

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
A61K 31/397
A61K 31/43 A61K 31/66

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00814380.3

[43] 公开日 2002 年 11 月 27 日

[11] 公开号 CN 1382047A

[22] 申请日 2000.8.16 [21] 申请号 00814380.3
[30] 优先权
[32] 1999.8.16 [33] US [31] 60/149,115
[32] 1999.12.17 [33] US [31] 60/172,452
[32] 2000.1.18 [33] US [31] 60/176,570
[32] 2000.4.4 [33] US [31] 60/194,534
[86] 国际申请 PCT/US00/22450 2000.8.16
[87] 国际公布 WO01/12184 英 2001.2.22
[85] 进入国家阶段日期 2002.4.16
[71] 申请人 雷瓦尔克斯药品有限公司
地址 美国印第安纳州
[72] 发明人 G·A·科佩

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 温宏艳 钟守期

权利要求书 9 页 说明书 80 页 附图 37 页

[54] 发明名称 神经病治疗组合物和方法
[57] 摘要

已经发现,在温血脊椎动物中,施用 β -内酰胺化合物,包括某些细菌肽酶抑制剂,能够提供显著的向神经作用,特别是抗焦虑和抗侵略行为以及提高认知的作用,据信这是通过抑制神经原性 NAALAD 酶以及相关酶活性来介导的。已经发现, β -内酰胺抗生素和 β -内酰胺酶抑制剂表现出有效的 NAALAD 酶抑制作用,并且具有血脑屏障运输能力的那些化合物是有效的神经原性 NAALAD 酶抑制剂,且具有显著的神经治疗作用。 β -内酰胺化合物可用于治疗多种与谷氨酸异常有关的疾病状态。还描述了使用所述化合物的治疗方法以及它们的药物制剂。

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

1. 治疗需要这种治疗的患者中选自下列的行为障碍的方法：侵略性精神障碍、强迫观念与行为精神障碍、焦虑症、抑郁症、或 ADHD，所述方法包含给所述患者施用有效量的能抑制所述患者脑中一种或多
5 种神经原性肽酶的肽酶活性的化合物的步骤。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述行为障碍是抑郁症或强迫观念与行为精神障碍。

3. 权利要求 2 的方法，其中施用作为抗侵略行为剂的肽酶抑制剂来控制患有孤独症、图雷特氏综合征、精神发育迟缓、精神病、躁
10 狂症、老年性痴呆的人类患者或有人格障碍以及不适当侵略行为史的患者中的冲动和暴力行为。

4. 权利要求 2 的方法，其中给患有包括焦虑症在内的行为障碍的人类患者施用所述化合物。

5. 权利要求 2 的方法，其中给患有包括 ADHD 在内的行为障碍的
15 人类患者施用所述化合物。

6. 权利要求 1 的方法，其中所述肽酶抑制剂是 β -内酰胺化合物。

7. 权利要求 6 的方法，其中所述 β -内酰胺化合物是 β -内酰胺酶抑制剂。

8. 权利要求 7 的方法，其中所述肽酶抑制剂选自青霉素类、头
20 孢菌素类、苯氧乙基青霉素钾类、1-氧杂-1-去硫杂 cephems、clavams、clavams、azetidinones、carbapenams、carbapenems、和 carbacephems。

9. 权利要求 9 的方法，其中所述肽酶抑制剂是头孢菌素的 1-氧杂-1-去硫杂类似物。

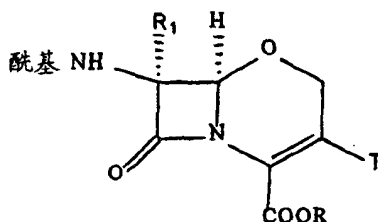
25 10. 权利要求 1 的方法，其中所述化合物是 β -内酰胺酶抑制剂。

11. 权利要求 1 的方法，其中还包含施用有效量的 P-糖蛋白流出泵抑制剂的步骤。

12. 权利要求 6 或 7 的方法，其中将肽酶抑制剂与有效量的 P-糖蛋白流出泵抑制剂联合施用。

30 13. 权利要求 1 的方法，其中所述肽酶抑制剂是 β -内酰胺抗生素，并且其施用给患者的量低于能提供抗菌有效血液水平的抑制剂的有效量。

14. 权利要求 1 或 3 的方法，其中所述肽酶抑制剂是下式所示化合物：



5 其中 R 是氢、盐形成基团或活性酯形成基团；R' 是氢或 C₁-C₄ 烷氧基；T 是 C₁-C₄ 烷基、卤素、羟基、O(C₁-C₄) 烷基、或 -CH₂B，其中 B 是亲核试剂 B:H 的残基，且酰基是有机酸酰基 OH 的残基。

15. 权利要求 14 的方法，其中所述化合物是拉氧头孢或氟氧头孢。

10 16. 权利要求 1 的方法，其中所述肽酶抑制剂是谷氨酸的 2-任选取代的氧杂-2-去氨基类似物、谷氨酸的 2-任选取代的碳(carba)-2-去氨基类似物、或谷氨酸的 N-取代衍生物。

17. 权利要求 16 的方法，其中还包含施用有效量的 P-糖蛋白流出泵抑制剂的步骤。

15 18. 提高需要这种治疗的患者的认知功能的方法，所述方法包含给所述患者施用有效量的能抑制所述患者脑中一种或多种神经原性肽酶的肽酶活性的化合物的步骤。

19. 权利要求 18 的方法，其中温血脊椎动物是患有痴呆或遗忘症的人类患者。

20 20. 权利要求 18 的方法，其中温血脊椎动物是患有阿尔茨海默氏病的人类患者。

21. 权利要求 18 的方法，其中所述肽酶抑制剂是β-内酰胺化合物。

25 22. 权利要求 21 的方法，其中所述β-内酰胺化合物是β-内酰胺酶抑制剂。

23. 权利要求 21 的方法，其中所述肽酶抑制剂选自青霉素类、头孢菌素类、苯氧乙基青霉素钾类、1-氧杂-1-去硫杂 cepheams、clavams、clavams、azetidinones、carbapenams、carbapenams、

和 carbacephems.

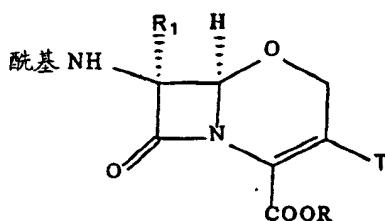
24. 权利要求 23 的方法, 其中所述肽酶抑制剂是头孢菌素的 1-氧杂-1-去硫杂类似物。

25. 权利要求 18 的方法, 其中所述抑制剂还包含施用有效量的 P-糖蛋白流出泵抑制剂的步骤。

26. 权利要求 23 的方法, 其中将肽酶抑制剂与有效量的 P-糖蛋白流出泵抑制剂联合施用。

27. 权利要求 18 的方法, 其中所述肽酶抑制剂是 β -内酰胺抗生素, 并且其施用给患者的量为至少 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 但是低于能提供抗菌有效血液水平的抑制剂的有有效量。

28. 权利要求 18 的方法, 其中所述肽酶抑制剂是下式所示化合物:



15 其中 R 是氢、盐形成基团或活性酯形成基团; R^1 是氢或 C_1 - C_4 烷氧基; T 是 C_1 - C_4 烷基、卤素、羟基、 O (C_1 - C_4) 烷基、或 $-\text{CH}_2\text{B}$, 其中 B 是亲核试剂 B: H 的残基, 且酰基是有机酸酰基 OH 的残基。

29. 权利要求 28 的方法, 其中所述化合物是拉氧头孢或氟氧头孢。

20 30. 权利要求 29 的方法, 其中抑制剂还包含施用有效量的 P-糖蛋白流出泵抑制剂的步骤。

31. 权利要求 18 的方法, 其中所述肽酶抑制剂是谷氨酸的 2-任选取代的氧杂-2-去氨基类似物、谷氨酸的 2-任选取代的碳(carba)-2-去氨基类似物、或谷氨酸的 N-取代衍生物。

25 32. 权利要求 34 的方法, 其中抑制剂还包含施用有效量的 P-糖蛋白流出泵抑制剂的步骤。

33. 治疗患有或趋于患有至少部分特征是脑或其它神经组织中细胞外谷氨酸浓度异常的病症的人类患者的方法, 所述方法包含给所述

患者施用组合物的步骤，其中所述组合物含有能够抑制青霉素结合蛋白或细菌源的 β -内酰胺酶活性的化合物，其中所述组合物以能够有效地预防或减轻所述病症的破坏或症状的量施用。

34. 权利要求 33 的方法，其中所述化合物是 β -内酰胺化合物。

5 35. 权利要求 33 的方法，其中所述化合物是 β -内酰胺酶抑制剂。

36. 权利要求 34 的方法，其中所述化合物选自青霉素类、头孢菌素类、苯氧乙基青霉素钾类、1-氧杂-1-去硫杂 cephems、clavams、clavams、azetidinones、carbapenams、carbapenams、和 carbacephems。

10 37. 权利要求 36 的方法，其中所述化合物是头孢菌素的 1-氧杂-1-去硫杂类似物。

38. 权利要求 37 的方法，其中所述化合物是拉氧头孢或其可口服吸收的活性酯。

39. 权利要求 33、34、35、36、37 或 38 任一项的方法，其中所述患者病症选自：局部缺血、癫痫症、低血糖症、亨廷顿氏舞蹈病、阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、肌萎缩性侧索硬化(ALS)、慢性疼痛、和神经组织创伤。

40. 权利要求 37 的方法，其中所述患者病症是由于所述组织的血流暂时中断而导致的神经组织局部缺血。

20 41. 治疗人类患者中选自前列腺癌或良性前列腺增生的前列腺疾病的方法，所述方法包含给所述患者施用组合物的步骤，其中所述组合物含有能够抑制青霉素结合蛋白或细菌源的 β -内酰胺酶活性的化合物，并且以能够有效地延迟所述疾病发展或减轻所述疾病症状的量施用所述化合物。

25 42. 权利要求 41 的方法，其中所述化合物是 β -内酰胺化合物。

43. 权利要求 41 的方法，其中所述化合物是 β -内酰胺酶抑制剂。

44. 权利要求 42 的方法，其中所述化合物选自青霉素类、头孢菌素类、苯氧乙基青霉素钾类、1-氧杂-1-去硫杂 cephems、clavams、clavams、azetidinones、carbapenams、carbapenams、和
30 carbacephems。

45. 权利要求 43 的方法，其中所述化合物是头孢菌素的 1-氧杂-1-去硫杂类似物。

46. 权利要求 44 的方法，其中所述化合物是拉氧头孢、其可口服吸收的活性酯、或 β -内酰胺酶抑制剂。

47. 治疗需要所述治疗的人类患者中焦虑症的方法，所述方法包含给所述患者施用有效量的能调节所述患者脑中神经原性羧肽酶或转肽基酶活性的神经原性肽酶抑制剂的步骤。

48. 权利要求 47 的方法，其中所述神经原性肽酶活性的特征是，其被包含序列 Ala-D- γ -Glu-Lys-D-丙氨酰基-D-丙氨酸的肽抑制。

49. 用于治疗需要这种治疗的人类患者中行为或认知障碍的呈单位剂型的药物制剂，所述制剂含有 β -内酰胺化合物及用于它的可药用载体，在所述单位剂量中 β -内酰胺化合物的量能有效地调节认知和行为能力。

50. 权利要求 49 的药物制剂，其中所述 β -内酰胺化合物是 β -内酰胺抗生素，并且所述 β -内酰胺抗生素的量低于施用所述制剂后能产生抗菌有效血液水平的抗生素量，但是为能在脑中产生足以调节认知和行为能力的 β -内酰胺抗生素水平的有效量。

51. 权利要求 49 的药物制剂，其中所述 β -内酰胺化合物是基本上不含临床有效 β -内酰胺抗生素的 β -内酰胺酶抑制剂。

52. 权利要求 50 的药物组合物，其中所述 β -内酰胺抗生素是 1-氧杂-1-去硫杂头孢菌素。

53. 权利要求 50 的药物组合物，其中所述 β -内酰胺抗生素是 7-甲氧基-1-氧杂-1-去硫杂头孢菌素。

54. 权利要求 50 的药物制剂，其中所述 β -内酰胺抗生素是拉氧头孢或其活性酯衍生物。

55. 配制成非胃肠道给药形式的权利要求 54 的药物制剂，其中所述抗生素是拉氧头孢，并且其量相当于约 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ - 约 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 患者体重。

56. 呈口服剂型的权利要求 53 的药物制剂，其中所述 β -内酰胺抗生素是拉氧头孢的活性酯，并且其含量为约 2.5 - 约 250 mg/单位剂量。

57. 权利要求 50 的药物组合物，其中还包含有效量的 P-糖蛋白流出泵抑制剂。

58. 权利要求 49 的药物组合物，其中还包含有效量的 P-糖蛋白流

出泵抑制剂。

59. 权利要求 50 的药物组合物，其中所述制剂是口服剂型。

60. 权利要求 50 的药物组合物，其中所述制剂是非胃肠道剂型。

61. 权利要求 50 的药物组合物，其中所述制剂是延迟释放剂型。

5 62. 治疗需要所述治疗的人类患者中认知障碍的方法，所述方法包含抑制所述脊椎动物脑中的神经原性肽酶活性的步骤，所述神经原性肽酶的特征是其被有效量的肽 Ala-D- γ -Glu-Lys-D-Ala-D-Ala 抑制。

63. 权利要求 62 的方法，其中抑制神经原性肽酶的步骤是通过施用其量能有效地提高患者认知能力的 β -内酰胺抗生素来进行的。

64. 权利要求 63 的方法，其中所述 β -内酰胺抗生素是以低于获得抗菌有效血液水平的所述抗生素所需量的量施用的。

65. 治疗人、犬科、猫科和马科动物中行为障碍的方法，所述方法包含抑制神经原性肽酶活性的步骤，所述神经原性肽酶的特征是其被有效量的肽 Ala-D- γ -Glu-Lys-D-丙氨酰基-D-丙氨酸抑制。

66. 权利要求 65 的方法，其中所述神经原性肽酶包含 N-乙酰化- α -连接的酸性二肽酶。

67. 权利要求 65 的方法，其中抑制神经原性肽酶的步骤是通过施用能有效地抑制脑中肽酶活性的 β -内酰胺化合物的量来进行的。

20 68. 权利要求 66 的方法，其中所述 β -内酰胺化合物是头孢菌素的 1-氧杂-1-去硫杂类似物。

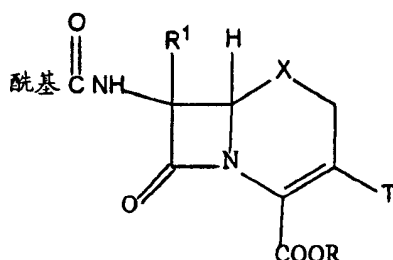
69. 权利要求 67 的方法，其中所述 β -内酰胺化合物选自拉氧头孢、氨苄西林和羧苄西林及它们的活性酯。

70. 治疗患有所述疾病的人、犬科、猫科和马科动物中行为障碍的方法，所述方法包含抑制神经原性肽酶活性的步骤，所述神经原性肽酶的特征是其被包含序列 Ala-D- γ -Glu-Lys-D-丙氨酰基-D-丙氨酸的肽抑制，并且所述步骤是通过给所述脊椎动物施用其量能有效地抑制所述肽酶活性的选自 β -内酰胺抗生素和 β -内酰胺酶抑制剂的 β -内酰胺化合物来进行的。

30 71. 用于治疗行为或认知障碍的口服剂型的药物制剂，所述制剂包含 β -内酰胺抗生素作为神经活性组分和用于其的可药用载体，其中所述抗生素的量低于能提供抗菌有效血液水平的所述抗生素的量，并

且在将所述剂型口服 (os) 施用给表现出行为或认知障碍症状的患者时, 所述 β -内酰胺抗生素在所述剂型中的量能有效地在脑中提供其浓度可有效地减轻患者行为障碍症状或提高痴呆或遗忘症患者中认知能力的所述 β -内酰胺抗生素。

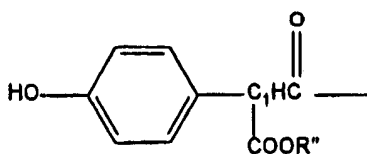
- 5 72. 权利要求 71 的药物制剂, 其中所述 β -内酰胺抗生素是下式所示化合物:



其中 X 是 O、C、或 S; R 是 H 或可药用成盐或成酯基团;

- 10 酰基是式酰基-OH 的有机酸的残基; R¹ 是 H 或低级烷氧基; 且 T 是 OH, T = Cl, F, Br, I, CH₃, C₂-C₄ 烷基, 芳基、包括杂芳基, S-烷基, S-芳基、包括 S-杂芳基, SO₃R (R = H、烷基、芳基), SO₂R (R = H、烷基、芳基), N-烷基₂, N-芳基₂, CO₂R (R = H、烷基), P-烷基₂, P-芳基₂, PO₃R₂ (R = H、烷基、芳基)。

- 15 73. 权利要求 72 的药物制剂, 其中 X = O, 且酰基是下式所示基团



其中旋光中心 C₁ 是 D 形式, 且 R 选自 H 或可药用成盐或成酯基团。

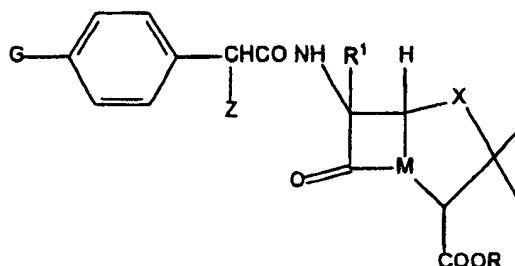
- 20 74. 权利要求 73 的药物制剂, 其中 R¹ 是甲氧基, 且 T 是 1-甲基四唑-5-基硫基甲基。

75. 权利要求 74 的药物制剂, 其中 R 是能够在体内水解以生成其中 R = H 的相应化合物的酯形成基团。

76. 权利要求 71 的药物制剂, 其中还包含 P-糖蛋白流出抑制剂。

77. 权利要求 69 的药物制剂, 其中所述 β -内酰胺抗生素是下式所

示化合物:



- 其中 X = O、S、或 C; R 是 H 或可药用成盐或成酯基团; R¹ 是 H 或低级
 5 烷氧基, G 是氢或羟基, 且 Z 是氨基、酰基氨基、CO₂M、SO₃M、PO₃M₂、
 或 PO₂M, 其中 M 是氢或可药用成盐或成酯基团。

78. 作为认知提高组合物中的与可药用载体混合的活性组分的 N-乙酰化- α -连接的酸性二肽酶的肽酶活性抑制剂在制备药物中的应用。

- 10 79. 作为抗焦虑组合物中的与可药用载体混合的活性组分的 N-乙酰化- α -连接的酸性二肽酶的肽酶活性抑制剂在制备药物中的应用。

80. 权利要求 78 或 79 中任何一项的应用, 其中所述抑制剂是 β -内酰胺抗生素或 β -内酰胺酶抑制剂。

- 15 81. 权利要求 80 的应用, 其中所述药物还包括 P-糖蛋白流出泵抑制剂。

82. 权利要求 78、79 或 80 中任何一项的应用, 其中所述抑制剂是谷氨酸的 2-任选取代的氧杂-2-去氨基类似物、谷氨酸的 2-任选取代的碳(carba)-2-去氨基类似物、或谷氨酸的 N-取代衍生物。

- 20 83. 权利要求 82 的应用, 其中所述药物还包括 P-糖蛋白流出泵抑制剂。

84. 治疗患有或趋于患有特征是神经组织中谷氨酸浓度异常增高或前列腺组织中 NAALAD 酶水平增高的病症的患者的方法, 所述方法包含给所述患者施用能够表现出与青霉素结合蛋白的特异性结合相互作用的化合物的步骤, 所述化合物以能够有效地抑制 NAALAD 酶活性并由此减轻或预防疾病症状的量施用。

- 25 85. 治疗患有多发性硬化的患者的方法, 所述方法包含给所述患者施用 β -内酰胺化合物的步骤, 所述化合物以能够有效地抑制患者神

经组织中 NAALAD 酶活性的量施用给患者。

86. 权利要求 1、18、33、34、41、84 和 85 任一项的方法，其中所述 NAALAD 酶抑制剂是基本上不具有抗生素活性的 β -内酰胺酶抑制剂。

- 5 87. 权利要求 1、18、33、35、41、84 和 85 任一项的方法，其中所述 NAALAD 酶抑制剂是基本上不具有抗生素活性的青霉素或头孢菌素亚砷或砷衍生物。

88. 权利要求 85 的方法，其中所述 β -内酰胺化合物是拉氧头孢或其酯。

- 10 89. β -内酰胺化合物在制备用于治疗焦虑症、且不伴有抗生素作用的药物中的应用。

神经病治疗组合物和方法

发明领域

- 5 本发明涉及新的神经精神病干预机制。更具体来说，本发明涉及用于治疗多种不同的神经病状态，包括认知和行为障碍的药物制剂和方法。

发明背景和概述

- 10 为了发现和和商业上提供治疗神经病的药物，药物工业已经作了广泛的研究和开发工作。这样的病症一般是由于脑中的化学物质失衡而导致的。据确定，相关神经化学物质的过度产生或生成不足和/或受体机能障碍与神经病学家、精神病学家、心理学家以及精神病诊断和治疗领域的其它医药技术人员所确知的多种病症有关。大多数发现神经病活性新药物
- 15 的工作是基于下述研究：激动剂/拮抗剂药物与一种或多种脑中为数众多的受体和/或其各自的受体配体的相互作用。

- 本发明提供了使用药物干预治疗多种神经病状态以及具有相关病因的其它疾病或临床病症的新方法。本发明部分基于下述发现：因具有细菌肽酶或蛋白酶、特别是转肽基酶和/或羧肽酶抑制剂活性而众所周知的含 β -内酰胺的化合物还是一些哺乳动物神经肽酶的有效抑制剂，这些神经肽酶在属类上称为 N-乙酰化- α -连接酸肽酶 (NAALAD 酶)，据文献记载已鉴定了几种这样的酶并确定了其特征 [Pangalos 等人, J. Biol. Chem., 1999, 274, No. 13, 8470-8783]。本发明还部分基于下述发现：神经原性 NAALAD 酶可以是 NAALAD 酶抑制剂的作用靶，以实现显著的行为改进和提高认知能力。初步研究已证实，能够识别和转化一些神经肽 (例如 N-乙酰基-L-天冬氨酰基-L-谷氨酸) 的一种或多种神经原性蛋白酶——现在据信是 NAALAD 酶和相关肽酶以及转移酶在脑功能神经化学上起着显著或占优势的作用，并且同时对患者的行为和认知能力有实质影响。先前已有报道，一些起 NAALAD 酶抑制剂作用的谷氨酸类似物可用于治疗与一些神经组织损伤有关的前列腺疾病和谷氨酸异常。现在已经确定，NAALAD 酶抑制剂，包括特别是一些能穿越血脑屏障的包含 β -内酰胺的细菌肽酶和 β -内酰胺酶抑制剂可
- 20
- 25
- 30

以在非常低的浓度下在脑中起强效神经活性药物的作用，以减轻特征是行为失常或感知/认知机能障碍的多种神经病的症状。值得注意的是，对于这样的细菌酶抑制剂，据信在临床上有效抑制细菌酶已知所需的浓度以下的浓度，它们是 NAALAD 酶和相关神经原性肽酶的有效抑制剂。因此，预计这样的化合物还可以用来有效地治疗前列腺疾病上述对于 NAALAD 酶抑制剂治疗有反应的与神经组织损伤有关的疾病状态。

因此，本发明一个实施方案涉及治疗温血脊椎动物中认知和行为障碍的方法，包括施用因具有细菌蛋白酶或肽酶抑制剂活性而众所周知的化合物，现在已经确定，当以有效浓度存在于脑中时，所述化合物能够抑制或调节一种或多种神经原性 NAALAD 酶和相关神经原性酶的活性。

在相关实施方案中，本发明提供了治疗需要这种治疗的患者中认知和行为障碍的方法。所述方法包含抑制神经原性肽酶，包括 NAALAD 酶和相关神经原性酶的步骤。在一个实施方案中，这样的神经肽酶抑制是通过施用有效量的已知能结合和抑制细菌酶，例如 β -内酰胺酶或参与细菌细胞壁合成的细菌蛋白酶的 β -内酰胺化合物而实现的。在本领域中这样的细菌蛋白酶是叫作“青霉素结合蛋白”。在另一个本发明实施方案中，该方法是通过施用本领域确认的 NAALAD 酶抑制剂，包括特别是一些去氨基谷氨酸类似物和 N-取代的谷氨酸衍生物来进行的。已经发现，在温血脊椎动物中有效地抑制这样的神经肽酶活性能显著地提高认知能力和行为控制。

易于依据本发明治疗的认知和行为障碍的实例包括侵略性精神障碍、强迫观念与行为精神障碍、焦虑症、抑郁症、ADHD、和记忆损伤。动物数据表明，本发明方法和制剂可作为抗侵略行为剂来控制患有孤独症、图雷特氏综合征、精神发育迟缓、精神病、躁狂症、老年性痴呆的个体或有人格障碍以及不适当侵略行为史的个体中的冲动和暴力行为。临床应用扩展到作为抗焦虑剂治疗患有 ADHD 和行为障碍的儿童，和作为认知增强剂用于老年群体以改善学习和记忆以及改善定向力障碍。

在另一个本发明实施方案中，本发明提供了治疗患有或趋于患有至少部分特征是脑或其它神经组织中细胞外谷氨酸浓度异常的病症的

患者的方法。所述方法包含给患者施用有效量的能抑制细菌源青霉素结合蛋白活性的化合物的步骤。组合物以能预防或减轻所述病症的症状的有效量施用。因此，例如据报道，在中风患者或其它脑创伤患者的脑中存在局部高谷氨酸浓度。最近有人报道，脑和外周神经组织中的高谷氨酸浓度与多发性硬化有关。

在另一个本发明实施方案中，本发明提供了治疗人类患者中选自前列腺癌和良性前列腺增生的前列腺疾病的方法。所述方法包含给患者施用包含能抑制细菌源青霉素结合蛋白活性的化合物的组合物的步骤。组合物以能延迟所述疾病的进程或减轻所述病症的症状的有效量施用。

一组依据本发明使用的化合物是 β -内酰胺化合物，即具有 β -内酰胺环系的化合物，包括特别是 β -内酰胺抗生素例如青霉素类、头孢菌素类和它们的类似物。此外，已发现肽 Ala-D- γ -Glu-Lys-D-Ala-D-Ala (据信起 NAALAD 酶的底物的作用)能有效地作为肽酶抑制剂来依据本发明用于行为改进和提高认知。非 β -内酰胺 NAALAD 酶抑制剂已在专利和非专利文献中有报道。参见例如 U. S. 专利 5,795,877; 5,804,602; 5,968,915; 5,902,817; 5,962,521; 5,863,536, 和 6,017,903, 将所述专利的说明书引入本发明以作参考，这些专利公开了这样的 NAALAD 酶抑制剂，以及通常这样的 NAALAD 酶抑制剂在治疗对 NAALAD 酶抑制治疗有反应的一些疾病状态中的应用。其它能依据本发明使用的化合物可用分子模型研究来确定。适用于本发明的抗生素化合物可以与一种或多种其它酶抑制剂，例如有效量的 β -内酰胺酶抑制剂(其中所述活性化合物是 β -内酰胺化合物)或另一种 NAALAD 酶抑制剂或 P-糖蛋白流出抑制剂联合施用来提高活性化合物的脑水平。本发明实施方案的方法和制剂既能在人类健康中使用，也能在兽医中使用，例如用于犬、猫和马类动物。

在一个本发明实施方案中，在口服(包括颊或舌下给药)或非胃肠道给药制剂中用任选作为活性酯衍生物的 1-氧杂-1-去硫杂头孢菌素，更优选 7-甲氧基-1-氧杂-1-去硫杂头孢菌素治疗患有其特征是认知或行为异常的神经病的温血脊椎动物、最优选人类患者。在一个实施方案中，肽酶抑制剂是拉氧头孢，[7- β -[2-羧基-2-(4-羟基苯基)乙酰氧基]-7 α -甲氧基-3-[[(1-甲基-1H-四唑-5-基) 硫基] 甲基]-1-

氧杂-1-去硫杂-3-头孢(cephem)-4-甲酸], U. S. 专利 4, 323, 567 中描述了并要求保护该化合物以及相关化合物, 包括其口服吸收的活性酯衍生物, 将该专利的说明书引入本发明以作参考。已发现, 当以至少约 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重的剂量非胃肠施用, 拉氧头孢表现出显著的剂量反应性神经活性。

在另一个本发明实施方案中, 本发明提供了用于治疗以随后减轻需要这种治疗的患者中行为或认知障碍的症状的药物制剂。所述制剂包含其特征是对细菌衍生的青霉素结合蛋白有亲和力的化合物。在一个实施方案中, 所述化合物能结合下述细菌蛋白酶并抑制其功能, 即已知对包含 C-末端肽序列酰基-D-丙氨酰基-D-丙氨酸的肽聚糖底物表现出其蛋白酶解活性的细菌蛋白酶。在另一个实施方案中, 化合物能结合 β -内酰胺酶——能结合青霉素的另一种细菌蛋白, 并抑制该酶的功能。所用抑制剂在制剂中的含量为经确定能有效地抑制内源性 NAALAD 酶活性的量。在一个实施方案中, 该量在足以调节认知和行为特性的水平下能有效地抑制脑中的 NAALAD 酶。在后一实施方案中, NAALAD 酶抑制剂在本发明方法中表现出的活性水平不仅取决于其对青霉素结合蛋白和 NAALAD 酶的亲和力, 还特别取决于抑制剂化合物穿越血脑屏障以在脑中达到能有效地调节患者行为和/或认知能力的水平的能力。

在一个本发明实施方案中, 药物制剂包含选自下列的含 β -内酰胺的化合物: 青霉素、头孢菌素类、其含 β -内酰胺的类似物, 包括 β -内酰胺酶抑制剂, 和用于所述含 β -内酰胺的化合物的药物载体。当 β -内酰胺化合物是例如市售抗生素时, β -内酰胺化合物在所述制剂中的含量低于通过商业上详细说明书的给药方式施用以产生临床有效的化合物抗菌血液水平所需的量。然而, 假定具有适当的血脑屏障穿越特性、剂量水平降低的所述抗生素可有效地产生足以抑制脑中神经原性蛋白酶活性并调节认知和行为特性的化合物的脑和 CSF 水平。此外, 这样的制剂还可任选包括有效量的一种或多种 β -内酰胺酶抑制剂和 P-糖蛋白流出泵抑制剂或者能抑制 NAALAD 酶和相关神经原性酶活性的另一化合物。虽然可具体制备本发明制剂以适于通过能够在脑中达到阈值最小蛋白酶抑制浓度的本领域已知给药方式来施用, 但是一般将其配制成适于非胃肠道或口服给药的形式, 并任选将其配制成本领域众所

周知的延长释放或“贮药库”类型制剂。

附图的简要说明

附图 1-42 是表示下述数据的图：在测定抗侵略性攻击行为活性
5 (附图 1-4、9-14、24、29、31 和 32)、一般运动原活性、嗅觉辨别
(附图 5)、性活性(附图 6)、抗焦虑活性(附图 7、25、26、28、37 和
40)、和空间记忆力(附图 8 和 29-36)的本领域所接受的不同动物模
型中测试拉氧头孢、其它 β -内酰胺抗生素、棒酸(clavulanic acid)、
和其它神经活性化合物所收集的数据。附图 15 和 16 表示的是，在仓
10 鼠中脑内施用肽聚糖前体蛋白对攻击性侵略行为和嗅觉辨别的影响。

发明详述

本发明以及在本文中描述和要求保护的各实施方案部分基于下述
发现：能结合和抑制细菌源青霉素结合蛋白的酶活性的化合物也是 N-
15 乙酰化- α -连接酸二肽酶 (NAALAD 酶) 活性以及脑中可能的其它相关酶
的强效抑制剂，并且当将其给药以在脑中提供有效的阈值 NAALAD 酶抑
制浓度时，NAALAD 酶抑制剂在临床上表现出显著的神经活性，部分表
现为行为改进以及提高认知和功能。

在一个实施方案中，依据本发明有效使用的 NAALAD 酶抑制剂的特
20 征是，它们能抑制对包含酰基-D-丙氨酰基-D-丙氨酸的蛋白或肽底物
表现出选择性蛋白酶解活性的细菌蛋白酶。或者，可依据本发明一个
实施方案治疗行为和认知障碍的有效 NAALAD 酶抑制剂的特征是，它们
对青霉素结合蛋白有选择性的亲和力(通过缔合/或共价结合)；这样的
化合物特别包括 β -内酰胺抗生素例如青霉素类、头孢菌素类及其类似
25 物。根据迄今为止的动物测试，在脑中这样的细菌蛋白酶抑制剂似乎
在亚临床抗菌水平上起作用来抑制可在行为和认知的神经化学介导中
起作用的神经肽酶活性。通过施用 β -内酰胺酶抑制剂、棒酸、一种在
临床上没有显著抗菌活性的含有 β -内酰胺的化合物，能有效地抑制神
经肽酶活性，同时调节行为和认知能力。据推测，抑制这样的神经肽
30 酶(例如 NAALAD 酶)活性可调节一种或多种神经递质或神经调质的浓
度和/或功能，同时改善表现为认知能力增强和行为表现型异常减轻的
神经功能。在一个本发明实例中，腹膜内施用 50 微克/kg 拉氧头孢抑

制了仓鼠中的攻击行为，提高了大鼠的空间学习能力，并且在大鼠中起抗焦虑剂作用。当以 1 微克/kg 以下的剂量腹膜内施用，棒酸表现出类似活性。

在历史上， β -内酰胺抗生素领域技术人员知道，抗菌剂的作用方式是通过起青霉素结合蛋白 (PBP) 的底物的作用来抑制细胞壁合成；术语 PBP 已被扩展，其包括结合所有 β 内酰胺包括头孢菌素类的蛋白。最近，研究人员已经能够克隆这些 PBP 并测定其序列，还结晶了这些酶并测定了其活性位点基元 (参见 P. Palomeque 等人, J. Biochem., 279, 223-230, 1991)。根据这些数据，已设计了四种 PBP 的公认结合位点，即活性位点 I、II、III 和 IV。这些活性位点、序列位置以及氨基酸 (AA) 序列如下所述：

活性位点 I:

从 N-末端开始计的上游的 35 AA's: STTK

15 活性位点 II:

从 STTK 基元开始计的上游的 57 AA's: SGC、SGN、或 SAN

活性位点 III:

从 SGC 基元开始计的上游的 111 AA's: KTG

活性位点 IV:

20 从 SGC 基元开始计的上游的 41 AA's: ENKD

通过努力鉴定被拉氧头孢以类似于抑制 PBP 的方式抑制的脑中的酶系统，发现了称为 N-乙酰基- α -连接酸二肽酶 (NAALADase) 的谷氨酰基羧肽酶 (参见 M.N. Pangalos 等人, J. Bio. Chem., 264, 8470-8483, 1999) 具有与公认的 PBP 活性位点几乎完全重叠的位点。该酶系统调节谷氨酸能神经传递路径，其作用表现为诸如攻击行为、记忆/认知、和焦虑的行为后果。作为公认的 PBP 活性位点与人和大鼠 NAALAD 酶中的保守序列几乎完全重叠的后果，据信拉氧头孢以及其它 β -内酰胺化合物在低浓度下通过抑制 NAALAD 酶来介导行为作用。这是基于下述在 PBP 与 NAALAD 酶 I——几种已知的 NAALAD 酶当中的一种——之间的重叠序列类似性，如下所示：

活性位点 I:

PBP: 从 N-末端开始计的上游的 35 AA's: STTK

NAALAD 酶: 从 N-末端开始计的上游的 38 AA's: STQK

活性位点 II:

5 PBP: 从 STTK 基元开始计的上游的 57 AA's: SGC、SGN、或 SAN

NAALAD 酶: 从 STQK 基元开始计的上游的 59 AA's: SFG

活性位点 III:

PBP: 从 SGC 基元开始计的上游的 111 AA's: KTG

NAALAD 酶: 从 SFG 基元开始计的上游的 110 AA's: KLG

10 活性位点 IV:

PBP: 从 SGC 基元开始计的上游的 41 AA's: ENKD

NAALAD 酶: 从 SFG 基元开始计的上游的 41 AA's: ERGV

15 因为 β -内酰胺通过结合这四个活性位点来抑制细菌细胞壁的 PBP 转肽基作用, 所以可推断, 这种在活性位点序列和位置中的保存类似性将使得拉氧头孢和其它 β -内酰胺化合物对 NAALAD 酶以及具有与这 4 个活性结合位点基元重叠的序列的其它神经原性酶有类似结合特性。该发现与施用非常低剂量的一些青霉素蛋白结合化合物会带来显著的行为改进作用这一观察结合起来, 给我们提供了预防和治疗特征是神经机能障碍的疾病的新方法。

20 迄今为止已进行过充分研究的两种 β -内酰胺化合物拉氧头孢和棒酸的独特神经活性表明, 这些化合物对多种神经原性酶靶表现出活性, 这些酶包括 NAALAD 酶和在结构上相关的酶, 特别是可能与 PBP 和 NAALAD 酶共享 4 个活性结合位点基元的酶。为了鉴定出与拉氧头孢和棒酸的行为与认知活性有关的其它公认神经原性目标, 使用 NAALAD 酶 II 的序列来检索人类基因组数据库 (NCBI-BLAST)。确定了与 NAALAD 酶 II 有显著的同源性并且编码这 4 个活性位点基元的 7 个人基因序列:

30 1) > dbj/AP001769.2/AP001769 Homo sapiens 染色体 11 克隆 RP11-240F8 map 11q14

活性位点 I:

PBP: 从 N-末端开始计的上游的 35 AA's:.....STTK

NAALAD 酶: 从 N-末端开始计的上游的 38 AA's:STQK

> dbj/AP001769: NSRK

5 活性位点 II:

PBP: 从 STTK 基元开始计的上游的 57 AA's:.....SGC、SGN、或 SAN

NAALAD 酶: 从 STQK 基元开始计的上游的 59 AA's:SFG

> dbj/AP001769: SFG

活性位点 III:

10 PBP: 从 SGC 基元开始计的上游的 111 AA's:.....KTG

NAALAD 酶: 从 SFG 基元开始计的上游的 110 AA's:KLG

> dbj/AP001769: KLG

活性位点 IV:

PBP: 从 SGC 基元开始计的上游的 41 AA's:.....ENKD

15 NAALAD 酶: 从 SFG 基元开始计的上游的 41 AA's: ERGV

> dbj/AP001769: ERSI

2) > dbj|AP000827.2|AP000827 Homo sapiens 染色体 11 克隆 RP.

活性位点 I:

20 PBP: 从 N-末端开始计的上游的 35 AA's:.....STTK

NAALAD 酶: 从 N-末端开始计的上游的 38 AA's: STQK

> dbj|AP000827.2: NSRK

活性位点 II:

PBP: 从 STTK 基元开始计的上游的 57 AA's:.....SGC、SGN、或 SAN

25 NAALAD 酶: 从 STQK 基元开始计的上游的 59 AA's: SFG

> dbj|AP000827.2: SFG

活性位点 III:

PBP: 从 SGC 基元开始计的上游的 111 AA's:.....KTG

NAALAD 酶: 从 SFG 基元开始计的上游的 110 AA's: KLG

30 > dbj|AP000827.2: KLG

活性位点 IV:

PBP: 从 SGC 基元开始计的上游的 41 AA's:.....ENKD

- NAALAD 酶: 从 SFG 基元开始计的上游的 41 AA' s: ERGV
> dbj|AP000827.2: ERSI
- 3) > dbj|AP000648.2|AP000648 Homo sapiens 染色体 11 克隆 CM.
- 5 活性位点 I:
PBP: 从 N-末端开始计的上游的 35 AA' s:.....STTK
NAALAD 酶: 从 N-末端开始计的上游的 38 AA' s: STQK
>> dbj|AP000648.2: NSRK
活性位点 II:
- 10 PBP: 从 STTK 基元开始计的上游的 57 AA' s:.....SGC、SGN、或 SAN
NAALAD 酶: 从 STQK 基元开始计的上游的 59 AA' s: SFG
> dbj|AP000648.2: SFG
活性位点 III:
PBP: 从 SGC 基元开始计的上游的 111 AA' s:.....KTG
- 15 NAALAD 酶: 从 SFG 基元开始计的上游的 110 AA' s: KLG
> dbj|AP000648.2: KLG
活性位点 IV:
PBP: 从 SGC 基元开始计的上游的 41 AA' s:.....ENKD
NAALAD 酶: 从 SFG 基元开始计的上游的 41 AA' s: ERGV
- 20 > dbj|AP000648.2: ERSI
- 4) > gb|AC074003.2|AC074003 Homo sapiens 染色体 2 克隆 RP11.
- 活性位点 I:
PBP: 从 N-末端开始计的上游的 35 AA' s:.....STTK
- 25 NAALAD 酶: 从 N-末端开始计的上游的 38 AA' s: STQK
gb|AC074003.2|AC074003: STQ-
活性位点 II:
PBP: 从 STTK 基元开始计的上游的 57 AA' s:.....SGC、SGN、或 SAN
NAALAD 酶: 从 STQK 基元开始计的上游的 59 AA' s: SFG
- 30 gb|AC074003.2|AC074003: SFG
活性位点 III:
PBP: 从 SGC 基元开始计的上游的 111 AA' s:.....KTG

- NAALAD 酶: 从 SFG 基元开始计的上游的 110 AA' s: KLG
gb|AC074003.2|AC074003: KLG
活性位点 IV:
PBP: 从 SGC 基元开始计的上游的 41 AA' s:.....ENKD
- 5 NAALAD 酶: 从 SFG 基元开始计的上游的 41 AA' s: ERGV
gb|AC074003.2|AC074003: ERGV
- 5) > emb|AL162372.6|AL162372 Homo sapiens 染色体 13 克隆 RP.
活性位点 I:
10 PBP: 从 N-末端开始计的上游的 35 AA' s:.....STTK
NAALAD 酶: 从 N-末端开始计的上游的 38 AA' s: STQK
emb|AL162372.6: STQ-
活性位点 II:
PBP: 从 STTK 基元开始计的上游的 57 AA' s:.....SGC、SGN、或 SAN
- 15 NAALAD 酶: 从 STQK 基元开始计的上游的 59 AA' s: SFG
emb|AL162372.6: SFG
活性位点 III:
PBP: 从 SGC 基元开始计的上游的 111 AA' s:.....KTG
NAALAD 酶: 从 SFG 基元开始计的上游的 110 AA' s: KLG
- 20 emb|AL162372.6: KLG
活性位点 IV:
PBP: 从 SGC 基元开始计的上游的 41 AA' s:.....ENKD
NAALAD 酶: 从 SFG 基元开始计的上游的 41 AA' s: ERGV
emb|AL162372.6: ERGV
- 25
- 6) gb|AC024234.5|AC024234 Homo sapiens 染色体 11 克隆 RP1.
活性位点 I:
PBP: 从 N-末端开始计的上游的 35 AA' s:.....STTK
NAALAD 酶: 从 N-末端开始计的上游的 38 AA' s: STQK
- 30 gb|AC024234.5|AC024234: STQ-
活性位点 II:
PBP: 从 STTK 基元开始计的上游的 57 AA' s:.....SGC、SGN、或 SAN

- NAALAD 酶: 从 STQK 基元开始计的上游的 59 AA' s: SFG
gb|AC024234.5|AC024234: SFG
活性位点 III:
PBP: 从 SGC 基元开始计的上游的 111 AA' s:.....KTG
- 5 NAALAD 酶: 从 SFG 基元开始计的上游的 110 AA' s: KLG
gb|AC024234.5|AC024234: KLG
活性位点 IV:
PBP: 从 SGC 基元开始计的上游的 41 AA' s:.....ENKD
NAALAD 酶: 从 SFG 基元开始计的上游的 41 AA' s: ERGV
10 gb|AC024234.5|AC024234: ERGV
- 7) dbj|AP002369.1|AP002369 Homo sapiens 染色体 11 克隆 RP....
活性位点 I:
PBP: 从 N-末端开始计的上游的 35 AA' s:.....STTK
- 15 NAALAD 酶: 从 N-末端开始计的上游的 38 AA' s: STQK
dbj|AP002369.1: STQ-
活性位点 II:
PBP: 从 STTK 基元开始计的上游的 57 AA' s:.....SGC、SGN、或 SAN
NAALAD 酶: 从 STQK 基元开始计的上游的 59 AA' s: SFG
20 dbj|AP002369.1: SFG
活性位点 III:
PBP: 从 SGC 基元开始计的上游的 111 AA' s:.....KTG
NAALAD 酶: 从 SFG 基元开始计的上游的 110 AA' s: KLG
dbj|AP002369.1: KLG
- 25 活性位点 IV:
PBP: 从 SGC 基元开始计的上游的 41 AA' s:.....ENKD
NAALAD 酶: 从 SFG 基元开始计的上游的 41 AA' s: ERGV
dbj|AP002369.1: ERGV

30 在脑中表达的各基因序列的编码蛋白是 β -内酰胺和其它 NAALAD 酶抑制剂的行为和认知活性的可能的靶目标。因此, 依据本发明的一个方面, 本发明提供了改善行为和/或认知的方法, 该方法包含通过施

用有效量的 β -内酰胺化合物或能抑制 NAALAD 酶的其它化合物来抑制由一个或多个上述确定的基因序列表达的非 NAALAD 酶蛋白的生物活性的步骤。

在一个实施方案中，一般而言，能有效地用于本发明不同药物制剂和方法实施方案的 NAALAD 酶抑制剂是对本领域众所周知的青霉素结合蛋白表现出可检测到的选择性亲和力的化合物，包括特别是含有 β -内酰胺的化合物(下文称为“ β -内酰胺化合物”)例如青霉素类和头孢菌素类及其类似物，一些 β -内酰胺酶抑制剂，和包含氨基酸序列 Ala-D- γ -Glu-Lys-D-Ala-D-Ala 的肽。在这样的 NAALAD 酶抑制化合物当中，优选依据本发明使用的是还表现出良好血脑屏障运输特性(由良好的脑脊液(CSF)/脑:血清浓度比例表示)的化合物。此外，应当理解，其它本领域众所周知的 NAALAD 酶抑制剂可单独使用或者与青霉素蛋白结合化合物联合使用来治疗和预防行为和/或认知障碍。

