



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101657194 B

(45) 授权公告日 2013. 10. 23

(21) 申请号 200880007277. X

(22) 申请日 2008. 03. 03

(30) 优先权数据

60/893, 075 2007. 03. 05 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009. 09. 04

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IN2008/000119 2008. 03. 03

(87) PCT申请的公布数据

W02008/107909 EN 2008. 09. 12

(73) 专利权人 INDUS 生物技术私人有限公司

地址 印度马哈拉施特拉邦

(72) 发明人 S·巴斯卡兰 M·维施马拉曼

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 唐晓峰

(51) Int. Cl.

A61K 31/198 (2006. 01)

A61K 36/48 (2006. 01)

A61K 31/455 (2006. 01)

A61P 25/16 (2006. 01)

A61K 45/06 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2004100968 A2, 2004. 11. 25, 说明书第 7 页第 1-3 段至第 13 页第 6 段, 实施例 1.

US 4540564 B, 1985. 09. 10, 全文.

审查员 尹瑶菲

权利要求书2页 说明书17页 附图3页

(54) 发明名称

包含葫芦巴碱和 4- 羟基异亮氨酸的药物组合物及其方法

(57) 摘要

本发明涉及具有多巴胺能活性和其它相关药物活性的药物组合物, 其包含葫芦巴碱或其衍生物和 4- 羟基异亮氨酸或其衍生物和任选的赋形剂; 制备包含葫芦巴碱或其衍生物和 4- 羟基异亮氨酸或其衍生物和任选的赋形剂的药物组合物的方法, 其中该方法包括下列步骤: (a) 从植物来源中提取包含葫芦巴碱和 4- 羟基异亮氨酸的澄清溶液; 和 (b) 任选从该澄清溶液中沉淀葫芦巴碱和 4- 羟基异亮氨酸的衍生物并且获得所述的组合物; 和通过使包含葫芦巴碱或其衍生物和 4- 羟基异亮氨酸或其衍生物的组合物的结合细胞受体在体外提高多巴胺或抑制催乳素水平的方法。

1. 具有多巴胺能活性的药物组合物,其由浓度在 30% -90% 的葫芦巴碱或其盐酸盐和浓度在 10% -30% 的 4- 羟基异亮氨酸或其盐酸盐和任选的赋形剂组成。

2. 如权利要求 1 中所述的药物组合物,其中所述的葫芦巴碱获自植物来源。

3. 如权利要求 1 中所述的药物组合物,其中所述的葫芦巴碱获自植物来源葫芦巴和 / 或小果咖啡。

4. 如权利要求 1 中所述的药物组合物,其中所述的 4- 羟基异亮氨酸获自植物来源。

5. 如权利要求 1 中所述的药物组合物,其中所述的 4- 羟基异亮氨酸获自葫芦巴和 / 或小果咖啡。

6. 如权利要求 1 中所述的药物组合物,其中所述的赋形剂选自成粒剂、粘合剂、润滑剂、崩解剂、助流剂、抗粘着剂、抗静电剂、表面活性剂、抗氧化剂、包衣衣料、着色剂、矫味剂、增塑剂、防腐剂、悬浮剂、乳化剂和滚圆剂。

7. 如权利要求 1 中所述的药物组合物,其中将该组合物配制成选自片剂、锭剂、水或油混悬液、软膏剂、贴剂、凝胶、洗剂、牙粉、胶囊、乳剂、霜剂、喷雾剂、滴剂、可分散粉末或颗粒、糖浆剂和酏剂的剂型。

8. 制备由浓度在 30% -90% 的葫芦巴碱或其盐酸盐和浓度在 10% -30% 的 4- 羟基异亮氨酸或其盐酸盐和任选的赋形剂组成的药物组合物的方法,其中该方法包括下列步骤:

a. 剥离葫芦巴和 / 或小果咖啡的籽;

b. 使用己烷溶剂给剥离的籽脱脂;

c. 使脂族醇和水 1 : 9 至 9 : 1 的溶剂混合物通过经过脱脂的剥离的籽以便提取包含葫芦巴碱和氨基酸的溶剂,其中所述脂族醇选自乙醇、异丙醇和甲醇;

d. 对含有葫芦巴碱和氨基酸的步骤 (c) 的溶剂进行真空浓缩而得到半固体物质;

e. 将所述的半固体物质溶于去离子水而得到澄清溶液;

f. 使步骤 (e) 的澄清溶液通过离子交换树脂柱以保留所述氨基酸和葫芦巴碱;

g. 洗脱柱并且浓缩洗脱液而得到所得物质;

h. 干燥所得物质的澄清溶液而得到可自由流动的粉末;

i. 将所述的粉末溶于溶剂而得到包含葫芦巴碱和 4- 羟基异亮氨酸的所述澄清溶液;
和

j. 任选将步骤 (i) 的澄清溶液冷却至 0°C -5°C 的低温并且使氯化氢干燥气流通过它以便沉淀葫芦巴碱和 4- 羟基异亮氨酸的盐酸盐并且任选地加入赋形剂获得所述的组合物。

9. 如权利要求 8 中所述的方法,其中所述低温是 0°C。

10. 如权利要求 8 中所述的方法,其中所述的赋形剂选自成粒剂、粘合剂、润滑剂、崩解剂、助流剂、抗粘着剂、抗静电剂、表面活性剂、抗氧化剂、包衣衣料、着色剂、矫味剂、增塑剂、防腐剂、悬浮剂、乳化剂和滚圆剂。

11. 如权利要求 8 中所述的方法,其中将所述的籽剥成 2mm 厚度的大小。

12. 如权利要求 8 中所述的方法,其中在溶剂混合物中所述脂族醇和水的比例为 7 : 3。

13. 如权利要求 8 中所述的方法,其中用氨的水或醇溶液洗脱柱。

14. 如权利要求 8 中所述的方法,其中步骤 (i) 中的所述溶剂为乙醇或异丙醇。

15. 如权利要求 8 中所述的方法,其中浓缩在 40°C -80°C 的温度下进行。

16. 由葫芦巴碱或其盐酸盐和 4- 羟基异亮氨酸或其盐酸盐和任选的赋形剂组成的药物组合物在制备用于对需要的受试者控制与多巴胺相关的疾病的药物中的应用, 其中所述的多巴胺相关疾病为帕金森病。

17. 如权利要求 16 中所述的应用, 其中所述的受试者为动物, 包括人。

18. 由葫芦巴碱或其盐酸盐和 4- 羟基异亮氨酸或其盐酸盐和任选的赋形剂组成的药物组合物在制备用于对需要的受试者控制多巴胺受体拮抗剂导致的副作用的药物中的应用, 其中所述的副作用为因多巴胺受体拮抗剂阻断多巴胺受体导致的运动障碍。

19. 如权利要求 18 中所述的应用, 其中所述的受试者为动物, 包括人。

包含葫芦巴碱和 4- 羟基异亮氨酸的药物组合物及其方法

发明领域

[0001] 本发明涉及来自天然来源的新的组合物及其制剂。本发明还涉及新的组合物作为多巴胺能药在用于控制与多巴胺相关的病症,包括帕金森病中的应用。

[0002] 本发明还涉及与因抑制催乳素的化合物而减少催乳素,肌肉松弛,减少由抗精神病药导致的副作用,减轻因催乳素增加导致的性功能障碍和作为强化精神警觉度的化合物的相关的应用。

[0003] 发明背景和现有技术

[0004] 多巴胺为存在于脊椎动物和无脊椎动物中的激素和神经递质。从化学上讲,它是存在于脑中的苯乙胺并且作为活化特异性多巴胺受体 (D1-D5) 的神经递质起作用。多巴胺在脑中具有许多功能,包括在行为和认知,运动活性,动机和报答,调节产乳,睡眠,情绪,注意力和学习中的重要作用。多巴胺在食欲,社交能力,突出性 (salience),行为障碍,潜伏性抑制和创造力驱动中起重要作用。多巴胺还涉及调节催乳素分泌。

[0005] 多巴胺水平不足引起如颤动,强直和运动迟缓 (运动缓慢) 这类症状。在健康受试者中,神经元在脑和身体的其它部分中产生并且释放多巴胺。当一个神经元释放多巴胺时,它被下一个神经元的受体接受。这种链反应最终导致神经兴奋。各种神经性障碍可以干扰多巴胺产生并且导致脑中多巴胺水平下降。多巴胺水平异常还导致许多病症,其中的某些为慢性变性的 (如帕金森病)。

[0006] 多巴胺强烈影响运动和脑的思考区域。一种类型的多巴胺在运动和运动系统中起作用。当多巴胺水平下降至低于“正常范围”时,运动和大幅度运动问题开始出现。已知在脑的运动区中的多巴胺水平极低产生具有诸如如下症状的帕金森病:肌强直和僵硬,弯腰体位 / 不稳定体位,平衡和协调缺失,步态 (步型) 紊乱,运动缓慢和随意运动困难,小步步态 / 步行,肌痛,颤动和摇动,固定的面具脸表情,缓慢单调的言语,精细运动技能受损,在步行时跌倒和认知 / 智力能力受损。

