



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106714793 B

(45) 授权公告日 2020.12.01

(21) 申请号 201580035346.8

(51) Int.CI.

(22) 申请日 2015.07.03

A61K 31/225 (2006.01)

(续)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106714793 A

(56) 对比文件

(43) 申请公布日 2017.05.24

US 20130116337 A1, 2013.05.09

(30) 优先权数据

1411937.4 2014.07.03 GB

Andrew P.Wojtovich等.The complex II inhibitor atpenin A5 protects against cardiac ischemia-reperfusion injury via activation of mitochondrial KATP channels.《Basic Res Cardiol》.2009,121-129.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2016.12.28

Petras P.Dzeja等.Targeting nucleotide-requiring enzymes:implications for diazoxide-induced cardioprotection.《Am J Physiol Heart Circ Physiol》.2002, H1048-H1056.

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2015/051949 2015.07.03

Stephen J.Ralph等.Inhibitors of Succinate: Quinone Reductase/Complex II Regulate Production of Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Protect Normal Cells from Ischemic Damage but Induce Specific Cancer Cell Death.《Pharm Res》.2011, 2695-2730.

(87) PCT国际申请的公布数据

W02016/001686 EN 2016.01.07

审查员 邓丽娟

(73) 专利权人 英国研究与创新署

地址 英国斯温登

权利要求书1页 说明书28页 附图25页

专利权人 剑桥企业有限公司

(72) 发明人 爱德华·舒沙尼 托马斯·克里格
库罗什·塞伯帕塞 (续)(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

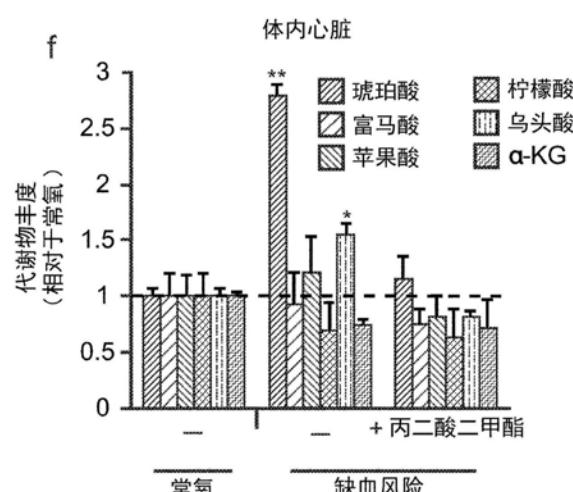
代理人 穆彬

(54) 发明名称

琥珀酸脱氢酶抑制剂(SDH)ⁱs

(57) 摘要

本发明涉及琥珀酸脱氢酶抑制剂或其前药和/或药用盐,其通过抑制琥珀酸的累积而用于治疗或预防再灌注损伤,如缺血-再灌注损伤,其中所述抑制剂或其前药和/或药用盐是琥珀酸脱氢酶的可透过细胞的可逆抑制剂。



[接上页]

(72) 发明人	迈克尔·帕特里克·墨菲 洛林·沃克 克里斯蒂安·弗雷扎	<i>A61P 9/00</i> (2006.01) <i>A61P 11/00</i> (2006.01)
(51) Int.Cl.		<i>A61P 7/10</i> (2006.01)
	<i>A61P 9/10</i> (2006.01)	<i>A61P 3/10</i> (2006.01)
	<i>A61P 17/02</i> (2006.01)	<i>A61P 9/12</i> (2006.01)
	<i>A61P 35/00</i> (2006.01)	<i>A61P 25/06</i> (2006.01)
		<i>A61P 27/02</i> (2006.01)

1. 琥珀酸脱氢酶抑制剂和/或其药用盐在制备药物中的用途,所述药物通过抑制琥珀酸的累积而用于治疗或预防再灌注损伤,其中所述抑制剂和/或其药用盐是琥珀酸脱氢酶的可透过细胞的可逆抑制剂,其选自 $R^1O_2C-CH_2-CO_2R^4$,其中 R^1 选自C₁₋₁₂烷基;且 R^4 选自C₁₋₁₂烷基。

2. 根据权利要求1所述的琥珀酸脱氢酶抑制剂和/或其药用盐在制备药物中的用途,其中所述可透过细胞的并且可逆的琥珀酸脱氢酶抑制剂和/或其药用盐选自 $R^1O_2C-CH_2-CO_2R^4$,其中 R^1 和 R^4 独立地选自甲基,乙基,丙基和丁基。

3. 根据权利要求1所述的琥珀酸脱氢酶抑制剂和/或其药用盐在制备药物中的用途,其中所述可透过细胞的并且可逆的琥珀酸脱氢酶抑制剂和/或其药用盐为丙二酸二甲酯。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的琥珀酸脱氢酶抑制剂和/或其药用盐在制备药物中的用途,其中所述再灌注损伤是动脉疾病的结果。

5. 根据权利要求1-3中任一项所述的琥珀酸脱氢酶抑制剂和/或其药用盐在制备药物中的用途,其中所述再灌注损伤是脑血管疾病的结果。

6. 根据权利要求1-3中任一项所述的琥珀酸脱氢酶抑制剂和/或其药用盐在制备药物中的用途,其中所述再灌注损伤是外周血管病的结果。

7. 根据权利要求1-3中任一项所述的琥珀酸脱氢酶抑制剂和/或其药用盐在制备药物中的用途,其中所述再灌注损伤是外科手术组织再灌注损伤的结果。

8. 根据权利要求1-3中任一项所述的琥珀酸脱氢酶抑制剂和/或其药用盐在制备药物中的用途,其中所述再灌注损伤是选自以下的病症的结果:腹主动脉瘤,动脉粥样硬化,烧伤,癌症,心脏停搏,卒中继发脑水肿,慢性阻塞性肺病,充血性心脏病,经皮腔内冠状动脉血管成形术后狭窄,冠心病,糖尿病,高血压,由挤压伤或外科手术导致的机械性创伤,偏头痛,心肌梗死,肺血管疾病,心脏手术后再灌注,视网膜血管病,和卒中。

9. 根据权利要求1-3中任一项所述的琥珀酸脱氢酶抑制剂和/或其药用盐在制备药物中的用途,其中所述可透过细胞的并且可逆的琥珀酸脱氢酶抑制剂和/或其药用盐通过抑制琥珀酸的累积而用于治疗或预防选择性外科手术中的再灌注损伤。

10. 根据权利要求1-3中任一项所述的琥珀酸脱氢酶抑制剂和/或其药用盐在制备药物中的用途,其中所述可透过细胞的并且可逆的琥珀酸脱氢酶抑制剂和/或其药用盐用于治疗或预防待保存的器官中的再灌注损伤。

11. 根据权利要求1-3中任一项所述的琥珀酸脱氢酶抑制剂和/或其药用盐在制备药物中的用途,其中所述可透过细胞的并且可逆的琥珀酸脱氢酶抑制剂和/或其药用盐用于治疗或预防器官移植中的再灌注损伤。

12. 根据权利要求1-3中任一项所述的琥珀酸脱氢酶抑制剂和/或其药用盐在制备药物中的用途,其中与下述治疗联合施用所述琥珀酸脱氢酶抑制剂,所述治疗用于或意欲去除血流中的阻塞。

13. 根据权利要求12所述的琥珀酸脱氢酶抑制剂和/或其药用盐在制备药物中的用途,其中用于或意欲去除血流中的阻塞的治疗选自血液稀释剂、溶解剂、MitoSNO和支架。

琥珀酸脱氢酶抑制剂 (SDH i's)

发明领域

[0001] 本发明涉及琥珀酸脱氢酶抑制剂或其前药和/或药用盐，其通过抑制琥珀酸的累积而用于治疗或预防再灌注损伤，其中所述抑制剂或其前药和/或药用盐是琥珀酸脱氢酶的可透过细胞的可逆抑制剂。

[0002] 发明背景

[0003] 已知琥珀酸在厌氧条件下累积。例如，可以观察到潜水动物，肿瘤中心的缺氧区，和某些寄生虫显示在缺氧条件下的升高的琥珀酸。然而，这些研究的背景典型地是在尝试杀死细胞或从研究的系统中阻止或去除细胞。然而，这些系统并非始终与缺氧下哺乳动物细胞经历的情况类似。例如，在细菌中，参与琥珀酸代谢的两种酶活性存在于两种分开的酶中[而非在哺乳动物细胞中相同的单个酶琥珀酸脱氢酶 (SDH) 中]。

[0004] 已经在某些体外系统中研究琥珀酸。可能的是，在某些体外系统中已经观察到通过琥珀酸的活性氧类别 (ROS) 生成。然而，这些观察大多数被认为是体外奇异现象而不是体内可能状况的真实反映。

[0005] 对于氧传感应用已经研究了琥珀酸。在现有技术中已经尝试阻断琥珀酸以便努力获得抗炎效果。

[0006] 在现有技术中没有已知的实验关联将体内琥珀酸累积和在再灌注后琥珀酸氧化导致的线粒体复合物I造成的ROS生产联系起来。

[0007] Hu等,Journal of Huazhong University of Science and Technology (华中科技大学期刊), Medical Sciences (医学), 第25卷, 2005, 第439-441页和 Hirata等, Transplantation (移植), 第71卷, 2001, 第352-359页两者都显示了：使用3-硝基丙酸化学预处理 (preconditioning) 减少了大鼠中的缺血-再灌注损伤。化合物3-硝基丙酸是线粒体复合物II的抑制剂。Woitovich等, Basic Research in Cardiology (心脏基础研究), 第104卷, 2009, 第121-129页已经报道了复合物II抑制剂atpennin A5通过mK_{ATP}通道依赖性机制保护心脏免受模拟的缺血-再灌注损伤。然而，诸如3-硝基丙酸和atpennin A5的抑制剂具有的缺点是它们是不可逆的。因此，结合这些不可逆抑制剂的任何复合物II被永久阻止实施其正常功能。

[0008] Drose等, Molecular Pharmacology (分子药理学), 第79卷, 2011, 第814-822页研究了几种保护心脏的复合物II抑制剂，包括2-噻吩甲酰三氟丙酮 (TTFA), 3-硝基丙酸, atpennin A5和丙二酸。在测试的抑制剂中，丙二酸要求最高的浓度(毫摩尔水平)，以实现半最大抑制，相比之下atpennin A5要求纳摩尔水平。另外，丙二酸具有不能透过细胞的缺点。其他抑制剂TTFA、3-硝基丙酸和atpennin A5具有的缺点是它们是不可逆的。

[0009] 丙二酸二甲酯是已知的化合物。丙二酸及其衍生物是用作聚合物形成的原料的工业化合物。关于使用丙二酸衍生物(如丙二酸二甲酯)作为SDH抑制剂的前药，现有技术中没有已知的教导。前药丙二酸二甲酯将在体内水解为丙二酸，其为SDH的抑制剂。

[0010] 本发明寻求克服与现有技术相关的问题。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明人进行了广泛的代谢组学研究以鉴定在缺血过程中累积的代谢物。作为仔细对照研究的一部分,该代谢组学分析在广泛范围的组织类型中平行进行。观察到许多代谢物在缺血条件下在不同组织中变化。然而,尽管这一发现,但是发明人坚持他们的分析并且仅选择在所有研究范围的组织中被相似影响的那些代谢物。由此,发明人能够巧妙地选择更可能对于缺血效应而言共同的代谢物。

[0013] 另外,发明人进一步分析再灌注对于分析物的影响。这允许发明人仅选择在缺血期间在各种组织类型中表现类似累积的三种代谢物(次黄嘌呤,黄嘌呤和琥珀酸)。最令人意外的是,发明人发现在这三者中,仅琥珀酸可以貌似在再灌注后的活性氧类别的生成中发挥作用。本发明正是基于这些引人注目的见解,其将琥珀酸挑选出来,因为在缺血过程中累积,被快速代谢并参与再灌注后活性氧类别的生成。

[0014] 对于发明人意外的是,琥珀酸在再灌注之后消失的如此快。还出人意料的是发现琥珀酸是在常氧条件下代谢功能恢复后活性氧类别的来源。另一个意外是多个器官共享相同的代谢特征,证明琥珀酸代谢是哺乳动物细胞对缺血情形的应答中广泛适用的现象。

[0015] 因此,在一方面,本发明提供琥珀酸脱氢酶抑制剂或其前药和/或药用盐,其通过抑制琥珀酸的累积而用于治疗或预防再灌注损伤,其中所述抑制剂或其前药和/或药用盐是琥珀酸脱氢酶的可透过细胞的可逆抑制剂。

[0016] 在另一方面,本发明提供一种治疗或预防受试者中的再灌注损伤的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的琥珀酸脱氢酶抑制剂或其前药和/或药用盐,其中所述抑制剂或其前药和/或药用盐是琥珀酸脱氢酶的可透过细胞的可逆抑制剂。

[0017] 在另一方面,本发明提供琥珀酸脱氢酶抑制剂或其前药和/或药用盐,其用于治疗或预防再灌注损伤,其中所述抑制剂或其前药和/或药用盐是琥珀酸脱氢酶的可透过细胞的可逆抑制剂。

[0018] 在另一方面,本发明提供琥珀酸脱氢酶抑制剂或其前药和/或药用盐,其通过抑制琥珀酸的累积而用于治疗或预防再灌注损伤,其中所述抑制剂或其前药和/或药用盐是琥珀酸脱氢酶的可透过细胞的可逆抑制剂。

[0019] 定义

[0020] C₁₋₁₂烷基:是指直链和支链饱和烃基,通常具有1-12个碳原子。烷基的实例包括甲基,乙基,正丙基,异丙基,正丁基,仲丁基,异丁基,叔丁基,戊-1-基,戊-2-基,戊-3-基,3-甲基丁-1-基,3-甲基丁-2-基,2-甲基丁-2-基,2,2,2-三甲基乙-1-基,正己基,正辛基,正壬基,正癸基,正十一烷基,正十二烷基等。

[0021] “药物”,“药物物质”,“活性药物成分”等是指可以用于治疗需要治疗的受试者的化合物(例如式(I)的化合物和以下具体命名的化合物)。

[0022] “赋形剂”是指可以影响药物的生物利用度、但是另一方面没有药理学活性的任何物质。

[0023] “药用的”物质是指落入合理医学判断范围内的那些物质,其适合用于与受试者组织接触而没有过度毒性、刺激性、变态反应等,与合理的收益/风险比相称,并且有效用于它们的意欲用途。

[0024] “药物组合物”是指一种或多种药物物质和一种或多种赋形剂的组合。

[0025] 本文所用的术语“受试者”是指人或非人哺乳动物。非人哺乳动物的实例包括家

畜,如绵羊、马、牛、猪、山羊、兔和鹿;和陪伴动物,如猫、狗、啮齿类和马。

[0026] 药物的“治疗有效量”是指有效治疗受试者和由此提供所需治疗、缓解、抑制或预防效果的药物或组合物的量。治疗有效量可取决于受试者的重量和年龄以及给药途径等等。

[0027] “治疗”是指逆转、缓解、抑制该术语应用的病症、疾病或病况的进展或者预防该病症、疾病或病况,或者逆转、缓解、抑制该病症、疾病或病况的一种或多种症状的进展或者预防该病症、疾病或病况的一种或多种症状。

[0028] “治疗 (Treatment)”是指“治疗 (treating)”的行为,如以上刚刚定义的。

[0029] “预防”是指降低患上给定疾病或病症的风险,即导致临床症状不发展。因此,“预防”是指预防性治疗需要其的受试者。预防性治疗可以通过向受试者施用适当剂量的治疗剂来实现,所述受试者具有对病症的易感性或者处在发展病症的风险中,尽管该病症的症状还不存在或是最小的,由此实质性地避免该病症的发作。

[0030] 术语“前药”是指在施用于受试者之后在体内(优选在血液中)进行结构改变(如水解)以产生SDHi或其盐的化合物。例如,已知各种从具有羧酸、氨基、羟基等的药物化合物生产前药的方法,并且本领域技术人员能够选择适当的方式。不特别限制SDHi或其盐的前药的类型。例如,当SDHi具有一个或多个羧酸时,实例包括其中一个或多个所述羧酸被转化为酯的前药。优选的实例包括酯化合物,如甲酯或二甲酯(diemethyl ester)。

[0031] “琥珀酸脱氢酶抑制剂”或“SDHi”是指抑制琥珀酸脱氢酶的作用的化合物。

[0032] 如本文所用,术语“包含 (comprising)”是指“至少部分由...组成”。当在本说明书中解释包括术语“包含”的每个陈述时,也可以存在除了由该术语作为开始的那个或那些以外的特征。相关术语如“包含 (comprise)”和“包含 (comprises)”意欲以相同方式解释。

[0033] 琥珀酸脱氢酶抑制剂 (SDHi's) 或其前药

[0034] SDHi或其前药和/或药用盐通过抑制琥珀酸的累积用于治疗或预防再灌注损伤。因此,与不施用SDHi或其前药和/或药用盐的情况下在再灌注处观察到的琥珀酸的量相比,通过降低组织中再灌注处观察到的琥珀酸的量,施用SDHi或其前药和/或药用盐治疗或预防受试者组织中的再灌注损伤,如心肌缺血。

[0035] SDHi是SDH的可逆抑制剂。SDHi的可逆性是重要的,因为这允许该抑制剂随时间过去通过竞争性结合从线粒体复合物上去除,由此其作用将是暂时的。结果,复合物将恢复行使其正常功能。

[0036] 对于通过琥珀酸位点作用的SDHi,可以通过测量和比较以下的梗死大小来确定SDHi的可逆性:(1)用SDHi处理的心脏;(2)未处理的心脏;和(3)用SDHi+琥珀酸二甲酯处理的心脏。如果与未处理的心脏相比,在用SDHi处理的心脏中梗死大小减小,则显示心脏保护。如果通过加回琥珀酸二甲酯而抑制用SDHi处理的心脏显示的心脏保护,则证明SDHi的可逆性。该方法在实施例中讨论,实施例使用氯化三苯基四唑鎓染色来确定心脏的梗死大小(还参见附图4b&c)。

[0037] SDHi的功效可以通过确定SDHi防止缺血期间琥珀酸累积的能力来评估。SDHi防止缺血期间琥珀酸累积的能力可以如下确定:通过液相色谱法/质谱法(LC/MS)测量组织中琥珀酸水平,如实施例中代谢组学分析中详述的。通过比较用SDHi处理后的琥珀酸水平和用SDHi+琥珀酸二甲酯处理后的琥珀酸水平,可以显示SDHi的可逆性。

[0038] SDHi或其前药和/或药用盐是膜可渗透的。该膜可透性使得化合物能够进入细胞并累积。

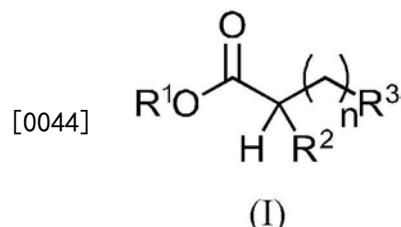
[0039] 在细胞实验中可以通过测量氧消耗率(OCR)和通过用琥珀酸二甲酯驱动其和然后加入SDHi或其前药和/或药用盐(如丙二酸二甲酯)抑制其来测定膜可透性,由此可以评估SDHi或其前药和/或药用盐的功效以及摄取和水解的时间表。另外,如图5a中所示,通过比较未处理细胞中化合物的水平和处理的细胞中化合物的水平,可以确定化合物的细胞可透性。典型地,使用LC/MS可以确定化合物的水平,如实施例中代谢组学分析中详述的。

[0040] 更适当地,SDHi或其前药和/或药用盐是SDHi的前药或其药用盐。

[0041] 更适当地,SDHi或其前药和/或药用盐是前药。

[0042] 适当地,SDHi结合SDH。

[0043] 适当地,SDHi或其前药和/或药用盐具有通式(I):



[0045] 其中:

[0046] n是0或1;

[0047] R¹选自C₁₋₁₂烷基;

[0048] R²选自H和OH;

[0049] R³选自CO₂R⁴,和C(O)-CO₂R⁴;并且

[0050] R⁴选自C₁₋₁₂烷基。

[0051] 适当地琥珀酸脱氢酶抑制剂或其前药和/或药用盐选自R¹O₂C-CH₂-CO₂R⁴,R¹O₂C-CH(OH)-CH₂-CO₂R⁴,R¹O₂C-CH₂-C(O)-CO₂R⁴。

[0052] 更适当地琥珀酸脱氢酶抑制剂或其前药和/或药用盐选自R¹O₂C-CH₂-CO₂R⁴,其中R¹和R⁴独立地选自甲基,乙基,正丙基,异丙基,正丁基,仲丁基,叔丁基。

[0053] 最适当地SDHi或其前药和/或药用盐是丙二酸类(malonate)化合物。

[0054] 适当地SDHi或其前药和/或药用盐可以包含可透过细胞的丙二酸类。

[0055] 适当地本发明的丙二酸类SDHi或其前药和/或药用盐是丙二酸乙酯。

[0056] 最适当地琥珀酸脱氢酶抑制剂或其前药和/或药用盐是丙二酸二甲酯。

[0057] 丙二酸二甲酯是有利的,因为其具有极低的毒性。例如,当口服施用时,丙二酸二甲酯的LD₅₀大约是5gms/kg。

[0058] 适当地,SDHi与SDH的结合是在琥珀酸结合位点。适当地,这是与琥珀酸的竞争性结合。

[0059] 适当地,在琥珀酸结合位点结合SDH的SDHi或其前药和/或药用盐选自R¹O₂C-CH₂-CO₂R⁴,R¹O₂C-CH(OH)-CH₂-CO₂R⁴和R¹O₂C-CH₂-C(O)-CO₂R⁴。

[0060] 适当地,SDHi在泛醌结合位点结合SDH。适当地,该结合是与醌的竞争性结合。

[0061] 更适当地,用于本发明的SDHIs抑制常氧条件下的琥珀酸的再氧化。

[0062] 适当地,本发明的SDHi是“复合物II”抑制剂。

- [0063] 本发明的SDHi是可逆抑制剂。
- [0064] 适当地,本发明的SDHi是可逆SDHi。
- [0065] $\underline{R^1}$
- [0066] 适当地 R^1 选自甲基,乙基,丙基,丁基,戊基和己基。
- [0067] 更适当地 R^1 选自甲基和乙基。
- [0068] $\underline{R^2}$
- [0069] 适当地 R^2 是H。
- [0070] $\underline{R^3}$
- [0071] 适当地 R^3 是 CO_2R^4 。
- [0072] $\underline{R^4}$
- [0073] 适当地 R^4 选自甲基,乙基,丙基,丁基,戊基和己基。
- [0074] 更适当地 R^4 选自甲基和乙基。
- [0075] 给药和时间安排
- [0076] 适当地将SDHi或其前药和/或药用盐口服、局部、皮下、肠胃外、肌内、动脉内和/或静脉内给药。
- [0077] 更适当地,将SDHi或其前药和/或药用盐静脉内施用。
- [0078] 可以通过直接注射到冠状动脉来施用SDHi或其前药和/或药用盐。
- [0079] 适当地,在缺血前施用本发明的SDHi或其前药和/或药用盐。在这些情况中,将SDHi或其前药和/或药用盐施用于处于缺血风险中的受试者。
- [0080] 适当地,在缺血后施用本发明的SDHi或其前药和/或药用盐。
- [0081] 适当地,在再灌注之前施用本发明的SDHi或其前药和/或药用盐。
- [0082] 适当地,在再灌注开始后尽可能快地施用本发明的SDHi或其前药和/或药用盐。
- [0083] 适当地,在再灌注开始五分钟内施用本发明的SDHi或其前药和/或药用盐。适当地,在再灌注开始四分钟内;在再灌注开始三分钟内;在再灌注开始两分钟内;或在再灌注开始一分钟内,施用本发明的SDHi或其前药和/或药用盐。
- [0084] 适当地,在外科手术之前施用本发明的SDHi或其前药和/或药用盐。
- [0085] 适当地,在外科手术期间施用本发明的SDHi或其前药和/或药用盐。
- [0086] 适当地,在缺血前将本发明的SDHi或其前药和/或药用盐施用于意欲保存的器官。
- [0087] 适当地,在缺血后尽可能快地将本发明的SDHi或其前药和/或药用盐施用于待保存的器官。
- [0088] 适当地,在再灌注后尽可能快地将本发明的SDHi或其前药和/或药用盐施用于待保存的器官。
- [0089] 适当地,在再灌注五分钟内将本发明的SDHi或其前药和/或药用盐施用于待保存的器官。适当地,在再灌注开始四分钟内;在再灌注开始三分钟内;在再灌注开始两分钟内;或在再灌注开始一分钟内,施用本发明的SDHi或其前药和/或药用盐。
- [0090] 适当地,在器官移植中应用本发明的SDHi或其前药和/或药用盐。
- [0091] 本发明的一个优势是提供保护性治疗。目前市场上没有批准的保护性化合物。
- [0092] 适当地,本发明的SDHi或其前药和/或药用盐在哺乳动物中快速代谢。
- [0093] 丙二酸SDHi's或其前药和/或药用盐的一个优势是它们在哺乳动物细胞中被代

