



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102573847 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 11

(21) 申请号 201080032121. 4

代理人 杨颖 张一军

(22) 申请日 2010. 05. 14

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

61/178, 191 2009. 05. 14 US

61/234, 788 2009. 08. 18 US

A61K 31/5415(2006. 01)

A61K 31/496(2006. 01)

A61K 31/382(2006. 01)

A61K 31/55(2006. 01)

A61P 25/16(2006. 01)

A61P 25/28(2006. 01)

A61P 25/00(2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 01. 16

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/034985 2010. 05. 14

(87) PCT申请的公布数据

W02010/132821 EN 2010. 11. 18

(71) 申请人 总医院公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 V·K·穆萨 V·戈希尔 S·谢斯

季玉华

(74) 专利代理机构 北京万慧达知识产权代理有

限公司 11111

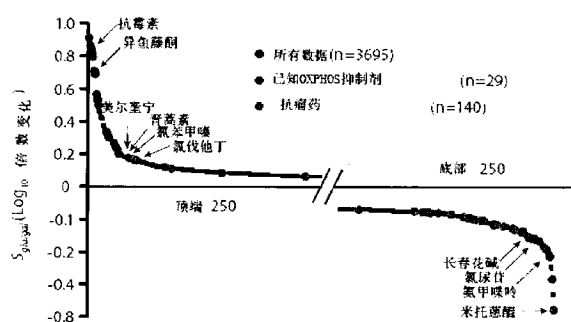
权利要求书 1 页 说明书 52 页 附图 51 页

(54) 发明名称

治疗退化性及缺血性疾病的方法和组合物

(57) 摘要

系统模型表明将一个细胞对氧化磷酸化 (OXPHOS) 的依赖转向糖酵解可以防止细胞死亡。但是利用这一策略的治疗潜力因为缺乏可以调整能量代谢的临床安全可靠的药物而受到限制。本发明发现了能够调节氧化代谢的无毒小分子化合物 (例如可以制药的化合物), 其中之一是氯苯甲嗪。正如这里所述, 氯苯甲嗪及其对映体 S- 氯苯甲嗪将 OXPHOS 转向糖酵解。这样的化合物可以对退化性疾病诸如糖尿病、亨廷顿氏舞蹈病、帕金森氏病和阿尔茨海默病 (老年痴呆症) 以及缺血性疾病包括但不限于中风、心力衰竭或灌注损伤可以起到保护或治疗作用。



1. 氯苯甲嗪或其 S- 对映体在治疗或预防与伴随缺血性损伤或细胞退化性疾病的细胞死亡相关的病症中的用途。
2. 氯苯甲嗪或其 S- 对映体在治疗或预防 II 型糖尿病中的用途。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的用途, 其中氯苯甲嗪为 S- 氯苯甲嗪。
4. 如权利要求 1-3 中任一所述的用途, 其中所述 S- 氯苯甲嗪大体上不含氯苯甲嗪的 R- 对映体。
5. 如权利要求 1 或 2 所述的用途, 其中所述细胞退化性疾病为神经退行性疾病。
6. 如权利要求 5 所述的用途, 其中所述神经退行性疾病为帕金森氏病、阿尔茨海默病、肌萎缩性脊髓侧索硬化、弗里德赖希氏共济失调、或亨廷顿氏舞蹈病。
7. 如权利要求 1 或 2 所述的用途, 其中所述疾病为缺血再灌注损伤。
8. 如权利要求 7 所述的用途, 其中所述缺血再灌注损伤为心肌缺血性损伤、肾脏缺血性损伤、或中风。
9. 如权利要求 1-8 中任一所述的用途, 其中所述氯苯甲嗪的给药剂量足够产生 100nM 到 1 μ M 的血清水平。
10. 如权利要求 1-8 中任一所述的用途, 其中所述氯苯甲嗪配制成适合注射的剂型。
11. 如权利要求 1-8 中任一所述的用途, 其中所述氯苯甲嗪给药剂量为每天大约 25mg 或更多。
12. 氯苯甲嗪或其 S- 氯苯甲嗪在治疗寄生虫感染中的用途。
13. 如权利要求 12 所述的用途, 其中所述 S- 氯苯甲嗪大体上不含氯苯甲嗪的 R- 对映体。
14. 如权利要求 12 所述的用途, 其中所述寄生虫选自下列组群: 布氏锥虫 (*Trypanosoma brucei*), 克氏锥虫 (*Trypanosoma Cruzi*), 和恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*)。
15. 一种筛选能够治疗或预防与伴随缺血性损伤或细胞退化性疾病的细胞死亡相关的病症的化合物的方法, 包括:
 - 提供一个包含具有酶活性的 CTP: 磷酸乙醇胺胞苷酰转移酶 2 (PCYT2) 的样品;
 - 将所述样品与一待测化合物接触;
 - 确定在样品中存在和不存在待测化合物时 PCYT2 的活性;
 - 其中能够降低样品中 PCYT2 活性的待测化合物选为治疗所述病症的待选化合物。
16. 如权利要求 15 所述的方法, 其中所述样品为活细胞, 所述方法进一步包括测定存在和不存在待测化合物时细胞内磷酸乙醇胺 (PEA) 水平, 其中能够提高细胞内 PEA 水平的待测化合物选为治疗所述病症的待选化合物。

治疗退化性及缺血性疾病的方法和组合物

[0001] 优先权申明

[0002] 本申请案主张 2009 年 5 月 14 日递交的美国临时专利申请案 No. 61/178, 191 和 2009 年 8 月 18 日递交的 No. 61/234, 788 之权益和优先权, 两个申请案之整体揭示内容全文以引用的方式并入本文中。

技术领域

[0003] 本发明是关于能量代谢调节。已经使用化学筛选方式鉴定能量代谢调节剂, 可以鉴别出线粒体代谢的小分子抑制剂 (例如, 抑制氧化磷酸化反应的)。例如, 这种线粒体代谢抑制剂可以用于预防或治疗神经退化性或缺血性疾病, 糖尿病, 及寄生虫感染。例如, 氯苯甲嗪 (mefloquine, 敏克静, 美克洛嗪, 敏克嗪) 已被发现为一种线粒体呼吸作用的抑制剂 (例如, 线粒体氧化磷酸化中的一种高 $S_{glu/gal}$ 抑制剂) 及抵制神经退化性疾病诱导的细胞死亡、缺血性损伤、及糖尿病, 如 2 型糖尿病。

[0004] 也提供了在个体中治疗寄生虫病的方法, 例如那些仅依赖于肯尼迪途径来合成磷脂酰乙醇胺的原生动物寄生虫, 包括的物种有锥虫和疟原虫。

技术背景

[0005] 几乎所有的细胞都有能力基于营养有效性, 环境条件, 或生长及分化的阶段将相关依赖性转移到糖酵解以应对氧化磷酸化作用 (OXPHOS)。另外, 有现象表明能量代谢的转移促进疾病的发生。例如, 很早就发现在糖酵解中癌细胞占更高的比例 (Warburg, Science 123 :309 (1956)), 可能会促进缺氧条件下的生存或维持快速的细胞增殖。最近的研究表明使用二氯乙酸将代谢向 OXPHOS 转换的确能阻止肿瘤的生长 (Bonnet et al., Cancer Cell 11 :37 (2007))。

[0006] 相反地, 细胞及模式动物中的基因组学及药物学最新研究表明 OXPHOS 的局部抑制意味着可以抑制与神经退化性疾病有关的疾病等位基因的毒性 (Buttner et al., J Biol Chem 283 :7554 (2008); Fukui et al., Proc Natl Acad Sci USA 104 :14163 (2007); 及 Vanna et al., Proc Natl Acad Sci USA 104 :14525 (2007)), 也能抑制中风模式动物中的细胞死亡 (Huber et al., J Neurosci Res 75 :441 (2004)) 和心脏缺血再灌注损伤 (Chen et al., Am J Physiol Cell Physiol 292 :C 137 (2007))。其潜在的保护机制还不清楚, 但已经表明通过一个受损或缺乏抵抗力的线粒体呼吸链的通量会促进发病, 通过将能量代谢转向糖酵解, 可能将氧化损伤最小化并抑制细胞凋亡 (Jeong et al., Biochem Biophys Res Commun 313 :984 (2004); and Hunter et al., Int J Radiat Biol 83 :105 (2007))。

[0007] 能将细胞依赖性从 OXPHOS 转移到糖酵解的临床有用药物目前还没有发现。例如, 传统的 OXPHOS 毒素, 比如鱼藤酮, 抗霉素, 氰化物及寡霉素有许多缺点诸如: i) 快速, 直接, 高效作用并阻碍呼吸作用; ii) 氧化组织剧烈消耗 ATP, 因此终止许多与呼吸链偶联的生化途径; iii) 导致迅速的细胞中毒; iv) 导致人死亡, 即使使用低剂量。

发明摘要

[0008] 本发明是基于,至少部分是基于发现线粒体代谢的小分子抑制剂,此处鉴定的线粒体代谢抑制剂可以用于预防或治疗神经退化性或缺血性疾病。例如,氯苯甲嗪已经被鉴定为一种线粒体代谢干扰物,并用于抵制神经退化性疾病和诱导性细胞死亡,缺血性损伤,及糖尿病,例如 2 型糖尿病。

[0009] 这样,一方面,本发明提供了对患有与伴随缺血性损伤或细胞退化性疾病的细胞死亡相关病症的个体进行治疗的方法。本发明包括选择一个个体,其具有伴随缺血性损伤或细胞退化性疾病的细胞死亡相关病症(例如,基于他们具有的状况来进行选择);并让选择的个体摄入一种组合物,包括有效治疗剂量的一种已经过鉴定为此处描述的 OXPHOS 抑制剂的化合物,例如表 1 或表 3 所列的化合物,例如氯苯甲嗪或它的一种 S- 对映体。一般而言,本文中提到的氯苯甲嗪的地方,都可以推及使用 S- 氯苯甲嗪,除了 S- 氯苯甲嗪被明确指明排除在外的地方。因此本文中描述的方法中,可使用 S- 氯苯甲嗪或氯苯甲嗪(外消旋体),虽然有些情况下由于本文中讨论的一些原因而倾向于选择两种中的一种。

[0010] 第二方面,本发明的特色方法是降低个体中与伴随缺血性损伤或细胞退化性疾病的细胞死亡相关病症的发病风险,本方法包括选择一个个体,其患有与伴随缺血性损伤或细胞退化性疾病的细胞死亡相关病症或有患此病风险(例如,基于其患病或具有患病风险进行选择);让此个体摄入有效治疗剂量的一种已经过鉴定为此处描述的 OXPHOS 抑制剂的化合物,例如,表 1 或表 3 所列的化合物,例如氯苯甲嗪或它的一种 S- 对映体。

[0011] 进一方面,本发明提供了治疗个体中糖尿病的方法。本方法包括选择一个患有 2 型糖尿病或有患此病风险的个体,例如,一个有代谢综合症的个体,其肥胖,或胰岛素抗性,或任何其它已知的患 2 型糖尿病的风险因素,让此个体摄入有效治疗剂量的一种已经鉴定为此处描述的 OXPHOS 抑制剂的化合物,例如,表 1 或表 3 所列的化合物,例如氯苯甲嗪或它的一种 S- 对映体。

[0012] 此处也描述了氯苯甲嗪及其 S- 对映体用于治疗或预防伴随缺血性损伤或细胞退化性疾病的细胞死亡相关病症,和使用氯苯甲嗪及其 S- 对映体用于治疗或预防 2 型糖尿病。

[0013] 另外,本发明包括摄入 S- 氯苯甲嗪用于治疗或预防由晕动病引起的恶心、呕吐、和头晕,或由特定的内耳疾病引起的眩晕的方法,例如,治疗那些目前正使用氯苯甲嗪外消旋体治疗的病症。

[0014] 此处提到的“个体”,是指哺乳类个体,例如人类个体。

[0015] 在有些实施方案中此处描述的方法包括摄入有效治疗剂量的 S- 氯苯甲嗪,例如,实质上、大体上由 S- 氯苯甲嗪组成的组合物。

[0016] 在有些实施方案中,此处描述的方法包括摄入一种组合物,其基本上不含氯苯甲嗪的 R- 对映体,例如,其纯度至少达到 92%,95%,97%,99%;例如 S- 对映体: R- 对映体的比例为 99 : 1,98 : 2,97 : 3,95 : 5,96 : 4,94 : 6,93 : 7,92 : 8,91 : 9,90 : 10,85 : 15,80 : 20。

[0017] 在有些实施方案中,细胞退化性疾病是一种神经退化性疾病,例如帕金森氏症,阿兹海默氏症,肌萎缩性脊髓侧索硬化症(ALS),弗里德希氏共济失调,或亨廷顿氏舞蹈病。

[0018] 在有些实施方案中,是缺血再灌注损伤病症,例如心肌梗死缺血性损伤,肾缺血性

损伤,或中风。

[0019] 在有些实施方案中,此方法包括摄入一剂氯苯甲嗪足以产生约 100nM 到 1 μ M 的血清水平,例如,最高浓度至少是 100nM,500nM,750nM,1 μ M。

[0020] 在有些实施方案中,氯苯甲嗪经注射给药。

[0021] 在有些实施方案中,摄入氯苯甲嗪的日服剂量是 25mg/ 天或更多。

[0022] 进一步方面,本发明提供的方法用于治疗患有寄生虫感染或有患此病风险的个体,例如一种寄生虫体内磷脂酰乙醇胺合成要求功能性 PCYT2 酶活性,例如,其体内磷脂酰乙醇胺的合成主要通过肯尼迪途径。本方法包括选择携带寄生虫或者有接触寄生虫风险的个体;让此个体摄入一种包含有效治疗剂量的氯苯甲嗪或其 S- 对映体的组合物。在有些实施方案中,此方法包括摄入有效治疗剂量的 S- 氯苯甲嗪,例如一种本质上由 S- 氯苯甲嗪组成的组合物,包括药学上可接受的载体或辅料。在有些实施方案中,本方法包括摄入一种基本上不含 R- 对映体的氯苯甲嗪组合物,例如,其纯度至少达到 92%,95%,97%,99%;例如 S- 对映体: R- 对映体的比例为 99 : 1,98 : 2,97 : 3,95 : 5,96 : 4,94 : 6,93 : 7,92 : 8,91 : 9,90 : 10,85 : 15,80 : 20。也提供了使用氯苯甲嗪或 S- 氯苯甲嗪治疗寄生虫感染的方法。

[0023] 在有些实施方案中,所述寄生虫选自包括布氏锥虫,克氏锥虫和恶性疟原虫在内的群组。

[0024] 另一方面,本发明提供方法用于鉴定治疗与伴随缺血性损伤或细胞退化性疾病的细胞死亡相关病症的组合物,例如,像此处描述的。本方法包括提供包含具有酶活性的 CTP : 磷酸乙醇胺胞苷酸转移酶 2 (PCYT2) 的样本;用一种待测化合物接触样本,判定待测化合物存在和不存在的条件下样本中 PCYT2 的活性。降低样本中 PCYT2 活性的待测化合物是治疗此类病症的候选化合物。在有些实施方案中,这个样本是活细胞,这种方法进一步包括判定待测化合物存在时细胞中磷酸乙醇胺 (PEA) 的水平,当一种待测化合物可以增加细胞中磷酸乙醇胺 (PEA) 的水平时,可以将其选作治疗此病症的候选化合物。

[0025] 在有些实施方案中,此处描述的方法和组合物包含或使用具有二苯甲胺基本结构的化合物。在有些实施方案中二苯甲胺基本结构包括一个 A1 (diphenylpiperazine) 或 A2 亚结构。在有些实施方案中,此处描述的方法和组合物包括或使用一种具有三环环状基本结构的化合物,在有些实施方案中,这种三环环状基本结构包括 EI, E2, FI, F2, G1 或 G2 亚结构。在有些实施方案中,此三环环状基本结构包括硫乙哌丙嗪 (thiethylperazine)。在有些实施方案中,这种三环环状基本结构包含一种化合物,包括但不限于图 32 所列种类。

[0026] 一方面,本发明涉及一种治疗组合物,包括一种氯苯甲嗪对映体,例如 S- 对映体,和一种药学上可接受的载体。

[0027] 在有些实施方案中,本发明涉及一种方法,包括:a) 提供 i) 一种候选化合物,其中所述化合物疑似可以调节线粒体能量产生;ii) 一种能够在大多数碳源上生长的细胞培养;b) 通过将细胞培养从第一种碳源上转移到第二种碳源上来筛选化合物;c) 测定第一个细胞培养的生长速率和第二个细胞培养的生长速率。在有些实施方案中,第一个细胞生长速率是由第一种碳源来测定的,在有些实施方案中,第二个细胞生长速率是由第二种碳源来测定的。在有些实施方案中,第一个的细胞生长速率低于第二个的细胞生长速率,由此鉴定这种化合物为一种糖酵解抑制剂。在有些实施方案中,第二个的细胞生长速率低于第一

个的细胞生长速率,由此鉴定这种化合物为一种氧化磷酸化抑制剂。在有些实施方案中,第一种碳源包含葡萄糖。在有些实施方案中,第二种碳源包含半乳糖。在有些实施方案中,此方法甚至包含判定第一个细胞生长速率与第二个细胞生长速率的比值。在有些实施方案中,这个比值包括一个第二个细胞生长速率的 $\log_{10}$ 转换。在有些实施方案中,这个比值包括一个第一个细胞生长速率和第二个细胞生长速率的 $\log_{10}$ 转换。在有些实施方案中,这个比值包括一个大约从 1.00 到 (-)1.00 之间的数值。在有些实施方案中,这个化合物是从由一种有机小分子,一种药物,一种营养制剂,一种核酸和一种蛋白质组成的群组中选择的。

[0028] 在有些实施方案中,本发明专注于一种方法,包括:a) 提供 i) 一种候选化合物,其中所述化合物疑似是 OXPHOS 的选择性抑制剂;ii) 在富含葡萄糖的培养基上进行第一个细胞培养;iii) 在富含半乳糖的培养基上进行第二个细胞培养;b) 在所述候选化合物存在的情况下孵育所述第一个细胞培养;c) 在所述候选化合物存在的情况下孵育所述第二个细胞培养,判定其中的半乳糖生长值;及 d) 通过计算葡萄糖 / 半乳糖生长值的比值来鉴定所述化合物作为一种 OXPHOS 选择性抑制剂,其中所述比值大约位于 0.01-1.0 之间。在有些实施方案中,这种化合物是从由一种有机小分子,一种药物,一种营养制剂,一种核酸和一种蛋白质组成的群组中选择的。在有些实施方案中,这种化合物包括一种抗肿瘤化合物。

[0029] 在有些实施方案中,本发明专注于一种方法,包括:a) 提供 i) 一种化合物,其中所述化合物包含一个大约位于 1.00 到 (-)1.00 之间的葡萄糖 / 半乳糖生长值的比值;ii) 一个患者至少表现一种疾病的一种症状;b) 让所述患者摄入所述化合物,使所述患者的至少一种症状得到缓解。在有些实施方案中,这种化合物是从由一种有机小分子,一种药物,一种营养制剂,一种核酸和一种蛋白质组成的群组中选择的。在有些实施方案中,这种疾病是从由退化性疾病,过度增生疾病(例如,肿瘤或癌症),糖尿病,缺血性疾病或寄生虫感染疾病组成的群组中选择的。

[0030] 在有些实施方案中,本发明专注于一种方法,包括:a) 提供 i) 一种化合物,其中所述化合物包含一个大约位于 0.01 到 1.00 之间的葡萄糖 / 半乳糖生长值的比值;ii) 一个患者至少表现一种疾病的一种症状;b) 让所述患者摄入所述化合物,使所述患者的至少一种症状得到缓解。在有些实施方案中,这种疾病是从由退化性疾病,缺血性疾病,糖尿病和寄生虫感染疾病组成的群组中选择的。在有些实施方案中,这种化合物包括氯苯甲嗪。在有些实施方案中,这种化合物是从由一种有机小分子,一种药物,一种营养制剂,一种核酸和一种蛋白质组成的群组中选择的。

[0031] 在有些实施方案中,本发明专注于一种方法,包括:a) 提供 i) 一种化合物,其中所述化合物包含一个大约位于 (-)0.01 到 (-)1.00 之间的葡萄糖 / 半乳糖生长值的比值;ii) 一个患者表现一种过度增生疾病(例如,肿瘤或癌症)的至少一种症状;b) 让所述患者摄入所述化合物,使所述患者的至少一种症状得到缓解。在有些实施方案中,这种化合物是从由一种有机小分子,一种药物,一种营养制剂,一种核酸和一种蛋白质组成的群组中选择的。

[0032] 在有些实施方案中,本发明专注于一个试剂盒,包括:a) 一个包含细胞培养基的固体基质;b) 包含第一种碳源的容器一;c) 包含第二种碳源的容器二;d) 一系列说明,解释如何鉴定一种候选化合物作为无毒性的线粒体能量代谢调节剂。在有些实施方案中,这

种固体基质包括许多检测孔。在有些实施方案中,这些检测孔包括一个细胞培养。在有些实施方案中,这种固体基质是冷冻的。在有些实施方案中,第一种碳源包括葡萄糖。在有些实施方案中,第二种碳源包括半乳糖。在有些实施方案中,提供一系列说明来检查细胞生长率,比较第一种碳源和第二种碳源。

[0033] 定义

[0034] 此处用到的“候选化合物”这个术语,是指可以被筛查用于调节线粒体能量产生的任何化合物(例如,有机小分子,肽,激素,核酸)

[0035] 此处用到的术语“碳源”,是指能被细胞用于产能生化途径的化合物(例如,产生三磷酸腺苷或二磷酸腺嘌呤)。碳源通常是糖类化合物(例如,葡萄糖,半乳糖,果糖,己糖)。

[0036] 此处用到的术语“生长速率”,是指一个组织,器官,有机体的细胞增殖。例如,一个细胞培养的生长速率可以通过比较第一个样本中的细胞数目与第二个样本的细胞数目来测定,其中的样本是暂时区分的。也可以选择,通过估计尺寸变化(例如,形状,宽度,密度等)检测组织、组织培养或器官的生长。

[0037] 此处用到的术语“糖酵解抑制剂”,是指任何能够干扰糖酵解的化合物。

[0038] 此处用到的术语“氧化磷酸化抑制剂”,是指任何能够干扰电子传递链的化合物(例如,一种 OXPHOS 抑制剂)

[0039] “ $S_{glu/gal}$ 值”这个术语,是指任何一个比较葡萄糖(glu)作为唯一的糖源(例如,一种富含葡萄糖的培养基)时的细胞生长与半乳糖(gal)作为唯一的糖源(例如,一种富含半乳糖的培养基)时的细胞生长得到的比值。例如, $S_{glu/gal}$ 值可以以 $\log_{10}$ 的转换方式表示为大约位于 1.00 到 (-)1.00 的数值。一个高 $S_{glu/gal}$ 值会大于 0,可用于鉴定 OXPHOS 抑制剂。一个低 $S_{glu/gal}$ 值会小于 0,可以用于鉴定细胞快速增值的抑制剂。

[0040] 此处用到的术语“半乳糖生长值”,是指当半乳糖作为唯一糖源时细胞任何定量的细胞增值

[0041] 此处用到的术语“葡萄糖生长值”,是指当葡萄糖作为唯一糖源时细胞任何定量的细胞增值

[0042] 此处用到的术语“有风险”,是指病人表现出的一种医疗状况或一系列医疗状况可能会使患者倾向于发展为一种特殊的疾病或病痛。例如这些状况可能是由于一些影响造成的包括,但是不限于,行为上的,情绪上的,化学的,遗传的,生化的或环境上的影响。

[0043] 当提及任何症状在一个未接受治疗的个体和一个相应的接受治疗的个体上的表现时,使用的这些术语“减少”,“抑制”,“缩小”,“禁止”,“减小”,“预防”及其他语法上同义的词(包括“更低”,“更小”等),意味着接受治疗的个体上的这种症状的数量或级别低于未接受治疗的个体,这个数量或级别是通过任何医务人员验证的任何可以作为临床相关性的数量。在有些实施方案中,接受治疗的个体上的这种症状的数量或级别至少比未接受治疗的个体低至少 10%,25%,50%,75%或 90%。

[0044] 此处用到的术语“抑制性化合物”或“抑制剂”,是指任何化合物能够在特定条件下与已结合配体(例如,糖酵解或氧化磷酸化途径中的酶类)相互作用(例如,附着或结合),以至于其结合配体对其自然配体无反应。抑制性化合物可以包括,但不限于,有机小分子,抗体,寡核苷酸,及蛋白或多肽。

[0045] 此处用到的术语“附着”，是指药物和中间体（或载体）的任何相互作用。附着作用可以是可逆的也可以是不可逆的。附着作用包括，但不限于，共价键，离子键，范德华力或摩擦力，其类似作用。一个药物被附着到一个中间体（或载体）上，比如是被浸渍、被合成，被包裹，被悬浮、被溶解或被混合在中间体中。

[0046] 此处用到的术语“药物”或“化合物”，是指任何药学上的活性物质，能够被摄入并到达预期效果。“药物”或“化合物”可以是合成的也可以是自然形成的，非肽、蛋白或多肽，寡核苷酸或核酸，多糖或糖类。

[0047] 此处用到的术语“被摄入”或“摄入”药物或化合物，是指任何一种为患者提供药物或化合物的方法以使药物或化合物对患者有预期效果。例如，一种摄入方法是通过使用一种医疗设备的间接途径，例如，但不限于，导管，涂药器，或注射器。第二种典型的摄入方法是通过直接途径，例如局部组织摄入（例如，血管外放置），口服吞食，皮肤药贴，局部，吸入剂或栓剂。

[0048] 此处用到的术语“患者”，是人或动物个体而且不需要住院就医。例如，门诊病人，疗养院里的人都是“患者”。一个“患者”可以是任何年龄的人或动物，因此包括成年的和未成年的（例如，儿童）。并不是说“患者”这个词就意味着需要治疗，因此，患者可以是自愿的或非自愿的加入到临床试验或支持基础科学研究。

[0049] 此处用到的术语“亲和力”，是指物质或微粒之间的任何相互吸引力，并使其进入并保持化学作用。例如，与亲和力较低的抑制剂相比，一种与受体有高的亲和力的抑制剂化合物会有更大的功效来防止这种受体与其天然配体相互作用。

[0050] 此处用到的术语“有效剂量”，是指特定量的药物组合物，包括一种可以达到临床良效的治疗药剂（例如，一种 OXPHOS 抑制剂）。

[0051] 此处用到的术语“蛋白质”，是指任何众多的自然形成的非常复杂的物质（例如一种酶或抗体），其由氨基酸残基通过肽键连接而成，包括的元素有碳，氢，氮，氧，通常也有硫。一般而言，蛋白质包括百级数量级的有序的氨基酸。

[0052] 此处用到的术语“肽”，是指任何各种氨基化合物，他们由两个或多个氨基酸通过一个氨基酸的氨基与另一个的羧基相互结合而形成，并且通常由蛋白质的部分水解而获得。一般而言，一个肽段包含一个有序的十级数量级的氨基酸。