[0007] 低水平多巴胺损害集中于环境或“锁定”任务、活动或交谈的能力。低水平多巴胺使得专注和集中极为困难并且还涉及注意力不集中的注意力缺陷多动症 (ADHD)。

[0008] 多巴胺还在抑制催乳素分泌方面起重要作用。催乳素为垂体中催乳激素分泌细胞分泌的肽激素。催乳素在诱导催乳和性欲望满足方面 (因多巴胺水平低导致。足够的多巴胺水平是性唤起所需的) 起重要作用。多巴胺作为主要的催乳素抑制因子起作用并且由下丘脑神经元分泌入门脉血流,结合泌乳细胞上的受体并且抑制催乳素合成和分泌。催乳素水平增加具有许多不良作用,如不育,多囊卵巢综合征 (PCOS),头痛,性欲减退和视力问题。高催乳素水平因许多因素导致,包括身体和精神紧张。因此,多巴胺能化合物 (增加多巴胺水平) 在调节 (限制) 催乳素水平方面起关键作用,由此控制高水平催乳素的各种作用。

[0009] 发现运动员、健身者和运动家实施的长期和大强度运动也导致催乳素水平增加。这种催乳素的增加使他们的性欲下降并且诱发性功能障碍。因此,多巴胺能药可以用于降低催乳素水平且由此通过维持这种激素在生理极限内消除所述副作用。

[0010] 多巴胺能药可以用作肌肉松弛药,因为它抑制乙酰胆碱产生的兴奋。因此,本发明

的多巴胺能物质可以用作运动生理学、麻醉和肌痉挛情况中的肌肉松弛药。

[0011] 低水平多巴胺的主要作用之一在于运动障碍。运动障碍是影响产生和控制运动的能力的一组疾病和综合征。为了产生任何形式的运动,甚至简单的运动也需要复杂信号网络的协调和行动。破坏这一系统中的任何部分都可能导致人产生过于弱,过于有力,过于共济失调或对在手边的任务的控制能力过差的运动。不需要的运动可以在静止时发生或有意识的运动可以变得不可能。这类情况称作运动障碍。

[0012] 在某些情况中,异常运动为低水平多巴胺的唯一症状。导致异常运动的病症包括:帕金森病,因药物或毒物导致的帕金森病,帕金森-加综合征(进行性核上麻痹,多系统萎缩和皮质-基底神经节变性)。

[0013] 这些病症因神经递质多巴胺缺乏或过量导致。药物疗法可以有助于补偿基底神经节回路的某些失衡。乙酰胆碱为有助于调节脑中多巴胺的兴奋性化学物质。在体内,在神经末梢上释放的乙酰胆碱导致肌肉收缩。

[0014] 帕金森病为进行性变性疾病,它破坏产生多巴胺的细胞并且在协调运动中产生问题。其特征在于颤动,强直,运动不能和体位不稳定。主要的生化异常在于多巴胺耗尽并且导致乙酰胆碱与多巴胺之间失衡。帕金森病的原因尚不清楚。几乎没有病例中存在弱的遗传相关性。它还可以因用作杀虫剂的环境毒素 MPTP(甲基苯基四氢吡啶)导致。

[0015] 帕金森病通常为 65 岁以后发生的中老年病症。它由脑中称作“黑质”或黑色物质的神经细胞群死亡导致,因它们在外观上看起来发暗。来自这些细胞的神经突出正常扩展至脑中另一个称作纹状体的区域,其中它们连接并且释放称作多巴胺的化学物质作为神经递质。

[0016] 黑质和纹状体有助于控制运动,包括我们开始运动的能力。在黑质纹状体途径缺失的情况下,帕金森病患者存在执行上的极度困难,诸如从椅子上站起和开始步行。他们也经历颤动增强和肌肉强直。

[0017] 目前治疗与多巴胺相关的疾病(例如:帕金森病和与低水平多巴胺相关的疾病)的方法包括:

[0018] L-多巴(二羟基苯丙氨酸)

[0019] 由于帕金森病的病因为释放多巴胺的神经细胞缺失,所以治疗该病的一种手段在于恢复脑中的多巴胺水平。多巴胺不通过血液进入脑。在神经细胞中,多巴胺由一系列酶催化的化学反应产生。该次序中的最后阶段为由氨基酸 L-多巴形成多巴胺。L-多巴易于从血液中交叉进入脑。帕金森病最普遍和有效的治疗在于给予片剂形式的 L-多巴。

[0020] L-多巴进入血流并且进入脑。在脑中,多巴脱羧酶将其转化成多巴胺。L-多巴在全身运动、面部表达和体位方面产生极为显著性的改善。然而,它对颤动、吞咽、平衡和运动缓慢开始的作用极差。

[0021] 其它药物与 L-多巴的联合用药

[0022] 将 L-多巴转化成多巴胺的酶多巴脱羧酶存在于血液和身体组织中。因此, L-多巴在血清中降解至 90% 的程度。这种情况因其它药物,如卡比多巴和苄丝肼抑制该酶而得到阻断。将它们与 L-多巴联用可增加其脑利用度。卡比多巴和苄丝肼不进入脑。

[0023] 托卡朋和安托卡朋(Entacapone)

[0024] L-多巴还被另一种酶 COMT(儿茶酚 O-甲基移位酶)破坏。这些药物抑制 COMPT

并且使得 L-多巴被脑利用。而这些药物与 L-多巴联用存在长期问题。在长期给予 L-多巴时,患者在其作用上可能发生波动。在动作发生上可能发生较大的延迟并且药物作用期可能缩短。患者还发生作用脱离期。这意味着患者在给药后长期完全起效良好,但他们可能发现这种药物作用突然终止了。

[0025] L-多巴的副作用:大部分患者感觉恶心;延长使用它可以诱发精神分裂症,尤其是幻觉和睡眠紊乱。持续使用还导致缓慢和不随意运动。

[0026] MAO 抑制(单胺氧化酶)

[0027] 增加脑中多巴胺形成的可选择方法通过给予 L-多巴以减少多巴胺分解来进行。多巴胺被酶单胺氧化酶(MAO),特别是 MAO-B 分解。司来吉兰抑制 MAO-B。

[0028] 受体激动剂

[0029] 能够通过使用直接对多巴胺受体起作用的药物补偿多巴胺缺失。药物,如溴隐亭、利舒脉为受体激动剂。它们刺激对多巴胺有应答的受体并且作为黑质纹状体神经元正常释放的多巴胺替代物起作用。这些药物诱导一定范围的不随意运动并且对控制许多重要激素分泌的垂体(大脑的一部分)中多巴胺受体起作用。多巴胺受体活化而抑制激素催乳素释放的副作用为不育和月经失调。

[0030] 抗胆碱能药

[0031] 在脑的纹状体中,多巴胺和乙酰胆碱都为神经递质。多巴胺导致神经细胞抑制,而乙酰胆碱导致其兴奋。当脑失去多巴胺细胞时,乙酰胆碱的活性为完整的。因此,一种策略在于减少乙酰胆碱并且平衡其作用与多巴胺的作用。抗胆碱能药在减轻颤动方面更有效,不过,它们对肌僵硬和运动困难不具有作用。这些药物存在许多副作用,如口干、视力模糊、便秘、排尿困难等。

[0032] US 专利 4880816 中描述了一种化合物,其中多巴胺与另一种分子 DHC,特别是具有血脑屏障穿透特性的葫芦巴碱以化学方式合并。在本文中,DHC 化合物作为多巴胺的辅助物起作用以便通过血脑屏障,并且断裂和消除。因此,它不会限定任何葫芦巴碱的多巴胺能作用。

[0033] 目前的疗法靶向症状缓解,且没有能够抑制神经元变性的活性剂。对长期控制并且副作用最少且功效最佳的较为平和和较为温和的疗法存在迫切需求。本发明满足了多巴胺能产品的迫切需求,该产品可以有效地用于控制与多巴胺缺乏相关的疾病,包括帕金森病。

[0034] 抗精神病药的主要缺点在于其阻断多巴胺的 D2 受体。因此,这些药物产生与阻断脑中多巴胺受体 D2 相关的运动障碍副作用。因此,多巴胺能药可以作为对作为抗精神病药副作用产生的不动性的响应。

