

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

A61K 31/70



# [12] 发明专利说明书

A61K 38/48 A61K 38/49

A61K 31/60 A61K 31/505

A61P 9/10

[21] ZL 专利号 96193176.0

[45] 授权公告日 2003 年 11 月 5 日

[11] 授权公告号 CN 1126546C

[22] 申请日 1996.3.6 [21] 申请号 96193176.0

[30] 优先权

[32] 1995. 3. 6 [33] US [31] 08/399,262

[32] 1996. 2. 20 [33] US [31] 08/603,102

[32] 1996. 3. 1 [33] US [31] 08/609,448

[86] 国际申请 PCT/US96/03159 1996.3.6

[87] 国际公布 WO96/27380 英 1996.9.12

[85] 进入国家阶段日期 1997.10.9

[71] 专利权人 英特纽隆制剂药有限公司

地址 美国马萨诸塞

[72] 发明人 B·W·桑达吉 M·费舍尔

K·W·劳克

[56] 参考文献

<<山东医药>>31(8) 1991-08-31 张桂森等抗  
栓酶-3 胞二磷胆碱治疗脑血栓形成 33 例疗效观察

<<新药与临床>>2(1) 1983-01-31 尹宗信等  
胞二磷胆碱治疗脑损害 16 例的临床观察

审查员 王晓浒

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利  
商标事务所

代理人 唐伟杰

权利要求书 3 页 说明书 19 页 附图 1 页

[54] 发明名称 使用胞磷胆碱减少梗塞面积

[57] 摘要

本发明涉及一种减少梗塞范围的方法，该方法尤其适用于脑缺血后的脑梗塞，具体方法是在缺血后的短时间内服用胞磷胆碱并每天持续治疗到 30 天，但持续治疗以至少 6 周为较好。本方法对中风及严重的头颅创伤的治疗也是有效的，并可增加病人完全或者基本恢复的机会。此外本发明还涉及使用组合物进行联合治疗的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 胞磷胆碱或其药用盐在制备用于保护缺血发生后脑梗塞的脑组织的药物中用途。

2. 权利要求1的用途, 其中药物是口服的。

3. 权利要求1的用途, 其中使用的胆磷胆碱或其药用盐为100mg/天至4000mg/天。

4. 权利要求2的用途, 其中使用的胆磷胆碱或其药用盐为100mg/天至4000mg/天。

5. 权利要求1-4的任一用途, 其中使用的胆磷胆碱或其药用盐为100mg/天至2000mg/天。

6. 权利要求1-4的任一用途, 其中使用的胆磷胆碱或其药用盐为100mg/天至1000mg/天。

7. 权利要求1-4的任一用途, 其中使用的胆磷胆碱或其药用盐为500mg/天。

8. 权利要求1-4的任一用途, 其中使用的胆磷胆碱或其药用盐为500mg/天, 但分二次。

9. 权利要求1-4的任一用途, 其中缺血发生在脑中。

10. 权利要求1-4的任一用途, 其中缺血发生在人中。

11. 权利要求1-4的任一用途, 其中缺血指脑部缺血, 头部损伤或中风。

12. 权利要求1-4的任一用途, 其中首次剂量的胞磷胆碱或其药用盐在缺血发生后的24小时以内给予, 随后剂量的胞磷胆碱或其药用盐给予至少一星期。

13. 权利要求12的用途, 其中首次剂量的胞磷胆碱或其药用盐在缺血发生后的12-15小时以内给予。

14. 权利要求13的用途, 其中首次剂量的胞磷胆碱或其药用盐和随后剂量的胞磷胆碱或其药用盐给予至少二星期。

15. 权利要求14的用途, 其中首次剂量的胞磷胆碱或其药用盐和

随后剂量的胞磷胆碱或其药用盐给予至少 4 星期。

16. 权利要求 15 的用途, 其中首次剂量的胞磷胆碱或其药用盐和随后剂量的胞磷胆碱或其药用盐给予至少 4-8 星期。

17. 权利要求 16 的用途, 其中首次剂量的胞磷胆碱或其药用盐和随后剂量的胞磷胆碱或其药用盐给予至少 5-8 星期。

18. 权利要求 17 的用途, 其中首次剂量的胞磷胆碱或其药用盐和随后剂量的胞磷胆碱在一定周期每天给予一次或多次。

19. 权利要求 18 的用途, 其中首次剂量的胞磷胆碱或其药用盐和随后剂量的胞磷胆碱在一定周期每天给予二次。

20. 胞磷胆碱与至少一种选自 t-PA、链激酶、尿激酶, 阿斯匹林或潘生丁的辅助治疗剂或它们的不同药用盐在制备用于保护缺血后脑梗塞的脑组织的药物中用途。

21. 权利要求 20 的用途, 其中在缺血发生后 24 小时以内给予首次剂量的胞磷胆碱和至少一种选自 t-PA、链激酶、尿激酶, 阿斯匹林或潘生丁的辅助治疗剂, 或它们的不同药用盐。

22. 权利要求 20 的用途, 其中使用首次剂量及一或多个随后剂量的胞磷胆碱其药用盐, 使用一或多个随后剂量的所述至少一种选自 t-PA、链激酶、尿激酶, 阿斯匹林或潘生丁的辅助治疗剂或其药用盐, 或共同使用一或多个随后剂量的胞磷胆碱和至少一种选自 t-PA、链激酶、尿激酶, 阿斯匹林或潘生丁的辅助治疗剂或它们的不同药用盐。

23. 权利要求 21 的用途, 其中使用首次剂量及一或多个随后剂量的胞磷胆碱其药用盐, 使用一或多个随后剂量的所述至少一种选自 t-PA 链激酶、尿激酶, 阿斯匹林或潘生丁的辅助治疗剂或其药用盐, 或共同使用一或多个随后剂量的胞磷胆碱和至少一种选自 t-PA、链激酶、尿激酶, 阿斯匹林或潘生丁的辅助治疗剂或它们的不同药用盐。

24. 权利要求 20-23 任一的用途, 其中在缺血发生后 12-15 小时以内使用首次剂量的胞磷胆碱和至少一种选自 t-PA、链激酶、尿激酶, 阿斯匹林或潘生丁的辅助治疗或它们的不同药用盐。

25. 权利要求 20-23 任一的用途, 其中首次剂量的胞磷胆碱和至

少一种选自 t-PA 链激酶、尿激酶，阿斯匹林或潘生丁的辅助治疗剂或它们的不同药用盐是一起或按顺序使用的。

26. 权利要求 20-23 的任一用途，其中随后剂量的使用或共同使用为至少 4 星期。

27. 权利要求 20-23 的任一用途，其中随后剂量的使用或共同使用为至少 4-8 星期。

28. 权利要求 20-23 的任一用途，其中随后剂量的使用或共同使用为至少 6 个月至一年。

29. 权利要求 20-23 的任一用途，其中首次剂量的使用或随后剂量的使用或共同使用为每天一或多次。

30. 权利要求 29 的用途，其中首次剂量的使用或随后剂量的使用或共同使用为每天两次。

31. 权利要求 20-23 的任一用途，其中缺血发生在脑中。

32. 权利要求 20-23 的任一用途，其中缺血发生在人类。

33. 权利要求 20-23 的任一用途，其中缺血指脑缺血，头部损伤或中风。

34. 权利要求 20-23 的任一用途，其中第二治疗剂为 t-PA，链激酶或尿激酶。

35. 权利要求 20-23 的任一用途，其中第二治疗剂为阿斯匹林或潘生丁。

## 使用胞磷胆碱减少梗塞面积

### 本发明的领域

本发明涉及减少缺血后梗塞范围尤其是脑梗塞范围的一种方法。在减少梗塞面积的同时，由于可能还有帮助受损组织修复的功能，所以增加了丧失关键血流供应后如中风后恢复的可能性。更具体地讲，本发明涉及在一个新的治疗方案中使用胞磷胆碱(胞昔-5'-二磷酸胆碱或者 CDP-胆碱)减少脑梗塞面积并增加完全或明显恢复的机会。

