

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日
2006年1月12日 (12.01.2006)

PCT

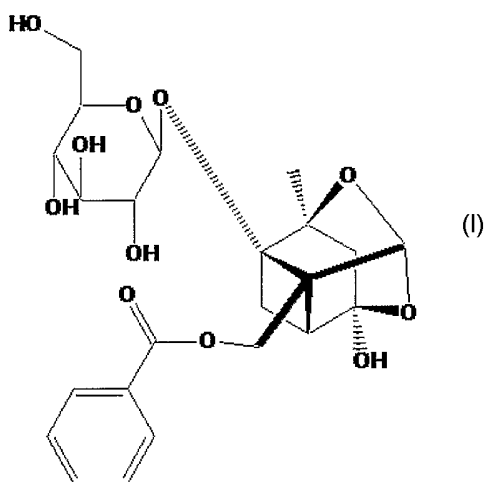
(10) 国际公布号
WO 2006/002589 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61P 25/00, 25/16
- (52) 国际专利分类号:
A61K 31/7048, ENCES) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区祖冲之路555号, Shanghai 201203 (CN)。
- (21) 国际申请号:
PCT/CN2005/000929
- (22) 国际申请日:
2005年6月27日 (27.06.2005)
- (25) 申请语言:
中文
- (26) 公布语言:
中文
- (30) 优先权:
200410025717.8
2004年7月2日 (02.07.2004) CN
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 中国科学院上海药物研究所(SHANGHAI INSTITUTE OF MATERIA MEDICA, CHINESE ACADEMY OF SCI-
- (72) 发明人; 及
(75) 发明人/申请人 (仅对美国): 朱兴族(ZHU, Xingzu) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区祖冲之路555号, Shanghai 201203 (CN)。 刘大志(LIU, Dazhi) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区祖冲之路555号, Shanghai 201203 (CN)。 叶阳(YE, Yang) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区祖冲之路555号, Shanghai 201203 (CN)。 刘华清(LIU, Huaqing) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区祖冲之路555号, Shanghai 201203 (CN)。
- (74) 代理人: 上海开祺知识产权代理有限公司(SHANGHAI KAIJI INTELLECTUAL PROPERTY AGENT CO., LTD.); 中国上海市南丹东路188号1501室, Shanghai 200030 (CN)。

[见续页]

(54) Title: THE MEDICAL USE OF PAEONIFLORIN

(54) 发明名称: 芍药甙的医药用途



(57) Abstract: The present invention provides the medical use of paeoniflorin in the manufacture of medicaments for treating and preventing apoplexy, Parkinson's diseases and other nervous system diseases.

(57) 摘要:

本发明提供芍药甙的医药用途:

芍药甙在制备治疗和预防中风及帕金森病等神经系统疾病中的应用。

WO 2006/002589 A1



(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明:

- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则4.17(ii))对以下指定国AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO 专利 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 专利 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

- 关于申请人有权要求在先申请的优先权(细则4.17(iii))对以下指定国US
- 发明人资格(细则4.17(iv))仅对US

本国际公布:

- 包括国际检索报告。

所引用双字母代码及其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

芍药甙的医药用途

技术领域

本发明涉及一种非嘌呤腺苷受体-1 (Adenosine Receptor-1, A₁R) 的选择性激动剂——芍药甙的医药用途, 具体指该化合物可选择性激动 A₁R 受体, 发挥治疗和预防中风及帕金森病等神经系统疾病的作用, 同时消除了传统的嘌呤类 A₁R 激动剂的严重心血管副作用。

背景技术

芍药甙是一种天然活性化合物, 源于毛茛科植物白芍、赤芍、及牡丹的根。其在源植物中的含量丰富, 以山东曹县产白芍为例, 该活性单体成分达 1.95%; 更甚之, 芍药甙在牡丹根中的含量高达 7%。再者, 其源植物地域分布广泛, 易于人工栽培, 适于大规模产业化种植。药效学研究表明, 其具有镇痛、镇静、解痉、抗炎、抗溃疡、扩张冠状动脉、对抗急性心肌缺血, 以及抑制血小板凝聚等诸多方面的药效, 且安全范围大。

大量研究发现, A₁R 受体激动剂一方面可激活突触前 A₁R 受体, 抑制谷氨酸等兴奋性氨基酸的释放, 缓解细胞的兴奋毒性及 Ca²⁺超负荷; 另一方面, 作用于突触后 A₁R 受体, 使 K 通道的电导增加, 通过限制细胞膜去极化抑制神经元的兴奋。从而, 发挥明显的神经保护作用 (Heron A, Lekieffre D, Le Peillet E, Lasbennes F, Seylaz J, Plotkine M, Boulu RG, Effects of an A₁ adenosine receptor agonist on the neurochemical, behavioral and histological consequences of ischemia. Brain Res. 1994; 641(2): 217-24., Goldberg MP, Monyer H, Weiss JH, Choi DW., Adenosine reduces cortical neuronal injury induced by oxygen or glucose deprivation in vitro. Neurosci Lett. 1988; 9(3): 323-7., Mori M, Nishizaki T, Okada Y., Protective effect of adenosine on the anoxic damage of hippocampal slice. Neuroscience. 1992; 46(2): 301-7., Von Lubitz DK, Beenhakker M, Lin RC, Carter MF, Paul IA, Bischofberger N, Jacobson KA., Reduction of postischemic brain damage and memory deficits following treatment with the selective adenosine A₁ receptor agonist. Eur J Pharmacol. 1996; 302(1-3): 43-8.), 但 A₁R 受体激动剂严重的心血管副作用, 很大程度上限制了其临床应用(Collis MG, Hourani SM., Adenosine receptor subtypes. Trends Pharmacol Sci. 1993; 14(10): 360-6. Review., Daval JL, Nehlig A, Nicolas F., Physiological and pharmacological properties of adenosine: therapeutic implications. Life Sci. 1991; 49(20): 1435-53. Review.)。近年来, 国际医药界投入大量的人力、物力, 试图寻找神经保护作用确切, 心血管副作用小的选择性 A₁R 受体激动剂。

