



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106983747 A

(43)申请公布日 2017.07.28

(21)申请号 201611204491.7

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2008.08.06

A61K 31/417(2006.01)

(30)优先权数据

A61P 25/30(2006.01)

60/935323 2007.08.06 US

A61P 25/34(2006.01)

60/956555 2007.08.17 US

A61P 25/36(2006.01)

60/960591 2007.10.04 US

(62)分案原申请数据

200880109939.4 2008.08.06

(71)申请人 生物系治疗公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 T.沃伊沃德 M.莫兰 L.皮克福德

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 张萍 李炳爱

权利要求书4页 说明书72页 附图8页

(54)发明名称

治疗依赖性的方法

(57)摘要

本发明提供了用化合物A治疗患有至少一种下列症状或对其敏感的患者方法:至少一种物质的滥用、依赖或戒除。本发明还提供了治疗患者对至少一种物质的物质依赖的至少一个阶段的方法,和提供了治疗患者可卡因依赖的至少一个阶段的某些方法。

1. 治疗患有至少一种下列症状或对其敏感的患者方法：对至少一种物质的滥用、依赖或戒除，该方法包括：给予患者治疗有效量的化合物A。

2. 权利要求1的方法，其中至少一种物质选自滥用的药和药物治疗。

3. 权利要求2的方法，其中滥用的药选自精神兴奋剂，阿片样物质，迷幻剂，吸入剂，镇静剂，镇定剂，安眠剂，抗焦虑药和非法物质。

4. 权利要求3的方法，其中精神兴奋剂是 β -苯基异丙胺衍生物。

5. 权利要求4的方法，其中 β -苯基异丙胺衍生物选自安非他明、右旋苯丙胺和脱氧麻黄碱。

6. 权利要求3的方法，其中精神兴奋剂选自合成迷幻药，苯甲吗啉，利他林，安非拉酮，佩默林，氯苯咪唑啉，(-) 去甲伪麻黄碱和芬氟拉明。

7. 权利要求3的方法，其中阿片样物质选自Lortab，反胺苯环醇，海洛英，美沙酮，氢可酮和氧可酮。

8. 权利要求3的方法，其中迷幻剂选自裸盖菇素，幻觉蘑，麦角酰二乙胺 (LSD)，苯西克定 (PCP) 和氯胺酮。

9. 权利要求3的方法，其中吸入剂选自苯，甲苯，邻二甲苯，间二甲苯，对二甲苯，乙苯，氟苯，邻二氟代苯，1,3,5-三氟苯，1,2,4-三氟苯，五氟甲苯，五氟苯和全氟代苯。

10. 权利要求2的方法，其中药物治疗选自麻醉药，镇痛药，抗胆碱能药，抗组胺剂，肌肉松弛药，非甾族抗炎药的药物，非处方药品和抗抑郁剂。

11. 权利要求2的方法，其中滥用的药是可卡因，醇，咖啡因，阿片，大麻素，大麻，苯并二氮杂~~革~~，肌安宁 (carisprodol)，烟草，烟碱，扑热息痛 (Vicodin)，氢可酮，盐酸羟考酮，羟可酮和泰勒宁 (Tylox)。

12. 权利要求11的方法，其中滥用的药是可卡因，化合物A可以减轻患者可卡因滥用和依赖性的至少一种症状，症状选自：注意力缺陷性机能亢进障碍；陶醉感；活力、兴奋和社交性提高；不感到饥饿和疲劳；生理和心理力量的明显感觉；痛觉降低；支气管炎；气短；胸痛；心悸；心律失常；心肌病；心力衰竭；瞳孔扩大；恶心；呕吐；头痛；头晕；眩晕；焦虑；精神异常；意识模糊；鼻发炎；鼻痂皮；周期性鼻出血；鼻不透气；面部疼痛；烦躁；和可卡因渴求。

13. 权利要求11的方法，其中滥用的药是可卡因，化合物A可以提高至少一种可卡因滥用和依赖性的负面主观症状。

14. 权利要求11的方法，其中滥用的药是可卡因，化合物A可以减轻至少一种可卡因戒除症状，戒除症状选自疲劳，缺乏快乐，忧郁症，烦躁，睡眠障碍，食欲增加，精神发育迟缓，激越，极端猜疑和渴求可卡因。

15. 权利要求1的方法，其中该方法进一步包括：共同给予治疗有效量的至少一种选自下列的其它药剂：选择性的血清素再摄取抑制剂 (SSRI)，血清素-去甲肾上腺素再摄取抑制剂 (SNRI)，去甲肾上腺素再摄取抑制剂 (NRI)，去甲肾上腺素-多巴胺再摄取抑制剂 (NDRI)，血清素5-羟色胺1A (5HT1A) 拮抗剂，多巴胺 β -羟化酶抑制剂，腺苷酸受体拮抗剂，腺苷酸A2A受体拮抗剂，单胺氧化酶抑制剂 (MAOI)，单胺氧化酶B抑制剂，钠通道阻断剂，钙通道阻断剂，中枢和周围的 α 肾上腺素能受体拮抗剂，中枢 α 肾上腺素能激动剂，中枢或周围 β 肾上腺素能受体拮抗剂，NK-1受体拮抗剂，促皮质素释放因子 (CRF) 拮抗剂，非典型性的抗抑郁剂/

抗精神病药,三环药物,抗惊厥剂,谷氨酸盐拮抗剂, γ -氨基丁酸(GABA)激动剂,GABA代谢酶抑制剂,GABA合成活化剂,部分多巴胺D2激动剂,多巴胺代谢酶抑制剂,儿茶酚-O-甲基-转移酶抑制剂,阿片样物质受体拮抗剂,情绪稳定剂,直接或间接多巴胺激动剂,部分5HT1激动剂,血清素5HT2拮抗剂,阿片样物质,羧化酶抑制剂,部分阿片样物质激动剂,部分烟酸激动剂和吸入剂。

16. 权利要求1的方法,其中该方法进一步包括:共同给予治疗有效量的至少一种选自下列的其它药剂:苯并二氮杂~~䇇~~,左旋多巴,肌安宁(carisprodol),莫达非尼(modafenil),阿坎酸, γ -丁内酯, γ -羟基丁酸盐,阿片,二甲-4-羟色胺磷酸,幻觉~~蘑~~,烟草和烟碱。

17. 权利要求1的方法,其中a之后对患者给予化合物A。

18. 治疗患者对至少一种物质的物质依赖的至少一个阶段的方法,其中物质依赖的至少一个阶段选自获得、保持、消退和复发阶段,该方法包括:给予患者治疗有效量的化合物A。

19. 权利要求18的方法,其中化合物A可以抑制患者获得阶段的发展。

20. 权利要求18的方法,其中化合物A可以促进患者消退阶段的发展。

21. 权利要求18的方法,其中化合物A可以减少患者复发的频率。

22. 权利要求18的方法,其中至少一种物质选自滥用的药和药物治疗。

23. 权利要求22的方法,其中滥用的药选自精神兴奋剂,阿片样物质,迷幻剂,吸入剂,镇静剂,镇定剂,安眠剂,抗焦虑药和非法物质。

24. 权利要求23的方法,其中精神兴奋剂是 β -苯基异丙胺衍生物。

25. 权利要求24的方法,其中 β -苯基异丙胺衍生物选自安非他明、右旋苯丙胺和脱氧麻黄碱。

26. 权利要求23的方法,其中精神兴奋剂选自合成迷幻药,苯甲吗啉,利他林,安非拉酮,佩默林,氯苯咪唑啉,(-)去甲伪麻黄碱和芬氟拉明。

27. 权利要求23的方法,其中阿片样物质选自Lortab,反胺苯环醇,海洛英,美沙酮,氢可酮和氧可酮。

28. 权利要求23的方法,其中迷幻剂选自裸盖菇素,幻觉~~蘑~~,麦角酰二乙胺(LSD),苯西克定(PCP)和氯胺酮。

29. 权利要求23的方法,其中吸入剂选自苯,甲苯,邻二甲苯,间二甲苯,对二甲苯,乙苯,氟苯,邻二氟代苯,1,3,5-三氟苯,1,2,4-三氟苯,五氟甲苯,五氟苯和全氟代苯。

30. 权利要求22的方法,其中药物治疗选自麻醉药,镇痛药,抗胆碱能药,抗组胺剂,肌肉松弛药,非甾族抗炎药的药物,非处方药品和抗抑郁剂。

31. 权利要求22的方法,其中滥用的药是醇,咖啡因,阿片,大麻素,大麻,苯并二氮杂~~䇇~~,肌安宁(carisprodol),烟草,烟碱,扑热息痛(Vicodin),氢可酮,盐酸羟考酮,羟可酮和泰勒宁(Tylox)。

32. 权利要求18的方法,其中该方法进一步包括:共同给予治疗有效量的至少一种选自下列的其它药剂:选择性的血清素再摄取抑制剂(SSRI),血清素-去甲肾上腺素再摄取抑制剂(SNRI),去甲肾上腺素再摄取抑制剂(NRI),去甲肾上腺素-多巴胺再摄取抑制剂(NDRI),血清素5-羟色胺1A(5HT1A)拮抗剂,多巴胺 β -羟化酶抑制剂,腺苷酸受体拮抗剂,腺苷酸A2A

受体拮抗剂,单胺氧化酶抑制剂(MAOI),单胺氧化酶B抑制剂,钠通道阻断剂,钙通道阻断剂,中枢和周围的 α 肾上腺素能受体拮抗剂,中枢 α 肾上腺素能激动剂,中枢或周围 β 肾上腺素能受体拮抗剂,NK-1受体拮抗剂,促皮质素释放因子(CRF)拮抗剂,非典型性的抗抑郁剂/抗精神病药,三环药物,抗惊厥剂,谷氨酸盐拮抗剂, γ -氨基丁酸(GABA)激动剂,GABA代谢酶抑制剂,GABA合成活化剂,部分多巴胺D2激动剂,多巴胺代谢酶抑制剂,儿茶酚-O-甲基-转移酶抑制剂,阿片样物质受体拮抗剂,情绪稳定剂,直接或间接多巴胺激动剂,部分5HT1激动剂,血清素5HT2拮抗剂,阿片样物质,羧化酶抑制剂,部分阿片样物质激动剂,部分烟酸激动剂和吸入剂。

33. 治疗患者可卡因依赖的至少一个阶段的方法,其中至少一个阶段选自获得、保持、消退和复发阶段,该方法包括:给予患者治疗有效量的化合物A。

34. 权利要求33的方法,其中化合物A可以抑制患者获得阶段的发展。

35. 权利要求33的方法,其中化合物A可以促进患者消退阶段的发展。

36. 权利要求33的方法,其中化合物A可以减少患者复发的频率。

37. 权利要求33的方法,其中化合物A可以减轻患者的可卡因滥用、依赖或戒除的至少一种症状。

38. 权利要求37的方法,其中化合物A可以减轻患者可卡因滥用的至少一种症状,症状选自:导致在工作、学校或家庭中无法履行主要义务的周期性可卡因使用;在身体处于危险情况下的周期性可卡因使用;涉及法律问题的周期性可卡因使用;和持续可卡因使用,尽管这种物质使用具有持久性的或周期性的社会或人与人之间的的问题,这种问题由可卡因的后果所导致或加重。

39. 权利要求37的方法,其中化合物A可以减轻患者可卡因依赖的至少一种症状,症状选自:耐受性;戒除症状;常常摄取大量可卡因或然后持续较长时间;为了削减或控制可卡因使用而有持续的目标和/或不成功的努力;为了获得可卡因、使用可卡因和从其效果中恢复而在至少一种活动中花费许多时间;由于可卡因使用而放弃和/或减少至少一种重要的社会、职业和娱乐活动;和尽管了解由可卡因导致或加重的持续或周期性身体或心理问题,但还继续使用可卡因。

40. 权利要求37的方法,其中化合物A可以减轻可卡因滥用和依赖性的至少一种症状,症状选自:注意力缺陷性机能亢进障碍;陶醉感;活力、兴奋和社交性提高;不感到饥饿和疲劳;生理和心理力量的明显感觉;痛觉降低;支气管炎;气短;胸痛;心悸;心律失常;心肌病;心力衰竭;瞳孔扩大;恶心;呕吐;头痛;头晕;眩晕;焦虑;精神异常;意识模糊;鼻发炎;鼻痂皮;周期性鼻出血;鼻不通气;面部疼痛;烦躁;和可卡因渴求。

41. 权利要求37的方法,其中化合物A可以提高可卡因滥用和依赖的至少一种负面主观症状。

42. 权利要求37的方法,其中化合物A可以减轻可卡因戒除的至少一种症状,症状选自疲劳,缺乏快乐,忧郁症,烦躁,睡眠障碍,食欲增加,精神发育迟缓,激越,极端猜疑和渴求可卡因。

43. 权利要求33的方法,其中化合物A可以提高患者对下列至少一种上的得分:ADHD-IV, HAM-D, HAM-A, BDI, 源于Neuropsychiatric Inventory的冷漠量表和认知功能量表。

44. 权利要求43的方法,其中认知功能评级量表选自WAIS-R, WMS-R, RAVLT, Trials I-

VII, RCFT和TMT的A和B部分。

45. 权利要求33的方法, 其中化合物A可以减少患者的可卡因使用数量和频率中的至少一种。

46. 权利要求33的方法, 其中化合物A可以促进患者症状缓解。

47. 权利要求46的方法, 其中症状缓解的特点在于: 早期完全症状缓解、早期部分症状缓解、持续完全症状缓解和持续部分症状缓解中的至少一种。

48. 权利要求33的方法, 其中化合物A可以延长患者症状缓解的周期。

49. 权利要求33的方法, 其中该方法进一步包括: 与应变管理和认知行为疗法中的至少一种一起治疗。

50. 权利要求33的方法, 其中该方法进一步包括: 共同给予治疗有效量的至少一种选自下列的其它药剂: 选择性的血清素再摄取抑制剂 (SSRI), 血清素-去甲肾上腺素再摄取抑制剂 (SNRI), 去甲肾上腺素再摄取抑制剂 (NRI), 去甲肾上腺素-多巴胺再摄取抑制剂 (NDRI), 血清素5-羟色胺1A (5HT1A) 拮抗剂, 多巴胺β-羟化酶抑制剂, 腺苷酸受体拮抗剂, 腺苷酸A2A受体拮抗剂, 单胺氧化酶抑制剂 (MAOI), 单胺氧化酶B抑制剂, 钠通道阻断剂, 钙通道阻断剂, 中枢和周围的α肾上腺素能受体拮抗剂, 中枢α肾上腺素能激动剂, 中枢或周围β肾上腺素能受体拮抗剂, NK-1受体拮抗剂, 促皮质素释放因子 (CRF) 拮抗剂, 非典型性的抗抑郁剂/抗精神病药, 三环药物, 抗惊厥剂, 谷氨酸盐拮抗剂, γ-氨基丁酸 (GABA) 激动剂, GABA代谢酶抑制剂, GABA合成活化剂, 部分多巴胺D2激动剂, 多巴胺代谢酶抑制剂, 儿茶酚-O-甲基-转移酶抑制剂, 阿片样物质受体拮抗剂, 情绪稳定剂, 直接或间接多巴胺激动剂, 部分5HT1激动剂, 血清素5HT2拮抗剂, 阿片样物质, 羧化酶抑制剂, 部分阿片样物质激动剂, 部分烟酸激动剂和吸入剂。

治疗依赖性的方法

[0001] 本申请是申请号为200880109939.4(国际申请号为PCT/US2008/072357)、申请日为2008年8月6日、发明名称为“治疗依赖性的方法”的中国专利申请的分案申请。

[0002] 申请要求保护根据35U.S.C. §119(e) 对下列美国临时专利申请系列Nos. 的权益和优先权:60/935,323, “Methods for Treating Dependence Using Nepicastat”, 2007年8月6日申请;60/956,555, “Methods for Treating Dependence Using Nepicastat”, 2007年8月17日申请;和60/960,591, “Methods for Treating Dependence Using Nepicastat”, 2007年10月4日申请。将其全部以整体结合到本文中作为参考。

技术领域

[0003] 本发明提供了用化合物A治疗患有至少一种下列症状或对其敏感的患者的一些方法:至少一种物质的滥用、依赖或戒除。本发明还提供了治疗患者对至少一种物质的物质依赖的至少一个阶段的某些方法,和提供了治疗患者可卡因依赖的至少一个阶段的某些方法。

背景技术

[0004] 物质滥用和依赖性的特点在于:渴求、寻找和使用物质,同时物质摄入的限制失控。这些行为的发生不顾及显著的物质使用相关的问题,并且损害其它行为。在2004年,大约两千二百五十万年龄12岁或12岁以上的美国人需要治疗物质(醇或非法药物)滥用。最新估计显示,仅仅非法药物滥用的社会费用就是1810亿(2002年)。

[0005] 可卡因滥用和依赖的问题是主要的医学、社会和法律所关心的问题。按照2005年 National Survey on Drug Use and Health 的数据,大约13.9%的12岁和12岁以上的美国人一生中至少尝试过一次可卡因,并且3.3%一生至少尝试过一次高纯度可卡因。更麻烦的是,在2005年,当时的(current)可卡因使用者有240万人,而2004年的数字是200万人。同样,当时高纯度可卡因使用者从2004年的467,000人提高至2005年的682,000人。在2004年, Drug Abuse Warning Network 估计,全国有940,953例药物相关的急诊,其中这些中的大部分涉及可卡因。

[0006] 明显地,对广泛有效的治疗方法有需求,并且包括药物组份的方法比当前的行为治疗例如单独的认知行为治疗或偶然管理更有效。临床试验中已经研究了各种治疗,但都没有显著的效果。尤其是,已经完成了抗抑郁剂的许多随机控制的临床试验,包括地昔帕明、氟西汀、安非他酮和丙咪嗪的试验。还完成了情绪稳定剂(包括卡马西平和锂)的临床试验,还试验了苯妥英、直接或间接的多巴胺激动剂,包括溴隐亭,培高利特,金刚烷胺,马吲哚(mazindole)和利他林。也研究了大量其它药剂,包括利坦色林(ritanserin),吉吡隆,尼莫地平 and 纳曲酮。这些化合物中没有一个是确实有效的。还评价了作用于GABA系统的若干药物对可卡因依赖性的治疗,包括噻加宾、巴氯芬和氨己烯酸(vigabatrin)。噻加宾的效果不可靠,巴氯芬的效果虽然不令人信服,但稍加令人鼓舞。氨己烯酸(vigabatrin)的研究也许同样令人鼓舞,虽然其主要基于开放性试验。这些研制计划的结果通常令人感到气馁。

[0007] 多巴胺β-羟化酶 (DBH) 抑制剂双硫仑是可卡因依赖性的现行最有效的药理学疗法。令人遗憾的是,双硫仑非特定地抑制一些酶,包括醛脱氢酶和血浆酯酶。双硫仑和相关的化合物与铜整合,其是多种酶的必要的辅因子,包括醛脱氢酶、血浆酯酶和DBH。通过抑制醛脱氢酶,双硫仑可改变醇(乙醇)代谢,产生双硫仑-乙醇反应。这种反应包括潮红、恶心和低血压。

[0008] 血浆酯酶的抑制可减缓可卡因的消除,这可以导致血浆可卡因水平升高。在用双硫仑治疗期间评价鼻内可卡因效果的实验室研究中,双硫仑治疗可显著地提高血浆可卡因水平。然而,可卡因水平提高与可卡因的生理或主观效果的变化无关。在一种可控研究中,观察到血浆可卡因水平有6倍的升高,在无控制非法使用的条件下可以升高更多。使用IV可卡因给药的随后研究证明,双硫仑可以减缓可卡因的消除,可能是由于抑制血浆酯酶的缘故。鼻内给药之后的缓慢吸收说明了先前所观察到的血浆浓度的提高。

[0009] 一些研究显示了双硫仑作为可卡因依赖性治疗的初期效果。在人类实验室研究中,用双硫仑治疗可降低可卡因产生的正面主观效果。当用最高达500mg的双硫仑治疗时,病态 (comorbid) 醇和可卡因依赖性患者的结果得到改善。同样,在用双硫仑治疗期间,丁丙诺啡维持的阿片剂和可卡因依赖性患者可降低可卡因使用。最近,大量临床试验的结果说明,与安慰剂相比,每天使用250mg双硫仑可降低可卡因使用,这与醇使用模式或所提供精神治疗的类型无关。在这种研究中,使112个可卡因依赖性志愿者随机使用安慰剂或双硫仑,并且提供两种精神治疗中的一种。与安慰剂治疗相比,双硫仑治疗可提供更少的可卡因阳性尿样品,证明其与降低可卡因使用有关。这种效果大小是适度的,并且这种结果可以保持重复。

[0010] 双硫仑可以抑制DBH,DBH是介导去甲肾上腺素 (NE) 的合成的单一酶。DBH在去甲肾上腺素神经元中表达,位于突触泡之内,并且与NE一起释放。DBH可以在血浆中测定,DBH的浓度是高度遗传的,并且活性变化主要通过DBH位点的变化来说明。T变体(-1021C→T)与削弱的DBH基因转录过程和降低的DBH活性有关。这种等位基因十分常见。据报道,T等位基因出现在20%非洲-美国人之中、22%北欧-美国人之中 和16%日本人之中。对于这些人群,相应的单倍体型出现率分别是0.32、0.34和0.09。

[0011] 一些报道表明,双硫仑在具有低DBH活性的患者中更有效。已经表明,在低DBH活性的患者中,在用250mg/天双硫仑治疗期间,可卡因阳性尿的比例随着时间的推移而降低(相对于安慰剂),但在用62.5mg和125mg双硫仑/天治疗期间,随着时间的推移,该比例显著地提高 ($p' s < 0.04$)。在具有高DBH活性的患者中,相对于安慰剂,用双硫仑 (62.5mg/天) 治疗的可卡因阳性尿的比例随着时间的推移而提高 ($p = 0.001$)。由此,250mg/天双硫仑治疗的效果限于低DBH活性的患者(与C→T基因型对应)。低于250mg/天的双硫仑剂量似乎使可卡因使用增加,这可能是由于通过抑制血浆酯酶而降低了可卡因廓清率,由此提高了与可卡因滥用相关的精神愉快效果。

[0012] 在与低DBH活性有关的DBH C→T基因型患者中,双硫仑可更有效地降低可卡因使用。在低DBH活性的患者中,大概双硫仑可以更彻底地抑制DBH,使得双硫仑在降活性C→T基因型的患者中更有效。双硫仑在低活性DBH C→T基因型患者中更有效的观察结果证明,抑制DBH是双硫仑作为可卡因依赖性疗法的关键作用机理。

[0013] 尽管双硫仑提供了DBH抑制剂可以治疗可卡因依赖性的原理的证据,但使用双硫

仑本身作为可卡因依赖性治疗严格地受到其与醇和可卡因相互作用的限制。

发明内容

[0014] 本发明提供了治疗患有至少一种下列症状或对其敏感的患者方法：至少一种物质的滥用、依赖或戒除。该方法包括：给予患者治疗有效量的化合物A。

[0015] 本发明还提供了治疗患者对至少一种物质的物质依赖的至少一个阶段的方法，其中至少一个阶段选自获得、保持、消退和复发阶段。该方法包括：给予患者治疗有效量的化合物A。

[0016] 本发明还提供了治疗患者可卡因依赖的至少一个阶段的方法，其中至少一个阶段选自获得、保持、消退和复发阶段。该方法包括：给予患者治疗有效量的化合物A。

附图说明

[0017] 图1说明了从5至15的样品大小所获得的效果大小。

[0018] 图2说明了独立酶催试验的详细内容。

[0019] 图3显示了内匹司他 (nepicastat) 与DBH和大量所选择的酶和受体的亲合性 (IC₅₀ 值或PKi) 图表。

[0020] 图4显示了内匹司他 (nepicastat) 对酶活性的%抑制效果。

[0021] 图5显示了用内匹司他 (nepicastat) 治疗24小时之后的正常志愿者中的尿多巴胺水平。

[0022] 图6显示了给予赋形剂或不同剂量内匹司他 (nepicastat) 后在SHRs的皮层中的去甲肾上腺素水平。

[0023] 图7显示了给予赋形剂或不同剂量内匹司他 (nepicastat) 后在SHRs的皮层中的多巴胺水平。

[0024] 图8显示了给予赋形剂或不同剂量内匹司他 (nepicastat) 后在SHRs的皮层中的多巴胺/去甲肾上腺素的比例。

[0025] 图9显示了给予赋形剂或不同剂量内匹司他 (nepicastat) 后在SHRs的肠系膜动脉中的去甲肾上腺素水平。

[0026] 图10显示了给予赋形剂或不同剂量内匹司他 (nepicastat) 后在SHRs的肠系膜动脉中的多巴胺水平。

[0027] 图11显示了给予赋形剂或不同剂量内匹司他 (nepicastat) 后在SHRs的肠系膜动脉中的多巴胺/去甲肾上腺素的比例。

具体实施方式

[0028] 在本说明书中使用的下列词汇和短语通常具有下面所列出的含义，但把上下文中表明其他用法的除外。

[0029] 本文使用的“化合物A”包括(S)-5-氨基-1-(5,7-二氟-1,2,3,4-四氢萘-2-基)-2,3-二氢-2-硫代-1H-咪唑、(R)-5-氨基-1-(5,7-二氟-1,2,3,4-四氢萘-2-基)-2,3-二氢-2-硫代-1H-咪唑和其混合物以及其可药用盐，例如盐酸盐。在一些实施方案中，使用内匹司他 (nepicastat) ((S)-5-氨基-1-(5,7-二氟-1,2,3,4-四氢萘-2-基)-2,3-二氢-2-

硫代-1H-咪唑盐酸盐)。

[0030] 本文使用的“化合物B”是指(R)-5-氨基-1-(5,7-二氟-1,2,3,4-四氢萘-2-基)-2,3-二氢-2-硫代-1H-咪唑以及其可药用盐,例如盐酸盐。

[0031] “可药用盐”包括但不限于:与无机酸的盐,例如盐酸盐,磷酸盐,磷酸氢盐,氢溴酸盐,硫酸盐,亚磺酸盐,硝酸盐和类似的盐;以及与有机酸成的盐,例如苹果酸盐,马来酸盐,富马酸盐,酒石酸盐,琥珀酸盐,柠檬酸盐,醋酸盐,乳酸盐,甲磺酸盐,对甲苯磺酸盐,2-羟基乙磺酸盐,苯甲酸盐,水杨酸盐,硬脂酸盐和烷羧酸盐,例如醋酸盐, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$, 其中n是0-4,和类似的盐。

[0032] 另外,如果以酸加成盐形式获得化合物,那么可以通过将酸式盐溶液进行碱化来获得游离碱。反之,如果产品是游离碱,那么加成盐(尤其是可药用加成盐)可以如下制备:按照由碱化合物制备酸加成盐的常规方法,将游离碱溶解在合适有机溶剂中,并用酸处理溶液。本领域技术人员了解可以用来制备无毒的可药用加成盐的各种合成方法。

[0033] 本文使用的术语“患者”是指哺乳动物。在某些实施方案中,术语“患者”是指人。

[0034] 本文使用的术语“服用”、“给予”或“给药”指的是直接给予患者化合物A或其组合物。

[0035] 本文使用的术语“治疗”或“医治”是指部分或彻底地缓和、抑制、预防、改善和/或减轻病症或其至少一种症状。

[0036] 本文使用的术语“患有”是指已经确诊患者具有或估计具有一或多种病症。

[0037] 本文使用的术语“敏感”是指具有受至少一种病症的症状影响的可能性。

[0038] 本领域普通技术人员可以理解,“物质滥用”常常与身体和/或心理“依赖性”的症状有关。此外,当依赖性个体戒除物质滥用时,该个体常常显现某些症状,包括睡眠和情绪紊乱和强烈的物质滥用渴求,称为“戒除症状”。本文所描述方法包括治疗物质滥用本身、依赖性以及戒除症状。

[0039] 本文使用的术语“物质滥用”可以参照在Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Ed. Text revision (2000) (“DSM-IV TR”) (其由Task Force on DSM-IV of the American Psychiatric Association制订)中列出的标准来定义。物质滥用的特征是物质使用的不良适应模式,表现为与物质重复使用相关的周期性和显著的不利结果。正如在DSM-IV TR中所列举的那样,将物质滥用定义为:导致临床上显著损害或痛苦的物质滥用的不良适应模式,表现为:在12个月时间之内出现至少一种下列症状:(1) 周期性物质使用,导致在工作、学校或家庭中无法履行主要义务;(2) 在身体上危险的情况下进行周期性物质使用;(3) 周期性物质-相关的法律问题;和(4) 虽然具有由物质的影响而导致或加重了持久性或周期性的社会或人与人之间的的问题,但继续物质使用。另外,DSM-IV TR要求物质滥用的症状一点也不符合物质依赖性的标准。在一些实施方案中,用内匹司他(nepicastat)来治疗物质滥用可以降低患者的物质使用数量或频率。在一些实施方案中,用化合物A来治疗患者物质滥用可以减轻物质滥用的至少一种DSM-IV TR症状。在一些实施方案中,用化合物A治疗患者可以减轻至少一种物质滥用症状,包括例如但不限于下列中的至少一种:陶醉感,冷漠,烦躁,鲁莽,判断力差,强迫症,攻击行为,发怒,渴望得到所滥用的物质和情绪障碍。在一些实施方案中,用化合物A来治疗可以减轻患者的由紧张状况诱导的物质渴求。

[0040] 本文使用的短语“减轻症状”是指减轻患者的病症症状的出现率和幅度中的至少一种。在某些实施方案中,患者的症状缓解,并且不再感受到该症状。

[0041] 本文使用的短语“提高症状”是指患者的病症症状的出现率和幅度中的至少一种得到提高。

[0042] 本文使用的术语“物质依赖性”可以参考DSM-IV TR所列出的标准来定义。DSM-IV TR中所列出的物质依赖性的症状是导致临床上显著损害或痛苦的物质使用模式,表现为:在相同的12个月时间之内的任何时间出现至少三种选自下列的症状:(1)由下列之一所定义的耐受性:(a)需要显著增加物质的数量,才能获得预期效果;或(b)继续使用同样数量的物质效果显著削弱;(2)由下列之一所说明的戒除症状:(a)具体物质的特征性戒除综合症;或(b)摄取相同的或密切相关的物质,以便减轻或避免戒除症状;(3)常常摄取大数量物质,或摄取的时间比预定时间长;(4)为了削减或控制物质使用,有持久性的期望或不成功的努力;(5)许多时间花费在获得物质、使用物质或恢复其效果的活动上;(6)由于物质使用而放弃或减少重要的社会、职业或娱乐活动;和(7)虽然具有持久性或周期性的身体或心理问题(可能由物质所导致或加重)的知识,但继续使用物质。物质依赖性可以是生理依赖性,其中存在耐受性或戒除的证据,或非生理依赖性,其中不存在耐受性或戒除的证据。在一些实施方案中,用化合物A来治疗物质依赖性可以降低患者的物质使用数量或频率。在一些实施方案中,用化合物A来治疗患者物质依赖性可以减少患者物质依赖性的至少一种DSM-IV TR症状。在一些实施方案中,用化合物A治疗患者可以减轻至少一种物质依赖性症状,包括例如但不限于下列中的至少一种:陶醉感,冷漠,烦躁,鲁莽,判断力差,强迫症,攻击行为,发怒,渴望得到所依赖的物质和情绪障碍。在一些实施方案中,用化合物A来治疗可以减轻患者的由紧张状况诱导的物质渴求。

[0043] 本文使用的“症状缓解”是指一种状态,在此状态期间,物质滥用或依赖性的至少一种症状的出现已经减轻。在一些实施方案中,如果患者正在使用激动疗法或处于有关物质受到限制的受控环境中,则术语症状缓解不适用。在一些实施方案中,症状缓解是指在物质滥用或依赖性的至少一种症状没有出现期间的状态。在一些实施方案中,症状缓解是指患者在物质滥用或依赖性的所有症状已经减轻期间的状态。在一些实施方案中,症状缓解是指在没有物质滥用或依赖性的症状发生的期间的状态。在一些实施方案中,症状缓解是指在没有出现物质使用期间的状态。

[0044] 在一些实施方案中,症状缓解的特点在于下列中的至少一种:早期完全症状缓解,早期部分症状缓解,持续完全的症状缓解,和持续部分的症状缓解,并且只有在不存在物质滥用和依赖性的任何症状至少一个月之后才适用。这四个类型症状缓解的定义基于从依赖性停止以来所经过的时间间隔(相对于持续症状缓解的早期症状缓解),以及是否持续存在物质依赖性 or 滥用的至少一个症状(相对于完全症状缓解的部分症状缓解)。

[0045] 当不出现物质依赖性 or 物质滥用的症状至少一个月(但小于12个月)时,使用限定词“早期完全症状缓解”。

[0046] 当至少一个月(但小于12个月)出现物质依赖性 or 物质滥用的至少一种症状、但不符合物质依赖性 or 物质滥用的标准时,使用限定词“早期部分症状缓解”。

[0047] 当在至少12个月期间的任何时间没有物质依赖性 or 物质滥用症状时,使用术语“持续完全症状缓解”。

[0048] 当对于至少12个月出现物质依赖性 or 物质滥用的至少一个症状、但不符合物质依赖性 or 物质滥用的标准时,使用术语“持续部分症状缓解”。

[0049] 在一些实施方案中,化合物A治疗可以促进患者症状缓解。在一些实施方案中,化合物A治疗可以延长患者症状缓解时间。

[0050] 短语“延长症状缓解时间”是指增加患者处于症状缓解的时间间隔。在一些实施方案中,紧张状况可以导致患者症状缓解结束。在一些实施方案中,在症状缓解的末期出现复发。在一些实施方案中,用化合物A来治疗可以降低患者在紧张状况之后的症状缓解结束的可能性。在一些实施方案中,用化合物A治疗可以促进下列中的至少一种状况:早期部分症状缓解,持续完全症状缓解,持续部分症状缓解和持续完全症状缓解。

[0051] “戒除”是指当给予相关物质被减少、延迟或停止时出现的集合症状。戒除的物质-特异性症状可以导致例如临床上显著的痛苦或社会、职业或其它重要功能区域的损害。这些症状不能归因于常规医学状况,并且不能用另一种精神错乱来很好地说明。戒除症状通常(而不是一定)与物质依赖性有关。在一些实施方案中,用化合物A来治疗可以减少患者戒除的至少一种症状。在一些实施方案中,戒除症状包括例如但不限于:冷漠,烦躁,鲁莽,判断力差,强迫症,攻击行为,发怒,物质渴求,情绪障碍和睡眠障碍。在一些实施方案中,用化合物A来治疗可以减轻患者的由紧张状况诱导的物质渴求。

[0052] 术语“物质依赖性”的特点在于:存在至少一种下列DSM-IV TR所鉴定的病症:醇滥用;醇依赖;醇中毒;醇中毒性精神错乱;醇戒除症状;醇戒除性精神错乱;醇诱导的焦虑症;醇诱导的情绪障碍;醇诱导的持续遗忘症;醇诱导的持续性痴呆;醇诱导的精神障碍(具有幻想性);醇诱导的精神病障碍(具有幻觉性);醇诱导的性功能障碍;醇诱导的睡眠障碍;醇相关的其他未注明(NOS)的障碍;安非他明滥用;安非他明依赖;安非他明中毒;安非他明中毒性精神错乱;安非他明戒除症状;安非他明诱导的焦虑症;安非他明诱导的情绪障碍;安非他明诱导的精神障碍(具有幻想性);安非他明诱导的精神病障碍(具有幻觉性);安非他明诱导的性功能障碍;安非他明诱导的睡眠障碍;安非他明相关的NOS障碍;大麻滥用;大麻依赖;大麻中毒;大麻中毒性精神错乱;大麻诱导的焦虑症;大麻诱导的精神障碍(具有幻想性);大麻诱导的精神障碍(具有幻觉性);大麻相关的NOS障碍;可卡因滥用;可卡因依赖;可卡因中毒;可卡因中毒性精神错乱;可卡因戒除症状;可卡因诱导的焦虑症;可卡因诱导的情绪障碍;可卡因诱导的精神障碍(具有幻想性);可卡因诱导的精神病障碍(具有幻觉性);可卡因诱导的性功能障碍;可卡因诱导的睡眠障碍;可卡因相关的NOS障碍;吸入剂滥用;吸入剂依赖;吸入剂中毒;吸入剂中毒性精神错乱;吸入剂诱导的焦虑症;吸入剂诱导的情绪障碍;吸入剂诱导的持续性痴呆;吸入剂诱导的精神障碍(具有幻想性);吸入剂诱导的精神病障碍(具有幻觉性);吸入剂相关的NOS障碍;阿片样物质滥用;阿片样物质依赖;阿片样物质中毒;阿片样物质中毒性精神错乱;阿片样物质戒除症状;阿片样物质诱导的情绪障碍;阿片样物质诱导的精神障碍(具有幻想性);阿片样物质诱导的精神病障碍(具有幻觉性);阿片样物质诱导的性功能障碍;阿片样物质诱导的睡眠障碍;阿片样物质相关的NOS障碍;苯西克定滥用;苯西克定依赖;苯西克定中毒;苯西克定中毒性精神错乱;苯西克定诱导的焦虑症;苯西克定诱导的情绪障碍;苯西克定诱导的精神障碍(具有幻想性);苯西克定诱导的精神病障碍(具有幻觉性);和苯西克定相关的NOS障碍。

[0053] 术语“停止”和“戒除”可以(但不必)是关于DSM-IV TR所鉴定的下列病症:烟碱戒

除症状;其他未注明的烟碱-相关的障碍;具有生理学依赖性的烟碱依赖;没有生理学依赖性的烟碱依赖性;早期完全症状缓解的烟碱依赖;早期部份缓解的烟碱依赖;持续完全症状缓解的烟碱依赖;持续部份缓解的烟碱依赖;激动治疗的烟碱依赖;阿片样物质戒除症状;其他未注明的阿片样物质-相关的障碍;具有生理学依赖性的阿片样物质依赖;没有生理学依赖性的阿片样物质依赖;早期完全症状缓解的阿片样物质依赖;早期部份缓解的阿片样物质依赖;持续完全症状缓解的阿片样物质依赖;持续部份缓解的阿片样物质依赖;激动剂治疗的阿片样物质依赖;和受控环境中的阿片样物质依赖;乙醇戒除症状;具有生理学依赖性的乙醇依赖;没有生理学依赖性的乙醇戒除症状;早期完全症状缓解的乙醇戒除症状;早期部份缓解的乙醇戒除症状;持续完全症状缓解的乙醇戒除症状;持续部份缓解的乙醇戒除症状;激动剂治疗的乙醇戒除症状;受控环境中的乙醇戒除症状;安非他明戒除症状;和可卡因戒除症状。

[0054] 本文使用的“激动剂治疗”是指用激动剂治疗物质滥用、依赖或戒除症状。术语“激动剂”是指一种要素,包括但不限于化合物,例如小分子或复合有机化合物或蛋白,其在患者中引起响应,这种响应是患者所滥用、依赖或戒除的物质的至少一种响应或部分响应。例如,在一些实施方案中,“激动剂治疗阿片样物质依赖”是指用美沙酮治疗阿片样物质依赖。

[0055] 当减少任何种类的物质时,可能出现戒除症状。例如,中止使用烟制品(所有都含有烟碱)典型地引起烟碱戒除症状。由于中止使用任何形式的烟草(包括但不限于吸香烟、雪茄或烟斗丝,或口腔或鼻内摄入烟草或嚼烟),个体常常经历烟碱戒除症状。这种口腔或鼻内烟草包括但不局限于鼻吸和咀嚼烟草。终止烟碱使用或减少烟碱使用量,常常在24小时之内出现症状,包括:烦躁不安的抑郁情绪;头晕目眩;失眠;烦躁,挫折感或发怒;焦虑;紧张性震颤;专心困难;不安;心率降低;食欲增加或体重增加;和渴望得到烟草或烟碱。这些症状常常导致临床上显著的痛苦或社会、职业或其它重要功能区域的损害。当烟碱戒除症状不能归因于常规医学病症、并且不能用另一种医学障碍来很好地解释时,本文所描述的方法可以用来减轻烟碱戒除所产生的一或多种症状。本方法还有助于已经借助于烟碱代替治疗来代替或部分代替其使用烟草的那些患者。由此,可以帮助这种患者减轻和甚至完全消除他们对所有形式烟碱的依赖。

