



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106604737 B

(45)授权公告日 2020.07.21

(21)申请号 201580026976.9

(22)申请日 2015.03.23

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 106604737 A

(43)申请公布日 2017.04.26

(30)优先权数据  
61/968,667 2014.03.21 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2016.11.21

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2015/021994 2015.03.23

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02015/143429 EN 2015.09.24

(73)专利权人 宾夕法尼亚大学董事会  
地址 美国宾夕法尼亚州

(72)发明人 刘仁玉

(74)专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限公司 11287  
代理人 路勇

(51)Int.Cl.  
A61K 47/40(2006.01)  
A61K 31/35(2006.01)

(56)对比文件  
CN 103313601 A, 2013.09.18,  
CN 103313601 A, 2013.09.18,  
CN 102186503 A, 2011.09.14,  
王艳晶等. 紫珠属植物的化学成分及生物活性研究进展.《中草药》.2008,第39卷(第01期),  
133-138.

审查员 江雪芹

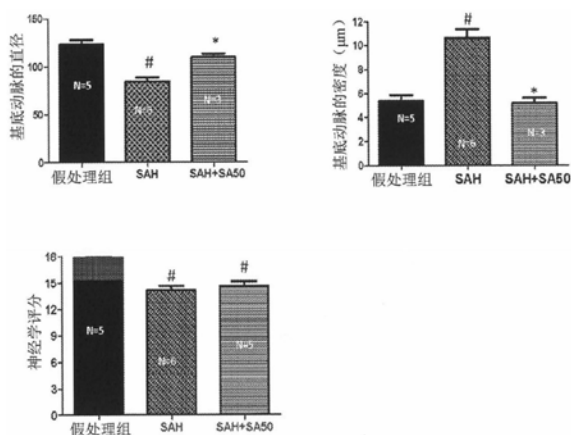
权利要求书2页 说明书32页 附图23页

### (54)发明名称

鼠尾草素组合物和其用途

### (57)摘要

本发明涉及鼠尾草素组合物和其用途。具体来说,本发明涉及投与鼠尾草素组合物来治疗与血管收缩、血管阻塞或血流和自调节破坏相关的疾病和病症。举例来说,鼠尾草素组合物可投与患有心跳骤停、蛛网膜下出血、中风、脑血管痉挛、脑低氧/缺血、脑动脉阻塞或任何涉及自调节减损的病况的个体。



1. 一种鼠尾草素A的医药组合物,其包含:鼠尾草素A和环糊精的水溶液,所述环糊精浓度在1% (w/v) 与50% (w/v) 之间,其中所述环糊精为2-羟丙基-环糊精,且所述鼠尾草素A浓度为至少50 $\mu$ g/mL。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述环糊精为2-羟丙基- $\beta$ -环糊精 (HPBCD)。

3. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述环糊精浓度为约20%。

4. 一种根据权利要求1到3中任一项所述的组合物的用途,其用于制备用于在个体中治疗与脑血管扩张相关的疾病的药剂。

5. 一种根据权利要求1到3中任一项所述的组合物的用途,其用于制备在个体中产生脑血管扩张的药剂。

6. 一种根据权利要求1到3中任一项所述的组合物的用途,其用于制备用于在罹患或遭受心跳骤停的个体中治疗与心跳骤停相关的神经损伤或增加生存的可能性的药剂,所述治疗包含:向所述个体投与治疗有效量的所述组合物。

7. 根据权利要求6所述的用途,其中所述投与为鼻内投与。

8. 根据权利要求6所述的用途,其中所述组合物在所述心跳骤停期间投与。

9. 根据权利要求6所述的用途,其中所述组合物在进行心肺复苏CPR的同时投与。

10. 根据权利要求6所述的用途,其中所述组合物在已进行心肺复苏CPR之后投与。

11. 根据权利要求6所述的用途,其中所述组合物向经历冠状动脉绕道手术的个体投与。

12. 根据权利要求6所述的用途,其中所述个体为新生儿个体。

13. 根据权利要求6所述的用途,其中所述个体为人类。

14. 一种根据权利要求1到3中任一项所述的组合物的用途,其用于制备用于在罹患或遭受中风的个体中治疗中风的药剂,所述治疗包含:向所述个体经鼻内投与治疗有效量的所述组合物。

15. 根据权利要求14所述的用途,其中所述组合物在所述中风期间或之后投与。

16. 根据权利要求14所述的用途,其中所述个体为新生儿个体。

17. 根据权利要求14所述的用途,其中所述个体为人类。

18. 一种根据权利要求1到3中任一项所述的组合物的用途,其用于制备用于在罹患或遭受脑动脉阻塞或脑低氧/缺血的个体中治疗脑动脉阻塞的药剂,所述治疗包含:向所述个体投与治疗有效量的所述组合物。

19. 根据权利要求18所述的用途,其中所述投与为鼻内投与。

20. 根据权利要求18所述的用途,其中所述组合物在所述个体罹患所述脑低氧/缺血或脑动脉阻塞的同时或在所述个体遭受所述脑低氧/缺血或脑动脉阻塞之后投与。

21. 根据权利要求18所述的用途,其中所述个体为新生儿个体。

22. 根据权利要求18所述的用途,其中所述个体为人类。

23. 一种根据权利要求1到3中任一项所述的组合物的用途,其用于制备用于在患有蛛网膜下出血的个体中治疗脑血管痉挛的药剂,所述治疗包含:向所述个体投与治疗有效量的所述组合物。

24. 根据权利要求23所述的用途,其中所述投与为静脉内投与。

25. 根据权利要求23所述的用途,其中所述投与为鼻内投与。

26. 根据权利要求23所述的用途,其中所述个体为新生个体。
27. 根据权利要求23所述的用途,其中所述个体为人类。

## 鼠尾草素组合物和其用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及鼠尾草素 (salvinorin) 组合物和其用途。具体来说,本发明涉及投与鼠尾草素组合物来治疗与血管收缩、血管阻塞或血流和自调节破坏相关的疾病和病症。举例来说,鼠尾草素组合物可投与患有心跳骤停、蛛网膜下出血、中风、脑血管痉挛、脑低氧/缺血、脑动脉阻塞或任何涉及自调节减损的病况的个体。

### 背景技术

[0002] 鼠尾草素A为墨西哥鼠尾草 (*Salvia divinorum*) 的活性组分,墨西哥鼠尾草是墨西哥本土的唇形(薄荷)科的多年生草本植物。出于宗教目的,墨西哥鼠尾草长久以来传统用于在精神治疗会话期间产生有远见的意识状态。已展示,鼠尾草素A为最高度有效的、天然产生的非肽,且为唯一的非含氮 $\kappa$ 类鸦片受体 (KOR) 激动剂。

[0003] 与鸦片的历史相似,墨西哥鼠尾草作为天然丰富的植物已被人类用于休闲目的长达数个世纪,且已提出,鼠尾草素A可为用于临床实践(即,用于治疗抑郁症或成瘾等)的可能的新类鸦片受体激动剂。迄今为止,由于其它类鸦片KOR激动剂的副作用,没有一者在临床上使用。这些副作用包括诱导显著烦躁不安、低选择性、呼吸抑制和未知的安全概况。尽管鼠尾草素A是KOR激动剂,但其不属于类鸦片,且在大多数国家中并非受控物质。所述化合物的许多内在特征(即,快速起效、作用时间短、易于跨过血脑屏障以及无呼吸抑制等)使得其成为有吸引力的可能药物,尤其对于神经疾病来说。

[0004] 心跳骤停(CA),尤其突然心跳骤停在美国是主要的死亡原因。每年,约有295,000例医院外CA,生存率为7%,和200,000例医院内CA,生存率为20%-30%。超过一半的CA幸存者之后遭受各种程度的永久性神经功能障碍,包括脑死亡。在人类个体和不同CA动物模型中的研究展现出这些神经病况是由对脑的缺血/再灌注(IR)损伤诱导的。在CA的数秒内,血流和氧气停止递送到脑,引起可导致脑组织低氧和坏死(低氧/缺血损伤)的级联代谢事件。当循环经由心肺复苏(CPR)恢复时,来自再灌注的继发性损伤可进一步加重在这段时间的脑损伤(再灌注损伤)。

[0005] 目前,治疗性降低体温被视为神经损伤的唯一有效的CA后治疗。然而,这种治疗仅可适用于符合条件的患者群体,且在资源贫乏的机构中可能是很危险的,由此尤其引起死亡发生率增加、多重器官衰竭、肺高血压和出血。因此,对于用以改善生存率并减少来自CA的神经元损伤负荷的易于管理的药物存在明显的医学需求。

[0006] 中风在全世界是主要的死亡原因。美国每年有约795,000人经历新的或复发的中风;在美国,每40秒就有人患上中风;每4分钟就有人死于中风。中风为严重长期失能的主要原因。所有中风中的87%当供应到脑的血液中断时缺血,缺血/再灌注(IR)器官损伤的一个典型实例。许多减少实验动物中此类神经元伤害的可能的神经保护剂在临床试验中已失败。由于中风的治疗窗狭窄,可能的神经保护剂能够以及时方式递送且在快速起始时间下无明显屏障。

[0007] 美国每年有约30,000名患者发生蛛网膜下出血(SAH)。在高达70%的SAH患者中,

脑血管痉挛经评估且为主要的发病率和死亡率来源。已提出且评估了大量治疗方法。尽管如此,没有单一的治疗模态被证实有效。

[0008] 鼠尾草素A为非常疏水的分子且不可溶于水。鼠尾草素A为可溶的,已知可溶于有机溶剂(如乙醇、DMSO和丙酮)中。然而,这些溶剂不适用于常规临床使用,尤其不适用于静脉内(IV)递送。由于鼠尾草素A在临床上适用于神经病症,故需要鉴别可用于调配鼠尾草素A以用于临床递送的材料,优选地FDA批准的材料。

[0009] 因此,需要探索鼠尾草素A作为治疗各种疾病和病症的临床药物的新用途和调配物。

## 发明内容

[0010] 在一个方面中,本文提供在罹患或遭受心跳骤停的个体中治疗与心跳骤停相关的神经损伤的方法,所述方法包含:向所述个体投与治疗有效量的鼠尾草素或其医药组合物。在另一方面中,本文提供在罹患或遭受心跳骤停的个体中增加生存的可能性的方法,所述方法包含:向所述个体投与治疗有效量的鼠尾草素或其医药组合物。

[0011] 在另一方面中,本文提供在患有蛛网膜下出血的个体中治疗脑血管痉挛的方法,所述方法包含:向所述个体投与治疗有效量的鼠尾草素或其医药组合物。

[0012] 在另一方面中,本文提供在罹患或遭受脑动脉阻塞的个体中治疗脑动脉阻塞的方法,所述方法包含:向所述个体投与治疗有效量的鼠尾草素或其医药组合物。

[0013] 在另一方面中,本文提供在罹患或遭受脑低氧/缺血损伤的个体中减小梗塞大小的方法,所述方法包含:向所述个体投与治疗有效量的鼠尾草素或其医药组合物。在另一方面中,本文提供在罹患或遭受脑低氧/缺血的个体中减少血管渗漏的方法,所述方法包含:向所述个体投与治疗有效量的鼠尾草素或其医药组合物。

[0014] 在另一方面中,本文提供鼠尾草素A的医药组合物,所述组合物包含:鼠尾草素A和环糊精的水溶液。

[0015] 在另一方面中,本文提供了医药组合物,所述组合物包含:鼠尾草素,其用于本文中所述方法。

[0016] 本发明的其它特征和优势将根据以下实施方式实例和图式而变得显而易见。然而,应理解,实施方式和特定实例虽然指示本发明的优选实施例,但仅以说明方式给出,因为本领域的技术人员将由此实施方式而变得显而易知本发明的精神和范围内的各种变化和修改。

## 附图说明

[0017] 图1. 鼠尾草素A扩张仔猪的软膜动脉。图A:鼠尾草素A剂量依赖性地扩张脑软膜动脉。L-NNA(一氧化氮合成酶抑制剂)阻断鼠尾草素而非SNP的扩张作用。图B:每2分钟投与鼠尾草素A可维持软膜动脉扩张。图C:nNOS抑制剂7-NINA不阻断鼠尾草素的扩张作用。图D:SNP(100pM)恢复L-NNA的构筑作用,但并不恢复由L-NNA阻断的通过鼠尾草素A诱导的扩张作用(n=5)。L-NNA:N(G)-硝基-L-精氨酸;SNP:硝普钠;7-NINA:7-硝基吲唑。

[0018] 图2. 鼠尾草素A增加CSF中的cGMP,且L-NNA阻断鼠尾草素诱导的cGMP升高和血管扩张(n=5)。cGMP:环单磷酸鸟苷;CSF:脑脊髓液;L-NNA:N(G)-硝基-L-精氨酸

[0019] 图3. 格列本脲而非伊贝瑞毒素阻断鼠尾草素A的扩张作用。以任何顺序与伊贝瑞毒素一起给予的格列本脲阻断鼠尾草素的扩张作用 (n=5)。S: 鼠尾草素A; Glib: 格列本脲; Iberi: 伊贝瑞毒素; \*: 首先投与的药剂。

[0020] 图4. 格列本脲而非伊贝瑞毒素阻断色满卡林和CGRP的扩张作用。伊贝瑞毒素而非格列本脲阻断NS1619的扩张作用。图A展示10nM色满卡林、CGRP和NS1619在存在或不存在预防治疗药剂的情况下的作用。图B展示1M色满卡林、CGRP和NS1619的作用 (n=5)。Glib: 格列本脲; Iberi: 伊贝瑞毒素; CGRP: 降血钙素基因相关多肽; \*: 首先投与的药剂。

[0021] 图5. 纳洛酮和诺丙纳托非敏而非舒必利阻断鼠尾草素A的扩张作用。图A: 纳洛酮和Met-脑啡肽而非异丙肾上腺素阻断鼠尾草素A的扩张作用。图B: 诺丙纳托非敏阻断鼠尾草素A的扩张作用。图C: 舒必利并不阻断鼠尾草素A的扩张作用 (n=5)。Met-enk: 甲硫氨酸脑啡肽。

[0022] 图6. 鼠尾草素A剂量对于两种测试剂量以剂量依赖性方式扩张由低碳酸血症和内皮素诱导的收缩的软膜动脉。图A: 低碳酸血症 (n=4); 图B: 内皮素 (n=5)。

[0023] 图7. 在软膜动脉上添加1μM鼠尾草素A在数秒内立即扩张血管。其使动脉扩张约40%, 且血管直径在5分钟内回到基线。

[0024] 图8为鼠尾草素A的图像。

[0025] 图9为葫芦脲的图像。

[0026] 图10为鼠尾草素-葫芦脲复合物的图像。

[0027] 图11为鼠尾草素-葫芦脲复合物的图像。

[0028] 图12为鼠尾草素-葫芦脲复合物的图像。

[0029] 图13: HI后鼠尾草素A投与对高碳酸血症的软膜动脉扩张的作用。HI与DMSO减轻高碳酸血症的软膜动脉扩张。HI发作时和30分钟后投与的SA保留软膜动脉对中度 and 重度高碳酸血症的扩张, 其通过诺丙纳托非敏 (Norbin) 钝化。每组中N=5。改变百分比 = (在高碳酸血症之后的直径 - 在高碳酸血症之前的直径) / 在高碳酸血症之前的直径 × 100。SA: 鼠尾草素A; 中度: PaCO<sub>2</sub>为50到60mmHg的高碳酸血症; 重度: PaCO<sub>2</sub>为70到80mmHg的高碳酸血症。

[0030] 图14: HI后鼠尾草素A投与对低血压的软膜动脉扩张的作用。HI与DMSO破坏低血压的软膜动脉扩张。HI发作时和30分钟后投与的SA保留软膜动脉对中度 and 重度低血压的扩张, 其通过共同投与的诺丙纳托非敏 (Norbin) 钝化。改变百分比 = (在低血压之后的直径 - 在低血压之前的直径) / 在低血压之前的直径 × 100。每组中N=5。SA: 鼠尾草素A。中度: 平均血压降低25%。重度: 平均血压降低45%。

[0031] 图15: 异丙肾上腺素诱导的动脉扩张与KOR或ERK信号传导无关。在存在和不存在各种干预的情况下, 在HI之前 (基线) 和之后异丙肾上腺素 (10nM, 1μM) 对软膜动脉直径的作用不显著改变, 与基线相比, p>0.05。每组中N=5。改变百分比 = (在异丙肾上腺素之后的直径 - 在异丙肾上腺素之前的直径) / 在异丙肾上腺素之前的直径 × 100; SA: 鼠尾草素A; Norbin: 诺丙纳托非敏

[0032] 图16. 鼠尾草素A投与阻断CSF ERK活性升高, 在HI之后1小时观察到。在对照组 (n=10, DMSO和nor-BIN组) 中在HI之后1小时pERK/ERK的比率与基线相比显著增加。将所有组的基线拉到一起 (n=20), 且将来自DMSO和nor-BIN组的数据拉到一起且呈现为DMSO+Norbin (n=10) 以增加统计分析的能量, 因为观察到一些较大变化。升高的ERK活性在HI后

立即 (n=5) 或30分钟 (n=5) 投与的组中消除。Norbin: 诺丙纳托非敏; SA: 鼠尾草素A。

[0033] 图17. 在低氧/缺血 (H/I; PO<sub>2</sub>为35mm Hg持续10分钟, 接着全脑缺血20分钟) 之前 (基线), 在H/I之后, 在用鼠尾草素A (10μg/kg, 静脉内; H/I+SA) (在H/I之前30分钟) 预治疗的H/I之后, 以及在用U0126 (1mg/kg, 静脉内; H/I+SA+U0126) (ERK的拮抗剂) (在鼠尾草素A之前30分钟)、SP600125 (1μM, 局部投与; H/I+SA+SP600125) (JNK的拮抗剂) (在鼠尾草素A之前30分钟)、SB203580 (10μM, 局部投与; H/I+SA+SB203580) (P38的拮抗剂) (在鼠尾草素A之前30分钟) 预治疗的H/I之后, 低血压对软膜动脉直径的作用。用鼠尾草素A预处理保留软膜动脉对低血压的扩张反应, 其通过U0126消除。SA: 鼠尾草素A; H/I: 低氧/缺血; 中度: 中度低血压 (MAP降低25%); 重度: 重度低血压 (MAP降低45%)。每组N=5; 基线条表示来自所有25只动物的数据。所有未列出校正P值>0.405。所有校正的95%置信区间宽度<10.32。

[0034] 图18. 在低氧/缺血 (H/I; PO<sub>2</sub>为35mm Hg持续10分钟, 接着全脑缺血20分钟) 之前 (基线), 在H/I之后, 在用鼠尾草素A (10μg/kg, 静脉内; H/I+SA) (在H/I之前30分钟) 预治疗的H/I之后, 以及在用U0126 (1mg/kg, 静脉内; H/I+SA+U0126) (ERK的拮抗剂) (在鼠尾草素A之前30分钟)、SP600125 (1μM, 局部投与; H/I+SA+SP600125) (JNK的拮抗剂) (在鼠尾草素A之前30分钟)、SB203580 (10μM, 局部投与; H/I+SA+SB203580) (P38的拮抗剂) (在鼠尾草素A之前30分钟) 预治疗的H/I之后, 高碳酸血症对软膜动脉直径的作用。用鼠尾草素A预处理保留软膜动脉对高碳酸血症的扩张反应, 其通过U0126消除。SA: 鼠尾草素A; H/I: 低氧/缺血; 中度: PaCO<sub>2</sub>为50到60mmHg的中度高碳酸血症; 重度: PaCO<sub>2</sub>为70到80mmHg的重度高碳酸血症。每组N=5; 基线条表示来自所有25只动物的数据。所有未列出校正P值>0.108。所有校正的95%置信区间宽度<10.43。

[0035] 图19. 在存在和不存在各种干预的情况下, 在低氧/缺血之前 (基线) 和之后异丙肾上腺素 (10nM, 1μM) 对软膜动脉直径的作用不显著改变。SA: 鼠尾草素A; H/I: 低氧/缺血。每组N=5; 基线条表示来自所有25只动物的数据。所有未列出校正P值=1。所有校正的95%置信区间宽度<10.13。

[0036] 图20. pERK/ERK在投与鼠尾草素A之前和在鼠尾草素A或U0126加鼠尾草素A预处理之后30分钟的比率。在鼠尾草素A预处理组中, CSF中的pERK/ERK比率显著增加30分钟; 且此类增加通过ERK拮抗剂 (U0126) 预处理消除。SA: 鼠尾草素A。H/I: 低氧/缺血。所有未列出校正P值=1。所有校正的95%置信区间宽度<0.33。

[0037] 图21展示实例5中不同组的死亡率。HP和SA组的死亡率分别为70%和38.5%。对照组中没有死亡。SA与HP组之间的差异指示SA在统计学上显著降低死亡率 (\*p=0.014, SA+HP对比HP。SA: 鼠尾草素A; HP: 低氧)。

[0038] 图22展示实例5中在产后第2天和第3天SA升高体重增加。在我们的研究中记录在P1、P2、P3、P7、P14和P21在对照、低氧和SA治疗组中幼畜的体重。与第1天相比, 在P2 (p=0.0318) 和P3 (p=0.0221), SA治疗升高体重增加。然而, 在P3、P7、P14和P21, 在不同组之间未观察到显著差异 (数据未示出) (\*p<0.05, SA+HP对比HP。P: 产后; SA: 鼠尾草素A; HP: 低氧)。

[0039] 图23展示实例5中SA改善一些发育神经结果。低氧诱导前肢抓握 (A)、悬崖排斥 (B)、翻正反应 (C) 和眼张开 (D) 的明显延迟。SA显著挽救此类低氧诱导的神经结果 (#p<0.05, HP对比对照; \*p<0.05, SA+HP对比HP。SA: 鼠尾草素A; HP: 低氧)。

[0040] 图24.SA展示对实例5中一些发育参数无统计改进。对如行走(A)、爬行(B)、跑动(C)、点头和嗅探(D)、坐(E)、用支持物直立(F)、负趋地性测试(G)和放置反射(H)的一些发育参数无统计显著性,不过与对照和SA组相比,低氧幼畜也展示出现延迟。在对照组中,与第 $18.18 \pm 0.4435$ 天相比,在第 $19.86 \pm 0.29$ 天,低氧幼畜展示用支持物直立的出现延迟。在第 $18.69 \pm 0.3843$ 天,与低氧幼畜相比,用SA治疗的低氧幼畜呈现更好表现(I),这与对照组类似( $\#p < 0.05$ ,HP对比对照; $*p < 0.05$ ,SA+HP对比HP.SA:鼠尾草素A;HP:低氧)。

[0041] 图25.SA不显著改善实例5中的开阔场地测试的结果。(A)左图展示开阔场地测试的草图。将小鼠个别地置放在 $41\text{cm (L)} \times 41\text{cm (W)} \times 30\text{cm (H)}$ 塑料箱中。“区域的中心部分”定义为箱子中心的 $20.5\text{cm} \times 20.5\text{cm}$ 正方形。区域的其余部分定义为“区域的周边部分”。在前5分钟和30分钟分别记录每一小鼠在探索区域的中心部分和周边部分花费的时间和直立行为的次数。(B)在P21在开阔场地测试中记录在中心场地的秒数,其展示与对照相比HP显著减少秒数,且SA投与增加在低氧之后在中心场地的秒数,但差异在统计学上不显著( $\#p < 0.05$ ,HP对比对照.P:产后;SA:鼠尾草素A;HP:低氧)。

[0042] 图26展示在实例5中SA显著改善在P21的直立活动性。在前5分钟和30分钟中在P21的直立测试通过低氧减损,且在SA投与的情况下未观察到此类减损,这与对照组相似,指示SA可改善一些低氧诱导的长期神经缺陷( $\#p < 0.05$ ,HP对比对照; $*p < 0.05$ ,SA+HP对比HP.P:产后;SA:鼠尾草素A;HP:低氧)。

[0043] 图27展示实例5中SA不改善长期焦虑水平和空间记忆。如对于用以检测焦虑水平和运动活动的高架零形迷宫,在SA投与和单独低氧组之间在迷宫的开放组(A)和开放/封闭转变(B)中在时间花费百分比方面无显著差异。巴恩斯迷宫任务用于评估空间参考记忆。在我们的研究中,组间到达目标的时间(C)和在目标区域中的时间(D)无显著差异。对照和HP组之间也没有差异(SA:鼠尾草素A;HP:低氧)。

[0044] 图28展示实例5中SA不改变长期记忆缺失。所有组均以类似速率学习,且在恐惧条件反射测试的长期行为中没有显著差异。对照组在训练试验(A)、提示试验(B)、短期(C)和长期(D)情境木僵行为中与HP组相比无减损( $p > 0.05$ )。与HP和对照小鼠相比,用SA预处理不改变恐惧记忆( $p > 0.05$ 。SA:鼠尾草素A;HP:低氧)。

[0045] 图29描绘实例6的小鼠研究中使用的方案。

[0046] 图30展示鼻内鼠尾草素A投与展现运动功能的剂量依赖性改善,如通过握力强度评分所测量。然而,此类保护作用在 $250\mu\text{g/kg}$ 剂量以外减小。

[0047] 图31展示鼻内鼠尾草素A投与展现神经行为的剂量依赖性改善。

[0048] 图32展示鼻内鼠尾草素A投与展现梗塞大小的剂量依赖性减小,如通过脑的TTC染色中的白色梗塞面积减小可见。与图30中指示的结果相似,保护作用在 $250\mu\text{g/kg}$ 的剂量以外减小。

[0049] 图33展示随所投与的鼻内鼠尾草素A剂量而变的梗塞面积。

[0050] 图34.伊文斯蓝外渗指示在脑的缺血和再灌注之后的血脑屏障破坏和血管渗漏。鼻内鼠尾草素A投与减少破坏和渗漏,而 $\kappa$ 受体拮抗剂诺丙纳托非敏(norbin)的投与抑制鼠尾草素A的保护作用。

[0051] 图35展示鼻内鼠尾草素A改善整体运动功能。尚未投与鼠尾草素A的小鼠(地上的小鼠)通常不可行走,因为左侧在120分钟大脑中动脉阻塞(MCAO)之后24小时是瘫痪的。已



在损伤之后鼻内投与鼠尾草素A的小鼠(绳上的小鼠)可在悬挂的绳上爬行。

[0052] 图36.在过度表达 $\mu$ 和 $\kappa$ 类鸦片受体的HEK细胞中赫克洛因的亲合力测定。图36A展示与DAMGO(强力 $\mu$ 激动剂)相比,赫克洛因与 $\mu$ 受体的结合亲合力。DAMGO的 $K_i$ 为2.5nM,且赫克洛因为45nM。图36B中示出的模型提示赫克洛因(标记为在结合袋中的红色球形配体上的H)结合于与 $\beta$ -富纳曲胺( $\beta$ -funaltrexamine)(标记为在结合袋中的浅蓝色球形配体上的 $\beta$ )(一种在晶体结构中发现的选择性 $\mu$ 类鸦片受体配体)相同的结合位点。

[0053] 图37.过度表达 $\kappa$ 类鸦片受体的HEK细胞中的赫克洛因的亲合力测定和结合位点的位置。图37A展示与U69593(强力 $\kappa$ 激动剂)相比,赫克洛因与 $\kappa$ 受体的结合亲合力。U69593的 $K_i$ 为0.8nM,且赫克洛因为184nM。图37B中示出的模型提示赫克洛因(标记为在结合袋中的红色球形配体上的H)结合于与JDTic(标记为在结合袋中的绿色球形配体上的J)(一种在晶体结构中发现的选择性 $\kappa$ 类鸦片受体配体)相同的结合位点。