本研究基于配体—受体竞争性结合试验的高通量筛选平台，首次发现芍药甙选择性竞争结合 A₁R 受体，其化学结构区别于传统的 A₁R 受体激动剂，为一种新型的非嘌呤类 A₁R 受体选择性激动剂；经典的试验动物模型证实，芍药甙具有治疗和预防中风及帕金森病等神经系统疾病的作用；进一步的研究证明，其心血管副作用小，具有临床应用价值。

中风和帕金森病等神经系统疾病是对人类健康威胁最大的杀手之一，在老年人中患病率和致残率居高不下。仅以中风为例，45—89 岁的群体中，其发生率约为 0.35%。其中约 20% 中风患者的存活期低于 1 个月；存活期超过 6 个月的患者中，超过 30% 的生活不能自理。个人、家庭、及社会承担着极大的心理上和经济上的双层负担。

本发明提供了一种治疗和预防中风及帕金森病等神经系统疾病的新型药物，具有巨大的社会效益和经济效益。

发明内容

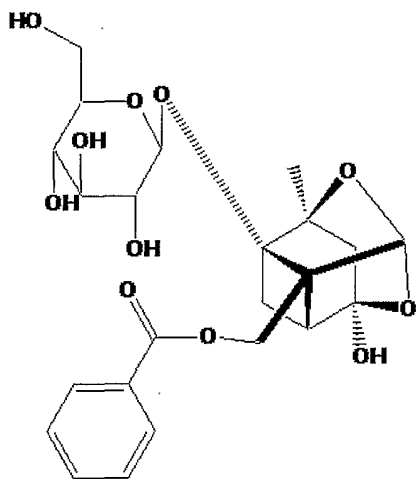
1. 本发明的目的在于公开芍药甙是一种非嘌呤类 A₁ 受体选择性激动剂。
2. 本发明的又一目的在于提供芍药甙在预防和治疗中风和帕金森症等神经系统疾病中的应用。

本发明采用化学方法从毛茛科植物白芍、赤芍、及牡丹的根中提取分离出一种天然活性化合物芍药甙，经过药理试验发现芍药甙作为一种非嘌呤类腺苷受体—1 的选择性激动剂，可以在制备预防和治疗中风和帕金森症等神经系统疾病药物中得到应用。

本发明采用白芍、赤芍、及牡丹的根为原料，制备过程如下：

白芍、赤芍、或牡丹的根，经乙醇回流提取，得干浸膏，浸膏加水充分溶解，通过大孔树脂，水洗脱至糖反应阴性，加 2 倍柱体积乙醇洗脱，得浸膏，经硅胶柱层析分离得纯化合物芍药甙。

芍药甙化学结构如下：



它的分子式为： $C_{23}H_{28}O_{11}$ ，分子量为 480.48 化学名为 β -D-Glucopyranoside,56-[(benzoyloxy)methyl]tetrahydro-5-hydroxy-2-methyl-2,5-methano-1H-3,4-dioxacyclobuta[cd]Pentalen-1a(2H)-yl,[1 α ,2 β ,3 α ,5 α ,5b α]]。

芍药甙的提取纯化方法参考文献（金继曙 都述虎 种明才 用大孔吸附树脂分离白芍总甙，中国中药杂志 1994 年 01 期 1994. VOL.19 NO.1 : 31）。

本发明采用上述方法提取获得的芍药甙进行了相关的药理药效试验。

一. 芍药甙的配体—受体竞争性结合试验：

采用大鼠大脑皮层突触膜，将大鼠断头后，分离出大脑皮层，随后在 1: 15 (W/V) 的蔗糖溶液中充分匀浆，离心，取上清离心。弃上清后，用 1: 30 (W/V) 的 Tris-HCl 缓冲液 (50 mM, PH 7.4) 重悬沉淀，匀浆洗涤后再离心，洗涤过程重复 3 次后，用 1: 5 (W/V) 的 Tris-HCl 缓冲液 (50 mM, PH 7.4) 再次重悬沉淀，分装保存于 -80°C ，并采用 Bradford 法测定蛋白浓度 (Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–254.)，上述操作均在 4°C 进行。

用上述模型分别验证芍药甙与 A_{1R} 和 A_{2aR} 受体混合型激动剂 [^3H]-乙基酰胺腺苷 ([^3H]-NECA) 及 A_{1R} 受体选择性激动剂 [^3H]-CCPA 的竞争性结合。

实验证明芍药甙可竞争结合 [^3H]-CCPA，同时对 [^3H]-NECA 的竞争结合具有典型的双位点竞争特性 ($EC_{50_1}=13.9\text{nM}$, $EC_{50_2}=5.00\mu\text{M}$)。结果提示芍药甙同时结合 A_{1R} 和 A_{2aR} 受体；并具有较高的选择性 ($EC_{50_2}/EC_{50_1}=360$ 倍)，低浓度选择性结合 A_{1R} ，高浓度结合 A_{2aR} 。

二. 芍药甙预防和治疗中风的药效试验：

采用可逆性大鼠中动脉栓塞法分别制成暂时性和永久性两种局灶脑缺血模型 (Belayev L,

Alonso OF, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model. Stroke, 1996; 27: 1616-22., Takano K, Tatlisumak T, Bergmann AG, Gibson DG 3rd, Fisher M. Reproducibility and reliability of middle cerebral artery occlusion using a silicone-coated suture (Koizumi) in rats. J Neurol Sci. 1997; 153: 8-11.)，分别检验芍药甙对脑缺血大鼠神经缺损体征及对大脑损伤体积的影响。腹腔注射氯醛糖麻醉，右股动脉插管监测血压，保持36.5~37.5℃肛温，颈部切口，游离颈外动脉，电凝切断其分支动脉，并在远端结扎，取颈头部呈鼓锤状4~0号的单丝尼龙线，由颈外动脉经颈内动脉插入大脑前动脉以阻断大脑中动脉起始处，同时也阻断了大脑前动脉以阻断大脑中动脉起始处，同时也阻断了大脑前、后动脉及颈内动脉的侧支血流。暂时性MCAO模型组，缺血1.5hr后拔出栓线，再灌注22.5hr，于缺血后15分钟和6小时，分别皮下注射生理盐水、不同剂量的芍药甙；永久性MCAO模型组，不拔出栓线，连续缺血24hr，于缺血后15分钟和6小时，分别皮下注射生理盐水、芍药甙、和DPCPX + 芍药甙，其中DPCPX在缺血前15min预先给予。

