



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1946400 B

(45) 授权公告日 2012. 05. 09

(21) 申请号 200580006633. 2  
 (22) 申请日 2005. 02. 22  
 (30) 优先权数据  
 T02004A000124 2004. 03. 01 IT  
 (85) PCT申请进入国家阶段日  
 2006. 09. 01  
 (86) PCT申请的申请数据  
 PCT/EP2005/001818 2005. 02. 22  
 (87) PCT申请的公布数据  
 W02005/084677 EN 2005. 09. 15  
 (73) 专利权人 梅迪斯蒂研究及生产股份有限公司  
 地址 意大利都灵  
 (72) 发明人 G·梅里兹  
 (74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001  
 代理人 王颖煜 黄可峻  
 (51) Int. Cl.  
 A61K 31/4545(2006. 01)  
 A61P 25/28(2006. 01)  
 (56) 对比文件  
 IS 5981548 A, 1999. 11. 09, 权利要求 1-5,  
 第 2 栏第 40-49 行.

EP 1132085 A1, 2001. 09. 12, 第 2 页 1-4 段.  
 GUAN ZHI-ZHONG 等人. Loss of nicotinic  
 receptors induced by beta-amyloid  
 peptides in PC12 cells: possible  
 mechanism involving lipid peroxidation.  
 J of Neuroscience Research 71  
 3. 2003, 71(3), 397-406.  
 Sotonyi peter 等人. Comparative study  
 on cardiotoxic effect of Tinuvin770: a  
 light stabilizer of medical plastics in rat  
 model. Toxicological sciences: an official  
 journal of the society of toxicology 77  
 2. 2004, 77(2), 368-374.  
 Francis michael 等人. Sensitivity to  
 voltage-independent inhibition determined  
 by pore-lining region of the acetylcholine  
 receptor. Biophysical Journal 74  
 5. 1998, 74(5), 2306-2317.  
 Hernandez C M 等人. Regional  
 and sub-type specific upregulation  
 of cholinergic receptors with  
 nicotine, mecamylamine and cotinine.  
 Society for neuroscience abstracts 27  
 2. 2001, 27(2), 2133.

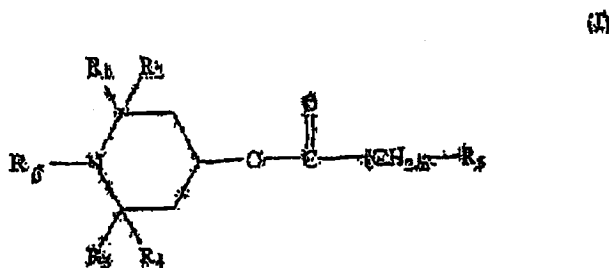
审查员 孟晋东

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 3 页

(54) 发明名称  
 N- 哌啶衍生物用于治疗神经变性疾病的应用  
 (57) 摘要  
 本发明涉及化合物、药用和兽用组合物, 以及  
 所述组合物在治疗或预防神经变性疾病和症状的  
 应用, 如帕金森氏病、阿尔茨海默氏病、缺血再灌  
 注损伤、创伤性脑损伤、HIV 引起的神经病变、唐  
 氏综合征、糖尿病性多神经病变、肌肉萎缩症、多  
 发性硬化症、亨廷顿氏病、朊病毒病、迟发性运动  
 障碍、taupathy 和脱髓鞘病, 以及其它危及生命  
 的疾病, 如心 / 肾 / 肺 / 肝 / 肠缺血再灌注损伤、  
 高血压、糖尿病、肿瘤、休克、药物和放射 ( 放疗和  
 放射防护 ) 所致毒性作用、炎症、动脉粥样硬化、

衰老、高脂血症、高胆固醇血症、癫痫和类风湿性  
 关节炎。上述所有疾病均与活性自由基过度产生  
 有关。更具体的, 本发明涉及含有来源于 N- 哌啶  
 的抗氧化剂环 ( 双 ) - 羟胺的药物组合物用于预防  
 和治疗人和动物的疾病。

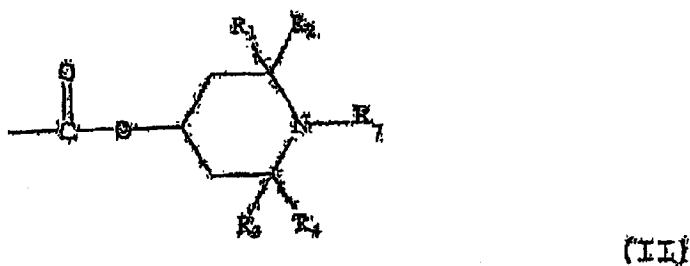
1. 如下式的化合物在制备治疗或预防神经变性疾病的兽用或人用药物组合物或药物中的应用：



其中  $R_6$  为氧或羟基,  $R_1, R_2, R_3$  和  $R_4$  彼此独立选自：

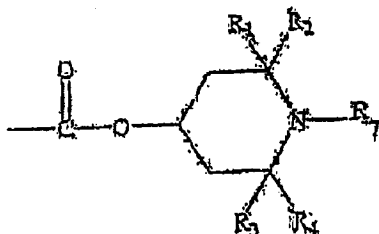
- 氢和
- 甲基,

并且  $R_5$  是：



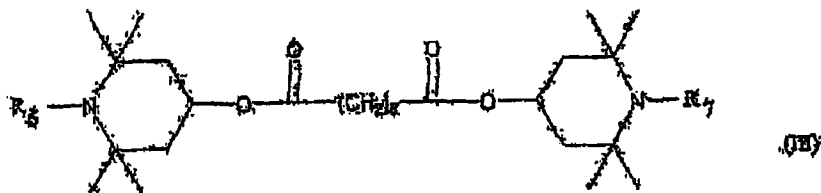
其中  $R_1, R_2, R_3$  和  $R_4$  同前面所定义,  
 $R_7$  与  $R_6$  可以相同或不同, 选自氧或羟基, 和  
 $n$  是从 6 到 10 的整数。