### 本发明的背景

大脑由于其存活及功能方面的原因较其它组织更需要恒定的有氧血流供应。虽然大脑只占体重的 2%，但是它却接受心脏输出血量的 15%并消耗全身所需氧的 20%。此外，大脑还需要恒定的血流供应以提供葡萄糖，因为葡萄糖是大脑的主要能量底物，其可产生高能磷酸化物如 ATP。

缺血是指组织丧失血流。脑缺血是指供应大脑的动脉血流被阻断或者减少，通常是由于血凝块(血栓)或者其它东西(栓子)阻塞动脉所致。局部血管区域血流的丧失称为局部缺血，整个大脑血流的丧失则为脑缺血。

一旦丧失血流，即没有氧气及葡萄糖的供应，脑组织可出现缺血性坏死或者梗塞。由此导致的细胞变性及死亡的代谢变化有：因 ATP 耗竭而致的能量障碍；细胞酸中毒；谷氨酸释放；钙离子内流；刺激膜磷脂变性及随后产生的游离脂肪酸聚集；自由基产生。

基于对上述变化的了解，研究者已经在尝试对一些类型的缺血损伤使用例如钙离子通道阻滞剂，谷氨酸及甘氨酸拮抗剂，CDP-胺类，自由基清除剂/抗氧化剂，全氟烃及溶栓剂以改善脑血流供应及/或神经系统情况，这些制剂的疗效是多种多样的。的确，有些血管扩张剂可以改善血流供应，所以也可用作抗缺血制剂。然而，没有一种制剂可以减少梗塞面积，尤其是中风病人的梗塞面积。虽然有些研究认为钙通道拮抗剂可以减少梗塞

范围, 但是这些研究的结果尚不一致, 并且还有一些意想不到的副作用, 如脉压或者灌注压减小. 可参见如 Kaste, M. et al. *Stroke* (1994) 25:1348-1353.

更具体地讲, 在某些特定的实验条件下, 谷氨酸拮抗剂可减少梗塞的面积, 可参见文献如 Olney, J.W. et al. *Science* (1991) 254:1515-1518. 然而大多数这类化合物可引起大脑空泡形成, 并且还可引起动物和人的苯环利定样主观症状. 摄入苯环利定可引起情绪兴奋, 精神焦虑, 情绪不稳定及长期精神病.

自由基清除剂/抗氧化剂为一组种类各异的化合物. 总的来讲, 这类化合物减少梗塞面积的作用不是很一致. 例如, 已经发现超氧化物歧化酶抑制剂只有在脑室内注射的情况下才可减少梗塞面积. 参见文献 Kinouchi, H. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1991) 88:11158-11162. 另外还发现其它化合物如 LUBELUZOLE 在临床上也有疗效, 但安全剂量范围很窄. 参见文献 Diener, H.C. et al. *Stroke* (1995) 26:30.

虽然, 全氟烃对缺血性中风有一定疗效, 但由于这类化合物的半衰期很长, 故在使用时须直接注入脑脊液中. 此外还观察到这类化合物可引起性腺肥大. 参见文献 Bell, R.D. et al. *Stroke* (1991) 22:80-83.

溶栓剂如 t-PA (组织纤溶酶原激活剂), 链激酶, 尿激酶也有希望用来治疗缺血. 然而, 这类制剂有增加颅内出血的倾向, 这就可以导致死亡率增加. 参见文献 del Zoppo, G.J. et al. *Seminars in Neurology* (1991) 11(4):368-384; The Ancrod Stroke Study Investigators, *Stroke* (1994) 25:1755-1759; Hacke, W. et al. *Stroke* (1995) 26:167. 另外, 由于该类制剂须在中风发生最初的三个小时内使用, 这也限制了这些制剂的有效性.

胞磷胆碱单钠是胞苷-5'-二磷酸胆碱 (CDP-胆碱) 的一种外源形式. 外源性 CDP-胆碱是膜卵磷脂生物合成中的关键中间产物, 它对维持细胞完整性的动态调节非常重要. 磷脂对维持神经元的功能也是非常重要的, 而缺血时可导致膜降解.

已有临床实验对胞磷胆碱进行了非常详尽的研究. 这些实验的结果显示其可改善各种临床症状, 包括头痛, 眩晕, 运动失调及失眠. 这些实验

还显示其可改善运动功能，减少中风后遗症。可是，在这些实验中胞磷胆碱仅用于可能患中风的恢复期病人，这种治疗是在推测的缺血情况发生后进行的。这些实验还表明中风及头颅创伤的病人可以耐受数周剂量范围在250 mg/天到1000 mg/天的胞磷胆碱治疗。

胞磷胆碱的所有治疗效果可能与增加缺血大脑中的磷脂合成从而稳定细胞膜有关，本发明者认为以前的研究并没有意识到这一点，因为以前的研究只是在缺血发生后才使用胞磷胆碱，而且治疗的目的也只是促进病人的恢复。另外，这些治疗的时间也不够长。

中风是一种危害极大的疾病，在美国每年大约有500,000人患此病。临床医生仅靠支持措施及非特异制剂如类固醇和甘露醇来减少脑水肿。中风病人中有25%到50%的人瘫痪，所以目前迫切需要改进治疗这些病人的方法。

虽然已有研究显示如果能在中风后的最初的3小时内通过静脉给予溶栓剂治疗会有一些的疗效，但是如果有一种口服药物在中风后24小时内给予，并会在中风后3个月改善神经系统的情况，那么这种药物治疗会成为治疗中风的重要新式武器。

## 本发明概述

本发明涉及一种减少因缺血如脑缺血而致梗塞体积，尤其是脑梗塞体积的方法，有多种疾病可引起缺血，如缺血性中风，这种方法为给予病人有效剂量的胞磷胆碱或者其药用盐。这类疾病包括有：血栓或者出血性中风，脑血管痉挛，低血糖，心脏停跳，癫痫状态等，另外还可包括精神分裂症，癫痫，神经变性疾患，老年性痴呆和亨廷顿舞蹈病。

