(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
2020 年 9 月 10 日 (10.09.2020)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2020/177290 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 31/55 (2006.01) *A61P 9/10* (2006.01)
A61K 31/19 (2006.01) *A61P 9/00* (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/104909

(22) 国际申请日: 2019 年 9 月 9 日 (09.09.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201910158856.4 2019年3月4日 (04.03.2019) CN

(71) 申请人: 中国药科大学 (**CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY**) [CN/CN]; 中国江苏省南京市鼓楼区童家巷24号, Jiangsu 210009 (CN)。

(72) 发明人: 黄张建(**HUANG, Zhangjian**); 中国江苏省南京市鼓楼区童家巷24号, Jiangsu 210009 (CN)。
张奕华(**ZHANG, Yihua**); 中国江苏省南京市鼓楼区童家巷24号, Jiangsu 210009 (CN)。

(74) 代理人: 南京纵横知识产权代理有限公司 (**NANJING ZONGHENG INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.**); 中国江苏省南京市浦口高新区高新路9号自主创新广场3楼, Jiangsu 210032 (CN)。

(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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,

(54) **Title:** PHARMACEUTICAL COMPOSITION, PREPARATION METHOD THEREFOR AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种药物组合物及其制备方法和用途

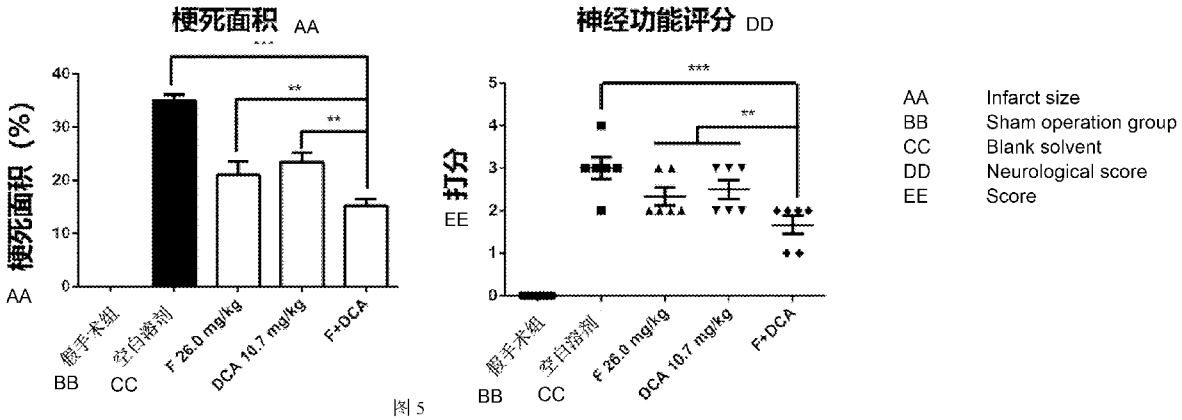


图 5

(57) **Abstract:** A pharmaceutical composition comprises fasudil dihydrochloride and dichloroacetate. The molar ratio of fasudil dihydrochloride to dichloroacetate is 1: 10 to 10: 1. A preparation method for the pharmaceutical composition and use thereof in preparing medicaments for preventing or treating pulmonary hypertension, ischemic cerebral stroke and subarachnoid hemorrhage.

(57) 摘要: 一种药物组合物，包括法舒地尔二盐酸盐和二氯乙酸盐，所述法舒地尔二盐酸盐与二氯乙酸盐的摩尔比为1:10至10:1。该药物组合物的制备方法及其在制备预防或治疗肺动脉高压、缺血性脑卒中和蛛网膜下腔出血的药物中的应用。

[见续页]

WO 2020/177290 A1

RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

一种药物组合物及其制备方法和用途

技术领域

本发明涉及一种药物组合物，具体涉及一种包括法舒地尔二盐酸盐和二氯乙酸盐的药物组合物，它们的制备方法、以及它们的医药用途，属于药学技术领域。

背景技术

Rho 激酶 (Rho associa ted kinase， ROCK)， 是参与细胞有丝分裂粘附、细胞骨架调整、肌肉细胞收缩、肿瘤细胞浸润等一系列细胞生命现象的重要酶。自 1996 年以来，已发现的 ROCK 分为 ROCK I (ROCK β)和 ROCK II (ROCK α)。前者主要存在于非神经组织如心脏、肺、骨胳肌等细胞; 后者主要存在于中枢神经系统，如海马锥体神经元、大脑皮质、小脑浦肯野细胞等。Rho 激酶(ROCK)在血管平滑肌细胞收缩、细胞迁移、增殖以及凋亡等多项细胞功能中具有重要的细胞内信号转导作用。在多种心血管疾病中都发现了 Rho 激酶异常活化，如动脉粥样硬化、再狭窄、高血压、肺动脉高压和心肌肥厚等。研究表明，慢性缺氧和野百合碱所致大鼠肺动脉高压模型以及严重肺动脉高压患者肺组织和肺动脉中 Rho 激酶活性均显著增高。

法舒地尔[六氢-1-(5-磺酰基异喹啉)-1(H)-1，4–二氮杂卓，Fasudil，又名 HA1077]，是日本旭化成株式会社和名古屋大学药理学研究室合作开发的一种新型异喹啉磺胺衍生物。作为一种新型、高效的血管扩张药，法舒地尔可以有效缓解脑血管痉挛，改善蛛网膜下隙出血(SAH)患者的预后，自 1996 年法舒地尔在日本上市以来，其对于肺血管的作用一直受到研究者的广泛关注，大量的动物实验和临床研究均表明法舒地尔可以：1）激活内源性的神经干细胞促进脑组织修复；2）增加星状胶质细胞刺激因子；3）抑制细胞内钙离子的释放；4）舒张脑部血管；5）保护神经细胞和改善伸进功能；6）促进轴突的再生。因此法舒地尔也用于缺血性脑卒中的治疗。此外，法舒地尔也能够安全有效地治疗肺动脉高压。ROCK 抑制药法舒地尔可以渗透入血管平滑肌细胞， 在正常或病理情况下都能与 ATP 竞争 Rho 激酶催化区的 ATP 结合位点，特异地阻断 Rho 激酶活性。目前盐酸法舒地尔抗 PAH 处于 II 期临床研究阶段。