2. 如权利要求 1 所述的应用, 其中  $R_1, R_2, R_3$  和  $R_4$  彼此独立是甲基,  $R_5$  是：



其中  $R_1, R_2, R_3$  和  $R_4$  彼此独立是甲基,  $R_7$  为氧、氢或羟基,  $n$  为从 6 到 10 的整数。

3. 权利要求 1 或 2 所述的应用, 其中化合物的式如下：



其中  $R_6$  与  $R_7$  可以相同或不同, 选自氧和羟基。

4. 权利要求 1 或 2 所述的应用, 其中所述神经变性疾病选自：帕金森氏病和阿尔茨海默氏病。

5. 权利要求 1 或 2 所述化合物用于制备药物的应用, 所述药物用于治疗缺血再灌注引起的心脏损伤。

6. 权利要求 1 或 2 所述的应用,其中药学或兽医学组合物或药物适用于口服、肠胃外、吸入或局部给药。

7. 权利要求 1 或 2 的应用,其中药学或兽医学组合物或药物的剂型适合于以 0.01-200mg/kg 体重给药。

8. 权利要求 7 的应用,其中所述药学或兽医学组合物或药物的剂型适合于以 0.5-20mg/kg 体重给药。

## N- 哌啶衍生物用于治疗神经变性疾病的应用

[0001] 众所周知,在细胞呼吸和正常代谢过程中有规律地产生氧中心自由基 (ROS) 和氮中心自由基 (RNS),发挥重要的生理功能,如作为诱导细胞进程的第二信使 (Suzuki H. J. Free Rad. Biol. Med. 22, 269-285, 1977 ;Clement M. V. & Pervaiz S. Free Rad. Res. 30, 247-2525, 1999)。

[0002] 目前也已经发现,大量的并且越来越多的病理过程与活性自由基的产生增加有关,所述自由基如超氧阴离子 ( $O_2^{\cdot -}$ ),过羟基自由基 ( $HO_2^{\cdot -}$ ),羟基自由基 ( $HO^{\cdot}$ ),单个氧 ( $^1\Delta O_2$ ),过氧化氢 ( $H_2O_2$ ),一氧化氮 ( $NO^{\cdot}$ ),二氧化氮 ( $NO_2^{\cdot}$ ),过(氧化)亚硝酸盐和其它 ( $R^{\cdot}$ ) 自由基 (烷基  $-L^{\cdot}$ , 烷氧基  $-LO^{\cdot}$ , 过氧基  $-LOO^{\cdot}$  自由基,等)。

[0003] 过量生成的自由基,饱和了由酶系统 (超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽还原酶) 和亲水亲脂非酶系统 (辅酶 Q、泛醇、维生素 E、维生素 C、维生素 A、还原型谷胱甘肽、尿酸、类胡萝卜素等) 共同构成的抗氧化机制,产生了导致细胞死亡与组织损伤的氧化应激状态 (OSS): 自由基发作导致产生更多的 ROS, RNS 和  $R^{\cdot}$ , 即在 OSS 状态下,最初的氧化损伤会随之加重。(Diaz M. D. 等, New Engl. J. Med. 331, 408-416, 1997 ;Cerutti P. A. , The Lancet 344, 862-863, 1994 ;Giacosa A. & Filiberti R. Eur. J. Cancer Prev. 5, 307-312, 1996 ;Bruce N. A. 等 Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 90, 1915-1922, 1993 ;Albens L. 等 J. Neural Transm. (Suppl.) 59, 133-154, 2000 ;Foley M. 等 J. Neurol : (Suppl. 2) 247, 1182-94, 2000 ;Huang Z. 等. Can J. Neurol. Sci. (Suppl. 1) 30, S10 ~ 18, 2003 ;He Y. 等. J. Neurochem. 86, 1338-1345, 2003 ;Gao H. M. 等 Trends Pharmacol. Sci. 24, 395-401, 2003 ;Sekhon B. 等 Brain Res. 971, 1-8, 2003 ;Nedelovic Z. S. 等 Postgrad. Med. J. 79, 195-198, 2003 ;Arbiser J. L. Nat. Med. 9, 1103-1104, 2003 ;也可参见 **Medline<sup>®</sup>** 和 **Toxline<sup>®</sup>**)

[0004] 此外,目前已经知道,多种试图减弱导致 OSS 级联反应的治疗手段因其自身无法避免的问题妨碍或限制了它们在人和动物体内的应用。以螯合剂为例,它能够在细胞内催化不必要的氧化还原反应,与多种细胞成份结合从而很容易分解或丧失活性 (Ikeda Y. 等 Neurosurgery 24820-824, 1989 ;White B. C. & Krause G. S. Ann. Emerg. Med. 22, 970-979, 1993)

[0005] 除了与酶饱和 ( $\ll$  = 酶变率) 相关的限制因素,以及与在更加复杂和动态的 OSS 过程中存在的个别歧化反应性种类 ( $O_2^{\cdot -}$ ) 相关的限制因素外,超氧化物歧化酶的应用也面临着稳定性方面的问题 (即便在脂质体内时),根据其种类不同,半衰期从几分钟到数小时不等 ;它不能通过细胞膜,更少通过血脑屏障,并且是免疫原性的 (尽管近来采用重组人 r-h-MnSOD 的结果令人鼓舞) (Mikawa S. 等 J. Neurosurg. 85, 885-891, 1996 ;Kontos H. A. & Wei E. P. J. Neurosurg. 64, 803-807, 1986 ;Chan P. H. 等 Ann, Neur. 21, 540-547, 1987) ;最近采用乙二醇结合超氧化物歧化酶 (**Pegorgotein<sup>®</sup>**) 治疗闭合颅内损伤的多中心随机临床试验明显不可避免的没有得到所希望的结果 (Young B. 等 276, 538-543, 1996)。

[0006] 通过采用具有歧化酶催化活性,例如具有超氧化物歧化酶活性的 (模仿 SOD) 小分子量有机化合物 (如 **M40401<sup>®</sup>** 或 **M40403<sup>®</sup>**) (见美国专利 Nos. 5874 421, US5 637578

和 US5696109 ;国际专利申请 W002/28390 和 W002/058686, Samilowski W.E. 等 Nat. Med. 9, 750-755, 2003), 或者采用分离的酶活性部位 (US6117454), 均能克服运用天然酶所带来的限制, 如细胞渗透性, 特别是血脑屏障, 以及给药。

[0007] 然而, 即使采取这些策略, 收效依然有限, 因为它们只是在分子水平再现天然酶的活性; 事实上, 它们也对单个自由基种类 ( $O_2^{\cdot-}$ ) 起作用, 因此与整体导致 OSS 的其它基团 ROS、RNS 和  $R^{\cdot}$  没有催化活性。这时, 需要通过血脑屏障、而难于或不能通过血脑屏障的药物只能通过直接输注进入 CNS 或通过控释聚合植入物进行给药, 其问题是很容易想象的 (如参见 US4883666)。