[0054] 图38.赫克洛因的脑血管扩张作用经由 $\kappa$ 类鸦片受体介导。图38展示赫克洛因(Herk)对软膜动脉的扩张作用由 $\kappa$ 受体拮抗剂诺丙纳托非敏(NTP)阻断(图38A);而非由 $\mu$ 受体拮抗剂 $\beta$ -富纳曲胺( $\beta$ -FNA,图38B)阻断。赫克洛因的扩张作用等同于异丙肾上腺素(ISO)(一种强力 $\beta$ 肾上腺素激动剂)的扩张作用(图38A)( $P_s > 0.05$ )。投与单独NTP或 $\beta$ -FNA不具有任何扩张作用(单向Anova接着邓尼特多重比较检验)。每组 $n=5$ 。在t检验中,\*用于 $p < 0.05$ ,\*\*用于 $p < 0.01$ ,\*\*\*用于 $p < 0.005$ ,且在ANOVA测试中,#用于 $p < 0.05$ 。

[0055] 图39.赫克洛因的脑血管扩张作用经由cAMP信号传导介导。图39A展示在赫克洛因投与的情况下CSF中的cAMP水平升高,这在投与 $\kappa$ 拮抗剂NTP的情况下消除。图39B展示赫克洛因的脑血管扩张作用通过投与10 $\mu$ M Rp-cAMPS(一种cAMP拮抗剂)消除( $n=5$ )。Sp:Sp-cAMPS,Rp:Rp-8-Br-cAMPS.\*用于 $p < 0.05$ ,\*\*用于 $p < 0.01$ ,\*\*\*用于 $p < 0.005$

[0056] 图40.24小时后假处理组、蛛网膜下出血(SAH)和鼠尾草素A(SA)治疗组的全脑图像(腹侧)。

[0057] 图41.假处理组、SAH和SA治疗组的基底动脉的H&E染色。

[0058] 图42.在SAH之后给予的鼠尾草素A在SAH后24小时显著(A)增加基底动脉的直径且(B)降低其壁厚度。(C)在SAH之后给予的鼠尾草素A对神经评分无显著作用,# $p < 0.05$ 对比假处理组,\* $p < 0.05$ 对比SAH。

[0059] 图43.甲醇-丙酮(4:1)中的鼠尾草素A的标准曲线。

## 具体实施方式

[0060] 本发明涉及鼠尾草素组合物和其用途。具体来说,本发明涉及投与鼠尾草素以在所述个体中在心跳骤停或中风之后增加个体的生存率。本发明进一步涉及治疗患有脑血管痉挛、蛛网膜下出血、脑低氧/缺血、脑动脉阻塞或任何涉及自调节减损的病况的个体。

[0061] 在一个方面中,本文提供在罹患或遭受心跳骤停的个体中治疗与心跳骤停相关的神经损伤的方法,所述方法包含:向所述个体投与治疗有效量的鼠尾草素或其医药组合物。在另一方面中,本文提供在罹患或遭受心跳骤停的个体中增加生存的可能性的方法,所述方法包含:向所述个体投与治疗有效量的鼠尾草素或其医药组合物。

[0062] 在另一方面中,本文提供在患有蛛网膜下出血的个体中治疗脑血管痉挛的方法,所述方法包含:向所述个体投与治疗有效量的鼠尾草素或其医药组合物。

[0063] 在另一方面中,本文提供在罹患或遭受脑动脉阻塞的个体中治疗脑动脉阻塞的方法,所述方法包含:向所述个体投与治疗有效量的鼠尾草素或其医药组合物。

[0064] 在另一方面中,本文提供在罹患或遭受脑低氧/缺血的个体中减小梗塞大小的方法,所述方法包含:向所述个体投与治疗有效量的鼠尾草素或其医药组合物。在另一方面中,本文提供在罹患或遭受脑低氧/缺血的个体中减少血管渗漏的方法,所述方法包含:向所述个体投与治疗有效量的鼠尾草素或其医药组合物。

[0065] 在另一方面中,本文提供了医药组合物,所述组合物包含:鼠尾草素,其用于本文中所述方法。

[0066] 在另一方面中,本文提供在有需要的个体中产生脑血管扩张的方法,所述方法包含:向所述个体投与治疗有效量的鼠尾草素或其医药组合物。在另一方面中,本文提供在个体中治疗与脑血管痉挛、低氧和/或缺血相关的疾病的方法,所述方法包含:向所述个体投与治疗有效量的鼠尾草素或其医药组合物。

[0067] 在另一方面中,本文提供治疗个体的与血管收缩、血管阻塞或血流和自调节破坏相关的疾病的方法,所述方法包含:向所述个体投与治疗有效量的鼠尾草素或其医药组合物。在另一方面中,本文提供在有需要的个体中产生镇静或麻醉作用的方法,所述方法包含:向所述个体投与治疗有效量的鼠尾草素或其医药组合物。

[0068] 在另一方面中,本文提供医药组合物,所述组合物包含:治疗有效量的鼠尾草素,其中所述鼠尾草素以在有需要的个体中有效产生脑血管扩张的量存在。在另一方面中,本文提供医药组合物,所述组合物包含:治疗有效量的鼠尾草素,其中所述鼠尾草素以有效治疗个体的与脑血管痉挛、低氧和/或缺血相关的疾病的量存在。在另一方面中,本文提供医药组合物,所述组合物包含:治疗有效量的鼠尾草素,从而在患有蛛网膜下出血的个体中治疗脑血管痉挛。

[0069] 在另一方面中,本文提供医药组合物,所述组合物包含:治疗有效量的鼠尾草素,其中所述鼠尾草素以在个体中有效提供器官免于低氧/缺血的保护的量存在。在另一方面中,本文提供医药组合物,所述组合物包含:治疗有效量的鼠尾草素,其中所述鼠尾草素以有效治疗个体的与血管收缩、血管阻塞或血流和自调节破坏相关的疾病的量存在。

[0070] 在另一方面中,本文提供医药组合物,所述组合物包含:治疗有效量的鼠尾草素,其中所述鼠尾草素以在有需要的个体中有效产生镇静或抗伤痛感受作用的量存在。

[0071] 在另一方面中,本文提供鼠尾草素A的医药组合物,所述组合物包含:鼠尾草素A和环糊精的水溶液。优选地,环糊精为2-羟丙基-环糊精,如2-羟丙基- $\beta$ -环糊精 (HPBCD) 或2-羟丙基- $\gamma$ -环糊精 (HPGCD)。更优选地,环糊精为2-羟丙基- $\beta$ -环糊精 (HPBCD)。在一些实施例中,组合物适合于静脉内投与。在一些实施例中,鼠尾草素A浓度为至少25 $\mu$ g/mL。优选地,鼠尾草素A浓度为至少50 $\mu$ g/mL。

[0072] 在一些实施例中,鼠尾草素A水溶液中的环糊精(例如HPBCD)浓度为至少1% (w/v)、至少2.5% (w/v)、至少5% (w/v)、至少7.5% (w/v)、至少10% (w/v)、至少12.5% (w/v)、至少15% (w/v)、至少17.5% (w/v)、至少20% (w/v)、至少22.5% (w/v) 或至少25% (w/v)。在一些实施例中,鼠尾草素A水溶液中的环糊精(例如HPBCD)浓度低于50% (w/v)、低于45% (w/v)、低于40% (w/v)、低于35% (w/v)、低于30% (w/v)、低于25% (w/v)、低于22.5% (w/v)、低于20% (w/v)、低于17.5% (w/v)、低于15% (w/v)。优选地,环糊精为HPBCD,且在鼠尾

草素A水溶液中的浓度为约至少20% (w/v)。

[0073] 本申请案的发明人意外地且出乎意料地发现鼠尾草素显著扩张脑血管,快速起效和消退,且不改变血流动力学。脑动脉的直径在1微摩尔鼠尾草素的情况下扩张高达40%,如图7中所示。血管在施加鼠尾草素之后立即扩张,且扩张作用持续不到3到5分钟。这一发现展示鼠尾草素可用于治疗中风、脑损伤或与脑血管痉挛相关的其它相关临床情形(包括蛛网膜下出血后和头部创伤)中的脑血管痉挛。此外,鼠尾草素可以用于治疗脊髓缺血和其它神经缺血。

[0074] 鼠尾草素A和其类似物为已知化合物。在美国每年由接近一百万人出于休闲目的使用的鼠尾草素A(墨西哥鼠尾草的活性组分)为唯一已知的非含氮选择性κ类鸦片受体(KOR)激动剂。

[0075] 二萜鼠尾草素A已展示为高亲和力和选择性κ类鸦片受体激动剂。参见罗斯(Roth)等人,《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》99:11934(2002);和布托曼(Butelman)等人,《精神药理学(Psychopharmacology)》172:220(2004)。

[0076] 鼠尾草素和其衍生物为此项技术中已知。举例来说,鼠尾草素、其衍生物和其合成方法描述在U.S.2006/0052439、U.S.2007/0213394、WO 2005/089745和WO2008/119097中,所述文献中的每一者以全文引用的方式并入本文中。

[0077] 本领域的技术人员已知的鼠尾草素或其衍生物可用于本文所述的方法和组合物。鼠尾草素的实例包括(但不限于)鼠尾草素A、B、C、D、E或F。在一个实施例中,鼠尾草素为鼠尾草素A。在另一实施例中,鼠尾草素为鼠尾草素B。在另一实施例中,鼠尾草素为鼠尾草素C。在另一实施例中,鼠尾草素为鼠尾草素D。在另一实施例中,鼠尾草素为鼠尾草素E。在另一实施例中,鼠尾草素为鼠尾草素F。在另一实施例中,鼠尾草素为鼠尾草素酯。在另一实施例中,鼠尾草素为鼠尾草素苯甲酸酯。在另一实施例中,鼠尾草素为鼠尾草素的代谢物。在另一实施例中,鼠尾草素为鼠尾草素A的类似物。举例来说,赫克洛因(herkinorin),鼠尾草素A的一种类似物(吉F(Ji F)等人,《大脑研究(Brain Res.)》2013,1490:95-100,其以全文引用的方式并入本文中)。可用于本文所述的方法和组合物的其它鼠尾草素类似物为2-O-乙氧基甲基鼠尾草素B和2-O-甲氧基甲基鼠尾草素B。

[0078] 根据一个实施例,投与治疗有效量的鼠尾草素在有需要的个体中产生血管扩张。

[0079] 本发明进一步提供治疗疾病或病况的方法,其包含向有需要的哺乳动物投与治疗有效量的鼠尾草素。

[0080] 在一个实施例中,提供治疗个体的与血管收缩、血管阻塞或血流和自调节破坏相关的疾病的方法,所述方法包含:向所述个体投与治疗有效量的鼠尾草素或其医药组合物。

[0081] 本文所述的医药组合物可以包括“治疗有效量”。“治疗有效量”是指在必需剂量下及在必需时间内有效实现所需治疗结果的量。分子的治疗有效量可根据如疾病病况、个体的年龄、性别和体重以及分子在个体中引发所需反应的能力的因素改变。治疗有效量也为分子的治疗有益效应超过其毒性或有害效应的量。

[0082] 如本文中所用的术语“治疗(treat)”和“治疗(treatment)”是指治疗性治疗,包括预防性或防治性措施,其中目的为预防或减缓(减少)与疾病或病况相关的非所需生理变化。举例来说,治疗与心跳骤停相关的神经损伤包括(但不限于)在罹患或遭受心跳骤停的个体中预防神经损伤。有益或所需临床结果包括(但不限于)缓解症状,减轻疾病或病况的

程度,稳定疾病或病况(即,其中疾病或病况不恶化),延迟或减缓疾病或病况的进展,减轻或缓和疾病或病况以及缓解(无论部分还是全部)疾病或病况。“治疗”还可以指存活期相较于未接受治疗时的预期存活期延长。需要治疗的那些包括已患有疾病或病况的那些,以及易患上疾病或病况的那些,或欲预防疾病或病况的那些。

[0083] 由或以与血管收缩、血管阻塞或血流和自调节破坏相关的其它方式引起的疾病或病症的实例包括(但不限于)脑血管痉挛、蛛网膜下出血、中风、脑创伤或损伤、缺血性再灌注性损伤、低灌注状态和低氧。

[0084] 本文所述的鼠尾草素和其医药组合物可通过此项技术中已知的方法投与个体,如非经肠、癌旁、经粘膜、经皮、肌肉内、静脉内、皮内、皮下、腹膜内、心室内、颅内、阴道内或肿瘤内、鞘内和吸入投与。在优选实施例中,其经粘膜投与。在更优选实施例中,其经鼻内投与。

[0085] 在本文所述的方法和组合物的另一实施例中,医药组合物经口投与,且由此以适用于经口投与的形式调配,即,调配为固体或液体制剂。适合的固体经口调配物包括片剂、胶囊、丸剂、颗粒、团块等。适合的液体经口调配物包括溶液、悬浮液、分散液、乳液、油剂等。在本发明的另一实施例中,活性成分调配在胶囊中。根据此实施例,本发明的组合物除了活性化合物和惰性载剂或稀释剂之外还包含硬明胶胶囊。

[0086] 在另一实施例中,医药组合物通过静脉内、动脉内或肌肉内注射液体制剂而投与。适合的液体调配物包括溶液、悬浮液、分散液、乳液、油剂等。在另一实施例中,医药组合物静脉内投与,并且因此以适用于静脉内投与的形式调配。在另一实施例中,医药组合物动脉内投与,并且因此以适用于动脉内投与的形式调配。在另一实施例中,医药组合物肌肉内投与,并且因此以适用于肌肉内投与的形式调配。

[0087] 在另一实施例中,医药组合物经鼻内投与,并且因此以适用于鼻内投与的形式调配。

[0088] 在另一实施例中,医药组合物局部投与到身体表面,并且因此以适用于局部投与的形式调配。局部调配物包括凝胶、软膏、乳膏、洗剂、滴剂等。

[0089] 在另一实施例中,医药组合物作为栓剂(例如直肠栓剂或尿道栓剂)投与。在另一实施例中,医药组合物通过皮下植入团块来投与。在另一实施例中,团块在一段时间内提供活性剂的控制释放。

[0090] 在另一实施例中,活性化合物在微脂粒(例如脂质体)中递送。

[0091] 在其它实施例中,本发明的方法中使用的载剂或稀释剂包括(但不限于)胶、淀粉(例如玉米淀粉、预胶凝化淀粉)、糖(例如乳糖、甘露糖醇、蔗糖、右旋糖)、纤维素材料(例如微晶纤维素)、丙烯酸酯(例如聚甲基丙烯酸酯)、碳酸钙、氧化镁、滑石或其混合物。

[0092] 在其它实施例中,液体调配物的医药学上可接受的载剂为水性或非水性溶液、悬浮液、乳液或油。非水性溶剂的实例为丙二醇、聚乙二醇和可注射有机酯(如油酸乙酯)。水性载剂包括水、醇性/水性溶液、乳液或悬浮液、包括盐水和经缓冲的介质。油的实例为动物、植物或合成来源的油,例如,花生油、大豆油、橄榄油、葵花油、鱼肝油、另一海生动物油、或来自牛奶或蛋的脂质。

[0093] 在另一实施例中,非经肠媒剂(用于皮下、静脉内、动脉内或肌肉内注射)包括氯化钠溶液、林格氏右旋糖(Ringer's dextrose)、右旋糖和氯化钠、乳酸林格氏溶液(lactated

Ringer's) 和不挥发性油。静脉内媒剂包括流体和营养物补充剂、电解质补充剂,如基于林格氏右旋糖的那些,等等。实例为无菌液体(如水和油),加入或不加入表面活性剂和其它医药学上可接受的佐剂。一般来说,水、盐水、右旋糖和相关糖水溶液以及如丙二醇或聚乙二醇的二醇是优选的液体载剂,尤其对于可注射溶液来说。油的实例为动物、植物或合成来源的油,例如,花生油、大豆油、橄榄油、葵花油、鱼肝油、另一海生动物油、或来自牛奶或蛋的脂质。

[0094] 在其它实施例中,组合物进一步包含粘合剂(例如阿拉伯胶、玉米淀粉、明胶、卡波姆(carbomer)、乙基纤维素、瓜尔胶、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、聚维酮)、崩解剂(例如玉米淀粉、马铃薯淀粉、海藻酸、二氧化硅、交联羧甲基纤维素钠、交联聚维酮、瓜尔胶、羟乙酸淀粉钠)、具有各种pH和离子强度的缓冲剂(例如Tris-HCl、乙酸盐、磷酸盐)、用以防止吸收到表面的添加剂(如白蛋白或明胶)、清洁剂(例如Tween20、Tween 80、Pluronic F68、胆酸盐)、蛋白酶抑制剂、表面活性剂(例如月桂基硫酸钠)、渗透增强剂、增溶剂(例如甘油、聚乙烯甘油)、抗氧化剂(例如抗坏血酸、焦亚硫酸钠、丁基化羟基苯甲醚)、稳定剂(例如羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素)、粘度增加剂(例如卡波姆、胶态二氧化硅、乙基纤维素、瓜尔胶)、甜味剂(例如阿斯巴甜糖、柠檬酸)、防腐剂(例如硫柳汞、苯甲醇、对羟基苯甲酸酯)、润滑剂(例如硬脂酸、硬脂酸镁、聚乙二醇、月桂基硫酸钠)、流动助剂(例如胶态二氧化硅)、塑化剂(例如邻苯二甲酸二乙酯、柠檬酸三乙酯)、乳化剂(例如卡波姆、羟丙基纤维素、月桂基硫酸钠)、聚合物涂层(例如泊洛沙姆(poloxamer)或泊洛沙胺(poloxamine))、涂层和膜形成剂(例如乙基纤维素、丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯)和/或佐剂。

[0095] 在另一实施例中,本文提供的医药组合物为控制释放组合物,即,其中活性化合物在投与之后在一段时间内释放的组合物。控制或持续释放组合物包括亲脂性储槽(例如脂肪酸、蜡、油类)中的调配物。在另一实施例中,组合物为立即释放组合物,即,其中活性化合物在投与之后立即释放的组合物。

[0096] 在另一实施例中,医药组合物在控制释放系统中递送。举例来说,药剂可以使用静脉内输注、可植入渗透泵、经皮贴片、脂质体或其它投与模式投与。在一个实施例中,可以使用泵(参见兰格(Langer),前述;塞夫顿(Sefton),《生物医学工程评论综述(CRC Crit.Ref.Biomed.Eng.)》14:201(1987);布克沃德(Buchwald)等人,《手术(Surgery)》88:507(1980);索德克(Saudek)等人,《新英格兰医学杂志(N.Engl.J.Med.)》321:574(1989))。在另一实施例中,使用聚合材料;例如在微球体中或在植入物中。在另一实施例中,控制释放系统接近目标细胞置放,由此仅需要一部分全身剂量(参见例如古德森(Goodson),《控制释放的医学应用(Medical Applications of Controlled Release)》,前述,第2卷,第115-138页(1984);和兰格R,《科学(Science)》249:1527-1533(1990))。

[0097] 在另一实施例中,组合物还包括将活性物质并入到聚合化合物(如聚乳酸、聚乙醇酸、水凝胶等)的微粒状制剂之中或之上或并入到脂质体、微乳液、胶束、单层或多层微脂粒、红细胞血影或原生质球状体上。所述组合物将影响物理状态、溶解度、稳定性、体内释放率和体内清除率。

[0098] 本发明还包括微粒状组合物,其涂布有聚合物(例如泊洛沙姆或泊洛沙胺),并且化合物与针对组织特异性受体、配体或抗原的抗体偶合或与组织特异性受体的配体偶合。

[0099] 本发明还包括通过共价连接水溶性聚合物而改性的化合物,所述水溶性聚合物如

聚乙二醇、聚乙二醇和聚丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、聚葡萄糖、聚乙烯醇、环糊精、葫芦脲(cucurbituril)、聚乙烯吡咯烷酮或聚脯氨酸。已知改性的化合物与相应未改性的化合物相比在静脉内注射之后在血液中展现大体上更长的半衰期(阿布丘夫斯基(Abuchowski)等人,1981;纽马克(Newmark)等人,1982;和凯特(Katre)等人,1987)。这类改性还可以增加化合物在水溶液中的溶解度,消除聚集,增强化合物的物理和化学稳定性,并且极大地降低化合物的免疫原性和反应性。因此,所希望的体内生物活性可以通过与未改性的化合物相比更低频率或以更低剂量投与这类聚合物-化合物诱导物来获得。

[0100] 在一个实施例中,所述方法包含将活性化合物作为唯一的活性成分投与。然而,本发明的范围内还涵盖治疗疾病和病症的方法,其包含投与活性化合物以及一种或多种其它治疗剂。这些其它药剂适合于所治疗的疾病或病症,如本领域中已知。

[0101] 其它治疗有效的药剂可结合于鼠尾草素,并入到与鼠尾草素相同的组合物中,或可作为单独的组合物投与。其它治疗药剂或治疗可在投与鼠尾草素之前、期间和/或之后投与。

[0102] 鼠尾草素与其它药剂和/或治疗的投与可同时或分开、经由相同或不同途径、在相同或不同时间进行。可以调整剂量方案以提供最优所需反应(例如,治疗反应或预防反应)。

[0103] 本文所述的用于治疗如本文中所述的病况或疾病的组合物的有效剂量取决于许多不同因素改变,包括投药方式、目标部位、患者的生理状态、患者是人类还是动物、所投与的其它药物以及治疗是预防性还是治疗性的。通常,患者为人类,但也可治疗非人类哺乳动物,包括转基因哺乳动物。治疗剂量可使用本领域的技术人员已知的常规方法滴定以使安全性及功效优化。

[0104] 在一个实例中,可投与单一大丸剂。在另一实例中,可随时间推移投与数个分次剂量。在另一实例中,剂量可能按比例减少或增加,如由治疗情形的紧急状态所指示。如本文中所用的单位剂型是指适合作为单一剂量用于治疗哺乳动物个体的物理上分散的单位。每一单位可含有经计算会产生所需治疗作用的预定量的活性化合物。在一些实施例中,单位剂型通过且直接取决于活性化合物的独特特征和欲获得的特定治疗或预防作用所指示。

[0105] 组合物可仅投与一次,或其可投与多次或连续输液。对于多个剂量,组合物可例如一天三次、一天两次、一天一次、每两天一次、一周两次、每周一次、每两周一次或每月一次投与。

[0106] 剂量值可以随着欲缓解的病况的类型和严重度变化。进一步理解的是,对于任何具体个体,可根据个体需求以及投与或监督投与组合物的人员的专业判断随时间推移调整特定剂量方案,且本文中阐述的剂量范围为示例性的且并不打算限制所述方法的范围或实施。

[0107] 对个体的“投与”不限于任何具体递送系统且可以包括(但不限于)非经肠(包括皮下、静脉内、髓内、关节内、肌肉内或腹膜内注射)、直肠、局部、经皮或经口(例如以胶囊、悬浮液或片剂形式)、鞘内、鼻内和吸入投与。对个体的投与可以单一剂量形式或以重复投与或连续输液形式进行,以及以多种生理学上可接受的盐形式中的任一种和/或与可接受的药物载剂和/或添加剂作为医药组合物的一部分形式进行。同样,生理学上可接受的盐形式和标准医药调配技术为本领域的技术人员已知(参见例如《雷明顿氏药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》,马克出版公司(Mack Publishing Co.))。

[0108] 术语“约”或“大约”意味着在如由本领域技术人员测定的具体值的可接受的偏差范围内,其将部分取决于所述值如何测量或测定,即,测量系统的限制。举例来说,“约”可意谓依据此项技术中的实施,在1个或多于1个标准偏差的范围内。或者,当提及可测量值(如量、持续时间、浓度等)时,可涵盖与指定值 $\pm 20\%$ 或 $\pm 10\%$ 、更优选地 $\pm 5\%$ 、甚至更优选地 $\pm 1\%$ 且更优选地 $\pm 0.1\%$ 的变化,因为所述变化适于进行所公开的方法。

[0109] 本文所述的治疗方法可用于治疗适合的哺乳动物,包括灵长类动物(如猴和人类)、马、牛、猫、狗、兔以及啮齿动物(如大鼠和小鼠)。优选地,待治疗的哺乳动物为人类。

[0110] 本文中所引用的包括专利、专利申请案或科学出版物在内的任何参考文献均以全文引用的方式并入。

[0111] 为了更全面说明本发明的优选实施例,呈现以下实例。然而,这些实例决不应被理解为限制本发明的广泛范围。

[0112] 实例

[0113] 实例1

[0114] 鼠尾草素A经由活化一氧化氮合成酶、 $\kappa$ 受体和三磷酸腺苷敏感性钾通道产生脑血管扩张

[0115] 在此实例中,我们展现了鼠尾草素A在由低碳酸血症或内皮素诱导的静息张力和升高张力条件下经由活化一氧化氮合成酶、三磷酸腺苷敏感性钾( $K_{ATP}$ )通道和 $\kappa$ 受体扩张软膜动脉。

[0116] 材料和方法

[0117] 鼠尾草素A(纯度 $\geq 98\%$ )、硝普钠(SNP)、N(G)-硝基-L-精氨酸(L-NNA)、格列本脲(glibenclamide)、伊贝瑞毒素(iberiotoxin)、色满卡林(cromakalim)、降血钙素基因相关多肽(CGRP)、NS 1619、纳洛酮(naloxone)、甲硫氨酸脑啡肽、诺丙纳托非敏(norbinaltorphimine)、7-硝基吲唑(7-NINA)、舒必利(sulpiride)和异丙肾上腺素获自西格玛-奥德里奇(Sigma-Aldrich,美国密苏里州圣路易斯(St.Louis,MO,USA))。所有其它化学物质也获自西格玛且属于试剂级的。

[0118] 动物和手术

[0119] 将两种性别的新生猪(1-6天大,称重1.3-1.8kg)用于这项研究。方案由宾夕法尼亚州大学(University of Pennsylvania)的机构动物照护与使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee)批准。动物用异氟烷(1-2个最低肺泡浓度)诱导且接着用 $\alpha$ -氯醛糖(80-100mg/kg,以5mg/kg/h补充,静脉内)维持。将两侧股动脉插入导管以监测血压和血液气体。将导管插入到右股静脉中以用于药物投与。动物在气管套管插入术后在室内空气下换气。直肠温度通过加热垫维持在37-39°C下。置放封闭颅骨窗以用于直接软膜动脉观测和直径测量。封闭颅骨窗由三个部分组成:不锈钢环、圆形玻璃盖片以及由连接于所述不锈钢环中的三个预切割洞的17号皮下注射针组成的三个孔口。皮层外周蛛网膜脑脊髓液(CSF)经由颅骨窗孔口收集以便测定环单磷酸鸟苷(cGMP)。在置放窗口之前,显出头皮且在顶叶皮层上方的颅骨中制得开口。接着,硬脑膜被切开且在骨边缘回缩。将颅骨窗置于颅骨开口上且用牙科丙烯酸树脂粘结在适当位置。窗口下的空间用具有以下组成的人工CSF填充(以mM为单位):3.0KCl、1.5MgCl<sub>2</sub>、1.5CaCl<sub>2</sub>、132NaCl、6.6脲、3.7右旋糖和24.6NaHCO<sub>3</sub>/升,pH 7.33,PCO<sub>2</sub> 46mmHg和PO<sub>2</sub> 43mmHg。使人工CSF升温到37-38°C,随后施加