本发明还涉及使用胞磷胆碱制备减少梗塞体积，尤其是脑梗塞体积的药物。其包括是将有效剂量的胞磷胆碱与药用载体混合。

给予有效剂量的胞磷胆碱减少梗塞体积的这种方法应在缺血后短时间内最好是24小时内进行。随后还应给予一段时间的胞磷胆碱。一般至少大约一周(5-10天，以至少7天为较好)，以几周到数周为最好(如3-8周，以至少6周为较好)。剂量可在一定的范围内变化。一般地来讲，每天可以一次或者多次服用100-2000 mg胞磷胆碱。在治疗期间以一天一次给药为较

好。每天一次给药量以 500-1000 mg 为较好，但以 500 mg 为更好。另外，上述药物的单剂量每天也可多次给予，如需要也可一天两次。

胞磷胆碱对于减少由缺血引起的梗塞体积要较其它制剂有更多的优点。由于其是一种内源性化合物，胞磷胆碱本身是很安全的。胞磷胆碱具有低毒且治疗指数高的特性。

胞磷胆碱的另一个优点是它具有多种作用机制。虽然胞磷胆碱对于减少梗塞大小的各种机制目前尚不清楚，但胞磷胆碱及其水解产物——胞苷和胆碱——对于膜形成及修复过程中磷脂的产生起很重要的作用。另外，这些化合物还可影响一些重要的代谢功能，如核酸及蛋白质的形成，神经递质乙酰胆碱的合成。参见文献 Ulus, I. H. et al. Brain Research (1989) 484: 217-227。这样在缺血的情况下，胞磷胆碱可有如下功能：(1) 通过提供维持膜需要的底物来稳定膜；(2) 通过提供重要的膜形成底物修复受损的膜；(3) 通过提供形成乙酰胆碱所需的底物恢复神经元功能。此外与其它已被提出的治疗制剂不同，胞磷胆碱不仅可减少初始的梗塞体积，还可修复已受损的区域。

这样本发明的其中一个目的是提供一种方法以增进中风及头颅损伤患者的恢复。所以本发明的另一个目的是在缺血发生的很短时间内，以 24 小时内为较好给予患者胞磷胆碱。当然胞磷胆碱的首剂最好在缺血后的 12 小时到 15 小时内给予。

另外，本发明还有一个目的就是提供一种用来减少病人梗塞体积的方法，这些疾病包括有缺血性中风，头颅创伤或者可引起器官组织血流丧失的任何疾病。

在读了上述的讨论以及下面有关本发明优选实施方案的其它详尽的说明后本领域普通技术人员将会清楚本发明的各种目的。

#### 附图的说明

图 1 所示为载体对照组，100 mg/kg 胞磷胆碱及 500 mg/kg 胞磷胆碱治疗组动物的梗塞体积棒状图。数值为均数+标准误 (SD)。

#### 优选实施方案的详细描述



本发明为一种减少梗塞体积的方法，该方法是在缺血发生后的很短的时间里，每天给予一到四个剂量的胞磷胆碱或者其药用盐，每个剂量约从100 mg到2000 mg，随后持续使用一周(如7天)到数周，一般4到8周，以5-8周为较好，但最好是持续使用至少6周。

不拘泥于理论，胞磷胆碱应至少有两个作用机理：限制如中风或严重头颅创伤所引起的脑损害以及帮助受损的神经组织进行修复。

现认为给予胞磷胆碱可通过防止毒性游离脂肪酸的聚集来限制梗塞或者受损组织的范围。此外还认为给予胞磷胆碱后，它可分解成两种成分，胞昔和胆碱。而这两种成分是合成细胞膜所需的底物。另外还推测为使大脑功能正常，因中风而受损的神经细胞须合成新的膜物质。正象如下所述的，中风动物模型临床预实验显示给予胞磷胆碱可明显地减少梗塞体积。这一结果得到了下面的一个有关人的临床调查的证实，在这项调查中，所选的一组早期给予胞磷胆碱治疗的病人均经过核磁共振影像技术的检查。

本发明的目的是使用胞磷胆碱这样一种新的重要的方法减少因脑缺血引起的梗塞体积。虽然认为稳定膜对于缺血是有益的，但目前还未完全证实稳定膜可以减少梗塞体积。本发明意外地发现使用胞磷胆碱仅7天即可明显地减少梗塞体积，其机理可能是由于改变卵磷脂合成从而影响膜形成所致。

在一例通过缝术阻断大脑中动脉(MCA)而造成前脑暂时缺血的大鼠模型中，可证实胞磷胆碱对大脑的保护作用。在试验中与对照相比，采用500 mg/kg的胞磷胆碱治疗可显著地减少平均梗塞体积。

胞磷胆碱一般是以药用盐的形式经口给予。一般采用胞磷胆碱的单钠盐，因这种形式很容易达到药用纯度。

如上所述，基于本发明的治疗应至少在缺血发生后约24小时内进行，以发病后12到15小时内进行治疗为较好，但发病后越早治疗越好。具体地讲，治疗应至少持续约7天，以至少持续14天为较好，但最好是至少持续约30天。

依据本发明的说明可以知道本发明发现了一种可以减少经历缺血病人梗塞体积的方法，其包括在缺血发生后的很短的时间内，一般不超过24小时，给予首剂有效剂量的胞磷胆碱或者其盐，随后至少一周持续给予有效

维持剂量的胞磷胆碱或者其盐。首剂以在缺血发生后的 12 到 15 小时内给予较好，随后至少 7 天给予维持剂量的胞磷胆碱或者其盐，但以 14 天为较好，30 天为最好。

所用的胞磷胆碱或者其药用盐的剂量每天约从 500 mg 到 1000 mg，可一次或分多次给予，以每天一到二次为较好。

本发明发明了一种治疗经历缺血尤其是脑缺血，脑创伤等病人的很好的方法。但是，应该强调首剂有效剂量的胞磷胆碱或者其药用盐应在缺血发生后尽可能短的时间内给予，而且不应超过 24 小时。

所使用剂量的范围很大。本发明中的胞磷胆碱每天可使用 100 mg 到 1000 mg，并可一到四次分别服用。例如，如果每天服用一次胞磷胆碱。可给予的剂量为 100 mg 到 4000 mg，但以每天 500 mg 到 2000 mg 为较好。在本发明的一个实施方案中每天所用的剂量为 1000 mg。

作为医用，要取得治疗效果所用的胞磷胆碱或者其盐（活性成分）的剂量依据给药途径及所治疗的特殊疾病而有所不同。对一个患有这里描述的疾病的哺乳类动物，活性成分的全身给药的合适剂量范围在每天 100 mg 到 4000 mg 之间，以每天 1000 mg 为较好，500 mg 分二次给予。每天剂量为 1000 mg 的胞磷胆碱可使血浆中的胞磷胆碱浓度达到 1.5 ng/ml，这与给予大鼠 500 mg/kg/天的胞磷胆碱所产生的血浆浓度相同，有关这些还将在实例中作进一步的阐述。然而，已有研究表明每天 500 mg 的胞磷胆碱即可得到很好的治疗效果，而同时又可减少某些病人可能出现的眩晕副作用。

在本临床调查中，有二百五十九名病人在缺血性中风发生 24 小时内接受治疗。病人被随机地分在安慰剂治疗组或者三个口服治疗组的一个组（每天 500 mg，1000 mg 或者 2000 mg），治疗持续六周，随后再监测六周。经过 Barthel 指数评估，中风发生后 12 周主要可见神经功能的改善。

每天接受 500 mg 或者 2000 mg 胞磷胆碱治疗的病人，依据 Barthel 指数评估，在 12 周要比接受安慰剂治疗的病人有明显的改善 ( $p < 0.05$ )。每天 1000 mg 治疗组有效性评估未见有统计学差异，虽然在这组病人中人数统计的失调及指标变化可完全解释这一现象。

此外，以另一种著名的 Ranking 分级法进行评估，经胞磷胆碱治疗的

病人其全面的神经系统的状况要较安慰剂治疗的病人有明显地改善 ( $p < 0.04$ ).