[0008] 其它考虑使用的分子被称为“自旋阱 (spin-trapping) 清除剂”, 如甘菊环烃亚硝酮、NXY-059, 特别是在多种病理学过程中取得满意效果的  $\alpha$ -苯基-叔-丁基硝酮 (PBN) (Rachnilewitz D. 等 Gut 35, 1181-1188, 1994; Krishna M. C. 等, J. Biol. Chem. 271, 26018-26025, 1996; Gilgun-Sherki Y. 等 Pharmacol. Rev. 54, 271-284, 2002)。然而, 尽管它对碳中心自由基 ( $C^{\cdot}$ ) 的作用导致了相对稳定的加合反应, 但它与氧中心自由基的结合仍不能完全满意, 这使它的作用也仅限于少数自由基种类; 如果要满足其要求, 非期望的羟基自由基 ( $HO^{\cdot}$ ) 与 PBN 之间加合反应的半衰期要刚好为 40 秒 (Jansen F. G. 等 Free Rad. Biol. Med. 12, 169-173, 1992)。

[0009] 即使在断裂后, 这些非持续性的一氧化氮也能产生更多能引发或起始自动氧化反应的自由基类型。此外, PBN 不能与氮中心自由基 (RNS) 结合 ((Hensley K. 等 Int. Rev. Neurobiol. 40, 299-317, 1997)。制备了自旋阱, 它在体外稳定性更高 (Tempo, Tempol), 能与超氧自由基 ( $O_2^{\cdot-}$ ) 和羟基自由基 ( $HO^{\cdot}$ ) 结合, 能够自我再生 (即没有其它普通抗氧化剂的自杀作用) 同时阻断 Fenton's 反应, 即终止自由基反应) (Samuni 等 Biochemistry 30, 555-561, 1991; Samuni 等 J. Clin. Invest. 87, 1562-1530, 1991; Li H. 等 Free Rad. Biol. Med. 32, 712-719, 2002; Krishna M. C. 等 J. Biol. Chem. 271, 26026-26031, 1996)。然而, 这些分子在体内的保护作用由于其毒性和半衰期小于 3 分钟受到了很大限制 (Laight D. 等 Br. J. Pharmacol. 124, 238-244, 1988)。

[0010] 为了克服上述不足, 这些自旋阱 (Spin-traps) 在体内实际上是与多硝氧化的大分子 (多硝氧化人血清白蛋白, PNA) 一起使用, 这种大分子能够降低其毒性, 允许其“再循环”, 如果保持低剂量, 还能防止血管舒张作用 (Kupposomi P. et al. Biochemistry 35 7051-7057, 1996; Kupposomi P. et al., Magn. Res. Med. 40; 806-811, 1998)。当然, 由于其大小, 这些大分子仅能在细胞外间隙发挥其功能。

[0011] US5981548 描述了含有 N-哌啶衍生的环-羟胺的药物组合物治疗与自由基过量生成相关的疾病。

[0012] 本发明的第一个方面是基于对以下事实的认识: 上述 US5981548 中阐述了 N-哌啶衍生的环-羟胺可以通过血脑屏障, 因此能够用于治疗 and 预防神经变性疾病。

[0013] 在本发明的范畴内, 鉴别了 N-哌啶衍生的其它化合物, 具有治疗下述多种病理过程的药理学活性, 且到目前为止尚未用于这些药理学领域。

[0014] 关于这些更多的化合物, 对其独特性质进行了鉴定, 例如特别是, 能够与多种类型自由基反应的高容量, 终止自由基反应, 易于通过细胞膜的脂质双层 (特别指血脑屏障), 在组织中的高容量分布, 从而使体内需要抗氧化剂保护的区域的活性物质达到高浓度, 以

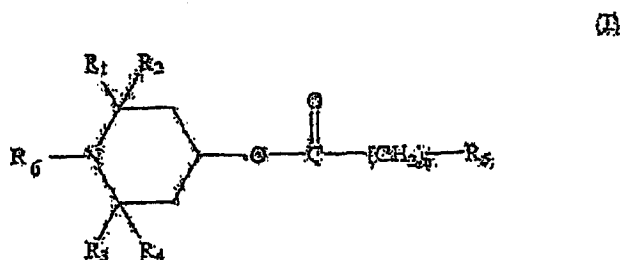
及自我再生的能力（自我补充抗氧化剂），和防止由金属离子的氧化作用引起的 Fenton's 反应等，本发明由此提出了它们的治疗与预防方面的新用途。

[0015] 本发明的另一个目标是优先提出一类化合物的新治疗用途，所述化合物除具有上述所有优点，而且无毒，无免疫原性，稳定并易于低成本大量生产。

[0016] 本发明的新治疗用途和药物组合物在所附的权利要求中给予定义。

[0017] 具体的，涉及式 (I) 的化合物在药物领域的新用途，在下文中详细讨论：

[0018]



[0019] 其中  $\text{R}_6$  为氧 (oxy1)、氢或羟基， $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$ ,  $\text{R}_3$  和  $\text{R}_4$  彼此独立选自：

[0020] - 氢

[0021] - 含 1-12 个碳原子的烷基，优选 1-6 个碳原子，更优选 1-3 个碳原子；

[0022] - 含 2-12 个碳原子的烯基，优选 2-6 个碳原子，更优选 2-3 个碳原子；

[0023] - 含 2-12 个碳原子的炔基，优选 2-6 个碳原子，更优选 2-3 个碳原子；或

[0024] -  $\text{R}_1$  与  $\text{R}_2$  都是环丁烷或环戊烷基团；

[0025] -  $\text{R}_5$  为 - 氢，

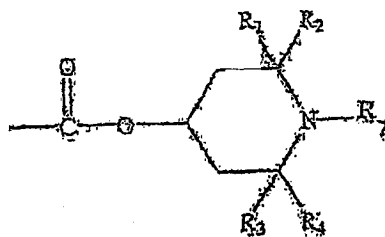
[0026] - 含 1-12 个碳原子的烷基，优选 1-6 个碳原子，更优选 1-3 个碳原子；

[0027] - 含 3-8 个碳原子的环烷基，

[0028] - 含 2-12 个碳原子的烯基，优选 2-6 个碳原子，更优选 2-3 个碳原子；

[0029] - 含 2-12 个碳原子的炔基，优选 2-6 个碳原子，更优选 2-3 个碳原子，或

[0030]



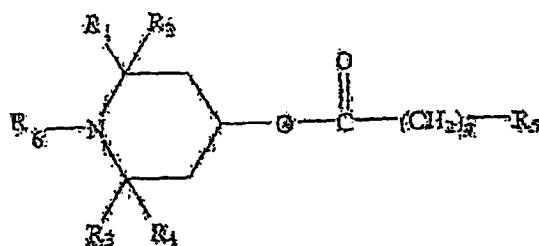
(II)

[0031] 其中  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$ ,  $\text{R}_3$  和  $\text{R}_4$  同前面所定义， $n$  为从 1 到 30 的整数，更优选 2-14，甚至更优选 6-10，