发明内容

目的：本发明提供一种药物组合物、其制备方法及医药用途。

技术方案：本发明采用的技术方案为：

一种药物组合物，所述药物组合物包括法舒地尔二盐酸盐、二氯乙酸盐；所述法舒地尔二盐酸盐与二氯乙酸盐的摩尔比为 1:10 至 10:1。

进一步的，所述二氯乙酸盐为二氯乙酸钠盐、二氯乙酸二异丙胺盐中的一种或两种。

作为优选方案，所述法舒地尔二盐酸盐与二氯乙酸盐的摩尔比为 1:1。

更优选的，所述二氯乙酸盐为二氯乙酸钠盐，所述法舒地尔二盐酸盐与二氯乙酸钠盐的摩尔比为 1:1。

另一方面，本发明还提供一种药物制剂，其中含有治疗有效量的上述的药物组合物及药学上可接受的载体、佐剂或媒剂。

另一方面，本发明还提供上述的药物组合物、上述的药物制剂在制备预防和/或治疗肺动脉高压、蛛网膜下腔出血、缺血性脑卒中等心脑血管疾病的药物中的应用。

本发明中，在给予哺乳动物上述化合物及其药学上可接受的盐，以及这些化合物的溶剂化物（这里统称为“治疗药物”）时，可以单独使用，或者最好是按照规范的制药方法将其与适于药用的载体或稀释剂配合后使用。给药方式可以经各种途径，包括口服、非胃肠道给药或局部给药。这里所指的非胃肠道给药包括但并不限于静脉注射、肌肉注射、腹腔注射、皮下注射和透皮给药。

同时，本发明公开了药物组合物对肺动脉高压的逆转作用。进一步进行动物实验，在野百合碱诱导的大鼠肺动脉高压的治疗模型中，通过将药物组合物灌胃给药发现，药物组合物可明显降低肺动脉高压大鼠的平均肺动脉压，右心室收缩压和右心室肥厚指数，而对体循环压无明显影响；通过将大鼠心肺组织进行病理学检查发现，药物组合物显著降低右心室心肌细胞面积(CSA)、心肌及肺组织纤维化程度。说明药物组合物可有效逆转大鼠肺动脉高压，且药物组合物（即法舒地尔二盐酸盐与二氯乙酸盐联合用药）抗肺动脉高压的活性优于法舒地尔和二氯乙酸钠，提示该药物组合物是一种有效的抗肺动脉高压的复方，值得进一步研究。

同时，本发明公开了药物组合物预防和/或治疗蛛网膜下腔出血的作用。在大鼠蛛网膜下腔出血模型中（蛛网膜下腔血管内穿孔造模，造模后 0.5h 和 6h 各给药一次，评价 24h 后大鼠的各项指标），药物组合物（即法舒地尔二盐酸盐与二氯乙酸盐联合用药）显著降低大鼠蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛损伤，改善脑

水肿和动物神经学评分，明显改善了基底动脉管径、管腔面积及管壁厚度和顶部皮层局部脑血流量（rCBF），优于法舒地尔和二氯乙酸钠。结果提示法舒地尔二盐酸盐与二氯乙酸盐联合用药是一种有效的抗蛛网膜下腔出血的候选药物，值得进一步研究。

同时，本发明公开了药物组合物预防和/或治疗缺血性脑卒中的作用。在大鼠短暂缺血模型中（缺血 2h 复灌，缺血 4h 给药一次，24h 给药，评价 48h 后的大鼠的各项指标），药物组合物（即法舒地尔二盐酸盐与二氯乙酸盐联合用药）有效地降低脑梗死面积，显著优于上市药物丁苯肽（NBP）组，显著优于法舒地尔二盐酸盐组和二氯乙酸钠组；此外法舒地尔二盐酸盐与二氯乙酸盐联合用药还显著地改善了缺血诱导的神经行为功能障碍，明显优于法舒地尔和二氯乙酸钠；略优于 NBP 组。结果提示法舒地尔二盐酸盐与二氯乙酸盐联合用药是一种有效的抗缺血性脑卒中的候选药物，值得进一步研究。

作为 ROCK 的抑制剂，法舒地尔可以舒张血管、降低血压，抑制血管平滑肌细胞的增殖，抑制血管重构；而二氯乙酸盐是丙酮酸脱氢酶激酶的抑制剂，可以提高丙酮酸脱氢酶的活性，促进葡萄糖的有氧代谢，减少乳酸的生成；同时还可以促进钾离子通道尤其是 Kv1 .5 的表达，抑制平滑肌细胞的增殖和促进其凋亡。因此，法舒地尔和二氯乙酸盐的联合给药可以从多个机制治疗肺动脉高压，缺血性脑卒中以及蛛网膜下腔出血等心脑血管疾病。

附图说明

图 1 是实施例 5 中化合物对 MCT 诱导的 PAH 模型大鼠血流动力学的影响；mPAP：平均肺动脉压，RVSP：右心室收缩压；mSAP：平均体循环压；RV/LV+S：右心肥厚指数；Control：对照组，MCT：野百合碱； F：法舒地尔二盐酸盐；DCA：二氯乙酸钠盐；F+DCA：法舒地尔二盐酸盐和二氯乙酸钠盐联合给药组。

图2 是实施例5 中各给药组对大鼠肺小动脉血管壁厚度与肺小动脉直径的比值(PAMT)和纤维化程度的影响；PAMT：大鼠肺小动脉血管壁厚度与肺小动脉直径的比值；Fibrosis：纤维化；Control：对照组，MCT：野百合碱； F：法舒地尔二盐酸盐；DCA：二氯乙酸钠盐；F+DCA：法舒地尔二盐酸盐和二氯乙酸钠盐联合给药组。

图 3 是实施例 5 中各给药组对右心室心肌细胞面积及纤维化程度的影响；

CAS：心肌细胞横断面面积；Fibrosis：纤维化；Control：对照组，MCT：野百合碱； F：法舒地尔二盐酸盐；DCA：二氯乙酸钠盐；F+DCA：法舒地尔二盐酸盐和二氯乙酸钠盐联合给药组。