在涉及用于抑制神经源性 NAALAD 酶以改善行为和/或改善认知功能的药物制剂的本发明实施方案中， β -内酰胺化合物或其它 NAALAD 酶抑制化合物，包括这类化合物的肽或类似物一般是配制成单位剂型，这样的单位剂型任选与已知能促进药物穿越血脑屏障运输的其它化合物或分子实体联合使用或作为共价轭合物使用。下列美国专利(这些专利的说明书引入本发明以作参考)描述并要求保护这样的药物制剂/轭合技术: U. S. 专利 5,624,894; 5,672,683; 5,525,727; 5,413,996; 5,296,483; 5,187,158; 5,177,064; 5,082,853; 5,008,257; 4,933,438; 4,900,837; 4,880,921; 4,824,850; 4,771,059; 和 4,540,564。

提高包括 NAALAD 酶抑制剂在内的药物在脑中的浓度可通过与 P-糖蛋白流出抑制剂例如在下列专利中描述的那些联合施用来实现: U. S. 专利 5,889,007; 5,874,434; 5,654,304; 5,620,855; 5,643,909; 和 5,591,715, 这些专利的说明书引入本发明以作参考。或者，可依据本发明使用的 β -内酰胺抗生素化合物，包括青霉素类、头孢菌素类、苯氧乙基青霉素钾类、1-氧杂-1-去硫杂 cephems、clavams、clavems、azetidinones、carbapenams、carbapenems、和 carbacephems 可单独使用或者与本领域众所周知的 β -内酰胺酶抑制剂联合使用，这些 β -内酰胺酶抑制剂自身可以是或者可以不是能够对青霉素结合蛋白表现

出选择性亲和力的 β -内酰胺化合物。可依据本发明单独使用或者与其它神经肽酶抑制剂联合使用来治疗和/或预防认知或行为障碍的 β -内酰胺酶抑制剂的实例是在临床上可以或可以不表现出独立的显著抗菌活性的其它 β -内酰胺化合物,例如棒酸和沙纳霉素及其类似物、舒巴坦、他佐巴坦、舒他西林、和氨曲南以及其它一内酰胺。

有很多专利和非专利文献描述了 β -内酰胺抗生素、其制备、其特征确定、其制剂及其作用方式。已知 β -内酰胺抗生素通过干扰涉及细菌细胞壁合成的一个或多个生物途径来表现出其抗菌活性;尤其是,它们抑制涉及用作构建细胞壁合成单位的肽基聚糖链的交联的羧肽酶和/或转肽基酶(或蛋白酶)活性。因此,据信 β -内酰胺抗生素通过下述机制起羧肽酶或转肽基酶抑制剂的作用:它们共价、非共价缔合(根据某些报道)键合一组或多组通常称为青霉素结合蛋白(PBP's)的细菌酶。这样的酶通过交联肽基聚糖链来完成细菌细胞壁的合成。

现在本发明提出了类似的肽酶-底物相互作用/抑制,以作为涉及对认知能力和行为表现型至关重要的脑功能的重要神经化学途径。之所以提出这样的神经化学机制还是因为下述发现:将有效量的肽 Ala-D- γ -Glu-Lys-D-丙氨酰基-D-丙氨酸直接给到脑中可产生改善的行为特性,并且所产生的行为特性与脑中可以拟的浓度的 β -内酰胺化合物所产生的效果相同。该肽似乎在介导认知能力和行为表现型的一些普通神经化学过程中起着一种或多种神经原性肽酶(通常表现出其对肽神经递质或神经调质、即 NAAD 的活性,例如 NAALAD 酶)的替代底物的作用(并由此抑制其活性)。

根据迄今为止的动物实验,据信一般类型的行为障碍都可以依据本发明通过施用有效量的 NAALAD 酶抑制剂来预防或治疗,包括侵略性精神障碍、强迫观念与行为精神障碍、焦虑症、抑郁症、和注意力缺乏活动过强疾病(ADHD)。因此在一个本发明实施方案中,NAALAD 酶抑制剂选自能结合青霉素结合蛋白的化合物,例如 β -内酰胺抗生素或 β -内酰胺酶抑制剂,和/或对包含 C-末端氨基酸序列酰基-D-丙氨酰基-D-丙氨酸的细菌蛋白或肽底物表现出选择性蛋白酶解活性抑制的化合物,或其它 NAALAD 酶抑制剂,并给患有下列疾病的患者施用作为抗侵略行为剂的上述 NAALAD 酶抑制剂来控制患者的冲动和暴力行为:孤独症、图雷特氏综合征、精神发育迟缓、精神病、躁狂症、老年性痴呆,

或给予有人格障碍以及不适当侵略行为史的患者。在另一实施方案中，施用有效量的去氨基谷氨酸类似物或 N-取代的谷氨酸衍生物来控制患有这样的病症的患者中的冲动和暴力行为。

可依据本发明治疗的其它神经病包括抑郁症，包括重性抑郁症(个别发作、复发、忧郁症)、非典型抑郁症、胸腺机能障碍性抑郁症、亚综合征性抑郁症、激越性抑郁症、运动阻抑性抑郁症、与癌症、糖尿病或心肌梗塞后一起致病的抑郁症、更年期抑郁症、双相型精神障碍、精神病性抑郁症，内源性和反应性抑郁症、强迫观念与行为精神障碍，或食欲过盛。此外，NAALAD 酶抑制剂可用于治疗患有下列疾病的患者：

5 疼痛(单独施用或者与吗啡、可待因或右旋丙氧吩联合施用)、强迫观念与行为人格精神障碍、创伤后紧张性障碍、高血压、动脉粥样硬化、焦虑症、神经性食欲缺乏、疼痛、社会恐怖症、口吃、睡眠障碍、慢性疲劳、与阿尔茨海默氏病有关的认知不足、酒精滥用、食欲障碍、

10 体重减轻、广场恐怖症、改善记忆、健忘症、戒烟、尼古丁戒断综合征症状、与月经前综合征有关的情绪和/或食欲失调、与月经前综合征有关的情绪抑郁和/或糖类嗜欲、与尼古丁戒断有关的情绪失调、食欲失调或导致复发趋向的失调、24 小时生理节奏的节律混乱、边缘型人格障碍、疑病症、月经前综合征(PMS)、后黄体期焦虑症、月经前焦虑症、拔毛发癖、其它抗抑制药停止后的症状、侵略性/间歇性爆发性障

15 碍、强迫性赌博、强迫性消费、强迫性欲、使用对精神起作用的物质所带来的病症、性障碍、精神分裂症、早泄、或选自紧张、忧虑、愤怒、拒绝敏感的精神病症状、和缺乏精神或身体活力。

20

可依据本发明治疗的精神病的其它实例包括但不限于：中度精神发育迟缓(318.00)、严重精神发育迟缓(318.10)、深度精神发育迟缓

25 (318.20)、非未特指的精神发育迟缓(319.00)、孤独障碍(299.00)、蔓延型发育障碍 NOS (299.80)、注意力缺乏活动过强障碍(314.01)、团体型行为障碍(312.20)、孤立侵略型行为障碍(312.00)、混合型行为障碍(312.90)、图雷特氏病(307.23)、慢性运动原或声音抽搐病症(307.22)、短暂抽搐病症(307.21)、抽搐病症 NOS (307.20)、老年

30 发作、无并发症的阿尔茨海默氏病型原发性退变性痴呆(290.00)、老年发作、伴有谵妄的阿尔茨海默氏病型原发性退变性痴呆(290.30)、老年发作、伴有妄想的阿尔茨海默氏病型原发性退变性痴呆

- (390.20)、老年发作、伴有抑郁症的阿尔茨海默氏病型原发性退变性痴呆(290.21)、老年前期发作、无并发症的阿尔茨海默氏病型原发性退变性痴呆(290.10)、老年前期发作、伴有谵妄的阿尔茨海默氏病型原发性退变性痴呆(290.11)、老年前期发作、伴有妄想的阿尔茨海默氏病型原发性退变性痴呆(290.12)、老年前期发作、伴有抑郁症的阿尔茨海默氏病型原发性退变性痴呆(290.13)、无并发症的多梗塞痴呆(290.40)、伴有谵妄的多梗塞痴呆(290.41)、伴有妄想的多梗塞痴呆(290.42)、伴有抑郁症的多梗塞痴呆(290.43)、老年性痴呆 NOS(290.10)、早老性痴呆 NOS(290.10)、酒精戒断性谵妄(291.00)、酒精性幻觉症(291.30)、与酒精中毒有关的酒精性痴呆(291.20)、苯丙胺或类似作用的拟交感神经药中毒(305.70)、苯丙胺或类似作用的拟交感神经药中毒妄想性障碍(292.11)、大麻性妄想性障碍(292.11)、可卡因中毒(305.60)、可卡因性谵妄(292.81)、可卡因性妄想性障碍(292.11)、迷幻剂性幻觉症(305.30)、迷幻剂性妄想性障碍(292.11)、迷幻剂性心境障碍(292.84)、迷幻剂迷幻剂后知觉障碍(292.89)、苯环利定(PCP)或类似作用的芳基环己基胺中毒(305.90)、苯环利定(PCP)或类似作用的芳基环己基胺性谵妄(292.81)、苯环利定(PCP)或类似作用的芳基环己基胺性妄想性障碍(292.11)、苯环利定(PCP)或类似作用的芳基环己基胺性心境障碍(292.84)、苯环利定(PCP)或类似作用的芳基环己基胺性器质性精神障碍 NOS(292.90)、其它或未特指的对精神起作用的物质中毒(305.90)、其它或未特指的应用精神作用物质所致谵妄(292.81)、其它或未特指的应用精神作用物质所致痴呆(292.82)、其它或未特指的应用精神作用物质所致妄想性障碍(292.11)、其它或未特指的应用精神作用物质所致幻觉症(292.12)、其它或未特指的应用精神作用物质所致心境障碍(292.84)、其它或未特指的应用精神作用物质所致焦虑症(292.89)、其它或未特指的应用精神作用物质所致人格障碍(292.89)、其它或未特指的应用精神作用物质所致器质性精神障碍 NOS(292.90)、谵妄(293.00)、痴呆(294.10)、器质性妄想性障碍(293.81)、器质性幻觉症(293.81)、器质性心境障碍(293.83)、器质性焦虑症(294.80)、器质性人格障碍(310.10)、器质性精神障碍(29.80)、强迫观念与行为精神障碍(300.30)、创伤后紧张性障碍

(309.89)、泛化性焦虑症(300.02)、焦虑症 NOS (300.00)、身体变形性精神障碍(300.70)、疑病症(或疑病性神经机能病) (300.70)、躯体症状化障碍(300.81)、混合型躯体病样精神障碍(300.70)、躯体病样精神障碍 NOS (300.70)、间歇性爆发性障碍(312.34)、盗窃癖(312.32)、病理性赌博(312.31)、放火狂(312.33)、拔毛发癖(312.39)、和冲动控制障碍 NOS(312.39)。

可用本发明所描述的包含 β -内酰胺的蛋白酶抑制剂治疗的精神病的其它实例包括亚慢性紧张症型精神分裂症(295.21)、慢性紧张症型精神分裂症(295.22)、伴有急性恶化的亚慢性紧张症型精神分裂症(295.23)、伴有急性恶化的慢性紧张症型精神分裂症(295.24)、处于缓解期的紧张症型精神分裂症(295.55)、未特指的紧张症型精神分裂症(295.20)、慢性错乱型精神分裂症(295.12)、伴有急性恶化的亚慢性错乱型精神分裂症(295.13)、伴有急性恶化的慢性错乱型精神分裂症(295.14)、处于缓解期的错乱型精神分裂症(295.15)、未特指的错乱型精神分裂症(295.10)、亚慢性妄想型精神分裂症(295.31)、慢性妄想型精神分裂症(295.32)、伴有急性恶化的亚慢性妄想型精神分裂症(295.33)、伴有急性恶化的慢性妄想型精神分裂症(295.34)、处于缓解期的妄想型精神分裂症(295.35)、未特指的妄想型精神分裂症(295.30)、亚慢性混合型精神分裂症(295.91)、慢性混合型精神分裂症(295.92)、伴有急性恶化的亚慢性混合型精神分裂症(295.93)、伴有急性恶化的慢性混合型精神分裂症(295.94)、处于缓解期的混合型精神分裂症(295.95)、未特指的混合型精神分裂症(295.90)、亚慢性残余型精神分裂症(295.61)、慢性残余型精神分裂症(295.62)、伴有急性恶化的亚慢性残余型精神分裂症(295.63)、伴有急性恶化的慢性残余型精神分裂症(295.94)、处于缓解期的残余型精神分裂症(295.65)、未特指的残余型精神分裂症(295.60)、妄想性(偏执狂样)障碍(297.10)、短暂反应性精神病(298.80)、精神分裂症样精神障碍(295.40)、分裂情感性精神障碍(295.70)、感应性精神障碍(297.30)、精神障碍 NOS (非典型精神病) (298.90)、无精神病特征的严重、混合型、双相性精神障碍(296.63)、无精神病特征的严重、躁狂型、双相性精神障碍(296.43)、无精神病特征的严重、抑郁型、双相性精神障碍(296.53)、有精神病特征的混合型、双相性精神障碍

(296.64)、有精神病特征的躁狂型、双相性精神障碍(296.44)、有精神病特征的抑郁型、双相性精神障碍(296.54)、双相性精神障碍 NOS(296.70)、具有神经病特征的单一发作、重性抑郁症(296.24)、具有神经病特征的复发的重性抑郁症(296.34)、妄想型人格障碍
5 (301.00)、精神分裂样人格障碍(301.20)、精神分裂症型人格障碍(301.22)、反社会性人格障碍(301.70)、边缘型人格障碍(301.83)。

可依据本发明治疗的焦虑症包括但不限于焦虑症(235)、惊恐性障碍(235)、伴有广场恐怖症的惊恐性障碍(300.21)、不伴有广场恐怖症的惊恐性障碍(300.01)、无惊恐性障碍史的广场恐怖症(300.22)、社会恐怖症(300.23)、单纯型恐怖症(300.29)、器质性焦虑症
10 (294.80)、应用精神作用物质所致焦虑症(292.89)、分离焦虑症(309.21)、青少年怯生症(313.21)、和过度焦虑症(313.00)。

有效量的本文所描述的 NAALAD 酶抑制剂,特别是 β -内酰胺化合物可用于治疗下列精神病:中度精神发育迟缓;严重精神发育迟缓;深度精神发育迟缓;孤独症;注意力缺乏活动过强病症;蔓延型发育障碍 NOS;团体型行为障碍;孤立侵略型行为障碍;图雷特氏病;老年发作、伴有谵妄的阿尔茨海默氏病型原发性退变性痴呆;老年发作、伴有妄想的阿尔茨海默氏病型原发性退变性痴呆;老年前期发作、阿尔茨海默氏病型原发性退变性痴呆;亚慢性紧张症型精神分裂症;慢性
20 紧张症型精神分裂症;伴有急性恶化的亚慢性紧张症型精神分裂症;伴有急性恶化的慢性紧张症型精神分裂症;处于缓解期的紧张症型精神分裂症;未特指的紧张症型精神分裂症;亚慢性错乱型精神分裂症;慢性错乱型精神分裂症;伴有急性恶化的亚慢性错乱型精神分裂症;伴有急性恶化的慢性错乱型精神分裂症;处于缓解期的错乱型精神分裂症;未特指的错乱型精神分裂症;亚慢性妄想型精神分裂症;慢性
25 妄想型精神分裂症;伴有急性恶化的亚慢性妄想型精神分裂症;伴有急性恶化的慢性妄想型精神分裂症;处于缓解期的妄想型精神分裂症;未特指的妄想型精神分裂症;亚慢性混合型精神分裂症;慢性混合型精神分裂症;伴有急性恶化的亚慢性混合型精神分裂症;伴有急性恶化的慢性混合型精神分裂症;处于缓解期的混合型精神分裂症;
30 未特指的混合型精神分裂症;亚慢性残余型精神分裂症;慢性残余型精神分裂症;伴有急性恶化的亚慢性残余型精神分裂症;伴有急性恶

化的慢性残余型精神分裂症；处于缓解期的残余型精神分裂症；未特指的残余型精神分裂症；妄想性(偏执狂样)障碍；短暂反应性精神病；精神分裂症样精神障碍；分裂情感性精神障碍；感应性精神障碍；精神障碍 NOS (非典型精神病)；有精神病特征的混合型、双相性精神障碍；有精神病特征的躁狂型、双相性精神障碍；有精神病特征的抑郁型、双相性精神障碍；双相性精神障碍 NOS；具有神经病特征的单一发作或复发的重性抑郁症；妄想型人格障碍；精神分裂样人格障碍；精神分裂症型人格障碍；反社会性人格障碍；边缘型人格障碍；焦虑症；惊恐性障碍；伴有广场恐怖症的惊恐性障碍；不伴有广场恐怖症的惊恐性障碍；无惊恐性障碍史的广场恐怖症；社会恐怖症；单纯型恐怖症；强迫观念与行为精神障碍；创伤后紧张性障碍；泛化性焦虑症；焦虑症 NOS；器质性焦虑症；应用精神作用物质所致焦虑症；分离焦虑症；青少年怯生症；和过度焦虑症。

一种或多种神经原性 NAALAD 酶抑制剂，包括特别是亲神经的 β -内酰胺抗生素或 β -内酰胺酶抑制剂可单独使用或者与 P-糖蛋白抑制剂联合使用来治疗下列精神病：亚慢性紧张症型精神分裂症；慢性紧张症型精神分裂症；伴有急性恶化的亚慢性紧张症型精神分裂症；伴有急性恶化的慢性紧张症型精神分裂症；处于缓解期的紧张症型精神分裂症；未特指的紧张症型精神分裂症；亚慢性错乱型精神分裂症；慢性错乱型精神分裂症；伴有急性恶化的亚慢性错乱型精神分裂症；伴有急性恶化的慢性错乱型精神分裂症；处于缓解期的错乱型精神分裂症；未特指的错乱型精神分裂症；亚慢性妄想型精神分裂症；慢性妄想型精神分裂症；伴有急性恶化的亚慢性妄想型精神分裂症；伴有急性恶化的慢性妄想型精神分裂症；处于缓解期的妄想型精神分裂症；未特指的妄想型精神分裂症；亚慢性混合型精神分裂症；慢性混合型精神分裂症；伴有急性恶化的亚慢性混合型精神分裂症；伴有急性恶化的慢性混合型精神分裂症；处于缓解期的混合型精神分裂症；未特指的混合型精神分裂症；亚慢性残余型精神分裂症；慢性残余型精神分裂症；伴有急性恶化的亚慢性残余型精神分裂症；伴有急性恶化的慢性残余型精神分裂症；处于缓解期的残余型精神分裂症；未特指的残余型精神分裂症；妄想性(偏执狂样)障碍；短暂反应性精神病；精神分裂症样精神障碍；分裂情感性精神障碍；感应性精神障碍；精神

障碍 NOS (非典型精神病); 有精神病特征的混合型、双相性精神障碍; 有精神病特征的躁狂型、双相性精神障碍; 有精神病特征的抑郁型、双相性精神障碍; 双相性精神障碍 NOS; 妄想型人格障碍; 精神分裂样人格障碍; 精神分裂症型人格障碍; 反社会性人格障碍; 边缘型人格障碍。

5 最优选用本发明方法治疗的精神病的实例包括: 亚慢性紧张症型精神分裂症; 慢性紧张症型精神分裂症; 伴有急性恶化的亚慢性紧张症型精神分裂症; 伴有急性恶化的慢性紧张症型精神分裂症; 处于缓解期的紧张症型精神分裂症; 未特指的紧张症型精神分裂症; 亚慢性
10 错乱型精神分裂症; 慢性错乱型精神分裂症; 伴有急性恶化的亚慢性错乱型精神分裂症; 伴有急性恶化的慢性错乱型精神分裂症; 处于缓解期的错乱型精神分裂症; 未特指的错乱型精神分裂症; 亚慢性妄想型精神分裂症; 慢性妄想型精神分裂症; 伴有急性恶化的亚慢性妄想型精神分裂症; 伴有急性恶化的慢性妄想型精神分裂症; 处于缓解期
15 的妄想型精神分裂症; 未特指的妄想型精神分裂症; 亚慢性混合型精神分裂症; 慢性混合型精神分裂症; 伴有急性恶化的亚慢性混合型精神分裂症; 伴有急性恶化的慢性混合型精神分裂症; 处于缓解期的混合型精神分裂症; 未特指的混合型精神分裂症; 亚慢性残余型精神分裂症; 慢性残余型精神分裂症; 伴有急性恶化的亚慢性残余型精神分
20 裂症; 伴有急性恶化的慢性残余型精神分裂症; 处于缓解期的残余型精神分裂症; 未特指的残余型精神分裂症; 妄想性(偏执狂样)障碍; 短暂反应性精神病; 精神分裂症样精神障碍; 分裂情感性精神障碍; 精神分裂样人格障碍; 精神分裂症型人格障碍。

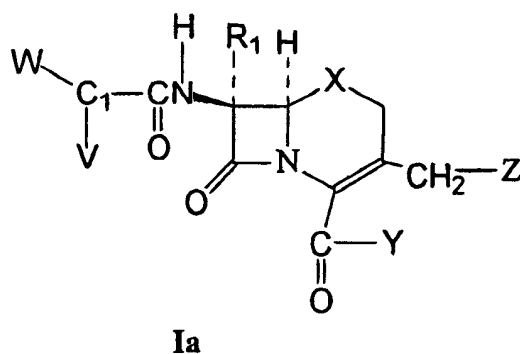
在一个优选的本发明方面, 本发明提供了治疗焦虑症的方法。可
25 用本发明方法和药物制剂治疗的焦虑症的实例包括焦虑症; 惊恐性障碍; 伴有广场恐怖症的惊恐性障碍; 不伴有广场恐怖症的惊恐性障碍; 无惊恐性障碍史的广场恐怖症; 社会恐怖症; 单纯型恐怖症; 强迫观念与行为精神障碍; 创伤后紧张性障碍; 泛化性焦虑症; 焦虑症 NOS; 器质性焦虑症; 应用精神作用物质所致焦虑症; 分离焦虑症; 青少年
30 怯生症; 和过度焦虑症。

可最优选治疗的焦虑症的实例包括惊恐性障碍; 社会恐怖症; 单纯型恐怖症; 器质性焦虑症; 强迫观念与行为精神障碍; 创伤后紧张

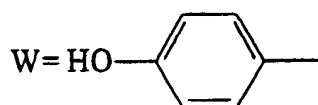
性障碍；泛化性焦虑症；和焦虑症 NOS。

在一个本发明实施方案中，用作本发明方法和制剂中的神经化学官能剂的 NAALAD 酶抑制剂的特征尤其是它们能结合青霉素结合蛋白 [使用例如在下列文献中描述的方法确定的：B.G. Spratt, 大肠杆菌 K12 的青霉素结合蛋白的性质, *Eur. J. Biochem.*, 72: 341-352 (1977) 和 N.H. Georgopapadakou, S.A. Smith, C.M. Cimarusti, 和 R.B. Sykes, 单内酰胺与大肠杆菌和金黄色酿脓葡萄球菌的青霉素结合蛋白的结合：与抗菌活性有关, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 23: 98-104 (1983)]，并且对于抗生素，它们的特征还是抑制选择性羧肽酶和/或转肽基酶对包含氨基酸序列 Ala-D-γ-Glu-Lys-D-丙氨酰基-D-丙氨酸的肽底物的活性。这样的化合物特别包括β-内酰胺化合物。可依据本发明使用的优选的β-内酰胺化合物是青霉素类、头孢菌素类、以及它们的单环和二环类似物和/或衍生物。可用于本发明方法以及制备本发明制剂的市售抗生素包括苯氧乙基青霉素钾类、
 15 cephems、1-氧杂-1-去硫杂 cephems、clavams、clavams、azetidinones、carbapenams、carbapenams、和 carbacephems。

下述化合物是可依据本发明使用的代表性β-内酰胺化合物。



20 其中



$V = -CO_2M$ 、 SO_3M 、 SO_2M 、 PO_3M_2 、 PO_2M ，其中 $M = H$ 或可药用盐或酯形成基团，

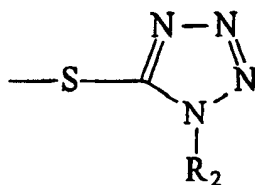
C1 手性可以是 R 或 S, 每个差向异构体具有独特的生物活性;

X = O;

R₁ = 低级烷氧基, 优选甲氧基;

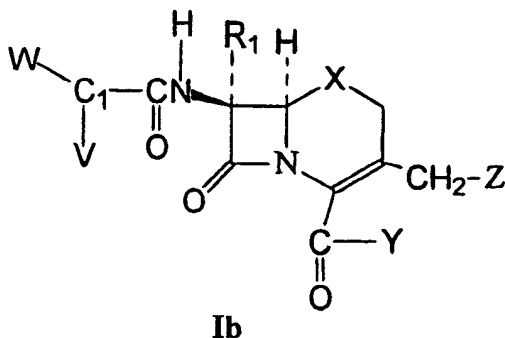
Y = OM, M = H, 可药用盐或活性酯形成基团例如 1-二氢茛基、新
5 戊酰氧基甲基、乙酰氧基甲基; 且

Z =

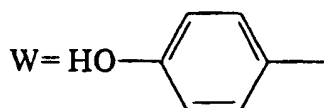


其中 R₂ = 低级烷基、优选甲基, 或支链低级烷基。

10



其中



15 V = -CO₂M、SO₃M、SO₂M、PO₃M₂、PO₂M, 其中 M = H 或可药用盐或酯形成基团,

C₁ 手性可以是 R 或 S, 每个差向异构体具有独特的生物活性;

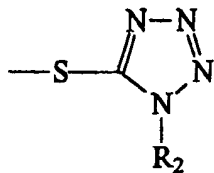
X = O;

R₁ = H;

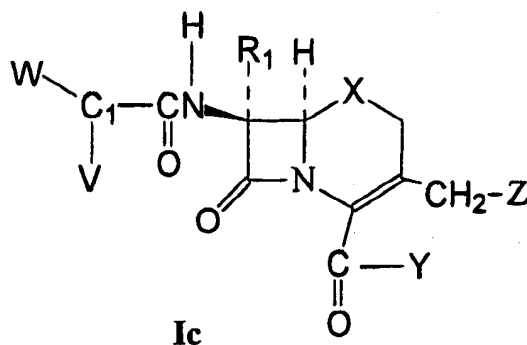
20 Y = OM, M = H, 可药用盐或活性酯形成基团例如 1-二氢茛基、新

戊酰氧基甲基、乙酰氧基甲基；且

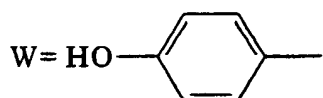
Z =



5 其中 R₂ = 低级烷基、优选甲基，或支链低级烷基。



其中



10

V = -CO₂M、SO₃M、SO₂M、PO₃M₂、PO₂M，其中 M = H 或可药用盐或酯形成基团，

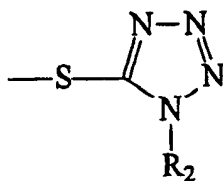
C₁ 手性可以是 R 或 S，每个差向异构体具有独特的生物活性；

X = S、S=O、SO₂；

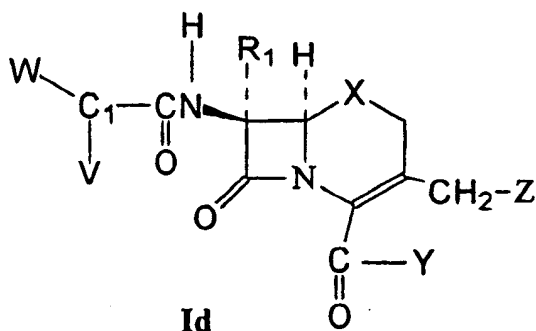
15 R₁ = 低级烷氧基，优选甲氧基；

Y = OM，M = H，可药用盐或活性酯形成基团例如 1-二氢茛基、新戊酰氧基甲基、乙酰氧基甲基；且

Z =

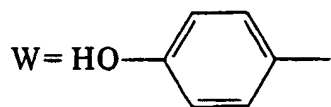


其中 R_2 = 低级烷基、优选甲基，或支链低级烷基。



5

其中



$V = -CO_2M$ 、 SO_3M 、 SO_2M 、 PO_3M_2 、 PO_2M ，其中 $M = H$ 或可药用盐或酯形成基团，

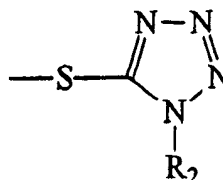
C_1 手性可以是 R 或 S，每个差向异构体具有独特的生物活性；

$X = S$ 、 $S=O$ 、 SO_2 ；

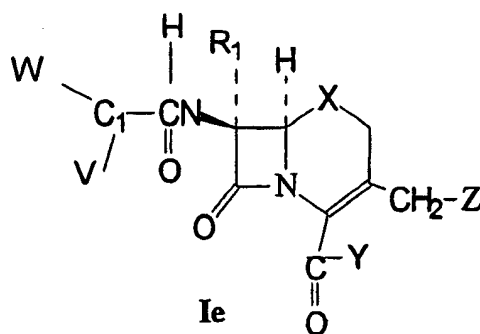
$R_1 = H$ ；

$Y = OM$ ， $M = H$ ，可药用盐或活性酯形成基团例如 1-二氢茛基、新戊酰氧基甲基、乙酰氧基甲基；且

$Z =$

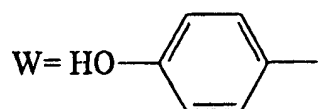


其中 R_2 = 低级烷基、优选甲基，或支链低级烷基。



其中

5



$V = -CO_2M$ 、 SO_3M 、 SO_2M 、 PO_3M_2 、 PO_2M ，其中 $M = H$ 或可药用盐或酯形成基团，

C_1 手性可以是 R 或 S，每个差向异构体具有独特的生物活性；

10

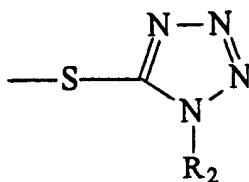
$X = C$ ；

R_1 = 低级烷氧基，优选甲氧基；

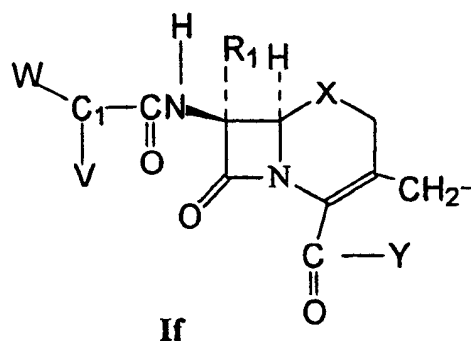
$Y = OM$ ， $M = H$ ，可药用盐或活性酯形成基团例如 1-二氢茛基、新戊酰氧基甲基、乙酰氧基甲基；且

$Z =$

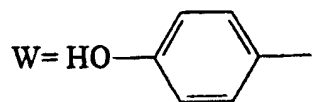
15



其中 R_2 = 低级烷基、优选甲基，或支链低级烷基。



其中



5

$V = -CO_2M$ 、 SO_3M 、 SO_2M 、 PO_3M_2 、 PO_2M ，其中 $M = H$ 或可药用盐或酯形成基团，

C_1 手性可以是 R 或 S，每个差向异构体具有独特的生物活性；

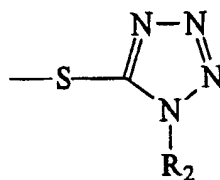
$X = C$ ；

10

$R_1 = H$ ；

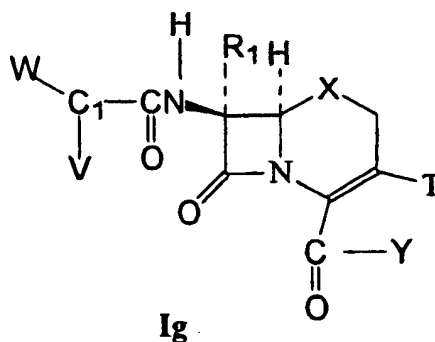
$Y = OM$ ， $M = H$ ，可药用盐或活性酯形成基团例如 1-二氢茛基、新戊酰氧基甲基、乙酰氧基甲基；且

$Z =$

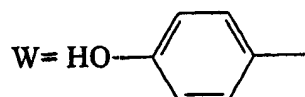


15

其中 $R_2 =$ 低级烷基、优选甲基，或支链低级烷基。



其中



5

$V = -\text{CO}_2\text{M}$ 、 SO_3M 、 SO_2M 、 PO_3M_2 、 PO_2M ，其中 $\text{M} = \text{H}$ 或可药用盐或酯形成基团，

C_1 手性可以是 R 或 S，每个差向异构体具有独特的生物活性；

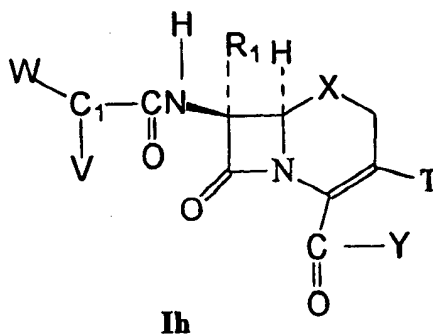
$\text{X} = \text{C}$ ；

10

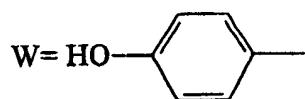
$\text{R}_1 = \text{H}$ ；

$\text{Y} = \text{OM}$ ， $\text{M} = \text{H}$ ，可药用盐或活性酯形成基团例如 1-二氢茛基、新戊酰氧基甲基、乙酰氧基甲基；且

15 $\text{T} = \text{Cl}$ ， F ， Br ， I ， CH_3 ， $\text{C}_2\text{-C}_4$ 烷基，芳基、包括杂芳基，S-烷基，S-芳基、包括 S-杂芳基， SO_3R ($\text{R} = \text{H}$ 、烷基、芳基)， SO_2R ($\text{R} = \text{H}$ 、烷基、芳基)，N-烷基，N-芳基， CO_2R ($\text{R} = \text{H}$ 、烷基)，P-烷基，P-芳基， PO_3R_2 ($\text{R} = \text{H}$ 、烷基、芳基)。



其中



$V = -CO_2M$ 、 SO_3M 、 SO_2M 、 PO_3M_2 、 PO_2M ，其中 $M = H$ 或可药用盐或酯

5 形成基团，

C_1 手性可以是 R 或 S，每个差向异构体具有独特的生物活性；

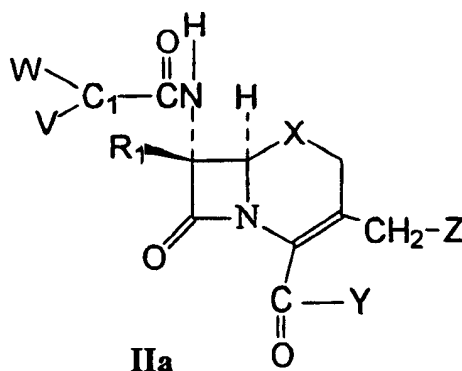
$X = C$ ；

R_1 = 低级烷氧基，优选甲氧基；

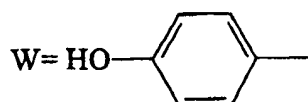
10 $Y = OM$ ， $M = H$ ，可药用盐或活性酯形成基团例如 1-二氢茛基、新戊酰氧基甲基、乙酰氧基甲基；且

$T = Cl$ ，F，Br，I， CH_3 ， C_2-C_4 烷基，芳基、包括杂芳基，S-烷基，S-芳基、包括 S-杂芳基， SO_3R ($R = H$ 、烷基、芳基)， SO_2R ($R = H$ 、烷基、芳基)，N-烷基₂，N-芳基₂， CO_2R ($R = H$ 、烷基)，P-烷基₂，P-芳基₂， PO_3R_2 ($R = H$ 、烷基、芳基)。

15



其中



20 $V = -CO_2M$ 、 SO_3M 、 SO_2M 、 PO_3M_2 、 PO_2M ，其中 $M = H$ 或可药用盐或酯形成基团，

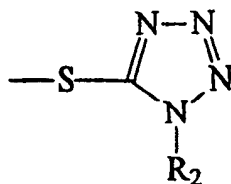
C_1 手性可以是 R 或 S，每个差向异构体具有独特的生物活性；

$X = O$;

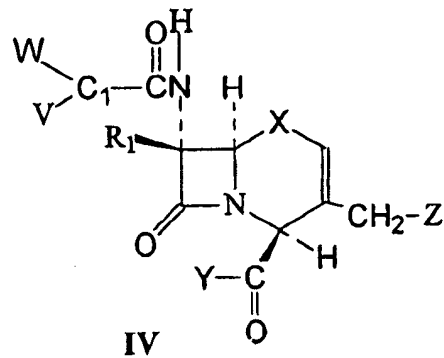
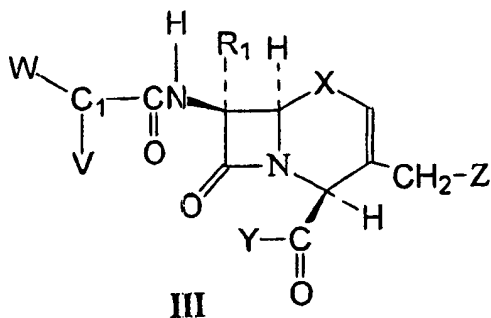
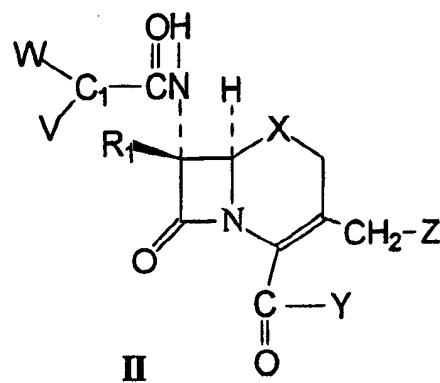
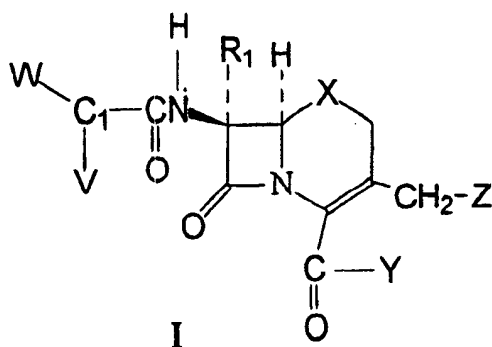
$R_1 =$ 低级烷氧基, 优选甲氧基;

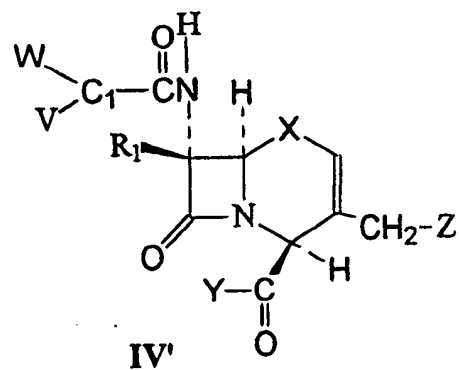
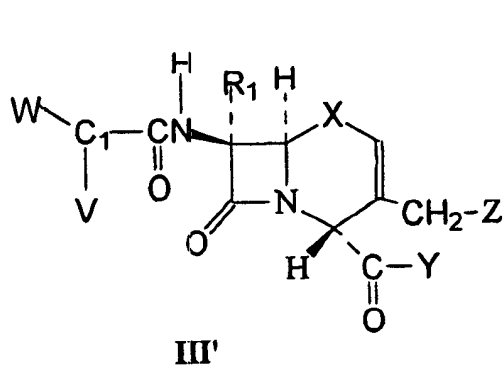
$Y = OM$, $M = H$, 可药用盐或活性酯形成基团例如 1-二氢茛基、新戊酰氧基甲基、乙酰氧基甲基; 且

5 $Z =$



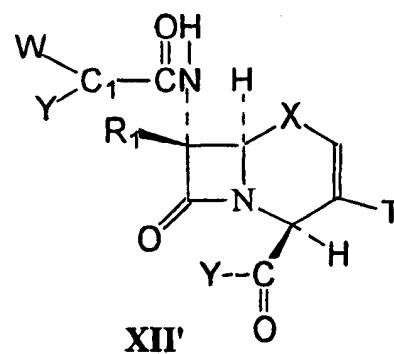
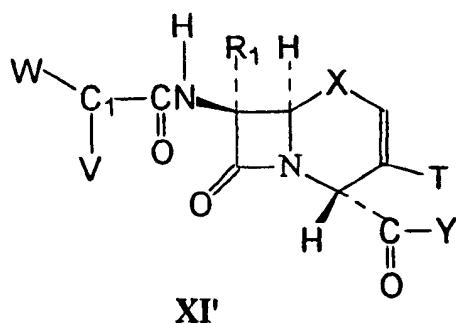
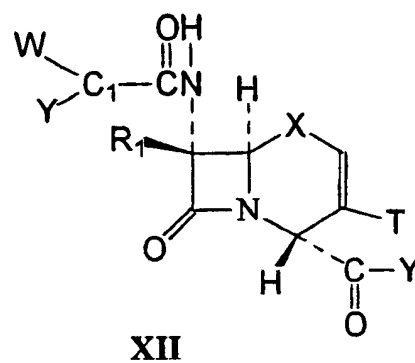
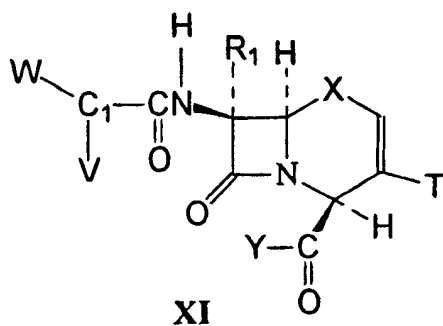
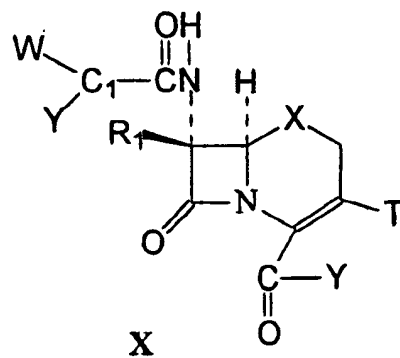
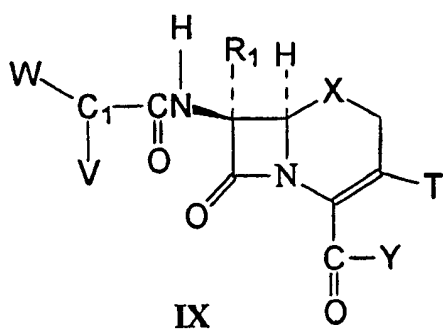
其中 $R_2 =$ 低级烷基、优选甲基, 或支链一般烷基。





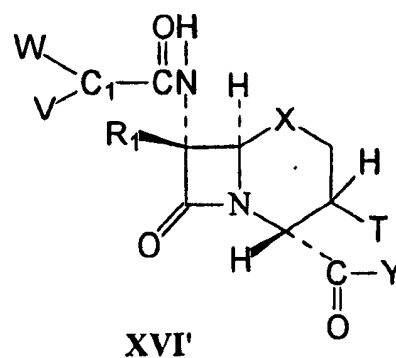
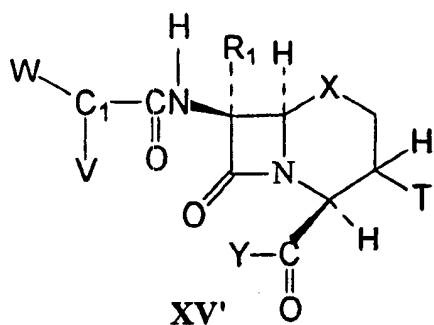
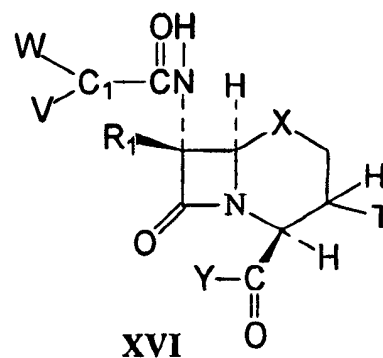
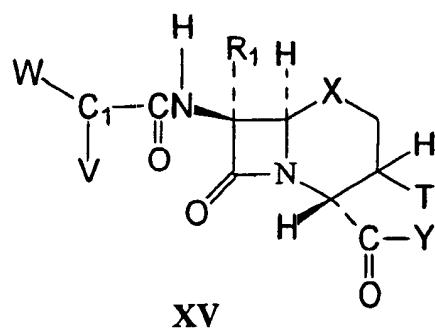
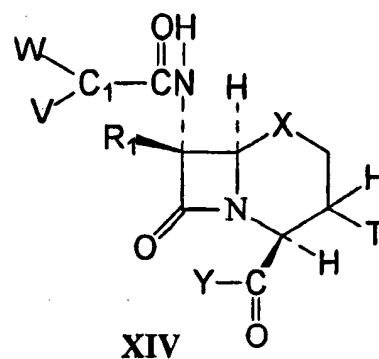
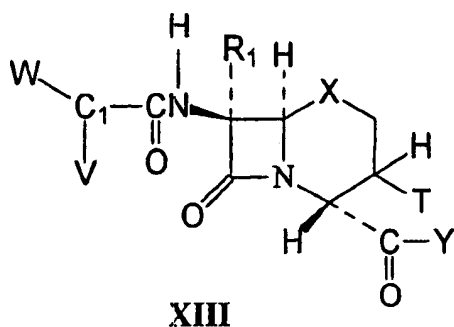
其中式 III、IV、III'、和 IV' 化合物可用于本发明，其中基团 W、V、X、R₁、Y、M 和 Z 分别如化合物 Ia-I f 中所定义。

