却的CCD摄影机(Sensys KAF 1401, Photometrics公司)获得了影像。在Axon成像工作台软件(Axon Imaging Workbench software)(Axon Instruments公司)控制的PC中获得并分析了数字图像。通过所述软件控制快门和滤光轮(Lambda10-2)以使得细胞在340或380nm激发波长下定时发光。在510nm的辐射波长处检测到了Fura-2荧光反应。凭借视野内的细胞的限定区域中的平均像素比值分析了比率图像(340/380)。所述值被输出至SigmaPlot以供进一步的分析。

[0130] 荧光素二乙酸酯染色与碘化丙啶吸收

[0131] 细胞在含有荧光素二乙酸酯(FDA)(5μM)和碘化丙啶(PI)(2μM)的ECF中孵育30分钟,之后用不含染料的ECF洗涤。在配备有对于PI在580/630nm处激发/辐射和对于FDA在500/550nm处激发/辐射的外荧光的显微镜(Zeiss)上观察和计数存活(FDA阳性)和死亡(PI

阳性)的细胞。利用配备有BQ 8000sVGA图像采集卡的光电DEI-730摄像机收集图像,并用计算机软件(Bioquant, TN公司)来分析。

[0132] COS-7细胞的转染

[0133] 在含10%HS和1%PenStrep(GIBCO)的MEM中培养了COS-7细胞。在~50%的融合下,利用FuGENE6转染剂(Roche Molecular Biochemicals公司),采用在pc^{DNA3}载体中的用于ASIC与GFP的cDNA共转染了细胞。用于ASIC的DNA(0.75μg)和0.25μg的用于GFP的DNA被用于每个35mm培养皿中。选取GFP阳性的细胞以在转染后用膜片钳记录48小时。为稳定ASIC1a的转染,在所述转染一周后将500μg/mL的G418加入到培养基中。在G418的存在下,幸存的耐G418的细胞被进一步地培养并传递>5代(passage)。然后细胞用膜片钳和免疫荧光染色来检查,用于ASIC1a的表达。

[0134] 氧糖剥夺(Oxygen-Glucose Deprivation)

[0135] 35℃下在含85% N₂、10% H₂和5% CO₂的气体的厌氧室(Model 1025, Forma Scientific公司)中,在pH 7.4或6.0下神经元被不含葡萄糖的ECF洗涤三次及孵育。1小时后通过在常规的细胞培养孵育器中用神经基质培养基替换所述不含葡萄糖的ECF并孵育培养物而终止氧糖剥夺(OGD)。随着HEPES缓冲的ECF的使用,1小时的OGD使pH由7.38稍稍降低至7.28(n=3)和由6.0稍稍降低至5.96(n=4)。

[0136] 局灶性缺血

[0137] 通过使利用1.5%异氟烷、70% N₂O和28.5% O₂而麻醉的插管和通气的雄性大鼠(SD, 250-300g)和小鼠(具有同类系C57B16的背景, ~25g)的大脑中动脉的线栓(MCAO)而引发了短暂的局灶性缺血。用恒温控制的加热板和发热灯将直肠和颞肌的温度维持在37℃ ± 0.5℃。通过经颅激光多普勒来监测脑部血流。剔除血流未降低20%以下的动物。

[0138] 局部缺血24小时后用水合氯醛杀死动物。快速取出脑部,间隔1mm(小鼠)或2mm(大鼠)冠状切片,并通过浸入活体染料(2%)2,3,5-三苯基四氮唑盐酸盐(TTC)中来染色。通过从未局部缺血的半球的面积中减去局部缺血的半球中被TTC染色的正常区域来计算梗死面积。通过加和所有切片的梗死面积并乘以切片厚度来计算梗死体积。采用具有在后部至前囟0.8mm、侧边至中线1.5mm以及腹侧至硬脑膜3.8mm的立体定位下插入的导管的微量注射泵,通过立体定位技术进行了大鼠的脑室注射。所有的操作和分析均通过不知所属治疗组的个体来进行。

[0139] 结果

[0140] (a)酸中毒激活小鼠的皮层神经元的ASIC

[0141] 图3和4显示了关于培养小鼠的皮层神经元的ASIC的电生理学和药理学的示例性数据。图3A和3B为图示了通过pH由7.4降至所示的pH值而激活的ASIC电流的pH相关性的图表。剂量响应曲线符合具有 6.18 ± 0.06 的平均pH_{0.5}的Hill公式(n=10)。图3C和3D为图示了ASIC的电流-电压关系的图表(n=5)。使在各个电压下的ASIC电流的幅度向在-60mV下记录的标准化。图4A和4B为图示了阿米洛利所造成的ASIC电流的剂量依赖性阻滞的图表, IC₅₀ = $16.4 \pm 4.1 \mu\text{M}$, N=8。图4C和4D为图示了PcTX毒素所造成的ASIC电流的阻滞的图表, **p < 0.01。

[0142] 记录了培养小鼠的皮层神经元的ASIC电流(参见图3)。-60mV的维持电势下,在大多数的神经元中,细胞外的pH(pH_e)急速下降至低于7.0诱发了具有少量稳态成分的较大的

瞬态内向电流(图3)。内向电流的幅度随着pH_e的下降而以S形上升,生成了 6.18 ± 0.06 的pH_{0.5}($n=10$,图3B)。获得了线性I-V关系和接近于Na⁺平衡电势的逆转($n=6$,图3C和3D)。这些数据证实:降低pH_e可激活小鼠的皮层神经元中常见的ASIC。

[0143] 测试了阿米洛利,ASIC的非特异性阻滞剂,对酸激活电流的影响(参见图4)。如图4所示,阿米洛利剂量依赖性地阻滞了皮层神经元中的ASIC电流,IC₅₀为 $16.4 \pm 4.1 \mu\text{M}$ ($n=8$,图4A和4B)。图4C和4D中显示了PcTX毒素对皮层神经元中的酸激活电流的影响。在100ng/mL下,PcTX毒素可逆地阻滞了ASIC电流的 $47\% \pm 7\%$ 的峰值幅度($n=15$,图4C和4D),表明同源的ASIC1a对总的酸激活电流的显著贡献。在大多数的皮层神经元中,提高PcTX的浓度并不会导致ASIC电流的幅度的进一步的下降($n=8$,数据未显示),表明在这些神经元中共存有PcTX不敏感的ASIC(例如,异源的ASIC1a/2a)。

[0144] (b)通过模拟的局部缺血增强了ASIC响应

[0145] 图5显示了表明模拟的局部缺血可提高ASIC的活性的示例性数据。图5A为一系列显示了1小时的OGD之后ASIC电流的幅度的上升和去敏感作用的下降的示例性曲线。图5B为阐释了在OGD神经元中ASIC电流幅度的上升的概括性数据的图表, $N=40$ 和 44 , $*p<0.05$ 。图5C为一系列显示了在OGD神经元中的下降的ASIC电流去敏感作用的示例性曲线和概括性数据, $N=6$, $**p<0.01$ 。图5D为一系列显示了1小时的OGD之后,控制条件下在ASIC1^{-/-}神经元中在pH6.0缺乏酸激活电流的示例性曲线($n=12$ 和 13)。

[0146] 由于酸中毒可能是脑局部缺血的首要特征,决定测试ASIC是否可在局部缺血条件下被激活以及局部缺血是否可改变这些通道的特性,参见图5。记录1小时的氧糖剥夺(OGD)后神经元中的ASIC电流。简而言之,将一组培养物用不含葡萄糖的细胞外液(ECF)洗涤三次并接受OGD,同时使对照培养物接受含葡萄糖的ECF的洗涤并在常规的细胞培养孵育器中孵育。1小时后通过在所述常规的孵育器中用神经基质培养基替换不含葡萄糖的ECF并孵育培养物而终止OGD。然后当神经元不存在形态学上的变化时,在所述OGD之后1小时记录ASIC电流。OGD的治疗导致了ASIC电流的幅度的平缓上升(对照组中 $1520 \pm 138 \text{ pA}$, $N=44$;1小时OGD后的神经元中 $1886 \pm 185 \text{ pA}$, $N=40$, $p<0.05$,图5A和5B)。更重要的是,电流衰减的时间常数的增大表明,OGD导致了ASIC去敏感作用的突然降低(对照组中 $814.7 \pm 58.9 \text{ ms}$, $N=6$;OGD后的神经元中 $1928.9 \pm 315.7 \text{ ms}$, $N=6$, $p<0.01$,图5A和5C)。类似于之前在海马神经元中的研究(Wemmie et al.,2002),在来自ASIC1^{-/-}小鼠的培养皮层神经元中,pH由7.4降低至6.0并不会激活任何的内向电流($n=52$)。在这些神经元中,1小时的OGD并不会激活或增强酸引发的响应(图5D, $n=12$ 和 13)。

[0147] (c)酸中毒引发经由ASIC1a的与谷氨酸无关的Ca²⁺的进入

[0148] 图6和7显示了表明皮层神经元中的ASIC可以是可渗透的Ca²⁺,且Ca²⁺的渗透性可取决于ASIC1a的示例性数据。图6A显示了用含10mM Ca²⁺的无Na⁺的ECF作为仅有的电荷载体获得的示例性曲线。在pH6.0下记录了内向电流。校正液体接界电势($n=5$)之后的平均逆转电势为 $\sim -17 \text{ mV}$ 。图6B显示了阐释由阿米洛利和PcTX毒素造成的Ca²⁺介导的电流的阻滞的代表性曲线和概括性数据。Ca²⁺介导的电流的峰值幅度通过100 μM 阿米洛利($n=6$, $p<0.01$)降至对照组值的 $26\% \pm 2\%$ 以及通过100ng/mL PcTX毒素($n=5$, $p<0.01$)降至 $22\% \pm 0.9\%$ 。图7A显示了表明由pH降至6.0导致的[Ca²⁺]_i的上升的作为pH的函数的示例性的340/380nm比率。将神经元浸入具有用于电压门控Ca²⁺通道的阻滞剂(5 μM 尼莫地平和1 μM ω -芋螺毒素

MVIIC)和谷氨酸受体(10 μ M MK801和20 μ M CNQX)的含1.3mM CaCl_2 的常规ECF中。图7A的小图显示了示例性的100 μ M阿米洛利对 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的酸诱导上升的抑制。图7B显示了阐释相比于pH6.0组,阿米洛利和PcTX毒素对 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的酸诱导上升的抑制的示例性的概括性数据, $N=6-8$,** $p<0.01$ 。图7C显示了NMDA出现/缺席时作为pH的函数的示例性的340/380nm比率,证实ASIC1 $^{-/-}$ 神经元中缺乏 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的酸诱导上升;神经元具有对NMDA的正常响应($n=8$)。图7D显示了阐释在ASIC1 $^{-/-}$ 神经元中在pH6.0时缺乏酸激活电流的示例性曲线。