图 4A 是实施例 6 中不同化合物对 SAH 大鼠自发性活动评分的影响；图 4B 是实施例 6 中不同化合物对 SAH 大鼠脑水肿的影响。

图 5 是实施例 7 中 tMCAO 模型大鼠脑梗死面积和大鼠神经功能评分图。

具体实施方式

为了进一步阐明本发明，下面给出一系列实施例，这些实施例完全是例证性的，它们仅用来对本发明具体描述，不应当理解为对本发明的限制。

实施例 1

一种药物组合物，由法舒地尔二盐酸盐、二氯乙酸钠盐组成；所述法舒地尔二盐酸盐与二氯乙酸钠盐的摩尔比为 1:10。

实施例 2

一种药物组合物，由法舒地尔二盐酸盐、二氯乙酸钠盐组成；所述法舒地尔二盐酸盐与二氯乙酸钠盐的摩尔比为 10:1。

实施例 3

一种药物组合物，由法舒地尔二盐酸盐、二氯乙酸钠盐组成；所述法舒地尔二盐酸盐与二氯乙酸钠盐的摩尔比为 1:1。

实施例 4

一种药物制剂，由法舒地尔二盐酸盐、二氯乙酸钠盐和载体组成；所述法舒地尔二盐酸盐与二氯乙酸钠盐的摩尔比为 3:7。

实施例 5

预防和/或治疗肺动脉高压

一、F+DCA 化合物对 MCT 诱导的 PAH 模型大鼠血流动力学的影响

研究野百合碱（MCT）引起的大鼠 PAH 模型中，F+DCA 及相关化合物的治疗作用。动物分组：①正常对照组；②正常对照组+F+DCA；③MCT 模型组；④法舒地尔二盐酸盐（F）治疗组；⑤DCA 治疗组；⑥F+DCA 联合治疗组。大鼠模型的建立：动物模型组及治疗组一次性腹腔注射野百合碱(MCT) 60 mg/kg，正常对照组注射等量生理盐水。实验处理：于注射野百合碱的第 14 天， 各给药

组以等摩尔剂量开始给药，给药方式为灌胃给药，每天一次，F 组 37.5 mg/kg，DCA 组 15.5 mg/kg，F+DCA 联合治疗组包括 F 37.5 mg/kg 和 DCA 15.5 mg/kg，以及正常对照组+F 37.5 mg/kg +DCA 15.5 mg/kg。正常组和模型组予以等量的生理盐水喂养。各组在第 28 天进行平均肺动脉压力(mPAP)，右心室收缩压(RVSP)和平均体循环压(mSAP)的测量，随后处死大鼠取肺组织和心脏进行右心肥厚指数(RV/LV+S)，PCNA 检测，免疫组织化学染色、苏木精-伊红染色，Masson 染色等处理，评价各给药组在血流动力学、肺动脉平均厚度，肺纤维化程度，右心功能等方面的活性。结果如图 1 所示，和正常对照组相比，直接给予 F+DCA 对正常大鼠的 mPAP，RVSP 和 RV/LV+S 的影响不大，说明 F+DCA 的安全性较高。而 MCT 模型组可明显升高 mPAP，RVSP 和 RV/LV+S。各给药组均可有效地降低 mPAP，RVSP 和 RV/LV+S，其中 F+DCA 组降低 mPAP，RVSP 和 RV/LV+S 的活性最强，优于 F 组，DCA 组。另外，各给药组对 mSAP 的影响较小。

如图 2 所示，不同给药组对大鼠肺小动脉血管壁厚度与肺小动脉直径的比值(PAMT)和纤维化程度的影响，可以发现 F+DCA 可有效降低 PAMT 和肺小动脉纤维化程度，略优于 F 组，DCA 组。

如图 3 所示，各给药组对右心室心肌细胞面积及纤维化程度的影响，结果提示与空白对照相比，MCT 模型组显著增加大鼠右心室心肌细胞面积和纤维化程度。而给药组，尤其是 F+DCA 可显著降低右心室心肌细胞面积和纤维化程度，优于 F 组，DCA 组，结果提示 F+DCA 可有效抑制右心室心肌细胞的增殖与重构。

实施例 6

预防和/或治疗蛛网膜下腔出血

实验动物

SPF 级 SD 大鼠，体重 260-340 g，雌雄对半，购自北京维通利华实验动物技术有限公司，饲养于 SPF 级饲养环境中，室内温度控制在 23 ± 2 ℃，自由饮食和摄水。动物总数 32 只。假手术组：等体积生理盐水含 1%的 DMSO（n=8）；

实验方法

试验分组情况及药物浓度选择：

SAH 模型组：等体积生理盐水含 1%的 DMSO（n=8）；法舒地尔二盐酸盐（F）组：（26 mg/kg）（n=8）；DCA 组（10.7 mg/kg）（n=8）；F+DCA 组：（包括 F 26

mg/kg 和 DCA 10.7 mg/kg)(n=8);所有药物配成含 1% DMSO 的生理盐水溶液,给药方式为尾静脉注射给药。分别在 SAH(大鼠蛛网膜下腔出血造模)后 0.5 h 和 6 h 后给药各一次,假手术组和模型组使用等体积生理盐水含 1% DMSO 代替。

模型及给药方法

参考文献(Stroke, 1995, 26, 1086–1092)所述进行 SAH 的血管内穿孔模型。即将大鼠麻醉,插管并在手术期间用 3%异氟烷在 70%/ 30%医用空气/氧气中保持人工通气。通过直肠探针监测体温,并通过加热灯维持正常热。将锐化的 4-0 尼龙缝合线引入左颈内动脉(ICA)直至感觉到阻力(距颈总动脉分叉约 18 mm)。然后将缝合线进一步推入以刺穿前脑动脉和大脑中动脉的分叉,直到克服阻力并在穿孔后立即撤回。在假手术动物中,将缝线插入左 ICA,但没有进行穿孔。缝合线移除后,关闭切口,将大鼠单独圈养在加热的笼子中直至恢复。

自发活动评分:将大鼠置于一宽敞、可以自由活动、四壁均可触及的笼中进行自发活动评分。SAH 造模后 24 h 由 2 位实验人员分别以双盲法对实验大鼠进行评价和记录,取 2 组均值为最后得分,自发活动观察后立即处死大鼠。自发活动评分根据动物精神状态及运动情况分为 4 级:1 级,大鼠活动正常,无活动障碍,积极探索四周环境,至少触及三面笼壁的上缘;2 级,轻度活动障碍,即大鼠精神差、嗜睡,行动有一定的延迟,没有到达所有的笼壁,但他至少触及一面笼壁的上缘;3 级,中度活动障碍,即大鼠几乎不能站立,在笼中几乎不进行活动;4 级,重度活动障碍,即老鼠没有动弹,并显示有肢体的瘫痪。结果见图 4A。

脑含水量测定:分别于 SAH 造模后 24 h 处死大鼠,迅速取出大脑和小脑,用滤纸吸去表面血液。用电子天平分别秤取大脑和小脑的质量(湿重),然后,将脑组织置于烤箱中,105℃烘烤至恒重,再次称取大脑和小脑的质量(干重)。脑组织含水量的计算公式为:脑组织含水量(%)=(湿重-干重)/湿重×100%。其中小脑的组织含水量作为正常对照。结果见图 4B。