5

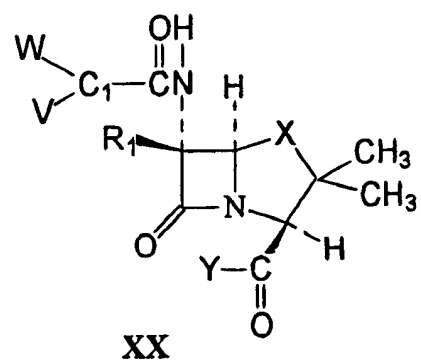
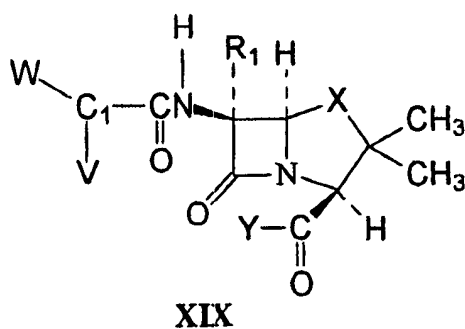
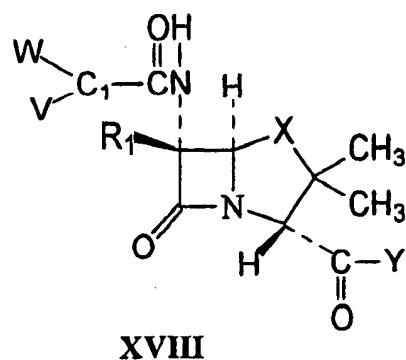
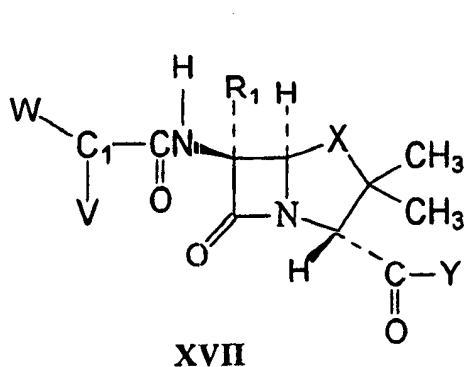


可依据本发明使用的其它优选的化合物 IXa - IXf、Xa - Xf、XIa - XI'f、XIIa - XII'f、XI'a - XI'f、和 XII'a - XII'f 是式 IX、X、XI、XII、XI'、和 XII' 化合物，其中基团 W、V、X、R₁、Y、和 M 分别如化合物 Ia - If 中所定义，且基团 T 如化合物 Ig 和 Ih 中所定义。

5

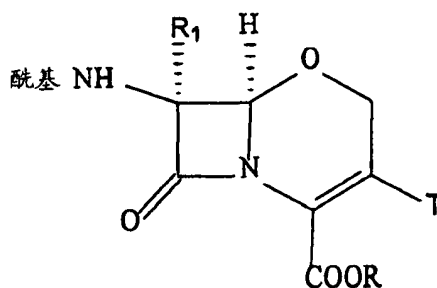


可依据本发明使用的另一组优选的化合物 XIIIa - XIII'f、XIVa - XIV'f、XVa - XV'f、XVIa - XVI'f、XV'a - XV'f、和 XVI'a - XVI'f 是式 XIII、XIV、XV、XVI、XV'、和 XVI' 化合物，其中基团 W、V、X、R₁、Y、和 M 分别如化合物 Ia - If 中所定义，且基团 T 如化合物 Ig 和 Ih 中所定义。



可依据本发明使用的另一组优选的化合物分别是化合物 XVIIa - XVIIIf、XVIIIa - XVIIIIf、XIXa - XIXf、和 XXa - XXf，其中基团 W、V、X、R₁、M、和 Y 分别如化合物 Ia - If 中所定义。

在一个优选的本发明实施方案中，蛋白酶抑制剂是下式所示化合物：



其中 R 是氢、盐形成或活性酯形成基团；R¹ 是氢或 C₁-C₄ 烷氧基；T 是 C₁-C₄ 烷基、卤素（包括氯、氟、溴和碘）、羟基、O(C₁-C₄) 烷基、或 -CH₂B，其中 B 是亲核试剂 B:H 的残基，且酰基是有机酸酰基 OH 的残基。

市售的这类化合物(1-烷氧基-1-去硫杂 cepheams)的实例是拉氧头孢和氟氧头孢。US 专利 4323567 描述了并要求保护拉氧头孢, 该专利的说明书引入本发明以作参考。拉氧头孢是特别优选的, 这是因为其具有良好的血脑屏障运输能力, 并因此能在脑中提供较高浓度的该化合物(相对于血液/血清水平)。

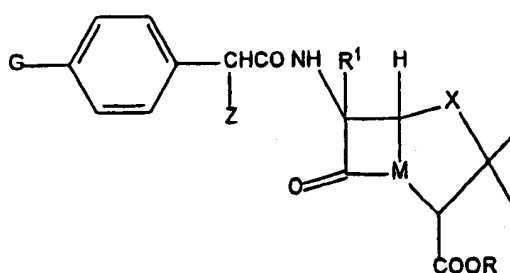
在另一个本发明实施方案中, 将拉氧头孢或据述可用于非胃肠道给药以获得临床有效抗生素组织浓度的另一市售 β -内酰胺抗生素(或其衍生物或类似物)转化成相应的一或二活性酯, 以将所述化合物的口服吸收改善至足以在脑中抑制神经原性蛋白酶活性、同时有效地影响行为和认知能力的水平, 尽管血清浓度在临床上不足以实现抗菌效力。

或者, 可将 N-取代的谷氨酸衍生物或 2-去氨基 2-取代的谷氨酸类似物转化成相应的活性酯衍生物。合适的可在体内水解的(活性)酯基的实例包括例如酰氧基烷基例如乙酰氧基甲基、新戊酰氧基甲基、 β -乙酰氧基乙基、 β -新戊酰氧基乙基、1-(环己基羧基氧基)丙-1-基、和(1-氨基乙基)羧基氧基甲基; 烷氧基羧基氧基烷基例如乙氧基羧基氧基甲基和 α -乙氧基羧基氧基乙基; 二烷基氨基烷基例如乙氧基羧基氧基甲基和 β -乙氧基羧基氧基乙基; 二烷基氨基烷基, 尤其是二低级烷基氨基烷基例如二甲基氨基甲基、二甲基氨基乙基、二乙基氨基甲基或二乙基氨基乙基; 2-(烷氧基羧基)-2-链烯基例如 2-(异丁氧基羧基)戊-2-烯基和 2-(乙氧基羧基)丁-2-烯基; 内酯基例如 2-苯并[c]呋喃酮基和二甲氧基 2-苯并[c]呋喃酮基; 与另一 β -内酰胺抗生素或 β -内酰胺酶抑制剂连接的酯。这样化学修饰的市售非胃肠道用 β -内酰胺抗生素的一个实例是拉氧头孢(Ia, Y = OH, R₁ = OCH₃, 且 V = COM, 其中 M = OH), 是制备其一种活性酯类似物 Ia, 其中 Y = OM, M = H 或活性酯例如 1-二氢茛基, 且 V = CO₂M, 其中 M 是 H 或活性酯, 其中至少一个 V 和 Y 包含活性酯部分。

上述 β -内酰胺抗生素或谷氨酸衍生物或类似物的羧基的合适的可药用盐包含金属盐例如铝盐, 碱金属盐例如钠盐或钾盐, 碱土金属盐例如钙盐或镁盐, 以及铵盐或取代的铵盐, 例如与低级烷基胺如三乙胺、羟基低级烷基胺例如 2-羟基乙胺、二(2-羟基乙基)胺或三(2-羟基乙基)胺、环烷基胺例如二环己基胺形成的盐, 或者与下述胺形成的

盐：普鲁卡因、二苄基胺、N,N-二苄基乙二胺、1-二苯羟甲胺、N-甲基吗啉、N-乙基哌啶、N-苄基-β-苯乙基胺、去氢枞胺、N,N'-二去氢枞胺、乙二胺，或吡啶型碱例如吡啶、可力丁或喹啉，或可用于与已知的青霉素类或头孢菌素类形成盐的其它胺。其它适用的盐包括锂盐和银盐。式(I)化合物的盐可通过以常规方法进行盐交换来制得。

在另一个本发明实施方案中，使用下式所示青霉素或青霉素类似物来作为 NAALAD 酶抑制剂



其中在所述式中，X = O、S、SO、SO₂ 或 C；R 是 H 或可药用成盐或成酯基团；R¹ 是 H 或低级烷氧基，G 是氢或羟基，且 Z 是氨基、酰基氨基、CO₂M、SO₃M、PO₃M₂、或 PO₂M，其中 M 是氢或可药用成盐或成酯基团，优选为活性酯形成基团。

没有抗菌作用或有弱抗菌作用的苯氧乙基青霉素钾和 cephem 或 cephem 亚砷和砷以及在结构上相关的β-内酰胺酶抑制剂例如他佐巴坦、棒酸和舒巴坦可特别用于其中担心会形成抗生素抗药性的应用。

有多种市售β-内酰胺抗生素可依据本发明使用、或修饰或配制以优化其效力。这样的化合物的实例是：

- 头孢羟唑钠甲酸酯 (Mandol)
- 20 头孢唑啉钠 (Zolicef, Ancef, Kefzol)
- 头孢美唑钠 (Zeegazone)
- 头孢尼西钠 (Monocid)
- 头孢哌酮钠 (Cefobid)
- 头孢雷特 (Precef)
- 25 头孢噻肟钠 (Claforan)
- 头孢替坦钠 (Cefotan, Apatef)
- 头孢西丁钠 (Mefoxin)

- 头孢他定 (Ceptaz, Fortaz, Tazicef, Tazidime)
- 头孢唑肟钠 (Kefurox, Zinacef)
- 头孢曲松 (Rocephin)
- 头孢曲松钠 (Rocephin)
- 5 注射头孢氨苄 (Kefurox, Zinacef)
- 注射头孢拉定 (Velosef-injectable)
- 头孢噻吩钠 (Keflin, Seffin)
- 头孢吡硫钠 (Cefadyl)
- 拉氧头孢 (Moxam)
- 10 阿莫西林 (Amoxil, Polymox)
- 阿莫西林和棒酸钾 (Augmentin)
- 氨苄青霉素 (Omnipen, Principen)
- 氨苄青霉素和舒巴坦 (Unasyn)
- 阿洛西林 (Azlin)
- 15 氨苄青霉素碳酯 (Spectrobid)
- 羧苄青霉素 (Geocillin, Geopen)
- 头孢克洛 (Cecloclor)
- 头孢羟氨苄 (Duricef, Ultracef)
- 头孢唑啉钠 (Mandol)
- 20 cefazolin sodium (Ancef, Kefzol)
- 头孢克肟 (Suprax)
- 头孢美唑钠 (Zefazone)
- 头孢尼西 (Monocid)
- 头孢哌酮 (Cefobid)
- 25 头孢雷特 (Precef)
- 头孢噻肟 (Claaforan)
- 头孢替坦 (Cefotan)
- 头孢西丁 (Mefoxin)
- 注射头孢罗齐
- 30 口服头孢罗齐 (Cefzil)
- 头孢他定 (Ceptaz, Fortax)
- 头孢唑肟 (Cefizox)

- 头孢曲松 (Rocephin)
- 头孢氨苄 (Ceftin, Zinacef)
- 头孢氨苄 (Keflex, Keflex)
- 头孢噻吩 (Keflin)
- 5 头孢吡硫 (Cefadyl)
- 头孢拉定 (Anspor, Velosef)
- 氯唑西林 (Cloxapen, Tegopen)
- 环青霉素
- 双氯青霉素 (Dycill, Pathocil)
- 10 注射氯拉卡比
- 口服氯拉卡比
- 甲氧西林 (Staphcillin)
- 美洛西林 (Mezlin)
- 拉氧头孢 (Moxam)
- 15 萘夫西林 (Nafcil, Unipen)
- 苯唑西林 (Bactocill, Prostaphlin)
- 青霉胺 (Cuprimine, Depen)
- 青霉素 G (Wycillin, Pentids, Bicillin LA)
- 青霉素 V (Veetids, V-Cillin K)
- 20 哌拉西林 (Pipracil)
- 羧噻吩青霉素 (Ticar)
- 羧噻吩青霉素和棒酸钾 (Timentin)

其它市售 β -内酰胺抗生素包括亚胺培南 (泰宁), 其通常与 cilastatin (其防止被肾酶水解) 联合施用。其它 β -内酰胺抗生素包括

25 美罗匹宁 (Meronem/Zeneca) 和氨曲南 (Azacetam)。其它 penems 包括 biapenem、panipenem、卡芦莫南、和 ritipenam。还表现出交叉抑制 NAALAD 酶、并且可以或可以不表现出独立抗菌活性的本领域已知的 β -内酰胺酶抑制剂可特别依据本发明使用。

如上所述, 可将适于非胃肠道给药的 β -内酰胺抗生素化合物修饰

30 成其活性酯衍生物, 以改善口服吸收, 并达到足以抑制神经源性蛋白酶化合物的脑水平, 但是不必须提供在临床上足够有效的抗生素血液水平。可依赖其抑制蛋白酶介导的细胞壁合成的抗菌效力的其它抗

生素，例如 γ -内酯和/或喹啉类抗生素也可依据本发明使用。

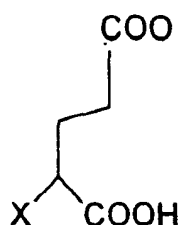
可使用本领域已知的分子发现技术，例如在 U.S. 专利 5,552,543 (该专利的说明书引入本发明以作参考) 中描述的技术来鉴定能够通过所提出的关于 β -内酰胺化合物活性的机制来抑制神经原性蛋白酶的其它化合物。该专利描述了用于检测在青霉素结合蛋白与 β -内酰胺抗生
5 素之间发生的“锁和钥匙”相互作用与抗菌活性之间的关系的算法。可将这样的分子模型技术与用于鉴定具有良好血脑屏障运输效力的化合物的其它药物模型技术(例如在出版的 PCT 国际申请 WO 99/10522 中描述的技术，该出版物引入本发明以作参考)联系起来，以最佳地鉴
10 定出可依据本发明实施方案使用的有效化合物。因此，为了依据本发明治疗目标神经原性 NAALAD 酶，不仅重要的是可用于本发明的化合物不仅应当具有作为目标神经蛋白酶(NAALAD 酶)抑制剂的活性，而且重要的是这样的化合物应当具有一定阈程度的穿越血脑屏障的效力，以提供药物在脑中的有效的蛋白酶抑制浓度。这样的血脑屏障运输特性
15 可能是化合物结构所固有的，或者可将这样的化合物与能有效地促进血脑屏障运输的其它化学实体配制在一起和/或轭合。为了制备和配制能提高其血脑屏障运输能力的化合物，人们已作了大量研究和开发工作，并且可使用这样的技术来提高可依据本发明使用的蛋白酶抑制剂及其助剂的脑浓度。

20 动物实验表明，拉氧头孢的阈有效剂量(非胃肠道给药)为约 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重。根据动物实验数据和非胃肠道施用的拉氧头孢在脑与身体其它组织之间的已知分布，拉氧头孢在脑中的有效最小神经原性蛋白酶抑制浓度为约 30 nM。据表明，当以 1 微克/千克体重的剂量腹膜内施用
25 于治疗行为和/或认知障碍时，NAALAD 酶抑制剂的有效剂量水平将显著地取决于患者体重、抑制剂与目标神经原性蛋白酶的亲和力、活性化合物的血脑屏障运输特征、给药方式、以及为了提高血脑屏障运输而任选使用的药物配制/轭合技术。对于非胃肠道施用的拉氧头孢，在仓鼠以及其它实验动物中的最小有效剂量为约 50 微克/千克体重，或
30 多或少。当拉氧头孢以口服形式，优选以活性酯修饰或衍化形式使用时，据估计剂量为约 2.5 - 约 50 mg/剂量，远低于提供治疗有效抗菌浓度所需的拉氧头孢剂量。预计棒酸类药物的有效口服剂量为约 0.1

- 约 10 mg/剂量。棒酸可口服吸收，并表现出良好的血脑屏障运输。

其它蛋白酶抑制剂的有效剂量同样将取决于其对目标蛋白酶的固有亲和力、所选的给药途径、患者体重、和血脑屏障运输效力。依据本发明使用的 NAALAD 酶抑制剂的有效剂量可易于使用动物模型以及本领域已知的分析技术凭经验确定。一般来说，对于 β -内酰胺抗菌化合物，在本发明方法和制剂中使用的剂量水平低于为达到临床有效的抗菌水平所需的剂量。 β -内酰胺抗菌化合物的非胃肠道给药剂量可以为约 1 - 约 80 mg/剂量。口服剂量可以为约 2.5 - 约 150 mg/剂量。当临床医师根据患者详细情况作出这种决定时，更高或更低的剂量可能是适当的，并且可依据本发明使用。因此，例如，当患者/临床病症处于不用担心 β -内酰胺化合物的固有抗菌活性是并发禁忌症的情况下时，可使用最高达或超过能够提供临床有效抗生素血液水平的高剂量抗生素，来治疗需要依据本发明通过 NAALAD 酶抑制来实行治疗的患者。

此外，依据本发明，可使用能以有效量穿越血脑屏障的其它本领域已知的 NAALAD 酶抑制剂来治疗行为和认知障碍。例如，它们可用于改善痴呆患者的认知能力或减侵略性行为。已知的 NAALAD 酶抑制剂的实例包括一般的金属肽酶抑制剂例如 O-菲咯啉，金属螯合剂例如乙二胺四乙酸 (EDTA) 和乙二醇双 (β -氨基乙醚)-N, N-四乙酸 (EGTA)，和肽类似物例如 quesqualic acid、天冬氨酸谷氨酸 (Asp-Glu)、Glu-Glu、Gly-Glu、 γ -Glu-Glu 和 β -N-乙酰基-L-天冬氨酸-L-谷氨酸。其它 NAALAD 酶抑制剂是最近描述的下式所示化合物



其中 X 是 $\text{RP(O)(OH)CH}_2\text{--}$ [参见 U. S. 专利 5,968,915, 该专利引入本发明以作参考]; RP(O)(OH)NH-- [参见 U. S. 专利 5,863,536, 该专利引入本发明以作参考]; RP(O)(OH)O-- [参见 U. S. 专利 5,795,877, 该专

利引入本发明以作参考]; $RN(OH)C(O)Y$ -或 $RC(O)NH(OH)Y$, 其中 Y 是 CR_1R_2 、 NR_3 或 O [参见 U. S. 专利 5,962,521, 该专利引入本发明以作参考]; 或者 X 是 $RS(O)Y$ 、 RSO_2Y 、或 $RS(O)(NH)Y$, 其中 Y 是 CR_1R_2 、 NR_3 或 O [参见 U. S. 专利 5,902,817, 该专利引入本发明以作参考]。

5 每篇上述 U. S. 专利都提出了所述 NAALAD 酶抑制剂在治疗与谷氨酸异常有关的疾病中的应用, 所述疾病包括癫痫症、中风、阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、肌萎缩性侧索硬化(ALS)、亨廷顿氏舞蹈病、精神分裂症、慢性疼痛、局部缺血和神经原损伤。本发明的发现使得能使用青霉素结合蛋白(细菌羧肽酶或转肽基酶)抑制剂, 特别是 β -内酰胺抗生素和 β -内酰胺酶抑制剂来开发基于这些化合物作为 NAALAD 酶抑制剂的以前未被发现的活性的治疗这类疾病的方法。最近已发现, 神经组织中高浓度的谷氨酸与多发性硬化有关, 并且据信, 抑制神经组织中的 NAALAD 酶以及因此抑制谷氨酸生成可通过减轻症状的严重程度或通过减少其发作来给患有这类疾病的患者提供治疗有益效果。

15 本发明还提供了治疗下述疾病的一些药物制剂: 行为或认知障碍, 以及与神经组织或包含 NAALAD 酶活性的其它组织中异常谷氨酸浓度生成有关的疾病。所述制剂一般包含神经活性组分和用于它的可药用载体, 神经活性组分包括能抑制细菌酶和能抑制已知(凭经验证据)选择性地作用于包含氨基酸序列 $Ala-D-\gamma-Glu-Lys-D-$ 丙氨酰基- $D-$ 丙氨酸的肽的神经原性肽酶(例如 NAALAD 酶)的化合物。在一个实施方案中, 药物制剂在单位剂型中包含一定量能抑制患有或趋于患有下述病症的患者中的 NAALAD 酶活性的 β -内酰胺化合物: 可通过抑制 NAALAD 酶来预防或治疗以减轻其症状的病症。肽酶(NAALAD 酶)抑制剂的量和载体的性质当然取决于欲采取的给药途径。抑制剂的量是通过预定的

20 给药途径施用后能有效地提供下述浓度的量: 抑制剂在其中需要抑制 NAALAD 酶的组织例如脑中的浓度, 并且该浓度能有效地治疗和减轻目标行为或认知障碍或可通过抑制 NAALAD 酶活性来治疗的其它疾病的症状。在使用 β -内酰胺抗生素化合物的实施方案中, 本发明制剂中肽酶抑制剂的量一般低于能提供临床有效细菌蛋白酶抑制的量, 即在剂型中施用给患者时, 低于能提供抗菌有效水平的量。可将适用于本发明的肽酶抑制剂与一种或多种可药用载体混合, 并且可以口服施用, 例如作为片剂、胶囊、小胶囊、可分散粉末、粒剂、锭剂、粘膜贴剂、

25 30

小药囊等剂型施用。可将 NAALAD 酶抑制剂与可药用载体例如淀粉、乳糖或海藻糖混合，加入或不加入一种或多种制片赋形剂，并压制成片剂或锭剂。可任选用肠溶衣将这样的片剂、小胶囊或胶囊包衣，以将在胃中的水解/降解减至最小。口服制剂含有约 1 - 约 99 % 的活性组分和约 1 - 约 99 % 重量的可药用载体和/或配制赋形剂。任选地，当 β -内酰胺抗生素用作 NAALAD 酶抑制剂时，剂型可这样制得：将其与 P-糖蛋白抑制剂组合以提供提高的药物半衰期和活性组分的脑浓度。或者，可简单地将蛋白酶抑制剂与 P-糖蛋白或 β -内酰胺酶抑制剂联合给药，或者剂型可包含单独或与 P-糖蛋白组合的 β -内酰胺酶抑制剂（其自身也是 NAALAD 酶抑制剂）与载体。

在另一个本发明实施方案中，药物制剂可含有例如约 2.5 % - 约 90 % 活性组分和载体，更优选含有约 5 % - 约 60 % 重量的活性组分。依据本发明一个实施方案，将药物制剂配制成口服（os）给药，即经口吞咽给药或颊或舌下给药的形式（小药囊、锭剂、和/或口服粘膜贴剂的形式）。在另一实施方案中，将口服施用的剂型配制成延长释放剂型，以在预定时间内释放活性组分。

含有活性蛋白酶抑制剂和适于这类给药途径的常规无毒可药用载体、辅料和载体的局部剂型，包括透皮贴剂、鼻内给药剂型、和栓剂单位制剂也在本发明范围内。

或者，本发明药物制剂可经由非胃肠道给药途径，包括皮下给药、腹膜内给药、肌内给药和静脉内给药来施用。这样的非胃肠道给药剂型一般呈水溶液或分散体的形式，其中使用了可药用载体例如等渗盐水、5 % 葡萄糖、或其它众所周知的可药用液体载体组合物。

适于注射使用的药物剂型包括无菌水溶液或分散液和用于临时制备无菌注射溶液或分散液的无菌粉末或冷冻干燥物。在所有情况下，剂型必须是无菌的，其在制备和贮存条件下是稳定的，并且必须抗微生物体的污染作用而防腐。注射剂的载体可以是含有例如水、乙醇、或多元醇（或例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇）、它们的混合物、和植物油的溶剂或分散介质。

可用于治疗行为和认知障碍以及对神经原性肽酶抑制有反应的其他疾病的肽酶抑制剂的非胃肠道给药剂型还可以配制成可注射的缓释制剂，其中是将蛋白酶抑制剂与一种或多种天然或合成生物可降解或

生物可分散聚合物混合，所述聚合物有例如碳水化合物，包括淀粉、树胶和醚化或酯化纤维素衍生物、聚醚、聚酯(特别是聚交酯、聚乙醇酸交酯或聚-交酯-乙醇酸交酯)、聚乙烯醇、明胶、或藻酸盐。这样的制剂可制成例如微球悬浮液、凝胶(亲水或疏水组成的凝胶)、或制成一定形状的聚合物基质植入物，这样的植入物是本领域众所周知的，起着“贮库型”药物递送系统的功能，能提供生物活性组分的延长释放。这样的组合物可使用本领域已知的制剂技术来制备，并且可设计任意多种药物释放类型。

在本发明中使用的药物组合物可间歇，或者以逐渐、连续、恒定或可控速度施用给需要治疗的患者。此外，每天施用本发明药物制剂的时间和次数可根据患者的病症和外界因素而变。对于在本发明范围内使用的任何给定的蛋白酶抑制剂，效力水平和最佳剂量以及剂型与患者有关，并且可在临床医师的合理判断范围内调节。制剂一般施用足以治疗或预防患者病症，例如足以改善受治疗患者的行为或认知能力的时间。可使用相同或减少的预防目标疾病的给药方案连续施用蛋白酶抑制剂的制剂。

由于认识了神经原性蛋白酶的存在和功能，可易于将这样的化合物与脑匀浆、脑脊液(CSF)或脑组织提取物中分离出来，并进行纯化以用于结构确定和药物开发应用。因此，通过使用包括特异性亲和色谱和/或高压液相色谱在内的本领域已知技术，可分离出一种或多种具有决定着行为表型和认知能力的确定神经化学功能的神经原性蛋白酶并确定其特征。因此，例如，可将 β -内酰胺抗生素与固体基质例如磁性珠子或官能化二氧化硅共价结合、任选经由可裂解接头结合，以形成能够与目标蛋白酶选择性地亲和/相互作用的固相。然后将携带固体底物的 β -内酰胺化合物与CSF、脑匀浆或脑提取物在一个或多个pH水平下接触足以使得神经原性蛋白酶与固定的 β -内酰胺化合物发生反应(或缔合结合)的时间。或者，可将包含氨基酸序列酰基-D-丙氨酰基-D-丙氨酸的蛋白或肽底物固定在固体底物上，并用作目标神经原性蛋白酶的亲和探针。

然后将共价或缔合结合的蛋白酶从提取物中分离出来，然后通过取决于蛋白酶-固定探针相互作用的性质的技术从固体底物上释放下来。如果蛋白酶与固定的 β -内酰胺化合物形成共价键，则可通过例如

将可裂解的接头裂解来将所得复合物从固相底物上释放下来，以获得基本上不含非蛋白酶组分的神经营原性蛋白酶、尤其是其衍生物。或者，优选地，用于蛋白酶亲和柱的探针表现出对蛋白酶的所选缔合（非共价）亲和，这样可通过改变严格性（液相的离子强度或 pH）来将蛋白酶从固相上释放下来，以将蛋白酶以基本上不含非蛋白酶组分的形式从固体底物上释放下来。

能够鉴定本发明方法和药物制剂的神经营原性蛋白酶目标的另一方案是使用用放射核酸金属化物 (radionuclide) (H^3) 标记的青霉素或头孢菌素。将这种青霉素或头孢菌素的溶液注射到测试动物的脑中，经过预定时间后，给动物实施安乐死，立即提取/均化脑。然后将脑提取物/匀浆进行一次或多次分离处理例如离心、透析、和色谱处理（例如凝胶纤维色谱）。分析分离的化学物质中存在的标记物，分离出标记的物质，任选进行另外的纯化操作，并进行物理化学分析以确定结构。

使用本领域已知的蛋白氨基酸分析技术/测序，易于确定出神经营原性蛋白酶的结构，由此能够制备出编码至少一部分蛋白酶的核酸探针。然后可使用探针来从可用基因库中检索编码蛋白酶的 DNA。使用本领域已知的克隆技术分析并克隆目标基因构建物，以获得可用于表达无限量纯蛋白酶的基因工程微生物、真核细胞或原核生物，然后可使用纯蛋白酶来进行诊断或药物筛选应用。

在一个相关的本发明实施方案中，将蛋白酶以半抗原形式耦合，以接种鼠或其它物种来制备识别一种或多种神经营原性蛋白酶表位的单克隆抗体。抗体生成可用本领域技术人员众所周知的杂交瘤形成技术来进行。U.S. 专利 4628077 中总结了这样的方法，特别是形成对胶原蛋白表现出的特异性的单克隆抗体的方法，将该专利中关于单克隆抗体形成的部分引入本发明以作参考。抗体自身可通过共价连接或亲和连接（例如经由生物素抗生物素蛋白复合物）与可检测的标记物例如放射性核酸金属化物、酶、或荧光或电发光物质配合。这样标记的抗体可在诊断试剂盒和方法中使用来分析例如脑脊液样本，以确定患者行为或认知状况与神经蛋白酶浓度的关系。这种诊断试验也可以用来评估患者对药物治疗的反映，并监视患者状态，而且也是作为神经营原性蛋白酶浓度的函数。该方法可用本领域技术人员已知的本领域承认的竞争性或三明治型特异性结合测定。

因此, 依据本发明另一实施方案, 本发明提供了评价患者神经化学状况的方法, 包括将脑脊液样本与具有下述作用的标记抗体接触的步骤: 所述标记抗体能特异性结合调节决定着患者认知能力水平和/或行为表型的神经化学路径的神经原性蛋白酶的表位, 最后与由具有预定认知或行为表型的患者测定得水平进行比较。

在另一个本发明实施方案中, 本发明提供了基本上纯形式的肽神经调质或神经递质。所述神经肽的特征在于, 其介导患者的行为和认知能力, 起着神经原性蛋白酶底物的作用, 其自身能够被拉氧头孢的D-异构体或包含序列酰基-D-丙氨酰基-D-丙氨酸的肽抑制。对肽神经调质或神经递质表现出选择性活性的神经原性蛋白酶可表现出蛋白酶解活性, 包括转蛋白酶或羧蛋白酶活性(或所述的转肽基酶或羧肽酶活性)。可用类似于上述分离和纯化神经原性蛋白酶的方法从脑脊液或脑匀浆分离出神经肽。然而, 是将青霉素结合蛋白(或分离的神经原性蛋白酶自身的任选化学修饰的形式)固定在固体底物的表面上, 来代替使用具有共价结合的 β -内酰胺抗生素的固体底物作为目标分子的亲和探针。青霉素结合蛋白(PBP)对肽神经调质/神经递质表现出选择性亲和性, 并且当把携带PBP的固相与脑匀浆或脑脊液在一个或多个离子强度和/或pH条件下接触时, 目标肽分子优先与固体底物结合。携带PBP的固相可以以色谱柱的形式使用, 即用在亲和色谱中, 或者, 可将固体底物简单地分散在脑匀浆或提取物或脑脊液中, 以选择性结合肽神经调质/神经递质, 然后将其从青霉素结合蛋白上释放下列, 按照需要通过高压液相色谱分离和进一步纯化, 以获得基本上不含其它蛋白质组分的纯形式的所述肽神经调质/神经递质。肽神经递质自身可用作神经活性药物, 或者其可用作开发相关神经活性药物的先导药物。此外, 所纯化的神经递质的结构可通过本领域已知的氨基酸序列分析法方便地确定, 这使得本领域技术人员可制备核酸探针(如果可能的话合成基因)来分离出编码肽神经递质/神经调质的DNA序列。最后, 与上述神经原性蛋白酶的基因的应用类似, 可以克隆出分离的基因类似物, 并制备临床量的用于药物介入、抗体生成或药物开发的肽神经递质/神经调质。

在本发明另一个方面, 可给患有认知或行为障碍的患者接种疫苗, 所述疫苗是制成例如能激发对患者接种的抗体反应的神经原性蛋

白酶轭合物，其中所述的抗体反应足以减弱神经原性蛋白酶的功能，同时改进患者的行为和/或认知表型，以改善与异常谷氨酸浓度/活性有关的其它患者病症，包括但不限于上述病症。在一个实施方案中，轭合物包含一个或多个肽的半抗原轭合物，所述肽包含 4 - 20 个
5 NAALAD 酶的氨基酸序列，所述氨基酸序列包含一个或多个如上所述的 NAALAD 酶或 PBP 的活性位点基元。

上述本发明实施方案部分得自根据在下述动物行为认知和技能模型中收集的数据推出的作用机制。通过分析在下述非限制性实验实施例中获得的数据，本发明其它实施方案将变得显而易见，下述实施例
10 仅是举例说明了可通过使用本发明方法和制剂而达到的行为改善和认知能力改善。

实验实施例

于 1981 - 1982 年上市的拉氧头孢 (Mox) 作为第三代头孢菌素样抗生素在世界范围内广泛使用。用 2200 名细菌感染患者评价了临床效力
15 和安全性 (Jackson 等人, 1986)。其中 260 名患者用 Mox 治疗格兰氏阴性软膜蛛网膜炎，241 名患者 (93%) 表现出令人满意的对抗生素治疗的反应。每 8 小时用 4 g Mox 治疗患者，治疗 2 - 3 周。IM 注射后 1 小时内达到了峰值血浆浓度，消除半衰期为 2.3 小时。以 8 - 12 小时的
20 间隔多次注射，没有任何累积。拉氧头孢可穿越血脑屏障。IV 施用 2.0 g 该药物后，Mox 的脑脊液 (CSF) 水平为 25 - 39 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。作为血清浓度百分比的 CSF 浓度估计为 20%。D 异构体具有抗菌活性，并且未与血浆蛋白结合的比例比 L 异构体大。

25 用拉氧头孢进行的行为实验

方法

动物饲养

将得自 Harlan Sprague-Dawley Laboratories (Indianapolis, IN) 的雄性叙利亚金色仓鼠 (*Mesocricetus auratus*) (140-150 g) 在
30 有机玻璃笼子 (24 cm $\times$ 24 cm $\times$ 20 cm) 中单独饲养，保持相反的光照：黑暗循环 (14L:10D; 在 19:00 点开始光照)，并提供食物和水让它们自由摄取。在测试前，让动物适应相反的光照：黑暗循环至少 2 周。所有

行为测试都是在 24 小时生理节奏循环的黑暗期进行的。所有动物都是依据在 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health Publication No. 85-23, Revised 1985) 中出版的准则获得和饲养的。

5

攻击性侵略行为

激动行为可分为攻击性或防卫性侵略行为 (Blanchard 和 Blanchard, 1977; Adams, 1979; Albert 和 Walsh, 1984)。攻击性侵略行为的特征是, 侵略者向对手发起攻击, 而防卫性侵略行为缺少主动接近。这两种侵略行为都有它们各自独特的神经行为系统。引起攻击性和防卫性攻击的刺激是不同的, 因为它们是伴随每一激动反应的行为后果。虽然已经由动物模型收集了支持独特攻击性和防卫性神经网络概念的大量经验数据, 但是在人侵略行为中有值得关注和令人感兴趣的类似性, 这表明有类似神经组织 (Blanchard, 1984)。攻击性侵略行为易于使用以居住/侵入式样测试的雄性金色仓鼠——一种建立的攻击性侵略行为模型来进行 (Ferris 和 Potegal 1988)。将不熟悉的雄性仓鼠置于另一雄性仓鼠的饲养笼子中, 引起居住仓鼠的明确的激动行为, 包括攻击性侵略行为。

20 行为测定和分析

仓鼠是夜间活动动物, 因此所有行为测试都是在暗淡的红色光照下的黑暗期的前 4 个小时进行。记录居住动物的攻击性侵略行为, 例如咬侵入者的潜伏时间, 咬的总次数, 与侵入者接触的总时间, 和在 10 分钟测试期间的胁腹标志 (Ferris 和 Potegal, 1988)。胁腹标志是嗅觉交流的形式, 其中仓鼠拱起其背部, 并靠着环境中的物体摩擦产生性外激素的胁腹腺 (Johnson, 1986)。在攻击性遭遇期间, 胁腹标志频率大大增加, 并且在发起并赢得战斗的优性动物中特别显著 (Ferris 等人, 1987)。

依次使用单向 ANOVA 和 Newman-Keuls 后 hoc 检验分析参数数据, 即潜伏时间和接触时间。依次使用 Kruskal-Wallis 检验和 Mann-Whitney U 检验来分析非参数数据, 即咬的次数和胁腹标志, 以确定各组间的差异。分别采用用于参数数据的成对和不成对 t-检验与用于

成对和不成对非参数数据的 Wilcoxon 和 Mann-Whitney 检验来分析两个样本比较。

结果

5 I. 高剂量拉氧头孢

在小规模试验中，给经过预筛选对较小侵入者有攻击性侵略行为的 6 只雄性仓鼠腹膜内 (IP) 给予 Mox (50 mg/kg, 体积为约 150 μ l)。用 Mox 和盐水进行的治疗是等衡的，这样每只动物接受间隔至少 48 小时的两种治疗。治疗 90 分钟——估计能反映出 Mox 峰值血浆水平的一定
10 时间后，测试动物 (Jackson 等人, 1986)。将拉氧头孢溶解在 0.9 % NaCl 中，并在冰上贮存。对于每一测试，都制备新鲜的溶液。

用盐水载体治疗的居住动物在不到 1 分钟内咬侵入者 (附图 1)。用 Mox 治疗后，咬的平均潜伏时间增加至 6 分钟以上 ($p < 0.05$)。此外，10 分钟内观察到的咬的次数显著减少 ($p < 0.05$)。然而，接触时间，即
15 居住动物嗅和探究侵入者所消耗的时间也显著减少 ($p < 0.01$)。胁腹标志的下降虽不显著，但是有这种趋势 ($p < 0.07$)。

总结

与攻击性侵略行为有关的所有行为指标的一般下降提出了这样的
20 可能性，即 50 mg/kg 剂量的 Mox 对运动原活动和激励有非特异性的抑制作用。为了验证该可能性，需要进行剂量反应实验以找到能有效地抑制攻击性侵略行为、同时不改变其它行为的 Mox 的最小剂量。

II. 拉氧头孢剂量反应

25 为了找到能显著地减轻攻击性侵略行为的 Mox 的最小剂量，在 6 只动物中测试一系列浓度 (载体、0.5、5.0、50、500、和 5000 μ g/kg)。治疗是等衡的，每只动物接受间隔至少 48 小时的每种治疗。在治疗之间咬的潜伏时间有显著差异 ($F(5, 30) = 5.66$; $p < 0.001$)。用 5.0 μ g 剂量的拉氧头孢治疗对攻击性侵略行为的任何行为指标都没有影响。
30 然而，与载体对照相比，50 μ g/kg 的剂量显著地延迟了咬的潜伏时间，其潜伏时间在 7 分钟以上 ($p < 0.001$)。500 μ g 和 5.0 mg 的剂量还显著地延长了咬的潜伏时间。正如所预计的那样，延长咬的潜伏时间的相

同剂量还减少了咬的次数 ($H = 24.12$; $p < 0.001$)。用 $50 \mu\text{g}$ Mox 治疗的动物表现出咬次数的显著减少 ($p < 0.05$)。实际上, 在 10 分钟的观察期间内, 6 只动物当中, 有 3 只动物根本没有咬过。在治疗之间接触时间有显著差异 ($F(5, 30) = 2.5$; $p < 0.05$)。与载体对照相比, $500 \mu\text{g}$ 和 5 mg 的剂量显著地减少了接触时间 (分别是 $p < 0.05$ 和 $p < 0.01$)。各组间胁腹标志没有显著差异 ($H = 9.256$; $p < 0.09$)。

总结

这些数据表明, $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ 剂量的 Mox 非常有效地抑制了攻击性侵略行为, 同时没有显著地减少接触时间和胁腹标志。高剂量的 Mox 虽然有效地减小了侵略行为的指标, 但是也减少了接触时间。因此, 对于以后的行为实验, $50 \mu\text{g}$ 剂量似乎是最佳的。已经鉴定了 Mox 的最有效剂量, 现在需要使用更大数目的动物和更多的行为测试来进行更全面的实验。

III. 用 $50 \mu\text{g}$ 拉氧头孢进行行为测试

攻击性侵略行为

用盐水载体或 $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ Mox 治疗后 (附图 4), 测试 13 只仓鼠的攻击性侵略行为。对于 2 种治疗, 都 IP 给予约 $150 \mu\text{l}$ 的体积。注射 90 分钟后测试动物。每只动物接受两种治疗。注射顺序是等衡的, 治疗之间的间隔不低于 48 小时。拉氧头孢显著地延长了咬的潜伏时间 ($p < 0.001$), 并减少了咬的次数 ($p < 0.01$)。接触时间或胁腹标志没有显著改变。

总结

该较大规模的低剂量 Mox 实验确证了剂量反应实验的结果, 即 Mox 可有效地减轻攻击性侵略行为, 同时没有改变通过在侵入者身上所消耗的时间表示的社会行为。

在开放区域中的运动原活动

用盐水载体或 $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ Mox 治疗后 (附图 5), 测试 6 只动物在“开放区域”中的运动原活动。该实验是等衡的, 每只动物接受各种治疗。

注射 90 分钟后，将动物单独置于大的、清洁的、没有任何褥草的有机玻璃笼子 ($48 \times 32 \times 40$ cm) 中。通过在笼子下面的带子将该开放区域划分成象限。通过计数 1 分钟内越过象限的次数来评价动物的运动原活动。在治疗组之间，开放区域活动方面没有任何显著差异。

5

嗅觉辨别力

用载体或 $50 \mu\text{g/kg}$ Mox 治疗 16 只动物，并通过测定其找到隐藏的向日葵籽所花费的时间来测试其嗅觉辨别力 (附图 5)。注射是等衡的，每只动物接受各种治疗。在测试前，将动物禁食 24 小时。注射 90 分钟后，将动物暂时从它们的饲养笼子里取出来，把 6 粒向日葵籽埋藏在位于一个角落中的褥草下面。将动物放回它们的饲养笼子中，在 10 分钟的观察期间内，通过它们找到向日葵籽所花费的时间来进行评价。与载体对照相比，在用 Mox 治疗的动物中，找到向日葵籽所花费的时间显著减少 ($p < 0.001$)。令人惊奇的是，用 Mox 而不是盐水治疗后不到 5 分钟，所有向日葵籽都被迅速地消耗掉了。实际上，用盐水治疗后，在这 16 只动物当中，没有一只消耗了所有向日葵籽，而用 Mox 治疗的动物都消耗了所有向日葵籽。

性活动

用盐水载体或 $50 \mu\text{g/kg}$ Mox 治疗后，在 5 分钟的观察期间内测试 6 只动物的性活动 (附图 6)。该实验是是等衡的，每只动物接受各种治疗。注射 90 分钟后，根据爬上的潜伏时间和插入次数，即与放在其饲养笼子中的感受雌性动物交配的回合数。在一般麻醉条件下切除雌性金色仓鼠的卵巢。通过连续 3 天单次 SC 注射 50 mg 雌二醇苯甲酸酯来治疗痊愈的动物，以诱导性感受性。在测试当天，将施以雌激素的雌性动物置于实验雄性动物的饲养笼子中。首先通过雄性动物在雌性动物中引起的剧烈脊柱前凸来进行评价。脊柱前凸是陈规的姿势，其特征在于是强烈的、持续的椎骨背屈。

用载体治疗后，动物在约 30 秒爬上并插入感受雌性动物。用 Mox 治疗后，爬上的时间显著增加了 ($p < 0.05$)。虽然两种治疗都表现出高交配回合，但是用 Mox 治疗的动物表现出插入速度下降的趋势 ($P < 0.07$)。

总结

拉氧头孢似乎具有非常良好的 serenic 特性。Serenic 是用于治疗冲动和暴行的药物 (Olivier 和 Mos, 1991)。Serenic 应该抑制攻击性侵略行为, 同时不干扰社会、食欲和认知行为。Mox 没有改变对侵入者的社会兴趣, 即接触时间。用药物治疗也没有改变胁腹标志和在开放区域中的活动, 这表明一般的激励和运动原活动是正常的。用 Mox 治疗的禁食动物更能发现隐藏的向日葵籽, 这表明药物治疗不干扰发现食物的嗅觉或促动; 实际上, 其可能提高这种能力。有趣的是, Mox 治疗减少了爬上感受雌性动物的潜伏时间, 并且在 5 分钟观察期间内, 减少了 (虽然不显著) 交配回合数。应当指出, 用 Mox 治疗的动物仍然具有非常强的性活动能力, 只是行为的强烈程度似乎弱一些。Mox 的抗侵略行为作用与减轻性活动的作用结合在一起, 这使得其可用于治疗性暴力侵犯。

eltoprazine——一种第一代 serenics 的开发之所以被放弃了, 部分是因为据发现其能增加动物的恐惧和焦虑 (Olivier 等人, 1994)。为了控制这种可能性, 需要在用于筛选药物对焦虑症的作用的模型中测试 Mox。

IV. 测试拉氧头孢的抗焦虑活性

高架正迷宫

高架正迷宫是为了在大鼠中测试抗焦虑以及焦虑诱导药物而开发的 (Pellow 等人, 1985)。已经在行为上、生理上、和药理上验证了该方法。正迷宫由两个开放的臂和两个封闭的臂构成。大鼠天生地进入开放臂的倾向小于进入封闭臂的倾向, 并且在开放臂中停留的时间要少得多。与限制在封闭臂中相比, 限制在开放臂中会带来更明显的焦虑相关性行为以及更高的紧张激素水平。临床有效的抗焦虑药物例如利眠宁或安定显著地增加了在开放臂中停留的时间百分比以及进入开放臂中的次数。与之相反, 焦虑诱导药物例如可立宁或安非他明会减少进入开放臂中的次数以及在臂臂中停留的时间。