Barthel 指数采用 100 分分级。95 或者大于 95 分为中风完全或者几乎完全改善。总之, 中风后 12 周, 经安慰剂治疗的病人中有 33% 分数大于 95, 而经每天 500 mg 的胞磷胆碱治疗的病人中有 53% 分数大于 95 ( $p < 0.04$ ).

以另一个结果分级, 即 NIH 分级结果表明在中风后 12 周经胞磷胆碱治疗的病人中有 34%, 而经安慰剂治疗的病人中只有 16% 获得功能完全或者大部分恢复, 分数以小于或者等于 1 表示 ( $p < 0.04$ ).

四个治疗组在死亡率上无明显差别。副作用及实验室检查的初步分析表明病人对三个胞磷胆碱的治疗量均可很好地耐受。胞磷胆碱治疗组病人与安慰剂治疗组病人唯一的差别是眩晕及意外受伤如摔倒机会增加。但在 500 mg 胞磷胆碱治疗组的病人在这些指标上与安慰剂组没有明显区别。

每天给予 500 mg 的剂量并起到疗效, 但与安慰剂组比较药物的副作用没有明显的差异。本研究显示每天 500 mg 为适宜的剂量。

虽然活性成分单独服用是可能的, 但还是以活性成分的制剂形式为较好。

适于口服的活性成分制剂可以是分个单位的形式, 如胶囊, 扁胶囊, 片剂或者锭剂; 也可以是经再组成的粉末或者颗粒形式; 也可是水或者非水的溶液或者混悬液形式; 也可是油水或者水油的乳剂形式。另外, 活性成分也可为丸剂, 药糖剂或者膏剂的形式。

适于非口服给药的活性成分的制剂应包括活性成分无菌及液化处理。制剂可以是单位剂量的形式并可通过已知的药理学上的任何一种方法来制备。

除了含有标准的及已知的药用载体及/或者赋形剂, 上述的制剂也可含有其它的有治疗活性的物质。因而, 本发明还可考虑联合治疗计划, 也就是将胞磷胆碱及至少一种辅助治疗剂或者其相应的药用盐一起服用。

可考虑作为辅助治疗剂有许多种类。这些制剂包括抗血小板药物(如白功击素 A (Alboaggregin A), BB-2113, BN-50726, BN-50739, 考塞温 M' (Corsevin M'), C68-22, Integrelin, KB-3022, Linotroban, 血小板因子 4, 星形孢菌素, S-1452, 噻氯吡啶, TP-9201 等), 抗凝物质(如 $\alpha$ -1

抗胰酶, 抗凝血酶 III, 抗凝血酶多肽, 阿加曲班, 凝血因子 Xa, CTC-110, CTC-111 及其它蛋白质 C 产物, CX-398, Deltaparin, Danaproid 钠, 依诺肝素, 因子 XIIa 抑制剂, Fraxiparin, 肝素, 水蛭素, Hirugen, Hoe-203, HV-1, ITF-300, 及 ITF-1300, 单克隆抗体, ONO-3307, 过硫化 LMW 肝素, Raviparin 钠, rTAP, R-020, SC-597, 凝血调节蛋白, TMD1-105 等), 溶栓及其相应制剂(如 Kabi-2161, Kunitz 蛋白酶抑制剂, 纤溶酶原激活剂, 纤溶酶原激活抑制剂, 组织纤溶酶原激活剂等), 抗缺血及神经保护制剂(如兴奋作用的抑制剂, 氨基酸, ACEA-1021, ACPC, Aptiganel, BW-619C, CNS-1145, CNS-1505, CPC-71 及 CPC-702, 右啡烷, 右美沙芬, Eliprodil, ES-242-1, FPL-15895, FR-115427, GP-1-4688, L-687414, L-689560, L-695902, LY-104658, LY-235959, LY-274614, LY-293558, 美金刚, NNC-07-9202, NS-257, NPC17742, Protara, 立马醋胺, 利芦塞唑, SDZ EAA 494, Selfotel, SYM-1010, SYM-1207, YM-90K, MK-801 等)。

与胞磷胆碱一起使用的治疗制剂还有钙通道拮抗剂(如 AJ-394, AK-275, 钙蛋白酶抑制剂, CD-349, CLENTIAZE, CNS-1237, CNS-2103, CPC-304 及 CPC-317, 达唑地平 (DAZODIPINE), 地波地尼 (DIPERDINENE), 依莫帕米, 法修地尔 (FASUDIL), 拉西地平, 利法瑞嗪 (LIFARIZINE), 老莫瑞嗪 (LOMERIZINE), 镁, MDL: 28170, NB-818, 尼伐地平, 尼莫地平, NS-626 及相应的化合物, SM-6586, SNX-111, S-312-d, U-92032, UK-74505, US-035 等), 作用于一氧化氮的制剂, 作用于其它神经递质的制剂(如  $\alpha_2$ -受体的治疗药物, CV-5197, 多巴胺受体, 艾那道林 (ENADOLINE), 拉齐百迈得 (LAZABEMIDE), 米尔那西元 (MILNACIPRAN), 纳美芬, RP-60180, SR-57746A, 突触摄取拮抗剂等), 细胞因子, 激素及相关产物(如 AN-100225 及 AN-100226, 脑衍化神经营养因子, 降钙素基因相关肽, CEP-075 及相关化合物, 睫状神经营养因子, 内皮细胞因子, 内皮素抑制剂, PR-139317, 白介素-1 受体拮抗剂(脂皮质蛋白), JTP-2942, 巨噬细胞调节化合物, 运动神经元营养因子 NBI-117, 神经生长因子, 神经干细胞, 中性细胞抑制因子, NS-506, NT-3, 胞沙替瑞啉 (POSATIRELIN), 雪旺细胞促进剂, sCR1, 索吗涛鸣叮-1 (SOMATOMEDIN-1) 等), 自由基清除剂(如 EPC-K1, MCI-186, 尼卡瑞万 (NICARAVEN), 芬那唑叮 (PHENAZOVIRDIN), 瑞沙思坦丁

( RESORSTATIN ) , 路润 ( RUMBRIN ) , 超氧化物歧化酶, 泰喘拉杂得甲磺酸盐 ( TIRILAZAD MESYLATE ) , U-88999E, YISSUM PROJECT P-0619, YM-737 等), 神经节甙酯及相关产物(如 LIGA4, LIGA4, 单唾液酸神经节苷脂(GM1), ND-37, 西高昔等)。