[0056] 中止或减少给予阿片样物质(典型地通过注射或口服、通过吸或鼻内摄入来自我给予)常常出现阿片样物质戒除症状的特征。这种戒除症状还可以通过在使用阿片样物质之后给予阿片样物质拮抗剂例如纳洛酮或纳曲酮而被促进(precipitated)。阿片样物质戒除症状的特点在于:通常与阿片样物质激动效果相反的症状。这些戒除症状可以包括:焦虑;不安;常常在背部和腿部出现肌肉酸痛;渴望得到阿片样物质;烦躁和对疼痛的敏感性增加;烦躁不安的情绪;恶心或呕吐;流泪;鼻溢;乳头膨胀;竖毛;发汗;腹泻;呵欠;发热;和失眠。当对短时作用的阿片样物质有依赖性时,例如海洛英,戒除症状通常在最后剂量之后6-24小时之内出现,而对于长效作用的阿片样物质,例如美沙酮,症状可能需要2-4天才显现。这些症状常常导致临床上显著的痛苦或社会、职业或其它重要功能区域的损害。当这种症状不能归因于常规医学状况、并且不能用另一种医学病症来很好地说明时,本文所描述的方法可以用来减轻阿片样物质戒除所产生的一或多种症状。

[0057] 中止或减少乙醇(例如,含有乙醇的饮料)的使用可以引起乙醇戒除症状。乙醇戒除症状的特点在于:当在乙醇使用停止或降低之后的4至12小时之内乙醇的血液浓度迅速

地降低时,症状出现。这些乙醇戒除症状包括:渴望得到乙醇;自主神经系统机能亢进(例如发汗或脉搏次数大于100);手震颤;失眠;恶心;呕吐;视觉、触觉或听觉出现暂时性幻觉或错觉;精神运动性激越;焦虑;和癫痫大发作。这些症状常常导致临床上显著的痛苦或社会、职业或其它重要功能区域的损害。当乙醇戒除症状不能归因于常规医学状况、并且不能用另一种医学病症来很好地解释时,本文所描述的方法可以用来减轻乙醇戒除所产生的一或多种症状。

[0058] 可卡因滥用和依赖性可以导致认知、行为和生理症状。可卡因滥用和依赖性的症状可以包括:不同程度的注意力缺陷性机能亢进障碍和陶醉感;活力、兴奋和社交性增加;无饥饿和疲劳感;生理和心理力量的明显感觉;烦躁;痛觉降低;和渴望得到可卡因。呼吸影响包括下列症状:例如支气管炎、气短和胸痛,心血管影响包括下列症状:例如心悸、心律失常、心肌病和心力衰竭。症状还包括瞳孔扩大,恶心,呕吐,头痛,头晕,焦虑,眩晕,精神异常和意识模糊。通过吸入或鼻吸给予可卡因可以引起耳朵、鼻子和喉咙影响,包括鼻发炎、鼻痂皮、周期性鼻出血、鼻不通气和面部疼痛。在一些实施方案中,用化合物A来治疗可以减少患者可卡因滥用和依赖性的至少一种症状。在一些实施方案中,nepicstat治疗可以增大可卡因滥用和依赖性的至少一种负面主观症状。

[0059] 可卡因戒除症状可以包括:疲劳,缺乏快乐,忧郁症,烦躁,睡眠障碍,食欲增加,精神运动性抑制,激越,极端怀疑和渴望得到可卡因。在一些实施方案中,用化合物A来治疗可以减少至少一种可卡因戒除症状。

[0060] 物质依赖性的特点在于下列阶段:获得,保持,消退和复发。本文使用的术语“获得”是指患者起始和获得物质依赖性的物质依赖性的阶段。在一些实施方案中,化合物A治疗可以抑制患者获得阶段的发展。在一些实施方案中,用化合物A来治疗获得阶段可以降低患者的物质使用数量或频率中的至少一种。在一些实施方案中,用化合物A来治疗获得阶段可以减轻患者物质滥用和依赖性的至少一种DSM-IV症状。在一些实施方案中,用化合物A治疗获得阶段可以减轻物质滥用和依赖性的至少一种症状,包括例如但不限于下列中的至少一种:陶醉感,冷漠,烦躁,鲁莽,判断力差,强迫症,攻击行为,发怒,渴望得到所滥用或依赖的物质和情绪障碍。在一些实施方案中,用化合物A来治疗可以减轻患者在获得阶段期间由紧张状况诱导的物质渴求。

[0061] “保持”是指物质依赖性的阶段,在此期间,稳定给予患者物质或患者稳定使用物质。在一些实施方案中,患者的物质使用的数量和频率中的至少一种发生10%的变化被认为是稳定行为。在一些实施方案中,用化合物A来治疗保持阶段可以降低患者的物质使用数量和频率中的至少一种。在一些实施方案中,用化合物A来治疗患者保持阶段可以减轻患者物质滥用和依赖性的至少一种DSM-IV症状。在一些实施方案中,用化合物A治疗保持阶段可以减轻物质滥用和依赖性的至少一种症状,包括例如但不限于下列中的至少一种:陶醉感,冷漠,烦躁,鲁莽,判断力差,强迫症,攻击行为,发怒,渴望得到所滥用或依赖的物质和情绪障碍。在一些实施方案中,用化合物A来治疗可以减轻患者在保持阶段期间由紧张状况诱导的物质渴求。

[0062] “消退”是指不给患者提供物质或患者戒除物质使用的物质依赖性阶段。在一些实施方案中,在消退阶段的物质依赖消失或减轻。在一些实施方案中,至少一种戒除症状存在于消退阶段。在一些实施方案中,化合物A治疗可以促进患者消退阶段的发展。在一些实施

方案中,用化合物A来治疗患者消退阶段可以减轻患者物质滥用和依赖性的至少一种DSM-IV症状。在一些实施方案中,在消退阶段期间用化合物A治疗可以减轻物质滥用和依赖性的至少一种症状,包括例如但不限于下列中的至少一种:陶醉感,冷漠,烦躁,鲁莽,判断力差,强迫症,攻击行为,发怒,渴望得到所滥用或依赖的物质和情绪障碍。在一些实施方案中,化合物A治疗可以减轻患者在消退阶段的戒除症状。在一些实施方案中,用化合物A来治疗可以减轻患者在消退阶段由紧张状况诱导的物质渴求。

[0063] “复发”是指患者在经过一段时期戒瘾之后重现物质滥用或依赖的至少一种症状。在一些实施方案中,在症状缓解的末期出现复发。在一些实施方案中,在复发之前对患者进行消退训练。在一些实施方案中,在药物引发、紧张或接触与先前物质使用有关的暗示或刺激环境之后出现复发。在一些实施方案中,化合物A治疗可以降低患者的复发频率。在一些实施方案中,用化合物A来治疗复发阶段可以减轻患者物质滥用和依赖性的至少一种DSM-IV症状。在一些实施方案中,用化合物A治疗复发阶段可以减轻物质滥用和依赖性的至少一种症状,包括例如但不限于下列中的至少一种:陶醉感,冷漠,烦躁,鲁莽,判断力差,强迫症,攻击行为,发怒,渴望得到所滥用或依赖的物质和情绪障碍。在一些实施方案中,化合物A治疗可以减轻患者在复发阶段期间的戒除症状。在一些实施方案中,用化合物A来治疗可以减轻患者在复发阶段期间由紧张状况诱导的物质渴求。

[0064] 物质滥用、依赖性和戒除症状的治疗可以分阶段进行。在一些实施方案中,戒除物质使用的初期优选在用化合物A治疗患者诱导之前。在一些实施方案中,给予患者初始低剂量的化合物A。在一些实施方案中,给予患者化合物A的量逐步升高,直到观察到目标治疗响应为止。在一些实施方案中,化合物A的量逐步升高,以便确定治疗病症的最适量,同时使患者的症状、副作用和物质渴求最小化。

[0065] 在一些实施方案中,化合物A治疗可以促进症状缓解。在一些实施方案中,化合物A的剂量无变化,或在患者达到症状缓解之后渐渐减少。

[0066] 本发明提供了治疗患有至少一种下列症状或对其敏感的患者方法:至少一种物质的滥用、依赖或戒除症状。该方法包括:给予患者治疗有效量的化合物A。在一些实施方案中,至少一种物质选自滥用的药和药物治疗。在一些实施方案中,滥用的药选自精神兴奋剂,阿片样物质,迷幻剂,吸入剂,镇静剂,镇定剂,安眠剂,抗焦虑药和非法物质。在一些实施方案中,精神兴奋剂是 β -苯基异丙胺衍生物。在一些实施方案中, β -苯基异丙胺衍生物选自安非他明、右旋安非他明和脱氧麻黄碱。在一些实施方案中,精神兴奋剂选自合成迷幻药,苯甲吗啉,利他林,安非拉酮,佩默林,氯苯咪唑啉,(-)去甲假麻黄碱cathione,和芬氟拉明。在一些实施方案中,阿片样物质选自Lortab,反胺苯环醇,海洛英,美沙酮,氢可酮和氧可酮。在一些实施方案中,迷幻剂选自裸盖菇素,幻觉蘑菇,麦角酰二乙胺(LSD),苯西克定(PCP)和氯胺酮。在一些实施方案中,吸入剂选自苯,甲苯,邻二甲苯,间二甲苯,对二甲苯,乙苯,氟苯,邻二氟代苯,1,3,5-三氟苯,1,2,4-三氟苯,五氟甲苯,五氟苯和全氟代苯。在一些实施方案中,药物治疗选自麻醉药,镇痛药,抗胆碱能药,抗组胺剂,肌肉松弛药,非甾体抗炎药物,非处方药品和抗抑郁药物。在一些实施方案中,滥用的药物是可卡因,醇,咖啡因,阿片,大麻素,大麻,苯并二氮杂䓬(benzodiazapine)肌安宁(carisprodol),烟草,烟碱,扑热息痛(Vicodin),氢可酮,盐酸羟考酮,羟可酮和泰勒宁(Tylox)。在一些实施方案中,滥用的药物是可卡因,化合物A可以减少患者可卡因滥用和依赖性的至少一种症状,该

症状选自:注意力缺陷性机能亢进障碍;陶醉感;活力增加、兴奋和社交性提高;不感到饥饿和疲劳;生理和心理力量的明显感觉;痛觉降低;支气管炎;气短;胸痛;心悸;心律失常;心肌病;心力衰竭;瞳孔扩大;恶心;呕吐;头痛;头晕;眩晕;焦虑;精神异常;意识模糊;鼻发炎;鼻痂皮;周期性鼻出血;鼻不通气;面部疼痛;烦躁;和可卡因渴求。在一些实施方案中,滥用的药是可卡因,化合物A可以提高至少一种可卡因滥用和依赖性的负面主观症状。在一些实施方案中,滥用的药是可卡因,化合物A可以减轻至少一种可卡因戒除症状,戒除症状选自疲劳,缺乏快乐,忧郁症,烦躁,睡眠障碍,食欲增加,精神发育迟缓,激越,极端猜疑和渴求可卡因。在一些实施方案中,用化合物A治疗可以提高患者在至少一种下列量表上的分数:注意力缺陷性机能亢进障碍IV评价量表(scale) (ADHD-IV),汉密顿抑郁量表(HAM-D),汉密顿焦虑量表(HAM-A),Beck忧郁量表(inventory) (BDI),来自神经精神病学量表的冷漠量表,和认知功能量表。在一些实施方案中,认知功能评级量表选自维-贝二氏智力量表-修订版(WAIS-R),龚氏修订韦氏记忆量表(WMS-R),瑞尔听觉词语学习测试(RAVLT, Trials I-VII),Rey复杂图形测验(RCFT),和循迹连线测试(TMT,部分A和B)。在一些实施方案中,化合物A可以在患者中降低患者使用物质的数量和频率中的至少一种。在一些实施方案中,化合物A可以在患者中减轻至少一种物质的滥用、依赖或戒除中的至少一种症状。在一些实施方案中,化合物A可以减轻患者物质滥用的至少一种症状,该物质滥用选自:导致在工作、学校或家庭中无法履行主要义务的周期性物质使用;在身体处于危险情况下的周期性物质使用;涉及法律问题的周期性物质使用;和持续物质使用,尽管这种物质使用具有持久性的或周期性的社会或人与人之间的(由物质的后果所导致或加重)。在一些实施方案中,化合物A可以减轻患者物质依赖性的至少一种症状,选自:耐受性;戒除症状;常常摄取大量物质或然后期望持续较长时间;对削减或控制物质使用有持续的欲望和/或不成功的努力;为了获得物质、使用物质和恢复其效果而在至少一种活动中花费许多时间;由于物质使用而放弃和/或减少至少一种重要的社会、职业和娱乐活动;和尽管了解由物质导致或加重的持续和/或周期性身体和/或心理问题,但还继续使用物质。在一些实施方案中,化合物A可以促进患者的症状缓解。在一些实施方案中,症状缓解的特点在于:早期完全症状缓解、早期部分症状缓解、持续完全症状缓解和持续部分症状缓解的至少一种。在一些实施方案中,化合物A可以延长患者的症状缓解时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括用应变(contingency)管理和认知行为治疗的至少一种来治疗。在一些实施方案中,该方法进一步包括共同给予治疗有效量的至少一种选自下列的其它药剂:选择性的血清素再摄取抑制剂(SSRI),血清素-去甲肾上腺素再摄取抑制剂(SNRI),去甲肾上腺素再摄取抑制剂(NRI),去甲肾上腺素-多巴胺再摄取抑制剂(NDRI),血清素5-羟色胺1A(5HT1A)拮抗剂,多巴胺β-羟化酶抑制剂,腺苷酸受体拮抗剂,腺苷酸A2A受体拮抗剂,单胺氧化酶抑制剂(MAOI),单胺氧化酶B抑制剂,钠通道阻断剂,钙通道阻断剂,中枢和周围的α肾上腺素能受体拮抗剂,中枢α肾上腺素能激动剂,中枢或周围β肾上腺素能受体拮抗剂,NK-1受体拮抗剂,促皮质素释放因子(CRF)拮抗剂,非典型性的抗抑郁剂/抗精神病药,三环药物,抗惊厥剂,谷氨酸盐拮抗剂,γ-氨基丁酸(GABA)激动剂,GABA代谢酶抑制剂,GABA合成活化剂,部分多巴胺D2激动剂,多巴胺代谢酶抑制剂,儿茶酚-O-甲基-转移酶抑制剂,阿片样物质受体拮抗剂,情绪稳定剂,直接或间接多巴胺激动剂,部分5HT1激动剂,血清素5HT2拮抗剂,阿片样物质,羧化酶抑制剂,部分阿片样物质激动剂,部分烟酸激动剂和吸入剂。在一些实施方案中,至少一种

其它药剂是选自帕罗西汀、舍曲林、西酞普兰、艾司西酞普兰和氟西汀的SSRI。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是选自度洛西汀、米尔塔扎平(mirtazapine)和文拉法新的SNRI。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是选自安非他酮和阿托西汀(atomoxetine)的NRI。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是NDRI安非布他酮(BUPROPION)。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是多巴胺 β -羟化酶抑制剂双硫仑。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是腺苷酸A_{2A}受体拮抗剂istradefylline。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是选自乐命达、卡马西平、奥卡西平和丙戊酸盐的钠通道阻断剂。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是选自尼莫地平(nimodopone)、乐命达和卡马西平的钙通道阻断剂。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是中枢和周围 α 肾上腺素能受体拮抗剂哌唑嗪。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是中枢 α 肾上腺素能激动剂可乐定。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是中枢和周围 β 肾上腺素能受体拮抗剂普奈洛尔。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是选自安非他酮、奥氮平(olanzepine)、利培酮和喹硫平的非典型性的抗抑郁剂/抗精神病药。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是选自阿米替林、阿莫沙平、地昔帕明、多塞平、丙咪嗪、去甲替林、protipyline和三甲丙咪嗪的三环药剂。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是选自苯妥英、乐命达、卡马西平、奥卡西平、丙戊酸盐、托吡酯、噻加宾、氨己烯酸(vigabatrin)和左乙拉西坦的抗惊厥剂。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是谷氨酸盐拮抗剂托吡酯。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是选自巴氯芬、丙戊酸盐和托吡酯的GABA激动剂。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是多巴胺代谢酶抑制剂卡比多巴。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是部分多巴胺D₂激动剂阿立哌唑。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是选自纳曲酮和纳洛酮的阿片样物质受体拮抗剂。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是选自卡马西平和锂的情绪稳定剂。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是选自多巴胺、溴隐亭、培高利特、金刚烷胺、马吲哚(mazindole)和利他林的直接或间接多巴胺激动剂。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是部分5HT₁激动剂吉吡隆。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是血清素5HT₂拮抗剂利坦色林(ritanserin)。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是阿片样物质美沙酮。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是部分阿片样物质激动剂丁丙诺啡。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是部分烟酸激动剂chamipix。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是选自苯、甲苯、邻二甲苯、间二甲苯、对二甲苯、乙苯、氟苯、邻二氟代苯、1,3,5-三氟苯、1,2,4-三氟苯、五氟甲苯、五氟苯和全氟代苯的吸入剂。在一些实施方案中,该方法进一步包括共同给予治疗有效量的至少一种其它药剂,其它药剂选自苯并二氮杂~~革~~,左旋多巴,肌安宁(carisprodol),莫达非尼(modafenil),阿坎酸, γ -丁内酯, γ -羟基丁酸盐,阿片,二甲-4-羟色胺磷酸(psilocybin),幻觉蘑菇,烟草和烟碱。在一些实施方案中,在患者戒除物质使用一段时期之后,给予患者化合物A。在一些实施方案中,通过逐步升高给予患者的化合物A的量(直到观察到目标治疗响应为止),确定患者的化合物A的治疗有效量。在一些实施方案中,患者达到症状缓解之后,渐渐减少化合物A的量。在一些实施方案中,患者达到症状缓解之后,化合物A的量无变化。

[0067] 本发明还提供了治疗患者对至少一种物质的物质依赖的至少一个阶段的方法。在一些实施方案中,物质依赖性的至少一个阶段选自获得、保持、消退和复发阶段。该方法包括:给予患者治疗有效量的化合物A。在一些实施方案中,化合物A可以抑制患者获得阶段发

展。在一些实施方案中,化合物A可以促进患者消退阶段的发展。在一些实施方案中,化合物A可以降低患者的复发频率。在一些实施方案中,至少一种物质选自滥用的药和药物治疗。在一些实施方案中,滥用的药选自精神兴奋剂,阿片样物质,迷幻剂,吸入剂,镇静剂,镇定剂,安眠剂,抗焦虑药和非法物质。在一些实施方案中,精神兴奋剂是 β -苯基异丙胺衍生物。在一些实施方案中, β -苯基异丙胺衍生物选自安非他明、右旋安非他明和脱氧麻黄碱。在一些实施方案中,精神兴奋剂选自合成迷幻药,苯甲吗啉,利他林,安非拉酮,佩默林,氯苯咪唑啉,(-)去甲伪麻黄碱,和芬氟拉明。在一些实施方案中,阿片样物质选自Lortab,反胺苯环醇,海洛英,美沙酮,氢可酮和氧可酮。在一些实施方案中,迷幻剂选自裸盖菇素,幻觉磨,麦角酰二乙胺(LSD),苯西克定(PCP)和氯胺酮。在一些实施方案中,吸入剂选自苯,甲苯,邻二甲苯,间二甲苯,对二甲苯,乙苯,氟苯,邻二氟代苯,1,3,5-三氟苯,1,2,4-三氟苯,五氟甲苯,五氟苯和全氟代苯。在一些实施方案中,药物治疗选自麻醉药,镇痛药,抗胆碱能药,抗组胺剂,肌肉松弛药,非甾族抗炎症药物,非处方药品和抗抑郁药物。在一些实施方案中,滥用的药物是醇,咖啡因,阿片,大麻素,大麻,苯并二氮杂~~革~~(benzodiazapine),肌安宁(carisprodol),烟草,烟碱,扑热息痛(Vicodin),氢可酮,盐酸羟考酮,羟可酮和泰勒宁(Tylox)。在一些实施方案中,用化合物A治疗可以提高患者在至少一种下列量表上的分数:ADHD-IV,HAM-D,HAM-A,BDI,来自神经精神病学量表的冷漠量表和认知功能量表。在一些实施方案中,认知功能评级量表选自WAIS-R,WMS-R,RAVLT,Trials I-VII,RCFT和TMT(部分A和B)。在一些实施方案中,化合物A可以在患者中降低患者使用至少一种物质的数量和频率中的至少一种。在一些实施方案中,化合物A可以在患者中减轻至少一种物质的滥用、依赖或戒除中的至少一种症状。在一些实施方案中,化合物A可以减轻患者物质滥用的至少一种症状,该物质滥用选自:导致在工作、学校或家庭中无法履行主要义务的周期性物质使用;在身体处于危险情况下的周期性物质使用;涉及法律问题的周期性物质使用;和持续物质使用,尽管这种物质使用具有持久性的或周期性的社会或人与人之间的(由物质的后果所导致或加重)。在一些实施方案中,化合物A可以减轻患者物质依赖性的至少一种症状,症状选自:耐受性;戒除症状;常常摄取大量物质或然后持续较长时间;为了削减或控制物质使用而有持续的目标和/或不成功的努力;为了获得物质、使用物质和恢复其效果而在至少一种活动中花费许多时间;由于物质使用而放弃和/或减少至少一种重要的社会、职业和娱乐活动;和尽管了解由物质导致或加重的持续和/或周期性身体和/或心理问题,但还继续使用物质。在一些实施方案中,化合物A可以促进患者的症状缓解。在一些实施方案中,症状缓解的特点在于:早期完全症状缓解、早期部分症状缓解、持续完全症状缓解和持续部分症状缓解的至少一种。在一些实施方案中,化合物A可以延长患者的症状缓解时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括用应变管理和认知行为治疗的至少一种来治疗。在一些实施方案中,该方法进一步包括共同给予治疗有效量的至少一种选自下列的其它药剂:选择性的血清素再摄取抑制剂(SSRI),血清素-去甲肾上腺素再摄取抑制剂(SNRI),去甲肾上腺素再摄取抑制剂(NRI),去甲肾上腺素-多巴胺再摄取抑制剂(NDRI),血清素5-羟色胺1A(5HT1A)拮抗剂,多巴胺 β -羟化酶抑制剂,腺苷酸受体拮抗剂,腺苷酸A2A受体拮抗剂,单胺氧化酶抑制剂(MAOI),单胺氧化酶B抑制剂,钠通道阻断剂,钙通道阻断剂,中枢和周围的 α 肾上腺素能受体拮抗剂,中枢 α 肾上腺素能激动剂,中枢或周围 β 肾上腺素能受体拮抗剂,NK-1受体拮抗剂,促皮质素释放因子(CRF)拮抗剂,非典型性的抗抑郁剂/抗精神病药,三环

药物,抗惊厥剂,谷氨酸盐拮抗剂, γ -氨基丁酸(GABA)激动剂,GABA代谢酶抑制剂,GABA合成活化剂,部分多巴胺D2激动剂,多巴胺代谢酶抑制剂,儿茶酚-O-甲基-转移酶抑制剂,阿片样物质受体拮抗剂,情绪稳定剂,直接或间接多巴胺激动剂,部分5HT1激动剂,血清素5HT2拮抗剂,阿片样物质,羧化酶抑制剂,部分阿片样物质激动剂,部分烟酸激动剂和吸入剂。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是选自帕罗西汀、舍曲林、西酞普兰、艾司西酞普兰和氟西汀的SSRI。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是选自度洛西汀、米尔塔扎平(mirtazapine)和文拉法新的SNRI。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是选自安非他酮和阿托西汀(atomoxetine)的NRI。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是NDRI安非布他酮(BUPROPION)。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是多巴胺 β -羟化酶抑制剂双硫仑。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是腺苷酸A2A受体拮抗剂istradefylline。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是选自乐命达、卡马西平、奥卡西平和丙戊酸盐的钠通道阻断剂。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是选自尼莫地平(nimodopone)、乐命达和卡马西平的钙通道阻断剂。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是中枢和周围 α 肾上腺素能受体拮抗剂哌唑嗪。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是中枢 α 肾上腺素能激动剂可乐定。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是中枢和周围 β 肾上腺素能受体拮抗剂普奈洛尔。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是选自安非他酮、奥氮平(olanzapine)、利培酮和喹硫平的非典型性的抗抑郁剂/抗精神病药。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是选自阿米替林、阿莫沙平、地昔帕明、多塞平、丙咪嗪、去甲替林、protriptyline和三甲丙咪嗪的三环药剂。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是选自苯妥英、乐命达、卡马西平、奥卡西平、丙戊酸盐、托吡酯、噻加宾、氨己烯酸(vigabatrin)和左乙拉西坦的抗惊厥剂。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是谷氨酸盐拮抗剂托吡酯。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是选自巴氯芬、丙戊酸盐和托吡酯的GABA激动剂。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是多巴胺代谢酶抑制剂卡比多巴。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是部分多巴胺D2激动剂阿立哌唑。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是选自纳曲酮和纳洛酮的阿片样物质受体拮抗剂。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是选自卡马西平和锂的情绪稳定剂。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是选自多巴胺、溴隐亭、培高利特、金刚烷胺、马吲哚(mazindole)和利他林的直接或间接多巴胺激动剂。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是部分5HT1激动剂吉吡隆。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是血清素5HT2拮抗剂利坦色林(ritanserin)。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是阿片样物质美沙酮。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是部分阿片样物质激动剂丁丙诺啡。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是部分烟酸激动剂chamipix。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是选自苯、甲苯、邻二甲苯、间二甲苯、对二甲苯、乙苯、氟苯、邻二氟代苯、1,3,5-三氟苯、1,2,4-三氟苯、五氟甲苯、五氟苯和全氟代苯的吸入剂。在一些实施方案中,该方法进一步包括共同给予治疗有效量的至少一种其它药剂,其它药剂选自苯并二氮杂䓬,左旋多巴,肌安宁(carisprodol),莫达非尼(modafenil),阿坎酸, γ -丁内酯, γ -羟基丁酸盐,阿片,psilocybin,幻觉蘑菇,烟草和烟碱。在一些实施方案中,在患者戒除物质使用一段时期之后,给予患者化合物A。在一些实施方案中,通过逐步升高给予患者的化合物A的量(直到观察到目标治疗响应为止),确定患者的化合物A的治疗有效量。在一些实施方案中,患者达到症状缓解之后,渐渐减少化合物A的量。在一些实施方案中,患者达到症状缓解之后,化合物

A的量无变化。

[0068] 本发明还提供了治疗患者可卡因依赖性的至少一个阶段的方法。在一些实施方案中,至少一个阶段选自获得、保持、消退和复发阶段。该方法包括:给予患者治疗有效量的化合物A。在一些实施方案中,化合物A可以抑制患者获得阶段发展。在一些实施方案中,化合物A可以促进患者消退阶段的发展。在一些实施方案中,化合物A可以降低患者的复发频率。在一些实施方案中,化合物A可以在患者中减轻可卡因的滥用、依赖或戒除中的至少一种症状。在一些实施方案中,化合物A可以减轻患者可卡因滥用的至少一种症状,症状选自:导致在工作、学校或家庭中无法履行主要义务的周期性可卡因使用;在身体处于危险情况下的周期性可卡因使用;涉及法律问题的周期性可卡因使用;和持续可卡因使用,尽管这种物质使用具有持久性的或周期性的社会或人与人之间的问题(由可卡因的后果所导致或加重)。在一些实施方案中,化合物A可以减轻患者可卡因依赖性的至少一种症状,症状选自:耐受性;戒除症状;常常摄取大量可卡因或然后期望持续较长时间;为了削减或控制可卡因使用而有持续的欲望和/或不成功的努力;为了获得可卡因、使用可卡因和恢复其效果而在至少一种活动中花费许多时间;由于可卡因使用而放弃和/或减少至少一种重要的社会、职业和娱乐活动;和尽管了解由可卡因导致或加重的持续和/或周期性身体和/或心理问题,但还继续使用可卡因。在一些实施方案中,化合物A可以减轻患者可卡因滥用和依赖性的至少一种症状,症状选自:注意力缺陷性机能亢进障碍;陶醉感;活力、兴奋和社交性提高;不感到饥饿和疲劳;生理和心理力量的明显感觉;痛觉降低;支气管炎;气短;胸痛;心悸;心律失常;心肌病;心力衰竭;瞳孔扩大;恶心;呕吐;头痛;头晕;眩晕;焦虑;精神异常;意识模糊;鼻发炎;鼻痂皮;周期性鼻出血;鼻不通气;面部疼痛;烦躁;和可卡因渴求。在一些实施方案中,化合物A可以增大可卡因滥用和依赖性的至少一种负面主观症状。在一些实施方案中,化合物A可以减轻至少一种可卡因戒除症状,戒除症状选自疲劳,缺乏快乐,忧郁症,烦躁,睡眠障碍,食欲增加,精神发育迟缓,激越,极端猜疑和渴求可卡因。在一些实施方案中,化合物A可以提高患者至少一种下列量表上的分数:ADHD-IV,HAM-D,HAM-A,BDI,来自神经精神病学量表的冷漠量表和认知功能量表。在一些实施方案中,认知功能评级量表选自WAIS-R,WMS-R,RAVLT,Trials I-VII,RCFT和TMT(部分A和B)。在一些实施方案中,化合物A可以在患者中降低患者使用可卡因的数量和频率中的至少一种。在一些实施方案中,化合物A可以促进患者的症状缓解。在一些实施方案中,症状缓解的特点在于:早期完全症状缓解、早期部分症状缓解、持续完全症状缓解和持续部分症状缓解的至少一种。在一些实施方案中,化合物A可以延长患者的症状缓解时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括用应变管理和认知行为治疗的至少一种来治疗。在一些实施方案中,该方法进一步包括共同给予治疗有效量的至少一种选自下列的其它药剂:选择性的血清素再摄取抑制剂(SSRI),血清素-去甲肾上腺素再摄取抑制剂(SNRI),去甲肾上腺素再摄取抑制剂(NRI),去甲肾上腺素-多巴胺再摄取抑制剂(NDRI),血清素5-羟色胺1A(5HT1A)拮抗剂,多巴胺β-羟化酶抑制剂,腺苷酸受体拮抗剂,腺苷酸A2A受体拮抗剂,单胺氧化酶抑制剂(MAOI),单胺氧化酶B抑制剂,钠通道阻断剂,钙通道阻断剂,中枢和周围的α肾上腺素能受体拮抗剂,中枢α肾上腺素能激动剂,中枢或周围β肾上腺素能受体拮抗剂,NK-1受体拮抗剂,促皮质素释放因子(CRF)拮抗剂,非典型性的抗抑郁剂/抗精神病药,三环药物,抗惊厥剂,谷氨酸盐拮抗剂,γ-氨基丁酸(GABA)激动剂,GABA代谢酶抑制剂,GABA合成活化剂,部分多巴胺D2激动剂,多巴胺代谢酶

抑制剂,儿茶酚-O-甲基-转移酶抑制剂,阿片样物质受体拮抗剂,情绪稳定剂,直接或间接多巴胺激动剂,部分5HT1激动剂,血清素5HT2拮抗剂,阿片样物质,羧化酶抑制剂,部分阿片样物质激动剂,部分烟酸激动剂和吸入剂。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是选自帕罗西汀、舍曲林、西酞普兰、艾司西酞普兰和氟西汀的SSRI。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是选自度洛西汀、米尔塔扎平(mirtazapine)和文拉法新的SNRI。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是选自安非他酮和阿托西汀(atomoxetine)的NRI。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是NDRI安非布他酮(BUPROPION)。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是多巴胺 β -羟化酶抑制剂双硫仑。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是腺苷酸A2A受体拮抗剂istradefylline。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是选自乐命达、卡马西平、奥卡西平和丙戊酸盐的钠通道阻断剂。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是选自尼莫地平(nimodopone)、乐命达和卡马西平的钙通道阻断剂。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是中枢和周围 α 肾上腺素能受体拮抗剂哌唑嗪。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是中枢 α 肾上腺素能激动剂可乐定。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是中枢和周围 β 肾上腺素能受体拮抗剂普奈洛尔。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是选自安非他酮、奥氮平(olanzapine)、利培酮和喹硫平的非典型性的抗抑郁剂/抗精神病药。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是选自阿米替林、阿莫沙平、地昔帕明、多塞平、丙咪嗪、去甲替林、protipyline和三甲丙咪嗪的三环药剂。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是选自苯妥英、乐命达、卡马西平、奥卡西平、丙戊酸盐、托吡酯、噻加宾、氨己烯酸(vigabatrin)和左乙拉西坦的抗惊厥剂。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是谷氨酸盐拮抗剂托吡酯。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是选自巴氯芬、丙戊酸盐和托吡酯的GABA激动剂。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是多巴胺代谢酶抑制剂卡比多巴。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是部分多巴胺D2激动剂阿立哌唑。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是选自纳曲酮和纳洛酮的阿片样物质受体拮抗剂。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是选自卡马西平和锂的情绪稳定剂。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是选自多巴胺、溴隐亭、培高利特、金刚烷胺、马吲哚(mazindole)和利他林的直接或间接多巴胺激动剂。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是部分5HT1激动剂吉吡隆。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是血清素5HT2拮抗剂利坦色林(ritanserin)。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是阿片样物质美沙酮。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是部分阿片样物质激动剂丁丙诺啡。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是部分烟酸激动剂champix。在一些实施方案中,至少一种其它药剂是选自苯、甲苯、邻二甲苯、间二甲苯、对二甲苯、乙苯、氟苯、邻二氟代苯、1,3,5-三氟苯、1,2,4-三氟苯、五氟甲苯、五氟苯和全氟代苯的吸入剂。在一些实施方案中,该方法进一步包括共同给予治疗有效量的至少一种其它药剂,其它药剂选自苯并二氮杂~~革~~,左旋多巴,肌安宁(carisprodol),莫达非尼(modafenil),阿坎酸, γ -丁内酯, γ -羟基丁酸盐,阿片,psilocybin,幻觉蘑,烟草和烟碱。在一些实施方案中,在患者戒除可卡因使用一段时期之后,给予患者化合物A。在一些实施方案中,通过逐步升高给予患者的化合物A的量(直到观察到目标治疗响应为止),确定患者的化合物A的治疗有效量。在一些实施方案中,患者达到可卡因依赖性的症状缓解之后,渐渐减少化合物A的量。在一些实施方案中,患者达到可卡因依赖性的症状缓解之后,化合物A的量无变化。在一些实施方案中,化合物A可以治疗患者中的至少一种次级(secondary)性物质的滥用、

依赖或戒除中的至少一种症状。在一些实施方案中,至少一种次级(secondary)物质选自滥用的药物和药物治疗。在一些实施方案中,滥用的药物选自精神兴奋剂,阿片样物质,迷幻剂,吸入剂,镇静剂,镇定剂,安眠剂,抗焦虑药和非法物质。在一些实施方案中,精神兴奋剂是 β -苯基异丙胺衍生物。在一些实施方案中, β -苯基异丙胺衍生物选自安非他明、右旋安非他明和脱氧麻黄碱。在一些实施方案中,精神兴奋剂选自合成迷幻药,苯甲吗啉,利他林,安非拉酮,佩默林,氯苯咪唑啉,(-)去甲伪麻黄碱,和芬氟拉明。在一些实施方案中,阿片样物质选自Lortab,反胺苯环醇,海洛英,美沙酮,氢可酮和氧可酮。在一些实施方案中,迷幻剂选自裸盖菇素,幻觉蘑,麦角酰二乙胺(LSD),苯西克定(PCP)和氯胺酮。在一些实施方案中,吸入剂选自苯,甲苯,邻二甲苯,间二甲苯,对二甲苯,乙苯,氟苯,邻二氟代苯,1,3,5-三氟苯,1,2,4-三氟苯,五氟甲苯,五氟苯和全氟代苯。在一些实施方案中,药物治疗选自麻醉药,镇痛药,抗胆碱能药,抗组胺剂,肌肉松弛药,非甾族抗炎药物治疗,非处方药品治疗和抗抑郁药物治疗。在一些实施方案中,滥用的药是醇,咖啡因,阿片,大麻素,大麻,苯并二氮杂革,肌安宁(carisprodol),烟草,烟碱,扑热息痛(Vicodin),氢可酮,盐酸羟考酮,羟可酮和泰勒宁(Tylox)。

[0069] 可药用衍生物包括酸、碱、烯醇醚和酯、酯、水合物、溶剂化物和前体药物形式。选择衍生物,以使它的药物动力学(pharmokinetic)特性相对于相应中性药剂的至少一种特征是优越的。可以在加工制剂之前将化合物A衍生化。

[0070] 化合物A或可药用衍生物的治疗有效量可以根据成瘾性或依赖性的严重程度、患者的年龄和相对健康情况、所使用化合物的效能及其它因素而广泛地变化。在某些实施方案中,治疗有效量是每天每千克体重大约0.1毫克(mg/kg)至每天大约50mg/kg体重。在其它实施方案中,该量大约是1.0至大约10mg/kg/天。因此,在某些实施方案中,对于70kg的人,治疗有效量是大约7.0至大约3500mg/天,而在其它实施方案中,它大约是70至大约700mg/天。

[0071] 不用过分实验,并且依靠自身的知识和本申请的公开内容,治疗这种疾病领域的普通技术人员能够确定化合物A用于治疗或预防成瘾性或依赖性的治疗有效量。通常(例如但不限于),可以通过下列途径之一以药物组合物形式给予化合物A:口服,系统(例如,透皮、鼻内或栓剂)或肠胃外给予(例如,肌内、静脉内或皮下)。组合物可以(例如但不限于)采用下列形式:片剂,丸剂,胶囊,半固体,粉剂,持续释放制剂,溶液剂,混悬剂,酏剂,气雾剂或任何其它合适的组合物,并且通常包含化合物A与至少一种可药用赋形剂的组合。可接受的赋形剂是(例如但不限于)无毒的、有助于给药的试剂,并且不会不利地影响化合物的治疗益处。这种赋形剂可以例如是任何固体、液体、半固体,或在气雾剂组合物情况下,可以是本领域技术人员通常可得到的气体赋形剂。

[0072] 固体药物赋形剂包括(例如但不限于)淀粉,纤维素,滑石粉,葡萄糖,乳糖,蔗糖,明胶,麦芽,稻米,面粉,白垩,硅胶,硬脂酸镁,硬脂酸钠,单硬脂酸甘油酯,氯化钠,脱脂奶粉,等等。液体和半固体赋形剂可以选自(例如但不限于)水,乙醇,丙三醇,丙二醇和各种油剂,包括石油产品、动物、植物或合成源的那些赋形剂(例如,花生油,大豆油,矿物油,芝麻油,等等)。优选液体载体,特别是注射溶液,包括(例如但不限于)水、盐水、葡萄糖水溶液和二醇。压缩气体可以以气雾剂形式来分散化合物。适合于该目的惰性气体是(例如但不限于)氮气、二氧化碳、一氧化二氮,等等。

[0073] 此外,药物制剂可以(例如但不限于)包含防腐剂,增溶剂,稳定剂,湿润剂,乳化剂,甜味剂,颜料,香味素,改变渗透压力的盐,缓冲液,掩蔽剂或抗氧化剂。在某些实施方案中,它们还可以包含其它有治疗价值的物质。其它合适的药物载体和它们的制剂描述在A.R.Alfonso Remington's Pharmaceutical Sciences 1985,17th ed.Easton,Pa.:Mack Publishing Company中。

[0074] 在组合物中,化合物A的量可以广泛地改变,这取决于例如制剂的类型、单位剂量的大小、赋形剂的类型及药物科学领域技术人员已知的其它因素。通常,最终组合物包含10%w至90%w的化合物,优选25%w至75%w,其余部分是赋形剂。优选,对于连续治疗,以单一单位剂型的形式给予药物组合物,或当具体需要减轻症状时,以不限制的单一单位剂型形式给予。

[0075] 实施例

[0076] 实施例1

[0077] 口服 $[^{14}\text{C}]$ -内匹司他(nepicastat)之后,血浆中的大部分放射性与内匹司他(nepicastat)相关联,其是内匹司他(nepicastat)的N-连接的葡萄糖苷酸(代谢物2,M2),和未鉴定的极性片段(M1)。使用多剂量,内匹司他(nepicastat)没有显著的积聚,并且在单和多剂量之后, $T_{1/2}$ 是相似的。 $T_{1/2}$ 是10-14小时。人们注意到,对于内匹司他(nepicastat),在具有快速乙酰化表型的患者和缓慢乙酰化表型的患者之间, C_{max} 或AUC没有显著差别,虽然在缓慢乙酰化中的N-乙酰基代谢物的 C_{max} 和AUC比在快速乙酰化中的N-乙酰基代谢物的 C_{max} 和AUC低得多(象预期的那样)。在比较40mg片剂(同时禁食或在膳食之后)的药物动力学的研究中,血浆浓度没有显著差异。 T_{ax} 从禁食状态的1.4小时升至膳食之后的3.5小时。

[0078] 在男性和女性中,比较了单一给药40mg之后的内匹司他(nepicastat)的药物动力学。在女性中,AUC大约比男性中的AUC大43%,女性比男性中的 C_{max} 大约大23%。女性比男性中的 $T_{1/2}$ 长。用40mg剂量给药10天之后比较内匹司他(nepicastat)的药物动力学,健康受试者中的AUC比患有CHEF的受试者的AUC高, $T_{1/2}$ 没有差别。在任何人群中,使用多剂量没有出现显著的累积现象。