方法

将重 250–300 g 的雄性 Wistar 大鼠成群地在标准 12:12 光照–黑暗循环(在早晨 8 点开始光照)中饲养, 并提供食物和水让其随意获得。正迷宫由 2 个开放臂(50×10 cm)和两个封闭臂(50×10×40 cm)和开放顶构成, 并且两个开放臂彼此相对。将迷宫提高至 50 cm 高度。

- 5 给动物 IP 注射 50 µg/kg Mox 和盐水载体 90 分钟后, 在正迷宫中测试 8 只动物。治疗顺序是等衡的, 注射间隔至少 48 小时。在实验开始时, 将动物放置在正迷宫的中央朝着封闭臂方向。在 5 分钟的观察期间, 根据动物进入封闭臂的潜伏时间、在封闭臂中停留的时间、以及第一次进入封闭臂后进入开放臂中的次数来评价动物(附图 7)。与载体相比, 用 Mox 治疗显著地增加了进入封闭臂的潜伏时间($p<0.05$)。在封闭臂中停留的时间显著地减少了($p<0.01$), 同时进入开放臂的数目显著地增加了($p<0.05$)。

总结

- 15 这些数据表明, 以 50 µg/kg 的剂量施用的 Mox 具有抗焦虑活性。该发现表明, Mox 具有 serenic 活性, 同时其与部分通过增加恐惧和焦虑来抑制攻击性侵略行为的以前的 serenics 例如 eltoprazine 不同。这些数据还表明, Mox 可具有用作抗焦虑剂的治疗价值。

- 20 然而, Mox 的抗焦虑活性引起了关于行为特异性的其它担心。许多抗焦虑剂, 特别是苯并二氮杂^葸类是镇静剂, 并且可抑制一般的运动原获得, 而且还可以起健忘剂的作用, 并影响学习和记忆。因为 Mox 对胁腹标志或在开放区域中的活动没有任何影响, 所以其可能不会起一般镇静剂的作用。然而, 需要测试 Mox 来确定其是否对学习和记忆有任何不利影响。

25

V. 测试拉氧头孢的抗焦虑活性

拉氧头孢 v. 利眠宁

方法

- 30 因为 Mox 和 CDP 具有不同的生物利用度特性, 例如脑穿越性, 所以其 CNS 活性不能通过系统注射等摩尔浓度的每种药物来进行比较。反而, 需要将两种药物直接注射到脑室系统中以绕过血脑屏障。用戊

- 巴比妥钠(50 mg/kg)将动物麻醉,植入目标是侧室的微注射导管,在测试前让动物恢复2天。用 Mox 或 CDP 测试各组动物(每组6只)。在隔开的2天,给每只动物注射药物和0.9% NaCl 载体。注射顺序是平衡的,并且间隔2天。Mox 和 CDP 都是在0.9% NaCl 中制成1 mM 浓度。
- 5 所有注射都是用10秒钟给完全清醒的束缚的动物注射2 μ l 的体积。60分钟后,在正迷宫中测试动物,观察3分钟,并如上所述评价行为。

结果

- 与载体治疗相比, Mox 治疗显著($p < 0.05$)延迟了动物进入封闭臂中的时间(附图17)。用 Mox 治疗使得动物在正迷宫的光亮臂中度过大部分时间。与载体相比,用 Mox 治疗后,在黑暗中停留的时间显著($p < 0.01$)减少。与载体治疗相比,用1 mM 浓度的 CDP 治疗后,对进入封闭臂的潜伏时间或在封闭臂中停留的时间没有任何影响。
- 10

15 控制非特异性抑制运动原活动

- 当 CDP 以5-15 mg/kg 的剂量系统施用给啮齿动物时,其是镇静剂,并抑制运动原活动。然而,在几天内重复施用 CDP 后,对运动原活动的抑制作用会消失。只有当动物对 CDP 的运动原作用变得感觉迟钝时,才在正迷宫中测试 CDP 的抗焦虑活性。为了控制直接注射到脑中后 Mox 和 CDP 对运动原活动的任何非特异性作用,在正迷宫中测试前30分钟,在开放区域中测试动物(附图18)。这两种抗焦虑剂对一般运动原活动都没有显著影响。
- 20

总结

- 25 关于 Mox 是抗焦虑剂的发现表明, Mox 具有 serenic 活性,同时其与部分通过增加恐惧和焦虑来抑制攻击性侵略行为的以前的 serenics 例如 eltoprazine 不同。在等摩尔基础上,直接施用到脑中后, Mox 表现出抗焦虑活性,而 CDP 则没有。这些数据表明,除了 serenic 以外, Mox 可具有用作抗焦虑剂的治疗价值。

- 30 然而, Mox 的抗焦虑活性引起了关于行为特异性的其它担心。许多抗焦虑剂,特别是苯并二氮杂革类是镇静剂,并且可抑制一般的运动原获得,而且还可以起健忘剂的作用,并影响学习和记忆。因为 Mox

对胁腹标志或在开放区域中的活动没有任何影响，所以其可能不会起一般镇静剂的作用。然而，需要测试 Mox 来确定其是否对学习和记忆有任何不利影响。

5 VI. 测试拉氧头孢的空间记忆作用

径向臂迷宫

径向臂迷宫是其中一个最常用的在啮齿动物中测试空间学习和记忆的方法。其是由 Olton 与合作者开发的(1976)，其提供了对测试个体的几个不同路径的同时选择。动物必须学习使用视觉空间线索来确定食物的位置(位置学习)。

方法

试验：试验由三期构成(如下所述)。迷宫的臂沿着顺时针方向从一到七，数字一是距离迷宫右侧最远的臂。所有试验都持续约 12 分钟。当不测试时，所有仓鼠都无限地摄取水。除了迷宫中的向日葵籽以外，每天给仓鼠一个 Agway Prolab 3000 食丸。在所有时期内的试验都是在连续的天内进行。

一期：一期由五个 15 分钟的试验构成。在开始一期中的五个试验之前，将 4 粒向日葵籽置于臂 1、2、和 3 的末端。臂 4、5、6、和 7 是空的。

二期：该试验的二期与一期相同，除了在臂 2、4 和 7 中放置向日葵籽。臂 1、3、5 和 6 是空的。二期由四个 15 分钟的试验构成。

三期：该试验的三期由三个 15 分钟的试验构成，在臂 2、4、和 7 中放置向日葵籽。三期与二期的不同之处在于将迷宫在房间中顺时针旋转 110°。

解读行为：如果仓鼠的所有 4 个爪子都越过臂入口，则记录臂进入。如果仓鼠的鼻子接触在臂末端的闭塞处顶部，或者如果它们的鼻子穿过闭塞处，则记录完全臂进入。这些评分是关于放置和未放置向日葵籽的臂。此外，记录被仓鼠装入袋中的向日葵籽的数目。

结果

用 0.9 % NaCl 或 50 $\mu\text{g/kg}$ Mox 治疗后，在径向臂迷宫中测试 6

只雄性仓鼠（附图 8）。每只动物接受每种治疗，治疗顺序是均衡的。在径向臂迷宫中，最重要的测定是，在测试的最后一天，将迷宫的方向反转后，所发现的向日葵籽的数目。与载体治疗相比，拉氧头孢治疗显著地增加了所发现的向日葵籽 ($p < 0.01$)。

5

总结

这些数据支持了下述观念：拉氧头孢的抗焦虑作用不伴有干扰学习和记忆（苯并二氮杂草抗焦虑剂伴有这种不利作用）。相反，拉氧头孢增强了空间记忆，其可用作精神病治疗剂来改善认知能力。该发现表明，拉氧头孢可以是治疗儿童和老年患者中的 ADHD 和行为障碍的有效治疗剂。

10

在水迷宫中的空间航行

类似于径向臂迷宫的 Morris 水迷宫是为了测试空间记忆而开发的 (Morris, 1984)。将水池分成通常称为北、南、东和西的象限。用奶粉使水池中的水变得不透明。在一个象限中将平台隐藏在表面之下，平台的作用是置于水池内的啮齿动物的逃脱途径。从多个不同起点将动物置于水池的某个地方，记录动物找到平台所用的时间，在每个象限中停留的时间百分比，行进的距离和游泳速度。在水池中动物没有任何视觉或空间线索，并且必须依赖于迷宫外的线索，即放在水池外可被游动的动物看见的物体。经过一系列试验，大鼠发展了根据迷宫外线索找到平台位置的“位置学习”或知识。每天可将平台移到不同象限中，以使空间记忆与工作记忆结合起来。该方案涉及以前记忆的消退和解答新的空间问题。

15

20

25

方法

水迷宫由黑色的塑料环状水池构成，直径约为 150 cm，高约 54 cm，填充了约 35 cm 水平的用奶粉变得不透明的水。将水池分成 4 个象限，在西北象限的表面 2 cm 下浸没着一个直径为 10 cm 的平台。将水维持约 25℃ 的温度。在水池周围有几个视觉线索。在水池上面是一个捕捉实验动物运动的录像机。使用 HVS Image (Hampton, UK) 开发的软件全自动地收集数据。在测试前，使大鼠熟悉水池和置于西北象

30

限中的平台。在连续 4 天中，每天都将动物置于水池中的随机位点上，并给它们 2 分钟来发现平台。在测试前 1 小时，用 $50 \mu\text{g/kg}$ Mox ($n=11$) 或载体 ($n=10$) 治疗动物。熟悉了试验后，测试动物的空间航行。测试开始的第二天，平台在预期的西北象限中。在 2 分钟的观察期间内，
5 用录像机记录所有行为。将测试动物干燥后，把它们放回到各自的饲养笼子中。在接下去的每一天，将平台移动到新的象限中，大鼠在不同位置开始。总是将大鼠置于水池中，并朝着侧壁。对于 4 个象限中的每一个，相对于平台的开始位点是不同的；然而，在每个象限，平台总是在相同的相对位置。距离水池侧面 20 cm，并且在朝着中央的左
10 边角。

结果

双向 ANOVA 表明，治疗 ($F_{(1, 20)} = 6.48$, $p < 0.05$) 和测试天数 ($F_{(3, 63)} = 5.76$, $p < 0.01$) 有显著的主要影响(附图 19)。在治疗与测试天数之间
15 间有显著的相互影响 ($F_{(3, 63)} = 4.35$, $p < 0.01$)。Newman-Keuls 后 hoc 检验表明，在第 2 天 ($p < 0.05$)、第 3 天 ($p < 0.01$) 和第 4 天 ($p < 0.05$)，治疗之间有显著差异(附图 19)。在每一天，与载体治疗组相比，用 Mox 治疗的动物发现隐藏平台所用的时间显著地缩短了。实际上，与第 1 天相比，用载体治疗的动物在第 2 天 ($p < 0.05$) 和第 3 天 ($p < 0.01$) 发现隐
20 藏平台所用的时间显著地增加了。

对于两种治疗(附图 19，底部的 2 个图)，发现平台的方案与通过动物在每个象限中停留的时间百分比所判断的结果类似。对于任一象限，在任一天，治疗之间没有任何显著差异。对于在任何特定象限中停留的时间百分比，在天数之间有显著差异(例如北面的象限， $F_{(3, 63)} =$
25 28.80 , $p < 0.0001$)。在某几天，动物在一些象限中度过了大部分时间。例如，在第 1 天，相对于其它象限，用 Mox 和载体治疗的动物都在北面的象限中度过了其大部分时间 ($p < 0.01$)。这是可以预计到的，因为它们已经通过熟悉过程了解了平台位于该象限中。有趣的是，与南面和东面的象限相比，在第 1 天，用载体治疗的动物还在西面的象限中度
30 过了较长时间 ($p < 0.05$)。这可能是因为平台隐藏在北面象限的西北部位所致。在第 2 天，与东面和西面的象限相比，用 Mox 和载体治疗的动物在北面和南面的象限度过了较长时间。在第 3 天，用 Mox 治疗的动

物没有表现出对任何象限的特别偏好，而与南面和西面的象限相比，用载体治疗的动物仍然表现出对北面象限的显著偏好。在第4天，用Mox和载体治疗的动物都在正确的象限(西面)中度过了大部分时间，在前一天隐藏平台的东面象限中度过了较少时间。在第4天，对于这两种治疗，该方案都表现出良好的空间、工作和程序记忆。

在各天中，对于到达平台所经过的距离，在用Mox和载体治疗的动物之间没有显著差异(附图20)。然而，用Mox治疗的动物的游泳速度比用载体治疗的动物要快得多($F_{(1,20)} = 22.94$, $p < 0.0001$) (附图20)。例如，在第2天，这两组游动了类似距离到达平台，只是用Mox治疗的动物以几乎2倍的速度游动了该距离($p < .01$)。对于Mox治疗，虽然各天没有任何显著影响($F_{(3,63)} = 2.27$, $p < .09$)，但是在游动速度与天数之间有相互影响($F_{(3,63)} = 2.75$, $p < .05$)，因为该组的游泳速度随着时间的延长下降了。

15 在水迷宫中的线索航行

方法

在空间航行最后一天(第4天)的下一天，测试动物的线索航行。在这些测试中，将平台升至水面以上。测试前一小时，用Mox或盐水载体治疗动物。对于线索航行，在空间航行期间用Mox治疗的动物也用Mox治疗。给动物进行一系列2分钟的试验，试验间隔45分钟。对于每个试验，将平台移至不同象限。线索航行实验与空间航行相同，除了平台是可以看见的，并且在一天内，测试是进行5个连续试验。在所有测试期间，记录动物找到平台所用的时间、在每个象限停留的时间百分比、游动的距离以及游泳速度。

25

结果

在用Mox和载体治疗的动物之间，动物找到平台所用的时间有差异($F_{(1,20)} = 24.68$, $p < 0.0001$) (附图21)。对于天数有显著影响($F_{(4,84)} = 6.53$, $p < 0.0001$)，但是在治疗与天数之间没有任何相互影响($F_{(4,84)} = 0.99$, $p < 0.4$)。在第1、3和4个试验，与用载体治疗的动物相比，用Mox治疗的动物找到平台所用的时间显著缩短。

就象空间航行中一样，对于两种治疗(附图21，底部的2个图)，

发现平台的方案与通过动物在每个象限中停留的时间百分比所判断的结果类似。对于任一象限，在任一天，治疗之间没有任何显著差异(例如南面的象限， $F_{(1,20)} = 1.61$, $p < 0.21$)。对于在任何特定象限中停留的时间百分比，在试验之间有显著差异(例如南面的象限， $F_{(4,84)} = 16.70$, $p < 0.0001$)。在某几个试验，动物在一些象限中度过了大部分时间。例如，在第5个试验，相对于其它象限，用 Mox 和载体治疗的动物都在隐藏平台的北面象限和在前一个试验放置平台的西面象限中度过了其大部分时间。

与空间航行不同，对于在线索航行期间游动的距离，在用 Mox 和载体治疗的动物之间有显著差异($F_{(1,20)} = 44.11$, $p < 0.0001$) (附图 22)。对于试验有显著影响($F_{(4,84)} = 7.90$, $p < 0.0001$)，并且在治疗与试验之间有相互影响($F_{(4,84)} = 2.67$, $p < 0.05$)。在第1个试验，对于游动距离，在治疗之间没有任何差异。然而，在第3和4个试验，与用 Mox 治疗的动物相比，用载体治疗的动物明显用了更多的时间来找到平台。对于用 Mox 治疗的动物，在各试验之间，游动距离没有显著改变。然而，对于用载体治疗的动物，在第3个试验游动的平均距离显著大于该治疗的任何其它试验。

与空间航行不同，在两种治疗之间游泳速度没有任何显著差异($F_{(1,20)} = 0.67$, $p < 0.42$) (附图 22)。然而，在试验之间有显著影响($F_{(4,84)} = 17.18$, $p < 0.0001$)，并且在治疗与试验之间有相互影响($F_{(4,84)} = 4.10$, $p < 0.01$)。在两个治疗中，在每个随后的试验，游泳速度有显著增加。例如，从第1个试验到第4个试验，用 Mox 和载体治疗的动物都表现出游泳速度的显著增加($p < 0.01$)。

25 总结

与用载体治疗的对照动物相比，用拉氧头孢治疗的动物能更有效地找到隐藏和可见的平台。然而，对于在每个航行范例中的成功，方案是严格不同的。在空间航行期间，动物必须依赖迷宫外的线索和程序记忆来找到移动的平台。用 Mox 和载体治疗的动物似乎表现出相同的学习和记忆，因为对于测试的每一天，在每个象限中度过的时间百分比没有任何不同。在游泳模式上没有任何表面差异(附图 23 和 24)。治疗之间的游动距离没有显著差异。用 Mox 治疗的动物能更快地找到

平台，这部分是因为其游动得更快。然而，线索航行呈现了不同情况。用 Mox 治疗的动物找到平台所用的时间比用载体治疗的动物少。由在各象限中停留的时间百分比限定的搜寻情况非常相似。然而，与空间航行不同，用 Mox 治疗的动物游动了更短的距离。此外，两个治疗组都以相同速度游动。

这些数据支持了下述观念：拉氧头孢的抗焦虑作用不伴有干扰学习和记忆(苯并二氮杂草抗焦虑剂伴有这种不利作用)。相反，拉氧头孢增强了空间记忆，其可用作精神病治疗剂来改善认知能力。该发现表明，拉氧头孢可以是治疗儿童和老年患者中的 ADHD 和行为障碍的有效治疗剂。

VII. 非人灵长目动物中的社会行为

实验方案

用 Mox 测试 8 只两岁大小的青春期恒河猕猴。在场地位置设定的组中由它们的母亲饲养动物。在 1 岁大小时，将它们放到单独的笼子中。之后的每一天，将它们成对饲养 2-3 小时。青春期伴侣总是相同的。该年的长过程导致青春期伴侣或“游戏同伴”具有限定良好的与可认识的支配和次要状态的社会相互关系史。以该方式展现的社会行为非常强烈，这是因为猴子一起度过的时间很有限。

在实验期间，将猴子成对地放置在“游戏笼子”中，用录像机记录 1 小时。该实验是这样设计的，对于用 Mox 和载体治疗的每只猴子，都获得行为数据。治疗是 ABA 型给药方案：第一天 - 每对中的一个成员接受 0.9% NaCl 载体，第二天 - 药物，第三天 - 载体。在测试天，一对当中只有 1 个成员接受注射。1 周后，依据相同的 ABA 给药方案给一对当中的另一个成员注射。拉氧头孢是以 1 mg/kg 的剂量 IM 注射。注射后 60 分钟，在一个小时的观察期间用录像机记录动物。记录动物 40 种以上的不同行为(Winslow 等人, 1988)。在表 1 中仅列出了 28 种行为。未列出的行为，例如咬自己、发音、紧贴、爬上、逃跑、自我打扮非常少见，因此将它们从分析中删除。对于每个行为指标，进行成对的 t-检验。

结果

与载体相比，通过 Mox 治疗使得打斗持续时间显著缩短 ($p < 0.05$)。该发现不受动物社会地位的影响，即用 Mox 治疗后，处于支配地位和次要地位的动物都表现出减少的打斗。有趣的是，几个不同的激动行为指标，例如综合侵略行为打分在接近显著水平上交错在一起。应当注意到，这些动物是青春期恒河猕猴，并且它们表现出的社会侵略行为主要限制在打斗上。侵略行为与成年的情绪暴虐不同。然而，据信打斗是成年侵略行为的成熟前期行为。青春期和成年猴子的异性打扮是交往行为的主要标志。虽然 Mox 显著地减轻了打斗的持续时间，但是其对异性打扮没有任何影响。

10

总结

将拉氧头孢以 1 mg/kg 的剂量施用给青春期恒河猕猴后，其显著地减轻了打斗—激动行为的标志。然而，作为交往行为标志的异性打扮未受影响。因此，关于 Mox 可减轻啮齿动物中激动行为的发现延伸到了非人灵长目动物。

15

VIII. 测试拉氧头孢的 D 和 L 异构体

原理

药物的 3D 结构可天然地存在镜像或异构体。根据它们的旋光，可将这些异构体分为 D 或 L 型。通常只有其中一个异构体具有生物活性。因为用于这些实验的 Mox 是作为两种异构体的混合物制得的，所以需要分离并测试活性异构体。

20

方法

拉氧头孢钠盐 (FW 564.4) 是作为异构体混合物从 Sigma Chemical (St Louis MO) 获得的。D, L-Mox 是通过 Ziemniak 等人, 1982 描述的方法用 HPLC 分离到的。将 D, L-Mox 置于水中，在 C18 柱上分离，用 1 % MeCN, pH 6.5 缓冲液洗脱。用 UV 检测器在 275 nm 检测洗脱液。两种异构体都呈现单峰。D-Mox 的保留时间为 6.7 分钟，而 L-Mox 的保留时间为 8.2 分钟。Mox 的单独异构体比较不稳定，并且在冷冻干燥期间会迅速异构化，这使得难以获得具有适当程度 (>98 %) 的样本。因此需要直接从 HPLC 施用给动物。将 D 异构体 (约 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HPLC 缓冲

30

液)稀释至 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 盐水,并在冰上保持直至 IP 注射(50 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。也将 L 异构体(约 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HPLC 缓冲液)稀释至 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 盐水,并进行类似处理。

5 结果

用 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ D 或 L Mox 治疗后,测试两组动物(每组 8 只)的攻击性侵略行为(附图 9)。注射后 90 分钟测试动物。D Mox 显著地延长了咬的潜伏时间($p < 0.01$),并减少了咬的数目($p < 0.05$)。对于接触时间或胁腹标志,这两种异构体之间没有显著差异。

10

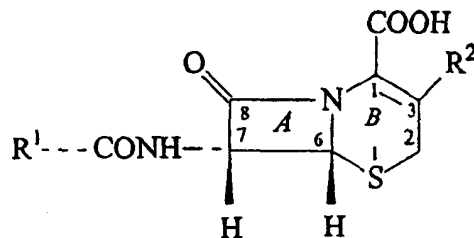
总结

这些数据表明, D 拉氧头孢是影响攻击性侵略行为的活性异构体。

IX. 测试 β -内酰胺类抗生素抗侵略性行为

15 原理

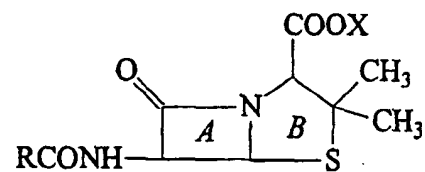
拉氧头孢在化学和药理上与头孢菌素和青霉素类抗生素相似。实际上,拉氧头孢被归为头孢菌素。所有头孢菌素类和青霉素的基本结构如下。它们都具有 β -内酰胺环(A),头孢菌素具有 6 元二氢噻嗪环(B),青霉素具有 5 元噻唑烷环(B)。形成这些抗生素的化学母核的这些基本结构天然存在于真菌中。拉氧头孢不是天然发现的,并且其特征是,氧替代了头孢菌素中的硫(S)。



头孢菌素母核

A β -内酰胺环

B 二氢噻嗪环



青霉素母核

A β -内酰胺环

B 二氢噻唑环

头孢菌素和青霉素是抗菌素。它们的抗菌活性是因为抑制了细菌细胞壁中的肽基聚糖的合成。虽然其精确的作用基质尚未完全了解，但是这些抗生素能结合几种蛋白酶解酶，例如羧肽酶和内肽酶，这几种蛋白酶解酶涉及合成能增强细菌细胞壁的肽基聚糖网格。这些抗生素与蛋白酶解酶之间的相互作用是可逆的。据信这些 β -内酰胺类抗生素起着酰基-D-丙氨酰基-D-丙氨酸—这些酶的内源性底物的底物类似物的作用。当这些细菌酶与抗生素结合时，它们就不能行使其功能，并且在它们复制时细菌裂解。

类似的羧肽酶和内肽酶与哺乳动物脑中神经元和神经胶质的细胞膜有关。在它们的多种功能中，其中一种是迅速地降解起神经递质作用的神经肽。与依赖再摄取机制来终止信号激活的标准神经递质例如多巴胺和血清素不同，神经肽由于其在细胞外空间中迅速降解而失活。据信这些 β -内酰胺类抗生素通过干扰在多个神经肽上的代谢 (NAALAD 酶活性) 以改变脑神经肽环境来发挥精神病治疗活性。

15

方法

用等摩尔浓度 (90 μ M) 的拉氧头孢 (Mox)、氨苄青霉素 (Amp)、羧苄青霉素 (Carb)、头孢西丁 (Cef)、阿莫西林 (Amox) 或盐水载体测试 6 只动物。将浓度调节至与前面实验中 MOX 所用的剂量相同的 50 μ g/kg。所有溶液都是在 0.9% NaCl 中制备的，并且是 IP 给药。注射顺序是等衡的。注射后 90 分钟，测试动物的攻击性侵略行为 (附图 10)。对于咬的潜伏时间，在治疗之间有显著差异 ($F(5, 30) = 2.83$, $p < 0.05$)。与载体对照相比，Mox 和 Amp 都显著地延长了咬的潜伏时间 (分别 $p < 0.001$ 和 $p < 0.05$)。对于咬的数目，在治疗之间也有显著差异 ($H = 10.6$; $p < 0.05$)。Mox 和 Amp 药物都显著地减少了咬的数目 ($p < 0.05$)。对接触时间和胁腹标志没有任何显著治疗影响 (附图 11)。

25

总结

这些数据表明， β -内酰胺抗菌 Mox 的抗侵略行为作用可延伸到包括 β -内酰胺氨苄青霉素。在所有测试的抗生素当中，Mox 穿透 CNS 的能力最强。施用 2.0 g Mox IV 的专利提出，药物的脑脊液水平约为 30 μ g/ml。Mox 的 CSF 与血清水平的比例为约 15 - 20%。据估计，在

30

IP 注射 14 μg Mox 的 140 g 仓鼠中, Mox 的血清浓度为 0.1 ng/ml。这可由 15 ng/ml 的 CSF 浓度或约 30 nM 的 Mox 脑水平反映出来。这些水平当然是在能有效地与神经肽受体相互作用的范围内, 其中大多数神经肽受体在纳摩尔范围内有结合亲和力。与标准神经递质相互作用的可能性很小, 因为这些受体具有在微摩尔和毫摩尔范围内的 K_d 's。

在患有脑膜炎的新生儿(有利于 β -内酰胺抗生素 CNS 穿透的病症)中, Amp 的 CSF 与血清水平的比例为约 10%。另一方面, 头孢西丁的 CNS 穿透力较弱, 甚至当脑膜发炎时也是如此。也许很多 β -内酰胺抗生素能有效地抑制侵略行为, 并且它们受其药动力学和 CNS 穿透能力的限制。为了验证这种想法, 需要使用高剂量的每种药物来重复 β -内酰胺抗生素实验。

X. 高剂量的 β -内酰胺类

用等摩尔浓度(约 5 mg/kg; 9 mM)的氨苄青霉素(Amp)、羧苄青霉素(Carb)和头孢西丁(Cef)或盐水载体测试 6 只动物。将浓度调节至与 Mox 剂量反应实验的剂量相同的 5 mg/kg。所有溶液都是在 0.9% NaCl 中制备的, 并且是 IP 给药。注射顺序是等衡的。注射后 90 分钟, 测试动物的攻击性侵略行为(附图 12)。对于咬的潜伏时间, 在治疗之间有显著差异($F(4, 25) = 5.49, p < 0.01$)。与载体对照相比, Amp 和 Carb 都显著地延长了咬的潜伏时间($p < 0.001$)。对于咬的数目, 在治疗之间也有显著差异($H = 11.7; p < 0.05$)。Amp 和 Carb 都显著地减少了咬的数目(分别 $p < 0.05$ 和 $p < 0.01$)。对接触时间和胁腹标志没有任何显著治疗影响(附图 13)。

在该高剂量 β -内酰胺抗生素实验中不包括阿莫西林。相反, 使用 1 mg/kg (约 2 mM)的剂量单独对其进行实验。IP 注射 Amox 或盐水载体后 90 分钟, 测试 8 只动物(附图 14)。给每只动物进行每种治疗, 注射之间的间隔不低于 48 小时。治疗是等衡的。在用 1 mg/kg Amox 治疗的动物中, 攻击性侵略行为没有显著改变。

30 总结

这些数据表明, 以足够高的剂量施用的氨苄青霉素和羧苄青霉素可抑制攻击性侵略行为, 同时不改变接触时间或胁腹标志。这些数据

支持了这样的可能性：拉氧头孢的精神病治疗作用被其它 β -内酰胺共享，并且作用生物机制可能是类似的。生物利用度和 CNS 穿透性可能是导致生物效力不同的部分主要因素。实际上，最近的测试表明，棒酸——一种 β -内酰胺化合物的抗菌活性在临床上不显著，但是具有临床重要的 β -内酰胺酶抑制活性，以低于 $1\text{ }\mu\text{g/kg}$ 的剂量 i. p. 施用，其表现出广泛的精神病治疗作用，包括抗焦虑、抗侵略行为和提高认知。其高口服吸收和良好的血脑屏障运输能力使得它与相关的 β -内酰胺酶抑制剂成为优选用于本发明方法和药物制剂的候选药物。

现在据信，这些 β -内酰胺化合物的精神病治疗作用的机制是它们与神经原性 NAALAD 酶相互作用。这是可行的，因为据报道头孢菌素在低至 10 nM 的浓度具有抗菌活性。以 $50\text{ }\mu\text{g/kg}$ 治疗后，估计 Mox 在脑中的浓度为约 30 nM 。

对于 β -内酰胺抗生素的精神病治疗活性，另一可能的解释是，其阻断了已知的神经递质受体或再摄取蛋白。为了测试第二种可能性，需要在广泛的放射配体结合测定中测定 Mox 的受体相互作用。

XI. 受体与运输结合测定中筛选拉氧头孢

测试 Mox 对后叶加压素 V_{1A} 与血清素 $5HT_{1A}$ 受体的相互作用

后叶加压素与血清素都是控制雄性仓鼠攻击性侵略行为的关键神经递质 (Ferris 等人, 1998)。这两种神经递质还都参与控制人的侵略行为 (Coccaro 等人, 1998)。后叶加压素促进侵略行为，而血清素部分通过抑制后叶加压素系统的活性来抑制侵略行为。阻断前下丘脑中的后叶加压素 V_{1A} 受体和刺激血清素 $5HT_{1A}$ 受体能阻断攻击性侵略行为 (Ferris 等人, 1999)。由于 Mox 显著地抑制攻击性侵略行为，因此猜测其是通过与一种或两种这些受体相互作用而行使活性的。为了验证这种猜测，在测试竞争性结合 V_{1A} 受体的膜结合测定 (Ferris 等人, 1994) 和测试竞争性 $5HT_{1A}$ 受体的受体放射自显影测定 (Ferris 等人, 1999) 中测试 Mox。 $1\text{ }\mu\text{M}$ 浓度的拉氧头孢没有显著地代替仓鼠肝脏膜制备物中的 $I^{125}\text{ HO-LVA}$ (后叶加压素配体) 结合。类似地，Mox 不能有效地减少 $I^{125}\text{ DPAT}$ (血清素配体) 与仓鼠脑组织切片的特异性结合。

总结

这些数据表明，拉氧头孢不与仓鼠中的后叶加压素 V_{1A} 和血清素 $5HT_{1A}$ 受体直接相互作用。这表明，拉氧头孢是通过改变其它神经化学途径来影响行为。

5 测试氨基酸、肾上腺素能、血清素能、和多巴胺能受体及其转运蛋白

通过 NOVASCREEEN—按照 Hanover, Maryland 的一种收缩研究组织在 36 个不同结合测定中测试拉氧头孢。对于在下页列出的测定，以 100 nM 和一式两份样本测试拉氧头孢。之所以选择这些测定是因为它们各自的受体或转运蛋白在精神病的病理生理学中起作用。在任一这些结合测定中，拉氧头孢没有任何显著作用。

10

氨基酸靶目标

苯并二氮杂草，外周

GABA

激动位点

苯并二氮杂草，中枢

GABA

谷氨酸

AMPA 位点

海人草酸位点

NMDA，激动位点

NMDA，甘氨酸[土的宁-不敏感的]位点

甘氨酸[土的宁-敏感的]位点

生物所产生的胺-肾上腺素能靶目标

肾上腺素能

α_{1A}

α_{1B}

α_{2A} (人 HT-29 细胞)

α_{2B}

α_{2C} (人重组)

β_1

β_2

生物所产生的胺-血清素能靶目标

血清素

5HT_{1A} (人重组)

5HT_{1B}

5HT_{1D}

5HT_{2A} (以前的 5HT₂)

5HT_{2C}

5HT₃

5HT₄

5HT₆ (大鼠重组)

5HT₇ (大鼠重组)

生物所产生的胺-多巴胺能靶目标

多巴胺

D₁

D₂ (人重组)

D₃ (大鼠重组)

氯氮平

摄取/转运蛋白靶目标

安络血

肾上腺素能, 去甲肾上腺素

多巴胺

GABA

谷氨酸

毒蕈碱的胆碱

血清素

激素靶

促肾上腺皮质激素释放因子

测试促肾上腺皮质激素释放激素受体

- 促肾上腺皮质激素释放激素(例如在下页显示的 CRH 或 CRF)是调节紧张的关键神经激素。因为 Mox 抑制冲动、侵略行为、和焦虑,同时促进学习和记忆,并且可减轻紧张。出于该原因,在 CRF 结合测定中
- 5 通过 NOVASCREEN 测试 Mox。在该测定中,100 nM 浓度的拉氧头孢没有任何作用。

总结

- 这些数据表明,拉氧头孢不直接与涉及侵略行为和精神病的病理的许多受体和转运蛋白相互作用。这有三种可能的作用机制:1)与未筛选的已知受体例如组氨酸、乙酰胆碱、和其它神经肽相互作用,
- 10 2)与未知或“孤立受体”相互作用,或 3)与改变脑化学环境的 CNS 中的蛋白酶解酶(例如 NAALAD 酶)相互作用。

15 XII. 验定作用机制

测试肽基聚糖前体肽对于攻击性侵略行为的作用

原理

- β -内酰胺抗生素的立体化学与酰基-D-丙氨酰基-D-丙氨酸—细菌蛋白酶解酶的天然底物类似。据假定,该结构的特征使得 β -内酰胺抗
- 20 生素能够作为竞争性底物来阻断酶活性。为了验证该假设,在仓鼠居住者/侵入者模型中测试酰基-D-丙氨酰基-D-丙氨酸的类似物肽基聚糖前体肽(Nieto 和 Perkins 1971; Zeiger 和 Maurer, 1973)的抗侵略行为作用。

25 方法

- 从 Sigma Chemical 获得肽基聚糖前体肽 Ala-D- γ -Glu-Lys-D-Ala-D-Ala (PPP),在 DMSO 中重新配制,并在 0.9% NaCl 中稀释至约 2 mM 的终浓度。用戊巴比妥钠(50 mg/kg)将动物麻醉,植入目标是侧室的微注射导管,在测试前让动物恢复 2 天。在测试的当天,给动物
- 30 (n=6)注射约 1 mg/kg 剂量(体积为 1 μ l)的载体(2% DMSO 的 0.9% NaCl 溶液)或 PPP。注射后 60 分钟,再测试动物对于放置在其饲养笼子中的较小侵入者的攻击性侵略行为。2 天后,再测试动物,并颠倒治疗顺序。

结果

肽基聚糖前体肽显著地延长了咬的潜伏时间 ($p < 0.05$), 并且减少了在 10 分钟观察期间内的咬的次数 ($p < 0.05$) (附图 15)。对于接触时间和胁腹标志, 在治疗之间没有显著差异 (附图 15)。

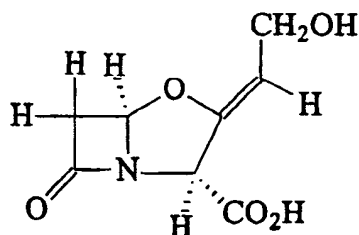
测试肽基聚糖前体肽对嗅觉辨别的影响

给 6 只动物脑室内注射载体或 1 mg/kg PPP, 并通过测定其找到隐藏的向日葵籽所花费的时间来测试其嗅觉辨别力 (附图 16)。注射是等衡的, 每只动物接受各种治疗。在测试前, 将动物禁食 24 小时。注射 60 分钟后, 将动物暂时从它们的饲养笼子里取出来, 把 6 粒向日葵籽埋藏在位于一个角落中的褥草下面。将动物放回它们的饲养笼子中, 在 5 分钟的观察期间内, 通过它们找到向日葵籽所花费的时间来进行评价。与载体相比, 用 PPP 治疗的动物找到向日葵籽所用的时间显著减少 ($p < 0.05$)。

总结

将肽基聚糖前体肽直接注射到仓鼠脑中, 产生了与外周注射 Mox 相同的行为结果。这两种药物和两种给药途径都显著地减轻了侵略行为, 同时没有改变运动原活动的社会兴趣, 即接触时间和胁腹标志。此外, 该前体肽类似地达到了可能是筛选 β -内酰胺抗生素的最简单和最有效的行为测定的嗅觉辨别力的提高效果。这些发现表明, β -内酰胺是通过下述途径来影响行为的: 1) 直接作用于脑, 和 2) 模拟酰基-D-丙氨酰基-D-丙氨酸肽部分。

虽然棒酸含有 β -内酰胺环, 并且在结构上与青霉素和头孢菌素类似, 但是其具有弱的抗菌活性, 没有作为抗生素的任何治疗价值。然而, 当与一些 β -内酰胺抗生素例如替卡西林 (Timentin®) 联合施用, 棒酸可延伸抗生素的作用谱并提高抗生素的活性 (AHFS, 1991)。该协同作用可能是由于棒酸具有细菌 β -内酰胺酶 (其天然降解 β -内酰胺抗生素并使其失活) 竞争性抑制剂的作用 (Brown 等人, 1976; Reading 和 Cole 1977)。



棒酸

在美国棒酸可商购获得，但是仅以与其它药物固定组合的形式市售。常规处方药物 Timentin®一般是以 200 - 300 mg/kg/天 (按替卡西林的含量计) 的剂量静脉内施用，这相当于约 7 - 10 mg/kg/天的棒酸剂量 (AHFS, 1991)。没有任何报道表明以该剂量施用的棒酸有副作用或禁忌症 (Koyu 等人, 1986; Yamabe 等人, 1987)。下文给出的数据表明，10 ng - 10 µg/kg 或比抗菌适应征用量低 1000 - 1, 00, 000 倍的剂量的棒酸可改变 CNS 活性和行为。

棒酸自身在口服时是有活性和稳定的。生物利用度约为 64 - 75 % (Davies 等人, 1985; Bolton 等人, 1986)，消除半衰期略低于 2 小时。峰值血浆浓度在摄取后 45 分钟 - 3 小时出现 (Bolton 等人, 1986)，血浆半衰期在 2 小时以上 (Nakagawa 等人, 1994)。分布体积约为 15 升，这表明棒酸主要限制在细胞外液体中 (Davies 等人, 1985)。CSF/血浆比例为约 0.25，这表明棒酸易于穿越血脑屏障 (Nakagawa 等人, 1994)。

用棒酸进行的行为实验

I. 棒酸在焦虑的种籽寻找模型中的剂量反应

20 原理

棒酸 (CLAV) 在结构上与 β-内酰胺抗生素相似。筛选具有 CNS 活性的 β-内酰胺的最有效和简单的生物测定是金色仓鼠种籽寻找焦虑模型。简言之，将仓鼠禁食过夜。在接下来的一天，如下所述将它们暴露于另外的紧张下：把它们从其饲养笼子中取出了，并在新的环境中放几分钟。该操作刺激了紧张激素皮质醇的释放 (附图 37)。在它们不在饲养笼子期间，将向日葵籽隐藏在一个角落的褥草下面。当被放回

饲养笼子中时, 仓鼠通常沿着墙壁爬行 1-2 分钟后才平静下来、定居和吃种籽。然而, 用苯并二氮杂^革类抗焦虑剂利眠宁治疗的动物在不到 10 秒钟内找到了种籽。用拉氧头孢和其它 β -内酰胺抗生素治疗后, 找到种籽所用的时间也从数分钟降至数秒钟。

5

实验方案

将得自 Harlan Sprague-Dawley Laboratories (Indianapolis, IN) 的雄性叙利亚金色仓鼠 (*Mesocricetus auratus*) (120-130 g) 在有机玻璃笼子 (24 cm $\times$ 24 cm $\times$ 20 cm) 中单独饲养, 保持相反的光照: 10 黑暗循环 (14L: 10D; 在 19:00 点开始光照), 并提供食物和水让它们自由摄取。在 6 组仓鼠 (4-8/组) 中测试一系列浓度的 CLAV (盐水载体、0.1、1.0、10、100、1,000 ng/kg) (附图 25)。所有行为测试都是在暗淡的红色光照射下的 24 小时生理节奏循环的黑暗期进行的。在测试前, 将所有动物禁食 20-24 小时。腹膜内 (IP) 注射药物 90 分钟后, 15 将动物从其饲养笼子中取出了, 在临时笼子中放 2 分钟。在此期间, 把 6 粒向日葵籽埋藏在位于饲养笼子一个角落中的褥草下面。将动物随机地朝着任何一个空角落放回它们的饲养笼子中, 并在 5 分钟的观察期间内, 记录它们找到向日葵籽所花费的时间。依次用单向 ANOVA 和 Scheffe's 后 hoc 检验分析所记录的时间。检验假定的等方差 20 (Hartley's $F_{\max} = 2.1$ $p > .05$)。

结果

对于找到向日葵籽所花费的时间, 在剂量之间有显著差异 ($F_{(5, 30)} = 10.0$; $p < 0.0001$)。10 ng 及 10 ng 以上剂量的 CLAV 将找到向日葵 25 籽所花费的时间显著地 ($p < 0.01$) 减少至少于 8.0 秒, 而对于盐水载体, 找到向日葵籽所花费的时间平均为 104 秒。1 ng/kg 的剂量与载体对照没有显著差异。

总结

30 数据表明, 在该种籽寻找测试中, 以 10 ng/kg 体重剂量施用的 CLAV 具有最大效力。在这些实验中使用的成年雄性仓鼠的体重约为 125 g。因此, 给这些动物施用约 1.25 ng CLAV。CLAV 具有约为细胞

外体液体积的分布体积。瘦肉的细胞外水分含量约为 22%。1.25 ng CLAV 在 27.5 ml 水中的浓度为 0.045 ng/ml 或约 200 pM (CLAV 钾盐的分子量约为 240)。因为 CSF/血浆比例为 0.25, 所以估计在脑中的浓度为约 50 pM。

- 5 该种籽寻找焦虑模型似乎具有经验有效性 (McKinney 1989), 即用于治疗临床焦虑症的药物例如苯并二氮杂草在动物模型中是有效的。然而, 对于多种抗焦虑和无效的药物, 在使用种籽寻找焦虑模型之前, 必须进行筛选以评价假阴性和假阳性的发生率。因此, 需要在传统高架正迷宫中验证 CLAV 的抗焦虑活性。

10

II. 在高架正迷宫中测试棒酸

- 高架正迷宫是为了在大鼠中筛选抗焦虑以及焦虑诱导药物作用而开发的 (Pellow 等人, 1985)。已经在行为上、生理上、和药理上验证了该方法。正迷宫由两个开放的臂和两个封闭的臂构成。大鼠天生地
15 进入开放臂的倾向小于进入封闭臂的倾向, 并且在开放臂中停留的时间要少得多。与限制在封闭臂中相比, 限制在开放臂中会带来更明显的焦虑相关性行为以及更高的紧张激素水平。临床有效的抗焦虑药物例如利眠宁或安定显著地增加了在开放臂中停留的时间百分比以及进入开放臂中的次数。与之相反, 焦虑诱导药物例如可立宁或安非他明
20 会减少进入开放臂中的次数以及在臂臂中停留的时间。

实验方法

- 将重 250-300 g 的雄性 Wistar 大鼠成群地在标准 12:12 光照-黑暗循环(在早晨 8 点开始光照)中饲养, 并提供食物和水让其随意获得。正迷宫由 2 个开放臂构成, 开放臂长 50 cm, 宽 10 cm, 并具有高
25 40 cm、由干净的有机玻璃制成的壁。两个封闭臂具有相同尺寸, 但是具有顶盖。将封闭臂的有机玻璃漆成黑色。每对臂彼此相对排列以形成正迷宫。将迷宫提高至 50 cm 高度。给动物 IP 注射 1.0 μ g/kg CLAV、50 或载体对照(注射体积为 0.3 ml)90 分钟后, 在正迷宫中测试 18 只
30 动物。治疗顺序是等衡的, 注射间隔至少 48 小时。在实验开始时, 将动物放置在一个开放臂的末端。在 5 分钟的观察期间, 根据动物进入封闭臂的潜伏时间、在封闭臂中停留的时间、以及第一次进入封闭臂

后进入开放臂中的次数来评价动物。该实验产生重复测定表。依次用双向重复测定 ANOVA 和 Bonferroni 后 hoc 检验来比较治疗之间的数据。

5 结果

对于进入黑暗的潜伏时间，在治疗之间有显著差异 ($F_{(1, 18)} = 8.53$ $p < 0.01$)。当用 CLAV 治疗时 ($p < 0.05$)，动物在初始开发光位置停留的时间比用载体治疗的动物长 (附图 26)。对于在开放臂中停留的时间，治疗之间有非常显著的差异 ($F_{(1, 18)} = 144$; $p < 0.0001$) (附图 26)。

10 与载体相比，用 CLAV 治疗使得在开放臂中停留的时间显著延长 ($p < 0.01$)。对于进入开放臂中的次数，治疗之间有显著差异 ($F_{(1, 18)} = 44.0$ $p < 0.0001$)，与载体相比，用 CLAV 治疗 ($p < 0.01$) 使得进入光照的开放臂中的运动增加了 (附图 26)。

15 总结

这些数据表明，以 $1 \mu\text{g/kg}$ 剂量施用的 CLAV 在正迷宫中有抗焦虑活性。这些数据是激动人心的；然而，许多抗焦虑剂例如苯并二氮杂革会抑制运动原活动。因为用 CLAV 治疗的动物用了较长时间从有光照的开放臂中移动到黑暗、保护的封闭臂中，因此可能有人提出该 β -内酰胺化合物没有减轻焦虑，相反，其对动物有镇静作用并妨碍其运动。

20 为了验证这种可能性，需要在开放区域中测试 CLAV 对一般运动原活动的影响。

III. 在开放区域中的运动原活动

25 实验方案

进行完在第 II 节中描述的正迷宫测试后，立即在“开放区域”中测试动物的一般运动原活动。将动物置于大的、清洁的、没有任何褥草的有机玻璃笼子 ($48 \times 32 \times 40 \text{ cm}$) 中。通过在笼子下面的带子将该开放区域划分成相等的象限。通过计数 1 分钟内越过象限的次数来评价动物的运动原活动。在 CLAV 与载体治疗之间，开放区域活动方面没有任何显著差异 (附图 27)。

30

总结

在该开放区域测试中,没有任何证据表明 CLAV 抑制了运动原活动。在另一行为实验—第 VII 节中报道的胁腹标志证实这个发现。胁腹标志是仓鼠用来散播信息激素以进行嗅觉交流的复杂的刻板的运动原行为(附图 39)。胁腹标志不受 CLAV 治疗的影响。与更常规的苯并二氮杂草抗焦虑药物相比,该 β -内酰胺化合物具有不抑制运动原活动的优点。然而,CLAV 的抗焦虑活性能比得上临床处方药物苯并二氮杂草吗?