此外其它的附属治疗制剂还包括有各种特定酶的调节剂(如 CEP-217, CEP-245, CEP-392, CNS-1531, 艾伯塞琳 ( EBSELEN ) , 艾帕尔瑞思啉 ( EPALRESTAT ) , JTP-4819, K-7259, 蛋白酶连接蛋白-1, SK-827, 酪氨酸激酶调节剂, Z-321 等), 记忆增进剂或者促智剂(如 ALORACETAM, 胆碱-L-ALFOSCERATE, DN-2574, IDEBENONE, OXIRACETAM, PERACETAM, PRAMIRACETAM, 塔克林及其类似物, VINCONATE), 有副作用的神经保护剂(如 ADEMATIONINE SULPHATE TOSILATE, ANCROD, APOCUANZINE, CPC-111, CPC-211, HSV 载体, KF-17329 及 KF-19863, LY-178002, MS-153, NICORANDIL, N-3393 及 N-3398, SUN 4757, TJ-8007, VA-045 等), 血液流变学制剂及血液代用品(如 DROTAVERINE ACEPHYLINATE, 'RheothRx' 血液代用品等)及造影或者对比制剂。

由上所述, 本发明提供一种治疗经历缺血病人的方法, 该方法为在缺血发生的很短时间内, 最好不超过 24 小时同时给予首剂有效剂量的胞磷胆碱及至少另一种辅助治疗剂或者其相应的药用盐。在首剂同时给药后, 可单独给予一次或者多次有效维持量的胞磷胆碱, 也可单独给予至少另一种辅助治疗剂或者其相应的药用盐, 另外在维持治疗时也可同时给予胞磷胆碱及辅助治疗剂。与本发明介绍的其它方法一样, 首剂联合给药可在缺血发生后的约 12 到 15 小时内进行。联合给药 这一词是指将胞磷胆碱及至少另一种辅助治疗剂或者其相应的药用盐一起服用或者依次服用。

所用的联合治疗的方法包括给予或者联合给予最好是至少 30 天的维持剂量。在本发明的具体实施方案中, 联合给药的维持量应至少进行 4 到 8 周, 但以约 6 个月到 1 年为较好。另外, 在已制定好的疗程内, 首剂治疗或者维持治疗每天可同时或者分次服用。预期联合治疗以头颅创伤及中风的疗效为最佳。综上所述, 联合治疗应包括另一种辅助治疗剂, 该制剂可为 t-PA, 链激酶, 甚至阿司匹林或者潘生丁。

因此, 有可能提供一种组合物用来治疗经历过缺血的病人, 该组合物

包括与药用载体混合的有效治疗量的胞磷胆碱及至少另一种辅助治疗剂或者其药用盐。在该组合物中，活性成分的有效量可依特定的需要而变化。但常用的范围是从约 100 mg 到 1000 mg 的胞磷胆碱及约 10 mg 到 500 mg 的至少另一种辅助治疗剂。

本发明将用下面的实例进行说明，但这些实例仅用于说明，而并非将本发明局限于这些实例的具体说明。

## 实例

### 动物实验 1

首先将大鼠的大脑中动脉 (MCA) 缝合阻塞制作前脑暂时性的缺血模型，然后通过此模型证实胞磷胆碱对大脑的保护作用。以 500 mg/kg 的胞磷胆碱进行治疗与对照组相比可明显地减少平均梗塞面积。

将 30 只体重为 280-350 克的雄性 Sprague-Dawley 大鼠随机分为三组，每组 10 只：其中 10 只动物以 500 mg/kg 的胞磷胆碱进行治疗；另 10 只动物以 100 mg/kg 的胞磷胆碱进行治疗；还有 10 只动物以胞磷胆碱的载体生理盐水进行治疗。

对所有的动物用 400 mg/kg 的水合氯醛经腹腔麻醉。用 PE-50 聚乙烯导管经左股动脉进行插管，以持续监测动脉血压及动脉血气分析样本的采取。在手术前，缺血后 1 小时，2 小时，再灌流前记录测定的结果。在手术及 MCA 阻塞期间，用恒温加热控制灯将直肠温维持在 37 °C。

如上所述，经血管将右侧 MCA 阻塞。参见参考文献 Minematsu, K. et al. Neurology (1992) 42: 235-240; Zea Longa, E. et al. Stroke (1989) 20: 84-91。简言之，经过颈中线切口暴露右侧颈总动脉及右侧颈外动脉。用 3-0 号丝线缝合远端 CCA 及颈外动脉。将 4-0 号单丝尼龙缝线 (40 mm 长) 经火加热使其一端变为圆环并在表面涂上硅 (Bayer, Leverkusen, Germany)，然后将此线经切除的 CCA 轻轻地插入颈内动脉。将圆环置于距颈动脉分叉约 17 mm 处，用缝线一端的圆环阻塞一侧的前脑动脉的近端，该动脉为 MCA 及后连接动脉的起始处。为防止出血，用 3-0 号丝线在动脉切开处远端轻轻缝合 CCA。

动物缺血 110 分钟后，经腹腔分别给予 500 mg/kg 的胞磷胆碱； 100

mg/kg 的胞磷胆碱; 或者 0.3 ml 的生理盐水载体(对照)。在组织缺血达到二(2)小时后, 开通 MCA 并去除股动脉插管, 使组织再灌注。动物麻醉恢复后允许自由地进食及饮水。此后持续 6 天重复胞磷胆碱治疗。

治疗的第 7 天, 经腹腔给予 400 mg/kg 的水合氯醛再次麻醉并断头处死动物。快速取出大脑, 检查确定无蛛网膜下腔出血, 然后沿大脑冠状面将其切成 6 片 2 mm 厚的切片。将大脑切片在 37 ℃ 的条件下在 2% 的 2, 3, 5-氯化三苯基四唑氮(TTC)溶液中孵育 30 分钟, 然后将其浸入 10% 的缓冲福尔马林溶液中进行固定。TTC 将正常脑组织(有完整细胞膜)染为红色; 缺血脑组织染为粉色; 而坏死脑组织染为白色。每只动物有 6 个脑切片行 TTC 染色, 用 Charge Couple 相机(EDC-1000HR Computer Camera, Electrim Corporation, Princeton, New Jersey)拍照, 并将影象储存在微机内。

已知脑水肿可以影响脑梗塞体积的测量, 所以采用一种图象处理软件包(Bio Scan OPTIMAS, Edmonds, Washington)进行处理以计算出矫正后的梗塞体积。矫正后的梗塞面积可通过下面的公式进行计算: 矫正的梗塞面积等于左半球面积减去(右半球面积减去梗塞面积)。矫正后的梗塞体积的计算是用矫正后的梗塞面积乘以切片厚度而得到的。

在对照组中, 10 只动物中有 5 只在 MCA 阻塞后 24 至 48 小时之间死亡。100 mg/kg 组的 10 只动物中有 5 只死亡; 其中 4 只是在 24 至 48 小时之间死亡, 而另一个是在第 5 天死亡。500 mg/kg 组中 10 只有 3 只死亡; 2 只是在 24 至 48 小时之间死亡, 而另一个是在第 6 天死亡。