基底动脉管径、管腔面积及管壁厚度的测量:将上述各组基底动脉的组织切片进行 HE 染色,光学显微镜下观察照相后,采用 image pro-plus6.0 图像分析系统测量基底动脉的管径、管腔面积和管壁厚度。管腔面积的测量方法如下:沿基底动脉内表面测定其管腔周长(L),在根据公式:直径(d)=L/π 计算管腔直径,半径(r)=L/2π 计算管腔半径,管腔面积(S)根据公式:$S=\pi r^2$ 求得。管壁厚度的测量方法如下:测量基底动脉内表面至中膜外缘之距,不包括外膜。每根血管

选取 4 个不同的检测点测量管壁厚度，取其平均值作为该血管的测定值。结果见表 1。

表 1. 各给药组大鼠基底动脉管腔直径、管腔面积和管腔厚度的测量。

组别	管腔直径（μm）	管腔面积（μm^2）	管腔厚度（μm）
Sham	180.66±20.64	25912.41±6017.4	5.94±0.20
Model	122.11±17.00	11903.30±3367.5	11.67±0.61
F	153.73±18.87**	18796.09±4730.3**	8.13±0.80**
DCA	129.10±9.87*	13092.20±1788.6*	10.12±1.21*
F+DCA	160.78±12.65**	20.7162±2987.76**	8.01±0.41**

注：与 model 相比 *P < 0.05, **P < 0.01，与 F+DCA 组相比 #P < 0.05, ##P < 0.01。

顶部皮层局部脑血流量（rCBF）测定：在邮顶部用直径 5 mm 小型环钻开骨窗，中心位于 Bergma 点后 1 mm，后外方 3 mm。将 LDF3 型激光多普勒血流仪探头固定于定向仪微推进器上，分别于制备 SAH 前及 SAH 后 1、4、12、24 h 及时观察 rCBF。结果见表 2。

表 2 化合物对 SAH 大鼠局部脑血流变化的影响

Group	rCBF (mL/100g/min)				
	before SAH	1 h	4 h	12 h	24 h
Sham	54.41±5.99	51.67±3.08	49.70±2.80	47.79±5.20	45.52±4.96
Model	54.01±2.63	43.36±3.21	35.86±4.32	28.11±3.19	25.72±3.88
F	53.32±4.93	45.91±4.03	37.11±4.22	35.85±3.66**	37.73±4.12**
DCA	53.88±3.76	45.51±2.12	36.67±3.78	30.87±5.12	29.89±3.19
F+DCA	53.98±2.78	44.67±3.71	38.11±4.23	37.17±1.67**	39.87±3.57**

注：与 model 相比 *P < 0.05, **P < 0.01，与 F+DCA 组相比 #P < 0.05, ##P < 0.01

统计方法：自发活动评分数据采用中位数表示，其余数据均以 means ± SD 表示；自发活动评分据组间统计学差异采用 Kruskal-Wallis 检验和 Mann-Whitney U 检验，其余数据组间统计学差异采用 one-way ANOVA 和 Tukey 's 检验，*P* 值小于 0.05 认为有显著性差异。

2.3 实验结果

如图 4A-图 4B 所示，与 SAH 对照组相比，给予不同的受试化合物 F 和 F+DCA 均可明显降低 SAH 大鼠蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛损伤（p<0.01，p<0.01）。如图 4A 所示，与 SAH 对照组相比，给予不同的受试化合物 F 和 F+DCA 均可改

善动物神经学评分（$p<0.01$，$p<0.01$）；同时，明显降低 SAH 大鼠脑含水量（$p<0.01$，$p<0.01$）（图 4B）。实验结果表明化合物 F+DCA 对 SAH 大鼠的改善作用显著好于药物 F（$p<0.01$）。

并且，与 SAH 对照组相比，给予不同的受试化合物 F 和 F+DCA 后，明显改善了基底动脉管径、管腔面积及管壁厚度（Table 1）和顶部皮层局部脑血流量（rCBF）（Table 2），且实验结果表明化合物 F+DCA 对 SAH 大鼠的改善作用显著好于药物 F（$p<0.01$）。

实施例 7

预防和/或治疗缺血性脑卒中

为研究 F+DCA 在体内是否具有神经保护作用，选用短暂性大鼠脑缺血模型（tMCAO）进行实验。

模型及给药方法：将大鼠腹腔注射 10%水合氯醛(350 mg/kg)麻醉后，仰卧位固定在实验台上，颈正中切口，手术刀切开皮肤，钝性分离各层组织，按照大鼠颈部血管解剖图，于体视显微镜下分离左侧颈总动脉(CCA)，置线备用向上分离左颈外动脉(ECA)和颈内动脉，双重结扎，剪断甲状腺上动脉及枕动脉两条颈外动脉分支，在近 CCA 分叉约 5 mm-8 mm 处双重结扎 ECA，于 ICA 及 CCA 近心端分别用微动脉夹夹闭，在 ECA 近分叉处留置一打好单结但不收紧的丝线，在 ECA 近端结扎处与颈总动脉分叉处之间做一直径约 0.2 mm 的 V 型微切口，将尼龙线头自切口处轻轻插入，轻轻收紧线结，将颈内动脉于两结扎线间剪断，使之与颈内动脉方向一致松开动脉夹，将尼龙线顺 ECA 经 ICA 送入颅内，插入深度约 18 mm~20 mm 微遇阻力时停止，使尼龙线头端位于 MCA 起始处，阻断 MCA 的血流收紧丝线，缝合切口，留置尼龙线尾端于体外。

缺血 2 h 后，用 10%水合氯醛再次麻醉大鼠，轻轻拉动尼龙线使其头端回到微切口处(略有阻力感)，使大脑中动脉恢复血供，进行再灌注。假手术组大鼠只进行麻醉和血管分离术，不结扎血管及导入线栓，术后动物保温。给药方式：缺血 4 h、24 h 后大鼠分别尾静脉注射给药。缺血 48h 后，神经功能评分，再处死大鼠。

分组：假手术组（Sham）

空白溶剂组（Vehicle）

法舒地尔二盐酸盐组（F，26.0 mg/kg，尾静脉注射）

二氯乙酸钠盐组（DCA，10.7 mg/kg）

F+DCA 组（F 26.0 mg/kg + DCA 10.7 mg/kg，尾静脉注射）

TTC 染色：在全脑视交叉及其前后各 2 mm 处，做冠状切四刀，切成五片后迅速将脑片置 5 ml 含有 2% TTC 的磷酸缓冲溶液中，37 ℃避光温孵 10 min，在温孵过程中每隔 7～8 分钟翻动一次，温孵 10 min 后取出脑片，用数码相机（Olympus C-4000， Japan）拍照，之后用眼科镊分离苍白区（梗塞区）和非苍白区（正常区），通过 Image pro-plus 6.0 计算梗塞百分比如下：

