



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103989682 B

(45) 授权公告日 2016. 03. 30

(21) 申请号 201410085543. 8

US 2003100507 A1, 2003. 05. 29,

(22) 申请日 2010. 04. 29

审查员 刘鑫

(30) 优先权数据

61/174257 2009. 04. 30 US

(62) 分案原申请数据

201080029672. 5 2010. 04. 29

(73) 专利权人 美国中西部大学

地址 美国伊利诺伊州

(72) 发明人 A. 古拉蒂

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 段菊兰 万雪松

(51) Int. Cl.

A61K 31/496(2006. 01)

A61P 29/00(2006. 01)

A61P 25/00(2006. 01)

A61K 31/485(2006. 01)

A61K 31/445(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2004063719 A1, 2004. 04. 01,

权利要求书1页 说明书45页 附图20页

(54) 发明名称

使用 centhaquin 的治疗法

(57) 摘要

本发明公开了使用肾上腺素能剂如 centhaquin, 治疗高血压, 疼痛, 和复苏出血性休克的方法。所述方法治疗哺乳动物, 包括人。

1. 2-[2-(4-(3- 甲基苯基)-1- 哌嗪基) 乙基]- 喹啉在制备用于治疗疼痛的药物中的用途。

2. 权利要求 1 的用途, 其中疼痛是慢性疼痛。

3. 权利要求 1 的用途, 其中疼痛是急性疼痛。

4. 权利要求 1 的用途, 其中疼痛是手术后疼痛。

5. 权利要求 1 的用途, 其中疼痛是神经性疼痛。

6. 2-[2-(4-(3- 甲基苯基)-1- 哌嗪基) 乙基]- 喹啉和阿片止痛药在制备用于治疗疼痛的药物中的用途。

7. 权利要求 6 的用途, 其中阿片止痛药选自阿片, 吗啡, 硫酸吗啡, 可待因, 磷酸可待因, 硫酸可待因, 二乙酰吗啡, 盐酸吗啡, 酒石酸吗啡, 盐酸二乙酰吗啡, 氢溴酸右美沙芬, 重酒石酸二氢可待因酮, 氢吗啡酮, 盐酸氢吗啡酮, 酒石酸羟甲左吗南, 盐酸羟吗啡酮, 盐酸氧可酮, 芬太尼, 哌替啶, 美沙酮, 丙氧芬, 右美沙芬, 二氢可待因酮, 氢吗啡酮, 左啡诺, 羟吗啡酮, 羟考酮, 左洛啡烷, 其盐, 和其混合物。

8. 权利要求 6 的用途, 其中疼痛是手术后疼痛。

9. 权利要求 6 的用途, 其中疼痛是神经性疼痛。

## 使用 centhaquin 的治疗法

[0001] 本申请是以下申请的分案申请：申请日：2010年04月29日；优先权日：2009年04月30日，申请号：2010800296725(PCT/US2010/032942)；发明名称：“使用 centhaquin 的新疗法”。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求申请日为2009年4月30日的美国临时专利申请61/174,257的申请日的权益，其全盘引入本文作为参考。

### 技术领域

[0004] 本发明涉及使用 centhaquin 的新疗法。在一种实施方案中，在高血压的治疗中 centhaquin 和内皮素拮抗剂一起使用。在第二实施方案中，在疼痛的治疗中 centhaquin 用作止痛药。在第三实施方案中，centhaquin 用于治疗复苏出血性休克 (resuscitative hemorrhagic shock)。

### 背景技术

[0005] 在全世界，高血压是折磨许多人的严重疾病。据统计三个美国人中的一个患有高血压，它们中差不多三分之一不知道该问题。除生活方式变化如锻炼、减肥和降低盐摄入，大部分抗高血压疗法包括使用一种或多种抗高血压药。除利尿剂、Ca<sup>++</sup>-通道阻断剂、肾上腺素能阻断剂、ACE抑制剂、和血管紧张素-II受体阻断剂外，中枢作用降血压药可用于治疗中度至严重高血压。

[0006] 可乐定，N-(2,6-二氯苯基)-4,5-二氢-1H-咪唑-2-胺，是广泛使用的抗高血压药，其通过刺激中枢  $\alpha$ 2-肾上腺素能受体介导其降血压效果 (Kobinger, 1978; Guyenet 和 Cabot, 1981)。相比于  $\alpha$ 1-肾上腺素受体，它具有约10倍的对  $\alpha$ 2-肾上腺素能受体的结合亲和性 (U'Prichard et al., 1977)。中枢作用抗高血压药用于治疗非受控的或难治的高血压。然而，由于双重作用，使用受限。当给予时，首先它们刺激周围  $\alpha$ 1-肾上腺素能受体，导致血管收缩和血压升高，和其次它们作用于中枢  $\alpha$ 2-肾上腺素能受体而抑制交感神经激动 (sympathetic drive)，导致血管舒张和血压降低。相比于周围作用，中枢作用占优，因此可乐定的总效果是血压降低。

[0007] centhaquin(2-[2-(4-(3-甲基(methy)苯基)-1-哌嗪基)乙基-喹啉)是中枢作用抗高血压药。centhaquin 的结构被确定 (Bajpai et al., 2000) 和 centhaquin 的构形由 X 射线衍射证实 (Carpy 和 Saxena, 1991)。尽管结构上不同于可乐定，但在麻醉的猫和大鼠中 centhaquin 产生类似于由可乐定看出的平均动脉压 (MAP) 和心率 (HR) 的下降 (Srimal 等, 1990)。在小鼠中，它具有 600mg/kg 腹膜内的 LD<sub>50</sub> 并且在不同的物种中产生了 MAP 的剂量依赖性降低。在乌拉坦麻醉的大鼠中在 MAP 和 HR 中 centhaquin (0.05 至 0.2mg/kg, iv) 产生了剂量依赖性降低。然而，在颈部切开的大鼠中，静脉内给予的 centhaquin 没有产生对 MAP 或 HR 的任何效果 (Gulati 等, 1991a)。鞘内给予 centhaquin 没有产生对 MAP 或 HR 的任何效果 (Gulati 等, 1991a)。十二指肠内给予 centhaquin (1.0 至 2.5mg/kg) 产生

MAP 的 40 至 50mmHg 降低,其没有受到用抗组胺药和阿托品预处理的影响 (Murthi 等,1976 ; Srimal 等,1990)。在自发性高血压大鼠中,cenchaquin(0.5 至 1.0mg/kg) 有效地降低 MAP 达 50 至 60mmHg。一天一次重复给予 cenchaquin 达 15 天没有产生任何增强作用或耐受性 (Murthi 等,1976)。

[0008] 发现 cenchaquin(0.1,1.0 和 10.0  $\mu$ g/mL) 产生了去甲肾上腺素 (NE) 的自发性释放和由氯化钾和二甲基苯基哌嗪鎓氯化物引起的抑制的去甲肾上腺素释放的初始增加、随后降低,这表明 cenchaquin 抑制去甲肾上腺素释放 (Bhatnagar 等,1985)。在大鼠中长期给药后,cenchaquin 和可乐定都产生了与在下丘脑和髓质中  $\alpha$ -肾上腺素能受体的向上调节有关的低血压和心动过缓 (Gulati 等,1991a ;Gulati 等,1991b)。有可能的是去甲肾上腺素在突触中的释放的降低导致  $\alpha$ -肾上腺素能受体的密度增加。

[0009] 血压的中枢性调节已经与内源性的 21-残基肽,内皮素 (ET) 有关。ET 在 20 年前在猪动脉上皮细胞中被发现,并且此后被认为是最有效的血管收缩剂之一 (Hickey 等,1985 ; Yanagisawa 等,1988)。存在有三个结构和功能上不同的异构肽 (ET-1,ET-2 和 ET-3),其又结合到三个不同的受体 (ET<sub>A</sub>,ET<sub>B1</sub>和 ET<sub>B2</sub>)。ET<sub>A</sub>和 ET<sub>B2</sub>受体位于血管平滑肌上,在此通过增加胞内 Ca<sup>++</sup>,它们产生血管收缩。另一方面,ET<sub>B1</sub>受体存在于血管内皮,其中通过一氧化氮和前列腺环素的合成和释放,它们介导血管舒张 (Sakamoto 等,1993 ;Shetty 等,1993)。静脉内给予 ET-1 产生血压的剂量依赖的、两相性改变,特征为短暂的低血压阶段,随后持续的高血压以及 HR 增加 (Ouchi 等,1989 ;kuwaki 等,1990)。ET 存在于脑,并且中枢性 ET 已经显示出调节交感神经系统 (Gulati 等,1997a ;Gulati 等,1997b)。

[0010] 先前发现 ET 可改变可乐定的心血管效应。在大鼠中用 ET 预处理产生对由可乐定诱发的低血压和心动过缓的拮抗效应。假定的机理是 ET 增加周围性  $\alpha$ -肾上腺素能受体的敏感性,导致可乐定的周围性高血压效果的增强作用 (Gulati,1992 ;Gulati 和 Srimal,1993)。研究已经表明在大鼠肠系膜动脉和豚鼠股动脉的刺激期间 ET 减弱加压响应和 [<sup>3</sup>H] 去甲肾上腺素释放,由此导致突触前抑制和交感神经紧张的随后增加 (Wiklund 等,1988 ; Tabuchi 等,1989)。因此可能的是由于突触前神经元传递的 ET-介导的抑制,可乐定的中枢性低血压和心动过缓效果可以被 ET 拮抗。

[0011] 已知的是存在着由 ET 造成的可乐定-诱发的心血管参数的显著改变并且少数 ET 拮抗剂已经在销售用于治疗肺动脉高血压并且一些在(销售)管道 (pipeline) 中。因此研究了 ET 和它们的拮抗剂对心血管参数的肾上腺素能抗高血压药-诱发的变化的影响。结构不同的化合物可乐定和 cenchaquin 已经显示出通过作用于中枢性和周围性  $\alpha$ -肾上腺素能受体具有对血压的类似的影响。本发明人因此探究了 ET 在调节可乐定和 cenchaquin 的周围性肾上腺素能影响中的参与。在大鼠中使用 ET 激动剂 (ET-1) 和拮抗剂 (BMS-182874 (ET<sub>A</sub>-特异性拮抗剂) 和 TAK-044 (ET<sub>A/B</sub>非特异性拮抗剂)) 进行研究来探查它们对 MAP,脉压 (PP) 和 HR 的可乐定和 cenchaquin 诱发的变化的影响。

[0012] 止痛药是通过中枢性作用来提高疼痛阈值 (优选地在没有干扰意识或改变其它感觉功能的情况下) 而减轻疼痛的药剂。已经阐述了止痛药缓和疼痛 (即,提高疼痛阈值) 的机理。

[0013] National Center for Health Statistics(2006) 估计大于四分之一的美国人 (26%) 超过 20 岁,和大于 76.5 百万美国人,报道他们已经具有在持续时间方面持续大于 24

小时的任何类型的疼痛的问题并且超过 191 百万急性疼痛事件在美国发生。阿片样物质是最常使用的止痛药用于临床管理急性和慢性疼痛。存在着各种与长期使用阿片样物质有关的副作用,包括耐受性的形成,这导致不适当的疼痛减轻。存在着若干被设计用于增强止痛和有效地管理疼痛的现有方案,包括非甾类抗炎药 (NSAID),另外的阿片样物质,和非阿片样物质以及阿片样物质疗法。尽管这些方法提供了症状的减轻,但它们对有助于耐受性的形成和造成毒性、依赖性和上瘾的显著风险的基础机理具有很小的影响。

[0014] 因而在本领域中存在着这样的需要,识别药剂或药剂的组合,其降低对阿片样物质止痛药的耐受性和减低疼痛症状,并且可作为有效的非阿片样物质止痛药。

### 发明内容

[0015] 本发明涉及给予需要其的个体内皮素拮抗剂以及 centhaquin 或其它肾上腺素能剂。更具体地说,给予 centhaquin 或其它肾上腺素能剂以及内皮素拮抗剂增强了 centhaquin 的抗高血压效应。

[0016] 根据本发明有用的肾上腺素能剂包括但不限于 centhaquin,可乐定,胍法辛,胍那苄, guanoxbenz, 甲基多巴,哌唑嗪,坦洛新,多沙唑嗪,特拉唑嗪,酚妥拉明,酚苄明,米氮平,和其混合物。在高血压的治疗中,肾上腺素能剂和内皮素拮抗剂一起给予。肾上腺素能剂可以单独地或以任何组合,连同一种或多种内皮素拮抗剂,给予来治疗高血压。

[0017] 本发明的另一方面是将作为止痛药的 centhaquin 给予需要其的个体来治疗疼痛。在本发明的另一方面中,在疼痛的治疗中,将 centhaquin 与阿片止痛药联合给予 (coadministered) 需要其的个体。

[0018] 本发明的又一方面是将 centhaquin 给予需要其的个体来治疗复苏出血性休克 (resuscitative hemorrhagic shock)。

[0019] 本发明的又一个方面是提供人药用使用的制品,其包括 (a) 包装插页 (package insert), (b) 容器,和或者 (c1) 包括 centhaquin 的包装的组合物或者 (c2) 包括内皮素拮抗剂的包装的组合物和包括 centhaquin 的包装的组合物。包装插页 (package insert) 包括或者用于治疗疼痛或复苏出血性休克 (resuscitative hemorrhagic shock) (c1) 或者用于治疗高血压 (c2) 的说明书。

[0020] 本发明的这些及其他方面将从本发明的以下具体实施方式变得显见。

### 附图说明

[0021] 图 1 包含了将 10, 30, 和 90ug/kg 的可乐定给予大鼠的平均血压 (mmHg) vs. 时间 (min), 脉压 (mmHg) vs. 时间 (min), 和心率 (心跳次数 /min) 的曲线图;

[0022] 图 2 包含了单独地和与 100, 300, 或 900  $\mu$ g/kg 的 ET-1 一起给予可乐定 (10  $\mu$ g/kg) 的平均血压 (mmHg) vs. 时间 (min), 脉压 (mmHg) vs. 时间 (min), 和心率 (心跳次数 /min) 的曲线图;

[0023] 图 3 包含了给予可乐定 (10  $\mu$ g/kg) 和与 TAK-044 或 BMS-182874 一起给予的平均血压 (mmHg) vs. 时间 (min), 脉压 (mmHg) vs. 时间 (min), 和心率 (心跳次数 /min) 的曲线图;

[0024] 图 4 包含了单独地和与 ET-1, 哌唑嗪, 和 centhaquin 或 clonidine 一起给予可乐

定 (10  $\mu$ g/kg) 的平均血压 (mmHz) vs. 时间 (min), 脉压 (mmHz) vs. 时间 (min), 和心率 (心跳次数/min) 的曲线图;

[0025] 图 5 包含了给予 0.05, 0.15, 和 0.45mg/kg 的 centhaquin 的平均血压 (mmHz) vs. 时间 (min), 脉压 (mmHz) vs. 时间 (min), 和心率 (心跳次数/min) 的曲线图;

[0026] 图 6 包含了单独地和与 100, 300, 和 900mg/kg 的 ET-1 一起给予 centhaquin (0.15mg/kg) 的平均血压 (mmHz) vs. 时间 (min), 脉压 (mmHz) vs. 时间 (min), 和心率 (心跳次数/min) 的曲线图;

[0027] 图 7 包含了单独地和与 TAK-044 或 BMS182874 一起给予 centhaquin (0.15mg/kg) 的平均血压 (mmHz) vs. 时间 (min), 脉压 (mmHz) vs. 时间 (min), 和心率 (心跳次数/min) 的曲线图;

[0028] 图 8 包含了单独地或与 ET-1 (300mg/kg) 和 哌唑嗪 (0.1mg/kg) 一起给予 centhaquin (0.15mg/kg) 的平均血压 (mmHz) vs. 时间 (min), 脉压 (mmHz) vs. 时间 (min), 和心率 (心跳次数/min) 的曲线图;

[0029] 图 9 包含了赋形剂和 centhaquin (0.1, 0.3, 或 0.9mg/kg) 的甩尾潜伏期 (秒) vs. 时间 (min) 的曲线图;

[0030] 图 10 包含了用赋形剂, centhaquin, 吗啡, 或 centhaquin 和吗啡处理的大鼠的温度 ( $^{\circ}$ C) vs. 时间 (min) 的曲线图;

[0031] 图 11-13 包含了用赋形剂, centhaquin, 吗啡, 或 centhaquin 和吗啡处理的大鼠的甩尾潜伏期 (秒) vs. 时间 (min) 的曲线图;

[0032] 图 14A 包含了显示在 centhaquin 处理的 1 小时后大鼠脑中的 ET<sub>A</sub>受体表达的免疫印迹;

[0033] 图 14B 包含了如通过密度测定法评价的归一化至  $\beta$ -肌动蛋白的 ET<sub>A</sub>受体的表达的倍数变化的柱状图;

[0034] 图 15 包含了在出血性休克模型中单独地或与 centhaquin 一起用林格 (氏) 乳酸盐复苏的大鼠中的血乳酸盐 (mmol/L) vs. 时间 (min) 的曲线图;

[0035] 图 16 包含了在出血性休克模型中单独地或与 centhaquin 一起用林格 (氏) 乳酸盐复苏的大鼠中的标准碱缺失 (standard basis deficit) (mEq/L) vs. 时间 (min) 的曲线图;

[0036] 图 17 包含了显示在出血性休克模型中单独地或与 centhaquin 一起用林格 (氏) 乳酸盐复苏的大鼠中的存活时间 (min) 的柱状图;

[0037] 图 18 和 19 包含了用林格 (氏) 乳酸盐复苏的大鼠的压力-容积环; 和

[0038] 图 20 包含了用林格 (氏) 乳酸盐和 centhaquin 复苏的大鼠的压力-容积环。

### 具体实施方式

[0039] 本发明涉及给予 centhaquin 或其它肾上腺素能剂和内皮素拮抗剂来治疗高血压。本发明还涉及给予 centhaquin 来治疗疼痛或复苏出血性休克 (resuscitative hemorrhagic shock)。

[0040] 本文中所述的方法受益于在高血压的治疗中使用肾上腺素能剂, 如 centhaquin, 和内皮素拮抗剂。可以同时地或顺序地给予肾上腺素能剂和内皮素拮抗剂来实现期望的效

果。

[0041] 对本文中公开的本发明的目的而言,术语“治疗”包括降低、改善或消除疼痛、高血压或复苏出血性休克(resuscitative hemorrhagic shock)和各个状况的相关症状。因而,术语“治疗”包括医学治疗性给药和,在疼痛的治疗中,预防性给药。

[0042] 术语“容器(container)”是指因此适用于储存、运输、分配和/或处理药物产品的任何接受器(receptacle)和封闭体(closure)。

[0043] 术语“插页”是指伴随产品的信息,其提供了如何给予产物的说明书以及使得医生、药剂师和患者做出关于产品使用的理性决断所需要的安全和效力数据。包装插页(package insert)通常被认为是药物产品的“标签(label)”。

[0044] 术语“肾上腺素能剂”是指这样的化合物,其刺激了交感神经系统,例如,模拟去甲肾上腺素和肾上腺素的效果。如本文中使用的,术语“肾上腺素能剂”是单数的或复数的。

[0045] ET是极有效的内皮源血管收缩因子(Hickey等,1985),其被分离、序列化和克隆(Yanagisawa等,1988)。内皮素是21氨基酸,非常有效的血管收缩肽,具有两个二硫醚键。通过由内皮素-转化酶将前内皮素原酶促裂解为内皮素原(proendothelin),然后为内皮素,生物学产生内皮素。通过结合到细胞表面受体,其是偶联至G-蛋白的7-跨膜受体,ET施加了生物效果。存在两种不同类型的内皮素受体:(a)ET-1选择性的ET<sub>A</sub>受体,主要存在于血管平滑肌上和负责血管收缩,和(b)非选择性ET<sub>B</sub>受体,主要存在于血管内皮中和负责血管舒张。

[0046] ET-1的血管收缩效果主要由G蛋白偶联的ET<sub>A</sub>受体介导。由前列腺、转移癌和CNS,还以高浓度产生ET-1。CNS中的ET由内皮细胞和非内皮细胞,如神经元,星形细胞,和胶质细胞产生。

[0047] 脑中的ET和它的结合部位的总体分布表明,除是血管收缩剂外,其可以作为CNS中的重要神经肽(Gulati等,1992)。内皮素(Et)受体拮抗剂,特别地选择性ET<sub>A</sub>或平衡拮抗剂ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub>,代表了用于如充血性心力衰竭(CHF)和肺动脉高血压的疾病的的治疗领域。BQ-123和BMS-182874是ET<sub>A</sub>受体的特异性拮抗剂(Stein等,1994)。内皮素拮抗剂对肺血管系统和右心具有深刻的影响,然而ACE抑制剂主要地影响周围血管和左心。

[0048] 若干研究表明中枢性ET受体主要地是ET<sub>B</sub>亚型的。大鼠大脑星形细胞已经显示出主要地表达ET<sub>B</sub>类型的受体并且还发现胶质细胞强烈地表达ET<sub>B</sub>受体mRNA。然而,中枢性给予高选择性的ET<sub>B</sub>受体激动剂,IRL-1620,没有对心血管系统产生任何影响,并且已经显示出中枢性给予的ET-1的全身性和区域性循环影响通过ET<sub>A</sub>受体介导(Gulati等,1995; Rebellio等,1995)。

[0049] 脑室内给予ET-1在平均动脉血压(BP)中产生短暂的上升、随后持续的降低。加压效应伴随有肾交感神经活性和儿茶酚胺和精氨酸-加压素的血浆水平的增加。

[0050] 还已经显示出中枢性给予ET-1的影响通过活化交感神经系统来介导,因为这些影响通过神经节阻断剂减弱。脑池内给予ET-1引起BP,肾交感神经活性,和膈神经活性的短暂增加。BP的随后的降低伴随有肾交感神经活性和膈神经活性的降低。观察到用酚苄明预处理抑制了加压响应的中枢性ET-1诱发的增加(Ouchi等,1989),进一步暗示了交感神经系统在初始加压阶段中的积极参与。

[0051] 在本发明中使用的内皮素拮抗剂可以是本领域已知的任何内皮素受体拮抗剂。如本文中使用的,术语“内皮素受体拮抗剂”和“内皮素拮抗剂”是同义的并且可互换地使用,并且是指给予一种或多种拮抗剂。内皮素是有效的血管收缩剂。内皮素拮抗剂用于治疗急性循环功能不全,充血性/慢性心力衰竭,肺动脉高压,肺水肿,蛛网膜下出血,慢性阻塞性肺病,心肌梗塞,急性脑缺血,急性冠状动脉综合征,急性肾衰竭,肝手术中的术后疗法,和前列腺癌。当给予患者内皮素拮抗剂时,预期没有副作用。

[0052] 优选的 ET 拮抗剂是对内皮素 A (ET<sub>A</sub>) 受体选择性的拮抗剂或者是平衡 ET<sub>A</sub>/内皮素 B (ET<sub>B</sub>) 拮抗剂。这样的 ET 拮抗剂在本文中在附录 A 和 B 中阐述。然而,内皮素 B 拮抗剂和杂类内皮素拮抗剂,如在本文中在附录 C 和 D 中阐述,还可被用于本发明的组合物或方法。另外的有用的内皮素拮抗剂可见于美国专利申请公开 Nos. US 2002/0082285 和 US 2003/0232787,和 Wu, Exp. Opin. Ther. Patents (2000), 10(11), 第 1653-1668 页,每一个全盘作为参考结合在本文中。

[0053] 可用于本发明的内皮素拮抗剂的特定的实例包括但不限于阿曲生坦,替唑生坦,波生坦, sitaxsentan, 恩拉生坦, BMS-207940 (Bristol-Myers Squibb), BMS-193884, BMS-182874, J-104132 (Banyu Pharmaceutical), VML 588/Ro 61-1790 (Vanguard Medica), T-0115 (Tanabe Seiyaku), TAK-044 (Takeda), BQ-788, BQ123, YM-598, LU 135252, PD 145065, A-127722, ABT-627, A-192621, A-182086, TBC3711, BSF208075, S-0139, TBC2576, TBC3214, PD156707, PD180988, ABT-546, ABT-627, Z1611, RPR118031A, SB247083, SB217242, S-Lu302872, TPC10950, SB209670, 和其混合物。

[0054] BQ123 是特异性内皮素 A 拮抗剂,并且是环 (-D-Trp-D-Asp-Pro-D-Val-Leu-) 的钠盐。BQ-788 是特异性内皮素 B 拮抗剂,并且是 N-顺-2,6-二甲基哌啶子基羰基-L-γ-甲基亮氨酸-D-1-甲氧基羰基色氨酸基 (tryptophanyl)-DNIe 的钠盐 (参见 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 第 4892-4896 页 (1994))。

[0055] 除常规的内皮素拮抗剂外,抑制内源性内皮素的形成的化合物还可在本发明中被用作内皮素拮抗剂。这样的化合物是有用的,因为它们防止内皮素形成,并且因此降低内皮素受体的活性。一类这样的化合物是内皮素转化酶 (ECE) 抑制剂。

[0056] 有用的 ECE 抑制剂包括但不限于 CGS34225 (即, N-((1-((2(S)-(乙酰基硫基)-1-氧代戊基)-氨基)-1-环戊基)-羰基-S-4-苯基苯基-丙氨酸甲酯)和磷酸阿米酮 (phosphoramidon) (即, N-(α-吡喃鼠李糖基氧基羟基氧磷基)-Leu-Trp)。

[0057] 进行测试以便举例说明内皮素拮抗剂对给予哺乳动物 (包括人) 的肾上腺素能剂如可乐定和 centhaquin 的影响。还进行测试以便举例说明 centhaquin 对止痛和复苏出血性休克 (resuscitative hemorrhagic shock) 的影响。

[0058] 测试和数据显示出肾上腺素能剂如 centhaquin 或可乐定,和内皮素拮抗剂的组合可以在治疗高血压的方法中被给予哺乳动物。测试和数据还显示在治疗疼痛的方法中,以及在治疗复苏出血性休克 (resuscitative hemorrhagic shock) 的方法中,单独地或与阿片止痛药一起,可以将 centhaquin 给予哺乳动物。肾上腺素能剂和内皮素拮抗剂,或 centhaquin 单独地,可以被配制在合适的赋形剂中以便口服,或肠胃外给药。这样的赋形剂是本领域众所周知的。活性剂 (例如 centhaquin 和,在一些实施方案中,内皮素拮抗剂和肾上腺素能剂) 典型地以如下的数量单独地或组合地存在于这样的组合物中:约 0.1% 至约

75wt%。

[0059] 对于本文中公开的实施方案的每一个来说,含本发明的活性剂的药物组合物适于给予人或其它哺乳动物。典型地,药物组合物是无菌的,并且不包含有毒的、致癌的、或致突变的化合物,当给予时其会引起不良反应。

[0060] 使用如上所述的活性剂,或者以其生理学可接受的盐或溶剂化物的形式,可以实现本发明的方法。活性剂、盐、或溶剂化物可以以纯的化合物的形式,或者以含任一(either)或两种(both)实体的药物组合物的形式给予。

[0061] 通过任何合适的途径,例如通过口服,含剂,吸入,舌下,直肠,阴道,脑池内通过腰椎穿刺,经尿道,鼻内,经皮(percutaneous),即,经皮(transdermal),或肠胃外(包括静脉内,肌内,皮下,和冠状动脉内)给予,可以给予活性剂。使用针和注射器,或使用高压技术,如 POWDERJECT™,可以实现肠胃外给药。在疼痛的发作前,在疼痛的发作期间,或在疼痛的发作后可以进行活性剂的给予。

[0062] 药物组合物包括以下的那些,其中活性成分以有效量给予以便实现其意欲目的。更具体地说,“治疗有效量”是指有效消除或减轻疼痛或高血压的数量。确定治疗有效量完全在本领域技术人员能力范围之内,特别地根据本文中提供的详细公开内容。