[0149] 利用标准离子置换方案(Jia et al., Neuron, 1996, 17:945-956)和Fura-2荧光反应的 Ca^{2+} 成像技术(Chu et al., 2002, J. Neurophysiol. 87:2555-2561)确定了皮层神经元中的ASIC的 Ca^{2+} 渗透性。利用含有10mM Ca^{2+} 的浴溶液(不含 Na^+ 和不含 K^+)作为仅有的电荷载体并在-60mV的维持电势下,我们记录下18个神经元中的15个的内向电流大于50pA,显示了大多数皮层神经元中的ASIC的显著的 Ca^{2+} 渗透性(图6A)。与同源ASIC1a通道的激活相一致,10mM Ca^{2+} 所承载的电流被非特异性ASIC阻滞剂阿米洛利和ASIC1a特异性阻滞剂PcTX毒素极大地阻滞(图6B)。 Ca^{2+} 介导的电流的峰值幅度通过100 μ M阿米洛利($n=6$, $p<0.01$)降至对照的 $26\% \pm 2\%$ 以及通过100ng/mL PcTX毒素($n=5$, $p<0.01$)降至 $22\% \pm 0.9\%$ 。在其它主要 Ca^{2+} 进入途径的阻滞剂(针对谷氨酸受体的MK801 10 μ M和CNQX 20 μ M;针对电压门控 Ca^{2+} 通道的尼莫地平5 μ M和 ω -芋螺毒素MVIIC 1 μ M)的存在下, Ca^{2+} 成像证实:20个神经元中的18个对pH下降作出了响应,其具有可检测到的细胞内 Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)的浓度的升高(图7A)。一般而言, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 残余会在低pH溶液的长期灌注期间升高。在一些细胞中, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高的持续时间甚至长于酸灌注的持续时间(图7A)。长期持续的 Ca^{2+} 响应表明在无损神经元中的ASIC响应可能会比在全细胞记录中更少地被去敏感,或表明经由ASIC的 Ca^{2+} 的进入可引发随后的自细胞内存储的 Ca^{2+} 释放。采用1 μ M毒胡萝卜内酯(thapsigargin)的神经元预孵育部分地抑制了 Ca^{2+} 升高的持久成分,表明自细胞内存储的 Ca^{2+} 释放也可促进酸诱导细胞内 Ca^{2+} 的累积($n=6$, 数据未显示)。类似于 Ca^{2+} 离子承载的电流(图6B), $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的峰值和持续升高被阿米洛利和PcTX毒素极大地抑制(图7A和7B, $n=6-8$),这与酸诱导 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的升高中同源ASIC1a的参与相一致。ASIC1基因的敲除在所有神经元中消除了酸诱导 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的升高而不会影响NMDA受体介导的 Ca^{2+} 响应(图7C, $n=8$)。膜片钳的记录证实了52个ASIC1 $^{-/-}$ 神经元中的52个在pH6.0处缺乏酸激活电流,这与ASIC1a亚单位的缺席相一致。然而,将pH降至5.0或4.0,在52个ASIC1 $^{-/-}$ 神经元中的24个中激活了可检测到的电流,表明这些神经元中ASIC1a亚单位的出现(图7D)。进一步的电生理学研究表明ASIC1 $^{-/-}$ 神经元具有对各种电压门控通道和NMDA、GABA受体门控通道的正常响应(数据未显示)。

[0150] (d)ASIC的阻滞保护了酸中毒引发的、与谷氨酸无关的神经元损伤

[0151] 图8显示了表明酸孵育可引发与谷氨酸受体无关的受ASIC的阻滞所保护的神经元损伤的示例性数据。图8A和8B显示了相比于相同时间点的pH7.4组(通过幸存神经元的细胞体染色和死亡神经元的核的碘化丙啶(PI)染色,还分析了用荧光素二乙酸酯(FDA)的酸诱导神经元损伤),通过皮层神经元在pH7.4(实心柱)或6.0(空心柱)的ECF中孵育1小时(图8A)或24小时(图8B)所引发的与时间相关的LDH释放的示例性数据的图表, $N=20-25$ 孔,* $p<0.05$,以及** $p<0.01$ 。图8C显示了阐释由100 μ M阿米洛利或100ng/mL PcTX毒素所造成的酸诱导LDH释放的抑制的图表($n=20-27$, * $p<0.05$, 以及** $p<0.01$)。对于所有的实验,在ECF中均存在MK801、CNQX和尼莫地平(图8A-C)。

[0152] 参见图8,研究了在pH7.4或6.0的含MK801、CNQX和尼莫地平(ECF)中孵育的24孔培养板上生长的神经元的酸诱导损伤。通过测定各个时间点的乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)的释放(Koh and Choi, J. Neurosci., 1987, 20:83-90)(图8A和8B)及通过幸存/死亡细胞的荧光染色测定了细胞损伤。相比于pH7.4下处理的神经元,1小时的酸孵育(pH6.0)引发了LDH释放的时间相关性增长(图8A)。24小时后,引发了最大LDH释放的 $45.7\% \pm 5.4\%$ ($n=25$ 孔)。pH6.0下的持续处理引发了更大的细胞损伤(图8B, $n=20$)。与LDH测定相一致,采用荧光素二乙酸酯和碘化丙啶的幸存/死亡染色显示出类似的由1小时酸处理造成的细胞死亡的增长(数据未显示)。采用pH6.5的ECF的1小时孵育同样引发了显著但比采用pH6.0的ECF更少的LDH释放($n=8$ 孔,数据未显示)。

[0153] 测试了阿米洛利和PcTX毒素对酸诱导LDH释放的影响,以确定ASIC的激活是否参与了酸诱导的、与谷氨酸受体无关的神经元损伤。在1小时的酸孵育之前的10分钟或期间加入 $100\mu\text{M}$ 阿米洛利或 100ng/mL PcTX毒素显著降低了LDH释放(图8C)。经过24小时,LDH释放由 $45.3\% \pm 3.8\%$ 被阿米洛利降至 $31.1\% \pm 2.5\%$ 以及被PcTX毒素降至 $27.9\% \pm 2.6\%$ ($n=20-27$, $p<0.01$)。尽管仅使用阿米洛利的持久孵育(例如,5小时)增加了LDH释放,但在pH7.4的ECF中添加阿米洛利或PcTX毒素后1小时并不会影响基线LDH释放($n=8$,数据未显示)。

[0154] (e)同源ASIC1a的激活是造成酸中毒引发的损伤的原因

[0155] 图9为一系列呈现出表明ASIC1a可能参与了体外的酸诱导损伤的示例性数据的图表。图9A显示了阐释通过降低 $[\text{Ca}^{2+}]_e$ 来抑制酸诱导LDH释放的示例性数据($n=11-12$, $**p<0.01$, 相比于pH 6.0, 1.3Ca^{2+})。图9B显示了阐释酸孵育引发了在ASIC1a转染的而非未转染的COS-7细胞中的LDH释放的增长的示例性数据($n=8-20$)。阿米洛利($100\mu\text{M}$)抑制了ASIC1a转染细胞中的酸诱导LDH释放(对于7.4比6.0和6.0比6.0+阿米洛利, $*p<0.05$)。图9C显示了阐释ASIC1^{-/-}神经元中酸诱导损伤的缺乏及凭借阿米洛利和PcTX毒素的保护的示例性数据(各组中 $n=8$, $p>0.05$)。图9D显示了阐释在OGD下培养的大脑皮层神经元中LDH释放的酸诱导增长的示例性数据($n=5$)。通过结合1小时OGD/酸中毒而引发的LDH释放并不会被水溶性维生素E(trolox)和左旋硝基精氨酸甲酯(L-NAME)所抑制($n=8-11$)。在ASIC1^{-/-}神经元中OGD并不会增强酸诱导的LDH释放(对于pH 7.4比pH 6.0, $**p<0.01$, 以及对于pH 6.0比6.0+PcTX毒素, $*p<0.05$)。对于所有的实验,在ECF中均存在MK801、CNQX和尼莫地平(图9A-D)。

[0156] 在常规或减少的 $[\text{Ca}^{2+}]_e$ 的存在下用pH 6.0的ECF处理神经元以确定 Ca^{2+} 的进入是否在酸诱导损伤中起了作用(参见图9)。如同用PcTX毒素阻滞ASIC1a, Ca^{2+} 由1.3降至0.2mM抑制了酸诱导的LDH释放(由 $40.0\% \pm 4.1\%$ 降至 $21.9\% \pm 2.5\%$) ($n=11-12$, $p<0.01$; 图9A)。未测试不含 Ca^{2+} 的溶液,因为 $[\text{Ca}^{2+}]_e$ 的完全移除可能会激发大的经由 Ca^{2+} 敏感阳离子通道的内向电流,这可在其它方面使得数据理解变得复杂。通过阿米洛利和PcTX(非特异性和特异性ASIC1a阻滞剂)或通过降低 $[\text{Ca}^{2+}]_e$ 而对酸损伤的抑制表明:可渗透 Ca^{2+} 的ASIC1a的激活可能参与了酸诱导神经元损伤。

[0157] 研究了未转染和ASIC1a转染的COS-7细胞的酸损伤,以提供ASIC1a的激活参与了酸损伤的另外的证据。COS-7为通常用于ASIC的表达的细胞系,这是因为其缺乏内源性的通道。融合后(铺板36-48小时后),用pH 7.4或6.0的ECF处理细胞1小时。酸孵育后24小时测定LDH释放。相比于pH7.4处理的细胞,用pH 6.0的ECF处理未转染的COS-7细胞并不会造成LDH释放的增长(对于pH 7.4, $10.3\% \pm 0.8\%$, 以及对于pH 6.0, $9.4\% \pm 0.7\%$, $N=19$ 和20孔; p

>0.05,图9B)。然而,在稳定转染ASIC1a的COS-7细胞中,pH 6.0下的1小时孵育使LDH释放由 $15.5\% \pm 2.4\%$ 显著增长至 $24.0\% \pm 2.9\%$ ($n=8$ 孔, $p<0.05$)。在这些细胞中,阿米洛利(100 μ M)的添加抑制了酸诱导的LDH释放(图9B)。

[0158] 同样研究了单独用编码GFP的cDNA或GFP加ASIC1a的cDNA瞬时转染的CHO细胞的酸损伤。所述转染之后(24-36小时),用酸性溶液(pH 6.0)孵育细胞1小时,并在酸孵育的24小时之后测定细胞损伤。一小时的酸孵育在GFP/ASIC1a组中而非用单独的GFP转染的组中极大地减少了幸存的GFP阳性细胞(数据未显示)。

[0159] 进行了针对来自ASIC^{+/+}和ASIC1^{-/-}小鼠的培养皮层神经元的细胞毒性实验,以进一步证实ASIC1a在酸中毒引发的神经损伤中的参与。再一次地,ASIC^{+/+}神经元在6.0时的1小时酸孵育引发了被阿米洛利和PcTX毒素所减少的可观的LDH释放($n=8-12$)。然而,ASIC^{+/+}神经元的一小时酸处理并不会在24小时后造成LDH释放的显著增长(对于pH 7.4, $13.8\% \pm 0.9\%$,以及对于pH 6.0, $14.2\% \pm 1.3\%$, $N=8$, $p>0.05$),这显示出这些神经元对酸损伤的耐力(图9C)。另外,ASIC1基因的敲除同样消除了阿米洛利和PcTX毒素对酸诱导的LDH释放的影响(图9C,各自 $n=8$),进一步表明阿米洛利和PcTX毒素对皮层神经元的酸诱导损伤的抑制(图8C)是由于ASIC1亚单位的阻滞。与酸孵育相反,用1mM NMDA+10 μ M甘氨酸对ASIC1^{-/-}神经元的1小时处理(在不含Mg²⁺的[pH 7.4]ECF中)在24小时后引发了最大LDH释放的 $84.8\% \pm 1.4\%$ ($n=4$,图9C),显示出对其它细胞损伤过程的常规响应。

[0160] (f)模拟的局部缺血通过ASIC加剧了酸中毒导致的、与谷氨酸无关的神经元损伤

[0161] 由于ASIC电流的大小可被脑缺血细胞溶胀的细胞和神经化学成分,花生四烯酸和乳酸盐所增大,且更重要的是,ASIC电流的去敏感作用可被模拟的局部缺血所显著降低(参见图5A和5C),则可预见在局部缺血状况中的ASIC的激活会产生更严重的神经元损伤。为了检验这个假设,使神经元在氧糖剥夺(OGD)条件下接受1小时的酸处理。在所有的溶液中加入MK801、CNQX和尼莫地平以抑制电压门控Ca²⁺通道和与OGD有关的谷氨酸受体介导的细胞损伤。在OGD条件下采用pH 7.4的ECF的一小时孵育在24小时后仅引发了最大LDH释放的 $27.1\% \pm 3.5\%$ ($n=5$,图9D)。这个发现与带有谷氨酸受体和电压门控Ca²⁺通道的阻滞的1小时的OGD不会引发实质的细胞损伤的在先报导(Aarts et al.,2003)相符。然而,1小时的OGD,结合酸中毒(pH 6.0),引发了最大LDH释放的 $73.9\% \pm 4.3\%$ ($n=5$,图9D, $p<0.01$),明显大于没有OGD时酸引发的LDH释放(参见图8A, $p<0.05$)。ASIC1a阻滞剂PcTX毒素(100ng/mL)的添加使酸/OGD引发的LDH释放显著降至 $44.3\% \pm 5.3\%$ ($n=5$, $p<0.05$,图9D)。