[0079] 在人中,与化合物有关的放射性可以快速消除。在头72小时,回收平均87.4%所给予的放射性同位素,其中82.4%在尿中,5.01%在排泄物中。10天之后,放射性同位素的平均总回收率是93.8%。在血浆中,放射性的 T_{ax} 是1-2小时(与内匹司他(nepicastat)情况相似)。在快速和缓慢乙酰化过程中,经过0至48小时,内匹司他(nepicastat)的N-连接的葡萄糖苷酸表明,在血浆中(26.8%)和尿中(57.9%)具有总放射性的最大百分比。发现血浆中的总放射性的最终 $T_{1/2}$ 很长(~ 100 小时),很可能是由于所存在的低浓度的极性部分消除缓慢。

[0080] 实施例2

[0081] 在设计评价内匹司他对认知功能的效果的研究中,用5或40mg内匹司他治疗受试者,对情绪、睡眠或认知能力没有显著的损害。在 ^{123}I 的甲状腺吸收的研究中,5、40和100mg剂量的内匹司他与安慰剂没有差别。在给予单一200mg剂量的内匹司他之后,吸收的降低显著地大于安慰剂,但显著地小于10mg剂量的甲巯咪唑之后的值。在单一剂量的一期研究中,在健康男人中,通常可以较好地耐受5至100mg剂量(基于盐酸盐计算剂量)的内匹司他。

[0082] 实施例3

[0083] 在内匹司他的多剂量一期研究中,在健康的男人中,通常可以较好地耐受5和40mg的剂量。

[0084] 用200mg治疗8天(或更长时间)的6个患者中的5个,形成皮疹,这种皮疹可自发地消除。

[0085] 用200mg内匹司他给药6天之后,一个患者形成房性心律不齐和周期性的右束支传导阻滞。

[0086] 实施例4

[0087] 在受试者设计之内,使用双盲、安慰剂对照来研究十六个非治疗性寻找可卡因依赖性志愿者(以住院病人的方式)。在知情同意之后,对潜在的志愿者实施门诊精神病和医学筛选。确认合格志愿者,并完成身体检查、EKG、妊娠试验和精神测试。该研究使用逐步提高的剂量设计,其中参加者(n=12)在每天用递增剂量的内匹司他(0mg, 80mg, 160mg)治疗期间接受递增剂量的可卡因(0mg, 10mg, 20mg和40mg)。为了保持盲性,在整个研究时期内,参加者的平行组(n=4)每天只接受安慰剂治疗。每天进行每个剂量水平的治疗,治疗4天,或超过内匹司他的4个半衰期(10至14小时)。在每个剂量水平治疗的第4天,使参加者按照0mg、10mg、20mg和40mg的顺序接受可卡因。以每小时的间隔给予可卡因,对心血管和主观效果提供足够的时间,以便回到基线。在与给予可卡因有关的所有过程期间,使用连续EKG和频繁的血压来小心地监控心血管指标,如果心血管指标超过预定极限,当时就中止参数监控,不再给予可卡因。先前的研究表明,以14分钟间隔给予6个剂量的32mg可卡因是安全的,将剂量间隔延长至1小时,可以进一步增加安全性。收集血样,分析10mg可卡因(在用0mg内匹司他治疗的第三天给予,在用80mg和160mg内匹司他治疗的第三天再次给予)的药物动力学。研究内匹司他对可卡因的药物动力学的效果。基于现有信息,没有预期的相互作用。

[0088] 每个参加者完成该研究大约需要12天。在一年之内,16个参加者可以完成该研究。

[0089] 为了参与该研究,参加者必须:

[0090] 1.是说英语的志愿者,其在研究的时候不会寻找治疗;

[0091] 2.在18-55岁之间;

[0092] 3.符合可卡因依赖性的DSM-IV TR标准;

[0093] 4.具有自我记录的使用(通过IV途径)可卡因的历史,并且在允许之前,提供至少一份可卡因阳性尿;

[0094] 5.具有生命特征如下:静止脉搏在50和95bpm之间,血压在85-150mm Hg心脏收缩压和45-96mm Hg心脏舒张压之间;必须在允许的2天之内符合该标准

[0095] 6.具有在正常(+/-10%)范围之内的血液病和化学实验室试验,下列例外:a)肝功能试验(总胆红素,ALT,AST和碱性磷酸酶)≤3x正常值上限,和b)肾功能试验(肌酐和BUN)≤2x正常值上限;

[0096] 7.具有显示临床上正常窦性节律、临床上正常传导和没有临床上显著心律失常的基准EKG;

[0097] 8.具有病史和简要的身体检查,显示没有针对参加研究的临床上显著的禁忌症,由入院医生和主要的调查者来判断。

[0098] 在研究中,如果有下列情况的话,从参与者中排除潜在的参加者:

[0099] 1.具有说明癫痫障碍或脑损伤的任何历史或证据;

- [0100] 2.对可卡因具有任何先前的医学不良反应,包括意识丧失、胸痛或癫痫性的发作;
- [0101] 3.具有神经病或精神病症,例如:
- [0102] ●精神异常,双相疾病或重度忧郁症(通过SCID评价);
- [0103] ●器质性脑疾病或痴呆,通过临床访谈来评价;
- [0104] ●需要进行治疗或使研究依从性困难的任何精神病症的历史;
- [0105] ●在过去的三个月之内具有自杀尝试的历史(通过SCID评价)和/或当前具有自杀观念/计划(通过SCID评价);
- [0106] 4.具有临床上显著的心脏病或高血压症的证据,通过PI确定,即使参加者可以摄取抗高血压药;
- [0107] 5.在早期心血管发病或致死的一级亲属中具有家族史,通过PI确定;
- [0108] 6.具有未经治疗的或不稳定的医学疾病的证据,包括:神经内分泌、自身免疫、肾、肝脏或活动性的传染病;
- [0109] 7.具有HIV,并且当前出现症状,具有AIDS的诊断,或正接受抗逆转录病毒药物;
- [0110] 8.怀孕或哺乳期间。其它女性必须不能怀孕(即,通过手术绝育,无生殖力或绝经后)或使用可靠的避孕形式(例如,禁欲,避孕丸药,避孕环,避孕套或杀精子剂)。在进入研究之前、当医院允许时、和在研究参与的最后,所有的女性必须提供阴性妊娠尿检验;
- [0111] 9.患有哮喘或当前使用 α 或 β 激动剂、茶碱或其它拟交感神经药;
- [0112] 10.患有任何其它疾病、状况,或使用影响精神的药物,其从PI和/或入院医生的观点来看将会妨碍安全和/或成功地完成该研究。
- [0113] 开始之后的中止标准
- [0114] 11.阳性尿药物筛选或呼吸试验表明非法使用可卡因,可卡因、醇、阿片剂或其它滥用的药物,这些不作为该方案的一部分来递送;
- [0115] 12.不能遵照研究过程;
- [0116] 13.由于对可卡因的夸大响应,符合中止标准,如下所述。
- [0117] 中止标准
- [0118] 参加者必须持续符合纳入标准,以便保留在方案中。如果存在临床上显著的心律失常,或如果生命特征超出可接受值域范围(静止脉搏 <130 bpm,血压低于165mm Hg心脏收缩压和100mm Hg心脏舒张压),则不能开始给予可卡因。这些数值比纳入/排除标准的那些数值高,这是因为生命特征的暂时提高可能在接受可卡因的预期情况中出现。另外,如果存在可卡因毒性的行为现象(激越,精神异常,不能与研究过程协同),则不能给予重复剂量的可卡因(研究医生中止持续的可卡因递送)。
- [0119] 进一步参与的中止标准
- [0120] 如果出现任何下列状况的话,终止受试者参与:
- [0121] 1.心脏收缩BP >180 mm Hg,持续5分钟或5分钟以上;
- [0122] 2.心脏舒张BP >120 mm Hg,持续5分钟或5分钟以上;
- [0123] 3.心率 $>(220-\text{年龄}\times 0.85)$ bpm,持续5分钟或5分钟以上。
- [0124] 受试者选择标准的基本原理
- [0125] 要求参加者已通过IV途径使用可卡因,以避免使参加者接触能够产生更强内感受性效果的给药途径。首先选择年龄标准,以避免登记的参加者患有未确诊的心血管疾病。将

患有活动性HIV疾病的参加者排除,以避免其原发疾病可能恶化;可以包括患有无症状HIV的参加者,这是因为该群组处于可卡因依赖性的高风险之中。排除患有哮喘的参加者(或摄取哮喘药物的参加者),这是由于在 β 激动剂药物和可卡因之间可能存在的不利相互作用。

[0126] 研究药物

[0127] 通过抑制DA、NE和血清素吸收到突触前的贮藏粒中,可卡因可产生原型兴奋效果。可卡因具有短时的消除半衰期,大约90分钟。可卡因的主要临床效果是精神运动激发和提高交感神经紧张性,心率和血压提高明显。

[0128] 给予最高达40mg单一剂量的可卡因,并且在自我给予阶段中给予最高达200mg,包括以13分钟间隔给予的10个20mg剂量。与在这些研究中已经报道的参加者每天使用数量相比,这些剂量是适度的;典型的日剂量模式是平均250mg至500mg或更多。

[0129] 比本文推荐剂量更高的剂量与癫痫发作和与严重心血管毒性和死亡有关。通过利用相对低的剂量、小心筛选潜在的志愿者、通过给予参与人可卡因之后进行小心监控和在不利的环境下迅速进行医学干预,这些可能的毒性得到改善。

[0130] IV给予可卡因,可以使利用率达到完全。通过不知道是否受内匹司他影响的血浆酯酶,可卡因主要代谢为苯甲酰芽子碱。苯甲酰芽子碱及其它较少的代谢物被经肾(renally)排泄掉。

[0131] 在人类中,IV使用的可卡因是从NIDA承包商处获得的,获得了允许我们参考可卡因的NIDA's IND的授权书,并且提交给了FDA。

[0132] 在7AM给予内匹司他的递增剂量(0mg、80mg和160mg)。每个剂量水平的治疗持续4天。

[0133] 以较低剂量起始,并且在研究过程的第一个系列完成之后增加剂量,这样就可以使内匹司他和可卡因的组合的危险最小化。这种方法还可以降低皮疹的危险,到目前为止,皮疹在7%至20%的志愿者中出现。皮疹发生率与剂量和治疗持续时间有关。高于160mg的剂量会产生更大的皮疹危险。

[0134] 不会发生药物动力学相互作用,因为内匹司他不是酶抑制剂,这可以通过内匹司他的每个剂量水平治疗的第三天给予10mg剂量可卡因的药物动力学评价来证明。因为内匹司他降低NE的合成,所以在用内匹司他治疗期间,可卡因的奖赏效果可以降低。因为内匹司他提高DA的血浆和脑浓度,所以可能出现DA介导的副作用例如偏执狂。这些症状在CHF的试验期间没有观察到,但在那些研究中没有给予兴奋剂。

[0135] 在允许之后,要求参与人提交可卡因阳性尿样品,用于记录正在进行的药品使用。在筛选和记录心率和动作的整个研究期间,还要求一些参与人(受到可提供的器件数量的限制)佩戴遥测器件。基于这些参数的变化,由这种器件的数据可以鉴定药品使用情节。

[0136] 为了控制烟碱接触,在与可卡因给予或接触暗示有关的研究过程的2小时之内,禁止吸烟。在研究期间,要求参与人戒除非法和处方药品使用,并且用每天的尿和呼吸酒精指标试验来确认。

[0137] 对于给定的参与人,在每天的大约同一时间进行实验阶段。在实验室中给予可卡因。使用注射泵给予可卡因,注射泵可以在2分钟内给予正确剂量的可卡因或盐水安慰剂。在药品给予阶段期间和药品给予阶段之后1小时,监控心率和血压。

[0138] 对参与人进行目标的历史和身体检查。抽取血液进行标准实验室试验,包括CBC、

电解质、LFT和肌酐。作为一项服务对参与人进行HIV筛选,并且对试验阳性的那些参与人提出劝告和治疗意见。

[0139] 在一些志愿者中,在允许进入之前,Actiheart MiniMitter用于测定心率和运动(志愿者数量受可提供器件数量的限制)。使用涂胶将MiniMitter安装在参与人的皮肤上,并且非侵入式地记录EKG和运动(至多记录两周)。可以将数据下载到PC上,用于随后的分析。

[0140] 参与人必须符合可卡因和烟碱依赖性的DSM-IV-TR标准(通过Mini International Neuropsychiatric Interview(MINI)来确定),并且由纳入/排除标准来定义。MINI是短时的有客观标准的诊断面谈,在1990年由美国 and 欧洲的精神病学家和临床医师所开发,用于DSM-IV TR和ICD-10精神病症。MINI是用于精神病评价选择的有客观标准的面谈,并且是临床精神药理学试验和流行病学研究中记录的结果,是世界上最广泛使用的精神病有客观标准的诊断面谈手段。这种手段可用于确定是否患者符合药物依赖性的DSM-IV TR标准,并且排除任何重度精神病症(例如,情感障碍,精神分裂症)。

[0141] 通过在筛选期间训练研究人员,实施成瘾严重性指数-Lite临床系数(ASI-Lite CF)形式。ASI-Lite是面谈者在七个领域(医学,职业,药品使用,醇使用,法律,家族/社会和心理)估计的参与人状态的严重程度。Lite形式是ASI的较短形式,其还保留用于计算ASI综合记录的所有问题。与ASI-Lite形式收集最小量家族史信息一样,保留了ASI的家族史部分。

[0142] 现有于1996年修订的第三版Beck抑郁症量表(BDI)。该工具书保留了它的原始21条问卷结构,其需要大约10分钟完成。已经针对BDI-IA验证了BDI-II,并且仍旧是抑郁/痛苦的出色指数。这种指标用于监控试验期间变得临床上抑郁的参与人,使它还是参与人安全的量度标准。

[0143] 现行的注意力缺陷机能亢进障碍(ADHD)症状是使用ADHD-IV评级量表每周进行评价的。

[0144] 来自神经精神病学量表的冷漠量表是以基线形式被收集的。

[0145] 用施加到Whatman FTA卡片上的口腔拭子来收集DNA。这些卡片可以提供用于DNA提取的生物样品的安全和稳态存储。基因组DNA的预测产率是50-100 μ g,其适用于超过500个基因型的试验(使用现行方法)。

[0146] 使用基于5' 外核酸酶(Taqman)的基因型试验来确定基因型。试验是由Applied Biosystems(ABI; Assays by Design)开发的。使用ABI 3730实时PCR扩增仪(cycler)进行等位基因辨别。

[0147] 在用0mg内匹司他治疗期间(研究第1天)和在用80mg和160mg内匹司他治疗期间(研究第4和8天),收集用于分析可卡因的药物动力学的血样。在用每个剂量水平的内匹司他治疗的第三天,给予10mg可卡因之后-15、20、30、40、50、60、90、120、180、240、300、360、420和480分钟之后,收集血样。注意:在用每个剂量水平的内匹司他治疗的第4天,给予另外剂量的可卡因(0-40mg),因此,药物动力学评价不会妨碍其它评价。收集血液,分离血浆,并在-70 $^{\circ}$ C冷冻,直到分析为止。使用液相色谱/串联质谱(LC/MS/MS)来分析可卡因和BE。对于这些分析,参考实验室具有2.5ng/ml的定量限制。药物动力学分析阐明了内匹司他对可卡因的药物动力学的效果。

[0148] DBH保存在NE贮藏粒中,并且与NE一起释放。由此,血浆DBH给出了在CNS之内的酶活性的良好指数。每天在10AM(在给予可卡因/安慰剂之前)将取血液样品,并存放用于随后的分析。使用酪胺-酚乙醇胺方法,使用先前所描述的高效液相色谱-荧光系统,测定DBH活性。这可以试验DBH随时间推移的变化,提供对内匹司他抑制DBH的药效的了解。在整个方案中,重复给予BDI,以便监控情绪变化。

[0149] 使用计算机化的视觉模拟量表(VAS)测定主观效果,其由连续的10cm数字化线条组成,目的是从0至100打分。要求参与人将光标从左手端移开,通过按下左或右侧鼠标键移动到线条上,用于在线条上进行左右移动。设计VAS,以便提供快速获得的可卡因陶醉感、烦躁和渴求的评级。这些包括下列评级:“任何药效”,“高”,“良好效果”,“激励”和“不良效果”,“偏执狂感觉”,“猜疑感觉”和“如果可能就会使用可卡因”,“渴求可卡因”,“现在可以拒绝可卡因”和“需要可卡因”。在给予可卡因之前,并在药品给予之后5、10、15、20、30和45分钟,收集VAS测定结果。

[0150] 给予可卡因之后15分钟,询问参与人他们为了该剂量的药品需要支付多少钱,以\$50/克为基准(如果从非法渠道购买,以现行成本为基准)。提供这种固定数字,以使反应标准化(假定可卡因的价格随着时间和地方的不同而改变)。

[0151] 在第13天(用研究药物治疗的最后一天),所有的患者都参与“实验阶段”,其中患者在金钱和安慰剂(盐水)或20mg可卡因的双盲输液之间可以进行一系列选择。在一个阶段中,只可以得到安慰剂(盐水)。在另一个阶段中,只可得到20mg可卡因。参与人选择自我给予安慰剂、或接受金钱和20mg可卡因(相对于金钱)。这种现象出现在上午(am)和下午(pm),顺序是随机化和均衡的,以便首先将安慰剂或内匹司他给予相等数量的患者。

[0152] 实验(选择)阶段:

[0153] 在每个阶段期间,要求患者在与颜色(“蓝色”或“绿色”)相当的输液和金钱之间进行一系列选择。颜色与抽样阶段期间给予患者的剂量(可卡因0mg或20mg)对应。对于2个选择阶段的每一个,参与人对输液(在一个阶段中,可卡因0mg IV,在另一个阶段中,可卡因20mg)或金钱可以进行10次选择。参与人在递增数值的金钱方案(\$0.05,\$0.05,\$0.05,\$0.05,\$1,\$4,\$7,\$10,\$13和\$16)或可卡因(0mg或20mg/IV/输液)(使用患者可控的镇痛(PCA)泵)之间进行一系列选择。

[0154] 使用PCA按钮,参与人进行输液选择,而金钱选择口头通知调查员。输液进行2分钟以上,而后进行3分钟的休息期间。如此,以5分钟间隔进行选择。

[0155] 在表明他们的选择之后,参与人立即接受可卡因剂量,条件是,在高达最大200mg可卡因(10X 20mg)的预定极限之内,保持生命特征。选择之后,立即将金钱选择直接给予患者,但这些钱必须花在放出去之前。

[0156] 图表显示了总计16个参与人的实验性选择阶段。

[0157]

	选择	8 个参与人	8 个参与人
am	选择 1	0 mg 可卡因 IV 或\$0.05	20 mg 可卡因 IV 或\$0.05
am	选择 2	0 mg 可卡因 IV 或\$0.05	20 mg 可卡因 IV 或\$0.05
am	选择 3	0 mg 可卡因 IV 或\$0.05	20 mg 可卡因 IV 或\$0.05
am	选择 4	0 mg 可卡因 IV 或\$0.05	20 mg 可卡因 IV 或\$0.05
am	选择 5	0 mg 可卡因 IV 或\$1.00	20 mg 可卡因 IV 或\$1.00
am	选择 6	0 mg 可卡因 IV 或\$4.00	20 mg 可卡因 IV 或\$4.00
am	选择 7	0 mg 可卡因 IV 或\$7.00	20 mg 可卡因 IV 或\$7.00
am	选择 8	0 mg 可卡因 IV 或\$10.00	20 mg 可卡因 IV 或\$10.00
am	选择 9	0 mg 可卡因 IV 或\$13.00	20 mg 可卡因 IV 或\$13.00
am	选择 10	0 mg 可卡因 IV 或\$16.00	20 mg 可卡因 IV 或\$16.00

[0158]

pm	选择 1	20 mg 可卡因 IV 或\$0.05	0 mg 可卡因 IV 或\$0.05
pm	选择 2	20 mg 可卡因 IV 或\$0.05	0 mg 可卡因 IV 或\$0.05
pm	选择 3	20 mg 可卡因 IV 或\$0.05	0 mg 可卡因 IV 或\$0.05
pm	选择 4	20 mg 可卡因 IV 或\$0.05	0 mg 可卡因 IV 或\$0.05
pm	选择 5	20 mg 可卡因 IV 或\$1.00	0 mg 可卡因 IV 或\$1.00
pm	选择 6	20 mg 可卡因 IV 或\$4.00	0 mg 可卡因 IV 或\$4.00
pm	选择 7	20 mg 可卡因 IV 或\$7.00	0 mg 可卡因 IV 或\$7.00
pm	选择 8	20 mg 可卡因 IV 或\$10.00	0 mg 可卡因 IV 或\$10.00
pm	选择 9	20 mg 可卡因 IV 或\$13.00	0 mg 可卡因 IV 或\$13.00
pm	选择 10	20 mg 可卡因 IV 或\$16.00	0 mg 可卡因 IV 或\$16.00

[0159] 在内匹司他治疗组中,12的样本量可以检测中等至大的效果,其适于初始评价。图(图1)说明了从5至15的样品量所获得的效果大小。增加样本量(高于12)会提高分析效率,从而检测治疗之间的差别,但成本增加。包括安慰剂治疗组只是为了保持盲性,不是作为比较组。

[0160] 分析主要集中在内匹司他治疗组中内匹司他的效果上。将安慰剂治疗组包括在内主要是为了保持盲性。将副作用和不利状况(AEs)列入表内,并使用ANOVA或卡(chi)平方对整个治疗条件之间加以比较。使用重复测定法(重复测定时间(time being the repeated

measure))、方差分析(ANOVA)、峰值效应单向ANOVA和(如果指明的话)ANOVA曲线下的面积,将在用内匹司他治疗期间由IV可卡因和安慰剂产生的自觉效果和心血管效果,与在用安慰剂治疗期间产生的自觉效果和心血管效果进行比较。

[0161] 实施例5

[0162] 通过测定酪胺至酚乙醇胺的转化率,分析牛和人多巴胺 β -羟化酶的活性。从Sigma Chemicals (St Louis, MO, USA) 获得牛肾多巴胺 β -羟化酶,而人多巴胺 β -羟化酶是从神经母细胞瘤细胞系SK-N-SH的培养介质中纯化获得的。分析是在pH5.2和32℃、在包含0.125M NaAc、10mM富马酸盐、0.5–2 μ M CuSO₄、0.1mg·ml⁻¹催化酶、0.1mM酪胺和4mM抗坏血酸盐的介质中进行的。在典型的分析中,将0.5–1毫单位的酶加入到反应混合物中,随后,将包含催化酶、酪胺和抗坏血酸盐的底物混合物加入以起始反应(200 μ l的最终体积)。在有或者没有合适浓度的内匹司他或化合物B的条件下,将样品在37℃培养30至40分钟。通过包含25mM EDTA和240 μ M 3-羟酪胺(内标)的中止溶液来猝灭反应。通过反相高压液相色谱(HPLC),使用紫外检测(在280nm),分析样品中的酚乙醇胺。HPLC色谱操作如下进行:流速1ml·min⁻¹,使用LiChroCART 125-4RP-18柱,用10mM酸(acidic acid)、10mM 1-庚磺酸、12mM四丁基胺磷酸盐和10%甲醇进行无梯度(isocratic)洗脱。基于对照物计算保留的百分比活性,使用内标进行校正,并与非线性的四参数浓度响应曲线拟合。

[0163] 内匹司他(S-对映体)和化合物B(R-对映体)对牛和人多巴胺 β -羟化酶的活性可产生浓度依赖性抑制。对于牛和人的酶,内匹司他的计算的IC₅₀值分别是8.5 $\pm$ 0.8nM和9.0 $\pm$ 0.8nM。化合物B比内匹司他的效果略微差一些(对于牛和人的酶,IC₅₀值分别是25.1 $\pm$ 0.6nM和18.3 $\pm$ 0.6nM)。证明内匹司他是人和牛多巴胺 β -羟化酶的体外有效抑制剂。化合物的抑制效果是立体特异性的,这是由于S-对映体(内匹司他)在一定程度上(marginally)(但显著地)比R-对映体(化合物B)更有效。

[0164] 使用已经建立的试验,测定内匹司他对12种选择的酶和受体的活性。在图2中给出了构成每一酶催试验原理的简要说明。通过迭代曲线(与四参数逻辑斯谛方程拟合)分析结合数据。使用Cheng-Prusoff方程式,由IC₅₀值计算K_i值。酶抑制活性可以表示为IC₅₀值(产生50%酶活性抑制所要求的浓度)。

[0165] 内匹司他对大量其它酶(酪氨酸羟化酶,乙酰辅酶A合成酶,酰基辅酶A-胆固醇转酰酶,Ca²⁺/钙调素蛋白激酶II,环加氧酶-I,HMG-CoA还原酶,中性肽链内切酶,氧化氮合酶,磷酸二酯酶III,磷脂酶A₂,和蛋白激酶C)和神经传递介质受体(α _{1A}, α _{1B}, α _{2A}, α _{2B}, β ₁和 β ₂肾上腺素能受体,M₁毒蕈碱性受体,D₁和D₂多巴胺受体, μ 阿片样物质受体,5-HT_{1A},5-HT_{2A}和5-HT_{2C}血清素受体)具有可以忽略的亲合性(IC₅₀值或K_is>10 μ M)。因为化合物对12种其它酶和13种神经传递介质受体具有可以忽略的亲合性,所以内匹司他显示了对多巴胺 β -羟化酶的高度选择性。

[0166] 在与SHRs有关的研究中,将药品内匹司他((S)-5-氨基-1-(5,7-二氟-1,2,3,4-四氢萘-2-基)-1,3-二氢咪唑-2-硫酮盐酸盐)和相应的R-对映体(化合物B)溶于蒸馏水中,并用强饲针头口服给药。在对狗的研究中,将药品填充在胶囊中,口服给药。所有的剂量可以用游离碱等效物来表示。

[0167] 雄性SHRs(15–16周大,Charles River,Wilmington,MA,USA)用于体内研究。研究的当天,将动物称重,并连续三次随机服用赋形剂(对照物)或合适剂量的内匹司他(3、10、

30或100mg.kg⁻¹,po) 或化合物B (30mg.kg⁻¹,po), 12小时间隔。第三次给药之后6小时,用氟烷(halothane)使大鼠麻醉,断头,快速地采集组织(大脑皮层、肠系膜动脉和左心室),称重,放入冰冻的高氯酸(0.4M)中,在液氮中冷冻,在-70℃保存,直到随后进行分析为止。为了定量去甲肾上腺素和多巴胺浓度,通过简短的超声处理将组织均化和在4℃离心(13,000rpm) 30分钟。使用电化学检测,通过HPLC试验上清液的去甲肾上腺素和多巴胺(上清液中加入)用3,4-二羟基苄胺(内标)。

[0168] 在对照动物中的基础组织儿茶酚胺含量(μg.g⁻¹湿重)如下:肠系膜动脉(去甲肾上腺素,10.40±1.03;多巴胺,0.25±0.02),左心室(去甲肾上腺素,1.30±0.06;多巴胺,0.02±0.00)和大脑皮层(去甲肾上腺素,0.76±0.03;多巴胺,0.14±0.01)。在研究的三个组织中,内匹司他使得去甲肾上腺素含量剂量依赖性降低,多巴胺含量与多巴胺/去甲肾上腺素比例提高。

[0169] 在肠系膜动脉和左心室中,在≥3mg.kg⁻¹的剂量下,这些变化获得统计显著性(p<0.05),但在大脑皮层中,只是在30和100mg.kg⁻¹的剂量下获得统计显著性。在研究的最高剂量下(100mg.kg⁻¹,po),在肠系膜动脉、左心室和大脑皮层中,去甲肾上腺素分别降低47%、35%、42%,多巴胺分别提高820%、800%和86%。当在30mg.kg⁻¹(po)下试验时,在肠系膜动脉和左心室中,与R-对映体(化合物B)相比较,内匹司他引起儿茶酚胺含量更显著的变化。

[0170] 雄性小猎犬(10-16kg,Marshall Farms USA Inc,North Rose,NY,USA)还用于体内试验。研究的当天,将狗称重,并随机口服服用空胶囊(对照物)或合适剂量的内匹司他(0.05、0.5、1.5或5mg.kg⁻¹;po,b.i.d),服用5天。在第5天的第一个剂量之后6小时,用戊巴比妥使狗安乐死,快速地采集组织(大脑皮层,肾动脉,左心室)。随后加工该组织,并分析去甲肾上腺素和多巴胺。

[0171] 数据用平均值(mean)±平均值的标准误差(SEM)来表示。分别使用非参数的单向方差分析(ANOVA)或双向ANOVA,分析组织和血浆的儿茶酚胺数据,而后使用Fisher LSD试验逐对比较。认为P<0.05是统计上显著的。

[0172] 在对照动物中的基础组织儿茶酚胺含量(μg.g⁻¹湿重)如下:肾动脉(去甲肾上腺素,10.7±1.05;多巴胺,0.22±0.01),左心室(去甲肾上腺素,2.11±0.18;多巴胺,0.07±0.03)和大脑皮层(去甲肾上腺素,0.26±0.02;多巴胺,0.03±0.00)。当与对照动物相比时,在研究的三个组织中,内匹司他使得去甲肾上腺素含量剂量依赖性降低,多巴胺含量与多巴胺/去甲肾上腺素比例提高。

[0173] 在三个组织中,在≥0.1mg.kg⁻¹天⁻¹的剂量下,这些变化获得统计显著性(p<0.05)。在研究的最高剂量(5mg.kg⁻¹,b.i.d.,po)下,在肾动脉、左心室和大脑皮层中,去甲肾上腺素分别降低88%、91%和96%,多巴胺分别提高627%、700%和166%。

[0174] 使雄性小猎犬随机口服空胶囊(对照物)或内匹司他(2mg.kg⁻¹;po,b.i.d),服用15天。每天第一个剂量之后6小时,抽取静脉血样品,测定多巴胺和去甲肾上腺素的血浆浓度。将样品收集在包含肝素和谷胱甘肽的管中,在-4℃离心,将分离的血浆在-70℃保存,直到分析为止。在两组动物中的儿茶酚胺的基线浓度彼此没有显著地不同:在对照组中,血浆去甲肾上腺素和多巴胺浓度分别是460.3±59.6和34.4±11.9pg.ml⁻¹,在内匹司他治疗组中,分别是401.9±25.5和411±8.8pg.ml⁻¹。当与对照组相比时,内匹司他(2mg.kg⁻¹,b.i.d.,po)引起去甲肾上腺素的血浆浓度显著地降低,引起多巴胺的血浆浓度和多巴胺/去甲肾上腺

腺素比例提高。

[0175] 对于充血性心力衰竭的控制,通过药理学手段,交感神经功能的抑制调节是诱人的治疗策略,这是由于该系统的活性升高和疾病的渐进性恶化有关。该研究的目标是药理学鉴定内匹司他的效果,其是通过抑制酶多巴胺 β -羟化酶而在交感神经中调节去甲肾上腺素合成的化合物。

[0176] 期望体内多巴胺 β -羟化酶的抑制可在接受去甲肾上腺素神经支配的组织中导致底物(多巴胺)的水平升高和产物(去甲肾上腺素)的水平降低。这种期望在研究内匹司他对体内中枢和周围组织中儿茶酚胺水平的产生的效果的实验中得到证实。在SHRs和小猎犬中,在周围(肠系膜或肾动脉,左心室)和中枢(大脑皮层)组织中,内匹司他引起去甲肾上腺素含量剂量依赖性地降低和多巴胺含量的提高。在这方面,化合物B比内匹司他效果更差,这与前者对映体对酶具有较低的 IC_{50} 值一致。虽然多巴胺/去甲肾上腺素比例也升高,但似乎并不是用多巴胺来化学计量地替代去甲肾上腺素。对于这种发现,最可能的解释是:由于多巴胺的神经内代谢而低估了多巴胺的组织水平。

[0177] 在大脑皮层中,内匹司他改变儿茶酚胺水平的能力说明药品穿透了血脑屏障。在狗中,大脑皮层中的儿茶酚胺变化的程度与周围组织中的程度是可比的。然而,在SHRs中,低剂量($\leq 10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)的内匹司他在周围组织中引起去甲肾上腺素和多巴胺含量的显著变化,在大脑皮层中不影响儿茶酚胺。这说明,至少在SHRs中,药品具有适度的周围选择性。

[0178] 血浆去甲肾上腺素浓度提供了整个交感神经活性的有效度量方法,虽然这种参数可以受儿茶酚胺的神经元吸收和代谢廓清率的改变的影响。在狗中,去甲肾上腺素在血浆中的基线浓度意外地升高,也许是通过静脉切开术血液取样方法所诱导的初始应力的反映。尽管如此,与对照组相比,内匹司他引起血浆去甲肾上腺素浓度显著地降低,其与降低传递质合成和释放一致,尽管不能轻看间接效果(次于神经元吸收或代谢廓清率的促进)。由于释放的去甲肾上腺素代表了全部神经元去甲肾上腺素储备的小部分,所以,只是在发生儿茶酚胺现有的储备已经充分地耗尽以后,去甲肾上腺素生物合成的抑制剂才会影响去甲肾上腺素释放。相应地,直到给予内匹司他4天为止,血浆去甲肾上腺素浓度的降低才会获得统计显著性(表示交感神经系统的逐渐调节)。

[0179] 越来越多的证据说明,在充血性心力衰竭中,交感神经系统的长期活化是不良适应的响应。这种论点得到临床试验的支持,临床试验显示了卡维地洛在充血性心力衰竭患者中对于长期发病和致死率的有利效果。然而,应注意,大部分患者需要一定水平的交感神经导致(drive),以便支持心血管动态平衡。实际上, β -阻断剂(包括卡维地洛)的治疗价值受到它们可导致血液动力退化倾向的限制,尤其在治疗起始期间。这种由交感神经载体的急剧戒除产生的不希望的效果需要小心的剂量确定。多巴胺 β -羟化酶的抑制剂,例如内匹司他,因为下列理由而可以没有这种不合需要的效果。首先,这类药物可以减弱,而不是消除,去甲肾上腺素的释放,其次,它们对系统产生逐渐的调节,由此避免剂量确定的需要。与 β -阻断剂相比,内匹司他的另一个优点是通过多巴胺受体的激动作用而可以提高多巴胺水平,对肾功能例如肾血管舒张、利尿和尿钠排泄可具有有益的效果。

[0180] 内匹司他是多巴胺 β -羟化酶的有效、选择性的和口服活性抑制剂,其可以治疗与交感神经系统的超活化有关的心血管病症。

[0181] 实施例6

[0182] 内匹司他的制备是基于下列:在Terashima所描述条件下(LAH, (-)-1R,2S-N-甲基麻黄碱,2-乙胺基吡啶),使四氢萘酮3(得自于 AlCl_3 -催化的3,5-二氟苯基乙酰氯与乙烯(在 CH_2Cl_2 中,在 -65°C)的傅列德尔-克拉夫茨反应)进行手性还原,得到R-(+)-四氢萘酚4a(92-95%ee),其转变为R-(+)-甲磺酸酯,而后与叠氮化钠反应,得到叠氮化物和二氢萘7的混合物(9:1)。将叠氮化物氢化,并用无水HCl处理产物,得到S-(-)-胺盐酸盐,通过Strecker反应(甲醛双亚硫酸盐复合物和KCN)转化为S-(-)-氨基腈。杂环的形成是通过氨基腈的连续二甲酰化、而后用硫氰酸连续处理实现的。腈的竞争水解得到相应数量的伯酰胺。使用LAH在THF中,完成腈还原为胺(93-96%ee)。通过与上面所描述路线的相同路线,在酮的Terashima还原中,使用(+)-1S,2R-N-甲基麻黄碱作为手性助剂,可得到对映体(91.6%ee)。手性中心的绝对构型基于文献中优选的、先前所描述的S-(-)-2-四氢萘酚。

[0183] 在Uni-Melt Thomas Hoover毛细管熔点装置或Mettler FB 81HT池(带有Mettler FP90处理机)上测定熔点,并且不进行校正。用Finnigan MAT 8230(电子-轰击或化学电离)或Finnigan MAT TSQ70(LSIMS)光谱仪获得质谱。在Bruker ACF300、AM300、AMX300或EM390光谱仪上记录 ^1H NMR谱,以ppm(δ)(四甲基硅烷作为内标)给出化学位移。在Nicolet SPC FT-IR光谱仪上记录IR谱。在Varian Cary 3UV-可见分光计(Leeman Labs Inc)上记录UV谱。用Perkin-Elmer Model141旋光计测定旋光度。在Regis Chiral AGP柱(4.6x 100mm)上进行手性HPLC测定,用2%乙腈-98%20mM KH_2PO_4 (pH4.7)洗脱(1mL/min,在 20°C)。

[0184] 5,7-二氟-2-四氢萘酮。将 SOCl_2 (100mL)一次性加入到3,5-二氟苯乙酸(100g, 0.58mol)中,搅拌15小时之后,减压蒸发挥发物。将得到的油性酰基氯溶于 CH_2Cl_2 (200mL)中,并逐滴加入到机械搅拌的 AlCl_3 (154g, 1.16mol)/ CH_2Cl_2 (1.0L)悬浮液中。在干冰/丙酮浴中,将搅拌的悬浮液冷却至 -65°C 的内部温度,在下述的速率下加入酰基氯溶液,以便保持内部温度 $<-60^\circ\text{C}$ 。加入完成之后,在 -65°C ,向反应混合物中快速地鼓入乙烯气体10分钟。在2小时内,在搅拌下,使反应混合物升温至 0°C ,然后冷却至 -10°C ,最初用水(500mL)逐滴处理,而后快速加入。分离有机层,用盐水(100mL)洗涤,用 MgSO_4 干燥。减压蒸发,得到黑色油性残余物,将其在Kugelrohr上真空蒸馏,收集在 $90-110^\circ\text{C}$ (1.0至0.7mm Hg)之间沸腾的物质。将蒸馏物在 $100-105^\circ\text{C}$ (0.3mm Hg)再蒸馏,得到产物白色固体(73.6g, 0.40mol; 70%):mp 46°C ; IR(KBr) 1705cm^{-1} ; ^1H NMR(CDCl_3) δ 2.55(t, $J=7.5\text{Hz}$, 2H), 3.10(t, $J=7.5\text{Hz}$, 2H), 3.58(s, 2H), 6.70(m, 2H); MS m/z 182(M^+)。 $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}$ 的分析计算值:C, 65.93; H, 4.42。实测值:C, 65.54; H, 4.42。

[0185] (R)-(+)-2-羟基-5,7-二氟-1,2,3,4-四氢化萘。将(-)-1R,2S-N-甲基麻黄碱(81.3g, 0.454mol)的无水 Et_2O (1.1升)溶液以足够保持温和回流的速度逐滴加入(45分钟)到1.0M氢化锂铝(416mL, 0.416mol)/ Et_2O 中。加入完成之后,将反应混合物回流加热1小时,然后冷却至室温。在下述速率下加入2-乙胺基吡啶(111g, 0.98摩尔)的无水 Et_2O (100mL)溶液(45分钟),以便保持温和回流。进一步将反应混合物回流加热1小时,在此期间,浅黄绿色悬浮液出现。使用干冰-丙酮浴,将混合物冷却至 -65°C 的内部温度,且以保持内部温度低于 -60°C 的速度逐滴加入5,7-二氟-2-四氢萘酮(23.0g, 126mmol)的 Et_2O (125mL)溶液。加入完成之后,将混合物在 -65°C 至 -68°C 搅拌3小时,并通过加入MeOH(100mL)来猝灭,保持内部温度低于 -60°C 。在 -65°C 进一步搅拌反应10分钟,升温至大约 -20°C 。然后以限制温度 $<35^\circ\text{C}$ 的速度加入3N HCl溶液(2L)。与达到全部溶解的高速率搅拌之后,分离各层,用盐水

(200mL) 洗涤醚层,干燥(MgSO₄)。减压蒸发醚溶液,将残余物溶于热Et₂O(20mL)中,而后加入己烷(200mL)。将种品的溶液在冰浴中冷却,在0℃保持1小时,由此将得到的沉淀晶体收集,真空干燥,得到醇(10.9g,47%):mp 85℃;[α]²⁵_D+38.1°(c=1.83,CHCl₃);93.4% ee,通过手性HPLC:¹H NMR(CDCl₃) δ1.70(br s,1H),1.76–1.88(m,2H),1.99–2.06(m,2H),2.63–3.08(m,3H),4.15(m,1H),6.60(m,2H)。C₁₀H₁₀F₂O的分析计算值:C,65.21;H,5.47。实测值:C,65.38;H,5.42。(S)-对映体4b的谱是相同的:mp84–85℃;[α]²⁵_D–37.8°(c=1.24,CHCl₃);92.4% ee,通过手性HPLC。C₁₀H₁₀F₂O的分析计算值:C,65.21;H,5.47。实测值:C,65.47;H,5.39。