谢。可透过细胞的丙二酸衍生物被适当地代谢以便一旦在细胞内就释放丙二酸。丙二酸本身通过细胞内的天然代谢途径被有利地代谢。更具体地，丙二酸被代谢成哺乳动物细胞中天然存在的脂肪降解途径的一部分。这提供了以下优势，即当SDHi或其前药和/或药用盐是丙二酸类化合物时，本发明的SDHi或其前药和/或药用盐的代谢没有副作用或副产物。

[0094] 适当地琥珀酸脱氢酶抑制剂或其前药和/或药用盐可以以0.1-50mg/kg受试者/min的剂量施用1-30分钟。更适当地，琥珀酸脱氢酶抑制剂或其前药和/或药用盐可以以0.5-20mg/kg受试者/min的剂量施用1-30分钟。更适当地，琥珀酸脱氢酶抑制剂或其前药和/或药用盐可以以1-10mg/kg受试者/min的剂量施用1-30分钟。

[0095] 发明详述

[0096] 从分析的候选代谢物，发明人排除了在不同组织中变化不同的那些。例如，在缺血病症后一些代谢物在一种组织中升高，但在另一种组织中下降。一些代谢物受影响的水平不同。其他代谢物似乎根本不受影响。另外的代谢物似乎不在所有研究的组织类型中受影响。发明人系统地研究数据并去除具有这些不同标准的每一种代谢物以便仅选择在研究的各种各样的不同组织的缺血中显示共同性质的那些代谢物。

[0097] 本发明基于的一个关键发现是在再灌注后琥珀酸快速恢复到正常水平。这例如在附图1E中阐述，其中可以看到琥珀酸水平在再灌注仅五分钟内急剧下降至正常。该反应的快速性是引人注目的。这有助于发明人积累的证据，即琥珀酸形成电子贮库，其在缺血病症期间产生。此外，时机也是特别的，因为其与再灌注施加给组织的损伤的时程精确重叠。正是在发明人观察到的该同一个五分钟窗口期间导致大多数损伤，其也完全符合在再灌注后琥珀酸代谢的时程。

[0098] 应用

[0099] 适当地，本发明涉及琥珀酸脱氢酶抑制剂或其前药和/或药用盐，其通过抑制琥珀酸的累积而用于治疗或预防再灌注损伤。

[0100] 适当地，本发明涉及琥珀酸脱氢酶抑制剂或其前药和/或药用盐，其通过抑制琥珀酸转运而用于治疗或预防再灌注损伤。

[0101] 适当地，本发明涉及琥珀酸脱氢酶抑制剂或其前药和/或药用盐，其通过抑制琥珀酸氧化而用于治疗或预防再灌注损伤。

[0102] 本发明应用于外科手术。

[0103] 本发明应用于器官保存。

[0104] 本发明应用于减少或抑制ROS产生。

[0105] 本发明应用于抑制或防止琥珀酸累积。

[0106] 本发明应用于延缓再灌注之后ROS的释放。

[0107] 本发明应用于所有形式的选择性外科手术。在本发明的这些应用中，治疗可以是预防性的，即防止在再灌注之后产生ROS。

[0108] 再灌注损伤

[0109] 适当地，所述再灌注损伤是缺血-再灌注损伤。

[0110] 适当地，所述再灌注损伤是选自以下的病症的结果：腹主动脉瘤，动脉粥样硬化，动脉疾病，烧伤，癌症，心脏停搏，脑血管疾病，卒中继发脑水肿，脑损伤，慢性阻塞性肺病，充血性心脏病，经皮腔内冠状动脉血管成形术后狭窄，冠心病，糖尿病，高血压，分娩期间/

之后的缺氧,由挤压伤或外科手术导致的机械性创伤,偏头痛,心肌梗死,(非致命)溺水,外周血管病,肺血管疾病,再生医学,心脏手术后再灌注,卒中后再灌注,视网膜血管病,卒中和外科手术组织再灌注损伤。

[0111] 适当地,所述外科手术组织再灌注损伤可以是肝脏,肾脏或肠外科手术的结果。

[0112] 外科手术组织再灌注损伤可以是选择性外科手术操作的结果,其中将器官暴露于缺血时期,包括肝外科手术(当对肝的血液供应被暂时夹紧以允许解剖/部分切除)和肾外科手术(例如,部分切除肿瘤)。

[0113] 脑损伤的一个常见原因是在外科手术期间的系统性高血压,导致脑的暂时灌注不足。

[0114] 更适当地,再灌注损伤是选自以下的病症的结果:腹主动脉瘤,动脉粥样硬化,动脉疾病,心脏停搏,脑血管疾病,卒中继发脑水肿,充血性心脏病,经皮腔内冠状动脉血管成形术后狭窄,冠心病,由挤压伤或外科手术导致的机械性创伤,心肌梗死,外周血管病,肺血管疾病,心脏手术后再灌注,卒中后再灌注,视网膜血管病,卒中和外科手术组织再灌注损伤。

[0115] 适当地,外科手术是血管外科手术,心脏搭桥手术(heart bypass surgery)或移植外科手术。

[0116] 更适当地,再灌注损伤是选自以下的病症的结果:卒中后再灌注,卒中和心肌梗死。

[0117] 适当地,所述再灌注损伤是在待保存的器官中的再灌注损伤。适当地,待保存的器官可以选自心脏,肠,肾,肝脏,肺,胰腺和皮肤。

[0118] 可以保存器官用于移植,或者作为细胞和组织来源用于再生医学(例如,分离干细胞)。

[0119] 更适当地,再灌注损伤是再生医学中的再灌注损伤。再生医学的未来是基于以下原理:在可能缺氧条件下(冷冻-)保存干细胞和干细胞来源的细胞和组织,随后过继转移和/或移植到氧合接受者。

[0120] 组合

[0121] 本发明的SDHi或其前药和/或药用盐可以与下述治疗联合施用,所述治疗用于或意欲去除血流中的阻塞。

[0122] 本发明的SDHi或其前药和/或药用盐可以与以下中的一种或多种组合施用:支架,MitoSNO,血液稀释剂,溶解剂(lysis agents),血液保存液,器官保存液或用于或意欲去除血流中的阻塞的任何其他治疗。

[0123] 适当地,血液或器官保存液可以包括结晶状的和非结晶状的溶液,包括但不限于盐水,人白蛋白溶液,Hartmann's溶液和gelfofusin。

[0124] MitoSNO可以如WO2008039085中所述制备。

[0125] 适当地,血液稀释剂可以选自CoumadinTM(华法林);PradaxaTM(达比加群);XareltoTM(利伐沙班)和EliquisTM(阿哌沙班),磺达肝癸钠(Fondaparinux),未分级肝素,低分子量肝素,包括但不限于依诺肝素(enoxaparin)和deltaparin,溶栓剂,包括但不限于链激酶(SK),尿激酶,拉诺替普酶(Lanoteplase),瑞替普酶(Reteplase),葡激酶(Staphylokinase)和替奈普酶(Tenecteplase)。

[0126] 本发明的SDHi或其前药和/或药用盐可以作为药物组合物施用,所述药物组合物包含SDHi和药用赋形剂、载体或稀释剂。

[0127] 适当的赋形剂、载体和稀释剂可以在标准药学课本中找到。参见例如,Handbook for Pharmaceutical Additives,第3版(编辑M.Ash和I.Ash),2007(Synapse Information Resources, Inc., Endicott, New York, USA) 和Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第21版(编辑D.B.Troy) 2006(Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, USA), 其通过参考结合于此。

[0128] 用于本发明的组合物中的赋形剂包括但不限于微晶纤维素, 柠檬酸钠, 碳酸钙, 磷酸氢钙和甘氨酸, 可以与各种崩解剂以及制粒粘合剂一起使用, 所述崩解剂诸如淀粉(并且优选玉米、马铃薯或木薯淀粉), 藻酸和某些复合硅酸盐, 所述制粒粘合剂如聚乙烯吡咯烷酮, 蔗糖, 明胶和阿拉伯胶。另外, 润滑剂如硬脂酸镁、十二烷基硫酸钠和滑石对于压片目的经常是非常有用的。也可以使用类似类型的固体组合物作为明胶胶囊中的填料; 这方面优选的材料还包括乳糖或奶糖以及高分子量聚乙二醇。当意欲将水性混悬液和/或酏剂用于口服给药时, 活性成分可以与各种甜味剂或调味剂、着色剂或染料和(如果需要)还有乳化剂和/或悬浮剂以及诸如水、乙醇、丙二醇、甘油的稀释剂及其各种类似组合进行组合。

[0129] 药物载体包括固体稀释剂或填料, 无菌水性介质和各种非毒性有机溶剂等。

[0130] 药用载体包括树胶, 淀粉, 糖, 纤维素材料及其混合物。通过例如皮下移植小丸, 可以将化合物施用于受试者。通过静脉内、动脉内或肌肉内注射液体制剂、口服施用液体或固体制剂或通过局部应用, 也可以施用制剂。也可以通过使用直肠栓剂或尿道栓剂完成给药。

[0131] 另外, 如本文所用的“药用载体”是本领域技术人员公知的, 并且包括但不限于0.01-0.1M和优选0.05M磷酸缓冲液或0.9%盐水。另外, 这些药用载体可以是水性或非水性溶液, 悬浮液, 和乳液。非水性溶剂的实例有丙二醇, 聚乙二醇, 植物油如橄榄油, 和可注射有机酯, 如油酸乙酯。水性载体包括水, 醇/水溶液, 乳液或悬浮液, 包括盐水和缓冲介质。

[0132] 药用肠胃外载体包括氯化钠溶液, Ringer's葡萄糖, 葡萄糖和氯化钠, 乳酸Ringer's和固定油。静脉内载体包括流体和营养补充剂, 电解质补充剂如基于Ringer's葡萄糖的那些, 等等。也可以存在防腐剂和其他添加剂, 如例如, 抗微生物剂, 抗氧化剂, 整理剂(collating agents), 惰性气体等等。

[0133] 用于根据本发明可施用的控释或缓释组合物的药用载体包括在亲脂性贮库(例如, 脂肪酸, 蜡, 油)中的制剂。本发明还包括用聚合物(例如, 泊洛沙姆或poloxamines)和与针对组织特异性受体的抗体、配体或抗原偶联或与组织特异性受体的配体偶联的化合物包被的颗粒组合物。

[0134] 药用载体包括通过共价连接以下各项而修饰的化合物: 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, 葡萄糖, 聚乙烯醇, 聚乙烯吡咯烷酮或聚脯氨酸, 其已知在静脉注射后在血液中显示与相应的未修饰化合物相比显著更长的半衰期(Abuchowski和Davis, Soluble Polymer-Enzyme Adducts, Enzymes as Drugs, Hocenberg和Roberts, 编辑, Wiley-Interscience, New York, N.Y., (1981), pp 367-383; 和[65])。这样的修饰也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, 和极大地降低化合物的免疫原性和反应性。结果, 通过与未修饰化合物相比以更低频率或更低剂量施用该聚合物-化合物加合物(abducts), 可以获得所需的体内生物学活性。

[0135] 更多具体和优选方面在后附独立和从属权利要求中阐述。从属权利要求的特征可以与独立权利要求的特征适当组合，并且该组合不同于权利要求中明确列出的那些。

[0136] 异构体,盐和溶剂化物

[0137] 某些化合物可以以一种或多种特别的几何、光学、对映体、非对映体、差向异构体、位阻异构体(atropic)、立体异构体、互变异构体、构象或异头物(anomeric)形式，包括但不限于顺式和反式；E-和Z-型；c-, t-, 和r-型；内向型(endo-)和外向(exo)-型；R-, S-, 和内消旋型；D-和L-型；d-和l-型；(+)-和(-)-型；酮式-，烯醇-，和烯醇化物(enolate)-型；顺式-和反式；向斜式(synclinal)-和背斜式(anticlinal)-； α -和 β -型；轴向(axial)和赤道(equatorial)型；船-，椅-，卷-，包封-，和半椅-型；和它们的组合存在，以下总称为“异构体”(或“异构型”)。

[0138] 应当注意，除了以下关于互变异构型讨论的，特别从本文所用的术语“异构体”中排除的有结构(或构造)异构体(即，原子之间的连接而不仅仅是原子空间位置不同的异构体)。例如，提到甲氧基， $-OCH_3$ ，不应解释为提到其结构异构体，羟甲基， $-CH_2OH$ 。

[0139] 对一类结构的提及可以完全包括落入该类别的结构异构形式(例如，C₁₋₆₇烷基包括正丙基和异丙基；丁基包括正丁基，异丁基，仲丁基，和叔丁基；甲氧基苯基包括邻-、间-和对-甲氧基苯基)。

[0140] 上述排除不适用于互变异构形式，例如，酮式，烯醇式和烯醇化物式，如例如在下列互变异构对中：酮/烯醇，亚胺/烯胺，酰胺/亚胺醇，脒/脒，亚硝基/肟，硫酮/烯硫醇(enethiol)，N-亚硝基/羟基偶氮(hydroxyazo)，和硝基/异硝基(aci-nitro)。

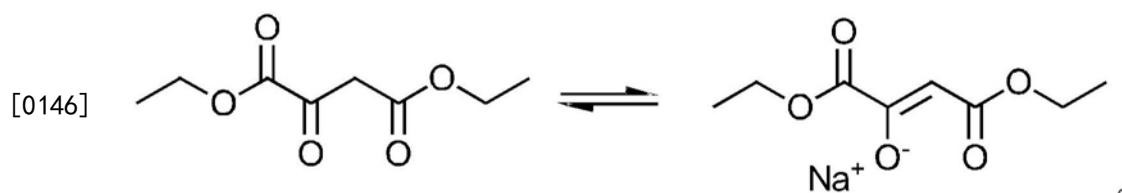
[0141] 注意，术语“异构体”中特别包括具有一个或多个同位素取代的化合物。例如，H可以是任何同位素形式，包括¹H, ²H(D)，和³H(T)；C可以是任何同位素形式，包括¹²C, ¹³C，和¹⁴C；O可以是任何同位素形式，包括¹⁶O和¹⁸O；等等。

[0142] 除非另外指出，对具体化合物的提及包括所有这些异构体形式，包括(完全或部分)外消旋物和它们的其他混合物。

[0143] 用于制备(例如，不对称合成)和分离(例如，分级结晶和色谱方法)这些异构体形式的方法或者是本领域已知的，或者是通过以已知的方式改编本文教导的方法或已知方法而容易获得。

[0144] 除非另外指出，对具体化合物的提及还包括离子的、互变异构的、盐的、溶剂化物的、被保护的形式，和它们的组合，例如，如下讨论的。

[0145] 它们的组合的一个实例是对SDHi的提及包括互变异构体的盐。例如，对化合物苹果酸二乙酯的提及包括如下所示的烯醇化物形式的钠盐：



[0147] SDHi's，其包括以上特别命名的化合物，可以形成药用复合物，盐，溶剂化物和水合物。这些盐包括非毒性酸加成盐(包括二酸类)和碱盐。

[0148] 如果化合物是阳离子型或者具有可以是阳离子型的官能团(例如-NH₂可以是-NH₃⁺)，那么可以与适当的阴离子形成酸加成盐。适当的无机阴离子的实例包括但不限于，衍生

于以下无机酸的那些:盐酸,硝酸,亚硝酸,磷酸,硫酸,亚硫酸,氢溴酸,氢碘酸,氢氟酸,磷酸和亚磷酸。适当的有机阴离子的实例包括但不限于,衍生于以下有机酸的那些:2-乙酰氧基苯甲酸,乙酸,抗坏血酸,天冬氨酸,苯甲酸,樟脑磺酸,肉桂酸,柠檬酸,乙二胺四乙酸,乙二磺酸,乙磺酸,富马酸,葡萄糖酸,葡萄糖酸,谷氨酸,乙醇酸,羟基马来酸,羟基茶羧酸,羟基乙磺酸,乳酸,乳糖酸,月桂酸,马来酸,苹果酸,甲磺酸,粘酸,油酸,草酸,棕榈酸,双羟萘酸,泛酸,苯乙酸,苯磺酸,丙酸,丙酮酸,水杨酸,硬脂酸,琥珀酸,对氨基苯磺酸,酒石酸,甲苯磺酸,和戊酸。适当的聚合物有机阴离子的实例包括但不限于,衍生于以下聚合酸的那些:鞣酸,羧甲基纤维素。这些盐包括乙酸盐,己二酸盐,天冬氨酸盐,苯甲酸盐,苯磺酸盐,碳酸氢盐,碳酸盐,硫酸氢盐,硫酸盐,硼酸盐,樟脑磺酸盐,柠檬酸盐,环己氨基磺酸盐(cyclamate),乙二磺酸盐,乙磺酸盐,甲酸盐,富马酸盐,葡萄糖酸盐,葡萄糖酸盐,葡萄糖醛酸盐,六氟磷酸盐,海苯酸盐(hibenzate),盐酸盐/氯化物,氢溴酸盐/溴化物,氢碘酸盐/碘化物,羟乙磺酸盐,乳酸盐,苹果酸盐,马来酸盐,丙二酸盐,甲磺酸盐,甲基磺酸盐,茶酸盐,2-萘磺酸盐,烟酸盐,硝酸盐,乳清酸盐,草酸盐,棕榈酸盐,双羟萘酸盐,磷酸盐,磷酸氢盐,磷酸二氢盐,焦谷氨酸盐,糖酸盐(saccharate),硬脂酸盐,琥珀酸盐,鞣酸盐,酒石酸盐,甲苯磺酸盐,三氟乙酸盐和昔萘酸盐(xinofoate)。

[0149] 例如,如果化合物是阴离子型的,或者具有可以是阴离子型的官能团(例如,-COOH可以是-COO⁻),那么可以与适当的阳离子形成碱盐。适当的无机阳离子的实例包括但不限于,金属阳离子,如碱金属或碱土金属阳离子,铵和取代的铵阳离子,以及胺。适当的金属阳离子的实例包括钠(Na⁺)钾(K⁺),镁(Mg²⁺),钙(Ca²⁺),锌(Zn²⁺),和铝(Al³⁺)。适当的有机阳离子的实例包括但不限于,铵离子(即NH₄⁺)和取代的铵离子(例如NH₃R⁺,NH₂R₂⁺,NHR₃⁺,NR₄⁺)。一些适当的取代的铵离子的实例是衍生于以下的那些:乙胺,二乙胺,二环己基胺,三乙胺,丁胺,乙二胺,乙醇胺,二乙醇胺,哌嗪,苯甲胺,苯基苯甲胺,胆碱,甲葡胺,和缓血酸胺(tromethamine),以及氨基酸,如赖氨酸和精氨酸。常见季铵离子的实例是N(CH₃)₄⁺。适当胺的实例包括精氨酸,N,N'-二苄基乙二胺,氯普鲁卡因,胆碱,二乙胺,二乙醇胺,二环己基胺,乙二胺,甘氨酸,赖氨酸,N-甲基葡萄糖胺,胆胺,2-氨基-2-羟甲基-丙-1,3-二醇,和普鲁卡因。关于有用酸加成盐和碱盐的讨论,参见S.M.Berge等.,J.Pharm.Sci.(1977)66:1-19;还参见Stahl和Wermuth,Handbook of Pharmaceutical Salts:Properties,Selection, and Use(2011)。

[0150] 可以使用各种方法制备药用盐。例如,可以将SDHi与适当的酸或碱反应以获得所需盐。还可以使SDHi化合物的前体与酸或碱反应来去除酸-或碱-不稳定的保护基或打开前体的内酯或内酰胺基团。另外,可以通过用适当的酸或碱处理或者通过与离子交换树脂接触,将SDHi化合物的盐转化为另一种盐。在反应后,然后可以通过过滤分离盐(如果其从溶液中沉淀)或者通过蒸发分离盐,以回收盐。盐的离子化程度可以从完全离子化到几乎非离子化变化。

[0151] 可能便利的或理想的是制备、纯化和/或处理活性化合物的相应的溶剂化物。术语“溶剂化物”描述了包含化合物和一个或多个药用溶剂分子(例如,EtOH)的分子复合物。术语“水合物”是其中溶剂为水的溶剂化物。药用溶剂化物包括其中溶剂可以是同位素取代的那些(例如D₂O,丙酮-d6,DMSO-d6)。

[0152] 当前接受的有机化合物的溶剂化物和水合物的分类系统是在隔离位点(isolated

site)、通道和金属-离子配位溶剂化物和水合物之间进行区分的系统。参见例如 K.R.Morris (H.G.Brittain ed.) *Polymorphism in Pharmaceutical Solids* (1995)。隔离位点溶剂化物和水合物是其中通过插入有机化合物分子而将溶剂(例如,水)分子隔离而不彼此直接接触。在通道溶剂化物中,溶剂分子位于格子通道中,其中它们紧接其他溶剂分子。在金属-离子配位溶剂化物中,溶剂分子与金属离子键合。

[0153] 当溶剂或水被紧密结合时,复合物将具有独立于湿度的定义明确的化学计量。然而,当溶剂或水被弱结合时,如在通道溶剂化物和在吸湿性化合物中,水或溶剂含量将依赖于湿度和干燥条件。在这些情形中,将典型地观察到非化学计量。

[0154] 更多具体和优选方面在后附独立和从属权利要求中阐述。从属权利要求的特征可以与独立权利要求的特征适当组合,并且该组合不同于权利要求中明确列出的那些。

[0155] 各种各样的SDHi's化合物是可商购的。这些可商购化合物的衍生物可以通过进行官能团相互转化或进行取代和进行常规反应来制备,如本领域已知的。常见的技术和反应,包括氧化,还原等等,分离技术(萃取,蒸发,沉淀,色谱,过滤,研磨,结晶等)和分析方法是有机化学领域的普通技术人员已知的。这些反应和技术的细节可以在许多专著中找到,包括Richard Larock, *Comprehensive Organic Transformations, A Guide to Functional Group Preparations*, 第2版 (2010), 和Michael B.Smith和他人, *Compendium of Organic Synthetic Methods* (1974参照以下) 编辑的多卷系列。原材料和试剂可以获自商购来源或者可以使用文献方法制备。另外,在一些情形中,在不分离或纯化情况下(即,原位)可以在随后步骤中使用反应中间体。

[0156] 使用保护基可以制备某些化合物,保护基防止在其他反应性位点的不需要的化学反应。保护基也可以用于增强化合物的溶解性或另外改变物理性质。关于保护基策略的讨论,用于安装和去除保护基的材料和方法的描述,和用于常见官能团(包括胺,羧酸,醇,酮,醛等)的有用保护基的汇编,参见T.W.Greene和P.G.Wuts, *Protecting Groups in Organic Chemistry*, 第4版, (2006) 和P.Kocienski, *Protective Groups*, 第3版 (2005)。

[0157] 通常,可以使用基本上化学计量的量的反应试剂进行化学转化,但是某些反应可以受益于使用过量的一种或多种反应试剂。此外,可以在大约室温(RT)和环境压力下进行许多适当反应,但是取决于反应动力学,产率等,一些反应可以在升高的压力下进行或者采用较高温度(例如,回流条件)或较低温度(例如,-78°C.至0°C.)。在本公开中对于化学计量范围、温度范围、pH范围等的任何提及,无论是否明确使用措词“范围”,也包括所示端点。

[0158] 附图简述

[0159] 参考附图,现在将进一步描述本发明的实施方案,其中:

[0160] 图1:比较代谢组学鉴定琥珀酸为潜在的驱动再灌注ROS产生的线粒体代谢物。(a)用于鉴定在缺血条件下在体内累积的代谢物的比较代谢组学策略的概述。

[0161] 图1: (b) 在所有缺血组织中在体内显著累积的代谢物的HIVE图表比较分析。突出在所有组织中普遍累积的代谢物。

[0162] 图1: (c) 在缺血期间在鼠组织中代谢物累积的普遍性。

[0163] 图1: (d) 在五种缺血组织情况下在缺血后线粒体柠檬酸循环(CAC)代谢物水平的曲线。每种组织,每组n=3-4只小鼠。

[0164] 图1: (e) 在心肌缺血和再灌注5分钟期间在离体心脏中CAC代谢物水平的时程。每

组n=4个小鼠心脏。

[0165] 图1: (f) 在缺血后和在5分钟再灌注后,在处于风险中的和外周心脏组织中体内心肌IR期间的CAC代谢物水平。每组n=3-5只小鼠。

[0166] 图1: (g) 紧接着在缺血后和在5min再灌注后,在体内脑IR期间的CAC代谢物水平。每组n=3只大鼠。

[0167] 图1: (h) 紧接着在缺血后和在5min再灌注后,在体内肾IR期间的CAC代谢物水平。每组n=3只小鼠。

[0168] 图1: (i) 在成年原代心肌细胞中通过二氢乙锭(DHE) 氧化评估在IR期间琥珀酸对于ROS生产的影响。每组n=3种独立的心肌细胞制备物。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ 。数据显示为至少三个重复的平均值 \pm s.e.m。

[0169] 图2: 通过还原富马酸,反向SDH活性驱动缺血性琥珀酸累积,所述富马酸是通过苹果酸-天冬氨酸穿梭作用和嘌呤核苷酸循环产生的。(a) 对于琥珀酸-定向的缺血通量的潜在输入。

[0170] 图2: (b) ^{13}C -葡萄糖代谢标记策略。

[0171] 图2: (c) 在常氧和缺血心肌中琥珀酸的 ^{13}C 同位素标记曲线。每组n=4个心脏。

[0172] 图2: (d) 在缺血心肌中氨己烯酸分流的 γ -氨基丁酸(GABA)的抑制对于GABA和琥珀酸水平的影响。每组n=3个心脏。

[0173] 图2: (e) 通过反向SDH操作驱动的缺血性琥珀酸累积的潜在驱动者的计算机(*in silico*)代谢建模总结; 和 ^{13}C -天冬氨酸代谢物标记策略,以确定苹果酸-和腺苷酰(adenylo)-琥珀酸关联途径对于缺血性琥珀酸累积的贡献。

[0174] 图2: (f) 在体内缺血心肌中通过丙二酸二甲酯抑制SDH对于琥珀酸累积和CAC代谢物丰度的影响。每组n=3只小鼠。

[0175] 图2: (g) 在常氧和缺血心肌中 ^{13}C -天冬氨酸与所示CAC代谢物的相对缺血通量。每组n=4个心脏。

[0176] 图2: (h) 通过氨基氧乙酸(AOA)-介导的天冬氨酸氨基转移酶的抑制,阻断NADH-依赖性的天冬氨酸进入CAC,或通过用AICAR抑制腺苷酰琥珀酸裂解酶来阻断PNC,对于体内缺血心肌中CAC代谢物丰度的影响。每组n=3只小鼠。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ 。数据显示为至少三个重复的平均值 \pm s.e.m。

[0177] 图3: 在成年原代心肌细胞中,在再灌注时缺血性琥珀酸水平控制ROS生产,线粒体膜极化,和NAD(P)H还原态。(a) 缺血性琥珀酸水平的操控对于ROS生产的影响,其作为晚期缺血和早期再灌注期间的DHE氧化来测量。每组n=3个独立的心肌细胞制备物。

[0178] 图3: (b) 通过用MitoSNO选择性抑制,确定在再灌注时线粒体复合体I RET对琥珀酸-驱动的ROS生产的贡献。每组n=3个独立的心肌细胞制备物。

[0179] 图3: (c) 晚期缺血和早期再灌注期间,缺血性琥珀酸水平的操控对于NAD(P)H氧化的影响。每组n=3个独立的心肌细胞制备物。

[0180] 图3: (d) 使用TMRM荧光,以去猝灭模式(高荧光=低膜电位),在晚期缺血(左图)和早期再灌注(右图)后,缺血性琥珀酸水平的操控对于线粒体膜电位的影响。

[0181] 图3: (e) 如通过在再灌注时TMRM猝灭的速率测定,缺血性琥珀酸水平的操控对于在40min缺血后内膜再极化的初始速率的影响。每组n=3个独立的心肌细胞制备物。

[0182] 图3: (f) 在有氧C2C12成肌细胞中,琥珀酸二甲酯和寡霉素(oligomycin)对于线粒体ROS的影响。用寡霉素和琥珀酸二甲酯将在常氧温育下的成肌细胞内的线粒体超极化,并评估MitoSOX氧化的速率以测量线粒体ROS生产。每次试验10-12个成肌细胞的n=4次独立实验。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ 。数据显示为至少三个重复的平均值 \pm s.e.m。

[0183] 图4:NADH和AMP传感途径驱动缺血性琥珀酸累积,以通过线粒体ROS生产控制体内再灌注病理。(a) 在缺血期间琥珀酸累积和在再灌注期间通过反向电子传递(RET)形成超氧化物的模型。

[0184] 图4: (b) 在心肌梗死通过i.v.注射丙二酸二甲酯抑制缺血性琥珀酸累积,或通过i.v.注射丙二酸二甲酯和琥珀酸二甲酯再引入缺血性琥珀酸后,来自小鼠心脏的横截面的代表性图像。梗死组织是白色的,有风险的其余面积是红色的,并且无风险组织是深蓝色的。

[0185] 图4: (c) 如b所述进行心肌梗死大小的定量。每个空心圆表示来自单只小鼠的数据,并且填充圆表示对于特定情形的所有小鼠的平均值。每组n=6只小鼠。

[0186] 图4: (d) 丙二酸二甲酯针对体内脑IR损伤的保护。在使用或未使用丙二酸二甲酯处理的情况下在进行体内tMCAO后,来自大鼠脑的横截面的代表性图像。用苏木精和曙红处理脑,以勾画出梗死组织。定量脑梗死体积。

[0187] 图4: (e) 和喙尾(rostral-caudal)梗死分布。

[0188] 图4: (f) 在通过tMCAO体内脑IR损伤后 \pm 丙二酸二甲酯。每组n=3-6只大鼠。

[0189] 图4: (g) 在tMCAO \pm 丙二酸二甲酯后大鼠的神经学评分。每组n=3-6只小鼠。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ 。数据显示为平均值 \pm s.e.m,除了数据是中值 \pm C.I的(g)以外。

[0190] 图5:丙二酸二甲酯和琥珀酸二甲酯处理体内细胞,导致丙二酸和琥珀酸的胞内累积。a,体内静脉内输注丙二酸二甲酯导致丙二酸在缺血性心肌内的累积。b,C2C12细胞与以下各项温育:无添加,葡萄糖,5mM琥珀酸二甲酯,5mM丙二酸二甲酯,或5mM丙二酸二甲酯和5mM琥珀酸二甲酯。由于ATP合成导致的细胞氧消耗率和c,最大速率,使用Seahorse XF96分析仪测定。n=3-4,* $p < 0.05$;*** $p < 0.001$ 。

[0191] 图6:对于琥珀酸-定向缺血性通量的三种潜在代谢输入的总结。为了理解可以有助于在缺血下琥珀酸生产的代谢途径,使用通量平衡分析,采用更新版本的心脏代谢iAS253模型来模拟缺血。该模型显示了生产琥珀酸的三种可能机理:来自CAC生产的 α -酮戊二酸,来源于糖酵解和谷氨酰胺裂解(灰色框),来自GABA支路(蓝色框)生产的琥珀酸半醛,和来自富马酸,所述富马酸是通过逆转SDH从苹果酸-天冬氨酸穿梭作用和嘌呤核苷酸循环(红色框)生产的。

[0192] 图7:在缺血和常氧心肌中通过¹³C葡萄糖的CAC和邻近(proximal)代谢物的代谢标记。在常氧和缺血性心肌呼吸期间,CAC和邻近代谢物的比例同位素标记曲线。将小鼠心脏用11mM ¹³C葡萄糖灌注10min,接着30min无流动缺血或30min常氧呼吸,接着快速冷冻和LC-MS代谢分析。n=4,* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。

[0193] 图8:在缺血和常氧心肌中,通过¹³C谷氨酰胺对CAC和邻近代谢物的代谢标记。在常氧和缺血性心肌呼吸期间,从谷氨酰胺至CAC和邻近代谢物的同位素通量。将小鼠用4mM ¹³C谷氨酰胺(+5标记的)灌注达10min,接着30min无流动缺血或30min常氧呼吸,接着快速

冷冻和代谢组学分析。(a) 每种代谢物的同位素曲线表示为总池(pool)的比例。

[0194] 图8: (b,) 另外,相对于心脏中+5谷氨酰胺池的比例,确定至αKG的通量。n=4,*p<0.05。

[0195] 图9:在缺血性心肌中,氨己烯酸抑制GABA转氨酶对于GABA支路和CAC代谢物的影响。将灌注的小鼠心脏进行30min无流动缺血土在缺血之前连续输注氨己烯酸(Vig; 100, 300, 和700μM) 10min。将心脏组织快速冷冻,和通过LC-MS,相对于常氧水平定量a,GABA和b,琥珀酸丰度。n=3,*p<0.05。

[0196] 图10:完整的代谢模型,鉴定通过组织缺血可以激活的途径以驱动琥珀酸累积。为了鉴定在缺血下可以促进琥珀酸生产的代谢途径,我们使用通量平衡分析,结合扩展版本的中央心脏代谢的iAS253线粒体模型,模拟这些情况。促进琥珀酸累积的主要途径(粗红线)是通过富马酸进料到SDH反向活性。这是通过嘌呤核苷酸循环(PNC)和苹果酸-天冬氨酸穿梭作用(MAS)(其消耗葡萄糖和天冬氨酸)产生的,并且还导致乳酸和丙氨酸的显著生产。较少来源的琥珀酸(细红线)包括糖酵解和谷氨酰胺裂解,但是这是相对较少的,因为该途径被NADH的过量生成所约束。另外,丙酮酸羧化酶活性产生少量富马酸。GABA支路并没有贡献(黑色虚线)。

[0197] 图11:相对于同位素池,比较朝向琥珀酸的¹³C缺血性代谢物通量。将小鼠心脏用¹³C-葡萄糖(+6标记的),¹³C-谷氨酰胺(+5标记的),或¹³C-天冬氨酸(+1标记的)灌注10min,接着30min无流动缺血或30min常氧呼吸,和快速冷冻和代谢组学分析。为了比较来自每个碳源的代谢物通量的相对规模,相对于常氧确定与未标记的琥珀酸池相比掺入琥珀酸的缺血性¹³C,并且相对于¹³C-输注前体的全部标记池表示。数据以线性(左)和对数(右)刻度作图。

[0198] 图12:在缺血期间和在再灌注后,在琥珀酸和OXPHOS代谢途径中的预测变化。为了确定缺血、再灌注和常氧期间琥珀酸代谢的可能变化,使用通量平衡分析,使用扩展版的iAS253模型,模拟在这些情况中的心脏代谢。模拟预测:(a) 在缺血下,复合物II相反运行,通过使用复合物I生产的泛醇将富马酸还原为琥珀酸,由此用作末端电子受体而不是氧。从嘌呤核苷酸循环(PNC)和反向柠檬酸循环(CAC)生成富马酸。通过呼吸链的其余部分的通量减少并且由于不充分的ATP生产,从ADP生成AMP。

[0199] 图12: (b) 随着氧恢复,复合物II代谢过多的琥珀酸。AMP至ADP再生的延迟,如在再灌注第一分钟内典型的,限制了通过ATP-合酶的通量。这又防止了复合物III消耗所有由复合物II产生的泛醇,因为膜变得超极化。过量的泛醇和质子通量迫使复合物I反向运行,其将产生ROS。

[0200] 图12: (c) 一旦琥珀酸通量降低至正常水平,如在从后期再灌注至常氧的过渡中,通过呼吸链和柠檬酸循环的通量恢复正常。

[0201] 图13:追踪在原位IR期间在原代心肌细胞中的心肌细胞ROS水平。将原代大鼠心肌细胞进行40min缺血和再氧合,并且通过比例测量二氢乙锭(DHE)氧化,在整个实验中追踪ROS水平。缺血缓冲液含有:无添加,4mM丙二酸二甲酯,或4mM琥珀酸二甲酯。显示每种情形的代表性踪迹。加亮窗显示了在图3.a中详细放大的实验期。

[0202] 图14:追踪在原位IR期间原代心肌细胞中NADH还原状态。将原代大鼠心肌细胞进行40min缺血和再氧合,并且通过测量NAD(P)H自发荧光,在整个实验中跟踪NADH还原状态。

缺血缓冲液含有:无添加,4mM丙二酸二甲酯,或4mM琥珀酸二甲酯。显示每种情形的代表性踪迹。加亮窗显示了在图3c中详细放大的实验期。

[0203] 图15:追踪在原位IR期间原代心肌细胞中线粒体膜电位。将原代大鼠心肌细胞进行40min缺血和再氧合,并且通过测量四甲基罗丹明(TMRM)荧光,在整个实验中跟踪线粒体膜电位。缺血缓冲液含有:无添加或4mM丙二酸二甲酯。显示来自至少三个重复实验的平均踪迹。(a)在整个实验中的TMRM信号。

[0204] 图15:(b)在从缺血至再氧合的过渡期间的TMRM信号。每组来自独立地分离的原代大鼠心肌细胞n=3-4个实验。

具体实施方式

[0205] 线粒体ROS生产是缺血-再灌注(IR)损伤的关键早期驱动物,并且已经被认为是在再灌注期间功能失调的呼吸链与氧相互作用的非特异性后果¹⁻⁴。发明人研究了替代性的假说:在IR期间的线粒体ROS是通过一种特异代谢过程产生的。为此发明人开发了一种比较代谢组学方法来鉴定在IR期间保守的代谢特征,其可能指示线粒体ROS的来源(图1a)。对于进行体内缺血的鼠脑、肾、肝和心脏的基于液相色谱-质谱(LC-MS)的代谢组学分析揭示几种代谢物的变化。然而,仅三种在所有组织中升高(图1b,c和表1)。

[0206] 将暴露于足够缺血时期以引发再灌注ROS生产的各种鼠组织进行代谢组分析和比较

累积普遍性 (组织数量)	在缺血性促 ROS 情况中显著累积的代谢物 (>2 倍, p<0.05)	组织
5	琥珀酸	所有
5	黄嘌呤	所有
5	次黄嘌呤	所有
4	腺嘌呤	B,L,K,H
4	丙酰肉碱	B,L,H,HL
4	鸟嘌呤	L,K,H,HL
3	乳酸	L,K,H
3	胆碱	L,K,HL
3	脯氨酸	L,K,H
[0207]	别嘌呤醇	B,H
	尿嘧啶	B,H
	腺苷琥珀酸	B,H
	半胱氨酸	B,L
	胞嘧啶	B,H
	肌酐	B,L
	硬脂酰肉碱	L,K
	苯丙氨酸	L,K
	赖氨酸	L,K
	鸟氨酸	L,K
	色氨酸	L,K
	亮氨酸	L,K

	2	AMP	L,K
	2	天冬酰胺	L,K
	2	精氨酸	L,K
	2	棕榈酰肉碱	L,HL
	2	腺嘌呤	L,HL
[0208]	1	尿嘧啶	L
	1	N-乙酰基天冬氨酸	L
	1	酪氨酸	L
	1	磷酰基胆碱	L
	1	乙酸	L
	1	蛋氨酸	L
	1	油酰肉碱	L
	1	苏氨酸	L
	1	2-羟基谷氨酸	L
	1	缬氨酸	L
	1	葡萄糖	L
	1	丙氨酸	L
	1	甘油磷酸	L
	1	甘油磷酸胆碱	L
	1	肉碱	L

[0209] 表1在缺血性促-ROS情况中显著累积的代谢物的完全比较分析。B=脑,H=离体全心脏缺血,HL=体内LAD缺血,K=肾,L=肝

[0210] 两种代谢物是缺血性嘌呤核苷酸降解的良好表征的副产物,黄嘌呤和次黄嘌呤⁶,支持了我们的方法的有效性。黄嘌呤和次黄嘌呤是通过胞质黄嘌呤氧化还原酶代谢并且不促进线粒体代谢⁷。第三种代谢物,线粒体柠檬酸循环(CAC)中间体琥珀酸,在测试的组织中(图1d)增加3-至19倍,并且是在各种各样的代谢各异的组织中普遍出现的缺血的唯一线粒体代谢特征。因此,本发明聚焦于琥珀酸在IR期间在线粒体ROS生产中的潜在作用。

[0211] 由于在再灌注早期发生线粒体ROS生成^{1-4,8,9},所以给ROS提供燃料的代谢物应当被快速氧化。引人注目的,在心脏中通过离体5分钟再灌注,在缺血期间累计的琥珀酸恢复至常氧水平(图1e),并且这也在内心脏、脑和肾中观察到(图1f-h)。此外,这些琥珀酸变化局限于体内发生IR损伤的组织区域,并且在缺乏其他CAC代谢物累积的情况下发生(图1d,f)。为了进一步评估琥珀酸在驱动ROS生产中的作用,发明人将琥珀酸的一种可透过细胞的衍生物,琥珀酸二甲酯(图5),施用于缺血性原代心肌细胞⁸并且发现在再灌注期间这显著增加线粒体ROS生产(图1i)。这些数据提示,在缺血期间的琥珀酸累积于是为再灌注后的ROS生产提供燃料。

[0212] 为了确定负责在缺血期间琥珀酸累积的机制和研究其在IR损伤中的作用,发明人聚焦于心脏,因为可以获得许多实验和理论资源。在哺乳动物组织中,琥珀酸可以通过 α -酮戊二酸-依赖性CAC通量从丙酮酸或谷氨酸或 γ -氨基丁酸(GABA)支路产生,(图2a和6)^{10,11}。通过测量在用¹³C-标记的葡萄糖或谷氨酰胺输注后其同位素体(isotopologue)分布,研究经由 α -酮戊二酸的至琥珀酸的缺血性CAC通量,所述¹³C-标记的葡萄糖或谷氨酰胺分别从丙酮酸和谷氨酸进入CAC。用U-¹³C-葡萄糖灌注后琥珀酸的¹³C-同位素体分布在缺血性心脏中显著降低,指示丙酮酸和 α -酮戊二酸-连接的CAC向琥珀酸的通量在缺血期间降低(图2b,c,和7)。谷氨酰胺并非常氧或缺血中CAC代谢物的主要碳源(图8a)。此外,在缺血中,观察到的最少的¹³C-谷氨酰胺掺入 α -酮戊二酸下降,并且用氨己烯酸¹⁰抑制GABA支路并不减少缺血性琥珀酸累积(图2d和9)。因此,在缺血期间琥珀酸的累积并非通过心脏代谢的常规操作导致。

[0213] 为了研究可以导致缺血期间琥珀酸累积的其他机制,发明人考虑在无氧代谢期间SDH是否可能反向作用来将富马酸还原为琥珀酸¹²⁻¹⁴。尽管没有在缺血性组织中显示SDH逆转,但是计算机通量分析确定在缺血期间通过SDH逆转生产琥珀酸是一个最优方案(图2e和10)。该方法还提示对SDH的富马酸供应可以来自两个收敛途径:苹果酸/天冬氨酸穿梭(MAS),其中高NADH/NAD比率驱动苹果酸形成,其转化为富马酸¹⁴⁻¹⁶;和AMP-依赖性的嘌呤核苷酸循环(PNC)的激活,其驱动富马酸生产^{17,18}(图2e和10)。为了实验检验该预测,发明人用丙二酸二甲酯(SDH竞争抑制剂丙二酸的一种可透过膜的前体)输注小鼠(图5)^{19,20}。出人意料的,丙二酸二甲酯输注显著地降低缺血性心肌中的琥珀酸累积(图2f)。该结果表明,SDH在缺血性心脏中反向运转,因为以其常规方向运转的SDH的抑制将具有进一步增加的琥珀酸(图2a和10)。因此,缺血期间的琥珀酸累积通过逆转SDH而来自富马酸还原。

[0214] 由于天冬氨酸是PNC和MAS途径两者的富马酸的共同来源(图2e),所以发明人使用¹³C-标记的天冬氨酸来评估这些途径对缺血期间琥珀酸生产的贡献(图6和10)。¹³C-天冬氨酸输注显著增加与常氧相比缺血性心肌的¹³C-琥珀酸含量(图2g)。事实上,¹³C-天冬氨酸是在缺血期间显著掺入琥珀酸中的唯一的¹³C-供体(图11)。为了表征MAS和PNC对缺血性琥珀酸累积的相对贡献,发明人使用氨基氧乙酸(AOA)(其抑制MAS中的天冬氨酸氨基转移酶²¹)(图2e)和5-氨基-1- β -D-呋喃核糖基-咪唑-4-甲酰胺(AICAR)(其抑制PNC中的腺苷酰琥珀酸裂解酶^{18,22})(图2e)。两种抑制剂都降低缺血性琥珀酸水平(图2h)。因此,这些结果表明,在缺血期间,MAS和PNC途径两者都增加富马酸生产,其然后通过SDH逆转转化为琥珀酸。

[0215] 为了研究构成琥珀酸-驱动线粒体ROS生产的基础的潜在机理,发明人对于在再灌注后缺血性心脏代谢如何改变进行建模(图12)。该分析提示,SDH将氧化累积的琥珀酸并且由此通过线粒体复合物I驱动反向电子传递(RET)²³⁻²⁶。有趣的是,琥珀酸驱动通过体外RET从复合物I形成广泛的超氧化物,使得其成为IR期间线粒体ROS的引人注目的潜在来源²⁶。然而,复合物I RET在IR损伤中的作用还未研究过。为了检验缺血期间累积的琥珀酸在再灌注后是否可以驱动复合物I RET,发明人在IR损伤的心肌细胞模型中²⁷,用荧光探针二氢乙啶(DHE)追踪线粒体ROS和从四甲基罗丹明(TMRM)的电位-敏感的荧光追踪线粒体膜电位。DHE的氧化速率在缺血期间保持稳定,但是在再灌注后快速增加,与增加的超氧化物生产一致(图3a和13)²⁷。用丙二酸二甲酯抑制SDH-介导的缺血性琥珀酸累积将再灌注后的DHE氧化减少(图3a),而在缺血期间用琥珀酸二甲酯进一步增加琥珀酸放大了再灌注DHE氧化,表明琥

珀酸水平控制再灌注ROS的程度(图3b)。重要的是,用MitoSNO选择性阻断复合物I RET⁸消除了在再灌注后琥珀酸二甲酯-驱动的DHE氧化(图3b),指示缺血性琥珀酸水平通过复合物I RET驱动过氧化物生产。以下观察进一步支持琥珀酸-依赖性RET:通过用琥珀酸二甲酯增加琥珀酸水平抑制了在再灌注时的NAD(P)H氧化(图3c和14)。追踪线粒体膜电位揭示:抑制缺血性琥珀酸累积减小了再灌注后线粒体极化的速率(图3d,e和15),与琥珀酸-依赖性增强的复合物I RET一致。最后,在C2C12小鼠成肌细胞中用琥珀酸二甲酯升高琥珀酸,同时用寡霉素将线粒体超极化,增加了MitoSOX氧化,其与IR无关(图3f),提示将高琥珀酸水平与大的质子驱动力组合足以驱动通过RET的复合物I ROS生产。

[0216] 发明人的发现可以通过以下模型来解释(图4a):在缺血期间,通过活化MAS和PNC,富马酸生产增加,然后通过SDH逆转还原为琥珀酸。在再灌注后,累积的琥珀酸被快速氧化,由此维持大的质子驱动力和驱动复合物I处的RET,以产生线粒体ROS,其引发IR损伤²⁶。该模型为IR损伤的迄今许多未联系的方面提供了统一的框架,如在缺血期间需要引发以在再灌注后诱导ROS,通过抑制复合物I⁸和II²⁸和通过轻度解偶联²⁹保护免受IR损伤。