[0162] 用来自ASIC1^{-/-}小鼠的培养神经元进行了同样的实验。然而,不同于含有ASIC1的神经元,结合OGD和酸的1小时处理在ASIC1^{-/-}神经元中仅稍稍提高了LDH释放(由 $26.1\% \pm 2.7\%$ 升至 $30.4\% \pm 3.5\%$, $N=10-12$,图9D)。这个发现表明:OGD造成的酸引发的损伤的加剧很可能是由于OGD加剧了ASIC1介导的中毒。

[0163] 已证实由反应性氧/氮物质激活的可渗透Ca²⁺的非选择性阳离子传导的激活导致了与谷氨酸受体无关的神经元损伤(Aarts et al,Cell,2003,115:863-877)。操作者可通过直接清理自由基(例如,水溶性维生素E)或减少自由基的产生(例如,左旋硝基精氨酸甲酯)来显著降低长期OGD引发的细胞损伤。为了确定短期OGD与酸中毒的结合所引发的神经元损伤是否涉及类似的机制,检验了水溶性维生素E和左旋硝基精氨酸甲酯对OGD/酸诱导的LDH释放的效果。如图9D所示,无论水溶性维生素E(500 μ M)还是左旋硝基精氨酸甲酯(300

μM),均不具有对结合的1小时OGD/酸中毒引发的神经元损伤的明显效果($n=8-11$)。另外的实验还证实:ASIC阻滞剂阿米洛利和PcTX毒素对TRPM7通道的传导无效(Aarts et al. supra)。综上,这些发现有力地表明:在我们的研究中,ASIC而非TRPM7通道的激活很可能是造成结合的1小时OGD/酸中毒引发的神经元损伤的原因。

[0164] (g)体内局部缺血性脑损伤中ASIC1a的激活

[0165] 图10显示了阐释体内脑局部缺血中,凭借ASIC阻滞剂和ASIC1基因敲除的神经保护的数据。图10A显示了得自TTC染色的大脑切片的示例性数据的图表,其中显示了来自注射了aCSF($n=7$)、阿米洛利($n=11$)或PcTX毒素($n=5$)的大鼠的大脑中的染色体积(“梗死体积”),与aCSF注射组相比, $*p<0.05$ 和 $**p<0.01$ 。图10B显示了阐释来自ASIC1^{-/-}小鼠的大脑中的梗死体积的减少(各组 $n=6$)的示例性数据的图表,与+/+组相比, $*p<0.05$ 和 $**p<0.01$ 。图10C显示了阐述来自腹腔注射10mg/kg美金刚(memantine, Mem)或者腹腔注射美金刚并伴随着侧脑室注射PcTX毒素(500ng/mL)的小鼠的大脑中的梗死体积的减少的示例性数据的图表,与aCSF注射相比并在美金刚与美金刚+PcTX毒素之间, $**p<0.01$ (各组 $n=5$)。图10D显示了阐述来自腹腔注射美金刚的ASIC1^{+/+}(wt)或ASIC1^{-/-}小鼠的大脑中的梗死体积的减少的示例性数据的图表(各组 $n=5$), $*p<0.05$ 和 $**p<0.01$ 。

[0166] 测试了短暂局灶性缺血的大鼠模型中阿米洛利和PcTX毒素的保护效果(Longa et al., Stroke, 1989, 20:84-91),以确定ASIC1a的激活是否参与了体内局部缺血性脑损伤。通过短暂地阻塞大脑中动脉(MCAO)而引发了局部缺血(100分钟)。在所述局部缺血之前的30分钟和之后侧脑室注射总共6 μL 的单独的人造CSF(aCSF)、含阿米洛利(1mM)的aCSF、或者PcTX毒素(500ng/mL)。用于4周龄大鼠的脑室和脊髓液的体积估计为 $\sim 60\mu\text{L}$ 。假定注入的阿米洛利和PcTX均匀地分散于CSF中,则预计阿米洛利的浓度为 $\sim 100\mu\text{M}$ 及PcTX的浓度为 $\sim 50\text{ng/mL}$,此为被发现在细胞培养实验中有效的浓度。局部缺血后24小时通过TTC染色确定了梗死体积(Bederson et al., Stroke, 1986, 17:1304-1308)。局部缺血(100分钟)在注射aCSF的大鼠中产生了 $329.5 \pm 25.6\text{mm}^3$ 的梗死体积($n=7$),但在注射阿米洛利的大鼠中仅为 $229.7 \pm 41.1\text{mm}^3$ ($n=11$, $p<0.05$)以及在注射PcTX毒素的大鼠中仅为 $130.4 \pm 55.0\text{mm}^3$ (降低了 $\sim 60\%$)($n=5$, $p<0.01$)(图10A)。

[0167] ASIC1^{-/-}小鼠被用于进一步证实ASIC1a在体内局部缺血性脑损伤中的参与。如之前所描述的(Stenzel-Poore et al., Lancet, 2003, 362:1028-1037),使雄性ASIC1^{+/+}、ASIC1^{+/-}和ASIC1^{-/-}小鼠($\sim 25\text{g}$,具有同类系C57B16背景)接受60分钟的MCAO。与通过ASIC1a的药物学阻滞的保护(如上所述)相一致,与+/+小鼠($84.6 \pm 10.6\text{mm}^3$, $N=6$, $p<0.01$)相比, -/-小鼠显示出明显较小(降低了 $\sim 61\%$)的梗死体积($32.9 \pm 4.7\text{mm}^3$, $N=6$)。+/-小鼠也显示出减小的梗死体积($56.9 \pm 6.7\text{mm}^3$, $N=6$, $p<0.05$)(图10B)。

[0168] 为了确定在谷氨酸受体阻滞的背景下,ASIC1a通道的阻滞或ASIC1基因的敲除是否会在体内提供额外的保护,则在60分钟的MCAO之后立即向C57B16小鼠腹腔(i.p.)注射美金刚(10mg/kg)并伴随着在局部缺血之前的15分钟或之后侧脑室(i.c.v.)注射总体积0.4 μL 的单独的aCSF或含PcTX毒素(500ng/mL)的aCSF。在i.p.注射生理盐水并i.c.v.注射aCSF的对照小鼠中,60分钟的MCAO造成了 $123.6 \pm 5.3\text{mm}^3$ 的梗死体积($n=5$,图10C)。在腹腔注射美金刚且侧脑室注射aCSF的小鼠中,相同持续时间的局部缺血造成了 $73.8 \pm 6.9\text{mm}^3$ 的梗死体积($n=5$, $p<0.01$)。然而,在注射美金刚和PcTX毒素的小鼠中,仅造成了 $47.0 \pm 1.1\text{mm}^3$ 的

梗死体积(相比于对照组和美金刚组, $n=5$, $p<0.01$, 图10C)。这些数据表明同源ASIC1a的阻滞可在NMDA受体阻滞的背景下, 在体内局部缺血中提供额外的保护。额外的保护还可在用药物NMDA阻滞处理的ASIC1^{-/-}小鼠中观察到(图10D)。在i.p.注射生理盐水或10mg/kg美金刚的ASIC1^{+/+}小鼠中, 60分钟的MCAO分别造成了 $101.4\pm9.4\text{mm}^3$ 或 $61.6\pm12.7\text{mm}^3$ 的梗死体积(各组中 $n=5$, 图10D)。然而, 在注射美金刚的ASIC1^{-/-}小鼠中, 相同持续时间的局部缺血造成了 $27.7\pm1.6\text{mm}^3$ 的梗死体积($n=5$), 明显小于注射美金刚的ASIC1^{+/+}小鼠的梗死体积($p<0.05$)。

[0169] 总之, 这些数据证实: 可渗透 Ca^{2+} 的ASIC1a的激活是新颖的、与谷氨酸无关的基于局部缺血性脑损伤的生物机制。

[0170] 实施例2: PcTX神经保护的时间窗

[0171] 参见图11, 本实施例描述了测定啮齿动物中风发作后PcTX毒素在不同时间下的神经保护效果的示例性的实验。简而言之, 通过阻塞大脑中动脉(MCAO)而引发了啮齿动物的脑局部缺血(中风)。在引发后的指定时间下, 向各个啮齿动物的侧脑室注入人造脑脊液(aCSF)、PcTX毒素($0.5\mu\text{L}$, 500ng/mL 总蛋白)或灭活(煮沸)毒素。如图11所示, PcTX毒素的给药在中风发作后一小时和三小时均使中风体积减少了60%。另外, 若在MCAO开始后五小时停止治疗, 仍可维持可观的中风体积的减少。因此, 由ASIC的抑制所致的神经保护可具有中风发作后延长了的治疗时间窗, 使得中风受治者从中风开始数小时后的治疗中获益。ASIC阻滞在中风神经保护方面的这个效果比采用谷氨酸拮抗剂的NMDA受体的钙通道阻滞(实验性中风治疗的主要目标)的效果更强。迄今为止, 没有谷氨酸拮抗剂具有如此处ASIC1a选择性抑制所示的这种良好的曲线。

[0172] 实施例3: 示例性的胱氨酸结肽

[0173] 此实施例描述了示例性的胱氨酸结肽, 包括全长PcTX和缺失PcTX衍生物, 其可在培养细胞中被筛选, 在局部缺血的动物(例如, 啮齿动物, 如小鼠或大鼠)中测得, 和/或被施用至局部缺血的人类受治者。

[0174] 图12显示了以50示出的示例性胱氨酸结肽PcTx1的以单字母编码的主要氨基酸序列(SEQ ID NO:1), 其具有所示的与氨基酸位置1-40有关的多种示例性肽特征。肽50可包含六个半胱氨酸残基, 其形成胱氨酸键52、54、56以生成胱氨酸结基序58。所述肽还可包括一个或多个 β 折叠区域60和带正电的区域62。N端区域64和C端区域66可位于所述胱氨酸结基序的两侧。

[0175] 图13显示了图12的PcTx1肽50与该肽的多种示例性缺失衍生物相对齐的对比。这些衍生物可包括: N端缺失70(SEQ ID NO:2)、部分C端缺失72(SEQ ID NO:3)、全C端缺失74(SEQ ID NO:4)和N/C端缺失76(SEQ ID NO:5)。其它的PcTx1衍生物可包括, 例如, 在维持与原始PcTx1序列的至少约25%或约50%的序列相似性或一致性的同时, 一个或多个氨基酸的缺失、嵌入或替换。

[0176] 可检测各个PcTx1衍生物的选择性抑制ASIC蛋白的能力和/或针对局部缺血的效果(如果有的话)。可采用任何适宜的检测系统以进行包括本发明别处所述的任何的基于细胞的测定系统和/或动物模型系统的此检测。同样或另选地, 可在局部缺血的人类受治者中检测所述PcTx1衍生物。

[0177] 实施例4: PcTX毒素对ASIC1a的选择性

[0178] 此实施例描述了相对于培养细胞中表达的其它ASIC蛋白或ASIC蛋白的组合,测定PcTX毒素(及由此获得的PcTx1毒素)对单独的ASIC1a的选择性的实验。用PcTX毒素(25ng/mL,针对表达ASIC1a的细胞;以及500ng/mL,针对表达ASIC2a、ASIC3或ASIC1a+2a的细胞)处理表达指定的ASIC蛋白的COS-7细胞。在通道半最大激活的pH(pH 0.5)下测定通道电流。如图14所示,PcTX毒素在25ng/mL的蛋白质浓度下极大地阻滞了由ASIC1a同源通道介导的电流,并在500ng/mL下对由同源的ASIC2a、ASIC3或异源的ASIC1a/ASIC2a介导的电流没有影响($n=3-6$)。在500ng/mL下,PcTX毒素也不会影响由其它配体门控通道(例如,NMDA和GABA受体门控通道)或电压门控通道(例如, Na^+ 、 Ca^{2+} 和 K^+ 通道)介导的电流($n=4-5$)。这些实验表明:PcTX毒素及由此获得的PcTx1肽为针对同源的ASIC1a的特定的阻滞剂。利用此基于细胞的测定系统,可测定多种合成肽或其它的候选抑制剂的ASIC抑制作用的效力和选择性(例如,参见实施例3)。