10 IV. 在正迷宫中的棒酸 vs 利眠宁

实验方案

利眠宁(Librium®)是常用的抗焦虑处方药物,其已经在临床前实验中进行过充分研究。在正迷宫中的有效抗焦虑剂量是 10–25 mg/kg (Lister 1987; File 和 Aranko 1988; Shumsky 和 Lucki 1994)。在该剂量范围内,利眠宁(CDP)是镇静剂并抑制运动原活动,从而使得需要运动的任何行为测定的解读很复杂(McElroy 等人, 1985)。然而,已发现,随着在几天内每天反复地施用 CDP,动物会对运动原抑制产生耐受(Shumsky 和 Lucki 1994)。因此在这些实验中,在开始实验前,每天给大鼠(n=6) IP 注射一次 CDP (10 mg/kg),注射 7 天。虽然 CLAV 对运动原活动没有任何影响,但是需要通过每天注射 CLAV (100 ng/kg) 来治疗等数量的大鼠以确保均衡的实验设计。此外,每天给第 3 组大鼠(n=6)注射盐水载体。使用第 II 节报道的实验,在正迷宫中测试 1 μ g/kg 剂量的 CLAV。得自第 I 节中报道的种籽寻找焦虑测定的数据表明,CLAV 应当在 10 ng–1 μ g/kg 的剂量范围内有效。出于该原因,在这些实验中,以 100 ng/kg 的剂量测试 CLAV。

结果

对于进入黑暗的潜伏时间,在治疗之间有显著差异($F_{(2, 15)} = 21.45$, $p < 0.001$)。与载体对照相比,用 CLAV 和 CDP 治疗的动物进入黑暗的封闭臂中的潜伏时间显著延长($p < 0.01$) (附图 28A)。对于在光照中停留的时间,治疗之间也有显著差异($F_{(2, 15)} = 17.14$, $p < 0.001$)。与载体对照相比,用 CLAV 和 CDP 治疗的动物暴露于开放臂中光照的时间也

显著延长($p < 0.01$) (附图 28A)。对于进入开放臂中的次数, 在治疗之间没有任何显著差异(附图 28B)。

总结

- 5 这些数据表明, 在高架正迷宫中, CLAV 和 CDP 具有类似的抗焦虑活性。然而, CLAV 具有更强的活性, 其在比 CDP 低 100,000 倍的剂量下有效。此外, CLAV 没有常规苯并二氮杂䓬类抗焦虑剂所具有的镇静、运动原抑制活性。CLAV 的抗焦虑作用是即时性的, 不需要发展出耐受性来实现行为效力。然而, 需要注意, 苯并二氮杂䓬类药物具有另一种
- 10 不需要的副作用, 对于这种副作用, 即记忆缺失没有产生任何耐受 (Shumsky 和 Lucki 1994)。例如, 安定 (Valium®) 选择性地削弱短期记忆, 并引起长期记忆缺乏 (Liebowitz 等人, 1987; Kumar 等人, 1987)。因此, 需要测试 CLAV 是否对学习和记忆有任何不良影响。

15 V. 在水迷宫中的棒酸和空间记忆

- Morris 水迷宫是为了测试空间记忆而开发的 (Morris, 1984)。将水池分成通常称为北、南、东和西的象限。用奶粉使水池中的水变得不透明。在一个象限中将平台隐藏在表面之下, 平台的作用是置于水池内的啮齿动物的逃脱途径。从多个不同起点将动物置于水池的某个
- 20 地方, 记录动物找到平台所用的时间, 在每个象限中停留的时间百分比, 行进的距离和游泳速度。在水池中动物没有任何视觉或空间线索, 并且必须依赖于迷宫外的线索, 即放在水池外可被游动的动物看见的物体。经过一系列试验, 大鼠发展了根据迷宫外线索找到平台位置的
- “位置学习”或知识。每天可将平台移到不同象限中, 以使空间记忆
- 25 与工作记忆结合起来。该方案涉及以前记忆的消退和解答新的空间问题。

1. 空间航行

方法

- 30 水迷宫由黑色的塑料环状水池构成, 直径约为 150 cm, 高约 54 cm, 填充了约 35 cm 水平的用奶粉变得不透明的水。将水池分成 4 个象限, 在西北象限的表面 2 cm 下浸没着一个直径为 10 cm 的平台。将

水维持约 25℃ 的温度。在水池周围有几个视觉线索。在水池上面是一个捕捉实验动物运动的录像机。使用 HVS Image (Hampton, UK) 开发的软件全自动地收集数据。在测试前, 使大鼠熟悉水池和置于西北象限中的平台。在连续 4 天中, 每天都将动物置于水池中的随机位点上, 5 并给它们 2 分钟来发现平台。在测试前 1 小时, 用 1.0 μg/kg CLAV (n=9) 或载体 (n=9) 治疗动物。熟悉了试验后, 测试动物的空间航行。测试开始的第二天, 平台在预期的西北象限中。在 2 分钟的观察期间内, 用录像机记录所有行为。将测试动物干燥后, 把它们放回到各自的饲养笼子中。在接下去的每一天, 将平台移动到新的象限中, 大鼠在不同位置开始。总是将大鼠置于水池中, 并朝着侧壁。对于 4 个象限中的每一个, 相对于平台的开始位点是不同的; 然而, 在每个象限, 平台总是在相同的相对位置。其位于距离水池侧面 20 cm 处, 并且在朝着中央的左边角。依次使用双向、重复测定 ANOVA 和 Bonferroni 后 hoc 检验来比较 CLAV 与载体治疗动物的找到隐藏平台所用的时间、路径长度、游泳速度、和象限时间。15

结果

对于发现平台所用的时间, 药物治疗 ($F_{(1,16)} = 4.17, p < 0.057$)、治疗天数 ($F_{(3,48)} = 0.51, p > 0.5$) 或因素间相互影响 ($F_{(3,48)} = 1.92, p > 0.1$) 没有任何显著影响 (附图 29)。然而, 在第 1 和 4 天, 用 CLAV 治疗的动物找到平台所用的时间较少, 并且有趋于显著的趋势。20

对于两种治疗 (附图 30A 和 B), 发现平台的方案与通过动物在每个象限中停留的时间百分比所判断的结果类似。对于任一象限, 在任一天, 治疗之间没有任何显著差异。对于在任何特定象限中停留的时间百分比, 在天数之间有显著差异 (例如 CLAV, 北面的象限, $F_{(3,32)} = 38.81, p < 0.0001$)。在某几天, 动物在一些象限中度过了大部分时间。例如, 在第 1 天, 相对于其它象限, 用 CLAV 和载体治疗的动物都在北面的象限中度过了其大部分时间 ($p < 0.01$)。这是可以预计到的, 因为它们已经通过熟悉过程了解了平台位于该象限中。25

对于通过动物在每个象限中停留的时间百分比表示的发现平台的状况, 虽然在 CLAV 和载体之间是类似的, 但是有小而明显的差异。与用载体治疗的动物相比, 用 CLAV 治疗的动物在正确的象限中度过了更30

长时间。在第2天,这种差异特别明显,用 CLAV 治疗的动物在正确(南面)的象限中度过了 50% 以上的时间 ($p < 0.01$)。用载体治疗的动物在正确的象限中度过了不到 40% 的时间,此时间与在其它象限中度过的时间无显著差异。在第4天,用 CLAV 和载体治疗的动物都在正确的象限(西面)中度过了大部分时间。在第4天,对于这两种治疗,该方案都表现出良好的空间、工作和程序记忆。

对于发现平台所经过的距离,治疗没有显著影响 ($F_{(1,16)} = 8.40$, $p > 0.01$)。在第1天,在寻找平台期间用 CLAV 治疗的动物游动的距离比用载体治疗的动物短 ($p < 0.05$) (附图 31)。对于游泳速度,在 CLAV 与载体之间没有任何显著差异(附图 32)。

2. 线索航行

方法

在空间航行最后一天(第4天)的下一天,测试动物的线索航行。在这些测试中,将平台升至水面以上。测试前一小时,用 CLAV 或盐水载体治疗动物。对于线索航行,在空间航行期间用 CLAV 治疗的动物也用 CLAV 治疗。给动物进行一系列 2 分钟的试验,试验间隔 45 分钟。对于每个试验,将平台移至不同象限。线索航行实验与空间航行相同,除了平台是可以看见的,并且在一天内,测试是进行 5 个连续试验。在所有测试期间,记录动物找到平台所用的时间、在每个象限停留的时间百分比、游动的距离以及游泳速度。

结果

在线索航行期间,对于找到平台所用的时间,治疗 ($F_{(1,16)} = 0.553$, $p > 0.1$)、试验 ($F_{(4,64)} = 0.9745$, $p > 0.1$) 或因素间相互影响 ($F_{(4,64)} = 0.7433$, $p > 0.5$) 没有任何显著影响(附图 33)。

就象空间航行中一样,对于两种治疗(附图 34A 和 B),发现平台的方案与通过动物在每个象限中停留的时间百分比所判断的结果非常类似。对于任一象限,在任一个试验,治疗之间没有任何显著差异(例如试验 1,北面的象限, $F_{(1,16)} = 0.099$, $p > 0.5$)。在大多数试验中,对于任一治疗,在任何特定象限中停留的时间百分比有显著差异,尤其是 CLAV 最明显。

对于发现平台所游动的距离,在用 CLAV 与载体治疗的动物之间没有显著差异 ($F_{(1, 16)} = 0.23$ $p > 0.5$) (附图 35)。虽然治疗对游泳速度没有任何显著重要影响 ($F_{(1, 16)} = 0.926$, $p > 0.1$), 但是有显著的试验影响 ($F_{(4, 64)} = 7.87$, $p < 0.001$) 和因素间相互影响 ($F_{(4, 64)} = 2.56$, $p < 0.05$)。在试验 4 ($p < 0.01$) 和试验 5 ($p < 0.05$), 两种治疗, 特别是 CLAV 治疗都表现出降低的游泳速度。这可能反映了这样的事实, 它们知道了在哪儿寻找如附图 34A 和 B 所示的平台。

总结

10 当在 Morris 水迷宫中进行空间和线索航行测试时, 用棒酸治疗的动物没有表现出减弱学习和记忆。实际上, 在空间和线索航行中, 对于找到隐藏平台所用的时间、和在正确平台中度过的时间百分比, 与载体相比, 用 CLAV 治疗的动物表现出更好的表现。这些数据表明, CLAV 的抗焦虑作用不伴有干扰学习和记忆 (苯并二氮杂䓬抗焦虑剂伴有这种不利作用)。

作用机制实验

VI. 棒酸和紧张反应

20 原理

在紧张状态下, 即在种籽发现测定中不给予食物并置于新的环境中, 和在高架正迷宫中暴露于光照且新的环境中, 而不改变运动元活性或认识功能, CLAV 能够减轻焦虑是重要发现。如果我们对其作用机制有更清楚的了解, 可拓宽 CLAV 作为抗焦虑剂以及治疗多种情感障碍的治疗应用。例如, CLAV 能通过抑制天然紧张反应来改变焦虑吗? 常规处方药物苯并二氮杂䓬类抗焦虑剂既阻断激素皮质醇的正常 24 小时生理节奏释放, 也阻断紧张介导的皮质醇释放 (Gram 和 Christensen, 1986; Petraglia 等人, 1986; Hommer 等人, 1986)。

30 实验方案

将成年雄性仓鼠在新环境中放置 5 分钟会引起显著的、可预测到的皮质醇血液水平增加 (Weinberg 和 Wong 1986)。使用该新测试来评

价 CLAV 对紧张引起的皮质醇释放的影响。IP 施用 CLAV ($10 \mu\text{g/kg}$, $n=6$) 或盐水载体 ($n=4$) 来治疗 2 组雄性仓鼠。使用不接受任何治疗或隔离紧张的第 3 组 ($n=4$) 作为基础水平皮质醇的对照。治疗 60 分钟后, 将动物从其饲养笼子中取出了, 并在新的笼子中放置 5 分钟。通过断头术处死动物, 收集躯干的血液来放射免疫测定皮质醇。在相反的光照: 黑暗条件下测试所有动物 4 小时, 然后进入黑暗循环。依次用单向 ANOVA 和 Fisher PLSD 后 hoc 检验来比较数据。

结果

对于皮质醇的紧张释放, 在治疗之间有显著差异 ($F_{(2, 11)} = 10.03$, $p < 0.01$)。与未治疗的未诱导紧张的对照相比, 载体 ($p < 0.05$) 与 CLAV ($p < 0.01$) 表现出 2 倍的皮质醇血液水平 (附图 37)。

总结

数据表明, β -内酰胺抗焦虑剂 CLAV 对由于暴露于新环境中产生轻度紧张而释放的皮质醇不具有任何表面影响。该详情与没有运动原抑制和认知损害结合在一起, 使得 CLAV 成为独特的抗焦虑剂, 并提出了一种高度特异性的新的作用机制。初看起来, 有人可能认为抑制紧张反应是有利的。实际上, 有人提出肾上腺皮质机能亢进与抑郁症的病理生理有关 (Sacher 等人, 1973)。导致肾上腺机能障碍、活动过强的长期精神紧张可危及生命。然而, 反应性下丘脑-垂体-肾上腺轴对于正常生理和行为是至关重要的。如果不适当地释放皮质醇, 通常辅助动物适应环境的紧张性刺激可能是致命的。

VII. 领土或攻击性侵略行为 原理

在更复杂的行为模型中继续研究 CLAV 的 CNS 活性可有助于弄清楚其作用机制。例如, 动物之间的敌对社会相互作用需要冒险的评定、交流和激动行为来解决领土、配偶、食物等的纠纷。神经递质血清素和后叶加压素是动物和人体中 CNS 组织以及表现这些行为的基本物质 (Ferris 等人, 1997; Coccaro 等人, 1998; Ferris 2000)。为此, 测试 CLAV 对领土或攻击性侵略行为, 即防卫居所不被侵入者侵犯的影

响。

激动行为可分为攻击性或防卫性侵略行为 (Blanchard 和 Blanchard, 1977; Adams, 1978; Albert 和 Walsh, 1984)。攻击性侵略行为的特征是, 侵略者向对手发起攻击, 而防卫性侵略行为缺少主动接近。这两种侵略行为都有它们各自独特的神经行为系统。引起攻击性和防卫性攻击的刺激是不同的, 因为它们是伴随每一激动反应的行为后果。虽然已经由动物模型收集了支持独特攻击性和防卫性神经网络概念的大量经验数据, 但是在人侵略行为中有值得关注和令人感兴趣的类似性, 这表明有类似神经组织 (Blanchard, 1984)。攻击性侵略行为易于使用以居住/侵入式样测试的雄性金色仓鼠——一种在防卫居所概念上建立的攻击性侵略行为模型来进行 (Ferris 和 Potegal 1988)。将不熟悉的雄性仓鼠置于另一雄性仓鼠的饲养笼子中, 引起居住仓鼠的明确的激动行为, 包括攻击性侵略行为。

15 实验方案

仓鼠是夜间活动动物, 因此所有行为测试都是在暗淡的红色光照射下的黑暗期的前 4 个小时进行。记录居住动物的攻击性侵略行为, 例如咬侵入者的潜伏时间, 咬的总次数, 与侵入者接触的总时间, 和在 10 分钟测试期间的胁腹标志 (Ferris 和 Potegal, 1988)。胁腹标志是嗅觉交流的形式, 其中仓鼠拱起其背部, 并靠着环境中的物体摩擦产生性外激素的胁腹腺 (Johnson, 1986)。在攻击性遭遇期间, 胁腹标志频率大大增加, 并且在发起并赢得战斗的优性动物中特别显著 (Ferris 等人, 1987)。

给 5 只雄性金色仓鼠 (130-140 g) IP 注射 CLAV (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 和盐水载体 (体积约为 0.2 ml)。在小规模实验中, 发现以 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ IP 施用的 CLAV 对侵略行为没有任何影响。因此需要在较高浓度测试 CLAV, 但是该浓度在仍然是侵略行为药理实验所能接受的剂量范围内。载体和 CLAV 治疗是等衡和随机的, 所有这 5 只动物接受间隔至少 48 小时的每种治疗。治疗 90 分钟后, 在 10 分钟的观察期间内测试动物。用双向 ANOVA 分析潜伏时间和接触时间。通过 Wilcoxon 匹配对有正负号排序的检验来来分析非参数数据, 即咬的次数和胁腹标志。

结果

对于咬侵入者的潜伏时间，虽然药物治疗没有任何显著的主要影响 ($F_{(1, 3)} = 7.40$, $P < 0.07$)，但是有趋于显著的趋势(附图 38)。对于与侵入者接触的时间，药物治疗没有任何显著的主要影响 ($F_{(1, 3)} = 2.85$, $p > 0.1$) (附图 38)。对于咬侵入者的次数，在药物治疗之间有显著差异 ($T = 3.0$, $p < 0.05$, $N=8$)。对于用载体治疗的动物，咬的平均次数为 13 次，而用 CLAV 治疗使得咬的平均次数降至 6 次(附图 39)。对于居住动物的胁腹标志行为，药物治疗没有任何显著影响 ($T = 4.0$, $p > 0.1$, $N=5$) (附图 39)。

10

总结

棒酸具有较小程度的抗侵略行为或 serenic-样特性。Serenic 是用于治疗冲动和暴行的药物 (Olivier 和 Mos, 1991)。Serenic 应该抑制攻击性侵略行为，同时不干扰社会、食欲和认知行为。CLAV 没有改变对侵入者的社会兴趣，即接触时间。eltoprazine——一种第一代 serenics 的开发之所以被放弃了，部分是因为据发现其能增加动物的恐惧和焦虑 (Olivier 等人, 1994)。CLAV 的强效抗焦虑活性不包括这种可能性。

20 VIII. 与谷氨酰基羧肽酶的相互作用

CLAV 对 β -内酰胺酶有非常高的结合亲和力。有人假定存在着这些细菌酶的哺乳动物同源物，并且这些同源蛋白参与 CNS 中神经递质水平的调控。已经克隆了大肠杆菌 TEM β -内酰胺酶并测定了其序列，还结晶了这些酶并测定了其活性位点基元。根据这些数据，已设计了可适应 CLAV 的四种在 β -内酰胺酶上的公认结合位点，即活性位点 I、II、III 和 IV。这些活性位点、序列位置以及氨基酸 (AA) 序列如下所述：

活性位点 I:

从 N-末端开始计的上游的 35 AA's: STTK

30 活性位点 II:

从 STTK 基元开始计的上游的 57 AA's: SGC、SGN、或 SAN

活性位点 III:

从 SGC 基元开始计的上游的 111 AA' s: KTG

活性位点 IV:

从 SGC 基元开始计的上游的 41 AA' s: ENKD

- 5 通过筛选在这些 β -内酰胺酶结合位点与哺乳动物酶之间的氨基酸序列同源物, Revaax 科学家在脑中鉴定了 CLAV 能以类似于结合 β -内酰胺酶的方式结合的酶系统。该酶谷氨酰基羧肽酶(N-乙酰基, α 连接, 酸性二肽酶)或 NAALAD 酶 (Pangalos 等人, 1999)有调节谷氨酸能神经传递路径的作用, 预计其作用表现为诸如侵略行为、记忆/认知、以及焦虑的行为后果。因为 β -内酰胺酶的公认的活性位点与人和大鼠 NAALAD 酶中的保守序列几乎完全重叠, 所以猜测 CLAV 是通过抑制 NAALAD 酶活性而影响行为的。 β -内酰胺酶与 NAALAD 酶之间的重叠序列类似性如下所示:

- 15 活性位点 I:

β -内酰胺酶: 从 N-末端开始计的上游的 35 AA' s: STTK

NAALAD 酶: 从 N-末端开始计的上游的 38 AA' s: STQK

活性位点 II:

β -内酰胺酶: 从 STTK 基元开始计的上游的 57 AA' s: SGC、SGN、或 SAN

- 20 NAALAD 酶: 从 STQK 基元开始计的上游的 59 AA' s: SFG

活性位点 III:

β -内酰胺酶: 从 SGC 基元开始计的上游的 111 AA' s: KTG

NAALAD 酶: 从 SFG 基元开始计的上游的 110 AA' s: KLG

活性位点 IV:

- 25 β -内酰胺酶: 从 SGC 基元开始计的上游的 41 AA' s: ENKD

NAALAD 酶: 从 SFG 基元开始计的上游的 41 AA' s: ERGV

- 30 棒酸以 15-34 nM 的浓度抑制革兰氏阴性 β -内酰胺酶, 而在种籽寻找焦虑模型中 CLAV 在 10 ng/kg 的剂量有效(pg 3)。如果 NAALAD 酶是与 β -内酰胺酶同源的人体酶, 则预计 CLAV 是高亲和性底物。

IX. 阻断 NAALAD 酶活性后的种籽寻找

原理和实验方案

假定在种籽寻找测定中 CLAV 是通过阻断脑中 NAALAD 酶活性而起抗焦虑作用的。如果该观念是正确的，则预计已知能阻断 NAALAD 酶的药物应当也能提高种籽寻找能力。为此，用 N-乙酰基- β -天冬氨酰基-谷氨酸 (β -NAAG)——一种竞争性 NAALAD 酶抑制剂 (Serval 等人, 1992) 治疗动物，并在种籽寻找焦虑模型中测试。除了一个显著的不同外，该实验与在第 I 节中描述的实验类似。因为 β -NAAG 不易于穿越血脑屏障，必须将其直接注射到侧脑室中，在侧脑室中其经由脑室系统被脑脊液携带着分布在脑中。在体积为 1 μ l 的盐水 ICV 中给予 3 ng 剂量的 β -NAAG (FW 304)。成年仓鼠脑重量平均为约 1.2 g，其中 22% 是细胞外液体。估计 β -NAAG 浓度为 11 ng/ml 或 36 nM。

如上所述分别将两组、每组 6 只动物禁食过夜，在接下来的一天测试。一组用 β -NAAG 治疗，另一组用盐水载体治疗，1 小时后，记录找到隐藏的向日葵籽所用的时间。使用用于未配对数据的 Student t-检验来进行统计学比较。

结果

对于找到向日葵籽所用的时间，在治疗之间有显著 ($p < 0.001$) 差异 (附图 40)。实际上，在微注射盐水载体的 6 只动物当中，没有一只在 5 分钟的观察期间内找到了向日葵籽。然而，3 天后，当给这些相同动物微注射 β -NAAG (3 ng/ μ l) 并测试种籽寻找时，它们找到向日葵籽所用的时间平均为 21.8 ± 9.7 秒。

总结

这些数据表明， β -NAAG——一种特异性 NAALAD 酶抑制剂可显著地减少找到隐藏的向日葵籽所用的时间——CLAV 也具有这样的生物活性。因为 β -NAAG 在种籽寻找焦虑模型中有活性，所以关于 β -NAAG 与 CLAV 具有相同作用机制的假定不能被否认。根据这些数据，可将该假定延伸，以预测 β -NAAG 和 CLAV 对一系列生物和行为指标表现出类似影响。为此，在如第 VII 节所述的居住动物侵入者模型中测试动物的攻击性侵略行为。如上所述，当以高浓度施用，CLAV 仅对攻击行为起较小程度影响。虽然 10 ng/kg 剂量的 CLAV 可提高种籽寻找能力，但是其在

高达 200 $\mu\text{g/kg}$ 的剂量下对攻击性侵略行为仅有较小程度影响。如果 $\beta\text{-NAAG}$ 和 CLAV 具有相同作用机制, 则 $\beta\text{-NAAG}$ 应当对侵略行为有小的影响或者没有影响。

5 X. NAALAD 酶阻断攻击性侵略行为的作用

实验方案

在该实验中测试的动物是在第 IX 节中使用的动物。种籽寻找测定结束后, 将 $\beta\text{-NAAG}$ ($n=6$) 和盐水载体 ($n=6$) 治疗的动物保持在其饲养笼子中, 并放入较小的雄性侵入者。在 10 分钟观察期间内, 记录居住动物的咬的潜伏时间、咬的次数、接触时间和胁腹标志。用 Student t -检验比较治疗之间的咬的潜伏时间和接触时间。用 Mann-Whitney 比较 $\beta\text{-NAAG}$ 与载体的非参数指标咬的次数和胁腹标志。

结果

15 对于攻击性侵略行为的任何指标, 在 $\beta\text{-NAAG}$ 与载体治疗的动物之间都没有任何显著差异(附图 41 和 42)。

总结

20 从在居住动物侵入者模型中测定的结果可看出, 用 $\beta\text{-NAAG}$ 阻断 NAALAD 酶活性没有改变攻击性侵略行为。该发现与小时观念是一致的: 即 CLAV 和 $\beta\text{-NAAG}$ 具有相同机制——阻断 NAALAD 酶活性。