[0217] 有趣的,发明人的模型还产生了出人意料的但是可测试的预测。操控缺血期间增加琥珀酸的途径和在再灌注后将其氧化应当确定IR损伤的程度。由于SDH的可逆抑制阻断缺血期间的琥珀酸累积(图2b)及其在再灌注后的氧化两者,所以它应当保护免受体内IR损伤。在心脏IR损伤的体内模型中,静脉内(i.v.)输注丙二酸二甲酯-SDH抑制剂丙二酸的前体-是保护性的(图4b,c)。重要的是,通过加回琥珀酸二甲酯抑制了该心脏保护(图4b,c),指示保护仅仅是通过钝化琥珀酸累积产生的。最后,在大鼠脑的大脑中动脉短暂性闭塞(tMCAO)-卒中期间脑IR损伤的体内模型-过程中,静脉内输注丙二酸二甲酯是保护性的,减少了固缩核的形态和神经毡的空泡化(图4d),降低了由IR损伤导致的梗死脑组织的体积(图4e,f)和防止与卒中相关的神经功能的下降(图4g和表2)。

[0218]	MCAO 对照	基线	第 1 天	第 2 天	第 3 天
--------	---------	----	-------	-------	-------

[0219]	中值神经学评分	31	16	19	20
	平均神经学评分	30.67	16.33	19.00	20.33
	α	0.05	0.05	0.05	0.05
	n	6.00	6.00	6.00	6.00
	标准偏差	0.82	2.25	2.37	2.34
	置信区间	0.29	1.10	1.06	1.02
	标准误差	0.33	0.92	0.97	0.95

[0220]	MCAO+丙二酸二甲酯	基线	第1天	第2天	第3天
	中值神经学评分	32.00	22.00	24.00	25.00
	平均神经学评分	31.67	22.67	24.00	24.33
	α	0.05	0.05	0.05	0.05

n	3.00	3.00	3.00	3.00
标准偏差	0.58	2.08	2.00	1.15
置信区间	0.20	0.87	0.80	0.45
标准误差	0.33	1.20	1.15	0.67

[0221] 表2:进行体内tMCAO IR±丙二酸二甲酯输注的大鼠的神经学评分的扩展总结。在图4g中描述的tMCAO IR±丙二酸二甲酯之后三天,中值神经学得分的扩展数据总结。

[0222] 这些发现证实了发明人的琥珀酸-驱动的IR损伤模型,证明了琥珀酸累积构成了心脏和脑中IR损伤的基础,并且证实了降低琥珀酸累积和氧化以治疗IR损伤的治疗方法。

[0223] 发明人已经证明了经由富马酸生产和逆转SDH的琥珀酸的累积是体内缺血的普遍代谢特征。相应地,琥珀酸是再灌注后线粒体ROS生产的主要驱动物,线粒体ROS生产是各种组织中IR损伤的基础。琥珀酸的缺血性累积通过其在炎症和缺氧信号转导¹⁰中的作用可能进一步相关。因此,琥珀酸可以通过线粒体ROS促进IR损伤的急性发病和然后在分泌后还引发炎症和新血管生成³⁰。除了阐明了构成IR损伤基础的代谢反应以外,发明人已经证明了防止缺血期间的琥珀酸累积对于体内IR损伤具有保护作用,因此,提供了病理学(如心脏病发作和卒中)中IR损伤的新的治疗靶标。

[0224] 方法总结

[0225] 使用热缺血和/或IR损伤的以下鼠模型:活体外(ex vivo)灌注小鼠心脏的整体(global)缺血;体内小鼠左降冠状动脉(LAD)结扎术;体内大鼠脑的大脑中动脉短暂性闭塞(tMCAO);通过单侧闭塞肾门的体内小鼠肾缺血;在颈脱位后肝脏的体内整体缺血。如之前所述¹¹,进行缺血性心肌中的代谢途径的建模。使用的IR损伤的细胞模型是成年分离的原代大鼠心肌细胞和小鼠C2C12成肌细胞细胞系。通过激光扫描共聚焦显微镜评估心肌细胞内的荧光。将DHE荧光用于测量ROS生产,将去猝灭模式的TMRM荧光用于线粒体膜电位,和将NAD(P)H自发荧光用于评估NAD(P)H池的还原电位⁸。为了评估活体外灌注小鼠心脏中的代谢途径,将¹³C-标记的葡萄糖,谷氨酰胺或天冬氨酸输注到分离的心脏中,然后通过LC-MS定量CAC代谢物的¹³C同位素。通过静脉内输注代谢抑制剂,接着LC-MS分析组织代谢物,评估代谢抑制剂对于缺血性代谢物累积和¹³C-标记物的分布的影响。通过LC评估心脏CoQ池的氧化还原态。通过静脉内施用抑制剂、接着通过氯化三苯基四唑染色测量心脏中的梗死大小和通过测定神经学功能和通过组织学测定梗死大小,评估代谢抑制剂对体内IR损伤的缓解。

[0226] 实施例

[0227] 方法

[0228] 体内小鼠心肌实验。使用的小鼠是C57BL/6J。

[0229] 体内小鼠心肌实验。对于内心脏IR模型,使用开胸的原位心脏模型^{31,32}。将雄性小鼠(8-10周龄;Charles River Laboratories,UK)用戊巴比妥钠(70mg/kg,腹膜内(i.p.))麻醉,气管内插管并以3em H₂O呼气末正压通气。使用角膜和屈肌反射来监视麻醉的充分性。将通气频率保持在每分钟110次呼吸,潮汐量为125-150μL。进行胸廓切开术并且通过剥去心包膜而暴露心脏。将左前降支冠状动脉(LAD)的突出分支用7-0Prolene缝合线围绕,所述缝合线然后通过小的塑料管。通过将管对着心脏表面收紧,诱导缺血。为了评估体内IR期间的代谢物,将小鼠分成三组:30min缺血,30min缺血+5min再灌注和30min假手

术,其中放置缝合线但是没有封闭LAD。在每个方案结束时,通过比较白色和红色组织从心脏有风险的和外周区域中摘除组织,并且速冻在液氮中。从假定风险区摘除假手术组织。

[0230] 在30min的缺血接着120min再灌注后,使用2%氯化三苯基四唑鎓染色评估梗死大小,并表示为风险区域的百分比³³。以下列剂量,在缺血之前10min和贯穿缺血过程将无菌盐水中的代谢抑制剂(全部来自Sigma)通过尾静脉静脉内输注:丙二酸二甲酯(4mg/kg/min),AOA(50μg/kg/min;Fluorochem)和AICAR 10mg/kg/min)。将琥珀酸二甲酯(8mg/kg/min)与丙二酸二甲酯联合输注。用无菌盐水输注对照小鼠。总施用体积不超过200μL/小鼠。

[0231] 用于代谢组分析的活体外Langendorff心脏实验。将小鼠用肝素处理(200U i.p.)和用戊巴比妥钠(100mg/kg i.p.)麻醉。然后将胸腔打开并快速摘除心脏和放入pH 7.4的冷Krebs-Henseleit (KH) 缓冲液(0.5mM EDTA, 118mM NaCl, 4.7mM KC1, 25mM NaHCO₃, 11mM 葡萄糖, 1.2mM MgSO₄, 1.2mM KH₂PO₄和2mM CaCl₂)。然后用22G钝针将主动脉插套管,并转到灌注装置中。将心脏用37°C KH缓冲液(95% O₂/5% CO₂)以80mm Hg的恒压灌注。在20min平衡后,将心脏分成四组:60min常氧灌注;30min整体缺血;30min整体缺血+5min再灌注;和30min整体缺血+30mins再灌注。在缺血之前通过主动脉插管之上的侧面端口以1%的冠脉血流量输注代谢抑制剂。在实验结束时,将心脏速冻在液氮中并贮存在-80°C。

[0232] 在活体外Langendorff心脏实验中¹³C代谢物标记。将小鼠用戊巴比妥钠(~140mg/kg)麻醉。将心脏快速摘除,插套管和在80mm Hg灌注压力下在37°C用KH缓冲液以等体积Langendorff模式灌注,所述缓冲液连续用95% O₂/5% CO₂供气(pH 7.4)³⁴。使用填充流体的球囊评估心脏功能,所述球囊插入左心室(LV)并且连接到压力传感器和PowerLab™系统(ADI Instruments, UK)。将球囊体积调整为4-9mm Hg的初始LV舒张压³⁴并且所有心脏步调为550bpm。从收缩压(SP)和舒张压(DP)之间的差异计算左心室形成压(Left ventricular developed pressure, LVDP)。使用LabChart™软件v. 7 (ADI Instruments, UK)连续记录功能参数(SP,舒张期末压,心率,LVDP,冠脉血流量,灌注压)。

[0233] 在用标准KH缓冲液平衡20min后,将心脏分成以下各组:用含有11mM U-¹³C葡萄糖的KH缓冲液灌注,接着30min常氧呼吸(n=4/组);用含有11mM U-¹³C葡萄糖的KH缓冲液灌注10min,然后进行30min整体温度正常的缺血(n=4/组);用含有1mM 5-¹³CL-谷氨酰胺的KH缓冲液灌注10min,接着使用未标记的KH缓冲液进行标准常氧灌注30min(n=4);用1mM ¹³C₅L-谷氨酰胺灌注10min,接着30min整体缺血(n=4);灌注1mM 1-¹³C L-天冬氨酸10min,接着用未标记KH缓冲液常氧灌注30min;用1mM 1-¹³C L-天冬氨酸灌注10min,接着30min整体缺血。在结束时,将心脏快速冷冻在液氮中并保存在-80°C。

[0234] 体内大鼠脑缺血和再灌注。将来自供养在格拉斯哥大学的群落的雄性有自发性高血压性卒中倾向的(SHRSP)大鼠(270-310g)用氧中的5%异氟烷麻醉,并通过外科手术插气管并在整个手术中通气(~2.5%异氟烷/氧)。将体温保持在37±0.5°C。将动物进行卒中前钻孔外科手术³⁵,之后短暂性大脑中动脉闭塞(tMCAO, 45min)。简而言之,将硅酮涂层的单丝(Doccol Corporation, USA)推进通过颈总动脉,以阻断MCA的来源³⁶。在缺血期间,将动物保持在麻醉下。在取出单丝之后立即,或者在5mins的再灌注后,在颈脱位法后摘除脑并从同侧的周围组织上分离梗死组织,并快速冷冻在液氮中用于代谢组学分析。相应的区域获自对侧。在tMCAO之前和期间用丙二酸二甲酯(6mg/kg/min)通过静脉内输注10min或载体将另一组输注,允许恢复3天,期间对它们进行神经学功能评分³⁷,如改进的³⁸。然后通过跨心脏

(transcardiac) 灌注固定将这些大鼠杀死，并且在苏木精和曙红染色后将梗死面积在7个冠向水平上评估³⁹。

[0235] 体内小鼠肾缺血和再灌注。在异氟烷全身麻醉下，将小鼠进行剖腹手术并暴露双侧肾门。将血管夹(8mm, InterFocus Fine Science Tools, Cambridge, UK)放置在一个肾门上以诱导单侧肾缺血。在45min缺血结束时，去除夹子并注意到肾再灌注是腮红的颜色的恢复和观察到从肾静脉流过。在缺血结束时或者在5min再灌注之后取出肾脏，并且快速冷冻在液氮中用于代谢组学分析。

[0236] 体内小鼠肝脏热缺血。通过颈脱位法以确保血流中止而杀死小鼠。通过使用恒温加热垫，将肝脏组织在37°C原位保持在体腔内达45min，接着摘除和快速冷冻在液氮上用于随后的代谢组学分析。

[0237] 代谢组学分析。按照制造商的使用说明，将等量湿重的鼠组织在Precellysis 24小管中在每10mg组织中250μL提取溶液(ES; 30%乙腈, 50%甲醇和20%水)中裂解。将悬浮液立即离心(16,000g, 15min, 0°C)并将上清液用于LC-MS分析。对于LC分离，柱A是Sequant Zic-Hilic (150mm×4.6mm, 内径3.5μm)，具有保护柱(20mm×2.1mm 3.5μm)，来自HiChrom, Reading, UK。流动相。A: 水中0.1%甲酸(v/v)。B: 乙腈中0.1%甲酸(v/v)。流速300μL/min。梯度: 0-3min 80% B, 25min 20% B, 26min 80% B, 36min 80% B。柱B是sequant Zic-pHilic (150mm×2.1mm内径3.5μm)，具有保护柱(20mm×2.1mm内径3.5μm)，来自HiChrom, Reading, UK。流动相。C: 20mM碳酸铵+0.1%氢氧化铵，在水中。D: 乙腈。流速100μL/min。梯度: 0min 80% D, 28min 20% D, 29min 80% D, 45min 80% D。以完整MS和极性转换模式操作质谱仪(Thermo QExactive Orbitrap)。将样品随机化，以便避免机器漂移(drifts)。使用靶向和非靶向的方法分析光谱。对于靶向方法，通过参照内部化合物文库，使用XCalibur Qual Browser和XCalibur Quan Browser软件(Thermo Scientific)分析光谱。对于非靶向方法，使用Sieve™2.0软件(Thermo Scientific)处理光谱，并且提取光谱峰。光谱阵列然后使用R包装muma的函数explore.data和univariate进行统计学分析⁴⁰。

[0238] 成年大鼠原代心肌细胞的原位缺血和再灌注。将雄性Sprague-Dawley大鼠(300-370g)通过IP注射200mg/kg戊巴比妥钠和330U/kg肝素，末端麻醉雄性Sprague-Dawley大鼠(300-370g)。摘除心脏并在Langendorff-灌注系统上用13mL/min氧合的KH缓冲液在37°C逆向灌注。使用标准方法，通过胶原酶消化分离细胞⁴¹。简而言之，将心脏用KH缓冲液灌注5min，然后用含有100μM EGTA的无Ca²⁺KH缓冲液灌注5min，接着用含有100μM CaCl₂和0.5mg/ml胶原酶II(Worthington)的KH缓冲液灌注8min。从套管中摘除心脏并且快速切碎心室并浸浴在20mL的相同胶原酶缓冲液中达15min。将消化的组织通过100μm细胞滤器，并且将细胞通过重力收集。去除上清液，并且将细胞首先用含有0.5mM CaCl₂的KH缓冲液洗涤，然后用含有1mM CaCl₂的KH缓冲液洗涤。典型的收率是2x 10⁶个细胞/心脏，具有90%活的杆状细胞。将细胞重悬于培养基199(补充有5mM肌酐, 2mM肉碱, 5mM牛磺酸, 和100μg/mL青霉素/链霉素)中，并铺平板于包被了层粘连蛋白(Sigma)的盖玻片。在37°C/5%CO₂温育1h后，洗去未贴壁的细胞，并且将新鲜培养基199加入每个孔中，在37°C/5%CO₂至少4小时。

[0239] 在铺平板36小时内将细胞成像。成像使用具有Fluar 20x/0.75NA UV物镜的Zeiss™ LSM 510META共聚焦显微镜，或装配有Orca™ ER冷却CCD照相机(Hamamatsu)，单色仪(Cairn Research)和发射滤光片轮(Prior)、具有Fluar 20x/0.75NA物镜的显微镜。将贴

壁到载玻片(其形成定制的成像室的基底)的细胞与常氧记录缓冲液(156mM NaCl, 3mM KCl, 2mM MgSO₄, 1.25mM K₂HP0₄, 2mM CaCl₂, 10mM Hepes, 10mM D-葡萄糖; pH 7.4)一起放置在显微镜上37°C热台上。通过用模拟缺血的预先充气的缺氧记录缓冲液(如上所述,但是缺少葡萄糖并含有10mM乳酸钠, 14.8mM KCl; pH 6.4)替换所述缓冲液和用透明的气密盖子覆盖所述热台,形成其中强加入氩气以保持缺氧的小室,从而实现模拟缺血。在模拟缺血期间将pO₂常规测量为<2.0mm Hg。为了模拟再灌注,从小室中去除盖子,并且用常氧记录缓冲液替换所述缓冲液。

[0240] 使用四甲基罗丹明,甲酯(TMRM,Life Technologies)以去猝灭(dequench)模式测量线粒体膜电位。以该模式,线粒体去极化导致高浓度的猝灭的TMRM从线粒体再分布至细胞溶质中,其中低浓度导致去猝灭和荧光的增加²⁷。将细胞在室温装载含有3μM TMRM的常氧记录缓冲液达30min。在成像前,去除装载缓冲液并替之以常氧记录缓冲液。在543nm激发TMRM荧光,并且使用LP 560滤光片收集发射。

[0241] 通过DHE的氧化评估ROS生产。对此,将细胞用5μM二氢乙啶(DHE, Invitrogen)装载,其贯穿整个常氧和缺血性条件保持存在。在351nm激发DHE,并且用BP 435–485 IR滤光片获得发射的信号。在543nm激发氧化的DHE,并且用LP 560滤光片收集发射。在351nm激发NADH自发荧光,并使用BP 435–485IR滤器收集发射的信号。所有测量的细胞参数使用Fiji图像处理软件分析。

[0242] 在成肌细胞中评估琥珀酸依赖性的线粒体超氧化物生产。将C2C12成肌细胞接种在35mm玻璃底培养皿(MatTek)中并在低葡萄糖(1g/L)DMEM中温育24h。在成像前2h,去除DMEM,并替之以成像缓冲液(132mM NaCl; 10mM HEPES; 4.2mM KCl; 1mM MgCl₂; 1mM CaCl₂,用Tris碱调节至pH 7.4并补充有2-脱氧葡萄糖(25μM),和丙酮酸钠(10mg/L或4μM寡霉素,如所示的)。将成肌细胞与2μM MitoSOX预温育15min,之后成像。使用Nikon Eclipse Ti共聚焦显微镜,在37°C在温度控制台上监视MitoSOX荧光达30min。将MitoSOX在510nm激发,并且在所示添加后用LP 560滤光片收集激发的信号。

[0243] 在缺血和再灌注期间代谢通量的计算机分析。

[0244] 使用扩展版本的心肌线粒体代谢模型iAS253¹¹,进行模拟。通过使用最新版本的MitoMiner(一种线粒体蛋白质组数据库⁴²),将该模型扩展以包括另外的线粒体反应。使用MitoMiner,通过将这些数据与来自BRENDA⁴³,HumanCyc⁴⁴和相关文献的信息互相参照以证实新反应在人中存在、在人心脏组织中表达和局限于线粒体基质,鉴定包括的新线粒体反应。另外,包括可促进能量生产的细胞溶质反应,如氨基酸降解和转化反应以及嘌呤核苷酸循环。通过使用Marvin套件的计算化学软件(ChemAxon Ltd,Budapest,Hungary),计算模型中的代谢物的质子化状态。然后根据在pH 8.05对于线粒体基质⁴⁵和在pH 7.30对于细胞溶质发现的主要细微物质的质子化状态,将反应进行电荷平衡。另外,基于来自公共资源如BRENDA和HumanCyc的不可逆性、热力学和信息的一般规则,施加方向性约束,并且从文献¹¹中获得容量限制。最终的模型含有227个线粒体基质反应,76个细胞溶胶反应,在两个区室之间的91个运输步骤和代表输入和输出系统的84个边界条件。扩展的模型是线粒体的手工处理的(curated)和高度精炼的模型,并且如同iAS253,不存在代谢物死路并且所有反应能够具有通量。

[0245] 为了表示缺血,将最大氧摄取降低至其正常条件下水平的5% (0.99向对19.8μ

mol/min/g干重)。为了表示再灌注,将氧水平恢复至其正常水平,并且将琥珀酸、乳酸、丙酮酸和NADH的可利用性增加至各种水平,以反映这些代谢物的缺血性累积。ATP合酶的通量容量被降低至可达50%以表示从AMP产生ADP(ATP合酶行使功能必需)的延迟,以及对线粒体膜的超极化进行建模,实际上是通过限制电子传递链的其他质子泵复合物的效率。

[0246] 使用通量平衡分析-一种已经在别处详细描述的技术⁴⁶-模拟线粒体网络的代谢。用于最优化反应通量的目标函数是最大ATP生产。使用带有COBRA Toolbox⁴⁷的MATLABTMR2012b(Math Works, Inc, Natick, MA)和线性编程解决者GLPK(<http://www.gnu.org/software/glpk>) ,进行所有的FBA模拟。

[0247] 参考文献

[0248] 1.Murphy,E.& Steenbergen,C.Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion iniury(构成心脏缺血-再灌注损伤的急性保护的基础的机理).Physiol.Rev.88,581-609, (2007) .

[0249] 2.Yellon,D.M.& Hausenloy,D.J.Myocardial reperfusion injury(心肌再灌注损伤) .N Engl.J.Med.357,1121-1135, (2007) .

[0250] 3.Burwell,L.S.,Nadtochiy,S.M.& Brookes,P.S.Cardioprotection by metabolic shut-down and gradual wake-up(通过代谢切断和逐渐唤醒来保护心脏) .J.Mol.Cell.Cardiol.46,804-810, (2009) .

[0251] 4.Eltzschig,H.K.& Eckle,T.Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation(缺血和再灌注-从机理到转化) .Nat.Med.17,1391-1401, (2011) .

[0252] 5.Timmers,L.等The innate immune response in reperfused myocardium (在再灌注心肌中的先天免疫应答) .Cardiovasc.Res.94,276-283, (2012) .

[0253] 6.Harmsen,E.,de Jong,J.W.& Serruys,P.W.Hypoxanthine production by ischemic heart demonstrated by high pressure liquid chromatography of blood purine nucleosides and oxypurines(通过高压液相色谱证明的血液嘌呤核苷酸和羟嘌呤的通过缺血心脏的次黄嘌呤生产) .Clin.Chim.Acta 115,73-84 (1981) .

[0254] 7.Pacher,P.,Nivorozhkin,A.& Szabo,C.Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors:renaissance half a century after the discovery of allopurinol(黄嘌呤氧化酶抑制剂的治疗效果:在发现别嘌呤醇后半个世纪复兴) .Pharmacol.Revs.58,87-114, (2006) .

[0255] 8.Chouchani,E.T.等Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I(线粒体复合物I上半胱氨酸转换S-硝基化的心脏保护作用) .Nat.Med.19,753-759, (2013) .

[0256] 9.Zweier,J.L.,Flaherty,J.T.& Weisfeldt,M.L.Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium(直接测量在再灌注缺血性心肌后的自由基产生) .Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84,1404-1407 (1987) .

[0257] 10.Tannahill,G.M.等Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1beta through HIF-1alpha(琥珀酸是通过HIF-1 α 诱导IL-1 β 的炎症信号) .Nature 496,238-242, (2013) .

[0258] 11.Smith,A.C.& Robinson,A.J.A metabolic model of the mitochondrion

and its use in modelling diseases of the tricarboxylic acid cycle(线粒体的代谢模型及其在三羧酸循环疾病建模中的应用).BMC Syst.Biol.5,102,(2011).

[0259] 12.Pisarenko,O.I.等On the mechanism of enhanced ATP formation in hypoxic myocardium caused by glutamic acid(关于由谷氨酸导致的缺血心肌中增强的ATP形成的机理).Basic Res.Cardiol.80,126-134(1985).

[0260] 13.Taegtmeyer,H.Metabolic responses to cardiac hypoxia.Increased production of succinate by rabbit papillary muscles(对于心脏缺血的代谢反应。通过兔乳头肌增加琥珀酸生产).Circ.Res.43,808-815(1978).

[0261] 14.Hochachka,P.W.& Storey,K.B.Metabolic consequences of diving in animals and man(潜水在动物和人中的代谢后果).Science 187,613-621(1975).

[0262] 15.Easlon,E.,Tsang,F.,Skinner,C.,Wang,C.& Lin,S.J.The malate-aspartate NADH shuttle components are novel metabolic longevity regulators required for calorie restriction-mediated life span extension in yeast(苹果酸-天冬氨酸NADH穿梭组分是酵母中限制热量介导的寿命延长的新的代谢寿命调节物).Genes Dev.22,931-944,(2008).

[0263] 16.Barron,J.T.,Gu,L.& Parrillo,J.E.Malate-aspartate shuttle, cytoplasmic NADH redox potential, and energetics in vascular smooth muscle(血管平滑肌中的苹果酸-天冬氨酸穿梭, 细胞质NADH氧化还原电位, 和能量).J.Mol.Cell.Cardiol.30,1571-1579,(1998).