梗塞百分比（%）=苍白区重量/（苍白区重量+非苍白区重量）×100%

神经功能评级：在缺血 48 h 后，根据 Longa's 方法对动物的神经功能缺陷进行分级评分，标准如下：

0 分：未观察到神经症状；

1 分：提尾悬空时，动物的手术对侧前肢表现为腕肘屈曲，肩内旋，肘外展，紧贴胸壁；

2 分：将动物置于光滑平面上，推手术侧肩向对侧移动时，阻力降低；

3 分：动物自由行走时向手术对侧环转或转圈；

4 分；软瘫，肢体无自发活动。

统计方法：神经功能缺陷分级评分数据采用中位数表示，其余数据均以 means ± SD 表示；神经功能缺陷分级评分数据组间统计学差异采用 Kruskal-Wallis 检验和 Mann-Whitney U 检验，其余数据组间统计学差异采用 one-way ANOVA 和 Tukey 's 检验，P 值小于 0.05 认为有显著性差异。

结果表明，如图 5 所示，在缺血 4 h 后，给予大鼠 F+DCA 有效地降低脑梗死面积（梗死面积百分比：6.78%），显著优于 F 组和 DCA 组。此外，F+DCA 还显著地改善了缺血诱导的神经行为功能障碍，优于 F、DCA。

以上所述仅是本发明的优选实施方式，应当指出：对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

权 利 要 求 书

1. 一种药物组合物，其特征在于，所述药物组合物包括法舒地尔二盐酸盐、二氯乙酸盐；所述法舒地尔二盐酸盐与二氯乙酸盐的摩尔比为 1:10 至 10:1。

2.根据权利要求 1 所述的药物组合物，其特征在于，所述二氯乙酸盐为二氯乙酸钠盐、二氯乙酸二异丙胺盐中的一种或两种。

3.根据权利要求 1 所述的药物组合物，其特征在于，所述法舒地尔二盐酸盐与二氯乙酸盐的摩尔比为 1:1。

4.根据权利要求 1 所述的药物组合物，其特征在于，所述二氯乙酸盐为二氯乙酸钠盐，所述法舒地尔二盐酸盐与二氯乙酸钠盐的摩尔比为 1:1。

5.根据权利要求 1 所述的药物组合物，其特征在于，所述药物组合物的制备方法为：

按照配方比例称取法舒地尔二盐酸盐、二氯乙酸盐，然后两者混合在一起即可。

6．一种药物制剂，其中含有治疗有效量的权利要求 1-4 任一项所述的药物组合物及药学上可接受的载体、佐剂或媒剂。

7．权利要求 1-5 任一项所述的药物组合物、权利要求 6 所述的药物制剂在制备预防和/或治疗肺动脉高压疾病的药物中的应用。

8．权利要求 1-5 任一项所述的药物组合物、权利要求 6 所述的药物制剂在制备预防和/或治疗缺血性脑卒中疾病的药物中的应用。

9．权利要求 1-5 任一项所述的药物组合物、权利要求 6 所述的药物制剂在制备预防和/或治疗蛛网膜下腔出血疾病的药物中的应用。

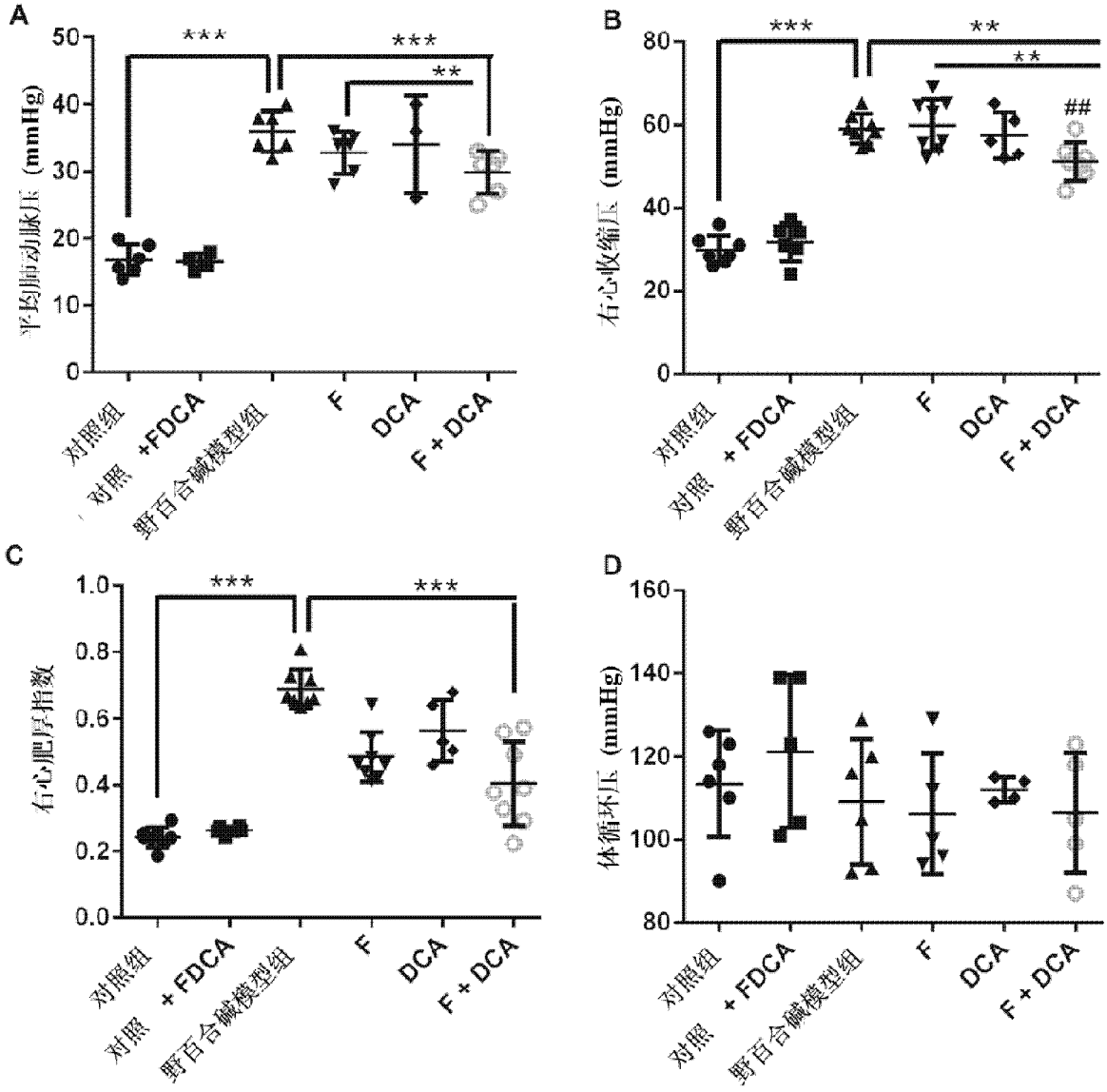

A
平均肺动脉压 (mmHg)
50
40
30
20
10
0
***
***
**
对照组
对照 +FDCA
野百合碱模型组
F
DCA
F + DCA
B
右心收缩压 (mmHg)
80
60
40
20
0
***
**
**
##
对照组
对照 + FDCA
野百合碱模型组
F
DCA
F + DCA
C
右心肥厚指数
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
***
***
对照组
对照 + FDCA
野百合碱模型组
F
DCA
F + DCA
D
体循环压 (mmHg)
160
140
120
100
80
对照组
对照 + FDCA
野百合碱模型组
F
DCA
F + DCA