[0186] (R)-(+) -2-甲磺酰氧基-5,7-二氟-1,2,3,4-四氢化萘。使用冰-MeOH浴将R-(+) -5,7-二氟-2-四氢萘酚(59.0g,320mmol)和Et₃N(74.2ml,53.9g,530mmol)的无水Et₂O(1.78升)溶液冷却(-15℃),在氩气氛下(在搅拌下)用MsCl(37.2ml,55.3g,480mmol)处理5–10分钟。5小时之后,反应完成(通过TLC确定),加入水,使固体溶解。加入少量的EtOAc,帮助固体完成溶解。将有机相分离,用1N HCl、NaHCO₃水溶液、盐水顺序洗涤,用MgSO₄干燥。蒸发溶剂,得到类白色固体(87.1g,332mmol),其可以在下一步直接使用。用i-Pr₂O研磨少量样品,得到分析样品:mp78.8–80.5℃;[α]²⁵_D+16.8°(c=1.86,CHCl₃);¹H NMR δ2.13–2.28(m,2H),2.78–2.96(m,2H),3.07(s,3H),3.09(dd,J=17.1Hz,4.7,1H),3.20(dd,J=17.2,4.7Hz,1H),5.20(m,1H),6.67(m,2H)。C₁₁H₁₂F₂O₃S的分析计算值:C,50.37;H,4.61。实测值:C,50.41;H,4.64。(S)-对映体5b的谱是相同的:mp79.9–80.9℃;[α]²⁵_D–16.6°(c=2.23,CHCl₃)。C₁₁H₁₂F₂O₃S的分析计算值:C,50.37;H,4.61。实测值:C,50.41;H,4.65。

[0187] (S)-(-)-2-氨基-5,7-二氟-1,2,3,4-四氢化萘盐酸盐。在搅拌下,将叠氮化钠(40.0g,0.62mol)加入到DMSO(1L)中,直到获得澄清溶液为止。一次性加入甲磺酸酯(138g,0.53mol),并在N₂氛围中、在50℃将混合物加热16小时。将反应混合物用水(1.8L)稀释,用戊烷(4x 250mL)提取,而后用水(2x 100mL)、盐水(100mL)顺序洗涤合并的戊烷提取物,用MgSO₄干燥。减压蒸发溶剂,得到挥发油,将其进行快速硅胶色谱,使用戊烷作为洗脱液,得到二氢萘(8.50g,51.2mmol)挥发油。用戊烷/CH₂Cl₂(9:1)进一步洗脱,得到叠氮化物(101g,483mmol)无色油:IR(CHCl₃) 2103cm⁻¹;m/z 171(M⁺)。将叠氮化物6a溶于EtOAc(1200mL)中,在2.5L Parr瓶(60psi)中用10%Pd/C(6g)氢化6小时。每个小时之后,将瓶排气,并用氢气再填充,以除去放出的N₂。将得到的混合物通过硅藻土过滤,与醚化的HCl(1N,500mL)一起搅拌,滤出细沉积物,用EtOAc洗涤,然后用无水醚洗涤。(过滤需要大约4小时)。将湿润的固体转入圆底烧瓶中,真空除去剩余溶剂,得到白色固体(90.4g,412mmol;77.9%):mp>280℃;[α]²⁵_D–60.2°(c=2.68,MeOH);¹H NMR(d₆-DMSO) δ1.79(m,1H),2.33(m,1H),2.63(m,1H),2.83–2.92(m,2H),3.14(dd,J=16.7,5.0Hz,1H),3.46(m,1H),6.93(d,J=9.4Hz,1H),7.00(dt,J=9.4,2.5Hz,1H)。C₁₀H₁₂ClF₂N的分析计算值:C,54.68;H,5.51;N,6.37。实测值:C,54.31;H,5.52;N,6.44。(R)-对映体8b的谱是相同的:mp>280℃;[α]²⁵_D+58.5°(c=1.63,MeOH)。C₁₀H₁₂ClF₂N的分析计算值:C,54.68;H,5.51;N,6.37。实测值:C,54.64;H,5.51;N,6.40。

[0188] (S)-(-)-(5,7-二氟-1,2,3,4-四氢萘-2-基)(氰基甲基)胺。将胺盐酸盐8a(50.27g,229mmol)用NaOH(10.0g,250mmol)水(150ml)溶液处理,而后用足够获得溶液的几个额外NaOH球粒处理。进一步加入水(300ml),将混合物放入50℃浴中,用甲醛化亚硫酸氢

钠复合物 (30.8g, 230mmol) 处理。搅拌混合物30分钟之后, 加入KCN (15.0g, 230mmol)。在80℃进一步搅拌反应混合物1小时, 冷却至室温, 用EtOAc提取, 得到油 (51.3g), 其凝固。TLC (5%MeOH-CH₂Cl₂) 显示剩余大约10-15%的起始胺。进行硅胶色谱, 得到腓产物 (39.4g) 和起始游离胺 (7.12g), 其在空气中快速形成碳酸盐。将该胺再循环, 额外得到5.35g产物。合并产率 (44.8g, 202mmol; 87.5%): mp 73.1-76.5℃; $[d]^{25}_D$ -58.0° (c=1.63, CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.50 (br s, 1H), 1.70 (m, 1H), 2.05 (m, 1H), 2.55-3.04 (m, 4H), 3.22 (m, 1H), 3.70 (s, 2H), 6.62 (m, 2H); MS m/z 222 (M⁺)。C₁₂H₁₂F₂N₂的分析计算值: C, 64.85; H, 5.44; N, 12.60。实测值: C, 65.07; H, 5.47; N, 12.44。(R)-对映体9b的谱是相同的: mp 64.4-73.6℃; $[α]^{25}_D$ +52.3° (c=2.12, CHCl₃)。C₁₂H₁₂F₂N₂的分析计算值: C, 64.85; H, 5.44; N, 12.60。实测值: C, 65.14; H, 5.54; N, 12.53。

[0189] (S)-(-)-1-(5,7-二氟-1,2,3,4-四氢萘-2-基)-5-氰基-2,3-二氢-2-硫代-1H-咪唑。在N₂氛围中, 将腓 (44.7g, 201mmol) 在甲酸丁酯 (240ml) 中回流加热 (120℃浴) 19小时, 然后减压除去溶剂。加入甲苯, 蒸发, 除去最后痕量的溶剂, 高真空干燥残余物, 得到油 (53.2g)。在冰/MeOH (-15℃) 中, 将得到的甲酰胺和甲酸乙酯 (48.7ml, 44.7g, 604mmol) 在无水THF (935ml) 中冷却, 搅拌, 同时用20分钟加入t-BuOK (1M, 在THF中, 302ml, 302mmol)。搅拌反应18小时之后, 蒸发溶剂, 将残余物溶于1N HCl (990ml) 和乙醇 (497ml) 中, 用KSCN (78.1g, 804mmol) 处理。在85℃搅拌混合物135分钟, 然后放入冰浴中, 得到沉淀。将过滤的固体以10%MeOH/CH₂Cl₂中的浆液形式装载到硅胶 (1kg) 填装柱上 (用己烷)。用10%丙酮/CH₂Cl₂洗脱, 得到产物 (18.05g, 62.1mmol; 30.8%): m.p. 240.7-249.2℃; $[α]^{25}_D$ -69.1° (c=1.18, DMSO); ¹H NMR (d₆-DMSO) δ 2.18 (br m, 1H), 2.47 (m, 1H), 2.75 (m, 1H), 3.03-3.35 (m, 3H), 5.19 (m, 1H), 6.94 (d, J=9.3Hz, 1H), 7.03 (dt, J=9.3, 2.4Hz, 1H), 8.29 (s, 1H), 13.3 (br s, 1H); MS m/z 291 (M⁺)。C₁₄H₁₁F₂N₃S的分析计算值: C, 57.72; H, 3.80; N, 14.42。实测值: C, 57.82; H, 3.92; N, 14.37。(用1:1 MeOH/CH₂Cl₂进一步洗脱柱, 得到伯酰胺11a: mp 261.9-262.7℃; $[α]^{25}_D$ -90.5° (c=0.398); IR (KBr) 1593, 1630cm⁻¹; ¹H NMR (d₆-DMSO) δ 2.14 (m, 1H), 2.15-2.28 (m, 1H), 2.74-3.05 (m, 4H), 5.64 (m, 1H), 6.90 (d, J=9.2Hz, 1H), 7.05 (dt, J=9.5, 2.4Hz, 1H), 8.73 (s, 1H), 9.70 (br s, 1H), 13.7 (br s, 1H); MS m/z 309 (M⁺)。C₁₄H₁₃F₂N₃OS 0.25H₂O的分析计算值: C, 53.57; H, 4.33; N, 13.39。实测值: C, 53.32; H, 3.96; N, 13.24。(R)-对映体的谱是相同的: mp 243.1-244.7℃; $[α]^{25}_D$ +74.9° (c=2.14, DMSO)。C₁₄H₁₁F₂N₃S的分析计算值: C, 57.72; H, 3.80; N, 14.42。实测值: C, 57.85; H, 3.85; N, 14.45。

[0190] (S)-1-(5,7-二氟-1,2,3,4-四氢萘-2-基)-5-氨基-2,3-二氢-2-硫代-1H-咪唑。在冰浴中, 在氩气氛围中, 将上述腓 (5.00g, 17.2mmol) 在THF (75ml) 中搅拌, 直到获得均相溶液为止。用10分钟逐滴加入LAH/THF溶液 (1M, 34.3ml, 34.3mmol), 然后在0℃搅拌溶液30分钟, 并使其达到室温, 保持1.5小时。将反应再冷却至0℃, 用饱和酒石酸钾钠溶液处理, 直到混合物变得可自由搅拌为止。进一步加入酒石酸盐溶液 (30mL), 而后加入10%MeOH/CH₂Cl₂ (200mL), 搅拌混合物15分钟, 用水 (100-150mL) 处理。分离有机层, 用10%MeOH/CH₂Cl₂ (2x125mL) 提取水相。将合并的提取物洗涤, 干燥 (MgSO₄), 蒸发。对残余物 (5.2g) 进行硅胶色谱, 用5%MeOH/CH₂Cl₂洗脱, 得到游离胺 (2.92g, 9.89mmol; 58%): mp 170℃; $[α]^{25}_D$ -11.0° (c=1.59, DMSO)。C₁₄H₁₅F₂N₃S 0.25H₂O的分析计算值: C, 56.07; H, 5.21; N, 14.01。实

测值:C,56.11;H,5.10;N,14.14。

[0191] (S)-1-(5,7-二氟-1,2,3,4-四氢萘-2-基)-5-氨基-2,3-二氢-2-硫代-1H-咪唑盐酸盐(内匹司他)。如下制备盐酸盐:将醚化的HCl (1M, 20ml, 20mmol) 加入到游离胺2a (3.12g, 10.6mmol) (通过加热已经将其溶于MeOH (250mL) 中) 中。减压除去部分溶剂,而后通过与EtOAc共同蒸发若干次来置换溶剂,不用蒸干。将得到的沉淀用EtOAc (150mL) 和醚 (150mL) 处理,滤出,用醚洗涤,在氮气氛围中干燥,然后在78℃、在高真空条件下干燥20小时,得到盐酸盐 (3.87g): mp 245℃ (dec); $[\alpha]_D^{25} +9.65^\circ$ ($c=1.70$, DMSO); (93% ee, 通过手性HPLC); ^1H NMR ($T=320^\circ\text{K}$, DMSO) δ 2.07 (m, 1H), 2.68–3.08 (m, 4H), 4.09 (m, 3H), 4.77 (m, 1H), 6.84 (m, 2H), 7.05 (s, 1H), 8.57 (br s, 3H), 12.4 (br s, 1H)。C₁₄H₁₆ClF₂N₃S · 0.5H₂O的分析计算值:C, 49.33; H, 5.03; N, 12.33。实测值:C, 49.44; H, 4.96; N, 12.18。(R)-对映体(R)-1-(5, 7-二氟-1,2,3,4-四氢萘-2-基)-5-氨基-2,3-二氢-的谱是相同的; mp 261–263℃; $[\alpha]_D^{25} -10.8^\circ$ ($c=1.43$, DMSO), 91.6% ee, 通过手性HPLC。C₁₄H₁₆ClF₂N₃S · 0.35H₂O的分析计算值:C, 49.73; H, 4.98; N, 12.42。实测值:C, 49.80; H, 4.93; N, 12.39。

[0192] 证明内匹司他是牛 ($\text{IC}_{50}=8.5\pm0.8\text{nM}$) 和人 ($\text{IC}_{50}=9.0\pm0.8\text{nM}$) DBH的竞争性抑制剂。R-对映体(R)-1-(5, 7-二氟-1,2,3,4-四氢萘-2-基)-5-氨基-2,3-二氢- ($\text{IC}_{50}=25.1\pm0.6\text{nM}$; $18.3\pm0.6\text{nM}$) 和SKF102698 ($\text{IC}_{50}=67.0\pm4.2\text{nM}$; $85.0\pm3.7\text{nM}$) 分别是牛和人的酶的不太有效的抑制剂。通过测定酪胺至酚乙醇胺的转化率, 试验DBH活性。源于肾上腺的牛DBH是从Sigma Chemical Co (St Louis, MO) 获得的。人分泌的DBH是从神经母细胞瘤细胞系SK-N-SH的培养介质中纯化获得的。试验是在pH5.2和32℃、在0.125M NaOAc、10mM富马酸盐、0.5–2μM CuSO₄、0.1mg/mL催化酶、0.1mM酪胺和4mM抗坏血酸盐中进行的。在典型的试验中, 将0.5–1毫单位的酶加入到反应混合物中, 随后, 将包含催化酶、酪胺和抗坏血酸盐的底物混合物加入以起始反应 (200μL的最终体积)。在有或者没有合适浓度的抑制剂的条件下, 将样品在37℃培养30–40分钟。通过包含25mM EDTA和240μM 3-羟酪胺(内标)的中止溶液来猝灭反应。通过反相HPLC, 使用UV检测 (在280nm), 分析样品中的酚乙醇胺。基于对照物 (没有抑制剂) 计算保留的百分比活性, 使用内标进行校正, 并与非线性的四参数浓度响应曲线拟合, 获得 IC_{50} 值。

[0193] 使用已经建立的试验, 测定内匹司他对11种不同酶的活性。通过放射性配体结合试验, 使用标准过滤技术和膜制品, 测定内匹司他对13种所选择受体的亲合性。通过迭代曲线 (与四参数逻辑斯谛方程拟合) 分析结合数据。使用Cheng-Prusoff方程式计算 K_i 值。图3显示了描述内匹司他对DBH和大量所选择酶与受体的相互作用的图表。内匹司他对大量其它酶和神经传递介质受体显示了弱的亲合性。这些数据说明, 内匹司他是DBH的体外有效和高度选择性的抑制剂。此外, S-对映体内匹司他比R-对映体更加有效, 大约2–3倍, 表示是立体选择性的。

[0194] 给自发性高血压大鼠 (SHRs) 和正常狗口服内匹司他可以在周围动脉 (肾或肠系膜)、左心室和大脑皮层中使组织多巴胺 (DA) /去甲肾上腺素 (NE) 比例产生有效和剂量依赖性地提高。给正常狗长期口服内匹司他也可以持续提高血浆中的DA/NE比例。在神智清醒的SHRs中, 紧急口服内匹司他产生剂量依赖性的和持久的 (>4小时) 抗高血压效果, 以及还可以减弱对神经节前的交感神经刺激的增高血压 (pressor) 反应。血清T₃和T₄水平不受可以使肠系膜动脉中的多巴胺/去甲肾上腺素比例升高的剂量 (6.2mg/kg, po, b.i.d., 10天) 的影

响。基于内匹司他可有效调节交感神经驱动心血管组织的能力,临床上评价内匹司他用于治疗充血性心力衰竭。

[0195] 在美国,充血性心力衰竭(CHF)是致死的主要原因。CHF的特点在于:交感神经系统(SNS)和肾素-血管紧张素系统(RAS)的明显活化。这两个神经激素系统的同时活化愈加地和CHF的维持和发展有牵连。阻滞这些神经激素系统的影响的治疗干预很可能有利地改变CHF的自然历程。实际上,血管紧张素-转化酶(ACE)抑制剂(其阻碍血管紧张素II的形成)已经显示其可降低CHF患者的发病率和致死率。然而,ACE抑制剂具有减弱SNS的有限的间接能力。用 β -肾上腺素能受体拮抗剂来抑制SNS是目前临床评价的有前途的方法。直接调节SNS的替代策略是通过抑制多巴胺 β -羟化酶(DBH)(负责将NE转化为多巴胺(DA)的酶)来抑制去甲肾上腺素(NE)的生物合成。期待DBH的抑制可以降低NE的组织水平,并且提高DA的组织水平,由此提高组织的DA/NE比例。这种方法比 β -肾上腺素能受体拮抗剂具有潜在的优势,例如, α -肾上腺素能受体的刺激降低,和DA水平提高,其可以引起肾血管舒张、尿钠排泄和醛甾酮释放削弱。先前的DBH抑制剂,例如镰孢菌酸和SKF-102698,具有缺点,例如,效能和特异性低,这会妨碍它们在心力衰竭方面的临床开发。

[0196] 内匹司他用于体内生物化学研究,研究在自发性高血压大鼠(SHRs)和正常小猎犬中的效果。在研究的当天,将动物称重,并使之随机接受安慰剂(赋形剂)或合适剂量的内匹司他。每个小鼠口服给药三次,12小时间隔,在早上开始。在第三次给药之后6小时,用氟烷使大鼠麻醉,断头,快速地采集组织(大脑皮层、肠系膜动脉和左心室),称重,放入冰冻的高氯酸(0.4M)中,在液氮中冷冻,在-70℃保存,直到随后进行分析为止。利用HPLC,使用电化学检测,测定组织的NE和DA浓度。在该研究中,使用雄性小猎犬(10-16kg,Marshall Farms USA Inc,North Rose,NY)。在研究的当天,使狗随机接受安慰剂(空胶囊)或合适剂量的内匹司他。每天给每个狗给药两次,给药4.5天。在第5天第一次给药之后6小时,用戊巴比妥使狗安乐死,采集组织(大脑皮层、肾动脉和左心室),称重,放入冰冻的高氯酸(0.4M)中,在液氮中冷冻,在-70℃保存,直到分析为止。利用HPLC,使用电化学检测,测定组织的NE和DA浓度。

[0197] 口服内匹司他在SHRs和狗的动脉(肠系膜或肾)、左心室和大脑皮层中,引起DA/NE比例的剂量依赖性提高。

[0198] 在最高剂量试验(在SHRs中100mg/kg,在狗中5mg/kg)中,在动脉、左心室和大脑皮层中DA/NE比例最大的提高分别是14、11和3.2倍(在SHRs中)和95、151和80倍(在狗中)。当在SHRs中试验30mg/kg时,在肠系膜动脉、左心室和大脑皮层中,SKF-102698(1)分别提高DA/NE比例5.5倍、3.5倍和2.7倍,而相同剂量的内匹司他分别提高该比例8.3、7.5和1.5倍。在SHRs中,30mg/kg的化合物B在肠系膜动脉、左心室和大脑皮层中仅仅分别引起DA/NE比例提高2.6、3.5和1.1倍。这些数据说明,内匹司他在SHRs和狗中引起期望的生物化学作用,但在后面的物种中更有效。此外,在SHRs中,内匹司他比它的化合物B和SKF-102698(1)更有效。

[0199] 在正常狗中,研究了内匹司他(14.5天治疗)对血浆DA/NE比例的长期效果。使动物随机接受口服安慰剂(空胶囊)或内匹司他(2mg/kg,b.i.d)14.5天。每天抽取血样(第一个剂量之后6小时),用于测定DA和NE的血浆浓度。将样品收集在包含肝素和谷胱甘肽的管中,在-4℃离心,在-70℃保存,直到分析为止。

[0200] 口服内匹司他 (2mg/kg; b.i.d) 使DA/NE比例显著增加, 在大约6-7天获得峰值效应, 然后在7-14天之间进入平台期至新的稳态。

[0201] 在神智清醒的、受到限制的SHRs (具有高度交感神经驱动至心血管组织的模型) 中, 进一步评价内匹司他的体内血液动力活性。在SHRs中研究血液动力学。在该研究中, 使用雄性SHRs (15-16周大)。用醚将动物轻微麻醉, 并将左股动脉和静脉插入导管, 分别用于测定血压和给予药物。将动物放置在限制器中, 恢复30-40分钟。获得基线测定之后, 用赋形剂或合适剂量的内匹司他口服治疗动物, 连续记录血液动力学参数4小时。然后用戊巴比妥使动物麻醉, 放置在加热板 (37℃) 上, 用Harvard啮齿类动物 (rodent) 通风机进行通风。给予阿托品 (1mg/kg, iv) 和筒箭毒碱 (1mg/kg, iv) 之后, 用不锈钢条通过眼眶将动物刺毁脑脊髓。用80V的1ms脉冲将刺毁脑脊髓的棒条进行电激发 (在不同频率 (0.15、0.45、1.5、5、15Hz)), 获得频率-血压响应曲线。

[0202] 口服给予内匹司他导致剂量依赖性抗高血压效果。将动物放置在限制器中, 恢复30-40分钟。获得基线测定之后, 用赋形剂或合适剂量的内匹司他口服治疗动物, 连续记录血液动力学参数4小时。除0.3mg/kg (180、210和240分钟) 和1mg/kg (30、210和240分钟) 之外, 内匹司他在所有剂量和时点都可显著地 ($p < 0.05$) 降低平均动脉压。

[0203] 用10mg/kg剂量时, 观察到平均血压最大降低 53 ± 4 mmHg (相对于赋形剂对照物, 降低33%)。起始响应很慢, 用3-4小时达到它的平台期。在最高剂量 (30mg/kg) 下抗高血压效果丧失的确切理由目前还不清楚。对心率没有显著影响, 只不过在10和30mg/kg时仍然具有轻微明显的降低 (分别降低9.8和10.5%)。在该研究之后, 将大鼠刺毁脑脊髓, 给药之后5小时, 评价内匹司他对于脊髓的神经节前神经刺激 (PNS) 的增加血压的响应的效果。频率-血压响应曲线以剂量依赖性方式显著地 ($p < 0.05$) 移动至右侧 (在频率响应曲线中最大移动~5倍)。没有显著地影响对PNS的心率响应。这些数据说明, 在SHRs中, 内匹司他可以抑制交感神经驱动至血管系统, 并且是其抗高血压效果的可能机制。

[0204] 由于内匹司他的杂环部分结构上与甲硫咪唑 (哺乳动物甲状腺功能的已知的有效抑制剂) 相似, 在缺乏碘的Sprague Dawley大鼠 ($n = 9-12$) 中, 在2.0和6.2mg/kg (po, b.i.d, 10天) 的剂量下, 评价内匹司他对甲状腺功能的效应。给药4小时后, 用作阳性对照的甲硫咪唑 (1mg/kg, po, b.i.d.) 可导致 T_3 的血清水平显著降低 (第3天, 31%, $p < 0.05$; 第7和9天, 42%和44%, $p < 0.01$) 和 T_4 的血清水平显著降低 (第3和7天, 46%和58%, $p < 0.01$), 而内匹司他在整个研究 (第3、7和9天) 中没有显示显著的效果。在第10天最后给药之后4小时, 内匹司他的两个剂量显著地提高肠系膜动脉中的DA/NE比例 ($p < 0.01$, 相对于赋形剂对照物), 但在皮层中不是这样。

[0205] 该研究的发现说明内匹司他是DBH的有效的、选择性的和口服活性的抑制剂。该化合物在动物模型中也缺少显著的行为效果, 并且这些发现将是将来公开的主题。因为化合物内匹司他可有效地调节交感神经驱动至心血管组织, 已经试验了用其治疗CHF。

[0206] 实施例7

[0207] 在942个血浆样品 (从充血性心力衰竭 (CHF) 患者处收集) 中测定多巴胺和去甲肾上腺素的浓度。研究目的是:

[0208] 1. 评价各种剂量的内匹司他在四周之后对心肌血运 (动脉冠状窦) 和冠状窦儿茶酚胺水平的效果, 和评价经过12周的内匹司他的安全性和耐受性。

[0209] 2. 用下列评价内匹司他对从基线开始的变化效果:

[0210] a) 4周和12周之后的血浆(静脉)儿茶酚胺水平

[0211] b) 4周和12周之后的生活质量(QoL)、CHF症状、整体(Global)评价和NYHA类别

[0212] c) 4周之后的血液动力学参数,包括心输出量、体循环血管阻力、 MVO_2 、肺动脉压力和肺动脉楔压

[0213] d) 经过12周的CHF治疗的住院治疗和药物剂量的变化

[0214] e) 4和12周时的血压和心率

[0215] f) 4周和12周之后的6分钟行走试验

[0216] g) 12周的左心室射血分数、左心室收缩末期和左心室舒张末期容积。

[0217] 在4和12周期间给药后2小时,使患者仰卧,从患者周围静脉处收集血液样品。在第0天(即在起始给药之前的当天),在与给药后2小时相当的时间处,从仰卧患者处进一步收集样品。另外,在第4周期间,在给药后2小时和在第0天(即在起始给药之前的当天)(在与给药后2小时相当的时间处),对一组患者进行右心和冠状窦导管插入术。从这些患者的动静脉处和冠状窦收集血液的三份样品。

[0218] 通过放射性酶原方法,测定多巴胺和去甲肾上腺素的游离碱的浓度。该方法包括:用儿茶酚-O-甲基转移酶和氟化的S-腺苷甲硫氨酸培养血浆样品。培养完毕后,通过液体/液体提取,从血浆中提取O-甲基化儿茶酚胺,然后通过薄层色谱分离。标记每个儿茶酚胺的相关谱带,然后刮削到闪烁管中,用于计数。该方法的定量限制是每mL血浆1pg多巴胺或去甲肾上腺素。线性范围是每mL血浆1至333000pg多巴胺或去甲肾上腺素(使用0.045mL至1mL的等分样品)。

[0219] 收集的人血浆样品用作品质控制样品(QC),并且在该方法的常规使用期间每天进行单份样品(singlicate)分析,以监控该方法的效能。

[0220] 实施例8

[0221] 对内匹司他进行了临床前的体外和体内药理学研究。体外研究评价了化合物抑制DBH活性和其对所选择受体的结合亲合性的能力。体内试验再分成四个类型:1)生物化学效果(即降低组织去甲肾上腺素水平和提高多巴胺水平的能力),2)对甲状腺功能的效果,3)心血管效果,和4)行为效果。

[0222] 内匹司他是牛和人的DBH的有效抑制剂。内匹司他对人的DBH的 IC_{50} 值是9nM(CL_{6960}),比DBH抑制剂SKF-102698的 IC_{50} 值(85nM)显著地降低。S对映体内匹司他比R对映体(18nM)(表示为化合物B)更有效。

[0223] 筛选内匹司他对所选择的受体的结合亲合性。对于M1、D1和D2和5HT_{1A}、2A和2C,内匹司他显示了小于5.0的结合亲合性。内匹司他在大鼠和猴子中的N-乙酰基代谢物显示了对这些受体结合亲合性的缺乏。由此,内匹司他和它的主要代谢物不是上列受体的有效抑制剂。

[0224] 在自发性高血压大鼠(SHRs)中,相对于正常血压的Wistar-Kyoto大鼠,对苯肾上腺素的体外主动脉收缩响应受到削弱。在SHRs中,每天用内匹司他(10mg/kg, p.o.)治疗,治疗21天,恢复了苯肾上腺素响应,达到的值与Wistar-Kyoto大鼠的响应值类似。

[0225] 总的说来,在大鼠和狗中,内匹司他是DBH的有效抑制剂。在两个物种中,口服或静脉内给药可在心脏、肠系膜或肾动脉和大脑皮层中导致组织去甲肾上腺素的显著($p <$

0.05)降低、多巴胺增加和多巴胺/去甲肾上腺素水平提高。

[0226] 在对雄性自发性高血压大鼠 (SHRs) 的研究中,在口服或i.v.给药(6.2mg/kg)之后0.5至4小时,在肠系膜动脉中,内匹司他显著地降低了去甲肾上腺素和提高了多巴胺和多巴胺/去甲肾上腺素比例。两次i.v.注射(15mg/kg)(12小时间隔)的第二次之后的6小时,在雄性Sprague-Dawley大鼠的左心室也观察到了这些参数的显著变化。在雄性SHRs中,在分别口服10或30mg/kg之后,研究了组织儿茶酚胺的24小时时程。在第1小时,多巴胺/去甲肾上腺素比例显著提高,并且是持久的(10mg/kg持续12小时,肠系膜动脉,和30mg/kg持续24小时,左心室)。给予雄性Sprague-Dawley大鼠2.0和6.2mg/kg(p.o.b.i.d.)10天之后,观察到肠系膜动脉多巴胺和去甲肾上腺素水平的显著变化,在大脑皮层中没有观察到显著的效果。以1或10mg/kg/d(p.o.)的剂量给予SHRs 7或25天,在肠系膜动脉和大脑皮层中,多巴胺和多巴胺/去甲肾上腺素比例显著提高。结合在一起,在紧急或长期(至多25天)给药的大鼠中,在肠系膜动脉中,内匹司他导致去甲肾上腺素显著降低和多巴胺和多巴胺/去甲肾上腺素比例的升高。

[0227] 在雄性SHRs和Sprague-Dawley大鼠中,当在0.3、1、3、10、30和100mg/kg的单一口服剂量之后6小时进行评价时,发现内匹司他的效果是剂量响应性的。在SHRs中,在肠系膜动脉(0.3mg/kg剂量)中,在左心室(3.0mg/kg剂量)中,和在大脑皮层(10mg/kg剂量)中,多巴胺/去甲肾上腺素比例存在显著的变化。在Sprague-Dawley大鼠中,在肠系膜动脉(3.0mg/kg剂量)中,在左心室(1.0mg/kg剂量)中,和在大脑皮层(仅仅100mg/kg剂量)中,多巴胺/去甲肾上腺素比例存在显著的提高。在SHRs中的第二个剂量-反应研究中,以3.0、10、30或100mg/kg(12小时间隔)的剂量给予三个剂量,第三个剂量之后6小时,采集组织。在左心室和肠系膜动脉中,内匹司他导致显著的去甲肾上腺素的剂量依赖性降低(10mg/kg)和多巴胺(3.0mg/kg)和多巴胺/去甲肾上腺素比例(3.0mg/kg)的提高。在大脑皮层中,内匹司他对多巴胺和去甲肾上腺素浓度和多巴胺/去甲肾上腺素比例的效果仅仅在30和100mg/kg时是显著的。在左心室中,在用内匹司他给药的雌性Wistar大鼠中(通过饮用水给药7天,0.3、0.6和1.0mg/ml),观察到类似的显著的剂量响应效应效果。总之,内匹司他在大鼠的大脑皮层中(60-100mg/kg/d)比在左心室和肠系膜动脉中(1-6mg/kg/d)对DBH的抑制效果差。

[0228] 在SHRs中,以12小时间隔给予三个剂量之后(30mg/kg p.o.),在左心室和肠系膜动脉中,内匹司他(S对映体)比R对映体更显著有效。在SHRs中,在以30mg/kg的剂量进行单一给药或给予三个剂量之后,在左心室和肠系膜动脉中,在去甲肾上腺素降低和多巴胺与多巴胺/去甲肾上腺素比例提高方面,内匹司他显著地比DBH抑制剂SKF-102698更有效。在左心室和肠系膜动脉中,源于这些体内试验的效能关系强烈地与使用纯化DBH的体外试验(参见上面)所获得的那些相平行。然而,在大脑皮层中,在去甲肾上腺素水平降低和多巴胺水平提高方面,内匹司他显著地比SKF-102698的效果差。已经表明,去甲肾上腺素可以刺激肾素的释放和提高血浆肾素活性。因此,人们有兴趣评价用内匹司他降低去甲肾上腺素水平是否会导致血浆肾素活性降低。然而,内匹司他(30和100mg/kg/d,p.o.,5天)不会在雄性SHRs中改变血浆肾素活性。由此,当以降低组织去甲肾上腺素水平的剂量给予时,内匹司他不改变SHRs中的血浆肾素活性。

[0229] 在雄性小猎犬的肠系膜动脉中,十二指肠内给药30mg/kg之后5小时,内匹司他导致去甲肾上腺素水平的显著降低和多巴胺/去甲肾上腺素比例的提高,但没有改变多巴胺

水平。当给予雄性小猎犬4.5天内匹司他(5、15和30mg/kg b.i.d.,或10、30和60mg/kg/d)时,在肾动脉、肾脏外皮和肾髓质中,去甲肾上腺素显著降低,多巴胺和多巴胺/去甲肾上腺素比例提高,响应平台期从10mg/kg/d开始,并且延长至60mg/kg/d。在左心室中观察到类似的结果,只不过多巴胺没有显著的增加。在大脑皮层中,在30和60mg/kg/d的剂量时,去甲肾上腺素显著地降低,和在所有的剂量时,多巴胺和多巴胺/去甲肾上腺素比例显著地提高。总之,在狗中,在至少10mg/kg/d的剂量条件下,内匹司他是DBH的有效的口服活性抑制剂。

[0230] 内匹司他与甲巯咪唑(甲状腺过氧化物酶的体内有效抑制剂)具有结构相似性。在饲喂低碘饮食和给药10天的雄性Sprague-Dawley大鼠中,4或12.4mg/kg/d(p.o.)剂量的内匹司他对三碘甲腺原氨酸(triiodothyramine)或甲状腺素的血清水平没有影响,而甲巯咪唑(2mg/kg/d)显著地降低了三碘甲腺原氨酸(triiodothyramine)或甲状腺素的血清水平。由此,与甲巯咪唑不同,内匹司他没有影响三碘甲腺原氨酸(triiodothyramine)或甲状腺素的血清水平。

[0231] 在神智清醒的、受到限制的SHRs(1.0-30mg/kg, p.o.)中,内匹司他可引起高达4小时的显著的抗高血压效果,并且显著地降低心率(10和30mg/kg)。在神智清醒的、受到限制的SHRs(10mg/kg, p.o.)中,内匹司他的抗高血压效果没有由于用多巴胺受体(DA-1)拮抗剂SCH-23390预先治疗而受到减弱。在神智清醒的、受到限制的正常血压的Wistar-Kyoto大鼠中,给药之后,内匹司他(10mg/kg)也可以降低血压4小时;然而,压力的降低(-13mmHg)比用SHRs时的压力降低(-46mmHg)少。总结在一起,内匹司他可在SHRs和正常血压大鼠中导致血压降低,但在SHRs中的抗高血压效果更明显。在SHRs中的抗高血压效果并不象是通过DA-1受体介导的。

[0232] 在刺毁脑脊髓的SHRs中,给药(3mg/kg p.o.)之后5小时,内匹司他还显著地减弱高血压和对神经节前的神经刺激的心动过速反应。由此,在对交感神经刺激的响应中,内匹司他降低了血压的升高。

[0233] 用内匹司他(3.0mg/kg, i.v.)紧急静脉内治疗麻醉的SHRs在3小时时间内降低了平均动脉压,但没有降低肾血流量或改变尿产生、或钠或钾的尿排泄。在给药之后,计算的肾血管阻力降低。使用DA-1拮抗剂SCH-23390来进行过尝试,以便评价内匹司他的肾血管扩张效果是否是由DA-1受体介导的。然而,当单独给予时,这种化合物可以降低血压,由此产生不能解释的结果。总的说来,尽管内匹司他导致动脉血压降低,但不会使麻醉的SHRs的肾功能削弱,并且不会降低肾血流量。

[0234] 在SHRs中,每天用内匹司他(1和10mg/kg, p.o.)治疗(治疗21天)不会改变心率或收缩压(通过尾套法测定)。然而,当使大鼠受到限制并且直接通过动脉套管测定它们的血压时,内匹司他(10mg/kg, p.o.)引起显著的抗高血压效果。

[0235] 在SHRs(带有仪表,仪表配有无线电遥测血压传感器)中,在30和100mg/kg/d的剂量下(30天),内匹司他显著地降低血压,但在3和10mg/kg/d的剂量下没有观察到明显的效果。单一给药之后,在30和100mg/kg/d的条件下,效果持续24小时时间,并且经过30天效果没有丧失。心率没有提高,运动活动未受影响。血管紧张肽转化酶抑制剂依那普利(1mg/kg, p.o.) (其不能降低血压)与内匹司他(30mg/kg)的剂量组合可以在30天的给药时间内增强抗高血压效果,并且导致左心室质量(mass)的明显减少。对于单独的依那普利,不会出现左心室质量的降低。由此,用内匹司他(30和100mg/kg/d)治疗SHRs 30天,可导致血压降低,并

且当同依那普利相结合时,导致额外的血压降低,伴随着左心室质量的降低。

[0236] 在30和100mg/kg/d的剂量下(给药7天),在正常血压的Wistar大鼠(带有仪表,仪表配有无线电遥测血压传感器)中,内匹司他的血压降低效果小于在SHRs所观测的效果。在30mg/kg/d的剂量下,与SHRs中的-20mmHg相比,血压的最高降低值是-10mmHg。在100mg/kg/d的剂量下,与SHRs中的-42mmHg相比,血压的最高降低值是-17mmHg。由此,内匹司他在SHRs中比在正常血压大鼠中具有更大的血压降低效果。

[0237] 在正常麻醉的狗中的研究表明,在紧急静脉内给药(1-10mg/kg i.v.)之后,内匹司他对心血管没有效果,给药之后高达五个小时内,动脉血压、左心室压(包括峰值dp/dt)、心率、心输出量或肾血流量没有变化。在长期带有仪表的、神智清醒的狗的研究中,单一剂量(3-30mg/kg i.v.)之后12小时,观察到类似的效果缺乏。

[0238] 在麻醉的雄性小猎犬中,给药之后至多5小时,在对直接肾神经刺激的响应过程中,内匹司他(30mg/kg,十二指肠内给药)没有显著地抑制肾血流量降低,或在对颈动脉堵塞的响应过程中,没有显著地抑制动脉血压的升高。然而,在给药之后5小时,在肠系膜动脉中,内匹司他导致去甲肾上腺素水平的显著降低和多巴胺/去甲肾上腺素比例(而不是多巴胺水平)的提高。由此,虽然组织去甲肾上腺素水平显著地降低,但不会显著地抑制交感神经引起的功能性反应。

[0239] 当给予雄性小猎犬内匹司他时(4.5天,10mg/kg/d),在麻醉动物中,在对颈动脉堵塞响应的过程中,没有统计上显著的血压降低和心率提高。在对i.v.酪胺刺激的响应过程中,内匹司他治疗可显著地降低心率的提高,但对血压提高仅仅产生轻微的和非显著的抑制。由此,以导致组织去甲肾上腺素水平最大降低的剂量长期给予内匹司他,对交感神经引起的功能性反应不会具有较大的抑制效果。

[0240] 在紧急给予1.0-30mg/kg(p.o.)的小鼠中,内匹司他没有导致对粗大(gross)运动行为的明显的影响,并且它不会影响小鼠(10-100mg/kg i.p.)的运动(loco motor)活性。对大鼠紧急给药不会影响运动(loco motor)活性或声学惊恐反应(3-100mg/kg i.p.)。

[0241] 在给予10、30和100mg/kg/d(p.o.) 10天之后的大鼠中,没有观察到行为影响。还未影响直肠温度。通过用DBH抑制剂SKF-102698(100mg/kg/d,p.o.)和通过中枢起作用的 α -肾上腺素能激动剂可乐定(20mg/kg,b.i.d.,p.o.)治疗,运动(motor)活动和听觉惊恐反射显著地降低。在SHRs中经过30天给药(3-100mg/kg/d,p.o.),运动(motor)活动也未受影响。由此,在大鼠中,内匹司他不会在中枢神经系统介导的行为影响中导致可检测的变化。

[0242] 内匹司他是人的DBH的体外有效竞争性抑制剂,和在大鼠和狗中是DBH的体内有效竞争性抑制剂。在大鼠中用6mg/kg/d剂量的内匹司他进行口服治疗,在心脏和肠系膜动脉中,可产生显著的DBH抑制的证据。与另一种DBH抑制剂SKF-102698相反,相对于大脑皮层,内匹司他对左心室和肠系膜动脉显示了一些选择性。在大鼠中,没有观察到内匹司他对行为的影响。在狗中,在10mg/kg/d的剂量下,在心脏、肾动脉和肾脏中出现DBH抑制的平台效果。在大鼠中(3mg/kg p.o.),内匹司他显著地降低对交感神经刺激的高血压响应,并且当在SHRs中每天给药一次(30mg/kg/d p.o.)(给药30天)时,它在整天都可显著地降低血压。总之,内匹司他是调节交感神经系统作用的有效的DBH抑制剂。