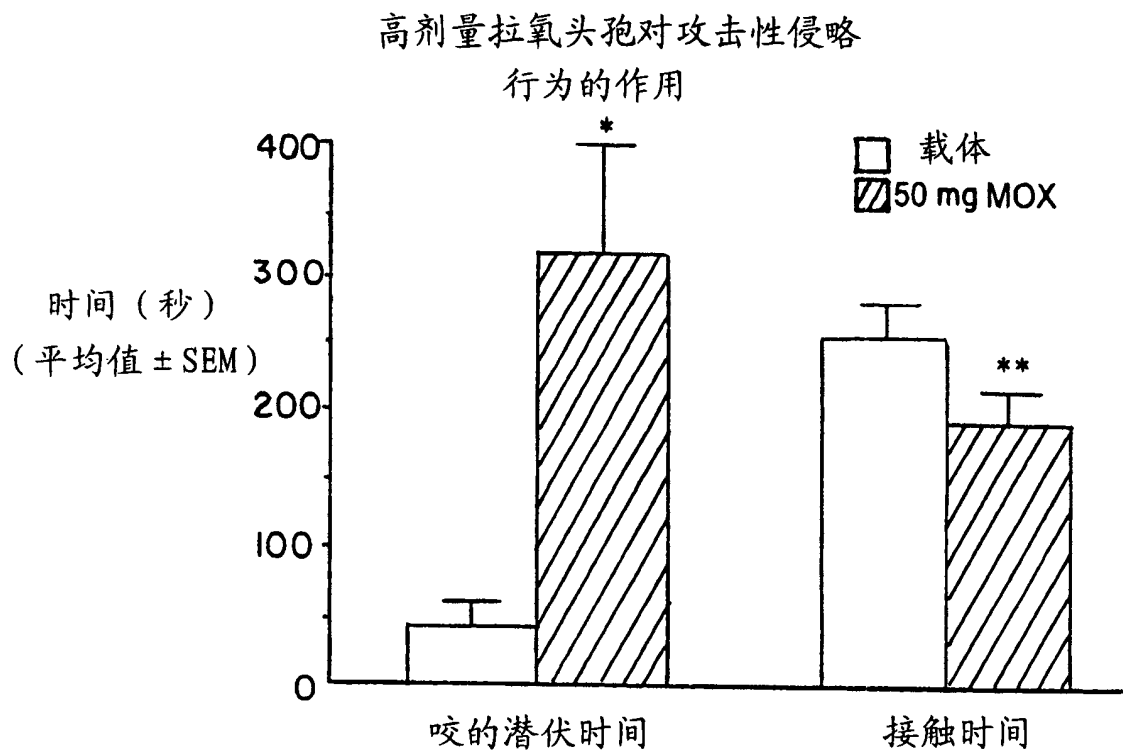


图 1a

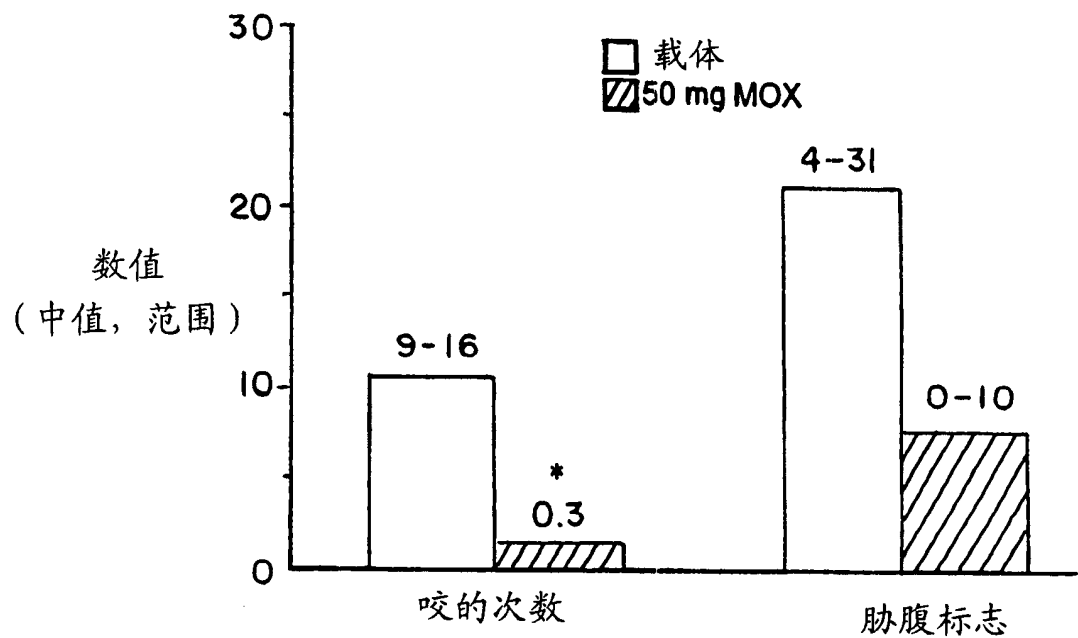


图 1b

拉氧头孢对攻击性侵略行为的剂量
依赖性作用

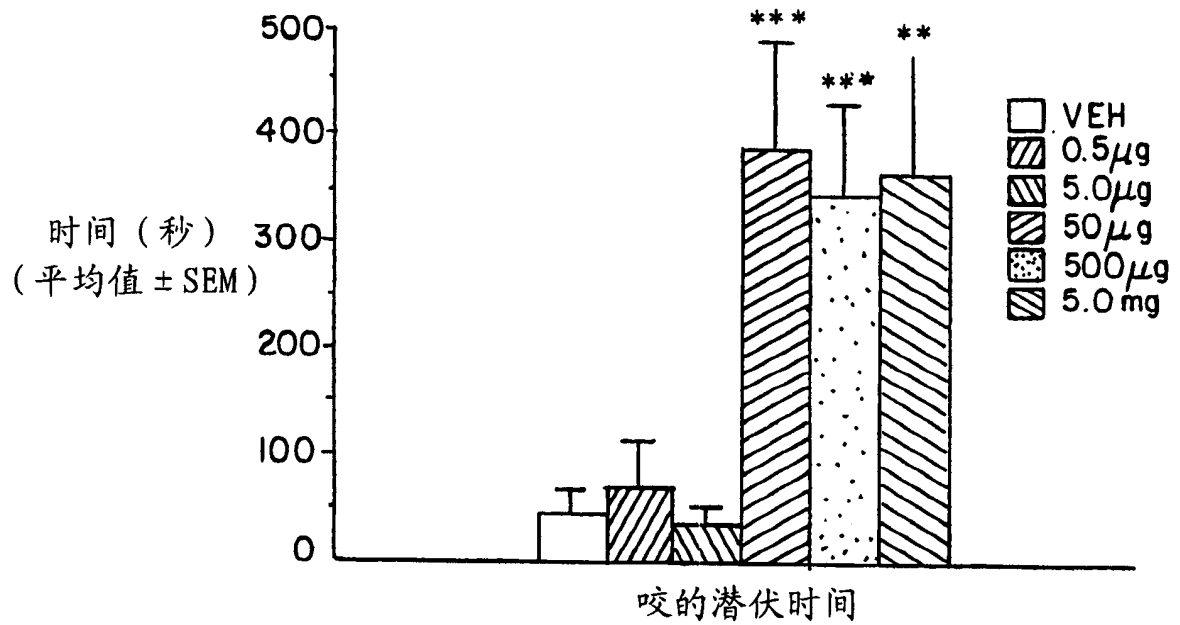


图 2a

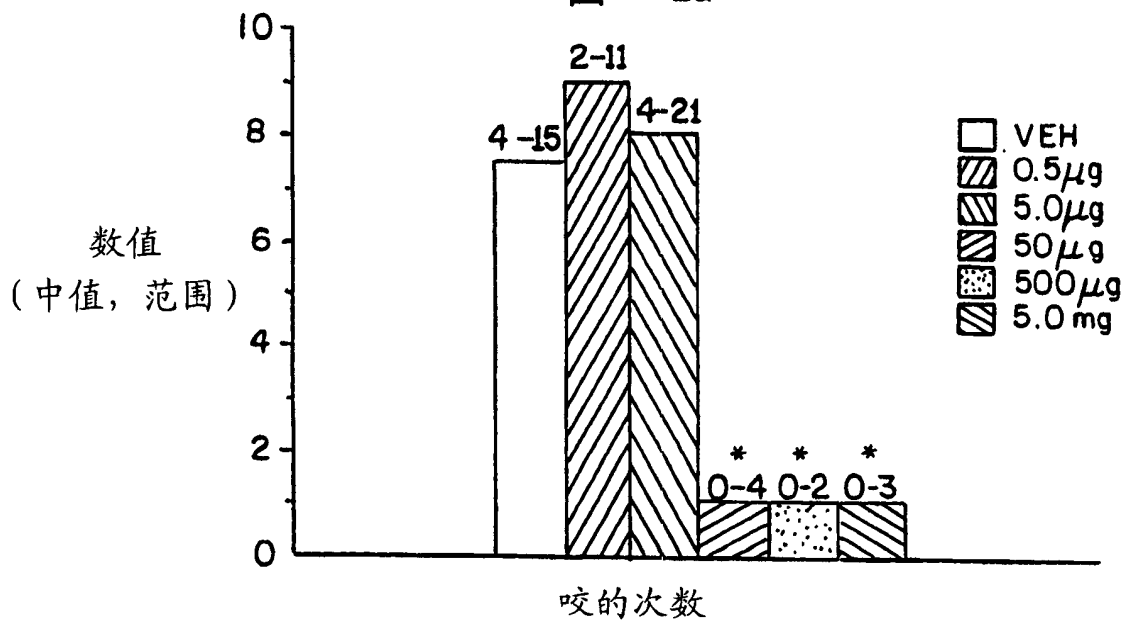


图 2b

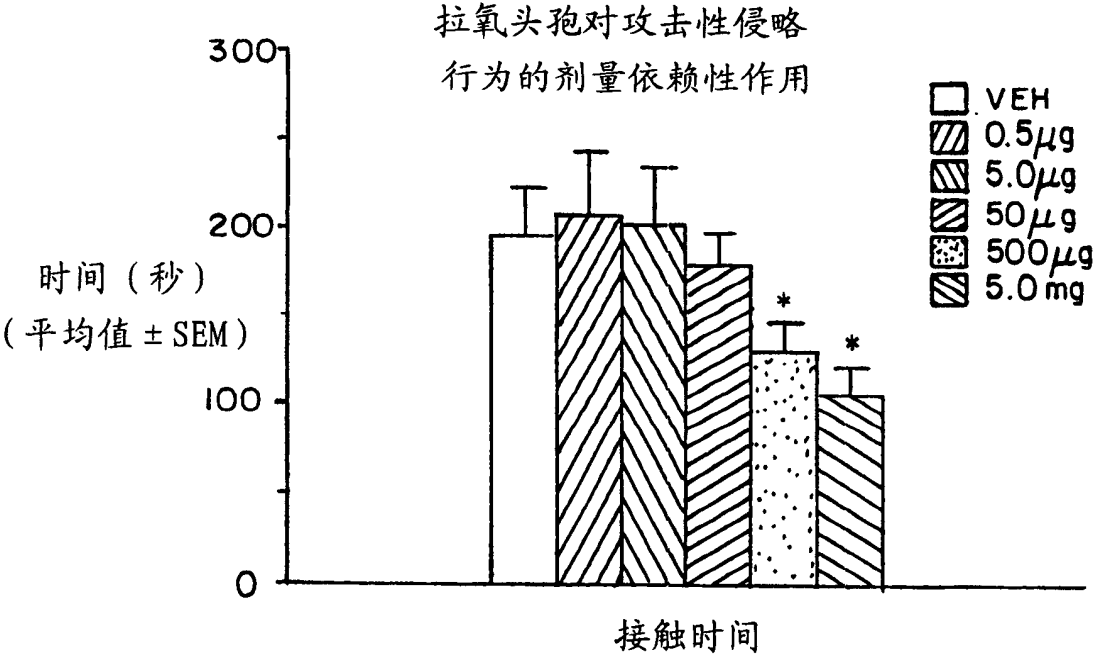


图 3a

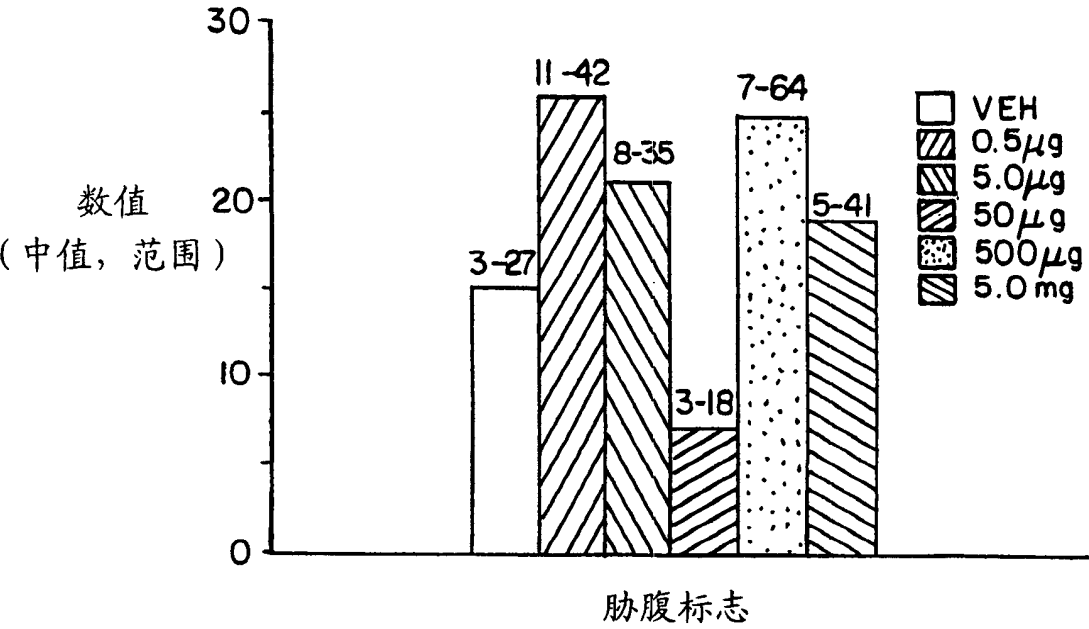


图 3b

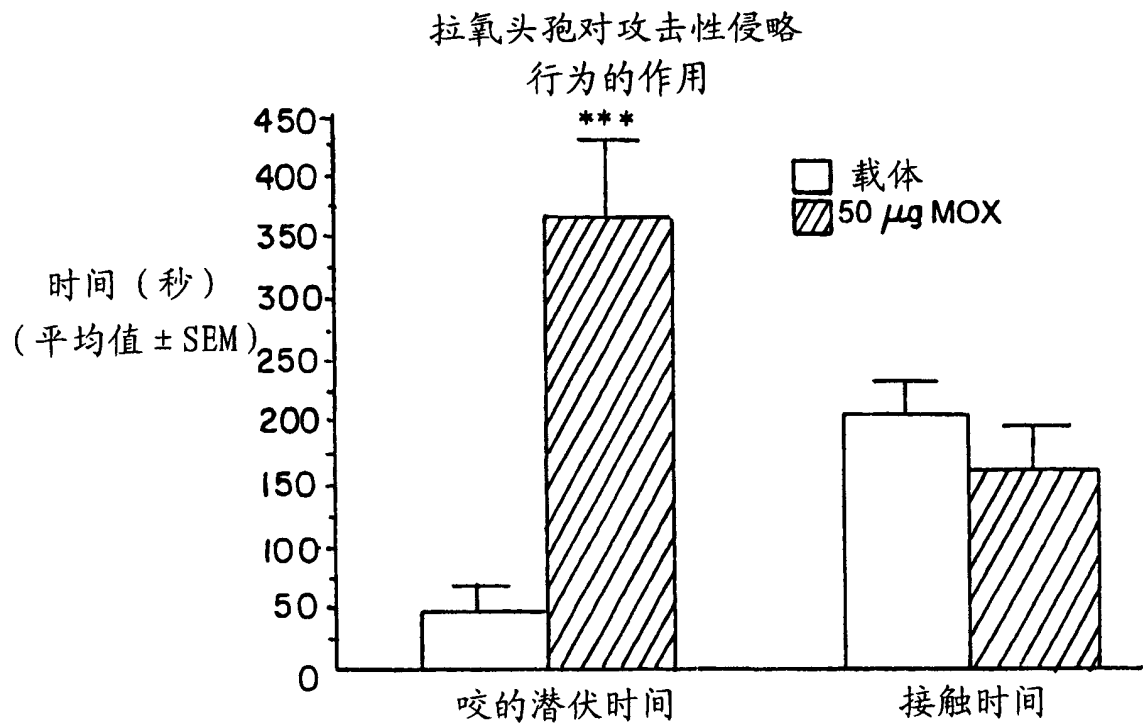


图 4a

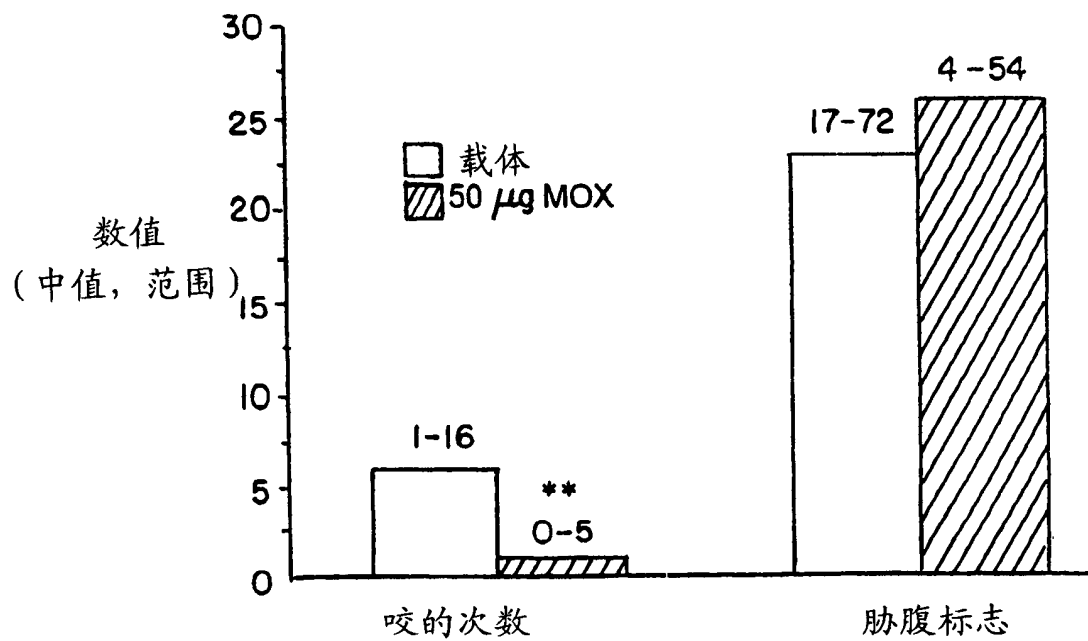


图 4b

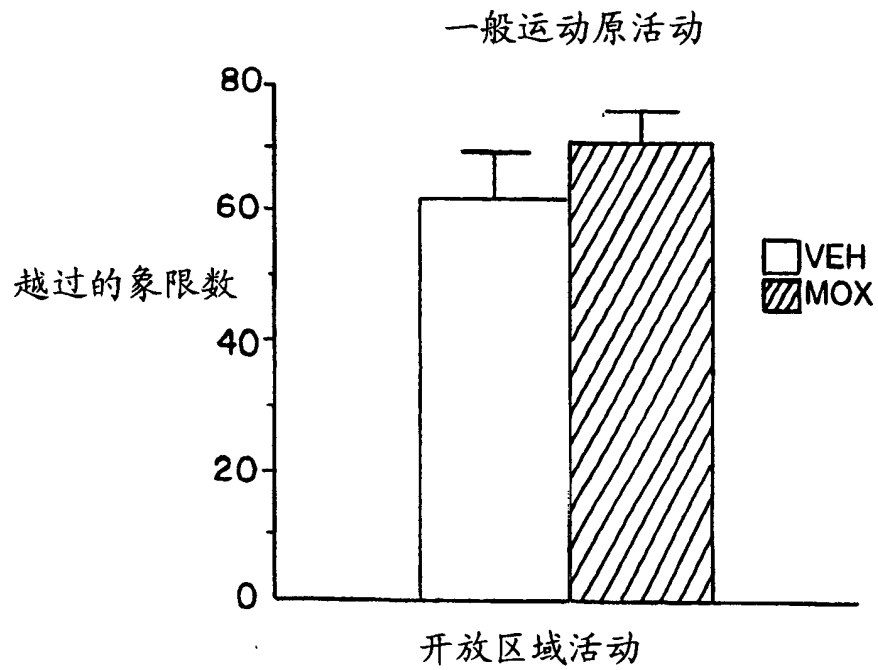


图 5a

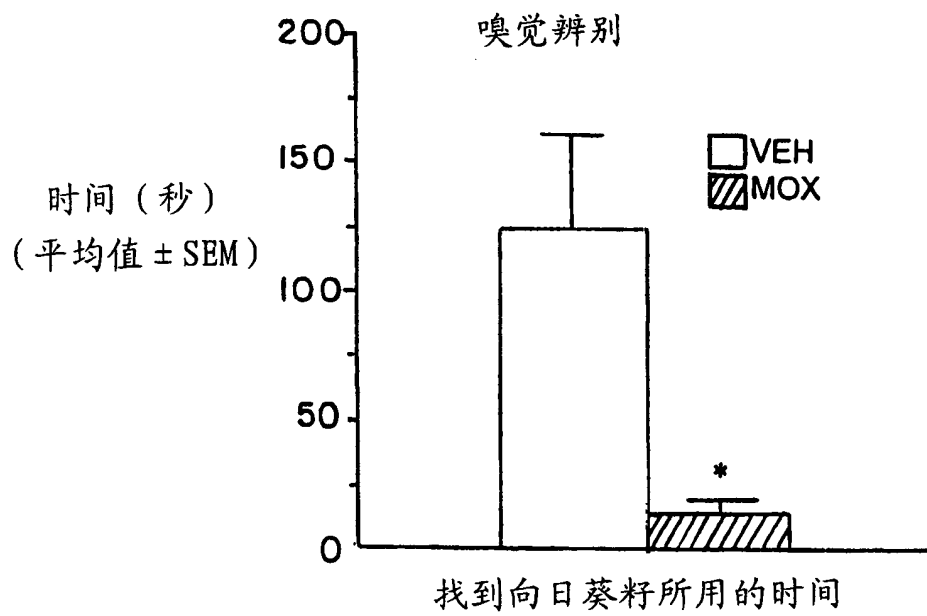


图 5b

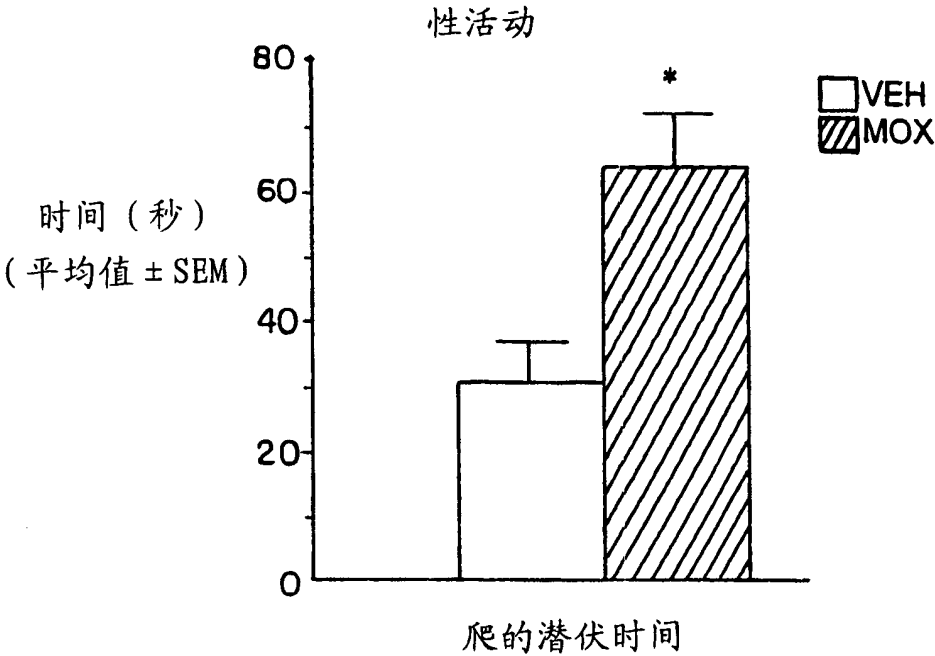


图 6a

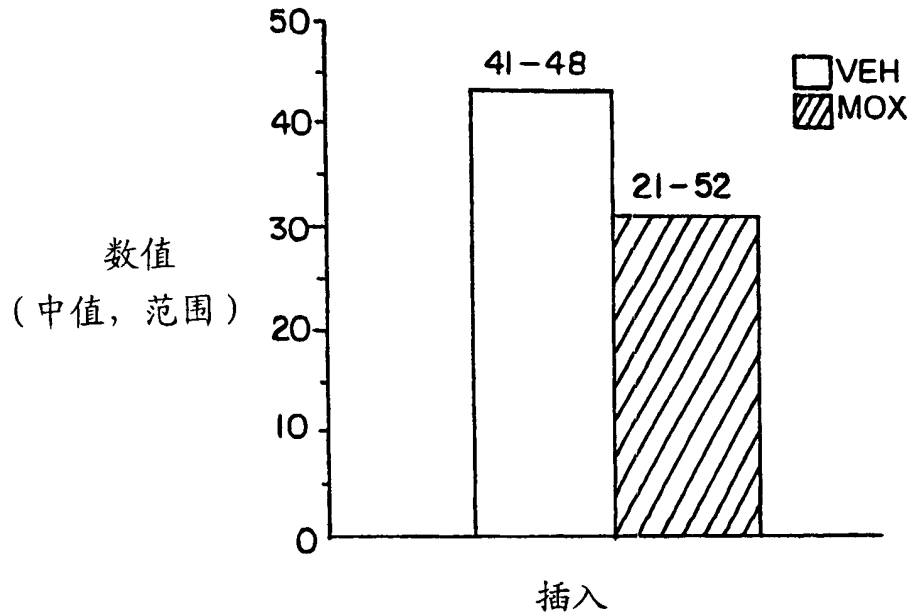


图 6b

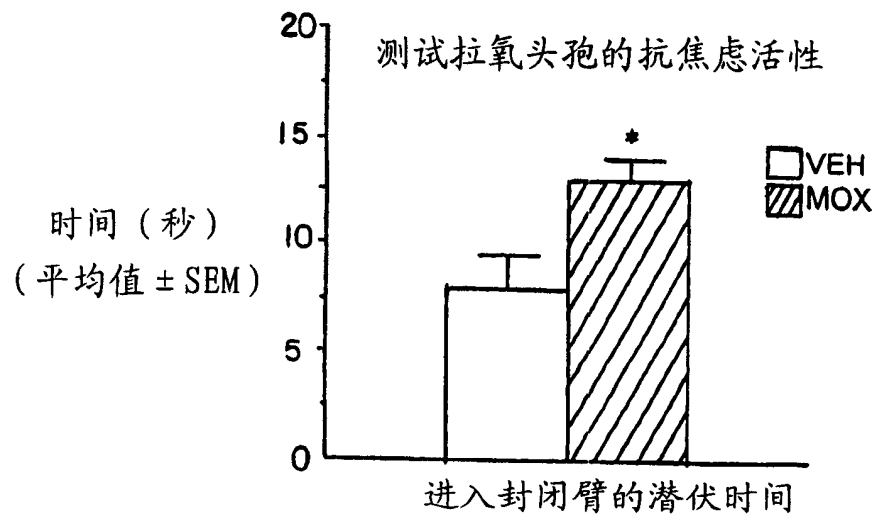


图 7a

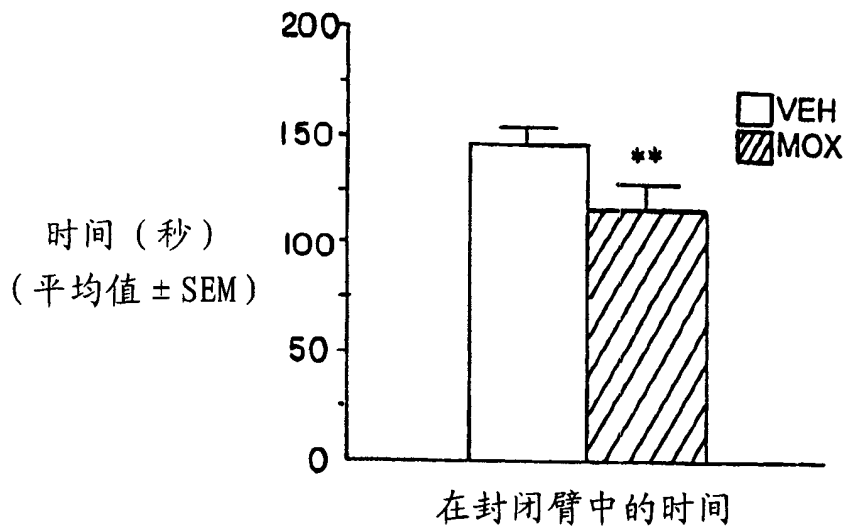


图 7b

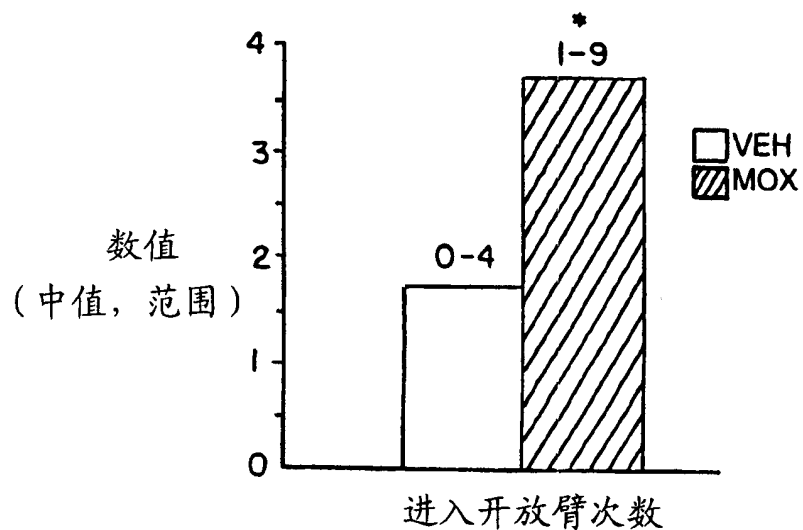


图 7c

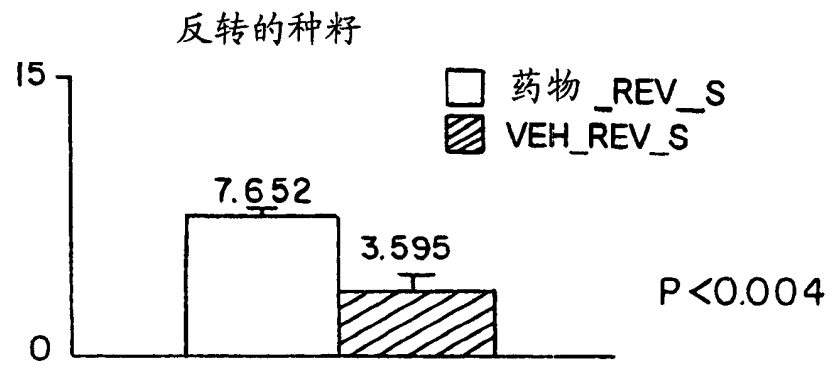


图 8a

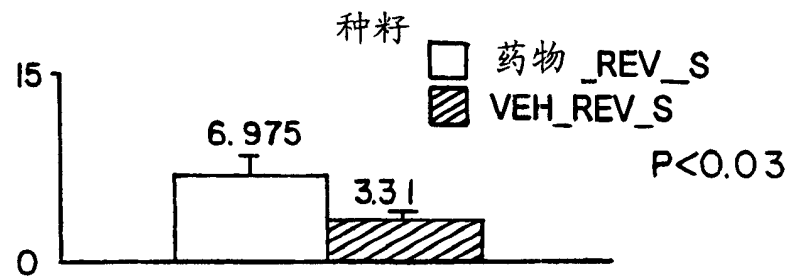


图 8b

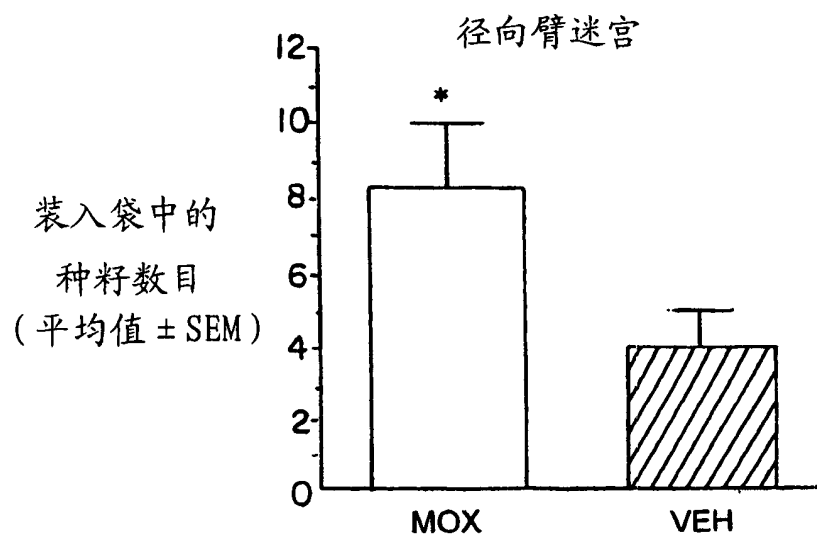


图 8c

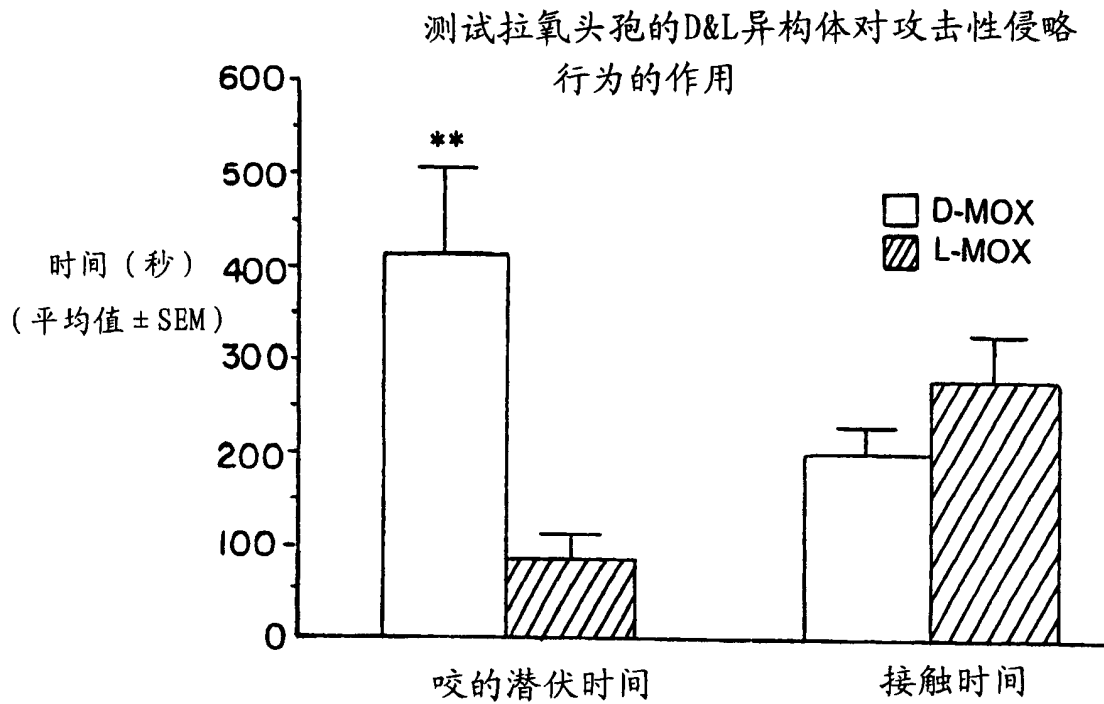


图 9a

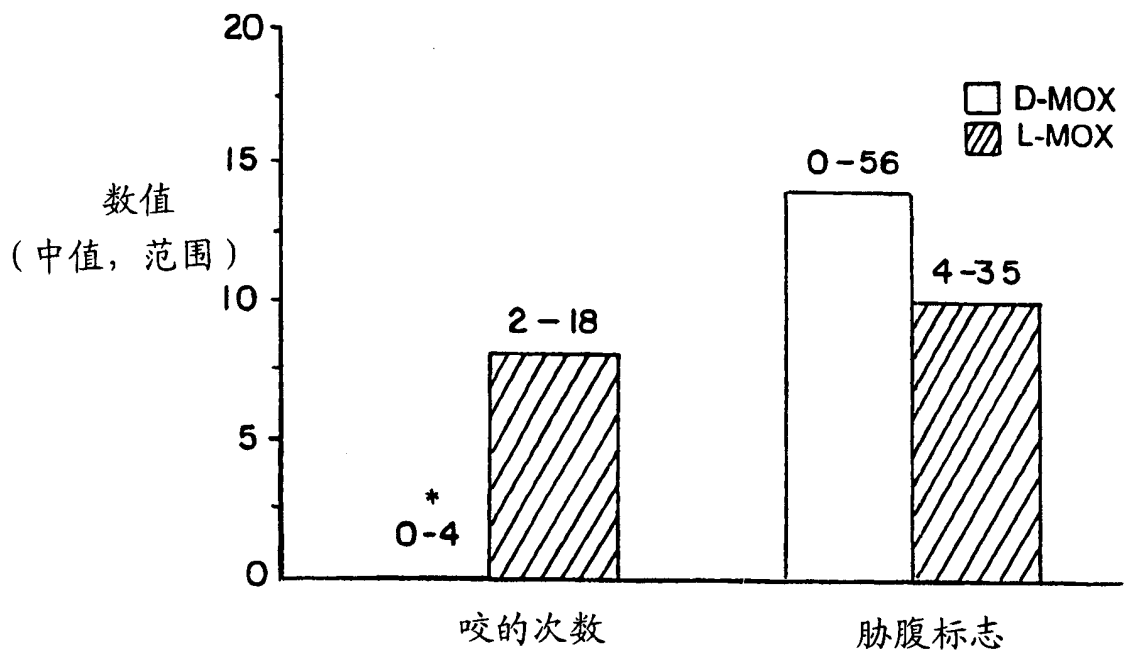


图 9b

β-内酰胺类抗生素对攻击性侵略行为的作用

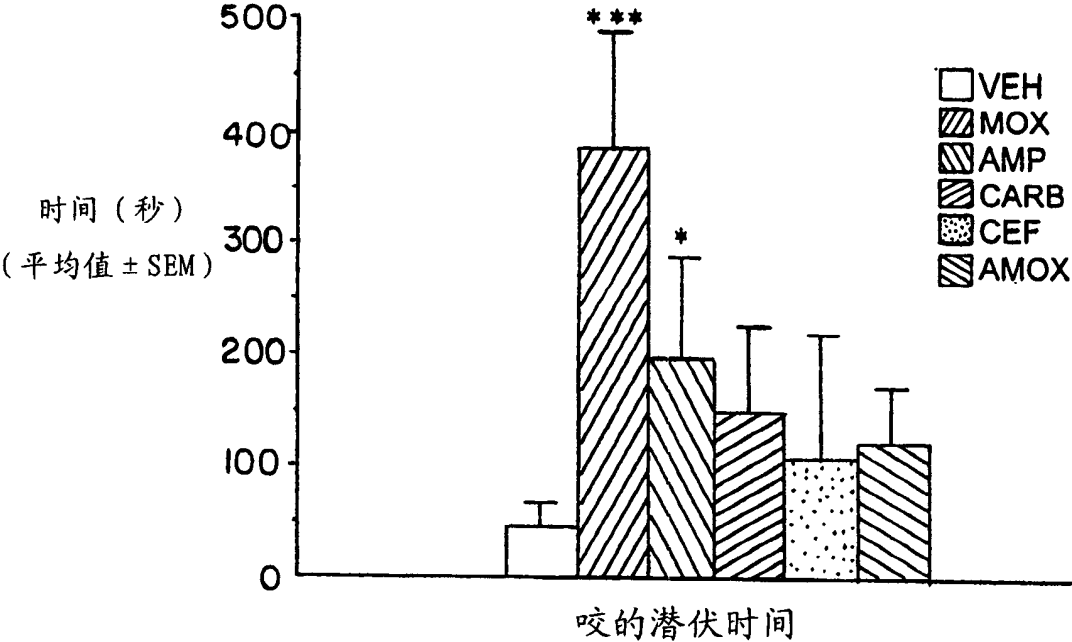


图 10a

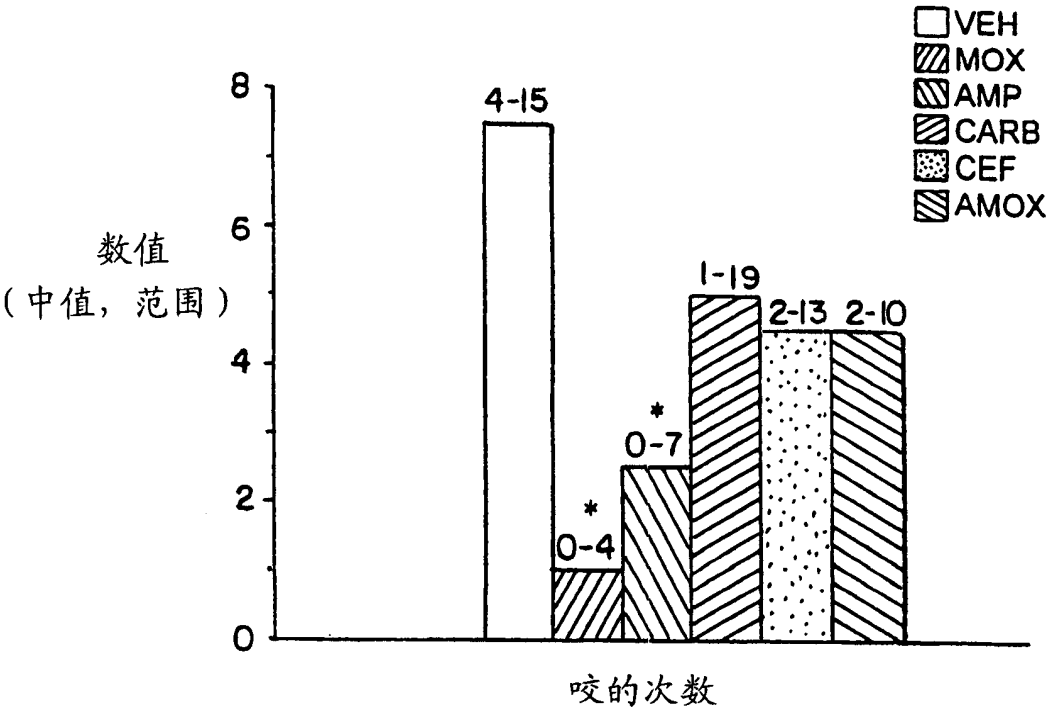


图 10b

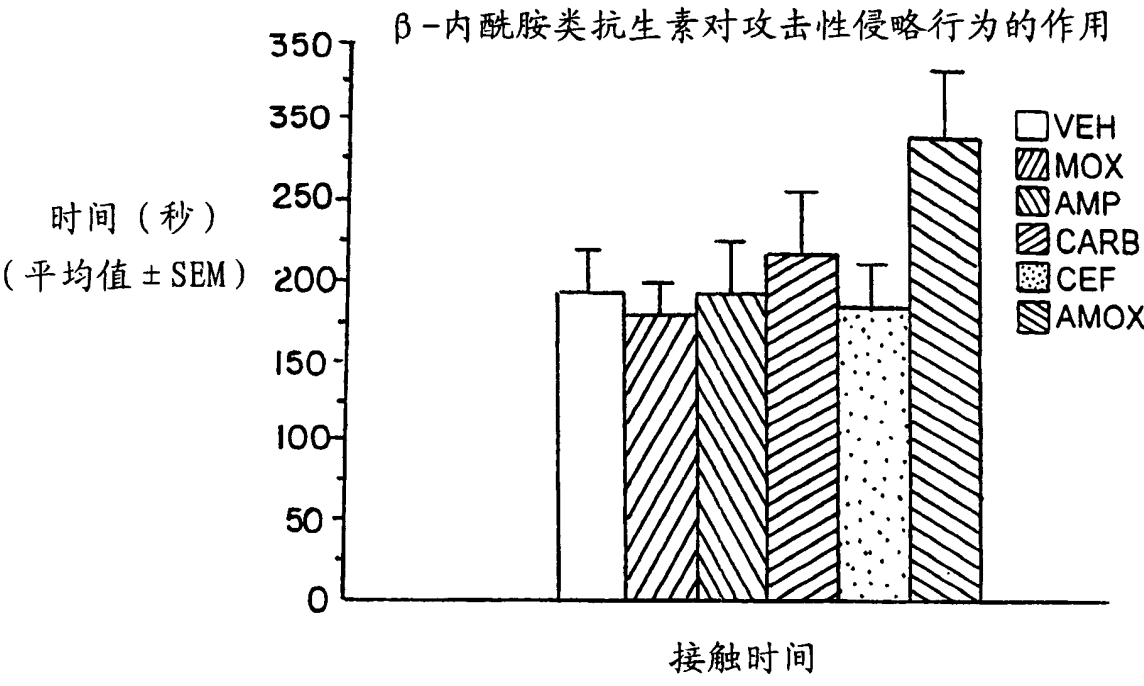