[0264] 17.Van den Berghe,G.,Vincent,M.F.& Jaeken,J.Inborn errors of the purine nucleotide cycle:adenylosuccinase deficiency(嘌呤核苷酸循环的先天性缺陷:腺苷酰琥珀酸酶缺陷).J.Inherit.Metab.Dis.20,193-202(1997).

[0265] 18.Sridharan,V.等O₂-sensing signal cascade:clamping of O₂respiration, reduced ATP utilization, and inducible fumarate respiration(O₂-传感信号级联:O₂呼吸的钳制减少了ATP利用和可诱导的富马酸呼吸).Amer.J.Physiol.295,C29-37,(2008).

[0266] 19.Dervartanian,D.V.& Veeger,C.Studies on succinate dehydrogenase.I.spectral properties of the purified enzyme and formation of enzyme-competitive inhibitor complexes(对琥珀酸脱氢酶的研究.I.纯化酶的光谱性质和形成酶-竞争性抑制剂复合物).Biochim.Biophys.Acta 92,233-247(1964).

[0267] 20.Gutman,M.Modulation of mitochondrial succinate dehydrogenase activity,mechanism and function(线粒体琥珀酸脱氢酶活性、机理和功能的调节).Mol.Cell.Biochem.20,41-60(1978).

[0268] 21.Bunger,R.,Glanert,S.,Sommer,O.& Gerlach,E.Inhibition by (aminoxy) acetate of the malate-aspartate cycle in the isolated working guinea pig heart(在分离的工作豚鼠心脏中通过(氨基氧)乙酸抑制苹果酸-天冬氨酸循环).Hoppe Seylers Z.Physiol.Chem.361,907-914(1980).

[0269] 22.Swain,J.L.,Hines,J.J.,Sabina,R.L.,Harbury,O.L.& Holmes,E.W.Disruption of the purine nucleotide cycle by inhibition of

adenylosuccinate lyase produces skeletal muscle dysfunction (通过抑制腺苷琥珀酸裂解酶破坏嘌呤核苷酸循环导致骨骼肌功能失调) .J.Clin.Invest.74,1422–1427, (1984) .

[0270] 23.Hirst,J.,King,M.S.& Pryde,K.R.The production of reactive oxygen species by complex I(复合物I生产活性氧类别) .Biochem.Soc.Trans.36,976–980 (2008) .

[0271] 24.Kussmaul,L.& Hirst,J.The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase(complex I) from bovine heart mitochondria(NADH产生超氧化物的机理：来自牛心脏线粒体的泛醌氧化还原酶(复合物I)) .Proc.Natl.Acad.Sci.USA 103,7607–7612 (2006) .

[0272] 25.Pryde,K.R.& Hirst,J.Super oxide is produced by the reduced flavin in mitochondrial complex I:a single,unified mechanism that applies during both forward and reverse electron transfer(在线粒体复合物I中通过还原黄素生产超氧化物) .J.Biol.Chem.286,18056–18065, (2011) .

[0273] 26.Murphy,M.P.How mitochondria produce reactive oxygen species(线粒体如何产生活性氧类别) .Biochem.J.417,1–13, (2009) .

[0274] 27.Davidson,S.M.,Yellon,D.& Duchen,M.R.Assessing mitochondrial potential,calcium, and redox state in isolated mammalian cells using confocal microscopy(在分离的哺乳动物细胞中使用共聚焦显微镜评估线粒体电位、钙和氧化还原状态) .Methods Mol.Biol.372,421–430, (2007) .

[0275] 28.Wojtovich,A.P.,Smith,C.O.,Haynes,C.M.,Nehrke,K.W.& Brookes,P.S.Physiological consequences of complex II inhibition for aging,disease, and the mKATP channel(复合物II抑制对于衰老、疾病和mKATP通道的生理后果) .Biochim.Biophys.Acta 1827,598–611, (2013) .

[0276] 29.Brennan,J.P.等Mitochondrial uncoupling,with low concentration FCCP, induces ROS-dependent cardioprotection independent of KATP channel activation(用低浓度FCCP将线粒体解偶联诱导独立于KATP通道活化的ROS-依赖性心脏保护) .Cardiovas.Res.72,313–321, (2006) .

[0277] 30.Hamel,D.等G-Protein-coupled receptor 91 and succinate are key contributors in neonatal postcerebral hypoxia-ischemia recovery(G-蛋白偶联受体91和琥珀酸是新生儿脑缺氧缺血恢复的关键贡献者) .Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.34,285–293, (2014) .

[0278] 31.Schmidt,K.等Cardioprotective effects of mineralocorticoid receptor antagonists at reperfusion(盐皮质激素受体拮抗剂在再灌注中的心脏保护作用) .Eur.Heart J.31,1655–1662, (2010) .

[0279] 32.Methner,C.等Protection through postconditioning or a mitochondria-targeted S-nitrosothiol is unaffected by cardiomyocyte-selective ablation of protein kinase G(通过后调解或线粒体靶向的S-亚硝基硫醇的保护不受蛋白激酶G的心肌选择性消除的影响) .Basic Res.Cardiol.108,337, (2013) .

- [0280] 33.Nadtochiy,S.M.,Redman,E.,Rahman,I.& Brookes,P.S.Lysine deacetylation in ischaemic preconditioning:the role of SIRT1(缺血预调节中的赖氨酸脱乙酰化:SIRT1的作用).Cardiovasc.Res.89,643–649,(2011).
- [0281] 34.Ashrafi,H.等Fumarate is cardioprotective via activation of the Nrf2 antioxidant pathway(富马酸是通过活化Nrf2抗氧化途径来保护心脏的).Cell Metab.15,361–371,(2012).
- [0282] 35.Ord,E.N.J.,Shirley,R.,van Kralingen,J.C.,Graves,A.,McClure,J.D.,Wilkinson,M.,McCabe,C.,Macrae,I.M.& Work,L.M.Positive impact of pre-stroke surgery on survival following transient focal ischemia in hypertensive rats(卒中前外科手术对于高血压大鼠中暂时性局灶性缺血后的存活的正面影响).J.Neurosci.Methods 211,305–308,(2012).
- [0283] 36.Koizumi,J.,Yoshida,Y.,Nakazawa,T.& Ooneda,G..Experimental studies of ischemic brain edema:a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area(缺血性脑水肿的实验研究:大鼠中脑水肿的新实验模型,其中可以在缺血区域中引入再循环).Jpn.J.Stroke 8,1–8(1986).
- [0284] 37.Hunter,A.J.,等,Functional assessments in mice and rats after focal stroke(在局灶性卒中后小鼠和大鼠中的功能评估).Neuropharmacology.39,806–816,(2000).
- [0285] 38.Ord,E.N.J.等,Combined antiapoptotic and antioxidant approach to acute neuroprotection for stroke in hypertensive rats(抗凋亡和抗氧化联合方法对于高血压大鼠中的卒中的急性保护).J.Cereb.Blood Flow Metab.33,1215–1224,(2013).
- [0286] 39.Osborne,K.A.等Quantitative assessment of early brain damage in a rat model of focal cerebral ischaemia(局灶性脑缺血的大鼠模型中早期脑损伤的定量评估).J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry 50,402–410(1987).
- [0287] 40.Gaude,E.等muma,An R Package for metabolomics univariate and multivariate statistical analysis(用于代谢组学单变量和多变量统计学分析的R套装).Current Metabol.1,180–189(2013).
- [0288] 41.Davidson,S.M.& Duchen,M.R.Effects of NO on mitochondrial function in cardiomyocytes:Pathophysiological relevance(NO对于心肌中线粒体功能的影响:病理生理学相关性).Cardiovasc.Res.71,10–21,(2006).
- [0289] 42.Smith,A.C.,Blackshaw,J.A.& Robinson,A.J.MitoMiner:a data warehouse for mitochondrial proteomics data(MitoMiner:用于线粒体蛋白质组学数据的数据仓库).Nucleic Acids Res.40,(2012).
- [0290] 43.Chang,A.,Scheer,M.,Grote,A.,Schomburg,I.& Schomburg,D.BRENDA,AMENDA and FRENDNA the enzyme information system:new content and tools in 2009(D.BRENDA,AMENDA和FRENDNA酶信息系统:2009年的新内容和工具).Nucleic Acids Res.37,D588–592,(2009).

[0291] 44.Romero,P.等Computational prediction of human metabolic pathways from the complete human genome(从完整人基因组的人代谢途径的计算机预测).Genome Biol.6,R2,(2005) .

[0292] 45.Abad,M.F.,Di Benedetto,G.,Magalhaes,P.J.,Filippin,L.& Pozzan,T.Mitochondrial pH monitored by a new engineered green fluorescent protein mutant(通过新改造的绿色荧光蛋白突变体监视线粒体pH).J.Biol.Chem.279,11521-11529,(2004) .

[0293] 46.Orth,J.D.,Thiele,I.& Palsson,B.O.What is flux balance analysis?(通量平衡分析是什么?)Nat.Biotechnol.28,245-248,(2010) .

[0294] 47.Becker,S.A.等Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models:the COBRA Toolbox(用基于约束的模型定量预测细胞代谢).Nat.Prot.2,727-738,(2007) .

[0295] 上述说明书中提到的所有出版物通过参考结合于此。尽管在本文中已经参考附图详细公开了本发明的例举性实施方案,但是应当理解,本发明不限于精确的实施方案,并且本领域技术人员在不背离如后附权利要求和它们的等同物限定的本发明的范围的情况下可以在其中进行各种改变和改进。