[0179] 实施例5:PcTX毒素的鼻腔给药的神经保护

[0180] 此实施例描述了说明经鼻腔施用PcTX毒素在中风的动物模型系统中减轻局部缺血引发的损伤的效力的示例性数据。通过阻塞大脑中动脉在雄性小鼠中引发了脑局部缺血。在阻塞开始后一小时,将动物作为对照处理或用PcTX毒素处理(鼻腔导入50 μL 5ng/mL(总蛋白)的PcTx)。如图15所示,相对于对照处理,PcTX毒素的鼻腔给药导致如梗死体积所定义的局部缺血引发的损伤(局部缺血性损害)降低了55%。鼻腔给药可凭借基本上沉积于鼻腔通道而非吸入肺中的喷剂和/或可凭借至少部分吸入肺中的气雾剂而实现。在一些实施例中,鼻腔给药相比于其它的给药路径可具有许多的优点,如更有效地传送至大脑和/或适于局部缺血受治者的自主给药。

[0181] 实施例6:阿米洛利和阿米洛利类似物对ASIC1a通道的抑制作用

[0182] 如图16所示,阿米洛利和阿米洛利类似物苯扎米尔、非那米尔和EIPA以剂量依赖的方式阻滞了ASIC1a电流。类似地,阿米洛利和阿米洛利类似物苯扎米尔和EIPA以剂量依赖的方式阻滞了ASIC2a电流(图17)。表1总结了阿米洛利和阿米洛利类似物对ASIC1a通道的抑制作用。阿米洛利为此通道的有效抑制剂,具有7.7 μM 的IC₅₀。

[0183] 表1阿米洛利和阿米洛利类似物对ASIC1a通道的抑制作用

[0184]

敲除1a	39.1 ± 3.8 {n=4}	
敲除2a	5.14 ± 0.79 {n=5}	
神经元(-60 mV)	43.3 ± 1.43 {n=6}	
神经元(-20 mV)	32.2 ± 6.3 {n=3}	
CHO 1a	111 ± 30 {n=5}	EIPA
CHO 2a	31 {n=1}	
敲除1a	35.9 ± 2.1 {n=5}	
敲除2a	20.1 ± 2.2 {n=2}	
神经元(-60 mV)	82.9 ± 5.2 {n=8}	苄普地尔
神经元(-60 mV)	100 ± 11 {n=10}	KB-R7943
神经元(-60 mV)	24.3 ± 17.2 {n=2}	5-(N-甲基-N-异丁基)阿米洛利
神经元(-60 mV)	15.0 ± 11.7 {n=3}	5-(N,N-六亚甲基)阿米洛利
神经元(-60 mV)	14.8 ± 7.1 {n=2}	5-(N,N-二甲基)阿米洛利盐酸盐

[0185] 实施例7:阿米洛利和阿米洛利类似物的侧脑室注射降低了小鼠的梗死体积

[0186] 如上所述,使小鼠接受60分钟的阻塞大脑中动脉(MCAO)。MCAO后一小时通过侧脑室注射施用阿米洛利或阿米洛利类似物苯扎米尔、苄普地尔(bepri del)、EIPA或KB-R7943。局部缺血引发一天后评价动物。如图18所示,阿米洛利或阿米洛利类似物苯扎米尔、苄普地尔、EIPA或KB-R7943的侧脑室注射有效减少了梗死体积。

[0187] 实施例8:阿米洛利的静脉注射降低了小鼠的梗死体积

[0188] 如上所述,使小鼠接受60分钟的阻塞大脑中动脉(MCAO)。MCAO后1、3或5小时通过静脉注射施用阿米洛利。局部缺血引发一天后评价动物。如图19所示,阿米洛利的静脉注射有效减少了梗死体积。阿米洛利的有效的CNS渗透可通过脑局部缺血/再灌注后危及了血脑

障壁的事实来解释。图20显示了阿米洛利的静脉注射具有5h的长效治疗窗。

[0189] 实施例9:疏水性的阿米洛利类似物对各种通道的结构活性关系

[0190] 如表1所示,用烷基取代阿米洛利的C-5氨基导致了对ASIC1a通道的效力的减小。该取代提高了对ASIC3通道的效力(Kuduk et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 2009, 19: 2514-2518)。当将疏水性基团取代到结构的胍基部分上时,会获得相反的结果。实际上,苄基取代的胍基类似物(苯扎米尔)为测得的最强效的ASIC1a阻滞化合物($IC_{50}=4.9\mu M$)。总之,这些结果显示:阿米洛利为ASIC1a通道的有效抑制剂,具有 $7.7\mu M$ 的 IC_{50} 。它们还提供了结构活性关系(参见图21)以用于设计可抑制ASIC1a通道的阿米洛利类似物。因此,在一些实施方式中,通过在阿米洛利结构的胍部分引入变化来产生阿米洛利类似物。由于阿米洛利仅是 Na^+/Ca^{2+} 离子交换器的非常弱的抑制剂($IC_{50}=1.1mM$)。所述阿米洛利类似物也很可能是 Na^+/Ca^{2+} 离子交换器的非常弱的抑制剂。在一些实施方式中,所述阿米洛利类似物被设计为具有比ASIC3通道更高的针对ASIC1a的选择性。在另外的实施方式中,在阿米洛利结构中引入了环结构(如环胍基团)以提高ASIC1a电流的抑制效力。阿米洛利的一个或多个N-H基团也很可能会形成与3-氨基的内部的或与离子通道的H键。

[0191] 小鼠的体内结果显示:在 $32.5\mu M$ 的血浆浓度($50\mu L \times 1mM$ 的静脉剂量)和 $12.5\mu M$ 的总的脑浓度($1\mu L \times 500\mu M$ 的侧脑室剂量)下可实现功效。由此可估计:为实现适于人类中风的急性治疗的有效浓度,仅需要在效力上增长10倍。因此,筛选新颖的类似物以使ASIC1a IC_{50} 的效力由对于阿米洛利和苯扎米尔来说的4至 $8\mu M$ 提高至 $<1\mu M$ 。

[0192] 在一些实施方式中,所述阿米洛利类似物包括苯扎米尔的甲基化类似物(图21的式1-5)和苯扎米尔的脒基类似物(图21的式6)。在另外的实施方式中,所述阿米洛利类似物包含形成于胍基团上的环。在另外的实施方式中,所述阿米洛利类似物包含用于提高ASIC1a电流的抑制效力的酰胍基。

[0193] 阿米洛利以 $1mM$ 是可溶于水的,且在 $50\mu L$ 每针的剂量下在治疗小鼠模型的局部缺血中是有效的。在 $65kg$ 人类上的相同剂量(以 mg/kg 为基准)可能会接近 $40mg$,且需要超过 $160mL$ 的注射体积。类似地,已有报导苯扎米尔具有在 0.9% 生理盐水中的 $0.4mg/mL$ ($1.7mM$)的溶解度,这允许在 $10mL$ 注射液仅 $5mg$ 苯扎米尔二盐酸盐的给药。因此,需要具有更高的水溶性的阿米洛利类似物。在一些实施方式中,所述阿米洛利类似物在胍基上包含水增溶性基团,如N,N-二甲基氨基或糖基,以改善水溶性。在一些实施方式中,所述阿米洛利类似物具有 $5mM$ 、 $10mM$ 、 $20mM$ 、 $30mM$ 、 $40mM$ 、 $50mM$ 、 $60mM$ 、 $70mM$ 、 $80mM$ 、 $90mM$ 、 $100mM$ 或更高的水溶性。在另外的实施方式中,所述阿米洛利类似物具有允许在单次 $10mL$ 注射液中将 $10mg$ 、 $25mg$ 、 $50mg$ 、 $100mg$ 、 $150mg$ 、 $200mg$ 、 $250mg$ 、 $300mg$ 、 $400mg$ 或 $500mg$ 的剂量通过静脉施用至人体的溶解度。在更另外的实施方式中,所述阿米洛利类似物具有允许在单次 $2mL$ 注射液中将 $10mg$ 、 $25mg$ 、 $50mg$ 、 $100mg$ 、 $150mg$ 、 $200mg$ 、 $250mg$ 、 $300mg$ 、 $400mg$ 或 $500mg$ 的剂量通过侧脑室施用至人体的溶解度。

[0194] 以上所述的本公开可包括一个或多个具有独立用途的不同的发明。各个发明已以其优选的方式被公开。这些优选的方式,包括本文中公开和阐释的具体实施方式,不应以限制性的观念去理解,因为还可以有许多的变体。本发明的主题包括本文所公开的各种元素、特征、功能和/或性能的全部的新颖的和非显而易见的组合和次组合。以下的权利要求特别指出了认为是新颖性和非显而易见性的组合和次组合。在元素、特征、功能和/或性能的其

它组合和次组合中体现的发明可在要求本申请或相关申请的优先权的申请中声明。这些权利要求, 无论是否指向不同的发明或相同的发明, 以及无论是否比原始权利要求的保护范围更宽、更窄、等同或不同, 均应被视为包含于本公开的发明的主题之内。