于脑皮层表面。软膜动脉用安装在解剖显微镜上的电视摄像机观察。血管直径从连接摄影机的视频监视器用视频微型定标器(型号VPA 550,加利福尼亚州洛杉矶的佛埃公司(For-A-Corp., Los Angeles, CA))测量。

#### [0120] 实验方案

[0121] 在存在或不存在研究药物的情况下,在注射人工CSF之后,每半分钟监测并记录软膜动脉直径(小动脉直径120-160微米;微动脉直径50-70微米),持续10分钟。通常,窗口用1-2ml CSF经由连接到窗口侧面中的孔口冲洗超过30秒。在药物投与之前和之后10分钟收集CSF样品以用于cGMP分析。我们通过将CSF缓慢灌注到窗口的一个孔口中且允许CSF自由滴到对置孔口上的收集试管中来收集脑皮层外周蛛网膜CSF。

[0122] 在不存在或存在N(G)-硝基-L-精氨酸(L-NNA, 1 $\mu$ M)、一氧化氮合成酶(NOS)抑制剂和7-硝基吲唑(100nM,一种神经元NOS的拮抗剂)的情况下,获得对鼠尾草素A(10nM, 1 $\mu$ M,用醇溶解)和SNP(10nM, 1 $\mu$ M)的反应。

[0123] 为了区分一氧化氮在对鼠尾草素A的扩张反应中的直接或容许作用,在与L-NNA和鼠尾草素A一起投与SNP(100pM,一氧化氮供体的亚阈值血管浓度)之后记录软膜动脉直径变化。也测定了舒必利(100nM,一种多巴胺受体D2拮抗剂)、格列本脲(100nM,一种K<sub>ATP</sub>通道拮抗剂);伊贝瑞毒素(100nM,西格玛-奥德里奇,一种K<sub>Ca</sub>通道拮抗剂)对软膜动脉对鼠尾草素A、色满卡林(1 $\mu$ M)和降血钙素基因相关多肽(10nM, 1 $\mu$ M,一种K<sub>ATP</sub>激动剂)、和NS 1619(10nM, 1 $\mu$ M,一种K<sub>Ca</sub>通道激动剂)反应的影响。最后,研究了纳洛酮(1mg/kg,静脉内)和诺丙纳托非敏(1 $\mu$ M,局部投与,一种 $\kappa$ 类鸦片受体拮抗剂)对于对鼠尾草素A、甲硫氨酸脑啡肽(10nM, 1 $\mu$ M)和异丙肾上腺素(10nM, 1 $\mu$ M,一种 $\beta$ 肾上腺素受体激动剂)的反应的作用。所有测试药物溶液均在使用当天新鲜制备。每2分钟记录软膜动脉对所投与的鼠尾草素A的反应,持续30分钟,从而判定是否可获得持续的血管扩张。

#### [0124] cGMP测定

[0125] 为了测定一氧化氮路径对于鼠尾草素对脑血管的影响的作用,在伴有或不伴有L-NNA和诺丙纳托非敏预治疗的情况下在鼠尾草素A投与之前和之后收集CSF样品以用于cGMP测定。市售ELISA试剂盒(宾夕法尼亚州普利茅斯米丁的恩佐生命科学国际公司(Enzo Life Sciences International, Inc. Plymouth Meeting, PA))用于定量cGMP浓度。

#### [0126] 关于收缩血管的鼠尾草素A

[0127] 为了测试在脑血管张力升高期间鼠尾草素的脑血管作用,我们经由低碳酸血症(PaCO<sub>2</sub>降低20-30%持续10分钟)和内皮素(0.1pM)诱导血管收缩。在基线、在低碳酸血症或投与内皮素之后以及在鼠尾草素A(10nM, 1 $\mu$ M)投与之后,监测软膜动脉直径(对于低碳酸血症, n=4, 对于内皮素, n=5)。

#### [0128] 统计分析

[0129] 使用采用重复测量的ANOVA,接着邦弗朗尼事后检验(Bonferroni post hoc test, 双尾),用10.0的社会科学统计软件包(Statistical Package for the Social Sciences, SPSS)分析所有数据(直径和cGMP)。p<0.05的水平被认为是统计学上显著的。值表示为绝对值的平均值 $\pm$ SEM;或表示为相对于基线值的变化百分比。所有值的分布均通过直方图评估。

#### [0130] 结果



[0131] 扩张作用和一氧化氮路径的作用

[0132] 鼠尾草素A剂量依赖性地(10nM, 1 $\mu$ M)扩张仔猪的软膜动脉,如图1A中所示。在鼠尾草素投与之后立即观察到扩张作用,且对于两种剂量,扩张的持续时间持续不到5分钟。当鼠尾草素A每2分钟投与时,观察到持续的扩张作用,如图1B中所示。扩张反应通过L-NNA(NOS抑制剂)而非7-硝基吲唑(100nM,神经元NOS(nNOS)的拮抗剂)消除(图1A、C)。对SNP的扩张反应不受L-NNA影响(图1A)。SNP(100pM)对软膜动脉不具有作用,但其恢复由L-NNA诱导的收缩。然而,其并不恢复由L-NNA阻断的鼠尾草素A的扩张反应(图1D)。对鼠尾草素A起反应的扩张与CSF中升高的cGMP相关,而L-NNA阻断cGMP的升高(图2)。在鼠尾草素投与期间不发生显著血压变化。

[0133]  $K_{ATP}$ 通道而非KCa通道参与扩张作用

[0134] 格列本脲(100nM,  $K_{ATP}$ 通道抑制剂)而非伊贝瑞毒素(100nM,  $Ca^{2+}$ 活化的 $K^{+}$ (KCa)通道抑制剂)阻断鼠尾草素A的扩张作用。呈任何顺序的格列本脲与伊贝瑞毒素也阻断由鼠尾草素A诱导的扩张(图3)。格列本脲(100nM)而非伊贝瑞毒素(100nM)阻断对色满卡林(一种 $K_{ATP}$ 通道的激动剂,10nM和1 $\mu$ M)和降血钙素基因相关多肽(另一种 $K_{ATP}$ 通道激动剂,10nM和1 $\mu$ M)起反应的扩张;伊贝瑞毒素(100nM)而非格列本脲(100nM)阻断NS1619(KCa通道激动剂,10nM和1 $\mu$ M)的扩张作用(图4)。

[0135] 类鸦片受体而非多巴胺受体D2拮抗剂阻断鼠尾草素的扩张作用

[0136] 诺丙纳托非敏( $\kappa$ 类鸦片受体选择性拮抗剂)和纳洛酮阻断鼠尾草素A和甲硫氨酸脑啡肽的扩张作用。对异丙肾上腺素的反应不受影响(图5A、B)。舒必利(多巴胺受体(D2)拮抗剂)对鼠尾草素A的扩张反应不具有作用(图5C)。诺丙纳托非敏阻断从鼠尾草素A投与起CSF中的cGMP升高。在诺丙纳托非敏预治疗的情况下在鼠尾草素A(10nM和1 $\mu$ M)投与之前和之后的cGMP水平之间无差异( $p=1$ )。

[0137] 鼠尾草素在升高的脑血管张力条件中扩张软膜动脉

[0138] 低碳酸血症和内皮素显著降低软膜动脉的直径(图6)。鼠尾草素在升高的张力条件下扩张软膜动脉,与在正常碳酸血(静息张力)条件下观察到的相似(图6)。在任何上述实验中未观察到小动脉与微动脉反应之间的显著差异,因此,仅呈现小动脉的变化。

[0139] 论述

[0140] 在此实例中,鼠尾草素A在仔猪中在正常条件和由内皮素和低碳酸血症诱导的血管收缩条件中展现为强力软膜动脉扩张剂。在鼠尾草素投与之后立即观察到扩张作用,对于两种测试剂量持续不到5分钟,且为剂量依赖性的。在连续投与的情况下观察到鼠尾草素A的持续扩张作用。类鸦片受体、NOS和 $K_{ATP}$ 通道的活化参与此类扩张作用的信号路径。

[0141] 已展现出,U50488(一种外源性KOR激动剂)和强啡肽(一种内源性KOR激动剂)扩张软膜动脉。还展现出,U50488剂量依赖性地松弛大鼠中的经分离主动脉。不同于其它KOR激动剂,鼠尾草素的扩张作用存在时间极短,不到5分钟。这是迄今为止 $\kappa$ 激动剂当中作用时间最短的药剂,这对于许多临床药物是重要的药理学特征,在围手术期环境和紧急照护中易于管理和滴定。为了实现较长作用,输液是临床麻醉中使用的最常见技术。在此实例中,我们发现持续血管扩张可经由连续投与获得。

[0142] 鼠尾草素A的独特结构(不急速减敏)有助于其作用时间短的特征,因为连续投与引起持续扩张作用。在其结构中的酯键可易于通过血液和组织中的酯酶代谢。一组展现出,

碳酸酯酶主要参与大鼠血浆中的鼠尾草素A水解,且降解产物包括鼠尾草素B以及鼠尾草素A的内酯环开放形式,其两者均无药理学活性。

[0143] 与其它KOR激动剂相似,NOS、K<sub>ATP</sub>通道和类鸦片受体的活化介导鼠尾草素A的扩张作用。另一组展现出,选择性KOR激动剂BRL 52537经由使缺血纹状体中的一氧化氮产生减弱来保护缺血大脑。已证明,BRL 52537的神经保护在nNOS剔除小鼠中损失。因此,KOR激动剂BRL 52537减弱nNOS活性和缺血诱发的一氧化氮产生。然而,在此实例中,鼠尾草素A的软膜动脉扩张通过L-NNA(非特异性NOS抑制剂)而非7-硝基吲唑(选择性nNOS拮抗剂)消除,指示nNOS不参与鼠尾草素A的扩张作用。由于亚阈值量的一氧化氮供体SNP无法恢复扩张反应,故CSF中的cGMP升高很可能归因于一氧化氮产生的刺激并非抑制,鼠尾草素对 endothelial 细胞NOS的直接活化而非作为容许使能剂。

[0144] K<sub>ATP</sub>通道活化可引起血管平滑肌细胞膜的超极化。膜电位变化将接着经由Ca<sup>2+</sup>通过电压依赖性Ca<sup>2+</sup>通道的内流改变来调节肌肉松弛。此实例展示鼠尾草素A直接或间接活化K<sub>ATP</sub>通道。与可活化K<sub>ATP</sub>通道的许多其它药剂不同,鼠尾草素A可易于渗透血脑屏障。由于K<sub>ATP</sub>通道起到免于大脑因低氧、缺血或代谢抑制而损伤的至关重要的保护作用,故鼠尾草素A可为供临床使用的神经保护剂。

[0145] 尽管已证明鼠尾草素A对多巴胺D2受体具有高亲和力,但舒必利(多巴胺D2受体选择性拮抗剂)对鼠尾草素A的扩张作用不具有作用。相反地,纳洛酮和诺丙纳托非敏(κ类鸦片受体选择性拮抗剂)消除鼠尾草素A的血管扩张作用,表明κ受体而非多巴胺D2受体的重要作用。

[0146] 在正常脑血管以及由低碳酸血症和内皮素两者引起的收缩脑血管中观察到的血管扩张作用可允许其在许多临床情形中治疗脑血管痉挛的临床应用,所述临床情形包括偏头痛和其中内皮素增加起到重要作用的蛛网膜下出血后的脑血管痉挛。与其它作用时间短的药剂相似,连续输液可用于滴定和通过调节剂量来实现持续作用。

[0147] 在此实例中,将新生仔猪用作研究个体。猪的多脑回大脑具有比灰质更多的白质,其选择性地易受损伤,与人类相似,且在成年期中也类似。新生仔猪也因为其大到足以易于置放颅骨窗和观测血管而被使用。新生儿的脑血管反应在许多临床情形中与人类个体相似。

[0148] 总之,鼠尾草素A在仔猪中在正常条件和由内皮素和低碳酸血症诱导的血管收缩条件中为起效快速且作用时间短的强力软膜动脉扩张剂。机制涉及NOS、K<sub>ATP</sub>通道和κ受体的活化。这些发现展示出鼠尾草素A在苛刻的脑血管扩张环境中的临床价值。

[0149] 实例2

[0150] 在全脑低氧/缺血之后投与鼠尾草素A在仔猪中经由κ类鸦片受体保留脑血管自调节

[0151] 由低氧/缺血(HI)诱导的大脑损伤引起的神经元死亡和行为功能障碍在围产期期间并不少见。全世界,所有新出生死亡中的23%与窒息相关,且30%出生涉及中度低氧-缺血脑病变(HIE)的儿童可能出现智力迟钝、学习困难和其它失能。令人遗憾的是,没有可用于管理这一破坏性情形的药物。

[0152] KOR激动剂引起脑血管扩张,这是维持脑自调节以及减少大脑因缺血损伤所需的关键特征。在缺血之后,脑自调节减损,引起脑血流减少和神经元死亡。我们在仔猪模型中

展现出,在整体HI之前投与鼠尾草素A保留脑动脉的自调节,一种保留神经元完整性的重要机制。此实例,我们假设且测试在HI之后投与鼠尾草素A是否可经由KOR和ERK路径保留脑自调节。

#### [0153] 材料和方法

[0154] 鼠尾草素A(纯度 $\geq 98\%$ )获自克玛戴克斯公司(ChromaDex, Inc., 美国加利福尼亚州尔湾(Irvine, CA, USA))。异丙肾上腺素(ISO)、诺丙纳托非敏(Nor-BIN)获自西格玛-奥德里奇(密苏里州,美国密苏里州圣路易斯)。所有其它化学物质(试剂级)也获自西格玛。

#### [0155] 动物和用于封闭颅骨窗的手术

[0156] 将两种性别的新生猪(1-5天大, 1.2-1.5kg)用于这项研究。动物实验方案由宾夕法尼亚州大学的机构动物照护与使用委员会批准。如先前所描述,异氟烷(1到2个最低肺泡浓度)最初用于麻醉诱导,接着 $\alpha$ -氯醛糖(30-50mg/kg, 以5mg/kg/hr补充, 静脉内)用于维持麻醉。在气管切开术之后,动物最初在室内空气下换气,且用加热垫保持温暖以维持直肠温度在37-39°C下。将两侧股动脉插入导管以监测血压、血液气体张力和pH。将股静脉插入导管以用于药物投与。置放连接于3个孔口的由具有玻璃盖片的钢环组成的封闭颅骨窗以用于直接软膜动脉观测和直径测量。小软膜动脉(120到160 $\mu\text{m}$ )和微动脉(50到70 $\mu\text{m}$ )在显微镜下鉴别,在连接于显微镜的监测器上观测,且经由视频微型定标器(型号VPA 550, 加利福尼亚州洛杉矶的佛埃公司)测量。连接于颅骨窗环的孔口装配17号皮下注射针以用于CSF取样、清洗和药物投与。在基线和HI后60分钟收集皮层外周蛛网膜CSF以用于ERK活性分析。

#### [0157] HI诱导

[0158] 低氧通过以下方式诱导持续10分钟:将室内空气换成N<sub>2</sub>用于换气,继而恢复室内空气换气。接着,全脑缺血通过经由颅中的中空螺栓灌注盐水来诱导,从而维持颅内压力高于平均血压持续20分钟。当在颅骨窗上方连接于显微镜的监测器上可见软膜动脉中的血流停止时,证实全脑缺血。为了避免库欣反应(Cushing response, 动脉压力由于高颅内压力而显著升高),在必要时抽血以维持平均动脉血压低于100mmHg。在缺血结束时,血液经由股静脉返回。

#### [0159] 药物治疗

[0160] 在HI之后进行四组静脉内药物投与(每一组中n=5): (1) DMSO组:在HI之后立即投与DMSO(鼠尾草素A的媒剂) 1 $\mu\text{l}$ /kg; (2) SA 0分钟组:在HI之后立即用鼠尾草素A(1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 于DMSO中) 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; (3) SA 30分钟组:在HI之后30分钟用鼠尾草素A(1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 于DMSO中) 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; (4) SA+Norbin组:在HI之后立即用鼠尾草素A(10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )和nor-BIN(1 $\mu\text{M}$ , 经由颅骨窗的一个孔口局部注射)。

#### [0161] 软膜动脉反应

[0162] 在HI之前以及在HI之后60分钟,获得软膜动脉对高碳酸血症、低血压和异丙肾上腺素(10nM, 1 $\mu\text{M}$ )的反应,如先前所述。将异丙肾上腺素用作阳性对照,因为其是作用时间短的药剂且其在此类模型中的血管扩张作用在我们实验室中是充分确立的。通过吸入高浓度CO<sub>2</sub>混合气体(10%CO<sub>2</sub>; 21%O<sub>2</sub>; 69%N<sub>2</sub>)产生两种水平的高碳酸血症(PaCO<sub>2</sub>在低水平时为50到60mmHg, 在高水平时为70到80mmHg)。通过从股动脉快速抽出5-8或10-15ml/Kg血液来产生两种水平的低血压,以诱导中度和重度低血压(平均血压降低25%为中度,降低45%为重度)。此类血压降低通过抽出或再输注其它血液来恒定地维持10分钟。

[0163] ERK活性测量

[0164] ERK活性接着从上文所述的冷冻CSF样品测定。pERK和ERK的水平利用ELISA试剂盒(宾夕法尼亚州普利茅斯米丁的恩佐生命科学国际公司)测量。

[0165] 统计分析

[0166] 通过重复测量ANOVA,接着邦弗朗尼方法作为事后检验,分析软膜动脉直径的数据。单向ANOVA用于比较在HI之前和之后60分钟每一组中以及在投与或不投与鼠尾草素A的组中的ERK活性变化(以pERK相较于ERK的比率形式定量)。在重复测量分析中排除基线数据(Graph Pad Prism 5.02版)。P<0.05的 $\alpha$ 水平被认为是在所有统计检验中显著的。值表示为平均值±标准误差。

[0167] 结果

[0168] 鼠尾草素A在全脑HI之后保留软膜动脉对高碳酸血症的自调节

[0169] 如图13中所示,小软膜动脉对HI之前两种水平的高碳酸血症起反应而扩张(呈现为基线)。当在HI结束时立即投与DMSO时,对高碳酸血症的扩张反应在HI之后钝化(与HI之前的基线相比,ps<0.01)。在HI之后立即或之后30分钟投与鼠尾草素A(10 $\mu$ g/kg)保留软膜动脉对高碳酸血症的扩张反应。此类反应在HI后30分钟共投与鼠尾草素A和诺丙纳托非敏(nor-BIN)时完全消除(与HI之前的基线相比,ps<0.01)。在软膜微动脉中获得类似的观察结果(数据未示出)。

[0170] 鼠尾草素A在全脑HI之后保留软膜动脉对低血压的自调节

[0171] 与低血压的结果相似,小软膜动脉对HI高碳酸血症(呈现为基线,图14)之前HI之前两种水平的低血压起反应而扩张。当在HI结束时立即投与DMSO时,扩张反应在HI之后钝化(与HI之前的基线相比,ps<0.01)。在HI之后立即或之后30分钟投与的鼠尾草素A(10 $\mu$ g/kg)保留软膜动脉对低血压的扩张反应。对低血压的此类反应在HI后30分钟共投与鼠尾草素A和nor-BIN时消除(与基线相比,ps<0.01)。在软膜微动脉中获得类似观察结果。

[0172] 软膜动脉对异丙肾上腺素的反应在所有组的实验中保持不变

[0173] 作为阳性对照,测量软膜动脉对异丙肾上腺素的反应(图15),且在HI之前和之后在所有组之间未观察到变化。

[0174] ERK信号传导参与鼠尾草素A的保留作用

[0175] ERK活性以CSF中的pERK/ERK水平比率形式定量。将无鼠尾草素作用的组中的ERK活性数据合并(DMSO组和SA+Norbin组;重新命名为DMSO+Nornin组)。如图16中所指示,无鼠尾草素的组中的ERK活性在HI之后60分钟显著增加(与HI前基线相比,p<0.05)。鼠尾草素A投与组的ERK活性降低到基线水平。

[0176] 论述

[0177] 由此实例得到三种新发现。首先,在HI之后即刻或之后30分钟投与鼠尾草素A保留软膜动脉对高碳酸血症和低血压的扩张反应。第二,鼠尾草素A的保留作用为钝化的KOR拮抗剂nor-BIN。且第三,鼠尾草素A阻断HI之后CSF ERK活性的增加。

[0178] 脑HI的问题和KOR激动剂的潜在作用

[0179] 出生窒息和小儿缺血中风均为分娩的常见并发症。在这两种并发症中发生的围产期HI可诱导重度和永久的神经心理缺陷,包括延迟的认知和行为发育、智力迟钝、大脑性麻痹和癫痫症,这对于患者、家庭和社会来说是破坏性的。令人遗憾的是,没有可用于有效围

产期HI管理的药物。降低体温为HIE的唯一治疗以减少负面并发症。但其在临床实践中不被广泛接受或不被推荐与药理学药剂组合。重组组织类型纤维蛋白溶酶原活化剂(t-PA, FDA批准用于急性缺血中风的治疗)展示出不良作用,包括增加经受诱导中风和减损脑血流动力学的小鼠中的中风梗塞体积。

[0180] 在其它缺血动物模型中已展现KOR激动剂的神经保护作用。举例来说,当在损伤之前30分钟或之后最多6小时投与时,KOR激动剂BRL 52537和CI-977减少对不同水平缺血起反应的皮层伤害,包括大脑肿胀和梗塞体积。这些发现表明KOR激动剂可为临床环境中HI治疗的有价值的替代药物。

[0181] 鼠尾草素A作为新颖药物

[0182] 尽管KOR激动剂展现极大的治疗价值,但大多数KOR激动剂由于其作为类鸦片的固有特征(低选择性和/或缺少可接受的安全概况)而尚未用于临床环境。不同于其它类鸦片KOR激动剂,鼠尾草素A为已知衍生自天然来源的最强力、高度选择性以及唯一的非类鸦片KOR激动剂。鼠尾草素A为墨西哥鼠尾草的活性组分,墨西哥鼠尾草是已被人类出于休闲和祭祀目食用数个世纪的天然丰富的多年生草本植物。这种化合物的许多固有特征使得其成为用于各种神经病况的潜在治疗药物。那些特征包括其能够从丰富的植物中提取并纯化或经由合成产生;起效作用快速;脂溶性;易于通过血脑屏障;镇静和抗伤痛感受作用(对病危患者尤其相关的特征);在高剂量或长期暴露的情况下在重要器官中的负面病理学发现(无毒性);无呼吸抑制;以及无明显的幻觉或烦躁不安的作用。鼠尾草素A已被评估为用于抑制的潜在药物。除了我们展示出在HI损伤之前投与鼠尾草素A的保护作用的发现之外,我们现已展现出,在HI损伤之后(最多30分钟)投与鼠尾草素A保留软膜动脉的自调节。这种保护作用通过添加KOR拮抗剂nor-BIN而消除,这指示鼠尾草素A的保护作用经由KOR介导。各种研究已证实,自调节(大脑的关键保护机制)在脑HI之后倾向于恶化。脑血管张力的自调节是大脑的关键保护机制。且在低血压期间减损的补偿性脑血管扩张促使缺血中风环境中的结果恶化。

[0183] ERK信号传导的作用

[0184] 由脑缺血/再灌注刺激的ERK信号传导为HI损伤的至关重要路径。我们已展现,ERK活性在HI之后增加,且所述增加涉及HI的神经元减损,且所述增加的抑制与对抗缺血的神经保护反应相关,所述神经保护反应可能与细胞凋亡减少相关。在此实例中,HI诱导的CSF ERK活性增加由鼠尾草素A阻断,这促进损伤后脑自调节的保护。值得注意的是,ERK信号传导在HI中的作用可能在HI损伤之前和之后不同。ERK信号传导的活化可能与预适应的保护作用相关。由预适应诱导的ERK信号传导上调减少中风时的神经元细胞凋亡,且在亚致死缺血之后海马中的ERK信号传导活化与由预适应诱导的神经保护相关。这些结果与我们的工作一致,我们的工作展示出,损伤前投与鼠尾草素A对损伤后脑自调节的减损具有保护性。总之,在HI之后0和30分钟投与鼠尾草素A在仔猪模型中经由KOR和ERK路径保留软膜动脉对高碳酸血症和低血压的自调节。

[0185] 实例3

[0186] 鼠尾草素A预处理在仔猪中在大脑低氧/缺血损伤之后经由ERK/MAPK保留脑血管自调节

[0187] 由于在用于先天性心脏手术的心肺绕道与深低温停循环(DHCA)手术期间的脑血

流中断的脑低氧/缺血是重要的临床问题。50%患有复杂先天性心脏病的经历心肺绕道与DHCA的儿童具有发育缺陷,如到学龄时的言语失能和注意缺陷障碍。在DHCA期间发生的脑低氧/缺血是可预测的,因此,有可能用药理学方法使由缺血诱导的脑损伤减到最少。令人遗憾的是,尚未鉴别出具有已证实的临床益处的药物。

[0188] 脑血管自调节损失是脑低氧/缺血的关键特征之一。对低血压自调节的损失可引起压力被动脑循环,其可减少脑血流且进一步加重脑缺血。对高碳酸血症的脑血管调控损失也有助于发展压力被动循环和室周白质软化。因此,从缺血保留脑血管自调节对于减少大脑因缺血损伤极为重要。我们已展现,鼠尾草素A(墨西哥鼠尾草的活性组分和非类鸦片 $\kappa$ 类鸦片受体(KOR)激动剂)是在正常和病理条件中的强力脑血管扩张剂。因此,鼠尾草素A可保护脑血管免于缺血。不同于其它KOR激动剂,鼠尾草素A长久以来已被不同族裔群体出于各种目的使用,包括精神体验和“治疗”疾病,指示其作为临床上可接受的药物的高潜力。

[0189] 已展现,KOR激动剂的全身投与在脑缺血的动物模型中具有神经保护作用。KOR激动剂可活化丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)。MAPK是关键的胞内信号传导系统,其包括细胞外信号调节的激酶(ERK)、c-Jun-N端激酶(JNK)和p38。已展现,ERK级联的长期和持续活化是脑缺血预适应的重要贡献机制。这一路径也参与许多其它形式的药理学预适应,如异氟烷和七氟烷。因此,鼠尾草素A可经由这一路径产生脑保护作用。基于上述证据,我们假设鼠尾草素A预治疗可经由活化MAPK从低氧/缺血保留软膜血管对低血压和高碳酸血症的自调节。

#### [0190] 方法

[0191] 鼠尾草素A(纯度 $\geq 98\%$ )是来自克玛戴克斯公司(美国加利福尼亚州尔湾)。异丙肾上腺素、U0126、sp600125和sb203580获自西格玛-奥德里奇(密苏里州,美国密苏里州圣路易斯)。所有其它化学物质也获自西格玛且属于试剂级的。

#### [0192] 动物和手术

[0193] 使用一到五天大的仔猪。方案由宾夕法尼亚州大学(费城(Philadelphia))的机构动物照护与使用委员会批准。异氟烷(1-2个最低肺泡浓度)最初用于诱导,接着 $\alpha$ -氯醛糖用于维持麻醉(30-100mg/kg,以每20-30分钟5-30mg/kg补充,静脉内)。在气管切开术之后,仔猪在室内空气下机械地换气,且用加热垫保持温暖,维持直肠温度在37到39℃下。将股动脉插管以用于连续的血压监测或间断的血液气体监测,且将股静脉插入导管以用于药物投与。如先前所描述(21),置放封闭颅骨窗以用于直接软膜动脉观测和直径测量(21)。小软膜动脉(120到160 $\mu\text{m}$ )和微动脉(50到70 $\mu\text{m}$ )在显微镜下鉴别,在连接于显微镜的监测器上观测,且经由视频微型定标器(型号VPA 550,加利福尼亚州洛杉矶的佛埃公司)测量。颅骨窗为具有玻璃盖片的钢环,连接于三个孔口,用于脑脊髓液(CSF)取样、清洗和药物投与。在基线和投与鼠尾草素A或U0126加鼠尾草素A后30分钟经由上述孔口中的一个收集皮层外周蛛网膜CSF以用于ERK/MAPK分析。