图 11a

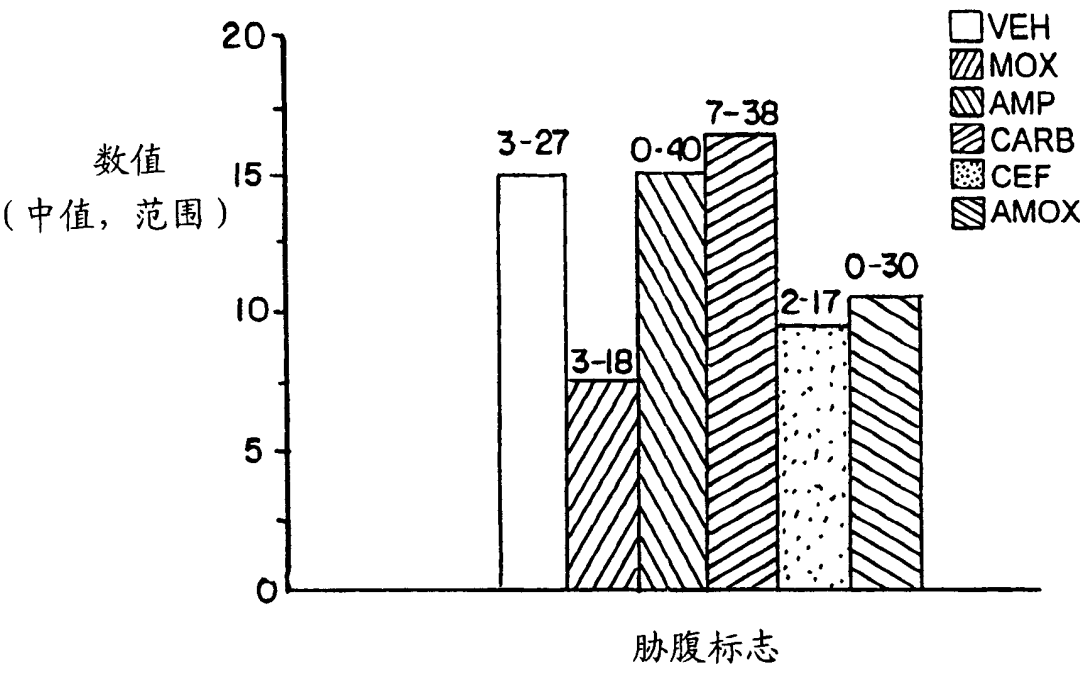


图 11b

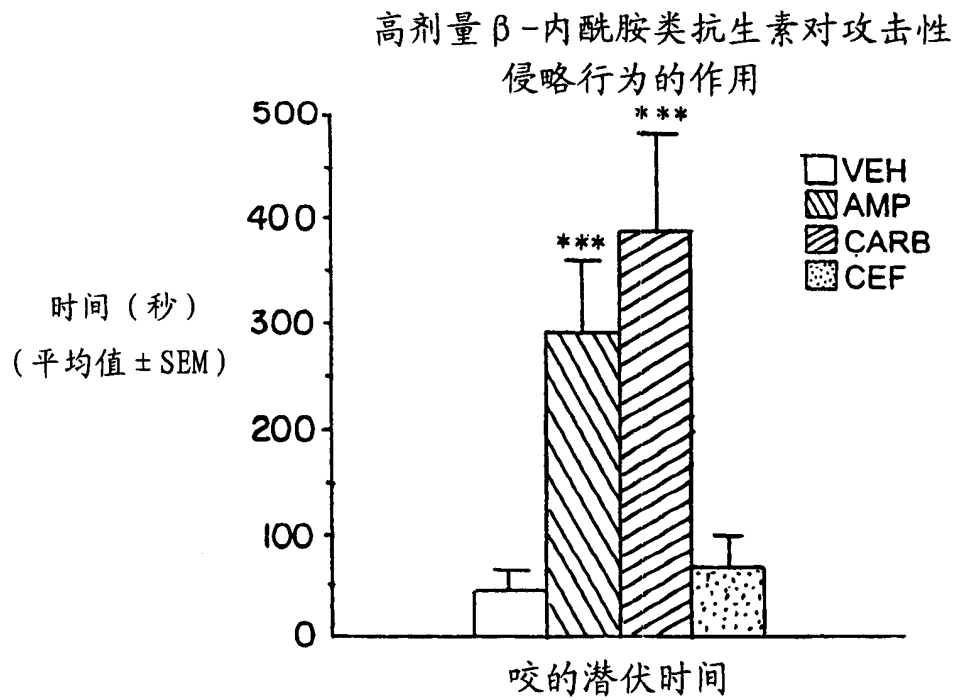


图 12a

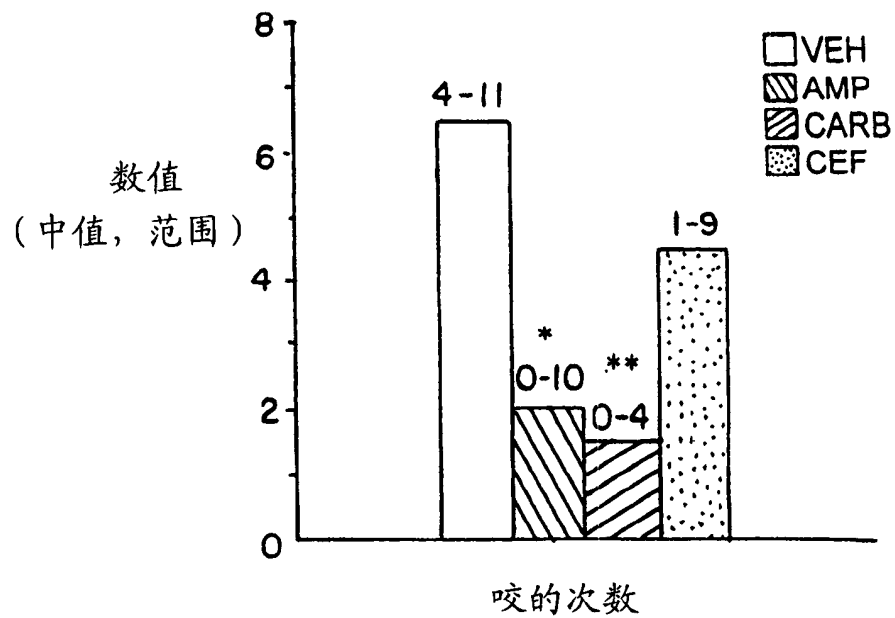


图 12b

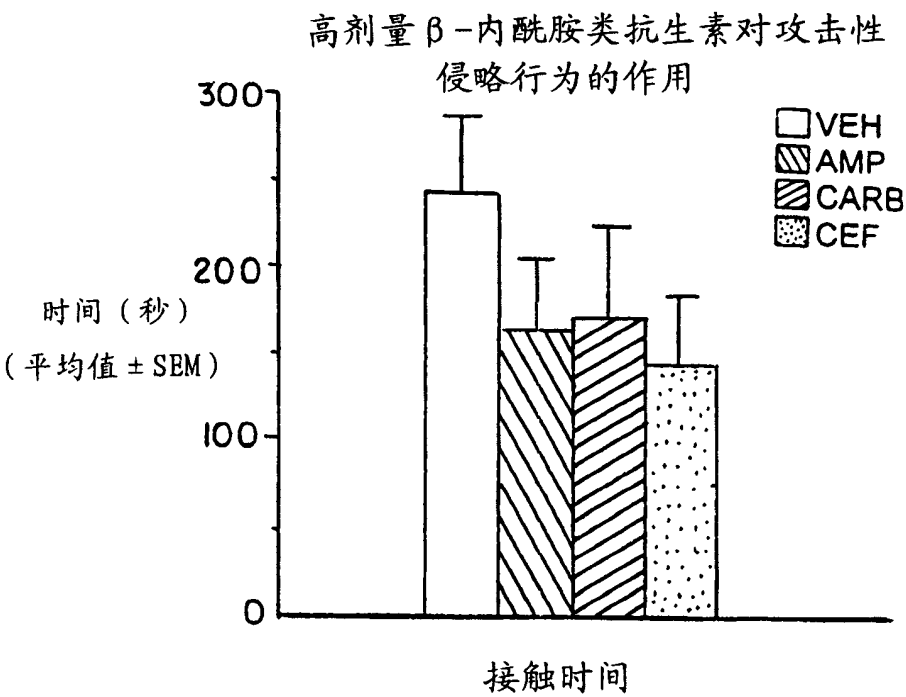


图 13a

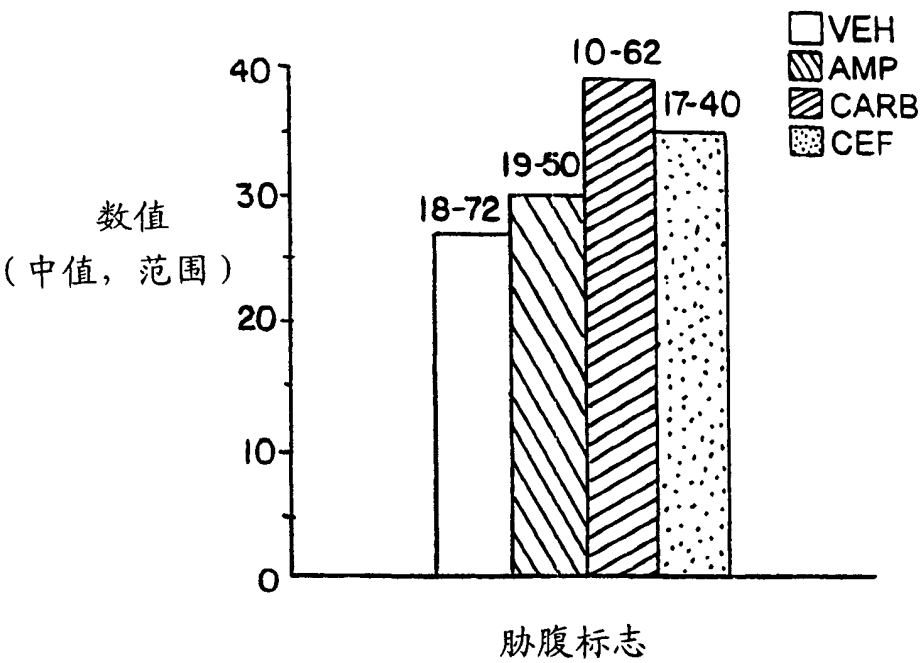


图 13b

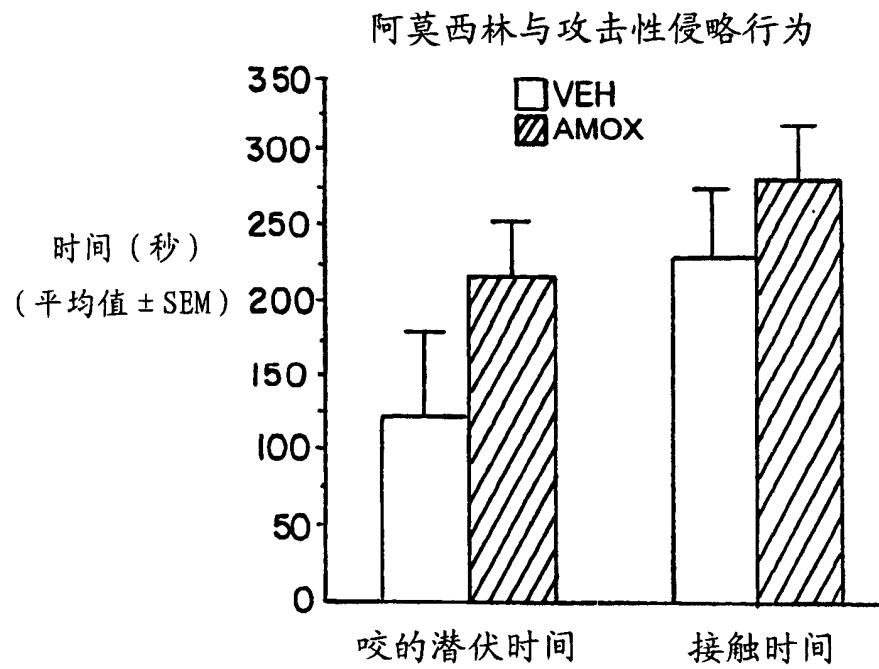


图 14a

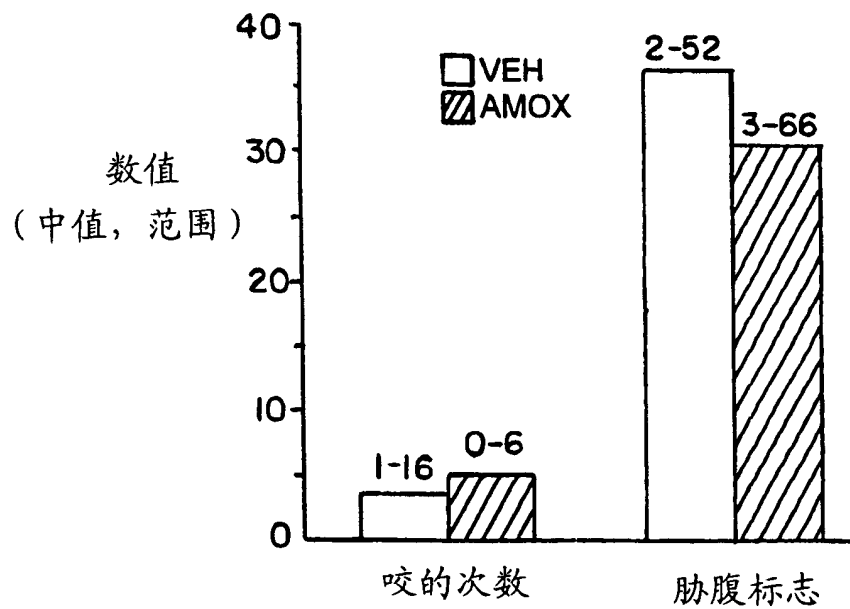


图 14b

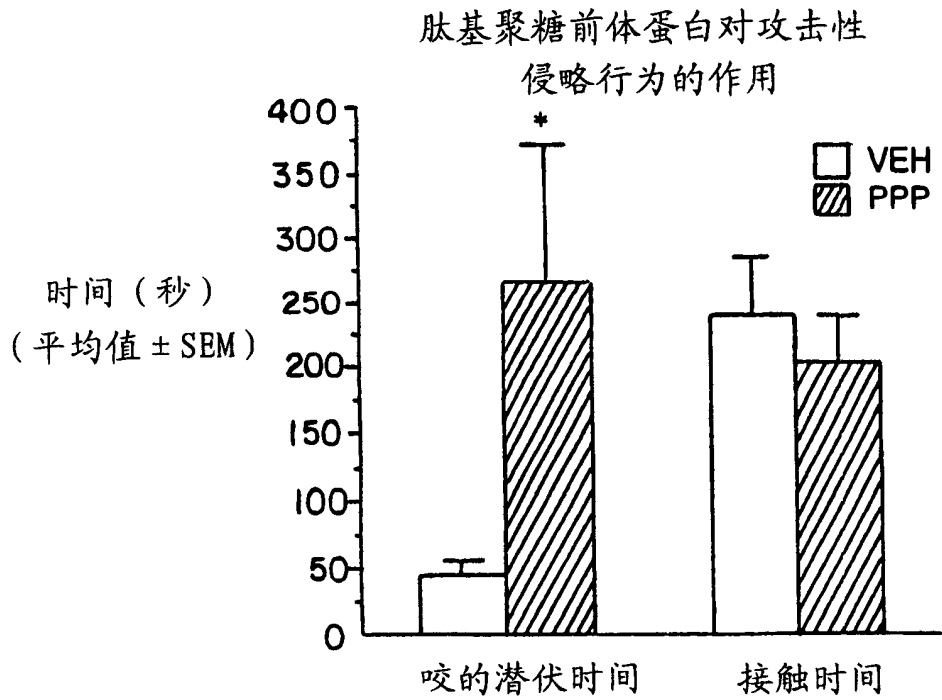


图 15a

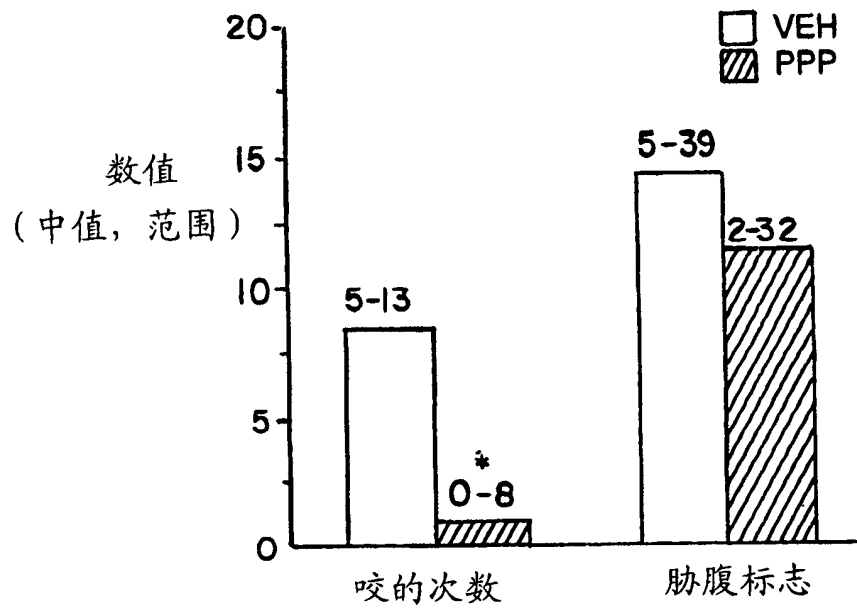


图 15b

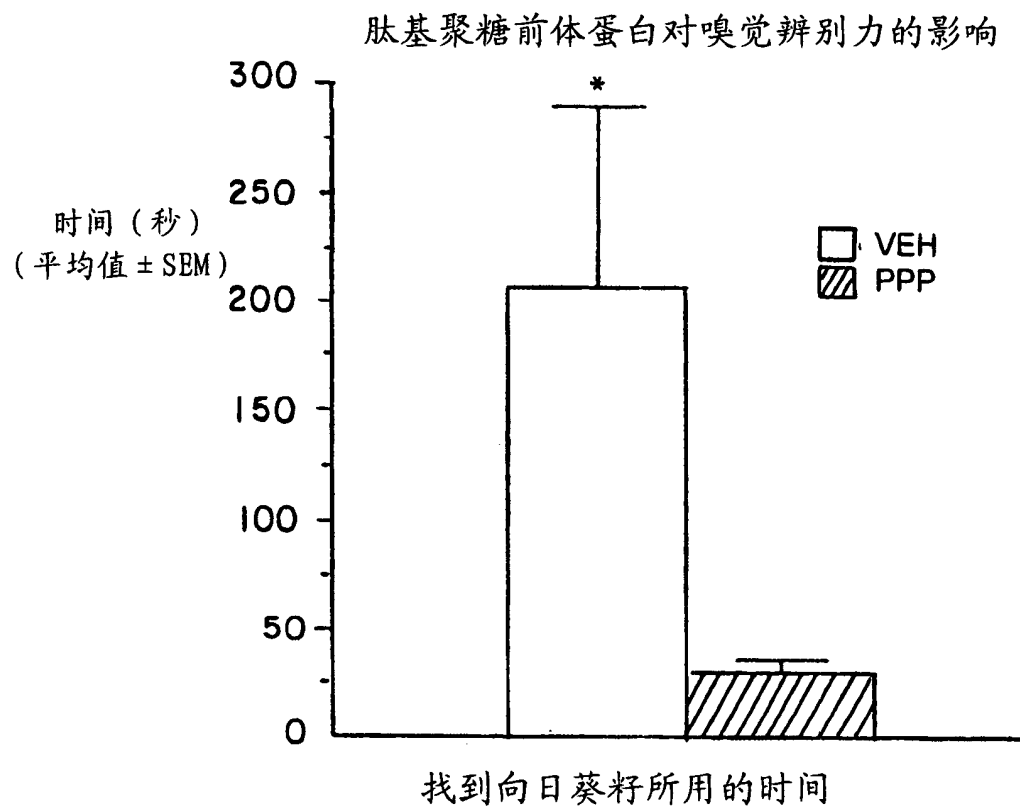


图 16

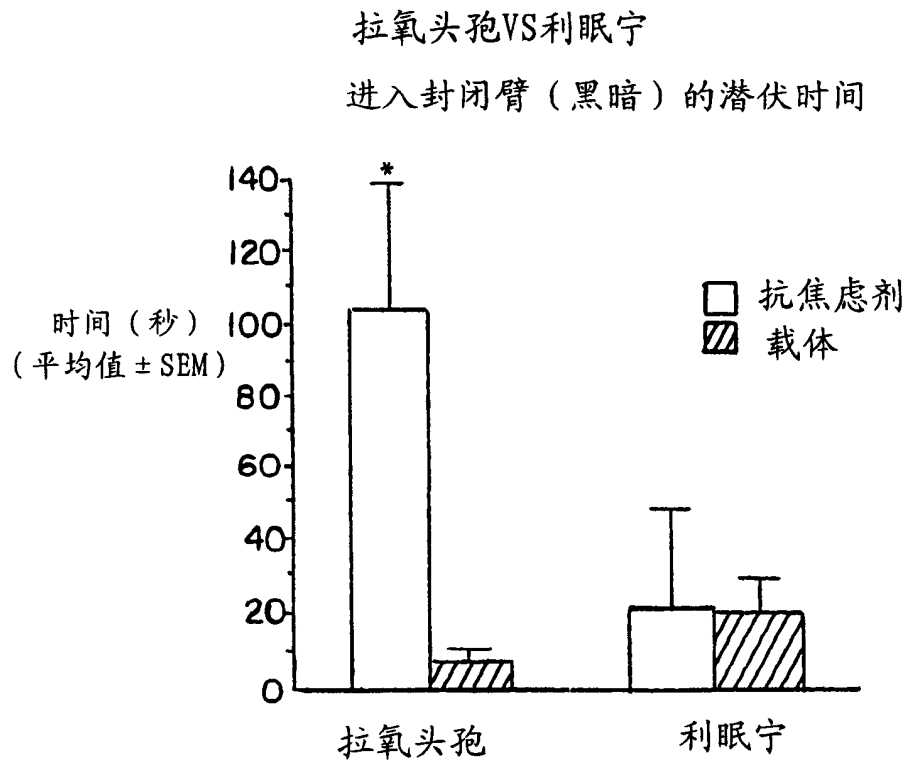


图 17a

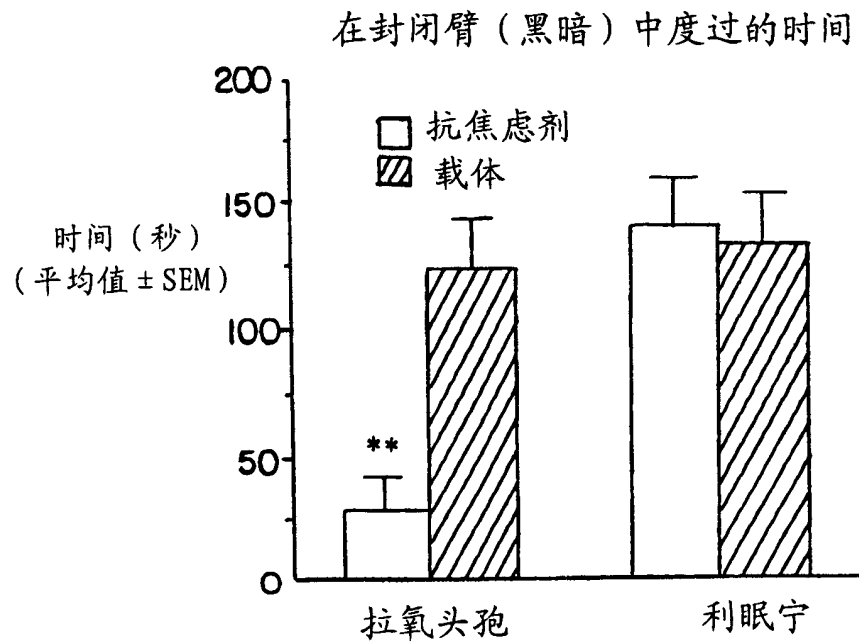


图 17b

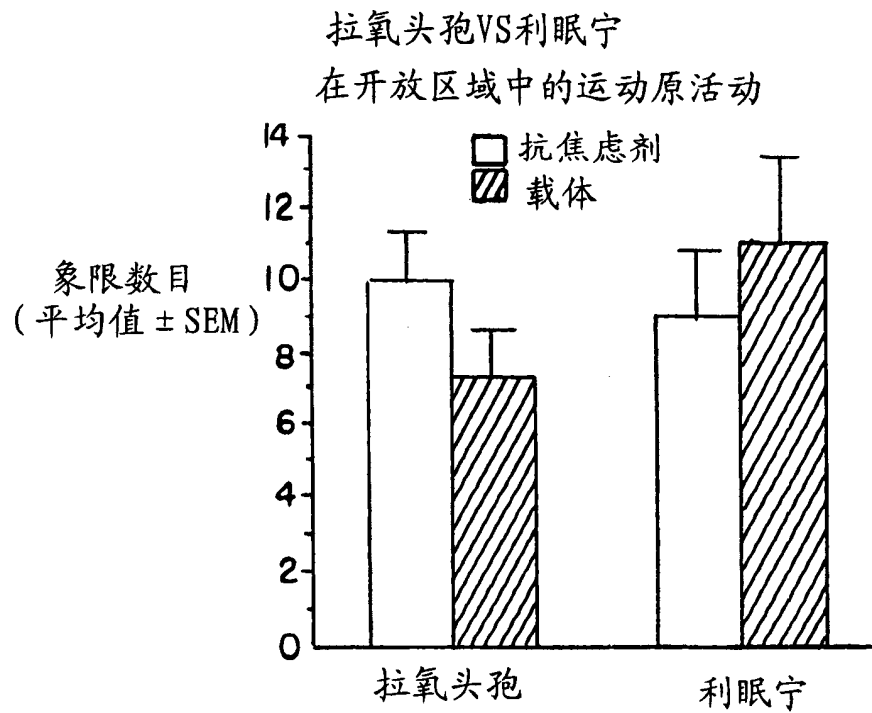


图 18

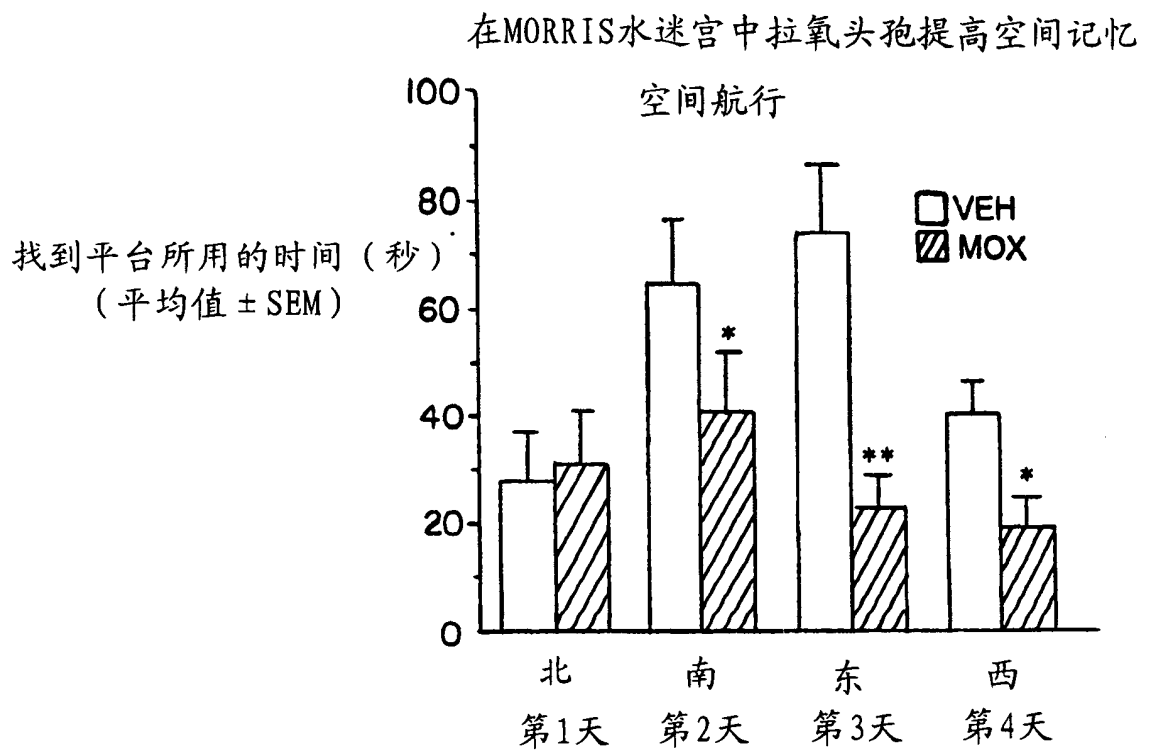


图 19a

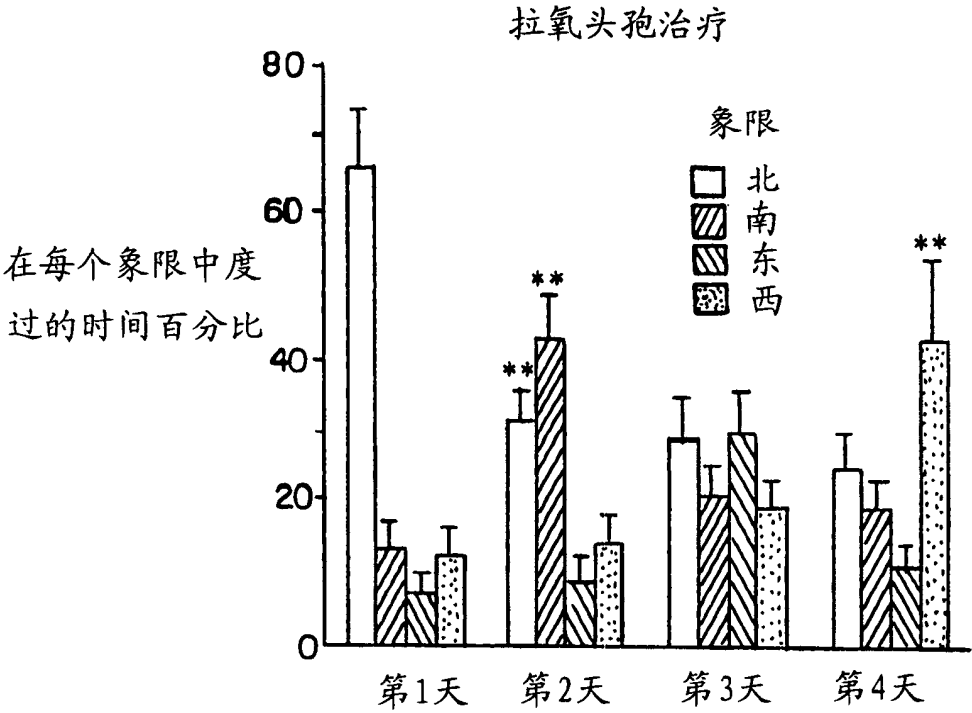


图 19b

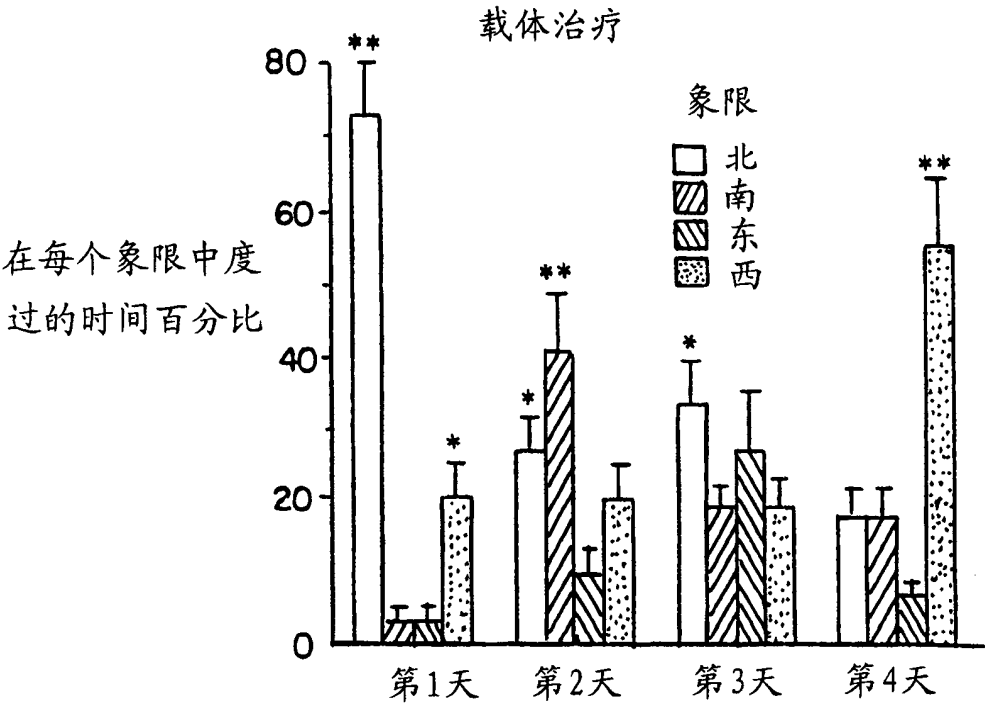


图 19c

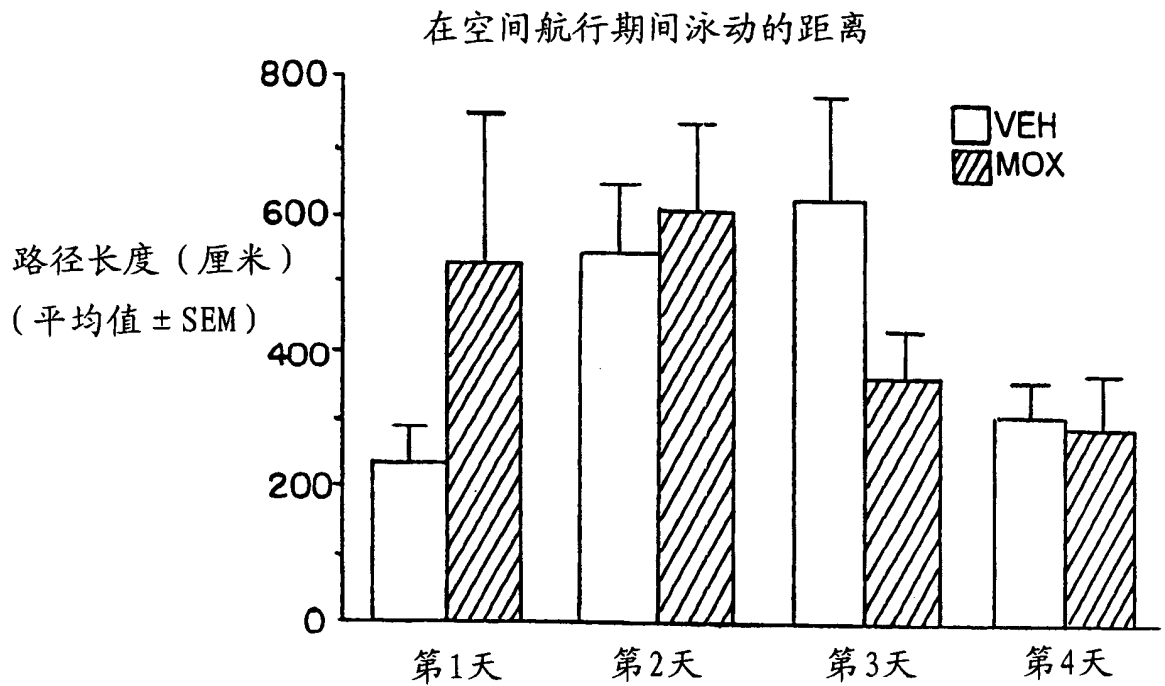


图 20a

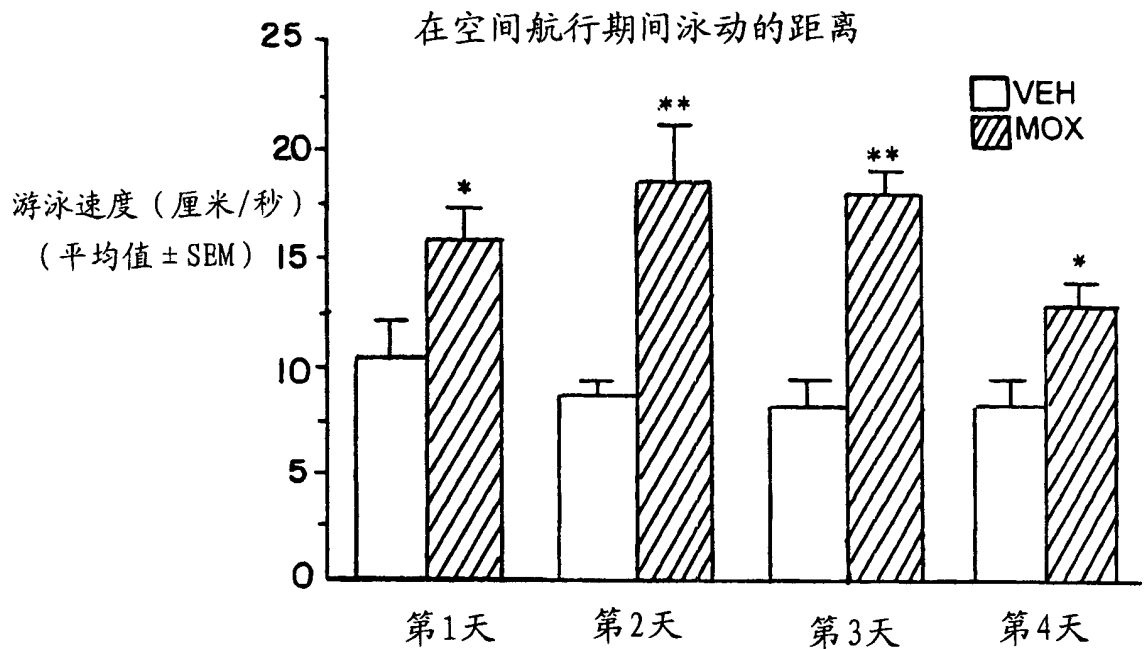


图 20b

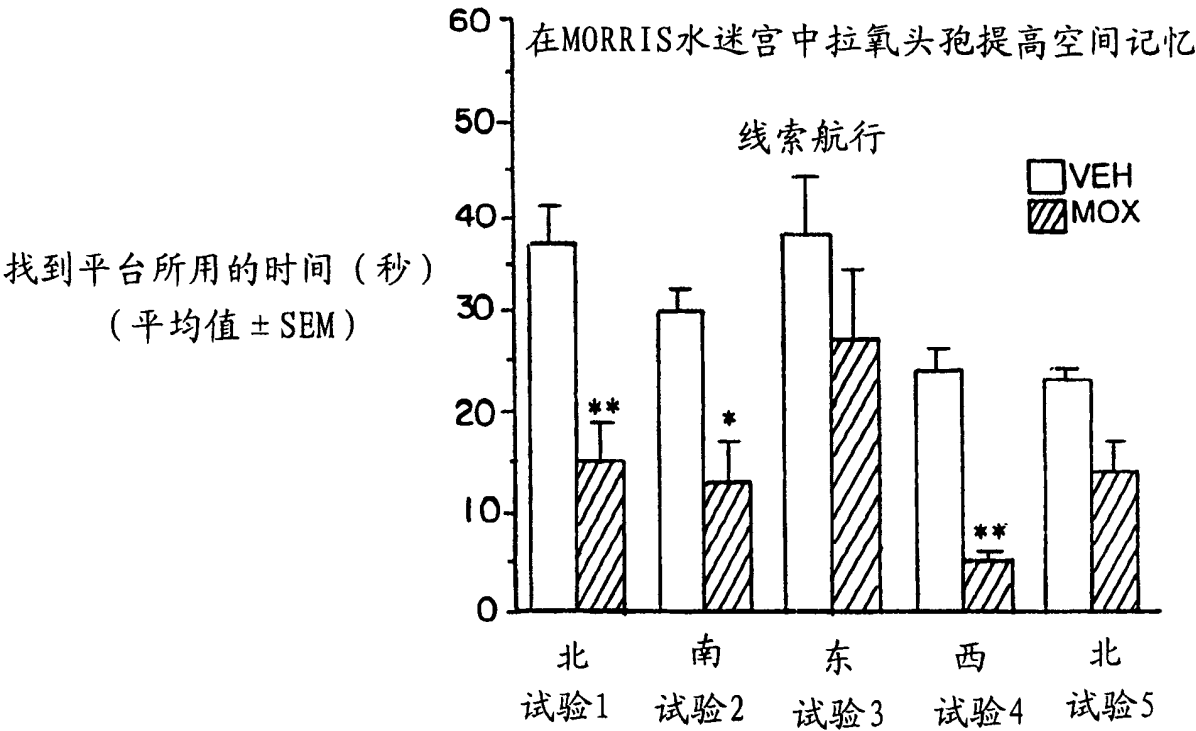


图 21a

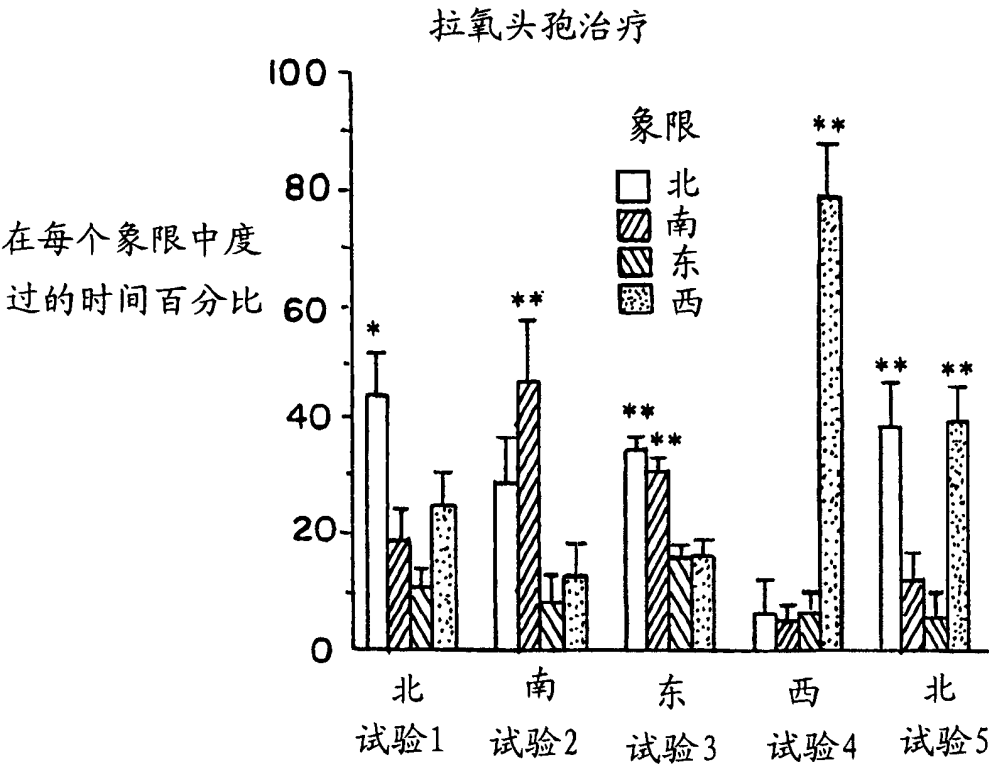


图 21b

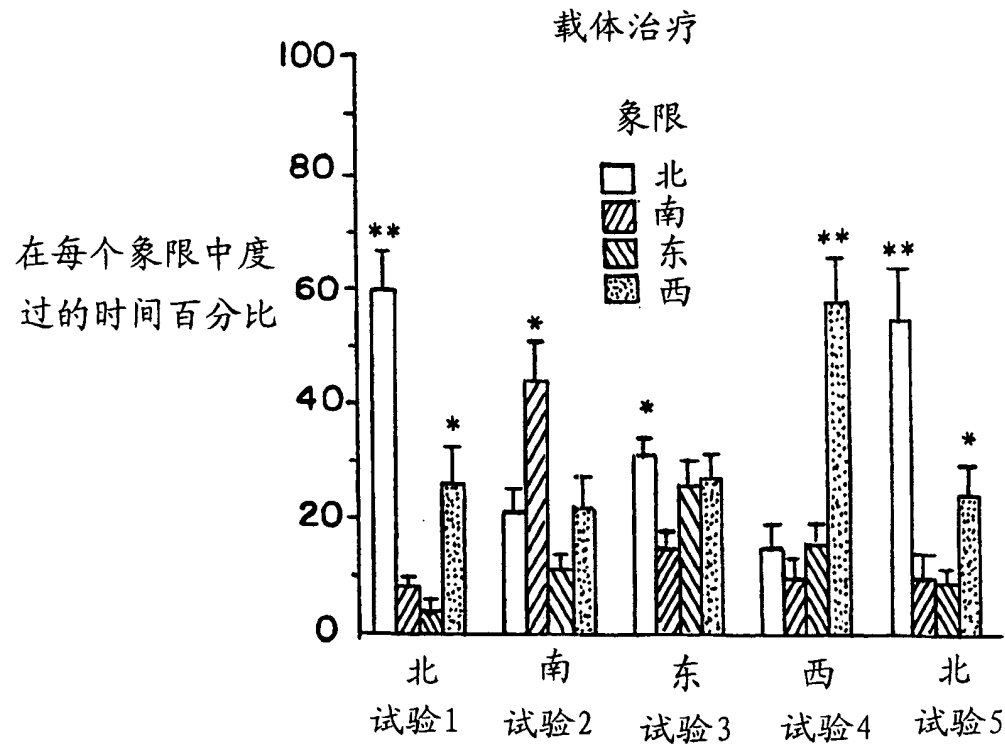


图 21c

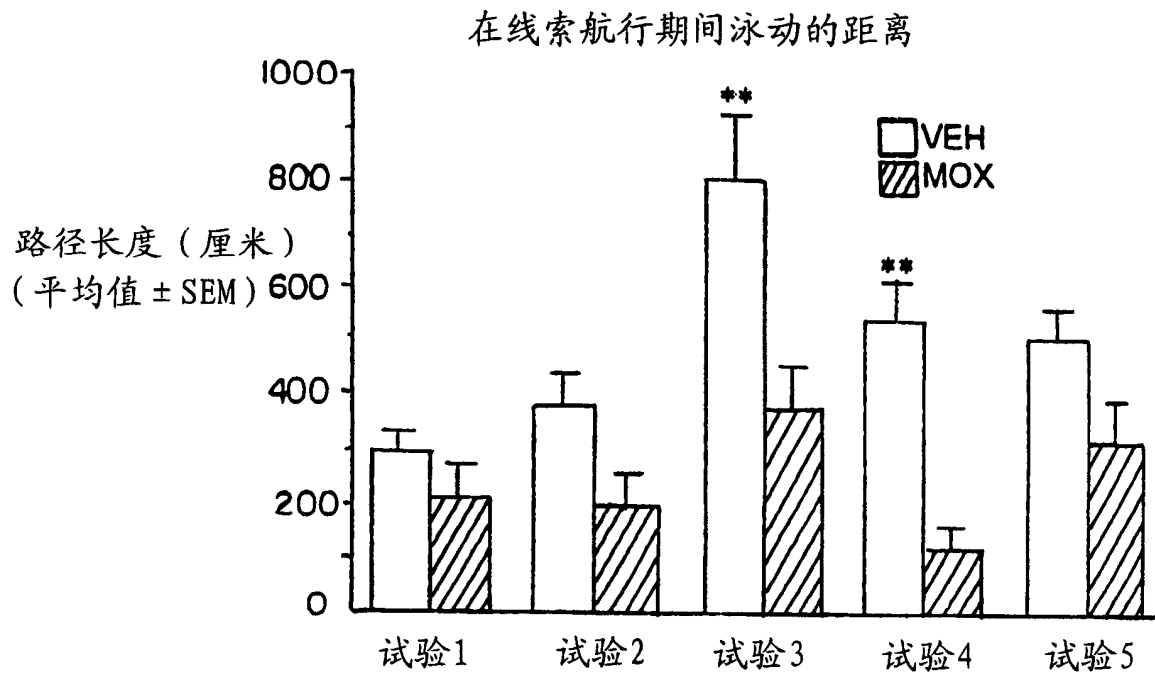


图 22a

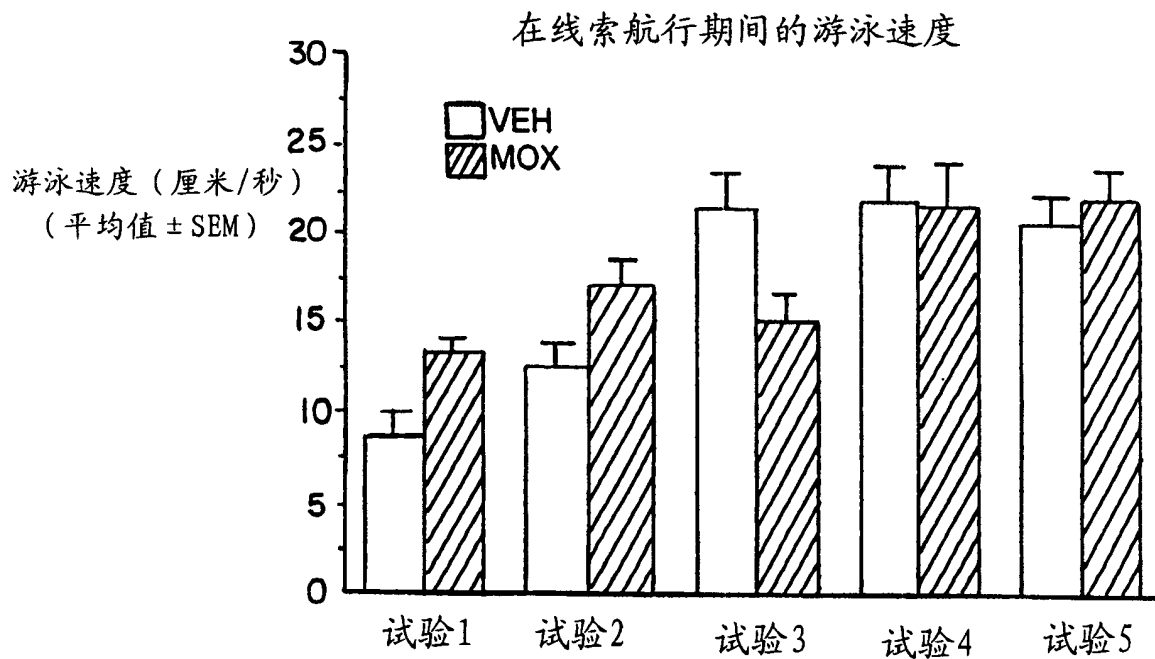


图 22b