图 1

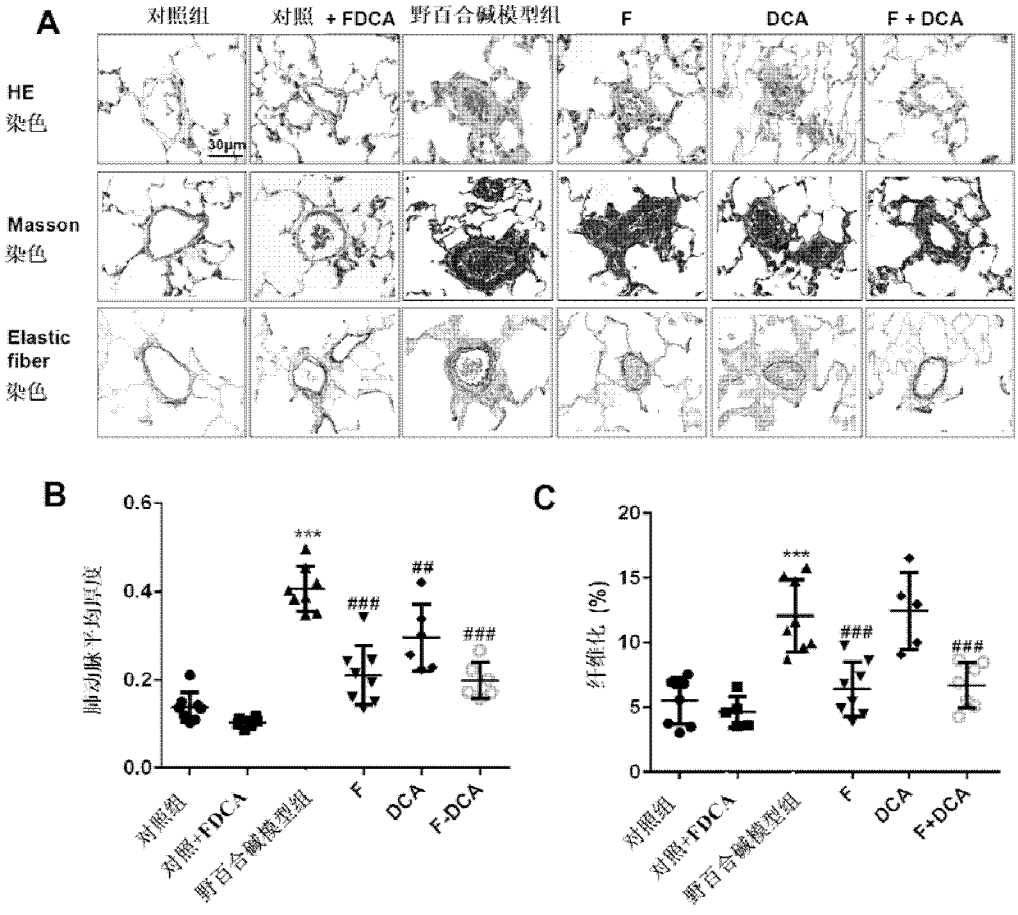

A
对照组
对照 + FDCA
野百合碱模型组
F
DCA
F + DCA
HE
染色
30μm
Masson
染色
Elastic
fiber
染色
B
肺动脉平均厚度
0.6
0.4
0.2
0.0
***
###
##
###
对照组
对照+FDCA
野百合碱模型组
F
DCA
F+DCA
C
纤维化 (%)
20
15
10
5
0
***
###
###
对照组
对照+FDCA
野百合碱模型组
F
DCA
F+DCA

图 2

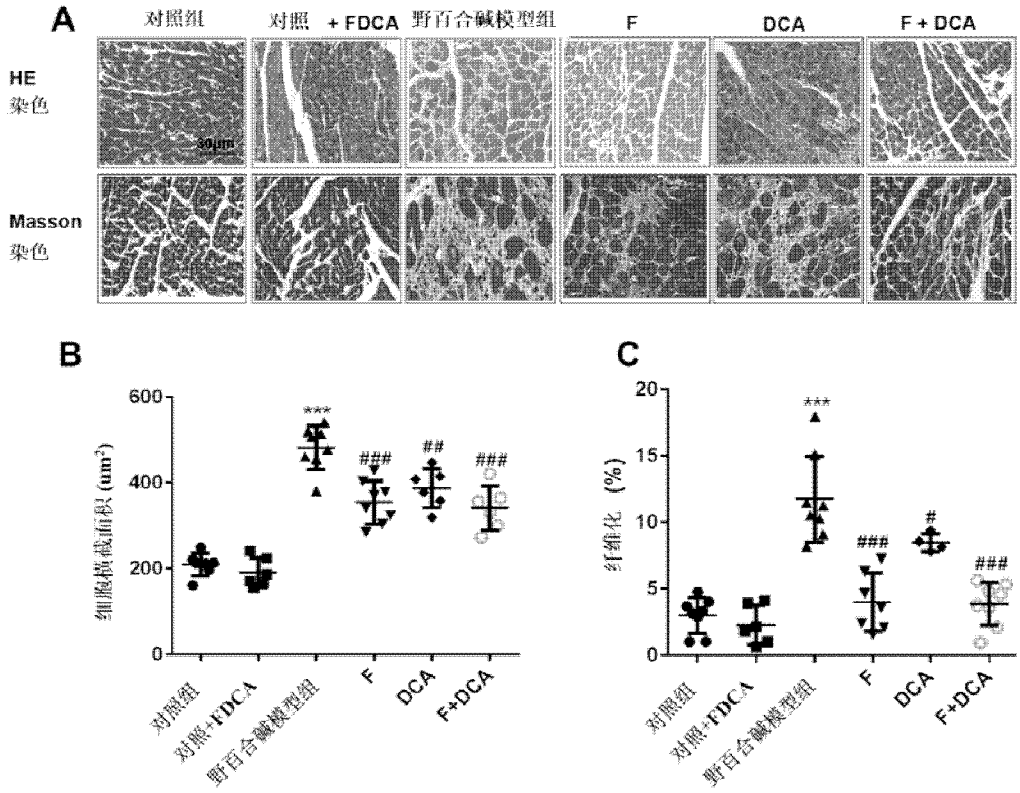

A
对照组
对照 + FDCA
野百合碱模型组
F
DCA
F + DCA
HE
染色
30μm
Masson
染色
B
细胞横截面积 (um²)
600
400
200
0
***
###
##
###
对照组
对照+FDCA
野百合碱模型组
F
DCA
F+DCA
C
纤维化 (%)
20
15
10
5
0
***
###
#
###
对照组
对照+FDCA
野百合碱模型组
F
DCA
F+DCA