#### [0194] 方案

[0195] 低氧通过以下方式诱导持续10分钟:将室内空气换成N<sub>2</sub>用于换气,继而恢复室内空气换气;且接着全脑缺血通过经由颅中的中空螺栓灌注盐水来诱导,从而维持颅内压力高于平均血压持续20分钟。当在颅骨窗上方连接于显微镜的监测器上观测到软膜动脉中的血流停止时,证实全脑缺血。为了避免库欣反应(动脉压力由于高颅内压力而显著升高),在必要时抽血以维持平均动脉血压不高于100mmHg。在缺血结束时,血液经由股静脉返回。

[0196] 进行五组实验(每一组实验中 $n=5$ ): (1) 低氧/缺血与鼠尾草素A的媒剂DMSO,  $1\mu\text{l}/\text{kg}$ , 在低氧/缺血之前30分钟投与; (2) 低氧/缺血与鼠尾草素A,  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 于DMSO中,  $10\mu\text{g}/\text{kg}$ , 静脉内; (3) 低氧/缺血与鼠尾草素A ( $10\mu\text{g}/\text{kg}$ , 静脉内) 和U0126 ( $1\text{mg}/\text{kg}$ , 静脉内, ERK上游的蛋白激酶抑制剂); (4) 低氧/缺血与鼠尾草素A和sp600125 ( $1\mu\text{M}$ , 经由颅骨窗的一个孔口局部注射, JNK的抑制剂); (5) 低氧/缺血与鼠尾草素A和sb203580 ( $10\mu\text{M}$ , 经由颅骨窗的一个孔口局部注射, P38的抑制剂)。在鼠尾草素A之前30分钟投与U0126、sp600125和sb203580。Sp600125和sb203580与血管活性刺激物共投与以便在损伤之后具有持续的脑皮层表面暴露。

[0197] 高碳酸血症( $\text{PaCO}_2$ 在低水平时为50到60mmHg, 在高水平时为70到80mmHg) 通过吸入高浓度 $\text{CO}_2$ 混合气体 ( $10\%\text{CO}_2$ ;  $21\%\text{O}_2$ ;  $69\%\text{N}_2$ ) 来产生。低血压通过从股动脉抽血来产生(平均血压降低25%为中度, 降低45%为重度)。在低氧/缺血之前以及在损伤之后60分钟获得软膜动脉对低血压、高碳酸血症和异丙肾上腺素 ( $10\text{nM}$ ,  $1\mu\text{M}$ ) 的反应, 如先前所描述。

[0198] ERK和pERK测量

[0199] 为了测试ERK对于观察到的鼠尾草素A对大脑低氧/缺血的影响的作用, 收集CSF样品用于MAPK。MAPK同工型利用市售ELISA试剂盒(宾夕法尼亚州普利茅斯米丁的恩佐生命科学国际公司) 测量。

[0200] 统计分析

[0201] 通过重复测量ANOVA与格林豪斯盖赛尔校正 (Greenhouse Geisser correction) 分析在关于软膜动脉直径研究脑低氧/缺血对于软膜动脉对高碳酸血症、低血压和异丙肾上腺素的反应的作用时获得的数据。邦弗朗尼校正用于所有事后分析 (10个比较用于每一刺激)。五种不同治疗 (DMSO、SA、SB203580、U0126和SP600125) 作为组间比较的因子, 且将对在低氧/缺血之前和之后三种刺激的四次测量用作重复测量因子 ( $5 \times 4 \times 3 \times 2$ )。基线未包括在重复测量分析中。相同的统计方法用于pERK/ERK数据以比较在投与鼠尾草素A之前和之后的比率变化, 三种不同治疗 (DMSO、SA和SA+U0126) 作为组间因子, 时间 (在SA之前和之后30分钟) 作为重复测量因子。 $P < 0.05$ 的 $\alpha$ 水平被认为是在所有统计检验中显著的。所有值均表示为平均值 $\pm$ 标准误差。此实例中报导的所有P值均已针对多重比较作用进行校正。尽管这一实例中的样品规模相当小, 但没有明显违反缺少交互作用、方差齐性和正态分布的假设。

[0202] 结果

[0203] 鼠尾草素A在低氧/缺血之后保留软膜动脉对低血压的自调节。

[0204] 如图17中所示, 在低氧/缺血之前的基线时, 小软膜动脉对两种水平的低血压扩张, 但扩张反应在低氧/缺血之后显著降低 (与在低氧/缺血之前的扩张反应相比,  $p < 0.001$ )。用鼠尾草素A ( $10\mu\text{g}/\text{kg}$ , 静脉内) 预治疗保留软膜动脉对低血压的扩张反应。这通过U0126 (ERK的拮抗剂) 消除 (与SA组相比,  $p < 0.001$ )。然而, 在投与鼠尾草素A之前30分钟投与的SP600125 (JNK的拮抗剂, 与SA组相比,  $p > 0.05$ ) 和SB203580 (P38的拮抗剂, 与SA组相比,  $p > 0.05$ ) 的治疗之后, 无显著变化。在软膜微动脉中获得类似的观察结果 (数据未示出)。

[0205] 鼠尾草素A在低氧/缺血之后保留软膜动脉对高碳酸血症的自调节。

[0206] 与对低血压的反应相似, 在低氧/缺血之前的基线时, 小软膜动脉对两种水平的高碳酸血症扩张 (图18)。扩张反应在低氧/缺血之后钝化。用鼠尾草素A ( $10\mu\text{g}/\text{kg}$ , 静脉内) 预

治疗保留软膜动脉对高碳酸血症的扩张反应。这通过U0126 (ERK的拮抗剂) 消除。从鼠尾草素A投与之前30分钟投与的SP600125和SB203580观察到的保留作用无显著变化 ( $P>0.05$ )。在软膜微动脉中获得类似的观察结果 (数据未示出)。

[0207] 软膜动脉对异丙肾上腺素的反应在所有组的实验中不变

[0208] 作为阳性对照且展示在图19中, 在存在或不存在上述干预的情况下, 在低氧/缺血之前和之后, 软膜动脉对异丙肾上腺素的反应在所有组中不变。

[0209] ERK参与鼠尾草素A的保留作用

[0210] CSF中的pERK/ERK比率在鼠尾草素A预处理之后30分钟显著增加 (图20)。然而, 如果U0126 (ERK的拮抗剂) 在鼠尾草素A投与之前30分钟投与, 那么pERK/ERK的比率在鼠尾草素A预处理之后30分钟不变 (图20)。

[0211] 论述

[0212] 在此实例中有两种主要的新发现。第一, 鼠尾草素A的预处理在低氧/缺血之后保留脑血管自调节能力。第二, ERK/MAPK参与鼠尾草素A保留自调节的能力。此实例还证实了先前的发现: 新生儿仔猪中的全脑低氧/缺血使脑血管对低血压和高碳酸血症反应的自调节能力钝化。

[0213] 尽管婴儿中对脑低氧/缺血的病理生理学反应并未被充分阐明, 但脑血管功能障碍在低氧/缺血之后在神经损伤中起到极重要的作用。没有可用于预防或保留脑血管对大脑损伤继发的低血压和高碳酸血症的自调节反应的最优药理学干预。由食品和药物管理局 (Food and Drug Administration) 批准的用于中风的唯一药物为重组组织纤维蛋白溶酶原活化因子 (tPA)。然而, 尽管其在重新打开凝结血管中具有益作用, 但tPA增加小鼠的中风梗塞体积且其增强由低氧/缺血诱导的自调节减损。已证实L-NNA (一氧化氮合成的抑制剂) 在缺血之后投与能够恢复脑血管自调控, 然而, 其安全概况对于临床使用尚不明确。

[0214] 在此实例中, 我们展现出, 在低氧/缺血之后, 鼠尾草素A预处理在仔猪模型中保留对低血压和高碳酸血症的自调节反应, 这打开其用以减弱脑低氧/缺血的临床应用, 尤其用于婴儿中DHCA期间的预期大脑缺血。需要更多的研究来提供用以展现其是否可减弱神经元细胞因低氧/缺血损伤的直接证据。

[0215] 不同于其它不具有已证实临床价值的KOR受体, 鼠尾草素A是从丰富的天然植物墨西哥鼠尾草中提取的。与鸦片的历史极相似, 墨西哥鼠尾草作为天然丰富的植物已被人类出于各种目的使用数个世纪。已提出, 墨西哥鼠尾草的活性组分鼠尾草素A可为临床实践中使用的潜在新 $\kappa$ 激动剂。

[0216] 如我们已展现, 鼠尾草素A在正常和收缩条件中为强力脑血管扩张剂。然而, 除非在持续投与的情况下, 否则这一扩张作用是短暂的; 因此, 自调节的保留不同于从低氧/缺血之前30分钟投与鼠尾草素来自扩张作用的诱导。MAPK已证实在从细胞表面到细胞核的信号转导中很重要。在缺血之前ERK/MAPK的升高与在缺血之后的神经元存活率有关 (15)。在亚致死缺血之后海马CA1区中的ERK/MAPK活化与由预适应诱导的神经保护相关。运动预适应通过上调ERK/MAPK来减少中风时的神经元细胞凋亡。在此实例中, CSF中的pERK/ERK在投与鼠尾草素A之后30分钟显著增加, 指示ERK的活化且也表明鼠尾草素A当在大脑缺血之前投与时可能具有血管或神经保护性。然而, 其它研究已观察到ERK/MAPK在损伤再灌注时期后即刻升高与仔猪中对脑血管扩张剂的反应减损以及低氧/缺血之后的组织病理学相关



(32)。所观察到的ERK/MAPK功能二元性的原因是不确定的但可能涉及起始细胞位点、信号偶合或释放的时间模式。

[0217] 此实例中使用的新生仔猪提供含有大量白质的多脑回大脑的独特优点,与啮齿动物大脑相比,其对缺血损伤更敏感,且与人类更相似。总之,鼠尾草素A预处理经由仔猪模型中的ERK/MAPK保留对大脑低氧/缺血之后的低血压和高碳酸血症的脑血管自调节。

[0218] 实例4

[0219] 鼠尾草素作为困难气管管理的辅助药物

[0220] 当困难气管成为问题时,我们通常必须管理苏醒(未麻醉)状态时的患者气管,但部分镇静有助于患者舒适度和程序的进行。理想的镇静剂应符合以下准则:(1)具镇静性;(2)具有快速起效;(3)作用时间短;(4)抑制咳嗽;(5)具有最低程度的呼吸抑制;(6)具有最低程度的血流动力学作用;以及(7)易于静脉内递送。鼠尾草素A满足这些准则,至少基于文献中可用的数据。其为 $\kappa$ 类鸦片受体激动剂,至少与常规 $\mu$ 受体激动剂(吗啡碱)相比,具有镇静和离解作用,抑制咳嗽且具有最低程度的呼吸压抑作用。其具有快速起效和消退,且血流动力学变化最低。因此,鼠尾草素在苏醒插管期间可能有用。然而,鼠尾草素难溶于水中。一种选择方案为使用其盐形式来增加水溶性,且其它选择方案为使用脂质乳液。两种技术易于可供使用,且已成功地用于围手术期环境中的其它麻醉药物。葫芦脲(图11)可用作载剂。如图12-13中所示,可使用鼠尾草素和葫芦脲的复合物。

[0221] 与这一药物相关的另一问题是其烦躁不安的作用,其可能用短效苯并二氮唑(如咪达唑仑(midazolam))解决。

[0222] 实例5

[0223] 鼠尾草素A在新生小鼠低氧模型中降低死亡率且改善神经结果

[0224] 新生儿低氧-缺血(HI)损伤可诱导高死亡率和终身灾难性的神经和神经发育缺陷,其包括癫痫症、学习失能和行为病症。令人遗憾的是,没有可供用于管理HI相关神经缺陷的有效药物。治疗性降低体温以及支持性治疗被视为唯一有效的方法。然而,良好控制的降低体温可能仅适用于公认机构中的经高度选择的患者群体,且其仅可在窒息婴儿中产生仅约30%的结果改进。其需要大量的训练和多学科协作。在资源不足的机构中,治疗性降低体温可能是危险的,引起死亡、多重器官衰竭、突然心跳骤停、肺高血压和出血的发生率增加。因此,对开发新颖药物和/或易于可管理的治疗策略以减少围产期中神经元因脑HI损伤存在显著医学需求。

[0225] 鼠尾草素A(SA)为非类鸦片、高度选择性且强力 $\kappa$ 类鸦片受体(KOR)激动剂,从墨西哥鼠尾草提取出来,墨西哥鼠尾草是已被人类食用数世纪的植物。使用仔猪模型,先前已展现,在大脑HI之前或之后投与SA保护大脑免于HI(苏D(Su D)等人,《麻醉镇痛(Anesth Analg.)》2012;114:200-204;苏D等人,《麻醉学(Anesthesiology)》.2011;114:374-379;和王Z(Wang Z)等人,《公共科学图书馆·综合(PLoS One)》.2012;7:e41724;其各自以全文引用的方式并入本文中),指示SA可为用于新生儿大脑保护的潜在药物。不同于其它类鸦片KOR激动剂,SA不产生言语困难,且其固有特征使得其成为各种神经病况的理想治疗候选物。这些特征包括:快速起效,易于通过中枢神经系统,抗伤害感受和镇静作用,在长期或高剂量暴露之后器官中无负面病理学变化,以及无呼吸压抑作用。尽管据报导化合物具有致幻活性,但此类作用存在时间短且并不产生血压和心跳速率变化或认知障碍。在近来的人

类研究中,未观察到与SA相关的持久不良作用。

[0226] 在此实例中,我们假设SA投与可在新生小鼠低氧模型中改善结果。选择小鼠模型,归因于公认模型的可用性,神经行为测试策略和研究短期和长期神经结果两者的能力。

[0227] 个体和方法

[0228] 鼠尾草素A(纯度 $\geq 98\%$ )获自爱坡药物(Apple Pharms,美国北卡罗来纳州阿什维尔(Asheville NC,USA))。所有其它化学物质(试剂级)获自西格玛-奥德里奇(密苏里州,美国密苏里州圣路易斯)。

[0229] 实验方案

[0230] 方案由宾夕法尼亚州大学的机构动物照护与使用委员会(IACUC)批准且根据美国国家卫生研究院动物使用指南(National Institutes of Health guidelines for the use of animals)进行。C57BL/6J小鼠购自杰克逊实验室(The Jackson Laboratory,缅因州巴港(Bar Harbor,ME))且近交幼畜用于后续实验。幼畜在出生之后圈养在12小时光/暗循环下,且在整个研究期间自由获得食物和水。将来自不同窝的幼畜随机分成3组。对照组中的幼畜( $n=11$ )接受腹膜内注射17%二甲亚砜(DMSO)且无低氧损伤;低氧组( $n=46$ )接受腹膜内注射17%DMSO和低氧损伤;SA组( $n=26$ )接受腹膜内注射含0.5mg/kg SA的17%DMSO和低氧损伤。从研究中排除低体重( $<1.2g$ )的幼畜。

[0231] 低氧损伤

[0232] 在产后第1天诱导低氧损伤。在腹膜内注射之后,将幼畜放入温度维持在 $37^{\circ}\text{C}$ 下的水浴中的玻璃腔室中。将腔室紧紧地关闭,且用8%氧气(其余为氮气)填充。在120分钟低氧气体暴露之后,打开腔室,且使幼畜暴露于空气。进行胸腔按压和肢体拉伸持续最多20分钟以恢复自发呼吸。接着,将成功恢复自发呼吸的幼畜在恢复持续30分钟之后送回其母亲处。

[0233] 死亡率测定

[0234] 如果在缺氧损伤之后立即复苏20分钟不可恢复自发呼吸,那么新生小鼠将被视为非存活的。死亡率将计算为:生存率=(组中小鼠数目-非存活数目)/组中小鼠数目。

[0235] 短期发育运动行为观察

[0236] 从产后第2天到产后第21天,将幼畜称重,且每天进行运动行为观察。在塑料测试箱中个别地观察幼畜。记录以下行为中的每一种持续3分钟:爬行、行走、跑动、点头和嗅探、坐、直立和眼张开。在观察之后,进行放置反射、悬崖排斥、负趋地性、扶正反应和前肢抓握测试。记录持续两个连续天的行为或反射的首次出现。

[0237] SA的长期神经行为作用

[0238] 进行开阔场地测试以在产后第21天(此时小鼠被考虑青少年)评估运动活动。将小鼠个别地置放在 $41\text{cm(L)} \times 41\text{cm(W)} \times 30\text{cm(H)}$ 塑料箱中。“中心区域”定义为箱子中心的 $20.5\text{cm} \times 20.5\text{cm}$ 正方形。区域的其余部分定义为“周边区域”(参见图25A)。在前5分钟和30分钟记录每一小鼠在探索中心部分和周边部分花费的时间和在每一相应区域中的直立行为的次数。

[0239] 在10-11周龄时,按以下次序在数种行为任务中测试所有小鼠:零形迷宫、巴恩斯迷宫(barnes maze)和恐惧适应。进行这些任务以检查小鼠的基础焦虑水平、自发运动活动、运动学习、空间学习和关联记忆。每一行为测试之间给小鼠休息5天。

[0240] 零形迷宫(焦虑样行为):“开放中的时间”测量小鼠因其避免开放空间的倾向的焦

虑。焦虑通过记录在开放对比封闭空间中花费的时间来测量。焦虑增加与开放中的时间减少相关。开放/封闭转变测量整体活动性。转变增加等同于更大活动性。

[0241] 巴恩斯迷宫(空间学习):测量在视觉提示下学习的能力。到达目标的时间测量在19个其它洞和数个视觉提示下在场所中找到目标洞花费的时间。巴恩斯迷宫易于设置且可能压力更小,且为用以研究空间记忆的水迷宫的有效替代物。巴恩斯迷宫任务的优点之一在于其不会受到如其它类似任务一般多的压力影响且不使用强烈排斥刺激或剥夺。

[0242] 恐惧适应(记忆):记录训练试验木僵、短期情境木僵、长期情境木僵和提示试验木僵以检查并评估低氧损伤之后的记忆缺陷。

[0243] 统计学分析

[0244] 不同组中的幼畜死亡率使用 $2 \times 2$ 列联表比较。P值用费歇尔精确检验(Fisher exact test)计算。对于运动行为观察,每一参数的首天出现用单因素ANOVA继而特凯氏检验(Turkey's test)比较。用Graph-Pad Prism(5.0版)进行统计分析。数据以平均值 $\pm$ SEM形式展示。 $p < 0.05$ 的值被认为是统计学上显著的。

[0245] 结果

[0246] SA显著降低死亡率

[0247] 低氧组中46只幼畜中的14只和SA组中26只幼畜中的16只在HI损伤之后存活。SA使死亡率从70%显著降低到38.5% ( $p = 0.014$ ) (图21)。

[0248] SA在产后第2天和第3天增加体重

[0249] 与低氧组相比,在产后第2天(P2) ( $p = 0.0318$ ) 和第3天(P3) ( $p = 0.0221$ ), SA投与增加体重。然而,在P7、P14和P21未观察到组间的显著差异(图22)。

[0250] SA改善发育结果

[0251] 低氧组中的幼畜展示出前肢抓握、悬崖排斥、翻正反应和眼张开的出现延迟。SA投与预防这些延迟(图23)。

[0252] 与对照组中的 $18.18 \pm 0.44$ 天相比,低氧幼畜展示出在 $19.86 \pm 0.29$ 天不用支持物直立(图24I)的延迟出现( $p = 0.0034$ )。与和对照组相似的在 $18.69 \pm 0.38$ 的低氧幼畜相比,投与SA的低氧幼畜呈现显著的表现改善( $p = 0.0252$ )。然而,其它发育参数无统计显著性,如爬行(图24A)、行走(图24B)、跑动(图24C)、头指向和嗅探(图24D)、坐(图24E)、用支持物直立(图24F)、负趋地性测试(图24G)和放置反射(图24H),不过与对照和SA组两者相比,低氧幼畜也展示延迟的出现。

[0253] 长期神经行为结果

[0254] 尽管SA小鼠在P21在开阔场地测试期间在中心区域中花费更多时间,但这一差异在统计学上不显著(图25)。同时,在P21在前5分钟和30分钟的直立测试在低氧之后减损。在SA投与的情况下未观察到这一减损,与对照组中相似,表明SA可改善低氧诱导的神经结果(分别 $p = 0.0167$ 和 $p = 0.0203$ ) (图26)。

[0255] SA对HI之后的抗焦虑特性的作用使用高架零形迷宫测试。在SA与低氧组之间在迷宫的开放组和开放/封闭转变中花费的时间百分比无显著差异(图27A、B)。巴恩斯迷宫任务用于评估空间记忆缺陷。然而,组间无显著差异(图27C和D)。此外,恐惧适应的测试展示出所有组均以类似速率学习,且未观察到组间的显著差异(图28)。

[0256] 论述

[0257] 在此实例中,我们发现在低氧之前投与SA降低死亡率且改善数种神经发育参数。然而,未观察到组间在21天以外的神经结果的显著差异。此实例中的发现与仔猪的研究一致,所述研究揭露SA可减少HI诱导的损伤。

[0258] SA和低氧损伤之后的死亡率

[0259] 死亡率的降低是这项研究中最惊人的发现之一。虽然其可能归因于SA的神经保护作用,但有可能SA可在低氧损伤期间在其它重要器官(如心脏)中提供保护作用。已展现,KOR激动剂可保护心脏免于缺血。未来的研究需要使用SA作为潜在治疗剂的进一步明确界定和针对性的研究。这一模型的对照组中的死亡率极高(70%),其高于使用修改后的莱斯-万努奇模型(Rice-Vannucci model)报导的死亡率。可能的解释可能与在我们的研究中使用产后第1天的幼畜代替在莱斯-万努奇模型中使用的产后第10天的幼畜相关。由于死亡率较高,我们保持研究设计对于仅神经结果观察来说相对简单,无剂量反应研究和治疗性时间窗口研究或机制研究。

[0260] 短期发育结果

[0261] 神经发育因低氧损伤减损,如通过神经发育行为和反射(扶正、置放、负趋地性和悬崖排斥)的缺陷所指示。SA改善一些发育行为(前肢抓握、眼张开和不用支持物直立)和一些反射(扶正和悬崖排斥)。尽管观察到一些显著改善,我们发现SA并未对与大脑各个区域有关的发育参数的所有方面提供神经保护。有可能并非所有观察敏感到足以检测行为的微妙变化,其可能需要相当大的样品规模。

[0262] 长期神经结果

[0263] 为了评估在10-11周(成年年龄)在长期中的大脑功能和对SA情绪行为的影响,我们选择用以测量焦虑水平的零形迷宫,用以测量空间和视觉学习的巴恩斯迷宫以及用以测量关联记忆的恐惧适应。令人遗憾的是,组间无任何显著差异。最重要的是,在对照组与低氧组之间未发现长期神经结果的差异,指示这一模型可能不适用于长期神经结果研究。尽管其它报导已指示SA损害长期记忆且不影响短期记忆,但在这项研究中对SA投与之后未观察到任何记忆或学习失能。

[0264] 结论

[0265] 在此实例中,SA的投与是与数个方面的神经结果改善和低氧损伤之后的死亡率降低相关的,表明SA可用作新生儿低氧的治疗策略。

[0266] 实例6

[0267] 鼻内鼠尾草素A在小鼠中风模型中减小梗塞大小且改善神经结果

[0268] 鼠尾草素A(SA)为唯一已知的天然存在的非类鸦片KOR激动剂,其已被人类食用数世纪,且安全概况已知。其在经由粘膜或吸入剂递送时具有快速起效(在数分钟内)。SA鼻内可在其中静脉内(IV)接取不可用(其对于医院外心跳骤停事件来说极常见)的急性环境中快速进行。缺血中风的有效疗法的主要障碍在于药物如何可快速递送到患者。虽然静脉内投与确保快速起效,但静脉内接取在医院外情形中通常不可用。经口投与对于欲获得的药理学作用通常需要超过30分钟。因此,快速治疗性鼻内递送将使得SA成为用于治疗大脑低氧/缺血事件的极实用且有利的药物。

[0269] 此实例展示SA的鼻内投与在小鼠中风模型中减小梗塞大小且改善神经结果。图29描绘所使用的方案。简单来说,在小鼠中诱导大脑中动脉阻塞(MCAO),且鼻内投与鼠尾草素

A于DMSO中的指示剂量。将小鼠再灌注24小时,之后,将小鼠安乐死且测量梗塞大小和血管渗漏。鼠尾草素A投与展现运动功能的剂量依赖性改进,如通过握力强度评分(图30)和神经行为(图31)所测量。鼠尾草素A的鼻内投与还引起梗塞大小的剂量依赖性减小(除了保护作用在250 $\mu$ g/kg的剂量下减弱),如通过大脑的TTC染色中的白色梗塞面积减小可见(图32和33)。伊文斯蓝(Evans blue)外渗指示在脑的缺血和再灌注之后的血脑屏障破坏和血管渗漏。鼻内鼠尾草素A投与减少破坏和渗漏,而 $\kappa$ 受体拮抗剂诺丙纳托非敏(norbin)的投与抑制鼠尾草素A的保护作用(图34)。鼻内鼠尾草素A改善整体运动功能,如图35中所示。尚未投与鼠尾草素A的小鼠(地上的小鼠)通常不可行走,因为左侧在MCAO之后24小时是瘫痪的;已鼻内投与鼠尾草素A的小鼠(绳上的小鼠)可在悬挂的绳上爬行。

[0270] 鼠尾草素A的鼻内投与避免静脉内接取用于快速药物递送的需求,缩短药物递送到患者的时间,且增加成功保护大脑的机率,因为缺血大脑损伤的治疗窗极狭窄。

[0271] 实例7

[0272] 赫克洛因在仔猪模型中经由 $\kappa$ 类鸦片受体和环单磷酸腺苷(cAMP)扩张脑血管

[0273] 赫克洛因是衍生自结构上相关的化合物鼠尾草素A的第一种非类鸦片 $\mu$ 激动剂。由于 $\kappa$ 类鸦片受体活化引发软膜动脉扩张,且鼠尾草素A为会活化一氧化氮合成酶、 $\kappa$ 受体和三磷酸腺苷敏感性钾通道的强力脑血管扩张剂,故赫克洛因很可能也可引发脑血管扩张。赫克洛因在竞争结合分析中具有对 $\mu$ 超过 $\kappa$ 受体大约8倍选择性和对 $\mu$ 超过 $\delta$ 受体大约98倍选择性。因此,重要的是阐明对于来自此类别的化合物其 $\mu$ 激动作用是否在脑血管作用中起到任何作用,归因于其作为非类鸦片受体激动剂的潜在临床暗示。

[0274] cAMP为类鸦片受体下游的关键调节剂(刘(Liu)和安纳德(Anand),2001),且cAMP信号传导的活化引发血管平滑肌松弛,引起猪大脑的脑血管扩张。另外,投与类鸦片受体拮抗剂会减轻cAMP类似物诱导的软膜,表明cAMP介导的与类鸦片介导的血管扩张之间的潜在关联。有可能赫克洛因可经由cAMP路径诱导脑血管扩张。