[0243] 实施例9

[0244] 设计这里所描述的研究是为了评价更高口服剂量的内匹司他的药物动力学,以便

在雄性和雌性大鼠中比较药物动力学,并且通过测定内匹司他在脑中的水平来测定内匹司他对CNS的渗透。

[0245] 在给药之前,将重180-220g的雄性大鼠(Cr1:CD BR Vaf+)禁食过夜,直到给药之后4小时为止。将剂量配制在水中,水包含2%1-羟丙基甲基纤维素(50厘泊粘度)、1%苯甲醇和0.6%Tween 80(全部从Sigma Chemical Company获得)。对于10、30和100mg/kg的剂量,在给药溶液中的药物浓度分别是5、15和50mg/ml,并且通过液相色谱(LC)证实。5mg/ml剂量是澄清溶液,更高浓度的剂量是半透明的悬浮液。剂量体积是2.0ml/kg。在给药之后的各个时间,通过用肝素化注射器将心脏穿刺来获得血液样品,并通过离心来制备血浆。通过手术切除大鼠的脑,所有样品都在-20℃冷冻,直到分析为止。

[0246] 将血浆的等分样品(0.05或0.5ml)与内标(50μl甲醇,包含5μg/ml内匹司他的单氟类似物和5mg/ml二硫苏糖醇)混合。将样品与200mM磷酸钠缓冲液(pH7.0,0.5ml)混合,用3ml乙酸乙酯/己烷(1/1,v/v)提取。用250μl的250mM乙酸反萃取包含分析物的有机相,并通过LC试验100μl水相的等分样品。LC系统使用Keystone Hypersil BDS 15cm C₈柱,在环境温度下。流动相A是12.5mM磷酸钾(pH3.0,含有5mM十二烷基磺酸),流动相B是乙腈。溶剂成分是40%B,并且以1ml/min的流速进行泵送。通过UV吸收(261nm)进行检测。用标准曲线测定分析物的浓度,标准曲线是由添加了已知浓度分析物的血浆(得自于未经治疗的大鼠)的分析产生的。血浆浓度数据用μg(游离碱)/ml来表示。

[0247] 用盐水简要地冲洗脑,在纸巾上吸干,然后称重(1.5-2.0g)。加入内标(50μl甲醇,包含20μg/ml内匹司他的单氟类似物),在包含0.5mg/ml二硫苏糖醇的5ml 200mM磷酸钠(pH7.0)中将脑均化。将组织均浆的等分样品(2ml)用10ml乙酸乙酯/己烷(1/1,v/v)提取。用150μl的250mM乙酸温和地反萃取有机相。

[0248] 将100μl甲醇加入到水相中之后(分散任何乳化液),按照针对血浆所描述的方法,通过LC分析100μl等分样品。脑中的水平用μg(游离碱)/g脑组织来表示。

[0249] 由平均血浆浓度计算药物动力学参数。血浆半衰期($T_{1/2}$)计算为: $0.693/\beta$,其中 β 是通过log血浆浓度对时间数据(在数据的末端线性部分内)的线性回归测定的消除速度常数。用梯形法则计算血浆浓度对时间曲线(从零至最后可以计量血浆浓度的时间)下的面积(AUC)。从零至无穷大的AUC(AUC_{全部})计算为:

[0250] $AUC_{全部} = AUC(0-C_{最后}) + C_{最后}/\beta$,其中 $C_{最后}$ 是最后可以计量的血浆浓度。

[0251] 在给予10、30或100mg/kg单一口服剂量的雄性大鼠的血浆中获得内匹司他的浓度。血浆中的内匹司他的浓度随剂量提高而增加,并且在AUC_{全部}和剂量之间的关系是线性的。在更高剂量(分别给雄性大鼠口服剂量10、30和100mg/kg之后1.70、2.09和3.88小时)下,消除半衰期似乎有略微地提高。对雌性大鼠口服30mg/kg的内匹司他剂量之后,在雌性大鼠中内匹司他的血浆AUC_{全部}比给予等剂量内匹司他的雄性大鼠中的血浆AUC_{全部}高77%。在初始时,内匹司他在脑中的水平(表示为μg/g)比在血浆中的水平(表示为μg/ml)低。然而,从给药之后2小时开始,脑中的内匹司他的浓度超过血浆中的浓度。

[0252] 在雄性大鼠中,基于AUC_{全部}值,在10和100mg/kg之间,内匹司他的血浆水平随着剂量提高而线性地提高。

[0253] 30mg/kg口服剂量之后,在雌性大鼠中,内匹司他的血浆水平比雄性大鼠中的高。

[0254] 给予雄性大鼠10mg/kg口服剂量的内匹司他之后,开始时,脑中的内匹司他水平比

血浆中的低,但从2小时开始,脑中的内匹司他水平大于血浆中的内匹司他水平。

[0255] 实施例10

[0256] 该研究的目的是在自发性高血压大鼠单一口服给药之后,测定24小时时程内的内匹司他(10mg/kg)在肠系膜动脉中对多巴胺和去甲肾上腺素水平的效果。在单一口服内匹司他(10mg/kg)或赋形剂(dH₂O;10ml/kg)之后1、2、4、6、8、12、16和24小时,测定儿茶酚胺水平。

[0257] 使重量300-400克的16-17周大的雄性自发性高血压大鼠(SHRs)不限量地使用食品和水。在研究之前的下午,将动物称重,并随机分派到一个下列试验组中(每组n=9):在将动物杀死前的1、2、4、6、8、12、16或24小时,给动物单一口服10mg/kg内匹司他,或单一口服赋形剂(10ml/kg)。

[0258] 以盐酸盐形式合成内匹司他,并将内匹司他溶于赋形剂(dH₂O)中,得到可以以10ml/kg的重复体积给予的口服剂量。以游离碱同等物形式给予所有剂量的内匹司他,并在给药的上午制备。

[0259] 在杀死动物的上午的每个测定时间(minute),对动物给药。在给药之后1、2、4、6、8、12、16和24小时,用氟烷将9个治疗动物和9个赋形剂动物麻醉,断头,快速地采集左心室和肠系膜动脉,并称重。将肠系膜动脉装入0.5ml 0.4M高氯酸(在离心管中)中,将左心室放进空的低温管中。将两个组织立即在液氮中冷冻,并在-70℃保存。使用HPLC(带有电化学检测)测定肠系膜动脉的儿茶酚胺水平。在断头的时候,通过从畜体上将血液引流到包含肝素的管中来获得血浆样品,并在4℃离心。

[0260] 在各个时点,将各个治疗组与赋形剂组进行比较。进行了具有效果TRT、HARVEST和它们的相互作用的双向方差(variomce)分析(ANOVA)。对于各个采集时间,进行了具有因子TRT的单向ANOVA。在每个时点,使用Fisher's LSD策略,在治疗和赋形剂动物之间进行成对分析,以便控制实验(experiment-wise)误差率。只是在4小时的时点,去甲肾上腺素值显著地($p<0.05$)比赋形剂组的低。在6小时时点,水平在一定程度上($0.05< p<0.1$)降低。在2和6小时采集时间,多巴胺水平显著地($p<0.05$)比赋形剂组的多巴胺水平高。在1、2、4、6和12小时时点,多巴胺/去甲肾上腺素比例显著地($p<0.05$)大于赋形剂治疗动物的多巴胺/去甲肾上腺素比例。

[0261] 通常,在自发性高血压大鼠中,在单一口服10mg/kg之后,在给药之后1、2、4、6、8、12、16或24小时,内匹司他对肠系膜动脉去甲肾上腺素或多巴胺水平几乎没有统计意义上显著的效果。然而,在治疗的第一12小时的大部分时间内,观察到多巴胺/去甲肾上腺素比例稳定的提高。在16和24采集时间,观察到三个参数都无变化。

[0262] 实施例11

[0263] 该研究的目的是:在Sprague-Dawley大鼠中,测定内匹司他的静脉内给药(下文称为内匹司他)对左心室中的多巴胺和去甲肾上腺素水平的影响。使动物接受两个静脉内(iv)给药(12小时间隔):赋形剂(75%丙二醇+25%DMSO;1.0ml/kg)或15mg/kg的内匹司他。最后的化合物服药之后6小时,测定组织去甲肾上腺素和多巴胺水平。

[0264] 使重量300-400克的16至17周大的雄性Sprague-Dawley大鼠不限量地使用食品和水。在研究之前的下午,将动物称重,并随机分派至一个下列试验组中(每组n=10):赋形剂(1.0ml/kg)或内匹司他15mg/kg。

[0265] 合成内匹司他,并溶于合适数量的赋形剂(75%丙二醇+25%DMSO)中,获得1.0ml/kg的给药体积。以游离碱同等物形式给予内匹司他,并在第一次给药之前的下午制备。

[0266] 在采样之前的下午,在尾部静脉对每个小鼠iv给药。第二天早晨12小时后,重复给药。最后给药之后6小时,用氟烷使大鼠麻醉,断头,快速地采集左心室,并称重。将心室放置在1.0ml冰冻的0.4M高氯酸中。将组织立即在液氮中冷冻,并在-70℃保存。利用高效液相色谱,使用电化学检测,测定组织多巴胺和去甲肾上腺素浓度。

[0267] 对于去甲肾上腺素,进行了具有治疗主要效果的单向方差分析(ANOVA)。主要由于试验组之中的异质性的方差,对多巴胺和它们的比例进行了Kruskal Wallis试验。随后使用Fisher's LSD试验,在内匹司他治疗的大鼠和赋形剂之间进行逐对比较。对所有的p-值进行Bonferroni校正,以保证总的实验性I型误差率为5%。

[0268] 与赋形剂治疗的动物相比,以15mg/kg给予内匹司他可显著地($p < 0.01$)将去甲肾上腺素水平降低51%,显著地($p < 0.01$)将多巴胺水平提高472%,显著地($p < 0.01$)将多巴胺/去甲肾上腺素比例提高1117%。

[0269] 总之,静脉内给予内匹司他可在Sprague-Dawley大鼠的左心室中显著地抑制DBH。

[0270] 实施例12

[0271] 该研究评价了内匹司他在雄性自发性高血压大鼠(SHRs)的皮层、左心室和肠系膜动脉中对改变多巴胺和去甲肾上腺素水平的效果。给予动物三个剂量(12小时间隔)(3、10、30或100mg/kg p.o.)。

[0272] 该研究也比较了三个剂量(30mg/kg)之后的S对映体(内匹司他)与R对映体(化合物B)的效果。该研究也比较了内匹司他与SKF-102698(DBH抑制剂)(先前在大鼠中证明了其口服活性)的效果。

[0273] 以游离碱同等物的形式制备和给予化合物。将内匹司他溶于合适数量的赋形剂(dH₂O(对于内匹司他),PEG 400:dH₂O,50:50体积:体积(对于SKF-102698))。以10.0ml/kg给药体积制备3、10、30和100mg/kg内匹司他和30mg/kg SKF-102698的药剂。

[0274] 使15-16周大的雄性自发地性高血压大鼠(SHRs)(Charles River Labs)不限量地使用食品和水。将动物称重,并随机分配给下列试验组之一:1)蒸馏水赋形剂(dH₂O),或3、10、30和100mg/kg的内匹司他,2)30mg/kg化合物B(在蒸馏水中),或3)PEG 400:dH₂O赋形剂或SKF-102698(30mg/kg)。每个小鼠口服给药三次(p.o.,使用强饲针头),12小时间隔,在早上开始。第三次给药之后6小时,用氟烷使大鼠麻醉,断头,快速地采集皮层、肠系膜动脉和左心室,称重,放入冰冻的高氯酸(0.4M)中,在液氮中冷冻,在-70℃保存。利用高效液相色谱和电化学检测,测定组织多巴胺和去甲肾上腺素浓度。

[0275] 进行四个系列的统计分析。第一个系列对用各种剂量的内匹司他和30mg/kg化合物B治疗的大鼠与赋形剂对照动物进行了比较。对于各个组织和品系(strain),分别进行了因子剂量(Dose)和阻断因子日(Day)的非参数单向方差分析(ANOVA)。对总体结果进行了报告。使用Dunnett's试验,在各个剂量的治疗组和对照组之间进行成对分析,以便控制实验误差率。第二个统计试验就SKF-102698与PEG-dH₂O赋形剂治疗组进行了比较(使用非参数t检验)。第三个统计试验将30mg/kg剂量的化合物B与内匹司他进行了比较(使用非参数t检验)。第四个统计分析将30mg/kg剂量的内匹司他与SKF-102698进行了比较。由于使用两种不同的赋形剂,进行了线性对比(contrast),其如下计算差别的差值:

[0276] 变化 = (30mg/kg-赋形剂) 内匹司他 - (30mg/kg-赋形剂) SKF-102698

[0277] 通过SAS procedure General Linear Models试验了该新的变量的零等同性 (for equality to zero)。

[0278] 在30和100mg/kg剂量的内匹司他情况下, 大脑皮层中的多巴胺浓度显著地 ($p < 0.05$) 大于赋形剂, 去甲肾上腺素浓度显著地 ($p < 0.05$) 低于赋形剂, 和多巴胺/去甲肾上腺素比例显著地 ($p < 0.05$) 大于赋形剂。

[0279] 在3、10、30和100mg/kg的剂量下, 在左心室中多巴胺浓度显著地 ($p < 0.05$) 大于赋形剂。在10、30和100mg/kg的剂量下, 去甲肾上腺素浓度显著地 ($p < 0.05$) 低于赋形剂。在剂量为3、10、30和100mg/kg的内匹司他情况下, 在左心室中的多巴胺/去甲肾上腺素比例显著地 ($p < 0.05$) 大于赋形剂组。

[0280] 在3、10、30和100mg/kg的剂量下, 在SHRs的肠系膜动脉中的多巴胺浓度显著地 ($p < 0.05$) 大于赋形剂组。在剂量为10、30和100mg/kg的情况下, 去甲肾上腺素浓度不是显著地 ($p < 0.05$) 小于赋形剂组。在所有剂量的内匹司他情况下, 肠系膜动脉中的多巴胺/去甲肾上腺素比例显著地 ($p < 0.05$) 大于赋形剂组。

[0281] 在大脑皮层中, 相对于赋形剂治疗, 化合物B导致多巴胺和去甲肾上腺素显著 ($p < 0.01$) 增加, 并且对多巴胺/去甲肾上腺素比例没有影响。用内匹司他, 去甲肾上腺素水平显著地低于化合物B ($p < 0.01$)。

[0282] 在左心室中, 相对于赋形剂治疗, 化合物B导致多巴胺和多巴胺/去甲肾上腺素比例显著增加 ($p < 0.01$), 但不会显著地降低去甲肾上腺素水平。在降低去甲肾上腺素水平和提高多巴胺与多巴胺/去甲肾上腺素比例方面, 内匹司他显著地比化合物B更有效 ($p < 0.01$)。

[0283] 在肠系膜动脉中, 相对于赋形剂治疗, 化合物B导致多巴胺和多巴胺/去甲肾上腺素比例显著增加 ($p < 0.01$), 但不会显著地降低去甲肾上腺素水平。在降低去甲肾上腺素水平和提高多巴胺与多巴胺/去甲肾上腺素比例方面, 内匹司他显著地比化合物B更有效 ($p < 0.01$)。

[0284] 在大脑皮层中, 将内匹司他与SKF-102698 (30mg/kg) 进行比较, 在剂量为30mg/kg的SKF-102698的情况下, 皮层中的多巴胺浓度显著地更大于赋形剂 ($p < 0.01$)。相对于赋形剂的提高, SKF-102698高于内匹司他 ($p < 0.01$)。对于SKF-102698来说, 其去甲肾上腺素浓度显著地低于赋形剂, 并且对这种降低, SKF-102698比内匹司他降低得更多 ($p < 0.01$)。对于SKF-102698, 皮层中的多巴胺/去甲肾上腺素比例显著地 ($p < 0.01$) 大于赋形剂, 并且对于赋形剂的提高, SKF-102698比内匹司他提高得更多 ($p < 0.01$)。

[0285] 对于SKF-102698, 左心室中的多巴胺浓度显著地大于赋形剂 ($p < 0.01$), 并且对于赋形剂的提高, 内匹司他比SKF-102698提高得更多 ($p < 0.01$)。用SKF-102698治疗与用赋形剂时的去甲肾上腺素浓度没有差别, 然而, 用内匹司他治疗相对于赋形剂显著降低了去甲肾上腺素, 其比SKF-102698降低得更多 ($p < 0.01$)。对于SKF-102698, 左心室中的多巴胺/去甲肾上腺素比例显著地大于赋形剂 ($p < 0.05$), 并且相对于赋形剂的提高, 内匹司他比SKF-102698提高得更多 ($p < 0.05$)。

[0286] 对于SKF-102698, 在肠系膜动脉中多巴胺浓度显著地大于赋形剂, 并且对于赋形剂的提高, 内匹司他比SKF-102698提高得更多。用SKF-102698治疗的去甲肾上腺素浓度显

著地低于赋形剂,并且用内匹司他治疗相对于赋形剂显著地降低了去甲肾上腺素,其比SKF-102698降低得更多。对于SKF-102698,在左心室中多巴胺/去甲肾上腺素的比例显著地大于赋形剂,并且对于赋形剂的提高,内匹司他比SKF-102698提高得更多。

[0287] 总之,数据表明,在三个口服剂量的第三个剂量之后6小时(给药间隔12小时),在SHRs的肠系膜动脉、左心室和大脑皮层中,内匹司他是DBH的体内有效抑制剂。在30mg/kg的剂量下,在所有三个组织中,S对映体(内匹司他)比R对映体(化合物B)更有效。此外,用24小时给予三个剂量(30mg/kg)之后,在肠系膜动脉和左心室中,内匹司他比SKF-102698更有效,但在大脑皮层中效果较少。

[0288] 实施例13

[0289] 以游离碱同等物的形式制备和给予内匹司他。将内匹司他和甲巯咪唑溶于赋形剂(66.7%丙二醇:33.3% dH₂O)中,得到合适浓度的给药溶液,使得所有剂量可以以1.0ml/kg体积的剂量给予。

[0290] 将雄性Sprague-Dawley大鼠(重量180-200克)不限量地饲喂缺乏碘的饮食(Purina,5891C, Lot 1478, 0.066 ± 0.042 mg碘/kg样品),饲喂14天,而后治疗。将动物称重,并随机分派至一个下列试验组中(每组n=12):内匹司他2.0mg/kg,内匹司他6.2mg/kg,甲巯咪唑1mg/kg或赋形剂1ml/kg。在晚上和第二天早晨(大约12小时间隔),将每组大鼠口服给药,给药10个连续日。

[0291] 第二次给药之后四个小时(在第10天),用氟烷将大鼠麻醉,断头,采集皮层、纹状体和肠系膜动脉,并称重。不从甲巯咪唑组中采集组织样品,因为它们只是充当甲状腺功能测定的阳性对照。将肠系膜动脉、皮层和纹状体立即放入0.4M冰冻高氯酸中,使用HPLC,同一天分析去甲肾上腺素和多巴胺水平。

[0292] 在第-3、0、3、7和9天(0天是给药的第一天),获取眼眶血样。使用放射免疫测定,分析血清样品中的T₃和T₄水平。

[0293] 为了统计上评价T₃和T₄水平的变化,由第-3天时点计算自基线的变化。在目标方差分析(ANOVA)范围之内,进行非参数双向方差分析。还进行单向ANOVA,从而检测是否与对照相比出现显著差异。使用Fisher's LSD策略,在对照和每个治疗组之间进行成对分析,以便控制实验误差率。为了统计分析儿茶酚胺水平,进行单向ANOVA(用因子DOSE)。使用Fisher's LSD策略,在每个剂量下的治疗和对照之间进行成对分析,以便控制实验误差率。

[0294] 在内匹司他治疗的动物中,在2.0和6.2mg/kg的剂量下,与赋形剂对照物相比,皮层中的去甲肾上腺素水平没有显著($p > 0.05$)不同。与赋形剂对照物相比,在2.0和6.2mg/kg剂量组中,肠系膜动脉中的去甲肾上腺素水平显著地($p < 0.05$)降低,在2.0和6.2mg/kg剂量组中,纹状体中的去甲肾上腺素水平在一定程度上($p < 0.10$)降低。

[0295] 在内匹司他的2.0或6.2mg/kg的剂量组中,与赋形剂对照物相比,所有三个组织中的多巴胺水平没有显著($p > 0.05$)不同。

[0296] 在2.0和6.2mg/kg内匹司他的剂量下,与赋形剂对照物相比,皮层和纹状体中的多巴胺/去甲肾上腺素比例没有显著的($p > 0.05$)不同,而在2.0和6.2mg/kg内匹司他的剂量下,肠系膜动脉中的该比例比赋形剂对照物中的显著的($p < 0.05$)更高。

[0297] 通过改变小鼠血清中的游离T₃或全部T₄水平,2.0或6.2mg/kg内匹司他都不影响甲状腺功能。与赋形剂对照物相比,1.0mg/kg甲巯咪唑(阳性对照)的剂量显著地($p < 0.05$)降

低了T₃水平(在所有的治疗天中)和T₄水平(在第3和7天)。甲巯咪唑治疗动物的T₄水平只是在第9天有一定程度的($p < 0.10$)降低。

[0298] 当与赋形剂相比时,内匹司他(2.0或6.2mg/kg)不会导致多巴胺或去甲肾上腺素水平或多巴胺/去甲肾上腺素比例的任何显著的($p > 0.05$)变化。在纹状体中,在6.2mg/kg剂量组中,观察到去甲肾上腺素水平在一定程度上显著地($p < 0.10$)降低,但没有观察到其它显著的变化。在肠系膜动脉中,与赋形剂相比,2.0和6.2mg/kg内匹司他引起去甲肾上腺素水平显著地($p < 0.05$)降低和多巴胺/去甲肾上腺素比例显著地($p < 0.05$)提高,没有观察到多巴胺水平的显著变化。由此,内匹司他似乎是多巴胺β-羟化酶的体内有效抑制剂,在Sprague-Dawley大鼠中给药10天之后,与在大脑皮层或纹状体中相比,在肠系膜动脉中具有更大的效果。

[0299] 实施例14

[0300] 进行该研究以测定服用内匹司他的狗的肾髓质和肾脏皮层中的多巴胺和去甲肾上腺素浓度。将成年雄性小猎犬随机分配给四个组中,每组8个狗,并且口服给予内匹司他。以5、15和30mg/kg的剂量(放在单一胶囊中)递送内匹司他。赋形剂是空胶囊。使每个狗每天接受2个剂量,早晨和下午(8-10小时间隔),接受4天。在第五天,在早上使每个狗接受单一剂量,最后给药之后6小时,使狗安乐死。快速地采集肾髓质和肾脏皮层的样品,称重,放入冷的0.4M高氯酸中,在液氮中冷冻,在-70℃保存。

[0301] 为了测定去甲肾上腺素(NE)和多巴胺(D)的浓度,通过在0.4M高氯酸中进行简要的超声处理,将每个组织均化。超声处理之后,在4℃、在微管中将组织均浆离心(13,000rpm)30分钟。取出每个上清液的等分样品,并加入3,4-二羟基苯胺(DHBA)作为内标。使用电化学检测,对每个样品的提取物进行HPLC分离。该方法具有2.0ng/mL的定量限制,每个分析物具有2.0ng/mL至400ng/mL的线性范围。

[0302] 将每个分析物测定数据对组织样品的重量标准化,并表示为:μg分析物/克组织。获得每个狗的多巴胺、去甲肾上腺素的浓度和多巴胺浓度与去甲肾上腺素浓度的比例(D/NE)。另外,对于每个治疗组,提供对每个分析物计算的平均值和标准偏差和D/NE比例。

[0303] 实施例15

[0304] 在该研究中,使用重量在9-16kg之间的雄性小猎犬(Marshall farms, North Rose, NY)。使动物不限量地得到水,并且每天在~10.00AM给予一次食品。将动物随机分配给下列治疗组之一($n=8$ /组):安慰剂(空胶囊),或内匹司他2mg/kg b.i.d (4mg/kg/天)。使每个动物每天接受2个剂量,早晨和下午(8-10小时间隔)。AM给药之后6小时,抽取每天的血样(10ml),用于测定内匹司他和儿茶酚胺的血浆水平。将血液收集在包含肝素和谷胱甘肽的管中,在-4℃离心,在1小时之内收集。将血浆分离,并分为两个样品,一个用于测定血浆儿茶酚胺,另一个用于分析内匹司他。

[0305] 如果在后面的时点需要分析组织儿茶酚胺,那么在该研究的最后,还从狗中获取组织样品。在第15天,在AM给药之后6小时,获取最后的血样(10ml)。用戊巴比妥钠(40mg/kg, iv)将狗麻醉,放在尸体解剖台上,第二次注射戊巴比妥(80mg/kg, iv),使其安乐死。进行快速的双向胸切开术和剖腹术。从肾动脉和左心室中获取活检。打开头骨,露出大脑皮层的额叶,获取活检。将组织样品称重,放入冰冷的0.4M高氯酸中,在液氮中冷冻,在-70℃保存,直到分析为止。

[0306] 使用电化学检测,通过HPLC分析血浆去甲肾上腺素(NE)、多巴胺(DA)和肾上腺素(EPI)。利用HPLC,使用电化学检测,测定内匹司他的血浆浓度。

[0307] Box-Cox变换表明,对数是稳定变换的合适变量;由此所有的分析用log-值进行。将狗1在第10天的DA浓度中的BQL(低于定量限制)设置为0;ln(0)设置为没有。使用混合模型(使用PROC MIXED)进行分析,固定天和治疗范畴变量,治疗范围内的狗是随机因子。对于固定效果,包括了天数和治疗之间的相互影响,这是由于药物和安慰剂组之间的差别每天都在改变。使用CONTRAST指令来计算对比度(contrast),其正确地考虑了每个具体对比度的误差项。尤其是,将治疗组与药物组比较的对比度使用了狗的误差项均方,而建立稳定状态所使用的比较全部在狗的比较之内,并且需要误差均方。

[0308] 使用Helmert变换(cf.SAS PROC GLM manual)计算稳定状态的时间周期。这些变换将每个治疗平均值(mean)后面的时点的治疗平均值的平均值进行比较。稳定状态周期定义为起始于最大时间后面的第一个时间点,此时Helmert对比度是统计上显著的。然而,由于这种方法不能测定平稳改变的过程,正如本文可能出现的情况那样,还需要计算稳定状态周期期间的分析物浓度的斜率。对于每个各别的狗,计算稳定状态周期期间的斜率,每个动物得到一个斜率。然后计算对斜率的一元统计,用平均斜率建立正常理论置信区间,并且试验斜率等于零的假设,计算它的正常理论p-值。无论稳定状态周期是否是改变浓度的周期,这种斜率分析用作测定的基础。

[0309] 当与安慰剂组相比时,内匹司他(2mg/kg,b.i.d)引起血浆NE(2.1倍)和EPI(1.91倍)显著降低,以及血浆DA(7.5倍)和DA/NE比例(13.6倍)显著提高。

[0310] 在第6天和第8天,分别观察到血浆NE和EPI的峰状降低,而在第7天和第6天,分别观察到血浆DA和DA/NE比例的峰状提高。在给药后的大约4、8和6天,对血浆NE、DA和EPI的效果分别达到稳态。在给药后的所有天,血浆DA和DA/NE比例的变化显著地不同于安慰剂。在给药后的4-9天和11-13天,血浆NE的变化显著地不同于安慰剂。在给药后的7-9天和12天,血浆EPI的变化显著地不同于安慰剂。

[0311] 在所有天,给予内匹司他(2mg/kg,bid)引起显著的血浆药物水平。在给药后2天,观察到峰值水平。在任何天,没有测定到显著性水平的内匹司他的N-乙酰基代谢物。

[0312] 长期(14.5天)给予内匹司他(2mg/kg,bid,po)引起血浆NE和EPI的显著降低,和血浆DA与DA/NE比例的显著提高。这些变化反映了通过酶多巴胺β-羟化酶的抑制而对交感神经肾上腺系统的抑制。

[0313] 实施例16

[0314] 将内匹司他称重,并放进胶囊(13-Torpac大小;East Hanover,NJ)中,得到每个胶囊5、15和30mg/kg的剂量(b.i.d.给予,得到10、30和60mg/kg/天的剂量)。初始狗重量用于测定每个动物的剂量。使接受0mg/kg/天的狗接受空胶囊(安慰剂)。内匹司他的所有剂量是以游离碱同等物形式给予的。

[0315] 将32个雄性小猎犬(重量10-12kg)随机分配给下列4个治疗组之一(每个组n=8):内匹司他0mg/kg/天(安慰剂),10mg/kg/天(5mg/kg,b.i.d.),30mg/kg(15mg/kg,b.i.d.)或60mg/kg/天(30mg/kg,b.i.d.)。将编号1-16的狗指定为剂量组A,编号17-32的狗指定为剂量组B。为了采集组织,用2天时间对每天研究的16个动物进行致死手术。在给予第一个化合物之前2或3天,将每个狗称重,修剪覆盖头部、隐静脉和颈静脉的皮肤区域。给药包括口服

一个胶囊,第二次给药在8-10小时以后。按照计划,对狗在1-3天给药。在第4天,在AM给药之前,从颈静脉获得3ml血液,测定基线血浆化合物水平。然后给予狗AM剂量,并且在给药之后1、2、4和8小时,收集额外3ml血样,测定血浆化合物水平。将血样放进包含肝素的管中,在4℃离心,在-20℃保存,直到分析为止。然后按照计划给予PM剂量。在手术的当天,如期给予AM剂量。AM剂量之后大约6小时,从颈静脉获取最后的3ml血样,测定血浆化合物水平。然后用戊巴比妥钠(~40mg/kg) (在头部或隐静脉i.v.给予)使狗麻醉,传送至尸体解剖房间,再给予额外剂量的戊巴比妥钠(~80mg/kg, iv)。然后快速地采集左心室、肾动脉、肾脏、肾髓质、肾皮质和大脑皮层,称重,放进2ml冰冻的0.4M高氯酸中,在液氮中冷冻,在-70℃保存,直到使用电化学检测、通过HPLC分析儿茶酚胺为止。将所有组织样品分成2份,将第二份立即在液氮中冷冻,并在-70℃保存,用于测定组织化合物水平。将第三个透壁样品(取自左心室)立即在液氮中冷冻,在-70℃保存,用于受体结合研究。

[0316] 使用Polytron P-10组织碎裂器(设定10、2x 15秒破裂),将心室在50mM Tris-HCl、5mM Na₂EDTA缓冲液(pH7.4,在4℃)中均化。将组织均浆在500x g下离心10分钟,并将上清液保存在冰上。通过再悬浮来洗涤球粒,并在500x g下离心,合并上清液。将合并的上清液在48,000x g下离心20分钟。通过再悬浮来洗涤球粒,并在均化缓冲液中离心一次,在50mM Tris-HCl、0.5mM EDTA缓冲液(pH7.4,在4℃)中离心两次。将膜在-70℃保存,直到需要为止。在包含50mM Tris-HCl、0.5mM EDTA的缓冲液(pH7.4,在32℃)中,使用[³H]CGP-12177进行饱和实验。通过10μM异丙基肾上腺素定义非特异性的结合。对于八个浓度的[³H]CGP-12177(从0.016nM至2nM),准备总结合、非特异性结合和总计数的管。将样品在32℃培养60分钟。使用Brandel细胞收集器,用0.1%PEI(预先处理的GF/B玻璃纤维过滤垫)过滤样品。将样品用常温水洗涤三次(3秒)。将水溶胶闪烁流体加入到每个管中,通过液体闪烁计数来测定放射性。在总配体浓度第一次转化为游离配体浓度(总计-结合=游离)之后,分析饱和和结合等温线。完成每个组织的独立饱和等温线。使用Bio-Rad蛋白结合方法,并使用两种球蛋白作为标准,对膜进行试验,测试蛋白。以每个治疗组的平均值形式表示每mg蛋白的受体密度。将内匹司他治疗组与安慰剂(对照物)治疗组进行比较,分析组织儿茶酚胺水平。对于每个组织和每个儿茶酚胺测定,各别用因子DOSE进行非参数单向方差分析(ANOVA)。使用Dunnett's试验,在各个剂量的治疗和对照之间进行成对分析,以便控制实验误差率。进行Student-Neuman-Kuels和Fisher's LSD试验来作为验证。用两种方式进行组织和血浆化合物水平的分析。首先,进行独立t检验,以便将每个参数的每个剂量水平与它的伴侣剂量的因素水平进行比较。例如,在具体组织或血浆中,在10mg/kg存在三倍的化合物水平,应该和在30mg/kg组中所观察到的化合物水平是可比的。另外,在单向ANOVA的范围内,对于所有三个剂量,计算线性正交对比。成对t检验用于测定赋形剂治疗组和10mg/kg/天内匹司他组之间的有关结合的任何差别。

[0317] 口服给予狗0、5、15或30mg/kg内匹司他胶囊(b.i.d.)得到10、30和60mg/kg/天的剂量,给予4.5天,最后给药之后6小时,采集组织。在肾动脉中,以10、30和60mg/kg/天的剂量给予内匹司他,分别显著地($p<0.01$)将去甲肾上腺素水平降低86%、81%和85%。在10、30和60mg/kg/天的剂量下,多巴胺水平分别显著地($p<0.01$)提高180%、273%和268%。与安慰剂相比,10、30和60mg/kg/天内匹司他的剂量分别显著地($p<0.01$)将多巴胺/去甲肾上腺素比例提高1711%、1767%和1944%。给予10和60mg/kg/天内匹司他之后,在大脑皮层

中,多巴胺水平分别显著地 ($p < 0.01$) 提高632%和411%。给予10mg/kg/天内匹司他之后,多巴胺/去甲肾上腺素比例显著地 ($p < 0.01$) 提高531%,以及给予60mg/kg/天内匹司他之后,提高612%。在这2个剂量下,去甲肾上腺素水平没有显著地 ($p > 0.01$) 受到影响。在30mg/kg/天剂量下,与安慰剂相比,去甲肾上腺素显著地 ($p < 0.01$) 降低63%,比例显著地 ($p < 0.01$) 提高86%,而多巴胺水平在一定程度上 ($0.05 < p < 0.10$) 提高174%。给予10、30和60mg/kg/天内匹司他之后,在左心室中,去甲肾上腺素水平分别显著地 ($p < 0.01$) 降低85%、58%和79%。与安慰剂动物相比,多巴胺/去甲肾上腺素比例分别显著地 ($p < 0.01$) 提高852%、279%和607%。在10、30和60mg/kg/天内匹司他的剂量下,没有观察到多巴胺水平的显著变化。

[0318] 在肾皮质中,与安慰剂相比,10、30和60mg/kg/天内匹司他的剂量之后,去甲肾上腺素水平分别显著地降低 ($p < 0.01$) 86%、66%和85%。在此剂量下,多巴胺水平分别显著地 ($p < 0.01$) 提高156%、502%和208%。在10、30和60mg/kg/天的剂量下,多巴胺/去甲肾上腺素比例分别显著地 ($p < 0.01$) 提高1653%、1440%和1693%。在肾髓质中,在10、30和60mg/kg/天内匹司他的剂量下,与安慰剂相比,多巴胺/去甲肾上腺素比例分别显著地 ($p < 0.01$) 提高555%、636%和677%。在30mg/kg/天的剂量下,多巴胺水平显著地 ($p < 0.01$) 提高522%,在10和60mg/kg/天的剂量下,多巴胺水平在一定程度上 ($0.05 < p < 0.10$) 分别提高150%和156%。给予10mg/kg/天内匹司他之后,与安慰剂相比,去甲肾上腺素水平显著地 ($p < 0.01$) 降低72%,给予60mg/kg/天之后,去甲肾上腺素水平在一定程度上 ($0.05 < p < 0.10$) 降低69%。

[0319] 统计分析表明,在每个剂量水平和它的伴侣 (partner) 剂量的因子 (factored) 水平之间,在第4天获得的血浆中内匹司他浓度和在第5天获得的组织和血浆中的是按剂量比例的。因此,测定的剂量点是线型的,下列除外 (显著的结果表示数据不是线型的):

[0320] 肾髓质: $3X \ 10 < 30$ ($p < 0.05$)

[0321] 肾髓质: $6X \ 10 < 60$ ($p = 0.077$)

[0322] 血浆 (第4天): $2X \ 30 > 60$ ($p = 0.076$)

[0323] 在第5天,所检验的所有组织中的内匹司他水平比血浆中的水平高。

[0324] 该结果表明,在得自于10mg/kg/天内匹司他治疗组和赋形剂治疗组的左心室样品之间没有差别。

[0325] 实施例17

[0326] 评价内匹司他对大量酶的活性,包括酪氨酸羟化酶,NO合酶,磷酸二酯酶III,磷脂酶A₂,中性肽链内切酶, Ca^{2+} /钙调素蛋白激酶II,乙酰基CoA合成酶,酰基CoA-胆固醇转酰酶,HMG-CoA还原酶,蛋白激酶 (非选择性的) 和环加氧酶-I。如图4所示,内匹司他对所有所研究的12种酶具有 $> 10\mu M$ 的 IC_{50} 值,因此它是多巴胺- β -羟化酶的高度选择性的 (> 1000 倍) 抑制剂。

[0327] 实施例18

[0328] 源于肾上腺的牛DBH是从Sigma Chemicals (St Louis, MO) 获得的。人分泌的DBH是从神经母细胞瘤细胞系SK-N-SH的培养介质中纯化获得的,并且用于获得抑制数据。制备包含25ml凝胶的扁豆外源凝集素柱,并用50mM KH_2PO_4 (pH6.5)、0.5M NaCl平衡。用35ml的10%甲基 α ,D-甘露糖苷 (在50mM KH_2PO_4 (pH6.5)、0.5M NaCl中) 洗脱柱,速度0.5ml/min。收集包

含大部分酶催活性的馏分,并使用YM30膜,用Amicon搅拌单元(cell)浓缩。通过在50mM KH_2PO_4 (pH6.5)、0.1M NaCl中进行缓冲液交换,取出甲基 α ,D-甘露糖苷。将浓缩的酶溶液等分,并在-25℃保存。

[0329] 使用酪胺和抗坏血酸盐作为底物,用HPLC试验测定DBH活性。该方法基于通过反相HPLC色谱的酪胺和酚乙醇胺的分离和定量(Feilchenfeld,N.B.,Richter,H.&Waddell,W.H.(1982).Anal.Biochem:A time-resolved assay of dopamine β -hydroxylase activity utilizing high-pressure liquid chromatography.122:124-128.)。试验是在pH5.2和37℃的条件下、在0.125M NaAc、10mM富马酸盐、0.5~2.0 μM CuSO_4 、0.1mg/ml催化酶(6,500u,Boeringer Mannheim,Indianapolis,IN)、0.1mM酪胺和4mM抗坏血酸盐中进行的。在典型的试验中,将0.5-1.0毫单位的酶加入到反应混合物中,随后,将包含催化酶、酪胺和抗坏血酸盐的底物混合物加入以起动反应(200 μl 的最终体积)中。将样品在37℃培养30~40分钟。通过包含25mM EDTA和240 μM 3-羟酪胺(内标)的中止溶液来猝灭反应。将样品(150 μl)装载到Gilson自动取样器中,并使用UV检测(在280nm),通过HPLC进行分析。PC-1000软件(Thermo Separations products,Fremont,CA)用于整合与数据分析。HPLC色谱操作如下进行:流速1ml/min,使用LiChroCART 125-4RP-18柱,用10mM acidic酸、10mM 1-庚磺酸、12mM磷酸四丁胺和10%甲醇进行无梯度洗脱。基于对照物(没有抑制剂)计算保留的百分比活性,使用内标进行校正,并与非线性的四参数剂量响应曲线拟合,获得 IC_{50} 值。

[0330] [^{14}C]-酪胺的纯化。通过C18轻负载柱(两个柱合并成一个)纯化[^{14}C]盐酸酪胺,将柱用2ml MeOH、2ml 50mM KH_2PO_4 (pH2.3)、30%乙腈、然后4ml 50mM KH_2PO_4 (pH2.3)洗涤。真空歧管(Speed Mate 30,得自于Applied Separations)用于真空洗涤和洗脱柱。装填[^{14}C]酪胺之后,用6ml 50mM KH_2PO_4 (pH2.3)洗涤柱,用2ml 50mM KH_2PO_4 (包含30%乙腈)洗脱。将洗脱物冷冻干燥,以除去乙腈,再悬浮在水中,在-20℃保存。

[0331] 利用放射性方法的酶试验。使用[^{14}C]酪胺作为底物,使用C18柱来分离产物,试验酶活性。试验是在200ml体积中进行的,200ml体积包含100mM NaAc (pH5.2)、10mM富马酸、0.5 μM CuSO_4 、4mM抗坏血酸、0.1mg/ml催化酶和各种浓度的酪胺。每个反应的总计数是~150,000cpm。在反应缓冲液中,在37℃,将牛DBH(每个反应0.18ng)与酪胺和抑制剂混合。通过加入抗坏血酸盐/催化酶混合物来起始反应,并在37℃培养30分钟。通过加入100ml 25mM EDTA、50mM KH_2PO_4 (pH2.3)来终止反应。将全部混合物装载到预先用MeOH洗涤和用50mM KH_2PO_4 (pH2.3)平衡的C18轻负载柱(两个合并成一个)上。用1ml KH_2PO_4 (pH2.3)缓冲液洗脱两次,而后用2ml相同缓冲液洗脱,洗脱到闪烁管中。将ReadySafe闪烁流体(16ml)加入到闪烁管中,计数样品的 ^{14}C 放射性。