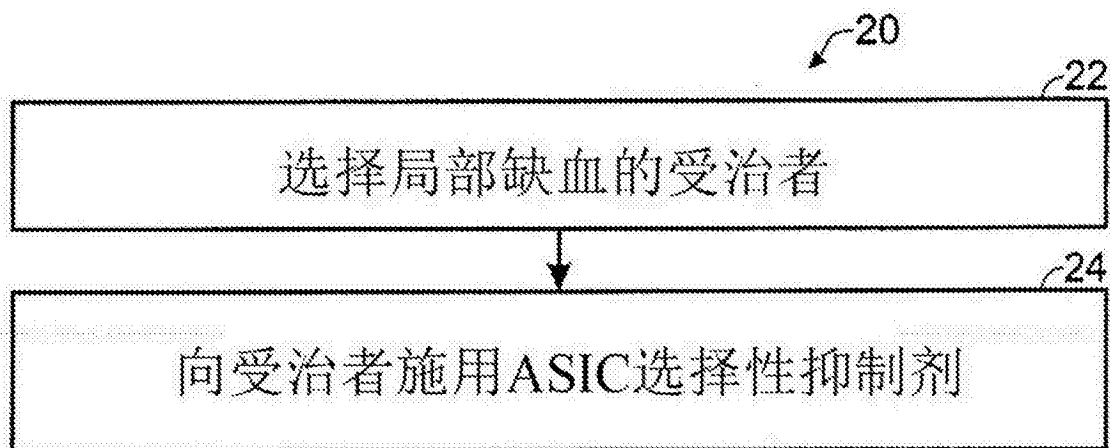


图1

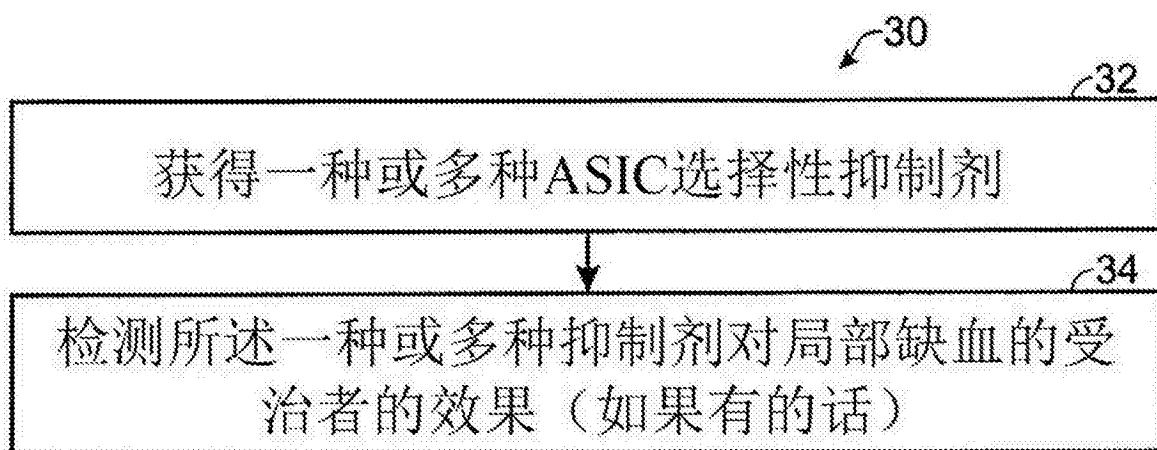


图2

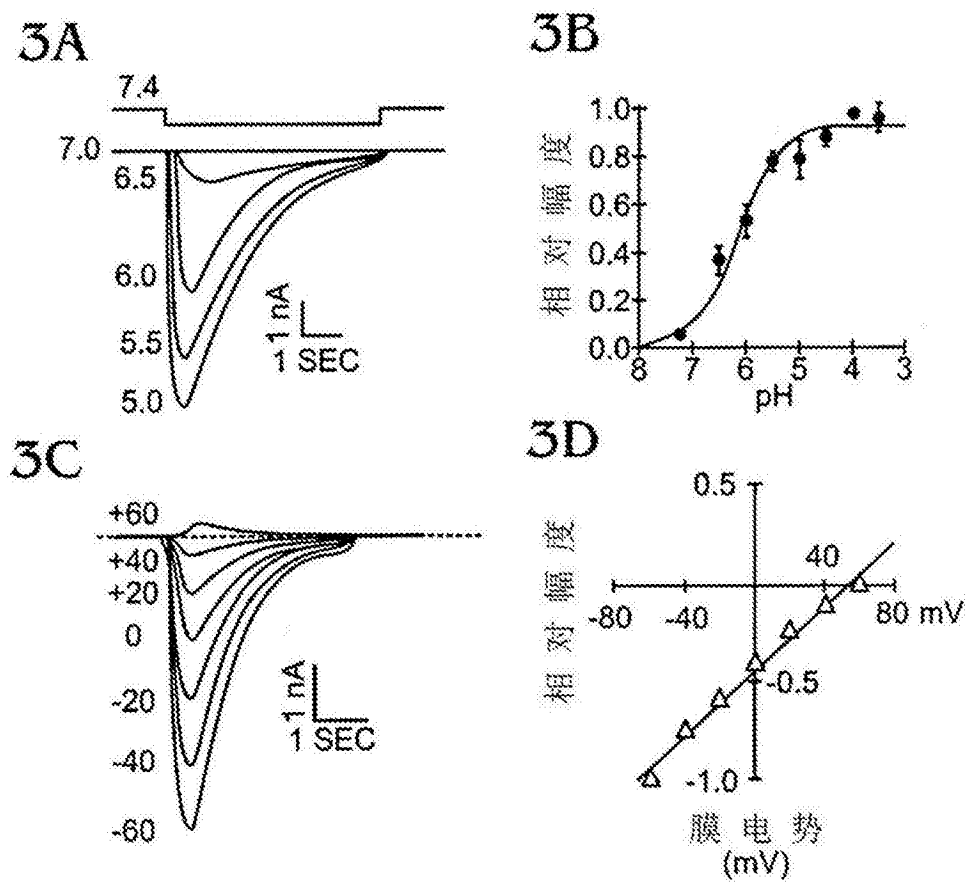


图3

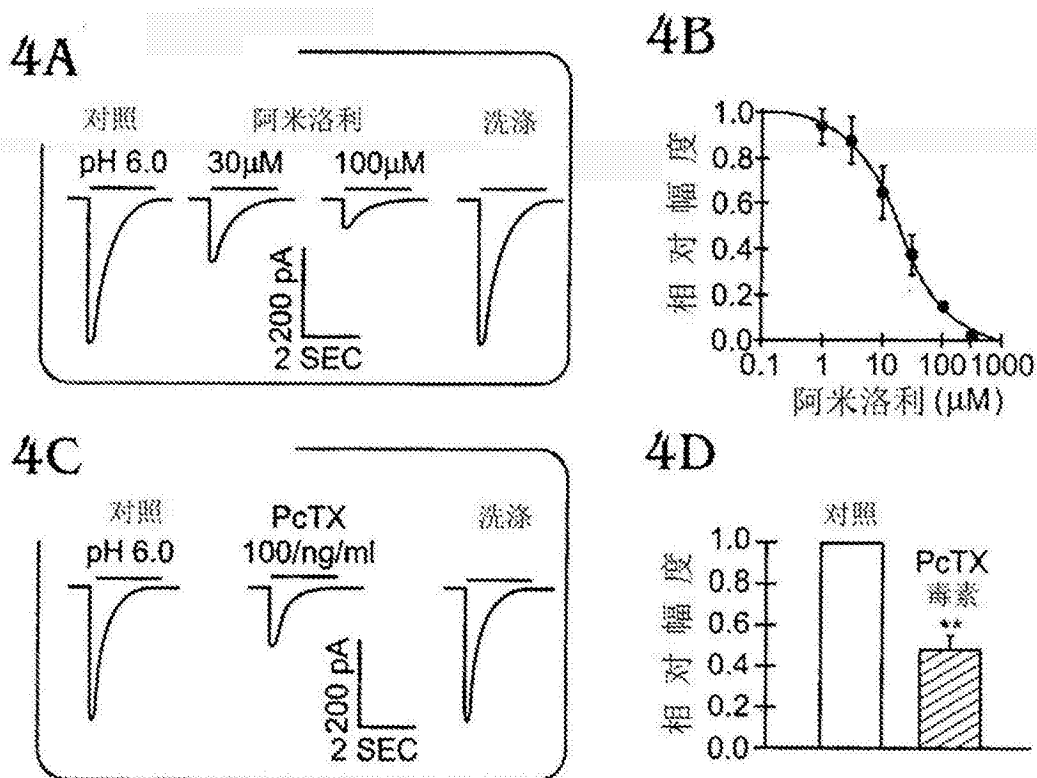


图4

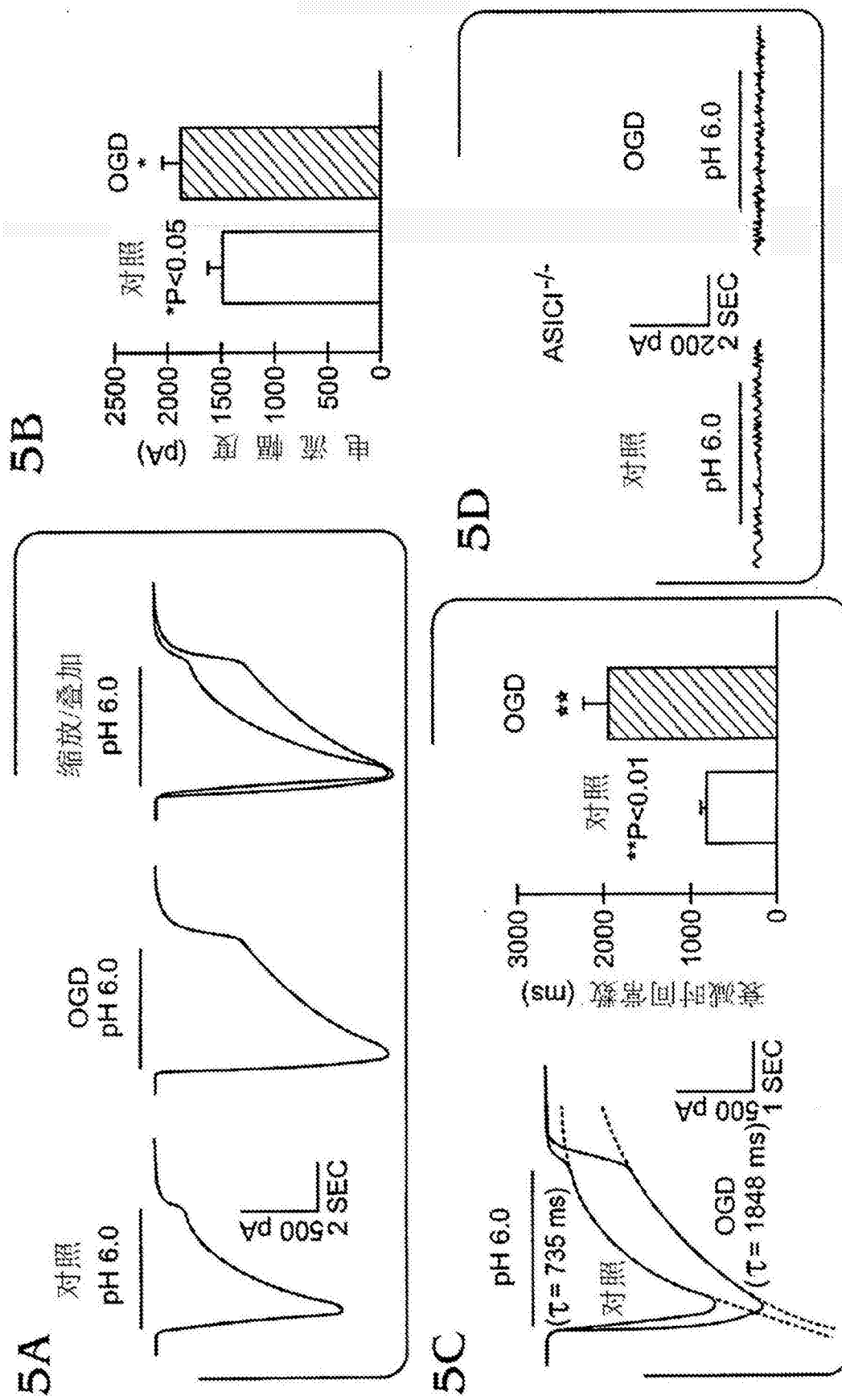


图5

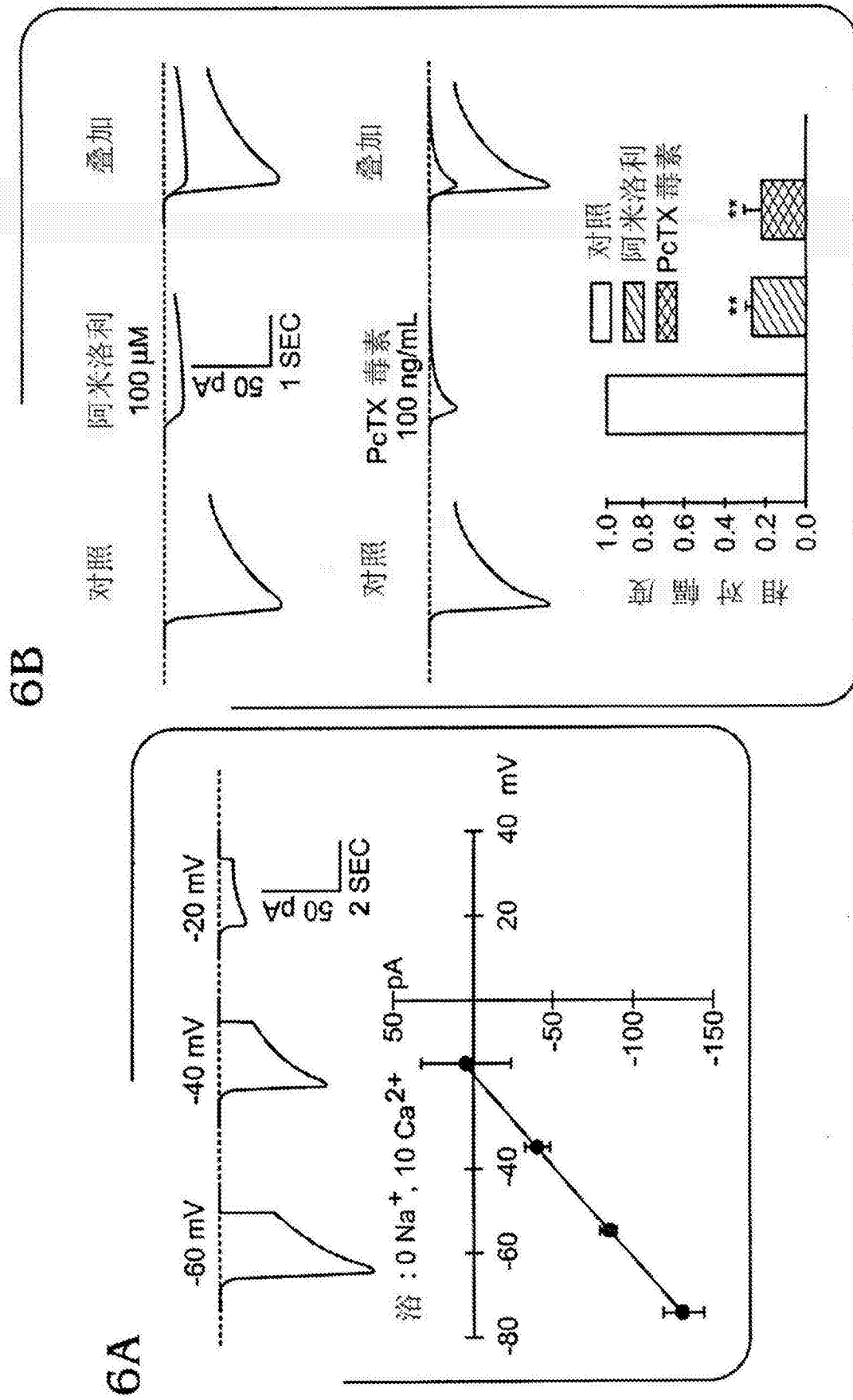


图6

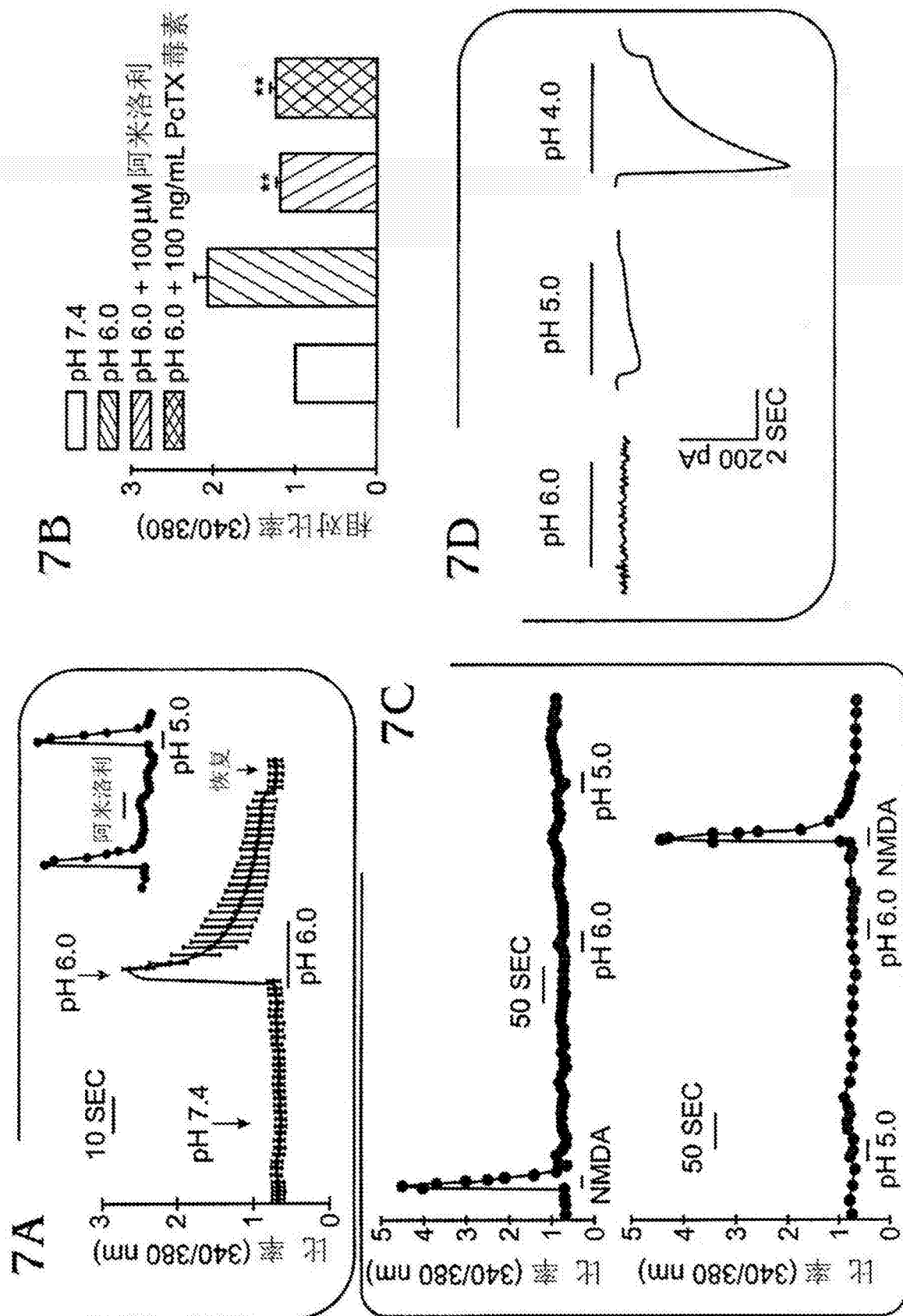


图7

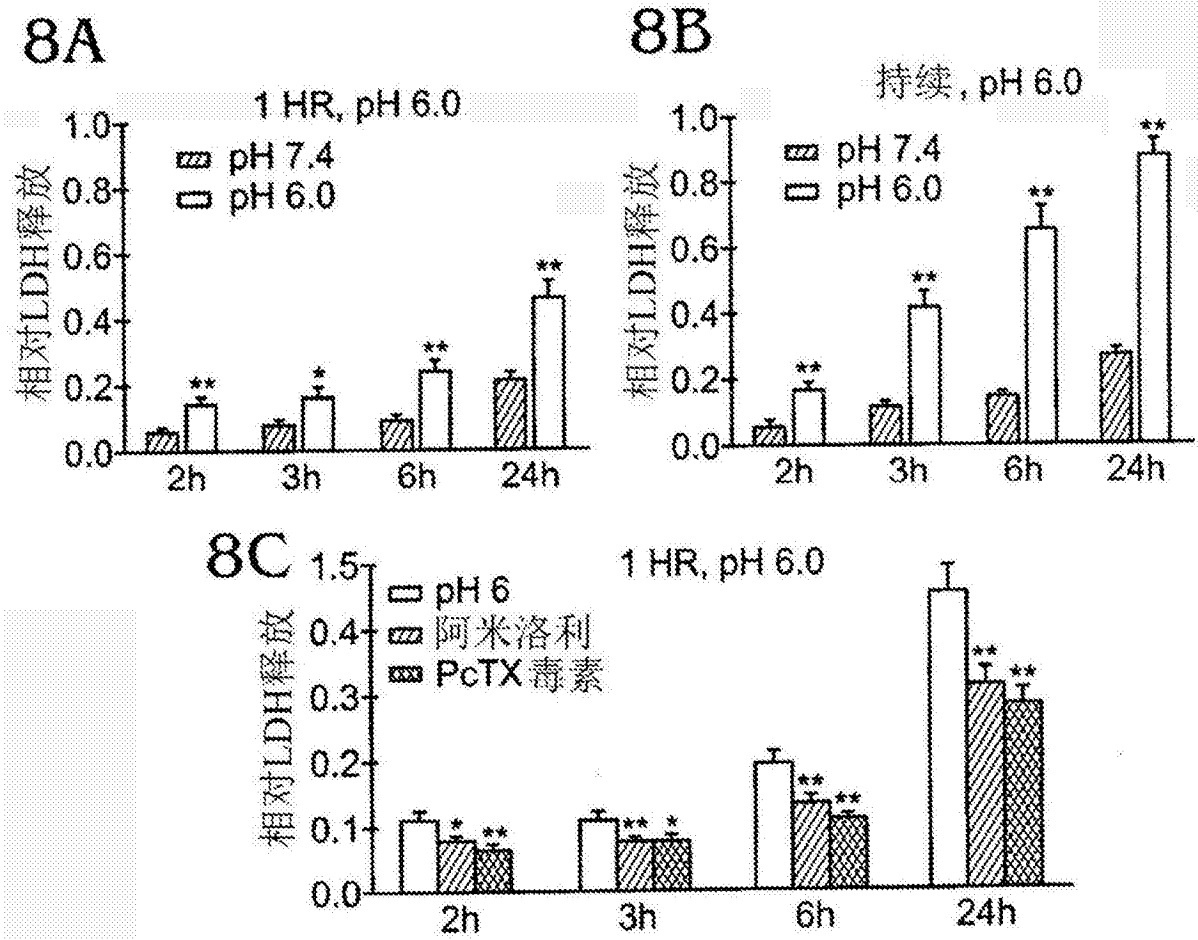


图8

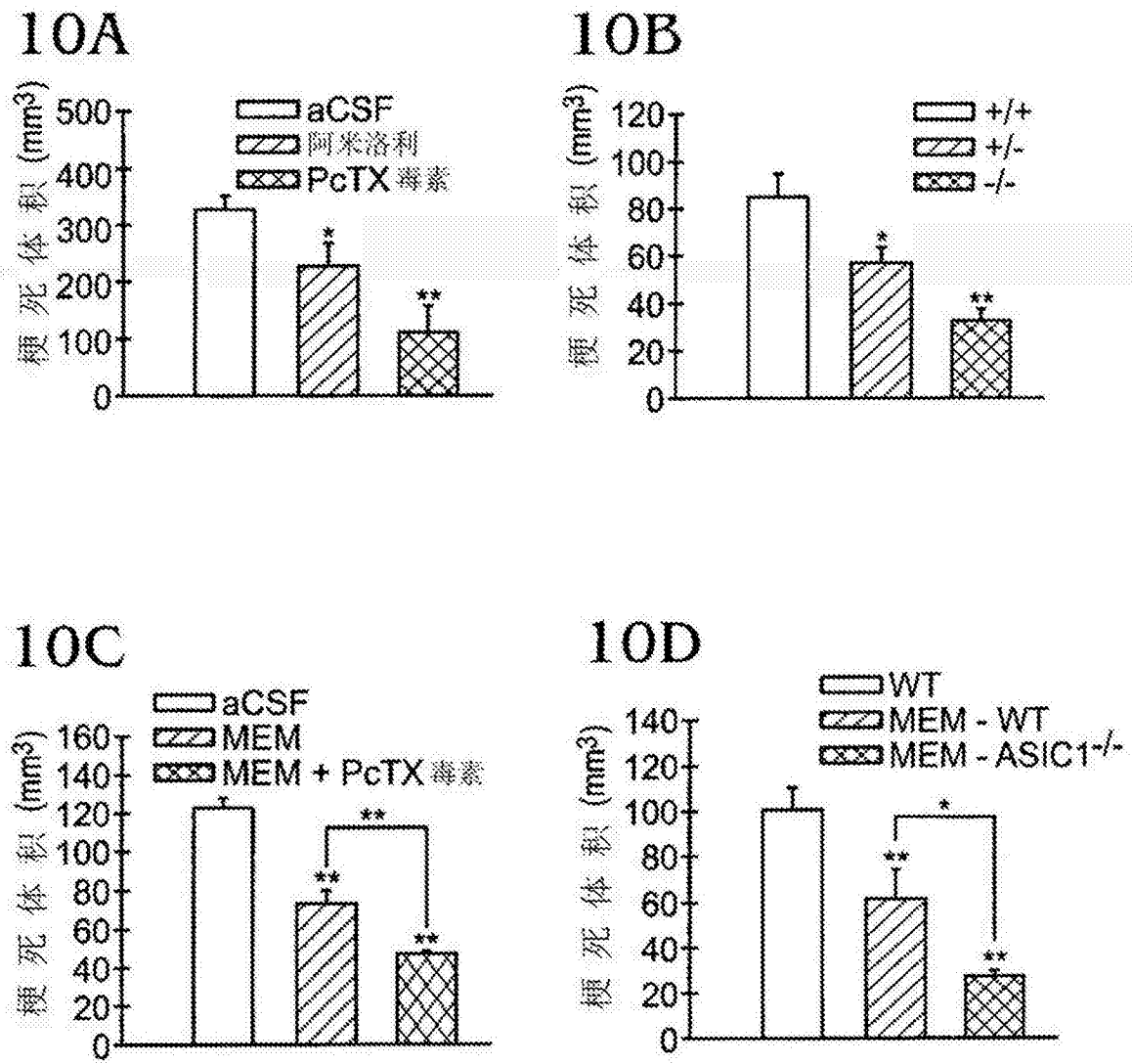


图10