如图 1 所示, 对照组平均的梗塞体积为  $243.5 + 88.6 \text{ mm}^3$  (均值+标准差); 100 mg/kg 组为  $200.2 + 19.9 \text{ mm}^3$ ; 500 mg/kg 组为  $125.5 + 45.2 \text{ mm}^3$ 。将对照组与 500 mg/kg 组比较, 平均梗塞体积有明显的差异 ( $p < 0.01$ , Scheffe's test)。虽然对照组与 100 mg/kg 组比较未见明显的差异, 但在 100 mg/kg 组梗塞体积有减少的趋势。

## 动物实验 2 - 行为

对体重为 250-300 g 的自发性高血压雄性大鼠, SHRs, 进行不同时间可逆性的大脑中动脉(MCA)及颈总动脉阻塞。简言之, 以水合氯醛麻醉动物(以 1 ml 的生理盐水溶解 0.5 g/kg 的水合氯醛一次注入腹腔, 麻醉可持续

2 小时), 将直径为 0.005 英寸的不锈钢丝线 (Small Parts Inc. Miami, FL) 置于鼻裂嘴侧的左 MCA 下, 并使之位于 MCA 主分支的近端及豆状核纹状体的远端。然后将动脉提起并顺时针旋转丝线。然后使用两个无创伤 Heifetz 动脉瘤夹阻塞左侧 CCA, 以 Vasamedics 激光血流灌注监测器测定, 发现经此处理后导致整个缺血期间梗塞核 (MCA 阻塞处背侧 4 mm) 血流减少到缺血前基值的 4-8%。在按预定的时间 0-120 分钟范围内阻塞 CCA/MCA 后, 通过先从 CCA 去掉动脉瘤夹, 然后逆时针旋转丝线并从 MCA 下将其去掉。

使用加热灯及保温毯将颞肌温度维持在  $36.5 \pm 0.3$  °C。由于设计该研究是用来分析运动功能, 所以需去除因股动脉插管而造成的创伤, 此外该创伤还可干扰行为测定。因而, 在手术中未记录血压, pH,  $PO_2$  及  $pCO_2$ 。在缺血的整个过程里及再灌注的头 2 个小时大脑的温度维持在  $36.2 \pm 0.4$  °C。

在缺血后 15 分钟, 经腹腔一次性给予 0.5-0.6 ml 用 0.9% NaCl 溶解的 CDP-胞磷胆碱。剂量为 0.5 g/kg, 随后连续 14 天每天给予相同的剂量。每天制备新鲜的 CDP-胞磷胆碱溶液。对照组大鼠仅以盐水代替 CDP-胞磷胆碱溶液进行注射。

所有行为测试结束后, 在缺血后 14 天进行形态测量分析。这样可使行为及组织学结果在同一个动物上进行直接的相关比较。MCA/CCA 阻塞 14 天后, 缺血大脑的主要特征是梗塞的皮质组织萎缩。所以, 缺血损伤量上的变化可通过计算同侧及对侧脑皮质体积的不同而得出。

缺血后 14 天在水合氯醛麻醉下处死动物。冷冻大脑并切成 2 mm 厚的切片。使用带有 Drexel 大学 (DUMAS) 分析器的计算机测定每个切片对侧及同侧脑皮质的面积, 并经校对以  $mm^2$  表示。皮质的体积是通过将各切片皮质面积之和乘以切片间隔的厚度而得到的。最后, 萎缩的体积是将同一只大鼠对侧皮质的体积减去同侧的体积计算而得的。对形态测量分析者并不知道治疗的计划, 即采用双盲法确保数据的可靠性。

#### 行为测定

缺血后功能结果的评估采用下面的一套测定, 该测定的这种模型已在以前的研究中有效使用过并被标准化。

#### 轮子测试

采用直径 12 英寸的大鼠跑动轮子, 轮子横档的间距为 2 mm, 轮子的



两侧用贴板封闭，只留一个可开关的结实的盖子，这样可将动物限制在轮子内侧。将鼠笼内的大鼠限制在轮子内侧，当大鼠跑动时以摄像机进行监测。观察梗塞半球对侧前爪所跑的 100 步，同时记录该前爪在跑动时在轮子横档上滑脱的次数。同样观察同侧前爪及后肢，记录每个肢体单位步数中滑脱的数值(错误)。通过从对侧错误的步数中减去同侧错误的步数得到错误的数值。在手术后的 4, 7 及 10 天每只动物每天测试一次。

#### 上肢弯曲实验

通过提起大鼠的尾巴将其提起，并将其腹侧暴露于观察者 10 秒钟。用计时器计时上肢不对称弯曲的时间。在术后的 1-14 天每天测试动物一次(每天两次实验)。

#### 布带实验

不对称实验及不对称恢复实验以前已由 Schallert 及 Whishaw 详细描述过。简言之，将一个很粘的签条(环状直径 1 cm)固定在大鼠每只前爪腕的桡骨远端区域。记录动物触及签条去掉签条所需的时间及次序(对侧与同侧)并据此估计同侧不对称性。将大一点的签条粘附于不优选的腕上并将相应较小的签条粘附于另一只腕上，根据所需签条的大小可消除偏差并同时可以量化。用来中和偏差的同侧与对侧签条片面积比值越大(从 1:1 到 1/8:15/8)，该大鼠所得的分数也越高，表明损伤也越严重。除了在手术前至少 7 天严格管理动物，预先不进行训练。手术后的 2-3 天测试每个动物(每天测试一次)。

在外科手术前后，将所有动物饲养在各自的鼠笼内，这样可减少外界环境对大鼠的刺激。至少需两周的适应期，在此期间动物由同一个研究者管理，该研究者每天进行所有的行为测试(每只动物每天至少 10 分钟)。该适应期是要减少接触动物时所引起的刺激反应，尤其是在进行布带实验时适应期尤为重要。采用双盲法，研究者在进行行为实验时不知道治疗的分组情况。

#### 综合的行为异常分数

行为异常的分数是通过计算三个行为测试的综合分数而得到的，包括错误数量(滑脱数/步数；轮子实验)，时间(上肢弯曲)，或者分数(去除偏

差所需的表面积; 布带实验), 通过上述 3 个实验来定量行为功能的异常。

首先, 计算出每只动物在每个实验中的整个时间内测试的均值。在每个行为测试里, 平均 2 个最低值, 并将其从 2 个最高平均值中减去。然后将均值范围分为 5 个等份, 随后从 0-4 计分。其次, 计算所有 3 个实验的综合分数, 每个实验占相同的权重。这样每个大鼠依据 3 个不同的实验进行记分并由此得到综合分数, 最大分数(缺陷)为  $3 \times 4 = 12$ 。