图 3

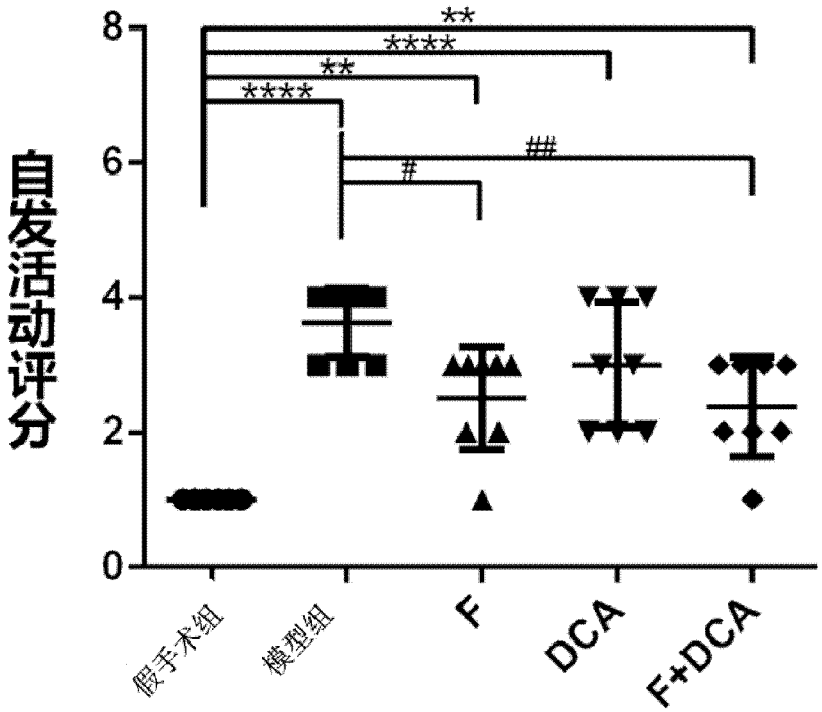

自发活动评分
8
6
4
2
0
**
****
**
****
##
#
假手术组
模型组
F
DCA
F+DCA

图 4A

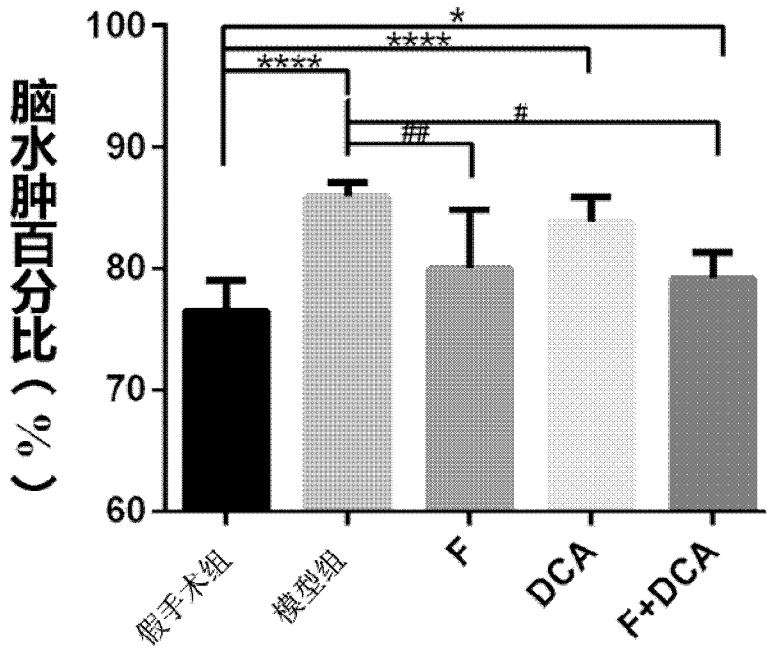

脑水肿百分比（%）
100
90
80
70
60
*
****
****
#
##
假手术组
模型组
F
DCA
F+DCA

图 4B

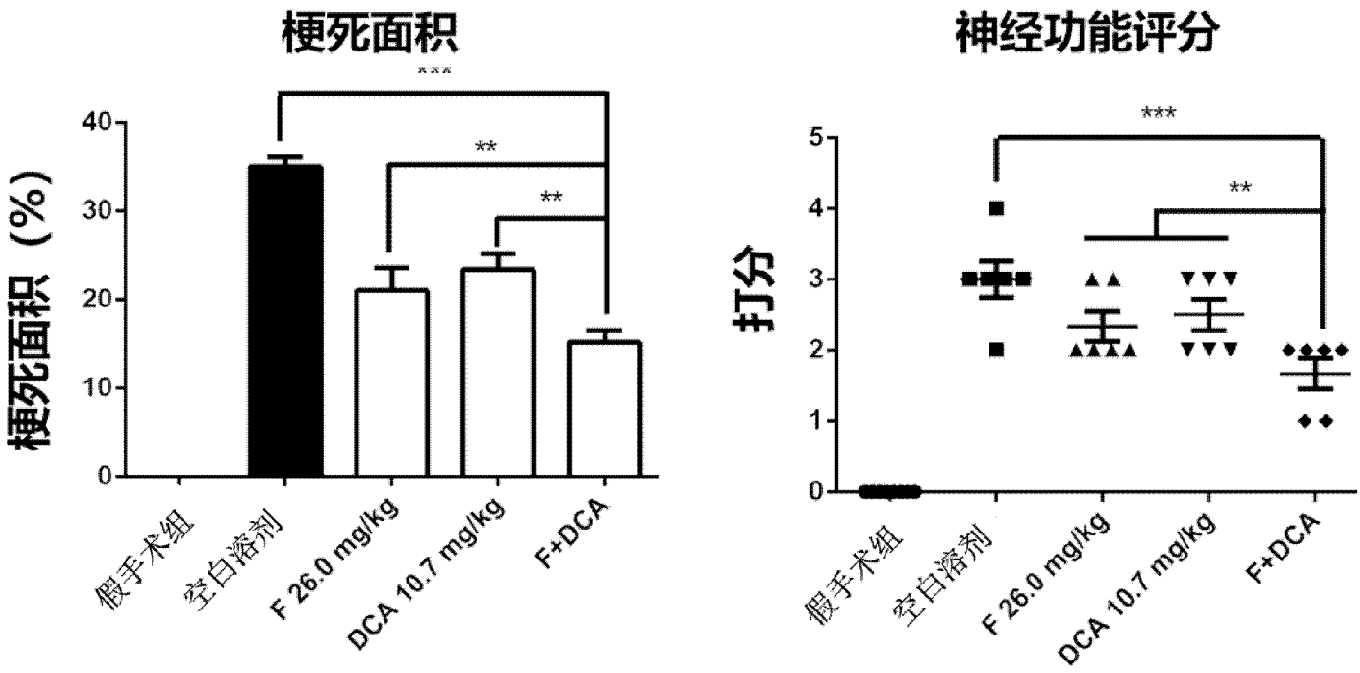

梗死面积
梗死面积（%）
40
30
20
10
0
***
**
**
假手术组
空白溶剂
F 26.0 mg/kg
DCA 10.7 mg/kg
F+DCA
神经功能评分
打分
5
4
3
2
1
0
***
**
假手术组
空白溶剂
F 26.0 mg/kg
DCA 10.7 mg/kg
F+DCA

图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2019/104909

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/55(2006.01)i; A61K 31/19(2006.01)i; A61P 11/00(2006.01)i; A61P 9/10(2006.01)i; A61P 9/00(2006.01)i

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)

A61K, A61P

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

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

CNABS, VEN(DWPI+SIPOABS), CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, 中国药物专利数据库, CTCMPD, CNKI, 百度学术搜索, BAIDU XUESHU SEARCH, ISI-WEB OF SCIENC, Pubmed; 法舒地尔, 二氯乙酸, Rho激酶, Fasudil, dichloroacetate, DCA, rho kinase, inhibitor, subarachnoid hemorrhage

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 107693490 A (NANJING DRUM TOWER HOSPITAL) 16 February 2018 (2018-02-16) description, page 1, paragraphs [0005] and [0007] and page 2, paragraph [0012]	1-9
PX	CN 109806263 A (CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY) 28 May 2019 (2019-05-28) claims 1-9	1-9
A	严子梦 (YAN, Zimeng). "二氯乙酸-开发中的新药 (Non-official translation: Dichloroacetic Acid-New Drug in Development)" *国外医药-合成药、生化药、制剂分册 (Non-official translation: World Pharmacy - Synthetic Drugs, Biochemical Drugs, Preparations),* Vol. 18, No. 4, 15 August 1997 (1997-08-15), ISSN: 1672-9188, page 203, left column, paragraph 2	1-9

☑ 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	Date of mailing of the international search report
29 November 2019	**12 December 2019**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088** **China** Facsimile No. **(86-10)62019451**	Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	张明; 孙晓川 (ZHANG, Ming; SUN, Xiaochuan). "法舒地尔的药理作用及其临床应用的研究进展 (Non-official translation: Research Progress on Pharmacological Effects of Fasudil and its Clinical Application)" *山西医科大学学报 (Journal of Shanxi Medical University),* Vol. 38, No. 4, 30 April 2007 (2007-04-30), ISSN: 1007-6611, page 371, right column, paragraph 3, and page 372, left column, paragraphs 1 and 5	1-9