[0035] 发明目的

[0036] 本发明的主要目的在于获得具有多巴胺能活性和其它相关药物活性的药物组合物。

[0037] 本发明的另一个主要目的在于获得包含葫芦巴碱或其衍生物和 4-羟基异亮氨酸或其衍生物任选与赋形剂的药物组合物。

[0038] 本发明的另一个目的在于研发制备包含葫芦巴碱或其衍生物和 4-羟基异亮氨酸或其衍生物任选与赋形剂的药物组合物的方法。

[0039] 本发明的另一个目的在于从植物来源提取葫芦巴碱和 4- 羟基异亮氨酸。

[0040] 本发明的另一个目的在于使用所述的药物组合物制备用于对有需要的受试者控制与多巴胺相关的疾病的药物。

[0041] 本发明的另一个目的在于使用所述的药物组合物制备用于对有需要的受试者控制由催乳素导致的不良作用的药物。

[0042] 本发明的另一个目的在于使用所述的药物组合物制备用于对有需要的受试者控制由多巴胺受体拮抗剂导致的副作用的药物。

[0043] 发明陈述

[0044] 因此,本发明涉及:具有多巴胺能活性和其它相关药物活性的药物组合物,其包含葫芦巴碱或其衍生物和 4- 羟基异亮氨酸或其衍生物任选与赋形剂;制备包含葫芦巴碱或其衍生物和 4- 羟基异亮氨酸或其衍生物任选与赋形剂的药物组合物的方法,其中该方法包括下列步骤:(a) 从植物来源提取包含葫芦巴碱和 4- 羟基异亮氨酸的澄清溶液;和 (b) 任选从该澄清溶液中沉淀葫芦巴碱和 4- 羟基异亮氨酸的衍生物并且获得所述组合物;包含葫芦巴碱或其衍生物和 4- 羟基异亮氨酸或其衍生物任选与赋形剂的药物组合物在制备用于对有需要的受试者控制与多巴胺相关的疾病的药物中的应用;包含葫芦巴碱或其衍生物和 4- 羟基异亮氨酸或其衍生物任选与赋形剂的药物组合物在制备用于对有需要的受试者控制由催乳素导致不良作用的药物中的应用;和包含葫芦巴碱或其衍生物和 4- 羟基异亮氨酸或其衍生物任选与赋形剂的药物组合物在制备用于对有需要的受试者控制由多巴胺受体拮抗剂导致副作用的药物中的应用。

[0045] 附图简述

[0046] 图 1:表示测试药物在减轻僵住症中的剂量依赖性反应。该图表示 IBH-B 作为本发明的测试药物。IBH-B(10, 30 或 100)+Hal(0.5) 和 L-多巴(10)+Hal(0.5) 的所有值在 $P < 0.001$ 下均有显著性并且 IBH-B(3)+Hal(0.5) 与 Hal(0.5) 在相应时间相比无显著意义。IBH-B 治疗显著减轻了氟哌啶醇诱导的僵住症。

[0047] 图 2:表示如图中 IBH-B 所示的测试药物使颤动评分显著下降。

[0048] 图 3:表示测试药物对酪胺增强作用的作用(急性研究)。

[0049] 图 4:表示测试药物对酪胺增强作用的作用(慢性研究)。

[0050] 图 5:例证测试化合物对 MAO-B 选择性抑制的响应曲线。

[0051] 发明详述

[0052] 本发明涉及具有多巴胺能活性和其它相关药物活性的药物组合物,其包含葫芦巴碱或其衍生物和 4- 羟基异亮氨酸或其衍生物任选与赋形剂一起。

[0053] 在本发明的另一个实施方案中,葫芦巴碱或其衍生物的浓度在 30% -90% 且 4- 羟基异亮氨酸或其衍生物的浓度在 10% -30%。

[0054] 在本发明的另一个实施方案中,所述的葫芦巴碱获自植物或动物来源。

[0055] 在本发明的另一个实施方案中,所述的葫芦巴碱获自葫芦巴 (*Trigonella foenum graecum*) 和小果咖啡 (*Coffee Arabica*)。

[0056] 在本发明的另一个实施方案中,所述的葫芦巴碱衍生物选自盐酸盐衍生物、乙酸盐衍生物、柠檬酸盐衍生物、苯甲酸盐衍生物、盐衍生物和酸衍生物,优选盐酸盐衍生物。

[0057] 在本发明的另一个实施方案中,4- 羟基异亮氨酸获自植物来源,优选葫芦巴。

[0058] 在本发明的另一个实施方案中,4-羟基异亮氨酸的衍生物选自盐酸盐衍生物、乙酸盐衍生物、柠檬酸盐衍生物、苯甲酸盐衍生物、盐衍生物和酸衍生物,优选盐酸盐衍生物。

[0059] 在本发明的另一个实施方案中,所述的赋形剂选自成粒剂,粘合剂,润滑剂,崩解剂,甜味剂,助流剂,抗粘着剂,抗静电剂,表面活性剂,抗氧化剂,树胶,包衣衣料,着色剂,矫味剂,增塑剂,防腐剂,悬浮剂,乳化剂和滚圆剂。

[0060] 在本发明的另一个实施方案中,将所述的组合物配制成选自片剂,含片,锭剂,水或油混悬液,软膏剂,贴剂,凝胶,洗剂,牙粉,胶囊,乳剂,霜剂,喷雾剂,滴剂,可分散粉末或颗粒,在硬胶囊或软胶囊中的乳剂,糖浆剂,酏剂,植物制品,营养制品和食品的剂型。

[0061] 在本发明的另一个实施方案中,所述的其它相关药物活性选自抑制催乳素,肌肉松弛,作为儿茶酚胺类前体和减少性功能障碍的作用和抗精神病药导致的副作用。

[0062] 本发明还涉及制备包含葫芦巴碱或其衍生物和4-羟基异亮氨酸或其衍生物任选与赋形剂一起的药物组合物的方法,其中该方法包括下列步骤:

[0063] a) 从植物来源提取包含葫芦巴碱和4-羟基异亮氨酸的澄清溶液;和

[0064] b) 任选从所述的澄清溶液中沉淀葫芦巴碱和4-羟基异亮氨酸的衍生物并且获得所述的组合物。

[0065] 在本发明的另一个实施方案中,葫芦巴碱或其衍生物的浓度在30% -90%且4-羟基异亮氨酸或其衍生物的浓度在10% -30%。

[0066] 在本发明的另一个实施方案中,所述的赋形剂选自成粒剂,粘合剂,润滑剂,崩解剂,甜味剂,助流剂,抗粘着剂,抗静电剂,表面活性剂,抗氧化剂,树胶,包衣衣料,着色剂,矫味剂,增塑剂,防腐剂,悬浮剂,乳化剂和滚圆剂。

[0067] 在本发明的另一个实施方案中,所述的衍生物选自盐酸盐衍生物,乙酸盐衍生物,柠檬酸盐衍生物,苯甲酸盐衍生物,盐衍生物和酸衍生物,优选盐酸盐衍生物。

[0068] 在本发明的另一个实施方案中,所述的澄清溶液提取自植物葫芦巴和/或小果咖啡,该方法包括下列步骤:

[0069] a. 剥离葫芦巴属和/或小果咖啡的籽;

[0070] b. 使用己烷溶剂给剥离的葫芦巴属(*Trigonella*)籽脱脂;

[0071] c. 使脂族醇和水的溶剂混合物通过剥离的籽以便提取包含葫芦巴碱和氨基酸的溶剂;

[0072] d. 对溶剂进行真空浓缩而得到半固体物质;

[0073] e. 将所述的半固体物质溶于去离子水而得到澄清溶液;

[0074] f. 使步骤(e)的澄清溶液通过离子交换树脂柱以保留氨基酸和葫芦巴碱;

[0075] g. 洗脱柱并且浓缩洗脱液而得到所得物质;

[0076] h. 干燥所得物质的澄清溶液而得到可自由流动的粉末;和

[0077] i. 将所述的粉末溶于溶剂而得到包含葫芦巴碱和氨基酸的所述澄清溶液。

[0078] 在本发明的另一个实施方案中,将所述的籽剥离成优选约2mm厚度的大小。

[0079] 在本发明的另一个实施方案中,所述的溶剂混合物包含1:9-9:1,优选7:3比例的脂族醇和水。

[0080] 在本发明的另一个实施方案中,所述的脂族醇为乙醇。

[0081] 在本发明的另一个实施方案中,用氨的水或醇溶液洗脱柱。

[0082] 在本发明的另一个实施方案中,所述的溶剂选自杂环芳族化合物,脂族化合物,酮类,氰化物,醇类,腈类,酯类,醚及其一种或多种的混合物。

[0083] 在本发明的另一个实施方案中,所述的溶剂为乙醇。

[0084] 在本发明的另一个实施方案中,在 40°C -80°C 的温度下进行浓缩。

[0085] 在本发明的另一个实施方案中,所述的氨基酸为 4- 羟基异亮氨酸。

[0086] 本发明还涉及包含葫芦巴碱或其衍生物和 4- 羟基异亮氨酸或其衍生物任选与赋形剂一起的药物组合物在制备用于对有需要的受试者控制与多巴胺相关的疾病的药物中的应用。

[0087] 在本发明的另一个实施方案中,所述的受试者为动物,包括人。

[0088] 本发明还涉及包含葫芦巴碱或其衍生物和 4- 羟基异亮氨酸或其衍生物任选与赋形剂一起的药物组合物在制备用于对有需要的受试者控制由催乳素导致不良作用的药物中的应用。

[0089] 在本发明的另一个实施方案中,由催乳素导致的不良作用选自不育、多囊卵巢病和泌乳增加。

[0090] 在本发明的另一个实施方案中,所述的受试者为动物,包括人。

[0091] 本发明还涉及包含葫芦巴碱或其衍生物和 4- 羟基异亮氨酸或其衍生物任选与赋形剂一起的药物组合物在制备用于对有需要的受试者控制由多巴胺受体拮抗剂导致副作用的药物中的应用。