[0053] 此处用到的术语“药学上”，或“药理学上可接受的”，是指当被动物或人摄入时，分子实体或组合物不会产生不利的，过敏的或其他不良反应。

[0054] 此处用到的术语“药学上可接受的载体”，包括任何所有溶剂，或分散介质，包括但不限于，水，酒精，多羟基化合物（例如，甘油，丙二醇，及液体聚乙二醇，及其他类似物），它们的适当混合物，及植物油，涂料，等渗或吸收延缓剂，脂质体，商业化有效清洁剂，及其他类似物。补充性生物活性成分也可以归为这类载体。

[0055] 此处用到的术语“纯化”或“分离”，可以是指一种肽类组合物已经经过处理（例如，分馏）去除各种其他组分，这种组合物大幅保持了其表达的生物活性。使用术语“大幅度纯化”的地方，是指一种组合物中的主要成分是蛋白或肽，例如构成组合物的大约 50%，大约 60%，大约 70%，大约 80%，大约 90%，大约 95% 或更多（例如，重量 / 重量，或重量 / 体积）。此处用到的术语“提纯以均质”是指组合物已经被纯化成“明显的均质性”以至于只有一种蛋白（例如，基于 SDS-PAGE 或 HPLC 分析）。一种纯化的组合物并不是想要达到一

些微量杂质存在的纯度。

[0056] 此处提到的术语“大幅度纯化”，是指分子，核酸或者氨基酸序列，从其天然环境中移除，分离或区分，并且至少从它们天然结合其他组分中释放出 60%，75%，最好是 90%。“分离多核苷酸”因此实际上是纯化多核苷酸。

[0057] 此处用到的术语“核酸序列”或“核苷酸序列”，是指一种寡核苷酸或多核苷酸，及其片段或一部分，及基因组的或起始合成的 DNA 或 RNA，其可能是单链的或双链的，并表现为正义链或反义链。

[0058] 此处用到的术语“一种分离的核酸”，是指任何从天然状态中分离的核酸分子（例如，从细胞中分离，并且以一种优先的实验方案从其他基因组核酸中释放出来）。

[0059] 此处用到的术语“氨基酸序列”和“多肽序列”，两者是可以互换的，是指一段氨基酸序列。

[0060] 此处用到的术语“一部分”，当用在一种蛋白上时（例如在“一种给定的蛋白的一部分”）是指那种蛋白的片段。这个片段的大小可能是从四个氨基酸残基到整个氨基酸片段减去一个氨基酸残基的片段长度。

[0061] 当提到核酸序列时用到的术语“一部分”，是指那条核酸序列的片段，这个片段的大小可能是从 5 个核苷酸残基到整条核酸序列减去一个核苷酸残基的片段长度。

[0062] 当说到一个小分子与一种蛋白质或肽相互作用时用到的术语“特异性的结合”或“特异性结合”，意味着这种相互作用是基于蛋白质特殊结构的存在（例如，一种二维或三维空间结构），换言之，一个小分子识别并结合到一个特殊的蛋白质上，而不是通常的蛋白质类。例如，一个分子对“A”结构是特异的，包括“A”结构的一种化合物存在于（或游离的，未标记“A”）一个包含标记“A”的反应中，这个分子就会通过结合的方式减少标记“A”的数量。

[0063] 此处用到的术语“有机小分子”，是指任何一种分子，其大小可以比得上那些通常用于药物上有机分子。这个术语包括生物大分子（例如，蛋白，核苷酸等）。提到的有机小分子是指大小大约从 10Da 到 5000Da，更好地达到 2000Da，最好地达到 1000Da。

[0064] 此处用到的术语“结合”，是指任何控制组合物和表面之间的相互作用。例如，表面被定义为“结合表面”。结合可以是可逆的或非可逆的。这种结合可以是，但是不限于，非共价结合，共价键结合，离子键结合，范德华力结合或摩擦力，或其他。一种感染控制组合物如果被浸渍，合并，包裹，重悬，溶解或混合等，就会结合到表面上。

[0065] 除非另有鉴定，此处用到的所有的技术上的和科学上的术语与平常的本领域内的一个具有普通技能的人员的理解有相同的意思。此处描述的方法和材料是用于本发明，另外本项工艺中所知的适当的方法和材料也可以被使用。材料，方法和例子只是用作说明的，并非要限制于此。此处提到的所有的出版物，专利申请，专利，序列，数据库条目及参考文献，都以全部引用的方式并入。如果有冲突，本说明书，包括定义，将控制。

[0066] 本发明的其他特点及优势通过以下的详细描述，图形及声明中展现出来。

[0067] 附图概述

[0068] 图 1A 说明了在葡萄糖丰富的培养液中通过糖酵解和有氧代谢产生 ATP 的细胞生长。

[0069] 图 1B 说明了在葡萄糖丰富的培养液中通过有氧代谢产生多数 ATP 的细胞生长。

[0070] 图 1C 提供了在 10mM 葡萄糖或 10mM 半乳糖生长 3 天的纤维细胞检测细胞外酸化率 (ECAR) 和氧耗率 (OCR) 的代表性数据。数据表示为平均 $\pm$ SD ($n = 5$)

[0071] 图 1D 展示了暴露在 0.5 μ M 寡霉素 (复合物 V) 和 0.1 μ M 抗霉素 (复合物 III) 氧耗抑制剂后, 检测生长在葡萄糖和半乳糖的纤维细胞 OCR 的代表性数据。数据表示为 $\pm$ SD, 其表明 $p < 0.05$; p 值计算通过双面 t 检验 ($n = 5$)。

[0072] 图 1E 的代表性数据展示了在各种浓度鱼藤酮中, 生长在葡萄糖或半乳糖丰富培养液中的纤维细胞的总细胞 ATP 水平 (CellTiter-Glo[®])。数据表示为平均 $\pm$ SD ($n = 5$)。

[0073] 图 1F 的代表性数据展示了在各种浓度抗霉素中, 生长在葡萄糖 (10mM) 或半乳糖 (10mM) 丰富培养液中的纤维细胞的总细胞 ATP 水平 (CellTiter-Glo[®])。数据表示为平均 $\pm$ SD ($n = 5$)。

[0074] 图 1G 的代表性数据展示了在各种浓度寡霉素中, 生长在葡萄糖 (10mM) 或半乳糖 (10mM) 丰富培养液中的纤维细胞的总细胞 ATP 水平 (CellTiter-Glo[®])。数据表示为平均 $\pm$ SD ($n = 5$)。

[0075] 图 1H 的代表性数据展示了在各种浓度解偶联剂 CCCP 中, 生长在葡萄糖 (10mM) 或半乳糖 (10mM) 丰富培养液中的纤维细胞的总细胞 ATP 水平 (CellTiter-Glo[®])。数据表示为平均 $\pm$ SD ($n = 5$)。

[0076] 图 2A 展示了基于图像的高通量细胞计数技术的标准曲线的实施方案。首先通过血球计数器计数细胞, 然后种植在 96 孔板再通过自动成像法计数。实线代表了最适值的线性回归。数据表示为平均 $\pm$ SD ($n = 10$)。

[0077] 图 2B 展示了使用自动种植仪, 抽吸器, 液体剂量分配器, 和成像法得到的筛选前数据, 这些典型数据证明了对细胞数差别具有高敏感性。在 0 天, 细胞种植在含有 25mM 葡萄糖培养液的 96 孔板。在 1 天, PBS 洗脱细胞, 用 10mM 葡萄糖或 10mM 半乳糖更换培养液, 之后添加药物或二甲亚砜 (DMSO)。数据表示为 $\pm$ SD ($n = 3$)。

[0078] 图 2C 展示了简要插图, 其描述了在含有暴露化学库测试化合物的葡萄糖或半乳糖培养液 96 孔板细胞生长的筛选概念。每个孔的细胞生存能力的分析需考虑到每种化合物作为无毒的 (没有变化), 有毒的 (在两种情况下的低细胞数), OXPHOS 抑制剂 (细胞数仅在半乳糖培养液低, 如高 S 葡萄糖 / 半乳糖), 或快速增值抑制剂 (细胞数仅在葡萄糖培养液低, 如低 S 葡萄糖 / 半乳糖) 的分类。

[0079] 图 2D 展示了潜在线粒体代谢抑制剂和快速增长抑制剂的高通量文库筛选的典型数据。对于所有划分在起降低作用组的药物, 在葡萄糖的倍数变化 Log10 除以在半乳糖的倍数变化。分布曲线包含了最有效的 OXPHOS 抑制剂 (S 葡萄糖 / 半乳糖 > 0.0) 和快速细胞增殖抑制剂 (S 葡萄糖 / 半乳糖 < 0.0)。

[0080] 图 3A 的代表性数据展示了 3 天孵育后, MCH58 细胞在氯苯甲嗪浓度变化的细胞生存能力 (钙黄绿素 AM[®] 染料)。实线: 葡萄糖丰富培养液。洗脱线: 半乳糖丰富培养液。数据描述为平均 $\pm$ SD ($n = 5$)。

[0081] 图 3B 的代表性数据展示了 3 天孵育后在氯苯甲嗪浓度变化时, MCH58 细胞的 ATP 水平 (CellTiter-Glo[®])。实线: 葡萄糖丰富培养液。洗脱线: 半乳糖丰富培养液。数据描述为平均 $\pm$ SD ($n = 5$)。

[0082] 图 3C 的代表性数据展示了在 3 小时内, 暴露在不同浓度氯苯甲嗪的 MCH58 细胞,

其在 OCR 从 DMSO 基线的变化。每 7 分钟检测一次。5 个重复的平均值如图中所示。

[0083] 图 3D 提供了在 3 小时内,暴露在不同浓度氯苯甲嗪的 MCH58 细胞,其在 ECAR 从 DMSO 基线的变化的典型数据。每 7 分钟检测一次。5 个重复的平均值如图所示。

[0084] 3E-I 的线性图表展示了氯苯甲嗪对包括氧耗的独立线粒体生物能量参数的急性影响,该反应是以谷氨酸 / 苹果酸 (3E),琥珀酸 (3F) 或丙酮酸 / 苹果酸 (3G) 作为底物。5 个独立检测有代表性。(图 3H) 用四甲基罗丹明甲酯 (TMRM) 检测氯苯甲嗪在独立线粒体膜的潜在急性影响。5 个独立检测有代表性。(图 3I) 氯苯甲嗪在独立线粒体 NADH 的急性影响。5 个独立检测有代表性。在指明时间点加入线粒体 (Mito),谷氨酸和苹果酸 (G/M),琥珀酸 (S),丙酮酸 / 苹果酸 (P/M),氯苯甲嗪 (Mec) 或 DMSO,ADP 和羰基氰化物氯苯胺 (CCCP)。

[0085] 图 3J 的代表性数据展示了在葡萄糖或半乳糖丰富的培养液中,氯苯甲嗪在一段时间对细胞生存能力的影响。MCH58 纤维细胞生长在 10mM 葡萄糖或 10mM 半乳糖中,用 50 μ M 氯苯甲嗪处理至 3 天。在每个时间点,用 CellTiter-Glo 相对荧光试验 (RLU) 计算细胞内 ATP 水平。数据表示为超过 DMSO 对照 $\pm$ SD ($n = 5$) 的平均倍数变化。

[0086] 图 3K 的线性图表展示了氯苯甲嗪在从老鼠心脏分离的最初心肌细胞抑制呼吸。心肌细胞暴露在氯苯甲嗪指示浓度后,在呼吸代谢箱测定氧耗。典型的呼吸影响如图所示。

[0087] 图 3L 的线性图表展示了氯苯甲嗪在从老鼠胚胎分离的最初皮层神经细胞抑制呼吸。在时间为 0 (分钟) 时,在 E14-15 天胚胎获得的最初老鼠皮层神经细胞加入氯苯甲嗪 (5 和 10 μ M) 或抗霉素 (1 μ M) 测定氧耗率 (OCR)。数据表示为平均 $\pm$ SD ($n \geq 3$)。

[0088] 图 3M-N 的柱状图展示了氯苯甲嗪不能改变线粒体 DNA 拷贝数 (3M) 或线粒体 mRNA 表达 (3N)。* $P < 0.001$; 双面 t 检验 (每个 $n = 3$)。

[0089] 图 4A 说明了具有代表性的全基因组 RNA 数据概况,该数据展示了在细胞生长中对于 i) 谷氨酰胺酶 (GLS); ii) 己糖激酶 (HK2); and iii) 硫氧还蛋白 (TXNIP) 的 mRNA 水平,该细胞生长在 50 μ M 氯苯甲嗪或 DMSO 处理过的葡萄糖中。数据描述为平均 $\pm$ SE; 通过双面检验 $p < 0.05$ ($n = 3$)。

[0090] 图 4B 的典型数据展示了细胞的生存能力 (Cell titer-Glo®),该细胞生长经过 DMSO 或 50 μ M 氯苯甲嗪,20mM 谷氨酸和 2.5mM 谷氨酸二甲酯盐酸盐处理后的葡萄糖培养液。DMSO- 实心柱状图。氯苯甲嗪 - 空心柱状图。

[0091] 图 4C 的典型数据展示了细胞的生存能力 (Cell titer-Glo®),该细胞生长经在 DMSO 或 50 μ M 氯苯甲嗪,20mM 谷氨酸和 2.5mM 谷氨酸二甲酯盐酸盐处理后的半乳糖培养液。DMSO- 实心柱状图氯苯甲嗪 - 空心柱状图。

[0092] 图 5A 的典型数据展示了突变 STHdhQ111/111 鼠科纹状体细胞的 ATP 水平,该细胞描述了去除血清与不去除血清,暴露 50 μ M 氯苯甲嗪与不暴露 50 μ M 氯苯甲嗪的变异亨廷顿蛋白。数据表示为平均 $\pm$ SD,双面 t 检验表明 $p < 0.01$ ($n = 3$)。

[0093] 图 5B 的典型数据展示了在对照 STHdhQ7/7 鼠科纹状体细胞的 ATP 水平,该细胞描述了去除血清与不去除血清,暴露 50 μ M 氯苯甲嗪与不暴露 50 μ M 氯苯甲嗪的野生型亨廷顿蛋白。数据表示为平均 $\pm$ SD,双面 t 检验表明 $p < 0.01$ ($n = 3$)。

[0094] 图 5C 的典型数据展示了突变 HD 细胞生存能力对氯苯甲嗪的剂量反应。CellTiter-Glo® 试验确定细胞生存能力,以相对于 DMSO 处理细胞的倍数变化来表示。实线代表了非线性回归。数据描述为平均 $\pm$ SD (每个数据点 $n = 3$)。

[0095] 图 5D 的典型数据展示了移去血清和暴露 DMSO 或 50 μ M 氯苯甲嗪后的 3 个时间点, Western blot 分析从突变 HD 细胞提取的蛋白。

[0096] 图 5E 的典型数据展示了 16 种药物和 DMSO 孵育后的细胞生存能力 (CellTiter-Glo®)。通过药物靶组织化合物。血清处理作为阳性对照。数据表示为平均 $\pm$ SD ($n = 3$ 每种药物)。

[0097] 图 5F 的典型数据展示了在昆虫中氯苯甲嗪的剂量反应曲线, 对照 19Q 或 128Q 描述了该曲线。

[0098] 24h 同时以血清和 50 μ M 氯苯甲嗪处理与不处理, STHdhQ111/111 纹状体细胞的明视场典型显微图片 (20X) 如图 5G 所示。

[0099] 暴露在不同浓度氯苯甲嗪 200 分钟, MCH58 纤维细胞氧耗率 (OCR) 的典型变化数据如图 6A 所示。数据表示为平均 $\pm$ SD ($n = 3$)。

[0100] 暴露在 50 μ M 氯苯甲嗪 6 小时后, MCH58 纤维细胞乳酸生产率典型变化数据如图 6B 所示。 $n = 6$; 意味着 $p < 0.01$ 。

[0101] 图 7A 和图 7B 的柱状图展示了暴露在 50 μ M 氯苯甲嗪或 DMSO 200 分钟后, 多种细胞类型的 OCR 和 ECAR 典型变化数据。数据描述为平均 $\pm$ SD ($n \geq 3$)。在含有培养液的葡萄糖中, 暴露在 50 μ M 氯苯甲嗪或 DMSO 对照 200 分钟后, 多种类型细胞的氧耗率变化 (OCR) 如 7A 所示, 细胞外酸化率 (ECAR) 如 7B 所示。数据描述为平均 $\pm$ SD ($n \geq 3$)。意味着 $p < 0.05$; 两面 t 检验法计算 p 值。

[0102] 在 HeLa 细胞 (图 . A 和 B), HEK 293 细胞 (图 . 8C 和 8D), 老鼠永生生化纹状体细胞 STHdhQ7/7 (图 8E 和 8F), 50 μ M 氯苯甲嗪对氧耗率 (OCR) 和细胞外酸化率 (ECAR) 的影响的典型数据如图 8A-F 所示。数据标准化为 DMSO 对照; 数据描述为平均 $\pm$ SD ($n \geq 3$)。

[0103] 图 9 的线性图表展示了在 293 个细胞中, 与传统的 OXPHOS 抑制剂相比, 超过 DMSO 基线以氯苯甲嗪介导的氧耗率 (OCR) 减少的时间进程。数据描述为 $\pm$ SD ($n \geq 3$)。

[0104] 图 10A-10B 的典型数据展示了氯苯甲嗪对 HIF-1 α 稳定性的影响。在图 10A 中, 在 6h 以 0.1% DMSO, 100 μ M 去铁胺 (DFO) 或 50 μ M 氯苯甲嗪治疗后, 通过提取 HeLa 细胞蛋白 western blot 分析检测 HIF-1 α 和 HIF-2 α 。6 小时以 DMSO, 100 μ M DFO 或 50 μ M Mec 处理, 图 10B 的柱形图展示了短暂地转染 HeLa 细胞测量 HIF 受体活性。NTC 指的是没有转染的对照。数据代表了 2 个各 3 次重复的独立实验。(* $P < 0.05$; 双面 t- 检验)。

[0105] 在葡萄糖丰富的培养液中暴露在 50 μ M 氯苯甲嗪 6 小时 ($n = 3$) 后, 图 11A 的代表性数据鉴别了 MCH58 细胞的不同表达基因 ($FDR < 0.175$), 通过 Affymetrix U133 plus2.0 基因表达试验测定其 mRNA 水平。

[0106] 图 11B 的代表性数据展示了通过 qRT-PCR 测量 GLS 的表达 ($n = 3$, * $P < 0.005$)。

[0107] 图 12A 的代表性数据展示了 shRNA 靶向 GLS 减少了 GLS 的表达。

[0108] 图 12A 的代表性数据展示了在稳定转导 shGLS 细胞中, shRNA 靶向 GLS 减少了细胞内 OCR ($n = 5$, * $P < 10^{-4}$)。

[0109] 图 13 的代表性数据展示了 Western blot 分析了氯苯甲嗪在 GLS 蛋白水平的影响。

[0110] 图 14A 的代表性数据展示了来自于 CMV 启动子的 GLS-GFP 融合蛋白组成性表达。用抗 GLS 抗体做 Western blot 分析。

[0111] 0 分钟 ($n = 4$) 加入 DMSO 或 50 μ M 氯苯甲嗪后, 图 14B 的代表性数据展示了在分

类对照 (LacZ)FACS 或 GLS 表达细胞的 OCR 检测。

[0112] 图 15A 的代表性数据展示了 6 小时暴露在 50 μ M 氯苯甲嗪后, MCH58 纤维细胞中 124 种代谢物的倍数变化。数据表示为在 DMSO 处理细胞的倍数变化 ($n = 6$)。

[0113] 图 15B 的代表性数据展示了质谱检测的磷酸乙醇胺相对量。通过三重四极质谱仪检测 DMSO 或 50 μ M 氯苯甲嗪处理后的 MCH58 纤维细胞或老鼠纹状体细胞的磷酸乙醇胺 (PEA) 的相对量。HILIC 分离细胞提取的代谢物, 通过跑 PEA 标准 (Sigma P0503) 确定 HPLC 柱和 PEA 峰。(纤维细胞 $n = 6$; 纹状体细胞 $n = 3$)。

[0114] 图 16A 的代表性数据证明了在独立线粒体的剂量依赖性方式中, PEA 抑制解偶联呼吸作用。给药 CCCP 的前后检测了独立线粒体氧耗的急性影响, 如箭头所示。3 个独立测量有代表性。

[0115] 图 16B 的代表性数据证明了对解偶联剂 CCCP 的反应中, 氯苯甲嗪抑制了呼吸作用的增加。CCCP 处理后, 293 个细胞以 25 μ M 氯苯甲嗪进行前处理 6 个小时, 但未能激发氧耗, 未能达到以 DMSO 对照处理的同等程度。

[0116] 图 16C-D 的线性图表展示了 PCYT2 (CTP:磷酸乙醇胺腺苷酸转移酶 2) 是氯苯甲嗪 (16C) 和 S-氯苯甲嗪 (16D) 的靶标。在 50-1000 μ M 氯苯甲嗪或 50-600 μ M S-氯苯甲嗪存在下, 纯化的重组体 PCYT2 在体外进行 PCYT2 酶试验。

[0117] 图 17A 的代表性数据展示了氯苯甲嗪解救的 STHdhQ111/111 的生存能力和其对 OXPHOS 的影响有关。图中描绘了由于 (0, 5, 10, 12.5, 25, 37.5 and 50 μ M) 不断增加的氯苯甲嗪浓度, STHdhQ111/111 细胞的生存能力的倍数变化和与之相应的 OCR 的减少。数据表示为平均 $\pm$ SD ($n \geq 3$)。

[0118] 图 17B-C 的线性图表展示了加入 50 μ M 氯苯甲嗪, 50 μ M 阿托品, 或 50 μ M 莨菪碱 (17B) 和 50 μ M 氯苯甲嗪, 50 μ M 美吡拉敏, 50 μ M 苯吡胺 (17C) 后, 293 个细胞检测的氧耗率 (OCR) 的结果。数据表示为平均 $\pm$ SD ($n \geq 3$)。

[0119] 图 18A-B 的代表性数据展示了在 ERK 和 AKT 信号通路中的氯苯甲嗪的影响。移去血清和暴露在 DMSO, 50 μ M 氯苯甲嗪或 33 μ M 鱼藤酮后, 在 12 小时提取 STHdhQ111/111 纹状体细胞的蛋白做 Western blot 分析。从细胞信号通路能获得市场上能买到的抗体, 其能特异性检测磷酸化 ERK 或 AKT。图 18-A 为 p-ERK ;Thr202 or Tyr204 的磷酸化检测。图 18B 为 p-AKT ;Thr308 的磷酸化检测。

[0120] 图 18C 的柱形图展示了撤销血清, 药物处理后 STHdhQ111/111 细胞生存能力的百分变化。使用 20 μ M 的 R-氯苯甲嗪 (R-Mec), S-氯苯甲嗪 (S-Mec) 和外消旋混合物 (Rac-Mec)。血清处理作为阳性对照。数据表示为平均 $\pm$ SD (每种药物 $n = 4$)。

[0121] 图 19A-B 的代表性药物展示了在两种亨斯顿疾病模型中氯苯甲嗪 (33 μ M) 对 Htt-Q128 蛋白表达的影响。用鼠源抗人 HD 抗体检测 Htt-Q128。对照为 DMSO。图 19A 为从 Htt-Q128 表达的线虫提取蛋白进行 Western blot 分析。图 19B 为从 elav-GAL4 > UAS-Htt-Q128 成年 D. 黑腹果蝇 (十天饲养期)。提取的溶菌产物进行 Western blot 分析。

[0122] 图 20 的代表性数据展示了在 Q128 表达的线虫 PLM 神经细胞氯苯甲嗪对其蛋白聚集体的影响。33 μ M 氯苯甲嗪处理后通过光学显微镜检测 Htt-Q128 聚集体的形成。在 80 个昆虫中至少 180 PLM 神经细胞被计算在内 ($n = 3$)。

[0123] 图 21A 的代表性数据展示了 DMSO 或 33 μ M 氯苯甲嗪对 128Q 线虫轴突障碍性疾病

的影响的荧光图片。柱形图大小意味着 $5\mu\text{m}$ 。

[0124] 图 21B 的代表性数据展示了在 128Q 表达的线虫 PLM 神经细胞氯苯甲嗪对轴突肿胀的影响。在 Htt-Q128 表达的昆虫 PLM 神经细胞, DMSO 或 $33\mu\text{M}$ 氯苯甲嗪处理后光学显微镜观察轴突肿胀。至少计算 80 个昆虫的 180 个 PLM 神经细胞 ($n = 3$, $*P < 0.01$)。

[0125] 图 22 的代表性数据展示了突变 Htt (Q128/128) 在黑腹果蝇光感受器的表达。用伪瞳孔技术光学显微镜成像。图 22A 展示了表达突变 Htt-Q128 ($\text{elav-GAL4} > \text{UAS-Htt-Q128}$) 的果蝇在羽化时每个小眼有 7 个可见光收集单位 (视杆细胞) 的正常互补区。图 22B 展示了表达突变 Htt-Q128 ($\text{elav-GAL4} > \text{UAS-Htt-Q128}$) 的果蝇在羽化后视杆细胞数量在减少, 退化加快。

[0126] 图 23 的代表性数据展示了在黑腹果蝇体内 HD 模型中, 氯苯甲嗪解救的神经元亏损。转基因人类 HD-Q128 中的神经细胞使用了 elav-GAL4 , 其导致了时间依赖性神经退行性疾病, 这可作为对可见视杆细胞的数量估计。果蝇以 DMSO 赋形剂或 $33\mu\text{M}$ 氯苯甲嗪处理 10 天, 计算每个小眼的视杆细胞的平均数量, 其分布如图所示。数据表示为 $\pm\text{SD}$ ($n = 2$, $*p < 0.05$)。

[0127] 图 24A-B 的代表性数据展示了在人类胚胎的 293 个肾细胞中, (R) 和 (S) 氯苯甲嗪对细胞氧耗的影响。

[0128] 在 C2C12 肌小管中, 氯苯甲嗪, S- 氯苯甲嗪, R- 氯苯甲嗪激活 AMPK 的 Western blot 如图 24C 所示。

[0129] 图 24D 的线性图表展示了不是 S-mec, 是 R-mec 结合 H1 受体。

[0130] 图 24E-F 的线性图表展示了 R- 氯苯甲嗪 (24E) 比 S- 氯苯甲嗪 (24F) 对组胺受体更有效。

[0131] 图 25A-B 的代表性数据展示了在缺血再灌注的体内纹状体细胞中, 氯苯甲嗪的保护作用。数据表示为 $\pm\text{SD}$, $n \geq 3$ 。意味着双面 t 检验 $p < 0.01$ 。在 PBS 中将氯苯甲嗪溶于 10% Cremaphor EL 溶液 (Sigma No. C5135), 用 NaOH 调 pH 为中性。图 25A 为葡萄糖和氧气的对照 IR 数据。图 25B: 保护性 IR 数据代表了氯苯甲嗪, 葡萄糖和氧气的功能。

[0132] 图 26 展示了 Subclass I 中二甲亚砜派生物结构的代表性化合物。

[0133] 图 27A 展示了 Subclass II 中三环结构的代表性化合物。

[0134] 图 27B 展示了 Subclass III 中硫代二苯胺的代表性化合物。

[0135] 图 28 展示了抗组胺剂的代表性化合物。

[0136] 图 29 展示了 diphenylpiperazine 结构的代表性化合物。

[0137] 图 30 展示了烷氧基联二苯结构的代表性化合物。

[0138] 图 31 展示了联二苯 (烷氧基) 结构的代表性化合物。

[0139] 图 32 展示了三环结构的代表性化合物。

[0140] 氯苯甲嗪对暴露在局部缺血 - 再灌注 (I/R) 的独立心肌细胞的影响如图 33A-33C 所示。图 33A 简要展示了实验设计。图 33B 的直方图展示了心肌细胞 I/R 后在对照, 未处理和药物处理 (Mec, 氯苯甲嗪; Atrop, 阿托品; Phenir, 苯比胺; Pyril, 美吡拉敏; Scopo, 莨菪碱) 的生存能力。图 33C 的直方图展示了在对照, 未处理和氯苯甲嗪处理中的心肌细胞 I/R 后的 VO_2 。

[0141] 图 34A-B 包含的数据展示了在独立心脏中氯苯甲嗪的保护作用。图 34A 的线性图

表展示了在细胞赋形剂（开放的环）和氯苯甲嗪处理（闭合的环）的心脏中增压前和 I/R 后的百分率。图 34B 的线性图表展示了在细胞赋形剂（开放的循环）和氯苯甲嗪处理（封闭的循环）的心脏中检测的梗死区大小。

[0142] 图 35A-35C 包含的数据展示了在中风动物模型中氯苯甲嗪的保护性作用。35A 是哺乳动物中风模型方案。在大脑动脉短暂闭塞中间前 1h, 分别在 17h 和 3h 以 100mg/kg 的氯苯甲嗪, 20mg/kg 美吡拉敏和 0.5mg/kg 苈蓉碱或赋形剂对雄性 C57BL/6 小鼠进行两次腹腔注射, 然后 24h 再灌注。图 35B 表示以氯苯甲嗪, 苈蓉碱, 美吡拉敏或赋形剂处理的小鼠, 从该小鼠内获得的以 TTC 着色的 1mm 后的冠状切片, 以此计算梗死体积。数据点指的是相对独立的实验, 实线代表了他们的平均值 (赋形剂和苈蓉碱 *P < 0.05, 和美吡拉敏 *P < 0.01 一步 ANOVA 后是 Tukey 的多重比较实验)。以氯苯甲嗪, 苈蓉碱, 美吡拉敏或赋形剂处理, 在共同颈动脉 (CCA) 和中部大脑动脉 (MCA) 闭塞后, 在基线处检测的大脑血流量 (CBF) 如图 35C 所示。数据表示为平均 $\pm$ s. d.