根据Syderff神经缺损体征判别法进行综合等级评分(Sydserrf SG,Borelli AR,Green AR,Cross AJ., Effect of NXY-059 on infarct volume after transient or permanent middle cerebral artery occlusion in the rat; studies on dose, plasma concentration and therapeutic time window. Br J Pharmacol. 2002;135(1):103-12.)。根据前肢弯曲、自发旋转、及异侧搔挠刺激反应缺失的程度，分别评以0-2分(0=正常，2=严重)。此外，肢体异侧旋转的扭矩也被作为一个单独的指标，评以0-2分(0=大扭矩，2=小扭矩)。因此损伤评分值在0-8之间。

试验结果表明芍药甙在中剂量浓度(5mg.kg⁻¹s.c.)下明显改善暂时性中动脉栓塞大鼠的神经症状，同时显著降低缺血引起的大脑皮层下核团及大脑皮层的损伤；芍药甙剂量依赖性的减轻缺血引起的大脑皮层下核团及大脑皮层的损伤，且此作用可被选择性 A₁R 受体拮抗剂 DPCPX 所拮抗。提示芍药甙可能通过激活 A₁R 受体，发挥神经保护作用，可用于中风的临床治疗和预防。

三. 芍药甙在预防和治疗帕金森病(PD)的应用:

采用 N-甲基苯四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro-pyridine, MPTP) 诱导的小鼠 PD 模型,分别检测芍药甙对 PD 模型小鼠爬杆能力及中脑黑质多巴胺神经元缺失的影响。用 20-25g 雄性 C57Bl/6J 小鼠,实验开始前测定按小鼠爬杆时间,以按爬杆时间随机分 5 组,每组 8 只。用低剂量和中剂量芍药甙分别连续 11 天皮下注射给药,于实验第 8 天以 2 小时

为间隔腹腔注射 (ip) 4 次 N-甲基苯四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro-pyridine, MPTP) 诱导小鼠 PD 模型。

通过爬杆法测定小鼠运动能力, 将小鼠头向下, 置于长 55cm, 直径为 8mm 的垂直粗糙的杆上, 记录小鼠从杆向下爬至四肢全部接触地面的时间(Hamaue N, Minami M, Terado M, Hirafuji M, Endo T, Machida M, Hiroshige T, Ogata A, Tashiro K, Saito H, Parvez SH. Comparative study of the effects of isatin, an endogenous MAO-inhibitor, and selegiline on bradykinesia and dopamine levels in a rat model of Parkinson's disease induced by the Japanese encephalitis virus. *Neurotoxicology*. 2004 Jan;25(1-2):205-13.)。

试验结果表明芍药甙中剂量组 ($5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{s.c.}$) 显著改善 MPTP 引起的运动功能障碍, 对抗 MPTP 诱发的多巴胺能神经元的缺失, 提示芍药甙可用于帕金森病的临床治疗和预防。

四. 药甙对清醒大鼠血压的影响

以清醒大鼠为研究对象, 采用尾套传感器, 将压力脉冲传至光电三极管, 转换为相应的血压和心率值。待大鼠恢复平静后, 记录其血压和心率, 作为基础值。随后, 经尾静脉分别注射生理盐水、不同剂量芍药甙和利血平 (reserpine)。

记录给药前 (0 min) 及给药后 (5min 至 2hr) 的血压和心率的变化。

试验结果显示不同剂量的芍药甙 ($10, 40, 160\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.v.) 均不影响大鼠血压和心率, 显然在其发挥治疗和预防中风及帕金森病等神经系统疾病的治疗剂量范围内, 无显著的心血管副作用。

附图说明:

图 1.1 是分别用不同浓度的芍药甙、CPA (选择性 A_1R 受体激动剂) 和 CV-1808 (选择性 $A_{2A}R$ 受体激动剂) 竞争 $[3H]$ -NECA (A_1R 和 $A_{2A}R$ 混合型激动剂) 在大鼠大脑皮层突触膜上的结合位点。结果显示芍药甙剂量依赖性地竞争 $[3H]$ -NECA 于大鼠大脑皮层突触膜上的结合位点, 并具有双位点竞争特性 ($EC_{50_1}=13.9\text{nM}$, $EC_{50_2}=5.00\mu\text{M}$)。

图 1.2 是分别用不同浓度的芍药甙竞争 $[3H]$ -CCPA (选择性 A_1R 受体激动剂) 在大鼠大脑皮层突触膜上的结合位点。结果显示芍药甙剂量依赖性地竞争 $[3H]$ -CCPA 于大鼠大脑皮层突触膜上的结合位点 ($EC_{50}=19.8\text{nM}$)。

图 2.1 (a) 芍药甙 ($2.5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 对暂时性 MCACO 大鼠神经症状的改善 ($n=6$, $*p<0.05$, $**p<0.01$ vs Sal); (b) 芍药甙 ($2.5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 对暂时性 MCACO

大鼠皮层下核团及皮层的保护 (n=6, *p<0.05, **p<0.01 vs Sal)。

图 2.2 芍药甙 (2.5 mg·kg⁻¹, 5 mg·kg⁻¹, 10 mg·kg⁻¹ s.c.) 对暂时性 MCACO 大鼠皮层下核团及皮层的保护, DPCPX (0.25 mg·kg⁻¹ s.c.) 阻断芍药甙的保护作用 (n=6, * p<0.05, ** p<0.01 vs Sal; # p<0.05 vs 芍药甙 10 mg·kg⁻¹ s.c.)。