[0092] 在本发明的另一个实施方案中,所述的副作用为多巴胺受体拮抗剂阻断多巴胺受体导致的运动障碍。

[0093] 在本发明的另一个实施方案中,所述的受试者为动物,包括人。

[0094] 本发明的一个实施方案涉及包含葫芦巴碱,其衍生物,4 羟基异亮氨酸,其衍生物和任选的赋形剂的组合物在制备具有多巴胺能活性的药物中的应用。所述的葫芦巴碱可以来源于植物和动物来源。该组合物用于增加脑中的多巴胺浓度且由此改善与低多巴胺水平相关的疾患,诸如帕金森病,运动障碍等。该组合物用于与催乳素抑制,停止泌乳,肌肉松弛,减轻性功能障碍,提高精神警觉度和其它多巴胺相关功能相关的活性。该实施方案的另一个方面在于具有多巴胺能活性的组合物为选择性单胺氧化酶 B 抑制剂。本发明的另一个方面在于具有多巴胺能活性的组合物与含酪胺的物质不发生相互作用且由此在受试者摄入具有高水平酪胺的物质时不会升高血压。

[0095] 本发明的另一个实施方案涉及组合物在制备具有能够抑制需要的受试者催乳素水平的多巴胺能活性的药物中的应用。本发明的另一个方面涉及该组合物在治疗多囊卵巢病中的应用。本实施方案的另一个方面涉及该组合物在制备用于治疗不育的药物中的应用。本实施方案的另一个方面在于制备用于调节人性激素水平的药物。

[0096] 本发明的另一个实施方案涉及具有多巴胺能活性的组合物在制备减轻由多巴胺受体拮抗剂导致的伤害,由此诱导不动性的药物中的应用。

[0097] 本发明的另一个实施方案涉及具有多巴胺能和药物活性的组合物,其包含葫芦巴碱,葫芦巴碱衍生物,4 羟基异亮氨酸,其衍生物和赋形剂。

[0098] 本发明包含葫芦巴碱或其衍生物和 4- 羟基异亮氨酸或其衍生物任选与赋形剂一起的组合物在本文中还可称作本说明书中的测试药物或测试化合物。

[0099] 本发明目前的实施方案的主要优点在于测试药物为单胺氧化酶-B抑制剂。它因这种选择性而不会引起对膳食酪胺的应答,由此防止了为非-选择性MAO抑制剂的主要副作用的“干酪反应”。第二个优点在于具有多巴胺能活性的该组合物可以减少抗精神病药物的副作用。第三,该组合物还可以抑制催乳素分泌,这为一个主要优点。

[0100] 本发明详细描述了用于从诸如葫芦巴和小果咖啡(植物名)这类植物中分离和纯化化学标记的方法。所述的化学标记为生物碱葫芦巴碱并且作为其盐酸盐,乙酸盐,柠檬酸盐,磺酸盐,甲磺酸盐,氢碘酸盐,苯甲酸盐或酸性无机和有机酸盐提取,但优选作为盐酸盐提取。研究这种纯化的提取物在各种典型动物模型中的生物活性。该化合物的一个新的方面在于它具有如通过作为每个批准的方案的具体动物实验证实的多巴胺样活性。因此,已经通过我们的发明首次证实化合物葫芦巴碱表现出多巴胺能活性。

[0101] 一个实施方案的简述如下:

[0102] a. 剥离包含葫芦巴碱的籽,例如葫芦巴子或小果咖啡籽以暴露内核,从而确保有效脱脂,提取和加工。

[0103] b. 使己烷溶剂反复通过葫芦巴子床以便对葫芦巴子进行有效脱脂。该操作不必对小果咖啡籽进行。

[0104] c. 将剥离的籽载入渗滤液并且使由脂族醇和水组成的溶剂混合物通过该层以便对所述的葫芦巴碱和氨基酸(4-羟基异亮氨酸)与皂苷进行有效提取。

[0105] d. 在低温下对溶剂进行真空浓缩以确保物质的完整性并且将所得物质溶于去离子水而得到澄清溶液。

[0106] e. 使由此获得的澄清溶液通过凝胶形式的强酸阳离子交换树脂以保留所述的氨基酸和葫芦巴碱。

[0107] f. 使用去离子水洗涤柱以使不含所有杂质和颜色并且用具有5N浓度强度的氨的水溶液或醇溶液洗脱柱。

[0108] g. 在真空中浓缩溶剂洗脱液中洗脱的化合物以便除去水和溶剂并且溶解所得物质且过滤而得到澄清溶液。

[0109] h. 对获得的澄清溶液进行喷雾干燥而得到可自由流动的粉末并且可以照此使用。

[0110] i. 将粉末再溶于异丙醇或乙醇而得到澄清溶液。

[0111] j. 对纯化的提取物进行HPLC测定以证实该分析。

[0112] 此外,使澄清的醇溶液任选接触氯化氢气流以便将葫芦巴碱和4-羟基异亮氨酸转化成其相应的盐酸盐衍生物。

[0113] 将作为葫芦巴碱和/或其衍生物和4-羟基异亮氨酸和/或其衍生物的上述化合物的纯化提取物给予Swiss Albino小鼠作为每个氟哌啶醇方案。这会诱发帕金森症状。该提取物以剂量依赖性方式逆转这些症状,从而证实该提取物的多巴胺能或多巴胺样活性。

[0114] 将作为葫芦巴碱和/或其衍生物和4-羟基异亮氨酸和/或其衍生物的上述化合物的纯化提取物给予Swiss Albino小鼠以便检验它在氧代震颤素拮抗机制中的作用。这证实了适度的抗胆碱能活性,使得它明显地适合于帕金森病治疗。

[0115] 合并了适度抗胆碱能作用的多巴胺作用为治疗与多巴胺相关的病症,包括帕金森病的最佳方法。帕金森病不仅因多巴胺耗尽引起,而且因多巴胺和乙酰胆碱失衡导致。

[0116] 多巴胺为肾上腺素和去甲肾上腺素的前体。因此,该化合物可以增加肾上腺素的

浓度并且提高精神警觉度和行为。多巴胺为抑制性神经递质。它可以控制乙酰胆碱的作用。提出的提取物和化合物可以用于运动生理学中的肌肉松弛目的。

[0117] 多巴胺能物质降低激素催乳素水平。催乳素涉及性功能障碍。该化合物可以用于抑制催乳素。催乳素诱导哺乳母亲泌乳。多巴胺能物质抑制催乳素。该化合物可以用于终止泌乳。

[0118] 在本发明的另一个实施方案中,具有多巴胺能活性的组合物来源于植物来源。

[0119] 1. 使用滚筒式刨片机将葫芦巴子或任意其它包含葫芦巴碱如小果咖啡籽的籽剥离至 1mm-4mm 大小的厚度大小。通过剥离至优选 2mm 厚度大小暴露内核。将剥离的籽装入安装了适当筛目,优选 100 目的底部滤器的提取器,以便确保籽粉不会与溶剂一起运动。使己烷通过包紧的籽层渗滤。

[0120] 2. 使渗滤的溶剂在 8-10 小时期限内有效再循环,使得所得葫芦巴籽粉不含油和脂质。这种去脂质化操作不必对小果咖啡籽进行。

[0121] 3. 用包含 1 : 9-9 : 1, 优选 7 : 3 比例的含水脂族醇的溶剂混合物作为溶剂再提取己烷提取的粉。就小果咖啡籽而言,使醇溶剂减少至 9 份水与 1 份醇的最低醇组成。所述的醇可以为甲醇,乙醇,异丙醇且优选乙醇作为醇溶剂。使含水醇混合物从上部经渗滤器中的葫芦巴子层到达底部。使该溶剂再循环过程在室温下持续 8 小时-10 小时,优选 8 小时的时间期限。通过视觉检查来自底部渗滤器的澄清提取物中任何悬浮的颗粒,且如果必要再过滤。

[0122] 4. 在 50°C -75°C, 优选 55°C 的温度下对澄清滤液进行真空浓缩至得到糊状物质并且回收溶剂。将该糊状物再溶于去离子水而得到由约 5% 固体含量组成的澄清溶液。

[0123] 5. 使所述的澄清溶液通过由凝胶形式的强酸阴离子组成的离子交换树脂柱并且用 5N 氨水溶液洗脱。还可以用氨的水醇溶液,优选乙醇、异丙醇或甲醇按照 1 : 1 比例洗脱柱。

[0124] 6. 将解吸的溶液真空浓缩至 50% 固体含量并且在直流喷雾干燥器中喷雾干燥成粉末。任选将通过上述方式获得的粉末按照 1 : 20 粉末与醇比例溶于乙醇或异丙醇且然后过滤。

[0125] 7. 任选将澄清滤液冷却至 0°C -5°C, 优选 0°C 的低温并且使氯化氢干燥气流通过它以便沉淀作为其相应的盐酸盐衍生物的葫芦巴碱和 4 羟基异亮氨酸。过滤沉淀的衍生物并且洗涤掉杂质且在 60°C -90°C 的真空干燥。

[0126] 进一步借助于下列实施例阐述本发明。然而,这些实施例不应用于限制本发明的范围。

[0127] 实施例 1 :