[0032]  $\text{R}_7$  为氢、氧或羟基。

[0033] 优选的并且为本发明例示的一组化合物是具有如下式的化合物：

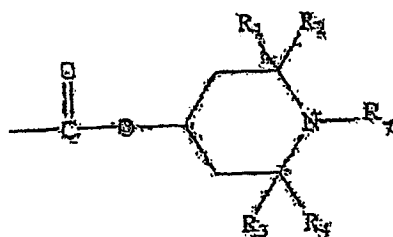
[0034]



[0035] 其中  $R_1, R_2, R_3$  和  $R_4$  是含 1-3 个碳原子的烷基,

[0036]  $R_5$  为式 (II)

[0037]

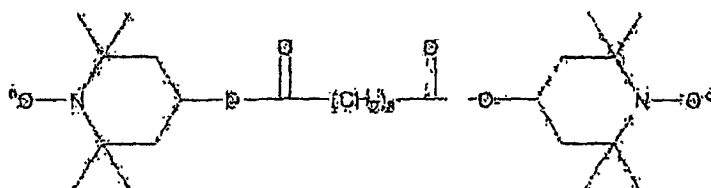


(II)

[0038] 其中  $R_1, R_2, R_3$  和  $R_4$  为含 1-3 个碳原子的烷基,

[0039]  $n$  为从 1 到 10 的整数,  $R_6$  和  $R_7$  中至少一个为氧, 另一个为氧或者羟基; 具体的, 特别优选使用如下式的化合物:

[0040]



[0041] 叫做: 双(1-氧-2,2,6,6-四甲基-4-二乙哌啶基)癸二酸酯。

[0042] 术语“含 1-12 个碳原子的烷基”指由饱和烃去除一个氢原子得到的取代基。包括甲基, 乙基, 正丙基, 正丁基, 仲丁基, 异丁基, 叔丁基和戊基, 己基, 庚基, 辛基, 壬基, 癸基, 十一烷基和十二烷基的各种异构体。

[0043] 术语“含有 2-12 个碳原子的烯基”和“含 2-12 个碳原子的炔基”指分别由链烯烃和炔烃去除一个氢原子得到的取代基。包括乙烯基, 乙炔基, 丙烯基, 丙炔基和类似的含至多 12 个碳原子的支链和非支链不饱和烃基团。

[0044] 术语“含 3-8 个碳原子的环烷基”是指饱和碳环, 如环丙基, 环丁基, 环戊基, 环己基, 以及由含有至多 8 个碳原子的烷基, 如甲基、二甲基、乙基和环己基取代的碳环。

[0045] N-氧和 N-羟基衍生化合物可依照 US4691015 和 US5981548 所述的方法由 N-H 衍生物制备而得。

[0046] 具体的, N-氧衍生物可由相应的 N-H 衍生物与 m-氯代过苯甲酸反应而得。通过催化氢化作用, 如采用  $PtO_2$  作为催化剂, N-氧衍生物可生成相应的 N-羟基衍生物。

[0047] 如上所述, 本发明的一个主题是上述化合物在制备治疗(抑制, 防止, 预防和治理)神经变性综合征和病变的药用或兽用组合物中的应用, 所述疾病如帕金森氏病、阿尔茨海默氏病、猝发性脑损伤(encephalic lesions due to ictus)、创伤性脑损伤、HIV 引起的神经病变、唐氏综合征、糖尿病性多神经病变、肌肉萎缩症、多发性硬化症、亨廷顿氏病、

朊病毒病 (prion disease)、迟发性运动障碍、tauopathy, 脱髓鞘病和 LouGherig' s 综合征。

[0048] 本发明还涉及所述化合物在制备治疗、防止和 / 或预防致命疾病的药用或兽用组合物或药物中的应用, 所述致病疾病如心 / 肾 / 肺 / 肝 / 肠缺血再灌注损伤、高血压、糖尿病、癌症、和休克、囊性纤维病、病毒感染、药物和放射 (例如放疗或更具体是放射防护) 所致毒性作用、炎症、动脉粥样硬化、衰老、类风湿性关节炎、癫痫、高胆固醇血症、高脂血症, 以及疼痛和脓毒症的治疗, 以及与自由基过量产生相关的疾病。

[0049] 本发明化合物用于药学或兽医学领域时, 给予患者的剂量是 0.01-1g/kg 体重, 优选 0.1-200mg/kg, 更优选 0.5-20mg/kg 体重, 每日一次或多次给药。

[0050] 但是, 所使用的具体剂量可以根据患者或动物的需要, 根据所治疗疾病的严重程度而变化 (根据年龄、性别、饮食, 给药方法和药理学考量, 如所用化合物的活性, 预选化合物的效能、药物代谢动力学和毒理学性质以及与其它药物的任何组合等)。最优剂量的确定在本领域技术人员可能选择的范围内。

[0051] 固态和液态药学可接受赋形剂均可用于制备包含至少一种本发明化合物的药用或兽用药物组合物。

[0052] 给药方法除了包括口服和肠胃外给药, 还包括吸入给药和皮肤 (局部) 途径给药。

[0053] 固体制剂包括, 如粉剂、片剂、颗粒剂、胶囊剂、扁囊剂和栓剂。

[0054] 固态赋形剂可由一种或多种物质构成, 这些物质还可用作稀释剂、调味剂、增溶剂、润滑剂、混悬剂、片剂的粘合剂或崩解剂; 还可以使用被囊材料。

[0055] 在粉剂中, 赋形剂由与至少一种活性化合物混合的精细粉碎的固体构成。在片剂中, 活性成分与有必要粘合性质的赋形剂以恰当比例混合, 压制所需形状和大小。粉剂和片剂优选含 7% -70% 重量的活性成份。

[0056] 合适的赋形剂主要代表有碳酸镁、硬脂酸镁、滑石粉、乳糖、蔗糖、果胶、糊精、玉米淀粉、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、低熔点蜡、椰子油等。

[0057] 片剂、粉剂、扁囊剂和胶囊剂均可作为适宜剂型进行口服给药。

[0058] 液态制剂包括适用于肠胃外给药 (皮下、静脉、肌内、胸骨内注射或输注技术) 或口服给药 (即适于口服给药的混悬液和乳浊液) 的溶液。适用于肠胃外给药的液态制剂的例子包括, 活性成分的无菌水溶液和溶于包括水、乙醇或丙二醇的溶剂的活性成份的无菌溶液。