图 3.1 芍药甙 (PF) (2.5 mg·kg⁻¹, 5 mg·kg⁻¹ s.c.) 对 MPTP 引起小鼠运动徐缓的影响。

图 3.2 芍药甙 (PF) (2.5 mg·kg⁻¹, 5 mg·kg⁻¹ s.c.) 对 MPTP 引起的多巴胺能神经元的缺失及纹状体多巴胺神经纤维的减少的影响。

图 4.1 芍药甙 (10, 40, 160mg kg⁻¹, i.v.) 不影响清醒大鼠血压的影响(n=6; *p<0.05, **p<0.01)。

图 4.2 芍药甙 (10, 40, 160mg kg⁻¹, i.v.) 不影响清醒大鼠心率的影响(n=6; *p<0.05, **p<0.01)。

从上述实验可以看出, 本发明所提供的化合物芍药甙竞争结合 A₁R 受体, 并具有高选择性。就其化学结构而言, 区别于传统的 A₁R 受体激动剂, 为一种新型的非嘌呤类 A₁R 受体激动剂。通过相关动物实验确证, 芍药甙具有治疗和预防中风及帕金森病等神经系统疾病的作用; 进一步的研究证明, 其心血管副作用小, 具有临床应用价值, 可以在中风及帕金森病等神经系统疾病的治疗和预防中得以应用。

具体实施方式

实施例 1: 芍药甙是一种非嘌呤类 A₁ 受体的选择性激动剂

1.1. 大鼠大脑皮层突触膜制备

将大鼠断头后, 立即分离出大脑皮层, 置于冰冷的生理盐水。随后, 在 1: 15 (W/V) 的蔗糖溶液 (0.32 mol/L) 中充分匀浆, 离心 (1,000×g, 10 分钟), 取上清离心 (30,000×g, 30 分钟)。弃上清后, 用 1: 30 (W/V) 的 Tris-Hcl 缓冲液 (50 mM, PH 7.4) 重悬沉淀, 匀浆洗涤后再离心 (48,000×g, 10 分钟)。此洗涤过程重复 3 次后, 用 1: 5 (W/V) 的 Tris-Hcl 缓冲液 (50 mM, PH 7.4) 再次重悬沉淀, 分装保存于 -80℃, 并采用 Bradford 法测定蛋白浓度上述操作均在 4℃ 进行。

1.2. 配体-受体竞争结合

选用 A₁R 和 A_{2a}R 受体混合型激动剂 [3H]-NECA (NEN; 15.3 Ci/mmol=0.57 TBq/mmol) 以及 A₁R 受体选择性激动剂 [3H]-CCPA (NEN; 30 Ci/mmol=2.9 PBq/mol), 检验芍药甙与 A₁R 和 A_{2a}R 受体的结合。反应体系为 200μL, 其中预试药物 5μL, 分别为芍药甙、A₁R 选择性激动剂

(CPA) 和 $A_{2a}R$ 受体选择性激动剂 (CV-1808), 终浓度均从 $0, 10^{-10}$ 到 10^{-4} mol/L; 大脑皮层突触膜悬液 $20\mu\text{L}$; 25nmol/L 的 $[3\text{H}]\text{-NECA}$ 或 0.2nmol/L 的 $[3\text{H}]\text{-CCPA}$ $20\mu\text{L}$; 分析缓冲液 (50mmol/L Tris-HCl, 1mmol EDTA, 0.5% BSA, pH 7.4) $155\mu\text{L}$ 。样品于 25°C 孵育 3 小时后, 采用细胞收集器抽吸反应液, 使之透过 GF/C 滤膜, 以中止反应, 再用过滤缓冲液 (50mmol/L Tris-HCl, 0.1% BSA, pH 7.4) 冲洗滤膜 3 次, 随后于 40°C 干燥 1 小时。再将滤膜装入密封袋, 加入 5mL MicroScint 20, 压匀后加以封条, 进行放射活性计数 (Micro β , PerkinElmer)。统计结果按双位点竞争模型进行拟合。

1.3. 试验结果

芍药甙可竞争结合 $[3\text{H}]\text{-CCPA}$, 其 $\text{EC}_{50}=19.8\text{nM}$; 同时对 $[3\text{H}]\text{-NECA}$ 的竞争结合具有典型的双位点竞争特性 ($\text{EC}_{50_1}=13.9\text{nM}$, $\text{EC}_{50_2}=5.00\mu\text{M}$)。结果提示芍药甙同时结合 A_1R 和 $A_{2A}R$ 受体; 并具有较高的选择性 ($\text{EC}_{50_2}/\text{EC}_{50_1}=360$ 倍), 低浓度选择性结合 A_1R , 高浓度结合 $A_{2A}R$ 。

实施例 2: 芍药甙在预防和治疗中风中的应用

2.1. 动物模型及给药方法

采用可逆性大鼠中动脉栓塞法分别制成暂时性和永久性两种局灶脑缺血模型, 腹腔注射氯醛糖 $350\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 麻醉, 右股动脉插管监测血压, 保持 $36.5\sim 37.5^\circ\text{C}$ 肛温, 颈部切口, 游离颈外动脉, 电凝切断其分支动脉, 并在远端结扎, 取颈头部呈鼓锤状 4~0 号的单丝尼龙线, 由颈外动脉经颈内动脉插入大脑前动脉以阻断大脑中动脉起始处, 同时也阻断了大脑前动脉以阻断大脑中动脉起始处, 同时也阻断了大脑前、后动脉及颈内动脉的侧支血流。暂时性 MCAO 模型组, 缺血 1.5hr 后拔出栓线, 再灌注 22.5hr, 于缺血后 15 分钟和 6 小时, 分别皮下注射生理盐水 ($2\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)、芍药甙 ($2.5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$); 永久性 MCAO 模型组, 不拔出栓线, 连续缺血 24hr, 于缺血后 15 分钟和 6 小时, 分别皮下注射生理盐水 ($2\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)、芍药甙 ($2.5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、和 DPCPX ($2.5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) + 芍药甙 ($10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 其中 DPCPX 在缺血前 15min 预先给予。