[0128] 在滚筒式刨片机中将具有含水量低于 5% 的 1000 克葫芦巴子剥离至 2mm 厚度。使剥离的物质上具有 300mm 床高的柱。在 35°C 下使 5 升己烷通过葫芦巴子层并且使从底部收集的洗脱液再循环通过葫芦巴子层 10 小时期限。10 小时后,从葫芦巴子层排空己烷。在 35°C 下使由异丙醇和水按照 4 : 1 比例组成的溶剂混合物 (8 升) 经再循环洗脱液通过该层 8 小时期限。8 小时后,从葫芦巴床排空提取物并且在 50°C 下和真空中浓缩所有收集的提取物而得到半固体物质。

[0129] 将浓缩的物质再溶于 5 升去离子水而得到澄清溶液。使该澄清溶液通过含 400ml

强酸阳离子交换凝胶型树脂的柱 2 小时。使用由正 - 丁醇 : 乙酸 : 水按照 12 : 8 : 4 比例组成的系统作为流动相在硅胶预涂布板 F254 (1. 05554. 007) 上检查柱洗脱液上进行 TLC 筛选, 不存在葫芦巴碱, 并且在 UV 254nm 下观察。在饱和柱后, 使用 4 升去离子水洗涤掉树脂床的颜色和粘附的杂质。使用 800ml 5N 浓度的氨水以 400ml/ 小时的速率解除吸收柱。在 45°C 下和真空中将洗脱出的混合物浓缩至得到半固体物质。

[0130] 将干燥的物质再溶于 150ml 去离子水并且过滤出不溶物。在 50°C 下和真空中将该溶液浓缩至得到 20% 固含量并且在直流间接热空气喷雾干燥器中和下列条件下干燥。

[0131] 入口温度 :160°C

[0132] 出口温度 :80°C

[0133] 喷雾器 RPM :12000

[0134] 产量为 9gms。(HPLC 显示 25% 葫芦巴碱 & 35% 氨基酸)

[0135] 将上述物质再溶于 250ml 乙醇, 通过 41Whatmann 滤纸过滤并且冷却至 0°C。在该温度下, 使干燥的氯化氢气流通过它以便沉淀所述的葫芦巴碱盐酸盐。将该沉淀过滤在滤纸上并且用冷乙醇洗涤且在 60°C 下真空干燥。

[0136] 实施例 2 :

[0137] 在滚筒式刨片机中将具有含水量低于 5% 的 1000 克葫芦巴子剥离至 2mm 厚度。使剥离的物质上具有 300mm 床高的柱。在 35°C 下使 5 升己烷通过葫芦巴子层并且使从底部收集的洗脱液再循环通过葫芦巴子层 10 小时期限。10 小时后, 从葫芦巴子层排空己烷。在 35°C 下使由异丙醇和水按照 4 : 1 比例组成的溶剂混合物 (8 升) 经再循环洗脱液通过该层 8 小时期限。8 小时后, 从葫芦巴床排空提取物并且在 50°C 下和真空中浓缩所有收集的提取物而得到半固体物质。

[0138] 将浓缩的物质再溶于 5 升去离子水而得到澄清溶液。使该澄清溶液通过含 400ml 强酸阳离子交换凝胶型树脂的柱 2 小时。使用由正 - 丁醇 : 乙酸 : 水按照 12 : 8 : 4 比例组成的系统作为流动相在硅胶预涂布板 F254 (1. 05554. 007) 上检查柱洗脱液上进行 TLC 筛选, 不存在葫芦巴碱, 并且在 UV 254nm 下观察。在饱和柱后, 使用 4 升去离子水洗涤掉树脂床的颜色和粘附的杂质。使用 800ml 5N 浓度的氨水以 400ml/ 小时的速率解除吸收柱。在 45°C 下和真空中将洗脱出的混合物浓缩至得到半固体物质。

[0139] 将干燥的物质再溶于 150ml 去离子水并且过滤出不溶物。在 50°C 下和真空至将该溶液浓缩至得到 20% 固含量并且在直流间接热空气喷雾干燥器中和下列条件下干燥。

[0140] 入口温度 :160°C

[0141] 出口温度 :80°C

[0142] 喷雾器 RPM :12000

[0143] 产量为 9gms。(HPLC 显示 35% 葫芦巴碱 & 20% 4- 羟基异亮氨酸)

[0144] 实施例 3 :

[0145] 在滚筒式刨片机中将具有含水量低于 5% 的 1000 克葫芦巴子剥离至 2mm 厚度。使剥离的物质上具有 300mm 床高的柱。在 35°C 下使 5 升己烷通过葫芦巴子层并且使从底部收集的洗脱液再循环通过葫芦巴子层 10 小时期限。10 小时后, 从葫芦巴子层排空己烷。在 35°C 下使由异丙醇和水按照 3.5 : 1 比例组成的溶剂混合物 (8 升) 经再循环洗脱液通过该层 8 小时期限。8 小时后, 从葫芦巴床排空提取物并且在 50°C 下和真空中浓缩所有收集

的提取物而得到半固体物质。

[0146] 将浓缩的物质再溶于 5 升去离子水而得到澄清溶液。使该澄清溶液通过含 400ml 强酸阳离子交换凝胶型树脂的柱 2 小时。使用由正 - 丁醇 : 乙酸 : 水按照 12 : 8 : 4 比例组成的系统作为流动相在硅胶预涂布板 F254 (1. 05554. 007) 上检查柱洗脱液上进行 TLC 筛选, 不存在葫芦巴碱, 并且在 UV 254nm 下观察。在饱和柱后, 使用 4 升去离子水洗涤掉树脂床的颜色和粘附的杂质。使用 800ml 5N 浓度的氨水以 400ml/ 小时的速率解除吸收柱。在 45°C 下和真空中将洗脱出的混合物浓缩至得到半固体物质。

[0147] 将干燥的物质再溶于 150ml 去离子水并且过滤出不溶物。在 50°C 下和真空至将该溶液浓缩至得到 20% 固含量并且在直流间接热空气喷雾干燥器中和下列条件下干燥。

[0148] 入口温度 :160°C

[0149] 出口温度 :80°C

[0150] 喷雾器 RPM :12000

[0151] 产量为 10gms。 (HPLC 显示 35% 葫芦巴碱 & 18% 4- 羟基异亮氨酸氨基酸)

[0152] 将上述物质再溶于 250ml 乙醇, 通过 41Whatmann 滤纸过滤并且冷却至 0°C。使干燥的氯化氢气流通过它以便沉淀所述的葫芦巴碱盐酸盐。将该沉淀过滤在滤纸上并且用冷乙醇洗涤且在 60°C 下真空干燥。

[0153] 实施例 4 :

[0154] 在滚筒式刨片机中将具有含水量低于 5% 的 1000 克绿小果咖啡剥离至 2mm 厚度。使剥离的物质上具有 500mm 床高的柱。在 35°C 下通过再循环洗脱液使包含 9 : 1 比例的水和乙醇的溶剂混合物 (8 升) 通过该层 8 小时期限。8 小时后, 从小果咖啡床中排空提取物并且在 50°C 下和真空中浓缩所有收集的提取物而得到半固体物质。

[0155] 将浓缩的物质再溶于 5 升去离子水而得到澄清溶液。使该澄清溶液通过含 400ml 强酸阳离子交换凝胶型树脂的柱 2 小时。使用由正 - 丁醇 : 乙酸 : 水按照 12 : 8 : 4 比例组成的系统作为流动相在硅胶预涂布板 F254 (1. 05554. 007) 上检查柱洗脱液上进行 TLC 筛选, 不存在葫芦巴碱, 并且在 UV 254nm 下观察。在饱和柱后, 使用 4 升去离子水洗涤掉树脂床的颜色和粘附的杂质。使用 800ml 5N 浓度的氨水以 400ml/ 小时的速率解除吸收柱。在 45°C 下和真空中将洗脱出的混合物浓缩至得到半固体物质。

[0156] 将干燥的物质再溶于 150ml 去离子水并且过滤出不溶物。在 50°C 下和真空至将该溶液浓缩至得到 20% 固含量并且在直流间接热空气喷雾干燥器中和下列条件下干燥。

[0157] 入口温度 :160°C

[0158] 出口温度 :80°C

[0159] 喷雾器 RPM :12000

[0160] 产量为 5 克。 (HPLC 显示 60% 葫芦巴碱 & 剩余的氨基酸)

[0161] 将上述物质再溶于 200ml 乙醇, 通过 41Whatmann 滤纸过滤并且冷却至 0°C。使干燥的氯化氢气流通过它以便沉淀所述的葫芦巴碱盐酸盐。将该沉淀过滤在滤纸上并且用冷乙醇洗涤且在 60°C 下真空干燥。

[0162] 实施例 5 :

[0163] 在 Commuting 碾磨机中将不含羊皮纸状壳的 1000 克绿小果咖啡粉碎成 100% 通过 20 目筛。用 6 升去离子水在 95-100°C 将破碎的籽煮沸 4 小时并且通过滤布过滤出所有