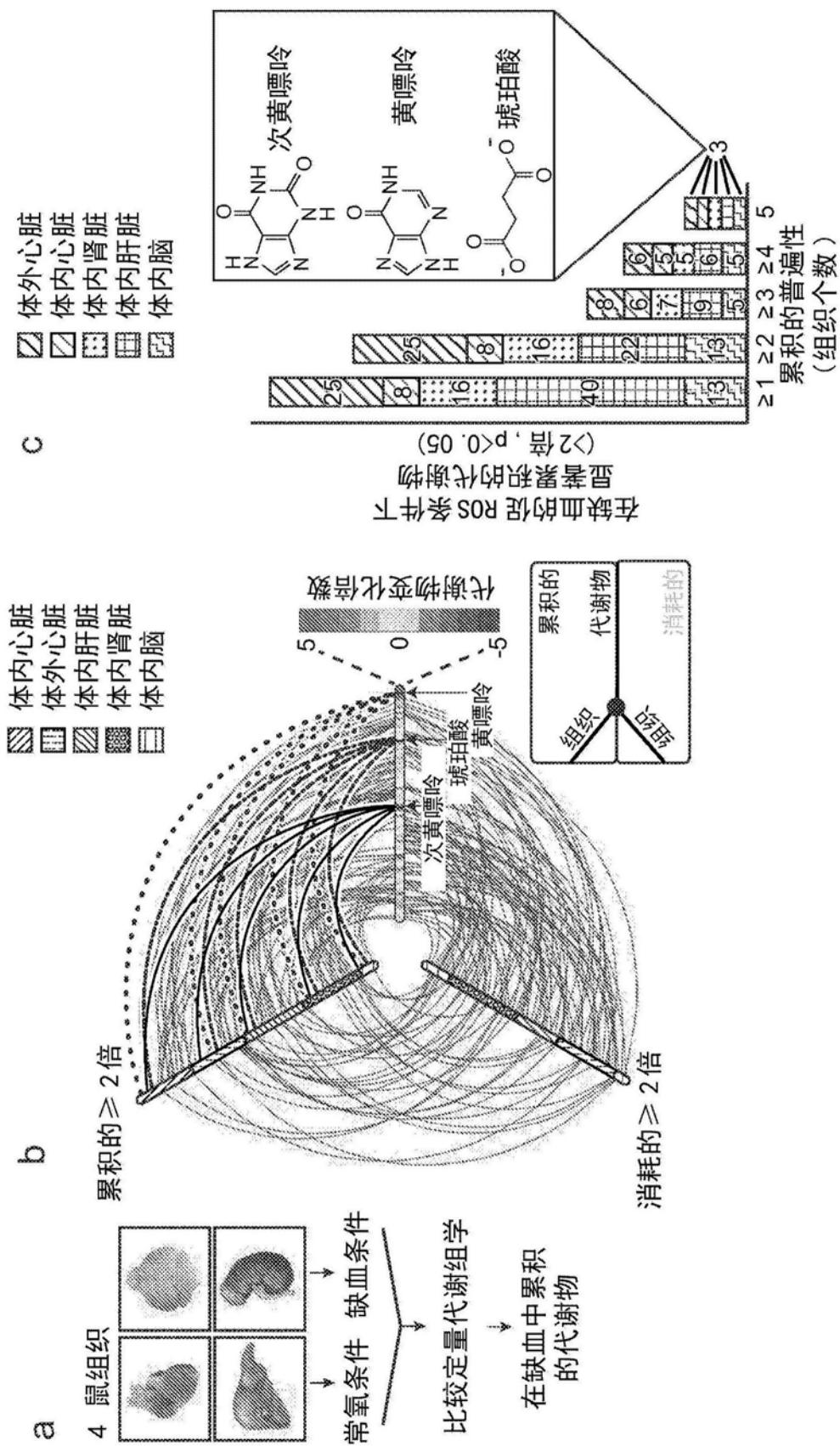


图1

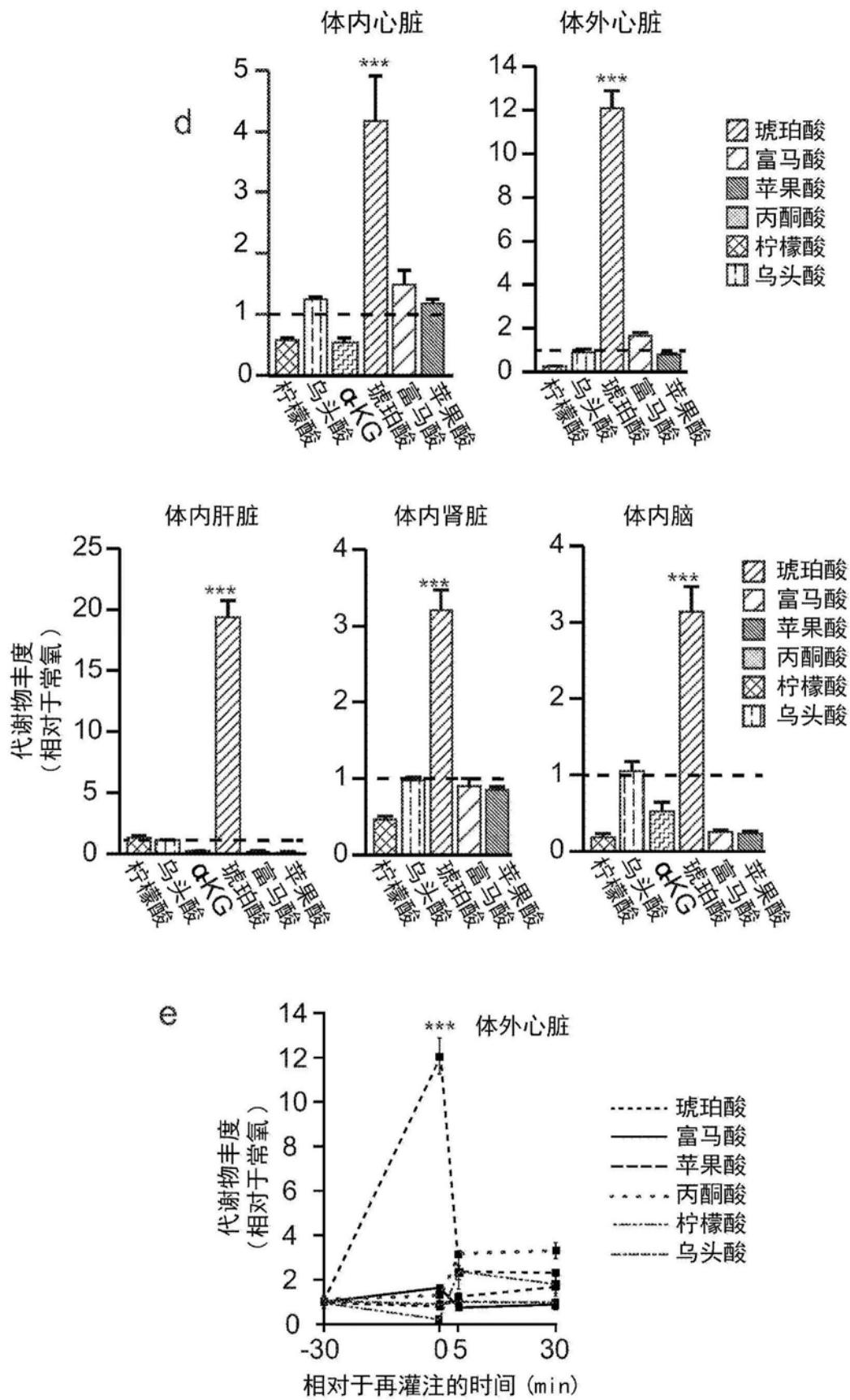


图1续

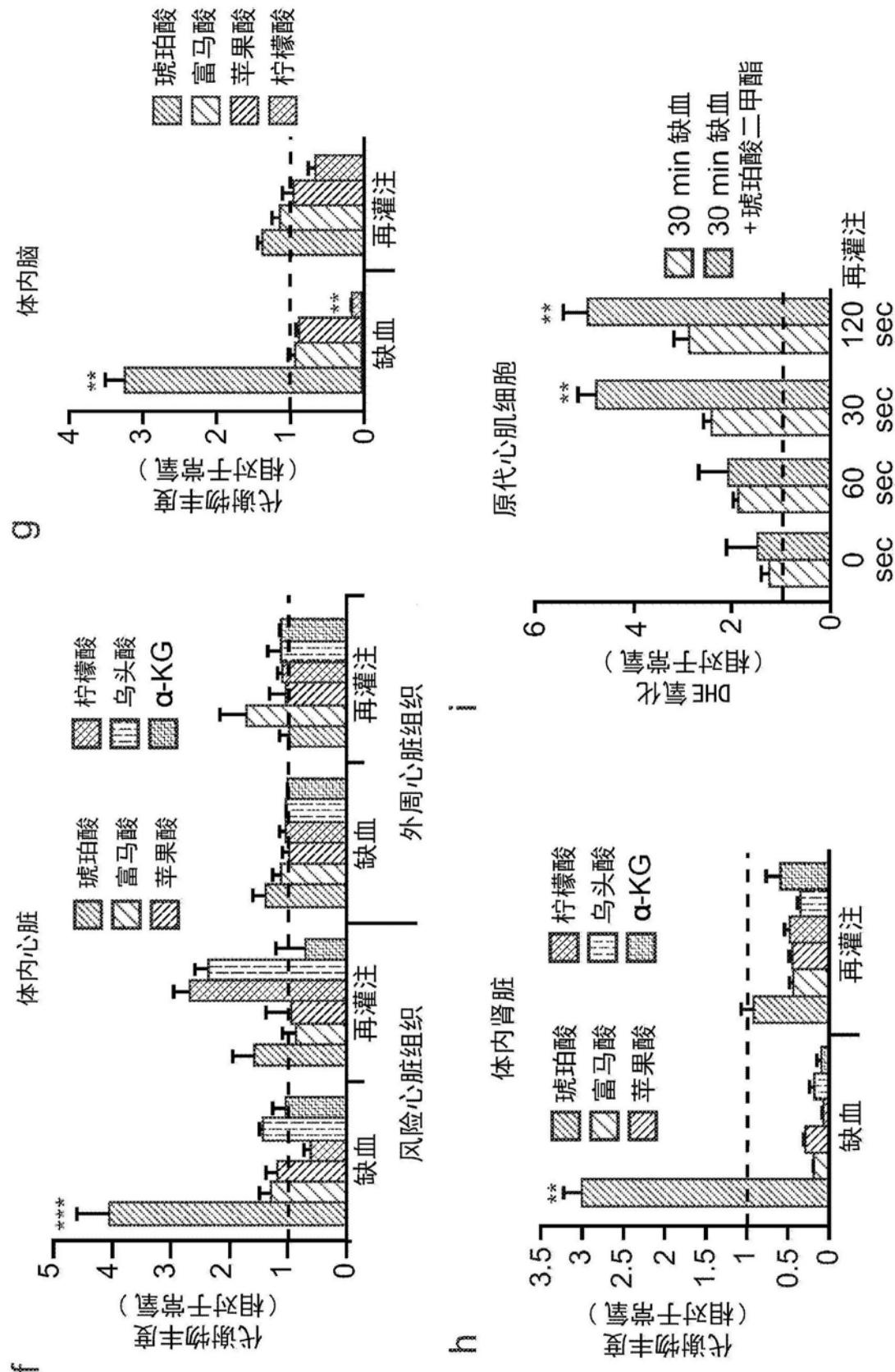


图1续

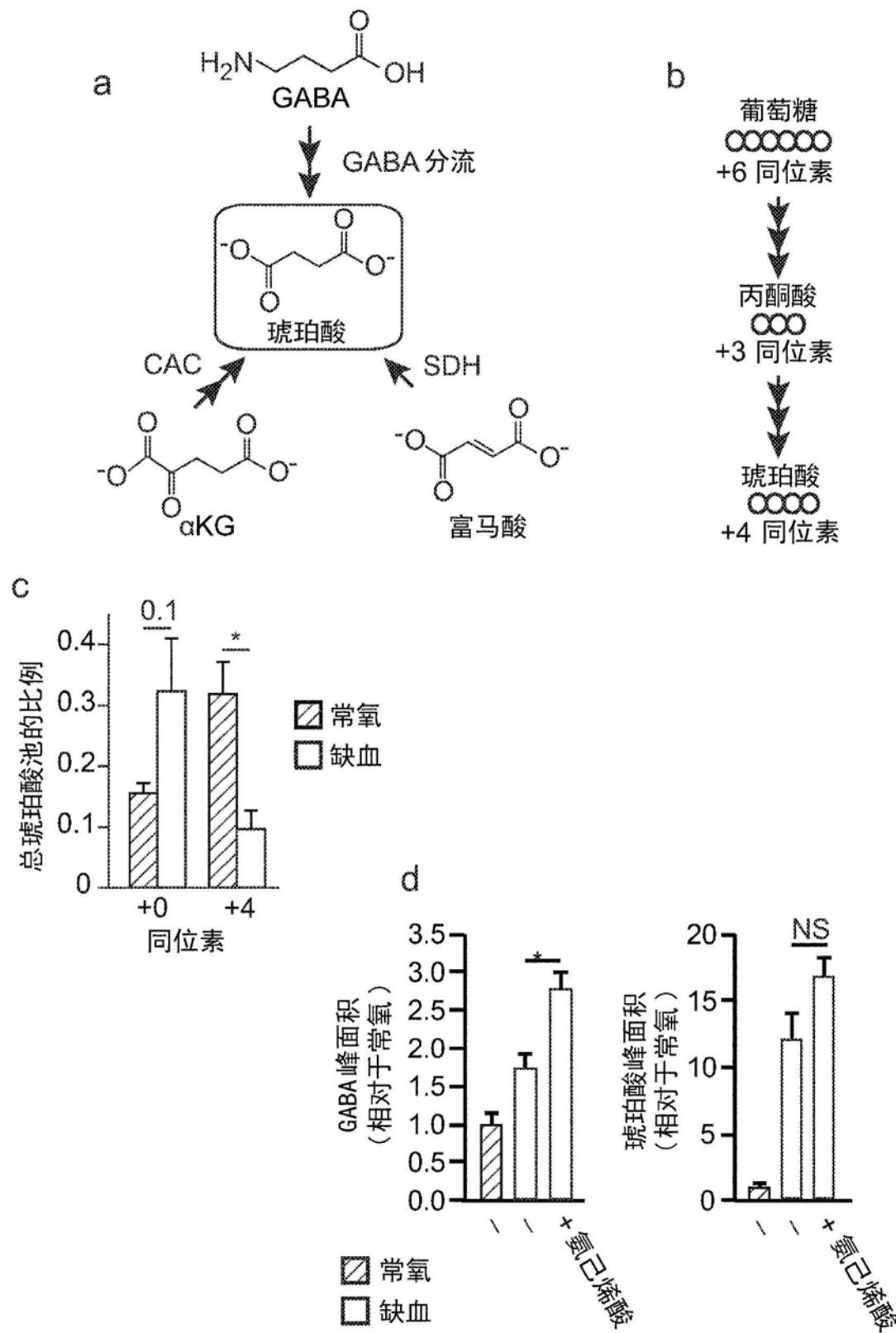


图2

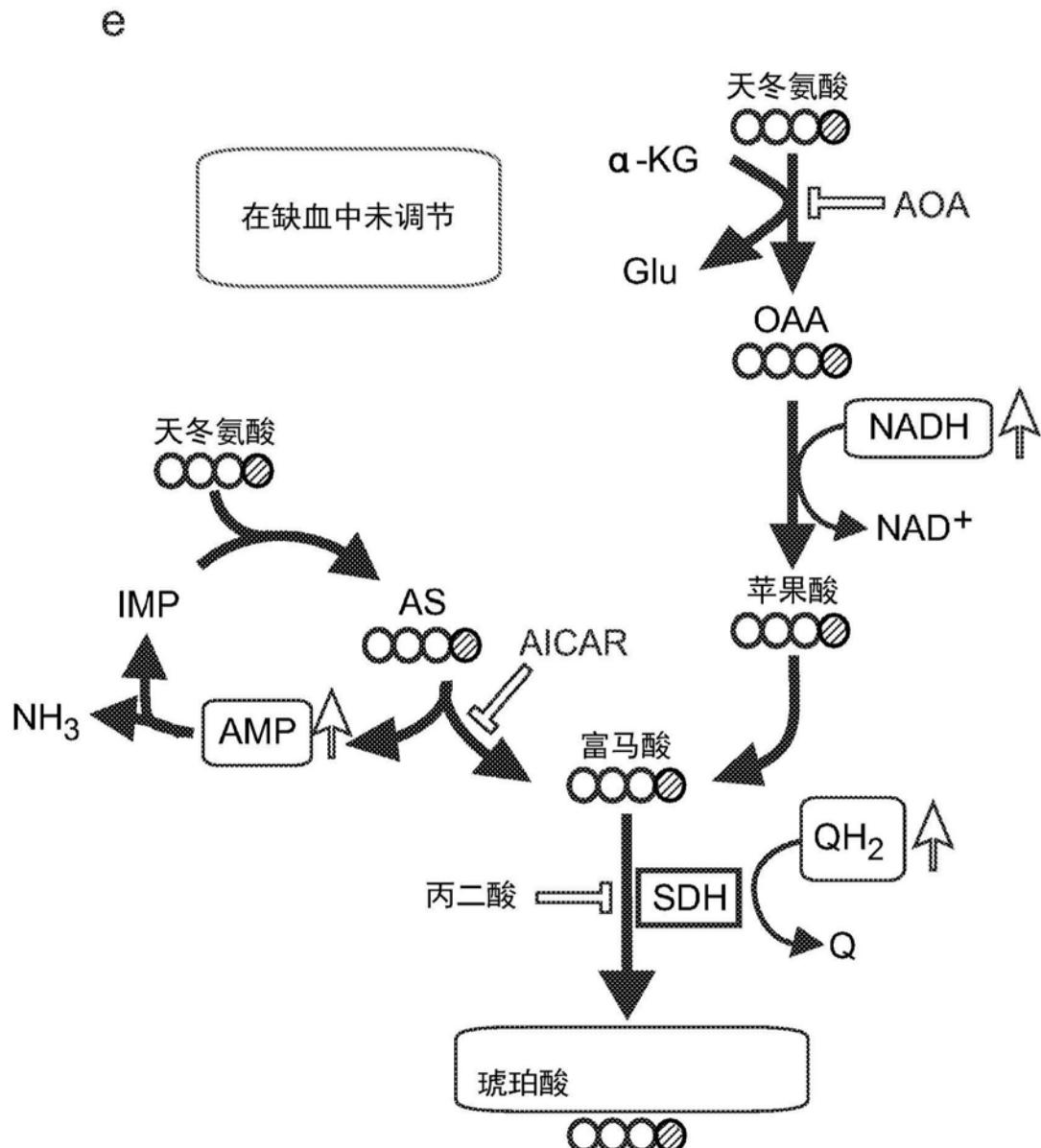


图2续

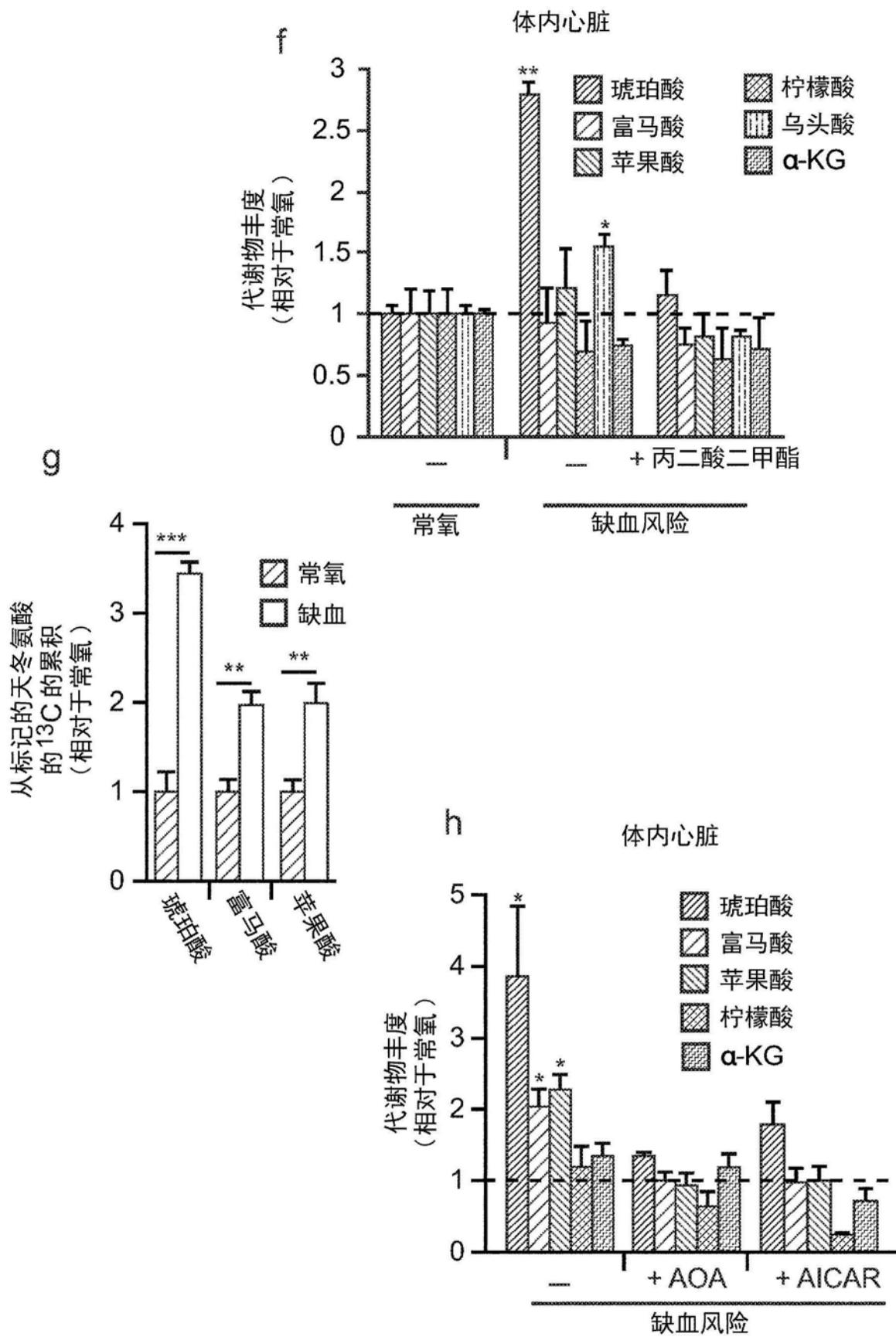


图2续

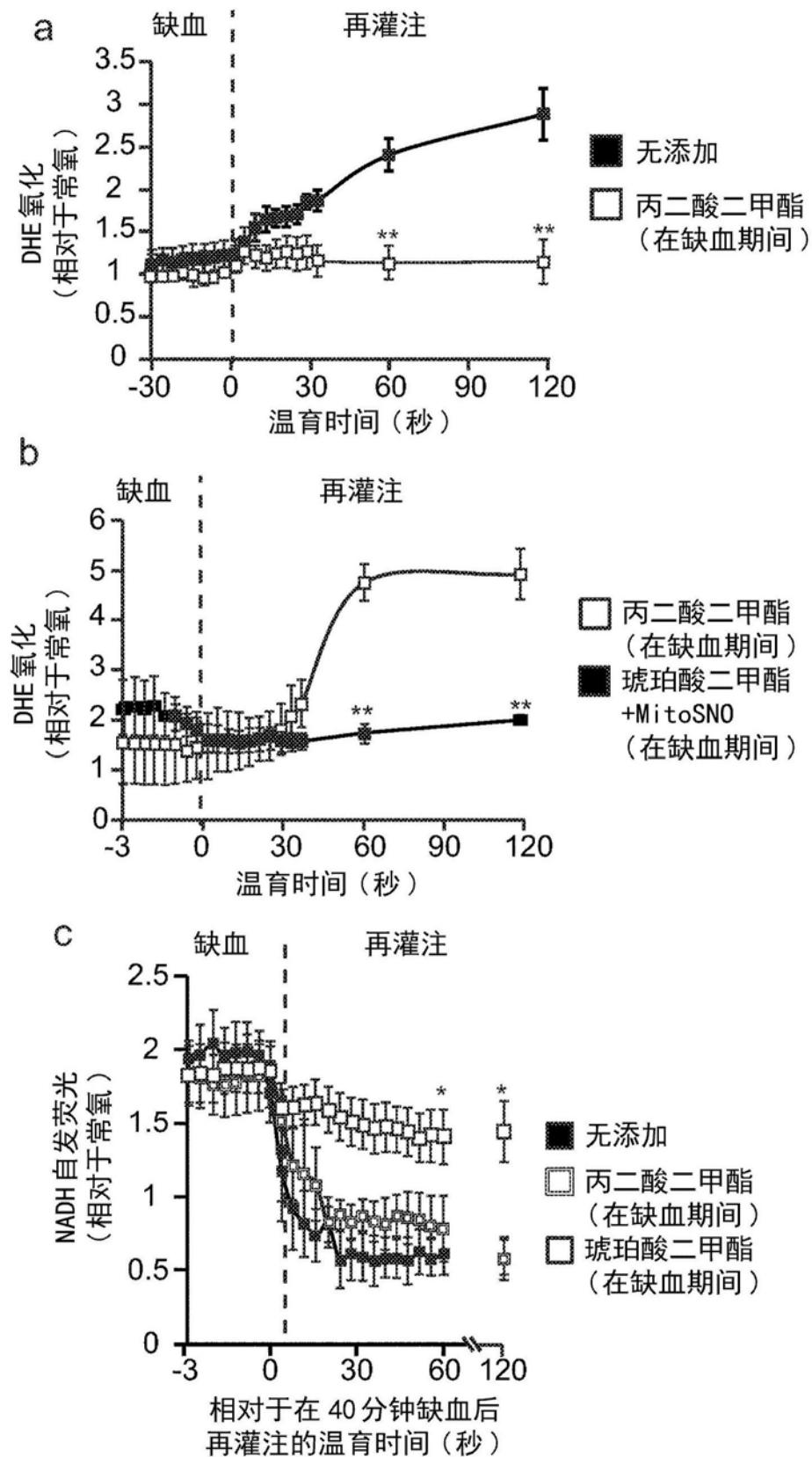


图3

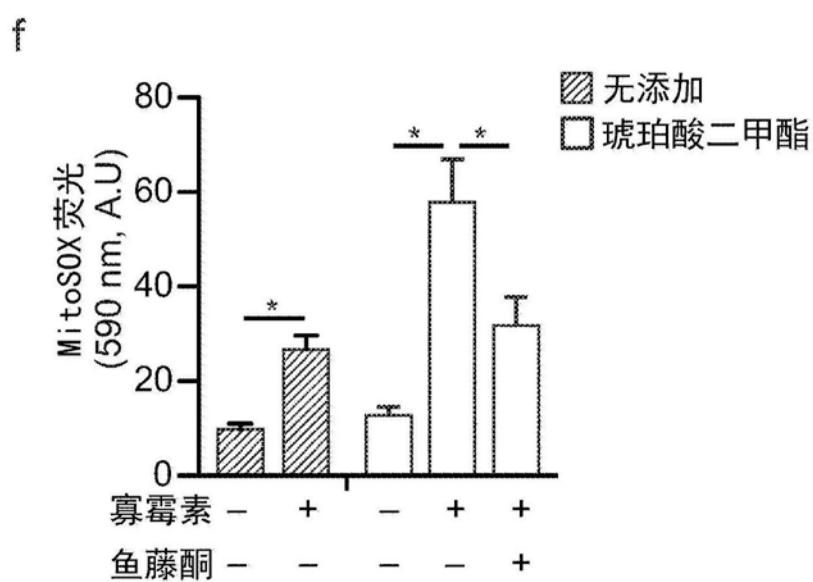
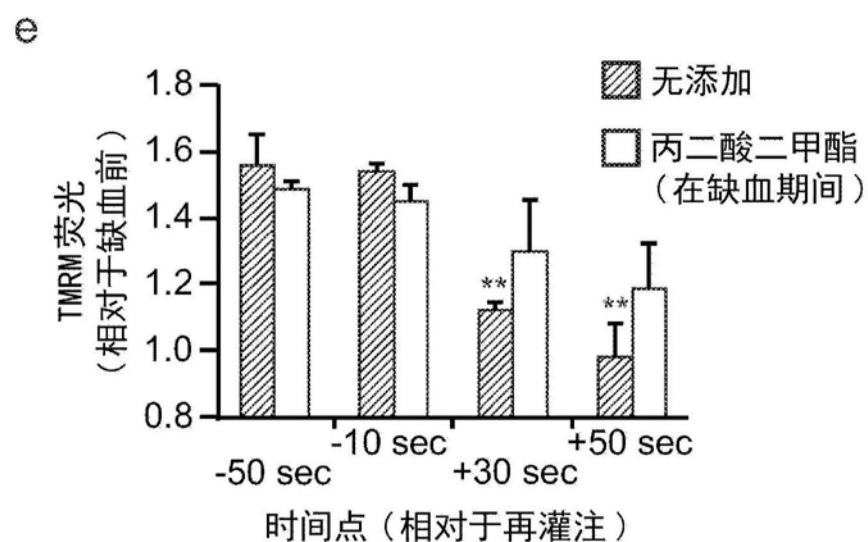
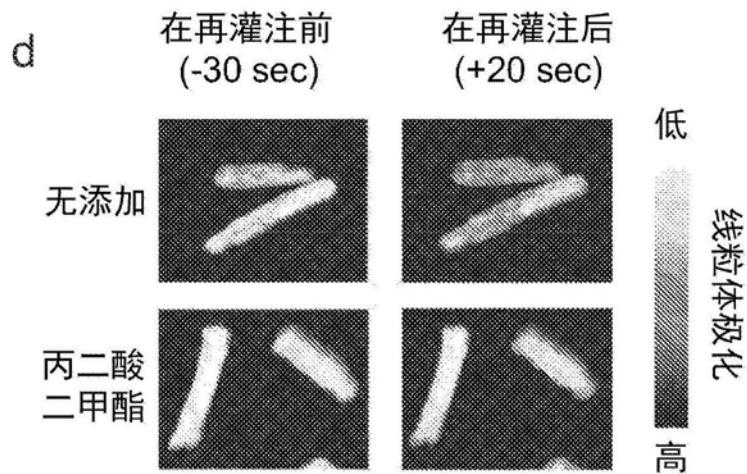