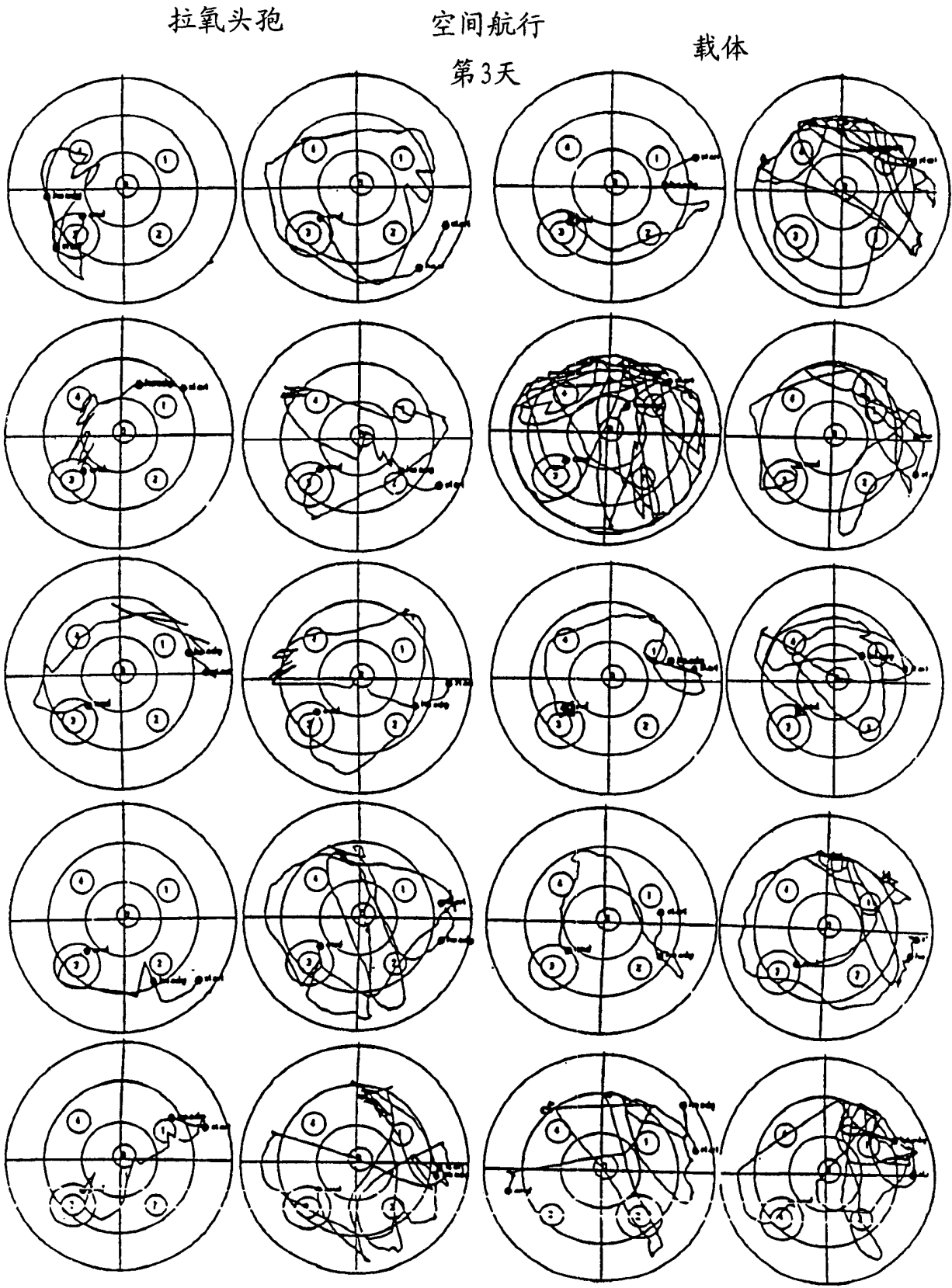


图 23

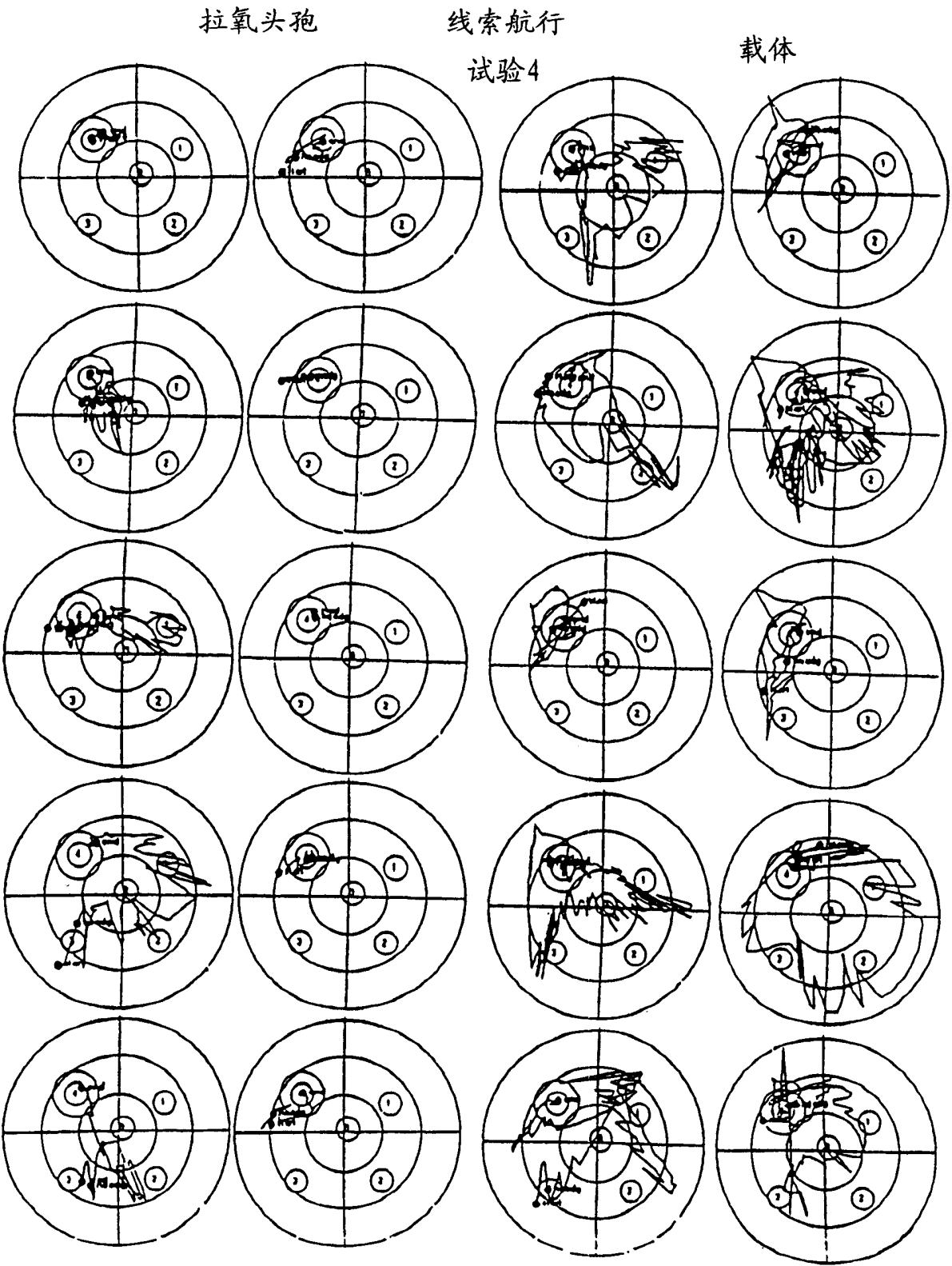


图 24

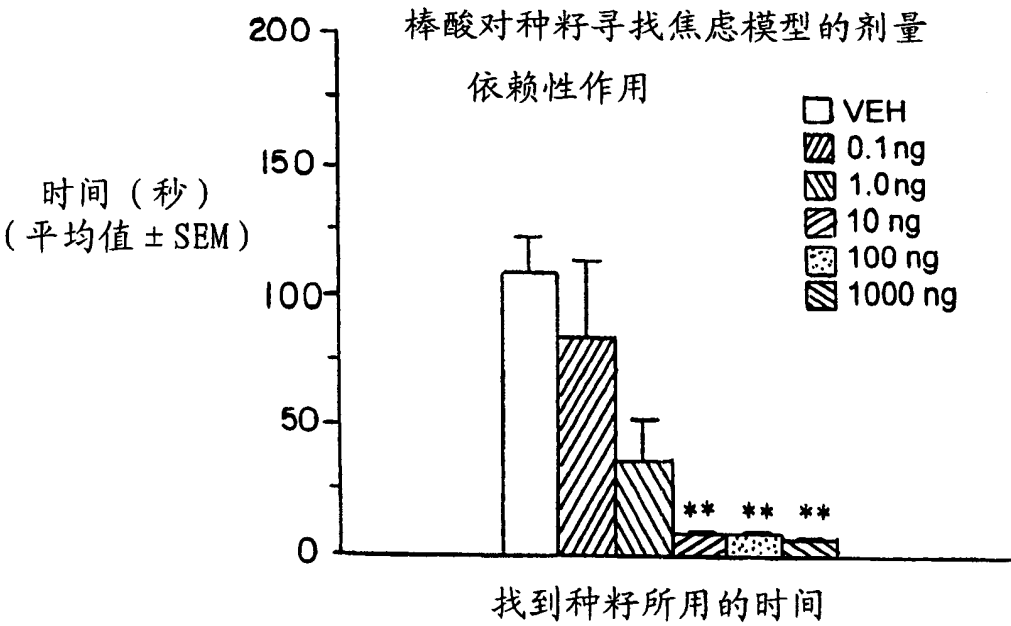


图 25

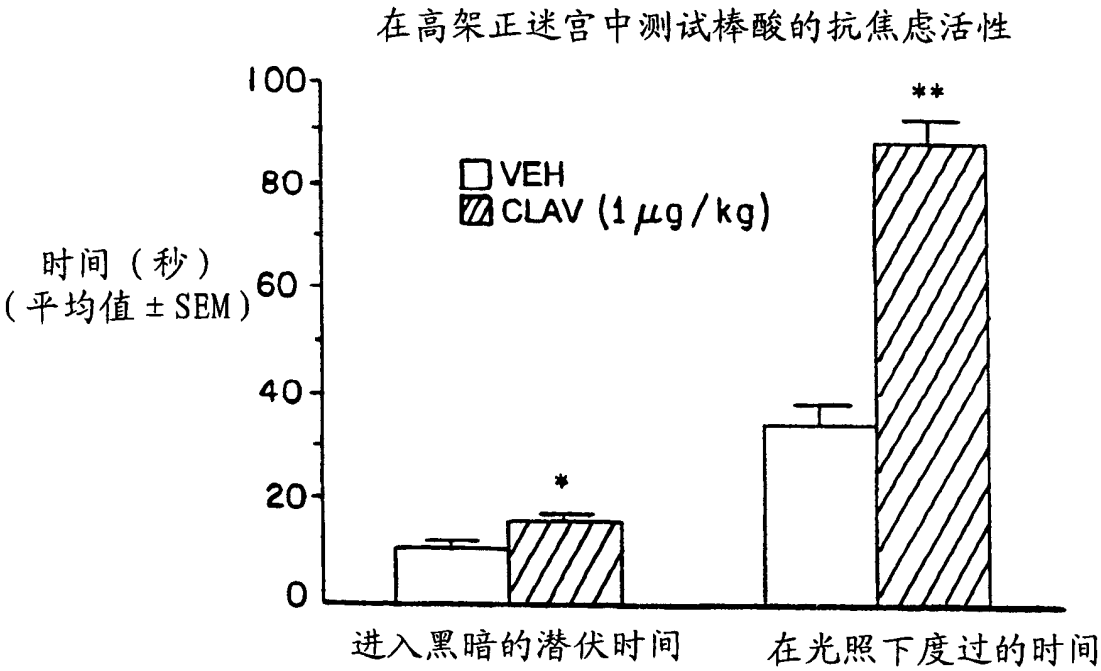


图 26A

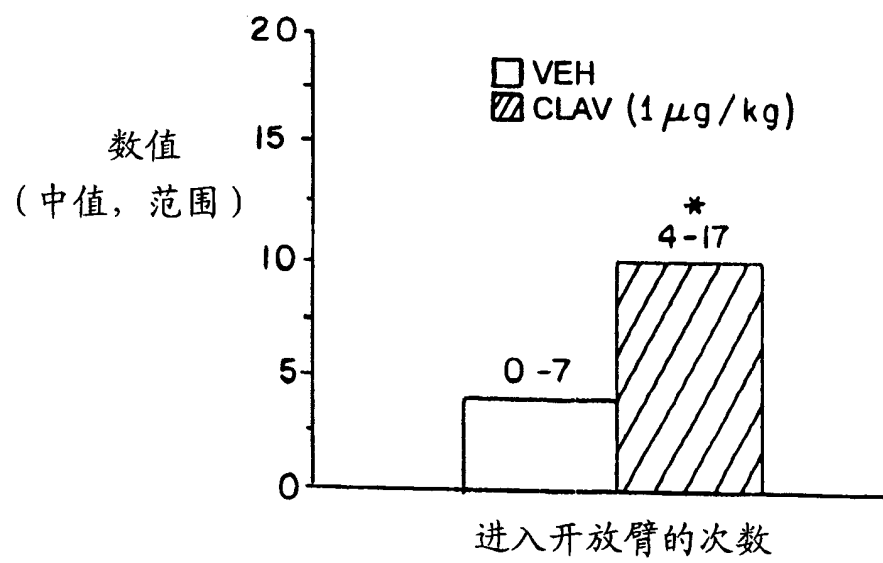


图 26B

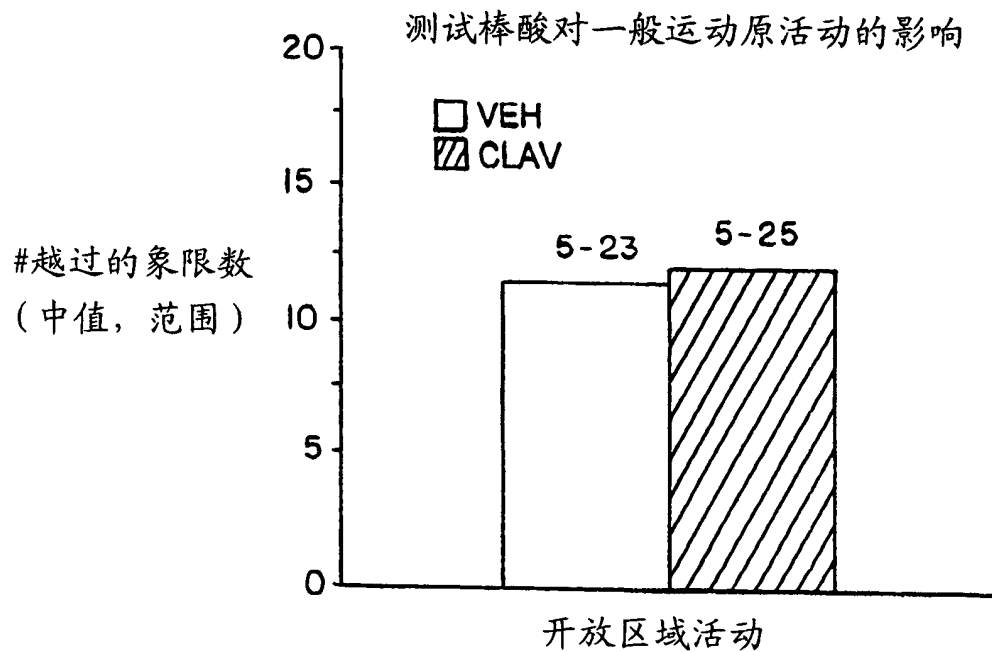


图 27

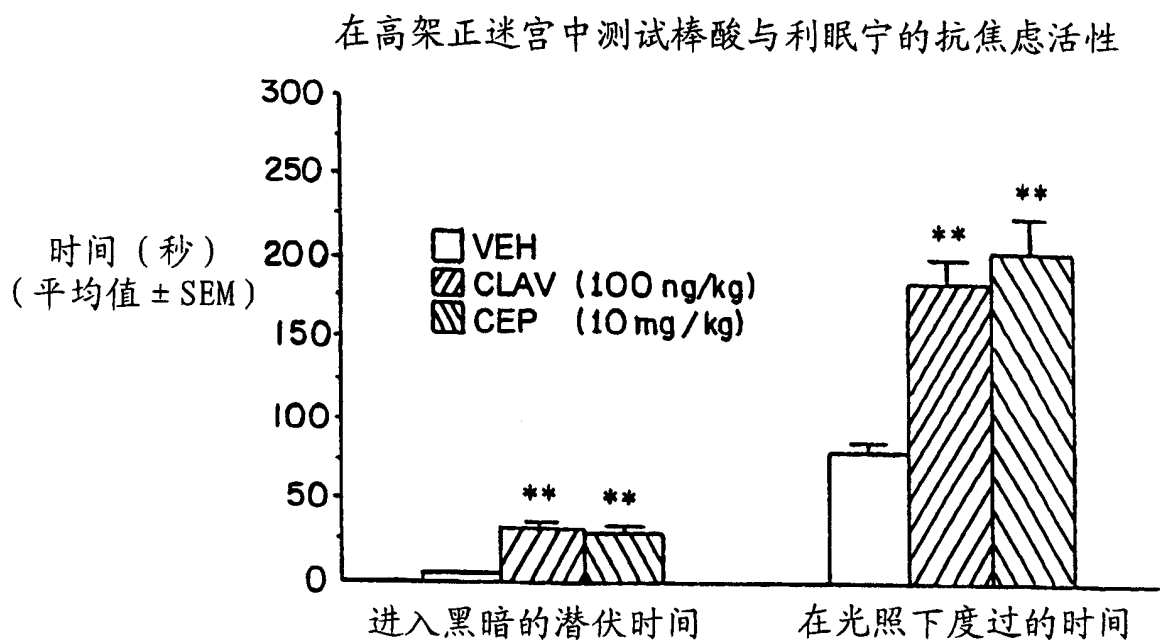


图 28A

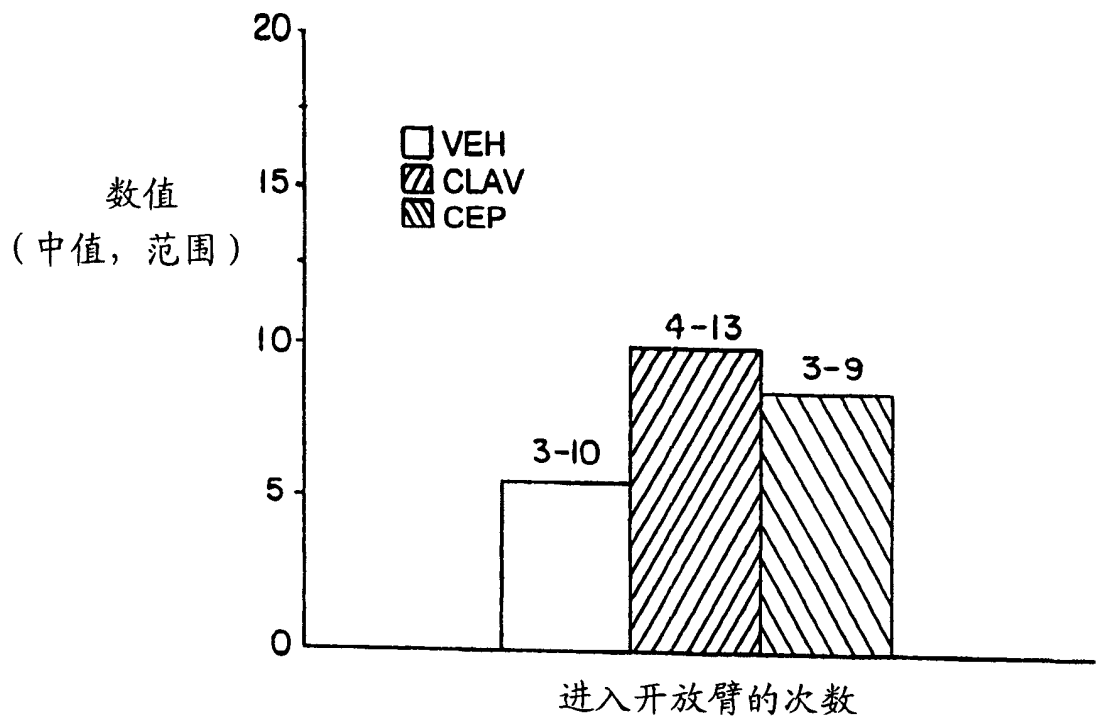


图 28B

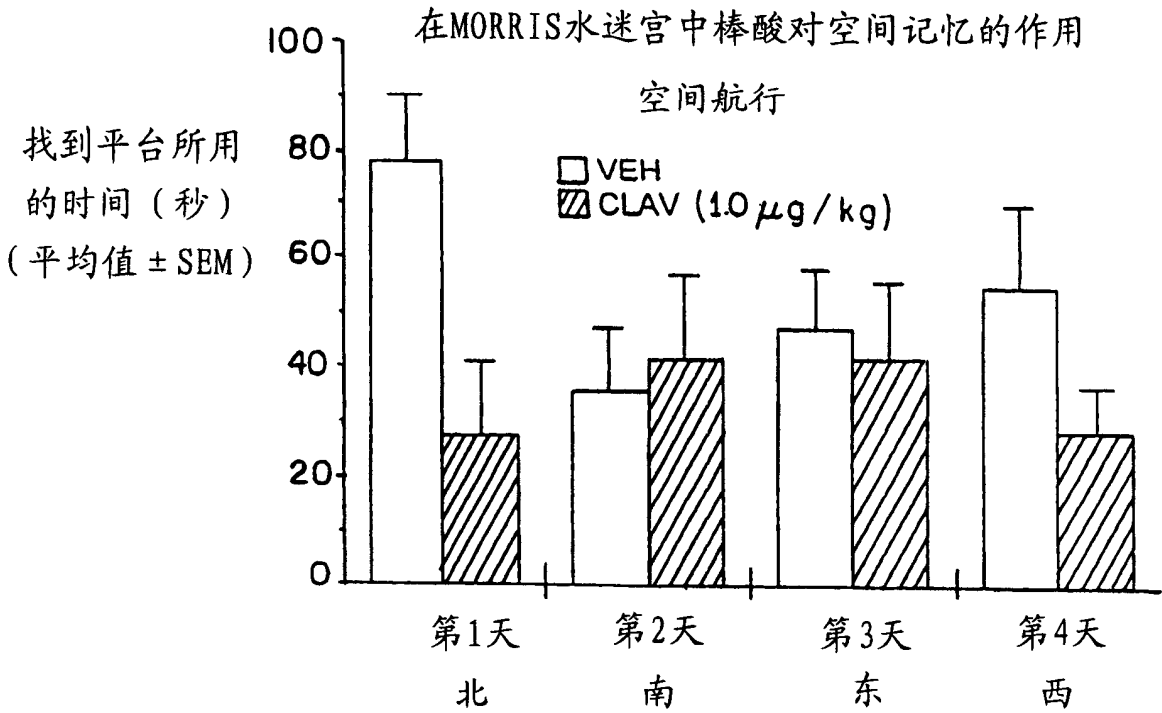


图 29

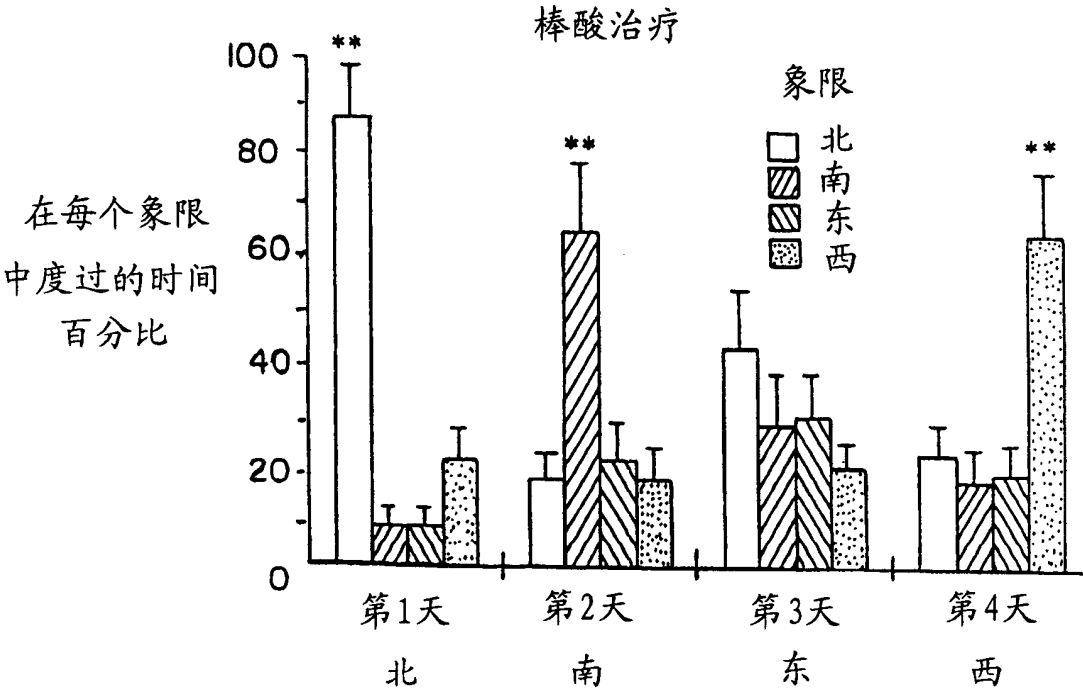


图 30A

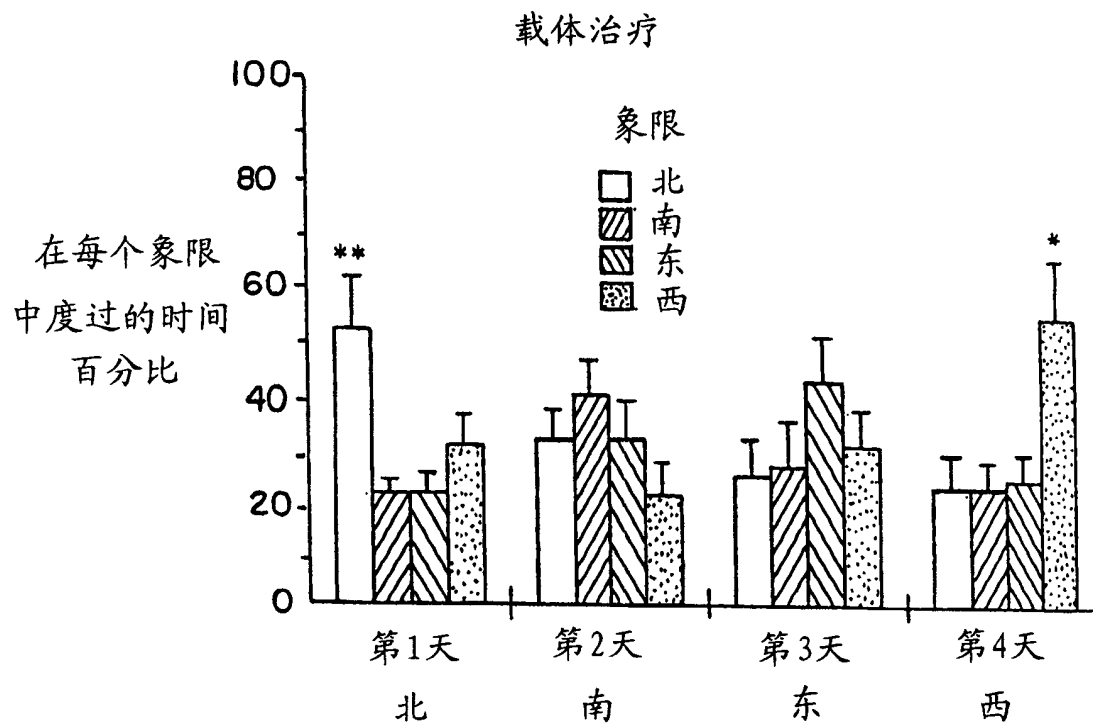


图 30B

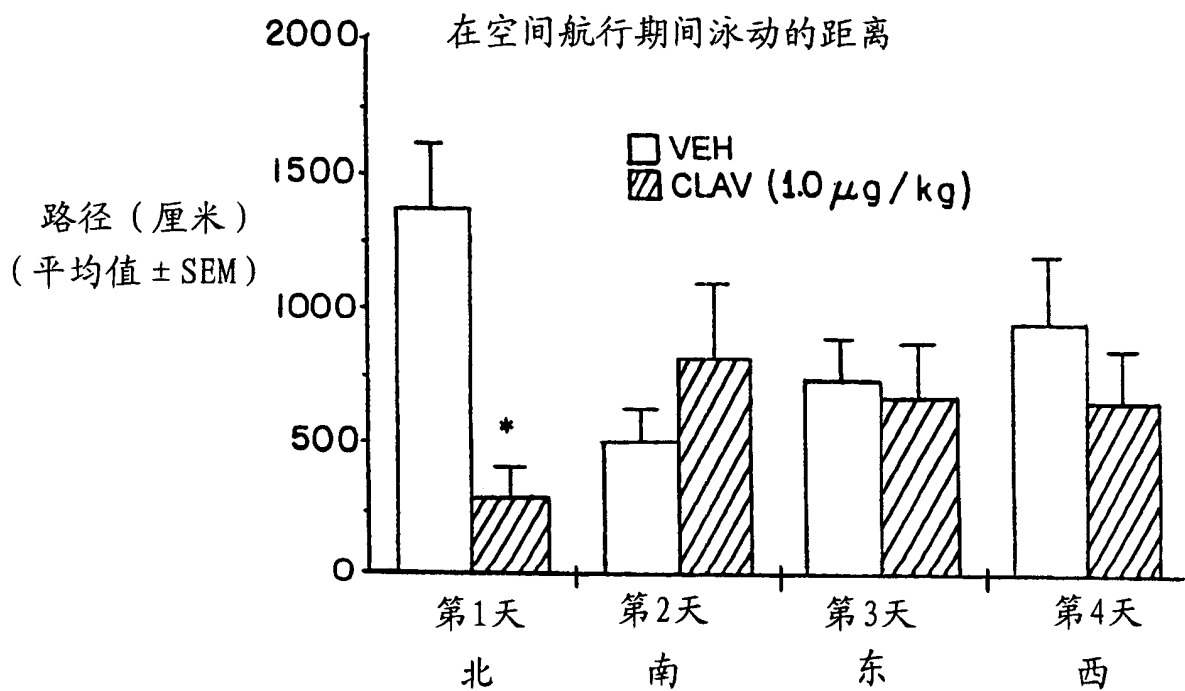


图 31

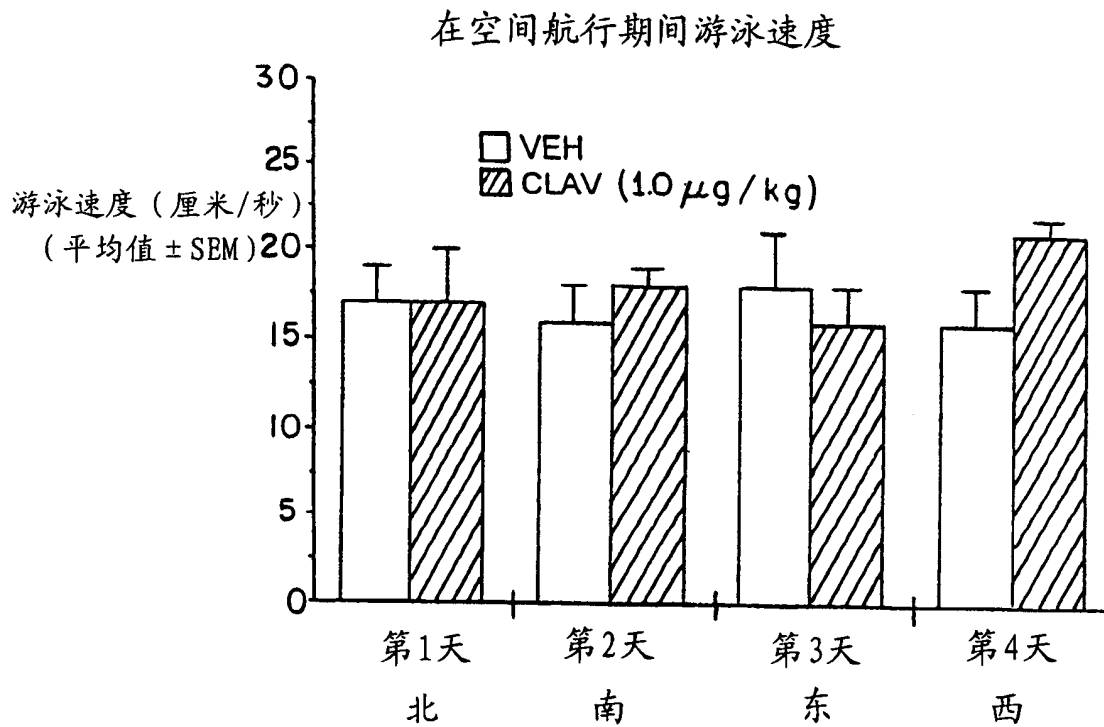


图 32

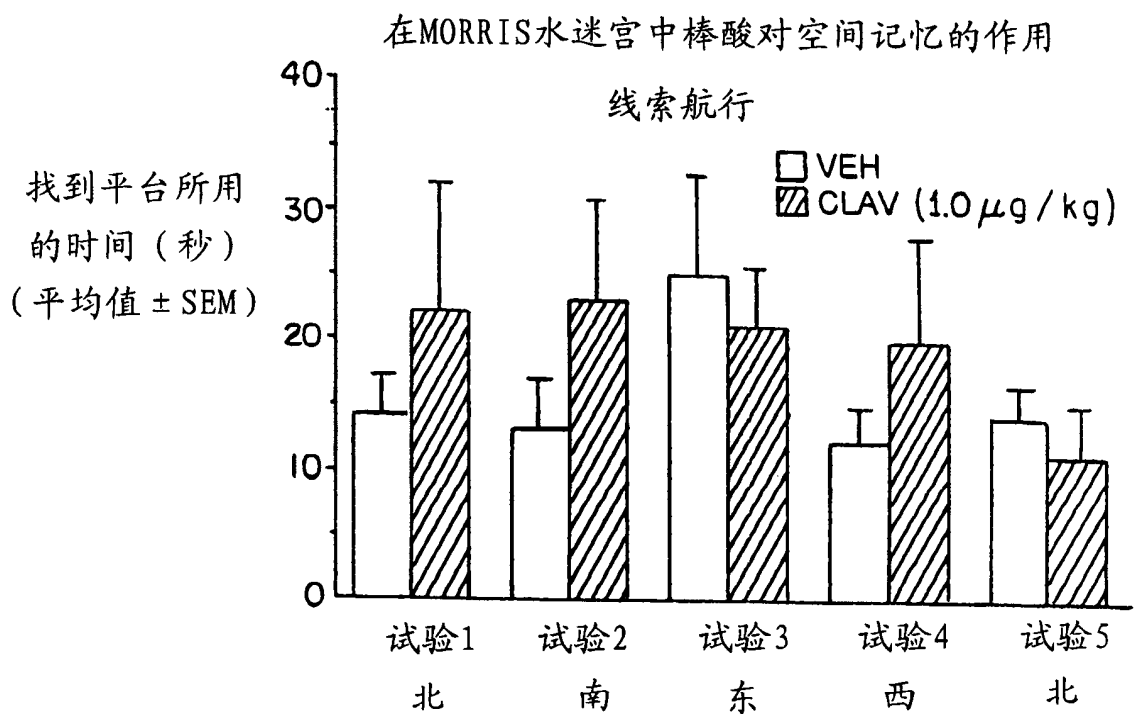


图 33

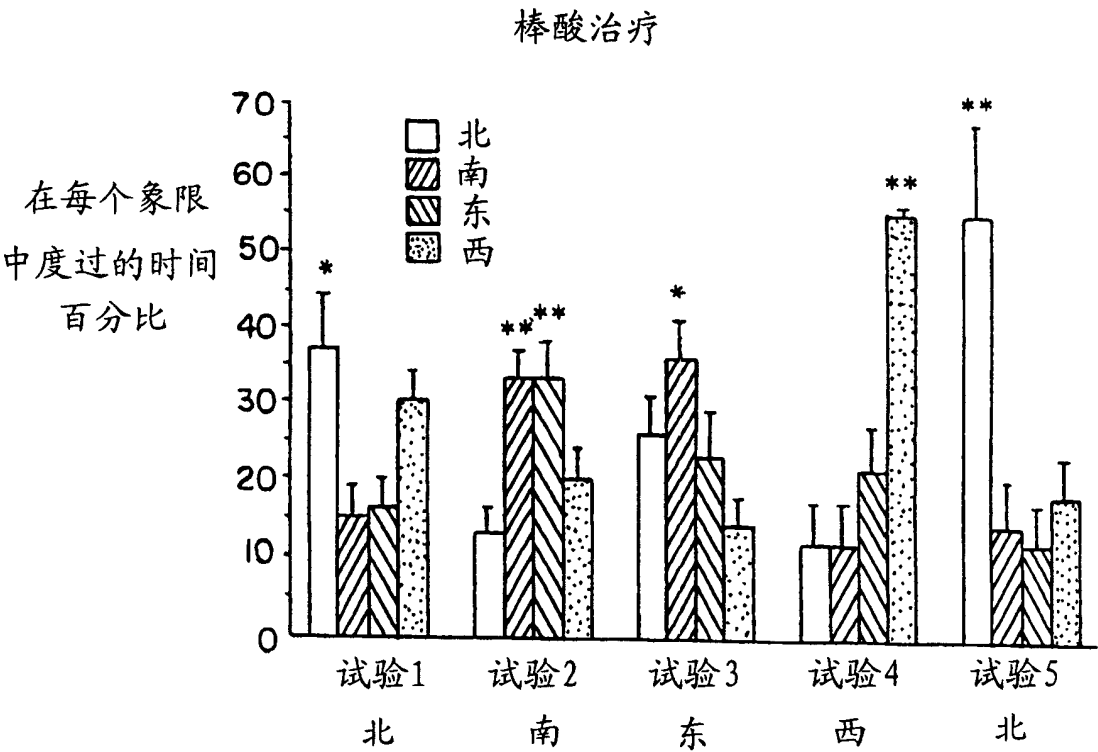


图 34A

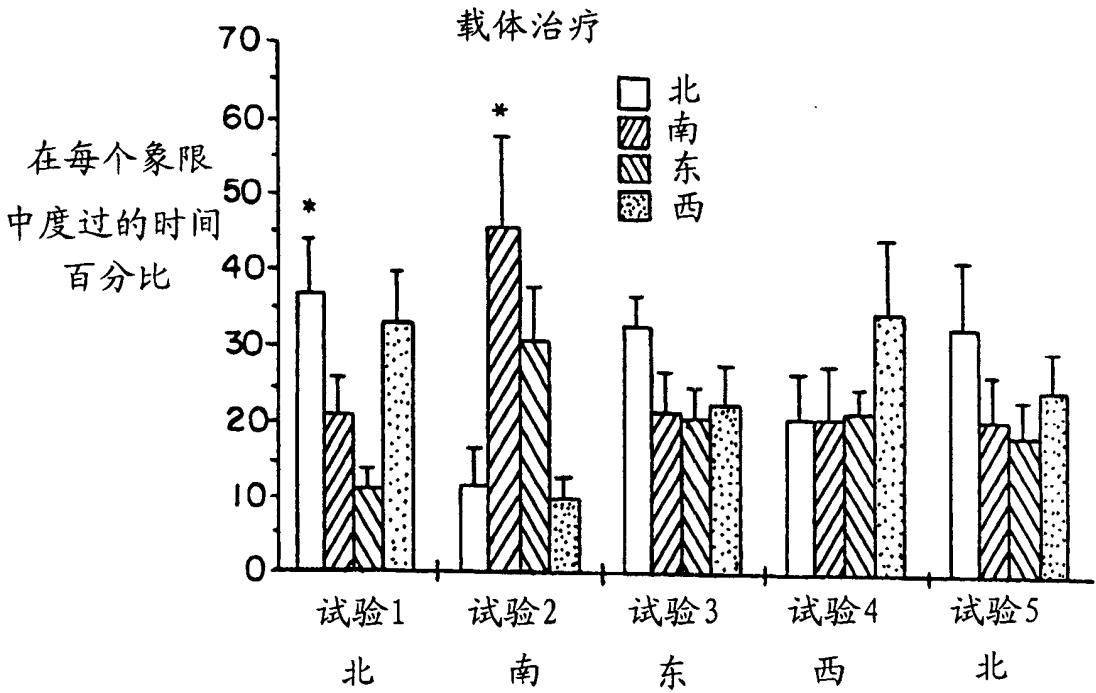


图 34B

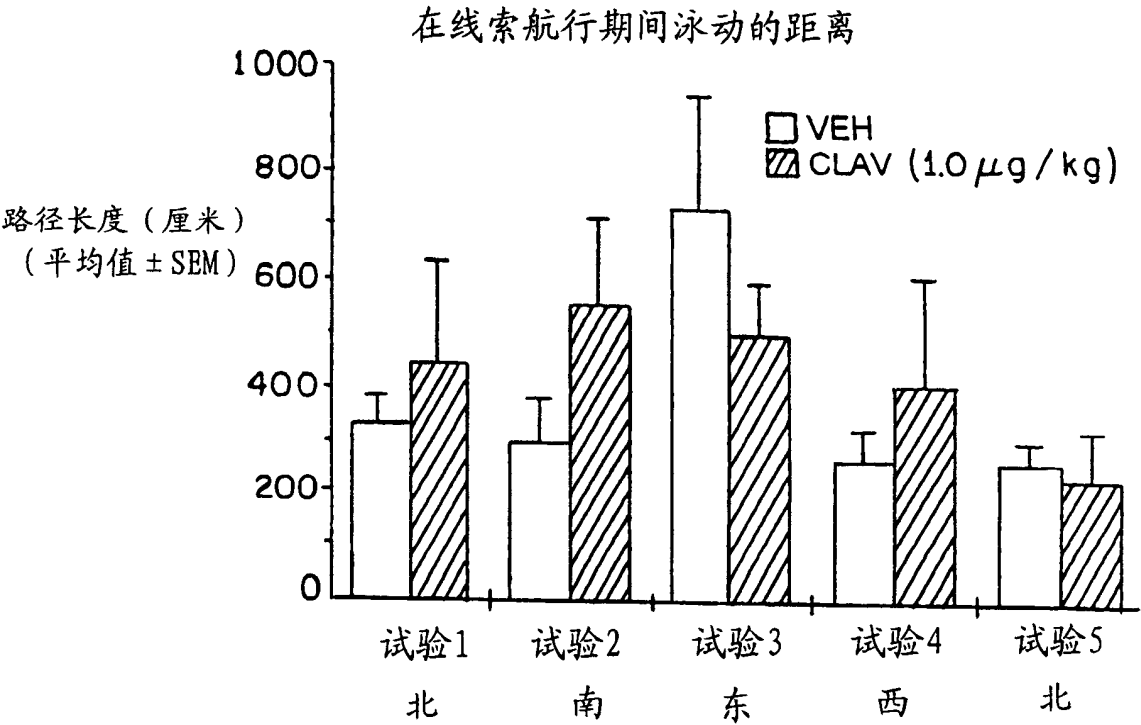


图 35

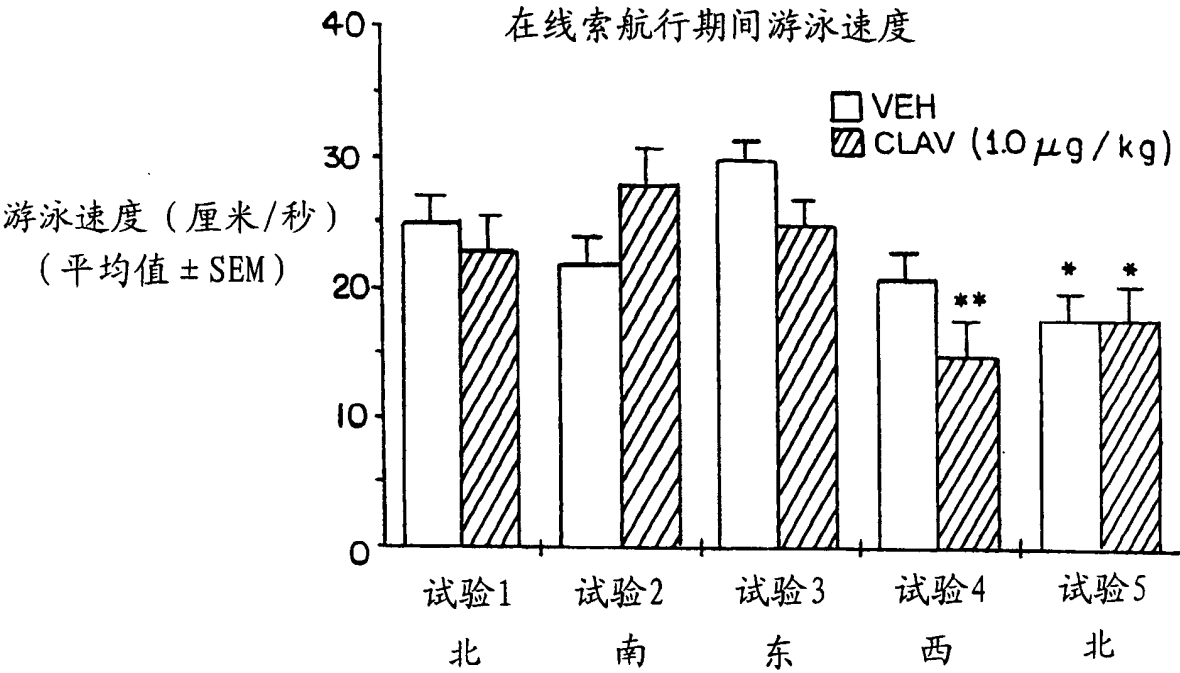


图 36

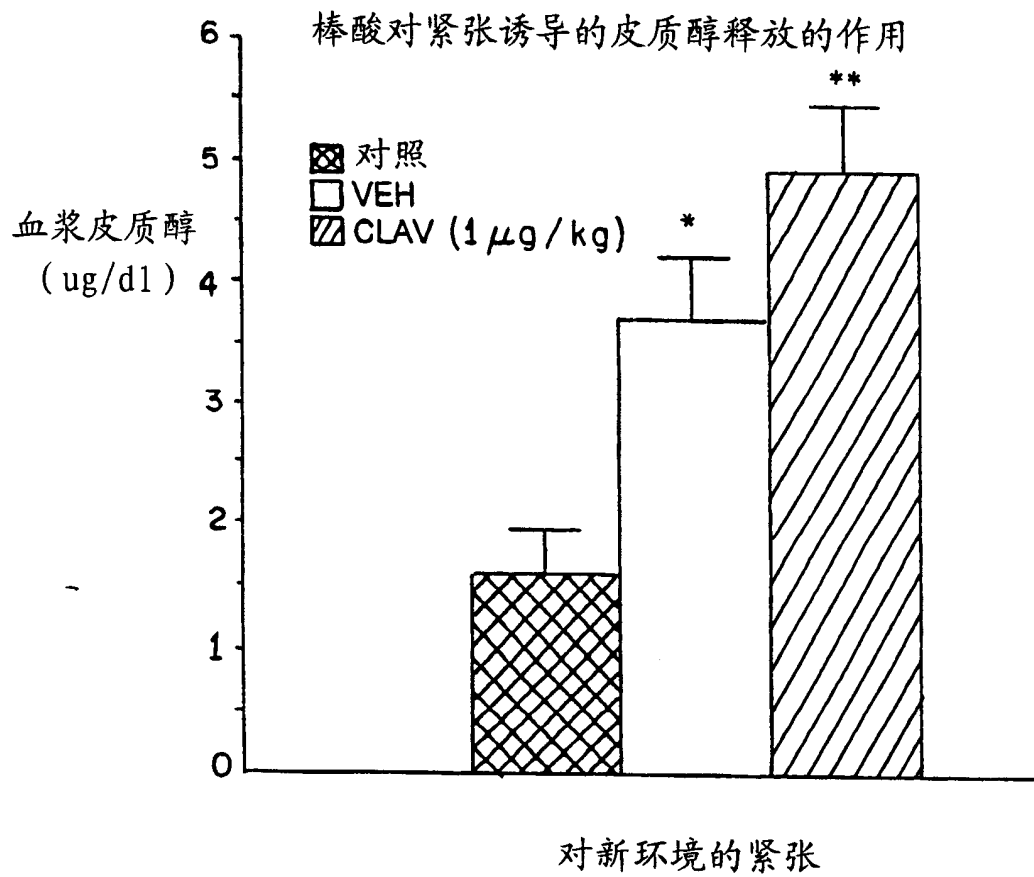


图 37

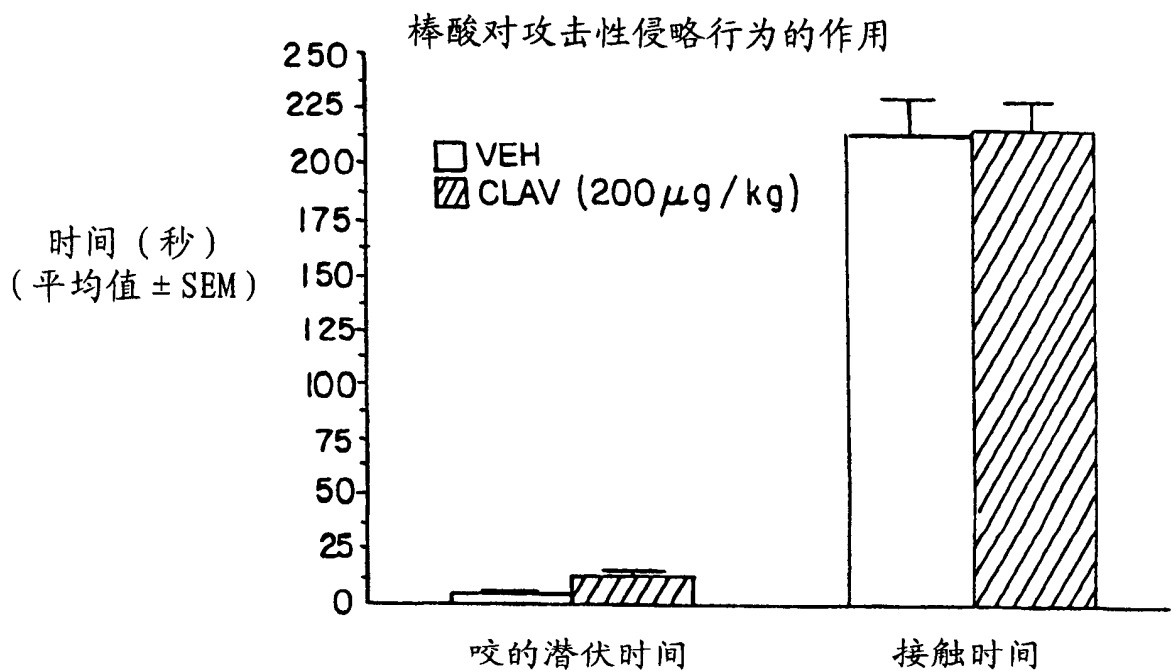


图 38

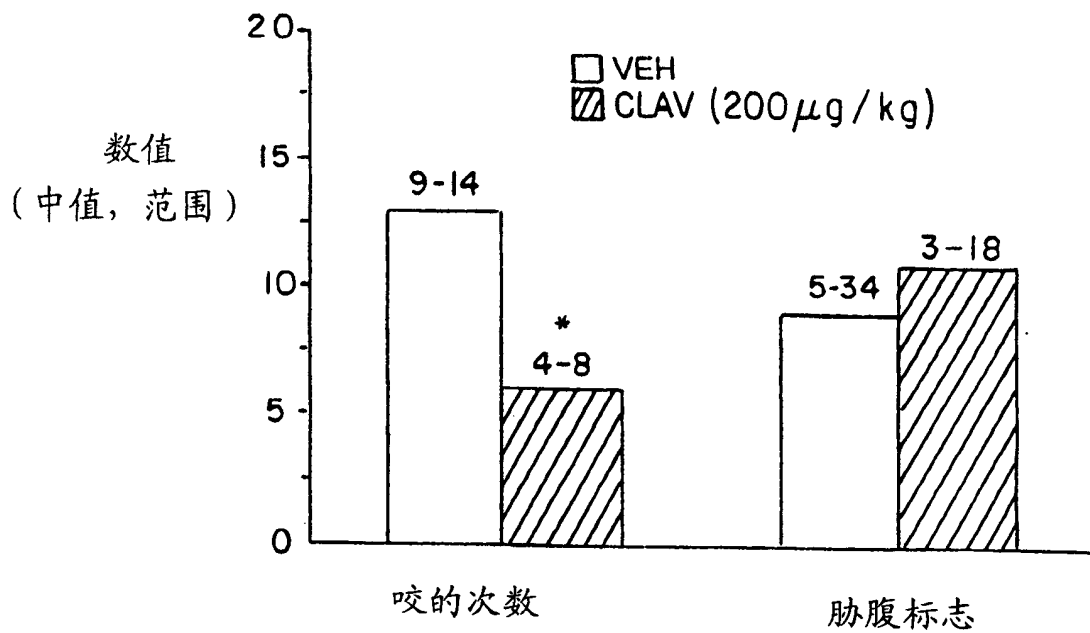


图 39

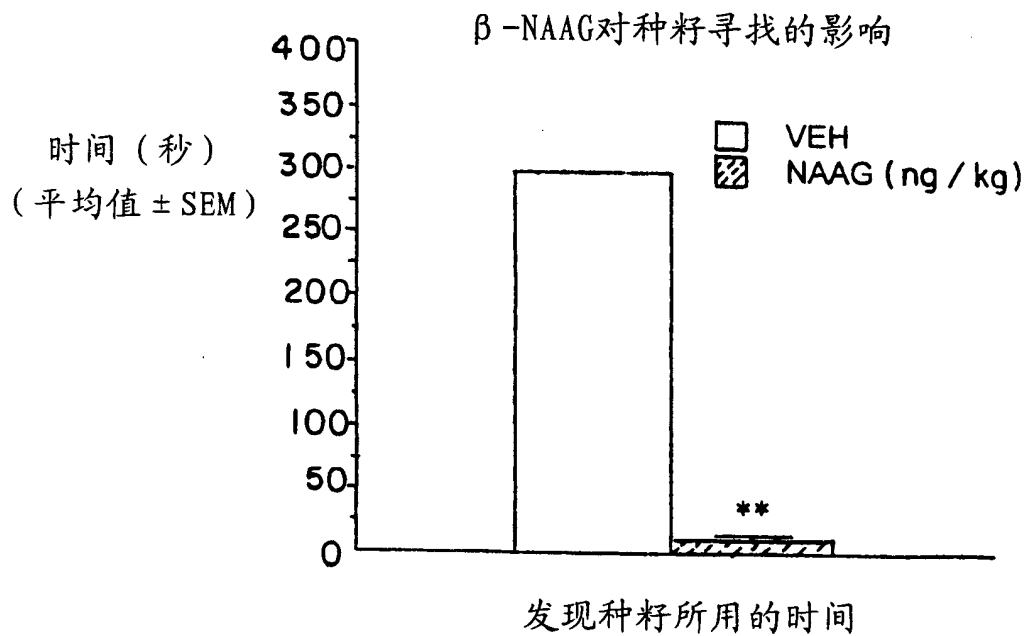


图 40

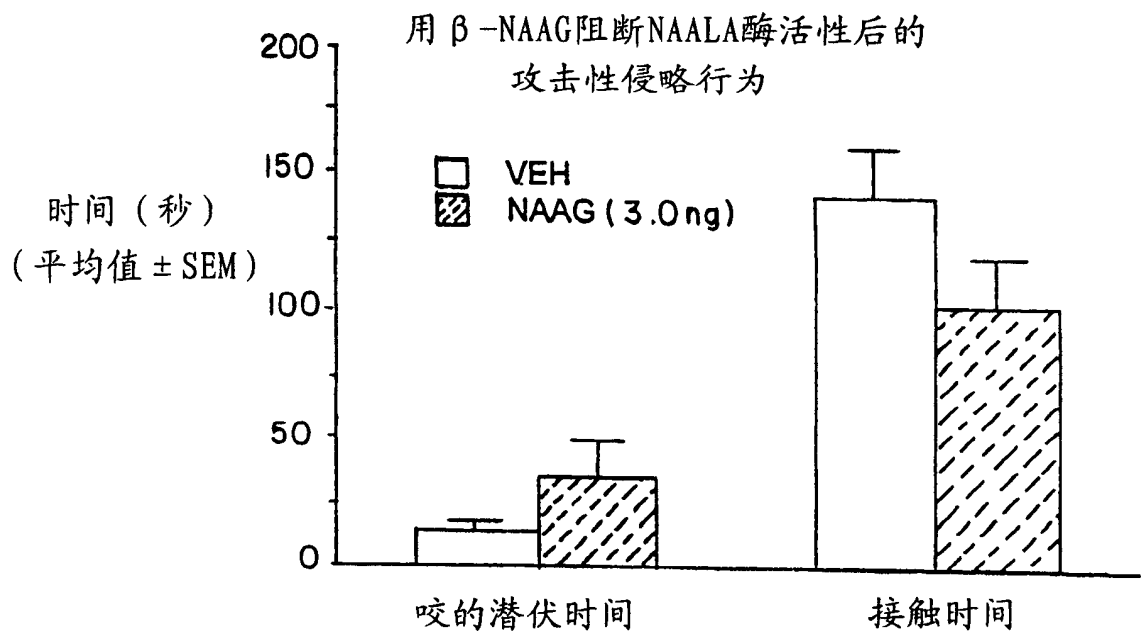


图 41

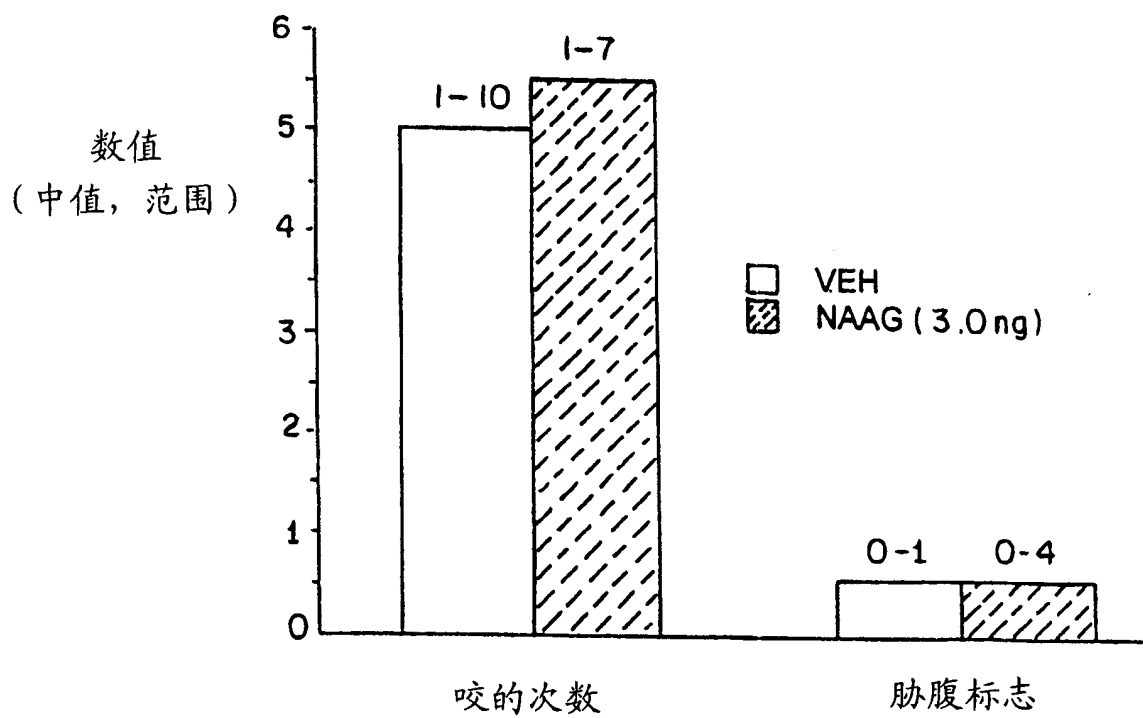


图 42