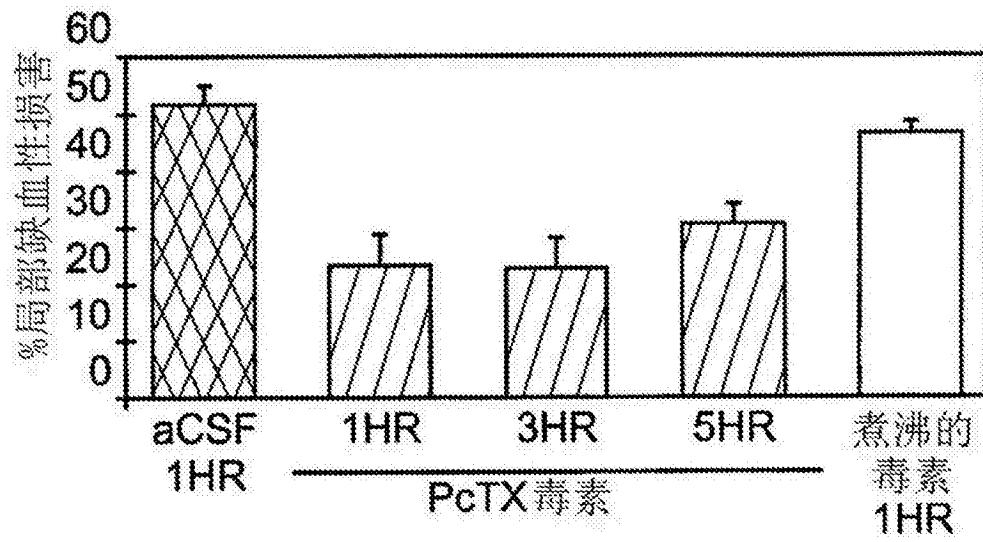


图11

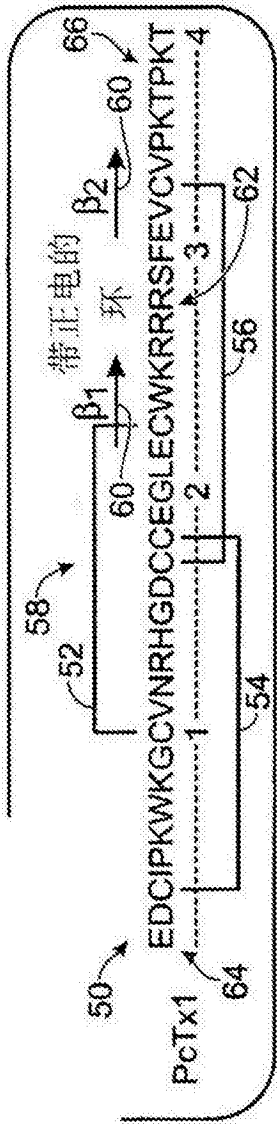


图12

变体	识别码	位置
50 → 全长 PcTx1	(SEQ ID:1):	 1 2 3 4
70 → N 端缺失	(SEQ ID:2):	EDCIPKWKGCVNRHGDCCCEGLECWKRRRSFEVCVPKTPKT
72 → C 端缺失	(SEQ ID:3):	CIPKWKGCVNRHGDCCCEGLECWKRRRSFEVCVPKTPKT
74 → 全 C 端缺失	(SEQ ID:4):	EDCIPKWKGCVNRHGDCCCEGLECWKRRRSFEVCVPKT
76 → N & C 端缺失	(SEQ ID:5):	EDCIPKWKGCVNRHGDCCCEGLECWKRRRSFEVC
		CIPKWKGCVNRHGDCCCEGLECWKRRRSFEVC