[0332] 在下列酪胺浓度下,0、1、2、4、8nM的内匹司他浓度用于研究抑制动力学:0.5、1、2、3、4mM。在如上述进行的每个反应中, ^{14}C 计数是相同的。不含酶的空白对照用于获得背景。针对背景来校正数据,转变为活性(nmol/min),并制图(1/V vs 1/S)。由斜率和Y截距计算 Km' ,并且线性回归用于获得 Ki 值。

[0333] SKF-102698、内匹司他和化合物B针对人和牛DBH的 IC_{50} 值是使用HPLC试验获得的,底物浓度是0.1mM酪胺、4mM抗坏血酸盐,pH5.2和37℃。对牛和人的酶两者,所有三个化合物导致DBH活性的剂量依赖性抑制。

[0334] 对内匹司他、化合物B和SKF-102698计算的 IC_{50} 值表明,S对映体(内匹司他)比R对

映体(化合物B)更有效,针对牛DBH更加有效3倍,针对人的酶更加有效2倍。内匹司他比SKF-102698更有效,针对牛酶更加有效8倍,针对人DBH更加有效9倍。

[0335] 从Lineweaver-Burk图测定0.6mM的Km。内匹司他(1-8nM)导致Km有很大的变化,与对竞争性抑制剂预计的一样。内匹司他对牛DBH的抑制似乎可与酪胺竞争。通过线性回归计算 4.7 ± 0.4 nM的Ki。

[0336] 内匹司他是人和牛两者的DBH的有效抑制剂。它比SKF-102698更加有效8-9倍。内匹司他(S对映体)比化合物B(R对映体)更加有效2-3倍。内匹司他对牛DBH的抑制似乎可与酪胺竞争,具有 4.7 ± 0.4 nM的Ki。

[0337] 实施例19

[0338] 在所述的使用标准放射性配体的结合试验中,使用过滤结合方法,测定内匹司他的亲合性。

[0339] 通过迭代曲线(与四参数逻辑斯谛方程拟合)分析竞争结合数据。直接获得Hill系数和IC₅₀值。使用Cheng-Prusoff方程式,由IC₅₀值计算竞争配体的pKi(Ki的-log)。

[0340] 内匹司他针对 α_1 受体具有中度亲合性(6.9-6.7的pKi)。其对所检验的所有其它受体的亲合性相对较低(pKi<6.2)。

[0341] 实施例20

[0342] 在给药的时候,通过将赋形剂与内匹司他粉剂混合、而后摇动,制备60mg/ml内匹司他制剂。通过周赋形剂稀释60mg/ml制剂,制备6和20mg/ml内匹司他制剂。重组的内匹司他制剂保留了使用期间的效能。赋形剂水溶液和内匹司他制剂包含羟丙基甲基纤维素、苯甲醇和聚山梨酸酯80。

[0343] 基于急性毒性研究选择剂量,在该研究中,给予小鼠内匹司他的250、1000或2500mg/kg的单一口服剂量。在1000和2500mg/kg时,出现毒性和死亡临床征象。

[0344] 使用啮齿类动物插管器,通过强饲法给予每个小鼠赋形剂或内匹司他制剂的单一口服剂量。选择口服途径,是因为它是推荐的临床给药途径。基于给药之前记录的个体体重(体重数据没有列入该报道内),计算剂量体积。给药之前2.5至3.5小时(不是在方案中具体给定的1.5小时),不给小鼠食品和水。这种偏差不影响研究的完整性。

[0345] 给药之前记录临床观察。给药之后60分钟开始,评价每个治疗组中的小鼠(在最多3个组中,大约10分钟的间隔),每次进行临床观察和具体方案行为试验。给药之后,30mg/kg组中的一个小鼠和100mg/kg组中的一个小鼠死亡,并从该研究中将它们除去。使幸存的小鼠安乐死,并在观察/试验周期的最后,将它们从研究中除去。

[0346] 将6个雄性组的小鼠通过强饲法给予0(赋形剂)、30、100或300mg/kg的内匹司他的单一口服剂量。给予试验制剂之后60分钟,开始临床观察和行为试验。在观察期的最后,使所有幸存的小鼠安乐死,并将它们从研究中除去。

[0347] 与赋形剂对照组相比较,在30、100和300mg/kg组中,出现身体温度降低。没有出现治疗相关的临床或肉眼所见行为改变。获得直肠体温数据和观察和行为试验数据。没有出现治疗相关的临床或肉眼所见的行为改变。在100mg/kg组的小鼠之中,出现异常的社交群体(列为其它反应),但在300mg/kg组中没有这种现象;认为这种发现是偶然的。100mg/kg组中的1个小鼠的临床/行为变化包括不活动性、步态和姿势异常、诱导活动性降低、异常消极和柔和/连续发声;这些变化不是内匹司他造成的结果。给药之后,在30和100mg/kg组的每

个组中有一个小鼠死亡;认为该死亡是偶然的,并将该小鼠从研究中除去。

[0348] 实施例21

[0349] 该研究的目的是测定是否DBH抑制剂SKF-102698和内匹司他可引起运动活性或声音惊吓反应性的变化。这些行为变化可以因此反映这些化合物在中枢神经系统中的活性。

[0350] 从Charles Rivers Labs获得成年雄性Sprague Dawley大鼠(在研究的当天250-350g)。将大鼠放置在正常的照明/黑暗循环环境中,在0900Hrs.和2100Hrs之间开灯。将动物成对放置在标准金属笼中,不限量地使用食品和水。

[0351] 运动活性盒子包括Plexiglas®盒子(大小是18"x 18"x 12"高)。围绕Plexiglas®盒子的是Omnitech Digiscan Monitors(model#RXXCM 16),其由光子束的一英寸的ban和每个盒子32个光敏器件组成。通过Omnitech Digiscan分析器(model#DCM-8),分析光子束中断数目。在密封房间中试验动物,同时运行白(white)噪声发生器,以便屏蔽外来噪声。

[0352] 在八个SR-Lab(San Diego Instruments, San Diego, CA)自动化试验站中,进行声音惊恐反应性试验。将大鼠单独放置在Plexiglas®圆筒(10cm直径)中,将圆筒放在通风的减音外壳中。通过固定在动物上方30cm处的扬声器,提供突发噪声(宽音域噪音,上升时间和衰减时间1msec)。压电式加速计按0至4095的标度将目标移动转换为随机(arbitrary)的电压。

[0353] 在给予药物之前,将72个大鼠的每一个放置在惊吓装置中,适应5分钟之后,每20秒给它们提供一次突发噪声,提供15分钟(总计45次惊吓)。通过取得惊吓数目为11至45的平均值(头十次惊吓可以忽略),计算每个大鼠的平均惊吓。然后将这些大鼠中的64个放入八个治疗组的一个中,以使每个组具有类似的平均惊吓值。八个治疗组如下:SKF-102698(100mg/kg)和它的赋形剂(50%水/50%聚乙二醇),可乐定(40μg/kg),内匹司他(3、10、30和100mg/kg)和它们的赋形剂,dH₂O。先前的工作已经表明,这种匹配方法最适合于惊吓,这是由于在大鼠之间的惊吓响应存在显著的可变性,但在大鼠中在一天接一天的时间中具有高度一致性。

[0354] 该试验方法之后的每天,给八个大鼠(源于八个治疗组中的每一个)注射其指定的药物治疗,并立即单独地放置在运动活动盒子中。监控大鼠运动活动4小时。接下来,将大鼠放置在转移笼中15分钟。在该15分钟开始时,使已经指定可乐定治疗的大鼠再接受40μg/kg的注射液。接下来,将大鼠放置在惊吓(startle)装置中,5分钟适应周期之后,每分钟给它们提供90dB突发噪声,提供4小时。

[0355] 为了评价运动活动,测定横向活动(光子束中断的数目)、移动数目和静止时间。单独分析每个参数。在每次间隔(或称为样品),使用分级(ramked)数据(非参数技术)进行双向方差分析(ANOVA),以便测试白天所阻滞的治疗效果。使用Dunnett's t检验,还进行治疗组与赋形剂对照组的逐对比较。

[0356] 为了评价惊吓反应性,每次接连的惊吓之后的立即在200毫秒内,测定每个惊吓大鼠在整个200毫秒内产生的平均力和最大力。计算每次试验(TRIALN)的每次治疗(TREAT)的最大的和平均的电压(MAXMEAN和AVGMEAN),然后将这些值对每次治疗的试验数量进行制图。图附着在报道中。将试验1-60设置为:时间=1,试验61-120设置为:时间=2,试验121-180设置为:时间=3,试验181-240设置为时间=4。计算各个时间之内和每个治疗的平

均的最大的和平均的惊吓反应。然后在统计分析中使用该平均值。使用共方差分析来分析惊吓反应。研究者对时间之内的治疗对比有兴趣,而不是治疗之内的时间效应。因此,按时间来分析惊吓反应。该模型包括大鼠试验当天(日期)、基线惊吓响应和治疗的术语。日期是组块(blocking)因子,基线惊吓响应是协变量。针对每一个上述目的,存在三个独立模型。使用Dunnett's方法,将内匹司他的变化剂量与赋形剂进行比较,以便控制多重比较。

[0357] 当4个内匹司他治疗组与赋形剂治疗对照组进行比较时,在任何3个参数中,在任何检验时间,不存在总体上的和成对的重大差别。

[0358] 当与赋形剂治疗的对照组相比时,在2和2.5小时,可乐定治疗组具有显著更多的横向活动性,在2小时,具有显著更多的移动性,在2小时,静止时间显著地更少(所有的 $p < 0.05$)。注意,在1小时,可乐定治疗组比赋形剂治疗对照组具有显著更多的静止时间($p < 0.05$)。

[0359] 当与赋形剂治疗的对照组相比时,在2.5小时,SKF-102698治疗组具有显著更少的横向活动,在2.5小时,具有显著更少的移动(两个 $p < 0.05$)。注意,在1.5和4小时,SKF-102698治疗组比赋形剂治疗的对照组具有显著更多的移动(两个 $p < 0.05$)。在静止时间方面,在任何检验时间,在SKF-102698和赋形剂之间没有重大差别。

[0360] 通常,在头2个小时,横向活动和移动数量降低,并且最后2个小时,仍然保持很低。类似地,头2个小时的静止时间提高,最后2个小时还保持提高。

[0361] 内匹司他对大鼠的运动活动没有明显的影响。在横向活动、移动数量或静止时间方面,在任何检验时间,用3、10、30或100mg/kg内匹司他治疗的动物与赋形剂治疗的对照组没有显著的不同。

[0362] 在惊吓响应中,在任何时间,针对任何一个响应,内匹司他和赋形剂的,总体治疗效果不是显著的($p > 0.05$)。在时间2,平均惊吓响应的总体治疗效果在一定程度上是显著的($p = 0.0703$),并且Dunnett's试验显示,内匹司他30mg/kg比赋形剂组具有显著更高的平均惊吓响应($p < 0.05$)。在两个响应的的时间3和4,基线平均响应是统计上显著的($p \leq 0.05$),并且在最大惊吓响应的的时间1和2和在平均惊吓响应的的时间2,在一定程度上是显著的($p \leq 0.10$)。

[0363] 在惊吓响应测定的任何时间,SKF-102698(100mg/kg)统计上没有显著地不同于赋形剂。

[0364] 在时间1,可乐定统计上比赋形剂显著地降低最大和平均惊吓响应, ($p < 0.01$),而在时间2,只有平均惊吓是这样($p = 0.0352$)。对于时间2的最大惊吓响应和时间3的平均惊吓响应在,可乐定组一定程度上显著地比水组低。

[0365] 当与赋形剂相比时,在大鼠中,在任何时间,给予3、10、30或100mg/kg内匹司他似乎不会影响最大或平均惊吓响应。对于两个惊吓响应,在所有的时间中,SKF-102698的表现与赋形剂(PEG)类似。在较早的时间期间,可乐定成功地降低了最大和平均惊吓响应,并且在后面的时间期间,其表现与赋形剂类似。

[0366] 实施例22

[0367] 在大鼠中检验内匹司他的长期给药的效果。在第一次给药日子之前的3和13天之间,将大鼠放置在惊吓装置内部,5分钟适应周期之后,给它们提供118dB突发噪声,平均一分钟一次(使用介于30和90秒范围中间的可变试验间隔),提供20分钟。测定惊吓响应,并计

算每个大鼠的最后20次惊吓响应的平均值。将大鼠随机放入八个试验组中的一个之中(内匹司他,5、15或50mg/kg,bid;SKF-102698,50mg/kg,bid;可乐定,20 μ g/kg,bid;d-安非他明,2mg/kg,bid;dH₂O或环糊精(SKF-102698的赋形剂))。通过口服强饲法给予大鼠10ml/kg剂量体积。每天在早上和在晚上对大鼠给药,给予10天。在早晚之间的时间,在6和10时之间给药。先前的工作已经表明,这种匹配方法最适合于声音惊吓反应,这是由于在大鼠之间的惊吓响应存在显著的可变性,但大鼠在一天接一天的时间中具有高度一致性。

[0368] 由于不可能在同一天试验所有96个大鼠(8个试验组,n=12),所以使给药计划交错排列,每天只操作8个大鼠。这12组(每组八个大鼠)中,每组大鼠包括一个来源于八个治疗组的每一个中的大鼠,使得治疗组在整个天数中保持平衡。此外,所有治疗组在八个运动活动舱中可以保持平衡,然而,治疗组不能在惊吓舱中保持平衡。

[0369] 在长期给药期间和之后,施行下列行为试验:身体内部温度,运动活动,声音惊吓反应性和声音惊吓的脉冲前抑制。

[0370] 在密封房间中试验动物,同时运行白噪声发生器。在给药第10天获取身体内部温度读数(在给药第10天,上午内匹司他和SKF-102698的日剂量之后大约3小时35分钟,在每天给予可乐定和d-安非他明之前20分钟)之后,立即进行运动活动试验。运动活动试验进行一小时。在每个试验阶段之前,对每一运动活动舱进行诊断程序,以保证光束和光敏元件恰当地运行。已经证明,运动活动对中枢多巴胺水平的变化敏感(Dietze和Kuschinsky,1994),这使得这种行为试验成为体内DBH抑制剂的效果的潜在敏感性试验。D-安非他明用作该试验的阳性对照。

[0371] 通过将直肠探针插入到每个大鼠结肠的2cm处,获得大鼠身体内部温度。测定三次每个大鼠的身体内部温度,并计算三个读数的平均值。在十天长期给药之前(为了获得基线),在给药的第1、5和10天,在内匹司他和SKF-102698的上午剂量之后三个半小时,和在每天给予可乐定与d-安非他明之前15分钟,立即获得身体内部温度读数。已经证明,身体内部温度对多巴胺和去甲肾上腺素水平敏感,这使得这种行为试验成为体内DBH抑制剂的效果的潜在敏感性试验。可乐定(α_2 激动剂)和d-安非他明(多巴胺释放者)用作该试验的阳性对照。

[0372] 在八个SR-Lab(San Diego Instruments,San Diego,CA)试验站中,测定声音惊吓反应性(通过强烈的突发干扰引起的快速起始的一系列肌肉收缩)和脉冲前抑制(通过分析惊吓反应性(当在非惊吓刺激之前立即进行惊吓刺激时出现)的任何降低来测定感觉运动门控)。将大鼠单独放置在Plexiglas圆筒(10cm直径)中,将圆筒放在通风的减音外壳中。通过固定在动物上方30cm处的扬声器,提供突发噪声(宽音域噪音,上升时间和衰减时间1msec)。此外,在所有的试验阶段,这些扬声器产生68dB水平的背景噪声。附着在有机玻璃圆筒下面的压电式加速计将目标移动转换为电压,然后通过PC电脑(配备SR-Lab软件和接口组合件)将电压进行修正和数字化(在0至4095的规模上)。在八个试验站的每一个中,分贝计用于将扬声器校正至平均值的 $\pm 1\%$ 。另外,SR-Lab校准仪表用于将八个惊吓探测仪表的每一个校正至平均值的 $\pm 2\%$ 。在运动活动试验之后立即同时操作惊吓反应性和脉冲前抑制试验(在给药的第10天,在每天上午注射内匹司他和SKF-102698之后大约4小时40分钟,和在辅助给予可乐定与d-安非他明之后10分钟)。惊吓反应性和脉冲前抑制试验包括:将每个大鼠单独放到SR-Lab试验站中,五分钟适应周期之后,给大鼠提供三个不同类型之

一的突发噪声(惊吓反应测定),平均一分钟一次(使用介于30和90秒范围中间的可变试验间隔),提供一小时(60次总的突发噪声和惊吓反应)。三个不同类型的突发噪声包括:高声的突发噪声(118dB)和相对温和的突发噪声(77dB),在高声的突发噪声之前,提供温和的突发噪声100msec(脉冲前抑制试验)。以拟随机顺序提供这些试验。已经证明,脉冲前抑制对中脑边缘多巴胺水平的变化敏感。此外,也已经证明,声音惊吓反应性对多巴胺和去甲肾上腺素水平变化敏感,这使得这些行为试验成为体内DBH抑制剂的效果的潜在敏感试验。可乐定和d安非他明充当声音惊吓反应性和声音惊吓试验的脉冲前抑制的阳性对照。

[0373] 每天行为试验的计划如下。在 $t=0$ 时,注入DBH抑制剂。在3.5小时,测定内部体温。在3小时35分钟,评价运动活动性。在4小时40分钟,评价惊吓反应性和脉冲前抑制。

[0374] 三个温度读数取自试验的每个时间的每个目标。然后计算这三个读数的平均值。

[0375] 通过计算试验阶段期间目标中断的光子束总数,获得每个大鼠的自发运动性。

[0376] 提供刺激之后,测定目标在每个试验的40msec期间的反应。通过取得每个突发噪声之后立即开始的40个读数(每毫秒一个)的平均值,计算每个惊吓反应。通过测定由118dB突发声音引起的每个目标惊吓的平均响应,计算声音惊吓反应性。脉冲前抑制值计算如下:对于每个大鼠,从118dB单独试验所引起的平均惊吓响应中减去由77dB脉冲-118dB脉冲成对试验(上述脉冲前抑制试验)所引起的平均惊吓响应,然后用该值除以118db单独试验值,即: $[(118\text{dB试验值}-\text{脉冲前抑制试验值}) \div 118\text{db试验值}]$ 。

[0377] 对于治疗在每个时间对每个动物基线变化的主要效果,进行总体单向ANOVA。随后,对研究中的每个比较,进行t检验。

[0378] 对每个动物,每15分钟测定自发运动活动,测定1小时。单独分析每个时间组(每15分钟)。进行Kruskal-Wallis试验(非参数技术),以便测试治疗组之间的差别。如果没有测定总体显著差异,然后进行用于多重比较的Bonferroni's校正。

[0379] 在每个试验(TRIALN)中,对于每个治疗(TREAT)和试验类型(TRIALT),计算平均电压(AVGMEAN)和平均百分比脉冲前抑制(RATIO)。脉冲前抑制值计算如下:对于每个大鼠,从118dB单独试验所引起的平均惊吓响应中减去由77dB脉冲-118dB脉冲成对试验(上述脉冲前抑制试验)所引起的平均惊吓响应,然后用该值除以118db单独试验值,即: $[(118\text{dB试验值}-\text{脉冲前抑制试验值}) \div 118\text{db试验值}]$ 。

[0380] 对于每个治疗和试验类型,将这些值对试验数字制图,这些图附着在报道中。注意图上的y轴变化。试验1-15与时间1对应,试验16-30与时间2对应,试验31-45与时间3对应,试验46-60与时间4对应。还附上了显示每个治疗的平均百分比脉冲前抑制图和随着时间推移的动物的平均惊吓图。

[0381] 使用方差分析来分析平均惊吓响应和百分比脉冲前抑制。该模型包括术语治疗、处于治疗内的动物、时间和治疗与时间的相互作用。对处于治疗内的动物使用误差术语来测试治疗效果。研究总体治疗效果和治疗随时间变化的效果。Fisher的最小显著差方法用于多重比较的调整。如果总体治疗效果或治疗随时间变化的效果不是显著的($p\text{-值} > 0.05$),那么进行Bonferroni校正。如果总体治疗效果不显著,那么校正用于具体逐对比较。进一步的,如果具体成对治疗效果不显著($p\text{-值} > 0.05$),那么在时间范围之内,还将校正应用于治疗效果。如果总体治疗效果和治疗随时间变化的效果不是显著的($p\text{-值} > 0.05$),那么在时间范围之内对独立比较进行Bonferroni校正,并对时间进行平均。

[0382] 对于每个分析的动物,计算从前剂量开始的体重变化。使用重复测定的双向ANOVA来测试治疗、时间和治疗与时间的相互作用的总体效果。然后进行单向ANOVAS,以便试验每天的治疗效果。

[0383] 在长期给药的第一天,阳性对照(d-安非他明和可乐定)显著地提高身体内部温度,但其它化合物在任何时间对身体内部温度没有任何显著的影响。

[0384] 在所有的检验时间中,d-安非他明组比赋形剂对照组具有显著更高的运动活动性。然而,在任何检验时间,可乐定组没有显著地不同于赋形剂对照组。与赋形剂对照组相比,在第一个45分钟(即样本1-3) SKF-102698 (50mg/kg, b. i. d.) 组显著地降低运动活动性,但在45分钟之后不显著。

[0385] 在任何检验时间,内匹司他没有总体显著的治疗效果。逐对比较显示,在任何检验时间,内匹司他治疗组中没有一个显著地不同于赋形剂对照组。此外,在任何检验时间,在两个赋形剂对照组(dH₂O和SKF的赋形剂)之间没有显著差异。

[0386] 治疗组中没有一个在脉冲前抑制中产生任何显著的变化。对于SKF-102698组和环糊精组来说,总体时间效果是统计上显著的($p=0.0001$)。对于环糊精与dH₂O,治疗与时间的相互作用是统计上显著的($p=0.0283$),但其它的则没有。对于研究中的任何比较,治疗效果都不是显著的。然而,与环糊精组相比,SKF组在一定程度上具有更高百分比的脉冲前抑制($p=0.0782$)。

[0387] 在时间1和2期间,与赋形剂对照组相比,可乐定组刚好具有显著更高百分比的脉冲前抑制,但在时间3和4期间,其不是显著地不同于赋形剂。在任何时间,d-安非他明和SKF-102698都不是显著地不同于它们自己的赋形剂。在任何时间,内匹司他剂量组中没有一个显著地不同于dH₂O。

[0388] 只有SKF-102698治疗组引起了声音惊吓反应性的显著变化。对于研究中的所有比较,总体时间效果是统计上显著的(所有的 $p=0.0001$)。将安非他明与dH₂O、可乐定与dH₂O和环糊精与dH₂O比较,治疗与时间的相互作用是统计上显著的(所有的 $p<0.05$),但其它的则没有。SKF-102698 (50mg/kg, b. i. d.) 相对于环糊精($p=0.0007$)和内匹司他 (50mg/kg, b. i. d.) 相对于SKF-102698 (50mg/kg, b. i. d.) ($p=0.0047$) 治疗效果是显著的,但其它的则没有。与环糊精相比,SKF-102698 (50mg/kg, b. i. d.) 组显著地降低了惊吓响应,并且与内匹司他 (50mg/kg, b. i. d.) 组相比较,也显著地降低了惊吓响应。

[0389] 在所有时间,与环糊精组相比,SKF-102698 (50mg/kg b. i. d.) 组显著地降低了惊吓响应。在时间1和3期间,与SKF-102698 (50mg/kg, b. i. d.) 组相比,内匹司他 (50mg/kg, b. i. d.) 组显著地提高了惊吓响应。没有测定出其它重大差别。

[0390] 在各组之间,在前剂量基线处,没有体重方面的总体或成对的重大差别。

[0391] 与赋形剂对照组相比,d-安非他明组从前剂量开始体重方面具有显著更小的变化($p<0.01$)。当每天分析时,在治疗的第4-10天,与安非他明组相比,赋形剂对照组显著更大地增加了体重(从前剂量开始)。然而,在任何检验时间,可乐定组没有显著地不同于赋形剂对照组。与赋形剂对照物(SKf-赋形剂)相比,从前剂量基线开始,SKF-102698 (50mg/kg, b. i. d.) 组显示了体重显著较小的增加($p<0.01$)。当每天分析时,在治疗的第2-10天(第3和6天除外),与SKF-102698组相比,SKF-赋形剂对照物从前剂量开始显著更大地增加了体重。重要的是,在任何一天,在SKF-赋形剂和赋形剂对照组之间,体重变化没有差别。

[0392] 在任何检验时间,任何剂量的内匹司他对体重没有总体显著的治疗效果。逐对比较显示,在任何检验时间,内匹司他治疗组中没有有一个显著地不同于赋形剂对照组。有趣的是,在体重变化方面,在SKF-102698 (50mg/kg, b.i.d.) 组和内匹司他 (50mg/kg, b.i.d.) 组之间存在显著的 ($p < 0.05$) 总体差别。当每天分析时,在第7-9天,与内匹司他 (50mg/kg, b.i.d.) 组相比,SKF-102698 (50mg/kg, b.i.d.) 组显著地降低了体重。

[0393] 实施例23

[0394] 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶 (MPTP) 购买于RBI, Inc, (Natick, MA)。为了给药,将MPTP以2mg/ml的浓度(游离碱)悬浮在水中,并且以等于每个动物重量(kg)的体积进行皮下注射。例如,950克动物接受0.95ml MPTP (2mg/ml) 的注射液,导致最终每次注射2.0mg/kg。

[0395] 使猴子保持在13h/11h照明-黑暗循环中,可以不限量地得到食品和水。在该研究中使用的所有方法按照NIH的指导,并且由Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) 批准。将动物单独放置,在开始行为研究之前,使动物适应群体最少一个月。

[0396] 六个松鼠猴(三个非病变的,三个病变的)(提前3个月接受2mg/kg MPTP)用于研究内匹司他的最佳给药途径。检验三个不同的途径,包括:(i) 嵌入式治疗,(ii) 口腔注射和(ii) 经口喂食。在3个非病变猴子中,试验嵌入到蜀葵糖中的内匹司他溶液(5mg/ml),证明是差的给药途径,这是因为,可能由于不利的味觉而使动物不愿吞下。将内匹司他注射液(0.5、2和5mg/kg)口腔注射到三个非病变和三个病变猴子的嘴中,也是不可接受的途径,这是由于在最高药物浓度时动物倾向于吐出溶液。在最高剂量(5mg/kg)下,在3个MPTP-病变猴子中进行经口喂食给药,并且较好地接受了给药。

[0397] 六个松鼠猴(三个非病变的,三个病变的)(提前3个月接受2mg/kg MPTP)用于研究内匹司他的安全和耐受性。使动物接受0.5、2.0或5.0mg/kg浓度的内匹司他,每天两次(10am和2pm),接受5天,在不同的剂量水平之间有两天的廓清。通过口腔注射器给予内匹司他(0.5、2.0和50mg/kg剂量),当经口喂食时,剂量是5.0mg/kg。在两个较低剂量时,药物具有较好的耐受性。在给药的最后两天,接受5.0mg/kg的一个非病变猴子出现淡米色稀粪,停止服药一天,这种现象消除。

[0398] 在Parkinsonian模型中使用24个松鼠猴(14个雌性,10个雄性)。将二十四动物随机分配给四个治疗组中的一个,每组6个动物。各组包括下列:A组(6个动物),接受安慰剂(水)治疗;B组(5个动物),接受药物内匹司他,1mg/kg/天(0.5mg/kg,每天两次);C组(6个动物),接受4mg/kg/天(2mg/kg,每天两次);和D组(6个动物),接受10mg/kg/天(5mg/kg,每天两次)。在B组中,一个动物在MPTP-引起机能障碍之后急性死亡,不用替换。

[0399] 在病变之前,使用红外活动监控(IRAM)笼,对动物进行自发运动活动的定量评价。所有记录阶段是60分钟,在2周期间内进行10个阶段。使用似帕金森氏病的临床评级量表(CRS),由1至3个临床评估者来评价动物的行为,每天一次(中午12点至1pm),评价3至5个连续日。正常动物一般在CRS上分数不会大于3。活动监控(IRAM)和临床评级评价建立了每个动物的平均基线活动。

[0400] 通过给予2.0mg/kg浓度的MPTP(游离碱)(通过皮下注射),使动物产生病变,达到帕金森氏病的状态。最后MPTP-病变之后2至4周,进行MPTP病变后的行为评价。在60分钟阶

段通过IRAM监控运动活动,监控3至5天。在3至5天期间内,通过一个至三个独立评级,评价临床行为(CAS)。

[0401] 在某些情况下,动物需要额外剂量的MPTP (2mg/kg),以便获得足够程度的、显示帕金森氏病症状的病变(定义为:平均总临床评级分数大于3)。在开始效果研究的三周之内,所有动物接受最后的MPTP后行为评价(IRAM和CRS)。这种最后的MPTP后评价用于建立基线临床帕金森氏病的状态,并且用作统计分析的预处理值。

[0402] 测试动物对L-Dopa的响应和药物内匹司他的效果。最后MPTP剂量之后,进行4至12周试验。通过经口喂食来给予L-Dopa (浓度2.5、5或7.5mg/kg),每天两次(在10am和2pm),给予7个连续日。通过IRAM和CRS测定行为。在最后4天的治疗中,10am早晨剂量之后,进行60至90分钟的临床评级。评估者(一个至三个人)对于不同的治疗组是不知情的。在最后2至5天的药物治疗中,在2pm给予药物之后,立即进行90分钟IRAM评价。在每个治疗剂量之间,有最少2天的廓清周期。

[0403] 在给予L-Dopa之后,经过最少2天廓清之后,给予12天的内匹司他或水(作为安慰剂)。在10am和2pm,通过经口喂食,每天给予药物两次。通过IRAM和CRS评定行为。在药物治疗的最后5天,10am内匹司他的剂量之后60至90分钟,在早上进行CRS。评估者(一个至三个人)对于不同的治疗组是不知情的。在最后5天的药物治疗中,在2pm给予药物之后,立即进行90分钟IRAM评价。

[0404] 为了统计分析,监控运动活动和临床评级分数。对于每个动物,在MPTP病变前和后,计算平均运动活动。通过将10个1小时监控阶段进行平均,测定MPTP病变前的基线。在开始效果研究的三周之内,获得MPTP后(预先治疗)的行为评价。通过将3至5个1小时监控阶段进行平均,测定MPTP病变后的运动活动(IRAMS)。活动监控以“移动/10分钟”来报道。分数高被认为是更快的动物。对于动物的每个组(A组至D组),Wilcoxon符号等级检验用于比较MPTP病变前和后的活动。

[0405] 每次药物水平之后,每10分钟监控IRAM运动活动,至少监控90分钟。认为评级更高是更快的动物(较少帕金森氏病)。

[0406] 统计分析包括:描述统计,和将安慰剂与1、4和10mg/kg实验性药物的每10分钟数据块的平均值制成曲线。然后检验曲线,以测定任何趋势。由于从图解分析测定不出有差别,所有不进行进一步的统计分析。

[0407] 由于不充分的IRAM数据收集,不进行比较MPTP病变后(预先治疗)与2.5、5.0和7.5mg/kg L-Dopa和内匹司他(1、4、10mg/kg/天或安慰剂)的统计分析。相对于内匹司他(90分钟),在MPTP后只收集60分钟阶段。

[0408] 在临床评级分数测定中,MPTP病变前的动物在CRS上的分数不大于3。通过将1至3个独立评估者的总计CRS进行平均(用3至5个连续日的数据),在效果研究开始的三周内,测定MPTP后的临床评级分数。

[0409] 在每个动物中,评定八个帕金森氏病特征,并且总分来源于这八个特征的和。对于每个动物,通过将所有评估者(一个至三个)在连续多重给药(相同剂量)天中进行的临床评级分数进行平均,提供每个药物剂量的单一临床评级分数。这种平均CRS用于统计分析。分数低认为是无帕金森氏病行为状态。

[0410] 统计分析包括:(1)在安慰剂与1、4和10mg/kg/天内匹司他的平均CRS之间进行比

较(使用Kruskal-Wallis(非参数方差分析))。使用每个实验药物浓度(通过对每个动物的最终MPTP后评级进行校正)的平均CRS,重复这种比较。校正的临床记录是每个浓度的实验药物的临床记录作为MPTP后临床记录的比值。(2)使用Friedman's分析(非参数的方差分析,重复测定),在MPTP病变后(预先治疗)与2.5、5.0和7.5mg/kg L-Dopa和安慰剂治疗之间进行逐对比较。在1、4和10mg/kg的浓度下,对内匹司他进行相同的分析。必要时,进行Dunnett's事后分析(对于非参数的数据)。

[0411] 在每个松鼠猴中,IRAM(活动监控)和CRS(临床评级量表)用于评价MPTP病变的程度。

[0412] 在病变前和病变后IRAM组之间没有显著差异,这是由于A组:安慰剂治疗,每个动物每10分钟移动的高度可变性。Wilcoxon符号秩次(rank)检验: $W=19, N=6, P<0.06$,接受零假设。A组的平均CRS是8.9,范围4.8至15.4。MPTP病变之后,所有的动物显示了临床评级分数的显著提高。正常动物(非病变)一般具有小于3的分数。

[0413] 在病变前和病变后IRAM组之间没有显著差异,这是由于B组(1mg/kg/天治疗组)的每个动物每10分钟移动的高度可变性。Wilcoxon符号秩次检验: $W=9, N=5, P<0.06$,接受零假设临床评级分数(CRS)。B组的平均CRS是10.32,范围4.3至16.1。MPTP病变之后,所有的动物显示了临床评级分数的显著提高。正常动物(非病变)一般具有小于3的分数。

[0414] 在病变前和病变后IRAM组之间没有显著差异,这是由于C组(4mg/kg/天治疗组)的每个动物每10分钟移动的高度可变性。Wilcoxon符号秩次检验: $W=17, N=6, P>0.06$,接受零假设。C组的平均CRS是8.97,范围6.5至17.3。MPTP病变之后,所有的动物显示了临床评级分数的显著提高。正常动物(非病变)一般具有小于3的分数。

[0415] 在病变前和病变后IRAM组之间没有显著差异,这是由于D组(10mg/kg/天治疗组)的每个动物每10分钟移动的高度可变性。Wilcoxon符号秩次检验: $W=21, N=6, P>0.06$,接受零假设。MPTP病变之后,所有的动物显示了临床评级分数的显著提高。C组的平均CRS是8.02,范围4.0至156。正常动物(非病变)一般具有小于3的分数。

[0416] 由于每个动物的RAM结果的高度可变性,在通过IRAM测定的运动活动方面(在各组内,在基线(MPTP病变前)和MPTP病变后之间测定),总体没有显著差异。CRS结果显示了在MPTP前和MPTP病变后状态之间的差别。MPTP病变前的动物分数不大于CRS中的3。MPTP病变后的动物所有的分数都大于3。所有的组(A至D组)具有8至10的平均CRS,出于(out of)总的可能的CRS分数是24。

[0417] 在MPTP病变的松鼠猴中,在安慰剂治疗和三个不同浓度的内匹司他(1、4、10mg/kg/天)之间,没有可测的差异。4和10mg/kg/天内匹司他与安慰剂显示了MPTP后(预先治疗)状态的显著改善。当与MPTP后(预先治疗)相比时,除7.5mg/kg剂量的C组和5mg/kg/剂量的B组之外,对于5mg/kg和7.6mg/kg L-Dopa,所有的动物组都显示了显著的改善。当与MPTP后相比时,在2.5mg/kg L-Dopa的条件下,没有动物组表明显著的改善。

[0418] 在给药后的时点10至90分钟,进行治疗组和L-DOPA、Friedman试验结果、描述统计学和Dunnett's试验事后分析的比较,并且在安慰剂治疗的活动监控与所有其它内匹司他浓度的活动监控之间进行比较。对于每个药物剂量水平,绘出10分钟间隔的图。当与安慰剂相比时,在4和10mg/kg/天剂量水平下,没有药物(内匹司他)治疗的差别。在1mg/kg/天条件下,与安慰剂治疗相比,动物活动的更缓慢。在PD的MPTP病变的非人灵长类模型中,基于4个

不同治疗组(1、4和10mg/kg内匹司他和安慰剂)的非成对比较分析,与安慰剂(水治疗)相比,内匹司他对帕金森氏病症状没有产生显著的效果。基于动物(治疗前和后检验的相同组的动物)的成对比较分析,与MPTP病变后(预先治疗评价)相比,4和10mg/kg/天浓度的内匹司他对帕金森氏病症状显示了显著的效果。安慰剂具有不明确的显著效果。使用相同的逐对比较,在所有组中(除B组(5mg/kg L-Dopa没有效果)和C组(7.5mg/kg L-Dopa没有效果)动物之外),当与MPTP病变后状态相比时,5和7.5mg/kg L-Dopa显示了显著的效果。然而,2.5mg/kg L-Dopa没有显示显著的效果。

[0419] 在松鼠猴中进行药物动力学研究,以便测定内匹司他的血浆浓度。这种研究与安全和耐受性研究同时进行。使用三个MPTP病变的松鼠猴(#353、358和374)。收集一毫升血液(从每个动物的股静脉中取出),用于分析。以1、4和10mg/kg的浓度给予内匹司他,给予5天,在每个药物浓度之间有2天廓清时间。在建立基线的第一个剂量之前1小时,和在每一不同药物水平的第一个药物剂量之后6小时,收集血液,用于分析。

[0420] 进行第二个药物动力学研究,以测定内匹司他的稳态血浆水平。该研究与效果研究相伴进行,在研究中,用三个不同药物浓度中的每一个浓度来试验动物,试验12天。在第1天的第一个剂量之后6小时,然后在第7天的第一个剂量之后6小时,最后在第12天的第一个剂量之后6小时,从股静脉中取出一毫升血液。在药物给予之前的一周,测定所收集样品的基线血浆水平。

[0421] 该研究也表明,当使用少量动物时,与非成对的研究设计相比,成对分析(通过比较治疗前和后的相同动物,降低动物与动物之间的可变性)最适合用于测定显著的药效。

[0422] 实施例24

[0423] 使雄性自发性高血压大鼠(280-345g;Charles River Labs,Kingston,NY)禁食过夜,然后用醚麻醉。用PE50管插入股动脉和股静脉,分别用于记录血压和给予化合物。然后将动物放入MAYO限制器中,并将它们的足宽松地绑在限制器上。在整个实验中,肝素化盐水(50单位肝素钠/ml)用于保持每个管不闭合。使用Modular Instruments MI² BioReport™软件(安装在IBM个人电脑上)连续记录下列参数:平均动脉压(MAP),心率(HR)和实验中具体时点的每个参数的基线变化。

[0424] 在使用当天,将所有的化合物溶解。将内匹司他溶于去离子水(赋形剂)中,得到1mg/ml的游离碱浓度。内匹司他或赋形剂的口服剂量体积是10ml/kg。将SCH-23390溶于盐水(赋形剂)中,得到0.2mg/ml的游离碱浓度。静脉内给予内匹司他或盐水,浓注形式,体积1.0ml/kg,而后直接给予0.2ml等渗盐水。

[0425] 手术准备之后,使每个动物恢复最少一个小时时间。将动物随机分配给四个治疗组:赋形剂(iv)/赋形剂(po);赋形剂(iv)/内匹司他(po);SCH-23390(iv)/赋形剂(po);或SCH-23390(iv)/内匹司他(po)。一旦动物稳定(最少一个小时),通过将15分钟时段的每个参数进行平均,测定基线血压和心率。一旦确定基线血压和心率,静脉内给予动物SCH-23390(200μg/kg)或赋形剂(盐水,1ml/kg)。15分钟以后,口服给予动物内匹司他(10mg/kg)或赋形剂(去离子水,10ml/kg)。

[0426] 在静脉内给药之前15分钟,测定所记录的参数,以便建立基线血压和心率。然后在静脉内给予SCH-23390或赋形剂之后5、10和15分钟,测定所记录的参数。在口服内匹司他或赋形剂之后,在15、30、60、90、120、150、180、210和240分钟测定所记录的参数。

[0427] 在实验的最后,用氟烷使每个动物麻醉,并通过断头使其安乐死。解剖出皮层、左心室(尖)和肠系膜动脉,称重,并放在0.4M高氯酸中。然后将组织在液氮中冷冻,并在-70℃保存。在以后的时期,对这些组织进行生化分析,测定儿茶酚胺水平,包括多巴胺和去甲肾上腺素水平。单独分析血压和心率。通过方差分析(ANOVA),分析血压和心率的基线变化,同时分析治疗效果、时间和它们的相互作用。在iv时间周期后和口服时间周期后,进行这种分析。通过ANOVA在每个时间对时间的主要效果进行进一步分析。当总体治疗效果不显著时,利用Fisher's LSD策略(具有Bonferroni校正),每个ANOVA之后,进行逐对比较。