[0059] 将活性成份溶于所需溶剂系统, 然后使所得溶液通过膜滤器使其灭菌, 或者在无菌条件下将灭菌的化合物溶于事先灭菌的溶剂中, 可制备灭菌溶液。

[0060] 将活性成份溶于水, 再加入适宜的、所需量的着色剂、调味剂、稳定剂和凝结剂, 制备得到用于口服给药的水溶液。

[0061] 将精细粉碎的活性成份, 与粘稠物质, 如天然或合成胶质、树脂、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和其它药用或兽用制剂领域已知的混悬剂, 分散于水中制备得到用于口服给药的液态混悬液。

[0062] 药用或兽用制剂优选是含 1-300mg 的单剂量单位形式。在此剂型下, 制剂成分含有适量活性成份的剂量单元。单剂量单位由包含片剂、胶囊、或装于药瓶或安瓿的粉剂的包装制剂构成。

[0063] 本发明的药物组合物优选用于人类。然而由于能用于人,也可用于兽医领域,如宠物、外来动物和农业动物,包括哺乳动物,鸟类,啮齿类等,更优选动物如狗、猫和牛、绵羊和猪。

[0064] 下列实施例使本领域技术人员能够实现本发明。它们只是用来说明本发明,仅作为例子而不是限制本发明。以帕金森氏病模型作为神经变性疾病的例子,以心肌缺血再灌注模型作为危及生命的疾病的例子,说明了本发明的用途。

#### [0065] 实施例 1

[0066] 尽管 James Parkinson 于 1817 年首次将帕金森氏综合症描述为原因不明的“震颤麻痹”(然而帕金森氏综合症的证据可追溯到甚至几千年前),其病因学仍然不明。

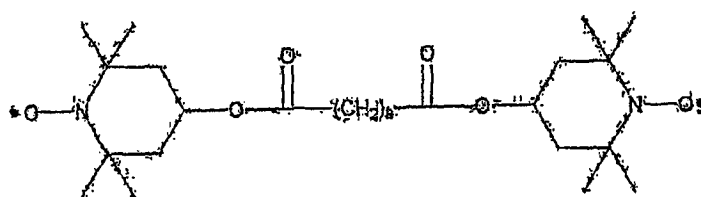
[0067] 除了年龄因素,遗传与环境因素在帕金森氏综合症起因中的作用在国际上也引起广泛争论(Huang z 等 Can. J. Neur. Sci. 30Suppl. 1, 510-518, 2003; Daner W. 等 Proc. Natl. Acad. Scie. (USA) 99, 14524-14529, 2002; Vaughan J. R. 等 Am. Hum. Gen. 65, 111-126, 2001; Thiruchelvam M. 等 Neurotoxicology 23, 621-633, 2002; Scott W. K. 等 JAMA 286, 2239-2244, 2001; Warner T. T. & Schapira A. H. Am. Neurol. 53Suppl. 3, 516-523, 2003)。在 20 世纪 80 年代中早期,发现特定神经毒素如 n-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)能够引起人和动物的帕金森氏综合征,这给环境领域的研究带来相当大的推动。从那以后,又发现有多种杀虫剂能够在动物模型中再现 PS (Betarbert R. 等 Nat. Neurosci. 3, 1301-1306, 2000; Kirbi M. L. 等, Toxicol. Sci. 61, 100-106, 2001; Yumino K. 等 J. Biochem. (Tokyo) 131, 565-570, 2002; Gao 等 J. Neurosci. 23, 6181-6187, 2003)。通过对已有的研究进行病例-对照荟萃分析,提示暴露于杀虫剂与 PS 发生存在关联,且有显著性意义 (Priyadarshi A. 等 Neurotoxicology 21, 435-440, 2000; Priyadarshi A. 等 Environ. Res. 86, 123-127, 2001)。

[0068] 许多实验证据表明,除草剂百草枯(paraquat)(化学结构类似于 MPTP)与 PS 发病相关;动物黑质内微输注百草枯,或者系统或腹膜内给予百草枯均导致多巴胺能神经元选择性变性,并伴随严重的非选择性神经毒引起的行为和神经病理表现 (Brooks A. I. 等. Brain Res. 823, 1-10, 1999; Thiruchelvam M. 等. Neurotoxicology 23, 621-633, 2002; McCornack A. L. 等. Neurobiol Dis. 10, 119-127, 2002),这是由 OSS-反应性自由基的过量引起的 (Jannone N. 等. Neuropharmacology 30, 893-898, 1991; Klivenyi G. 等, Neurobiol. Dis. 5, 253-258, 1998; Foley M. 等, J. Neurol. 247 Suppl. 2, II82-94, 2000)。

[0069] 选择百草枯/大鼠/帕金森综合症实验模型作为验证本发明化合物有效性的最合适模型。在试验中使用了两种抗氧化剂,分别命名为 MP1002 和 MP1001:

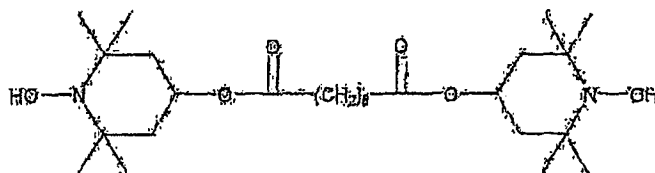
[0070] MP1002

[0071]



[0072] MP1001

[0073]



[0074] 实验前,雄性 Sprague Dawley 大鼠 (重 210-220g) 采用标准实验室饮食并补充“Nossan 片”圈养 3 周 (动物和饲料来自 Nossan Company, Milan, Italy) (相对湿度 50% ± 10%, 温度 22°C ± 1, 光照 / 黑暗循环为 12 小时 / 12 小时, 第一次光照在早上 7:30), 食物与水均不限制摄入。

[0075] 实验前,腹腔注射 380mg/kg 重量水合氯醛麻醉大鼠,然后在立体定向指引下将一根不锈钢导管 (25 号) 植入一侧的黑质中,用牙科丙烯酸材料将其固定在颅骨上。

[0076] 动物 (每试验组 20 只) 在实验前给予七天的恢复期;在这期间,未观察到运动活动或姿态的变化。用 10 μl 的 Hamilton 注射器经特氟龙管与注射导管相连进行微输注,化合物或赋形剂 (0.8% NaCl) 以总容量 1 μl/min 注入脑内。

[0077] 将 50 μg 百草枯微输注入黑质 (n = 20 只老鼠), 约 24 分钟后可以引起老鼠的运动活动增加, 表现为跳跃和相对注射位置的对侧转圈; 所有老鼠均在注射 24 ± 2.5h 后死亡。对另外 20 只老鼠注射百草枯, 20 只老鼠注射百草枯加赋形剂; 每组有约 10 只老鼠在治疗 20 小时后存活, 并用于测定黑质中脂质过氧化作用的进展。