2.2. 指标测定

2.2.1. 神经缺损评价标准

根据 Syderff 神经缺损体征判别法进行综合等级评分 根据前肢弯曲、自发旋转、及异侧搔挠刺激反应缺失的程度, 分别评以 0—2 分 (0=正常, 2=严重)。此外, 肢体异侧旋转的扭矩也被作为一个单独的指标, 评以 0—2 分 (0=大扭矩, 2=小扭矩)。因此损伤评分

值在 0—8 之间。

2.2.2. 脑缺血的功能性酶组织化学染色——TTC 染色

将大鼠断头后，立即取出大脑， -20°C 储存 15min，连续冠状切片（片厚 2mm）。脑片置于 1% TTC (PH7.2) 染色， 37°C 孵育 10min，倾去染色液，固定于 4% 甲醛溶液。数码相机拍照，对脑切片的皮层及皮层下损伤区进行像素点扫描 (Adobe ImageReady 7.0)，计算出皮层损伤区，皮层下损伤区及总损伤区所占的面积百分比，进一步参照全脑体积，推算皮层损伤区，皮层下损伤区及总损伤区的体积。

2.3. 试验结果

实验结果显示芍药甙 ($5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{s.c.}$) 明显改善暂时性 MCAO 大鼠的神经症状，同时显著降低缺血引起的大脑皮层下核团及大脑皮层的损伤；芍药甙 ($2.5, 5, 10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{s.c.}$) 剂量依赖性的减轻缺血引起的大脑皮层下核团及大脑皮层的损伤，且此作用可被选择性 A_1R 受体拮抗剂 DPCPX 所拮抗。提示芍药甙可能通过激活 A_1R 受体，发挥神经保护作用，可用于中风及其后遗症中的临床治疗和预防。

实施例 3：芍药甙在预防和治疗帕金森病的应用

3.1. 动物模型及给药方法

20-25g 雄性 C57Bl/6J 小鼠，实验开始前测定按小鼠爬杆时间，以按爬杆时间随机分 5 组，每组 8 只。芍药甙 (2.5mg kg^{-1} , 5mg kg^{-1}) 连续 11 天皮下注射给药，于实验第 8 天以 2 小时为间隔腹腔注射 (ip) 4 次 N-甲基苯四氢吡啶 (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro-pyridine, MPTP) 诱导小鼠 PD 模型。给药方案如下：

组别	给药	剂量	ip MPTP (on day 8)
对照组	Saline	0.1ml/10g	
模型组	Saline	0.1ml/10g	4 x 20mg/kg·d
低剂量组	芍药甙	2.5mg/kg	4 x 20mg/kg·d
中剂量组	芍药甙	5mg/kg	4 x 20mg/kg·d

3.2. 指标测定

3.2.1 爬杆法测定小鼠运动能力

将小鼠头向下，置于长 55cm，直径为 8mm 的垂直粗糙的杆上，记录小鼠从杆向下爬至

四肢全部接触地面的时间

3.2.2 中脑黑质多巴胺神经元免疫荧光染色——酪氨酸羟化酶 (Tyrosine hydroxylase, TH) 染色

心脏灌注 4% 多聚甲醛进行前固定, 随后取出大脑, 4% 甲醛溶液后固定一周。于 -20°C 连续冠状切片 (片厚 $30\ \mu\text{m}$), 以酪氨酸羟化酶 (Tyrosine hydroxylase, TH) 作为多巴胺神经元的特异性标记。一抗为单克隆小鼠 TH 抗体 (1:1000, Sigma), 二抗为 Alexa fluor 488 荧光标记山羊抗小鼠 (1:1000, Molecular Probes)。荧光显微镜 (Olympus DP70) 拍照, 并对黑质 TH 阳性细胞计数。

3.3. 试验结果

芍药甙 ($5\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\ \text{s.c.}$) 明对抗 MPTP 引起的多巴胺能神经元的缺失及运动功能障碍, 提示芍药甙可用于帕金森病的临床治疗和预防。

实施例 4: 芍药甙不影响清醒大鼠血压

4.1. 动物模型及给药方法

以清醒大鼠为研究对象, 采用尾套传感器, 将压力脉冲传至光电三极管, 转换为相应的血压和心率值。待大鼠恢复平静后, 记录其血压和心率, 作为基础值。随后, 经尾静脉分别注射生理盐水、芍药甙 ($10, 40, 160\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$) 和利血平 (reserpine)。

4.2. 指标测定

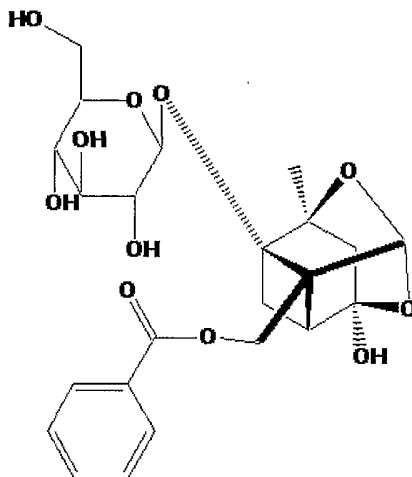
记录给药前 (0 min) 及给药后 (5min 至 2hr) 的血压和心率的变化。

4.3. 试验结果

芍药甙 ($10, 40, 160\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}, \text{i.v.}$) 不影响大鼠血压和心率, 显然在其发挥治疗和预防中风及帕金森病等神经系统疾病的治疗剂量范围内, 无显著的心血管副作用。