[0428] 通过对治疗主要效果的ANOVA,进行补充分析,以比较每个治疗组的基线平均值,随后进行逐对比较。进行下列比较: SCH-23390 (iv) / 赋形剂 (po) 与 赋形剂 (iv) / 赋形剂 (po), 赋形剂 (iv) / 内匹司他 (po) 与 赋形剂 (iv) / 赋形剂 (po), 和 SCH-23390 (iv) / 内匹司他 (po) 与 赋形剂 (iv) / 内匹司他 (po)。

[0429] 在治疗组之间,基线心率或平均动脉压没有重大差别。

[0430] 在口服后期间,在120分钟和240分钟,与赋形剂对照物相比,用SCH-23390进行静脉内治疗可导致心率显著的降低 ($p < 0.05$)。内匹司他不会使心率降低与赋形剂治疗动物中所观察的心率降低一样多。在给药后150和180分钟,这是统计上显著的 ($p < 0.05$)。应该注意,随着该实验时间的推移,会观察到心率变化很大。

[0431] 与接受赋形剂的动物相比,在iv周期后15分钟期间,静脉内给予SCH-23390仍然会造成平均动脉压少量 ($5 \pm 1 \text{ mmHg}$) 显著的降低 ($p < 0.05$)。给药后30分钟,用内匹司他口服治疗会导致平均动脉压显著降低 ($p < 0.05$),这在实验期间会继续保持。用SCH-23390预先治疗不会显著地减弱抗高血压效果,可通过单独给予内匹司他观察到这种效果。

[0432] 实施例25

[0433] 使用15周大的雄性Cr1:COBS (WI) BR大鼠。给24个大鼠长期植入遥测植入物 (TA11PA-C40, Data Sciences, Inc., St. Paul, MN), 用于测定动脉血压、心率和运动活动。用戊巴比妥钠 (60mg/kg, ip) 使大鼠麻醉,并修剪它的腹部。在无菌条件下,在中线上切口。露出腹主动脉,插入遥测发射装置的导管。将发射器连接到腹部肌肉组织上之后,将皮肤缝合。使每个大鼠恢复至少2周,而后进行药物给予。在实验开始之前三天,将大鼠随机分为4个治疗组: 赋形剂 (p.o.), 胍苯哒嗪 (10mg/kg, p.o.), 内匹司他 (30mg/kg, p.o.), 内匹司他 (100mg/kg, p.o.)。

[0434] 监控收缩压 (SBP)、舒张压 (DBP)、平均血压 (MBP)、心率 (HR) 和运动活动 (MA)。在含有痕量Tween 80的水中制备内匹司他和胍苯哒嗪。口服给予大鼠10ml/kg的所有剂量,并且用游离碱同等物来表示。

[0435] 计算机化数据收集系统用于连续地收集SBP、DBP、MBP、HR和MA的数据。每5分钟收集关于每个大鼠的数据,每次10sec。然后每小时将这些数据平均,并且计算标准平均误差 (SEM)。所有的值用平均值 $\pm$ SEM来表示。统计显著性定义为P水平小于0.05。单独分析关于MBP、HR和MA的数据。在每天测定的26个时点来进行每个分析。对治疗主要效果和时间与它们的相互作用使用双向ANOVA。如果测定总体治疗效果或显著的相互作用,在每个时点进行一系列单向ANOVA。使用Dunn's方法,在每个时点进行逐对比较。如果没有检测到总体治疗效果,那么可使用Bonferroni校正通过调整临界值来进行与对照物的成对差别的分析。

[0436] 建立这些参数的给药前的值之后,相应的大鼠组每天接受赋形剂、内匹司他或胍

苯吡嗪的治疗,接受7天。

[0437] 口服内匹司他 (30mg/kg) (下文表示的所有剂量是po剂量) 倾向于慢慢地降低血压,但在第1天不会引起稳定的降血压效果。随着效果的进展,在第2天,在13小时,观察到-10mmHg的峰值降血压效果。在整个研究中,引起类似程度的抗高血压效果。在100mg/kg时,在第1天给药之后22小时,化合物引起-11mmHg的峰值抗高血压响应 ($p < 0.01$)。MBP继续降低,在第3天达到其大约-17mmHg的最低点 ($p < 0.01$)。在整个研究中,MBP保持降低。

[0438] 10mg/kg肼苯吡嗪导致快速的降血压效果,这种效果在10小时减弱,并且在第1天给药之后的1小时之内,观察到MBP最大降低-24mmHg ($p < 0.01$)。在整个研究中,观察到类似的暂时性降血压效果。

[0439] 在第1天,30和100mg/kg内匹司他不会连续地影响HR。然而,在第2天,给药之后3小时,100mg/kg内匹司他导致-100b/mm的减慢心率响应。在第3-7天,观察到有意义的但不太明显的减慢心率的响应。在比较过程中,在整个研究中,10mg/kg肼苯吡嗪引起不同程度的心动过速。

[0440] 在整个研究中,药物治疗中没有一个显示对MA的一致效果。

[0441] 每天记录体重。对于体重,相对于给药前的变化的双向ANOVA用于分析治疗总体效果、天和治疗与天数的相互作用。然后每天进行单向ANOVA,并且使用Dunn's方法和Fisher's LSD策略,进行药物治疗组与赋形剂对照物的逐对比较,以便校正多重比较。与赋形剂治疗相比,药物治疗中没有一个对体重具有任何效果 ($p < 0.05$)。虽然用100mg/kg内匹司他治疗在第3天引起体重降低,但它不是统计上显著的。

[0442] 实施例26

[0443] 内匹司他可以降低多巴胺转化为去甲肾上腺素。内匹司他活性的基础试验可以测定血浆或尿多巴胺的水平或多巴胺与去甲肾上腺素的比例。内匹司他治疗可以提高多巴胺的血浆或尿水平或提高血浆或尿中的多巴胺/去甲肾上腺素比例。

[0444] 图5中显示了在用内匹司他治疗24小时之后的正常志愿者中的尿多巴胺水平。

[0445] 使用重复测定方差分析模型,当与接受安慰剂的那些受试者相比时,在接受200mg内匹司他的受试者中测定到了平均仰卧位 (supine) 血浆多巴胺/去甲肾上腺素比例的显著提高 ($p < 0.05$)。给予40mg和200mg内匹司他10天之后,尿多巴胺水平提高。

[0446] 实施例27

[0447] 在慢性心力衰竭 (CHF) 患者中,给予10天40、80和120mg内匹司他的日剂量通常具有较好的耐受性。造成显著不利状况的频率提高的剂量是160mg。

[0448] 在用160mg治疗8天或更长时间的8个患者中,其中四个形成皮疹。皮疹患者中的两个伴有瘙痒。一个患者还具有呼吸急促现象,同时出现皮疹。

[0449] 用80mg剂量治疗的一个患者退出该研究,因为出现了立位性低血压的症状。相伴的药物包括肼苯吡嗪和三种利尿剂。在使用所有剂量的患者中 (包括安慰剂),偶尔报道有立位性低血压的情况。在接受160mg的8个患者中,其中6个出现立位性低血压症状。

[0450] 在正在进行的研究中,在具有CHF的患者中,已有2个死亡:一个是由于CHF恶化而死亡 (患者接受80mg, qd), 接受安慰剂的一个患者猝死。

[0451] 所报道的可能与药物有关的一个严重不利状况是肌酐水平提高,这需要住院治疗。不认为与研究药物有关的医学重要状况包括:在2个患者中出现CHF恶化 (其中一个随后

出现急性MI和心动停止),在1个患者中出现不稳定的心绞痛,在1个患者中出现非典型性的胸痛,在1个具有乳腺癌历史的患者中出现肾肿块。

[0452] 在充血性心力衰竭患者的研究中,测定了用内匹司他治疗10天之后的血浆多巴胺水平、去甲肾上腺素水平和多巴胺/去甲肾上腺素比例的变化。在10天研究中,内匹司他治疗提高了多巴胺/去甲肾上腺素水平。

[0453] 在充血性心力衰竭患者的研究中,测定了用内匹司他治疗30天之后的血浆多巴胺水平、去甲肾上腺素水平和多巴胺/去甲肾上腺素比例和该水平和比例的变化。在30天研究中,内匹司他治疗提高了多巴胺/去甲肾上腺素水平。

[0454] 实施例28

[0455] 测定了用内匹司他治疗的啮齿类的脑中的多巴胺/去甲肾上腺素比例。在用内匹司他或双硫仑治疗的啮齿类的脑中,多巴胺/去甲肾上腺素比例提高。

[0456] 对相关领域普通技术人员显而易见的是,对本文所描述方法和应用的其它合适的改进和修改是合适的,并且可以在不背离本发明或其任何实施方案的范围的条件下进行。尽管与某些实施方案结合描述了本发明,但在下列权利要求所定义的本发明的精神和范围之内,可以包括替换方案、改进和等效内容。

[0457] 实施例29

[0458] 在大鼠中,延迟位置匹配 (DMTP) 试验用于检验药物对短期或工作记忆的潜在效果。

[0459] 在延迟位置匹配研究中,在开始试验内匹司他之前,进行试验性研究,目的是评价紧急和重复给予最高推荐剂量的内匹司他 (100mg/kg, p.o.) 的行为/生理效应,和确定重复给予的毒扁豆碱的最大耐受口服剂量。

[0460] 在试验性研究中,急性给予雄性Sprague Dawley大鼠 (n=8) 内匹司他 (30和100mg/kg, p.o.) 或赋形剂,大鼠在训练动物的相同重量范围之内 (400-480g)。在给予药物或赋形剂之后1、3和24小时,由对每个动物的治疗状态不知情的观测者来观察动物。类似地,在单独的研究中,急性给予8个大鼠的组毒扁豆碱 (1、3、10或30mg/kg, p.o.) 或赋形剂。在给予药物或赋形剂之后1、3和24小时进行观察。

[0461] 在重复给药的试验性研究中,给予8个大鼠的组内匹司他 (100mg/kg, p.o.) 或赋形剂,每日两次 (06:00和18:00h), 给予10天 (在第11天给予一次)。在整个研究中,监控动物的重量,在第5天,由“不知情的”独立观测者来观察动物,以便评价重复给药之后的明显的行为/生理效应。在单独的研究中,使用相同的给药计划,使8个大鼠的组接受赋形剂或毒扁豆碱 (0.3、1、3或10mg/kg, p.o.)。在整个研究中,监控动物的重量。

[0462] 内匹司他 (30或100mg/kg, p.o., 急性) 不会引起任何明显的行为生理变化。类似地,重复给予100mg/kg (p.o.) 剂量的内匹司他没有明显的效果。然而,在后面的研究中,11天之后,药物治疗的动物显示了平均28g的体重损失,而对照物具有平均1g的体重增加。当在11天研究期间操作时,药物治疗的动物还变得比对照物治疗的动物更急躁。

[0463] 急性给予毒扁豆碱 (3mg/kg或更高) 引起明显的行为效果 (嘴进行咀嚼和流涎)。在30mg/kg (p.o.) 剂量下,观察到毒性迹象 (青紫,震颤,头痉挛,运动失调)。重复给予3和10mg/kg (p.o.) 毒扁豆碱出现毒性 (在10mg/kg组,发现8个动物中的3个在第2天死亡,在3mg/kg组,8个动物中的2个在第5天出现痉挛)。重复给予0.3或1mg/kg毒扁豆碱没有效果。

[0464] 作为这些研究的结果,DMTP研究的最高内匹司他剂量减少到30mg/kg (p.o.),并且选择1mg/kg (p.o.)的毒扁豆碱剂量用于重复给予。

[0465] 在目前的DMTP研究中,在整个日程化的0、8、16或32秒的延迟中,训练大鼠记住杠杆的位置,以便获得食品奖赏。训练之后,在DMTP任务中试验的10个连续天中,检验重复给予内匹司他(1、3、10和30mg/kg, p.o., b.i.d.)或毒扁豆碱(1.0mg/kg, p.o., b.i.d.)的效果。在实验的第11天,一起给予用内匹司他和毒扁豆碱治疗的动物东莨菪碱Hbr (0.1mg/kg, s.c, 30mm预处理时间)。基于试验性DMTP研究中的数据,选择东莨菪碱的剂量,在试验性DMTP研究中,发现0.1mg/kg东莨菪碱导致选择准确性的显著损害。除了用内匹司他或毒扁豆碱治疗的动物之外,用东莨菪碱治疗先前用赋形剂治疗的一组动物。在整个实验中,另一个组的大鼠只接受赋形剂治疗。最终东莨菪碱试验的目的是:确定长期给予内匹司他或毒扁豆碱是否会逆转东莨菪碱导致的DMTP任务中的选择准确性的损害。

[0466] 在目前研究中,依赖性测定包括:正确选择的百分比,产生选择反应的等待时间,和动物能够在70分钟试验阶段期间能够完成的试验数目。前者测定的变化可以表明记忆和/或注意功能的变化,而后两个测定的变化可以表明药物的其它非认知效果的变化。

[0467] 使用56个雄性Sprague Dawley大鼠,在训练开始时,重量在200-290g之间。将它们放在每笼四个的组中,并且每个大鼠每天饲喂大约12-15g食品。这种数量的食品可以使大鼠保持大约85%的其自由摄食的重量。对开始低于这种重量的任何动物给予额外食品。可自由地得到水。将动物保持在12:12小时照明/黑暗循环条件下,光照期从6a.m开始。

[0468] 12个Campden Instruments工作舱(具有两个可取消的杠杆和在中心放置的食品料斗)用于行为试验。一个挡板(大鼠可以使其可以向后倒退,以便能够使它获得食品球粒)设置在食品料斗前面。修改盒子,使得在食品料斗的两边可以安装隔板。隔板是透明的有机玻璃,从舱的格形地面达到舱的天花板,并且延长105mm到达中心区。将工作盒容纳在声响和照明衰减的壳中。Paul Fray Control System Interlaces和用Arachnid软件程序化的Acorn A5000计算机用于控制工作设备。

[0469] 整个阶段照亮房间,开始训练大鼠从料斗挡板后面取回Noyes 45mg Formula 'A'食品球粒。然后训练大鼠挤压左右杠杆,以便获得食品奖赏。在30mm阶段期间,随机提供左或右侧杠杆。对所插入杠杆的反应导致杠杆缩回、食品球粒的输送和料斗灯的照明。保持料斗灯打开,直到球粒取回为止。

[0470] 接下来开始位置匹配训练。这种训练和所有随后的训练用放进工作盒子的隔板进行。该阶段最初是50分钟长的时间。将大鼠放在工作盒子中,当房间灯照射时,开始该阶段。在30s试验间隔(ITI)之后,将两个杠杆中的一个(样品杠杆)插入舱中。使杠杆保持插入舱中,直到出现杠杆挤压反应为止。对杠杆的反应导致杠杆缩回和料斗灯的照明(但没有球粒输送)。一旦料斗挡板被挤压,料斗灯熄灭,插入两个杠杆。对样品杠杆的反应(即,与先前所提供杠杆相同的杠杆)导致两个杠杆缩回、食品球粒的输送和料斗灯的照明。保持料斗灯打开,直到挡板被挤压为止。对不恰当杠杆(与所提供样品杠杆相对的杠杆)不会得到食品球粒,开始10s暂停(TO)周期,在此期间,房间灯熄灭。在开始新试验之前,开始30s ITI。作为样品杠杆插入的杠杆是半随机确定的,这样就可以在16个试验的单元中,右和左侧杠杆有8次是作为样品杠杆提供的。

[0471] 在这个训练和所有随后的训练中,使用校正方法。对于非校正性试验(即,该阶段

的第一个试验和正确选择出现的试验之后立即进行的试验),作为样品杠杆插入的杠杆(左或右侧杠杆)是由计算机随机确定的。每次出现不恰当反应时,在随后的‘校正’试验中,未选择的杠杆(即‘正确’杠杆)作为样品提供。这些校正试验防止了位置习惯(即,始终对左或右侧杠杆响应,并达到50%正确率)。记录校正试验的数目,但只有在非校正试验中收集的数据用于评价正确选择的百分比。

[0472] 在24个阶段之后,以高度的精确性使动物进行位置匹配工作。在阶段25,在选择试验中,在样品杠杆的减少和杠杆的提供之间插入可变的延迟间隔。对样品杠杆响应之后,在0s(立即)、4、8或16s延迟之后,随着第一次挡板挤压的出现,插入选择杠杆。四个类型试验(0、4、8或16s延迟)的顺序是半随机确定的,限制条件是:在16个试验单元中,每个延迟出现4次;两次针对左杠杆试验,两次针对右杠杆试验。使用有限制的控制(hold),这样的话,如果大鼠在计划延迟周期末尾的30s之内不产生选择反应,就可以终止试验,并开始试验间隔。这种试验视为不完全试验,并且不会有助于数据分析。在ITI结束之后,恢复相同的试验。从阶段25开始,忽略不恰当选择之后的超时期间,并且阶段长度增至70分钟。

[0473] 在具有0-16s延迟的26个阶段(阶段25-50)之后,试验间隔减少到10s,在接下来的8个阶段(阶段51-58),使用最多64s的延迟。然而,由于64s延迟时的表现很差,在更进一步阶段中不使用这种延迟。在阶段59,使用0、8、16和32s的延迟。在所有随后的阶段,使用这些延迟。在阶段59期间,56个大鼠中只有51个大鼠完成了24个以上的试验(校正加上非校正)。选择这些大鼠,并且半随机地分配给下列7个组,以使这些组在表现(百分比正确,反应潜伏期和完成的试验数目)方面匹配:赋形剂/赋形剂(n=7),赋形剂/东莨菪碱(n=),内匹司他1.0mg/kg/东莨菪碱(n=7),内匹司他3.0mg/kg/东莨菪碱(n=7),内匹司他10.0mg/kg/东莨菪碱(n=7),内匹司他30mg/kg/东莨菪碱和Phys/东莨菪碱(n=8)。

[0474] 在连续目的6:00am和6:00pm,在此期间,操作阶段60-69,使大鼠口服赋形剂、毒扁豆碱(Phys)或内匹司他(1、3、10或30mg/kg)。由于在阶段68和69期间赋形剂治疗动物所显示的高度准确性选择,所以在最后试验阶段(阶段70)期间(在此阶段中,几乎所有的赋形剂/赋形剂治疗组接受0.1mg/kg东莨菪碱HBr(在试验之前30分钟s.c.给予)),还使用0、8、16和32s延迟。在最后试验阶段之前30分钟,使赋形剂/赋形剂组中的动物接受s.c.注射的盐水。由此,在所提供实验的11个连续日期间,给予七个组的药物治疗是:

组	阶段 60-69 (0、8、16 和 32 s 延迟)	阶段 70 (0、4、8 和 32 s 延迟)
1	赋形剂	赋形剂/赋形剂
2	赋形剂	赋形剂/东莨菪碱
[0475] 3	内匹司他 1.0mg/kg	内匹司他 1.0 mg/kg/东莨菪碱
4	内匹司他 3.0 mg/kg	内匹司他 3.0 mg/kg/东莨菪碱
5	内匹司他 10 mg/kg	内匹司他 10 mg/kg/东莨菪碱
6	内匹司他 30 mg/kg	内匹司他 30 mg/kg/东莨菪碱
7	毒扁豆碱	毒扁豆碱/东莨菪碱

[0476] 在所提供DMTP研究中收集和分析的数据包括：1) 正确反应的百分比；2) 在对样品杠杆反应的表现和选择反应的表现之间的等待时间；和3) 完成校正和非校正试验的总数。只收集前两个依赖性测定数据用于非校正试验。

[0477] 虽然包括研究的第1-10天所收集数据的附图，为了提高统计分析的效率和敏感度，在第一个10个药物治疗阶段（阶段60-69）期间，将数据分为两个阶段单元（单元1-5）。同样，对于试验的第一个10天，因为赋形剂/赋形剂和赋形剂/东莨菪碱组中的动物接受相同治疗，将这两个组中的动物合并，以便在单元1-5期间进行统计分析。

[0478] 使用对作为受试者之间因素的药物治疗和作为受试者内部因素的延迟（0、8、16或32s）的双向方差分析（ANOVA）来分析正确选择的百分比和反应潜伏期。对每组数据各别进行这些分析。在显著的相互影响后，进行单向ANOVA（在每个延迟阶段进行）。从单向ANOVA获得显著的主要效果后，进行双尾（two-tailed）Dunnett's t检验。单向ANOVA之后进行事后Dunnett's t试验，当合适时，用于分析已完成试验的平均数目。

[0479] 所有的统计试验用Macintosh电脑（使用SuperAnova软件）进行。整个期间，将 α 设置为0.05。将在四个延迟周期的每个周期中不能完成试验的动物从正确选择的百分比和反应等待时间的分析中排除。对于5个单元药物试验的每个和东莨菪碱（scop）试验天，将包括在正确选择的百分比和对响应的等待时间的分析中的动物数目进行记录。为了评价药物对进行样品工作的延迟匹配能力的总体效果，将所有动物包括在完成试验数目的分析中。

[0480] 在6:00am和6:00pm开始给予（p.o.，每日两次）毒扁豆碱硫酸盐（10mg/kg，由RBI提供）和内匹司他（1、3、10和30mg/kg，由Roche提供）。在最后试验阶段之前30分钟，给予（s.c.）东莨菪碱HBr（0.1mg/kg，由Sigma提供）。将毒扁豆碱和内匹司他溶解或悬浮在蒸馏水中，并注射2.5ml/kg的体积。将东莨菪碱HBr溶于盐水中，注射1.0ml/kg的体积。所有的药物剂量用碱重来表示。

[0481] 在第一个试验单元期间，药物对正确选择的百分比或在DMTP工作中进行选择反应的等待时间没有明显的影响。药物治疗也未能影响完成试验的数目， $F(5, 45) = 0.319, p = 0.899$ 。

[0482] 在单元2中，内匹司他和毒扁豆碱对该单元试验期间的任何依赖性测定没有明显的影响。虽然效果不是统计上显著的（ $F(5, 45) = 1.717, p = 0.150$ ），但倾向于减少所完成试验的数目。在用3或30mg/kg内匹司他治疗的组和在用毒扁豆碱治疗的组中，明显的效果略微更显著一些。事实上，在该训练单元期间，用30.0mg/kg内匹司他治疗的7个动物中，只有4个能够在所有四个延迟中完成试验。

[0483] 在试验的单元3期间，在选择准确性方面，用毒扁豆碱治疗的动物显示了独立的延迟缺陷。对正确选择百分比的ANOVA显示了药物治疗的显著的主要效果，但药物治疗X延迟的相互影响未能达到统计显著性。对药物治疗的主要效果的事后Dunnett's t试验显示，只有毒扁豆碱治疗组与赋形剂治疗组有显著区别。在该试验单元期间，药物治疗不会显著地影响反应等待时间或完成试验的数目， $F(5, 45) = 0.701, p = 0.625$ 。

[0484] 在单元4中，药物治疗对正确选择的百分比达到了效果，但未能达到统计显著性（ $p = 0.056$ ）。然而，药物治疗显著地减少了反应等待时间，同时ANOVA显示了显著的药物治疗X延迟的相互影响。随后在0、8、16和32s延迟进行的单向ANOVAs发现，只有32s延迟具有统计上显著的效果；0、8、16和32s延迟的分析结果分别如下： $F(5, 40) = 2.115, p = 0.084$ ； $F(5,$

40) = 1.403, $p=0.244$; $F(5, 40) = 2.259, p=0.067$; $F(5, 40) = 3.325, p=0.013$ 。在32s延迟时, 事后Dunnett's试验发现, 与赋形剂治疗组相比, 只有用10.0mg/kg内匹司他治疗的组进行选择反应时具有较长的等待时间。在试验的单元4期间, 药物治疗不会显著地影响完成试验的数目, $F(5, 45) = 1.533, p=0.199$ 。

[0485] 在试验的单元5期间, 在选择准确性方面, 内匹司他诱导了显著的剂量-和延迟-依赖性缺陷。双向ANOVA显示了显著的药物治疗X延迟的相互影响, 随后的单向ANOVAs (0、8、16和32s延迟) 发现, 只有在32s延迟时正确选择的百分比具有显著的组差别, 0、8、16和32s延迟时的分析结果分别如下: $F(5, 39) = 0.327, p=0.894$; $F(5, 39) = 0.825, p=0.539$; $F(5, 39) = 1.188, p=0.333$; $F(5, 39) = 3.018, p=0.021$ 。在32s延迟时, 事后Dunnett's试验发现, 相对于赋形剂治疗的动物, 10和30mg/kg内匹司他治疗的组显示了正确选择百分比的缺陷。

[0486] 在试验的单元5期间, 内匹司他和毒扁豆碱不会显著地影响反应等待时间或完成试验的数目, $F(5, 45) = 1.692, p=0.156$ 。

[0487] 给予东莨菪碱HBr之后, 许多动物没有完成与试样试验的延迟匹配。在四个延迟的每个中, 只有1个用10.0mg/kg内匹司他加上东莨菪碱治疗的大鼠和只有2个用30.0mg/kg内匹司他加上东莨菪碱治疗的大鼠能够完成试验。事实上, 在所有组中, $n < 4$, 不过赋形剂/赋形剂和赋形剂/东莨菪碱组除外, 在其中, 分别有七个和四个大鼠在四个延迟的每一个中完成了试验。

[0488] 在所有东莨菪碱治疗组中, 动物完成的试验数目显著地减少, $F(6, 16) = 8.801, p=0.001$ 。

[0489] 在东莨菪碱治疗组中, 由于受试者的数量少, 所以对选择准确性和反应等待时间数据没有进行ANOVA。另外, 在四个延迟中, 正确选择的平均百分比急剧下降。在比较赋形剂/东莨菪碱组与赋形剂/赋形剂组的选择准确性的t检验中, 发现东莨菪碱显著地减少了正确选择的百分比, $t_{(9)} = 4.15, p=0.003$ 。由于在其它组中受试者少于4个, 所以没有进行进一步的统计分析。然而, 有趣的是, 与单独东莨菪碱治疗的组相比, 给予30.0mg/kg内匹司他加上东莨菪碱的组中的两个动物完成的较好: 与赋形剂/东莨菪碱治疗组的动物或其它东莨菪碱治疗组的任何动物相比, 用30.0mg/kg内匹司他加上东莨菪碱治疗的两个动物产生更多正确的选择。

[0490] 在DMTP试验中, 当单独给予内匹司他时, 似乎不会导致记忆提高效果。值得注意的是, 在赋形剂治疗的对照动物中, 在五个单元试验中观察到的延迟导致的记忆缺陷似乎消失了。然而, 对于第五个试验单元, 赋形剂治疗的对照动物还显示了延迟依赖性记忆缺陷, 在0s延迟具有100%选择准确性, 在32s延迟具有80%选择准确性。由此, 在赋形剂治疗动物的行为中, 在32s延迟时没有观察到上限效果。

[0491] 尤其是, 对于第五个训练单元, 内匹司他具有选择性的记忆破坏效果。毒扁豆碱在任何治疗天中都不会改善表现, 并且在试验的单元3期间 (第5和6天), 实际上在选择准确性方面产生延迟独立性缺陷。在第11天, 由东莨菪碱刺激试验产生的结果 (在该试验中, 共同给予动物东莨菪碱HBr (0.1mg/kg) 和内匹司他或毒扁豆碱) 不能进行分析, 这是由于内匹司他和毒扁豆碱治疗组中能够进行DMTP工作的受试者的数量很少。然而, 与任何其它东莨菪碱治疗的动物相比, 接受30.0mg/kg内匹司他和东莨菪碱的两个大鼠 (能够进行DMTP工作)

显示了更高的选择准确性。内匹司他可能会逆转一些东莨菪碱导致的认知失常,这种效果可能被化合物的其它“非认知”作用所掩盖。

[0492] 在选择准确性方面,内匹司他导致显著的剂量-和延迟-依赖性缺陷。在0、8和16s延迟时,用10.0mg/kg内匹司他治疗的动物在选择准确性方面绝对没有显示缺陷。相反,在32s延迟时,相对于赋形剂治疗组,在10.0mg/kg内匹司他组的动物受到削弱。在0s延迟时,用30.0mg/kg最高剂量的内匹司他治疗的组在选择准确性方面没有显示缺陷,在8和16s延迟时,有选择准确性削弱的倾向,在32s延迟时,相对于赋形剂治疗组,选择准确性出现显著的缺陷。在选择准确性方面,这些药物所导致缺陷的延迟依赖性质说明,化合物可以直接对短期或工作记忆起作用。在较短延迟时,动物可以受到充分刺激,并且能够准确地完成DMTP工作,只有当滞留间隔很长时,才显示出缺陷。在该模型中,已经试验的少数化合物显示了这种特性。已经主张能够削弱记忆的许多化合物一般会导致选择准确性的缺陷,这在所有延迟中都已经观察到了(例如,MK-801,东莨菪碱)。内匹司他对完成试验的等待时间具有很小的效果,这在训练的第四个单元很明显,在此期间,与赋形剂治疗的动物相比,用10.0mg/kg内匹司他治疗的动物需要花费更长时间来完成32s延迟试验。这种效果不是剂量依赖性的,并且在用30.0mg/kg治疗的组中没有观察到。与赋形剂治疗的动物相比,对于用内匹司他治疗的动物,还有完成更少试验的趋势:在最后两个训练单元期间,观察到了完成试验数目减少的趋势。然而,由于数据的可变性,该趋势没有达到统计显著性。这种数据可变性是出乎意外的。似乎是,长期口服剂量导致的初始应力可能干扰了这些被夺去食品动物的表现,尤其在最初几个实验单元期间。在第一和第二训练单元之间,所有的组都出现了完成试验数目减少的现象。动物从这种初始降低中恢复,并且在接下来的三个训练单元中,显示了更稳定的表现。

[0493] 我们发现,一些动物在该研究中开始体重减轻,在某些情况下,减轻超过总体重的5%。将显示体重减轻的动物分开,并在它们每天训练阶段结束时给予额外食品。这种额外的给食可以有助于完成试验数目的变化性。虽然没有进行系统记录,但随机观测说明,于其它组动物相比,30mg/kg组中的更多动物必须给予额外食品。这种观察结果与探索性研究(每天给予100mg/kg (p.o.) 内匹司他导致显著的体重减轻)的结果一致。

[0494] 在DMTP试验中,毒扁豆碱没有改善大鼠的表现。事实上,在训练的单元3期间,用毒扁豆碱治疗的动物在正确选择的百分比方面显示了显著的缺陷。与内匹司他所获得效果相反,由毒扁豆碱导致的选择准确性的缺陷是延迟独立性的:源于方差分析的相互影响术语没有接近统计显著性。由此,当以此剂量给予时,毒扁豆碱对反应准确性的影响很可能对药物的行为毒性效果是次要的。在最后两个训练单元(在此期间,由毒扁豆碱导致的选择准确性的缺陷不再达到统计显著性)中,动物似乎对这些影响形成了耐受性。

[0495] 最后,在东莨菪碱试验期间,毒扁豆碱看来不会逆转东莨菪碱的影响。有可能不同剂量的毒扁豆碱针对东莨菪碱有效。我们先前没有企图用毒扁豆碱(使用所提供的给药方式)逆转东莨菪碱,因此,没有与所提供结果相比较的历史数据。与急性给药相比较,毒扁豆碱的这种效果缺乏可能是由于低剂量的毒扁豆碱必须长期使用。动物不能忍受逆转东莨菪碱的效果所需要的重复给予高剂量的毒扁豆碱(参见探索性研究的结果)。另外,内匹司他不会逆转东莨菪碱的效果,虽然令人感兴趣的是两个用30.0mg/kg内匹司他治疗的动物(能够在东莨菪碱试验期间完成)比任何其它东莨菪碱治疗组中的任何动物显示了更高的选择

准确性。在该试验中,进一步的研究必须明确地确定是否用内匹司他进行急性或长期治疗可以逆转东莨菪碱的效果。

[0496] 内匹司他似乎具有特异性的记忆干扰效果,这在给药8天之后是很明显的。毒扁豆碱在任何治疗天中都不会改善表现,并且在试验的单元3期间(第5和6天),实际上在选择准确性方面产生延迟独立性缺陷。在第11天,由东莨菪碱刺激试验产生的结果(在该试验中,共同给予动物东莨菪碱HBr (0.1mg/kg) 和内匹司他或毒扁豆碱) 不能进行分析,这是由于内匹司他和毒扁豆碱治疗组中能够进行DMTP工作的受试者的数量很少。然而,与任何其它东莨菪碱治疗的动物相比,接受30.0mg/kg内匹司他和东莨菪碱的两个大鼠(能够进行DMTP工作) 显示了更高的选择准确性。内匹司他能够逆转一些东莨菪碱导致的认知失常,这种效果可能被化合物的其它“非认知”作用所掩盖。在最后的训练单元中,在选择准确性方面,内匹司他导致显著的剂量-和延迟-依赖性缺陷。这是出乎意外的发现,这是因为考虑到许多其它记忆干扰药物,例如东莨菪碱和MK-801,在选择准确性方面可以导致延迟独立性缺陷(这可能是由于注意力和/或运动原/激发因素的缺陷造成的)。相反,用注意力或运动原/刺激表现的变化来解释内匹司他所提供的结果是不太可能的。如果这种药物对新的受体或药理学机制是选择性的,那么这些结果说明了对这种底物在工作记忆中的重要作用。

[0497] 实施例30

[0498] 最近,我们已经证明,内匹司他(选择性的多巴胺 β -羟化酶抑制剂) 在SHRs中的急性研究中显现了有效的抗高血压活性。在相同品系的大鼠中,长期地检验了内匹司他的抗高血压效果。此外,我们也探索了与血管紧张肽转化酶抑制剂依那普利共同给予该化合物的增强效果。在SHRs中,还检验了对心脏肥大的治疗效果。

[0499] 使用雄性SHRs/NCr1 BR大鼠(给药开始时22-28周大) 和重量匹配的WKY/NCr1 BR大鼠。顺序进行四个系列实验:

[0500] 系列I

[0501] 赋形剂

[0502] 依那普利 10mg/kg

[0503] 内匹司他 3mg/kg

[0504] 内匹司他 10mg/kg

[0505] 系列II

[0506] 赋形剂

[0507] 依那普利 10mg/kg

[0508] 内匹司他 30mg/kg

[0509] 内匹司他 100mg/kg

[0510] 系列III

[0511] 赋形剂

[0512] 依那普利 1mg/kg

[0513] 内匹司他 30mg/kg

[0514] 内匹司他 30mg/kg+ 依那普利 1mg/kg

[0515] 系列IV

- 依那普利 1 mg/kg (E1)
[0516] 内匹司他 15 mg/kg + E1
内匹司他 30 mg/kg + E1
内匹司他 60 mg/kg + E1

[0517] 在每个系列中,给24个SHRs长期植入遥测植入物,用于测定动脉血压、心率和运动活动。用戊巴比妥钠(60mg/kg, i.p)使大鼠麻醉,并修剪它的腹部。在无菌条件下,在中线上切口。露出腹主动脉,插入遥测发射装置的导管。将发射器连接到腹部肌肉组织上之后,将皮肤缝合。使每个大鼠恢复至少2周,而后进行药物给予。将大鼠单独放置在安静房间中,该房间具有颠倒的照明/黑暗循环(08:00-20:00熄灯)。

[0518] 在实验开始之前三天,将大鼠随机分为4个组,并监控它们的收缩压(SBP)、舒张压(DBP)、平均血压(MBP)、心率(HR)和运动活动(MA)。确定这些参数的剂量前的值,使相应的大鼠组接受30天的(每天)内匹司他和/或依那普利治疗(见下文)。

[0519] 最后治疗之后二十四小时,杀死大鼠,收集左心室,称重(湿重),冷冻干燥至少24小时,以便获得干重。

[0520] 每个实验开始时,进行遥测监控的每个组中的大鼠数目始终是6个。然而,在系列I中,类似地放置7个Wistar Kyoto(WKY)大鼠,并给予赋形剂(水),而在系列III和IV中,类似地治疗每个组中的额外2个大鼠(增加动物数目,用于对SHRs的过度增大的效果进行统计分析)。对这些大鼠没有实施遥测设备安装或监控。

[0521] 在水中制备内匹司他和依那普利。口服给予大鼠10ml/kg的所有剂量,并且用游离碱同等物来表示。依那普利(Vasotec®)可以从本地药店商业上获得。

[0522] 计算机化数据收集系统用于连续地收集SBP、DBP、MBP、HR和MA的数据。每5分钟收集关于每个大鼠的数据,每次10sec。然后每小时将这些数据平均,并且计算平均值的标准误差(SEM)。在治疗结束时,获得左心室质量(干和湿重)。每天记录体重。

[0523] 所有的值用平均值±SEM来表示。统计显著性定义为P水平小于0.05。

[0524] 单独分析关于MBP、HR和MA的数据。在每天测定的26个时点来进行每个分析。对治疗主要效果和时间 and 它们的相互影响使用双向ANOVA。如果测定总体治疗效果或显著的相互影响,在每个时点进行一系列单向ANOVA。使用Dunn's方法,在每个时点进行逐对比较。如果不测定总体治疗效果,那么通过使用Bonferroni校正来调整临界值,从对照物开始进行成对差别分析。

[0525] 对于左心室质量,具有最终体重的协变量的共方差分析用于分析组织湿重和组织干重,而Kruskal-Wallis试验用于分析组织湿重/体重和组织干重/体重的比例。如果在所有组之中没有测定总体治疗效果,然后进行用于多重比较的Bonferroni's校正。

[0526] 对于体重,相对于给药前的变化的双向ANOVA用于分析治疗总体效果、天和治疗与天数的相互影响。然后每天进行单向ANOVA,并且使用Dunn's方法和Fisher's LSD策略,进行药物治疗组与赋形剂对照物的逐对比较,以便校正多重比较。

[0527] 对于系列I和II,在30天治疗的任何一天,口服内匹司他(3和10mg/kg)(下文表示的所有剂量是po给予的)不会显著地影响血压(数据未显示)。在30mg/kg时,在第1天,内匹司他逐渐地降低MBP,并且在第3天继续将MBP降低至最大-20mmHg($p < 0.01$),在24小时之内

稍微回升。在整个研究中,引起类似的抗高血压效果。在100mg/kg时,在第1天给药之后21小时,化合物引起-29mmHg的峰值抗高血压响应($p<0.01$)。MBP继续降低,在第3天达到其大约-42mmHg的最低点($p<0.01$)。在整个研究中,MBP保持降低。

[0528] 在整个研究中,10mg/kg依那普利不断地降低MBP。在第5天,在给药之后1小时之内,观察到MBP-29mmHg的最大降低($p<0.01$)。

[0529] 在系列III中,虽然单一给予依那普利(1mg/kg ($n=6$))或内匹司他(30mg/kg ($n=6$))只导致很小的抗高血压效果,但共同给予两个化合物($n=6$)导致更大的抗高血压反应(在第1天的第16小时,达到-21mmHg, $p<0.01$)。反应的起始是缓慢的,并且是逐渐的。随着在第2天第二次给药,当天的大部分时间观察到组合治疗的更大抗高血压反应(在第13小时,-25mmHg, $p<0.01$)。在整个研究中,观察到增强作用。

[0530] 在系列IV中,进一步研究了内匹司他的效果得到非抗高血压剂量的依那普利的增强。在依那普利(1mg/kg)的存在下,与15或30mg/kg化合物所导致效果相比,虽然内匹司他(60mg/kg)最初产生了更大和更长时间的抗高血压效果,但在第8至第30天,没有观察到更大的效果。由此,增强作用与试验的内匹司他的剂量(15、30和60mg/kg)无关。接受内匹司他(15mg/kg)和E1的组显现了降低的平均血压,具有很大的标准误差(两个大鼠比其余大鼠显示了更大的抗高血压反应)。

[0531] 在30天研究中,内匹司他(3和10mg/kg)不会一致地影响心率(HR)。然而,给药之后至少最初几个小时,与赋形剂对照组相比,用内匹司他(100mg/kg)治疗的组有降低HR的倾向。虽然依那普利(1mg/kg)不会影响HR,但化合物(10mg/kg)在给药之后2小时之内有导致暂时性稍微心动过速的倾向。在系列III中,没有一个治疗(即依那普利(1mg/kg)、内匹司他(30mg/kg)或其组合)可以一致地影响HR。在系列IV中,与单独依那普利(1mg/kg)治疗组相比,内匹司他(15、30和60mg/kg)和依那普利(1mg/kg)治疗组有降低HR的倾向。