### 缺血时间与梗塞体积或者行为异常的相关性

通过使用行为异常分数及计算出的萎缩体积( $\text{mm}^3$ )得到未经治疗及经 CDP-胞磷胆碱治疗动物的缺血时间与行为异常分数或者萎缩体积的相关性。

将综合分数值及萎缩体积输入计算机, 并通过一种计算机曲线软件程序 ALLFIT 制成一种描述行为异常/萎缩体积及缺血时间关系的曲线, 依据曲线中因缺血导致的最大行为功能异常/最大萎缩体积( $BD_{\text{max}} \setminus Vol_{\text{max}}$ ), 引起半数最大行为功能异常/萎缩体积( $BD_{50} \setminus T_{50}$ ), 及曲线的形态和坡度来进行分析。本分析中采用的计算机程序(ALLFIT)使用逻辑功能  $y = (a - d) / [1 + (x/c)^b] + d$ , 其中  $y$  为行为异常分数,  $x$  为缺血时间,  $a$  为  $x=0$  时的反应,  $d$  为  $BD_{\text{max}} - Vol_{\text{max}}$ ,  $b$  为决定曲线陡度的因子,  $c$  为  $BD_{50} / T_{50}$ 。该程序是用来同时适应一组 S 型剂量效应曲线而设计的, 程序是由 NIH 的理论及物理生物学实验室得到的。

### 统计学分析

计算组间  $BD_{50} / T_{50}$  及  $BD_{\text{max}} - Vol_{\text{max}}$  的统计学差异, 计算中采用 ALLFIT 所提供数值相应的对数均数及标准误, 并采用 student's t 检验进行评估。

### 结果

#### 组织学-萎缩体积的分析

在盐水对照组及 CDP-胞磷胆碱治疗组相应的分别有 18 及 23 只大鼠。在导致半数最大萎缩( $T_{50}$ )的再灌注之前服用 14 天的 CDP-胞磷胆碱可明显地延长缺血的时间。

由 ALLFIT 程序计算出的对照组(未治疗组)动物的  $T_{50}$  为  $38.3 \pm 5.9$  分

钟, 而经 CDP-胞磷胆碱治疗的动物为  $60.5 \pm 4.3$  分钟。在此模型中, CDP-胞磷胆碱没有减少最大梗塞体积; 对照组及 CDP-胞磷胆碱治疗组  $Vol_{max}$  相应地为  $103.3 \pm 13.6 \text{ mm}^3$  及  $101.6 \pm 11.4 \text{ mm}^3$ 。

上述结果表明 CDP-胞磷胆碱主要是在导致亚最大损伤的缺血比较短的时间里服用才可减少形态学损伤。这些结果还是强调胞磷胆碱应在缺血发生后短时间内, 即尽快地服用。

### 行为分析

实验分析了 16 只未经治疗及 21 只经胞磷胆碱治疗的大鼠。与在组织学分析中所观察到的类似, CDP-胞磷胆碱治疗可明显地延长  $BD_{50}$ 。对照组大鼠的  $BD_{50}$  为  $41.9 \pm 4.6$  分钟。而经 CDP-胞磷胆碱治疗后可延长  $BD_{50}$  约 30 分钟, 为  $72.9 \pm 24.5$  分钟。

CDP-胞磷胆碱治疗对  $BD_{max}$  无明显作用; 在对照组及 CDP-胞磷胆碱治疗组其值相应地为  $8.5 \pm 0.7$  及  $10.1 \pm 4.0$ 。

上述数据表明通过较长时间的 CDP-胞磷胆碱治疗由于延长了  $T_{50}$  及  $BD_{50}$  因而明显地改善了组织学变化及功能的恢复。可是, 在该实验中 CDP-胞磷胆碱对  $Vol_{max}$  及  $BD_{max}$  没有影响。这些结果表明 CDP-胞磷胆碱是在亚最大缺血损伤时使用效果较好, 在本实验中导致亚缺血最大损伤的时间是 30-75 分钟。

### 双盲, 安慰剂-对照的临床实验

基于对两个临床实验的总结及以往文献中的 17 篇报道, 在中风及头颅创伤病人中一致认为可以很好地耐受 5 天到 8 周疗程的胞磷胆碱(剂量范围为 250 到 1000 mg/每天)。基于对文献中 50 多个实验的总结, 一致认为在其他人群中也可很好地耐受胞磷胆碱。除了一些因严重缺血导致的死亡病例(这在人群研究中是可以预测的), 在临床中未见有大的副作用。在临床的实验室检查, 生命体征或者心电图检查中均未见大的改变。

本实验是设计用来评估在急性缺血性中风的病人中给予三种剂量的胞磷胆碱(500 mg, 1000 mg 及 2000 mg)及安慰剂对疾病所产生的作用。

### 剂量使用说明/计划

如果随机地在下午 3:00 以前病人进入本研究则立即给予 2 片药, 在下顿饭吃饭时再服用 2 片药, 这样在进入研究的当天共服用 4 片药。否则, 病人进入的当天只给 2 片药(晨量), 1 天(晚上的量)的药停止使用。在本研究剩下的时间里, 对病人早晨给予 2 片药并晚上给予 2 片药(可参见下面的治疗计划)。对于不能服用本研究的整个药片的病人, 可采用其它可接受的给药途径包括鼻饲或者将药片碾碎并与食物或者饮料一起服用。

### 治疗时间

研究药物每天服用 2 次(早晨 2 片及晚上 2 片)共服用 6 周。

胞磷胆碱各种剂量的效果采用 Barthel 指数来评估。

在本研究期间采用的辅助有效性评估包括 12 周时的 Barthel 指数(至少 61 分才可认为有效), 修改的 Rankin 分数, NIH 中风分级, NIH 中风运动项目分级, 出院所需的时间, 死亡率, 及其它种类的神经精神分数。NIH 中风分级及 Barthel 指数是有关日常生活中中风症状及功能情况的标准测定。

双盲, 安慰剂-对照的实验表明以 NIH 中风分级评价, 中风后 12 周每天服用 500 mg 胞磷胆碱的病人功能基本恢复或者完全恢复要较服用安慰剂的病人多 2 倍, 而以 Barthel 指数评价为多 1.6 倍。

### 扩散加权 MRI (DWI) 研究

在缺血发生的数分钟内, DWI 可发现缺血损伤的区域, 并且动物模型证实使用 DWI 可监测神经保护性治疗。以安慰剂作为对照的实验表明, 胞磷胆碱可减少如上所述的大鼠暂时性阻塞模型的梗塞范围。

在本研究中, 对 III 期双盲安慰剂对照实验中的 12 例病人进行了研究, 病人在在急性中风期(发病 24 小时内, MCA 供血区域), 服用胞磷胆碱(每天口服 500/1000/2000 mg 共 6 周)。整个实验的设计及结果已经在上面叙述过。在急性期及慢性期的不同时间里进行多层次回声平面的 DWI 及 T2-加重 MRI。也就是说, 在基线水平(即推测的中风时间, 症状发生后 8 到 24 小时之间)进行 DWI 扫描, 并且在治疗开始后再进行至少一次的照相。跟踪

的平均时间为 9.3 周(范围在 4.1-26.3 周; 中间数为 6.6 周)。损伤体积的测定是由 3 名不知道病人治疗及临床情况的医生经 2 次测定而得到的结果。然后得到基线扫描及治疗后第 2 次扫描梗塞体积变化的百分比。