[0275] 此处,我们假设赫克洛因(衍生自鼠尾草素A的第一种非类鸦片 $\mu$ 激动剂)可经由 $\mu$ 和 $\kappa$ 类鸦片受体和cAMP路径扩张脑血管。这一假设区别于我们先前与鼠尾草素A相关的研究,因为赫克洛因被归类为 $\mu$ 受体激动剂,尽管其结构上与高度选择性 $\kappa$ 类鸦片受体激动剂鼠尾草素A类似。

[0276] 实验程序

[0277] 赫克洛因(纯度 $\geq 99\%$ )获自埃克森科学有限责任公司(Ascent Scientific LLC,美国马萨诸塞州剑桥(Cambridge,MA,USA))。异丙肾上腺素、NTP、 $\beta$ -FNA、Rp-cAMPS和Sp-8-Br-2'-O-Me-cAMPS(Sp-cAMPS)购自西格玛-奥德里奇(美国密苏里州圣路易斯)。所有其它化学物质属于试剂级的且也获自西格玛。

[0278] 体外亲和力测定

[0279] 将用克隆的大鼠 $\kappa$ 受体和克隆的人类 $\mu$ 受体转染的细胞株用于如先前所描述的亲和力和测定。将[3H]U69593(强力 $\kappa$ 受体激动剂)和[3H]DAMGO( $\mu$ 受体激动剂)用作测试化合物的竞争物。赫克洛因制备为DMSO中的1mg/ml储备液。也制备鼠尾草素A的类似储备液(阳性对照)。Ki测定在国立精神卫生研究所(National Institute of Mental Health)的精神活性药物筛选程序(Psychoactive Drug Screening Program,合同号HHSN-271-2008-00025-C,NIMH PDSP;<http://pdsp.med.unc.edu/>)下进行。

[0280] 使用计算对接的结合位点位置

[0281] 对接计算使用如先前所描述的DockingServer (<http://www.dockingserver.com>) 进行以定位配体结合位点。赫克洛因坐标从PubChem服务器 (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载。鼠类 $\mu$ 类鸦片受体 (PDB代码:4DKL) 和 $\kappa$ 类鸦片受体 (PDB代码:4DJH) 的高分辨率结构的坐标从蛋白数据库 (PDB) 服务器下载。我们经由服务器将加斯特艾格部分电荷 (Gasteiger partial charge) 添加到赫克洛因原子上。在这项研究中使用 $30 \times 30 \times 30$  Å 网格点和 $0.375$  Å 间隔的亲和力 (网格) 图。对接结果的排名靠前位姿用于比较配体对每一受体的重叠。我们使用PyMOL (<http://www.pymol.org/>, 第1.3版, 薛定谔有限责任公司 (Schrödinger, LLC)) 来产生图形渲染。

[0282] 动物和手术

[0283] 将两种性别的新生猪 (年龄为最多6天,  $1.1$ – $2.0$  kg) 用于这项研究。方案由宾夕法尼亚州大学 (费城) 的机构动物照护与使用委员会批准。使用新生仔猪模型是因为其大脑为多脑回的且含有比灰质更多的白质, 这与人类的大脑相似。此外, 头部足够大以便插入颅骨窗和血管观测。动物用异氟烷 ( $1$ – $2$  个最低肺泡浓度) 诱导且用 $\alpha$ -氯醛糖 ( $80$ – $100$  mg/kg, 以  $5$  mg/kg  $\cdot$  h 补充, 静脉内) 维持。将两侧股动脉插入导管以监测血压和血液气体以维持恒定的二氧化碳和pH。将导管插入到右股静脉中以用于药物投与。动物在气管插管后在室内空气下换气。加热垫用于将动物的直肠温度维持在 $37$ – $39$  °C下。在仔猪的头顶部上置放封闭颅骨窗以用于直接软膜动脉观测和直径测量。封闭颅骨窗由三个部分组成: 不锈钢环、圆形玻璃盖片以及由连接于所述不锈钢环中的三个预切割洞的17号皮下注射针组成的三个孔口。CSF经由颅骨窗孔口收集以用于一些动物中的cAMP测量。窗口下的空间用具有以下组成的人工CSF填充 (以mM为单位):  $3.0$  KCl;  $1.5$  MgCl<sub>2</sub>;  $1.5$  氯化钙;  $132$  NaCl;  $6.6$  豚;  $3.7$  右旋糖;  $24.6$  NaHCO<sub>3</sub>; pH  $7.33$ ; PaCO<sub>2</sub>,  $46$  mmHg; 和PO<sub>2</sub>  $43$  mmHg。使人工CSF升温到 $37$ – $38$  °C, 随后施加于脑皮层表面。软膜动脉用安装在解剖显微镜上的摄像机观察。血管直径由投与药物的研究者从连接于摄影机的视频监视器用视频微型定标器 (VPA 550; 加利福尼亚州洛杉矶的佛埃公司) 测量。

[0284] 方案

[0285] 在存在或不存在研究药物的情况下, 在注射人工CSF之后, 每30秒监测并记录两种类型的软膜血管, 即, 小动脉 (静息直径 $120$ – $160$   $\mu$ m) 和微动脉 (静息直径 $50$ – $70$   $\mu$ m)。通常, 窗口经由孔口在30秒内用 $1$ – $2$  ml CSF冲洗。在具有或不具有 $\beta$ -FNA、NTP、Sp-cAMPS和Rp-cAMPS的情况下, 获得对赫克洛因 ( $0.1$  nM和 $10$  nM, 用DMSO溶解) 和异丙肾上腺素 ( $10$  nM和 $1$   $\mu$ M) 的反应。所有测试药物溶液均在使用当天新鲜制备。

[0286] cAMP分析

[0287] 在投与赫克洛因和NTP之前和之后10分钟收集脑皮层外周蛛网膜CSF样品以测量cAMP水平。将人工CSF缓慢输注到窗口的一个孔口中, 允许CSF自由滴到对置孔口上的收集试管中。市售ELISA试剂盒 (密歇根州安娜堡的分析设计 (Assay Designs, Ann Arbor, MI)) 用于定量cAMP浓度。

[0288] 统计分析

[0289] 使用单向ANOVA (双尾), 接着邦弗朗尼事后检验或邓尼特多重比较检验 (Dunnett's multiple comparison test) (用于视窗 (Windows) 的SPSS 11.0), 分析所有数据。 $P < 0.05$

的 $\alpha$ 水平被认为是在所有统计检验中显著的。所有值均表示为平均值 $\pm$ 标准误差。论文中报导的所有P值均已针对多重比较作用进行校正。尽管这项研究中的样品规模相当小,但没有明显违反缺少交互作用、方差齐性和正态分布的假设。

#### [0290] 结果

##### [0291] 赫克洛因与 $\mu$ 和 $\kappa$ 受体结合

[0292] 如图36A中所示,与DAMGO ( $K_i=2.5\text{nM}$ ) 相比,赫克洛因与 $\mu$ 受体的结合亲和力相对较弱 ( $K_i=45\text{nM}$ )。赫克洛因的结合位点与 $\beta$ -FNA (一种选择性 $\mu$ 类鸦片受体配体,呈晶体结构形式,展示在图36B中) 的结合位点重叠。类似地,与U69593 ( $K_i=0.8\text{nM}$ ,图37A) 相比,赫克洛因与 $\kappa$ 受体的亲和力相对较弱 ( $K_i=184\text{nM}$ ),且结合位点与JDTic (一种选择性 $\kappa$ 受体配体,呈晶体结构形式,展示在图37B中) 重叠。赫克洛因对 $\mu$ 受体的结合亲和力与对 $\kappa$ 受体的结合亲和力相比强约4倍。

[0293] 赫克洛因在投与后诱导 $\kappa$ 受体依赖性血管扩张。

[0294] 软膜动脉直径在赫克洛因投与之后增加,且无显著全身血压变化。施用 $0.1\text{nM}$ 赫克洛因诱导 $10.6\%$ 直径扩张,而 $10\text{nM}$ 赫克洛因诱导平均 $17.8\%$ 直径扩张。扩张作用通过诺丙纳托非敏(NTP,一种 $\kappa$ 受体拮抗剂)完全消除(图38A,与赫克洛因投与组相比, $P_s<0.05$ ),而非受 $\beta$ -FNA影响(图38B)。异丙肾上腺素诱导的软膜动脉扩张通过NTP或 $\beta$ -FNA不变。 $\beta$ -FNA自身引起最低程度的软膜动脉扩张( $P<0.05$ ,邓尼特多重比较检验)。这些结果指示赫克洛因诱导的血管扩张经由 $\kappa$ 而非 $\mu$ 类鸦片受体介导。

[0295] 通过赫克洛因的软膜动脉扩张经由cAMP信号传导介导。

[0296] 赫克洛因的投与显著增加CSF中的cAMP水平。升高的cAMP水平通过NTP阻断,而非在 $\beta$ -FNA投与之后受影响(图39A)。此外,PKA拮抗剂Rp-cAMPS使赫克洛因介导的软膜动脉扩张钝化。 $10\mu\text{M}$  Rp-cAMPS与 $0.1\text{nM}$ 或 $10\text{nM}$ 赫克洛因的共投与减弱软膜动脉直径的变化(图39B)。由cAMP类似物Sp-cAMPS诱导的动脉扩张与异丙肾上腺素相似( $P_s>0.05$ )。这些数据表明cAMP/PKA路径调节赫克洛因介导的脑血管扩张。

[0297] 在此实例中有至少三种发现。第一,赫克洛因为强力软膜动脉扩张剂,不过其被归类为非类鸦片 $\mu$ 受体激动剂。第二,赫克洛因诱导的软膜动脉扩张作用经由 $\kappa$ 类鸦片受体调节。未观察到 $\mu$ 类鸦片受体的明显参与。第三,cAMP展现为参与先前 $\kappa$ 激动剂诱导的脑血管扩张。这项研究还证实先前发现:赫克洛因与 $\mu$ 和 $\kappa$ 类鸦片受体两者相互作用,且这一相互作用的结合位点与其它传统类鸦片受体配体的结合位点重叠。

#### [0298] 论述

##### [0299] 赫克洛因作为非含氮类鸦片受体激动剂

[0300] 尽管赫克洛因为类鸦片受体激动剂,但其不含氮,氮是传统含氮类鸦片配体的必需元素。因此,赫克洛因为第一种非类鸦片 $\mu$ 类鸦片受体配体。在2005年,当合成天然产物鼠尾草素A的各种类似物以研究新克罗烷二萜烯(neoclerodane diterpene)的结构和功能时,发现赫克洛因。虽然鼠尾草素A为选择性 $\kappa$ 类鸦片激动剂,不具有显著的 $\mu$ 类鸦片受体亲和力,但赫克洛因作用于 $\mu$ 和 $\kappa$ 受体两者。其对 $\mu$ 受体的亲和力与对 $\kappa$ 受体的亲和力相比强许多,如此处和其它研究所展示。因此,不同于鼠尾草素A,赫克洛因被归类为 $\mu$ 类鸦片受体配体。其结合位点与其它受体配体的位点充分重叠,如对接实验中所展示。

[0301] 有趣的是,赫克洛因不诱导P-抑制蛋白募集或促进受体内化的事实提示,赫克洛

因可能不如传统类鸦片般诱导显著耐受度或依赖性。近来的研究指示赫克洛因可在大鼠疼痛模型中产生剂量依赖性抗伤痛感受作用,表明赫克洛因可为开发无显著依赖性 or 耐受度风险的新颖镇痛剂的有希望的起点。

#### [0302] 对脑血管的作用和受体的作用

[0303] 在此实例中,赫克洛因对脑血管展现与鼠尾草素A类似的药理学特征,如我们先前所展示。与鼠尾草素A相比,赫克洛因似乎是更强力的动脉扩张剂,因为与鼠尾草素A (10nM) 相比,对于赫克洛因 (0.1nM),有效扩张软膜动脉所需的浓度(与基线相比变化10%-16%)低得多。赫克洛因的脑血管扩张作用通过NTP而非 $\beta$ -FNA阻断。与我们的先前研究相似,NTP和 $\beta$ -FNA自身均未展示对软膜直径的任何作用。因此,赫克洛因的脑血管扩张作用经由 $\kappa$ 类鸦片受体而非 $\mu$ 受体介导。

#### [0304] cAMP的作用

[0305] 脑血管扩张经由数种机制介导,包括cGMP、cAMP和K<sup>+</sup>通道。异丙肾上腺素和cAMP增加脑血管肌肉中钙依赖性钾通道的活性,据信其诱导血管扩张。在这项研究中,我们观察到脑血管扩张与赫克洛因投与之后CSF中的cAMP水平升高相关。此外,通过赫克洛因投与诱导的脑血管扩张通过cAMP拮抗剂Rp-cAMPS消除。这一观察结果与cAMP类似物Sp-cAMPS的投与引发血管扩张(其可通过Rp-cAMPS钝化)的报导一致。总之,这些发现指示cAMP在赫克洛因诱导的脑血管扩张中起到重要作用。先前已展示,cGMP参与鼠尾草素A介导的血管扩张。高度可能的是,cGMP还参与赫克洛因的扩张作用。

#### [0306] 潜在暗示

[0307] 因为鼠尾草素A可在仔猪模型中扩张脑血管且保留脑自调节免于脑低氧/缺血损伤,高度可能的是,赫克洛因具有类似特性,鉴于其脑血管扩张作用以与鼠尾草素A相似的方式调节。因此,其可能是欲在围手术期期间使用的替代非类鸦片药物,用于处于脑血管痉挛或缺血风险下的患者。

#### [0308] 实例8

##### [0309] 鼠尾草素A治疗蛛网膜下出血

[0310] 在此实例中,使用三组,即,假处理组(对照)、蛛网膜下出血(SAH)和鼠尾草素A(SA)治疗组。在SAH之后24小时获得三组的全脑图像(腹侧),如图40中所示。为了测定每一组中的血管壁的直径和厚度,在SAH之后24小时,将每一组中具有基底动脉的脑干部分用H&E染色(图41)。在显微镜下获得图像之后,血管的直径和血管壁的厚度使用Image J测量。神经测试以盲法方式进行且在SAH之后24小时评估。如图42中所示,在SAH之后24小时给予的鼠尾草素A显著(A)增加直径且(B)在SAH之后24小时显著降低基底动脉壁的厚度,而(C)所给予的鼠尾草素A对神经评分不具有显著作用。

#### [0311] 实例9

##### [0312] 鼠尾草素A的溶解度

[0313] 鼠尾草素A为非常疏水的分子且不可溶于水。鼠尾草素A为可溶的,已知可溶于有机溶剂(如乙醇、DMSO和丙酮)中。然而,这些溶剂不适用于常规临床使用,尤其不适用于静脉内(IV)递送。由于鼠尾草素A临床上适用于神经病症,故需要鉴别可用于调配鼠尾草素A以用于临床递送的材料,优选地FDA批准的材料。鼠尾草素的物理和化学特性呈现在以下表1中。



[0314] 表1. 鼠尾草素A的物理和化学特性

| [0315] | 特性       | 值                                                                    | 注释                       |
|--------|----------|----------------------------------------------------------------------|--------------------------|
|        | 分子量      | 432.464 g/mol                                                        | 无水                       |
|        | 分子式      | C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub>                       | 无水                       |
|        | 晶体水合物分子式 | C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub> ·1/3 H <sub>2</sub> O | 三水合物晶体形式                 |
|        | 熔点       | 238-240℃                                                             | 三水合物晶体形式                 |
|        | 计算的 LogP | 2.49                                                                 | ChemAxon/Marvin          |
|        | pKa      | 无                                                                    | 不可离子化                    |
|        | 手性中心     | 7                                                                    | 3 可差向异构                  |
|        | 旋光度      | 在 25℃ 下 -41 度                                                        | CHCl <sub>3</sub> 中的 c=1 |
|        | 水含量      | 1.4% (卡尔费舍尔 (Karl Fischer))                                          | 三水合物晶体形式                 |

[0316] 缺乏可离子化官能团, 鼠尾草素A不可形成可溶盐。鼠尾草素A具有八个氢键接受体位点, 均为氧原子, 且无氢键供体基团。因此, 似乎可能的是, 其晶格应仅包含相邻分子之间的微弱非键结相互作用, 且所得减弱的晶格能量以低熔点形式反映。实际上, 鼠尾草素A具有相当高的熔点范围, 报导为238-240℃。SA的X射线晶体结构揭露从水性有机溶剂(丙酮、甲醇)结晶得到作为化学计量水合物的SA, 每三个鼠尾草素A分子具有一分子水。令人遗憾的是, x射线结构不解析水氢原子的位置, 因此鼠尾草素A分子氢键键联到晶格中的详细照片仍然不清楚。预期鼠尾草素A以高熔点结晶水合物形式存在可影响其在有机和水性溶剂中的溶解行为。溶解度差将很可能限制药物转换成临床可适用药物的可获得的调配方法。

[0317] 方法

[0318] 测试鼠尾草素A在含有不同类型环糊精的各种溶液中的溶解度。使用以下变化形式的环糊精(亚什兰(Ashland))和水(作为阴性对照)。

[0319] 1. 100% 水;

[0320] 2. 20% 2-羟丙基-β-环糊精 (HPBCD) ;

[0321] 3. 20% 2-羟丙基-γ-环糊精 (HPGCD) ;

[0322] 4. 20% α-环糊精硫酸化钠盐; 和

[0323] 5. 20% β-环糊精硫酸化钠盐。

[0324] 对于每一化合物, 将20g所述化合物溶解在100mL水中。接着, 将0.3mg鼠尾草素A混合到每一溶液中。将溶液搅拌过夜。使用每一样品的三个复制品。样品用0.2μm PTFE过滤器(沃特曼(Waterman))过滤, 随后测定浓度。还测试鼠尾草素A在各种其它化合物中的溶解度。

[0325] 鼠尾草素A于甲醇-丙酮(4:1)中的标准曲线通过色谱使用C-18HPLC柱,使用1mL/min水/乙腈的洗脱速度测定(图43)。

[0326] 结果

[0327] 鼠尾草素A仅最低限度地可溶在水和 $\alpha$ -环糊精硫酸化钠盐或 $\beta$ -环糊精硫酸化钠盐中。在所测试的环糊精(表2)中,HPBCD展示鼠尾草素A的溶解度,且最大浓度超过100 $\mu$ g/mL。因此,HPBCD可用于调配50 $\mu$ g/mL鼠尾草素A,其等于芬太尼(fentanyl)的临床剂量。有趣的是,HPBCD与HPGCD之间存在显著溶解度差异,如表2中所指示,即,122.5 $\pm$ 0.6 $\mu$ g/mL于20%HPBCD对比52.6 $\pm$ 0.9 $\mu$ g/mL于20%HPGCD中。表3中呈现鼠尾草素A在其它溶剂中的溶解度。

[0328] 表2. 鼠尾草素A在各种环糊精中的溶解度

| [0329] | 鼠尾草素 A 于               |                            | 浓度  |
|--------|------------------------|----------------------------|-----|
|        | 100%水                  | 1.0 $\pm$ 0.1 $\mu$ g/ml   | N=3 |
|        | 20% HPBCD              | 122.5 $\pm$ 0.6 $\mu$ g/ml | N=3 |
|        | 20% HPGCD              | 52.6 $\pm$ 0.9 $\mu$ g/ml  | N=3 |
|        | 20% $\alpha$ -环糊精硫酸化钠盐 | 1.0 $\pm$ 0.1 $\mu$ g/ml   | N=3 |
|        | 20% $\beta$ -环糊精硫酸化钠盐  | 1.5 $\pm$ 0.1 $\mu$ g/ml   | N=3 |

[0330] 数据以平均值 $\pm$ SD形式呈现

[0331] 表3. 鼠尾草素A在其它溶剂中的溶解度

| [0332] | 媒剂                                | 鼠尾草素 A 溶解度( $\mu$ g/ml) |
|--------|-----------------------------------|-------------------------|
|        | 水                                 | <2                      |
|        | 单辛酸甘油酯                            | <2                      |
|        | 2-丙醇                              | 22                      |
|        | 1,2-丙二醇                           | 59                      |
|        | 2.5%聚山梨醇酯 80                      | <2                      |
|        | 1.25%聚山梨醇酯 80 和 2.5% Solutol HS15 | 25                      |
|        | 5% Solutol HS15                   | 26                      |
|        | 10%四甘醇                            | <2                      |
|        | 5%维生素 E TPGS                      | 45                      |
|        | N,N-二甲基乙酰胺                        | >5000                   |
|        | N-甲基吡咯烷酮                          | >10000                  |
|        | DMSO                              | >1000                   |
|        | 乙醇                                | >1000                   |
|        | 10%胆盐                             | <2                      |

[0333] 结论

[0334] 发现多种可接受的鼠尾草素A的溶剂,包括一些批准用于临床使用的FDA物质。20%HPBCD为FDA批准在临床实践中用于静脉内药物递送的物质。举例来说,伏立康唑(voriconazole, VFEND®,辉瑞(Pfizer))使用磺基丁醚 $\beta$ -环糊精用于静脉内递送。

[0335] 虽然已经在本文中说明和描述了本发明的某些特征,但本领域普通技术人员现在将想到许多修改、取代、改变和等效物。因此,应理解,所附权利要求书旨在涵盖如属于本发明的真实精神内的所有此类修改和改变。