[0078] 当 50 μg 百草枯与 1 μg MP002 或 MP1001 同时微输注进入动物的黑质内时, 所有动物均又存活 24 小时, 在持续监测期间没有观察到变化 (见表 1)。腹膜内给予抗氧化剂也得到类似结果, 证明 MP1002 和 MP1001 具有令人意外的穿过血脑屏障的能力, 而这是传统抗氧化剂治疗神经变性疾病的最主要的限制因素 (及其对特定自由基种类的选择性)。

[0079] 特别的是, 在下述情况下, 无一只大鼠死亡: (1) 微输注 50 μg 百草枯前 5 分钟, 预先以 120mg/kg 体重的 MP1002 或 MP1001 腹膜内注射处理; (2) 微输注 50 μg 百草枯, 同时以 120mg/kg 体重的 MP1002 或 MP1001 腹膜内注射处理; 和 (3) 微输注 50 μg 百草枯 5min 后, 以 120mg/kg 体重的 MP1002 或 MP1001 腹膜内注射。(见表 1)

[0080] 以 Buege J. A. & Aust S. D. Meth. Enzymol. 52, 302-310, 1978 所述的丙二酰硫脲-TAC-HCL 试剂, 定量作为生物标记的丙二醛 (MDA) 的释放, 从而确定黑质内的脂质过氧化反应。表 1 清楚地显示, 输注 50 μg 百草枯或百草枯和盐水 20h 后存活下来的一组老鼠 (约 10 只) 黑质中, 脂质过氧化反应明显增加。各种方式给予 MP1001 或 MP1002 (在输注百草枯之前, 同时, 之后) 显著的 (P < 0.01) 的降低黑质中的脂质过氧化反应, 这也清楚表明这些化合物具有高的抗氧化剂潜能。

[0081] 在这些实验中, 脑内和周围给予这里所说的 MP1002 或 MP1001 两种抗氧化剂, 能够完全预防由百草枯引起的老鼠行为和神经病理效应。这些结果显示本发明所述的化合物能够容易地穿透血脑屏障, 从而保护黑质多巴胺神经元免受由除草剂如百草枯引起的变性损伤 (如 OSS)。这显示了一种治疗多种神经变性疾病, 包括帕金森氏综合征的有用的策略。

#### [0082] 实施例 2

[0083] 选择缺血再灌注导致的心肌损伤体内模型作为检验本发明化合物 MP1002 和 MP1001 的有效性的最适模型。

[0084] 实验前, 雄性 Sprague Dawley 大鼠 (重 220-230g) 采用标准实验室饮食并补充

“Nossan 片”圈养 3 周 (Nossan Company, Milan, Italy) (相对湿度 50% ± 10, 温度 22°C ± 1, 光照 / 黑暗循环为 12 小时 / 12 小时, 第一次光照在早上 7:30), 食物与水均不限制摄入。

[0085] 腹腔注射 380mg/kg 水合氯醛麻醉老鼠 (每组 20 只), 然后切开气管, 插管, 用合适的通气机通入环境空气; 体温保持在 38°C ± 1, 在右颈动脉插管, 连接一个压力传感器监测平均动脉压 (MAP)。

[0086] 在右颈静脉插管给药, 行胸廓切开术, 将心脏悬于临时的心包支架内, 在左下冠状动脉 (LAD) 上放置一环状闭合器; LAD 结扎前允许动物稳定 40 分钟。

[0087] 通过拉紧闭合器闭塞冠状动脉, 引起与典型心肌缺血的心电图和血液动力学变化 (MAP 下降) 相关的病理过程。在心肌缺血 25 分钟后, 重新打开闭合器, 使血液再灌注 2 小时。持续监测心率 (HR) 和 MAP。

[0088] 再灌注 2 小时后, 再次阻塞冠状动脉, 通过右颈动脉插管将染料伊文氏蓝 (4.5ml 2% p/v) 注入左心室, 用来区分心脏的灌注区与非灌注区 (AAR)。伊文氏蓝溶液使灌注的心肌染色, 而被阻塞的血管床则不染色。

[0089] 用过量麻醉剂杀死老鼠, 取出心脏切成薄片 (3-4mm), 取出右心室壁和危险区 (粉红色), 与非缺血区 (蓝色) 分开。危险区切成小片, 用硝唑蓝 (NBT, 0.48mg/ml) 于 37°C 孵育 20 分钟; 在完整脱氢酶存在的情况下 (活的心肌内), NBT 形成深蓝色的甲月替, 而没有脱氢酶活性的坏死区域, 则不被染色。这些小片依据其颜色分离, 称重, 确定梗死的大小占 AAR 重量的百分比。

[0090] 进行以下实验组: a) LAD 阻断 (25 分钟), 再灌注 (2 小时), 再灌注开始 5 分钟后给予赋形剂, 并在再灌注期间持续给予 (盐水溶液, 3ml/kg 静脉推注, 1.8ml/kg/h); b) LAD 阻断再灌注, 再灌注前 5 分钟给予 MP1002 或 MP1001 (10mg/kg 快速推注), 然后在再灌注期间以 2mg/kg/h 输注; c) 假手术 (无 LAD 阻断), 输注赋形剂; d) 假手术, 如上所述输注 MP1002 或 MP1001。

[0091] 丙二醛 (MDA) 作为心脏组织内细胞膜脂类的最终过氧化产物如上所述进行测定。

[0092] 表 2 显示了在实验期间测得的多个 MAP 和 HR 数值。在研究的多个分组中, 基本血液动力学结果基本相似。

[0093] 在接受了假手术 (无 LAD 阻断) 的动物中, 输注赋形剂或赋形剂加 MP1002 或 MP1001 均不引起实际的血液动力学效应。

[0094] 在接受了冠状动脉阻断与再灌注的动物中, 在实验期间平均 MAP 轻微降低, 但 HR 不变。而且, 接受 I/R (缺血 / 再灌注) 加 MP1002 或 MP1001 处理的大鼠与单独用赋形剂处理的 I/R 组动物, 平均 MAP 和 HR 值上没有显著差异。

[0095] 与对照组相比 (图 1), 输入 MP1002 或 MP1001 能够显著减小 ( $P < 0.01$ ) 梗死的大小 (分别为 80% 和 78%)。假手术不能引起明显的梗阻, 与假手术相比 (加上赋形剂或抗氧化剂), I/R 处置能引起脂质过氧化反应明显与显著 ( $P < 0.01$ ) 的增加, 给予 MP1002 或 MP1001 能够显著降低 ( $P < 0.01$ ) 过氧化作用的发展, 其过氧化作用的水平与实施了假手术 (图 2) 的动物相似, 证明了这些化合物具有很高的抗氧化能力。