[0143] 图 35D 的线性图表展示了以氯苯甲嗪, 苈蓉碱, 美吡拉敏或赋形剂处理, 在大脑 (切片 1-10) 的梗塞范围变化。数据点代表了在个体切片水平差异中 (赋形剂 n = 14, 氯苯甲嗪 n = 8, 美吡拉敏 n = 8, 苈蓉碱 n = 5 *P < 0.05)。梗塞 $\pm$ s. d. mm² 的平均范围。

[0144] 图 36 的柱形图展示了在赋形剂, S- 氯苯甲嗪和二甲双胍处理的 C2C12 肌小管中以分钟为单位检测的本底葡萄糖摄取量。

[0145] 发明详述

[0146] 正如本文所述, 通过化合物筛选策略来筛选能量代谢调节剂, 鉴定线粒体代谢 (如氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation) 和或糖酵解 (glycolysis)) 的小分子抑制物。氯苯甲嗪 (meclizine) 被确定为线粒体代谢的干扰剂, 可以用于防止细胞死亡, 例如, 与细胞死亡相关的缺血性损伤 (ischemic insult) 或细胞退化性疾病, 如神经退化性疾病或糖尿病。

[0147] 化合物筛选策略旨在鉴别从线粒体呼吸到有氧糖酵解 (aerobic glycolysis) 的小分子诱导代谢转换开关, 反之亦然。氯苯甲嗪, 一种通过此筛选方法确定的小分子化合物, 可以抑制线粒体呼吸和激活有氧糖酵解, 显然是通过一种新的代谢机制即抑制 PCYT2 来完成。这种代表性药物也抑制在细胞和动物模型中的神经退化性疾病的表型。在一些实施例中, 本发明可利用细胞代谢的可塑性来开发用于治疗很多与能量平衡相关的疾病的药物。

[0148] 虽然此项发明的作用机理并不重要, 我们认为上述筛选策略包括代谢状态依赖性的致死率并利用哺乳动物细胞的代谢可塑性。大多数细胞在提供营养物质的前提下有能力进行有氧糖酵解或氧化磷酸化。在分化和发育阶段, 存在长期的、适应性的氧化磷酸化 (OXPHOS) 和糖酵解之间的转换, 并且可以由转录和转录后调控机制来进行驱动, 例如: Moyes et al., J. Exp Biol. 208:1601 (2005)。

[0149] 在葡萄糖作为唯一糖源下生长的细胞都通过糖酵解以及线粒体谷氨酰胺氧化途径来获取三磷酸腺苷 (ATP), 只有一小部分葡萄糖碳骨架 (skeleton) 进入柠檬酸循环 (TCA cycle)。(Reitzer et al., J Biol Chem 254:2669 (1979); DeBerardinis et al., PNAS USA 104:19345 (2007)) 然而, 当细胞在半乳糖存在下生长时, 几乎所有的 ATP 都是通过线粒体谷氨酰胺氧化得来, 且半乳糖碳骨架用来还原生物合成 (biosynthesis)。代谢状态依

赖致死率筛选可以通过选用类似哺乳动物版的经典酵母在发酵和非发酵培养基中生长的生长实验来得到功能性验证。该方法被用来诊断人类的线粒体呼吸链缺陷疾病。(Robinson et al., *Biochem Med Metab Biol.*, 48:122(1992))。

[0150] 这里公开的筛选试验可用于鉴别化合物,例如可以将细胞代谢向氧化磷酸化转换并减缓快速繁殖细胞的生长率和存活的小分子(这种化合物可以起到治疗癌症的效用),以及新的氧化磷酸化抑制剂小分子。这种筛选机制可以在完整的细胞中进行,例如,经过72小时的药物治疗,从而确定能够通过新的机制降低氧化磷酸化的试剂,包括在葡萄糖作为唯一糖源的情况下不影响细胞生长或存活的相对无毒的试剂。

[0151] 细胞能量代谢和疾病

[0152] 线粒体是细胞能量的加工厂,它能够将我们吃的食物转换为细胞能量流通货币ATP。越来越多的证据表明,抑制线粒体呼吸实际上可以在一系列的疾病中起保护作用,包括糖尿病、阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease, AD)、帕金森病(Parkinson's disease, PD)、亨廷顿病(Huntington's disease, HD),以及缺血性疾病像中风(stroke)和心肌梗塞。

[0153] OXPHOS 到糖酵解途径是如何转换的? 现有研究表明,基因突变导致的 HD, AD, PD 和肌萎缩侧索硬化(Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS)通过与电子传递链的不同组分相互作用,从而导致改变线粒体的钙运输,氧化损伤(oxidative damage),坏死或凋亡细胞死亡。(Knott et al., *Nat Rev Neurosci* 9:505(2008))。一个功能性的线粒体呼吸链可能加剧突变蛋白的毒性。就像在细胞和动物模型中进行的遗传和化学修饰研究所证明,通过调控电子传递链的活力,从而提供一种减少疾病病理发生途径的潜在手段。例如 Buttner et al., *J Biol Chem* 283,7554(2008); Fukui et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 14163(2007); 和 Varma et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 104:14525(2007)。在 AD、PD、HD 的动物模型研究中发现,遗传或药理抑制线粒体呼吸链可以抑制疾病的病理发生途径。神经元特异性细胞色素 C 氧化酶缺陷型小鼠(杂合 IV 型)实验证实,当表达淀粉样蛋白(amyloid)前体或早老素 1(presenilin 1)时,形成的一些淀粉样蛋白斑块会减少,氧化损伤也降低。Fukui et al., *PNAS USA* 104:14163(2007)。在表达 α -突触核蛋白(synuclein)的酵母中,通过消耗线粒体 DNA 来去除线粒体呼吸,可以减少活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)的形成和细胞凋亡。因此,抑制线粒体功能可以抑制由等位基因疾病引起的毒性。(Buttner et al., *JBC* 283:7554-7560(2008))由鱼藤酮(rotenone)和寡霉素(oligomycin)介导的药理性抑制呼吸链可以在细胞培养过程以及 HD 体内模型实验过程中防止细胞凋亡发生。(Varma et al., *PNAS USA* 104:14525(2007))。

[0154] 二甲双胍(Metformin),糖尿病的一种有效治疗药物,被认为参与了抑制线粒体呼吸链,从而激活了一些自适应途径包括提高腺苷酸激酶(AMP Kinase, AMPK)活性,促进外围对葡萄糖的摄取,并抑制肝脏糖异生(gluconeogenesis)。(Leverve et al., *Diab. Metab.* 29:6S88-94(2003))。二甲双胍是目前最广泛应用的 II 型糖尿病的治疗药物之一。按照本文描述方法确认的抑制 OXPHOS 的其它化合物,像氯苯甲嗪(meclozine)或 S-氯苯甲嗪,也是治疗糖尿病的候选治疗药物。此外,其他研究者已经提出,那些阻断线粒体呼吸的试剂可以在心脏或大脑缺血再灌注(reperfusion)后,预防细胞损伤和死亡发生。(Chen et al., *Am J Physiol Cell Physiol* 292:C137(2007), and Huber et al.,

Neuropharmacology 48 :558 (2005))。用于二级预防中风 (stroke) 的的他汀类药物和其他药物的神经保护作用可能是由于这些药物引起轻度抑制线粒体呼吸链。见 Huber et al., Neuropharmacol 48 :558 (2005))。用 II 型复合物抑制剂 3-硝基丙酸 (3-nitropropionic, 3-NPA) 预处理, 可以在局部和全脑缺血的小鼠中诱导耐受性。

[0155] 将之前报告的这些关于 OXPHOS 抑制剂的治疗效果的研究结果转化存在一个很大的限制, 那就是缺乏临床上可接受的用于转变病人体内细胞对线粒体呼吸的依赖性的策略。目前所知的 OXPHOS 抑制剂直接阻断呼吸链, 表现出不佳的治疗指数 (therapeutic index), 并且有毒性。由于其作用迅速, OXPHOS 抑制剂往往能够快速中断呼吸链, 产生自由基损伤和迅速消耗细胞三磷酸腺苷, 尤其在氧化的细胞中。见图 9 所示。虽然激活组织缺氧诱导因子途径可以将能量代谢调向糖酵解来提供另一种潜在治疗途径, 但是很少有临床上可以接受的激活这种途径的策略。(Lu et al., J Biol Chem 283 :28106 (2008); Aragones et al., Nat Genet 40 :170 (2008); and Giaccia et al., Nat Rev Drug Discov 2 :803 (2003))。

[0156] 在一些实施例中, 本发明提供通过对 OXPHOS 减少的数量或水平来滴定, 即 OXPHOS 的部分衰减, 而不是完全抑制线粒体的 OXPHOS, 使得伴随完全抑制 OXPHOS 的毒副作用不出现或降到最低的方法。(滴定的能力, 可以使用剂量反应分析检测; 或全有或全无反应的化合物 (例如, 一个阶跃函数 (step-function) 响应) 是不合适的, 因为他们是不可滴定的, 而那些有一个平滑的剂量反应曲线的药物则是可滴定的)。这些可滴定的药物将有望提高治疗指数。

[0157] 相反, 快速增长的细胞 (如肿瘤细胞) 主要依靠糖酵解的能量。因此, 确定化合物具有低 $S_{\text{glu/gal}}$ (例如, 化合物 $S_{\text{glu/gal}}$ 低于零, 例如 $S_{\text{glu/gal}}$ 在 -0.33 到 -0.75 之间) 可以作为治疗癌症的药物或作为其他癌症治疗药物的佐剂。

[0158] Lampidis et al., U. S. Pat. No. 7, 338, 940 专利公开的用于治疗癌症的组合物和方法旨在单独抑制厌氧增长的肿瘤细胞 (即, 这些细胞在肿瘤核心) 的糖酵解和或结合抑制来源于同一肿瘤的有氧生长的肿瘤细胞 (即, 这些细胞在肿瘤边缘) 的氧化磷酸化。文献侧重于六类糖酵解抑制剂: i) 2 脱氧-D-葡萄糖类似物; ii) D-己糖吡喃糖 (hexopyranose) 类似物; iii) C-2 葡萄糖异构物; iv) C-3, C-4 葡萄糖异构物; v) 甘油类似物; 和 vi) 乳酸脱氢酶抑制剂。然而, 如文献公开所述, 由于细胞从有氧到厌氧代谢转换, 氧化磷酸化抑制剂 (即, 罗丹明 (rhodamine) 123) 导致乳酸增加。这种状况增加了他们对糖酵解抑制剂的敏感性。此外, 该文献提到了传统上使用的抗癌药物 (即, 阿霉素 (doxorubicin), 长春新碱 (vincristine), 紫杉醇 (paclitaxel)) 在有氧且无乳酸积聚的环境下是有效的 (即, 没有反映抑制氧化磷酸化)。因此, 文献建议通过使用一种方法测量乳酸积聚可用于广泛筛选结构不同的化合物库, 以确定抑制氧化磷酸化的化合物, 从而使肿瘤对糖酵解酶抑制剂敏感。然而, 文献没有提到通过比较细胞在葡萄糖和半乳糖培养基中生长来确认非毒性的糖酵解抑制剂, 即有效的抗癌药物。(dated 3/4/2008; See also U. S. Patent No. 7, 160, 865 (dated 1/9/2007); U. S. Patent Application No. US 2006/0025351, 2005/0043250 and 2003/0181393; and WIPO Publication No. WO/2001/082926 selected parts.)。

[0159] Rossignol et al., Cancer Research, 64 :985-993, 2004 报道研究癌细胞或者适

应糖酵解或者适应氧化磷酸化,取决于提供能量来源的葡萄糖和半乳糖的使用。进一步文献揭示,当葡萄糖不可用而癌细胞只能靠糖酵解产生能量时,癌细胞能够利用谷氨酰胺酶解,谷氨酰胺氧化产物。文献没有提到通过比较细胞在葡萄糖和半乳糖培养基中生长来确认非毒性的或者氧化磷酸化或者糖酵解抑制剂。

[0160] 治疗方法

[0161] 通过本发明的方法确认的组合物,例如文中提到的化合物,由于他们具有调控线粒体氧化磷酸化的能力,所以可以用来治疗人类疾病或延缓疾病发展,其中 OXPHOS 活力可能有助于疾病形成,或者抑制 OXPHOS 可以激活细胞的自适应程序从而帮助预防疾病发生。例如,线粒体 OXPHOS 活性有助于形成的疾病,包括但并不局限于,糖尿病例如 II 型糖尿病、神经退化性疾病、以及缺血再灌注损伤例如中风、肾缺血性损伤、缺血性心脏病。另外,如下面描述的与寄生虫 (parasitic) 如某些原生动物 (protozoan) 寄生虫感染相关的疾病也可以治疗。所有这些疾病都可以用经确认为 OXPHOS 抑制剂的化合物来治疗,比如说一种具有高 $S_{glu/gal}$ 评分的化合物,例如氯苯甲嗪。

[0162] 例如,筛选出来的药物 $S_{glu/gal}$ 评分大于零则可以作为一种非毒性的 OXPHOS 抑制剂,可以用于治疗神经退化性疾病或缺血性疾病,糖尿病,或寄生虫感染。已经确认的化合物,例如这里提到的氯苯甲嗪,可以作为药物或继续开发用于治疗文中提到的由线粒体 OXPHOS 活力引发的疾病。另外,筛选出来的药物 $S_{glu/gal}$ 评分低于零则可能有潜在的治疗癌症的用途。

[0163] 正如本文所述,氯苯甲嗪作用于 PCYT2,从而扰乱在所有真核细胞都作为主要磷脂 (phospholipid) 的磷脂酰乙醇胺 (phosphatidylethanolamine) 的合成。磷脂酰乙醇胺合成可以通过 (i) Kennedy 途径的 CDP-乙醇胺分支;(ii) 磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine) 的脱羧 (decarboxylation) 途径;或 (iii) 基于磷脂酰丝氨酸的交换途径来完成。在哺乳动物包括人类,所有三个途径都可用。然而,在某些原生动病原体 (pathogen) 包括布氏锥虫 (Trypanosomabrucei),这个引发人类和动物的非洲锥虫病 (昏睡病 (sleeping sickness)) 的病原体;克氏锥虫,一种引起美洲锥虫病 (Chagas disease) 的寄生虫;和恶性疟原虫,人类疟疾寄生虫,他们的磷脂酰乙醇胺主要都是通过 Kennedy 途径合成的。因此,像氯苯甲嗪针对 PCYT2 扰乱这一途径的化合物可作为治疗药物,用于治疗靠 PCYT2 介导磷脂酰乙醇胺合成途径的这些寄生虫所引起的疾病。

[0164] 细胞退化性疾病

[0165] 本文描述的方法包括治疗像神经退化性疾病的细胞退化性紊乱。该方法可以包括给那些已经或正在发展为退化性疾病的患者摄入像氯苯甲嗪这类具有高 $S_{glu/gal}$ 评分的化合物。可以用这些方法治疗的疾病包括阿尔茨海默氏病 (AD),帕金森病 (PD),亨廷顿病 (HD),肌萎缩侧索硬化 (ALS) 和弗里德赖希氏共济失调 (Freidreich ataxia)。线粒体代谢抑制剂已被证明在亨廷顿型病模型中可以挽救细胞死亡 (Varma et al, Proc Natl Acad Sci U S A. 2007),这种线粒体的代谢功能对老龄化酵母中 α -突触核蛋白毒性发生尤其需要 (Buttner et al., J Biol Chem. 2008)。正如本文所示,氯苯甲嗪对三种不同亨廷顿病模型中能够起到防止神经细胞死亡和细胞营养不良。

[0166] 糖尿病

[0167] 此外,本方法可用于治疗糖尿病。抑制线粒体呼吸链激活几种自适应途径包括

提高 AMP 激酶 (AMPK) 活性,从而促进在外围对葡萄糖的摄取,并抑制肝脏糖异生途径。(Leverve et al., Diab. Metab. 29 :6S88-94(2003))。二甲双胍,其功效至少部分是通过这一机制来完成的,是目前广泛应用的 II 型糖尿病的治疗药物之一。正如本文所述,氯苯甲嗪和 S- 氯苯甲嗪能够抑制培养的肌肉细胞的 OXPHOS 并激活 AMPK 活性 (见图 24C),促进培养的肌肉细胞对葡萄糖的摄取 (图 36),降低 R6 小鼠的血糖水平 (图 37)。

[0168] 缺血性紊乱

[0169] 本文所述方法包括治疗缺血再灌注损伤相关的疾病,包括心肌缺血 (myocardial ischemia),脑缺血 (cerebral ischemia) 和肾缺血 (renal ischemia)。例如,对易患或存在心肌缺血高风险的患者,该方法可用来在心脏手术过程如心脏移植、经皮冠状动脉介入治疗 (percutaneous coronary intervention, PCI)、或冠状动脉旁路搭桥术 (coronary artery bypass graft, CABG)、和不稳定型心绞痛 (angina) 期间快速保护心肌、防止心肌损伤。该方法可以包括给冠状动脉疾病患者摄入像氯苯甲嗪这类具有高 $S_{glu/gal}$ 分值的化合物,作为抗心绞痛药物。对于那些已经患上肾缺血或具有患上肾缺血风险的患者,在冠状动脉旁路搭桥手术时,具有高 $S_{glu/gal}$ 值的化合物例如像氯苯甲嗪可以用来减轻急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI),并减少移植损伤。对于那些已经患上或具有患上脑缺血风险的患者,在颈动脉内膜切除手术 (carotid endarterectomy, CEA) 或冠状动脉旁路搭桥手术期间,具有高 $S_{glu/gal}$ 评分的化合物例如氯苯甲嗪可以用来降低中风的风险或中风带来的损伤,并且可以防止蛛网膜下腔出血 (subarachnoid hemorrhage, SAH) 后二次缺血。特别是,这些化合物可用于治疗短暂性脑缺血发作 (transient ischemic attack, TIA) 或轻微中风,或具有中风风险或在 30 天内中风复发风险的患者 (例如,刚发生完出血性中风 (hemorrhagic stroke) 的患者,或即将接受伴随缺血再灌注损伤风险的手术例如器官移植、经皮冠状动脉介入治疗、冠状动脉旁路搭桥或颈动脉内膜切除等手术的患者)。当患者即将接受伴随缺血再灌注损伤风险的手术,这类化合物可以在手术前、手术过程中或手术后摄入。

[0170] 因此,由文中所描述的方法确认的组合物,例如氯苯甲嗪这类具有高 $S_{glu/gal}$ 评分的药物适用于治疗缺血性紊乱疾病,包括但不限于中风、缺血性心脏病 (例如心脏病发作或心绞痛)、再灌注损伤。

[0171] 缺血性心脏病

[0172] 缺血性心脏病是医生用来描述由于冠状动脉疾病导致的充血性心脏衰竭的一个术语。“缺血”,是指器官 (如心脏) 得不到足够的血液和氧气。当动脉血液和氧气往心脏运输过程中被阻断时发生缺血性心脏疾病。在用于输送氧气到心脏肌肉组织的动脉中可能积聚了称为斑块的胆固醇 (cholesterol) 和其他物质。缺血性心脏疾病是充血性心脏衰竭的常见病因。患有这种疾病的患者可能曾经有过心脏病发作、心绞痛、或不稳定型心绞痛。一些患者可能并没有注意到任何前期症状。在美国,缺血性心脏病是心肌病的一种常见类型,大约影响着百分之一的人群,病发人群主要出现在中年到老年男子中。

[0173] 患缺血性心脏病的危险因素包括但不局限于个人或家族有心脏病发作、心绞痛、不稳定型心绞痛、动脉粥样硬化或其他冠状动脉疾病、高血压、吸烟、糖尿病、高脂饮食、高胆固醇和肥胖的历史。

[0174] 缺血性心脏病的症状包括但不局限于胸部疼痛,局部性的胸骨下但可以移动 (从

中心向四周扩散)到脖子、下巴、背、肩、臂且伴随着紧张、压力、不能站起来和或挤压的感觉(疼痛可能会或不会随着休息或注射硝化甘油得到缓解)、心悸、不规则或快速脉搏(rapid pulse)、呼吸急促、咳嗽、疲乏无力、头晕、警觉性下降或注意力不集中、白天尿量减少、晚上排尿过多和全身肿胀。

[0175] 测量射血分数(ejection fraction)测试可用于诊断缺血性心脏病,包括但不限于超声心动图、心导管插入术(cardiac catheterization)期间的脑室造影照片(ventriculogram)、门控断层显像(gated SPECT)、胸部核磁共振成像(MRI)、心电图(ECG)或心脏活检。

[0176] 目前的治疗目标是缓解症状和解决致病起因。目前给药的几种类型的药物,包括但不限于血管紧张素(angiotensin)转换酶抑制剂(如卡托普利(captopril)或赖诺普利(lisinopril))、 β -肾上腺素(adrenergic)阻滞剂(如美托洛尔(metoprolol)或卡维地洛(carvedilol))、或利尿剂(diuretic)(如呋塞米(furosemide))(速尿(Lasix))、安体舒通(spironolactone)、或依普利酮(eplerenone)。这里描述的方法包括这些治疗方法与氯苯甲嗪相结合,分别实施或组成单一组合物进行实施。

[0177] 脑缺血或中风

[0178] 中风是一个中断向大脑任何部位供应血液的症状。中风有时也被称为“brain attack”。大约每40秒钟,美国就会发生一例中风。中风在如下条件下会发生:i)向大脑供应血液的血管被血凝块堵塞(例如缺血性中风),ii)血管破裂,导致血液渗漏到大脑(例如出血性中风)。如果血流停止时间超过几秒,大脑得不到血液和氧气,脑细胞就会死亡,造成永久性损伤。

[0179] 缺血性中风是中风的一个常见类型。通常这种类型的中风是由动脉阻塞导致的,这种情况被称作动脉粥样硬化。脂肪、胆固醇和其他物质在动脉壁聚集则会形成一种粘性物质,称为斑块。随着时间的推移,斑块积聚。这往往使得血液很难正常流动,从而导致血液凝结。其他引起血栓相关的缺血性中风的原因,包括但不限于不正常的心脏瓣膜(abnormal heart valve)、心内膜炎(endocarditis)或存在一个机械性心脏瓣膜。例如血栓能够在心脏瓣膜形成,中断,然后传播到大脑。因为这个原因,那些能够形成机械性或不正常心脏瓣膜的药物往往是处方的抗凝血药物(例如香豆素(coumadin))。

[0180] 出血性中风也是一种常见的中风类型。通常这种类型的中风是由脑出血导致的。它可以在大脑中的小血管变得软弱和爆裂时发生。某些大脑血管存在缺陷的人更容易出现此现象。当血管破裂损害脑细胞后就会出现脑出血。

[0181] 缺血性中风的危险因素包括但不限于高血压、糖尿病、家族病史、心脏病高胆固醇或老龄化。某些药物使血液凝块的可能性更大,可能会增加中风的风险(如某些口服避孕药(contraceptive))。

[0182] 出血性中风的危险因素包括但不限于饮酒、出血疾病、吸食可卡因(cocaine)或头部创伤。

[0183] 中风的症状取决于大脑的哪个部分受损。在某些情况下,一个人甚至不可能意识到他或她中风了。症状往往来得突然,没有任何预兆。他们可能是偶发(episodic)(突然发生,然后停止)或可能随着时间的推移慢慢变得更糟。一般中风的症状包括但不限于警觉性发生变化、昏睡(coma)、嗜睡(lethargy)、瞌睡(sleepiness)、不省人事(stupor)、

失去知觉 (unconsciousness)、情绪低落 (emotional withdrawal)、说话困难或理解能力低下、吞咽困难、读写困难、头痛、散失协调、失去平衡、独自行动困难、恶心 (nausea) 或呕吐 (vomiting)、抽搐 (seizure)、自我感观改变、突然混乱、全身虚弱或视力出现问题。

[0184] 诊断中风的测试可以包括但不限于进行脑血管造影、完整血小球计数、凝血素 (prothrombin) 活化时间、部分促凝血酶原激酶 (thromboplastin) 活化时间、心电图 (ECG) 超声心动图、颈动脉多谱超声 (carotid duplex ultrasound)、脑部 CT、脑部核磁共振成像 (MRI)、核磁共振造影 (magnetic resonance angiography, MRA)、血管造影 (CT angiography) 或心脏检测。

[0185] 目前的治疗通常需要立即 (即缺血性中风事件发生 3 小时内) 给药使用溶栓 (thrombolytic) 药物 (例如, 对苯二甲酸 (tPA))。值得注意的是, 如果中风是出血性而非缺血性, 溶栓可以使损伤变得更重。对于出血性中风而言, 需要进行手术来清除汇集于大脑的血液和修复受损血管。