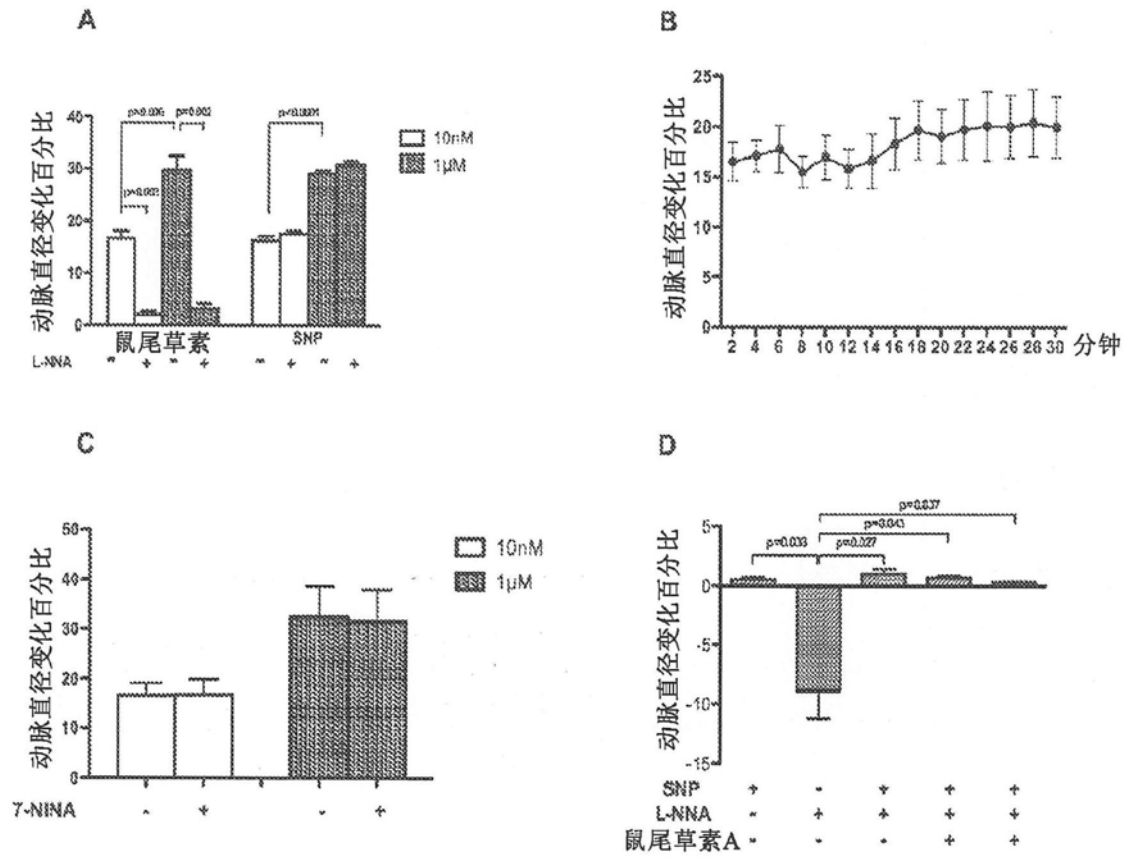


图1

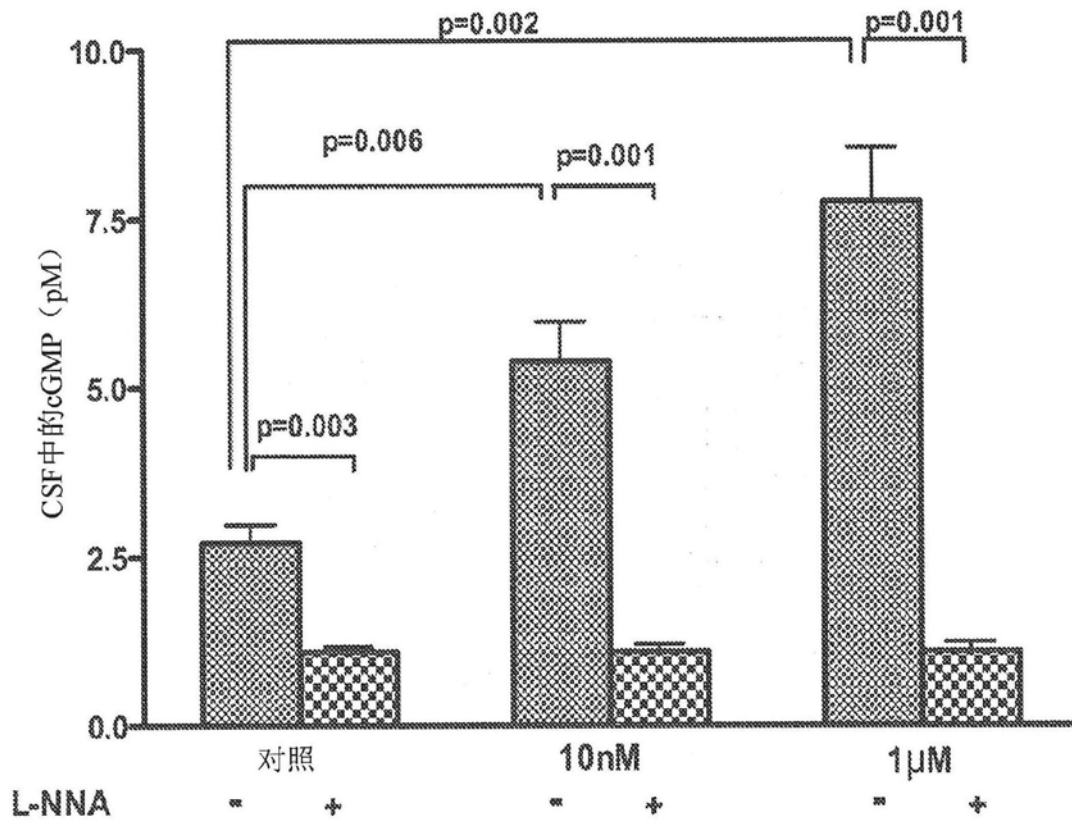


图2

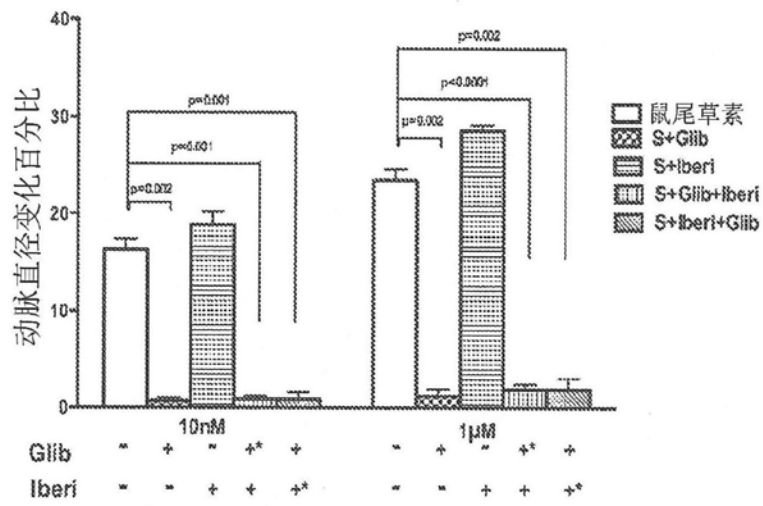


图3

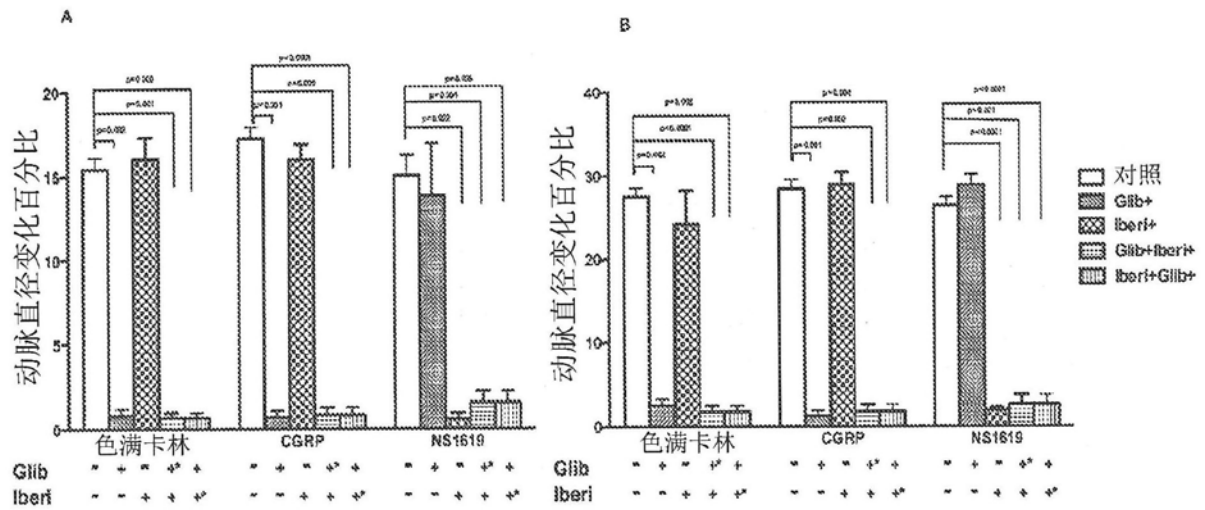


图4

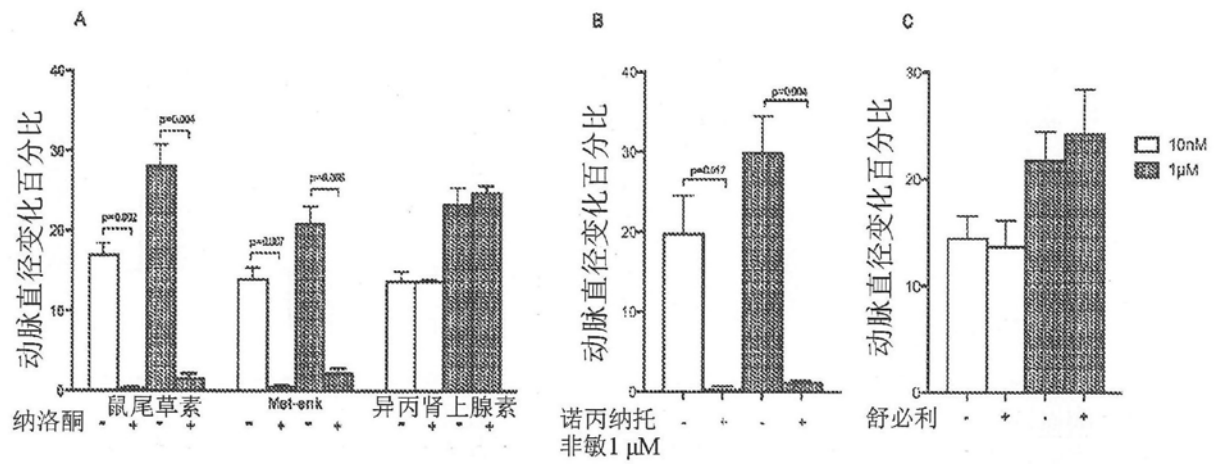


图5

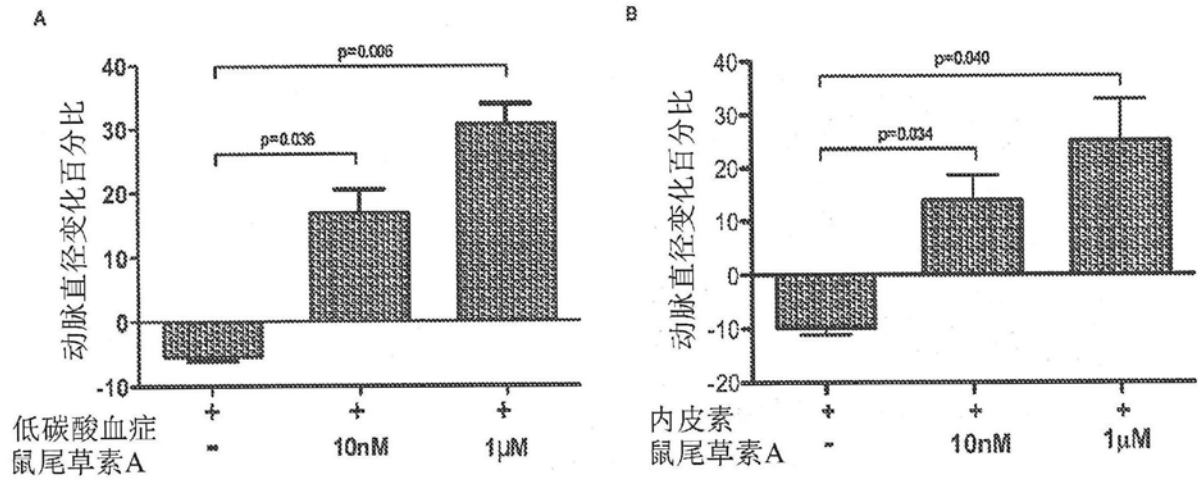


图6

在鼠尾草素之前

在鼠尾草素之后

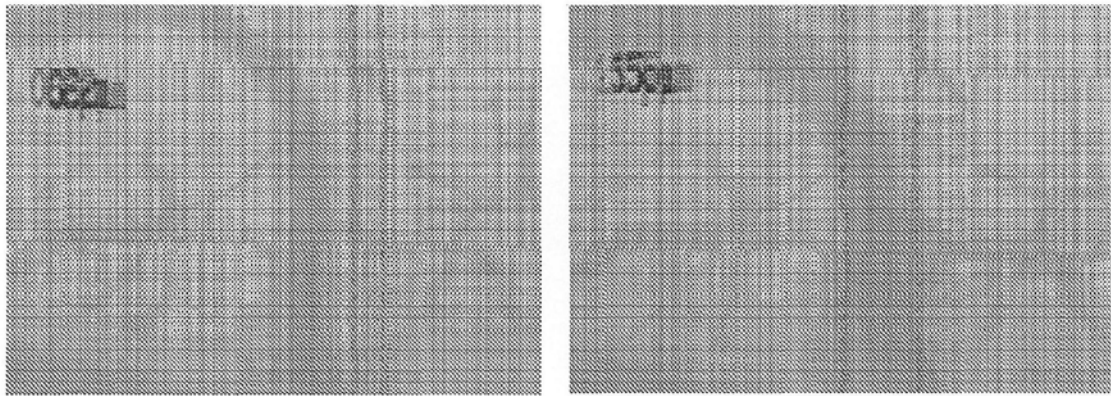


图7

鼠尾草素A的图像

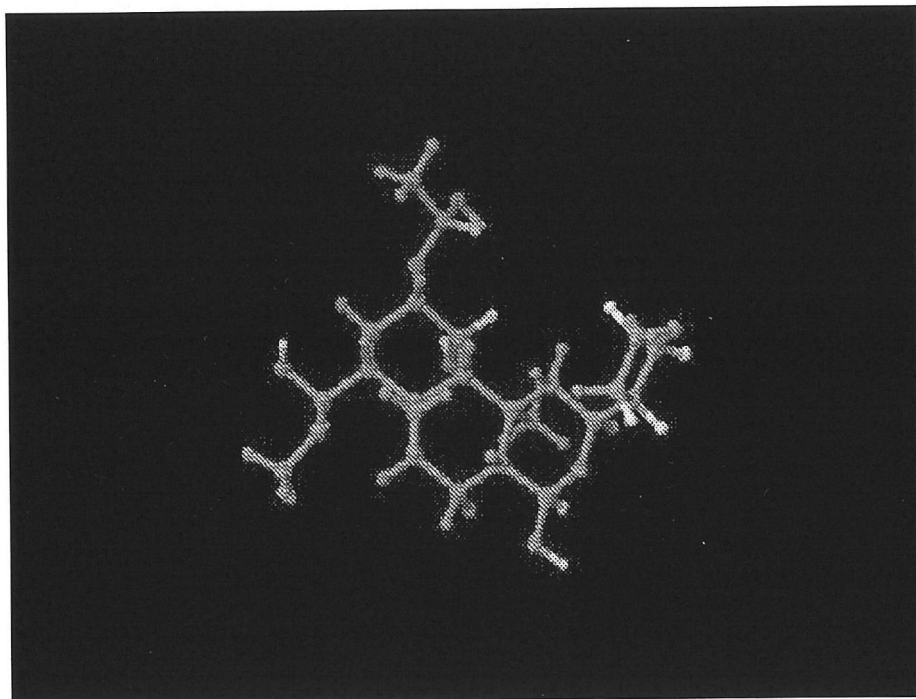


图8

葫芦[7]脉的图像

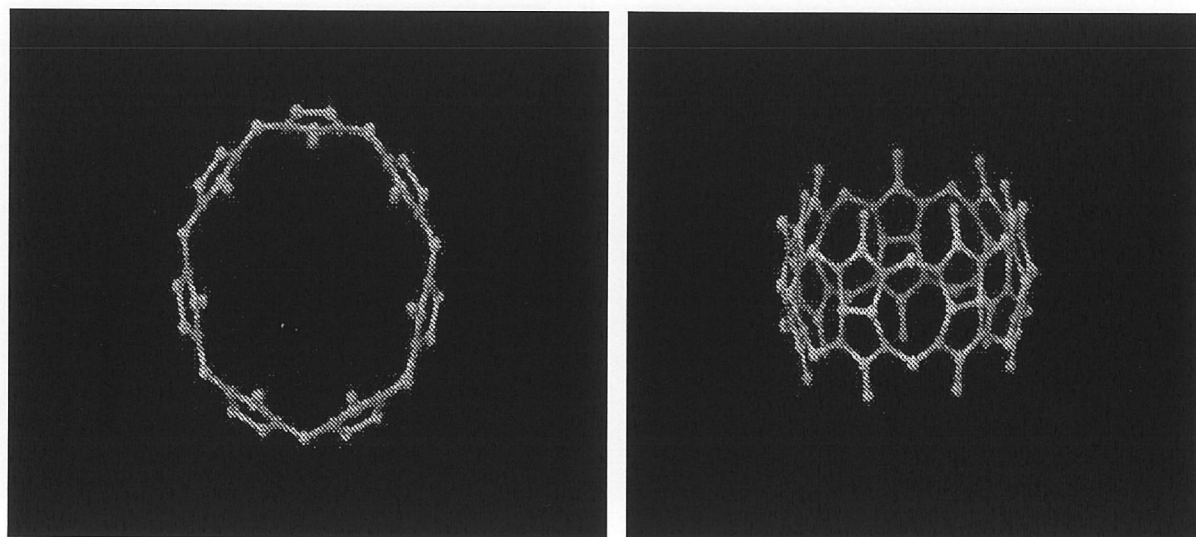


图9



鼠尾草素葫芦脲7复合物

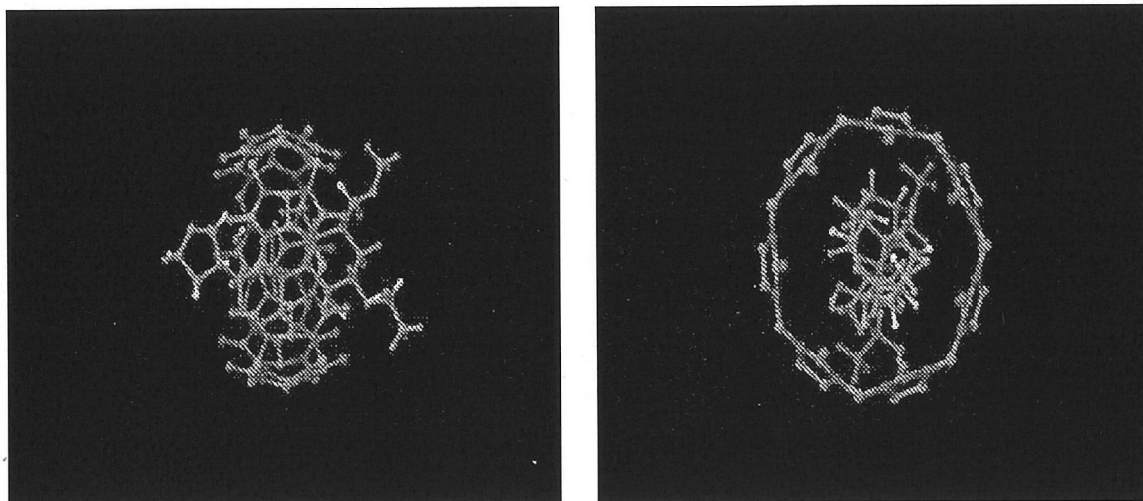


图10

鼠尾草素-葫芦脲复合物图像

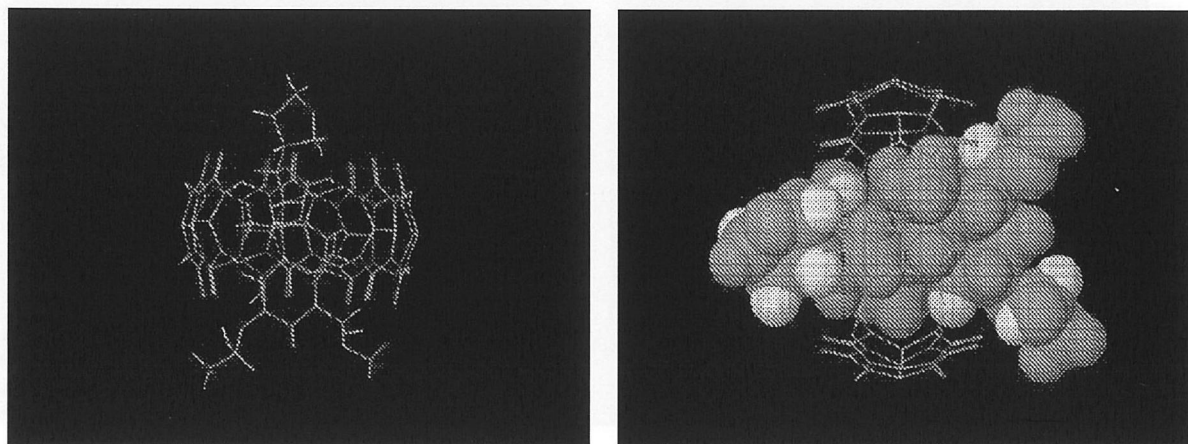


图11

鼠尾草素-葫芦脲复合物图像

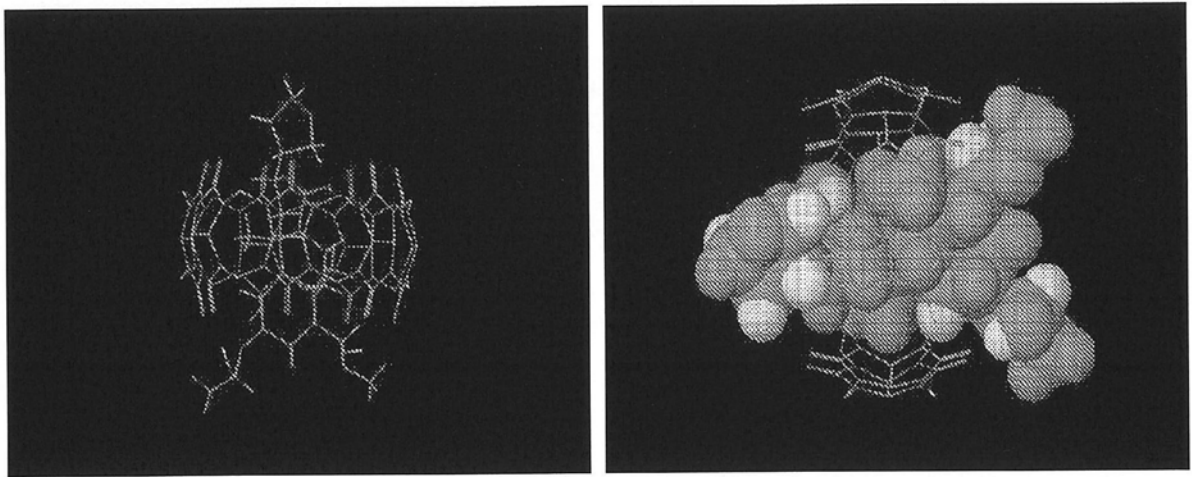


图12

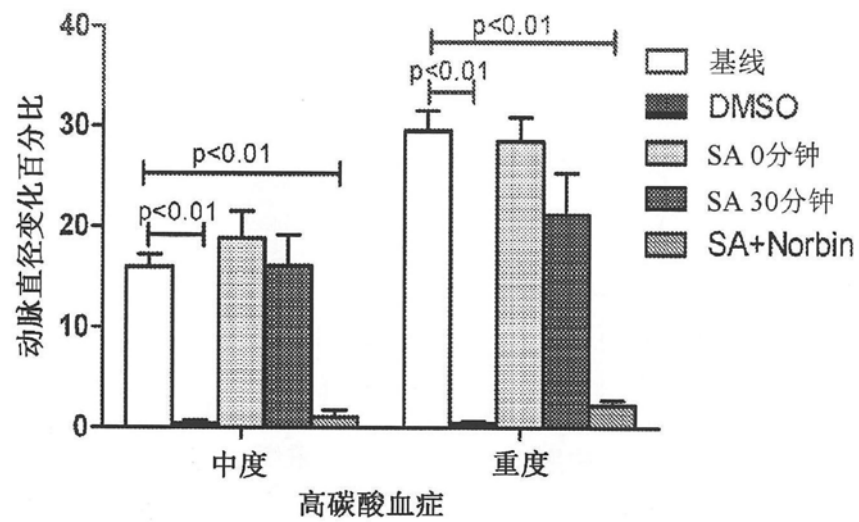


图13