[0532] 在整个研究中,药物治疗中没有一个显示对运动活动(motor activity) (MA)的显著效果。

[0533] 内匹司他(3-100mg/kg)不会影响在SHRs中所观察到的心脏肥大($p>0.05$)。在系列II(但在系列I中)中,依那普利(10mg/kg)显著地降低左心室的质量。在系列III中,依那普利(1mg/kg)不会使过度增大衰退,但共同给予依那普利(1mg/kg)和内匹司他(30mg/kg)可显著地降低SHRs的左心室的质量($p<0.01$)。然而,在系列IV中,共同给予依那普利(1mg/kg)和内匹司他(15、30和60mg/kg)对左心室的质量的效果与单独的依那普利所造成的效果没有区别($p>0.05$)。

[0534] 与赋形剂治疗相比,用内匹司他(3和10mg/kg)治疗SHRs不会对SHRs的体重有任何效果($p>0.05$)。然而,用化合物(30和100mg/kg)治疗可导致体重增加更多($p<0.05$)。

[0535] 比较起来,依那普利(10mg/kg)显著地降低($p<0.05$)大鼠的体重,或大鼠的体重没有影响。虽然用依那普利(1mg/kg)治疗可略微地降低体重,但共同给予依那普利(1mg/kg)和内匹司他(30和60mg/kg)可略微地增加大鼠的体重。

[0536] 用赋形剂、依那普利和内匹司他(3和10mg/kg)治疗的大鼠的给药前pre-dose体重分别是:387±11、415±12、407±4和415±12g。

[0537] 用赋形剂、依那普利和内匹司他(30和100mg/kg)治疗的大鼠的给药前pre-dose体重分别是:399±10、389±6、389±9和401±10g。

[0538] 用赋形剂、依那普利和内匹司他 (30mg/kg) (与依那普利一起或不与依那普利一起) 治疗的大鼠的给药前pre-dose体重分别是: 365 ± 9 、 371 ± 8 、 361 ± 7 和 369 ± 7 g。

[0539] 用单独的依那普利和共同给予内匹司他 (15、30和60mg/kg) 治疗的大鼠的给药前(pre-dose) 体重分别是: 357 ± 6 、 363 ± 6 、 347 ± 8 和 346 ± 8 g。

[0540] 在30天治疗的4个系列中, 观察到四个死亡大鼠。这些死亡的原因还未确定, 但似乎这些死亡不太可能与内匹司他治疗有关。

[0541] 在带有无线电遥测植入物的自发性高血压大鼠 (SHRs) 中, 用四个系列实验来评价30天长期口服内匹司他对血压、心率、运动活动和左心室质量的效果。每天用内匹司他 (3和10mg/kg) 治疗 ($n=6$) 不会影响血压。在第3天, 内匹司他 (30mg/kg) ($n=6$) 导致-20mmHg的峰值抗高血压效果 ($p<0.01$)。在整个研究中, 抗高血压效果是适度的, 但可以测定到这种效果。内匹司他 (100mg/kg) ($n=5$) 导致更大的抗高血压效果。该效果是逐渐上升的, 并且在第3天达到-42mmHg的峰值 ($p<0.01$)。在其余的研究中, 观察到类似幅度的抗高血压效果。比较起来, 在整个研究中, 血管紧张肽转化酶抑制剂依那普利 (10mg/kg, $n=6$) 导致-20至-30mmHg的抗高血压效果。虽然单一给予依那普利 (1mg/kg) 不会导致显著的抗高血压效果, 但与内匹司他 (30mg/kg; $n=6$) 共同给予可导致更大的和持久的抗高血压效果 ($p<0.01$)。在整个30天研究中, 观察到增强作用。由于依那普利 (1mg/kg) 而使内匹司他的抗高血压效果得到增强还可以在15、30和60mg/kg的剂量下看到, 虽然这些效果不是剂量依赖性的。

[0542] 在内匹司他 (3-10mg/kg) 或依那普利 (1mg/kg) 治疗的组中, 没有观察到对心率的明显影响。然而, 接受内匹司他 (30或100mg/kg) 的组在大鼠清醒期间显现了轻微的心动过缓。相反, 依那普利 (10mg/kg) 导致暂时性的心动过速。与单独的依那普利 (1mg/kg) 相比, 共同给予内匹司他 (15、30和60mg/kg) 和依那普利 (1mg/kg) 有降低心率的倾向。在任何治疗组中, 没有测定到对运动活动的显著效果。

[0543] 在SHRs中, 用内匹司他 (30 ($n=6$) 和100 ($n=5$) mg/kg) 治疗不会对左心室肥厚有明显的影响。虽然依那普利 (1mg/kg, $n=8$) 或单独的内匹司他 (30mg/kg, $n=7$) 不会使过度增大衰退, 但共同给予两个化合物 ($n=8$) 可显著地降低SHRs的左心室的质量。然而, 共同给药对左心室质量的效果与内匹司他剂量 (15、30和60mg/kg) 无关, 并且与单独的依那普利 (1mg/kg) 的效果没有统计上的不同。

[0544] 在四个系列实验中, 在30天治疗期间, 出现四个死亡大鼠。在用内匹司他治疗的组中发现三个大鼠, 在赋形剂组中发现一个。这些死亡的原因还未确定, 但似乎与内匹司他治疗无关。

[0545] 在SHRs中, 在30天周期内, 内匹司他 (30和100mg/kg) 可显著地降低血压, 并且没有导致任何反射性心动过速。在SHRs中, 与单独的内匹司他治疗相比, 与非抗高血压剂量的依那普利 (1mg/kg) 共同给予内匹司他 (30mg/kg) 具有更大的抗高血压效果, 并且对过度增大的衰退具有更大的效果。然而, 这些效果与内匹司他剂量 (15、30和60mg/kg) 无关。

[0546] 实施例31

[0547] 在麻醉的 (带有仪表) 的狗中进行研究, 以评价内匹司他对自主神经系统作用物 (auto nomic agent) 的反映的效果。

[0548] 通过十二指肠管, 给予小猎犬0 (赋形剂) 或60mg/kg内匹司他的单一十二指肠内剂量。赋形剂对照组由1个雄性和1个雌性组成, 内匹司他治疗组由2个雄性和2个雌性组成。当

用异氟烷气体麻醉时,通过手术给每个动物安装上仪表。在给予试验制剂之前,评估平均血压对自主神经系统作用物的静脉内剂量、去甲肾上腺素(3 μ g/kg)、异丙基肾上腺素(0.3 μ g/kg)和乙酰胆碱(10 μ g/kg)的反应。然后给予每个动物单一浓注(bolus)剂量的试验制剂,给药之后大约1、2和3小时,评价血压对自主神经系统作用物的反应。在实验完成后,使每个狗安乐死,并从研究中除去。

[0549] 因为通常用于评价试验化合物对血液动力学参数的效果,所以对狗进行选择。从Marshall Farms, Inc., North Rose, New York获得小猎犬。通过供应商施加的刺耳标号独特地确认每个狗。在给药之前,使动物适应实验室条件至少3周。在适应周期期间,评价每个动物的一般条件,而且使用健康的那些动物。将狗随机分配给治疗组;雄性指定为单号,雌性指定为双号。

[0550] 分配给研究之后,将狗单独地放置在不锈钢笼中,标明研究编号、动物数目和刺耳标号。可以控制放置狗的房间的环境。每天清理笼,每隔一周将动物转到消毒笼中。每天提供一次Purina Certified Canine Chow®,不限量地提供水。

[0551] 在治疗的当天,狗大约是14至16个月大。雄性重量10.3至12.9kg,雌性重量8.5至11.2kg。

[0552] 在给药的时候,通过将内匹司他粉剂与赋形剂混合,制备60mg/ml悬浮液。重组的60mg/ml内匹司他制剂保留了使用期间的效能。在每天给药时,在无菌水中制备去甲肾上腺素(60 μ g/ml)、异丙基肾上腺素(6 μ g/ml)和乙酰胆碱(200 μ g/ml)的水溶液。

[0553] 给予赋形剂对照组(1个雄性和1个雌性)1ml/kg赋形剂,给予内匹司他治疗组(2个雄性和2个雌性)1ml/kg的60mg/ml内匹司他溶液。给予每个动物的内匹司他总剂量是60mg/kg。

[0554] 基于内匹司他的两个研究的数据选择剂量。在急性毒性研究中,在狗中,400mg/kg的单一口服剂量导致暂时性的毒性临床征象。在1个月研究中,给予狗5、20或80mg/kg的剂量,每天口服一次。在80mg/kg/天时,出现毒性的临床征象。

[0555] 通过十二指肠管,直接将单一十二指肠内剂量的赋形剂或内匹司他制剂给予到十二指肠中。选择十二指肠内途径,这是因为口服途径是推荐的内匹司他的临床给药途径。基于给药之前记录的个体体重(体重数据没有列入该报道内),计算剂量体积。在每个实验的最后,通过过量的戊巴比妥钠(300mg/kg, IV)使所评价的狗安乐死,并从研究中除去。

[0556] 按照方案中所描述的方法,通过手术给狗安装上仪表。在手术安装仪表之前,不给动物食品,过夜。通过注射(IV)氯胺酮(10mg/kg)和地西洋(0.5mg/kg)的混合物,开始使所评价的每个动物麻醉。将每个动物放置在手术台上,台上有保持体温的循环加热的水垫,整个实验中保持机械通风。手术的麻醉平面(plane)保持有异氟烷气体(1.5%至2%的潮气量,在氧中输送,大约1.5L/分钟的流速)。监控直肠体温,只用于测定血液气体水平,数据没有提供在该报道中。皮下放置外部针形电极,以便监控标准肢体导联(limb lead) II心电图(ECG),用于评价麻醉。

[0557] 将导管插入左股静脉,将聚乙烯管的尖端推进到腔静脉中,用于给予自主神经系统作用物。使用充满50U/ml肝素-盐溶液的聚乙烯管,将导管插入左股动脉。将动脉插管的尖端推进到胸主动脉中,并与外部压力传感器联接,记录心脏收缩和心脏舒张主动脉血压。从动脉插管中抽取动脉血样品,用于血液pH、PCO₂和PO₂分析。

[0558] 进行中线开腹术,刚好在尾部至幽门括约肌处分离十二指肠。将针头插入十二指肠中,将填满盐水的管的尖端通过针头推进到内腔中,用于给予试验制剂。将针头从切口位置抽出,将插管固定到位置里,使管的旋塞阀从腹部取出,将剖腹术的皮肤重新并置在一起。

[0559] 在通过手术安装仪表之后,进行通风(ventilatory)调节,如果需要的话,将动脉血pH和PCO₂水平调节至大约正常生理范围之内(pH=7.43至7.50,PCO₂=22至27mmHg)。

[0560] 使用股静脉管,每个剂量之间拥有大约10分钟间隔,通过快速浓注(用大约15秒钟)静脉内给予自主神经系统作用物、去甲肾上腺素(3μg/kg)、异丙基肾上腺素(0.3μg/kg)和乙酰胆碱(10μg/kg)。在每次给予药剂之后,用3ml水将管冲洗。首次给予乙酰胆碱之后大约20分钟,重复给予药剂。

[0561] 第二次给予乙酰胆碱之后大约30分钟,给予每个动物赋形剂或内匹司他。剂量体积是1ml/kg,使用十二指肠内管,以浓注形式直接给予到十二指肠中。给药之后立即用3ml赋形剂溶液将十二指肠内管冲洗。给药之后大约50、110和170分钟,重复给予自主神经系统作用物(在给予每个药剂之间具有大约10分钟间隔)。

[0562] 主动脉搏压、心率和ECG参数连续地直接记录在多导生理记录仪上。在大约抽取血样的时间点,将得自于血液气体分析器的血液pH、PCO₂和PO₂值人工记录到多导生理记录仪上。心率、ECG和血液气体参数只用于评价麻醉水平和动物制品的稳定性;这些数据没有提供在该报道中。

[0563] 刚好在给药之前(基线)和在每个药剂的峰值响应(从基线的最大变化)的时候,评价心脏收缩压、心脏舒张压和平均主动脉搏压。在给药之前和在给予试验制剂之后大约50、110和170分钟,评价心脏收缩压、心脏舒张压和平均主动脉搏压和血液pH、PCO₂和PO₂。

[0564] 对去甲肾上腺素的反应的表征的方法是:对于每次给予去甲肾上腺素,刚好在峰值压力提高之前和在这个提高之时,评价平均主动脉搏压。对异丙基肾上腺素和乙酰胆碱的反应的表征的方法是:对于每次给予异丙基肾上腺素和乙酰胆碱,刚好在峰值压力降低之前和在这个降低之时,评价心脏舒张时的主动脉搏压。

[0565] 在实验的最后,通过过量的戊巴比妥钠(大约300mg/kg,IV)使所评价的狗安乐死,并从研究中除去。

[0566] 在对去甲肾上腺素的剂量前和剂量后反应之间不存在治疗相关的差别。在赋形剂对照物的狗中,与剂量前反应相比,对去甲肾上腺素的剂量后反应幅度较小;认为这是偶然的。在对异丙基肾上腺素的剂量前和剂量后反应之间不存在治疗相关的差别。在对乙酰胆碱的剂量前和剂量后反应之间不存在治疗相关的差别。

[0567] 通过手术安装仪表后,给予麻醉的小猎犬60mg/kg的单一十二指肠内剂量的内匹司他。在给药之前和给药之后大约1、2和3小时,评价血压对自主神经系统作用物(去甲肾上腺素、异丙基肾上腺素和乙酰胆碱)的静脉内剂量的反应。在对自主神经系统作用物的剂量前和剂量后反应之间不存在治疗相关的差别。

[0568] 实施例32

[0569] 急性腹腔内给予内匹司他、DBH抑制剂(DBHI)对小鼠运动(locomotor)活动的效果。说明了这类化合物对运动(locomotor)活动有影响。

[0570] 将成年雄性CD-1(ICR)小鼠(在研究当天30-40g)放在每八个一组中,在正常的照

明/黑暗循环下,在0900hr和2100 hr之间开灯。使动物不限量地使用食品和水。所有的动物都首次(naive)用于药物治疗和行为试验。每个动物只使用一次。

[0571] 用自动化的14个工作站活动监控系统(San Diego Instrument Co.)监控运动活动。每个工作站包括:透明的有机玻璃笼(25cm x 45cm x 20cm;w x l x h),放置在金属框架之内,包含3个光发射器和3个光检测器(沿着壁的长度方向平均布置)。每个笼的底部稍微覆盖一些干净的雪松层。

[0572] 在试验之前,将小鼠放置在试验室中至少1小时。将小鼠单独放到一个活动笼中,并使其勘查(explore)30分钟。在这种习惯周期之后,腹膜内给予小鼠内匹司他(10、30和100mg/kg)、SKF-102698(30和100mg/kg)、可卡因(30mg/kg)或赋形剂,并立即送还至相同的笼中。在60分钟预先治疗周期之后,监控运动(motor)活动180分钟。每30分钟记录一次每个动物的活动统计和移动(定义为:中断2个连续的光子束)。

[0573] 使用总体分级数据(非参数技术)进行重复测定的双向方差分析(ANOVA),以便试验治疗的总体效果、时间间隔和治疗与时间间隔的相互影响。在每次间隔,进行单向ANOVA,以便看到在任何间隔所存在的治疗效果。然后,使用Dunn's方法和Fisher's LSD策略,在每次间隔进行逐对比较,以便调整多重比较的问题。

[0574] 对于内匹司他,剂量范围是3-100mg/kg,并且溶于dH₂O中,超声处理。对于SKF-102698,剂量范围是30-100mg/kg。对于盐酸可卡因,剂量范围是30mg/kg。以1ml/100g的体积给予化合物。所有报道的剂量以游离碱表示,可卡因除外(其中使用盐重量)。

[0575] 在整个模型中,治疗和时间有显著的效果(两个都是 $p < 0.01$),而治疗与时间的相互影响不是显著的。每个时点的分析显示,在时间间隔1-4有显著的总体治疗效果(即,试验的头120分钟;所有的 $p < 0.01$),而在时间间隔5和6(即试验的最后60分钟)没有测定到总体显著的治疗效果。

[0576] 当比较可卡因与赋形剂组时,在活动统计和移动方面,治疗和时间有显著的总体效果(两个 $p < 0.01$),而治疗与时间的相互影响不是显著的。每个时间间隔的分析显示,在时间间隔1-4(而不是5和6),可卡因组具有显著更大的总活动统计和显著更大的移动数量(所有的 $p < 0.05$)。

[0577] 相反,与赋形剂对照物相比,对于任何内匹司他治疗组或SKF-102698治疗组,在任何时间间隔,在总活动统计或移动方面没有重大差别。

[0578] 有效地证明了可卡因在30mg/kg的剂量时可作为运动(locomotor)兴奋剂。相反,与赋形剂对照物相比较,在任何时间间隔,急性给予内匹司他(3、10、30或100mg/kg剂量)在总活动或移动方面不会导致任何显著的变化。类似地,在检验的任何时间间隔,30和100mg/kg剂量的SKF-102698对总活动或移动没有明显的影响。这些数据说明,这些DBHI在小鼠中没有肌肉运动(motoric)作用。

[0579] 实施例33

[0580] 已经显示,急性给予多巴胺- β -羟化酶抑制剂内匹司他可以在自发性高血压大鼠的肠系膜动脉和左心室中抑制酶。在自发性高血压大鼠的大脑皮层和肠系膜动脉中,检验了口服1mg/kg或10mg/kg内匹司他7和25天之后的去甲肾上腺素和多巴胺水平的变化。

[0581] 根据游离碱来制备1和10mg/kg的内匹司他。将称量物溶于赋形剂(dH₂O)中,得到可以以10.0ml/kg的体积给予的口服剂量。

[0582] 在研究开始时,使用16-17周大的雄性自发性高血压大鼠 (SHRs)。动物不限量地接受食品和水。将动物随机分配给一个下列试验组中:口服内匹司他10mg/kg、1mg/kg,或10ml/kg的去离子水赋形剂组。口服给予大鼠(一天一次,给予7或25天)赋形剂、1mg/kg或10mg/kg内匹司他($n=8$),除了第25之外,其中 $n=9$ 。在第7天,给予化合物之后四个小时,用氟烷将动物麻醉,断头,采集皮层和肠系膜动脉,称量,用24个大鼠分析($n=8$ /治疗组)。在接下来的18天,使其余31个大鼠继续接受口服给予的三个治疗之一。在最后治疗之后4小时,从该组采集肠系膜动脉和皮层,称量,分析儿茶酚胺水平。

[0583] 将在第25天杀死的动物也用于血压测量。在第22天进行最后的血压测量。

[0584] 统计上,使用非参数的单向方差分析(ANOVA),在每个时间周期(7或25天)比较三个治疗。使用对平均值的Fisher's LSD策略,调整样本量的差别,进行每个治疗与对照物的逐对比较,以便控制实验误差率。单独分析每个可变量。对于图6-11,*, $p<0.05$ 和**, $p<0.01$ 。

[0585] 在大脑皮层中,治疗七天之后,与赋形剂组相比,10mg/kg剂量组显著地具有($p<0.1$)更低去甲肾上腺素水平和显著地具有($p<0.05$)更高的多巴胺/去甲肾上腺素比例。治疗七天之后,在两个治疗组(1或10mg/kg内匹司他)中的任何一个,与赋形剂相比,多巴胺水平没有显著的($p>0.05$)差别,或1mg/kg内匹司他剂量组的去甲肾上腺素水平或多巴胺/去甲肾上腺素比例没有显著的差别(附图6-8)。对于10mg/kg内匹司他剂量的第7天,皮层多巴胺/去甲肾上腺素比例有轻微显著的($p<0.05$)提高。

[0586] 治疗25天之后,在1mg/kg内匹司他剂量组中,与赋形剂组相比,多巴胺的皮层水平显著地($p<0.05$)提高。在该组中,皮层多巴胺/去甲肾上腺素比例也显著地($p<0.01$)大于赋形剂组的比例。与赋形剂相比,10mg/kg内匹司他剂量组的该比例显著地更大($p<0.05$)。在任何一个剂量组中,去甲肾上腺素水平没有显著地($p>0.05$)不同于对照物,在10mg/kg剂量组中,多巴胺水平也是如此(附图6-8)。

[0587] 在肠系膜动脉中,给药7天($p<0.05$)和25天($p<0.01$)之后,与赋形剂组相比,10mg/kg剂量组具有显著地更高的多巴胺水平和多巴胺/去甲肾上腺素比例,但去甲肾上腺素水平没有差别。在1mg/kg内匹司他剂量组中,没有一个测定的参数显著地($p<0.05$)不同于对照物(附图9-11)。

[0588] 口服给予内匹司他7和25天,可以显著地($p<0.05$)抑制自发性高血压大鼠 (SHRs)的皮层和肠系膜动脉中的多巴胺- β -羟化酶。与1mg/kg相比,给予10mg/kg内匹司他可以产生更大的抑制,因此所观察的效果是剂量依赖性的。

[0589] 对相关领域普通技术人员显而易见的是,对本文所描述方法和应用的其它合适的改进和修改是合适的,并且可以在不背离本发明或其任何实施方案的范围的条件下进行。尽管与某些实施方案结合描述了本发明,但本发明不受限于所列出的具体形式,相反,由于包括在下列权利要求所定义的本发明的精神和范围之内,包括这种替换方案、改进和等效内容可以被涵盖。

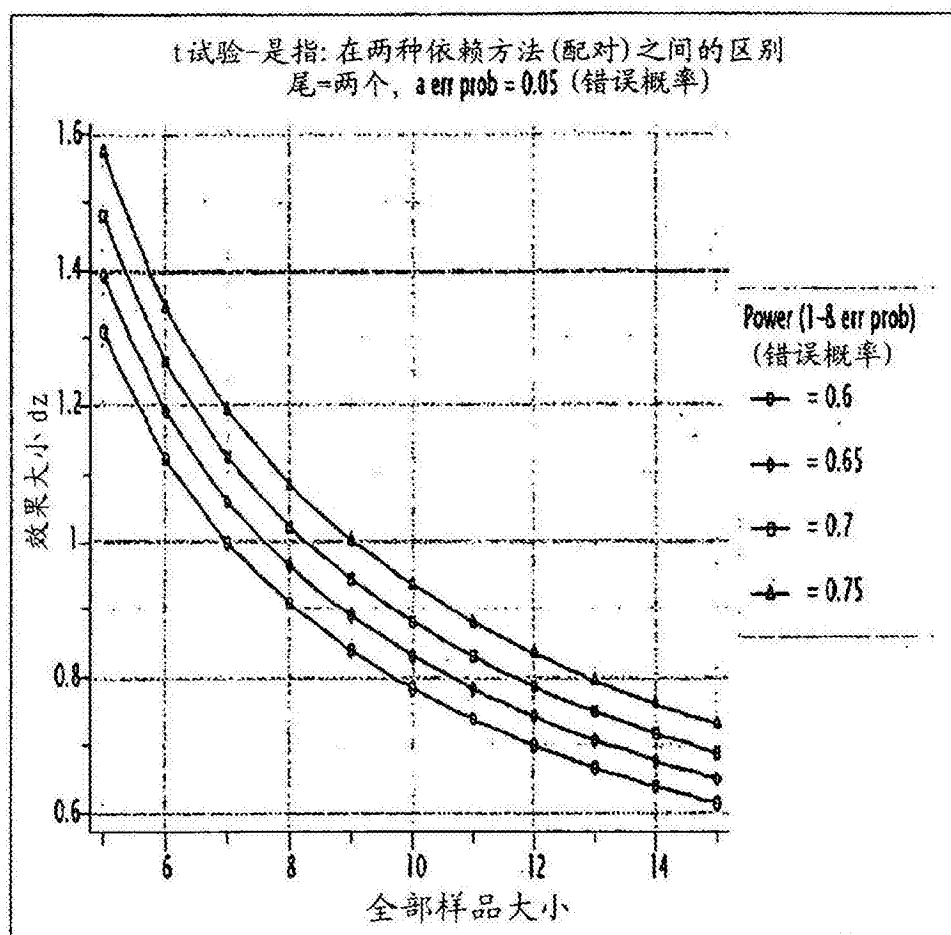


图1

酶	试验
酪氨酸羟化酶	与 L-[3, 5- ³ H]-酪氨酸转化为 DOPA 有关的 [³ H ₂ O] 的释放
乙酰 CoA 合成酶	[³ H]-乙酸钠乙酸盐的使用
酰基-CoA, 胆固醇酰基转移酶	由 [1- ¹⁴ C]-棕榈酰-CoA 和内原性的胆固醇形成胆固醇酯
Ca ²⁺ /钙调素-蛋白激酶 II	BB40 (合成肽底物) 的磷酸化 [³² P]
环加氧酶-I	花生四烯酸的氧化, 而后进行丙二醛的分光光度法定量
HMG-CoA 还原酶	由 [¹⁴ C]-HMG-CoA 形成 [¹⁴ C]-甲羟戊酸
中性肽链内切酶(人)	由戊二酰-ala-ala-phe-4-甲氧基-2-萘基酰胺形成 4-甲氧基-2-萘基胺
氧化氮合酶(组成性的)	[³ H]-精氨酸转化为 [³ H]-瓜氨酸
氧化氮合酶(诱导的)	在胞液制品 (得自于小鼠巨噬细胞, 由于干扰素- γ 和脂多糖诱导) 中测定 iNOS 反应产物 (NO ₂ 和 NO ₃)
磷酸二酯酶 III (人)	[³ H]-cAMP 转化为 [³ H]-AMP, 其随后转变为 [³ H]-腺苷酸
磷脂酶 A2	由 [¹⁴ C]-3-卵磷脂形成 [¹⁴ C]-棕榈酸酯
蛋白激酶 C (非选择性的)	组蛋白 H1 的磷酸化 [³² P]

图2

酶或受体	IC ₅₀ 值 (酶) 或 pK _i (受体)
酶	
多巴胺-β-羟化酶(牛)	8.5 nM
多巴胺-β-羟化酶(人)	9 nM
乙酰CoA合成酶	< 10 μM
Acyl-CoA:胆固醇酰基转移酶	< 10 μM
Ca ²⁺ /钙调素蛋白激酶II	< 10 μM
环加氧酶-I)	< 10 μM
HMG-CoA还原酶	< 10 μM
中性肽链内切酶(人)	< 10 μM
氧化氮合酶(组成性的)	< 10 μM
氧化氮合酶(诱导的)	< 10 μM
磷酸二酯酶III (人)	< 10 μM
磷脂酶A ₂	< 10 μM
蛋白激酶(非选择性的)	< 10 μM
受体	
α _{1A} , α _{1B} 肾上腺素能受体	< 5
α _{2A} , α _{2B} 肾上腺素能受体	< 5
β ₁ , β ₂ 肾上腺素能受体	< 5
M ₁ 毒蕈碱性受体	< 5
D ₁ , D ₂ 多巴胺受体	< 5
μ-阿片样物质受体	< 5
5-HT _{1A} , 5-HT _{2A} , 5-HT _{2C} 血清素受体	< 5

图3

酶	N	内匹司他的 浓度 (μM)	%酶的抑制	IC ₅₀ * (μM)
酪氨酸羟化酶	2	100	11	>100
NO合酶(组成性的)	2	10	6	>10
NO合酶(诱导的)	2	10	-1	>10
磷酸二酯酶III	2	100	-9	>100
磷脂酶A ₂	2	300	3	>300
中性肽链内切酶(人)	2	10	-12	>10
CA ²⁺ /钙调素依赖性蛋白激酶II	2	100	53	~100
乙酰CoA合成酶	2	100	-4	>100
Acyl CoA-胆固醇转酯酶	2	100	6	>100
HMG-CoA还原酶	2	30	16	>30
蛋白激酶(非选择性的)	2	300	39	>300
环加氧酶-I	2	300	44	>300

* IC₅₀ 的近似估算值

图4

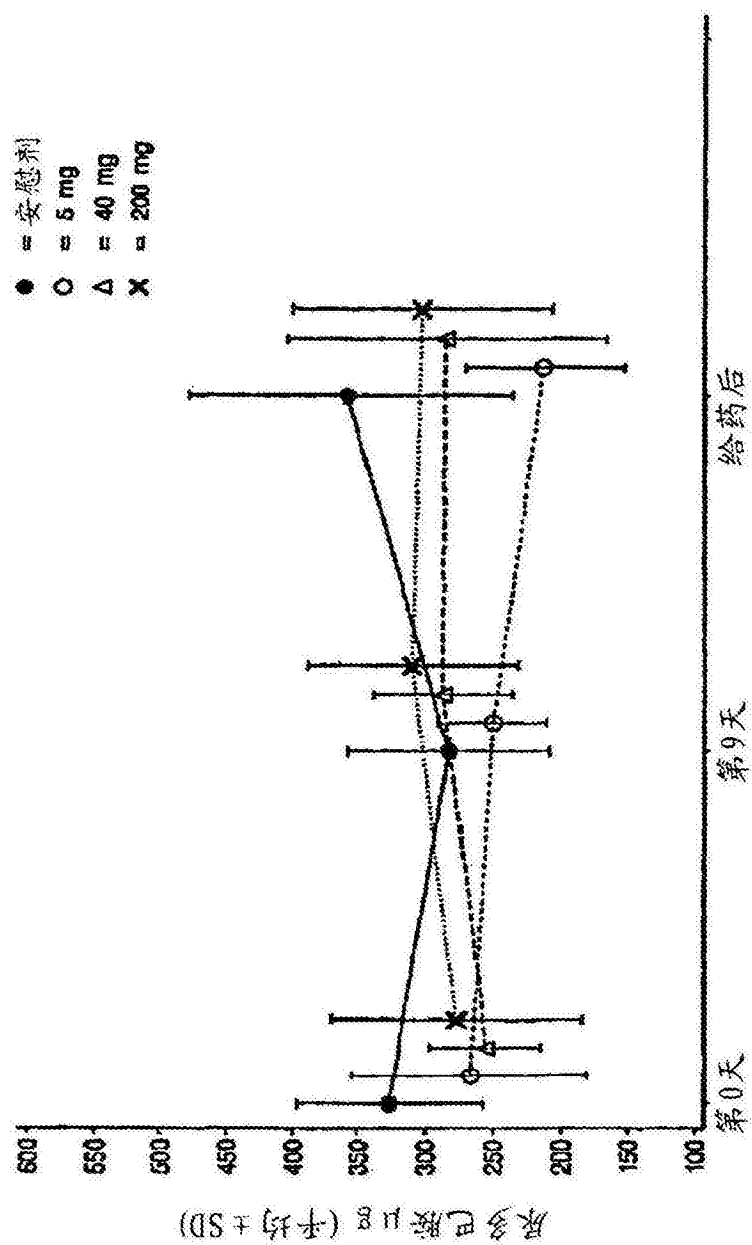


图5

皮层去甲肾上腺素

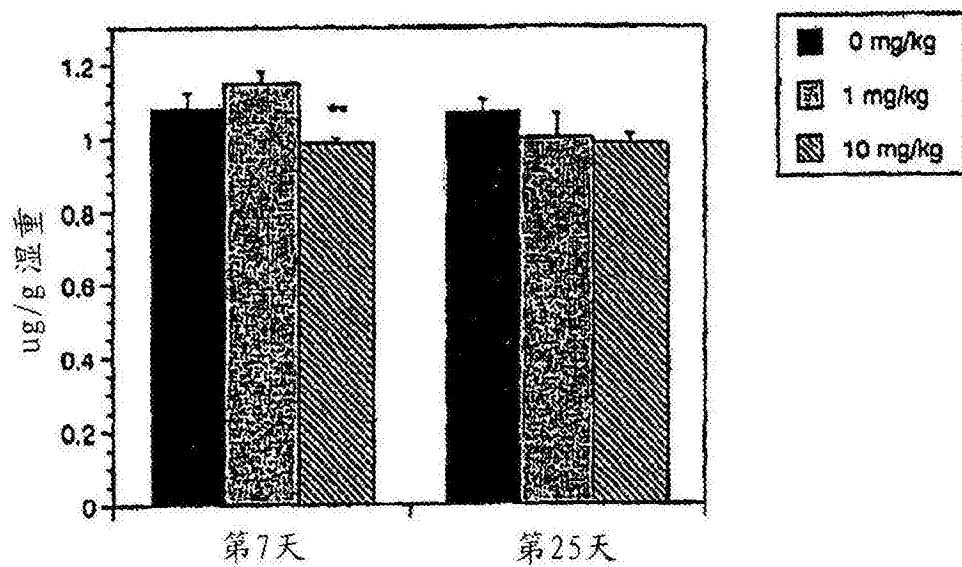


图6

皮层多巴胺

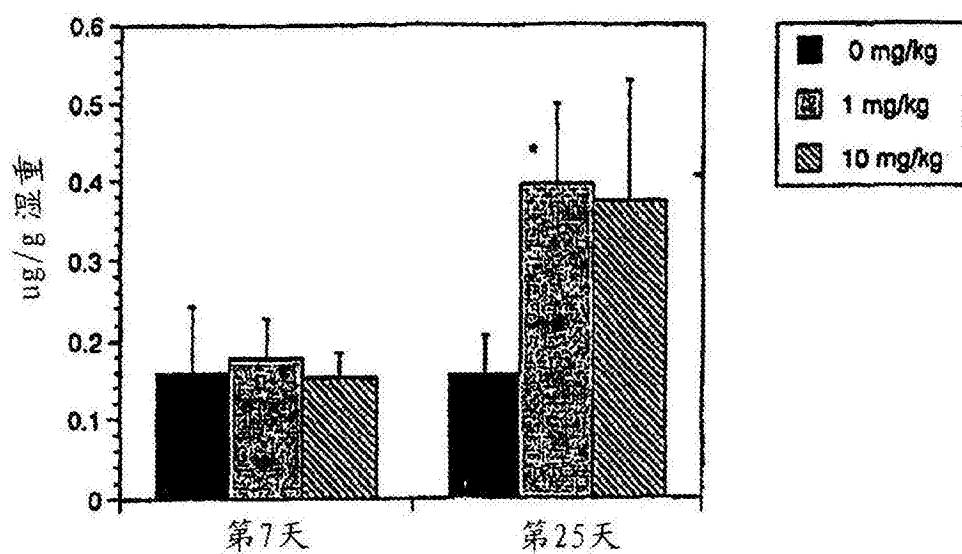


图7

皮层中DA/NE比例

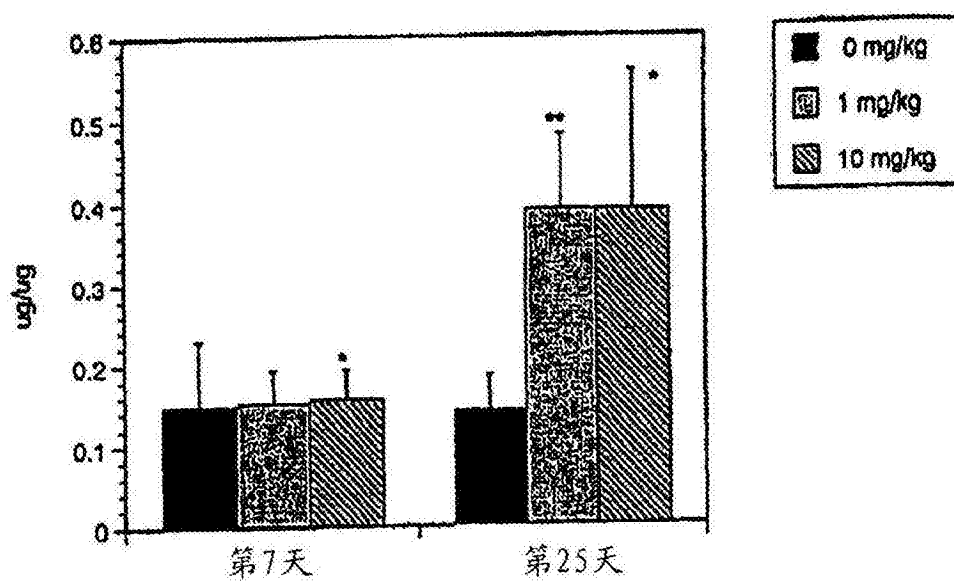


图8

肠系膜动脉去甲肾上腺素

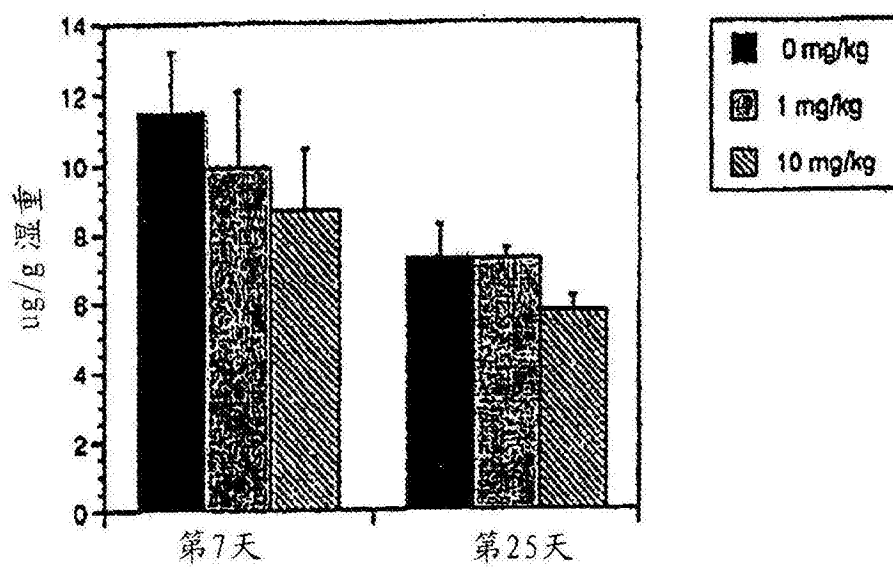


图9

肠系膜动脉中的多巴胺

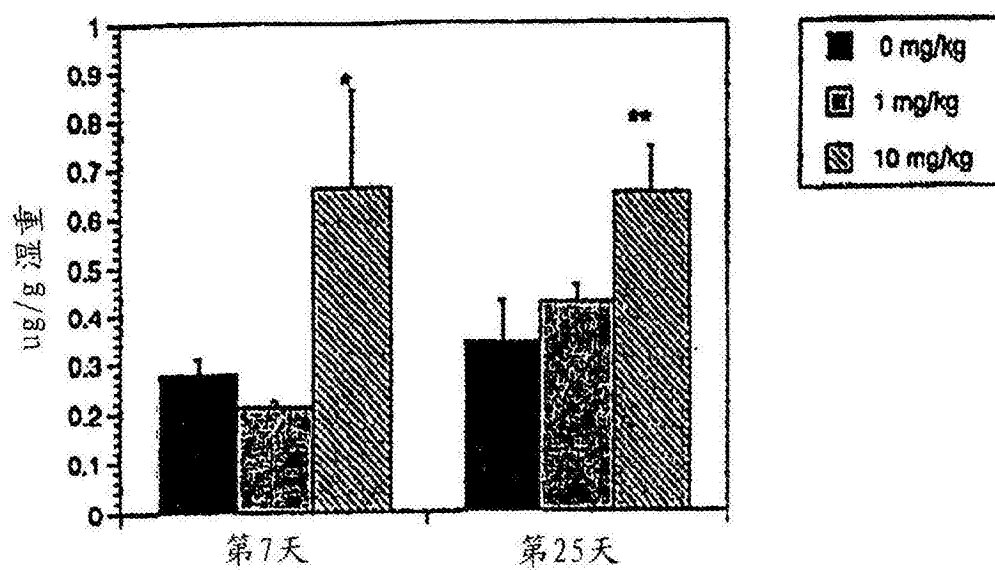


图10

肠系膜动脉的DA/NE比例

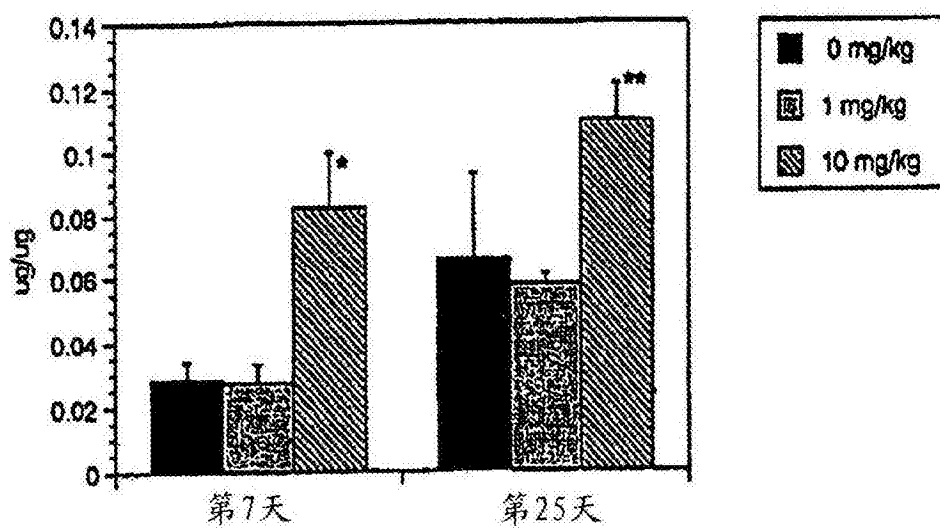


图11