[0063] “治疗有效的剂量”是指导致实现期望的效果的活性剂的数量。通过在细胞培养或实验动物中的标准药物程序,例如确定 LD<sub>50</sub>(使群体的 50% 致死的剂量)和 ED<sub>50</sub>(在群体的 50% 中治疗有效的剂量),可以确定这样的活性剂的毒性和治疗效能。毒性与治疗效果之间的剂量比是治疗指数,其表示为 LD<sub>50</sub>与 ED<sub>50</sub>之间的比例。高治疗指数是优选的。获自这样的数据的数据可被用于制定用于人的剂量的范围。活性剂的剂量优选地位于在包括 ED<sub>50</sub>、毒性小或无毒性的循环浓度的范围内。取决于所使用的剂型,和采用的给药途径,剂量可在该范围内变化。

[0064] 确切的制剂、给药途径,和剂量由个体医师根据患者的状况来确定。剂量数量和间隔可以个体地被调节而提供足以保持治疗效果的活性剂的水平。

[0065] 所给予的活性剂的量取决于被治疗的受试者,受试者的体重,痛苦的严重程度,给药方式,和主治医师的判断。

[0066] 特别地,对于在高血压的治疗性疗法中给予人来说,对于一般的成年患者(70kg),肾上腺素能剂和内皮素拮抗剂的口服剂量,各个地通常为每日约 0.01 至约 200mg,典型地分为每日两至三次。因而,对于典型的成年患者来说,单个片剂或胶囊包含在合适的药用可接受的赋形剂或载体中的约 0.1 至约 200mg centhaquin 和约 0.1 至约 50mg 内皮素拮抗剂,以便以单或多剂量的形式,每天给予一次或若干次。根据需要,用于静脉内,含剂,或舌下给予的剂量典型地为每一单剂量约 0.1 至约 10mg/kg。实际上,医生确定最适于个体患者的实际的剂量给药方案,并且剂量随特定患者的年龄、重量和响应而变化。上述剂量示范了平均情况,但是可以存在个体情况,其中更高或更低的剂量是有益的,并且这在本发明的范围内。

[0067] 本发明的活性剂可以单独地或者以与就意欲的给药途径和标准药物实践选择的药物载体混合地给予。因此,根据本发明使用的药物组合物可以按照常规方式使用一种或多种生理学可接受的载体配制,所述载体包括有助于将活性剂加工成可以药用的制剂的赋形剂和助剂。

[0068] 这些药物组合物可以以常规方式制造,例如通过常规的混合,溶解,粒化,制备糖锭,乳化,封装,包埋,或冻干方法。合适的制剂取决于选择的给药途径。当口服给予治疗有效量的活性剂时,组合物典型地是片剂,胶囊,粉末,溶液,或酞剂的形式。当以片剂形式给予时,组合物可另外包含固体载体,如明胶或辅料。片剂,胶囊,和粉末包含约 5% 至约 95% 的本发明的活性剂,和优选地约 25% 至约 90% 的本发明的活性剂。当以液体形式给予时,可以添加液体载体,如水,石油,或动物或植物源的油。液体形式的组合物可进一步包含生理盐水溶液,葡萄糖或其它糖溶液,或二醇。当以液体形式给予时,组合物包含约 0.5% 至约 90wt% 的活性剂,和优选地约 1% 至约 50% 的活性剂。

[0069] 当通过静脉内,经皮 (cutaneous),或皮下 (subcutaneous) 注射给予治疗有效量的活性剂时,组合物的形式是无热原的、肠道外可接受的含水溶液。适当考虑 pH、等渗性、稳定性等的情况下,制备这样的肠道外可接受的溶液,在本领域技术的范围之内。用于静脉内,经皮 (cutaneous),或皮下 (subcutaneous) 注射的优选的组合物典型地,除本发明的化合物外,包含等渗赋形剂。

[0070] 合适的活性剂可以容易地与本领域众所周知的药用可接受的载体组合。这样的载体能够使活性剂配制成片剂、丸剂、糖锭、胶囊、液体、凝胶、糖浆、浆液、悬浮液等,以便受治疗的患者口服摄取。通过将活性剂与固体赋形剂混合,任选研磨所得混合物,如果期望的话,加入适当助剂后,加工颗粒混合物,得到片剂或糖锭芯,从而可以获得口服用的药物制剂。合适的赋形剂包括,例如,填料和纤维素制剂。如果期望的话,可以添加崩解剂。

[0071] 可以配制活性剂以便通过注射(例如弹丸注射或连续输注)胃肠外给药。注射制剂可以以单位剂型例如在安瓿或以多剂量容器的形式提供,并且加有防腐剂。组合物的呈现形式可以是诸如在油性或水性赋形剂中的悬浮液、溶液或乳液形式,并且可包含诸如悬浮剂、稳定剂和 / 或分散剂的配方试剂。

[0072] 胃肠外给药的药物组合物包括水溶性形式的活性剂的含水溶液。另外,活性剂的悬浮液可以制成合适的油性注射悬浮液。合适的亲脂溶剂或赋形剂包括脂肪族油或合成脂肪酸酯。水性注射悬浮液可以含有增加悬浮液粘度的物质。任选地,悬浮液还可以含有适当的稳定剂或提高化合物的溶解性并且允许制备高浓度溶液的试剂。备选地,本发明组合物可以是粉末形式,临用前使用合适赋形剂如无菌无热原的水配制。

[0073] 活性剂也可在直肠组合物中配制,如栓剂或保留灌肠,例如包含常规的栓剂底物 (bases)。除如前所述的制剂外,活性剂还可以配制成长效型制剂 (depot preparation)。这样的长效的制剂可以通过植入(例如,皮下或肌肉植入)或通过肌肉注射给予。因此,例如,活性剂可以用合适的聚合物或疏水性材料(例如配制成在可接受油中的乳液)或离子交换树脂一起配制,或配制成微溶性衍生物,例如微溶性盐。

[0074] 特别地,活性剂可以以含赋形剂如淀粉或乳糖的片剂的形式,或以胶囊或胚珠 (ovules),单独地或以与赋形剂混合的形式,或以含芳香剂或着色剂的酞剂或悬浮液的形式口服、面颊、或舌下给予。这样的液体制剂可以用药用可接受的添加剂,如悬浮剂制备。活性剂还可以肠道外,例如,静脉内,肌肉内,皮下,鞘内,脑池内,或冠状动脉内注射。对于肠胃外给药来说,活性剂最好以无菌的含水溶液的形式使用,无菌的含水溶液可以包含其它物质,例如,盐,或单糖,如甘露醇或葡萄糖,从而引起溶液与血液等渗。

[0075] 对于兽医使用来说,根据正常的兽医实践,以适当可接受的制剂的形式给予活性

剂。兽医可以容易地确定最适合于特定动物的定量给药方案和给药途径。

[0076] 作为中枢作用抗高血压药的肾上腺素能剂

[0077] 可乐定是一种抗高血压药,其通过中枢  $\alpha_2$ -肾上腺素能受体起作用来降低平均动脉压 (MAP),但它还作用于周围性  $\alpha$ -肾上腺素能受体 ( $\alpha$ -ARs) 来产生血管收缩。内皮素 (ET) 已经显示出调节周围肾上腺素能受体的作用。本测试显示了 ET 参与可乐定和 centhaquin 的心血管效应。可乐定 (10, 30, 和 90  $\mu$ g/kg, i. v.) 产生平均动脉压 (MAP), 脉压 (PP) 的剂量依赖性下降, 和心率 (HR) 的降低。用 ET-1 处理 (100, 300 和 900ng/kg, i. v.), 显著地以剂量依赖性方式减弱可乐定 (10  $\mu$ g/kg, i. v.)- 诱发的 MAP 的降低。在用高剂量的 ET-1 (900ng/kg, i. v.) 处理的大鼠中, 可乐定产生了 MAP 的 42.58% 增加, 相比于未处理的大鼠。在用 ET-1 (900ng/kg, i. v.) 处理的大鼠中, 可乐定 (10  $\mu$ g/kg, i. v.) 产生了 HR 的 37.42% 增加, 相比于未处理的大鼠。相比于未处理的大鼠, ET<sub>A/B</sub>拮抗剂, TAK-044 (1mg/kg, i. v.), 和 ET<sub>A</sub>拮抗剂, BMS-182874 (9mg/kg, i. v.) 分别地增强了可乐定的低血压效应达 17.68% 和 4.81%。

[0078] 还研究了 ET 与 centhaquin 的相互作用, 其产生了类似于可乐定的 MAP 的降低。centhaquin (0.05, 0.15, 和 0.45mg/kg, i. v.) 产生 MAP 的剂量依赖性下降, 和 HR 的降低。它没有影响动脉血 pH, pO<sub>2</sub> 和 pCO<sub>2</sub>。没有改变血浆 ET-1 水平。用 ET-1 处理 (100, 300, 和 900ng/kg) 显著地以剂量依赖性方式减弱 centhaquin (0.15mg/kg, i. v.)- 诱发的 MAP 的降低。在用 900ng/kg 剂量的 ET-1 处理的大鼠中, centhaquin 产生了 MAP 的 33.48% 增加, 相比于未处理的大鼠。在用 ET-1 处理的大鼠中, centhaquin 产生了 HR 的 21.44% 增加, 相比于未处理的大鼠。centhaquin 的低血压效应显著地增强, 在用 TAK-044 (1mg/kg) 处理的大鼠中达 16.48%, 或者在用 BMS-182874 (9mg/kg) 处理的大鼠中达 30.67%, 相比于未处理的大鼠。centhaquin- 诱发的心动过缓显著地增强, 在用 TAK-044 处理的大鼠中达 12.74%, 或者在用 BMS-182874 处理的大鼠中达 29.00%, 相比于未处理的大鼠。

[0079] 哌唑嗪,  $\alpha$ -肾上腺素能受体拮抗剂, 预处理 (0.1mg/kg, i. v.) 完全阻断可乐定, 以及 centhaquin 的心血管效应的 ET-1 诱发的变化。因此推断出 ET 调节血管效应肾上腺素能受体, 导致可乐定和 centhaquin 的心血管效应的改变。这是首次表明 ET 拮抗剂可以通过增加血管肾上腺素能受体对 centhaquin 的缩肌效应的响应, 增强可乐定和 centhaquin, 即肾上腺素能剂, 的抗高血压效应。ET 拮抗剂与可乐定或 centhaquin, 或其它肾上腺素能剂的组合因此是治疗高血压的有用的选择。

[0080] 材料和方法

[0081] 动物

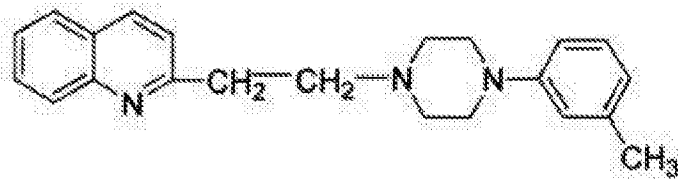
[0082] 将重 250 至 300g 的雄性 Sprague-Dawley 大鼠 (Harlan, Indianapolis, IN) 放置至少 4 天, 然后用于具有如下条件的房间中: 受控温度 (23 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C), 湿度 (50 $\pm$ 10%) 和照明 (上午 6:00 至下午 6:00)。使食物和水连续可得。由机构动物护理和使用委员会 (Institutional Animal Care and Use Committee) 批准实验程序的动物护理和使用。全部麻醉和手术程序遵循由动物护理委员会 (Animal Care Committee) 制定的指南。

[0083] 药物和化学品

[0084] centhaquin :2-[2-(4-(3-甲基 (methy) 苯基)-1-哌嗪基) 乙基-噻啉 (Central Drug Research Institute, Lucknow, India), 可乐定, 哌唑嗪, 乌拉坦 (Sigma-AldrichSt

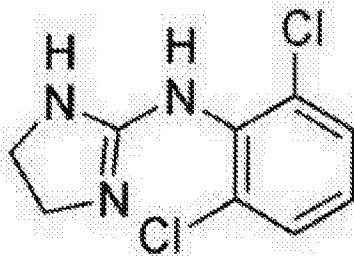
Louis, MO, USA), BMS-182874 盐酸盐 : (5- 二甲基氨基 )-N-(3,4- 二甲基 -5- 异噁唑基 )-1- 萘磺酰胺盐酸盐), ET<sub>A</sub>- 特异性拮抗剂 (Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA); TAK-044 : 环 [D-α-天冬氨酰-3-[(4- 苯基哌嗪-1-基) 羰基]-L-丙氨酰-L-α-天冬氨酰-D-2-(2- 噻吩基) 甘氨酰-L-Leu-Cyl-D-色氨酰] 二钠 (tryptophyliddisodium) 盐), ET<sub>A/B</sub> 非特异性拮抗剂 (Takeda Chemical Industries, Osaka, 日本), 内皮素-1 (Research Biochemicals International, Natick, MA, 美国), 内皮素-1 酶免疫测定分析 (EIA) 试剂盒 (Catalog No. 900-020A, Assay Designs, Inc., Ann Arbor, MI, 美国)。所使用的其它试剂是最高等级的市售可得品。

[0085]



[0086] centhaquin

[0087]



[0088] 可乐定

[0089] 在麻醉的大鼠中药物的心血管响应的确定

[0090] 大鼠用乌拉坦 (1.5g/kg i.p.) 麻醉并且准备用于确定血液动力学参数 (Gulati 和 Srimal, 1993; Gulati 等, 1997b)。麻醉的大鼠被刮毛和固定以便准备用于套管插入术。在股静脉和动脉以上做 2-3cm 切口, 并且将血管剖开和清洗。对左侧股静脉插套管 (PE-50 输液管, Clay Adams, Parsipanny, NJ) 并且固定以便药物给予。在左侧股动脉中插入具有在尖端侧装的单压力传感器的超微型压力传感器 SPR-320 (2F 聚氨酯) (Millar Instruments, Houston, TX) 以获得血液动力学信号。用 Viking 连接器 (AEC-10C) 将压力传感器连接到桥式放大器 (ML221 Bridge Amp; AD Instruments, Mountain View, CA, USA) 并且使用 Millar PowerLab16/30 数据获取系统 (AD Instruments, Mountain View, CA, USA), 以 1000S<sup>-1</sup> 的采样率, 连续地获得信号。用 LabChart-5.00 软件程序 (Millar Instruments) 测定和分析 MAP, HR, 和 PP。在完成实验后, 用较高剂量的乌拉坦 (3gm/kg) 使动物安乐死。

[0091] 在大鼠血浆中测定 ET-1 水平

[0092] 为分析 ET-1 水平的变化, 在药物治疗前和在药物治疗后 1 小时, 从麻醉的大鼠通过右侧股动脉 (在药物治疗后) 取出血样, 并且收集到含抑肽酶 (500KIU/ml 的血液) 的冷却的 EDTA 管 (1mg/ml 血液) 中。在 0°C 以 1,600×g 离心分离血样 15 分钟并且在 -70°C 储存

分离的血浆直到分析。使用分析设计内皮素-1酶免疫测定分析试剂盒 (Assay's Design's Endothelin-1 Enzyme Immunometric Assay Kit) (Nowicki 等, 2005 ; Brondani 等, 2007) 估计 ET-1 水平。简而言之, 将血浆样品和标准样品添加到涂布有对 ET-1 特异性的单克隆抗体的孔中。然后在 24 小时培养后洗涤板, 在板上仅仅留下结合的 ET-1。然后添加 ET-1 的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的单克隆抗体的溶液, 其结合到在板上捕获的 ET-1。培养板 30 分钟, 然后洗涤而除去过量的 HRP 标记的抗体。添加 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺 (TMB) 底物的溶液, 其形成蓝色颜色, 当通过 HRP 催化时。添加盐酸 (1N), 来终止底物反应, 和使用 DTX 800 Multimode 检测器在 450nm 读取所得的黄色颜色。用 Multimode Detection Software (Beckman Coulter, Inc., Harbor Boulevard, Fullerton, CA) 分析数据。测量的光密度与 ET-1 的浓度成正比。

#### [0093] 血液气体分析

[0094] 在药物给予前后监控动脉血 pH,  $pO_2$ ,  $pCO_2$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ , 和乳酸盐。使用血液气体取样注射器 (Innovative Medical Technologies, Inc. Leawood, KS) 从动脉插管中取出血样并且使用 GEM Premier 3000 装置 (Instrument Laboratory, Lexington, MA) 进行分析。

#### [0095] 测定对腹部主动脉环的可乐定响应

[0096] 从乌拉坦 (1.5g/kg, i. p.) 麻醉的大鼠分离和解剖出腹主动脉并且将其转移到 Krebs 碳酸氢盐缓冲液 pH7.4 (组成, 以 mM 计, NaCl, 112.0 ; KCl, 4.7 ;  $KH_2PO_4$ , 1.2 ;  $MgSO_4$ , 1.2 ;  $CaCl_2$ , 2.5 ;  $NaHCO_3$ , 25.0 ; 葡萄糖, 11.0), 连续供应 95%  $O_2$  和 5%  $CO_2$ , 在  $37 \pm 1^\circ C$ 。将组织切成环形段 (3mm 长) 并且使用 10mm Radnoti 玻璃环形支架装在器官浴中。当切割和安装所述环形段时, 要格外小心以防止内皮层的损失。通过施加 2g 的张力, 在每 15 分钟后定期缓冲液更换, 将组织平衡 45 分钟。用 100mM KCl 使血管预收缩来测定生存性。使用 Radnoti 8 单元组织浴 (Radnoti Glass Technology, Monrovia, CA) 和与 Grass P7D 多道记录仪耦联的力传感器, 测量主动脉环的可乐定 - 诱发的收缩。在有或者没有 ET-1 (4nM) 处理的情况下, 对于 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 和 10  $\mu M$  的可乐定记录剂量响应并且计算  $ED_{50}$  值。在第 1 组: 赋形剂 + 可乐定 (0.25 至 10  $\mu M$ ); 和第 2 组: ET-1 (4nM) + 可乐定 (0.25 至 10  $\mu M$ ) 中, 进行实验, 在每组中使用 (n=6) 大鼠。

#### [0097] 测定在脑和腹主动脉中的 $ET_A$ r 表达

[0098] 在 RIPA 缓冲液 (20mM Tris-HCl pH 7.5, 120 mM NaCl, 1.0% Triton X100, 0.1% SDS, 1% 脱氧胆酸钠, 10% 甘油, 1mM EDTA 和 1X 蛋白酶抑制剂, Roche) 中均化由赋形剂和可乐定处理的大鼠分离的脑和腹主动脉。以溶解形式分离蛋白并且由 Folin-Ciocalteu's 酚试剂测量浓度。溶解蛋白 (10  $\mu g$ ) 在 Laemmli 样品缓冲液 (Bio-Rad) 中变性, 在 10% SDS-PAGE 中拆分 (resolved) 并且转移到硝化纤维膜上, 随后用 5% BSA (w/v) / TBST (10mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) 阻塞膜。用兔多克隆的抗  $ET_A$  抗体 (1:1000), 随后 HRP- 共轭的二次抗体 (1:1000) 培养膜并且通过 ECL Plus 蛋白质印迹法检测系统 (GE Healthcare, Buckinghamshire UK) 显现。用  $\beta$ -肌动蛋白初次抗体 (1:1000) 再探测剥离的膜以便蛋白负荷控制。

#### [0099] 研究设计

[0100] 在手术程序后, 使动物稳定至少 20 分钟。

[0101] 对可乐定的研究:

- [0102] 进行以下研究来测定 ET 参与可乐定诱发的心血管 (MAP, HR, 和 PP) 效应。
- [0103] 研究 1 :测定可乐定的心血管效应 (N=4)。
- [0104] 第 1 组 :可乐定 (10  $\mu$ g/kg, i. v.) ;第 2 组 :可乐定 (30  $\mu$ g/kg, i. v.) ;和第 3 组 :可乐定 (90  $\mu$ g/kg, i. v.)
- [0105] 研究 2 :测定 ET-1 对可乐定 - 诱发的心血管效应的影响 (N=4)。
- [0106] 第 1 组 :ET-1 (100ng/kg) ;第 2 组 :ET-1 (300ng/kg) ;第 3 组 :ET-1 (900ng/kg) ;第 4 组 :赋形剂 (1ml/kg)+可乐定 (10  $\mu$ g/kg) ;第 5 组 :ET-1 (100ng/kg)+可乐定 (10  $\mu$ g/kg) ;第 6 组 :ET-1 (300ng/kg)+可乐定 (10  $\mu$ g/kg) ;和第 7 组 :ET-1 (900ng/kg)+可乐定 (10  $\mu$ g/kg)。
- [0107] 研究 3 :测定 TAK-044 (非选择性 ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub>受体阻断剂) 和 BMS-182874 (选择性 ET<sub>B</sub>受体) 对可乐定 - 诱发的心血管效应的影响 (N=4)。
- [0108] 第 1 组 :TAK-044 (1mg/kg) ;第 2 组 :BMS-182874 (9mg/kg) ;第 3 组 :赋形剂 (1ml/kg)+可乐定 (10  $\mu$ g/kg) ;第 4 组 :TAK-044 (1mg/kg)+可乐定 (10  $\mu$ g/kg) ;和第 5 组 :BMS-182874 (9mg/kg)+可乐定 (10  $\mu$ g/kg)。
- [0109] 研究 4 :测定哌唑嗪对可乐定的心血管响应的 ET-1 诱发的变化的影响 (N=4)
- [0110] 第 1 组 :赋形剂 (1ml/kg)+可乐定 (10  $\mu$ g/kg) ;第 2 组 :哌唑嗪 (0.1mg/kg)+可乐定 (10  $\mu$ g/kg) ;和第 3 组 :ET-1 (300ng/kg)+哌唑嗪 (0.1mg/kg)+可乐定 (10  $\mu$ g/kg)。
- [0111] 研究 5 :测定可乐定处理的大鼠中的血浆 ET-1 水平 (N=4)
- [0112] 第 1 组 :赋形剂 (1ml/kg, i. v.) ;第 2 组 :可乐定 (10  $\mu$ g/kg, i. v.) ;和第 3 组 :可乐定 (90  $\mu$ g/kg, i. v.)
- [0113] 对 centhaquin 的研究 :
- [0114] 进行以下研究来测定 ET 参与 centhaquin 诱发的心血管 (MAP, HR, 和 PP) 效应。
- [0115] 研究 1 :测定可乐定的心血管效应 (N=5)。
- [0116] 第 1 组 :centhaquin (0.05mg/kg, i. v.) ;第 2 组 :centhaquin (0.15mg/kg, i. v.) ;和第 3 组 :centhaquin (0.45mg/kg, i. v.)
- [0117] 研究 2 :测定 ET-1 对 centhaquin- 诱发的心血管效应的影响 (N=4)。
- [0118] 第 1 组 :ET-1 (100ng/kg) ;第 2 组 :ET-1 (300ng/kg) ;第 3 组 :ET-1 (900ng/kg) ;第 4 组 :赋形剂 (1ml/kg)+centhaquin (0.15mg/kg) ;第 5 组 :ET-1 (100ng/kg)+centhaquin (0.15mg/kg) ;第 6 组 :ET-1 (300ng/kg)+centhaquin (0.15mg/kg) ;和第 7 组 :ET-1 (900ng/kg)+centhaquin (0.15mg/kg)。
- [0119] 研究 3 :测定 TAK-044 (非选择性 ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub>受体阻断剂) 和 BMS-182874 (选择性 ET<sub>B</sub>受体) 对 centhaquin- 诱发的心血管效应的影响 (N=4)。
- [0120] 第 1 组 :TAK-044 (1mg/kg)+赋形剂 (1ml/kg) ;第 2 组 :BMS-182874 (9mg/kg)+赋形剂 (1ml/kg) ;第 3 组 :赋形剂 (1ml/kg)+centhaquin (0.15mg/kg) ;第 4 组 :TAK-044 (1mg/kg)+centhaquin (0.15mg/kg) ;和第 5 组 :BMS-182874 (9mg/kg)+centhaquin (0.15mg/kg)。
- [0121] 研究 4 :测定哌唑嗪对 centhaquin 的心血管响应的 ET-1 诱发的变化的影响 (N=4)
- [0122] 第 1 组 :赋形剂 (1ml/kg)+centhaquin (0.15mg/kg) ;第 2 组 :哌唑嗪 (0.1mg/kg)+centhaquin (0.15mg/kg) ;和第 3 组 :ET-1 (300ng/kg)+哌唑嗪 (0.1mg/kg)+centhaquin (0.15mg/kg)。

[0123] 研究 5 :测定 centhaquin 处理的大鼠中的血浆 ET-1 水平 (N=4)

[0124] 第 1 组 :赋形剂 (1ml/kg, i. v. ) ;第 2 组 :centhaquin (0. 15mg/kg, i. v. ) ;和第 3 组 :centhaquin (0. 45mg/kg, i. v. )

[0125] 在上述研究中,全部药物通过左侧股静脉注射并且使用 Millar PowerLab 16/30 数据获取系统,记录在可乐定和 centhaquin 注射后的 MAP, HR, 和 PP 的变化达 1 小时。

[0126] 数据的统计分析

[0127] 数据以平均值  $\pm$  S. E. M 的形式表示。差异显著性是通过单向方差分析 (组内比较,相对于基线数据)和二向方差分析 (组间比较,相对于来自每一组的相应时点),随后分别地应用 Dunnett 多重比较和 Bonferroni 检验来估计的。小于 0.05 的 P 值被认为是显著的。用 GraphPad Prism 软件版本 5.00 处理统计分析。

[0128] 结果

[0129] 可乐定和 centhaquin 对动脉血气体的影响

[0130] 在给予可乐定 (90  $\mu$ g/kg) 和 centhaquin (0. 45mg/kg) 前以及之后 1 小时监控动脉血 pH,  $pO_2$ ,  $pCO_2$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ , 乳酸盐, 和血细胞比容, 并且据发现用可乐定或 centhaquin 在这些参数方面没有显著的变化 (表 1)。使用血液气体取样注射器 (Innovative Medical Technologies, Inc. Leawood, KS) 从动脉插管中取出血样并且使用 GEM Premier 3000 装置 (Instrument Laboratory, Lexington, MA) 进行分析。

[0131] 表 1 总结了给予可乐定 (90  $\mu$ g/kg) 和 centhaquin (0. 45mg/kg) 前后的动脉血 pH,  $pO_2$ ,  $pCO_2$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ , 乳酸盐, 和血细胞比容水平。据发现用可乐定或 centhaquin 在这些参数方面没有显著的变化

| 处理         | pH              | $pCO_2$ (mmHg) | $pO_2$ (mmHg) | $Na^+$ (mmol/L) | $K^+$ (mmol/L) | 乳酸盐 (mg/dL)     | Hct (%)    |
|------------|-----------------|----------------|---------------|-----------------|----------------|-----------------|------------|
| 基线         | 7.28 $\pm$ 0.02 | 47 $\pm$ 3     | 114 $\pm$ 3   | 140 $\pm$ 2     | 3.6 $\pm$ 0.2  | 2.42 $\pm$ 0.32 | 46 $\pm$ 2 |
| 可乐定        | 7.28 $\pm$ 0.03 | 46 $\pm$ 4     | 100 $\pm$ 14  | 139 $\pm$ 2     | 4.3 $\pm$ 0.6  | 1.35 $\pm$ 0.25 | 50 $\pm$ 4 |
| 基线         | 7.30 $\pm$ 0.03 | 47 $\pm$ 4     | 104 $\pm$ 1   | 144 $\pm$ 3     | 3.5 $\pm$ 0.3  | 2.42 $\pm$ 0.17 | 46 $\pm$ 2 |
| centhaquin | 7.27 $\pm$ 0.02 | 53 $\pm$ 2     | 96 $\pm$ 9    | 140 $\pm$ 1     | 4.0 $\pm$ 0.2  | 1.25 $\pm$ 0.55 | 52 $\pm$ 1 |

[0132] ET 在可乐定 - 诱发的心血管效应中的参与

[0133] 可乐定的剂量依赖性心血管效应

[0134] 静脉内给予的可乐定产生显著的 MAP 降低。较低剂量的可乐定 (10  $\mu$ g/kg) 产生 24.02% 的 MAP 的降低 ( $p < 0.01$ ; 相比于基线), 而 30  $\mu$ g/kg 剂量产生 26.15% 的 MAP 的降低 ( $p < 0.01$ ; 相比于基线)。用 90  $\mu$ g/kg 剂量的可乐定, MAP 的降低是 19.48% ( $p < 0.01$ ; 相比于基线)。用 10 和 30  $\mu$ g/kg 剂量由可乐定诱发的 MAP 的降低显著地 ( $p < 0.01$ ) 大于由 90  $\mu$ g/kg 剂量的可乐定诱发的 (图 1A)。