权利要求

- 1、一种从毛茛科植物白芍、赤芍、牡丹根中提取分离结构如下的芍药甙的医药用途



其特征在于芍药甙作为一种非嘌呤类 A₁ 受体选择性激动剂在药物中的用途。

2. 根据权利要求 1 所述的芍药甙的医药用途, 其特征在于在制备治疗和预防神经系统疾病的药物中的应用。

3. 根据权利要求 2 所述的芍药甙的医药用途, 其特征在于在制备治疗和预防中风和中风后遗症的药物中的应用。

4. 根据权利要求 2 所述的芍药甙的医药用途, 其特征在于在制备治疗和预防帕金森症及其他相关的神经退行性病变的药物中的应用。

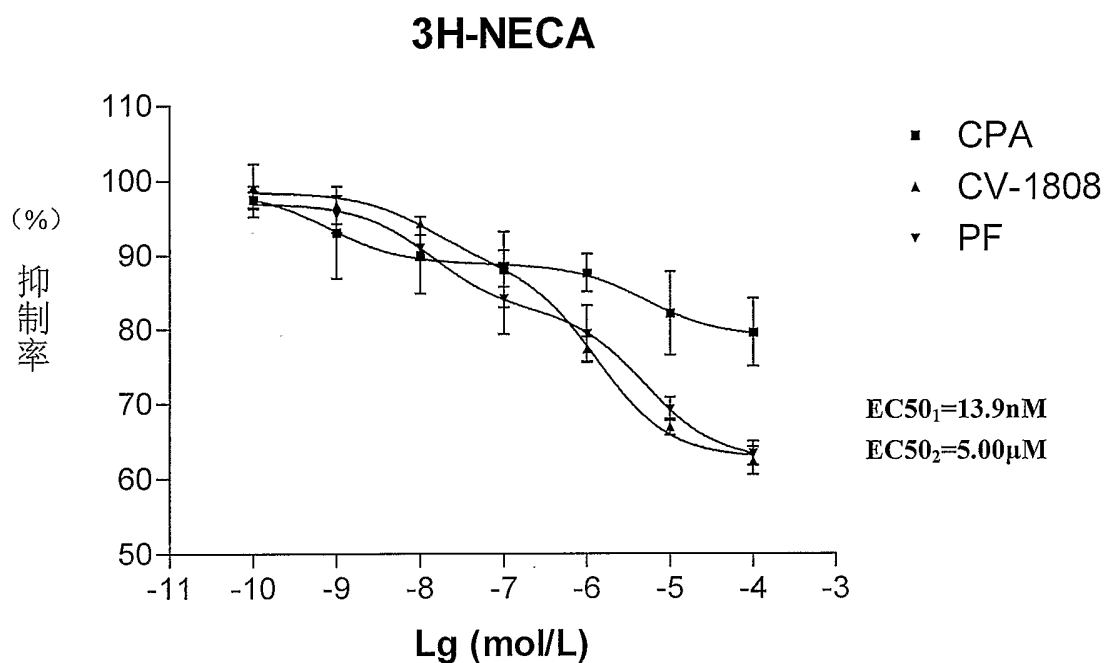


图 1.1

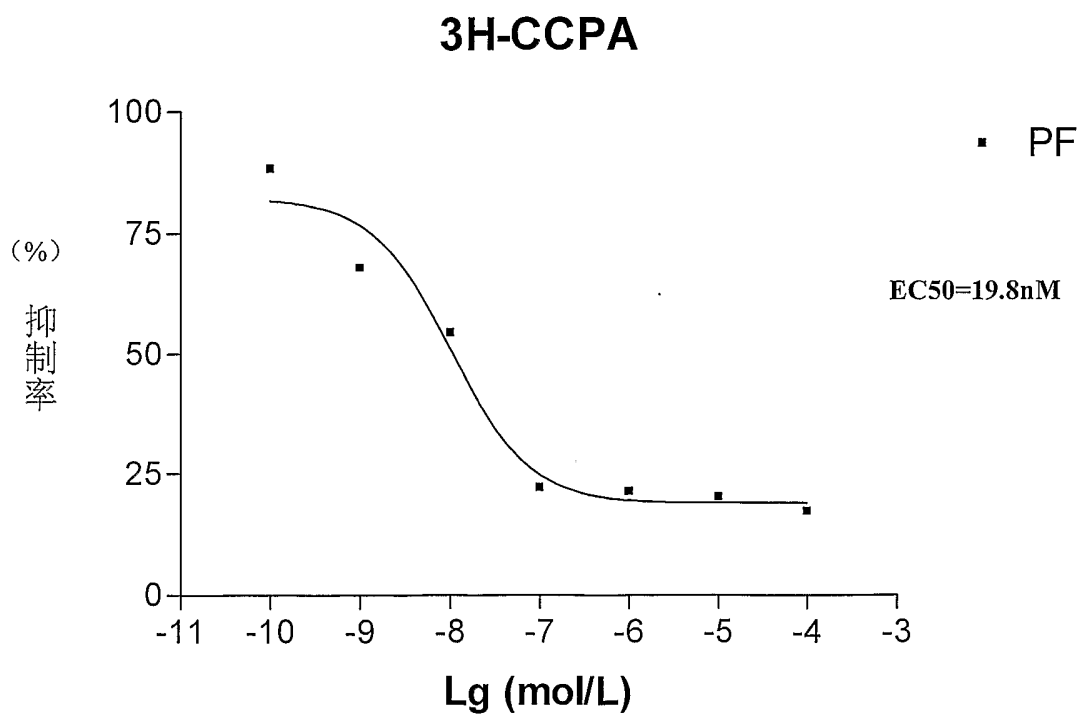


图 1.2

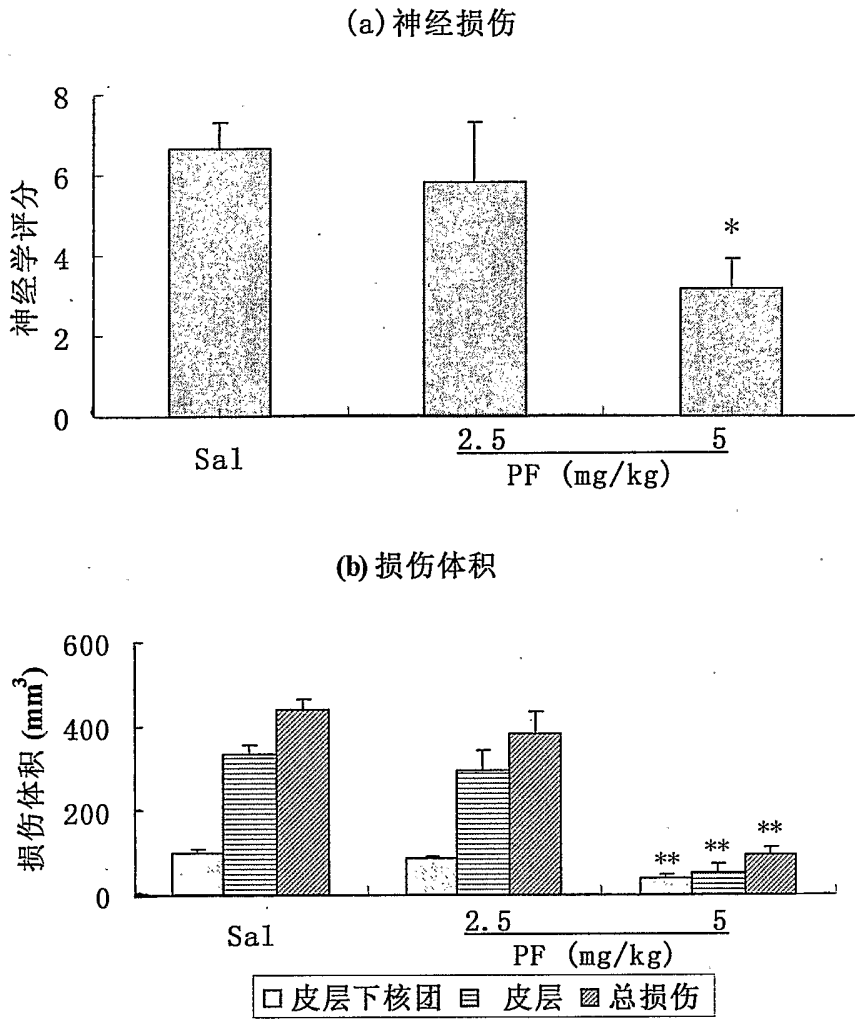


图 2.1

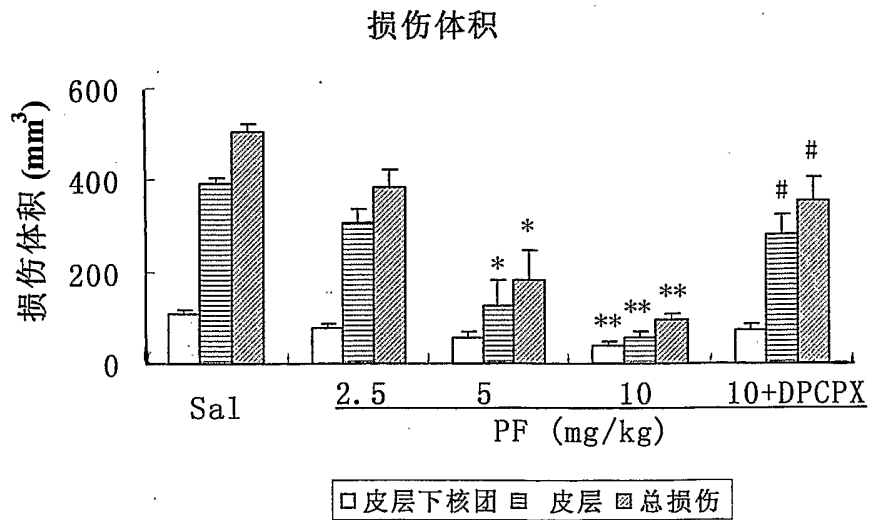


图 2.2

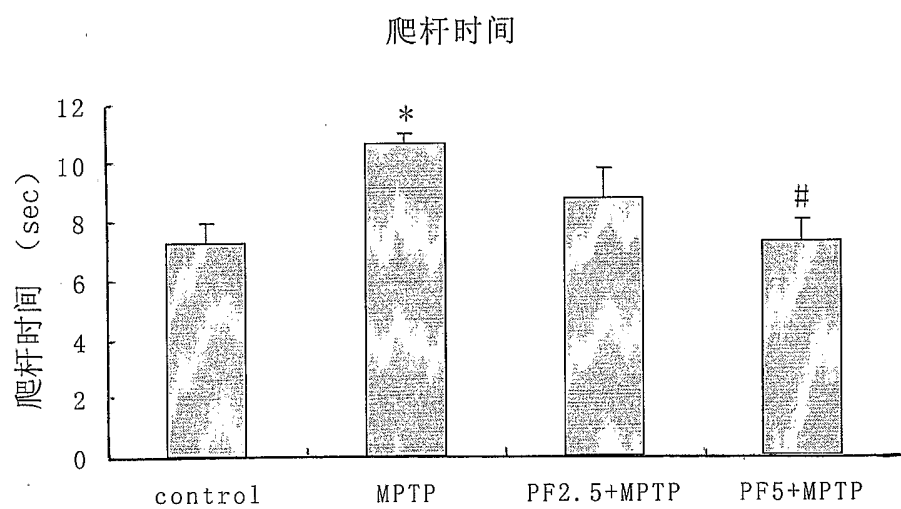


图 3.1

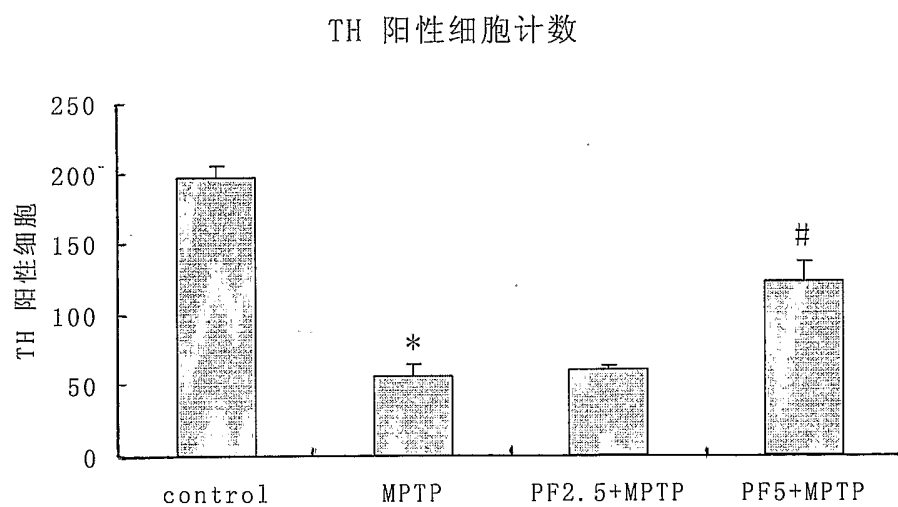


图 3.2

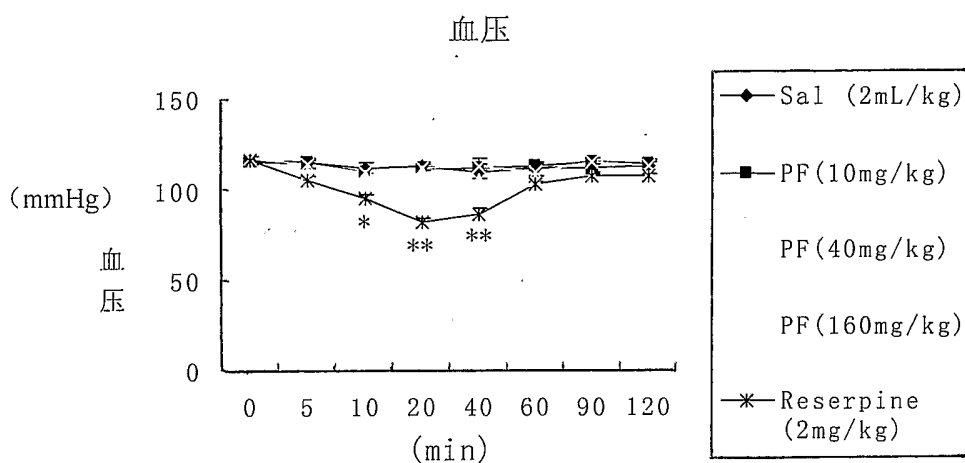


图 4.1

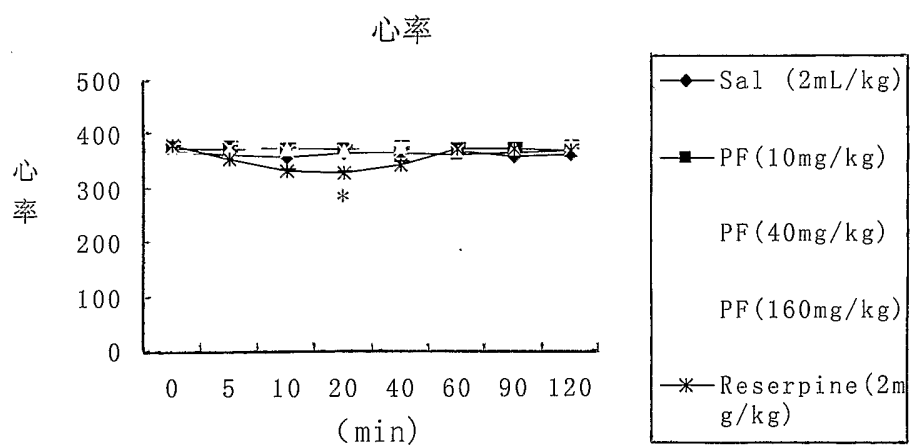


图 4.2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2005/000929

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁷: A61K31/7048, A61P25/00, A61P25/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

CPRS

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, PAJ, Chinese Pharmaceutical Abstract, CNKI(CN), CA, MEDLINE
paeoniflorin, adenosine, A1, parkinson, apoplexy, blood-stroke, cataptonsis, coup de sang, stroke, theoplegia,