4 例安慰剂治疗的病人中有 3 人显示损伤有扩大, 而经胞磷胆碱治疗的 8 例病人中有 7 人显示损伤体积减少(4/5 服用 500 mg; 3/3 服用 2000 mg)。基于剂量的卡方检验有统计学意义  $p=0.031$ 。Fisher's Exact 检验值为  $p=0.067$ 。将这些测定与以往以相同方式收集到的若干对照病人( $n=31$ )比较。31 例病人中有 22 人梗塞体积增加, 7 例梗塞体积减少, 2 例无变化。本研究中 4 例安慰剂治疗的病人中有 3 例梗塞体积增加而 1 例减少, 这与以往对照的比例相同。在本发明实际治疗的 8 例病人中(5 例 500 mg 每天服药 1 次, 3 例 2000 mg 每天服药 2 次), 7 例梗塞体积减少而 1 例增加。

使用 Fisher's Exact 检验对本发明治疗的梗塞体积减少的病人与以往对照的比例进行比较检验(即 22/7 比 1/7), 倾向于本发明的差别有显著性( $p=0.0021$ )。如采用 DWI 评价, 当缺血发生后在尽可能短的时间内使用胞磷胆碱进行治疗并将治疗持续数周, 结果表明可明显地减少梗塞体积。

### 联合治疗

对 40 到 60 只体重为 280-365 g 的未进食雄性 Sprague-Dawley 大鼠用水合氯醛(400 mg/kg 体重)经腹腔进行麻醉。在手术过程中为了维持麻醉状态, 在给予了起始剂量的水合氯醛后, 还应周期性地给予 100 mg/kg 的水合氯醛。仅在动脉阻塞的 90 分钟里保持麻醉状态。经左股静脉将导管插入下腔静脉, 以备给药用。在整个麻醉期间, 监测大鼠的体温并将体温维持在 37 °C。

采用管腔内缝术阻塞 MCA 模型, 该模型已经在其它的地方作过详细描述。参见文献 Minematsu, K. et al. Neurology (1991) 42: 235-240。简言之, 将 4-0 号单丝尼龙线经火焰加热使其顶端变为一称之为闭塞器的圆头, 然后将其经过结扎的右侧 CCA 插入颈内动脉, 再将其轻柔地插到距 CCA 分叉 17 mm 处的颅内部分。用该缝线阻塞单侧的大脑前动脉的近端, 颈内动脉的远端及 MCA 和后交通动脉的起始处。

将动物分为 4 组: ( i ) 用 NMDA 治疗, ( ii ) 盐水+胞磷胆碱治疗, ( iii ) NMDA 拮抗剂+胞磷胆碱治疗及 ( iv ) 盐水对照组。在 MCA 阻塞 5 分钟后, 对 10-15 只大鼠经静脉缓慢注射以 1 ml/kg 的生理盐水溶解的 0.5 mg/kg 体重的 MK-801 (一种 NMDA 拮抗剂)。在 MCA 阻塞后的 8 小时及 20 小时, 经腹腔给予维持剂量的 MK-801, 0.5 mg/kg。对第 2 组的另外 10-15 只大鼠与 NMDA 拮抗剂组相同, 在同样的时间给予同样量的生理盐水, 所不同的是, 在 MCA 阻塞后的 5 分钟, 8 小时及 20 小时经腹腔同时给予 500 mg/kg 体重的胞磷胆碱。在第 3 组的另外 10-15 只大鼠重复 NMDA 治疗组的治疗, 但另外也在 MCA 阻塞后的 5 分钟, 8 小时及 20 小时经腹腔给予 500 mg/kg 胞磷胆碱。在第 4 组和最后一组的其它 10-15 只大鼠, 与 NMDA 治疗组相同在同样的时间给予同样量的盐水。

动物在麻醉恢复清醒以后, 允许自由进食及饮水。在经过选择性神经系统评估后, 经腹腔再次给予 300 mg/kg 的水合氯醛麻醉动物并立即断头处死。立即将大脑取出, 仔细检查以确定管腔内缝线所致的 MCA 阻塞, 以 2 mm 的间隔沿冠状面进行切片, 在 37 °C 的温度下用 2% 的 2, 3, 5-氯化三苯基四唑氮溶液 (TTC) 对切片染色 30 分钟, 然后将其浸入 10% 的福尔马林缓冲溶液中进行固定。对每个动物以 TTC 染色的脑切片进行照相以测定梗塞的大小。采用双盲的方法对放大的照片进行评估。以 TTC 染色未将切片染红的区域被认为是梗塞的区域。梗塞体积 (mm<sup>3</sup>) 是通过计算每个动物的所有 TTC 染色切片的梗塞面积及切片间的距离积和而得到的。

通过统计学的标准检验方法来评估所监测的各组间生理学变量及梗塞面积和体积的统计学差异。如双尾概率值小于 0.05 则认为是有统计学差异。

本发明发现接受同一种类型治疗的 3 个组的大鼠其梗塞体积的减少要较对照组明显且有统计学差异。的确, 单独接受 NMDA 拮抗剂或者单独接受胞磷胆碱的两个组的大鼠的梗塞体积也较对照组有减少, 而接受 NMDA 拮抗剂及胞磷胆碱联合治疗的第 3 组大鼠疗效要好于其它组。该结果表明有明显的协同作用趋势。神经系统的评估也表明第 3 组的大鼠的分数要好于其它组的大鼠。使用上述的其它治疗剂如组织纤溶酶原激活剂 (t-PA), 链激酶及尿激酶等与胞磷胆碱联合使用亦可见类似的益处。在经过联合治疗的

首剂治疗后，还可进行一次或者多次的维持治疗，可以是单独给予胞磷胆碱。或者单独给予至少一种辅助治疗剂或者如本发明中所述的两者同时使用。

### 胞磷胆碱和阿司匹林

作为联合治疗的一部分，本发明还研究了胞磷胆碱和阿司匹林的同时给药，即在缺血发生的短时间内同时或者依次给予胞磷胆碱和阿司匹林。（实际上，只要确定中风为非出血性，而是缺血，栓塞或者其他所致，即可开始联合治疗）。依据病人个体的需要可以变化阿司匹林及胞磷胆碱的剂量。但是，一般地来讲每剂阿司匹林的量为 50 到 500 mg（以 70-300 mg 为较好），而每剂胞磷胆碱或其盐的剂量为 100-1000 mg（以 300-700 mg 为较好）。在所优选的实例中，组合物含有 70-90 mg 的阿司匹林及带有药用载体的 400-600 的胞磷胆碱或者其盐，可在中风发生的短时间内每天分 1 次或者 2 次给予。联合治疗计划应至少持续 30 天，以持续数周为较好，持续几个月则更好。为了减少组织的损伤，加大病人的恢复及降低中风等继发症的发病率，最好治疗持续 6 个月到一年。

综上所述，本发明研究了在缺血发生的短时间内同时给予胞磷胆碱及至少一种辅助治疗制剂的联合治疗。联合给药可以是同时给药或者是依次给药。如果是依次联合给药，胞磷胆碱或者其盐及至少一种辅助治疗剂最好是在缺血发生后的头 24 小时内给予。

通过上述所提供的详细说明应容易了解其它的实施方案，因为这些实施方案都在本发明的范围和精神实质内。例如，潘生丁等可以代替阿司匹林。所以，无论如何上述的实施方案不应是用来限制本发明的。

图 1