[0135] 给予可乐定产生显著的 PP 的降低。用 10  $\mu$ g/kg, PP 的降低是 33.81%, 用 30  $\mu$ g/kg, 36.39%, 用 90  $\mu$ g/kg 剂量的可乐定, 34.27%。相比于各自的基线, PP 的降低是统计上显著的 ( $p < 0.01$ )。使用全部剂量的可乐定, PP 的降低类似 (图 1B)。

[0136] 可乐定产生 HR 降低。剂量 10  $\mu$ g/kg 产生 20.84% 的 HR 降低, 而 30  $\mu$ g/kg 产生 23.18% 降低, 和 90  $\mu$ g/kg 产生 23.19% 降低。使用全部剂量, 可乐定诱发的心动过缓类似 (图 1C)。

[0137] ET-1 对可乐定诱发的心血管效应的影响

[0138] 在这些实验中, 使用低剂量的可乐定 (10  $\mu$ g/kg) 并且据发现在用 ET-1 (100, 300, 或 900ng/kg) 处理的大鼠中, 没有观察到通常由可乐定诱发的 MAP 的降低。ET-1 (100ng/kg)

处理显著地减弱可乐定诱发的 MAP 的降低。最大减弱是 27.63% ( $p < 0.01$ ), 相比于接收可乐定的赋形剂处理的大鼠。类似地, 300ng/kg 剂量的 ET-1 产生减弱可乐定 - 诱发的 MAP 的降低达 27.41%, 当相比于接收可乐定的赋形剂处理的大鼠时。以 900ng/kg 的剂量 ET-1 处理产生显著的减弱 (42.58%;  $p < 0.001$ ) 的可乐定 - 诱发的 MAP 的降低, 相比于接收可乐定的赋形剂处理的大鼠。统计分析表明在用不同剂量 (100, 300, 和 900ng/kg) 的 ET-1 处理的大鼠中, 可乐定 - 诱发的 MAP 的降低的减弱是类似的 (图 2A)。

[0139] 通过用 ET-1 处理减弱可乐定 - 诱发的 PP 的降低。在减弱 (33.66%) 可乐定诱发的 PP 的降低中, 100ng/kg 的 ET-1 的剂量是最有效的, 并且发现是统计上显著的 ( $p < 0.01$ )。然而, 300 和 900ng/kg 的剂量显示出减弱, 但没有达到统计显著性的水平 (图 2B)。

[0140] 用 ET-1 (100, 300, 或 900ng/kg) 处理的大鼠, 当注射以可乐定时, 没有显示出任何显著的 HR 的降低, 相比于基线。以 100ng/kg 的剂量 ET-1 处理显示可乐定 - 诱发的 HR 降低的 18.01% 减弱, 而 300ng/kg 剂量的 ET-1 显示 21.00% 减弱和 900ng/kg 剂量的 ET-1 产生 HR 的 37.42% ( $p < 0.001$ ) 减弱, 相比于接收可乐定的赋形剂处理的大鼠 (图 2C)。

[0141] ET 拮抗剂对可乐定诱发的心血管效应的影响

[0142] 用  $ET_A/ET_B$  受体拮抗剂, TAK-044 (1mg/kg), 或  $ET_A$  受体拮抗剂, BMS-182874 (9mg/kg) 处理的大鼠, 当注射以可乐定 (10  $\mu$ g/kg) 时, 显示出显著的 MAP 的降低, 达 36.59% 和 29.44%, 分别地当与基线相比时。在用 TAK-044 处理的大鼠中, 可乐定产生 MAP 的 17.68% 的最大降低 ( $p < 0.05$ ), 相比于接收可乐定的赋形剂处理的大鼠。然而, 在用 BMS-182874 处理的大鼠中, 可乐定产生 MAP 的 4.81% 的最大降低, 相比于接收可乐定的赋形剂处理的大鼠 (图 3A)。

[0143] 用 TAK-044 或 BMS-182874 处理的大鼠, 当注射以可乐定时, 分别地显示显著的 PP 的降低和 52.72% 和 44.97% 的最大降低, 相比于基线。在用 TAK-044 处理的大鼠中, 可乐定产生 31.42% 的最大降低, 而用 BMS-182874 处理的产生 17.06% 的 PP 的降低, 相比于接收可乐定的赋形剂处理的大鼠。在 TAK-044 处理的大鼠中的 PP 的降低, 相比于用 BMS-182874 处理的那些, 是显著更大的 (图 3B)。

[0144] 可乐定产生 HR 降低, 这在用 TAK-044 或 BMS-182874 处理的大鼠中是类似的。在用 TAK-044 处理的大鼠中, 可乐定产生 HR 的 8.83% 的最大降低, 当相比于接收可乐定的赋形剂处理的大鼠时。在用 BMS-182874 处理的大鼠中, 可乐定产生 HR 的 5.85% 的最大降低, 当相比于接收可乐定的赋形剂处理的大鼠时 (图 3C)。单独用 TAK-044 (1mg/kg) 或 BMS-182874 (9mg/kg) 处理的大鼠显示出在 MAP, PP, 和 HR 中无显著的变化 (图 3A, 3B, 和 3C)。

[0145] 哌唑嗪对可乐定的心血管响应的 ET-1 诱发的变化的影响

[0146] 在用 ET-1 (300ng/kg) 和哌唑嗪 (0.1mg/kg) 处理的大鼠中, 可乐定没有产生 MAP 的变化, 相比于基线。在 ET-1 处理的大鼠中, 哌唑嗪完全阻断了由可乐定造成的在 MAP 中产生的变化 (图 4A)。

[0147] 类似地, 在用 ET-1 和哌唑嗪处理的大鼠中, 相比于基线, 可乐定没有产生 PP 的变化。在 ET-1 处理的大鼠中, 哌唑嗪显著地减弱由可乐定诱发的 PP 的降低 (图 4B)。

[0148] 在用 ET-1 和哌唑嗪处理的大鼠中, 相比于基线, 可乐定没有产生 HR 的显著的变化。在 ET-1 处理的大鼠中, 哌唑嗪显著地 ( $p < 0.05$ ) 减弱由可乐定诱发的 HR 的降低 (图

4C)。

[0149] 在用可乐定处理的大鼠中的血浆 ET-1 水平

[0150] 发现在基线 ET-1 的血浆水平是  $12.18 \pm 0.42 \text{ pg/ml}$  和在 1 小时的赋形剂处理后发现血浆 ET-1 水平是  $11.97 \pm 1.29 \text{ pg/ml}$ 。在用可乐定  $10 \mu\text{g/kg}$  处理的大鼠中, 基线 ET-1 水平是  $12.39 \pm 0.62 \text{ pg/ml}$  和 1 小时的处理没有产生血浆 ET-1 水平的任何变化 ( $13.45 \pm 0.68 \text{ pg/ml}$ )。类似地, 在用高剂量的可乐定 ( $90 \mu\text{g/kg}$ ) 处理的大鼠中基线 ET-1 水平是  $12.59 \pm 0.77 \text{ pg/ml}$  和可乐定处理没有产生任何对血浆 ET-1 水平的显著影响 ( $11.31 \pm 0.92 \text{ pg/ml}$ )。

[0151] 可乐定对腹部主动脉环的影响

[0152] 在大鼠腹部主动脉环中可乐定产生剂量依赖性 ( $0.25\text{--}10 \mu\text{M}$ ) 收缩, 而在 ET-1 预处理的主动脉中可乐定的收缩性响应显著地增强 ( $p < 0.001$ )。在赋形剂和 ET-1 ( $4 \text{ nM}$ ) 处理的主动脉中, 由可乐定 ( $2 \mu\text{M}$ ) 产生的主动脉的收缩百分比分别是  $51.017 \pm 1.70\%$  和  $75.95 \pm 1.36\%$ , 而用  $4 \mu\text{M}$  剂量的可乐定, 在赋形剂和 ET-1 处理的主动脉中的收缩百分比分别是  $80.27 \pm 2.48\%$  和  $96.83 \pm 0.54\%$ 。在赋形剂处理的主动脉中, 可乐定的  $\text{ED}_{50}$  值是  $2.64 \pm 0.02 \mu\text{M}$ , 而在 ET-1 处理的主动脉中, 可乐定的  $\text{ED}_{50}$  值是  $1.81 \pm 0.04 \mu\text{M}$ , 这表明由 ET-1 的可乐定响应的显著的增强作用 ( $p < 0.001$ )。

[0153] ET 在 centhaquin 诱发的心血管效应中的参与

[0154] centhaquin 的剂量依赖性心血管效应

[0155] 静脉内给予大鼠的 centhaquin, 产生显著的 MAP 的剂量依赖性降低。  $0.05 \text{ mg/kg}$ ,  $0.15 \text{ mg/kg}$ , 和  $0.45 \text{ mg/kg}$  centhaquin 的剂量分别产生  $15.64$ ,  $25.15$ , 和  $28.08\%$  的显著的降低 ( $p < 0.001$ ), 相比于基线。相比于  $0.05 \text{ mg/kg}$  剂量, 由  $0.15$  或  $0.45 \text{ mg/kg}$  剂量产生的 MAP 的降低是更显著的 (图 5A)。

[0156] 用  $0.05 \text{ mg/kg}$ ,  $0.15 \text{ mg/kg}$ , 和  $0.45 \text{ mg/kg}$  剂量的 centhaquin 给予的大鼠分别显示  $10.49$ ,  $12.57$ , 和  $13.34\%$  ( $p < 0.01$ ) HR 的降低, 相比于基线 (图 5B)。

[0157] ET-1 对 centhaquin 诱发的心血管效应的影响

[0158] 用  $100$ ,  $300$ , 和  $900 \text{ ng/kg}$  剂量的 ET-1 处理的大鼠显示 MAP 的降低 ( $p < 0.001$ ), 随后显著的升高 ( $p < 0.001$ ) (图 6A), 而观察 HR 无变化 (图 6B), 相比于基线。中间剂量的  $0.15 \text{ mg/kg}$  的 centhaquin 用于随后的研究。较低剂量的 ET-1 ( $100$  和  $300 \text{ ng/kg}$ ) 显示 centhaquin- 诱发的 MAP 的降低的小的统计上非显著的减弱, 而  $900 \text{ ng/kg}$  的较高剂量显示 centhaquin- 诱发的 MAP 的降低的显著的 ( $33.48\%$ ;  $p < 0.001$ ) 减弱, 相比于接收 centhaquin 的赋形剂处理的大鼠 (图 7A)。

[0159] 给予 centhaquin ( $0.15 \text{ mg/kg}$ ) 产生 HR 降低。在用赋形剂或  $100 \text{ ng/kg}$  剂量的 ET-1 处理的大鼠中, 由 centhaquin 产生的 HR 的降低是类似的。然而, 在用较高剂量 ( $300 \text{ ng/kg}$ ) 的 ET-1 处理的大鼠中, centhaquin- 诱发的 HR 降低显著地减弱。 $900 \text{ ng/kg}$  的剂量的 ET-1 产生 centhaquin- 诱发的 HR 降低的  $21.44\%$  的显著的减弱 ( $p < 0.001$ ), 相比于接收 centhaquin 的赋形剂处理的大鼠 (图 7B)。

[0160] ET 拮抗剂对 centhaquin 诱发的心血管效应的影响

[0161] centhaquin ( $0.15 \text{ mg/kg}$ ) 产生 MAP 的降低。然而, 在用  $\text{ET}_A/\text{ET}_B$  受体拮抗剂 TAK-044 ( $1 \text{ mg/kg}$ ) 处理的大鼠中, centhaquin 产生 MAP 的  $32.31\%$  ( $p < 0.01$ ) 的明显的下降,

相比于基线。在用 ET<sub>A</sub>受体拮抗剂 BMS-182874 (9mg/kg) 处理的大鼠中, centhaquin 产生 MAP 的 43.46% (p<0.001) 的甚至更显著的降低, 相比于基线。据发现用 TAK-044 处理产生 centhaquin 效应的增强作用达 16.48% (p>0.05), 而用 BMS-182874 处理产生 30.67% 的增强作用 (p<0.001), 相比于赋形剂处理的大鼠 (图 7A)。

[0162] centhaquin 产生 PP 的降低。在用 TAK-044 处理的大鼠中, centhaquin 产生 PP 的降低达 46.49% (p<0.001), 相比于基线。在用 BMS-182874 处理的大鼠中, centhaquin 产生 PP 的降低达 49.68% (p<0.001), 相比于基线。在 TAK-044 和 BMS-182874 处理的大鼠中, 由 centhaquin 诱发的 PP 的降低是相似的 (图 7B)。

[0163] 通过 centhaquin 给予产生 HR 降低。在用 TAK-044 处理的大鼠中, centhaquin 产生 HR 降低达 21.94%, 相比于基线。然而, 在用 BMS-182874 处理的大鼠中, centhaquin 产生 HR 降低达 35.72% (p<0.001), 相比于基线。据发现 TAK-044 产生 centhaquin- 诱发的 HR 降低的增强作用达 12.74%, 而 BMS-182874 产生在 HR 的增强作用达 29.00% (p<0.001), 相比于赋形剂处理的大鼠。由 BMS-182874 的 centhaquin 诱发的 HR 降低的增强作用显著地多于由 TAK-044 处理产生的达 18.63% (p<0.05) (图 7C)。单独地用 TAK-044 (1mg/kg) 或 BMS-182874 (9mg/kg) 处理的大鼠显示出在 MAP 和 HR 中无显著的变化 (图 7A 和 7B)。

[0164] 哌唑嗪对 centhaquin 的心血管响应的 ET-1 诱发的变化的影响

[0165] 在用 ET-1 (300ng/kg) 和哌唑嗪 (0.1mg/kg) 处理的大鼠中, 相比于基线, centhaquin 没有产生 MAP 的变化。在 ET-1 处理的大鼠中, 哌唑嗪完全 (p<0.01) 阻断了由 centhaquin 造成的在 MAP 中产生的变化 (图 8A)。

[0166] 类似地, 在用 ET-1 和哌唑嗪处理的大鼠中, 相比于基线, centhaquin 没有产生 PP 的变化。在 ET-1 处理的大鼠中, 哌唑嗪显著地 (p<0.001) 减弱由 centhaquin 诱发的 PP 的降低 (图 8B)。

[0167] 在用 ET-1 和哌唑嗪处理的大鼠中, 相比于基线, centhaquin 没有产生 HR 的显著的变化。在 ET-1 处理的大鼠中, 哌唑嗪显著地 (p<0.05) 减弱由 centhaquin 诱发的 HR 的降低 (图 8C)。

[0168] 在赋形剂处理的大鼠中, 哌唑嗪还阻断了由 centhaquin 提供的 MAP 和 HR 的变化 (图 8A 和 8B)。

[0169] 在用 centhaquin 处理的大鼠中的血浆 ET-1 水平

[0170] 基线血浆 ET-1 水平是 12.18±0.42pg/ml, 和在 1 小时的赋形剂处理后是 11.97±1.29pg/ml。血浆 ET-1 水平没有显示出赋形剂处理的大鼠的任何变化。在用 centhaquin 处理的大鼠中 (0.15mg/kg), 基线 ET-1 水平是 10.89±1.77pg/ml 和 1 小时的处理没有产生血浆 ET-1 水平的任何变化 (10.39±1.75pg/ml)。类似地, 在用高剂量的 centhaquin 处理的大鼠中 (0.45mg/kg), 基线 ET-1 水平是 11.83±1.04pg/ml 和 centhaquin 处理没有产生任何对血浆 ET-1 水平的显著影响 (11.67±1.41pg/ml)。

[0171] 本发明举例说明了 ET 激动剂和拮抗剂与中枢性作用抗高血压药, 可乐定和 centhaquin 的相互作用。

[0172] 可乐定是抗高血压药, 其通过刺激脑中的 α-肾上腺素能受体 (Schmitt, 1969; U'Prichard 等, 1977; Kobinger, 1978), 导致心搏量, 周围血管阻力和血压的降低而起作用。它具有对脑干中的血管运动中枢中的突触前的 α<sub>2</sub>-肾上腺素能受体的特异性

(Schmitt,1969 ;Kobinger,1978)。这降低了突触前的钙水平,和抑制了去甲肾上腺素的释放,并且净效果是交感神经紧张的降低 (Langer 等,1980 ;van Zwieten 等,1984 ;Chen 等,1994)。可乐定还具有周围  $\alpha$  1- 肾上腺素能对抗活性,其当以较高剂量全身给予时,可以产生短暂的血管收缩和高血压。在结合分析中和在离体器官中 (U' Prichard 等,1977),相比于  $\alpha$  1- 肾上腺素能受体,它具有大约 10- 倍高的对  $\alpha$  2- 肾上腺素能受体的结合亲合性。通过  $\alpha$  2- 肾上腺素能受体的刺激介导可乐定的低血压效应 (Kobinger,1978 ;Guyenet 和 Cabot,1981),而高血压效应应归于由周围  $\alpha$  1- 肾上腺素能受体的刺激所引起的血管收缩 (Timmermans 和 van Zwieten,1980 ;Bousquet 和 Schwartz,1983)。

[0173] 尽管结构上不同于可乐定,但在麻醉的猫和大鼠中 centhaquin 产生类似于由可乐定看出的 MAP 和 HR 的下降 (Srimal 等,1990)。centhaquin,像可乐定,被认为主要地作用在中枢性  $\alpha$  2- 肾上腺素受体上。在大鼠中长期给药后,centhaquin 和可乐定都产生了与在下丘脑和髓质中  $\alpha$  - 肾上腺素能受体的向上调节有关的低血压和心动过缓 (Gulati 等,1991a ;Gulati 等,1991b)。

[0174] 静脉内给予的可乐定或 centhaquin 产生剂量依赖性低血压和心动过缓。用 ET-1 处理完全减弱可乐定 - 和 centhaquin- 诱发的低血压和心动过缓。在用高剂量的 ET-1 处理的大鼠中,当给予可乐定或 centhaquin 时,观察到高血压和心动过速。由 ET-1 造成的可乐定或 centhaquin 效应的这种减弱可能是由于周围肾上腺素能受体的增强的敏化,这导致功能阻断由可乐定 (Gulati 和 Srimal,1993) 或 centhaquin 诱发的低血压。可以推导,但不依赖于,当给予可乐定或 centhaquin 时,ET-1 处理使周围性  $\alpha$  - 肾上腺素能受体的敏感性增加到如下的程度,产生了显著的高血压效应,使得其中枢性低血压效应被掩蔽并且未被观察到。

[0175] 为证实内源性 ET 参与周围肾上腺素能受体的调节,使用 ET 拮抗剂进行了研究。使用两种不同的 ET 拮抗剂 :TAK-044( 非选择性的  $ET_A/ET_B$  受体阻断剂 ) (Ikeda 等,1994) 和 BMS-18287( 选择性  $ET_A$  受体阻断剂 ) (Stein 等,1994)。用 TAK-044 和 BMS-182874 预处理的大鼠显示出可乐定或 centhaquin 的低血压效应的增强作用,这表明内源性 ET 参与由可乐定引起的周围高血压。相比于 BMS-182874,发现用 TAK-044 的增强作用更突出,这表明  $ET_B$  受体可能参与可乐定 - 诱发的周围效应 ( 表 2)。还使用哌唑嗪处理来确定是否  $\alpha$  - 肾上腺素能受体涉及可乐定 - 或 centhaquin- 诱发的心血管效应的 ET-1 增强作用。当注射以可乐定,用 ET-1 和哌唑嗪处理的大鼠显示出完全阻断可乐定响应的 ET-1 诱发的减弱,这证实了通过周围性  $\alpha$  - 肾上腺素能受体介导了这种效应。

[0176] 表 2 总结了非选择性  $ET_A/ET_B$  受体拮抗剂 TAK-044 和选择性  $ET_A$  受体拮抗剂 BMS182874 对平均动脉压,脉压,和心率的可乐定 (10  $\mu$  g/kg) 和 centhaquin (0. 33mg/kg) 诱发的变化的影响。相比于在对照大鼠中的可乐定或 centhaquin 响应,表示百分比变化。

[0177]

|            | 低血压          | 低血压            | 脉压的降低         | 脉压的降低         | 心动过缓      | 心动过缓           |
|------------|--------------|----------------|---------------|---------------|-----------|----------------|
|            | 可乐定          | centhaquin     | 可乐定           | centhaquin    | 可乐定       | centhaquin     |
| TAK-044    | ++ (17. 68%) | ++ (16. 48%)   | +++ (31. 42%) | +++ (23. 83%) | +(8. 83%) | ++ (12. 74%)   |
| BMS-182874 | +(4. 81%)    | ++++ (30. 67%) | ++ (17. 06%)  | +++ (28. 72%) | +(5. 85%) | ++++ (29. 00%) |

[0178] 通过在颈部切开的大鼠中进行的研究,先前已经证明周围肾上腺素能受体参与由 ET-1 的可乐定效应的调节,其中静脉内给予的可乐定没有对血压和心率产生任何影响,这

表明由于颈部切开术,可乐定不能产生其对 CNS 的作用。然而,当在颈部切开的大鼠中 ET-1 处理后给予可乐定时,获得了显著的高血压响应 (Gulati 和 Srimal,1993)。这些结果证实了在 ET-1 处理的大鼠中周围血管系统参与可乐定的高血压效应。

[0179] 由下述研究支持了目前的结果,所述研究表明 ET-1 是血管舒缩张力的重要的调节剂并且已经证明 ET-1 能够放大若干血管活性化合物的收缩性响应 (Consigny,1990 ; Nakayama 等,1991 ;Gondre 和 Christ,1998)。已经报道了  $ET_A$ 受体和  $\alpha 1$ -肾上腺素能受体之间的串馈 (Cross-talk)。在用仓鼠  $\alpha 1$ -肾上腺素能受体转染的大鼠成纤维细胞中,  $ET_A$ 受体的活化导致  $\alpha 1$ -肾上腺素能受体磷酸化并且抑制  $\alpha 1$ -肾上腺素能受体活化 (Vazquez-Prado 等,1997 ;D' Angelo 等,2006)。已经显示出内皮在  $\alpha$ -肾上腺素能激动剂-诱发的血管收缩中的调节剂作用,因为除去内皮增强了敏感性和对肾上腺素能激动剂的最大收缩性响应,这显示出氧化氮 (nitric oxide) 的参与 (Carrier 和 White,1985)。目前的体内进行的研究的结果清楚地证明,通过增强由肾上腺素能受体介导的周围血管收缩,ET-1 改变了肾上腺素能药物,例如,可乐定和 centhaquin 的响应。尽管可乐定主要地作用于  $\alpha 2$ -肾上腺素能受体并且较小地作用于  $\alpha 1$ -肾上腺素能受体,研究已经表明哌唑嗪 ( $\alpha 1$ -肾上腺素能受体拮抗剂) 阻断尾部动脉的可乐定-诱发的收缩 (Kennedy 等,2006)。这支持了以下发现:由哌唑嗪可以完全阻断由 ET-1 调节可乐定-和 centhaquin- 诱发的心血管响应。 $\alpha 1$ -肾上腺素能受体的参与进一步由以下研究支持,其中发现这些受体介导股动脉中的对去甲肾上腺素的收缩响应 (Jarajapu 等,2001)。兔耳动脉和大鼠胸主动脉的血管环制备显示出  $\alpha 1$ -肾上腺素能受体的亚型涉及收缩 (Fagura 等,1997)。最近的研究表明,用非选择性  $ET_A/ET_B$ 受体拮抗剂,波生坦 (bosentan) 的 7 天处理后,交感神经激动 (sympathetic drive) 的增加和降低的副交感神经活性 (Souza 等,2008),这表明内源性 ET 在自主控制中起重要作用。

[0180] 令人感兴趣的是注意到相比于 centhaquin,在增强可乐定-诱发的低血压和心动过缓方面,非选择性  $ET_A/ET_B$ 受体拮抗剂, TAK-044,显著地更有效。另一方面,相比于可乐定,在增强 centhaquin- 诱发的低血压和心动过缓方面,选择性  $ET_A$ 受体拮抗剂, BMS-182874 更有效。此外, TAK-044 产生了可乐定和 centhaquin 的 MAP、PP 和 HR 响应的或多或少类似的增强作用,而相比于可乐定, BMS-182874 产生了 centhaquin 对 MAP、PP 和 HR 的影响的明显更显著的增强作用(表 2)。这些结果表明除  $\alpha 1$ -肾上腺素能受体外,其它受体也可能正起到作用,并且可乐定和 centhaquin 的作用机理是不同的。这也支持了  $ET_A$ 而非  $ET_B$ 受体参与由 ET 调节肾上腺素能药物的心血管效应。

[0181] 其它受体也可能被涉及,因为已经发现重复给予可乐定或 centhaquin 产生了髓质中的 5-HT<sub>1</sub>受体的向上调节 (Gulati 等,1991a ;Gulati 等,1991b),这表明 centhaquin 和可乐定两者也可能正作用于 5-HT<sub>1</sub>受体。若干报道已经表明 ET-1 的阈值或近阈值浓度增强了对其它血管活性物质如 5-HT 的收缩性响应 (Consigny,1990 ;Nakayama 等,1991)。可乐定或 centhaquin 处理没有产生血浆 ET-1 水平的任何变化,更可能的是存在 ET 受体与肾上腺素能受体的相互作用。

[0182] 当将可乐定给予具有完整的自主功能的患者时,血压的短暂上升,随后血压的持续降低,并且为可乐定在降低血压方面是有效的,自主完整性是必需品 (Naftchi 和 Richardson,1997)。在具有脊髓损伤的患者中,可乐定和 centhaquin 的周围作用效应可以

支配导致血管收缩和高血压 (Backo 等, 2002)。在此情况下, 使用 ET 拮抗剂以及肾上腺素能剂, 例如, 可乐定或 centhaquin, 可以是防止副作用的有用的治疗选择。

[0183] 已经报道了可乐定中毒的情况 (Pai 和 Lipsitz, 1976), 并且中毒的症状通常源于可乐定的中枢作用, 不过也已经报道了陷入超剂量的高血压 (Kobinger 和 Walland, 1967; Hunyor 等, 1975)。在用同时开药的可乐定和 mirtazepine 维持的患者中报道了高血压急症的情况 (Abo-Zena 等, 2000)。这种相互作用和高血压急症的可能的推测性机理是在中枢性  $\alpha$  2- 肾上腺素能抑制性受体可乐定通过激动剂活性施加其抗高血压效应并且在相同的  $\alpha$  2- 肾上腺素能受体抗抑郁药 mirtazepine 用作拮抗剂 (Troncoso 和 Gill, 2004)。在高剂量下, 它替换可乐定, 导致抗高血压效应的可能的损失。可乐定停药的另外的反跳性高血压看起来加重了在先的高血压状态。可推测的是在此情况下 ET 拮抗剂可用于降低可乐定的副作用。

[0184] 已经发现 ET 可以调节通过血管肾上腺素能受体介导的心血管效应。这是首次报道, 其表明 ET 拮抗剂可以增强可乐定和 centhaquin 的抗高血压效应。ET 拮抗剂可能因此可用于处理由于超剂量的可乐定造成的毒性效应。因为两种 ET 拮抗剂已经在美国销售用于治疗肺动脉高血压, 并且若干处于 (销售) 管道中, 可能重要的是探究这些药剂与其它作用于肾上腺素能系统的抗高血压药的相互作用。因为由于其副作用使用可乐定受到限制, ET 拮抗剂与可乐定或 centhaquin 的组合可能是治疗高血压的有用的选择。

[0185] 表 3 总结了所建议的机理, 通过其 ET-1 和 ET 受体拮抗体调节可乐定 - 和 centhaquin- 诱发的平均动脉压的变化。可乐定和 centhaquin 作用于中枢以及周围肾上腺素能受体。刺激 (a) 周围受体产生血管收缩, 和 (b) 中枢受体降低交感神经激动 (sympathetic drive), 产生血管舒张, 净结果是血压降低, 因为中枢效应比周围效应占主导。用 ET-1 处理显著地增加周围血管收缩效应并且现在相比于中枢效应, 周围效应占主导, 并且净结果是血压升高。然而, 用 ET 拮抗剂的治疗降低了周围血管收缩效应, 因此中枢效应占主导并且净结果是显著的低血压效应。