图3续

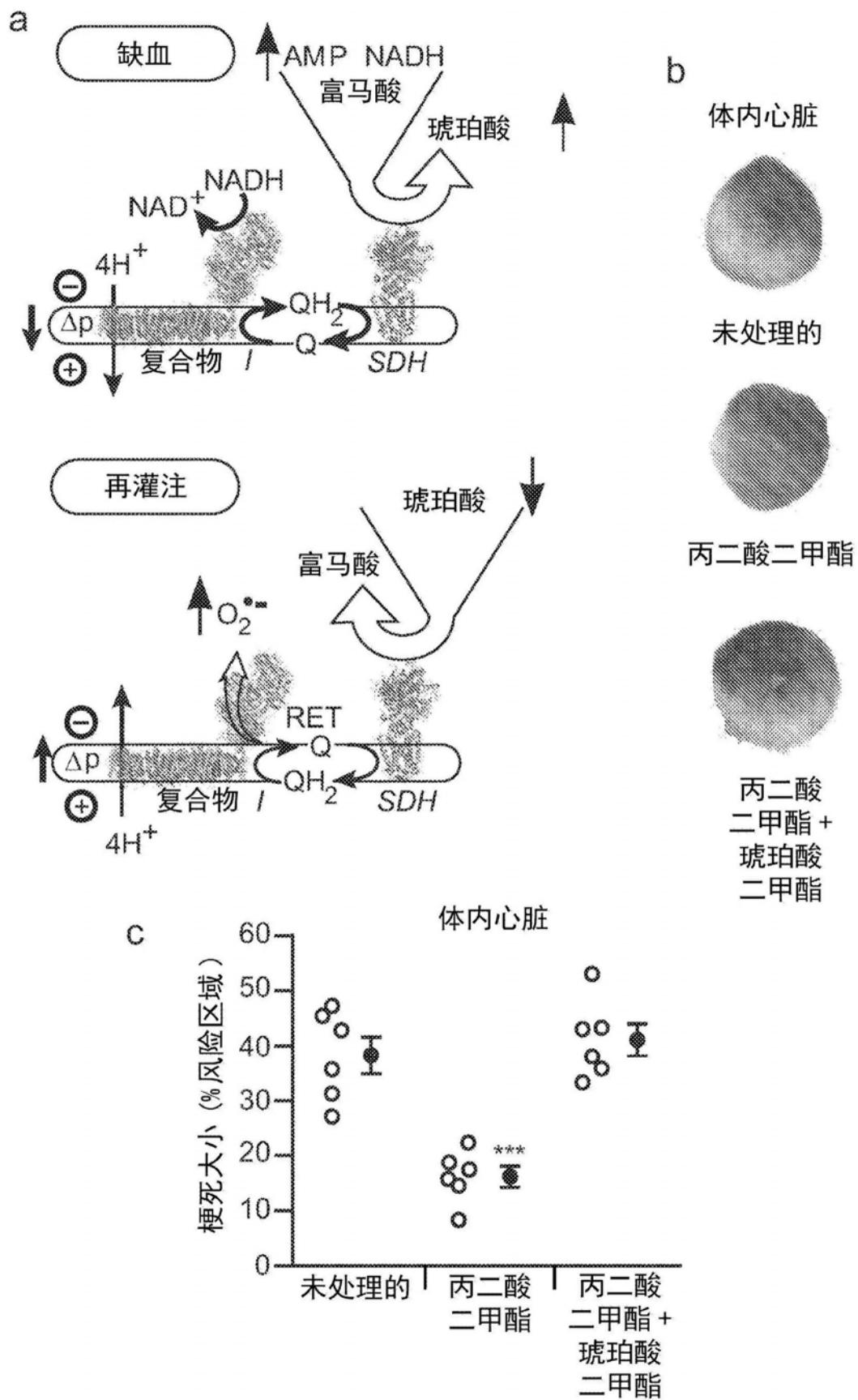


图4

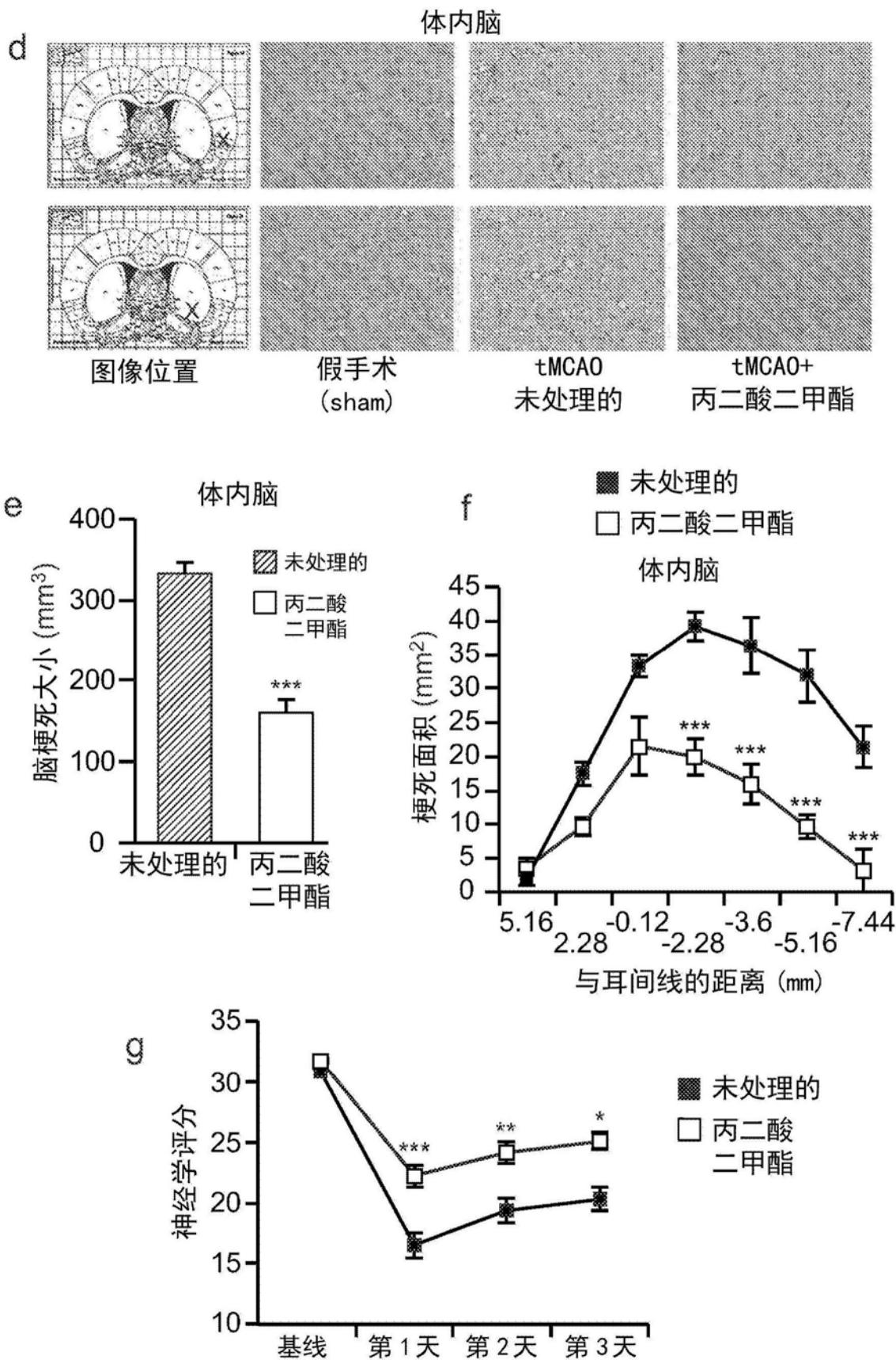


图4续

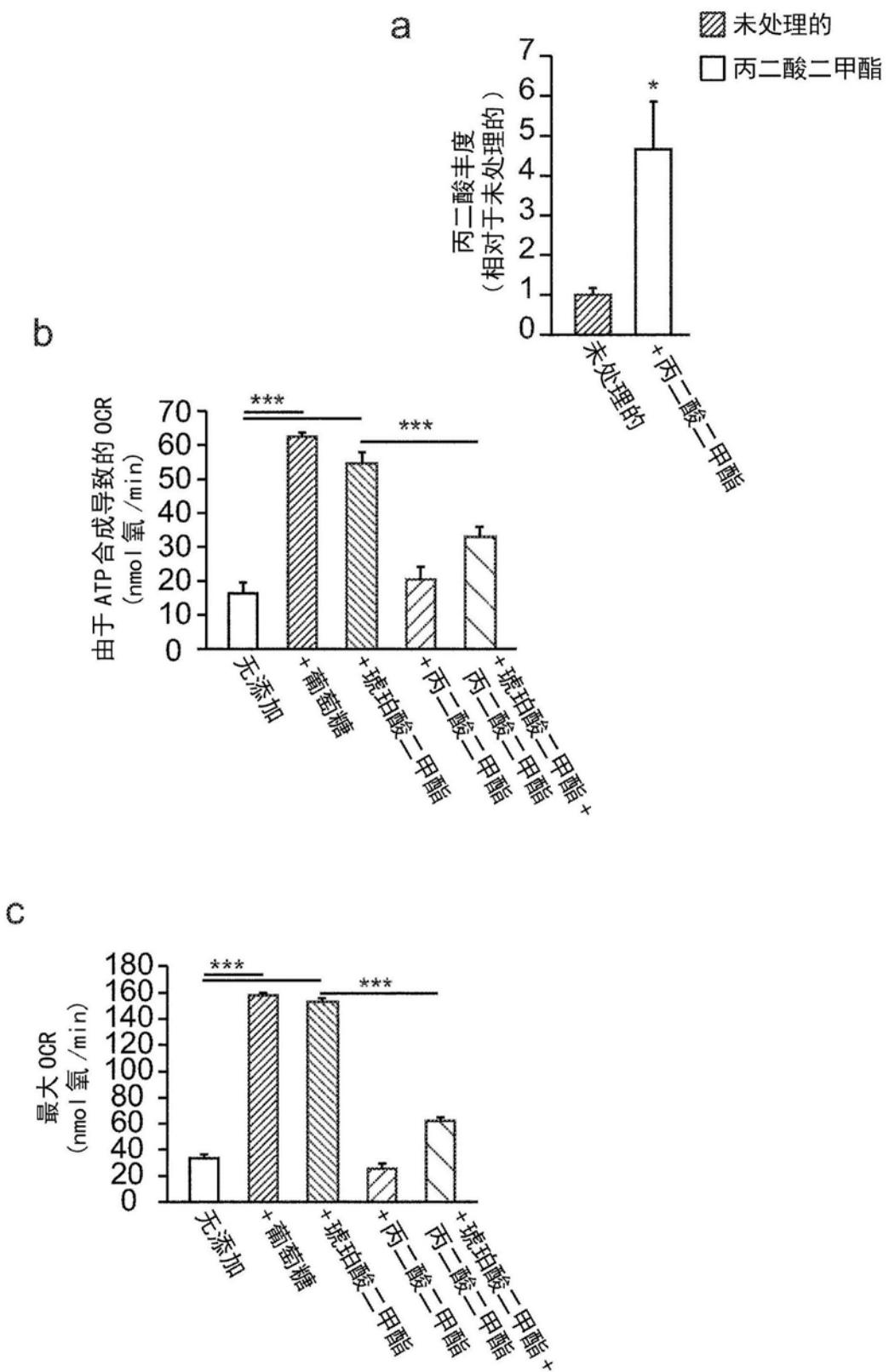


图5

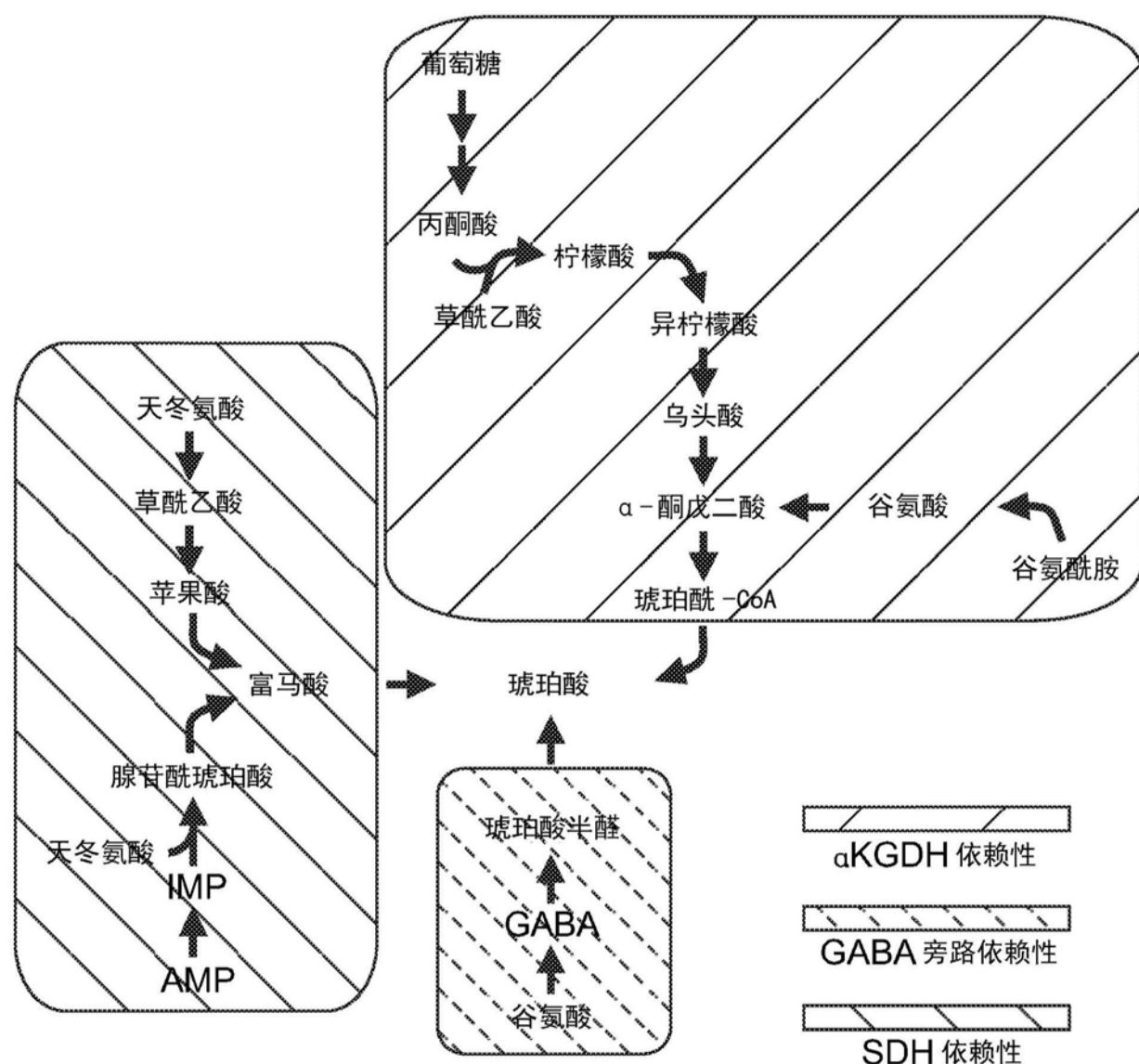


图6

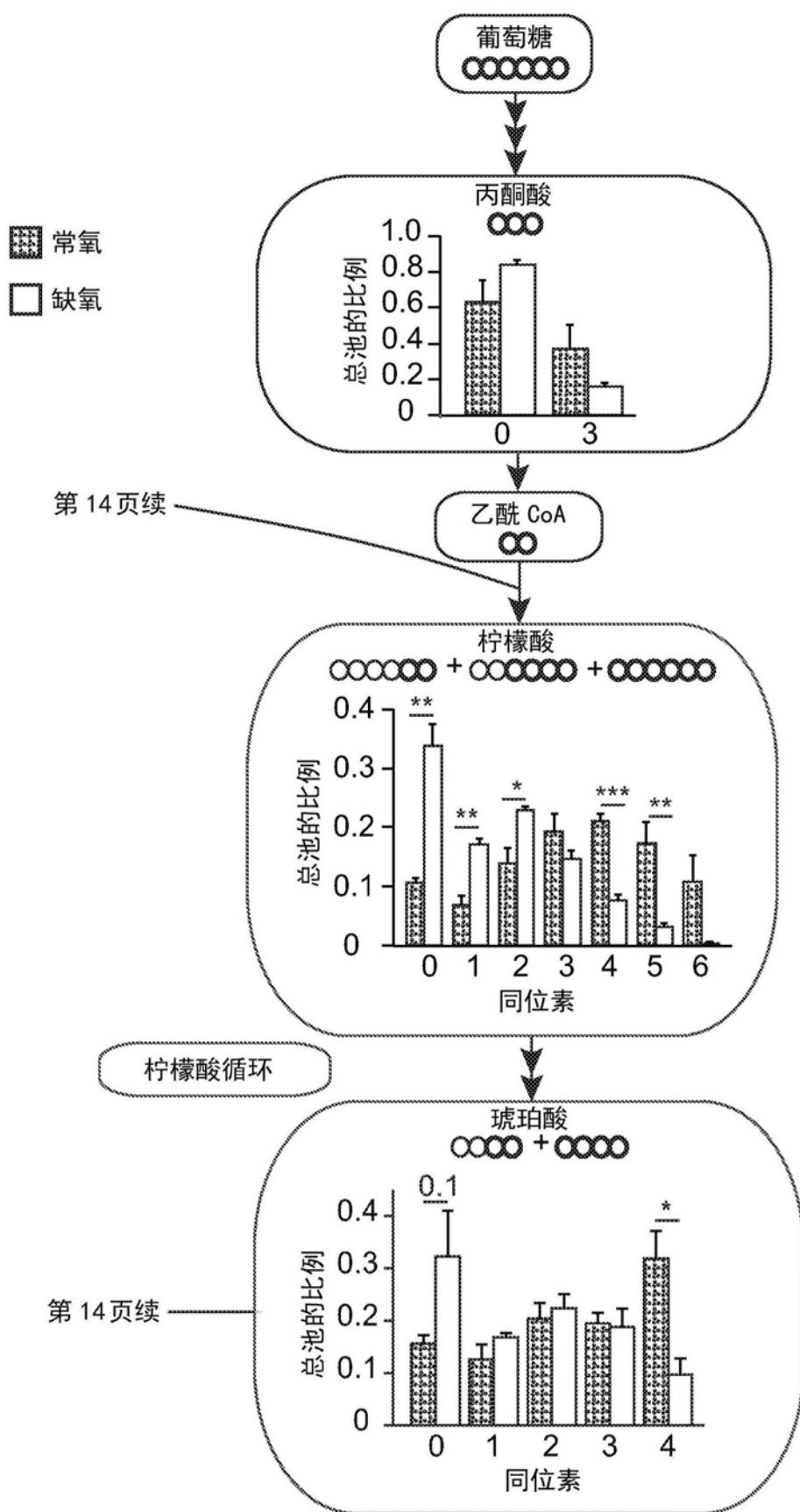


图7

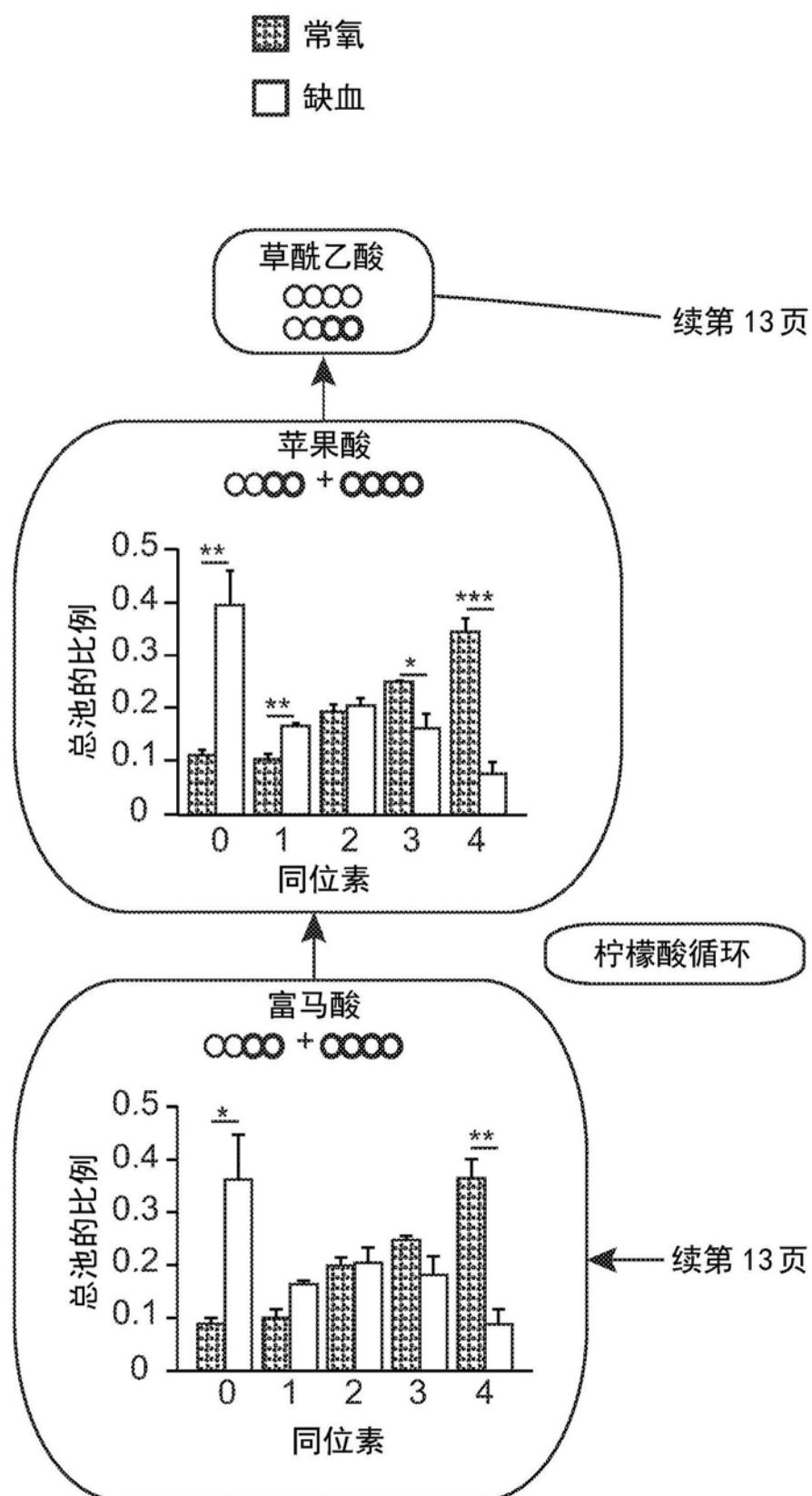


图7续

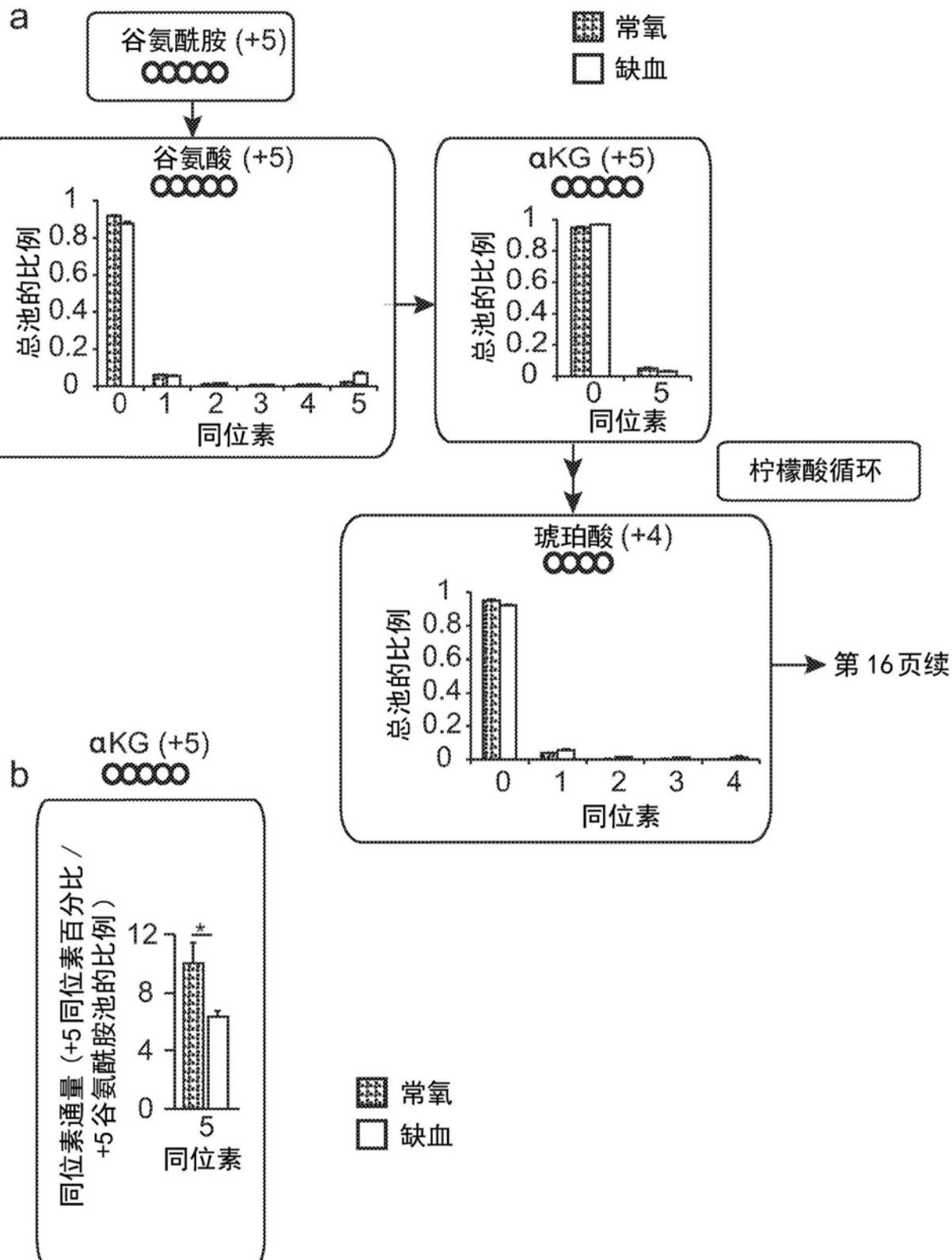


图8

■ 常氧
□ 缺血

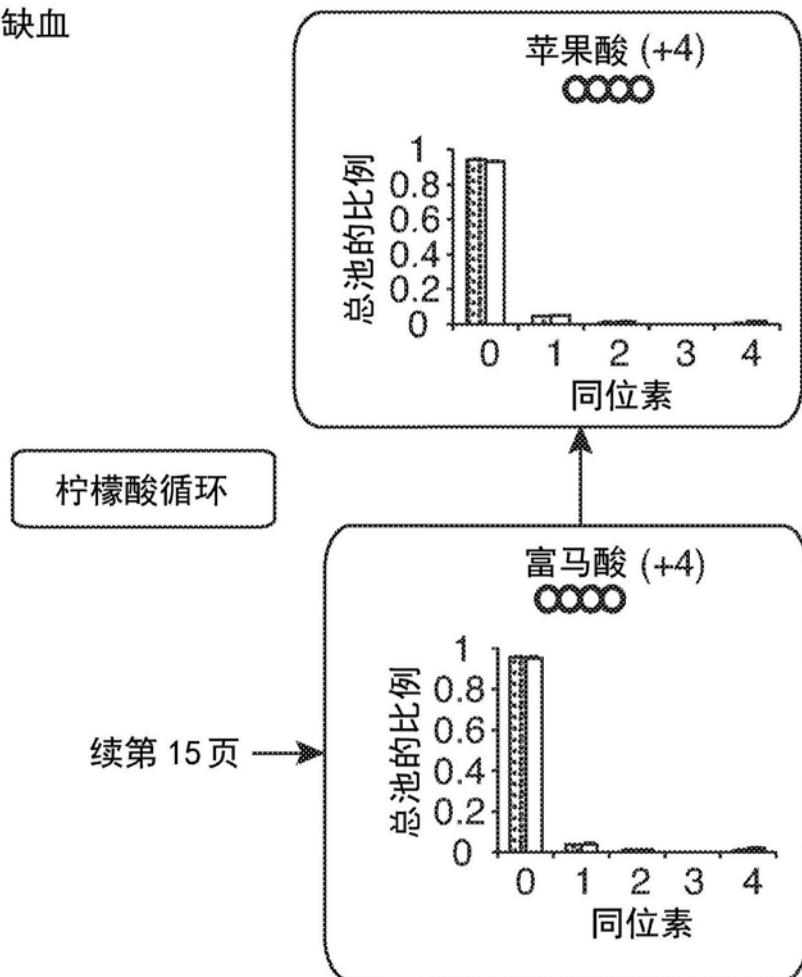
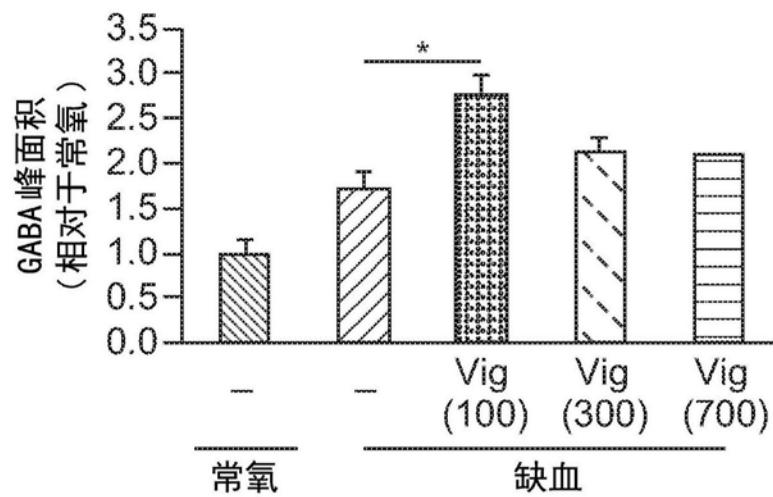