[0186] 在其他情况下, 由于有血液凝块, 采用肝素 (heparin) 和香豆素抗凝血剂来治疗中风。阿司匹林也可以使用。另外可能需要其他药物来控制其他症状, 像高血压。止痛药 (Painkiller) 用来控制剧烈的头痛。长期治疗的目的是为了帮助病人恢复尽可能多的功能, 防止将来中风。恢复时间和需要长期治疗因人而异。根据症状, 康复 (rehabilitation) 可能包括但不限于专业治疗、物理治疗或言语治疗。

[0187] 肾缺血

[0188] 急性肾损伤 (Acute kidney injury, AKI) 可由肾缺血导致。例如, 在所有诸如冠状动脉旁路搭桥手术的高风险手术中 AKI 达到了 5%。用氯苯甲嗪或 S- 氯苯甲嗪预处理可以帮助防止或减少急性肾损伤带来的损害。如图所示 (图 7A 和 7B), 在来源于人类肾的 293 细胞中, 氯苯甲嗪能够转移呼吸产物到糖酵解途径。

[0189] 当前适应症

[0190] 此外, 本发明提供了 S- 氯苯甲嗪和其药学上可接受的载体, 例如盐酸 S- 氯苯甲嗪, 用于其外消旋体 (racemate) 应用的适应症。这些适应症包括那些列在默克手册上的疾病, 像恶心和与伴随运动相关疾病的呕吐 (包括慢性和急性运动病) 和终端疾病 (例如临终病人); 和眩晕 (vertigo) 或头晕造成的某些内耳问题, 例如良性 (benign) 位置性眩晕, 梅尼埃病 (Meniere's disease), 前庭神经炎 (vestibular neuronitis), 内耳迷路炎 (labyrinthine); 中耳炎 (otitis media); 创伤 (trauma) (例如, 鼓膜 (tympanic membrane) 破裂, 挫伤迷路 (labyrinthine contusion), 外淋巴瘘 (perilymphatic fistula), 颞骨 (temporal) 骨折, 脑震荡 (postconcussion)); 听神经瘤 (acoustic neuroma); 耳毒性给药, 例如耳毒性药物; 耳袋状疱疹 (Herpes zoster oticus) (拉姆齐综合征 (Ramsay Hunt syndrome)); 和其他中枢和外周神经炎症。

[0191] 眩晕通常是用来描述各种相关的感觉, 包括视线模糊 (感觉即将昏厥 (syncope)); 头晕; 感觉不平衡或不稳定; 或含糊或精神恍惚的感觉。眩晕是一种虚假的自我或环境的运动感。如 Tucci 所描述的, “头晕和眩晕”是发生在耳、鼻、咽喉和牙的神经紊乱; 治疗耳朵有问题患者的途径, 默克手册, 2009 年 1 月。

[0192] 在一些实施例中, 这些迹象表明 S- 氯苯甲嗪给药剂量和外消旋体是相同的。

[0193] 线粒体疾病或先天性线粒体代谢疾病的禁忌

[0194] 线粒体疾病是指与呼吸链功能失常相关的一些异常症状,这些异常症状在技术领域很著名;被发现有的高的 Sglul/gal(值正如本文描述的)的化合物对有线粒体疾病的患者中是有毒的,这一观点被普遍接受。因此,这些方法可以包括决定一个患者是否有线粒体疾病,而不是对患者用某种药物(例如不会给患者用氯苯甲嗪),或者是选择一种没有高的 Sglu/gal 值的药物来治疗。

[0195] 筛选代谢调节物的方法

[0196] 许多生物可以在糖酵解代谢和氧化代谢之间转换,这种灵活性已经在酵母中进行了经典的研究,研究表明当发酵的糖源在培养基中耗尽时酵母中经历了一个二阶段的转换。在某些实施方案中,这里描述的方法探究代谢的灵活性以发现安全和临床可用的药物,而此次研究用本文描述的方法是以细胞为基础的研究策略,为的是发现可以选择性的阻断细胞的生长和生存化合物,当细胞依赖于氧化磷酸化与糖酵解时。

[0197] 与前面的研究一致,这里显示的数据表明当人类的纤维状细胞以葡萄糖为唯一碳源时,细胞从线粒体中的有氧糖酵解和谷氨酰胺氧化获取能量。例如,当哺乳动物细胞被培养的时候,葡萄糖的出现抑制了氧化代谢(如克拉布特里效应),在同位素标记的 HELA 细胞实验中已经揭示了当用半乳糖来代替葡萄糖时,细胞就会利用谷氨酰胺驱动的呼吸去产生 > 98% 的细胞 ATP,见例子,DeBerardinis et al., Proc Natl Acad Sci U S A 104: 19345(2007); and Reitzer et al., JBC 254:2669(1979)。见图 1A 和 1B。永生化的人类成纤维上皮细胞通过改变他们的培养基中的糖源可以在糖酵解和氧化代谢之间转化,这种转化可以通过至少两种细胞生理指标(细胞外的酸化速率和氧气的消耗速率)观测到。当葡萄糖为唯一糖源时,细胞从线粒体中的有氧糖酵解和谷氨酰胺氧化获取能量。但是,当半乳糖为唯一碳源时,有一个几乎完全的向谷氨酰胺氧化的转换,作为证明,相比在葡萄糖中生长,糖酵解率会有 5-6 倍的下降,产生的酸会降低 3-4 倍,氧气的消耗有 2 倍的升高,见图 1C。

[0198] 附加的数据还描述了在两种营养的情况下的生物动力学,用抗霉素和寡霉素处理可以用来量化整体和解偶联的线粒体呼吸水平。使用这些试剂,在半乳糖存在的情况下,几乎所有的线粒体呼吸是偶联的,在葡萄糖存在时,只有大约 15% 的呼吸是没有偶联的。只用寡霉素处理显示,在葡萄糖存在的情况下只有 60% 的呼吸是用来 ATP 的生产,然而在半乳糖存在的情况下,80% 的呼吸是用来生产 ATP 的,见图 1D。总的来说,这些结果表明,细胞用在半乳糖培养基中氧化磷酸化生产 ATP 的有效性来弥补糖酵解生产 ATP 的减少。

[0199] 这里描述的筛选的途径可以被用来发现改变细胞能量代谢的小分子。在某些实施方案中,这些物质可以刺激氧化磷酸化的内源抑制剂;在另外一些实施方案中,这些物质减少了 PCYT2(磷酸乙醇胺胞苷酸转移酶)的活性。就像本文描述的,氯苯甲嗪抑制 PCYT2 的活性。

[0200] 因此本文描述的是在体外筛选小分子物质的方法用来确认特异性抑制 PCYT2 的活性的化合物;这些被确认的化合物作为治疗这里描述的疾病和症状的候选化合物,例如,缺血性的和退行性疾病。在一些实施方案中,一个待试化合物可以应用于表达功能性 PCYT2 的被测样本中,例如一个细胞,一个存活的组织或器官,或者含有功能性的 PCYT2 例如纯化的或重组的 PCYT2 的被测样本,待试化合物对 PCYT2 活性的影响可以被评估。以培养的或初级细胞为例来评估被测化合物对 PCYT2 的抑制能力。在某些实施方案中,这里的方法

也包括一个用已知的结合试验来筛选直接和 PCYT2、例如分离的 PCYT2 结合的化合物。

[0201] PCYT2 的基因组序列已经被描述 (Gene 21 ;325 :145-55 (2004)), 人类 PCYT2 mRNA 序列在 GenBank Acc.No.NM_002861.2 中找到, 蛋白质的全长序列可以在 GenBank Acc.No.NP_002852.1. 中找到, 可以参考 J.Biol.Chem. 272(14), 9567-9572 (1997) and Johnson et al., Biochim Biophys Acta. 1735 (3) :230-5 (2005)。

[0202] 对 PCYT2 活性的测定在技术领域已知, 包括试验用 ^{14}C - 磷酸乙醇胺作为底物的结合试验。商业上可通过 Invitrogen, Millipore, Sigma-Aldrich, R&D Systems, Cell Signaling Technology, 和 / 或 Enzo Life Sciences 买到实验诸如生化试验。见 Zhu et al., Gene 447(1) :51-59 (2009) ;Tijburg et al., Methods Enzymol 209 :258-63 (1992) ; and Fullerton et al., Mol Cell Biol ;2007 May ;27 (9) :3327-36。PCYT2 的抗体可以从 Invitrogen, Millipore, Sigma-Aldrich, R&D Systems, Cell Signaling Technology, Abcam, Abnova, Novus Biologicals, Epitomics 购买得到。

[0203] 在某些实施方案中, 小分子可以在生长在葡萄糖或半乳糖的细胞中分别筛选。虽然了解一项发明的机制不是很必要, 但是我们认为葡萄糖检测评估糖酵解支持的生长, 我们认为半乳糖检测评估基于线粒体氧化磷酸化活性的细胞生产。

[0204] 在某些实施方案中, 本发明设计通过比较葡萄糖细胞生长数据和半乳糖细胞生长数据来评估被筛选的小分子化合物的有效性。在一些实施方案中, 此种比较包括一个 glu/gal 的比值。在一些实例中, 高的 glu/gal 比值暗示了氧化代谢的选择性抑制。在一些实例中, 低的 glu/gal 暗示了糖酵解的选择性抑制。在一些实例中, glu/gal 比值可以很好地用来鉴别没有毒性的针对任一线粒体途径的抑制剂。在某些实施方案中, 本方法包括鉴别选择性地抑制氧化磷酸化的一系列不同化合物。在某些实施方案中, 本方法包括鉴别选择性地抑制糖酵解的化合物 (即在葡萄糖存在的情况下, 通过增加细胞的生长来体现,), 或者鉴别可以同时抑制氧化磷酸化和激活糖酵解的一些药物。

[0205] 在某些实施方案中, 鉴别针对细胞的能量代谢的对一系列疾病有广泛治疗效果的临床上已经应用的药物 (如 FDA 批准)。

[0206] 一种这样的小分子 (例如氯苯甲嗪), 一种 OTC 止吐药, 具有很好的血脑屏障通透能力, 可以抑制线粒体呼吸。虽然了解此发明的机理不是必须的, 但是我们认为氯苯甲嗪可以通过新的代谢机制可以抑制线粒体呼吸, 例如抑制 PCYT2。另外, 氯苯甲嗪在一些疾病包括神经退行性病变, 缺血性疾病以及糖尿病疾病的细胞和动物模型中可以抑制疾病的发病机制, 显示了这些和其余的通过本文描述的方法发现的线粒体呼吸抑制剂的临床可用性。

[0207] 在某些实施方案中, 本文描述的筛选策略可以被用来鉴别小分子化合物, 这些小分子化合物可以选择性地抑制线粒体的氧化磷酸化 (OXPHOS)。哺乳动物细胞可以依靠培养基上糖的供应, 通过糖酵解或呼吸作用 (如氧化磷酸化) 来产生 ATP。见 Rietzer et al., JBC 254 :2669 (1979) ;and Rossignol et al., Cancer Res 64 :985 (2004)。这种灵活性被开发, 并且一种小分子的有效筛选方法用来发现对细胞没有明显毒性的物质。在某些实施方案中, 这种筛选方法可以用于鉴别化合物, 这种化合物对细胞是否有毒性与细胞中生产 ATP 的途径有关 (氧化磷酸化或糖酵解), 也可以叫做依赖于代谢途径的毒性。这些发现的化合物中的一些可以诱导细胞代谢途径的转换 - 可以从需氧的糖酵解到线粒体氧化磷酸化, 也可以反过来。

[0208] 正如本文所用到的,小分子是指低于 3000 道尔顿的有机或无机分子。总体来说,这项发明所用到的小分子都是低于 3000 道尔顿的,这些小分子可以最低从 100 道尔顿到 3000 道尔顿之间(大约 100Da 到 3000Da,大约 100Da 到 2500Da,大约 100Da 到 2000Da,大约 100Da 到 1750Da,大约 100Da 到 1500Da,大约 100Da 到 1250Da,大约 100Da 到 1000Da,大约 100Da 到 750Da,大约 100Da 到 500Da,大约 200Da 到 1500Da,大约 500Da 到 1000Da,大约 300Da 到 1000Da,大约 100Da 到 250Da。)

[0209] 待测化合物可以是天然产物或组合化学库中的成员。采用一组多样分子覆盖多种功能,例如电荷、芳香性、氢键、灵活性、大小、支链的长度、疏水性和硬度等方面的多样性。适用于制备小分子化合物的合成技术为技术领域内所知,就像 Obrecht 和 Villalgorido 所举例的 Solid-Supported Combinatorial and Parallel Synthesis of Small-Molecular-Weight Compound Libraries, Pergamon-Elsevier Science Limited(1998),包括“分裂和组合”或“平行”的合成技术,固相和液相技术,编码技术(参考 Czarnik, Curr. Opin. Chem. Bio. 1:60-6(1997))。除此以外,许多小分子的文库都可以在市场上买到。许多合适的小分子检测化合物在美国专利号 6,503,713 中列出,并全面地以引用的形式合并到文中。

[0210] 用本发明进行筛选的库可以包括许多不同类型的待测化合物。一个库可以包含一系列结构相关或不相关的待测化合物。在某些实施方案中,待测化合物是肽或肽类分子,在某些实施方案中,待测化合物是核酸。

[0211] 在某些实施方案中,待测化合物和化合物库可以通过系统地改变第一个待测化合物的结构而得到,例如,第一个待测化合物结构和目标多肽的已知的天然结合配体的结构相似,或者是第一个小分子具备结合目标多肽的能力,可以使用技术领域已知的或本文描述的技术,也可以将结构和其导致的生物活性联系起来,叫做结构活性相关研究。作为技术领域熟知的一项评估技术,有许多标准的方法可以建立这种结构和活性关系研究。因此,在一些情况下,这项工作需要多大量的实验,其他内源性多肽的三维结构或其中一部分可以作为一个或一些小分子化合物合理设计的起点,例如,在某些实施方案中,用本文描述的方法,筛选一小分子库。

[0212] 在某些实施方案中,待测化合物被应用于检测样本,例如细胞或活组织,并且评估该待测化合物的一个或多个作用。例如在培养或原细胞中,评估待测化合物对调节线粒体呼吸作用的能力。

[0213] 在某些实施方案中,被测样本是或来自于这里描述的疾病的整体模型,例如一种动物模型,啮齿类动物的大鼠或小鼠都可以使用。

[0214] 评估这些效果的方法为本技术领域所知,例如,评估调节蛋白质表达的能力可以在基因或蛋白质水平上,例如使用定量 PCR 或免疫分析法。在某些实施方案中,高效率的方法,例如蛋白质或基因芯片等在技术领域已知,可以用来检测对线粒体代谢的影响。(可参考文献 Ch. 12, Genomics, in Griffiths et al., Eds. Modern Genetic Analysis, 1999, W. H. Freeman and Company; Ekins and Chu, Trends in Biotechnology, 1999, 17:217-218; MacBeath and Schreiber, Science 2000, 289(5485):1760-1763; Simpson, Proteins and Proteomics: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2002; Hardiman, Microarrays Methods and Applications: Nuts & Bolts, DNA Press, 2003)

[0215] 本文所述的已经被筛选和鉴别的调节线粒体呼吸的待测化合物可以作为候选化合物, 候选化合物已经在疾病的体内模型中进行筛选, 这些疾病与改变的线粒体呼吸和功能有关, 如果这些化合物对疾病的一个或多个症状有理想的效果, 那么这个候选化合物就可以作为候选的治疗剂。候选治疗剂如果在临床上进行的筛选, 就可以作为治疗药物。候选化合物, 候选治疗药物和治疗药物可以被选择性的利用和衍生化, 并且可以用生理学上可接受的辅料来形成药物组合物。

[0216] 在第一次筛选中选出的(调节线粒体呼吸化合物)的待测化合物可以被选择性或系统性的改变, 例如, 使用合理的设计去最大可能的利用结合的亲和力, 特异性或其他参数。这种利用也可以用这里本文描述的方法来筛选。因此, 在一些实例中, 发明包括用技术领域内已知的方法或本文描述的方法来筛选第一个库, 找出库中一个或多个“匹配”, 对这些“匹配”进行系统的结构选择来形成化合物的第二个库, 第二个库中的化合物与“匹配”结构上有关, 使用本文描述的方法再筛选第二个库。

[0217] 被称为匹配的化合物被认为是候选治疗药物, 对治疗与改变的线粒体呼吸和功能有关的疾病有效。许多技术对测定匹配的结构很有效, 这些有效的技术能够使用到本文描述的方法中, 例如NMR, 质谱, 配备电子获气检测器的气相色谱分析, 荧光和吸收光谱。因此, 本发明也包括用这里描述的方法所发现的作为匹配的化合物, 还有一些用来管理治疗, 预防, 延迟发展和疾病恶化等的方法。

[0218] 被认定为候选治疗药物的被测化合物能够进一步的通过疾病动物模型来筛选, 这些疾病与这本文描述的改变了的线粒体呼吸和功能有关。可以检测有疾病的动物的变化, 例如疾病参数的提高等, 这些参数与临床结果有关。

[0219] 呼吸代谢的调节物

[0220] 本文所描述的组合物和方法包括线粒体代谢的调节剂, 在某些实施方案中, 这些调节剂是氧化磷酸化的抑制物, 在某些实施方案中, 这些化合物是糖酵解的抑制物。在某些实施方案中, 化合物是一种氯苯甲嗪, 或它的一种对映体或一种类似物, 或其药学上可接受的盐, 例如盐酸氯苯甲嗪, 或盐酸S-氯苯甲嗪。在某些实施方案中, 化合物是用本文描述的方法发现的氧化磷酸化的另一种抑制剂, 例如表1中列出的一些药物。在某些实施方案中, 化合物是一种组胺拮抗剂, 一种二苯哌嗪, 二苯烷(烷氧基)为基础的, 或是一种三环环状结构。

[0221] 正如本文描述的, 用本发明的方法筛选一个包含3695化合物的库, 其中包括两种市场上销售的化合物集合, 这些集合包括将近一半的FDA批准的药物和其余许多的有生物活性和天然的化合物。这个库被盲法筛选旨在发现哪一结构类型或化学类型可以作为有效细胞保护剂, 即抵制线粒体氧化磷酸化。

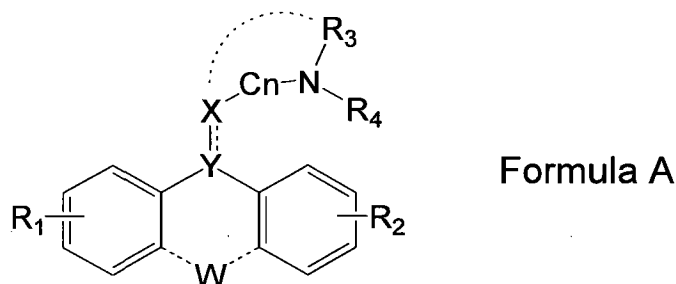
[0222] 在初步的筛选中, $S_{glu/gal}$ 值(这个比值是在葡萄糖中归一化的细胞数目对在半乳糖中归一化的细胞数目的倍数变化的log值)被用作按将细胞代谢依赖性从氧化磷酸化调整到糖酵解的能力区分化合物。在半乳糖中选择性致死或抑制生长的化合物将有一个高的 $S_{glu/gal}$ 值, 很可能包括氧化磷酸化的抑制剂。

[0223] 大约90%的化合物在用药后对在葡萄糖中生长的细胞的存活力和繁殖没有显著影响($FcGlu$ 的平均值 ≥ 0.8)。大约有124种化合物表现出高的 $S_{glu/gal}$ 值(大于等于0.8), 可能选择性抑制在半乳糖中生长的细胞的缘故。这些化合物包括25个被FDA批准的药物

(见表 1)。例如筛选的临床上使用被鉴定出可以选择性的干扰细胞在半乳糖中的生长而被认为是氧化磷酸化抑制剂的药物包括毒灰叶酚, 苜蓿素, 抗霉素 A, β 二氢化鱼藤酮, β 毒灰叶酚, 19- 羧基桃柟酮, 甲基苜蓿素, 异鱼藤酮, 鱼藤素, mundoserone, 盐酸小檗碱, 明杜隆, 壬苯聚醇-9, 阿立西定二氢氯化物, 地喹氯铵二氯化物, 氯非铵甲苯磺酸盐, 通佐溴铵, 茶茄衣酸, 硝呋齐特, 甲醚鱼藤酮酸, 鱼藤酮酸, 恩波维铵, 盐酸罂粟碱, 副品红噻啉, 盐酸乙基罂粟碱, 甲萘醌, 雷酚内酯, diffratic acid, isogedunin, 盐酸苯乙双胍, 苏木桐 A 三甲基乙醚, 喷他咪羟乙基磺酸钠, 尼洛替星, 长春西汀, 克罗米芬, 白血宁, 甲氟奎, 硫链丝菌肽, 盐酸萘替芳, 盐酸氯普硫蒽, 氯马斯汀富马酸, 丝他康唑, 氯化巴马亭, 氟苯尼考, 哌迷清, 地喹氯铵氯化物, 脱氧苏木桐 B 三甲基乙醚, 比沙可啶, 汞溴红, 甲氧槲因, 青蒿素, 二氢化鱼藤酮, 3-deshydroxysappanol trimethyl ether, 盐酸多佐胺, 鱼藤酮, 洗必太, 氯福克酚, 氯化巴马亭, 盐酸氯苯甲嗪, 钠盐氟伐他汀, 抗坏血酸。对以上列出的批准药物中的 16 种进行了更精细的研究, 这 16 种药物在先前的报道中没有提到其活性对能量代谢的影响。

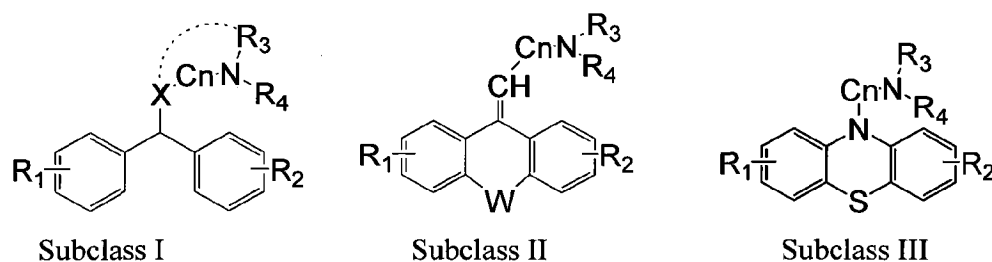
[0224] 通过对整个库的结构检查和结构活性分析表明通式 A 代表了一类结构, 这类结构的化合物与葡萄糖相比可以选择性地抑制细胞在半乳糖中生长。

[0225]



[0226] 因此, 通式 A 的这些化合物可以用作治疗用的药物用来保护细胞, 通过抑制线粒体 OXPHOS 和将细胞能量代谢向糖酵解的调整从而减少氧化损伤、抑制细胞凋亡。

[0227]



[0228] 通式 A 至少包括 3 个亚类。例如, 氯苯甲嗪结构上与通式 A 相似, 它是第一个亚类最好的代表。

[0229] 简单来说, 从通式 A 推断出的分子都包括一个亲脂的芳香基团, 一个碱性氨基基团 ($-NR_3R_4$), 连接基团 $-XCn-$, 这里的 R_3 和 R_4 是从不同的群体中筛选出来的, 包括但不限于 H, C_{1-6} 烷基, 3- 羟基乙烷羟乙烷基 (3-hydroxyethoxyethyl), 苯丙烯基 (phenylallyl), C_{1-4} 烯代苯基 (C_{1-4} -alkylenophenyl), 苯甲基, and 3- 甲基苯基, 4-terbutylbenzyl。除此以外, $-NR_3R_4$ 一起形成环胺, 例如哌啉衍生物 (例如咳平), 哌嗪衍生物 (硫乙哌丙嗪)。那个连接基团用 $-X(CH_2)_n-$ 表示, n 值是从 1 到 3 的整数, X 在亚类 III 中没有, 在亚类 I 中可以是 N 或 O, 在亚类 II 中可以是 CH。亚类 I 的亲脂基团包括两个芳香族苯环通过 $-CH-$ 连接形成二苯甲基衍生物 (Y 是个 CH), 然而在亚类 II 中, 两个苯

环通过一个链烯基 (YX 是 C = C) 和一个 S 原子 (W 是 S) 或乙烯基 (W 是 -CH₂-CH₂-) 连接形成一个三环基团, 在亚类 III 中, 亲脂基团噻嗪 (Y 是 -N-) 和 X 是没有的。

[0230] 对亚类 I 进行结构和活性的关系分析显示二苯甲基的苯环被卤族元素在对位取代, 例如氯或氧, 这样会导致更有效的化合物, 见表 26。二苯甲基基团连接到氮原子上 (X = N), 与 -NR₃R₄ 的氮原子组成的两个氮原子通过 R₃ 环化, 形成了哌嗪或者高哌嗪衍生物, 这里的 R₃ 是一种 C₂-3 烯属烃。二苯甲基哌嗪衍生物 (也叫做氯环哌嗪) 比高哌嗪类似物的抑制性更强。虽然了解发明的机制不是必要的, 但是普遍认为亲脂性胺基比亲水性胺基团更有活性, 例如羟哌嗪和西替立哌。当 R₁ 不等于 R₂ 时二苯甲基的亚甲基碳可以形成手性中心。结果, 化合物可以是外消旋混合物, 或者是有 R 或者 S 构造的对映体。

[0231] 对于亚族 II, 三环衍生物对生长在半乳糖的细胞表现出中等的抑制活性, 三环衍生物包括一个在中环 (例如去甲替林或阿米替林) 的乙烯 (W 是 -CH₂CH₂-), 当 W 是 S 原子的时候, 活性可以提高, 这样就产生了一个噻吨衍生物 (例如氯普硫蒽), 见表 27A。另外, 将芳香环取代成 C₁ 也是可以的。

[0232] 第亚类 III 主要是吩噻嗪衍生物, 在这里连接基团 C_n 可以是直链或有支链的亚烷基, 连接基团大约有 2 到 3 个碳原子 (N = 2-3), 含有乙硫取代基的硫乙哌丙哌比氟奋乃静的活力更强, 氟奋乃静与吩噻嗪核心同样的位置含有三氟甲基取代基, 见表 27B。

[0233] 其余的用本发明所描述的方法确定的其它抗组胺类药物, 至少有一些可以被亚类 I, II, III 所代表, 但是不局限于这些。在某些实施方案中, 以抗组胺类药物为基础结构的一组化合物包括在表 28 中列出的一些, 但不只局限于这些。

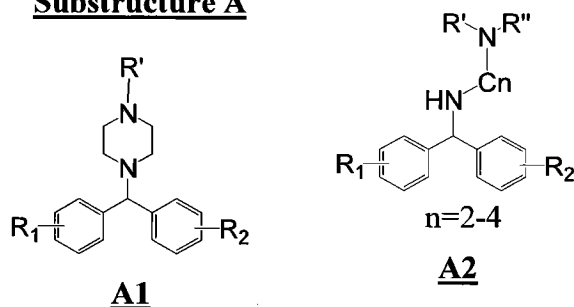
[0234] 二苯甲胺基结构物

[0235] 在某些实施方案中, 本发明考量了一种包含二苯甲胺基结构物的组合物。在某些实施方案中, 二苯甲胺基结构包括亚结构 A1 (双苯哌嗪) 或 A2 例如图 29 所示的化合物。在某些实施方案中, 基于双苯哌嗪结构的化合物包括氯苯甲哌。

[0236] 在某些实施方案中, 双苯氟哌基结构物包括一种包含但不限于罗列在图 29 的化合物。

[0237]

Substructure A



[0238] 二苯基烷基结构物

[0239] 在某些实施方案中, 本发明提供了一种包含一种基于二苯基烷基结构的化合物的组合物。在某些实施方案中, 二苯基烷基结构物包括哌咪清。在某些实施方案中, 二苯基烷基结构物包括一种包含但不限于罗列在图 30 的化合物。

[0240] 二苯基烷氧基结构物

[0241] 在某些实施方案中, 本发明考虑了一种包括二苯基烷氧基结构物的组合物。在某

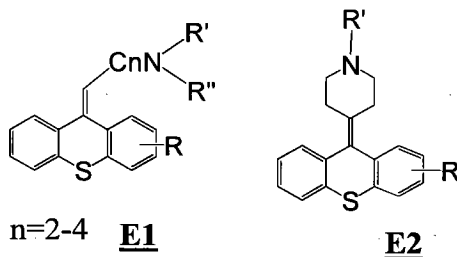
些实施方案中,二苯基烷氧基结构物包括哌嗪。在某些实施方案中,二苯基烷氧基结构物包括一种包含但不限于罗列在图 31 的化合物。

[0242] 基于三环核的结构物

[0243] 在某些实施方案中,本发明提供了一种包括基于三环核结构化合物的组合物。在某些实施方案中,基于三环核的结构化合物包括亚结构 E1 或 E2,如图 32 所示的化合物 1 或 2。

[0244]

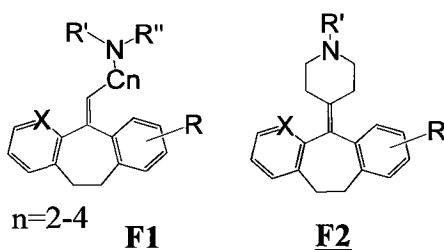
Substructure E



[0245] 在某些实施方案中,基于三环核的结构包括亚结构 F1 或 F2,如图 32 所示的化合物 3-5

[0246]

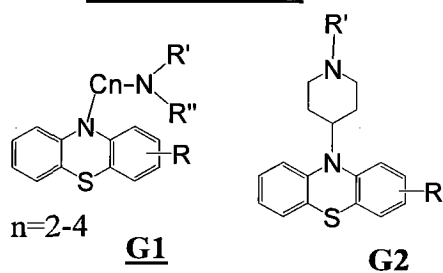
Substructure F



[0247] 在某些实施方案中,基于三环核的结构包括亚结构 G1。在某些实施方案中,基于三环核的结构包括亚结构 G2,如图 32 所示的化合物 7-10。

[0248]

Substructure G



[0249] 在某些实施方案中,基于三环核的结构物包括硫乙哌丙嗪。在某些实施方案中,基于三环核的结构物包括一种包括但不限于罗列于图 32 的化合物。

[0250] 氯苯甲嗪

[0251] 氯苯甲嗪几十年来已适用于人们的恶心和晕眩,耐受性好,伴有催眠的首要副作用。Food And Drug Administration, Federal Register 52:15866(1987); and F. P. P. Jerrold B. Leikin, Poisoning and Toxicology Handbook (Informa Health Care,

2008), pp. 1331.