[0186]

|        | 平均动脉压  | 平均动脉压  | 平均动脉压   |
|--------|--------|--------|---------|
| 处理     | 中枢血管舒张 | 周围血管收缩 | 血压变化    |
| 无      | +++    | +      | ↓ ↓     |
| ET-1   | +++    | ++++   | ↑       |
| ET 拮抗剂 | +++    | -      | ↓ ↓ ↓ ↓ |

[0187] 图 1 显示了在乌拉坦麻醉的大鼠中可乐定 (10, 30, 和 90  $\mu$ g/kg) 的心血管效应。记录可乐定的剂量 - 响应效应 60 分钟并且 MAP (图 1A), PP (图 1B), 和 HR (图 1C) 的值表示为均值  $\pm$  SEM, 其中在每组中 n=4。\*p<0.05 相比于基线并且 #p<0.05 相比于 10  $\mu$ g/kg 剂量的可乐定。

[0188] 图 2 显示了在乌拉坦麻醉的大鼠中 ET-1 (100, 300 和 900ng/kg) 处理对可乐定 - 诱发的心血管响应的的影响。在可乐定 (10  $\mu$ g/kg) 给予后, 记录 MAP (图 2A), PP (图 2B), 和 HR (图 2C) 60 分钟, 并且值表示为均值  $\pm$  SEM, 其中在每组中 n=4。\*p<0.05 相比于基线并且 #p<0.05 相比于 10  $\mu$ g/kg 剂量的可乐定。

[0189] 图 3 显示了在乌拉坦麻醉的大鼠中非选择性 ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub>受体拮抗剂 TAK-044 (1mg/kg) 和选择性 ET<sub>A</sub>受体拮抗体 BMS-182874 (9mg/kg) 处理对可乐定 - 诱发的心血管响应的的影响。

在可乐定 (10  $\mu$ g/kg) 给予后记录 MAP(图 3A), PP(图 3B), 和 HR(图 3C) 60 分钟, 并且值表示为均值  $\pm$  SEM, 其中在每组中 n=4。\*p<0.05 相比于基线并且 #p<0.05 相比于 10  $\mu$ g/kg 剂量的可乐定。

[0190] 图 4 显示了在乌拉坦麻醉的大鼠中哌唑嗪 (0.1mg/kg) 对可乐定 (10  $\mu$ g/kg) 的心血管响应的 ET-1 (300ng/kg) 诱发的变化的影响。在可乐定 (10  $\mu$ g/kg) 给予后记录 MAP(图 4A), PP(图 4B), 和 HR(图 4C) 60 分钟, 并且值表示为均值  $\pm$  SEM, 其中在每组中 n=4。\*p<0.05 相比于基线并且 #p<0.05 相比于 10  $\mu$ g/kg 剂量的可乐定。

[0191] 图 5 显示了在乌拉坦麻醉的大鼠中 centhaquin (0.05, 0.15, 和 0.45mg/kg) 的心血管效应。记录 centhaquin 的剂量 - 响应效应 60 分钟, 并且 MAP(图 5A), PP(图 5B) 和 HR(图 5C) 的值表示为均值  $\pm$  SEM, 其中在每组中 n=4。\*p<0.05 相比于基线和 #p<0.05 相比于 0.33mg/kg 剂量的 centhaquin。

[0192] 图 6 显示了在乌拉坦麻醉的大鼠中 ET-1 (100, 300, 和 900ng/kg) 处理对 centhaquin- 诱发的心血管响应的的影响。在 centhaquin (0.15mg/kg) 给予后记录 MAP(图 6A), PP(图 6B), 和 HR(图 6C) 60 分钟, 并且值表示为均值  $\pm$  SEM, 其中在每组中 n=4。\*p<0.05 相比于基线和 #p<0.05 相比于 0.15mg/kg 剂量的 centhaquin。

[0193] 图 7 显示了在乌拉坦麻醉的大鼠中非选择性 ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub>受体拮抗剂 TAK-044 (1mg/kg) 和选择性 ET<sub>A</sub>受体拮抗体 BMS-182874 (9mg/kg) 处理对 centhaquin- 诱发的心血管响应的的影响。在 centhaquin (0.15mg/kg) 给予后记录 MAP(图 7A), PP(图 7B), 和 HR(图 7C) 60 分钟, 并且值表示为均值  $\pm$  SEM, 其中在每组中 n=4。\*p<0.05 相比于基线和 #p<0.05 相比于 0.33mg/kg 剂量的可乐定。

[0194] 图 8 显示了在乌拉坦麻醉的大鼠中哌唑嗪 (0.1mg/kg) 对 centhaquin (0.15mg/kg) 的心血管响应的 ET-1 (300ng/kg) 诱发的变化的影响。在 centhaquin (0.33mg/kg) 给予后记录 MAP(图 8A), PP(图 8B), 和 HR(图 8C) 60 分钟, 并且值表示为均值  $\pm$  SEM, 其中在每组中 n=4。\*p<0.05 相比于基线和 #p<0.05 相比于 0.15mg/kg 剂量的 centhaquin。

[0195] 参考文献

[0196]

RA Abo-Zena et al., *Pharmacotherapy* 20:476-478 (2000).

Al. Becko et al., *Ann Pharmacother* 36:1396-1398 (2002).

UC Bajpai et al., *J. Molecular Structure* 516:15-21 (2000).

M Bhatnagar et al., *Arzneimittelforschung* 35:693-697 (1985).

P Bousquet et al., *Biochem Pharmacol* 32:1459-1465 (1983).

R Brondani et al., *Clin Biochem* 40:282-284 (2007).

[0197]

- A Carpy et al., *Acta Crystallographica* **C47**:227-229 (1991).
- GO Carrier et al., *J Pharmacol Exp Ther* **232**:682-687 (1985).
- R Charu et al. *Thorax* **61**:1011-1012 (2006).
- HI Chen *Circulation* **90**:970-975 (1994).
- PM Consigny *Eur J Pharmacol* **186**:239-245 (1990).
- G D'Angelo *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**:H1251-1258 (2006).
- MS Fagura et al., *Br J Pharmacol* **120**:247-258 (1997).
- M Gondre et al., *J Pharmacol Exp Ther* **286**:635-642 (1998).
- A Gulati *Life Sci* **50**:153-160 (1992).
- A Gulati et al., *Drug Development Research* **23**:307-323 (1991a).
- A Gulati *Drug Development Research* **22**:141-152 (1991b).
- A Gulati et al., *Neuropeptides* **31**:301-309 (1997a).
- A Gulati et al., *Am J Physiol* **273**:H1177-1186 (1997b).
- A Gulati et al. (1993) *Eur J Pharmacol* **230**:293-300.
- PG Guyenet et al., *J Neurosci* **1**:908-917 (1981).
- KA Hickey et al., *Am J Physiol* **248**:C550-556 (1985).
- SN Hunyor et al., *Br Med J* **4**:23 (1975).
- S Ikeda et al., *J Pharmacol Exp Ther* **270**:728-733 (1994).
- YF Jarajapu et al., *Eur J Pharmacol* **422**:127-135 (2001).
- WB Kennedy et al., *Cell Mol Neurobiol* **26**:645-657 (2006).
- W Kobinger *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **81**:39-100 (1978).
- W Kobinger et al., *Arzneimittelforschung* **17**:292-300 (1967).
- T Kawaki et al., *Jpn J Physiol* **40**:97-116 (1990).
- SZ Langer et al., *Hypertension* **2**:372-382 (1980).
- OH Lowry et al., *J Biol Chem* **193**:265-275 (1951).
- VA Murthi et al. in (Patent US ed), *Council of Scientific and Industrial Research* (1976).
- NE Naffichi et al., *J Spinal Cord Med* **20**:355-360 (1997).
- K Nakayama et al., *Br J Pharmacol* **104**:978-986 (1991).
- PT Nowicki et al., *J Pediatr* **146**:805-810 (2005).
- Y Ouchi et al., *Am J Physiol* **256**:H1747-1751 (1989).
- F Pacher et al., *Nat Protoc* **3**:1422-1434 (2008).
- GS Psi et al., *Pediatrics* **58**:749-750 (1976).
- T Radovits et al., *Vascul Pharmacol* **51**:37-43 (2009).

[0198]

- A Sakamoto et al. *J Biol Chem* **268**:8547-8553 (1993).
- H Schmitt *Eur J Pharmacol* **6**:8-12 (1969).
- SS Shetty et al. *Biochem Biophys Res Commun* **191**:459-464 (1993).
- HC Souza et al. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **35**:751-756 (2008).
- RC Srimal et al. *Pharmacol Res* **22**:319-329 (1990).
- PD Stein et al. *J Med Chem* **37**:329-331 (1994).
- Y Tabuchi et al. *Biochem Biophys Res Commun* **161**:803-808 (1989).
- PB Timmermans et al. *Eur J Pharmacol* **63**:199-202 (1980).
- AL Troncoso et al. *Psychosomatics* **45**:449-450 (2004).
- DC U'Prichard et al. *Mol Pharmacol* **13**:454-473 (1977).
- PA van Zwieten et al. *Hypertension* **6**:H28-33 (1984).
- J Vazquez-Prado et al. *J Biol Chem* **272**:27330-27337 (1997).
- SW Watts *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2009).
- SW Watts *Hypertension* **35**:244-248 (2000).
- NF Wiklund et al. *Acta Physiol Scand* **134**:311-312 (1988).
- M Yanagisawa et al. *Nature* **332**:411-415 (1988).

[0199] 治疗疼痛的方法

[0200] 本发明还涉及 centhaquin 作为止痛药来治疗受试者中的疼痛的用途。

[0201] 在一个方面中,本发明提供治疗或预防疼痛的方法,其包括给予需要其的哺乳动物治疗有效量的 centhaquin。在一种实施方案中,centhaquin 与阿片止痛药联合给予 (coadministered)。

[0202] 在一种实施方案中,以约 10  $\mu$ g 至约 300  $\mu$ g 的剂量范围给予 centhaquin。

[0203] 本发明方法预期了待治疗的受试者是哺乳动物。在一种实施方案中,哺乳动物受试者是人,或用于人医学研究的任何非人动物模型,或重要的动物如家畜或宠物,例如,结伴动物。在相关的实施方案中,受试者是人。

[0204] 在一种实施方案中,待治疗的疼痛是慢性疼痛或急性疼痛。在相关的实施方案中,疼痛选自灼痛,触觉异常性疼痛 (allodynia),神经性疼痛,痛觉增敏 (hyperalgesia),痛觉过度 (hyperpathia),炎性疼痛,手术后疼痛,慢性下腰痛,丛集性头痛,带状疱疹神经痛,幻肢和残端痛,中枢性疼痛,牙痛,神经性疼痛,耐阿片样物质的疼痛,内脏疼痛,手术疼痛,骨损伤疼痛,糖尿病性神经病疼痛,手术后或创伤神经病疼痛,周围神经病疼痛,受压性神经病疼痛,由醇滥用所引起的神经病,由 HIV 感染的疼痛,多发性硬化甲状腺机能减退或抗癌化疗疼痛,在分娩和胎儿产出期间的疼痛,源于烧伤,包括晒伤的疼痛,产后疼痛,偏头痛,心绞痛,和泌尿生殖道 - 相关的疼痛包括膀胱炎。

[0205] 在进一步的方面中,centhaquin 可用于增强阿片止痛药的止痛效果。因而,本发明提供治疗或预防疼痛的方法,其包括给予需要其的哺乳动物治疗有效量的阿片止痛药和治疗有效量的 centhaquin。

[0206] 阿片止痛药选自吗啡,硫酸吗啡,可待因,二乙酰吗啡,右美沙芬,二氢可待因酮,氢吗啡酮,氢吗啡酮,左啡诺,羟吗啡酮,羟考酮,左洛啡烷,和其盐。

[0207] 在一种实施方案中,阿片止痛药和 centhaquin 同时给予。在相关的实施方案中,从单个组合物或从分开的组合物给予阿片止痛药和 centhaquin。在进一步的实施方案中,顺序地给予阿片止痛药和 centhaquin。

[0208] 在一种实施方案中,本发明涉及使用 centhaquin 治疗疼痛的方法,其从疼痛刺激中产生显著的止痛和减轻。

[0209] 如本文中使用的术语“治疗”是指预防、降低或以其它方式改善或消除疼痛。因而,术语“治疗”包括医学治疗性和/或预防性给予,视情况而定。使用本领域已知的疼痛评价等级,可以测量疼痛症状的治疗和减轻。示范性的规程包括测量主观疼痛阈值(直观类比标度)和客观感受伤害屈反射(R III) 阈值。

[0210] 如本文中使用的术语“疼痛”是指所有类型的疼痛。在一个方面中,该术语是指急性和慢性疼痛。示范类型的疼痛包括但不局限于灼痛,触觉异常性疼痛(allodynia),神经性疼痛,痛觉增敏(hyperalgesia),痛觉过度(hyperpathia),炎性疼痛,手术后疼痛,慢性下腰痛,丛集性头痛,带状疱疹神经痛,幻肢和残端痛,中枢性疼痛,牙痛,神经性疼痛,耐阿片样物质的疼痛,内脏疼痛,手术疼痛,骨损伤疼痛,糖尿病性神经病疼痛,手术后或创伤神经病疼痛,周围神经病疼痛,受压性神经病疼痛,由醇滥用所引起的神经病,由 HIV 感染的疼痛,多发性硬化甲状腺机能减退或抗癌化疗疼痛,在分娩和胎儿产出期间的疼痛,源于烧伤,包括晒伤的疼痛,产后疼痛,偏头痛,心绞痛,和泌尿生殖道-相关的疼痛包括膀胱炎。

[0211] 如本文中使用的术语“止痛药”是指在受试者中减轻疼痛的活性剂。术语“阿片止痛药”或“阿片样物质止痛药”是指这样的麻醉止痛剂,例如使用作为麻醉的助剂(adjunct),或者用于减轻疼痛。术语“非阿片止痛药”是指为疼痛所指明的非麻醉药剂。

[0212] “治疗有效的剂量”是指导致实现期望的效果的一种或多种活性剂的数量。通过在细胞培养或实验动物中的标准药物程序,例如确定 LD<sub>50</sub>(使群体的 50% 致死的剂量)和 ED<sub>50</sub>(在群体的 50% 中治疗有效的剂量),确定这样的活性剂的毒性和治疗效能。毒性与治疗效果之间的剂量比是治疗指数,其表示为 LD<sub>50</sub>与 ED<sub>50</sub>之间的比例。高治疗指数是优选的。获自这样的数据的数据被用于制定用于人的剂量的范围。活性剂的剂量,在一个方面中,位于在包括 ED<sub>50</sub>、毒性小或无毒性的循环浓度的范围内。取决于所使用的剂型,和采用的给药途径,剂量在该范围内变化。

[0213] “并行给药”,“联合给予”,“同时给药”或类似短语是指包括两种或更多种药剂的组合物被同时给予正被治疗的受试者。“并行”是指每一个药剂在相同时间或者在不同的时间点以任何次序顺序地给予。然而,如果不是在相同时间给予的话,在一个方面中,它们在时间上足够紧密地被给予以便提供期望的治疗效果的增强作用。用这样的化合物的合适的定量给药间隔和定量给药次序将对本领域技术人员来说是容易显见的。还预期了两种或更多种药剂在分开的组合物中被给予,并且在一个方面中,一种组合物是在给予第一个药剂之前或之后给予的。在先给药是指在治疗前一天(24 小时)直至治疗前 30 分钟的范围内给予药剂。还预期了在给予其他药剂后给予一种药剂。随后给药是指描述从给予第一个药剂后的 30 分钟直至给予第一个药剂后的一天(24 小时)的给药。在 30 分钟至 24 小时内可以包括在 30 分钟、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、16、20、或 24 小时给药。

[0214] 如本文中使用的术语“低剂量”是指活性成分在组合物中的这样的剂量,其中组合物中活性成分的量低于在治疗受试者中典型地给出的量。例如,低剂量的活性剂可以与第二活性剂联合给予,使得活性剂们显示出协同效应,并且在联合治疗中每一个活性剂的剂量低于当不与第二活性成分联合而给予该(活性)剂所需的剂量。

[0215] 可得到的阿片剂和阿片样物质止痛药是五种化学基团的衍生物(即,菲、苯基庚

胺、苯基哌啶、吗啡喃、和苯并吗吩烷)。药理学上,阿片剂和非阿片剂(nonopiates)在活性上差别显著。一些是强激动剂(吗啡),其它是中度-至-适度的激动剂(可待因)。相比之下,一些阿片剂衍生物显示混合激动剂-拮抗剂活性(纳布啡),然而其它是阿片剂拮抗剂(纳洛酮)。吗啡是阿片剂和阿片样物质止痛药的原型,其全部具有对中枢神经系统的类似的作用。

[0216] 吗啡在化学上源自阿片。其它毒品,如海洛因,是由吗啡或可待因加工的。这样的阿片剂已经用于医学和非医学数百年。到 19 世纪早期,吗啡已经以适用于溶液的纯的形式被提取。随着皮下注射针的引入,注射吗啡溶液已经变为给药的常见方法。在阿片中所含的二十种生物碱中,仅仅可待因和吗啡仍然在普遍临床使用中。

[0217] 阿片类的麻醉药在最强有力作用和临床上有用的药物之中,其产生中枢神经系统的抑郁(depression)。这类药物主要地用作止痛药,但具有许多其它有用的性能。吗啡,例如,用于减轻疼痛,在疼痛存在时诱发睡眠,抑止腹泻,抑制咳嗽,使呼吸困难变容易,和促进麻醉。

[0218] 当吗啡和相关的化合物长期给予时,对止痛药效果的耐受性形成,并且剂量然后必须定期增加以获得同等的疼痛减轻。最终,耐受性和物理依赖性形成,其与欣快感结合,导致具有易染个性的那些患者的过度的使用和上瘾。为此,吗啡和它的衍生物必须仅仅按照医生的指导来使用(即,没有以较大的剂量,更频繁,或者比处方规定的时间长),并且当不同的止痛药将足够时,不应当被用来治疗疼痛。

[0219] 预期 centhaquin 可用于增强阿片止痛药的止痛药效应。阿片剂止痛药包括但不限于(a)阿片;(b)阿片生物碱,如吗啡,硫酸吗啡,可待因,磷酸可待因,硫酸可待因,二乙酰吗啡,盐酸吗啡,酒石酸吗啡,和盐酸二乙酰吗啡;和(c)半合成阿片剂止痛药,如氢溴酸右美沙芬,重酒石酸二氢可待因酮,氢吗啡酮,盐酸氢吗啡酮,酒石酸羟甲左吗南,盐酸羟吗啡酮,和盐酸氧可酮。

[0220] 预期使用本文中所述的方法治疗的受试者是哺乳动物受试者。哺乳动物受试者可以是人,或任何用于人医学研究的非人动物模型,或重要的动物如家畜或宠物,例如,结伴动物。

[0221] 在疼痛的发作前,在疼痛的发作期间,或在疼痛的发作后可以进行药物组合物(一种或多种)的给予。

[0222] 本发明提供了减轻和治疗在经历疼痛的受试者中出现的症状的方法。在一个方面中,本发明提供治疗或预防疼痛的方法,其包括给予哺乳动物治疗有效量的 centhaquin。

[0223] 疼痛的原因包括但不限于炎症,损伤,疾病,肌肉痉挛和神经性事件或综合征的发作。急性疼痛通常是自我限制的,然而慢性疼痛通常持续 3 个月或更长并且可以导致患者个性、生活方式、功能能力和总体生活质量的显著变化。通过限制功能,降低活动性,陷入睡眠,和干涉普遍生活质量,无效治疗的疼痛对于正经历其的人来说可能是不利的。

[0224] 当组织受损伤时,炎性(感受伤害)疼痛可能发生,这可能源于手术或由于不利的物理、化学或热事件或者被生物试剂感染。神经性疼痛是持续的或慢性疼痛综合征,其可能源于神经系统、外周神经、背根神经节或背根,或者中枢神经系统的损伤。神经性疼痛综合征包括异常性疼痛(allodynia),各种的神经痛如疱疹后神经痛和三叉神经痛,幻痛,和复合区域性疼痛综合征,如反射交感性营养不良和灼痛。灼痛特征为与

痛觉增敏 (hyperalgesia) 和异常性疼痛 (allodynia) 结合的自发性烧灼痛。痛觉增敏 (hyperalgesia) 特征为对痛苦刺激非常的敏感性。(Meller et al., *Neuropharmacol.* 33:1471-8, 1994)。这个状况可以包括内脏痛觉增敏 (hyperalgesia), 其在内脏中形成疼痛的感觉。神经性疼痛还包括痛觉过度 (hyperpathia), 其中通常无害的刺激, 如果给予持续的时间, 导致严重的疼痛。

[0225] 在人患者中治疗慢性疼痛通常如美国专利 6, 372, 226 所述进行。在一个方面中, 经历急性炎性疼痛, 神经性疼痛, 痉挛状况, 或其它来自损伤的慢性疼痛的患者通过用合适剂量的用于本发明的方法的本文中所述的组合物鞘内给药, 例如通过腰椎穿刺到腰区来治疗。在另外的实例中, 如果受试者遭受关节炎或其它关节疼痛, 组合物关节内给予。注射的特定剂量和位置, 以及给药的频率, 取决于治疗医生技能中的各种因素。

[0226] 使用本领域已知的方法, 包括直观类比标度 (VAS, visual analog scale), 口诉言词评分法 (VRS, verbal rating scale) 和数值评分法 (NRS, numerical rating scale), 测量疼痛症状的改善:(Williamson et al., *J Clin Nurs.* 14:798-804, 2005; Carlsson, A., *Pain.* 1983 16:87-101, 1983)。对于直观类比标度, 口诉言词评分法, 和数值评分法, 通常患者被要求在痛觉刺激前后在数值等级上将它们的疼痛评级。还通过客观等级化测试如 Leeds Assessment of Neuropathic Symptoms and Signs (LANSS) Pain Scale (Bennett, M. *Pain.* 92:147-157, 2001) 评价慢性疼痛。在用包括  $\alpha 2$  肾上腺素能激动剂和 / 或内皮素受体拮抗体的组合物处理后, 痛觉刺激的超敏性降低表明干扰  $\alpha 2$  肾上腺素能受体和 / 或内皮素受体的正常活性减轻了与慢性疼痛有关的症状。在本发明的另一个方面中, 本文中所述的组合物和如上所述的另一疼痛药物一起给予, 其中在减轻慢性疼痛的症状中治疗提供了协同效应。

[0227] 在给予止痛药后的不同时间点测量疼痛的改善并且评价基于测量等级的疼痛的降低。在一种实施方案中, 每 1、2、3、4、5、6、或 8 周, 或者如由治疗医生确定的, 进行疼痛症状的评价。在一种实施方案中, 当相比于在处理前的疼痛症状的评价, 受试者中的疼痛症状的改善可以为至少 10%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 或 100%, 如使用技术公认的疼痛等级测量的。

[0228] 作为另外的方面, 本发明包括试剂盒, 其包括以促进其使用而实施本发明的方法的方式包装的一种或多种化合物或组合物。在最简单的实施方案中, 这样的试剂盒包括在容器如密封瓶子或器皿中包装的如可用于实施本发明的方法的本文中所述的化合物或组合物 (即, centhaquin), 以及附着至容器的或包括在包装内的, 描述使用该化合物或组合物来实践本发明的方法的标签。优选地, 化合物或组合物以单位剂量形式包装。试剂盒可以进一步包括根据优选的给药途径适用于给予组合物的装置。

[0229] 图 9-13 中的数据表明

[0230] centhaquin (0.1, 0.3 和 0.9mg/kg, iv) 产生剂量依赖性止痛;

[0231] centhaquin (0.3 和 0.9mg/kg, iv) 增强吗啡止痛;

[0232] centhaquin (0.3mg/kg, iv) 的止痛效果可与 4mg/kg 剂量的吗啡止痛相比; 和

[0233] centhaquin 的止痛效果 (0.9mg/kg, iv) 显著地大于 4mg/kg 剂量的吗啡止痛。

[0234] 参考文献

[0235]

LG Hegde et al. *Pharmacol Res* 36:109-114 (1997).

A Gulati et al. *Eur J Pharmacol* 231:151-156 (1993).

RC Sumal et al. *Pharmacol Res* 22:319-329 (1990).

M Bhatnagar et al. *Arzneimittel-Forschung* 35:695-697 (1985).

A Gulati et al. *Drug Development Research* 23:307-323 (1981).

A Murli et al. *Indian Journal of Chemistry Section B-Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry* 28B: 934 (1989).