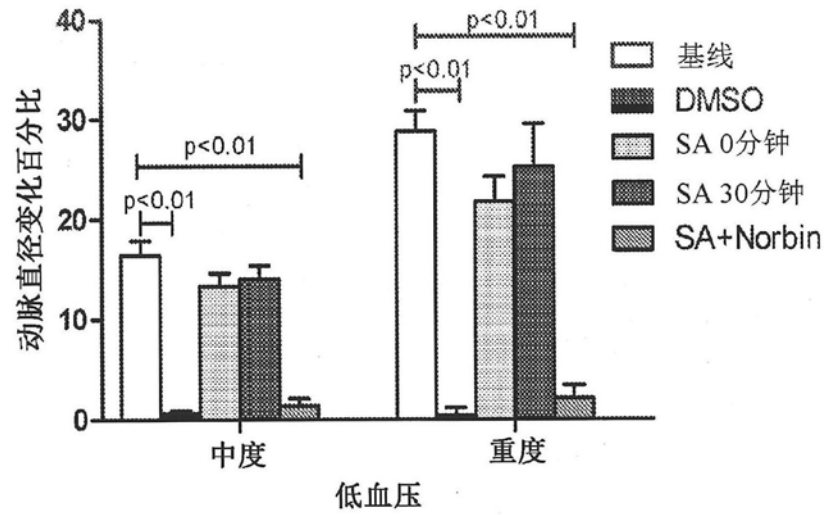


图14

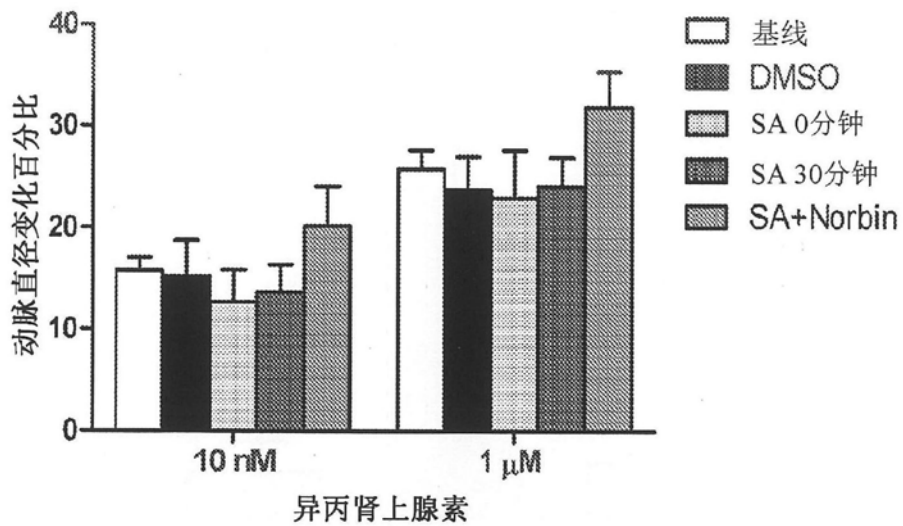


图15

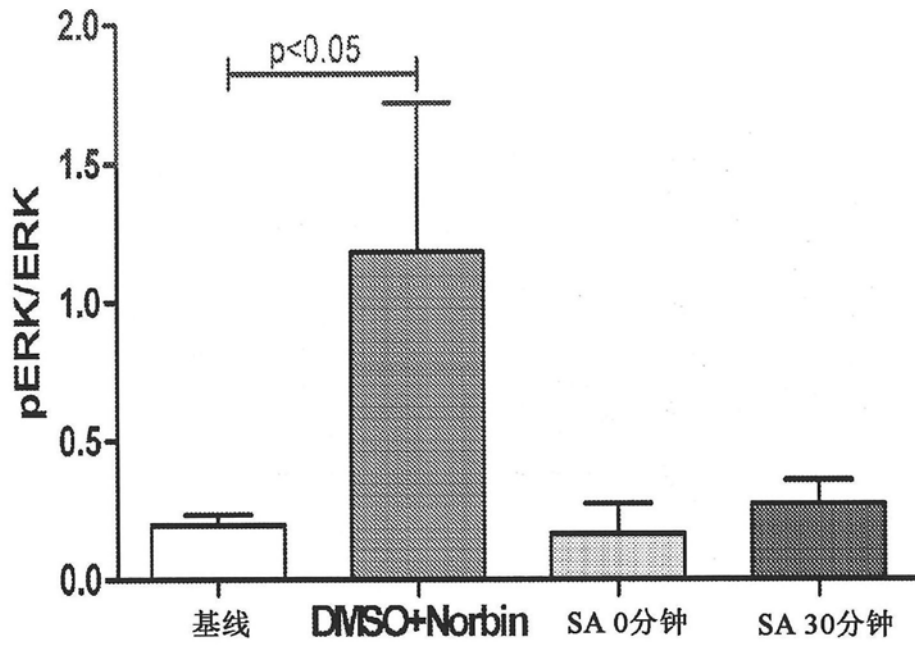


图16

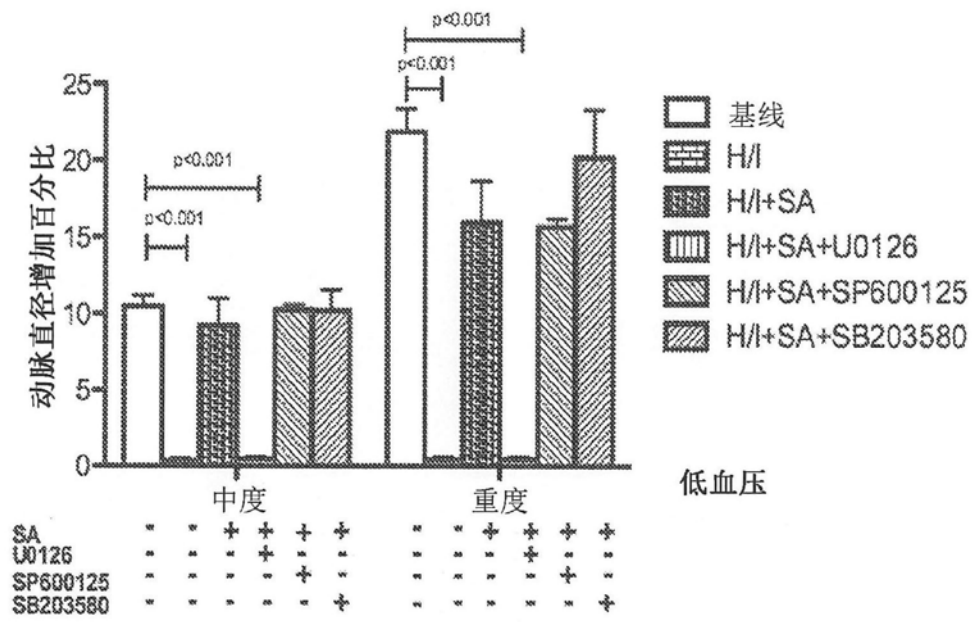


图17

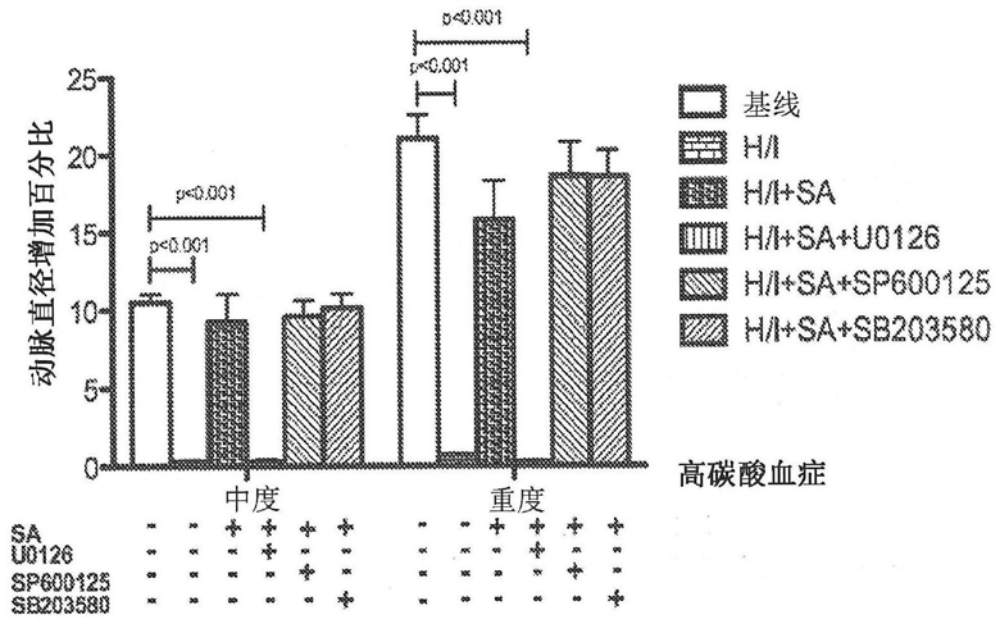


图18

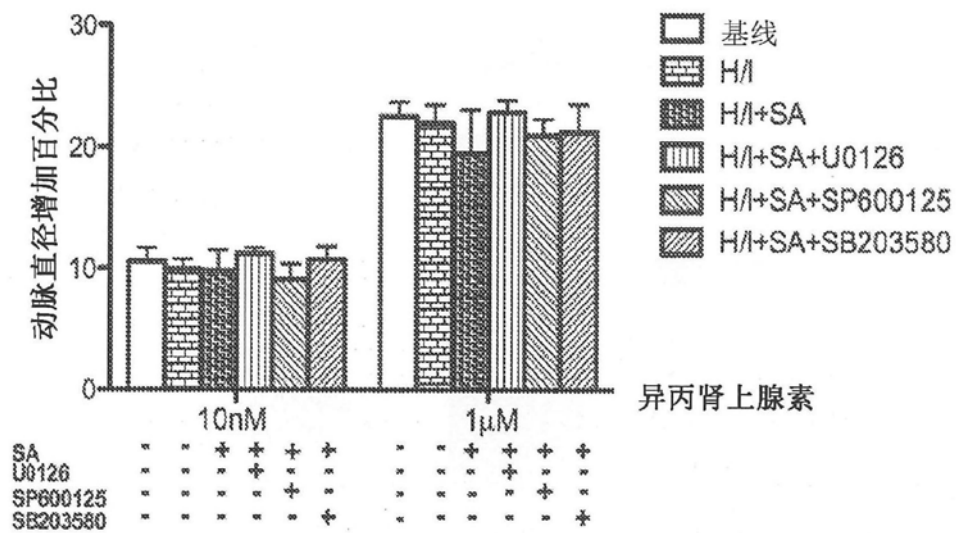


图19

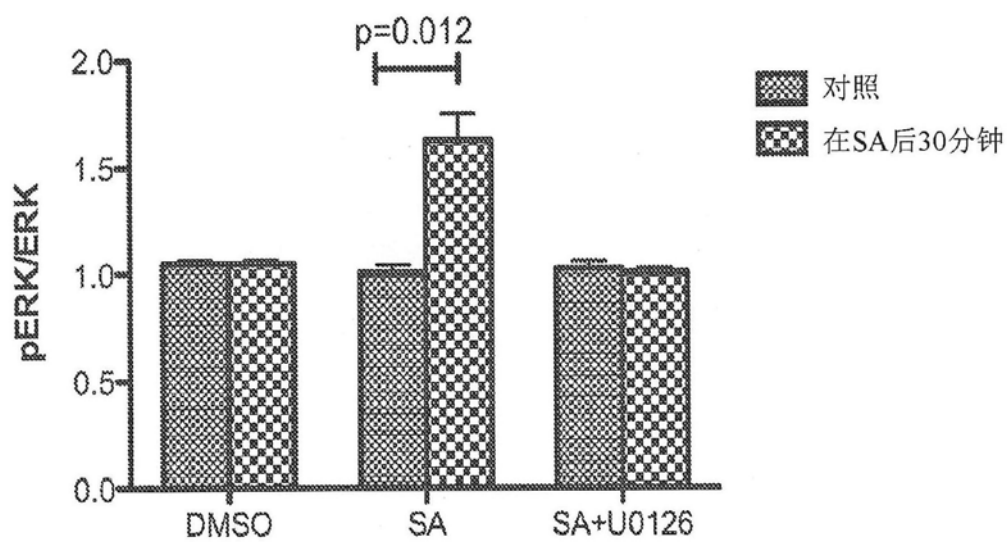


图20

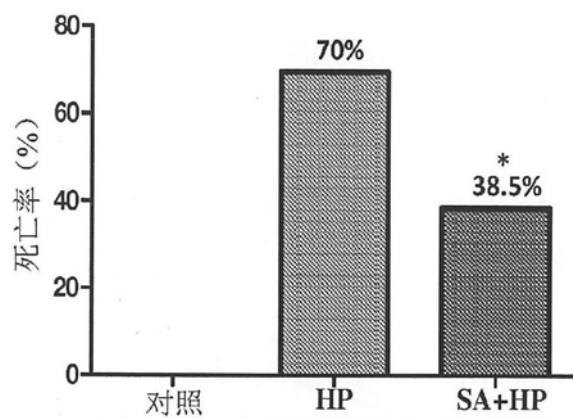


图21

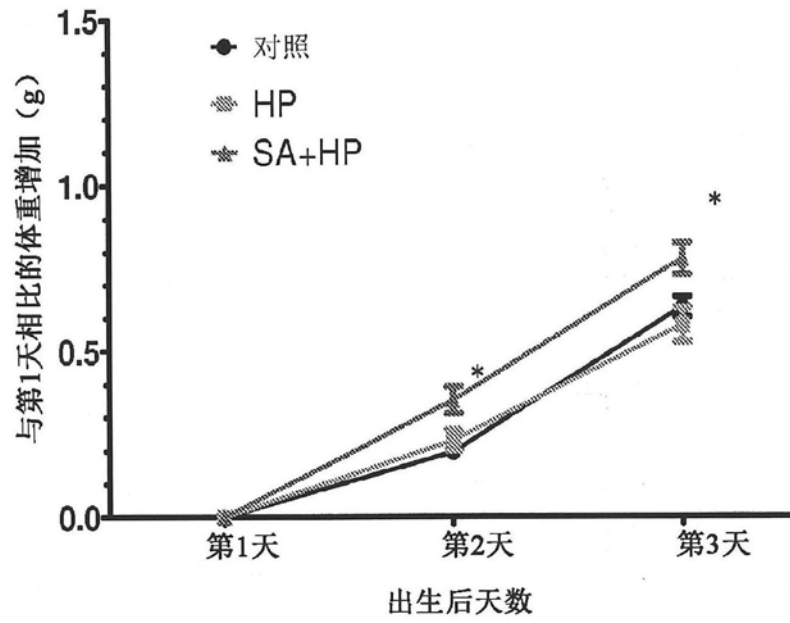


图22

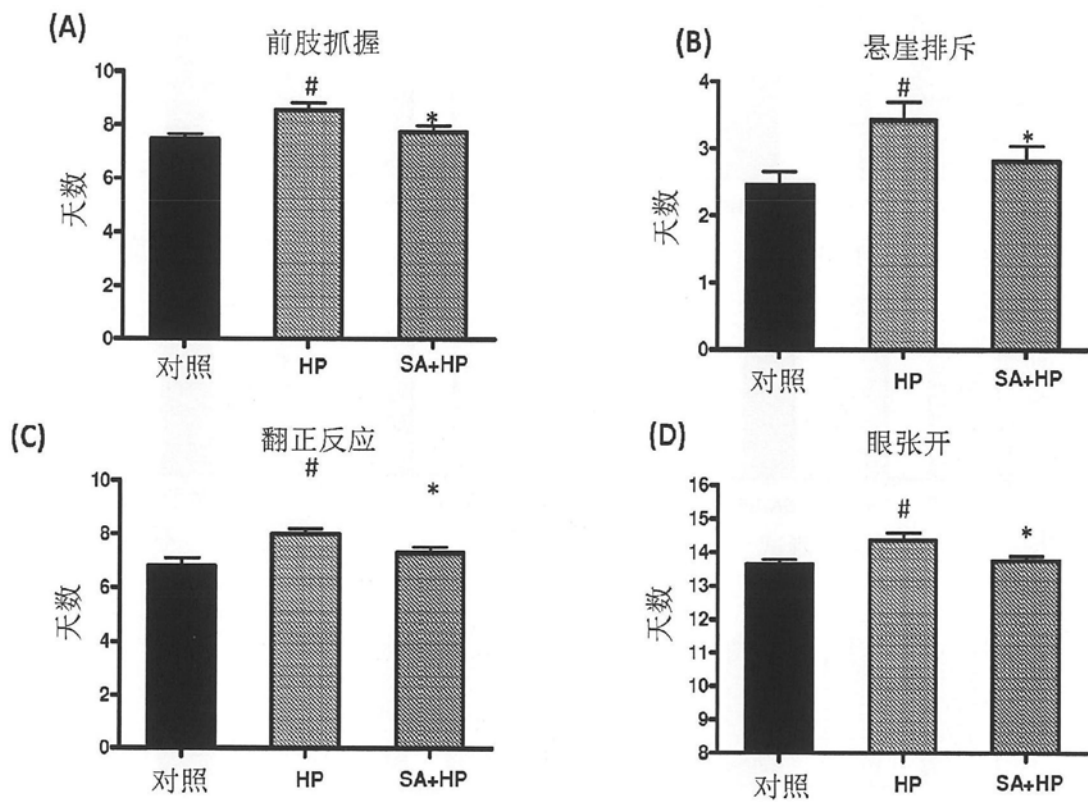


图23

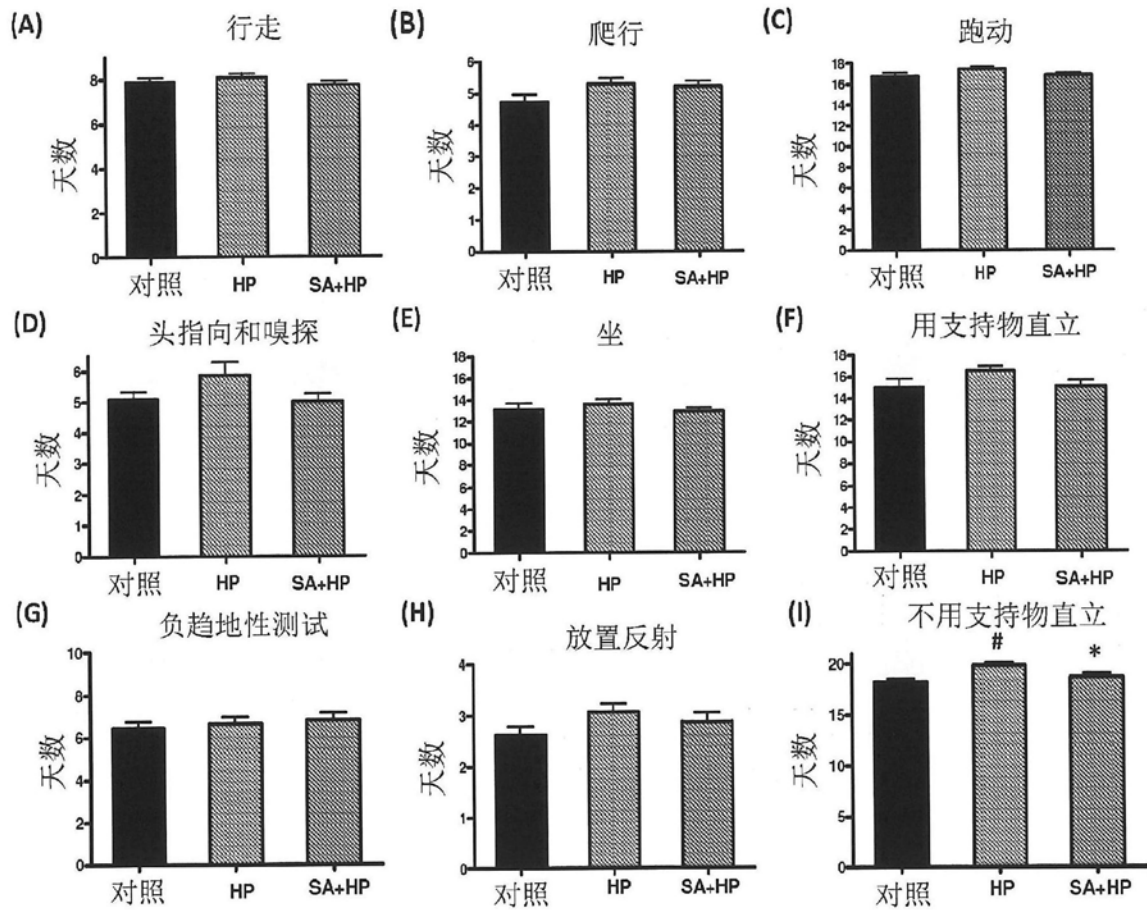


图24

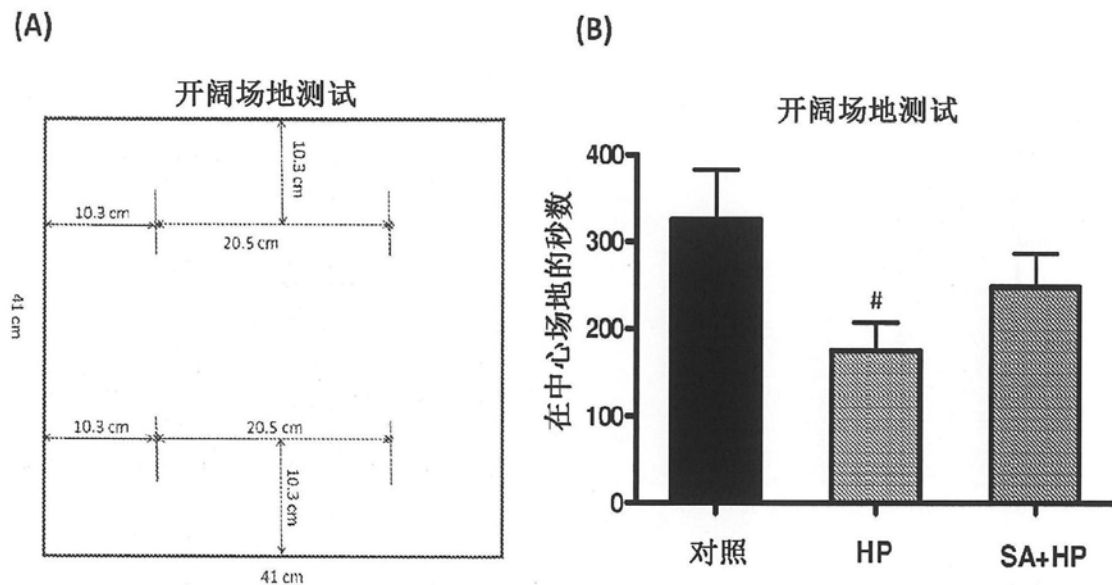


图25



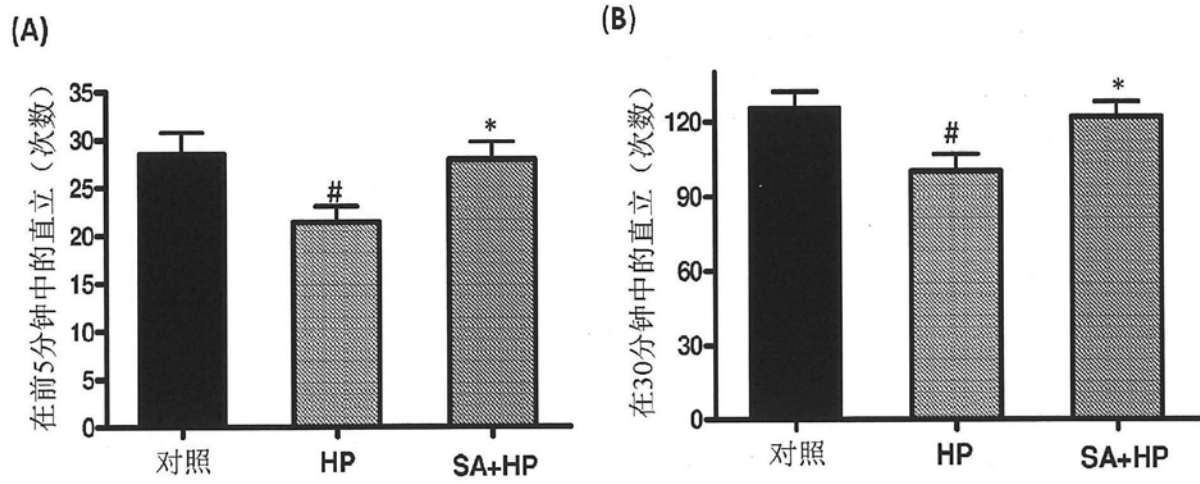


图26

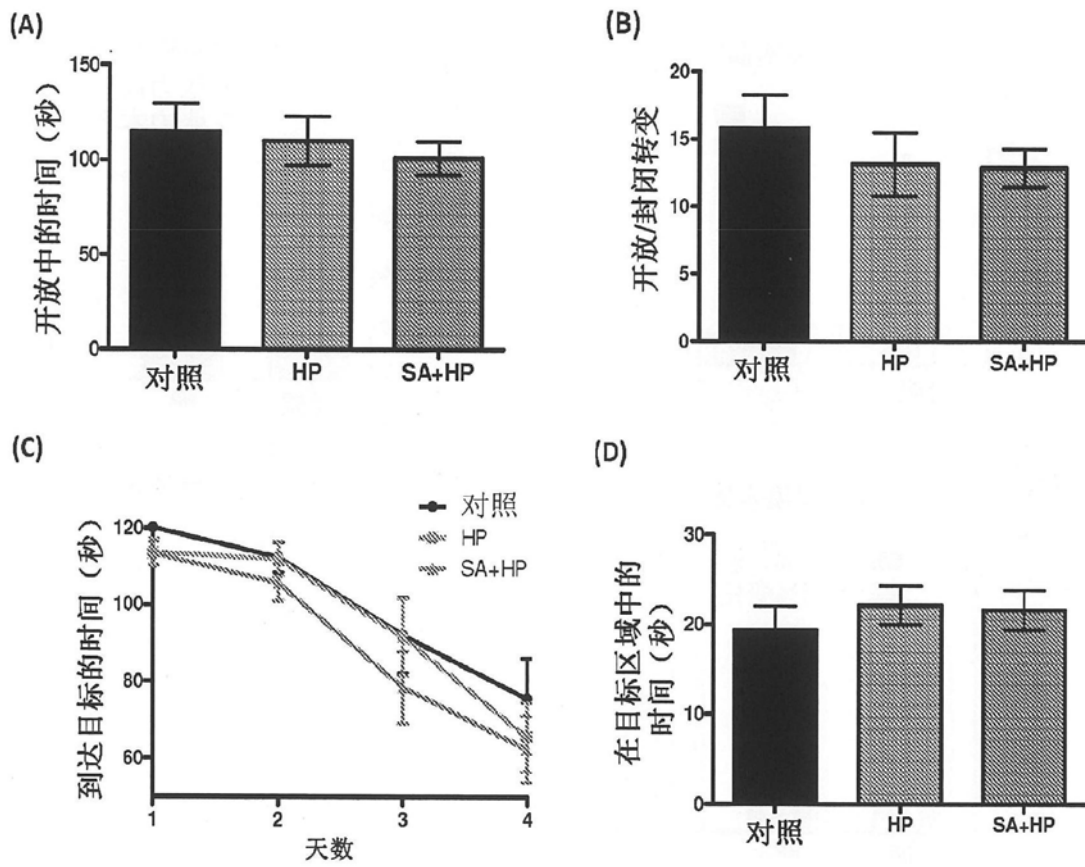


图27

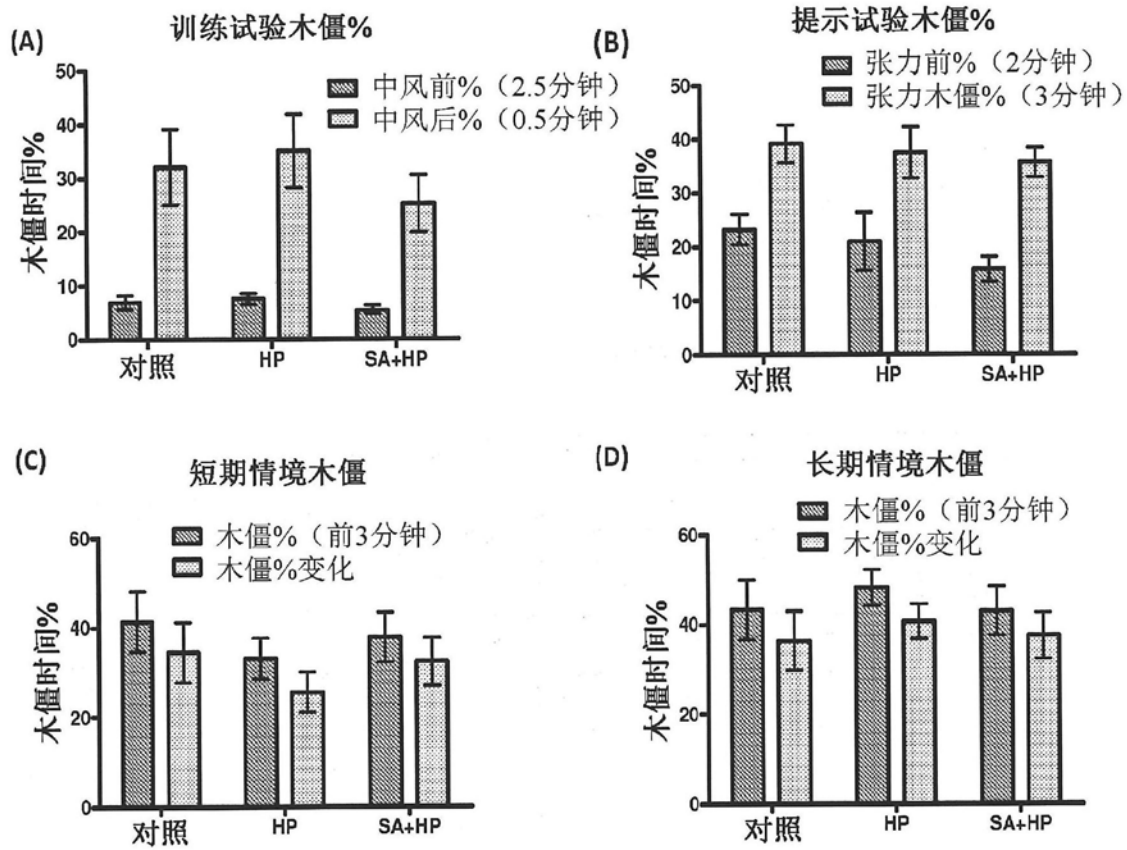


图28