[0096] 这些实验显示 MP1001 和 MP1002 能够显著降低心肌缺血再灌注后心肌梗塞的范围, 这些结论说明本发明化合物对缺血再灌注引起的心肌损伤具有良好的保护效应。

[0097] 这也提示本发明化合物为治疗包括缺血性心脏病在内的危及生命的疾病提供了

一个新的治疗途径。

[0098] 表 1. 大鼠黑质中注射百草枯后, 双(1-氧-2,2,6,6-四甲基-4-哌啶)癸二酸酯(MP1002) 或双(1-羟基-2,2,6,6-四甲基-4-哌啶)癸二酸酯(MP1001) 对癫痫潜伏期、癫痫持续期、死亡率和脂质过氧化进程的影响

[0099]

处理组	潜伏期 (min)	持续期 (min)	死亡率(%)	脂质过氧化 (nmolMDA × h <sup>-1</sup> × mg prot <sup>-1</sup> )
对照	0	0	0	3.8 ± 0.76 **
百草枯*	25 ± 4	270 ± 15	100(20/20)	14.6 ± 1.34 **
百草枯 + 赋形剂*	25 ± 6	266 ± 17	100(20/20)	13.5 ± 1.10 **
百草枯 + MP1002 <sup>a</sup>	无癫痫发作 和癫痫放电	无癫痫发作 和癫痫放电	0	4.3 ± 0.63 **
百草枯 + MP1001 <sup>a</sup>	无癫痫发作 和癫痫放电	无癫痫发作 和癫痫放电	0	5.4 ± 0.84 **
百草枯 + MP1002 <sup>b</sup>	无癫痫发作 和癫痫放电	无癫痫发作 和癫痫放电	0	5.2 ± 0.75 **
百草枯 + MP1001 <sup>b</sup>	无癫痫发作 和癫痫放电	无癫痫发作 和癫痫放电	0	4.7 ± 0.49 **
百草枯 + MP1002 <sup>c</sup>	无癫痫发作 和癫痫放电	无癫痫发作 和癫痫放电	0	4.9 ± 0.86 **
百草枯 + MP1001 <sup>c</sup>	无癫痫发作 和癫痫放电	无癫痫发作 和癫痫放电	0	5.1 ± 0.94 **
百草枯 + MP1002 <sup>d</sup>	无癫痫发作 和癫痫放电	无癫痫发作 和癫痫放电	0	4.1 ± 0.39 **
百草枯 + MP1001 <sup>d</sup>	无癫痫发作 和癫痫放电	无癫痫发作 和癫痫放电	0	4.8 ± 0.57 **

[0100] 在表 1 中, 每个数值表示在 20 只不同大鼠中进行的 20 个不同实验的平均值 ± SD ; a) 为黑质中微输注 50 μg 百草枯, 同时接受 1 μg MP1002 或 MP1001 的动物 ; b) 腹腔内注射 120mg/kg 体重的 MP1001 或 MP1002, 5 分钟后黑质内微输注 50 μg 百草枯的动物 ; c) 微输注 50 μg 百草枯, 同时腹腔内注射 120mg/kg MP1001 或 MP1002 的动物 ; d) 微输注 50 μg 百草枯, 5 分钟后腹腔内注射 100mg/kg MP1001 或 MP1002 的动物。

[0101] 在输注百草枯的相同位点输注赋形剂对与百草枯相关的行为改变或死亡没有任

何效果。

[0102] 本表还以治疗后 24h 或 20h(\*) 后丙二醛 (MDA) 的水平说明了黑质区脂质过氧化反应的变化情况。具体细节和实验步骤参考正文。

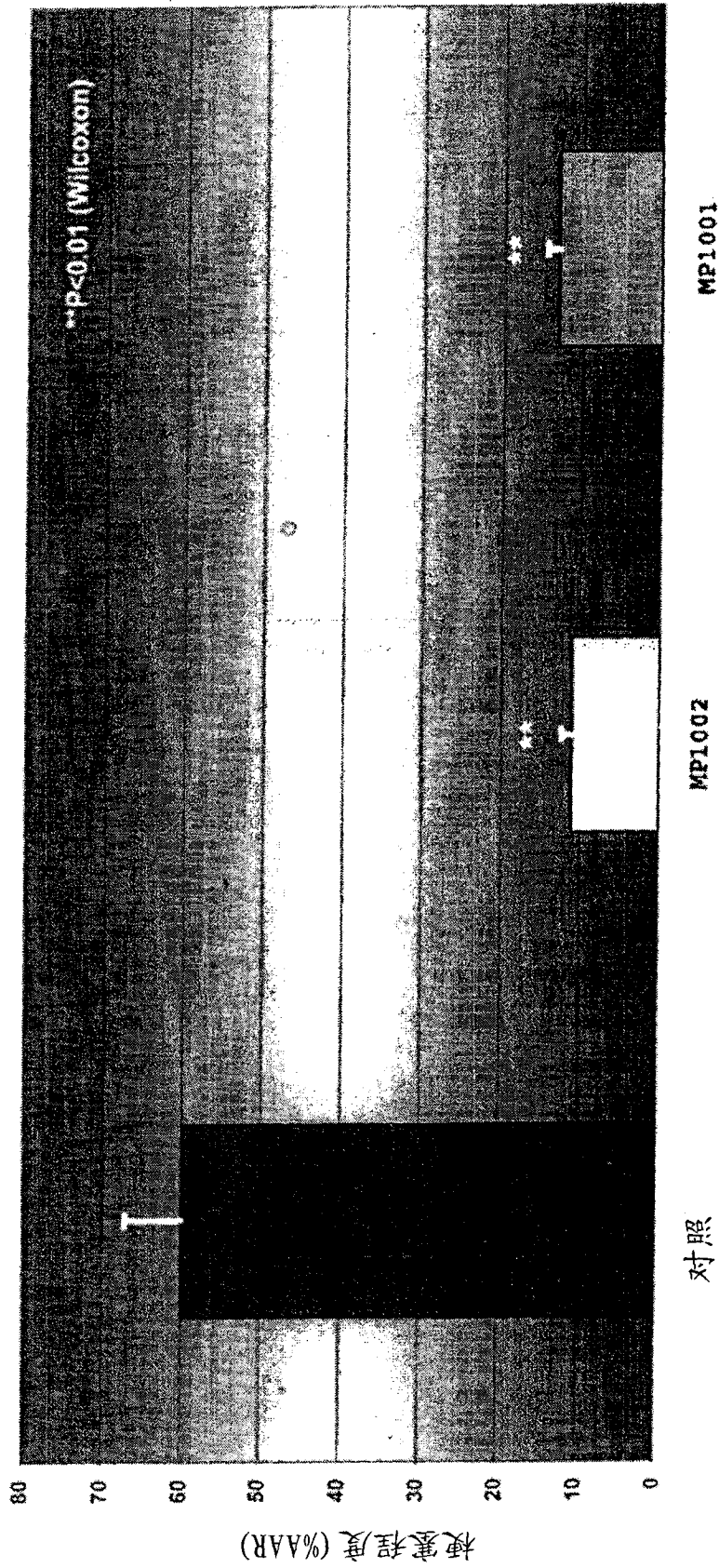
[0103] \*\*  $p < 0.01$  百草枯或百草枯+赋形剂/对照组和百草枯+赋形剂/MP1002 或 MP1001 治疗组 (Wilcoxon 分类法)。