图13

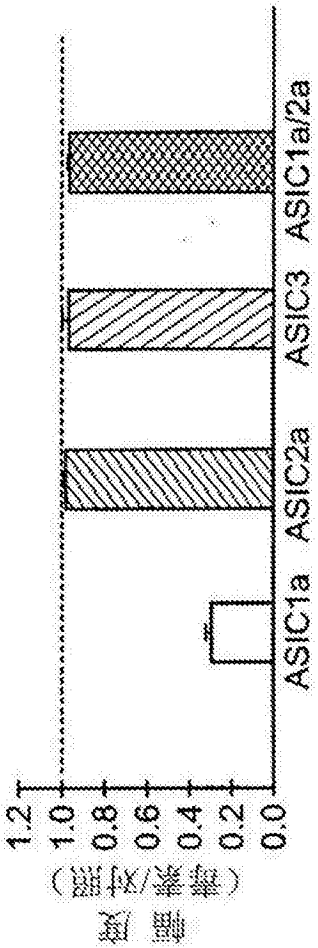


图14

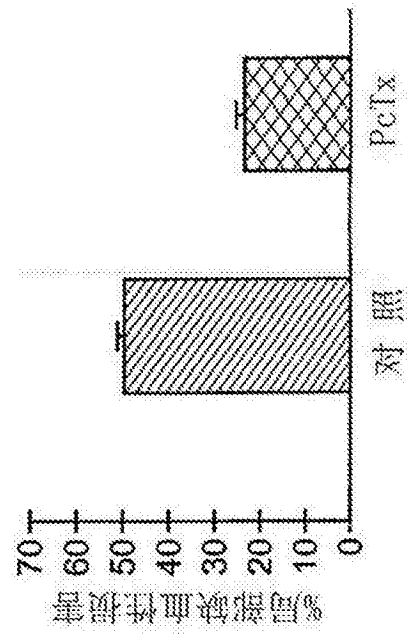


图15

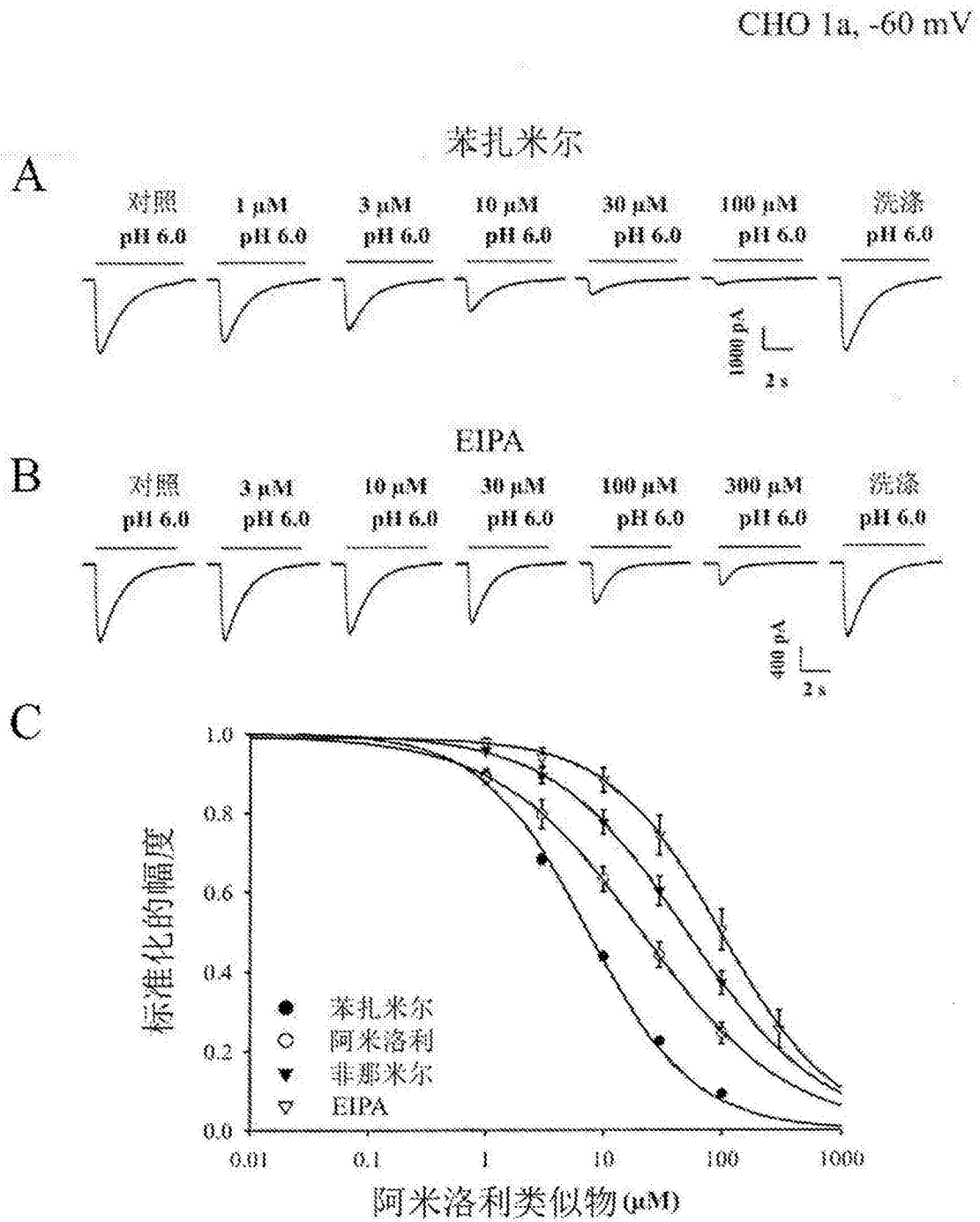


图16

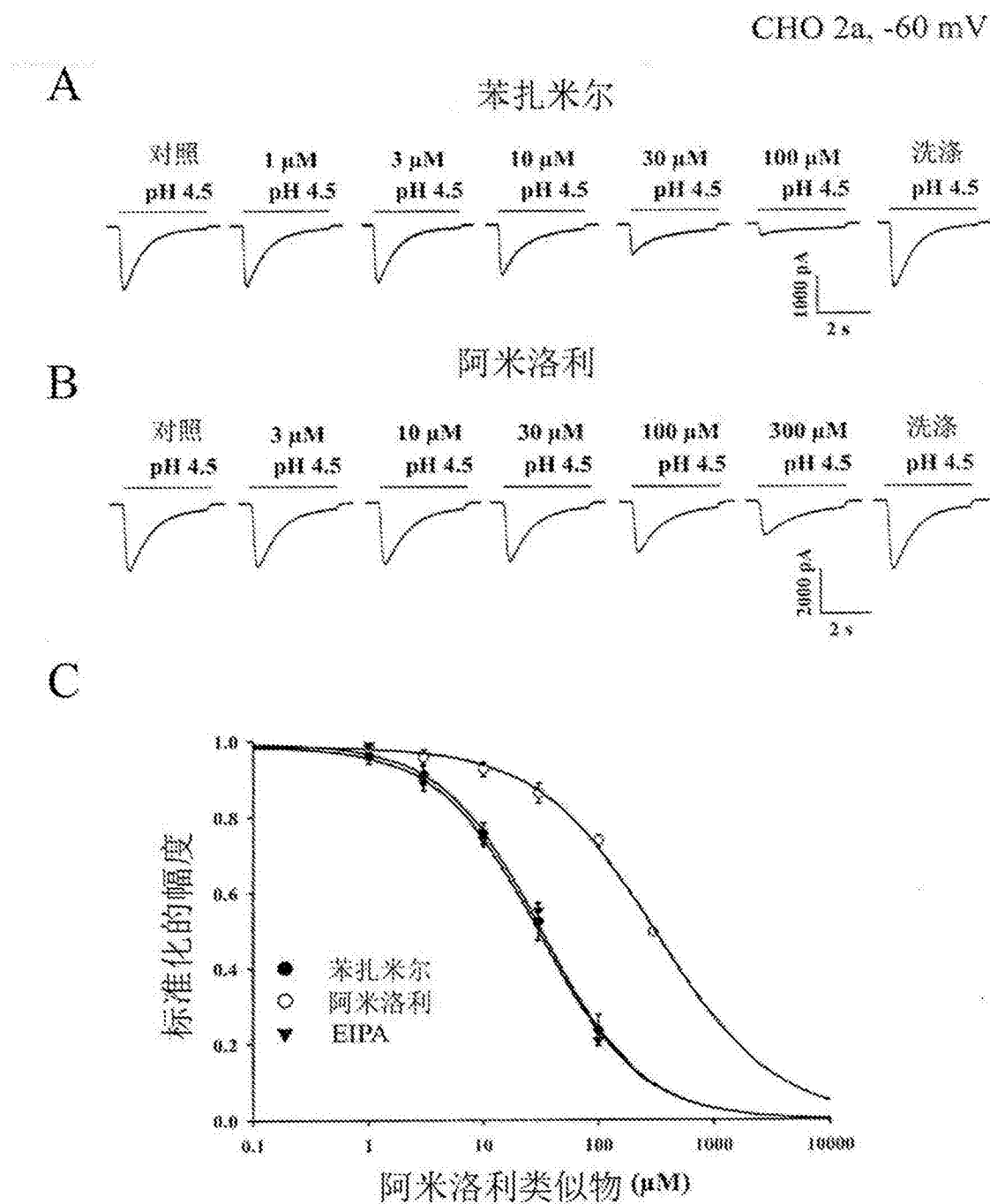


图17

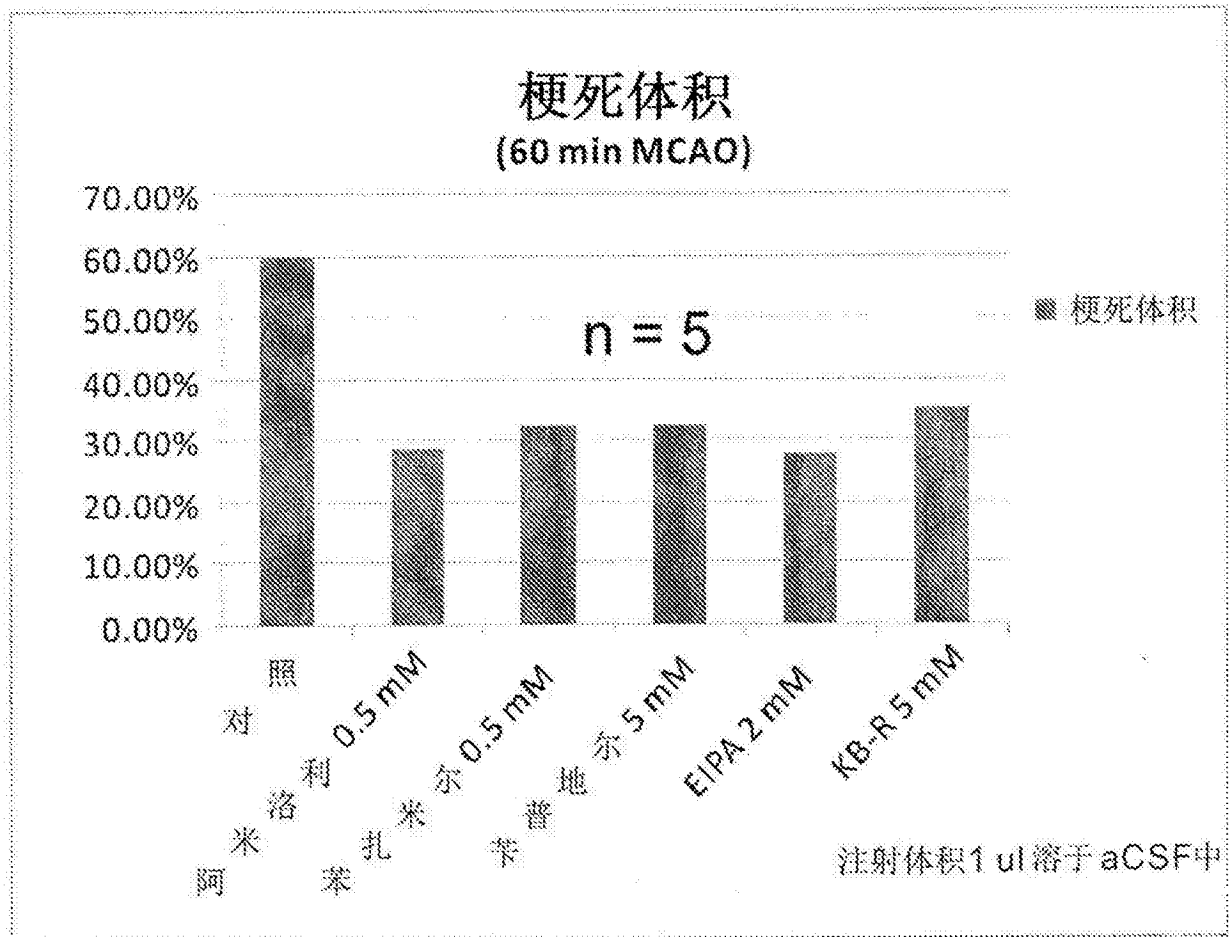