[0252] 盐酸氯苯甲嗪目前以以下商品名出售:DRAMAMINE II®; DRAMAMINE LESS DROWSY®; ANTIVERT®; BONINE®; BONAMINE®; BONIKRAFT®; EMETOSTOP®; MEDIVERT®; SEA-LEGS®; AGYRAX®; and POSTAFEN® (SWEDEN).

[0253] 展示于此的数据证明即使低微摩尔浓度的氯苯甲嗪也可引起显著的能量代谢转换,而且作为神经保护剂可以抵制多聚谷氨酰胺毒性并且在细胞和动物模型的心脏病/心脏缺血性损伤、中风、肾脏缺血性损伤和糖尿病中有细胞保护作用。而且,展示于此的数据也证明了氯苯甲嗪的S-对映异构体(“S-氯苯甲嗪”)并不是用高亲和力与H₁受体结合从而并不会嗜睡和/或镇静的副作用。

[0254] 1. 氧化伤害

[0255] 人的SH-SY5Y成神经瘤细胞以前用于筛选能够抵制氧化损伤的药物,见Sarang, *Physiol. Genomics*, 11:45-52, 2002. 氧化损伤在很多神经退行性疾病中是一个病理学因素。Sarang鉴定了26种药物作为神经保护剂;其中,6种已经过详细检验,包括氯苯甲嗪。Sarang文献所提供的基因组剖析数据表明氯苯甲嗪的氧化保护效应可能是由于对神经肽甘丙肽(galanin)的向上调节。引用文献中不教授比较葡萄糖和半乳糖介质间的细胞生长以鉴定氧化磷酸化作用的无毒性抑制剂(也就是,S_{glu/gal}在0-1.00之间的化合物)作为神经保护剂。

[0256] 一种基于细胞的筛选试验用于筛选能够抵制糖尿病性神经疾病中氧化压力的药物化合物已经报道于Vincent et al., *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(2): 387-393, 2008. 1040种所筛选的化合物中的25种可减少线粒体过氧化物和随后的神经元损伤。由Vincent等人提供的一潜在的神经保护化合物清单包括盐酸氯苯甲嗪。Vincent等人没有教授比较葡萄糖相对于半乳糖介质的细胞生长以鉴定氧化磷酸化或糖酵解的无毒性抑制剂。

[0257] 2、线粒体毒性

[0258] 一种基于细胞的筛选试验用于筛选用于线粒体毒性药物已报道于Marroquin et al., *Tox. Sciences*, 97(2):539-547, (2007)。文献比较了生长于葡萄糖相对于半乳糖之间的细胞。结果显示生长于半乳糖里的细胞比生长于乳糖里的细胞对于氧化磷酸化抑制剂的毒效更敏感(较低的LD₅₀)。因此,使用葡萄糖相对于半乳糖的培养基区分线粒体功能障碍并提供了一种综合的毒性筛查。文献没有教导葡萄糖/半乳糖细胞生长比率的计算来鉴定氧化磷酸化或糖酵解的无毒性抑制剂。

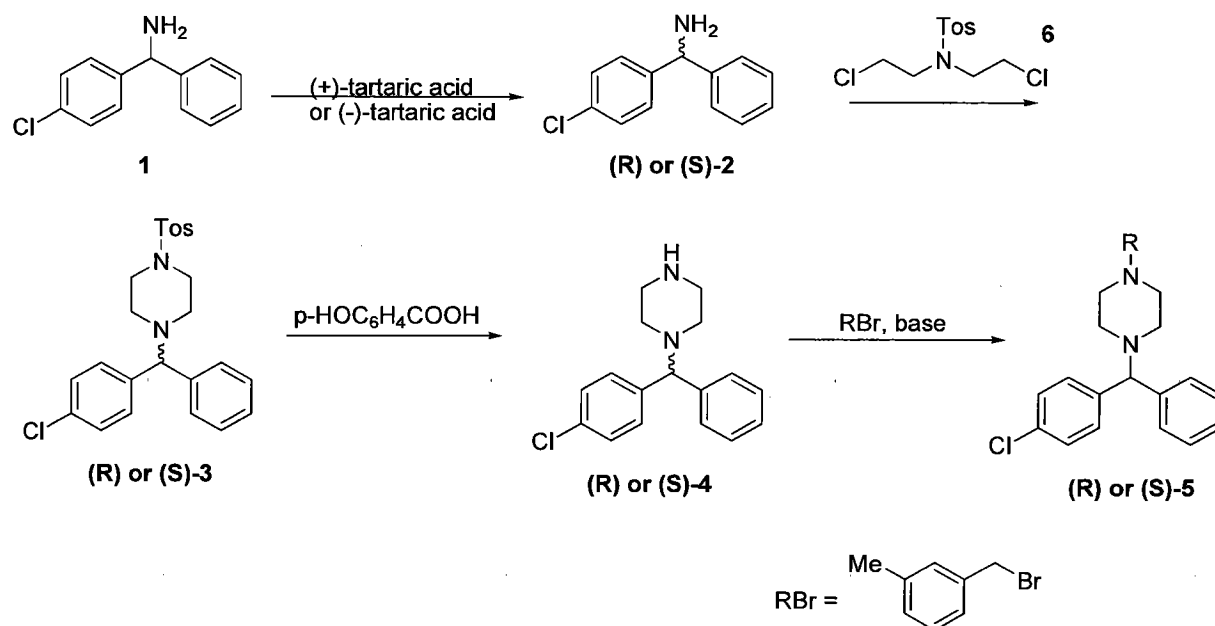
[0259] 氯苯甲嗪的对映异构物

[0260] 这里描述的方法可以包括使用光学上纯化的氯苯甲嗪例如S-氯苯甲嗪。如在此描述的,S-氯苯甲嗪保持了外消旋物中转换线粒体代谢的能力,但缺少结合H₁受体的能力,因此基本上缺少与组胺系统激活相关的副作用。因此S-氯苯甲嗪或其药学上可接受的盐,比如盐酸氯苯甲嗪可用于描述于此的方法中。

[0261] S-氯苯甲嗪可用该技术领域内已知的方法获得。以下是一个典型的合成相当纯的S-氯苯甲嗪的方案。

[0262] 方案1

[0263]



[0264] 氯苯甲嗪的 (R) 和 (S) 对映异构物如方案 1 所示合成。外消旋 4-氯二苯甲胺盐酸盐可用 D-酒石酸或 L-酒石酸处理。所得到的盐通过水重结晶以提供 > 98% 纯度的对映异构物。然后分离的对映异构物分别用 bisalkylating 试剂 6 处理以提供 3 的哌嗪环。甲苯磺酰基组在 HBr-醋酸中用对羟基苯甲酸脱保护以提供游离的胺。在回流甲醇中用 3-溴化甲苄基处理游离的胺提供光学上纯的 (R) 和 (S)-氯苯甲嗪。

[0265] 其他方法也可使用；例如可以分解氯苯甲嗪自身消旋酸盐为其对映异构体而不是分解上图中的化合物 1，例如通过一种手性酸如酒石酸进行分解。除了酒石酸，还可使用一种不同的手性酸（如乳酸或樟脑磺酸）。此外，可对手性二苯甲基乙醇（看起来与化合物 1 相似但 OH 代替了 NH₂）进行处理，把他转化成甲磺酸盐，然后与哌嗪反应而获得化合物 4。

[0266] Smilkstein (U. S. Pat. App. Pub. No. US 200810194652A1)（以引用的方式并入本文中）描述了使用惰性异构体组合物作为耐药逆转剂的方法和在预防性治疗中包括挑选所预选抗组胺剂的一种抗组胺惰性异构体的步骤，并且立体选择性利用抗组胺惰性异构体来预防和治疗疾病的方法。该报告显示大多数抗组胺剂的抗组胺和镇静活性是由相同的对映异构体造成的。包括此类药物如氯苯那敏（例如 (+) 异构体）。但是，该报告确定了 (-) 氯苯那敏异构体能提高对抗疟药物的耐药性。文献确定了氯苯甲嗪作为一种立体异构的抗组胺剂但是不能鉴别抗组胺剂的惰性对映异构体。因此，他没有给该领域内掌握通常技术的人员提示氯苯甲嗪有至少两种包含有差别的生物活性的对映异构体。其他类型的药物的报道显示抗疟药诸如三环类抗抑郁药和吩噻嗪类抗精神病药在体外的抗药性。然而，没有显示这些额外的药物类型在对映异构体活性的任何种差的数据得到探讨。因此，所公开的明确提出抗组胺药的对映异构体的特异性作用对氯苯那敏是有成效的。

[0267] 我们认为本领域内掌握通常技术的人员（比如药物化学家）不会认为单一的抗组胺剂对映异构体缺少抗组胺活性（如非氯苯甲嗪类）而提示所有的 R 和 S 对映异构体均表现不同。在化学领域里就是这样的，这种通则是不可预测的而需依靠实验数据（就是如这里所提供的）。此外，在本发明之前，还没有关于分析氯苯甲嗪的 R 或 S 对映异构体活性的报道。因此，先验性并不显而易见，即使各自对映异构体确实存在不同的活性，但是哪种是 R 或 S 和 / 或者哪种是活性的或惰性的。两种对映异构体能改变能量代谢以及抵制缺血性

或者退化性疾病并不显而易见；正如这里所提到的，两种对映异构体在代谢试验中都有活性，但只有一种（R 对映异构体）是由抗组胺活性。进一步相信一种对映异构体在寄生虫病（如疟疾）中的效力并不能提示在其它疾病包括但不限于神经退化性疾病，缺血性疾病和 2 型糖尿病中的效力。

[0268] 氯苯甲嗪由于其良好的安全性能、高血脑屏障穿透力和结构特点而作为一种优先的化合物被选择使用到一些描述于此的方法和组合物中。

[0269] 试剂盒

[0270] 在某些实施方案中，本发明考虑了试剂盒用于本研究方法的实验。该试剂盒包括了一个或多个包含用于本发明的筛选方法的候选化合物试剂的容器。试剂盒可选择性的包括含有细胞培养基质的固体基片。试剂盒可选择性包括一个或多个包含多种碳源的容器。试剂盒可选择性包括一个细胞培养。该试剂盒可选择性包括一套解释怎样鉴定候选化合物作为一种线粒体能量代谢的无毒调节器的说明书。试剂盒可选择性包括包含多个测试孔的固体基片。试剂盒可选择性被冰冻。试剂盒可选择性包括作为碳源的糖（比如葡萄糖或半乳糖）。试剂盒可选择性包括一套提供比较第一个碳源与第二个碳源的细胞生长速率测定的说明书。试剂盒也可选择性包括适当的系统（比如不透光容器）或者稳定剂（例如抗氧化剂）以防止光或其他不利条件造成的试剂降解。

[0271] 虽然指导材料典型地包括书面或印刷材料，但他们不仅限于此。本发明考虑了若干能够储存说明和传递他们给最终使用者的媒介。这些媒介包括但不限于电子存储媒介（例如磁盘，录音盘，暗盒，晶片），光学媒体（例如 CDROM），以及诸如此类。这些媒体可包括提供这些指导材料的因特网站地址。

[0272] 药物配方

[0273] 本发明进一步提供了药用组合物（例如包括小分子或上面描述的反义药物）。本发明的药用组合物可按多种途径给药，取决于是否需要局部或全身治疗和需治疗的部位。给药可以是局部的（包括眼睛和包括阴道和直肠粘膜），经肺的（例如通过吸入或吹入散剂或者气雾剂，包括通过喷雾器；气管内的，鼻内的，外表皮和皮肤给药），口服的或者注射的。注射给药包括静脉内的，动脉的，皮下的，腹膜内的或者肌肉内的注射或者输液；或者颅内的，比如鞘内或心室内的注射。

[0274] 局部摄入的药用组合物和配方可包括皮肤药贴，药膏，洗液，乳清剂，胶凝剂，滴剂，栓剂，喷雾剂，液体和散剂。常规的药用载体，流体，粉末或油基质，增稠剂和之类的东西可能使必要的或合适的。

[0275] 口服的组合物和配方包括散剂和颗粒剂，混悬剂或溶液剂或非水介质，胶囊，香袋或药片。增稠剂，芳香剂，稀释剂，乳化剂，分散助剂或粘结剂可能是需要的。

[0276] 鞘内或心室内注射用的组合物和配方可包括灭菌的水溶液也包含缓冲剂，稀释剂和其它合适的添加剂比如但不局限于，渗透促进剂、载体化合物、和其它药用可接受载体或赋形剂。

[0277] 本发明的药用组合物包括但不局限于，溶液剂，乳剂，和脂质体包含剂型。这些组合物可用各种各样的组分制成包括但不限于，预制液体，自乳化固体和自乳化半固体。

[0278] 以方便呈现的单位剂型的本发明的药用组合物，可根据制药业内众所周知的常规技术制备。这中技术包括将活性成分和药用载体或赋形剂相结合的步骤。一般来说，将活

性成分和液体载体或磨碎的固体载体或两者均匀地、紧密地结合以制备药用组合物配方，然后如果必要的话将产品塑型。

[0279] 本发明的组合物可以制成任何一种可能的剂型比如但不局限于药片、胶囊、液体糖浆、软凝胶、栓剂和灌肠剂。本发明的组合物也可制成在含水，无水的或混合媒介中的悬浮液。水性悬液可进一步含有增加悬浮液粘性的物质包括，比如羧甲基纤维素钠，山梨醇和 / 或葡聚糖。悬浮液也可包含稳定剂。

[0280] 在本发明的某些实施方案中，药用组合物可制成泡沫剂来使用。药用泡沫剂包括剂型比如但不限于，乳剂，微乳剂，乳清剂，凝胶剂和微脂囊。虽然本质上是基本一样的但这些剂型在成分和终产品的一致性是有差异的。

[0281] 提高细胞水平摄入的药剂也可根据情况添加到这里描述的一些药用的和其他组合物中。例如，阳离子脂质。比如脂质体 (U. S. Pat. No. 5, 705, 188)，阳离子甘油衍生物，和聚阳离子分子，比如聚赖氨酸 (WO 97/30731)，提高细胞摄取。

[0282] 本发明的组合物此外还可包含其他在药用组合物中常见的药用辅料。因此，举例来说，组合物可包含额外的，兼容的，药用活性材料比如，止痒剂，收敛剂，局部麻醉剂，抗炎剂，或者可包含本发明组合物在制定的各种各样的剂型中有用的辅料，比如食品色素，芳香剂，防腐剂，抗氧化剂，乳白剂，增稠剂和稳定剂。但是，这样的辅料当添加进去时不能过度影响本发明组合物成分的生物活性。配方可以灭菌消毒并且若需要的话可与药用辅料混合，例如，润滑剂，防腐剂，稳定剂，湿润剂，乳化剂，影响渗透压的盐分，缓冲剂，着色剂，调味剂和 / 或芳香物以及诸如此类对配方的活性剂没有有害影响的。举个例子来说，这里描述的方法和组合物可包括一种乙酰化或未乙酰化水杨酸盐，例如，乙酰水杨酸或双水杨酸酯。例如，在摄入一日量氯苯甲噁的实施方案中，日剂量为 81mg 的乙酰水杨酸也可以摄入。因此组合物可以制成一剂氯苯甲噁，例如，在单一剂型中含有 S- 氯苯甲噁加上辅料如乙酰水杨酸。例如口服剂型如药丸或药片。

[0283] 剂量可取决于需治疗疾病状态的严重性和反应性，伴随持续几天到几个月的疗程，或者直到治疗生效或者达到疾病状态的缓解。最佳的给药方案可根据患者体内药物累积的测定值计算。医生可确定最佳剂量，用量方法和重复率。最佳的剂量可能根据个体聚核苷酸的相对效力而变化，而且通常可以基于 EC_{50} s 找到对体内和体外动物模型有效或者基于这里描述的例子估算出。在某些实施方案中，剂量可以每天从约 250 到 1000mg，也可给予每天、每周、每月或每年一次或多次。执行医生可基于测量体液或组织中药物的滞留时间和浓度而估算剂量的重复率；在某些实施方案中，剂量要足够以使在患者血浆中的浓度达到 100nM–1 μ M。让患者经受维持疗法以避免疾病状态的复发也是适合的，其中氯苯甲噁以维持剂量摄入，范围从每公斤体重 0.01 μ g 到 100 μ g，每天一次或多次到每 20 年一次。

实施例

[0284] 下面的实施例是对本发明的进一步说明，但这并不限制本发明权利要求中所述的权利要求范围。

[0285] 实施例 1 细胞生长实验

[0286] 本实施例描述了利用能够筛选出氧化磷酸化 (OXPHOS) 通路抑制剂的生长实验方法。该实验包括在葡萄糖（这使得细胞能够利用糖酵解）或半乳糖（半乳糖将细胞能量生

产从糖酵解转变成 OXPHOS 通路) 中生长的细胞中的细胞生长的监测和测试。为了确定选择性 OXPHOS 通路调节剂, 对一个小分子库内化合物进行了筛选, 筛选出能够选择性地影响半乳糖中的细胞数量, 但不影响葡萄糖中细胞数量的化合物和 / 或试剂。在一些实施例中, 使用半乳糖和葡萄糖中不同的生长 / 细胞生存作为一种筛选方法来确定能够抑制 OXPHOS 通路的小分子。为了证明这一原则, 本发明的发明人至少成功地筛选了 3695 种临床使用的药物和生物活性物质, 并确定了其中一些作为 OXPHOS 抑制剂, 对这些物质来说, 这是它们迄今未知的用途。

[0287] 在这些实验中, 永生化的包含 pLK0.1 载体的 MCH58 人二倍体成纤维细胞在 37°C 和 5% CO₂ 的环境下的含有 10% 胎牛血清 (FBS) (Sigma 公司, 目录号 :F6178), 1X 青霉素, 链霉素和谷氨酰胺 (Invitrogen 公司目录号 :10378-016), 2u1/ml 嘌呤霉素和 50ug/ml 尿苷的 DMEM 高糖培养基 (Invitrogen 公司, 目录号 :11995) 中培养。根据需要在高糖培养基中加入 10mM 的葡萄糖或 10mM 的半乳糖。所有培养基均含有 1mM 的丙酮酸盐和 4mM 的谷氨酸。表达为野生型 (STHdh^{Q7/7}) 或突变型 (STHdh^{Q111/111}) 的小鼠的纹状体细胞在 37°C 和 5% CO₂ 的环境下的含有 10% FBS (Sigma 公司, 目录号 :12306C) 和 1× 青霉素, 链霉素, 谷氨酰胺和 200ug G418 的 DMEM 高糖培养基中培养 (1)。MCH58 成纤维细胞, HeLa 细胞和 293 细胞在 37°C 和 5% CO₂ 环境下的含有 10% FBS (Sigma 公司, 目录号 :F6178) DMEM 高糖培养基中培养。

[0288] 细胞的耗氧量和细胞外酸化实验按如下操作进行。简而言之, 将 MCH58 成纤维细胞以 30000 细胞 / 孔的密度接种在 XF24 孔细胞微孔板 (Seahorse 生命科学) 中的 10mM 葡萄糖或 10mM 的半乳糖培养基中, 并在 37°C / 5% CO₂ 环境下孵育 ~ 20 小时。测定之前, 生长培养基中加入 ~ 925uL 的监测培养基。检测培养基由 DMEM 碱性培养基 (Sigma 公司, 目录号 :D5030), 2mM GlutaMax-1 (Gibco, 目录号 :350350-061), 1mM 丙酮酸钠 (Sigma 公司, 目录号 :S8636), 10mM 葡萄糖 (Sigma 公司, 目录号 :G8270) 或半乳糖 (Sigma 公司, 目录号 :G5388), (1.85g/L) 氯化钠和 (15mg/L) 苯酚磺酞。用 1N 的氢氧化钠溶液将检测培养基的 pH 值调节为 7.4。测定前, 将细胞在检测培养基中在 37°C 下培养 60min。

[0289] 通过将 HeLa 以 40,000 / 孔和 STHdh^{Q7/7} 以 6000 / 孔的密度将 HeLa, 293, 和 STHdh^{Q7/7} 小鼠纹状体细胞接种在 XF24 板中, 在它们的常规条件下培养进行 OCR 和 ECAR 的测定。除了使用 25mM 的葡萄糖作为糖外, 检测培养基与上面所述相同。MCH 成纤维细胞在混合 2 分钟和等待 2 分钟后每隔 7 分钟同时进行测量, 而 HeLa, 293, 和 STHdh^{Q7/7} 小鼠纹状体细胞每隔 6 分钟 (混合 2 分钟和等待 2 分钟)。在加入寡霉素 (Biochemika, 75352), 抗霉素 (Sigma 公司, A8674), 鱼藤酮 (Sigma 公司, R8875), 羰基氰化 3-氯苯 (Sigma 公司, C2759) 和 meclizine 盐酸盐 (MSDiscovery, 01500376) 记录三个基线测量数据。在 DMSO 中配制 50mM 的 meclizine 原液, 然后在检测培养基中将其稀释至指定的浓度并用氢氧化钠溶液调整其 pH 值至 7.4。小鼠纹状体细胞在 33°C 进行测量, 而所有其他的细胞种类则在 37°C 进行测量。

[0290] 细胞数定量高通量实验按如下条件进行。采用机器人多点结合分配器 (ThermoFisher 科学公司) 将分散在 DMEM 高葡萄糖培养基中的 MCH58 成纤维细胞以 5000 / 孔的密度和每孔 100uL 的量, 接种到 96 孔板 (PerkinElmer, 6005182) 中。结果证明, 变异系数 < 10% (数据未给出)。24 小时后, 用 PBS 将细胞清洗两次并用含有 10mM 葡萄糖或 10mM 半乳糖的培养基置换培养基。

[0291] 采用 CyBi-Well 机器人 (CyBio), 将每一种化合物约 100uL 通过针转移, 以一式两份的形式转移到带有钢针阵列的板上。此前已对 3695 药物的化合物集合进行了描述 (Wagner 等人, Nat Biotechnol 26:343(2008)) 并包含了两个市售库 (Spectrum and Prestwick)。将化合物处理后的板在 37°C 下孵育 72 小时。然后用 PBS 清洗细胞, 用 10uM 的 Hoechst 33342 (Invitrogen 公司) 染色并在 3.7% 的甲醛溶液中固定 15 分钟。然后对板孔清洗一次并保存在 PBS 中。将细胞培养板保存在 4°C 下直至成像, 此时是固定后接近 24 小时。

[0292] 采用 Arrayscan VTI 自动显微镜, 用自动化板堆垛器 (ThermoFisher 科学) 进行成像。使用适当的过滤器套件进行 Hoescht 荧光信号检测。每张图像在 1.3mm x 1.3mm 的视野中获得 4 个放大 5 倍的非重叠图像。用 ArrayScan 软件对板堆垛器和包含一个自动对焦算法的显微镜进行完全控制。捕获图像并同时储存在至少两个不同的地方。采用免费提供的开放源代码软件包 CellProfiler 进行图像分析。Carpenter 等, Genome Biol 7:R100(2006)。通过 Hoescht 染色信号先确定细胞核的方式进行图像分析。

[0293] 记录每个视野中的细胞核数量, 并将每个孔的 4 个图像加起来作为每孔的细胞计数。采用 UNIX 计算机集群进行计算。通过对每个批次开始时和运行过程中的间歇进行视觉监控确保每个细胞核有适当的遮蔽。

[0294] 作为对照, 在生长于富葡萄糖培养基 (即, 葡萄糖是唯一的糖源) 和富半乳糖的培养基 (即, 此处半乳糖是唯一的糖源) 的 MCH58 成纤维细胞中对电子传递链的典型抑制剂 (例如, 复合物 I 抑制剂鱼藤酮, 复合物 III 抑制剂抗霉素, 复合物 V 抑制剂寡霉素, 解偶联羧基氰化物 M-chlorophen yehyhydra (CCCP)) 进行了测试。正如所料, 这些典型的代谢抑制剂在所有测试浓度下都是有毒的, 但对生长在富半乳糖的培养基中更毒性更强。