不溶物而达到澄清。将该澄清溶液冷却至室温并且在 3 小时期限内通过包含 500ml 新鲜再生的强酸阳离子交换树脂的离子交换树脂柱。使用由 N-丁醇：乙酸：水按照 10：8：5 比例组成的 TLC 系统监测底部洗脱液不存在葫芦巴碱并且通过 UV 在 254nm 处显影。

[0164] 使用 5 升软化水洗涤掉柱柱的所有颜色和杂质。用 600ml 6%氨溶液洗脱柱并且使用上述提及的 TLC 系统检查洗脱完全。在 50℃下和真空柱将洗脱的液体浓缩至得到糊状物。在 75℃下将该糊状物与 100ml 20%在异丙醇中的盐酸气体一起研磨 3 小时并且冷却至室温。过滤所得沉淀并且使用 500ml 异丙醇洗涤掉颜色。在 80℃下和真空中干燥固体而得到 10 克可自由流动的粉末。

[0165] 使用包含葫芦巴碱和 4HI 以及葫芦巴碱衍生物（盐酸盐）和 4HI 衍生物（盐酸盐）的新组合物实施下列实施例。

[0166] 实施例 6：氟哌啶醇诱导的小鼠僵住症

[0167] 氟哌啶醇为阻断脑中多巴胺 D2 受体的精神抑制剂。它引起可以通过“小鼠僵住钢棒测温法”测定的锥体外系副作用。将小鼠僵住症定义为在延长时间内校正外部施加的非正常姿态失败。这种小鼠的僵住症与在具有帕金森病的受试者中观察到的运动不能、肌僵直和颤动相差无几。如果将多巴胺能药物提供给脑纹状体多巴胺，那么可以逆转氟哌啶醇诱发的僵住，因为它增加竞争性拮抗作用。

[0168] 操作：使用称重为 23-28g 的两性别的 Swiss Albino 小鼠。用氟哌啶醇诱导僵住 (0.5mg/kg i. p.) 并且通过钢棒测温法评价至多 3 小时。通过腹膜内对 6 只动物给予盐水、测试药物和标准品。将动物放入具有距盒底部 2.5cm 水平固定的木制传力杆的半透明塑料盒中。使动物适应该盒 2min。然后在双肩周围和前爪下轻握每只动物并且谨慎放在传力杆上。测定棒上使用至少一只前爪花费的时间量。当动物移动其爪时，记录时间并且使小鼠重新位于棒上。在 30, 60, 120 和 360min 对每只动物进行三次试验，其中每组中 6 只动物。

[0169] 测试药物已经在减轻僵住方面显示出显著的剂量依赖性响应（图 1）。发现 10mg/kg 剂量的标准药物 L-多巴的作用比 100mg/kg 剂量的测试药物更有效。尽管这种差异显著，但是证实测试药物可快速起效并且避免了存在于标准药物中的“起效-停止”作用。此外，标准药物在对僵住的起始作用后表现出僵住减轻的下降。这证实了测试药物的多巴胺能作用（图 1）。因此，可以观察到测试药物逆转氟哌啶醇诱发的帕金森症状。

[0170] 逆转氟哌啶醇诱发的僵住证实测试药物组合物将为多巴胺受体拮抗剂的氟哌啶醇导致的副作用减小到最低限度的能力。因此，这表明该药物为可以用于将多巴胺受体拮抗剂，包括抗精神病药物的作用减少到最低限度的多巴胺能药。

[0171] 实施例 7：氧代震颤素拮抗作用

[0172] 氧代震颤素为胆碱能药，其为毒蕈碱激动剂并且诱导帕金森综合病样体征，诸如颤动、共济失调、痉挛状态、唾液分泌、流泪和低体温。氧代震颤素为胆碱能药，它诱导小鼠过度颤动。如果药物具有抗胆碱能特性，如阿托品，那么可以减轻颤动。

[0173] 操作：使用称重为 18-22g 的 6-10 只雄性 NMRI 小鼠的组。通过口服对它们给予测试化合物或标准品 (5mg/kg 甲磺酸苯扎托品 (benzotropine mesilate)) 1 小时，此后给予 0.5mg/kg 氧代震颤素。以 5min 时间期限对氧代震颤素给药后给颤动评分 1 小时。

[0174] 在给予 0.5mg/kg 氧代震颤素后，颤动在 15mins 内开始并且持续 30mins。

[0175] 参数：

[0176]

颤动评分		氧代震颤素 (oxotrmorine) 注射后 30 mins 的唾液分泌和流泪	
不存在	0	不存在	0
轻度	1	轻度	1
中度	2	中度	2
重度	3	重度	3

[0177] 每组中使用的动物数量 $n = 6$ [0178] 颤动评分

[0179]

类别	颤动评分 5 分钟	颤动评分 15 分钟	颤动评分 30 分钟	颤动评分 45 分钟
仅对照组氧代震颤素 $n = 6$	3.0	2.8	2.7	2.6
测试化合物组 30mg/kg 和氧代震颤素 $n = 6$	2.7	2.6	2.5	2.5
测试化合物组 100mg/kg 和氧代震颤素 $n = 6$	1.6	1.6	1.8	1.9
测试化合物组 200mg/kg 和氧代震颤素 $n = 6$	1.6	1.6	1.7	1.6
阳性对照阿托品 5mg/kg 和氧代震颤素 $n = 6$	0.9	0.9	1.0	1.3

[0180] 测试化合物已经通过在 100mg/kg 和 200mg/kg 剂量下减小颤动评分表现出显著活性。这种活性为一致性的并且持续至多 45 分钟。在 30mg/kg 下的活性低。阳性对照阿托品具有测试活性,但随时间下降。因此,测试药物因适度抗胆碱能活性而逆转帕金森症状。

[0181] 唾液分泌和流泪评分

[0182]

类别	30 分钟时的唾液分泌	30 分钟时的流泪评分
仅对照组氧代震颤素 $n = 6$	3.0	2.9
在 30mg/kg 下的测试化合物	2.5	2.6
在 100mg/kg 下的测试化合物	1.6	1.7

阿托品	0.8	0.6
-----	-----	-----

[0183] 测试化合物已经表现出减小唾液分泌评分。然而,并非如阿托品一样强有力,由此表明了适度的抗胆碱能作用。还减少了流泪。然而,并非如阿托品一样强有力。

[0184] 1mg/kg 阿托品和 100、200 和 400mg/Kg 测试药物导致颤动显著减轻(图 2)并且在 30mg/kg 剂量下不显著。该药物在 30min 时表现出最大作用,并且在 45min 后开始逆转。因此,测试药物在极高剂量下具有抗胆碱能特性。

[0185] 实施例 8 :6-羟基多巴胺模型

[0186] 6-羟基多巴胺(6-OHDA)为导致多巴胺能黑质纹状体途径一侧损伤的神经毒素,所述的多巴胺能黑质纹状体途径诱导受损侧纹状体中突触后多巴胺能受体超敏反应。对损害侧(同侧)循环给予间接起效的化合物,如苯丙胺,与之相反,此时给予直接起效的多巴胺能药,然后对侧循环给药。因此,本试验用于研究中枢多巴胺功能并且评价多巴胺拮抗剂和激动剂,特别是新的抗帕金森症药的活性。本试验将主要具有多巴胺受体激动剂活性的药物与主要具有多巴胺释放药物活性的那些明显区别开来。

[0187] 操作:使用手术时称重为 200-250 克的雄性 Wistar 小鼠。使它们寄居在可自由取食和饮水的受控环境中。使用戊巴比妥钠麻醉动物。将头放入立体定位装置(DKI 900)并且按照 Konig 和 Klippel 的图谱放置。在头盖骨皮肤上做矢状切开后,使用电环钻机钻 2mm 宽孔。谨慎不损害脑膜。与汉密尔顿氏注射器连接 30 标准规格不锈钢插管的目标针对黑质前带致密层(距仪器零点坐标前 1.88mm,侧向 2.0mm 和背腹侧 -8.2mm)。以 1 μ L/min 的速率注射总计在 4 μ L 盐水中的 8 μ g 6-OHDA。在颅内注射后,闭合伤口。

[0188] 使动物恢复几周并且进行损害研究。与固态编制程序仪器连接的特别构成的不透明塑料球用作测试室。整个数量相对于损害同侧或对侧旋转,每隔 15min 记录在自动输出情报指示纸带计数器上,持续 1 或 2 小时测试期。为了测定同侧旋转的对照值,对每位受试者给予 2.5mg/kg d-苯丙胺并且即刻放入旋转室 2 小时。通过注射 1mg/kg s.c. 阿扑吗啡并且记录大鼠旋转 1 小时测定对侧转圈的对照值。i.p 或 sc. 给予测试化合物并且将动物放入转圈室。在 1 小时期限内记录旋转次数。本实验在 30 只动物中进行并且将平均值列在下表中。

[0189]

药物和剂量	对侧旋转	同侧旋转
无菌水	1	0.33
测试药物 (10mg/kg)	0.67	5.33
测试药物 (30mg/kg)	0.83	30.67
测试药物 (100mg/kg)	0.35	10.4
阿扑吗啡 (0.3mg/kg)	169.33	0.67
L-多巴 (10mg/kg)	45.67	0.83