[0236] 治疗复苏出血性休克 (resuscitative hemorrhagic shock) 的方法

[0237] 本发明还涉及治疗复苏出血性休克 (resuscitative hemorrhagic shock) 的方法,包括给予需要其的个体治疗有效量的 centhaquin。

[0238] 一般说来,出血性休克的特征为组织灌注中的严重降低 (critical reduction in tissue perfusion),这导致组织酸中毒和低氧症,损害细胞代谢活性,和细胞与器官功能。文献已经记录了在出血性休克期间的血管收缩剂的低响应性。从适度至严重的出血性休克状态包括了很多病理生理、免疫和代谢过程。在外伤性休克期间碱缺失的增加恰恰与多器官衰竭和代谢失调的状态相关,随后是人的死亡。碱缺失平行于血液动力学变量,包括平均动脉压,心率,和心搏量。在改善休克代偿的复苏期间氧递送和消耗的变化精确地反映在碱缺失变化中。然而,碱缺失是随着休克发作和发展的代谢应力的指标,随着损伤和失血的开始,血管中的内皮和平滑肌细胞可以释放很多血管介质 (vasomediators)。

[0239] 然而,可获得有限的信息来限定在出血性休克期间在血管代谢失调状态中血管介质 (vasomediators) 的作用。已经观察到循环血浆 ET-1 的浓度的增加。不明确出血性休克的持续时间是否与在出血性休克的不同状态期间的全身性或区域性 (局部) ET-1 水平有关。有可能在出血性休克期间对血容量的损失快速代偿的需要刺激了 ET-1 的产生,其又可以调节肾上腺素能受体。因此, centhaquin 用作肾上腺素能剂,作为用于治疗与出血性休克的代偿和失代偿状态有关的状况的复苏方案 (solution) 的主要组分。该方法不局限于出血性休克,但可用于治疗任何由于循环衰竭造成的休克 (shock due to circulatory failure)。

[0240] 图 14 显示了归一化至  $\beta$ -肌动蛋白 (action) 的  $ET_A$  受体的表达的倍数变化,通过密度测定法评价。值表示为均值  $\pm$  SEM。\* $p < 0.05$  相比于赋形剂对照。更具体地说,图 14 是免疫印迹,其显示了在 1 小时的可乐定治疗后大鼠脑 (条带 -2 至条带 -4) 和腹主动脉 (条带 -5 至条带 -7) 中的  $ET_{Ar}$  表达。条带 -1: 蛋白标记;条带 -2: 赋形剂处理;条带 -3: 可乐定 (10  $\mu$ g/ml) 处理;条带 -4 可乐定 (90  $\mu$ g/ml) 处理;条带 -5: 赋形剂处理;条带 -6: 可乐定 (10  $\mu$ g/ml) 处理;条带 -7: 可乐定 (90  $\mu$ g/ml) 处理。墨迹 (blot) 代表具有类似结果的四次不同的实验 (A)。柱状图显示了归一化至  $\beta$ -肌动蛋白的大鼠脑和腹主动脉中的  $ET_{Ar}$  的表达的倍数变化,通过密度测定法评价。值表示为均值  $\pm$  SEM,其中在每组中,  $n=4$  大鼠。\* $p < 0.05$  相比于赋形剂治疗。

[0241] 图 15 显示了在出血性休克模型中用林格 (氏) 乳酸盐和 centhaquin 复苏的大鼠中的乳酸盐水平。乳酸盐的值表示为均值  $\pm$  SEM。其中  $n=5$  大鼠 / 每组。#  $p < 0.05$  相比于基线和 \* $p < 0.05$  相比于 LR-100 和在诱发休克后的基线乳酸盐水平。在逆转血乳酸盐水平中,

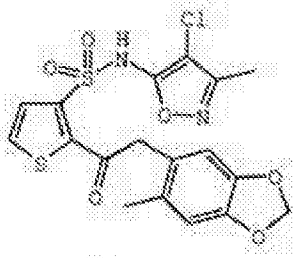
LR-100 不是有效的。LR-300 有效地降低血乳酸盐水平。曲线图显示,在给予 0.05-0.45mg/kg 的 centhaquin 的情况下,乳酸盐 (mmol/L) 降低。较低剂量的 centhaquin 比较高剂量更有效。

[0242] 图 16 显示了在出血性休克模型中用林格(氏)乳酸盐和 Centhaquin 复苏的大鼠的随时间的标准碱缺失 (standard basis deficit) (mEq/L)。碱缺失的值表示为均值  $\pm$  SEM, 其中 n=5 大鼠 / 每组。# p<0.05 相比于基线。↑, ↓ p<0.05 相比于基线,在出血性休克后的碱 (↑ - 高碱缺失, ↓ - 低碱缺失)。

[0243] 图 17 显示了在出血性休克模型中用林格(氏)乳酸盐和 centhaquin 复苏的大鼠的存活时间的改善。值表示为均值  $\pm$  SEM, 其中 n>5 大鼠 / 每组。\*p<0.05 相比于 LR-100。# p<0.05 相比于 LR-300。当 centhaquin 随 LR-100 给予时,数据表明存活时间增加。

[0244] 图 18 和 19 分别是随时间用 LR-100 和 LR-300 复苏大鼠的压力-容积环。图 20 包含压力-容积环,其显示用 LR-100 和 centhaquin (0.05mg/kg) 的复苏效应。通过比较图 20 的压力-容积环与图 18 的环,观察到除 LR-100 外,通过给予 centhaquin 的改进。

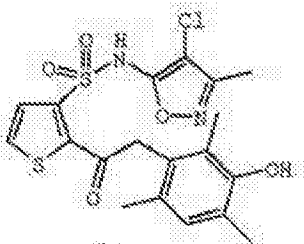
附录A  
选择性ET<sub>A</sub>拮抗剂



1

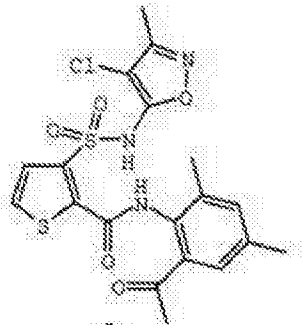
sitasantan

[0245]



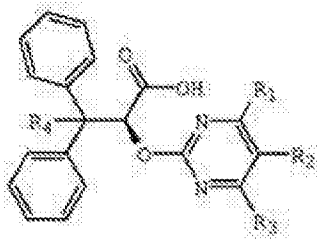
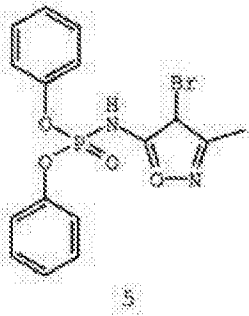
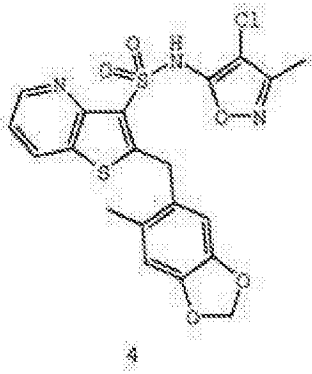
2

TBC2576



3

TBC3214

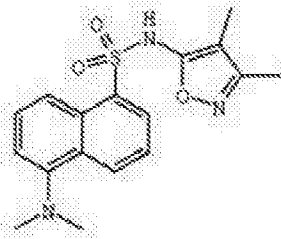


6  $R_1=R_3=R_4=CH_3$ ,  $R_2=H$

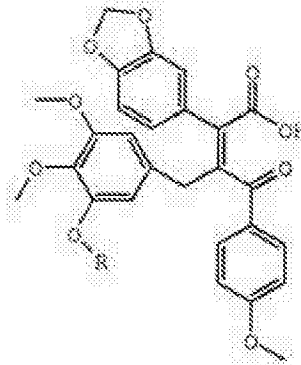
7  $R_1=R_3=R_4=OCH_3$ ,  $R_2=F$

8  $R_1=OCH_3$ ,  $R_2=H$ ,  $R_3=CH_3$ ,  $R_4=-OCH_2CON(CH_3)C_6H_5$

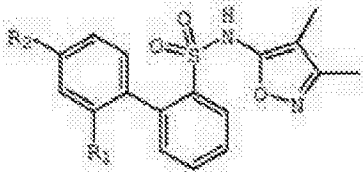
[0246]



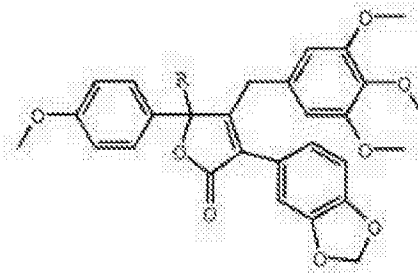
9  
BMS 182,874



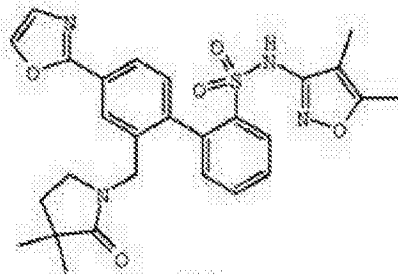
16 R=CH<sub>3</sub> (FD156787)  
17 R=CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H



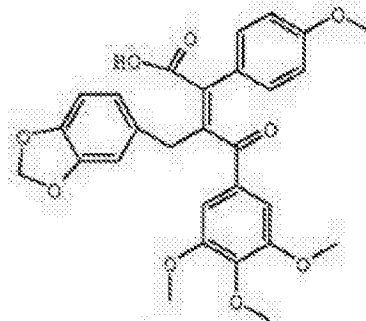
- 10 R<sub>1</sub>=CH<sub>2</sub>OH, R<sub>2</sub>=H
- 11 R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=2-噁唑基
- 12 R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=2-噁唑基
- 13 R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=4-甲氧基乙氧基  
甲基-1-氧代-1,2,4-咪唑-2-基
- 14 R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=1,3-重氮-2-丁基-1-  
氧代螺(3,4)-1-壬烯-3-基甲基



18 R=OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H  
19 R=OCONHCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>

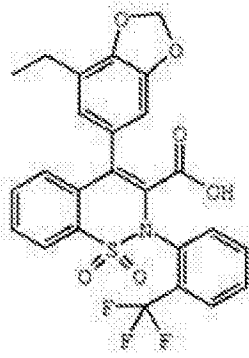


15

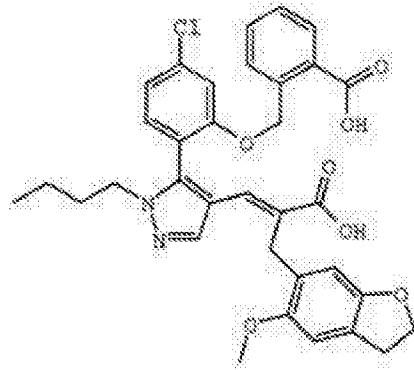


20

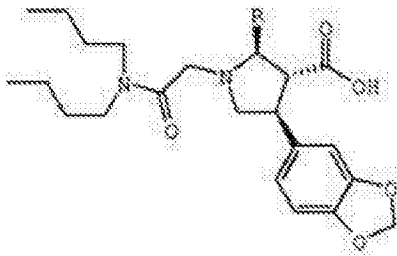
[0247]



21  
PD186980

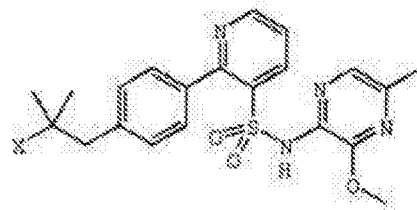


25  
SB247083



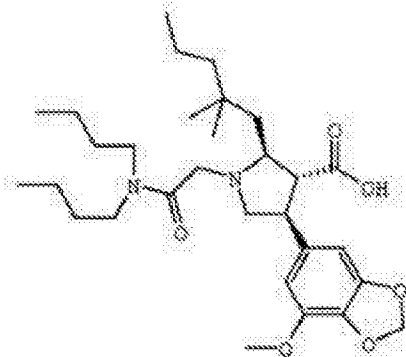
22 R=C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-4-OCH<sub>3</sub> (ABT-627)

23 R=CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-2-吡啶基

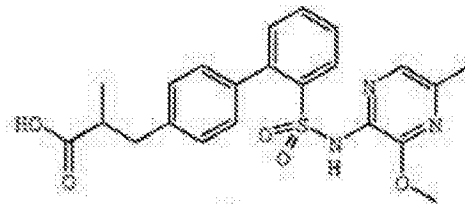


26 X=CO<sub>2</sub>H (Z1611)

27 X=H

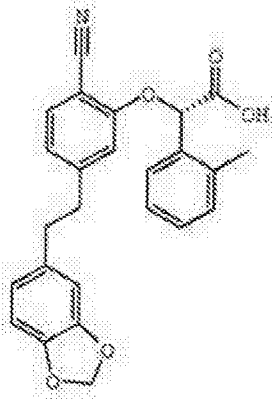


24  
ABT-546

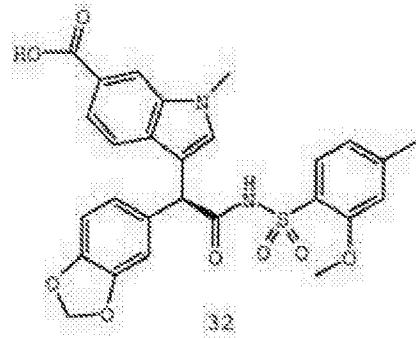


28

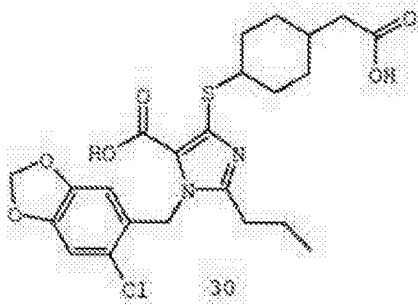
[0248]



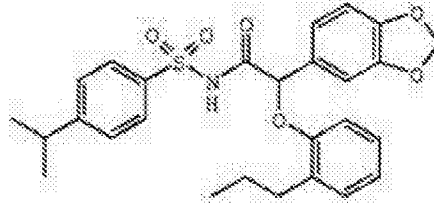
RPR118031A  
29



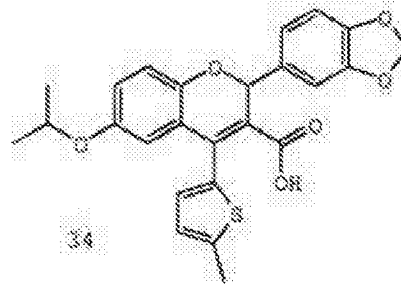
32



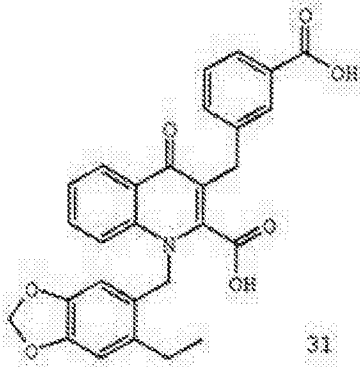
30



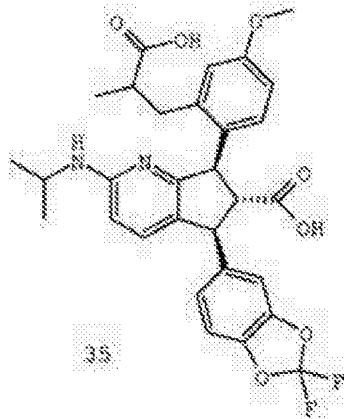
33



34



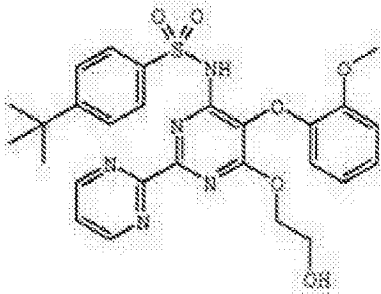
31



35

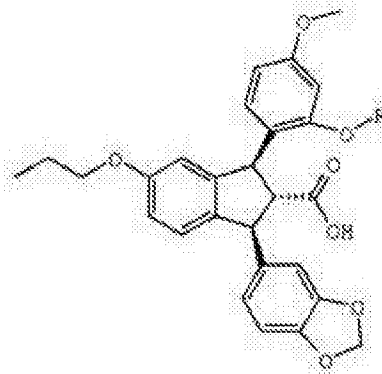
[0249]

附录 B  
平衡 ET<sub>2</sub>/ET<sub>3</sub> 拮抗剂



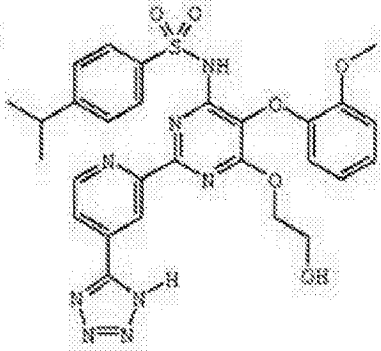
波生坦 (bosentan)

46

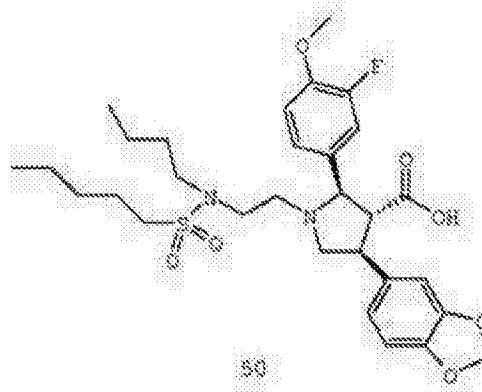


48 R=CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H SB209670

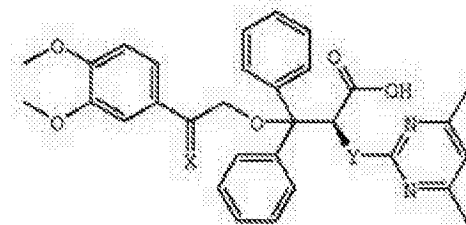
49 R=CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH SB217242



47



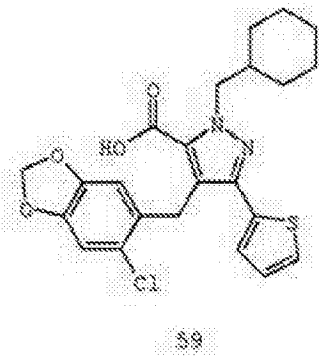
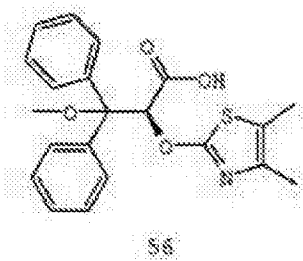
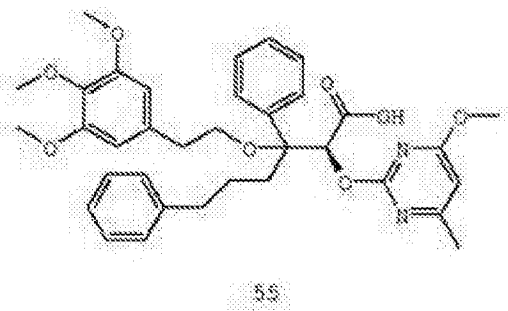
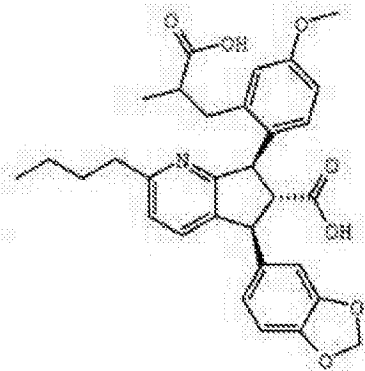
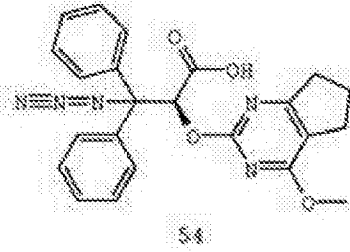
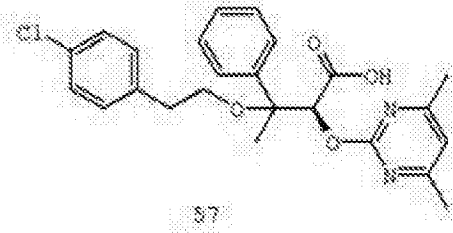
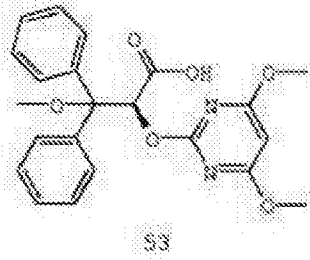
50



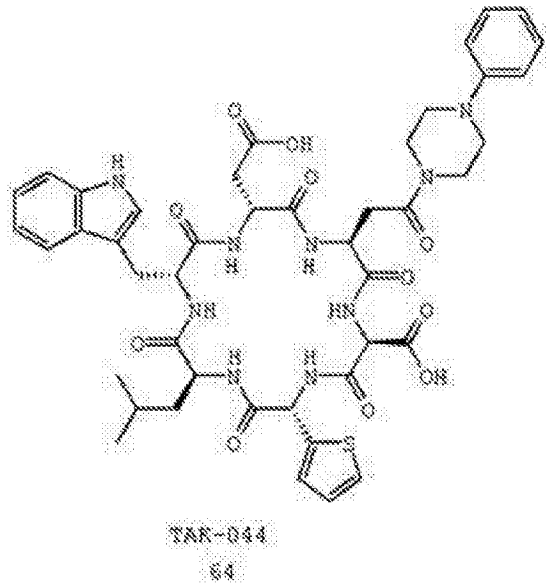
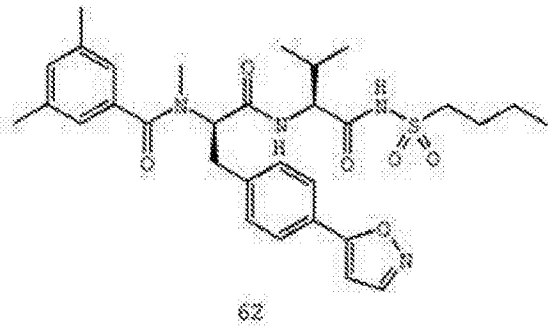
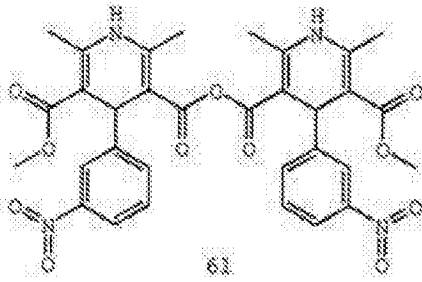
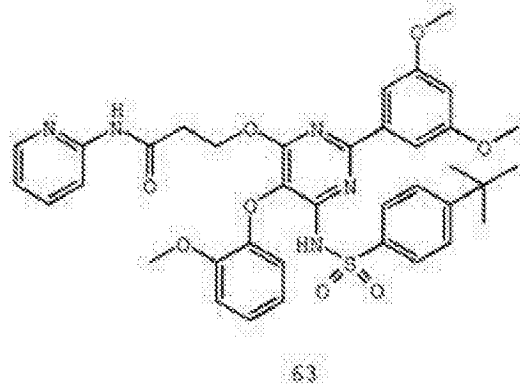
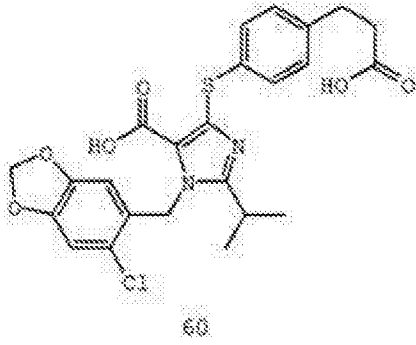
51 X=H<sub>2</sub>, Y=CH<sub>2</sub> S-LU 302872

52 X=O, Y=O

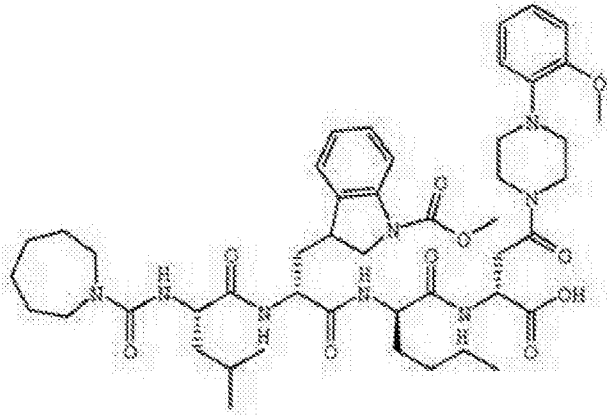
[0250]



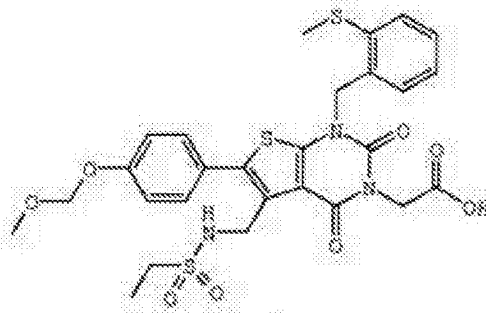
[0251]



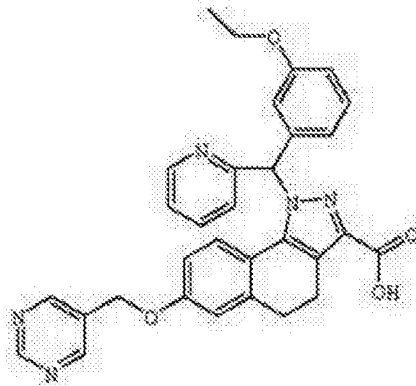
[0252]



65



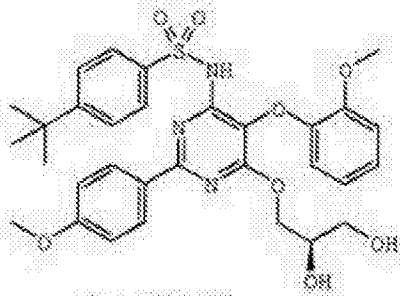
66



67

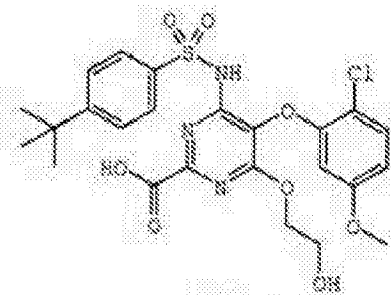
[0253]

附录C  
选择性 ET<sub>B</sub> 拮抗剂

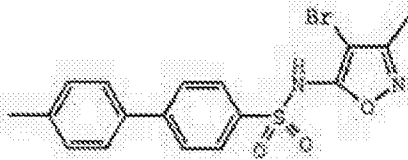


PO 46-8443

36

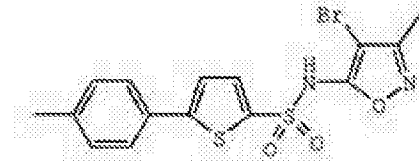


37

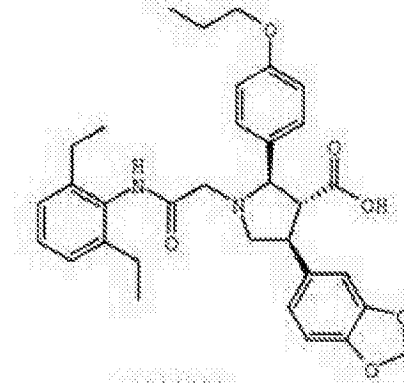


TBC10950

38

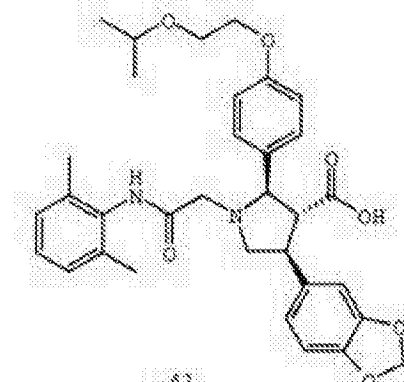


39



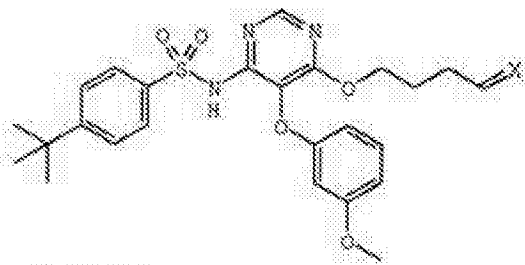
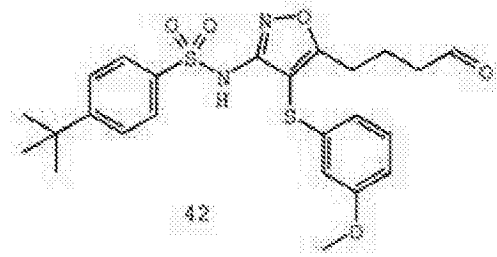
A192621

40

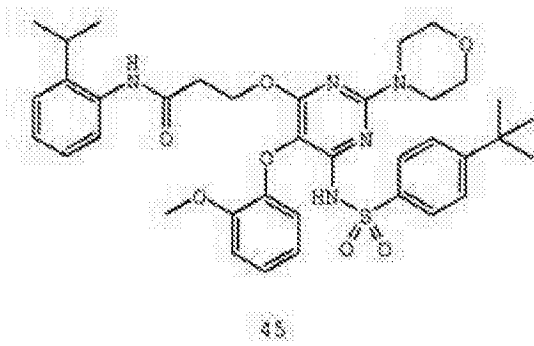


41

[0254]

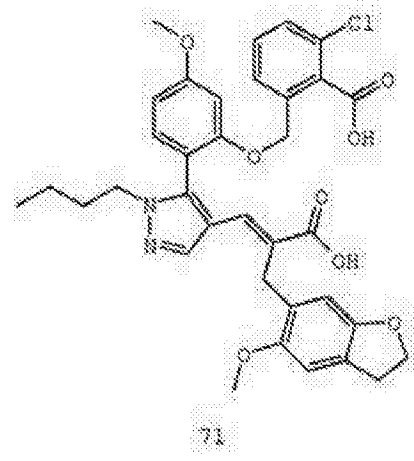
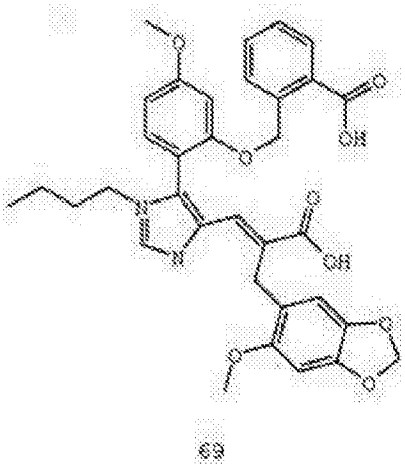
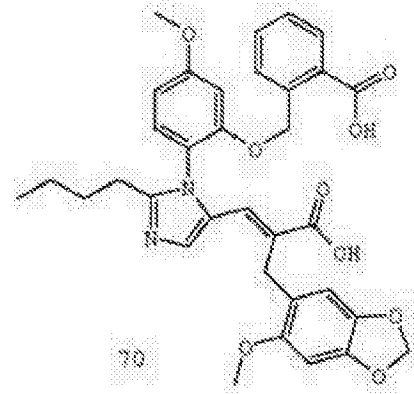
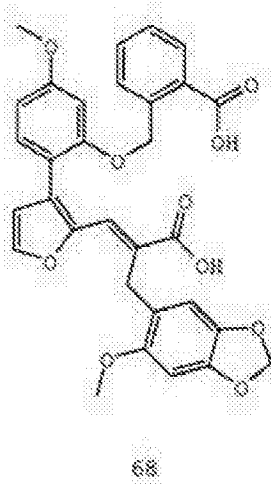