[0295] 例如, 与富葡萄糖培养基相比, 富半乳糖中鱼藤酮, 抗霉素, 寡的 LD50 至少低 4 个数量级。值得注意的是, 与富半乳糖培养基相比, 富葡萄糖培养基中 CCCP LD50 之间的差异更微妙, 最有可能的是因为线粒体膜电位对细胞的生存是很重要的。此前, 已经有人利用富葡萄糖培养基和富半乳糖培养基之间的分化生长来诊断人类 mitochondrial 障碍以及线粒体毒性。Robinson 等人, Biochem Med Metab Biol. 48:122(1992); 和 Marroquin 等人, Toxicol Sci 97:539(2007)。在一项筛选前的开发研究中, 通过比较各种已报道的 OXPHOS 中毒情况证实了成纤维细胞对“代谢状态依赖性杀伤力”的敏感性。见图 1E-1H。因为生长和存活是在一个为期三天的时间段内进行测量的, 所公开的检测非常敏感, 能够识别具有潜在微妙的或新颖的作用机制的化合物。

[0296] 此处所描述小分子筛选方法, 即基于代谢状态依赖性死亡的方法, 可以通过定量具有高稳定性的细胞数量的基于高通量方法的显微镜, 如通过成像细胞核计数测量接种细胞的数量之间的相关性, 进行缩放。见图 2A。在葡萄糖和半乳糖中用这一高通量的检测方法测定了经 DMSO 处理后的细胞的典型细胞生长情况。见图 2B。

[0297] 接下来, 通过筛选包含了 3695 种化合物的化学库, 生成数据来评估生长在富葡萄糖培养基或富半乳糖培养基中的一式两份的人类成纤维细胞的“代谢状态依赖性敏感性”。见图 2C。在一些实施例中, 化学库包括两个市售复合物集合, 其中包括了约一半 FDA 批准的药物和其他生物活性和天然产物。在第 0 天接种成纤维细胞并在标准培养基中培养 24 小时。在第 1 天, 将培养基更换为含有葡萄糖 (如复制样品 1) 或半乳糖 (如复制样品 2) 的

培养基作为唯一的糖源,然后以约为 10uM 的浓度加入需要筛选的化合物。在用需筛选的化合物培养 72 小时后,对板孔进行成像,相对 DMSO 对照孔测定并标准化细胞计数。

[0298] 用 calcein acetoxymethyl (AM) 酯检测 (Invitrogen, C34852) 对细胞活力进行检测。将分散在 DMEM 高葡萄糖培养基中的 MCH58 细胞以 5000 细胞 / 孔的密度接种到 96 孔板中。20 小时后,用 PBS 清洗细胞,并替换为用含有不同浓度药物或 DMSO (0.1%) 的 10mM 的葡萄糖或 10mM 的半乳糖。然后细胞培养 72 小时,之后用 PBS 清洗并加入 5uM 的 calcein AM。在 37°C 培养 30 分钟后,在 DTX880 模探测器 (Beckman Coulter 公司) 中分别在激发和发射波长 (EX/EM) 485nm 和 530nm 处的测量荧光强度。采用 CellTiter-Glo 发光生存活力实验 (Promega, G7571) 测量总的细胞 ATP 水平。MCH58 以 5000 细胞 / 孔的密度和小鼠纹状体细胞以 20,000 细胞 / 孔的密度接种到 96 孔板中生长。24 小时后加入 Meclizine, 72 小时后测量 MCH58 细胞的 ATP 水平,而按照制造商的说明,24 小时后测量纹状体细胞的 ATP 水平。

[0299] 除非另有说明,在 ATP 测量前,突变异种 (STHdh^{Q111/111}) 纹状体细胞在无血清培养基中生长 24 小时。在 DTX880 多模式模探测器中测量发光。测试了不同浓度 (介于 100uM 和 0.5uM 之间) 的鱼藤酮,抗霉素,寡霉素,meclizine,羟嗪 (Spectrum chemical),硫乙哌丙嗪 (Prestwick),赛庚啶 (Sigma 公司),甲氧苄二胺 (Spectrum chemical),tripelcnnamine (Spectrum chemical),苯海拉明 (Spectrum chemical),氯马斯汀 (Prestwick),bromopheniramine (Spectrum chemical),pheniramine (Spectrum chemical),异丙嗪 (MSDiscovery 01500510),阿托品 (Sigma 公司),和东莨菪碱 (Sigma 公司) 对无血清的培养基中 STHdh^{Q111/111} 细胞起保护作用。给出了赋予最大程度保护的剂量。在 DTX880 多模式检测器中测量发光强度。通过用 16 个 DMSO 处理的孔内修饰后的平均细胞计数 (去除最大和最小值之后的平均值) 除以每个孔内的细胞计数对每个 96 孔板的标准化细胞计数进行单独计算。丢弃所有孔内细胞计数非常低的单个 96 孔板。去除不能重复的样品,其要求是重复样品之间标准化细胞计数比小于 1.5,按这一要求就排除了 49 个孔。对剩余的重复测量进行平均,并倍数变化计算为葡萄糖和半乳糖筛选的平均标准化计数。为了评价统计学意义,计算了每个孔相对于 DMSO (空白) 分布的 Z 得分和整个复制样品的平均 Z 得分。认为平均 Z 得分大于 2.5 的孔具有显著的统计学意义。

[0300] 通过联合分析葡萄糖和半乳糖的结果,可以计算代表富葡萄糖培养基中细胞生长 $\log_{10}$ (变化倍数) 除以富半乳糖培养基中 $\log_{10}$ (变化倍数) 的葡萄糖 - 半乳糖细胞生长比率 ($S_{glu/gal}$)。因此,每个筛选药物可以用其对细胞数量的选择性影响来描述,通过将富葡萄糖培养基中的生长与富半乳糖培养基比较生长。正如所料,在富葡萄糖培养基和富半乳糖培养基中的 DMSO 生长数据相等,因此 $S_{glu/gal}$ 得分以 0 (即 ~ 0.0) 为中心。此外,大部分的筛选的化合物对细胞数量没有影响,相对 DMSO 而言,有些化合物会造成细胞死亡,且没有哪种化合物会增加细胞数量 (数据未在这里显示)。选择性致死或在富半乳糖培养基中抑制生长的药物应该有相对较高的 $S_{glu/gla}$ 得分 (例如,介于约 0.1-0.9 之间不等),并可能包括 OXPHOS 抑制化合物。低 $S_{glu/gla}$ 得分 (例如,介于约 (-)0.1-(-)0.7) 可能是由于抑制糖酵解或抑制增殖引起的,因为生长在富葡萄糖培养基中的细胞分裂更加迅速。见图 2B。在一些实施例中,高 $S_{glu/gla}$ (即在富半乳糖培养基中选择性地杀死细胞) 的化合物可能是氧化代谢抑制剂。低 $S_{glu/gla}$ 化合物是那些抑制富葡萄糖条件下迅速增殖的化合物;这些化合

物用作抗癌药物可能是有用的;它们可能是迅速分裂细胞的强有力杀手。

[0301] 根据 $S_{\text{glu/gal}}$ 对筛选的化合物进行排名。尽管没有必要去理解一项发明的机理,但我们认为,具有高 $S_{\text{glu/gal}}$ 的化合物可能会通过包括但不限于以下的方式抑制 OXPHOS:在特定的复合物上阻止电子传输,解偶联呼吸,并可能改变 OXPHOS 亚基的基因表达。正如所预期的, $S_{\text{glu/gal}}$ 的分布是以 0 为中心的,其中大部分化合物不论是在富葡萄糖培养基还是在富半乳糖培养基中均表现出具有相近的标准化生长和生存活力。见图 2D。尽管如此,数据显示,在 $S_{\text{glu/gal}}$ 分布的上尾部富集了已知的呼吸链毒药(例如,OXPHOS 抑制剂)。见表 1。例如,抑制前 25 名的化合物包括了 20 种此前报道的会通过直接从 ATP 合成中中断或解偶联电子转移而扰乱呼吸。

[0302] 表 1:25 种 $S_{\text{glu/gal}}$ ($\log_{10}$ (变化倍数)) 得分最高的化合物

排名	化合物	$S_{\text{glu/gal}}$	抑制机理
1	α -毒灰叶酚	0.91	复合物 I 抑制剂
2	苄索氯铵	0.90	包括 ψ 的损失
3	抗霉素 A	0.87	复合物 III 抑制剂
4	β -二氢化鱼藤酮	0.85	复合物 I 抑制剂
5	β -毒灰叶酚	0.82	复合物 I 抑制剂
6	桃柁酮—19—羧酸	0.80	解偶联剂
7	甲苄索氯铵	0.80	包括 ψ 的损失
8	异鱼藤酮	0.71	复合物 I 抑制剂
9	抗霉素 A	0.70	复合物 III 抑制剂
10	鱼藤素(-)	0.69	复合物 I 抑制剂
11	Mundoserone	0.57	复合物 I 抑制剂
12	苄索氯铵	0.54	包括 ψ 的损失
13	盐酸小檗碱	0.53	复合物 I 抑制剂
14	明杜隆	0.50	复合物 I 抑制剂
15	甲苄索氯铵	0.46	包括 ψ 的损失
16	壬苯醇醚-9	0.46	未知
17	己联双辛胍二盐酸盐	0.44	包括 ψ 的损失
18	甲苄索氯铵	0.42	复合物 I 抑制剂
19	对甲苯磺酸氯非铵	0.42	未知
20	盐酸小檗碱	0.41	复合物 I 抑制剂
21	溴苄嘧啶胺	0.38	未知
22	茶茄衣酸	0.35	未知
23	硝呋齐特	0.34	未知
24	Rotenonic 酸甲基乙醚	0.34	复合物 I 抑制剂
25	Rotenonic 酸	0.33	复合物 I 抑制剂

[0304]

[0305] 此外, $S_{\text{glu/gal}}$ 分布的下尾部富集了已知的抗肿瘤化合物(例如,已知的能杀死迅速分裂细胞的药物)。见图 2D。

[0306] 例如,50 种 $S_{\text{glu/gal}}$ 得分最低的化合物中有 26 种对应于已知的对富葡萄糖培养基中快速增殖的细胞具有选择性毒性化疗药物。见表 2。

[0307] 表 2:排名末尾 50 种 $S_{\text{glu/gal}}$ ($\log_{10}$ (变化倍数)) 得分最低的化合物

[0308]

排名	化合物	S _{glu/gal}	药物分类
1	米托蒽醌盐酸	-0.73	抗肿瘤药
2	番茄素	-0.64	杀菌剂
3	胡溴铵	-0.54	杀锥虫
4	穿心莲内酯	-0.46	抗肿瘤药
5	pristimerol	-0.45	抗肿瘤药
6	甲氨蝶呤; 甲氨蝶呤	-0.39	抗肿瘤药
7	抗革兰氏阳性球菌素	-0.37	抗肿瘤药
8	吡啶琐辛	-0.36	抗真菌
9	crassin acetate	-0.35	抗肿瘤药
10	藤黄酸	-0.34	抗肿瘤药
11	银胶菊内酯	-0.34	抗肿瘤药
12	斑蝥素	-0.33	抗疣
13	aklavine hydrochloride	-0.33	抗肿瘤药
14	dihydrogambogic acid	-0.32	抗肿瘤药
15	尼日利亚菌素钠	-0.31	抗菌
16	dihydrocelastrol	-0.31	抗肿瘤药
17	anthothecol	-0.30	抗疟药
18	盐酸奎纳克林	-0.30	抗风湿抗原虫
19	吡咯霉素	-0.30	抗肿瘤药
20	南蛇藤醇	-0.29	抗肿瘤药
21	15-norcaryophyllen-3-one	-0.29	
22	acriflavinium hydrochloride	-0.29	抗菌
23	氨基吡啶	-0.29	抗感染
24	苯基醋酸	-0.29	抗真菌
25	氟尿苷	-0.28	抗肿瘤药

[0309]

26	足叶草毒素	-0.27	抗肿瘤药
27	普达非洛	-0.27	抗肿瘤药
28	硫酸长春碱	-0.27	抗肿瘤药
29	甲氨蝶呤	-0.27	抗肿瘤药
30	氮甲喋呤	-0.26	抗肿瘤药
31	扑草胺	-0.26	除草剂
32	三氟尿苷	-0.26	抗病原体
33	二甲基亚砜 (DMSO)	-0.26	
34	喜树碱	-0.26	抗肿瘤药
35	秋水仙碱	-0.26	抗肿瘤药
36	吡啶硫酮锌	-0.25	抗菌剂
37	乙酰基鬼臼苦素	-0.24	抗肿瘤药
38	帕苯达唑	-0.24	驱虫剂
39	茴香霉素	-0.24	抗生素
40	氯噻星	-0.23	抗菌剂
41	堆心菊脑	-0.22	抗病原体
42	紫杉酚	-0.22	抗肿瘤药
43	7-desacetoxy-6,7-dehydrogedunin	-0.22	
44	文殊兰胺	-0.22	HIF-1 α 抑制剂
45	洋椿苦素	-0.22	抗菌
46	依米丁	-0.22	蛋白质合成抑制剂
47	工汞硫代水杨酸钠	-0.22	杀菌剂
48	黄夹次甙乙	-0.21	抗肿瘤药
49	gitoxigenin diacetate	-0.21	抗肿瘤药
50	萨门配质	-0.21	抗肿瘤药

[0310] 在 83 种 $S_{glu/gal}$ 得分最高的化合物中 (83 ; 分布的前 2%), 确定有 25 种试剂获得了临床应用 FDA 批准。参见表 3。观察到这些化合物显示比在验证研究中所使用的 5 种经典 OXPHOS 抑制剂更低的 $S_{glu/gal}$ (supra)。

[0311] 表 3 临床使用的 25 种高 $S_{glu/gal}$ ($\log_{10}$ (差异系数)) 得分化合物

[0312]

排名	化合物	$S_{glu/gal}$	临床应用	对 OXPHOS 的影响
16	壬苯醇醚-9	0.46	外用杀精	未知
23	硝呋齐特	0.34	抗生素	未知
27	盐酸罂粟碱	0.30	血管舒张药	复合物 I 抑制剂
34	盐酸苯乙双胍	0.27	降血糖药	复合物 I 抑制剂
36	喷他咪羟乙基磺酸钠	0.24	杀锥虫	未知
38	长春西汀	0.23	血管舒张药	未知
40	克罗米酚柠檬酸盐	0.21	选择性雌激素受体修饰剂	调节 ψ
42	甲氟奎	0.20	抗疟疾	未知

[0313]

45	盐酸蔡替芬	0.19	外用抗真菌	未知
47	富马酸氯苯苄咯	0.19	抗组胺	未知
48	硝酸舍他康唑	0.19	外用抗真菌	未知
52	哌迷清	0.18	精神抑制药	复合物 V 抑制剂
55	比沙可啶	0.18	轻泻药	未知
58	青蒿素	0.17	抗疟疾	包括 ψ 的损失
61	多佐胺盐酸盐	0.17	碳酸酐酶抑制剂	未知
63	双氯苯双胍己烷	0.16	局部防腐药	未知
66	盐酸美其敏	0.16	止吐药	未知
67	氟伐他汀钠盐	0.16	HMO 辅酶 A -还原酶抑制剂	包括 ψ 的损失
68	抗坏血酸	0.15	维生素	未知
69	氯硝柳胺	0.15	Anti-nematodal	解偶联剂
70	盐酸舍曲林	0.15	选择性血清素再摄取抑制剂	未知
71	马来酸乙硫拉嗪	0.15	止吐药	未知
72	卡维地洛	0.15	非选择性肾上腺素受体阻滞剂	复合物 I 抑制剂
75	Ethinodiol diacetate	0.15	避孕药	未知
83	盐酸环苯扎林	0.13	肌肉松弛剂	未知

[0314] 此前已经报道,这 25 种化合物中有九种(即,罂粟碱,降糖灵,青蒿素,喷他咪,克罗米酚,匹莫齐特,氯硝柳胺,氟伐他汀和 carvedilol)抑制了或偶合了线粒体呼吸。有趣的是,这个清单中包括了两个抗疟疾药物(如青蒿素或甲氟喹),符合青蒿素活性需要寄生虫内的呼吸的报道。Golenser 等人., Int J Parasitol 36:1427(2006)。其余 16 种临床使用的药物涵盖了一系列的临床适应症和各种作用机制。这些药物可能有助于治疗与能量代谢调制相关的疾病。

[0315] 实施例 2:美克洛嗪 (Meclizine) 活性的评价

[0316] 为了研究表 3 所列出的筛选出的候选药物对神经退行性疾病的潜在治疗效果,要求该试剂具有良好的治疗指数和跨过血脑屏障的能力。选择 Meclizine(排名第 66)作为一种代表性试验药物。Meclizine 在人体表现出较好的毒性表现并用作止吐药和抗眩晕剂。此外,meclizine 是 OTC 药品,被认为具有良好的中枢神经系统渗透性。美国食品和药物管理局, Federal Register 52:15866(1987);且在 Canada Gazette Vol.134(2000)中有描述。

[0317] 验证 meclizine 作为一种潜在治疗药物的第一步是通过使用两种不同的分析评估细胞生长和细胞活力来确认初筛结果。在初步筛选中,发现 meclizine 能在为期三天的时间内呈剂量依赖性的方式延缓成纤维细胞的生长。比如,观察到生长在富半乳糖中的 MCH58 成纤维细胞比生长在富葡萄糖培养基中的 MCH58 成纤维细胞对 meclizine 治疗更敏感(即,表现出细胞生存活力下降)。例如,确认 LD50 值至少有 2 倍的差异,但这仍然低于所观察到的经典 OXPHOS 抑制剂的 LD50 值。此外,相对于生长在葡萄糖富集的培养基中,生长在富半乳糖培养基中的细胞的 ATP 水平也对 meclizine 更为敏感。见图 3A,3B 和 3J。

[0318] 全细胞生物能量动力学分析证实,Meclizine 会改变细胞对 OXPHOS 和糖酵解的相

对依赖性,例如, meclizine 减少了氧气消耗率。见图 3C 和 6A。这在从大鼠的心脏分离的原代心肌细胞(图 3K)和从小鼠胚胎分离的原代皮层神经元(图 3L)中得到证实。将心肌细胞暴露在所示浓度的 meclizine 中保持 20 分钟,然后在呼吸室中进行氧气测量。耗氧率(OCR)测量是给从 E14-15 天胚胎获得的小鼠原代皮质神经元在 0 时刻加入 meclizine (5 和 10 μ M) 或抗霉素 (1 μ M) 后进行的。

[0319] 此外, meclizine 以剂量依赖性的方式增加了乳酸产生,需要几个小时才能出现。参见图 3D 和图 6B。用 meclizine 处理的细胞随着时间的推迟会在它们的培养基累积乳酸,与对糖酵解的依赖性的增加相符。

[0320] 在其他细胞类型包括人表皮成纤维细胞,小鼠纹状体细胞,人胚肾细胞,HeLa 细胞中也观察到了这些由 meclizine 诱导产生的耗氧量的减小和细胞外酸化率的随之增加。见图 7A,图 7B 和图 8A-F。Meclizine 被列为一种组胺受体拮抗剂(H_1)和弱胆碱受体拮抗剂。Brunton 和 Parker, Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 麦格劳-希尔公司,第 11 版,第 1889 页 (2006)。然而,所筛选的其他 64 种注明的 H_1 受体拮抗剂和 33 种注明的抗毒蕈碱拮抗剂并没有表现出升高的 $S_{glu/gla}$ 分值(胆碱能阻滞药:Mann-Whitney rank 总和 $P = 0.26$; Anti- H_1 s:Mann-Whitney rank 总和 $P = 0.77$)。这些结果表明,meclizine 可能通过一种不同于胆碱或组胺受体阻断的机制影响细胞能量代谢。

[0321] 相对于标准的 OXPHOS 抑制剂,meclizine 的氧气消耗抑制发生在较慢的时间尺度范围内。见图 9。事实上,向分离的线粒体加入 meclizine 对线粒体的氧消耗没有影响。见图 3E-3G。这些观察结果表明,meclizine 可能有一种新的作用机制。

[0322] 进行了其他的实验以确定是否存在分离的线粒体制备中存在 meclizine 的氧化磷酸化抑制作用。例如,在线粒体呼吸状态转换的过程中按如下操作进行了线粒体膜电位和氧化还原电位的测定。

[0323] 用差速离心法从 C57BL/6 小鼠肾脏分离得到线粒体并悬浮分散到实验缓冲液中,终浓度为 0.15mg/ml。Mootha 等,Am J Physiol 272:H769(1997)。通过加入 2.5mM 的谷氨酸钠和 2.5mM 的苹果酸启动状态 2 呼吸。通过加入 50nM 的 ADP 启动状态 3 呼吸。通过加入 5 μ M 的 CCCP (Sigma 公司,目录号:C2759) 启动解偶联呼吸。

[0324] 用由 Ocean Optics 生产的光纤氧传感器探头监测氧气消耗,用 Perkin-Elmer LS50B 荧光计测量 NADH(内源性,370 $\pm$ 7nm 激发,440 $\pm$ 4nm 发光)和膜电位(1.25 μ M TMRM, 546 $\pm$ 7nm 激发,590 $\pm$ 4nm 发光)。6 个独立的实验显示存在典型的痕量。用无菌水配制 1M 的磷酸乙醇胺原液(Sigma 公司,P0503)并用 1N 的氢氧化钾溶液将 pH 调节到 7.4。

[0325] 在有或没有 meclizine 的存在下结果大致相同。表明它不是电子传递链或氧化磷酸化的直接抑制剂。见图 3E-3I。此外,如图 3M-N 所示,meclizine 不会改变线粒体 DNA 拷贝数或线粒体 mRNA 的表达。将 HeLa 细胞暴露到 50 μ M meclizine (mec) 6 小时或暴露到 50ng/ml 的溴乙锭 (EtBr) 3 天,然后进行总基因组 DNA 提取。采用 Taqman 法实时定量 PCR 检测一细胞核基因和一线粒体基因以测定线粒体 DNA 拷贝数。从 50 μ M meclizine 处理过 6 小时的 HeLa 细胞中提取总的 RNA。用相对特定基因的 TaqMan 法实时定量 PCR 测定线粒体 DNA 编码的转录产物。

[0326] 这些数据表明 meclizine 自身不会直接抑制 OXPHOS 机器。这些数据与所观察到

的 meclizine 对整个细胞内氧消耗的慢动力学（即超过几个小时）的影响是一致的。见图 3C。上述研究表明，在所有试验的细胞类型中，meclizine 能将细胞能量代谢从氧化磷酸化（OXPHOS）向糖酵解转换。以前我们都不知道 meclizine 的这一作用。此外，meclizine 将细胞从 OXPHOS 转移到糖酵解的能力是其能够在培养的神经元缺氧缺葡萄糖状况下赋予细胞保护作用，在 Huntington 疾病细胞模型中抵制聚谷氨酸毒性，以及防止出现缺血损伤的主要原因。

[0327] 实施例 3 :S-Meclizine 影响细胞能量代谢

[0328] 市售的 meclizine 是一种消旋混合物，其中包括 R-meclizine 和 S-meclizine。因此，制备了 meclizine 旋光对映体并对它们各自减少细胞氧消耗率和 / 或立体选择性进行了评价。

[0329] 首先，如 Scheme I 所示，使用下列方法合成了以上两种旋光对映体。

[0330] 步骤 I (R) 和 (S)-4- 氯苄胺

[0331] 用 D- 酒石酸处理消旋 4- 氯苄胺 (4-chlorobenzhydrylamine)，然后在水中重结晶 10 次（如 Clemo 等，J. Chem. Soc, (1939), 1958-1960 所描述的方法）得到高光学纯度的 (S)-4 氯苄胺（根据手性高效液相色谱结果，> 98%）。

[0332] 用类似的方法，用 L- 酒石酸处理外消旋的 4- 氯苄胺得到了高纯度的 (R)-4- 氯苄胺（根据手性高效液相色谱结果，ee : > 98%）。

[0333] 步骤 2 : (R) 和 (S) 1-((4- 氯苄基) (苄基) 甲基) 哌嗪

[0334] 按照 Opalka 等人，Synthesis 1995, 766-768 中所描述的方法制备了 1-((4- 氯苄基) (苄基) 甲基) 哌嗪 (1-((4-chlorophenyl) (phenyl)methyl)piperazine)。

[0335] 步骤 4 : (R)-Meclizine 和 (S)-Meclizine

[0336] 将含有 (S) 1-((4- 氯苄基) (苄基) 甲基) 哌嗪 (50mg, 0.18mmol)，3- 甲基苯基甲基溴 (0.025ml, 0.19ml)，碳酸钾 (80mg) 和甲醇 (3ml) 回流下搅拌过夜。然后将混合物冷却至室温并过滤。滤液浓缩，然后用硅胶色谱柱纯化得到 10mg 的黄色油状 S-Meclizine，然后进一步将其转化为其盐酸盐。MS : 391 (M+L) ; ee : > 99% (保留时间 = 22.6 分 ; CHIRALPAK OD-H 柱 ; 流动相 : 正己烷 (0.1% 二乙基胺 (DEA)))。

[0337] 按如上所述方法进行氧消耗率 (OCR) 测定。简单而言，将分散在外加 10% 胎牛血清的 DMEM 高葡萄糖培养基中的 HEK 293 细胞以 50,000 细胞 / 孔的密度接种到 XF24 细胞培养基微板 (Seahorse 生物科学) 上。将细胞在 37°C, 5% 二氧化碳的环境下培养过夜。测定开始前，用约 925μL 不含血清的检测培养基替换生长培养基。测定前，将检测培养基中的细胞在 37°C, 5% 二氧化碳的环境下培养 30 分钟。在混合 2 分钟和等待 2 分钟后，每隔 6 分钟测定一次。在加入 R-meclizine, S-meclizine, 或外消旋 meclizine 前，记录 3 个基线测量结果。所有上述化合物的原液均用 100% DMSO 配制，原液均是在检测培养基中稀释到特定的浓度，并用氢氧化钠溶液将其 pH 值调整至 7.4。

[0338] 数据表明，S-meclizine 和 R-meclizine 能够抑制耗氧量。S-meclizine 和 R-meclizine 表现出剂量依赖性的细胞耗氧率 (OCR)。这两种对映体在 25-50μM 的浓度时，均抑制 OCR 达到 60-80%，见图 24A-B。

[0339] 也采用 Western blot 通过检测用 R-meclizine (R-Mec)，S-meclizine (S-Mec) 和外消旋 meclizine (Rac-Mec) 处理 24 小时后 C2C12 肌管内 AMPK 磷酸化评价了 Meclizine，

S-meclizine 和 R-meclizine 激活 C2C12 肌管内 AMPK 的能力。如图 24C 所示的结果表明, meclizine, S-meclizine 和 R-meclizine 均能激活 C2C12 肌管内的 AMPK。

[0340] 利用与外消旋体的竞争结合实验对每种对映体结合 H_1 受体的能力进行了评估。通过 3nM 的 [3H] 甲氧苄二胺 ([3H]pyrilamine) 存在下的竞争结合实验确定了 R-meclizine(R-Mec) 和 S-meclizine(S-Mec) 结合到人 H_1 受体的体外结合情况。在过量 (1mM) 未标记甲氧苄二胺存在下检测非特异性结合。用竞争曲线的非线性回归分析确定了 IC_{50} 。