[0190] 测试药物在 30mg/kg 剂量 ($P < 0.001$) 和 10mg/kg 剂量 ($P < 0.05$) 下诱导显著的同侧旋转。本试验模拟多巴胺耗尽和随后的帕金森病。抗帕金森病化合物可以具有对侧或同侧旋转。药物,如苯丙胺诱导同侧旋转。而药物,如 L-多巴,阿扑吗啡,溴隐亭诱导对侧旋转。单胺氧化酶 B 抑制剂,如 Selgiline 诱导同侧旋转。COMT 抑制剂诱导对侧旋转。

[0191] 测试药物特性类似于苯丙胺或单胺氧化酶 (MAO-B) 抑制剂。因此,测试药物可以具有多巴胺释放特性,该特性与在这些剂量下的对照组相比具有显著性。

[0192] 这种模型为测定化合物是否为多巴胺能化合物或对多巴胺受体起作用的化合物的一种重要模型。使用测试化合物的同侧旋转证实了其多巴胺能活性。不同于目前类型的表现出对侧旋转的药物,测试化合物为多巴胺能药,而非受体激动剂。

[0193] 本实验证实了测试药物的独特多巴胺能活性。因此,这种多巴胺能组合物可以具有涉及提高多巴胺水平的应用。提高多巴胺水平对催乳素水平具有抑制作用。提高的催乳素水平为 PCOS 和不育的原因之一。这种多巴胺能化合物通过提高多巴胺水平抑制催乳素水平。

[0194] 这种多巴胺能化合物也作为肌肉松弛药应用。

[0195] 实施例 9 :测试药物对 MPTP 治疗小鼠的作用的测试

[0196] 本试验测定 MPTP (甲基苯基四吡啶) 治疗的小鼠在它们被使用测试药物预治疗和治疗后运动行为的作用程度。

[0197] 当通过全身途径给予 MPTP 时,它导致多巴胺系统功能的暂时性受损。本试验有助于确定神经变性过程的病理生理学和神经营养药和神经保护药的作用。

[0198] MPTP 显著减少了小鼠运动行为。测试药物的功效基于 MPTP 治疗的小鼠中运动活动的增加百分比。

[0199] 根据如下情况测定运动行为 :

[0200] 1. 自发性运动

[0201]

治疗	平均值 \pm SEM	%增加
未治疗	868.166 \pm 17.377	-
MPTP	290.166 \pm 18.679 ^{###}	-
测试药物 (前):预防	564.166 \pm 24.106 ^{***}	94.43%
测试药物 (后):治疗	280.500 \pm 23.891 ^{ns}	-3.33%

[0202] 使用测试药物预-治疗小鼠显著减少了 MPTP 的作用。尽管预-治疗产生了联合效果,但是使用测试药物治疗小鼠,使用 MPTP 处理后未表现出运动活动增加。

[0203] 2. 开放区域中交叉的正方形数量

[0204]

治疗	平均值 \pm SEM	%增加
未治疗	465.500 \pm 18.005	-

MPTP	122.333±8.151 ^{###}	-
测试药物(前):预防	250.166±12.908 ^{***}	104.49%
测试药物(后):治疗	143.166±12.475 ^{ns}	17.03%

[0205] 使用测试药物预-治疗小鼠显著增加了小鼠交叉的正方形数量,而使用测试药物治疗后未表现出极为显著的增加。

[0206] 3. 开放区域中行进的总距离

[0207]

治疗	平均值 ±SEM	%增加
未治疗	698.250±27.008	-
MPTP	183.500±12.227 ^{###}	-
测试药物(前):预防	375.250±19.363 ^{***}	104.49%
测试药物(后):治疗	214.750±18.713 ^{ns}	17.03%

[0208] 使用测试药物预-治疗小鼠显著增加了小鼠行进的距离,而使用测试药物治疗后未表现出极为显著的增加。

[0209] 4. 开放区域中的总运动时间

[0210]

治疗	平均值 ±SEM	%增加
未治疗	233.420±7.322	-
MPTP	217.330±8.979	-
测试药物(前):预防	235.350±9.001	8.29%
测试药物(后):治疗	242.790±13.503	11.71%

[0211] 使用测试药物治疗前/后过程中对MPTP治疗小鼠未观察到明显的时间改变。

[0212] 5. 开放区域中的平均速率

[0213]

治疗	平均值 ±SEM	%增加
未治疗	2.999±0.124	-
MPTP	0.846±0.051	-
测试药物(前):预防	1.595±0.059 ^{***}	88.53%

测试药物（后）：治疗	0.890±0.079 ^{ns}	5.2%
------------	---------------------------	------

[0214] 使用测试药物预-治疗小鼠显著增加了小鼠的平均速率，而治疗后未表现出速率增加。

[0215] 因此，通过上述实验观察到通过上述方法制备的组合物具有有效的多巴胺能活性并且为 MAO 抑制剂。这种最佳药物剂量未表现出在该药物极高剂量下观察到的抗胆碱能活性。

[0216] 实施例 10：测试药物对酪胺增强作用的作用

[0217] 非选择性 MAO 抑制剂在用作神经精神药物时导致称作酪胺增强作用的情况。酪胺为一种氨基酸，是单胺去甲肾上腺素的前体。单胺氧化酶 -A (MAO-A) 为防止酪胺转化成去甲肾上腺素的酶。因此，在如 MAO-A 抑制剂起作用的药物存在下，去甲肾上腺素水平高。大部分发酵食品，如干酪，葡萄酒等具有高百分比的酪胺。因此，当如这些食品被消耗 MAO-A 抑制剂的受试者摄入时，酪胺水平突然激增且随后去甲肾上腺素水平也升高。这种去甲肾上腺素水平的突然增加显著升高了血压并且可以导致致命后果。

[0218] 进行酪胺增强作用试验是为了测定测试药物对 MAO-A/B 的选择性。为了精确测定本试验，在急性和慢性药物环境中进行本研究。

[0219] 急性研究：

[0220] 在急性研究中，取雄性 Wistar 大鼠 (n = 5)，通过注射乌拉坦溶液 (1.25g/kg, i. p.) 麻醉。将体温维持在 37°C 下并且给气管插套管以维持气道。（血压）仪器插入连接左侧颈动脉和颈静脉的套管，以便分别监测血压 (BP) 和给药。将动脉导管连接血压传感器以便使用通道生理记录仪系统测量血压。记录测试药物 (30mg/kg p. o.) 对酪胺 (5mg/kg i. v.) 的作用（图 3）。

[0221] 进行的研究有 3 组：

[0222] 1 组：正常

[0223] 2 组：酪胺 + 测试药物

[0224] 3 组：单独的酪胺

[0225] 慢性研究：

[0226] 对雄性 Wistar 大鼠 (n = 5) 给予测试药物 (30mg/kg p. o.) 1 个月。将体温维持在 37°C 下并且给气管插套管以维持气道。仪器插入连接左侧颈动脉和颈静脉的套管，以便分别监测血压 (BP) 和给药。将动脉导管连接血压传感器以便使用通道生理记录仪系统测量血压。记录测试药物 (30mg/kg p. o.) 对酪胺 (5mg/kg i. v.) 的作用（图 4）。

[0227] 进行的研究有 3 组：

[0228] 1 组：正常

[0229] 2 组：酪胺 + 测试药物

[0230] 3 组：单独的酪胺

[0231] 在急性和慢性研究中，测试药物未表现出任何血压升高，由此确立它们不是 MAO-A 抑制剂。酪胺导致血压适当升高，目前类型的 MAOIs 通常导致血压显著性升高（酪胺增强作用）。因此，从急性和慢性研究中观察到的示意图中可以看出，测试药物不会强化血压升高。

[0232] 因此,认为测试药物为 MAO-B 抑制剂,它不会导致酪胺增强作用并且不会与从膳食中的食物中摄取的酪胺发生相互作用。这就是测试药物超过现存类型药物的主要优点。

[0233] 实施例 11 :测试药物酶测定中的评价

[0234] 用于本实验的抑制曲线如图 5 中所示。如每篇参考文献中所述进行这些酶测定。

[0235] • Youdim MB 和 Finberg JP(1991)

[0236] New directions in monoamine oxidase A and B selective inhibitors and substrates. *Biochem Pharmacol.* 41(2) :155-162

[0237] • Urban P, Andersen JK, Hsu HP 和 Pompon D(1991)

[0238] Comparative membrane locations and activities of human monoamine oxidases expressed in yeast. *FEBS Lett.* 286(1-2) :142-146。

[0239] 本实验确定了测试药物组合物 F-1 在抑制酶单胺氧化酶中的能力。MAOs 为催化单胺类氧化的酶。在人体中存在两种类型的 MAOs—MAOA 和 MAO B。在神经元和星形神经胶质以及 CNS 外发现了这两种酶。

[0240] 在 CNS 外发现了 MAOs :

[0241] MAO-A :肝、胃肠道和胎盘

[0242] MAO-B :血小板

[0243] 两种 MAOs 对单胺能神经递质失活而言也为关键的,就此而言,它们展示出不同的特异性。

[0244] .MAO-A :5-羟色胺,去甲肾上腺素 (norepinephrine)(去甲肾上腺素 (noradrenaline)) 和肾上腺素 (epinephrine)(肾上腺素 (adrenaline)) 分解。