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JOURNAL OF CHINESE MEDICINAL MATERIALS Feb,2002 Vol.23 No.2 p95-97 Protective Effect of Total Paeony Glycoside Against Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury In Mice. Yang Jun et.al.	1-3
A	CHINESE TRADITIONAL PATENT MEDICINE, July,2003 Vol.25 No.7 p596 Determination of paeoniflorin which Is In the Jianxing granule by HPLC. Chen Siping et al	1-2,4
A	Clin-Exp-Pharmacol-Physiol. October 1999 26(10):815-6, Paeoniflorin reverses guanethidine-Induced hypotension via activation of central adenosine A1 receptors In Wintar rats. Cheng,-J-T et.al.MEDLINE abstract	1-4

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

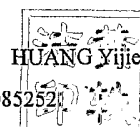
“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
21.Sep.2005(21.09.2005)

Date of mailing of the international search report
3 . SEP 2005 (3 . 1 0 . 2 0 0 5)

Name and mailing address of the ISA/CN
The State Intellectual Property Office, the P.R.China
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China
100088
Facsimile No. 86-10-62019451


Authorized officer



Telephone No. 86-10-62085252

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2005/000929

A. 主题的分类 IPC ⁷ : A61K31/7048, A61P25/00, A61P25/16 按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) IPC: A61K, A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 中国专利文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) WPI,EPODOC,PAJ, CNKI(CN), 中国药理学文摘库(CN), CHEMICAL ABSTRACT(US), MEDLINE. 芍药苷, 芍药甙, 腺苷受体, A1, 中风, 帕金森, paeoniflorin, adenosine, parkinson, apoplexy, blood-stroke, catapsois, coup de sang, stroke, theoplegia,		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	中药材 2000 年 2 月第 23 卷第 2 期, 杨军等人《赤芍总苷对小鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用》第 95-97 页	1-3
A	中成药 2003 年 7 月第 25 卷第 7 期, 陈四平等《高效液相色谱法测定健行颗粒中芍药苷的含量》第 596 页	1-2、4
A	Clin-Exp-Pharmacol-Physiol.1999 年 10 月 26(10):815-6, Paeoniflorin reverses guanethidine-Induced hypotension via activation of central adenosine A1 receptors In Wistar rats. Cheng, J-T et.al MEDLINE 摘要	1-4
<input type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 21.9 月 2005 (21.09.2005)	国际检索报告邮寄日期 13·10月2005 (13·10·2005)	
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451	授权官员  电话号码: (86-10) 62085252	