表2. 抗氧化剂MP1001和MP1002对大鼠心肌缺血再灌注(I/R)中平均动脉压(MAP)和心率(HR)变化的影响作用

组别	基线	阻断 (min)			再灌注 (min)		
		15	25	15	15	25	2.5
假 + 赋形剂	MAP	128±12	126±14	118±10	112±9	105±12	
	HR	425±25	429±26	426±21	431±23	429±22	
假 + MP1002	MAP	125±15	123±16	120±11	110±12	105±9	
	HR	421±26	420±33	422±25	428±26	426±32	
假 + MP1001	MAP	127±16	125±13	121±11	112±8	107±16	
	HR	422±33	422±26	424±48	427±27	427±23	
I/R + 赋形剂	MAP	128±10	121±12	113±10	101±12	96±9	
	HR	445±34	440±31	436±27	434±28	436±26	
I/R + MP1002	MAP	127±14	121±14	114±10	102±11	97±9	
	HR	438±30	437±32	431±24	427±29	429±25	
I/R + MP1001	MAP	125±9	118±12	111±13	100±10	95±8	
	HR	435±25	438±31	430±28	425±28	427±26	

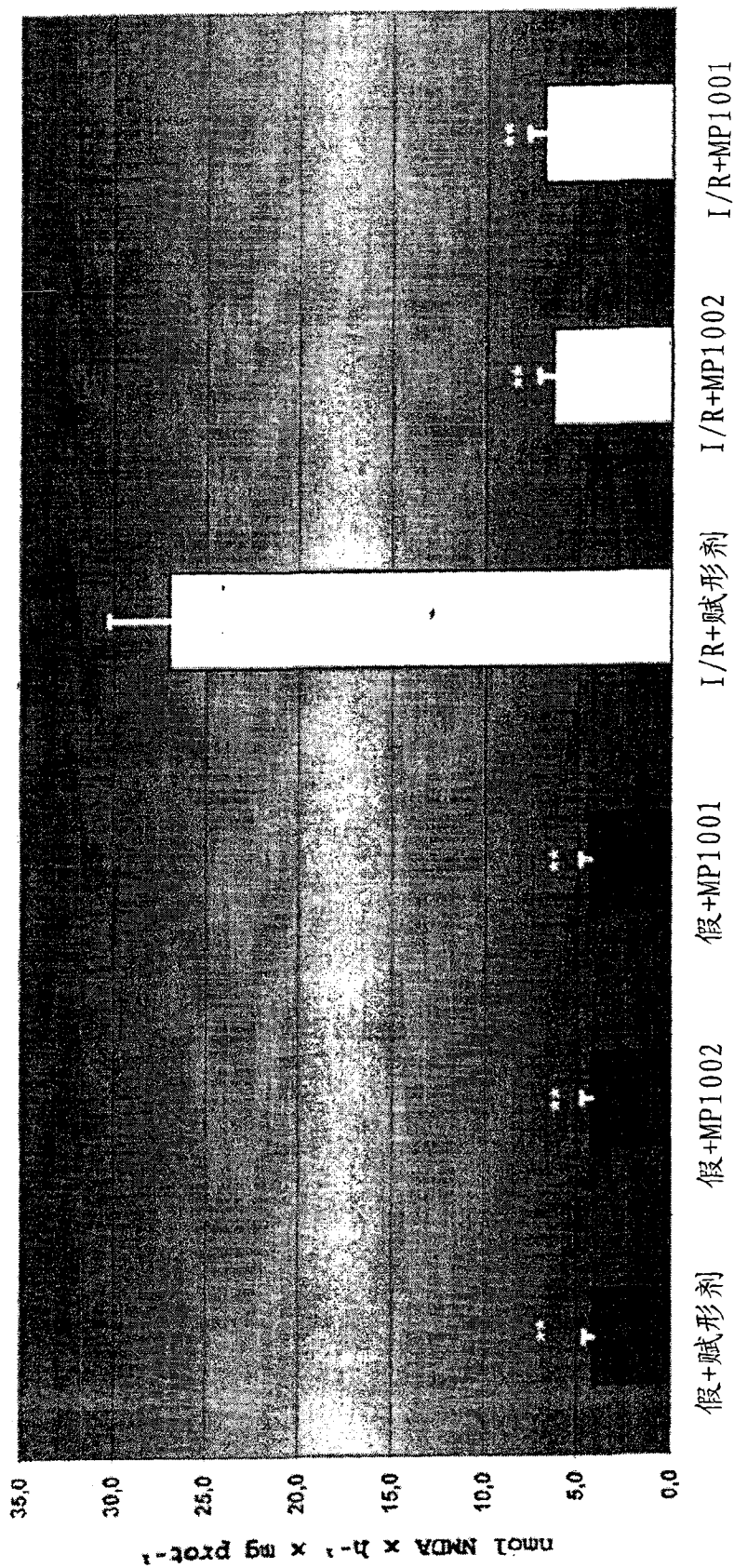
每个数值表示至少15个不同实验的平均值±SD。  
动物接受了MP1002, MP1001或等体积赋形剂。  
具体细节和实验步骤参考正文。

图1 抗氧化剂MP1002和MP1001对大鼠左下冠状动脉阻断再灌注(LAD)后心肌梗塞程度的影响



每个数值表示至少15组不同试验的平均值±SD。对各组动物进行LAD阻断，并且在再灌注开始5min后接受赋形剂(盐水溶液-对照), MP1002或MP1001

图2 抗氧化剂MP1002和MP1001对大鼠心肌缺血再灌注 (I/R) 的脂质过氧化进程的影响



每个数值表示至少15组试验的平均值 ± SD。 \*\*p<0.01与UI/R+赋形剂比较 (Wilcoxon方法)