图18

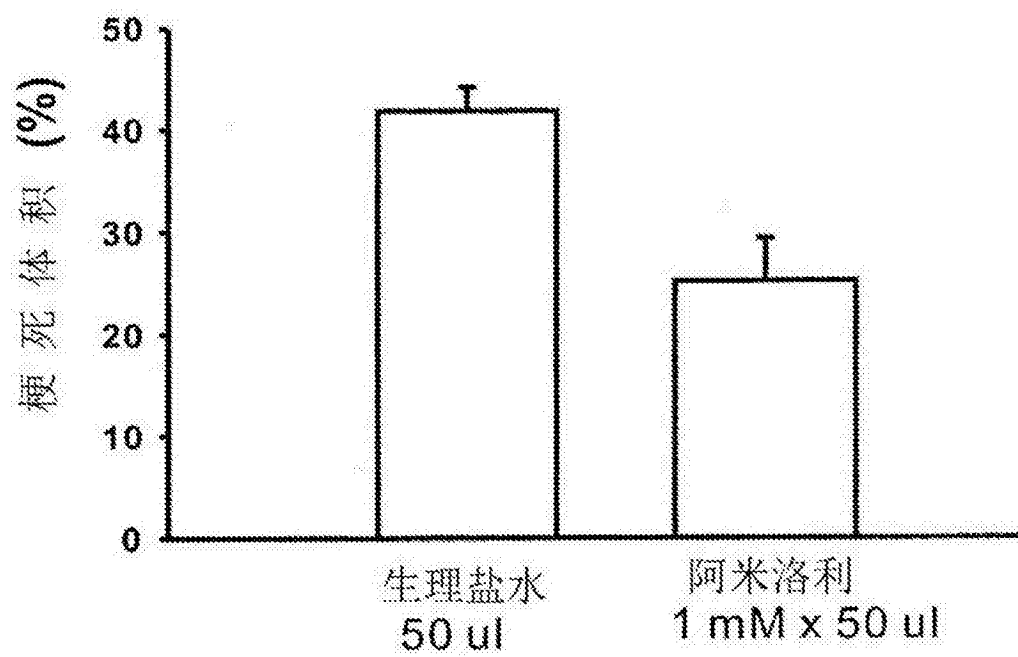
生理盐水 50 μ l阿米洛利 1 mM x 50 μ l

图19

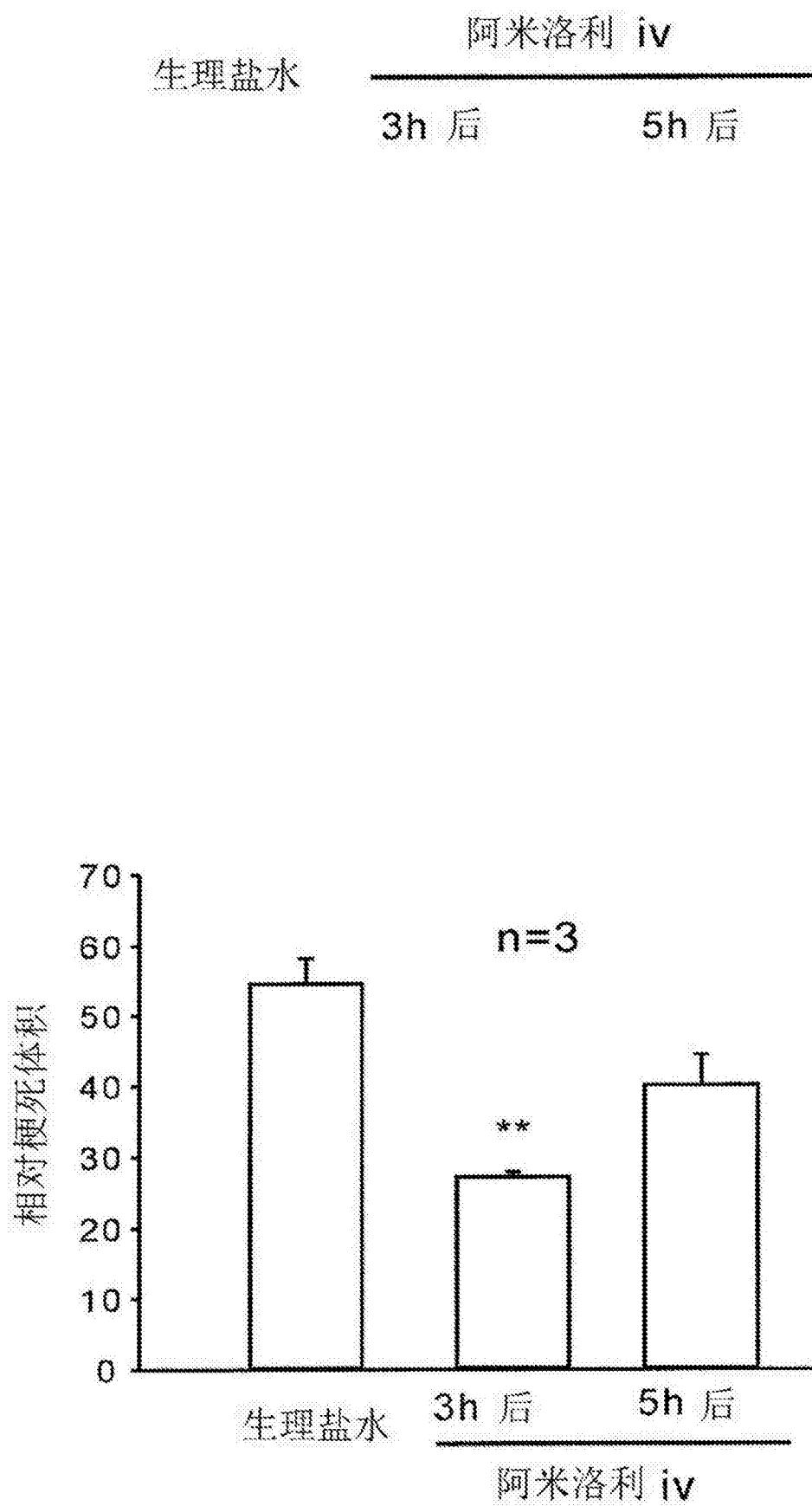


图20

疏水性阿米洛利类似物在各种通道上的结构活性关系 (SAR)

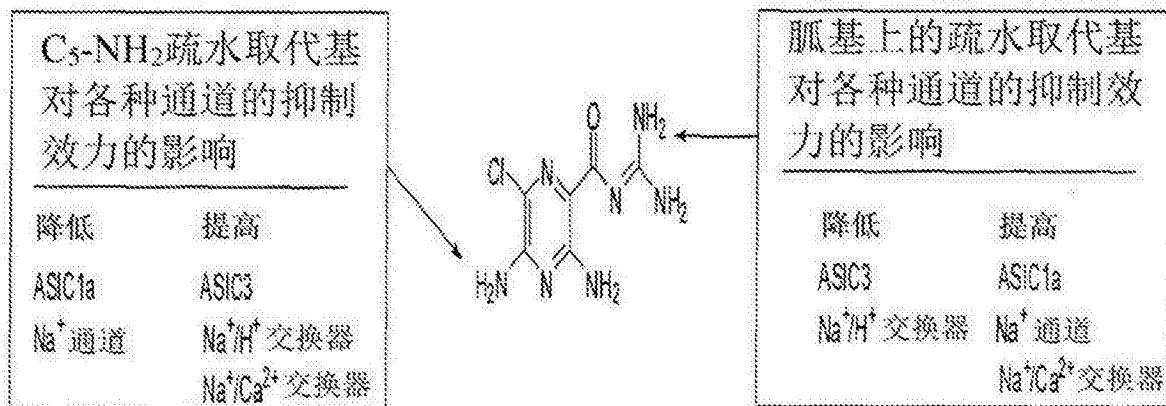


图21