[0341] 令人惊讶的是,如图 24D-F 所示,R-mec 结合到 H_1 受体并具有高亲和力,而 S-mec 在 H_1 受体上表现出的非常弱的亲和力。这表明,在活体中,与抗组胺作用相关的 meclizine 给药的副作用(如嗜睡和/或镇静)不可能在用 S-对映体给药时出现。

[0342] 实施例 4:Meclizine 作用的机理

[0343] 上述数据表明,meclizine:i) 诱导从 OXPHOS 向糖酵解的缓慢动力学转变;ii) 不直接抑制呼吸。这些数据的一种解释可能是,meclizine 能够通过一种代谢或转录重新布线机制改变细胞能量代谢。

[0344] A. 基因表达谱

[0345] 为了探讨这一假说,通过缺氧诱导因子 (HIF):一种已知的糖酵解转录激活剂对糖酵解的激活进行了测试。通过在 HeLa 细胞中,采用抗 HIF1- α 抗体 (Cell Signaling, 目录号:3716) 和抗 HIF2- α 抗体 (Novus 生物制品公司) 进行 Western blot 检测对 HIF1- α 和 HIF2- α 稳定性进行了评估。再从细胞中提取蛋白之前用 0.1% 二甲基亚砜, 50uM meclizine 或 100uM 的去铁胺 (Sigma 公司, 目录号:D9533 号) 进行预处理。用抗 GLS 抗体 (西班牙马拉加大学哈维尔马尔克斯博士免费提供的样品) 对从 293 细胞上提取出来的蛋白质进行了谷氨酰胺酶 Western detection (GLS)。Meclizine 处理后没有观察到 HIF 稳定性。见图 10A-B。

[0346] 接下来,对用 meclizine 处理 6 个小时(即,具有最大 OXPHOS 抑制作用的时间点)后的成纤维细胞测定了总的基因表达谱。按如下操作进行了寡核苷酸微阵列实验。用 RNeasy 试剂盒 (Qiagen) 从约 2 百万 MCH58 细胞上提取了总 RNA。对于 3 次传代和药物治疗的样本,细胞生长在 10mM 的葡萄糖或 10mM 的半乳糖中,并用 0.1% DMSO 或 50uM 的 meclizine 处理 6 小时。用 10ug 的 RNA 用于用 T7-(dT)₂₄ 引物和 Superscript one-cycle cDNA 合成试剂盒 (Affymetrix) 来合成 cDNA。根据 Affymetrix 公司所建议的方法,进行了 cRNA 标记,杂交到人类 UL 33 和 2.0 寡核苷酸阵列,清洗和染色。对于每个条件,使用了 3 个生物复制样品,总共 6 个阵列。利用采用了荧光定量检测的定量 RT-PCR 方法 (Applied Biosystems) 确认了 GLS 的表达。

[0347] 在最严格的错误发现率 ($FDR = 0.174$) 下,数据集包括了 14 个基因,其表达相对于 vehicle 处理上升或下降了。请参见,如 Hochberg 等人,Stat Med 9:811(1990)。数据表明,下调基因是 GLS,该基因编码谷氨酰胺,下调了 $\sim 40\%$ ($P < 10$)。见图 11A 和 11B。谷氨酰胺被认为是负责线粒体内将谷氨酸转化为谷氨酰胺。

[0348] 此外,总的基因表达谱数据还表明,meclizine 上调了许多糖酵解酶(例如, HK2; 出现了 1.5 变化倍数, $P < 10^{-3}$)。另一方面,有一种细胞葡萄糖摄取的负调节的基因(如 TXN1P) 被下调了 35%。帕瑞克等,PLoS Medicine 4:e158(2007)。

[0349] 进行了 motifADE,以确定这些 meclizine 诱导的总基因表达变化是否与过度取代了顺式调控机制相关联。Mootha 等,PNAS USA 101:6570(2004)。确定了一个 E-box 结合位点(即,5' -CACGTG-3') (Bonferroni 校正 ; $P < 10^{-5}$)。已经确定该 E-box 结合位点参与多种转录调节因子,包括葡萄糖的响应转录因子,如 ChREBP 和 MONDO。

[0350] B. GLS 转录分析

[0351] 按如下操作进行了 RNAi 和 c-DNA 过度表达的表达实验,以便评价 GLS。含有空载体 (pLK0.1) 的 lentiviral 颗粒或对 GLS 表达 shRNA 的载体 (GCACAGACATGGTTGGTATAT) (SEQ ID NO:1)。用 lentiviral 颗粒转导后,在嘌呤 (2ug/ml) 中对 MCH58 成纤维细胞进行选择并扩展制备稳定的组合。通过定量 RT-PCR 利用荧光定量检测确认了 GLS 组合。使用这些细胞进行代谢状态依赖性敏感性和 OCR 及 ECAR 实验。

[0352] 使用带有引物的校对 Taq 聚合酶 (Accuprime, Invitrogen 公司) 对谷氨酰胺酶全长 cDNA (Open Biosystems, Accession 编号:BC038507) 进行放大,引物包括用于随后亚克隆成 pDONR 221 载体的 attb 1 和 attb2 位点 (Invitrogen)。5' 引物总包含了部分 Kozak 序列,而从 3' 引物中去除了终止密码子。往前的序列 (F) 和反向引物 (R) 分别为 5' -GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTC CAC CAT GAT GCG GCT GCG AGG CTC-3' (SEQ ID NO:2);和 5' -GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAAAGC TGG GTC CAA CAA TCC ATC AAG ATT CT-3' (SEQ ID NO:3)。用 BP clonase,利用 STBL2E.coli 感受态细胞 (Invitrogen 公司) 将得到的 PCR 片段克隆到 Gateway 入口载体 pDONR 221 (Invitrogen 公司) 上。随后,用 LR clonase 将其亚克隆到目的载体 pcDNA6.2-EMGFP DEST 上,并进行了测序验证。采用 Eugene (Roche) 试剂,用 pcDNA6.2-GLS-GFP 和对照载体 pcDNA6.2-LacZ-GFP 对 293 细胞进行转染。采用抗 GLS 抗体,用 Western blot 对 GLS 表达进行了确认。见图 14A。对 FACS 排序转染细胞进行 meclizine 处理,然后进行 OCR 和 ECAR 测定。见图 14B。

[0353] GLS 的是一种线粒体酶,并将谷氨酸转换成谷氨酰胺,是 TCA 循环的一种关键的补缺基质并且是 ATP 合成的前体。见图 1A 及 1B。在富半乳糖培养基中,观察到细胞快速消耗谷氨酰胺且相对于葡萄糖条件,GLS 上调了约 30%。

[0354] 如果减少的 GLS 表达与代谢状态依赖杀伤力相关,那么经 meclizine 处理的生长在半乳糖培养基中的细胞应该可以通过加入谷氨酸(一种线粒体谷氨酰胺酶活性的产品)而获救。因此,将经 meclizine 处理的生长在富半乳糖培养基中的细胞与谷氨酸以及细胞渗透酯二甲基谷氨酸一起孵育。虽然它是没有必要地了解一项发明的机理,我们认为这些代谢物都应该会被摄取进入细胞,运送到线粒体内,通过谷氨酸脱氢酶转化为酮戊二酸,进而作为 TCA 循环中的补缺前驱体。然而,没有观察到 meclizine 诱导的细胞生存活力抑制的挽救。见图 4B 及 4C。随后的结果表明,GLS 的转录变化在谷氨酸介导的呼吸中起作用,但不可能是发生在 meclizine 处理后的代谢变化的主要驱动力。

[0355] 进一步的实验证实:i)meclizine 处理 6 个小时后,通过实时定量 PCR 检测到 GLS 转录减少 50%,且 ii) shRNA 介导的 GLS 表达的抑制导致了半乳糖中生长细胞生存活力的选择性丢失。

[0356] 例如, RNAi 对 GLS 减少了耗氧量,并引起了代谢状态依赖性杀伤力升高。见图 12A 和 12B。但是, GLS 蛋白质在 meclizine 处理之后没有减小。见图 13。此外,甚至基本的启动子迫使 GLS 表达细胞的细胞中 meclizine 继续抑制氧消耗。见图 14A 和图 14B。总的来

说,这些数据表明, GLS 转录水平的下降对于积极的 meclizine 影响可能是次要的。

[0357] C. 代谢产品的评价

[0358] 为了获得 meclizine 在减少氧化代谢作用机制进一步了解,对用 meclizine 处理的细胞进行了以质谱为基础的代谢分析。

[0359] 在用 50uM meclizine 或 vehicle 对照品对 MCH58 成纤维细胞处理 6 小时后,采用与此前描述的方法类似的方法进行了代谢产物分析,参见 Shaham 等, Mol Syst Biol 4: 214(2008)。简单而言,在浸泡于 4ml 培养基中的 6cm 组织盘上培养低传代的 MCH58 细胞,直至 90% 的融合且最终产量为 1×10^6 的细胞。为了评估培养基代谢产物,从培养盘中取出 500uL 用过的培养基或基线培养基(加入到细胞之前)并立即加入 500uL 预冷的(-80°C)甲醇提取液(80% 甲醇,20% 的水),以便快速淬新成代谢并提取代谢产物。在 4°C 放置 20 分钟后,将样品在 14000 克的离心力下离心 10 分钟,收集 50uL 上清,用 1 : 20 甲醇萃取液再稀释,将在氮气下蒸发 100uL 的最终溶液。将样品复溶于 60uL 的 HPLC 级水中并按下述方法测定代谢水平。为了评估细胞内的代谢产物,从上述组织培养板上吸取培养基并用 4 毫升的 PBS 轻轻地洗涤细胞,以确保彻底清除残留的培养基代谢产物。去除 PBS 并立即加入 1ml 预冷(-80°C)的甲醇萃取液(80% 甲醇,20% 水)淬灭细胞的新陈代谢。刮下细胞,收集提取液,振荡并按上述制备培养基样品的方法对样品进行离心。收集 100uL 上清,用 1 : 1 的甲醇提取液再次稀释,并在在氮气下蒸发 100uL 的最终溶液。将样品复溶于 60uL 的 HPLC 级水中并评估代谢产物。每组评估 6 个生物重复样本。

[0360] 采用由连接在三个 Agilent 1100 二进制 HPLC 泵(Agilent 科技公司)的 4000QTRAP 三重四极杆质谱仪(Applied Biosystems 公司/SCIEX 公司)和一个配备了三个注射口和一系列选择阀的 HTS PAL 自动进样器(LEAP 科技)组成的液相色谱串联质谱法(LC-MS)对内源性代谢物进行分析。为每个样品的分析配置了三种多路色谱方法:LC 方法 1 使用 Luna Phenyl-Hexyl 色谱柱(Phenomenex),用水/乙腈/乙酸(初始比例 100/0/0.001,最终比例 10/90/0.001)进行线性梯度洗脱;LC 方法 2 采用正相 Luna NH2 色谱柱,梯度洗脱采用含有 0.25% 的氢氧化铵和 10mM 醋酸铵(梯度洗脱开始时乙腈/水比例为 80/20 和结束时为 20/80)的乙腈/水流动相;LC 方法 3 使用反相的 Synergi Polar-RP 色谱柱(Phenomenex),梯度洗脱采用 5% 乙腈/5mM 醋酸铵(流动相 A)和 95% 乙腈/5mM 的醋酸铵(流动相 B)为流动相。在阳离子模式(LC 方法 1)和阴离子模式(LC 方法 2 和 3)两种离子模式中均采用多反应监测(MRM)获取 MS 数据。在开发这种方法的过程中,采用可信的参考化合物来分别确定 LC 保留时间和调整 MRM 转换。通过采用 MultiQuant 软件(1.1 版;应用生物系统公司/SCIEX 公司)对特定的 MRM 转换的峰面积进行积分来进行代谢产物的定量且人工对所有积分峰的质量进行审核。

[0361] 在评估在这项研究的样本之前,对提取和定量程序进行了优化,以确保所测量的细胞内和培养基的代谢产物在检测的线性范围内。采用外源性磷酸乙醇胺标准品来确认磷酸乙醇胺的峰(Sigma 公司, P0503)。

[0362] 在所测定的约 125 种代谢产物中,在多假设检验校正后,有 6 种产物有显著改变的细胞内水平($P_{\text{adj}} < 0.05$)。见表 4。

[0363] 表 4 :meclizine 处理后代谢产物的代表性列表

[0364]

样品名称	差异倍数	Padj 值
P1 M0014 氨羧丙氨酸	2.43	0.00
P1 M0008 丙氨酸	1.40	0.00
P1 M0054 磷酸乙醇胺	38.21	0.00
P4 M0090 丙氨酸丁氨酸硫醚	1.53	0.01
P1 M0062 牛磺酸	1.59	0.03
P1 M0015 天冬氨酸	1.25	0.04
P1 M0027 胞嘧啶	1.28	0.08
P4 M0159 CDP	1.52	0.13
P3 M0127 乳糖	0.42	0.15
P4 M0187 琥珀酸	0.83	0.15
P1 M0022 肌氨酸	1.47	0.31
P1 M0055 脯氨酸	1.28	0.34
P4 M0161/M0172 柠檬酸 / 异枸橼酸	0.66	0.40
P1 M0046 3-甲氧基肾上腺素 p2	0.87	0.74
P1 M0067 酪氨酸	1.18	0.82
P4 M0180 OH-苯丙酮酸	0.86	0.85
P4 M0191 黄苷-5'-磷酸	1.75	0.86
P4 M0184 泛酸	1.29	0.95
P1 M0034 谷氨酸 p2	1.16	0.99
P1 M0041 羟(基)脯氨酸	1.17	1.00
P1 M0040 高丝氨酸	1.14	1.00
P4 NM002-M109 葡萄糖-13C6-d7	1.15	1.00
P1 M0063 苏氨酸	1.14	1.00
P3 M0154 丙二酸二甲酯	0.86	1.00
P4 M0083 ATP D159	1.27	1.00
P4 M0108 GDP p1	1.38	1.00
P1 M0058 丝氨酸	1.11	1.00
P4 M0121 次黄嘌呤	0.76	1.00
P3 M0100 叶酸	0.63	1.00
P4 M0089 CTP	1.32	1.00
P4 M0166 葡萄糖醛酸	0.77	1.00
P4 M0188 牛磺鹅去氧胆酸	0.76	1.00

[0365]

P3 M0145/M0146 UDP-葡萄糖/UDP-半乳糖_p2	1.33	1.00
P4 M0206 乙酰辅酶 A P404	1.22	1.00
P4 M0144 UDP	1.21	1.00
P1 M0066 色氨酸	1.13	1.00
P3 M0147 UDP-葡(萄)糖醛酸	1.45	1.00
P4 M0116 GTP	1.24	1.00
P3 M0195 3-磷酸甘油酸	1.45	1.00
P3 M0081 ADP p2	1.43	1.00
P1 M0042/M0044 Ile/Leu	0.91	1.00
P4 M0205 磷酸酪氨酸	1.23	1.00
P1 M0200 L-NMMA	0.59	1.00
P1 M0038 组胺酸	1.07	1.00
P1 M0068/M0037 缬氨酸/胍乙酸	0.94	1.00
P3 M0150 尿苷	0.88	1.00
P3 M0109-M0110 葡萄糖/半乳糖	0.94	1.00
P1 M0035 谷氨酸	1.05	1.00
P4 M0088 CMP	1.27	1.00
P4 M0190 尿酸	0.87	1.00
P4 CAP193 Met-165	0.90	1.00
P3 M0112 谷胱甘肽减少	1.74	1.00
P3 M0139 山梨醇	0.92	1.00
P4 M0210 丙酮酸盐	1.08	1.00
P4 M0162 瓜氨酸	0.87	1.00
P1 M0053 苯丙氨酸	1.09	1.00
P4 M0100 叶酸	0.84	1.00
P1 M0019 胆碱	0.90	1.00
P4 M0169 甘氨酸胆汁酸	0.68	1.00
P1 M0009 1-脲基间二氮杂环戊烷-2,4-二酮	0.91	1.00
P4 M0207 丙二酰 辅酶 A_p1	1.16	1.00
P1 M0016 甜菜碱	1.08	1.00
P3 M0152 黄嘌呤	0.85	1.00
P3 M0102/M0103/M0196 Fl6DiP/F26DiP/G16DiP D79 p2	1.32	1.00
P4 M0168 Glycochenodeoxycholic 酸	0.83	1.00
P4 M0126 乳酸	0.96	1.00
P3 M0111 氧化谷胱甘肽	1.20	1.00
P1 M0045 赖氨酸	1.08	1.00
P4 M0170 苯甲酰氨基酯酸	0.86	1.00
P4 M0198 乌头酸 CAP203) D129	0.55	1.00
P1 MOO 26 半胱氨酸	1.38	1.00
P4 M0092 DCMP	1.17	1.00
P4 M0164/M0175 富马酸/马来酸	0.94	1.00
P1 MOO50 烟酰胺	1.08	1.00

[0366]

P3 M0121 次黄嘌呤	1.17	1.00
P4 M0183 草酰乙酸盐	0.92	1.00
P4 M0102/M0103/M0196 F16DiP/F26DiP/G16DiP D79 p1	1.14	1.00
P3 M0082 AMP	1.31	1.00
P1 M0003 2'-脱氧胞啶	1.13	1.00
P3 M0114 甘油-3-P	1.21	1.00
P3 M0164/M0175 富马酸/马来酸	1.07	1.00
P1 M0070 黄(嘌呤核)苷	1.21	1.00
P4 M0123 次黄嘌呤核苷 p2	1.18	1.00
P3 M0129 NAD	1.11	1.00
P3 M0130 NADP	1.24	1.00
P3 M0149 尿嘧啶	0.90	1.00
P1 M0047 蛋氨酸	1.06	1.00
P4 M0151 UTP	1.09	1.00
P3 M0077 乙酰醋酸盐	1.07	1.00
P3 M0140 蔗糖	1.18	1.00
P4 M0137/M0138 核酸糖-5-P/核酮糖-5-P D97	1.07	1.00
P1 M0204 甘油	0.94	1.00
P4 M0167 甘油酸盐-2-P p1 Met-185	1.09	1.00
P3 NM003-M161 柠檬酸-d4	0.97	1.00
P3 NM002-M109 葡萄糖-13C6-d7	1.02	1.00
P4 M0176 苹果酸	0.96	1.00
P1 M0056 吡哆醇	1.15	1.00
P4 M0148 UMP p1	0.83	1.00
P4 M0091 DCDP	1.09	1.00
P4 M0165 牛儿焦磷酸	1.18	1.00
P4 M0097 DUMP	0.88	1.00
P4 M0157/M0156 α -氧化-戊二/己二酸	1.06	1.00
P4 NM003-M161 柠檬酸-d4_p1	1.02	1.00
P4 M0140 蔗糖	1.10	1.00
P4 M0102/M0103/M0196 F16DiP/F26DiP/G16DiP D241	1.07	1.00
P1 M0007 乙酰胆碱 p2 Met-146	1.06	1.00
P1 M0013 精氨酸琥珀酸	1.08	1.00
P4 M0158 抗坏血酸	0.96	1.00
P1 M0052 鸟氨酸	1.01	1.00
P1 M0023 肌氨酸酐	1.03	1.00
P3 M0126 乳酸	0.99	1.00
P1 M0012 精氨酸	1.01	1.00
P3 M0104-M0107 F1P/F6P/G1P/G6P D97	0.97	1.00
P4 M0173 犬尿酸	0.96	1.00
P1 M0030 二甲基甘氨酸	0.98	1.00

[0367]

P1 NM001-M68 缬氨酸-d8	1.01	1.00
P1 M0039 高半胱氨酸	0.95	1.00
P4 M0163 DHAP	0.98	1.00
P4 M0093 DCTP	1.02	1.00
P1 M0142 胸腺嘧啶脱氧核苷	0.97	1.00
P1 M0201/M0202 ADMA/SDMA	0.99	1.00
P3 M0113 甘油醛	1.00	1.00
P4 M0185 吡哆醛 5 - 磷酸 p1	1.01	1.00
P1 M0018 肌肽	1.00	1.00

[0368] 上调最多的是磷酸乙醇胺 (phosphoethanolamine), meclizine 处理 6 小时后增加了将近 35 倍。参见图 15A。通过正交色谱仪以及通过 ^{31}P -NMR 证实了磷酸乙醇胺上调。在多种类型的细胞中均观察到了磷酸乙醇胺 (PEA) 上调。见图 15B。以往的研究表明, 磷酸乙醇胺 (PEA) 在未成年的细胞中可能升高, 乙醇胺和磷酸乙醇胺 (PEA) 可以直接抑制线粒体 OXPHOS。Zhu 等人., J Lipid Res 49:2197(2008); and Modica-Napolitano et al., Biol Psychiatry 55:273(2004)。为了测试磷酸乙醇胺 (PEA) 对线粒体呼吸的影响, 在加入 2.5mM 谷氨酸钠和 2.5mM 的苹果酸及随后加入 1 μM CCCP 之前, 将线粒体在不同浓度的磷酸乙醇胺 (PEA) 溶液中孵育 1 小时。与这些报道一致的是, 磷酸乙醇胺 (PEA) 阻断了解偶联剂刺激的呼吸, 且, 在完整的细胞中, meclizine 处理减弱了解偶联剂刺激的呼吸。分别见图 16A 及 16B。

[0369] 磷酸乙醇胺 (PEA), 大多是通过 PE-Kennedy 途径和磷脂酰丝氨酸脱羧重新合成的一种重要的内膜磷脂, 是受 meclizine 影响上调最大的细胞内代谢产物, 只需 meclizine 处理 6 小时后增加近 35 倍。CTP: 磷酸乙醇胺胞苷酰转移酶 (PCYT2) 催化 CDP-乙醇胺的形成, 是 PE-Kennedy 途径的速率调控步骤。参见 Fullerton 等, J Biol Chem 18:284(38):25704-13(2009)。为了确定 meclizine 是否影响 PCYT2 的活性, 在加入了 50-1000 μM meclizine 或 50-600 μM S-meclizine 的情况下, 用纯化的重组 PCYT2 PCYT2 在体外进行了 (CTP: 磷酸乙醇胺胞苷酰转移酶) 酶检测。如需了解详细资料, 见 Zhu 等, J Lipid Res 49:2197(2008)。如图 16C-16D 所示, meclizine 和 S-meclizine 结合到 PCYT2 上并抑制 PCYT2, 导致磷酸乙醇胺甚至是乙醇胺的升高。

[0370] 相比于经典的线粒体呼吸抑制剂, 在此已经证明 meclizine 是一种间接的 OXPHOS 抑制剂。例如, 我们可以在广泛的浓度范围内滴定测量 meclizine 的效果, 可以达到 10% 至 60% 的抑制细胞耗氧率。如图 6A 和图 17A 所示。虽然没必要了解一项发明的机理, 我们认为, 此处的数据表明, meclizine 是独立于毒蕈碱或组胺受体而发生作用的, 因为影响这两种类型受体的药物没有影响能量代谢; 见图 17B-C 所示。

[0371] 以往的研究表明, 乙醇胺和磷酸乙醇胺可以作为线粒体 OXPHOS 的内源性抑制剂, 且这两种代谢产物在癌细胞中均升高。分别见 Modica-Napolitano 等, Biol Psychiatry 55:273(2004) 和 Zhu 等, J Lipid Res 49:2197(2008)。有意思的是, 已有报道称两种 meclizine 代谢产物在 Alzheimer 疾病和 Huntington 疾病患者的大脑中均减少。参见 Ellison 等. Brain Res 417:389(1987)。此外, 众所周知的是, 线粒体的磷脂成分影响超复合物的形成。由于预计 PCYT2 抑制剂可能会影响细胞内的磷脂成分, 这可能是 OXPHOS 可能

被减弱的另一种机理。

[0372] 实施例 5 :神经退行性疾病中 meclizine 的体内评价

[0373] 本实施例描述了证明 meclizine 能有效地防止神经退行性疾病细胞模型中细胞死亡的实验。最近的几项研究表明,线粒体呼吸的基因或药物抑制,可以抑制氧化损伤和神经退行性疾病的细胞死亡。Buttner 等, JBC 283 :755415 (2008) ;Fukui 等, PNAS USA 104 :14163 (2007) ;和 Varma 等, PNAS USA 104 :14252 (2007) . 虽然这些结果满有希望且具有创新性,将这些结果转化为治疗效果,尤其是治疗的中枢神经系统疾病的治疗效果的一个主要局限,是缺乏跨血脑屏障并有良好治疗指数的 OXPHOS 抑制剂。经典的线粒体呼吸抑制剂如鱼藤酮和寡霉素能够抑制多聚谷氨酰胺 (polyQ) 的毒性。Varma 等, PNAS USA 104 :14252 (2007) 。然而,由于其急性和直接抑制 OXPHOS,这些试剂是剧毒的,不适合治疗干预。

[0374] Meclizine 能防止多聚谷氨酰胺的毒性

[0375] 用以上所描述的筛选方法确定了几种满足治疗各种疾病临床成功这一条件的候选化合物。这些候选化合物之一就是 meclizine。选择这一化合物作为整个潜在候选药物类的代表进行进一步的测试,这些潜在候选药物类可能会有治疗效果,同时不会出现目前已知的 OXPHOS 抑制剂所产生的典型的线粒体毒副作用。例如,以往的研究已经表明, OXPHOS 抑制剂包括鱼藤酮和寡霉素在 Huntington 疾病 (HD) 的细胞和动物模型中能提供保护作用。Varma 等, PNAS USA 104 :14252 (2007) 。然而,这些 OXPHOS 抑制剂都是剧毒,因此不能用作人类治疗的药物。进一步探讨了 meclizine 在细胞和动物 HD 模型中的治疗潜力,因为该化合物具有优良的中枢神经系统渗透性,广泛的治疗指数,并能通过轻微地减少 OXPHOS 基质的可用性来抑制线粒体呼吸。

[0376] 最近有关细胞和动物模型的研究表明, OXPHOS 的基因抑制实际上可以抑制一系列的神经退行性疾病突变型等位基因的毒性。Huntington 疾病就是这样一种由于 huntingtin 基因的蛋白质产物中聚谷氨酰胺 (polyQ) 扩展造成的。Gusella 等. Nature 306 :234 (1983) 。疾病的发病机制的理论之一认为, polyQ 与线粒体呼吸链相互作用会提高氧化损伤和损害线粒体钙处理。以往的研究表明,线粒体呼吸的经典抑制剂如鱼藤酮和寡霉素可以抑制 polyQ 的毒性,但在这些研究中所使用的试剂对于人类使用是不安全的。Varma 等, PNAS USA 104 :14252 (2007) 。