[0245] .MAO-B :苯乙胺分解

[0246] 两种 MAOs 形式分解多巴胺。

[0247] 目前类型的 MAO 抑制剂通常具有与具有高酪胺水平的食物,如干酪,腌制食品,巧克力,啤酒,葡萄酒和某些肉类的相互作用。酪胺与 MAOIs 的相互作用可以导致血压危险性地高度增加,这可以导致中风。

[0248] 例证测试化合物选择性抑制 MAO-B 的响应曲线如图 5 中所示。该示意图例证了在治疗与多巴胺相关的疾病,包括帕金森病中极为有用的测试药物对 MAO-B 的抑制。

[0249] 实施例 10 中进行的酪胺增强作用实验表明测试药物对血压不具有升高作用且由此对有此需要的受试者而言可安全地使用。

[0250] 实施例 12 :

[0251] 就人体剂量而言

[0252] 1) 就控制帕金森病的治疗应用而言,人体剂量为 0.5mg/kg-20mg/kg/日作为单剂量或每天分成三次等同剂量。

[0253] 2) 就在降低涉及性欲缺乏和性功能障碍的催乳素水平的治疗剂量而言,每日推荐剂量为 0.5mg/kg 体重-25mg/kg 体重作为单剂量或分成 3 次等同的分次剂量。

[0254] 3) 用于终止哺乳母亲泌乳的治疗剂量为 0.5mg/kg-20mg/kg 体重 / 日。

[0255] 4) 就运动生理学中的肌松弛而言,推荐剂量为 0.25mg/kg-17mg/kg 体重。

[0256] 5) 就精神警觉度和行为增强而言,推荐的每日剂量为 0.25mg/kg-15mg/kg 体重。

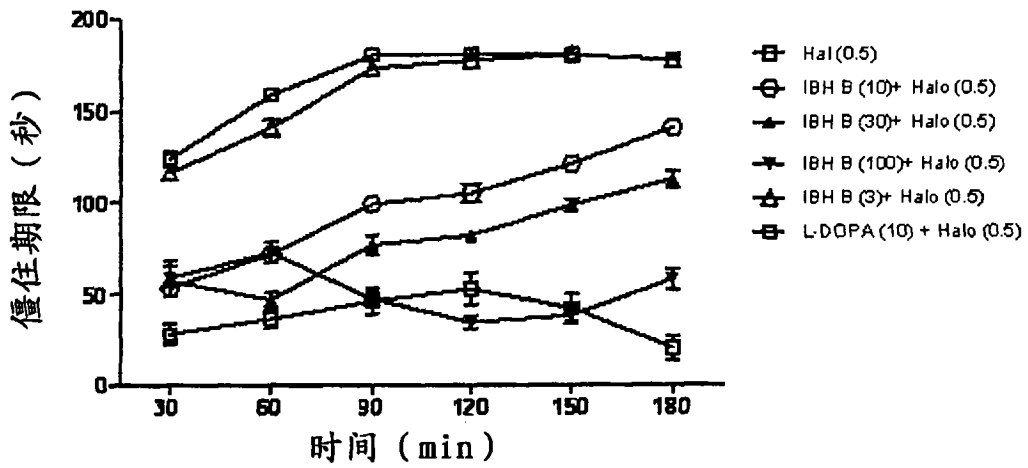
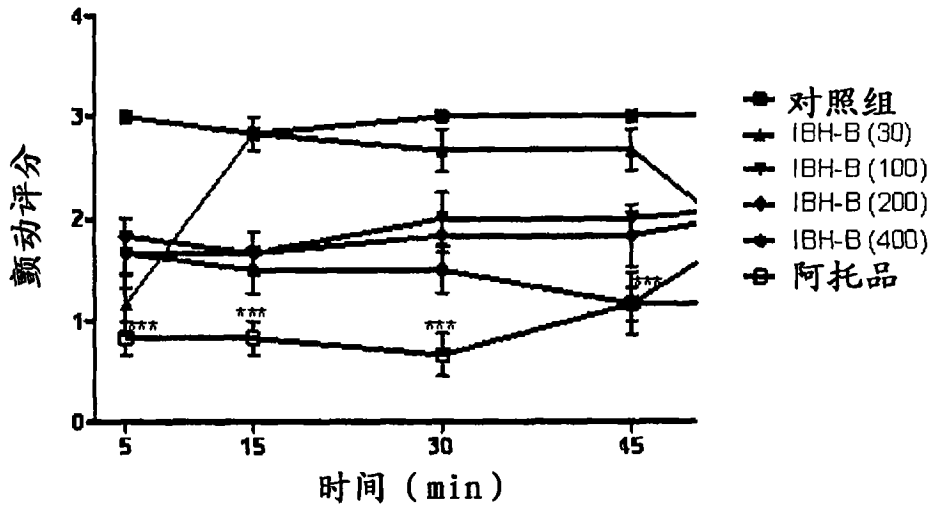


图 1



*** 在P<0.001时具有显著性

图 2

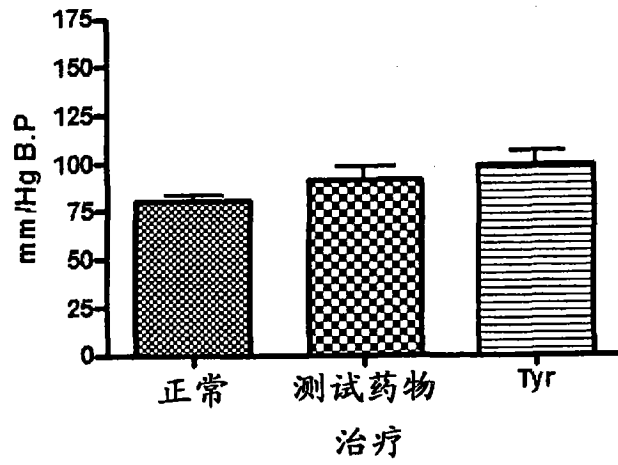


图 3

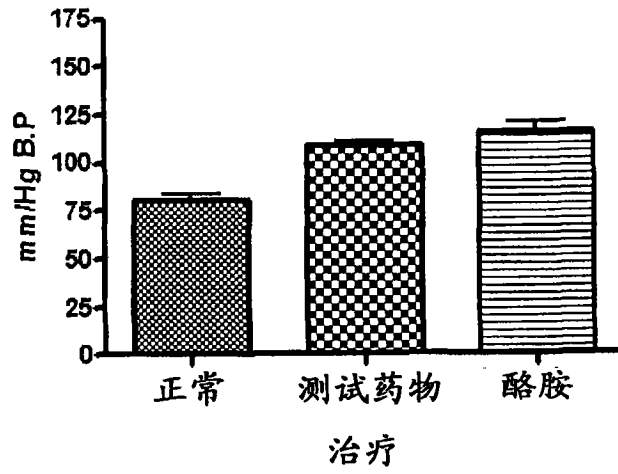


图 4

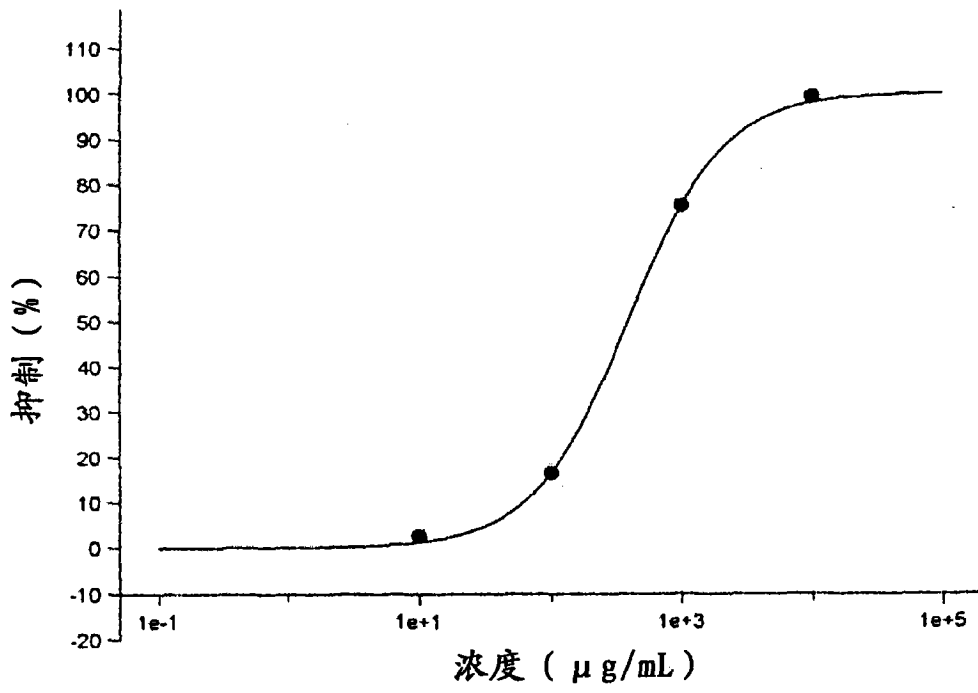


图 5