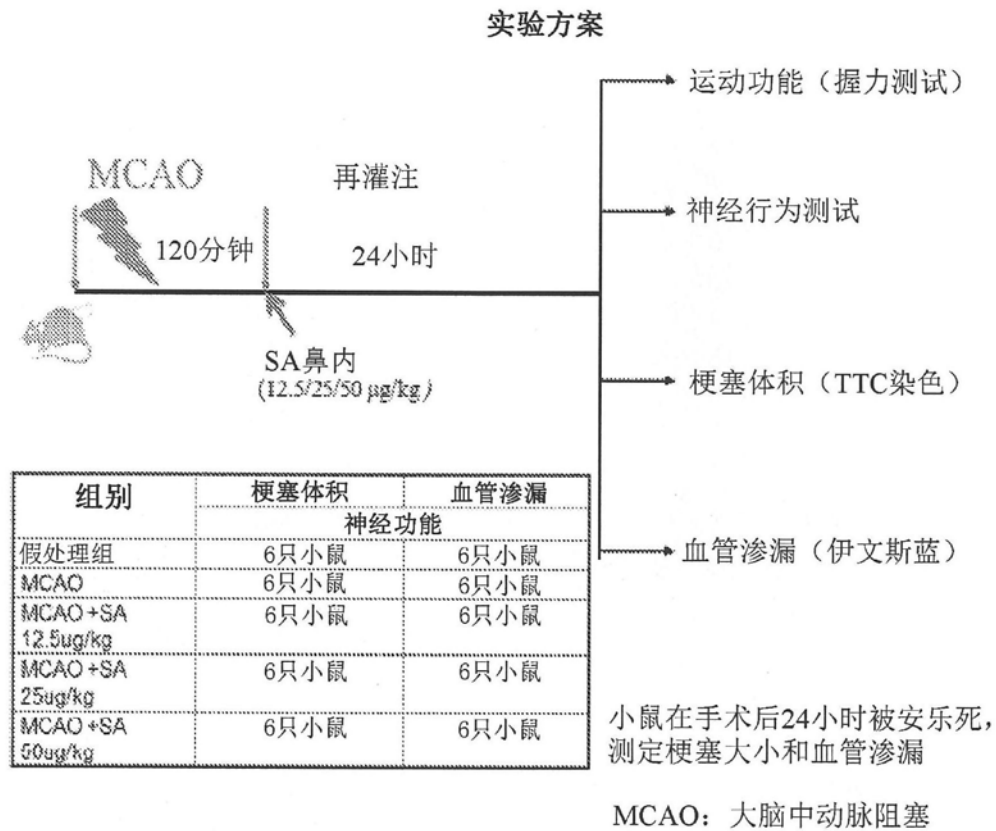


图29

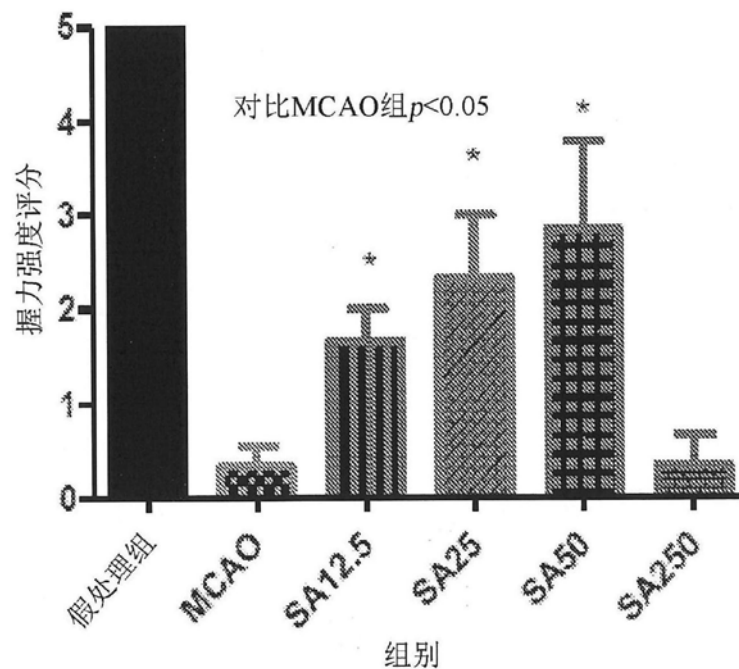


图30

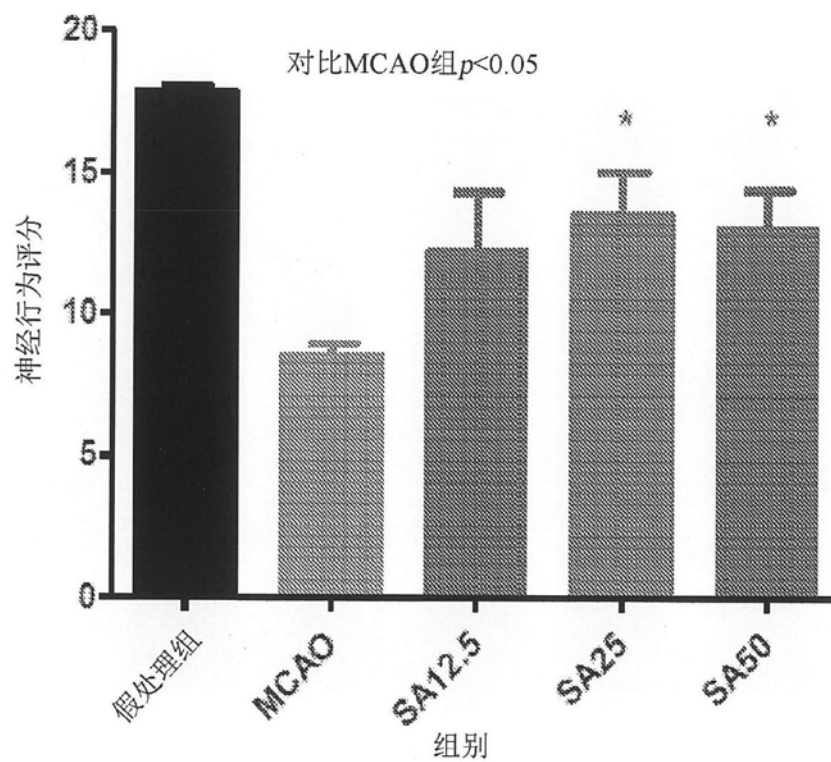


图31

TTC染色

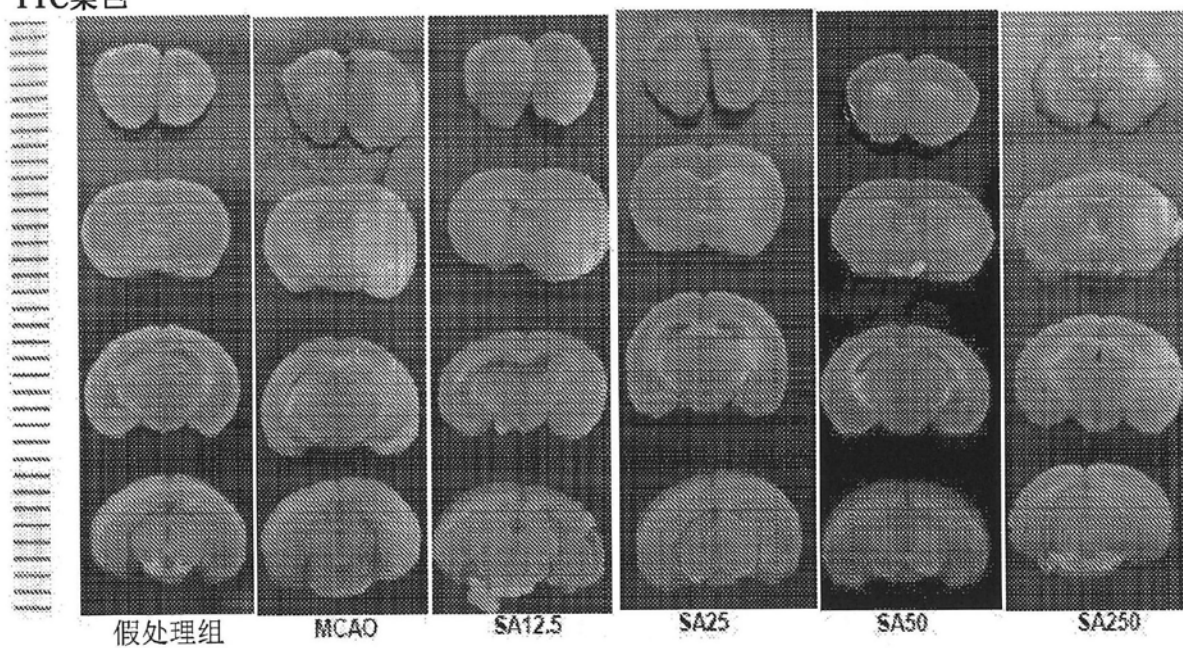


图32

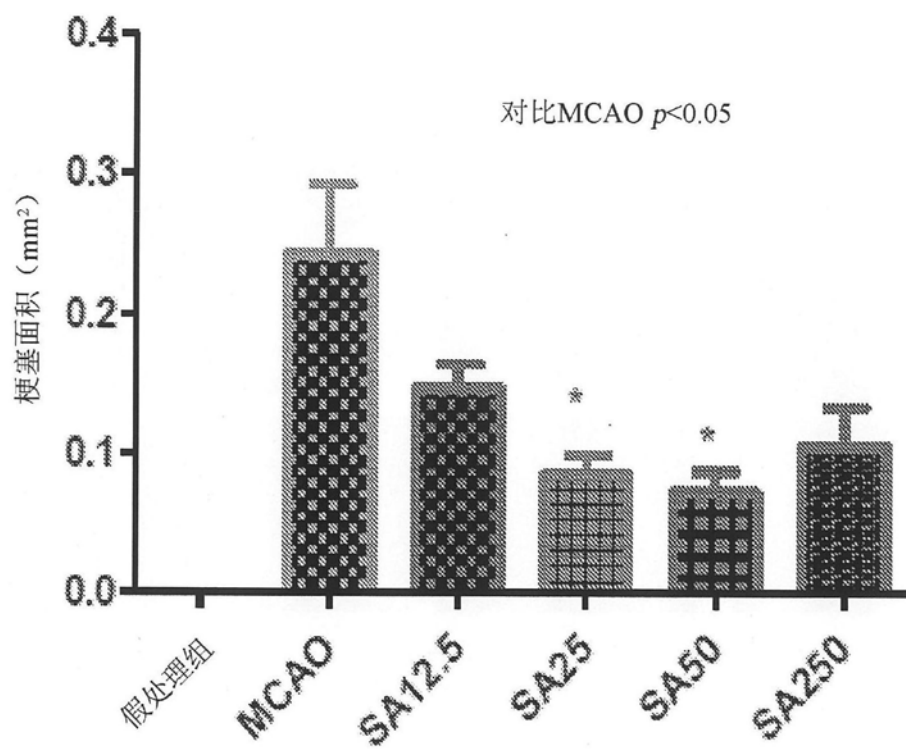


图33

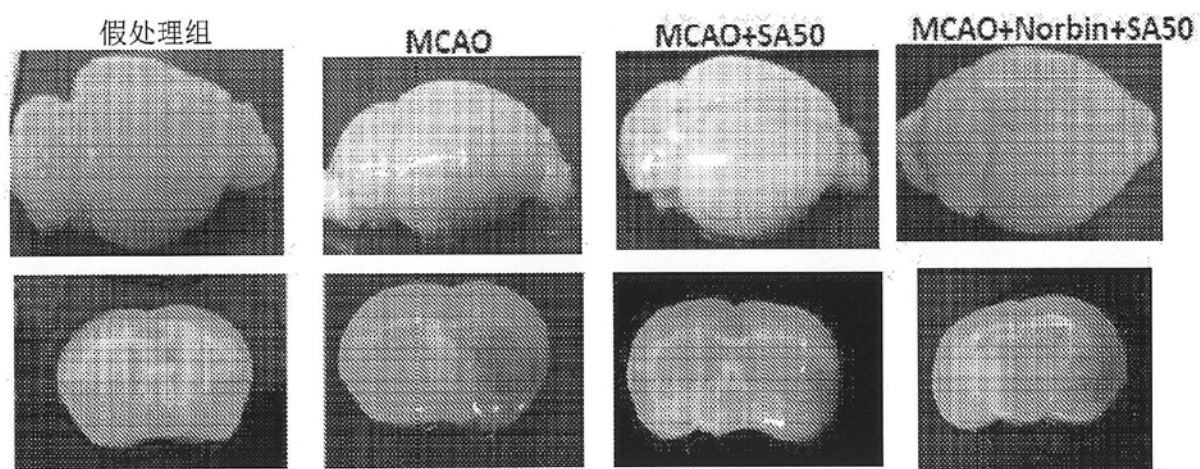


图34

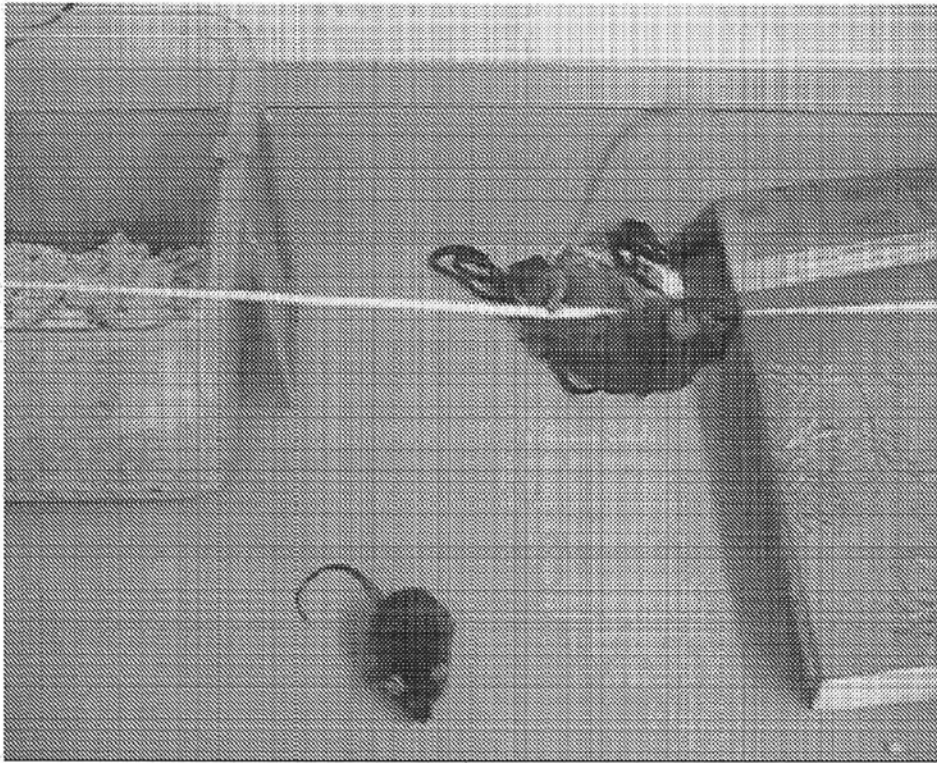


图35

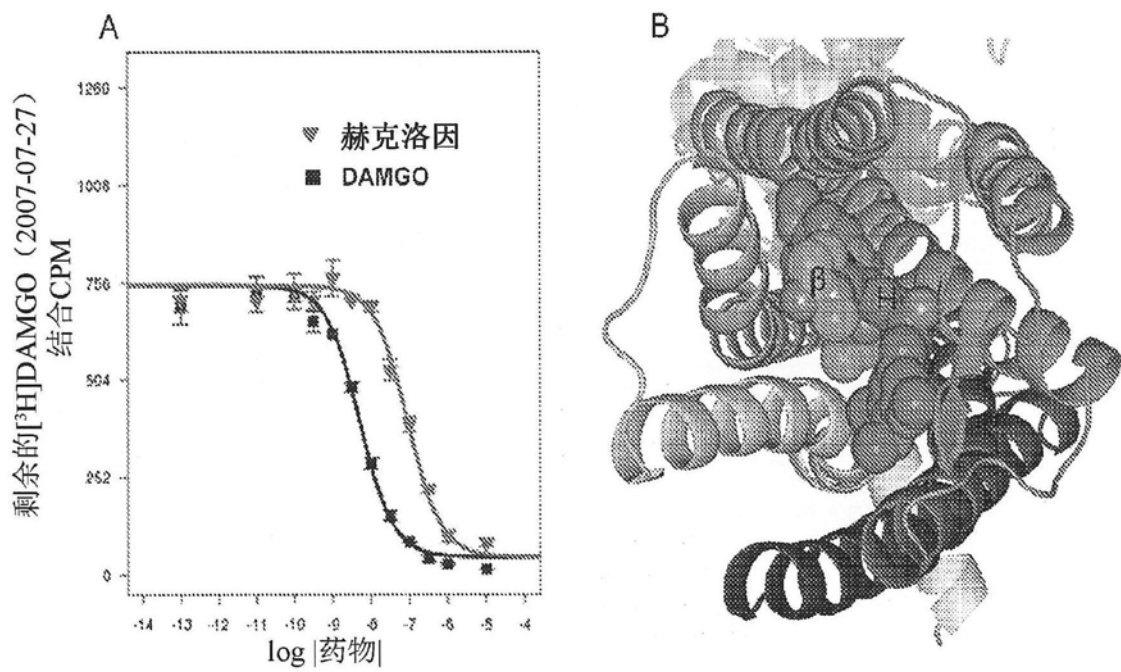


图36

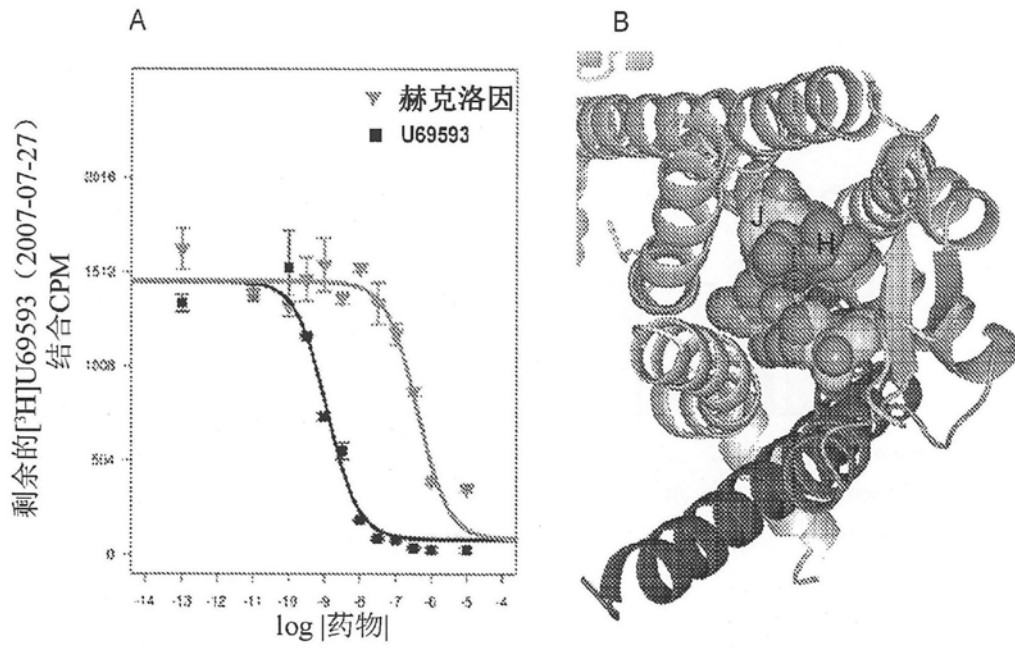


图37

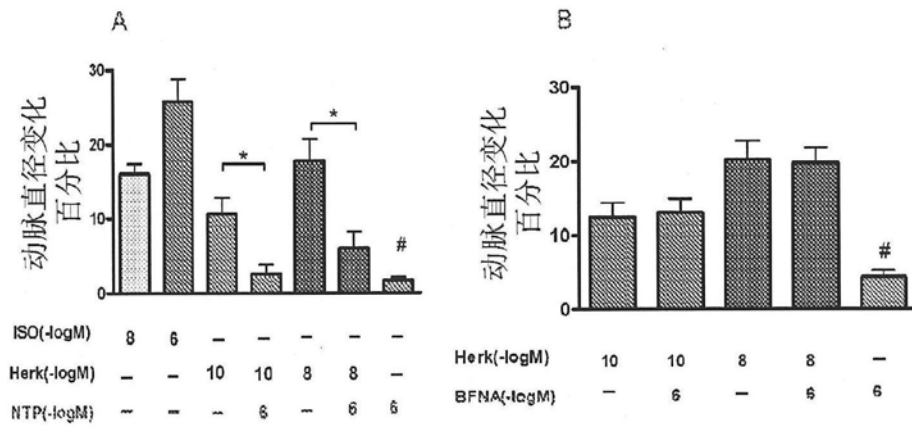


图38



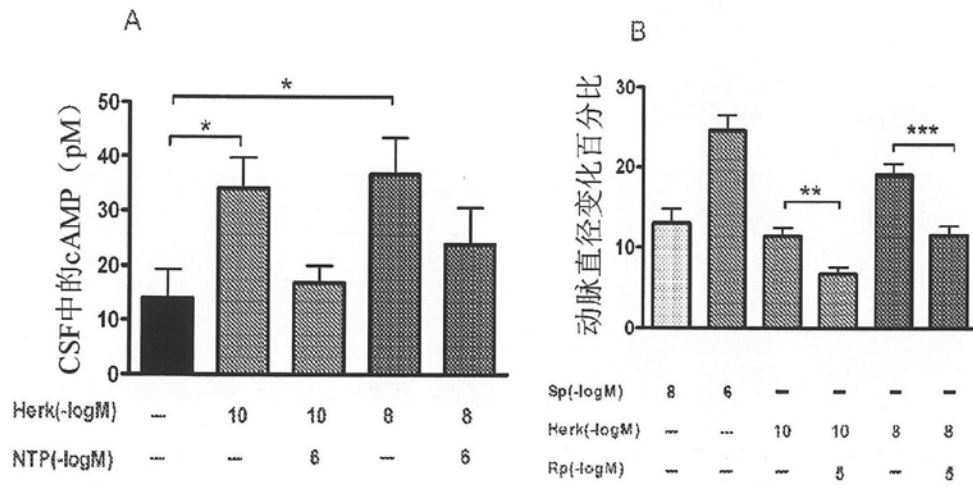


图39

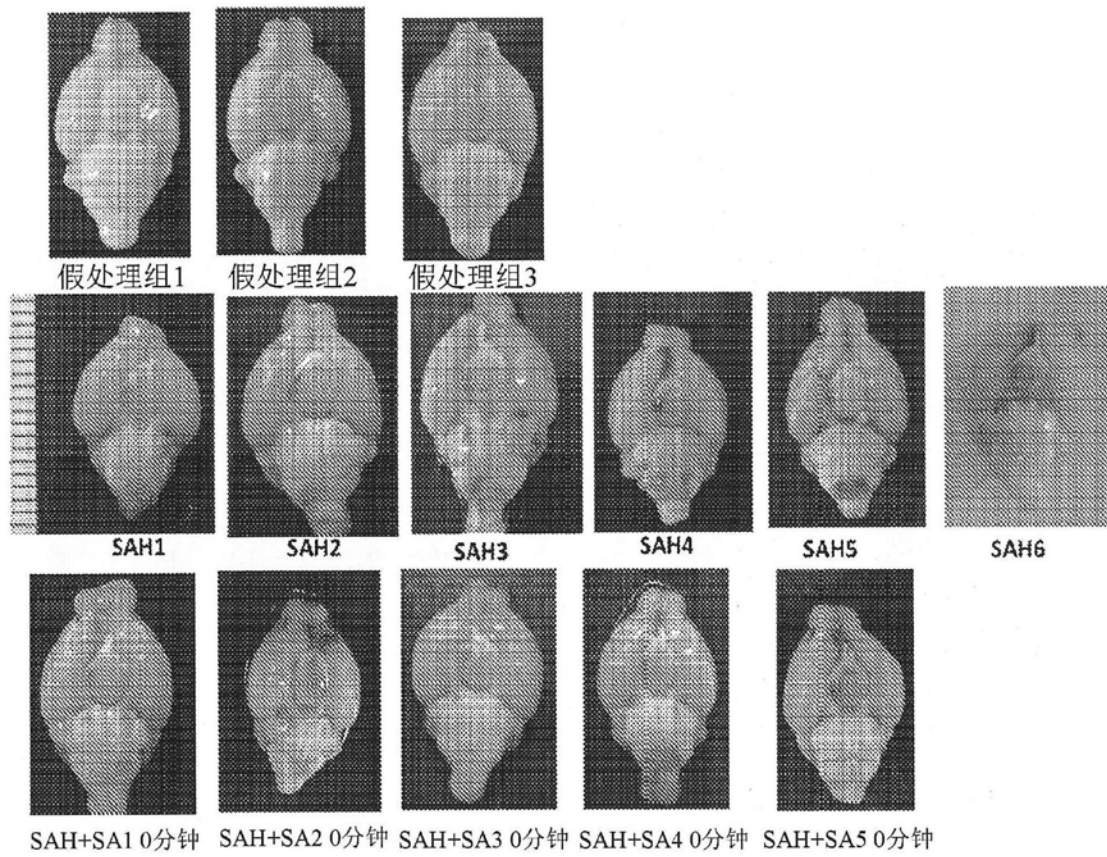


图40



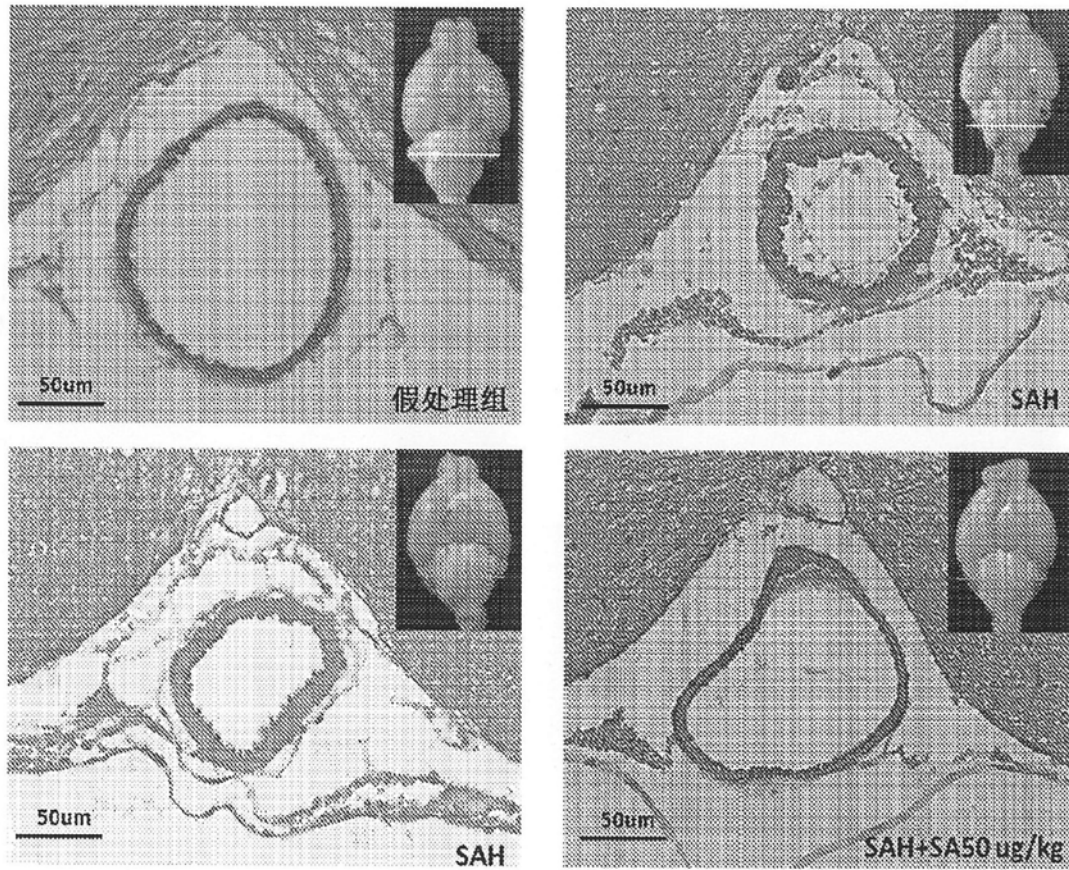


图41

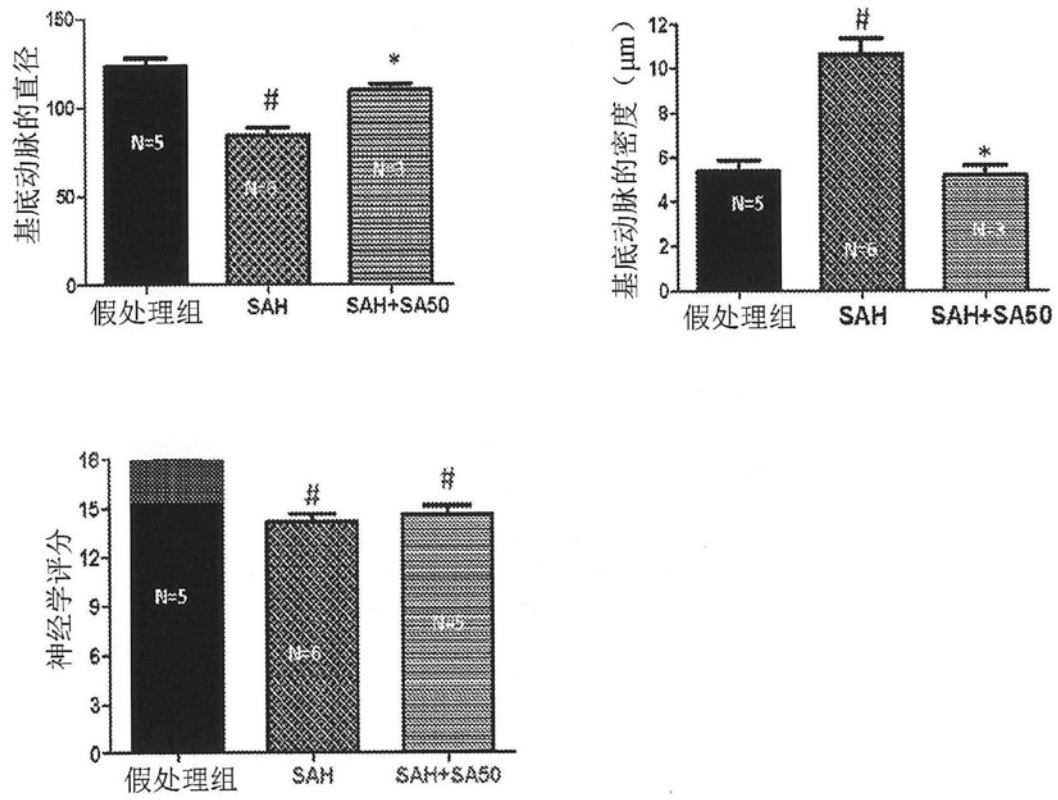


图42

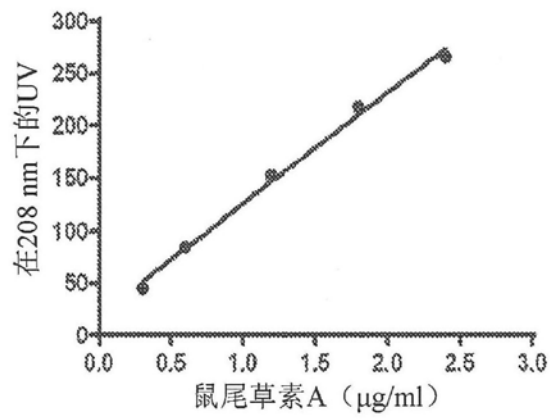


图43