44 X=NNHCO-3-吡啶基

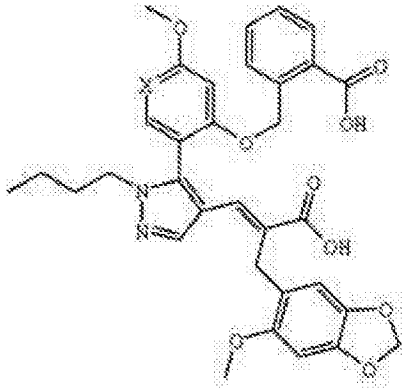


[0255]

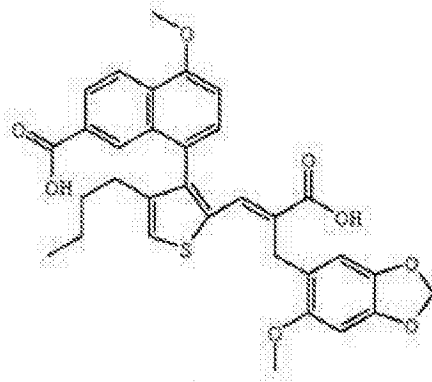
附录 D  
杂类 E-T 衍生物



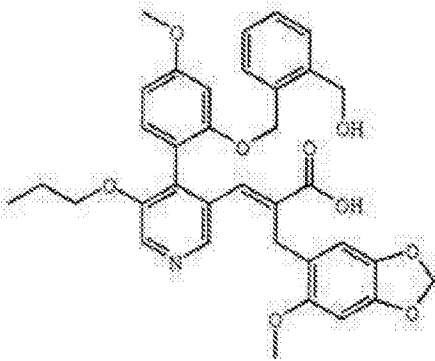
[0256]



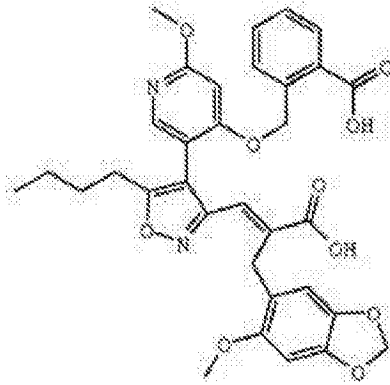
72 X=C  
73 X=N



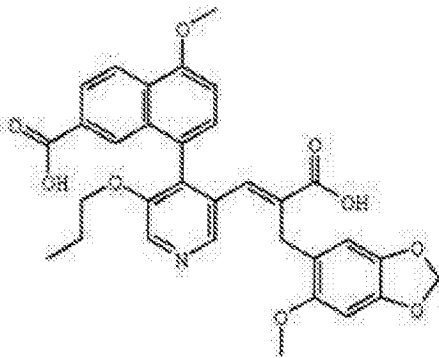
76



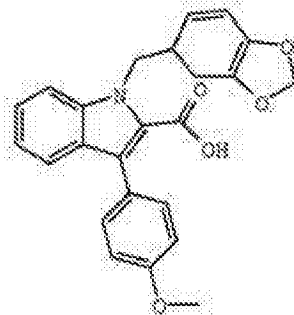
74



77

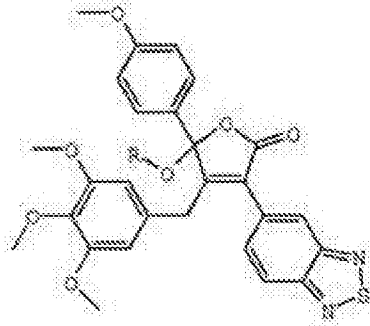


75

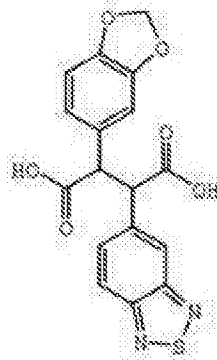


78

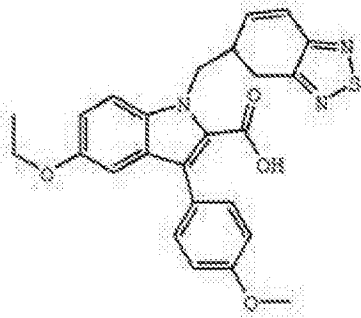
[0257]



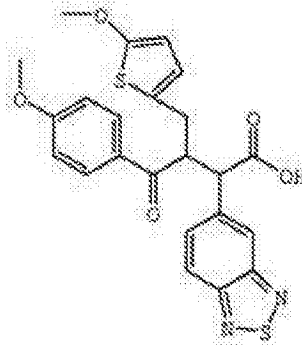
79: R=H  
80: R=CONHCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>



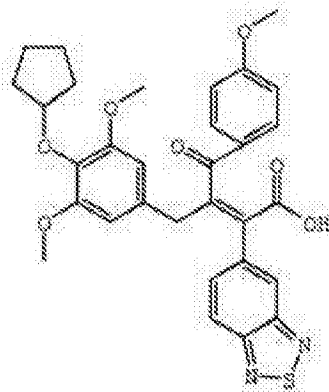
82



81

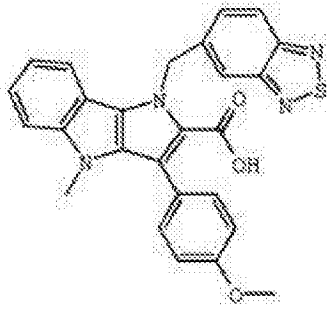


83

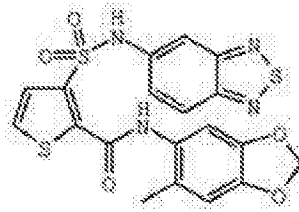


84

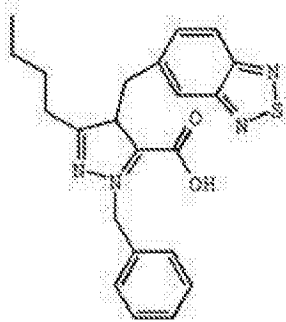
[0258]



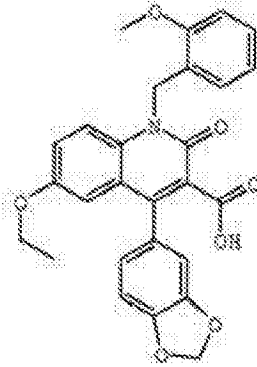
85



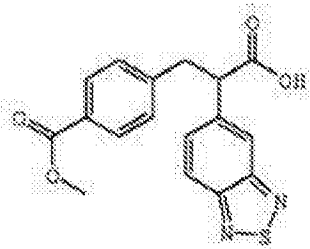
88



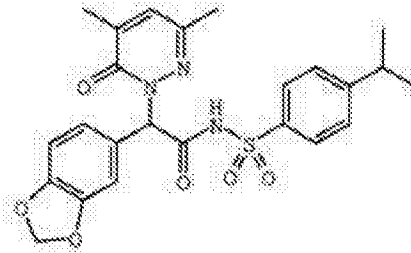
86



89

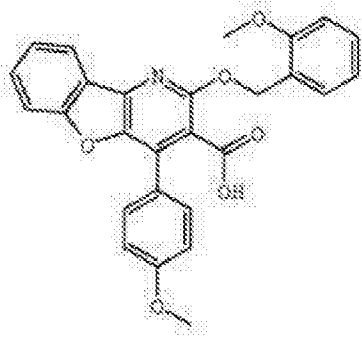


87

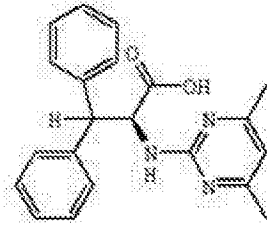


90

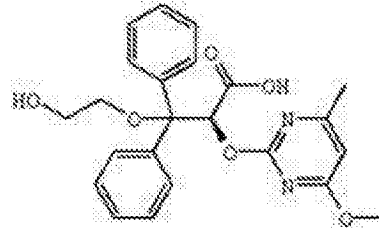
[0259]



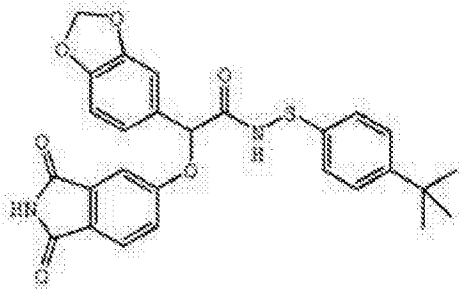
91



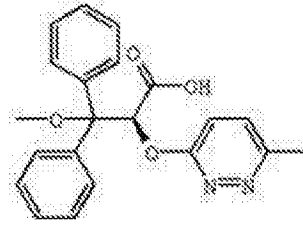
94



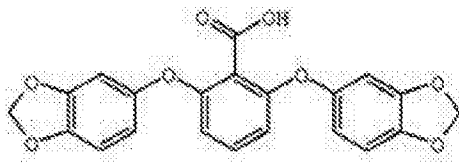
95



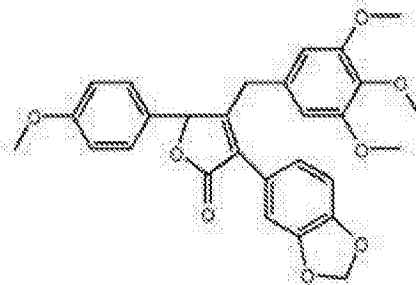
92



96

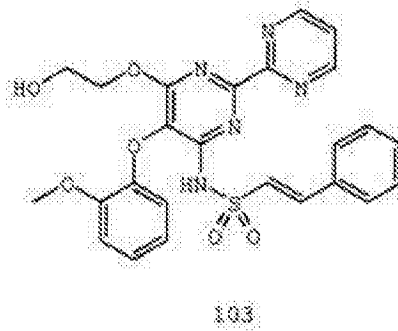
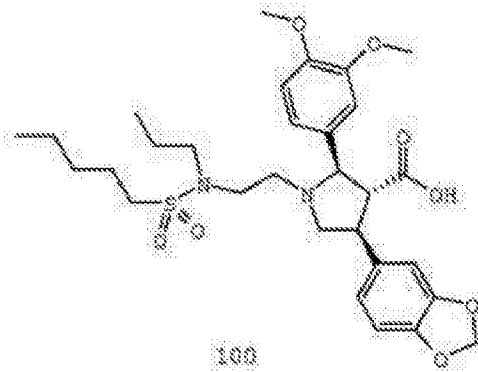
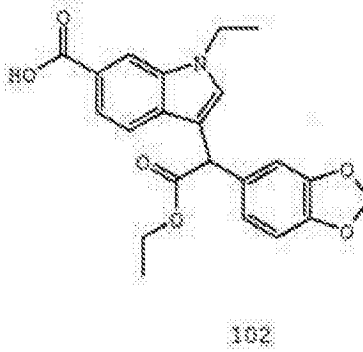
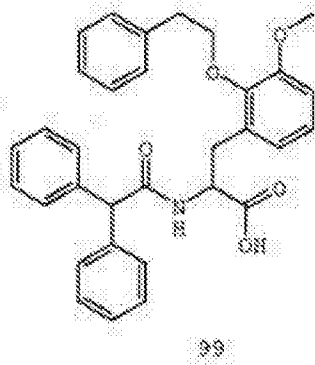
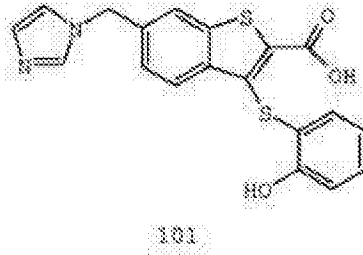
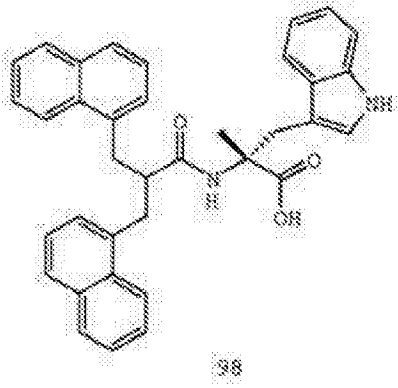


93

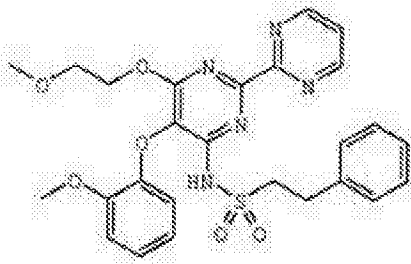


97

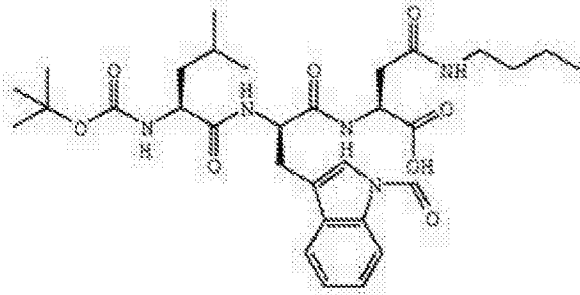
[0260]



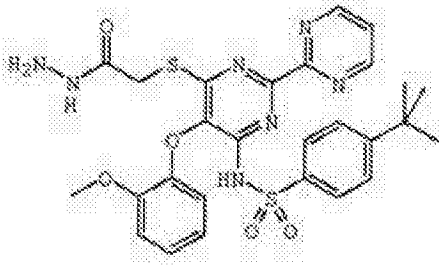
[0261]