图8续

a



b

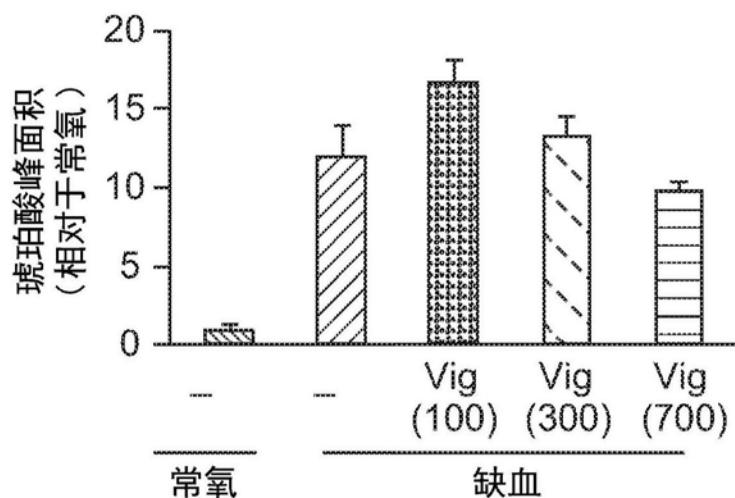


图9

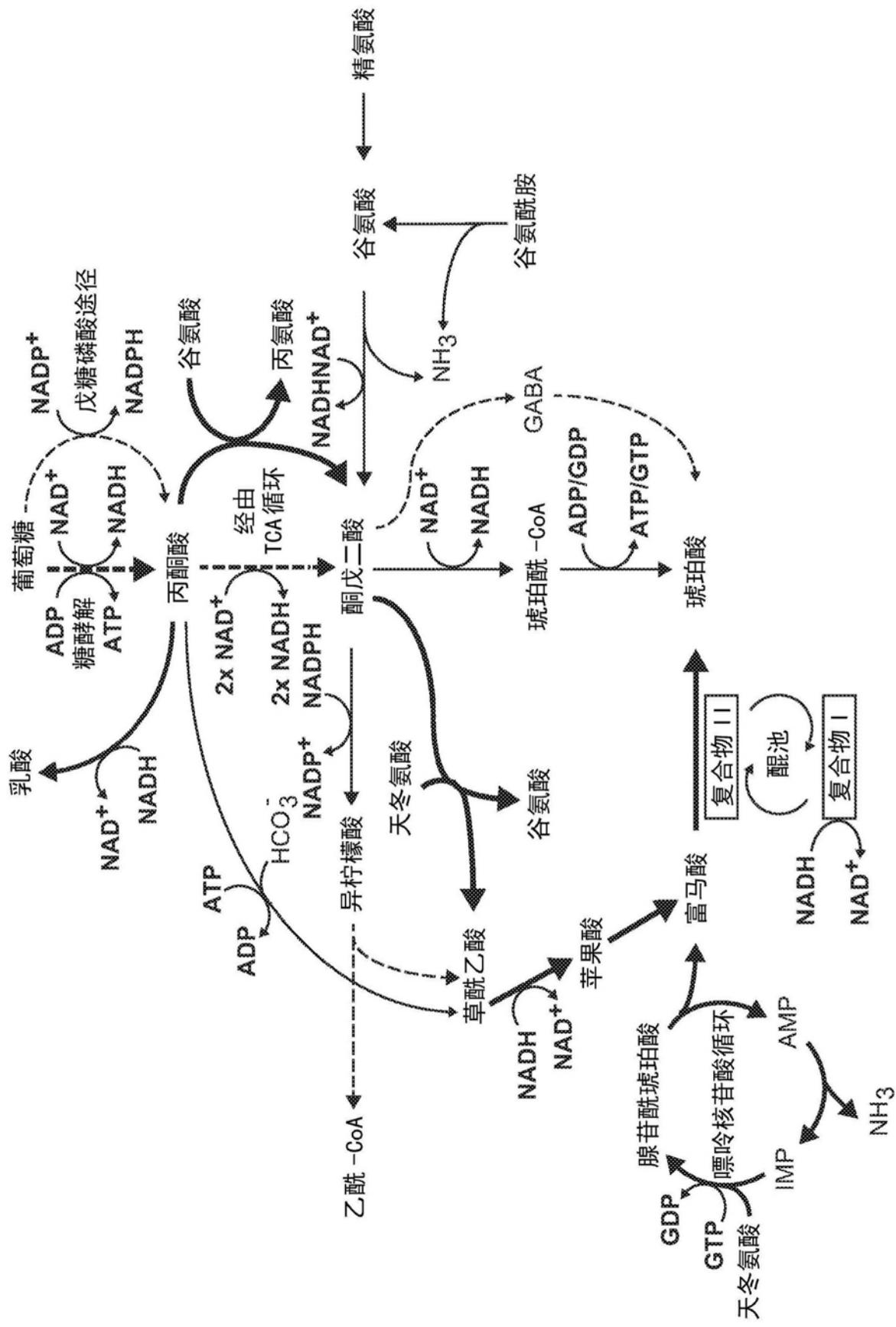


图10

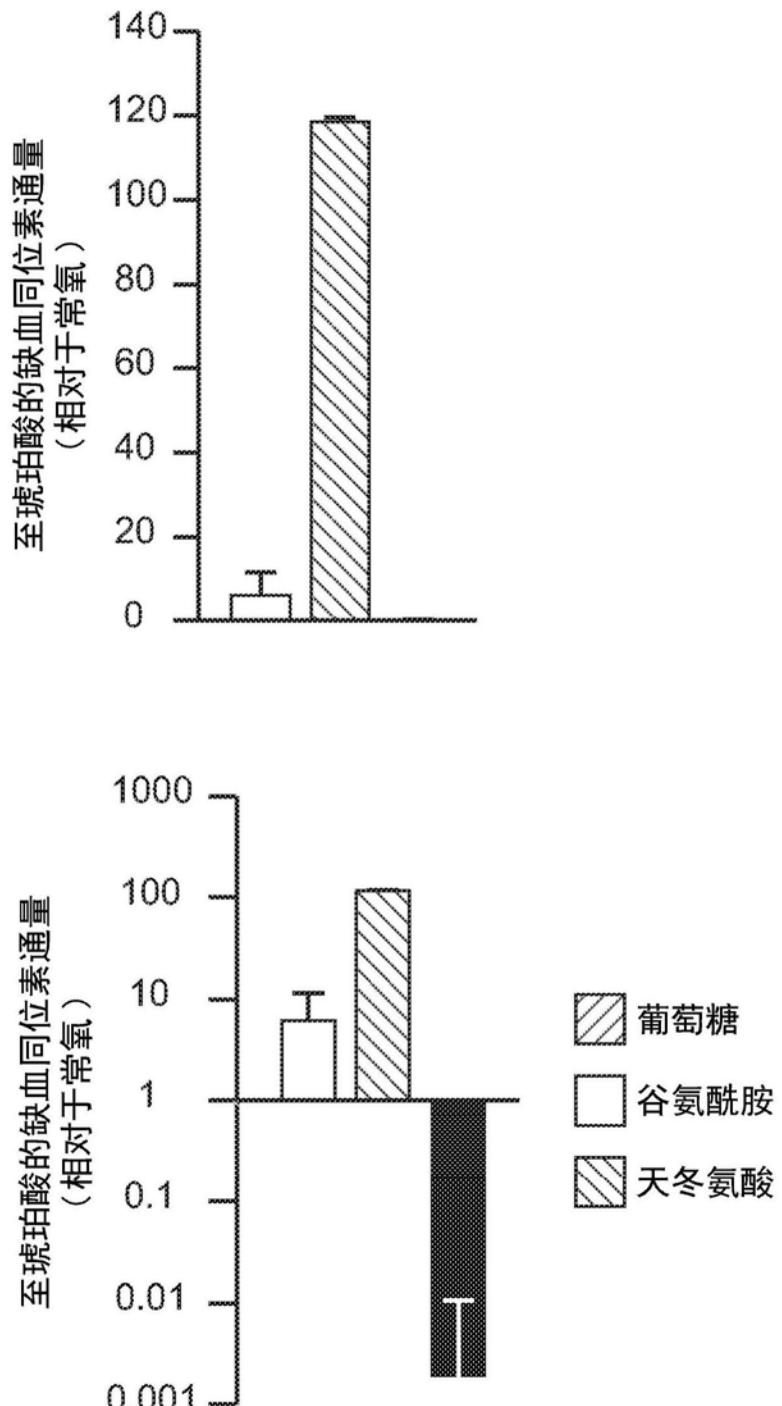
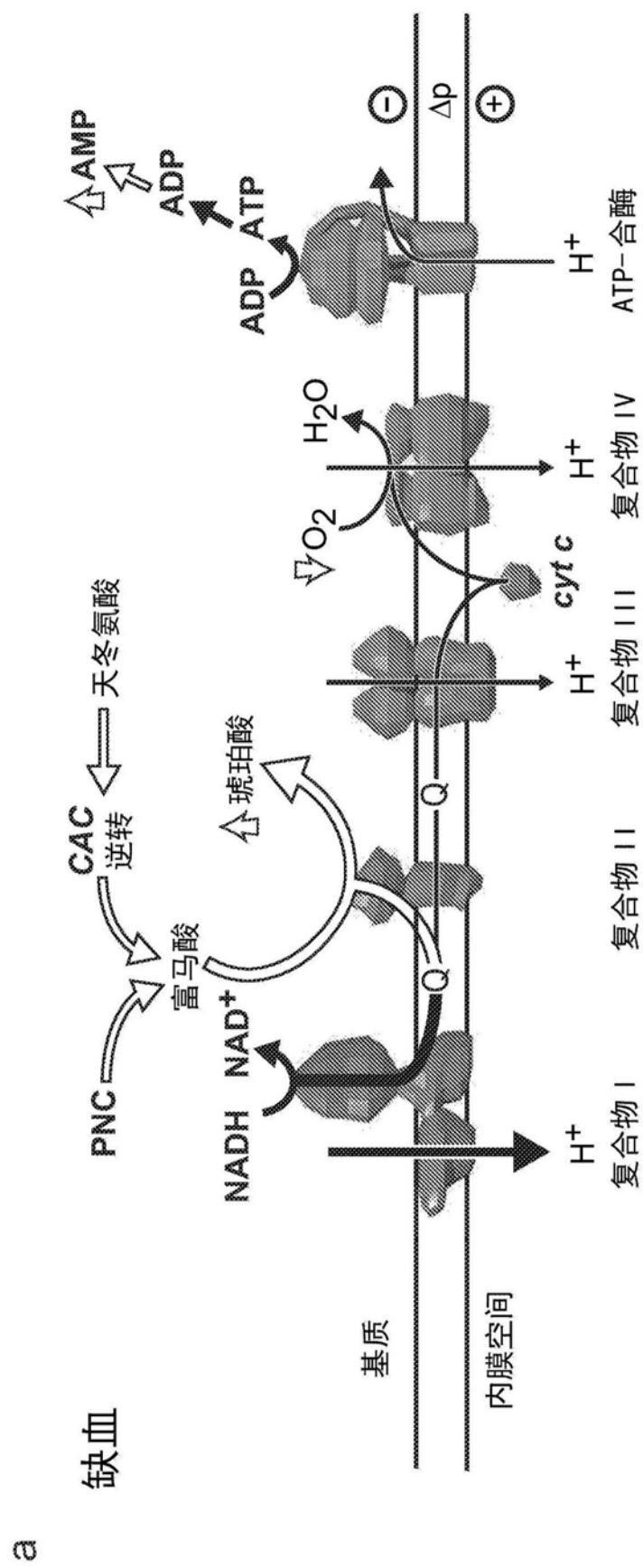


图11



a

图12

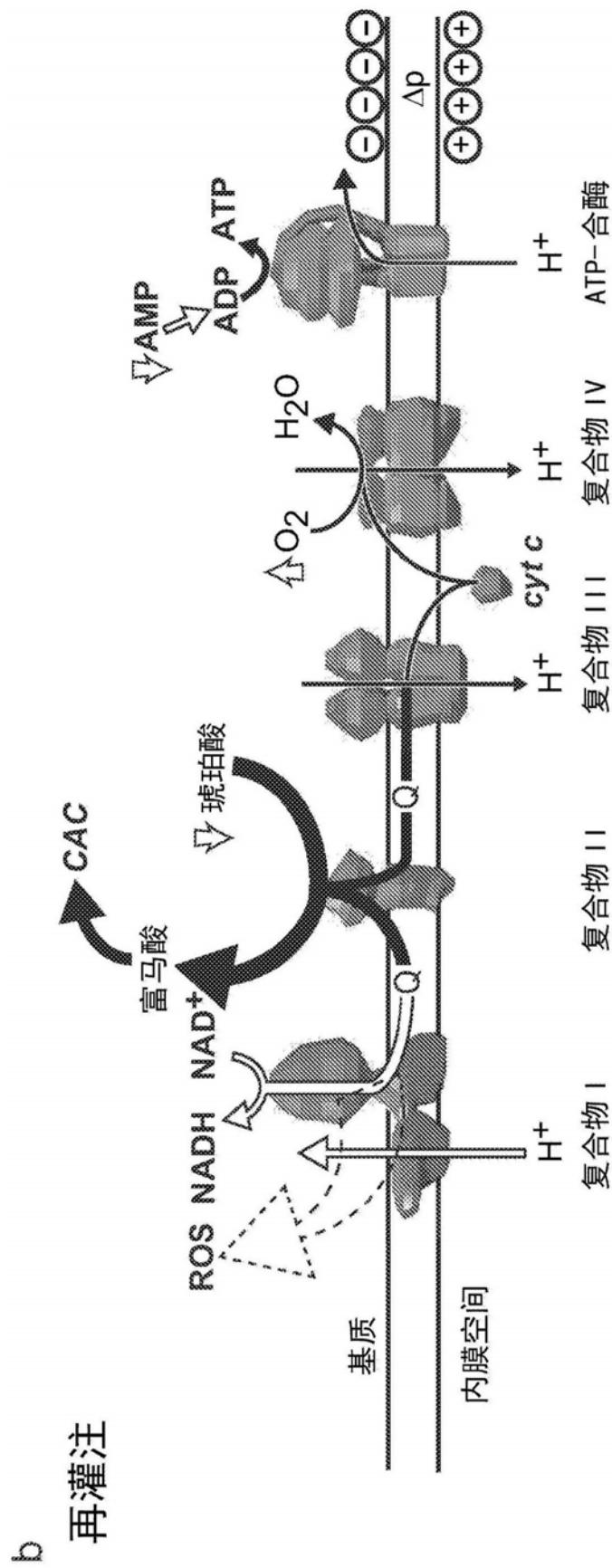


图12续

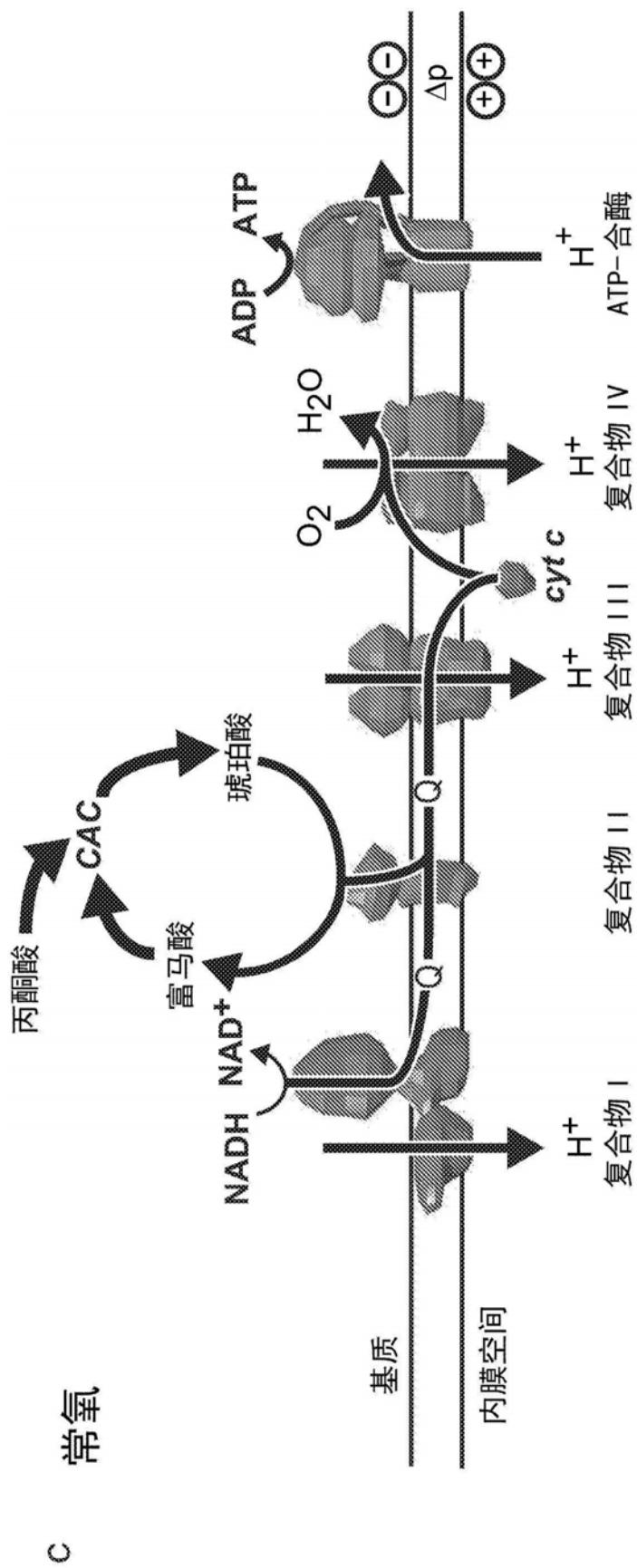


图12续

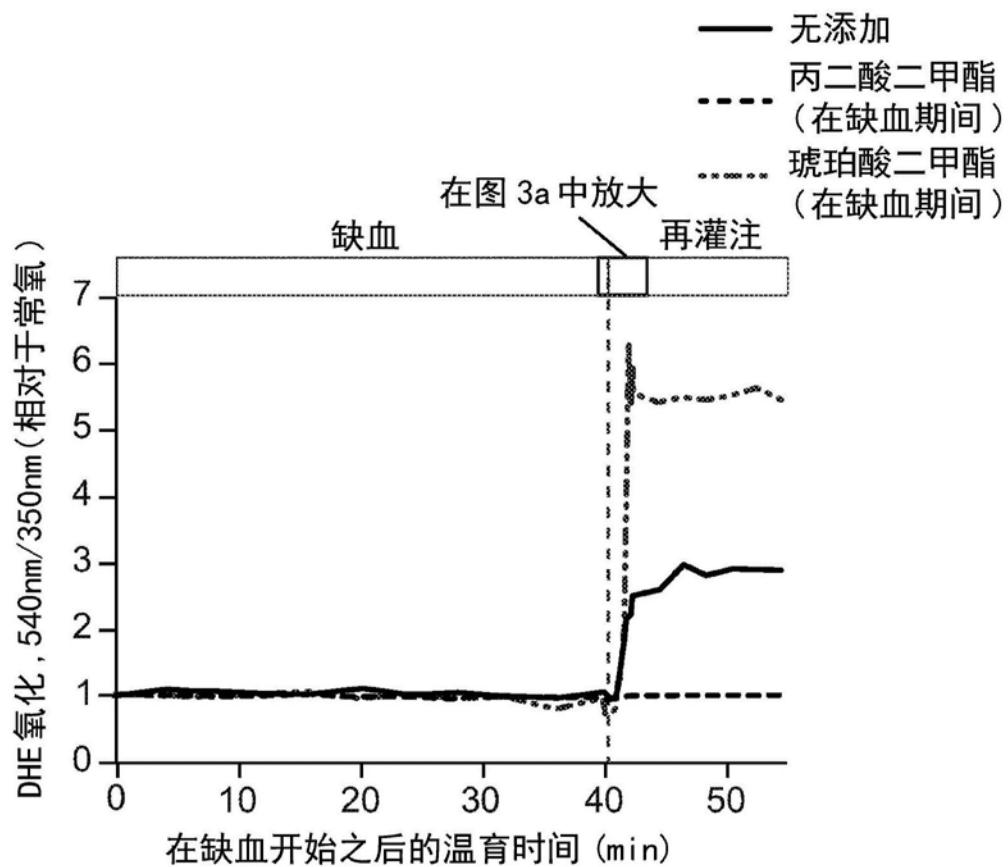


图13

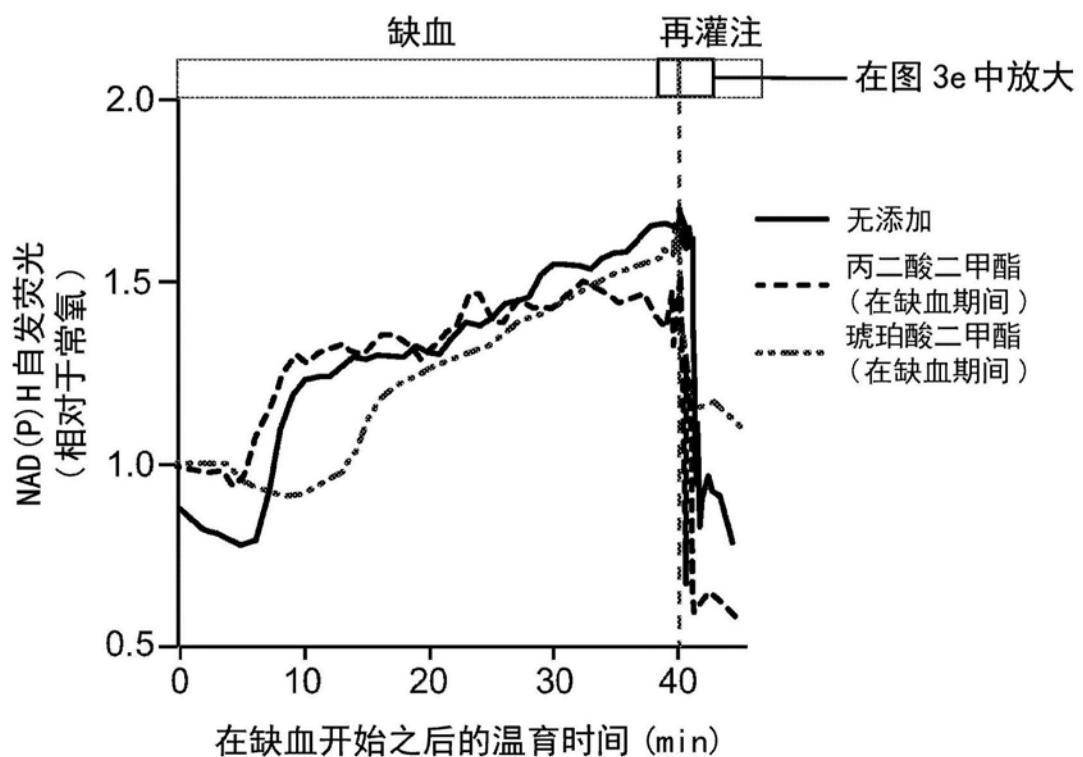


图14

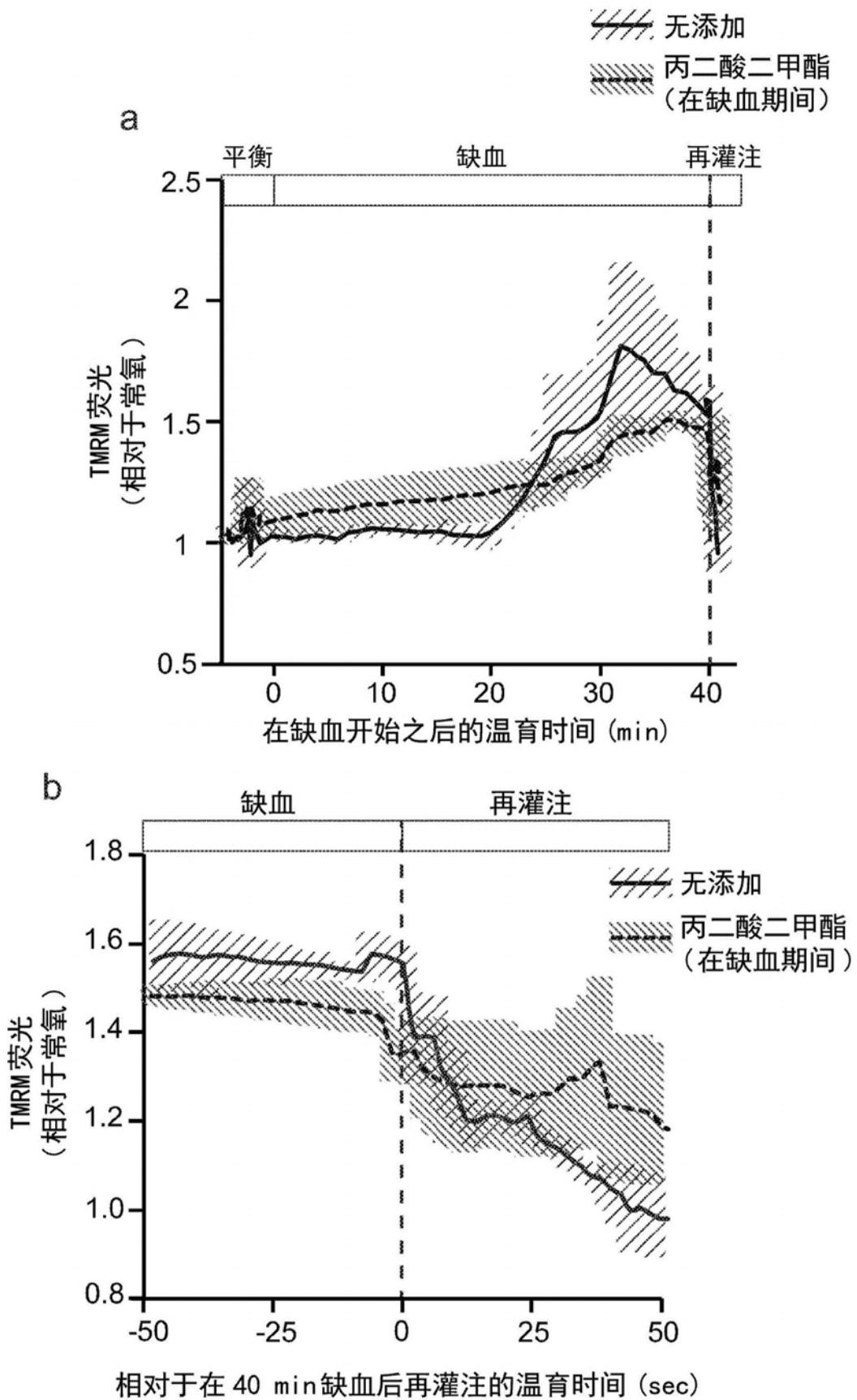


图15