A	李丽敏, 蒋萍等 (LI, Limin; JIANG, Ping et al.). "Rho激酶及其抑制剂在出血性脑血管疾病研究中相关进展 (Non-official translation: Related Progress of Rho Kinase and its Inhibitors in the Study of Hemorrhagic Cerebrovascular Disease)" *国际神经病学神经外科学杂志 (Journal of International Neurology and Neurosurgery),* Vol. 42, No. 4, 28 August 2015 (2015-08-28), ISSN: 1673-2642, page 367, right column, paragraph 2 and page 368, left column, paragraph 1	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2019/104909

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 107693490 A	16 February 2018	None	
CN 109806263 A	28 May 2019	None	

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2019/104909

A. 主题的分类

A61K 31/55(2006.01)i; A61K 31/19(2006.01)i; A61P 11/00(2006.01)i; A61P 9/10(2006.01)i; A61P 9/00(2006.01)i

按照国际专利分类(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)

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

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）)

CNABS,VEN(DWPI+SIPOABS),CNTXT, EPTXT,USTXT,WOTXT, 中国药物专利数据库,CNKI,百度学术搜索,ISI-WEB OF SCIENC, Pubmed;法舒地尔，二氯乙酸，Rho激酶，Fasudil, dichloroacetate, DCA, rho kinase,inhibitor,subarachnoid hemorrhage

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	CN 107693490 A (南京鼓楼医院) 2018年 2月 16日 (2018-02-16) 说明书第1页第[0005]段，第[0007]段，第2页第[0012]段	1-9
PX	CN 109806263 A (中国药科大学) 2019年 5月 28日 (2019-05-28) 权利要求1-9	1-9
A	严子梦. ″“二氯乙酸-开发中的新药”″ 《国外医药-合成药、生化药、制剂分册》, 第18卷，第4期，1997年 8月 15日 (1997-08-15), ISSN：1672-9188, 第203页左栏第2段	1-9
A	张明，孙晓川. ″“法舒地尔的药理作用及其临床应用的研究进展”″ 《山西医科大学学报》, 第38卷，第4期，2007年 4月 30日 (2007-04-30), ISSN：1007-6611, 第371页右栏第3段，第372页左栏第1段，第5段	1-9

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 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

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“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（如具体说明的）

“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	国际检索报告邮寄日期
2019年 11月 29日	2019年 12月 12日

ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	雷耀龙
传真号 (86-10)62019451	电话号码 86-10-62412194

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2019/104909

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	李丽敏， 蒋萍等. ″“Rho激酶及其抑制剂在出血性脑血管疾病研究中相关进展”″ 《国际神经病学神经外科学杂志》, 第42卷，第4期，2015年 8月 28日 (2015 - 08 - 28)， ISSN：1673-2642, 第367页右栏第2段，第368页左栏第1段	1-9

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2019/104909

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN 107693490 A	2018年 2月 16日	无	
CN 109806263 A	2019年 5月 28日	无	