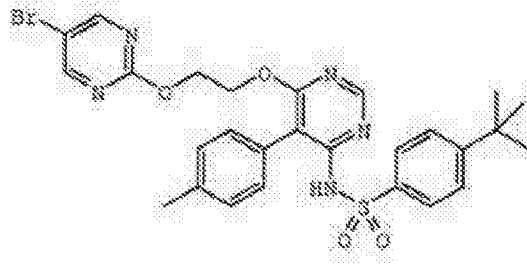
104



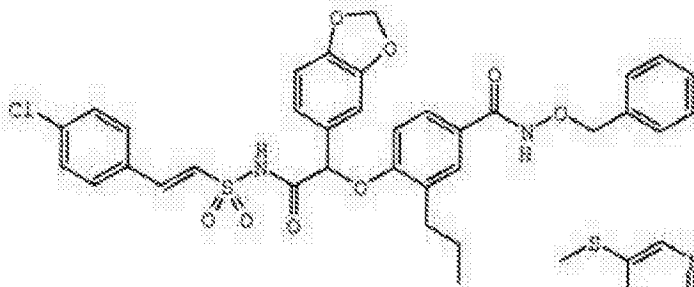
107



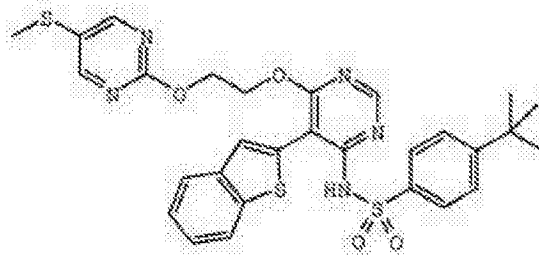
105



108



106



109

[0262] 如上所述的本发明的变体和变化可以在不背离其精神和范围的情况下做出，因此，仅仅应当施加这样的限制，其是由所附权利要求指明的。

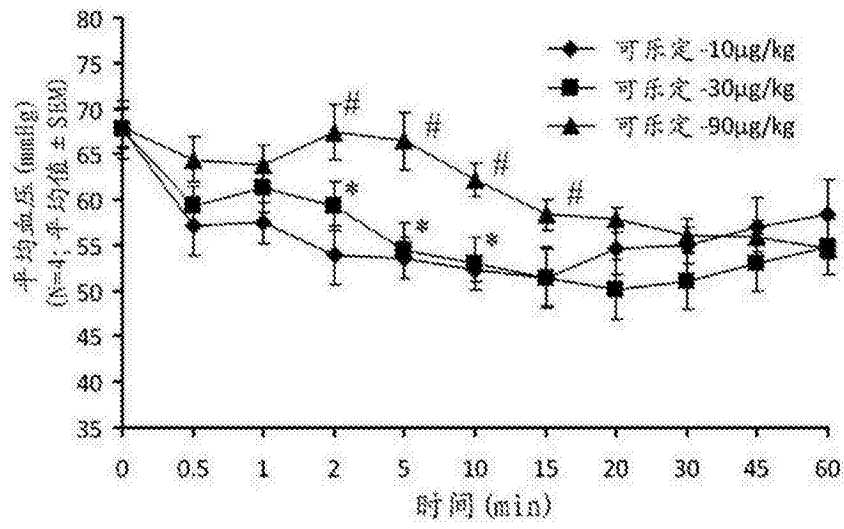


图 1A

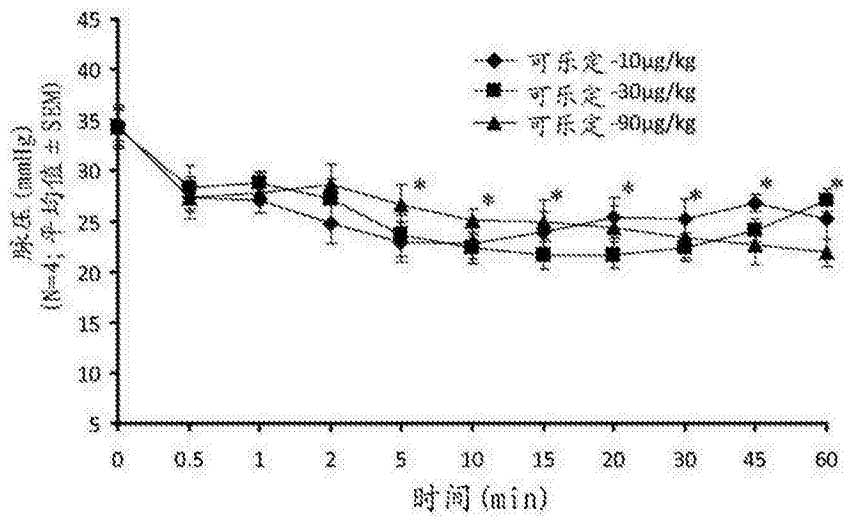


图 1B

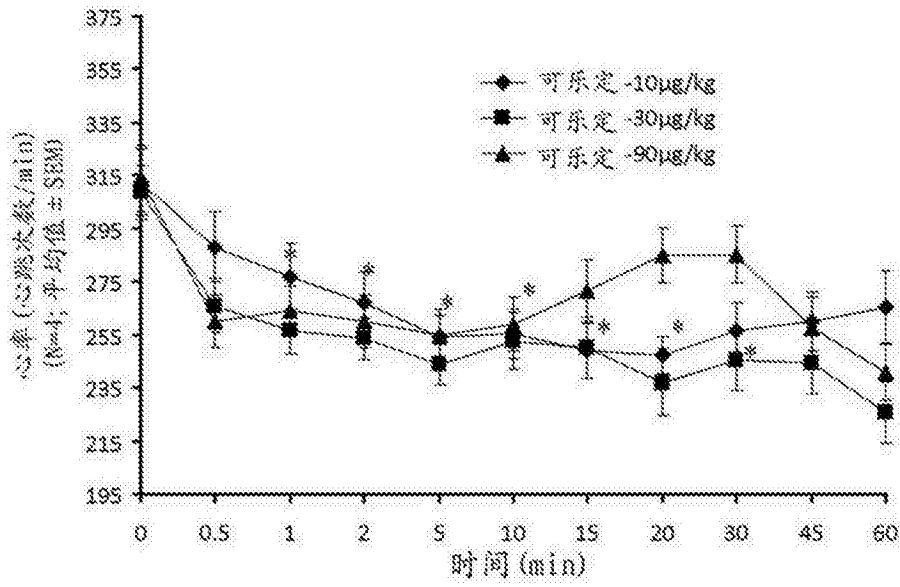


图 1C

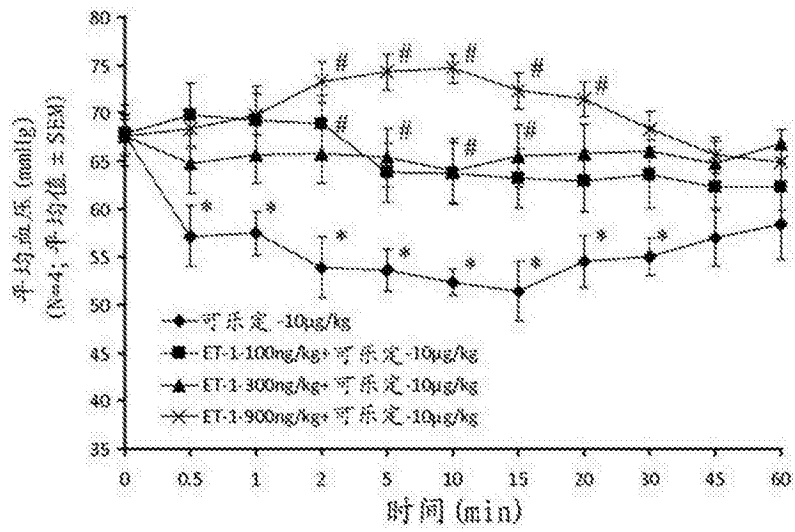


图 2A

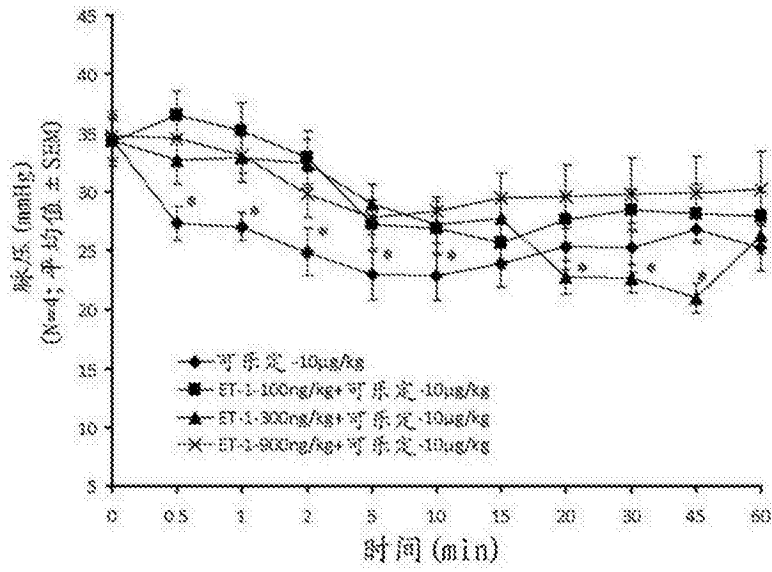


图 2B

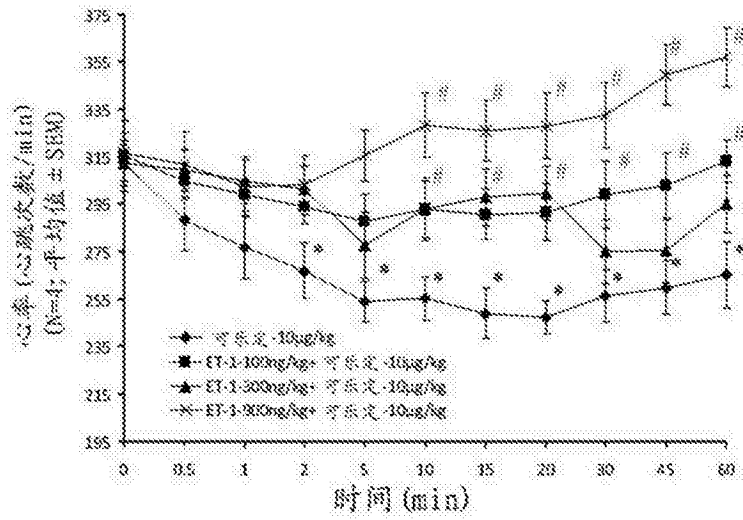


图 2C

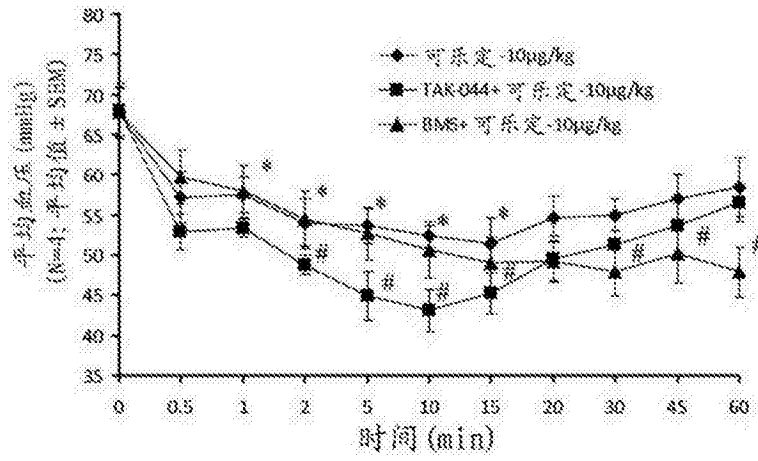


图 3A

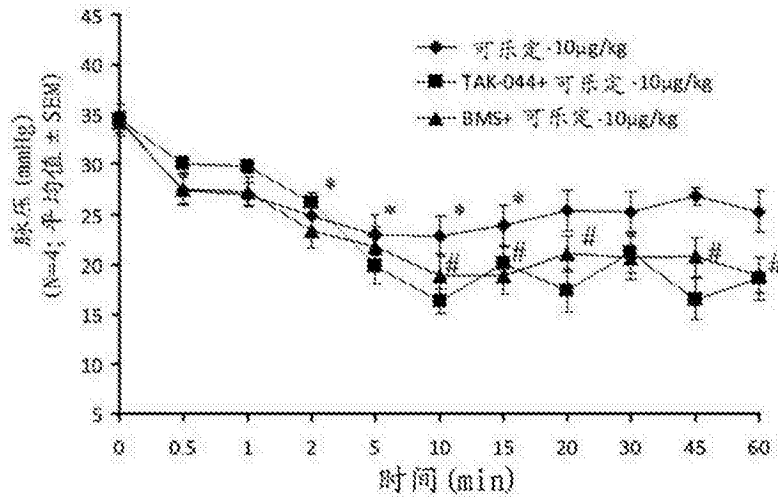


图 3B

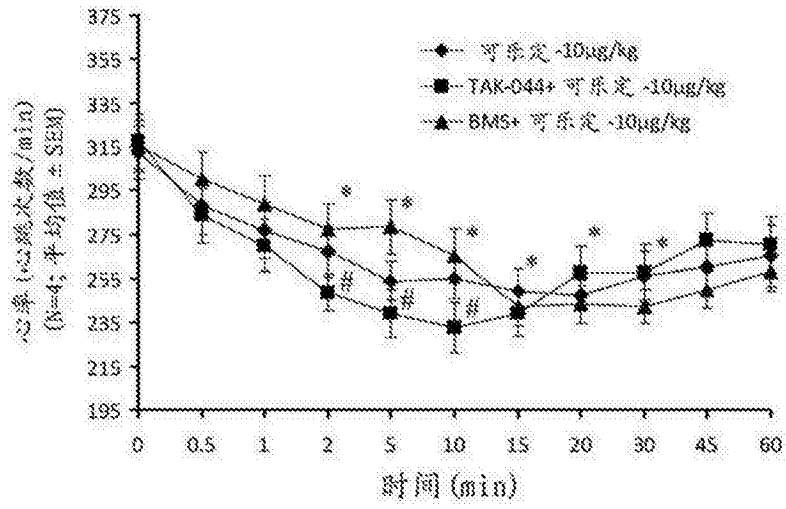


图 3C

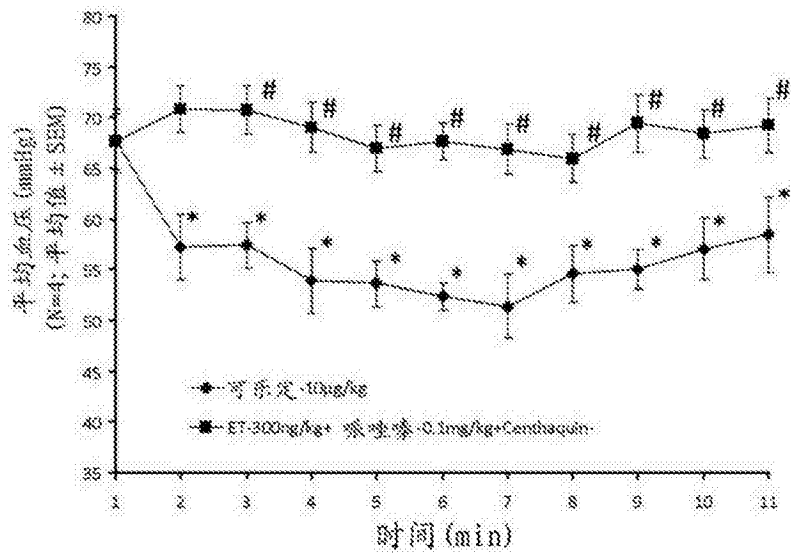


图 4A

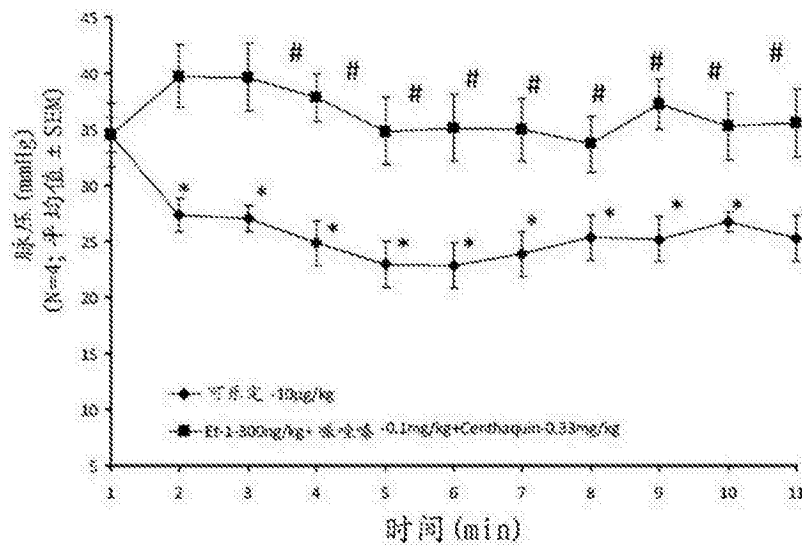


图 4B

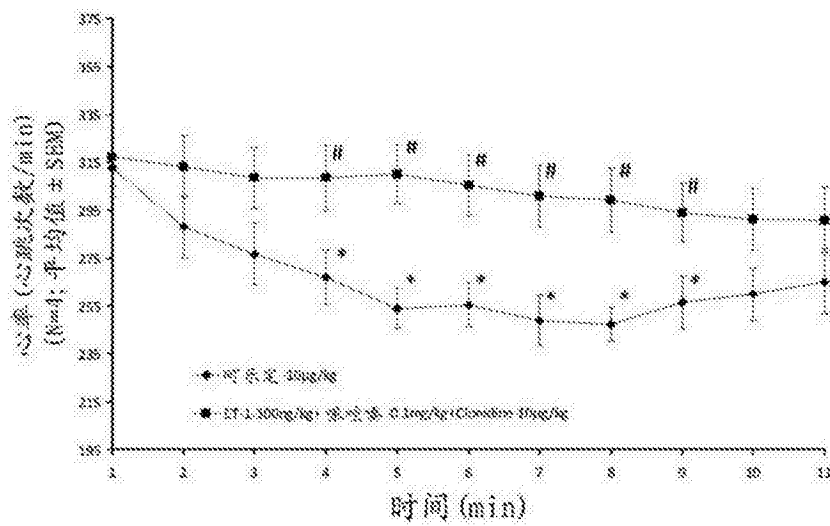


图 4C

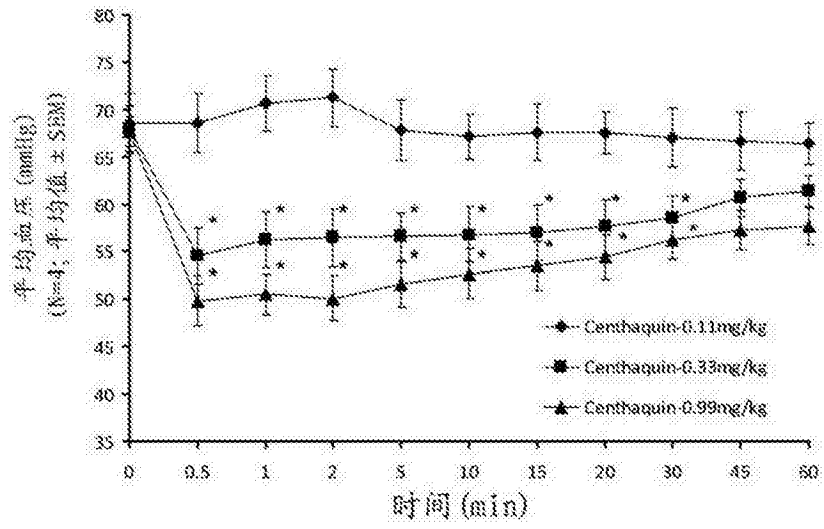


图 5A

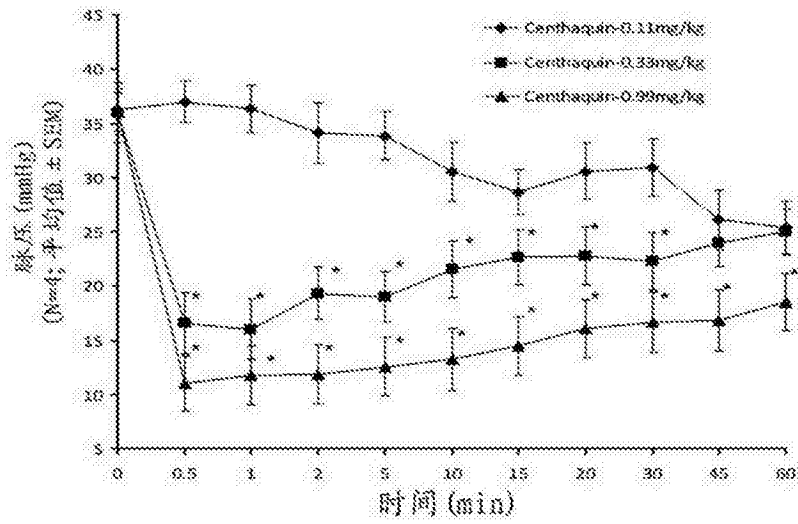


图 5B

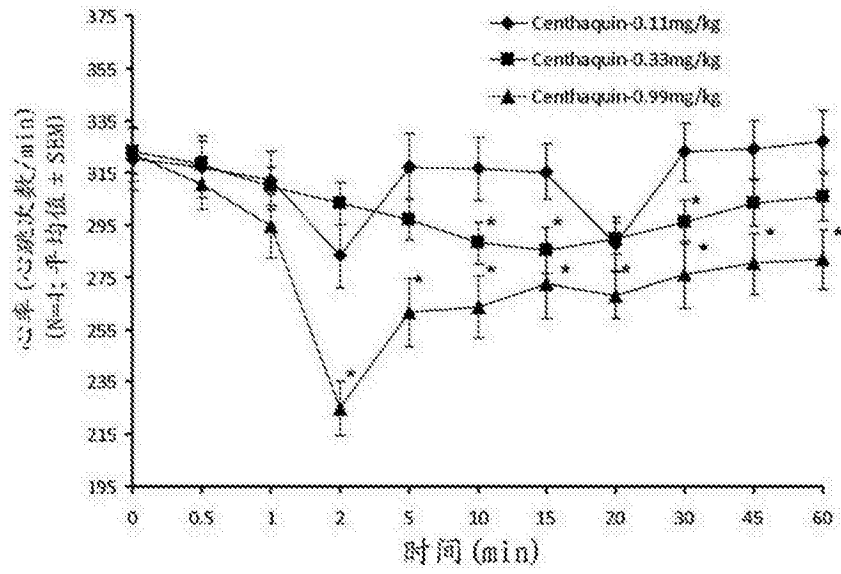


图 5C

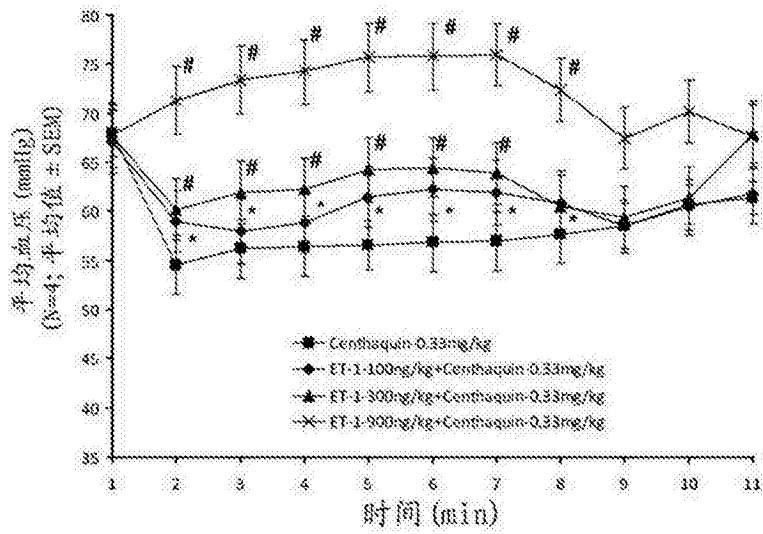


图 6A

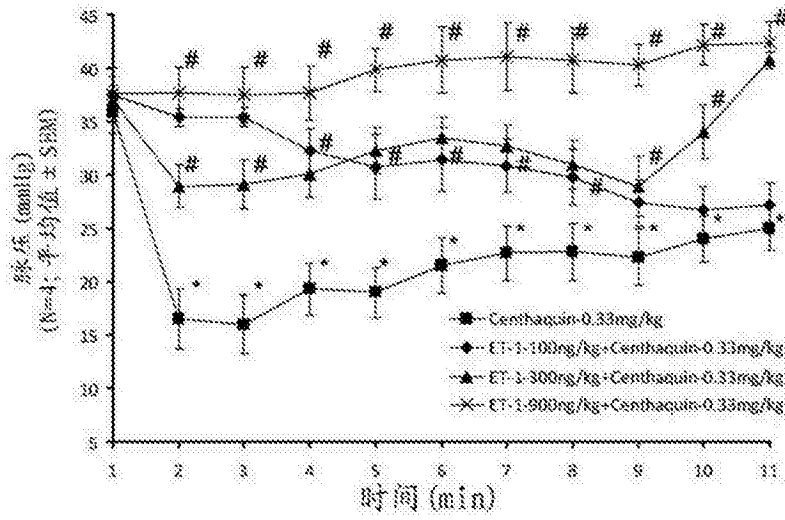


图 6B

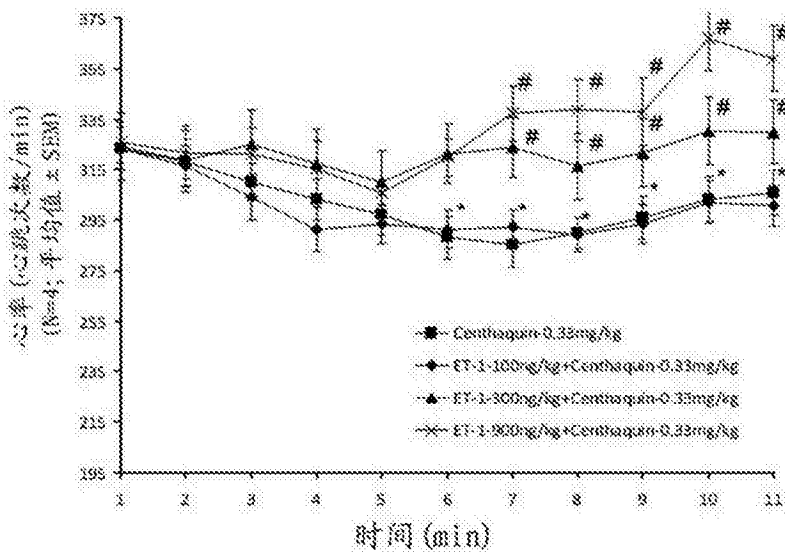


图 6C

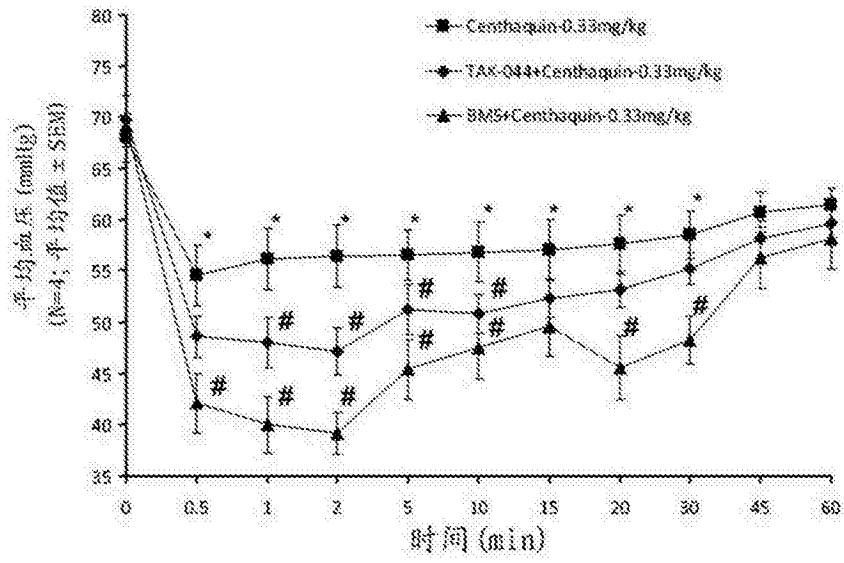


图 7A

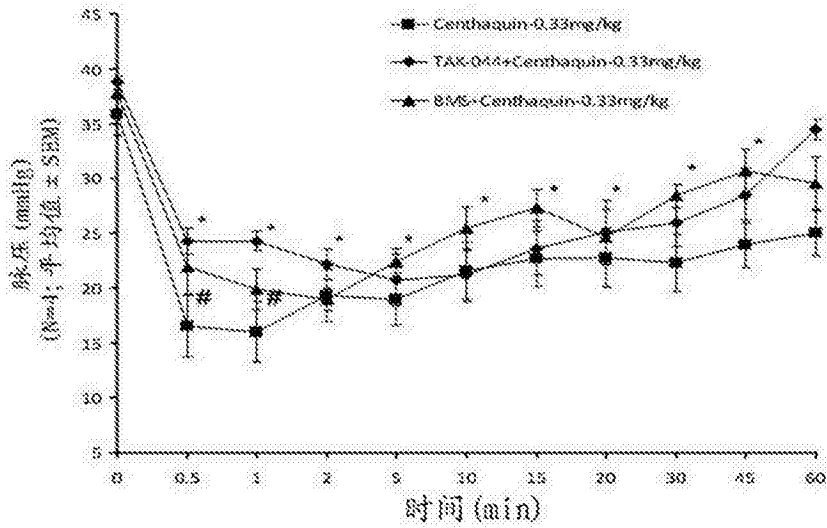


图 7B

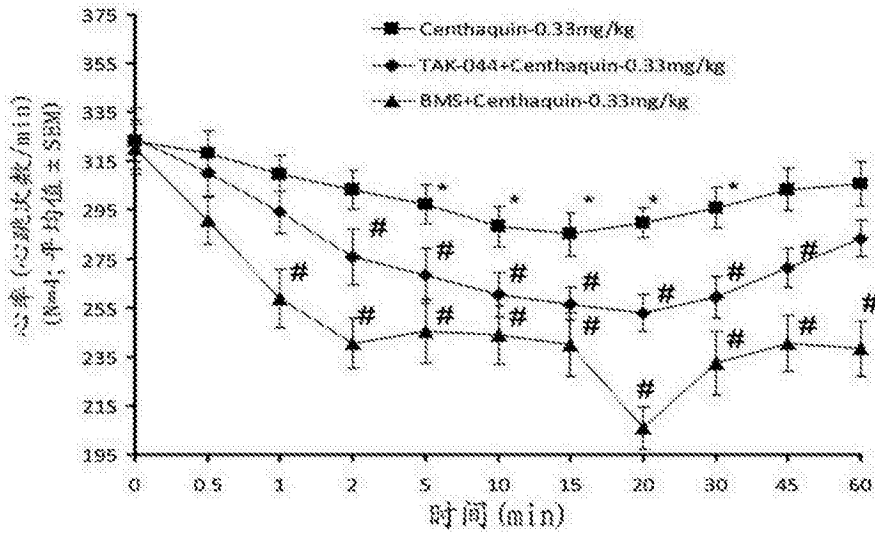


图 7C

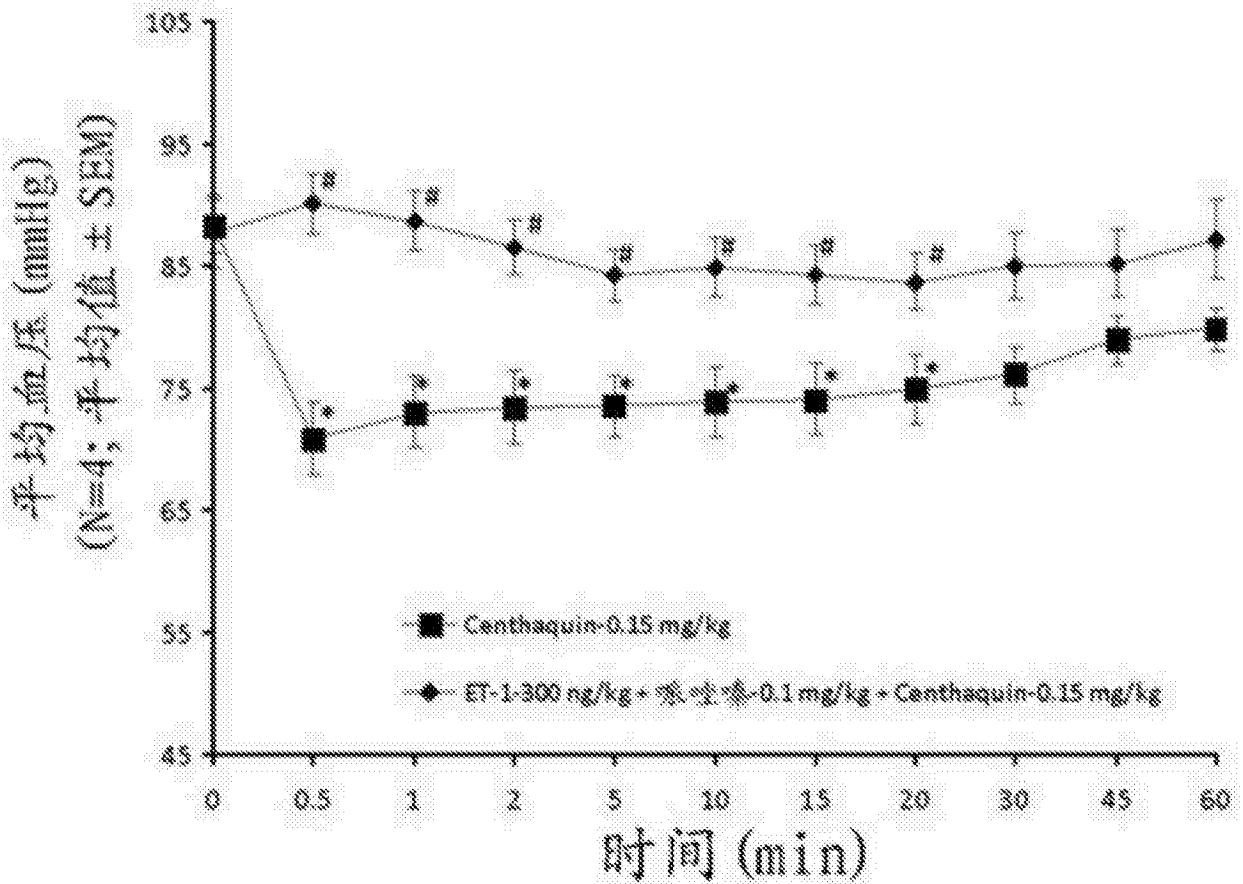


图 8A

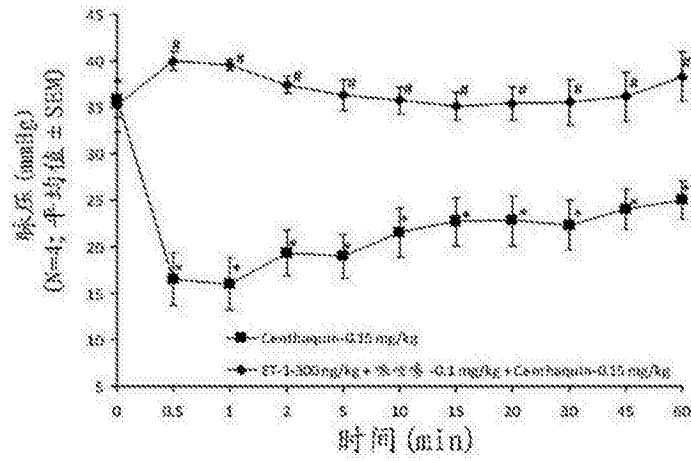


图 8B

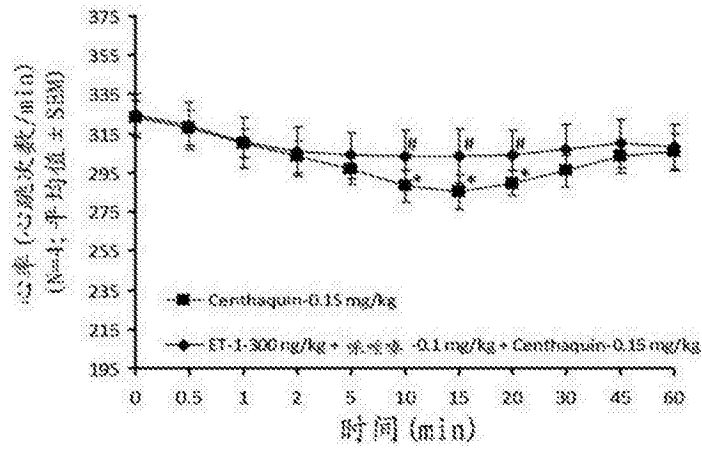


图 8C

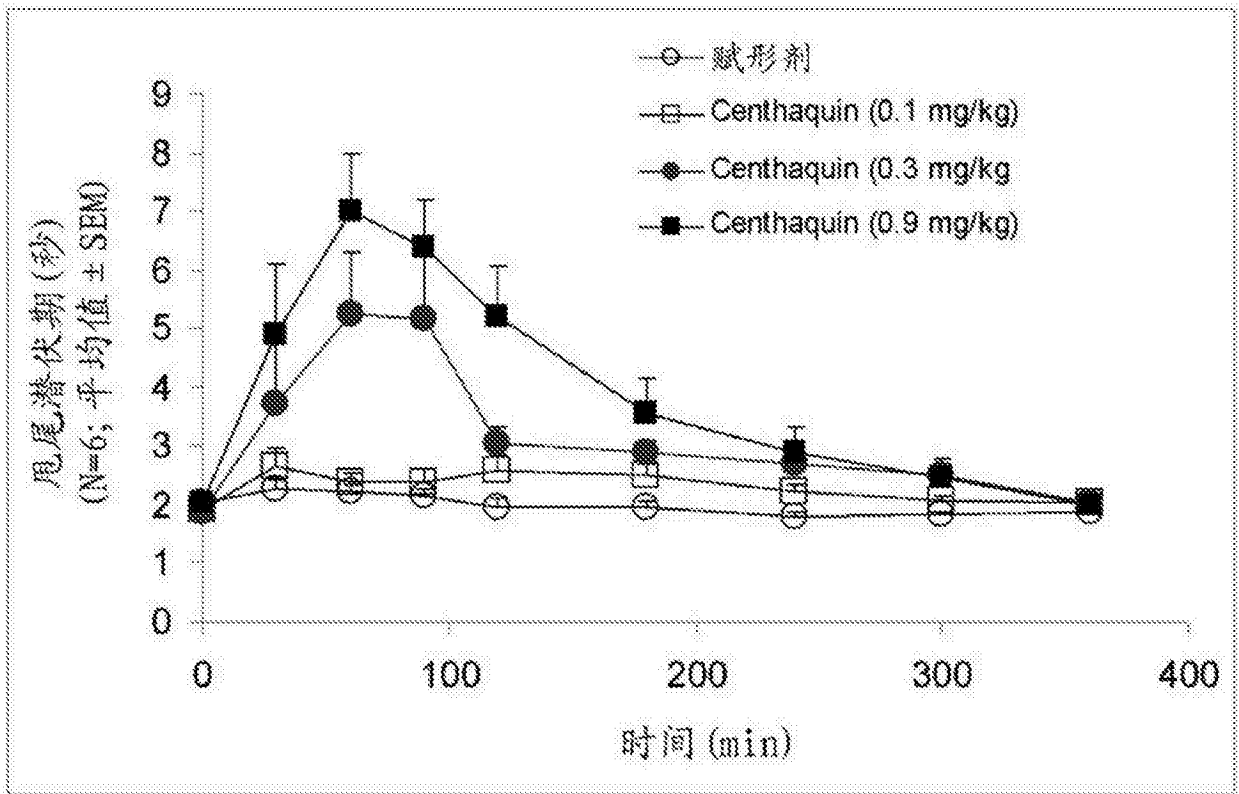


图 9

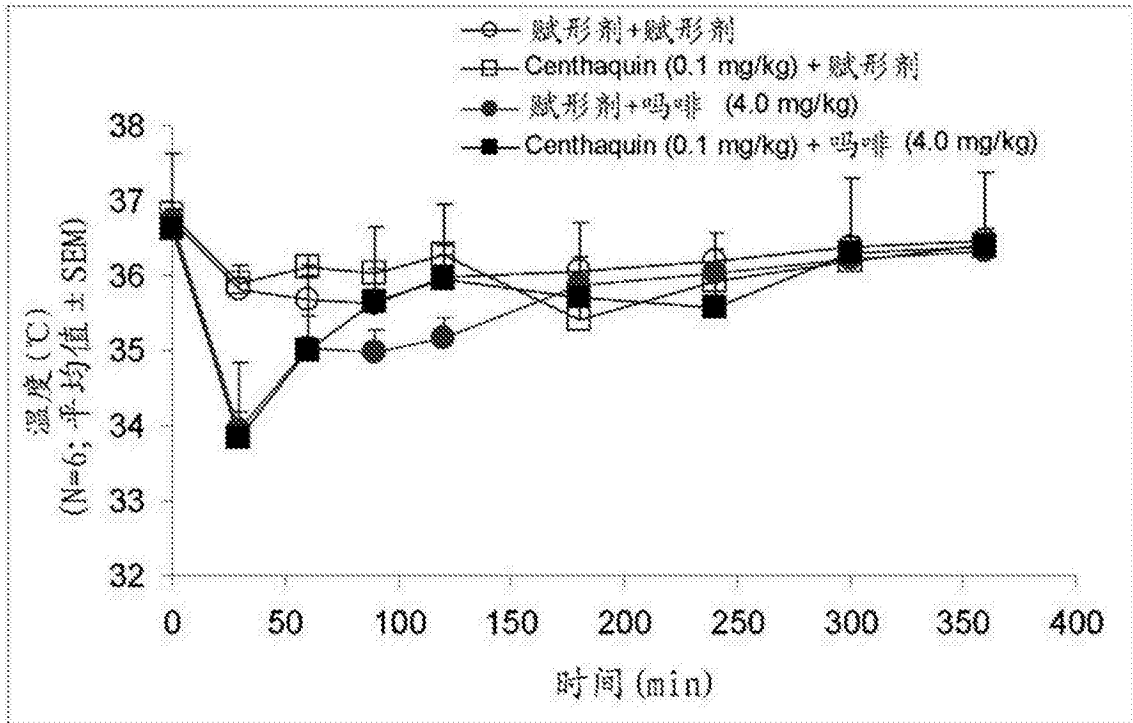


图 10

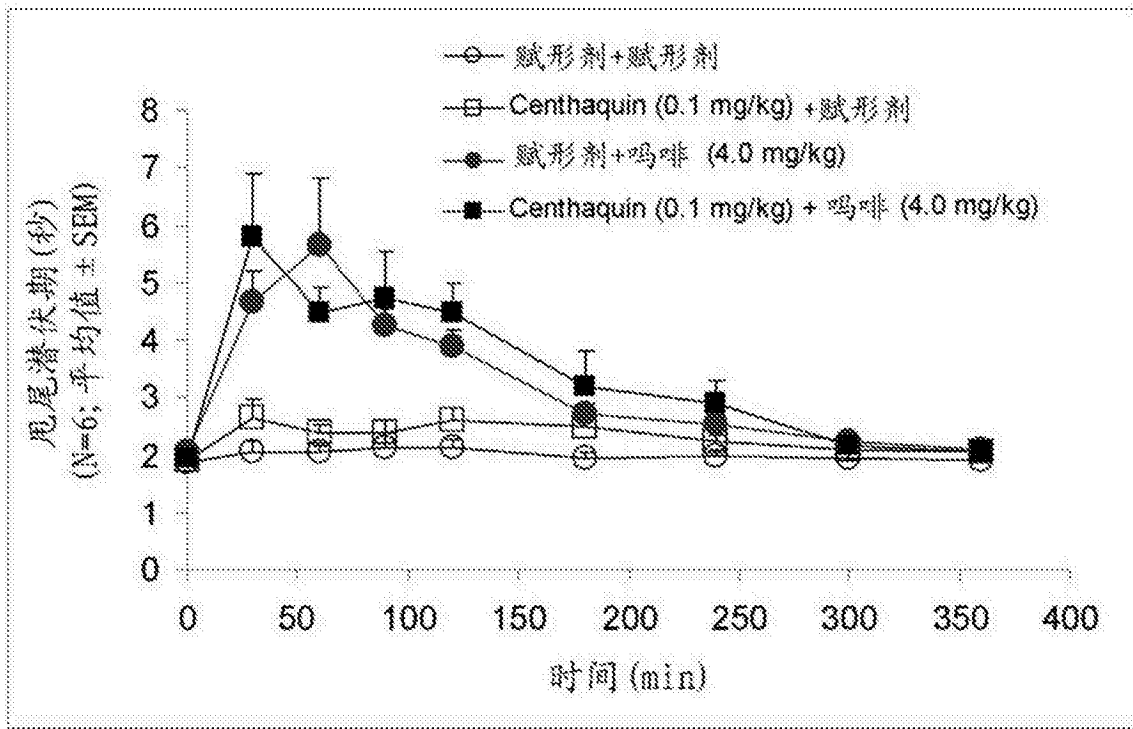


图 11

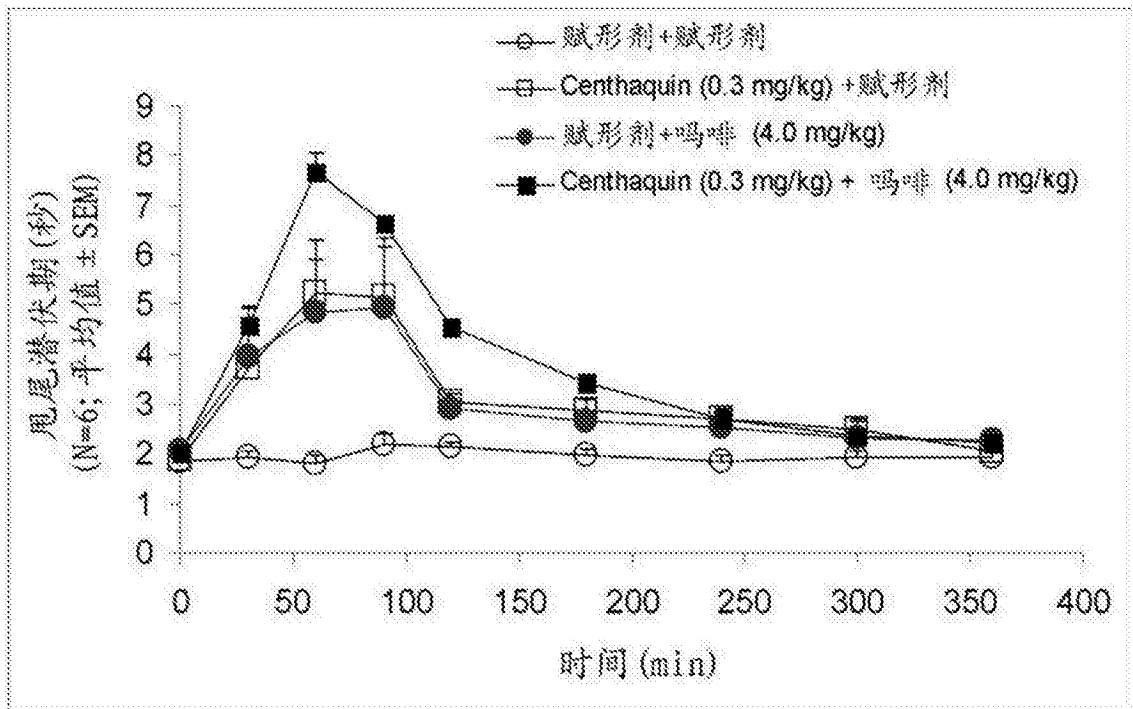


图 12

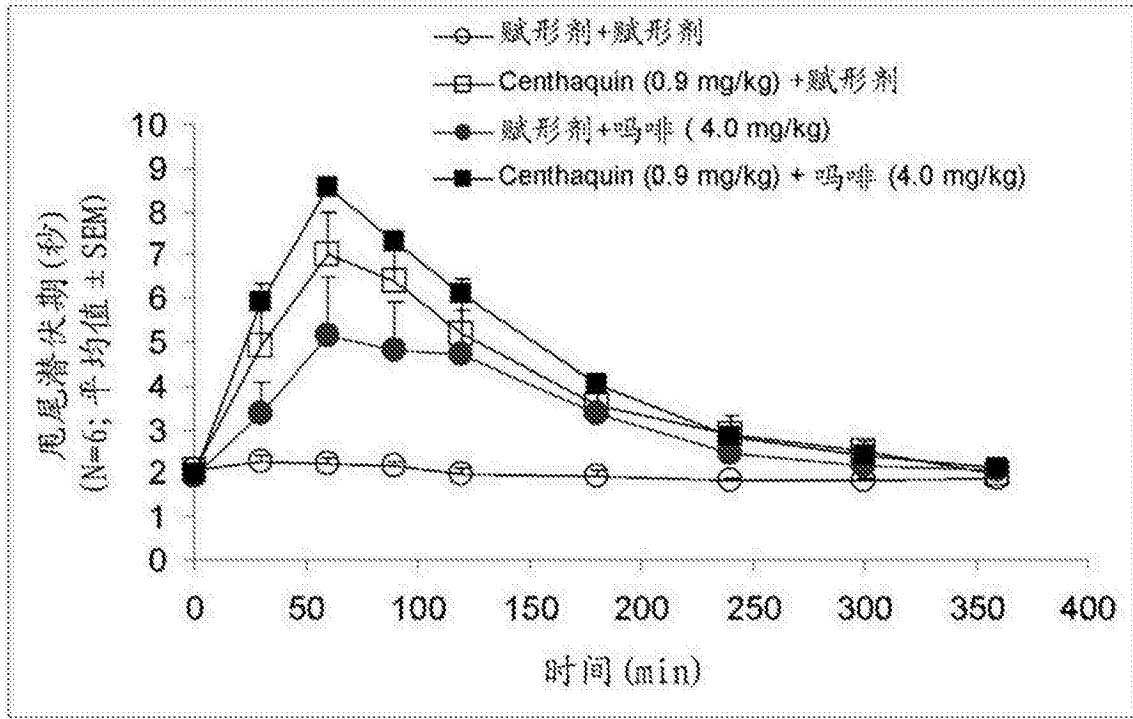


图 13

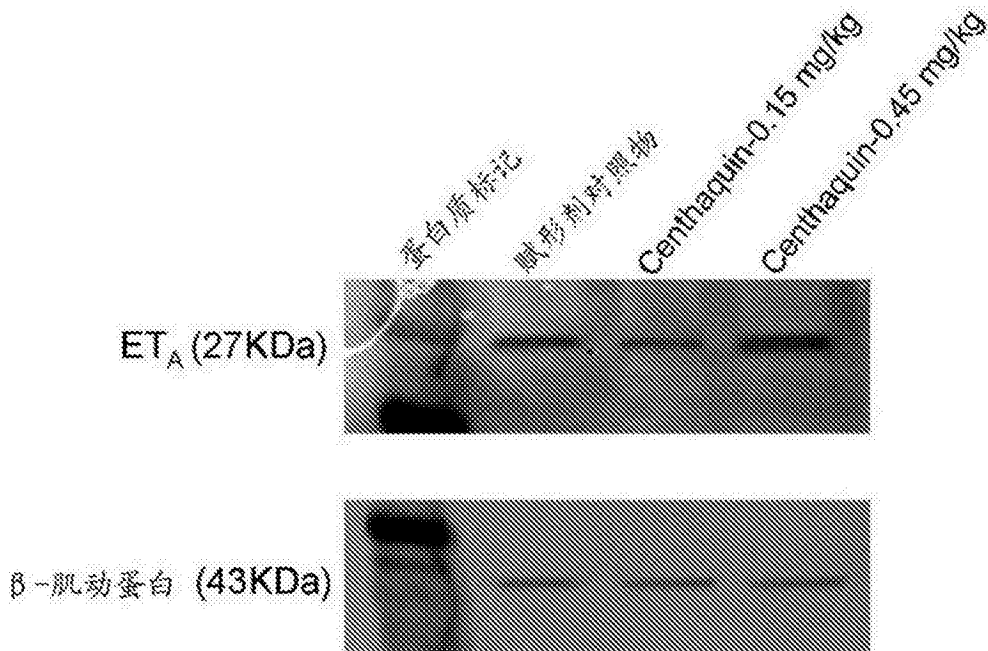


图 14A

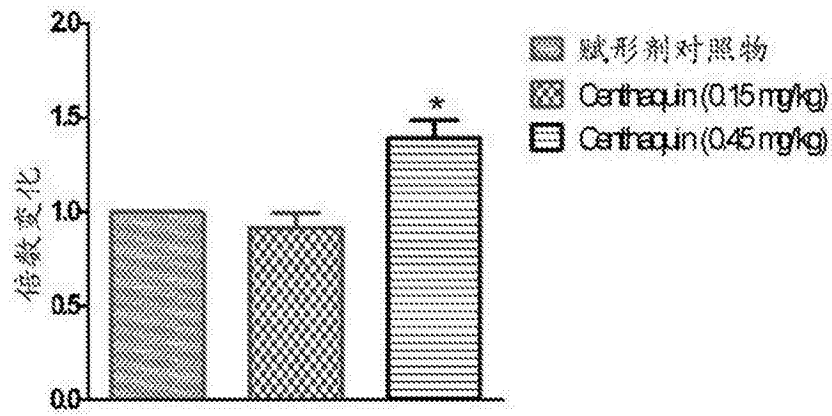


图 14B

血乳酸盐水平

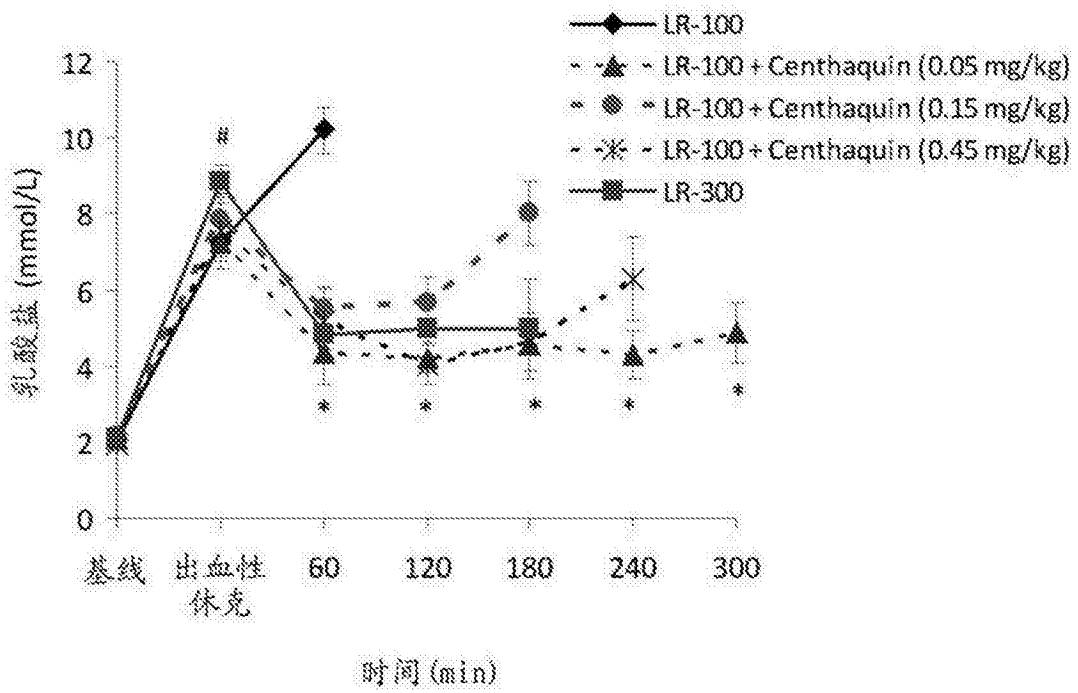


图 15

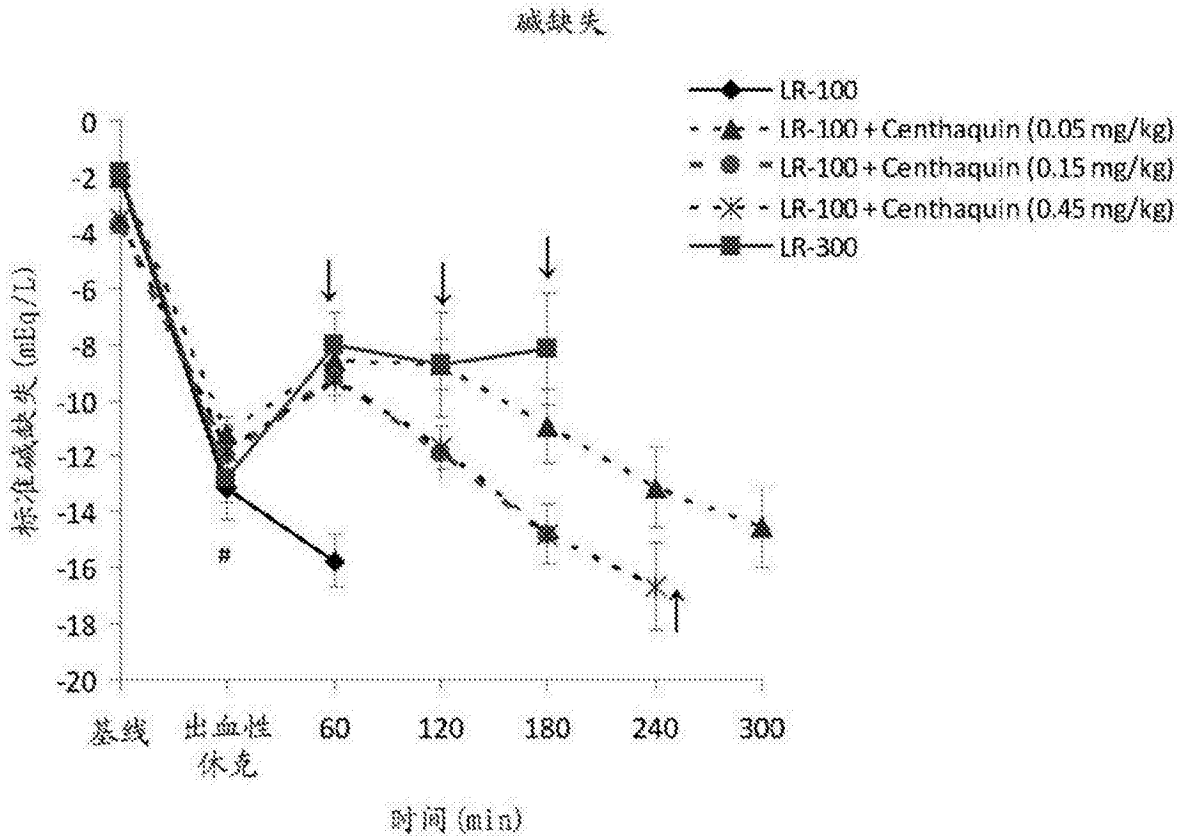


图 16

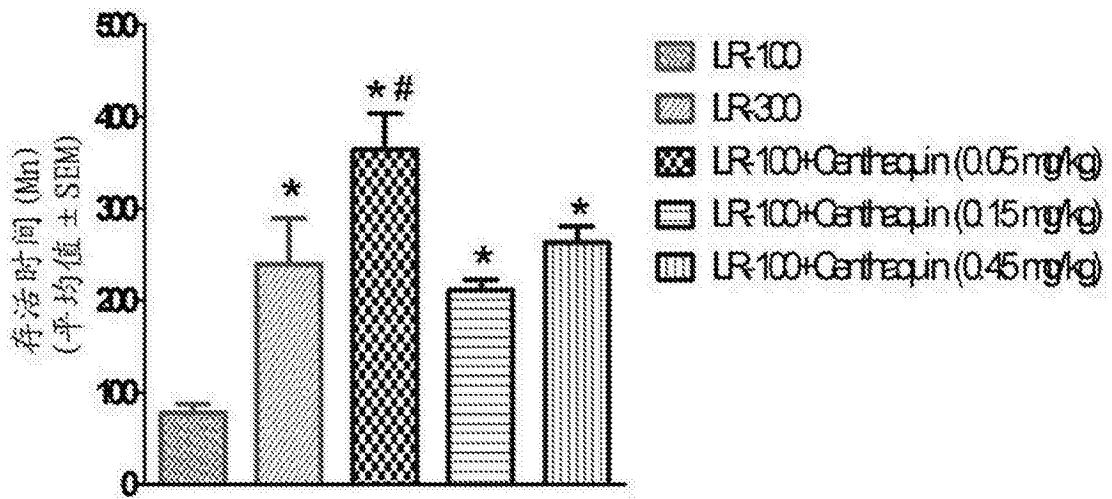


图 17

基线

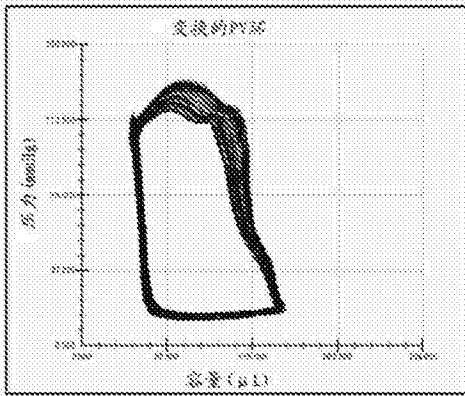


图 18A

出血性休克

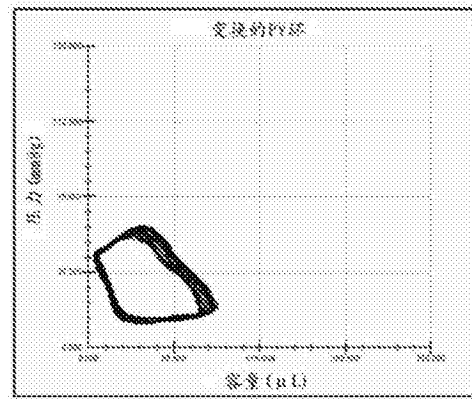


图 18B

复苏后30分钟

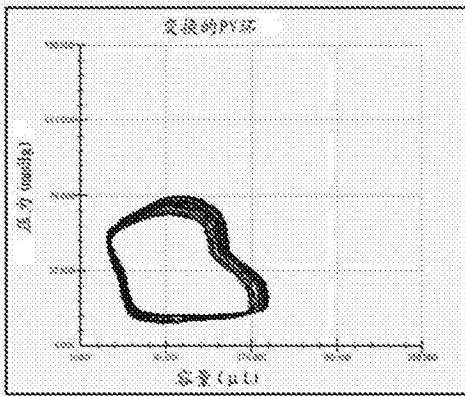


图 18C

复苏后60分钟

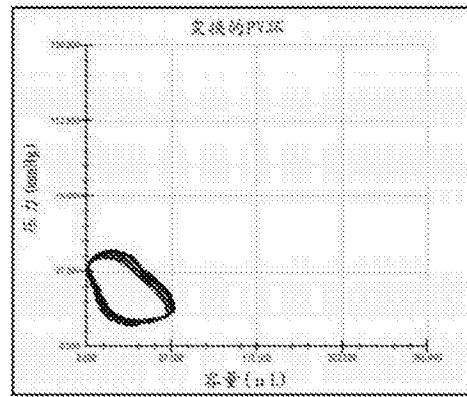


图 18D

基线

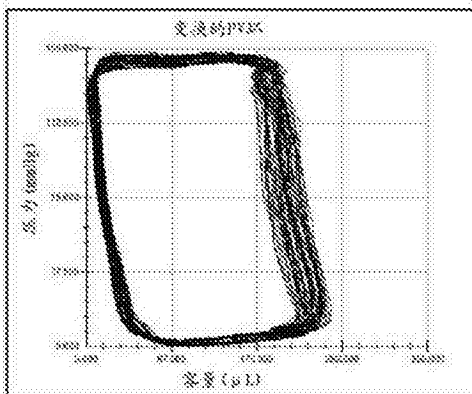


图 19A

出血性休克

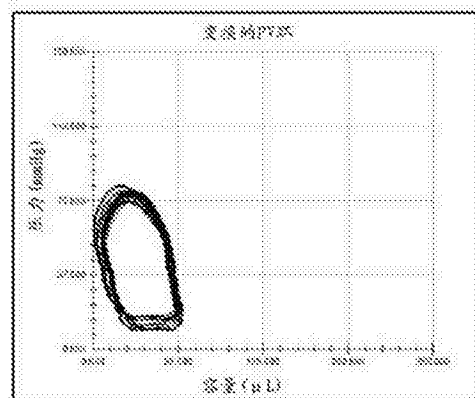


图 19B

复苏后1小时

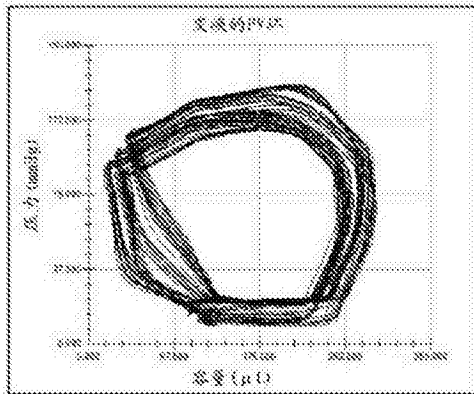


图 19C

复苏后2小时

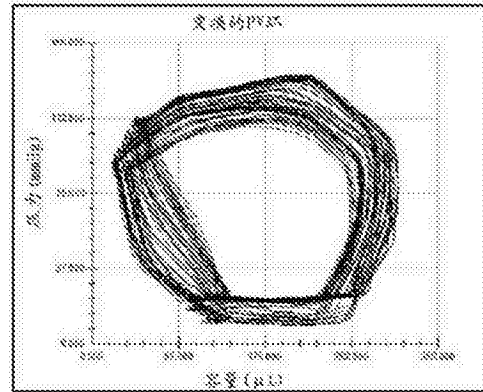


图 19D

复苏后3小时

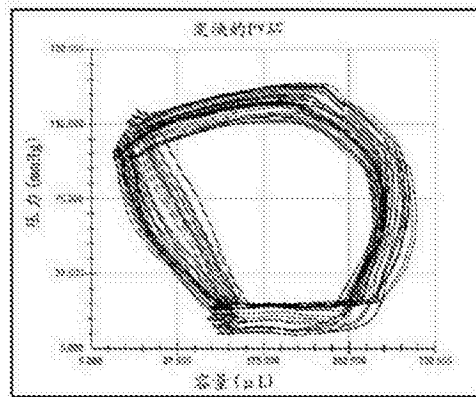


图 19E

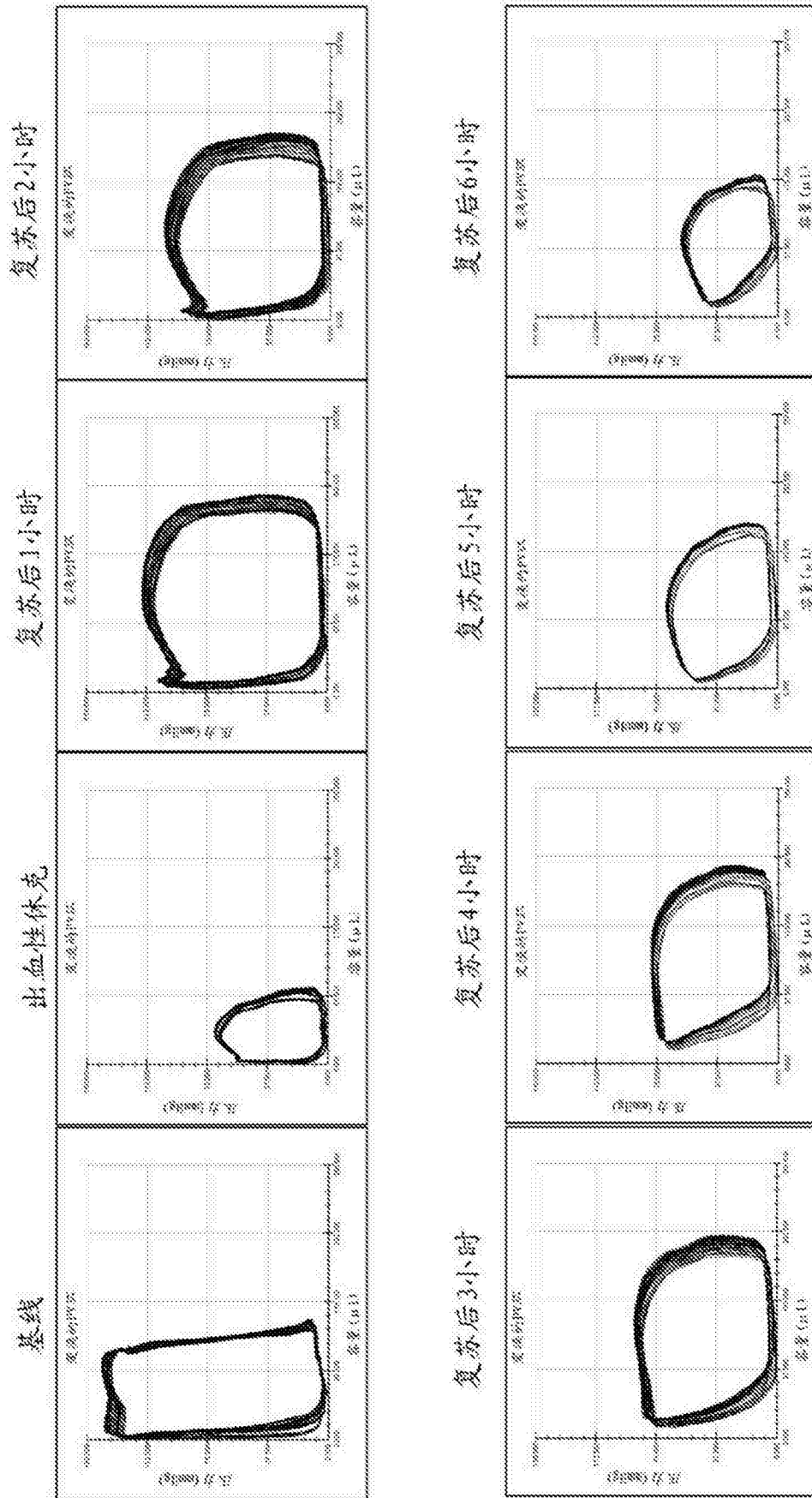


图 20