[0377] a. 纹状体细胞培养模型

[0378] 从表达具有多聚谷氨酰胺不同重复长度 (例如,111 多聚谷氨酰胺重复长度 (STHdh^{Q111/111}) 或 7 聚谷氨酰胺重复长度 (STHdh^{Q7/7}) 的 HdhCAG 基因敲除小鼠胚胎上获得有条件永生化的纹状体祖细胞。Trettel 等, Hum Mol Genet 9 :2799 (2000) 。具有 111 重复长度的小鼠 (STHdh^{Q111/111}) 表现出类似 HD 的显型,而用表达较短的 7 重复长度的小鼠作对照且没有这一表型。Wheeler 等. Hum Mol Genet. 1 (9) :503 (2000) 。STHdh^{Q111/111} 小鼠的一种细胞表型包括一种去血清后的快速、细胞凋亡性死亡,比野生型细胞更为明显 (~ 218%) 。见图 5A 和 5D 所示。给 STHdh^{Q111/111} 细胞加 meclizine,在去除血清 24 小时后,明显地增加了呈剂量依赖性 (EC50=17.3uM) 细胞存活 (如挽救),如图 5A-5C 所示。虽然没有必要了解一项发明的机理,但我们认为所观察到细胞存活可能是由于基于半胱天冬酶 3 和 7 裂解的细胞凋亡受抑制所造成的。参见图 5D。通过显微镜证实了提高的细胞活力。见图 5G。

[0379] 由于 meclizine 在细胞内有多种可能的作用机制 (例如,抗 - 组胺,抗 - 毒蕈碱,

或抗-OXPHOS),对 meclizine 赋予纹状体的细胞保护的细胞死亡机理进行了研究。因此,从 6 类不同的化合物中选择了 10 种抗-组胺,2 类抗毒蕈碱化合物,和 3 种 OXPHOS 抑制剂进行了评价。

[0380] 按如下操作进行 Western blot 分析。表达突变的 huntingtin 蛋白的小鼠 STHQ111/111 纹状体细胞生长至覆盖 15cm 细胞培养板~75%面积。然后用 0.1% DMSO 或 50uM meclizine 无血清培养基替换含血清的培养基,并在去除血清和细胞裂解液中药物处理后的 0.4,10 和 24 小时提取总蛋白(Cell Signaling,目录号 9803)。

[0381] 采用 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白质浓度(Thermo Scientific,目录号:23227 号)。采用购自 Invitrogen 公司的 NuPAGE 4-12% Bis-Tris 凝胶(NP0321)进行 SDS PAGE。每个通道加载 15ug 的蛋白质。根据标准操作规程进行 Western blotting。裂解半胱天冬酶 3(目录号:9661),裂解半胱天冬酶 7(目录号:9491),p-ERK(Thr220/Try204;目录号:9803),AKT(目录号:9803)抗体购自 Cell Signaling。P-肌动蛋白抗体购自 Sigma 公司(A1978)

[0382] 结果表明,meclizine 在去除血清后 24 小时内防止了半胱天冬酶 3 和半胱天冬酶 7 的无血清诱导活化。见图 5D。

[0383] 在这一纹状体细胞培养 HD 模型中也考察了 Meclizine 对 H_1 和 / 或毒蕈碱受体的拮抗性。在所有这些化合物中,meclizine 提供了最大程度的保护,且按类别看,OXPHOS 抑制剂能提供最大程度的保护,表明 meclizine 诱导的 OXPHOS 抑制对其神经保护作用有贡献。见图 5E。

[0384] 此外,在 meclizine 抑制纹状体细胞耗氧量的能力和其为表达突变等位基因提供增强生存能力之间也观察到了剂量反应的单调关系。见图 17A。尽管没有必要了解一项发明的机理,我们认为这些数据表明,meclizine 保护小鼠纹状体细胞的能力可以通过转换能量代谢的能力实现。

[0385] 以往一项使用 polyQ 毒性的大鼠细胞培养模型的研究报告显示,通过鱼藤酮挽救细胞死亡是部分通过亲生存 AKT 和 ERK 信号通路的上调介导的。Varma 等.Proc Natl Acad Sci USA 104:14525(2007)。此处给出的数据证实了从血清去除诱导的细胞凋亡中用鱼藤酮挽救小鼠 STHdh^{Q111/111} 细胞。见图 5D-5E。但是,没有证明鱼藤酮或 meclizine 激活 ERK 或 AKT 通路。见图 18A 和图 18B。

[0386] 且如图 5A-B 所示,Huntington 疾病模型中,Meclizine 能够抵制多聚谷氨酰胺毒性。这种抵制与其能够抑制细胞呼吸的能力相关(见图 17A),是独立于其抗组胺和抗毒蕈碱活性的(见图 5E)。这是通过血清去除和用药物处理后检测 STHdh^{Q111/111} 细胞的生存活力进行评价的。化合物是按照药物目标进行安排的。血清处理用作阳性对照。

[0387] 也对 Meclizine 两种对映体提供保护的能力进行了评价。在去除血清和用药物处理后对 STHdh^{Q111/111} 细胞的生存活力变化百分比进行了评价。R-meclizine(R-Mec),S-meclizine(S-Mec) 和外消旋混合物(Rac-Mec)使用的浓度为 20 μ M。如图 18C 所示,S-meclizine 在 Huntington 疾病的细胞模型中是具有保护作用的。

[0388] meclizine 作为止吐药或抗眩晕剂的作用机制还没有准确地阐明,但人们认为是通过阻断组胺和蕈毒碱受体发生作用的。上述以细胞为基础的生物能量学分析表明,meclizine 能在几个小时内将代谢从氧化磷酸化转换为糖酵解,这可能是通过一种独立于

组胺和毒蕈碱细胞表面受体的新的转录后机制实现的。例如, meclizine 转换能量代谢的 K_m 高于已公开的阻断 H_1 受体 K_m 的百倍以上。

[0389] b. 转基因线虫模型

[0390] 在 Huntington 疾病的一种动物模型中也对 Meclizine 进行了测试。转基因线虫接触受体神经元能表达一种含有 128 个谷氨酰胺重复单元的 huntingtin(htt)N 端片段, 而野生型蛋白质只有 17 个谷氨酰胺重复单元。这些神经元显示出 polyQ 依赖性神经功能障碍, 导致后部机械性刺激感觉缺陷。Parker 等, Nat Genet 37 :349 (2005)。使用融合到接触受体神经元中 CFP 的动物共同表达的 YFP 和 N- 端 htt 进行药物测试。请参见, Parker 等, Proc Natl Acad Sci U S A 98 :13318 (2001)。如此前所述, 在 96 孔板中, 用含有 OP-50 细菌和 30mg/ml 链霉素的 50ul M9 培养基, 将通过次氯酸钠提取获得的同步 L1 幼虫与药物一起在 20°C 下培养 3 天。进行了三次独立检测且每个剂量至少测试 100 只蠕虫。

[0391] 蠕虫用 DMSO 或 33 μ M 的 meclizine 处理 3 天。如果在轻轻接触 (如, 启动反向运动) 后发生了反应, 则认为这些蠕虫动物是接触反应性的。在 3 次接触中, 有 2 次或 3 次反应被认为是反应性的, 而 0 次或 1 次反应则被认为是非反应性的。如此前所描述的, 采用光学显微镜对 PLM 神经元中的聚集和轴突形貌进行评分 (Parker 等, Proc Natl Acad Sci U S A 98 :13318 (2001))。采用 CFP 荧光对 Htt 聚集进行评分, 采用 YFP 荧光对轴索营养不良进行量化, 以便检测轴索肿胀。

[0392] 采用分散在 4-15% bis-tris 凝胶上的 WormBook 方法提取蛋白, 转移到膜上, 然后用抗 -GFP 抗体 (Abcam 公司, ab6556) 对 GFP 标记的 128Q-htt 片段进行探查。采用抗肌动蛋白抗体对蛋白的数量进行标准化 (MP 生化, 69100)。

[0393] 在突变 PolyQ 动物中, Meclizine 以剂量依赖性的方式改善了对板尾刺的感官反应, 而在对照动物中没有检测到影响。见图 5F。在 33.33 μ M 浓度下观察到了最佳响应, 这与在小鼠 STHdh^{Q111/111} 细胞中的细胞生存活力相当。见图 5C。在 33.33uM 的剂量下, 在转基因蛋白表达中没有观察到变化。见图 19A。类似地, 没有检测到对 PolyQ 蛋白聚集的影响。见图 20。然而, 轴索肿胀减小了。见图 21A 和图 21B。这一数据与以前有关 PolyQ-15 表达蠕虫的报道是一致的, 轴索营养不良症是神经功能障碍的一种较强的关联物。Parker 等, Proc Natl Acad Sci U S A 98 :13318 (2001)。

[0394] 在 33.33uM 的浓度下, Meclizine 没有产生任何毒性。虽然 100uM 会造成轻度发育延迟。相比之下, 已经证明, 甚至在更低的剂量下, 鱼藤酮会因严重中毒造成发育迟缓。Varma 等, Proc Natl Acad Sci USA 104 :14525 (2007)。

[0395] c. 转基因果蝇模型

[0396] 在 Huntington 疾病的转基因昆虫模型中也对 Meclizine 进行了测试, 将人类 Htt 的前 548 个氨基酸 (含有 128 个谷氨酰胺) 在果蝇的眼睛内进行表达。编码分别含有 0 个或 128 个谷氨酰胺的人类 Htt 前 548 个氨基酸的 UAS-Htt-Q0 和 UAS-Htt-Q128 细胞株是由 Troy Littleton 免费提供的样品。elav-GAL4 driver 购自 Bloomington Stock Center (编号 :8765)。将 UAS-Htt-Q128 细胞株杂交到 elav-GAL4/CyO 获得 UASHtt-Q128/elav-GAL4 果蝇。

[0397] 对羽化后的蝇的伪瞳分析表明, 这些成年蝇没有出现可鉴别的退变, 但这些感杆在接下来的 10 天出现了逐步退化。见图 22B。相比之下, 由 elav-GAL4 驱动的 HAS-Htt Q0

没有出现退化。

[0398] 将相同数量的新羽化的 UAS-Htt-Q128/elav-GAL4 蝇加入到含有用水和不同浓度 (100, 33, 11 或 3 μ M) 的 meclizine 或 DMSO vehicle 新鲜配制的 Carolina Biological Instant 蝇食物的瓶子中。每隔两天给蝇更换新鲜的食物和药物并在整个实验过程中保持在 25°C。对于每个条件,在第 10 天,通过对至少 8 个动物的感杆数量 / 小眼评分,利用假瞳技术对神经退化性进行评估;请参见 Jackson 等,Neuron 21:633(1998)。实验进行了两次且评分是在盲态下进行的。采用小鼠抗 - 人 HD ((mAb2216, 购自 CA, Temecula 的 Chemicon 公司) 对来自用 33 μ M 的 meclizine 或 DMSO 喂养了 10 天的 UAS-Htt-Q128/elav-GAL4 成年蝇的细胞裂解物进行了 Western blot 分析。

[0399] 突变 Htt 输异基因的表达式会导致每个小眼感杆数量的逐步减少。见图 22A 和图 22B。用 33 μ M 的 meclizine 处理不会影响转基因蛋白的表达。见图 19B。然而,与用 DMSO 处理的对照相比,这种 meclizine 处理确实能防止感杆的损失。见图 23。

[0400] 实施例 6:缺血性疾病中 Meclizine 的体内评价

[0401] 此处的数据显示,meclizine 在缺血和再灌注的文献所接受的细胞模型中能提供保护。

[0402] 将生长在含有 10% 透析胎牛血清的 DMEM 中的永生化小鼠纹状体 20A5 细胞暴露到氧气和无葡萄糖的环境中 18 小时,然后用完全的培养基在含氧量正常的环境下恢复 12 小时。经 ATP 荧光检测 CellTiter-GLO 测定,这一 IR 模型诱导了约 30% 的细胞生存活力的降低。见图 25A。然后,在去除氧气和葡萄糖之前,细胞用 25 μ M 的 meclizine 处理 8 小时,其中,相对于相应空白预处理的细胞,meclizine 预处理导致了细胞生存活力的明显改善。见图 25B。

[0403] 按如下方式对 Meclizine 保护分离的心肌细胞和分离心脏抵制缺血性损伤的能力进行了研究。通过内毒素无胶原酶灌注分离了成年大鼠的心室心肌细胞,并按如前所述的方法 (Wojtovich 和 Brookes, Basic Res. Cardiol., 104:121-129 (2009)) 对缺血再灌注损伤进行了模拟。在进行图 33A 中的处理前,先培养分离出来的心肌细胞。将对照细胞暴露于 DMSO 20 分钟。将测试细胞暴露于 vehicle 或不同剂量的 meclizine 20 分钟,在进行 60 分钟缺血前清洗掉,然后在 pH 7.4 的常氧葡萄糖充满缓冲液的正常氧气条件下灌注 30 分钟。用曲利本蓝排出检测细胞生存活力。通过分离线粒体评价 VO_2 并采用 Clark 氧电极 (Wojtovich, supra) 测定呼吸细胞和线粒体。

[0404] 如图 33B 所示,观察到 DMSO 处理过的细胞在面临缺血 / 再灌注 (I/R) 时细胞生存活力减少了约 60%,而不同浓度的 meclizine 保护心肌细胞不受 I/R 影响。在 meclizine 浓度为 0.5 μ M-10 μ M 时观察到了最优化的保护作用。在浓度为 50 μ M 和 100 μ M 时未观察到 meclizine 保护作用。使用其他抗组胺药物 (甲氧苄二胺和苯吡胺) 或抗胆碱剂 (东莨菪碱和阿托品) 时未观察到保护作用。

[0405] 如图 33C 所示,与 DMSO 处理的细胞相比,meclizine 处理促进了 VO_2 的降低。这些观察结果支持 meclizine 可以用于保护心肌细胞不受 I/R 影响。

[0406] 采用逆行灌注心脏和 Langendorff 心脏 (Nadtochiy 等, Biochem. J., 395: 611-618 (2006)) 评估 meclizine 在分离的、体外的心脏中的作用。然后,心脏处于一段时间的缺血状态,之后进行灌注。如图 34A 和 34B 所示,如分压的增加 (见图 34A) 和较小的梗

死面积（见图 34B）所示，与未处理的对照品相比，meclizine 保护处理过的心脏以防止 I/R 损伤。

[0407] 这些观察结果进一步证明了在分离心肌细胞中所显示的观察结果并支持 meclizine 可以用于保护完整和正在运作的的心脏防止 I/R 损伤。

[0408] 按以下操作，采用文献公认的中风动物模型对 meclizine 对中风的保护作用进行了评估。

[0409] 腹腔注射到 C57BL/6 小鼠后测定了 meclizine 的血浆浓度。注射 100mg/kg 的 meclizine 或 vehicle 对照品后 1 小时或 6 小时，心脏穿刺抽血。采用液相色谱串联质谱法，以纯化的标准品对照测定血浆中 meclizine 的绝对浓度。为了考察所测试化合物的保护作用，在缺血前的第 17 小时和第 3 小时，雄性 C57BL/6 小鼠分别两次腹腔注射 100mg/kg 的 meclizine, 20mg/kg 的甲氧苄二胺和 0.5mg/kg 的东莨菪碱或 vehicle。甲氧苄二胺和东莨菪碱的药物剂量是根据以往的文献中体内大脑的生物利用度的证据选择的（参见，Miyazaki 等，Life Sci 57:2137(1995) and Toyota, et al., Mol. Pharmacol 62:389(2002)）。实验人员对处理组是处于盲态的。用异氟烷麻醉小鼠麻醉（2.5%用于诱导，1.5%用于维持麻醉，70% N2O/30% O2 中），使用腔内长丝经颈外动脉插入使小鼠处于 1 小时的瞬态中间脑动脉闭塞。使用放置在核心大脑中动脉区域的激光 Doppler 探头监测局部大脑血流。用伺服控制加热垫控制直肠温度为 37°C。通过对每个通常切片水平中梗死区的面积积分，在 2,3,5-三苯基氯化四氮唑（TTC）染色的 1 毫米厚冠状切片上通过整合 10 个切片中每一个的梗死区的面积计算总的梗死体积。用“间接方法”，即对侧脑半球减去同侧非梗死体积，来计算梗死体积。数据以平均值 ± 标准偏差表示。采用单因素方差分析和 Tukey 多重比较检查对不同组间的值进行分析。采用 Kruskal-Wallis 非参数方差分析和 Dunn 多重比较检查对神经功能缺损评分进行分析。P < 0.05 就确定为具有统计学显著意义。

[0410] 使用 MCA 闭塞让动物处于 1 小时的缺血，随后再灌注 24 小时，在缺血前给予 meclizine 或 vehicle 对照品（见图 35A）。

[0411] 如图 35B 和 35D 所示，与对照动物相比，meclizine 处理的动物的梗死体积显著降低，而 CBF 没有差异显著（图 35C）。

[0412] 这些观察结果支持 meclizine 可用于保护防止中风。总之，此处所给出的结果支持，meclizine 可用于防止心脏、大脑（中枢神经系统）、和肾脏中缺血再灌注促进的细胞损伤。

[0413] 实施例 7: Meclizine 和糖尿病

[0414] 此处给出的数据表明，meclizine 可用于糖尿病的治疗。

[0415] 按照如下操作，根据葡萄糖摄取协议对完全分化的 C2C12 成肌管进行处理。简而言之，在含有 0.1% DMSO 作为对照，50 微摩尔 meclizine, 50 微摩尔 S-meclizine, 或 2mM 甲福明二甲双胍的无血清的培养基中孵育 C2C12 成肌管 4 小时。随后将细胞在无血清和葡萄糖的缓冲液中孵育 30 分钟，然后过渡到含有 [3H]-2-脱氧葡萄糖的缓冲液中孵育 5 分钟。多次清洗后，裂解细胞，并将裂解液进行闪烁计数以量化摄取量。数据按每分钟原始计数表示，该数据与 2-脱氧葡萄糖的摄取量成比例。

[0416] 如图 36 所示，meclizine 和 S-meclizine 促进了 C2C12 成肌管中基底葡萄糖摄取

的

[0417] 增加。此外, meclizine 和 S-meclizine 也激活了 AMP 激酶, 如图 24C 所示。

[0418] 细胞研究表明, meclizine 和 S-meclizine 具有降低血糖的作用。此外, meclizine 和 S-meclizine 能够激活 AMPK。

[0419] 总之, 这些数据支持 meclizine 和 S-meclizine 作为糖尿病的治疗潜力。

[0420] 实施例 8 :Meclizine 和寄生虫感染

[0421] 此处给出的数据表明, meclizine 可用于治疗某些寄生虫引起的感染。

[0422] 磷脂是所有真核细胞中一种主要的磷脂类。可通过以下方式合成磷脂:(i) Kennedy 途径的 CDP- 乙醇胺分支反应;(ii) 磷脂酰丝氨酸脱羧;或(iii) 与磷脂酰丝氨酸的阳离子交换。在包括人类在内的哺乳动物中, 所有这三个途径都是可以实现的。但是, 在某些病原体中, 包括布氏锥虫 (*Trypanosoma brucei*)——一种导致人类和动物的非洲锥虫病(昏睡病)的病原体, *Trypanosoma Cruzi*——一种能引起南美洲锥虫病(Chagas disease)的寄生虫, 和恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*)——人类疟疾寄生虫, 磷脂主要是通过 Kennedy 路经合成的。因此, 我们假设 meclizine 能够有效杀死这些寄生虫。如表 5 所示, Meclizine, R-meclizine 和 S-meclizine 在低的微摩尔范围内能杀死半数有效量 (ED50) 的布氏锥虫。

[0423] 表 5- 对布氏锥虫的有效性

[0424]

化合物	ED50
Meclizine	$1.41 \pm 0.12 \mu\text{M}$
R-meclizine	$0.66 \pm 0.05 \mu\text{M}$
S-meclizine	$3.43 \pm 0.23 \mu\text{M}$

[0425] 其他实施例

[0426] 可以理解的是, 尽管已结合其详细描述对本发明进行了说明, 上述描述只是对本发明进行说明, 而不是限制权力要求书中所载的有关本发明的权力要求范围。其他方面, 优势, 以及对本发明的修改均在以下权利要求的保护范围内。

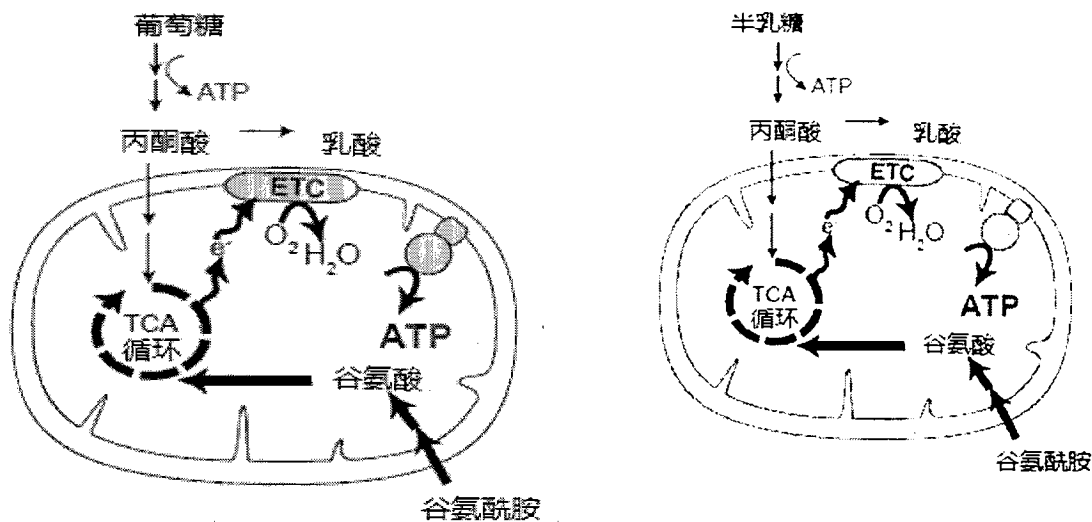


图 1A

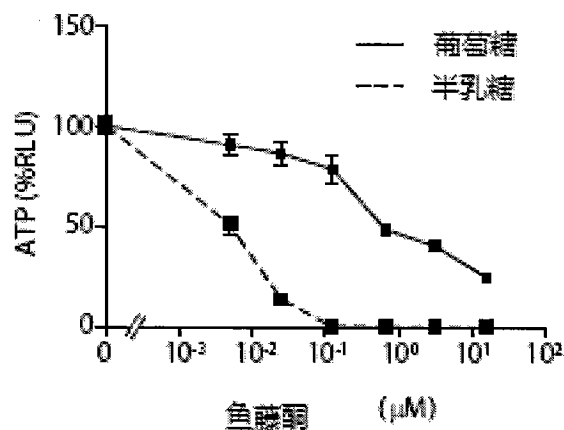
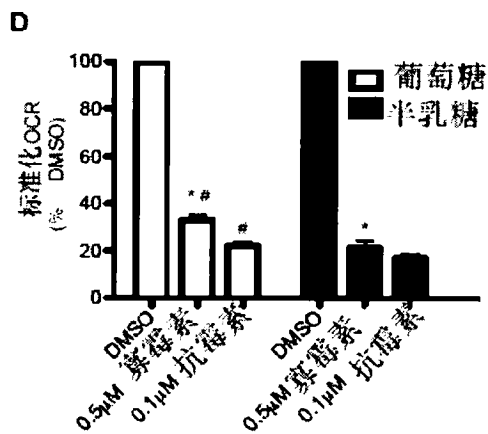
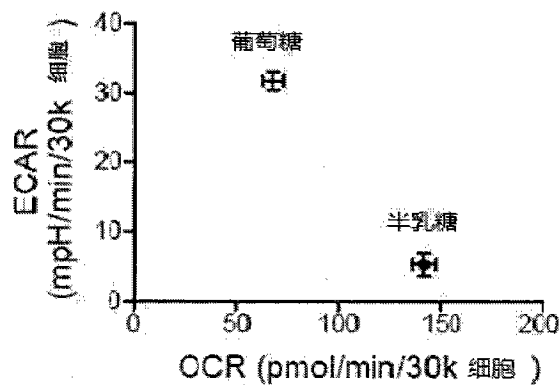


图 1E

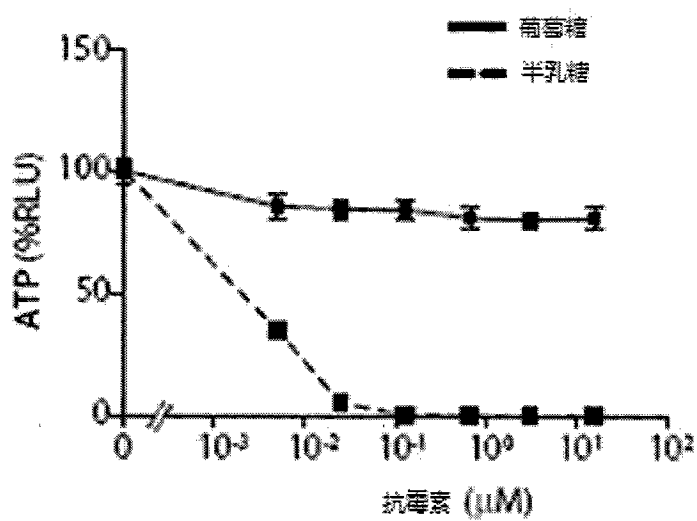


图 1F

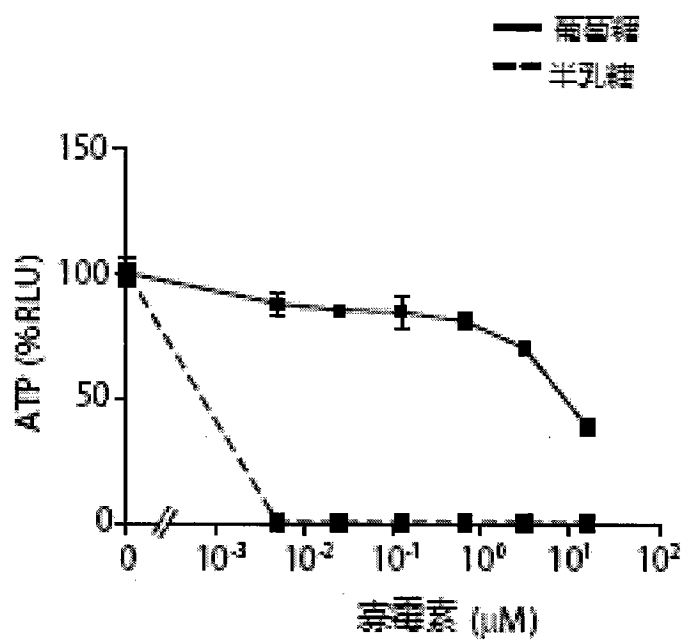


图 1G

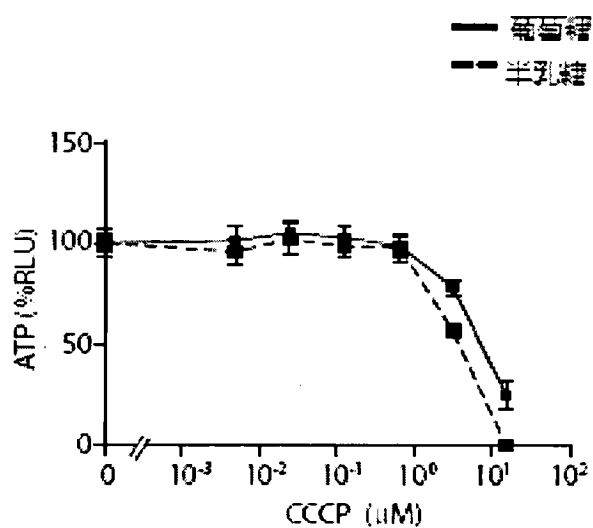


图 1H

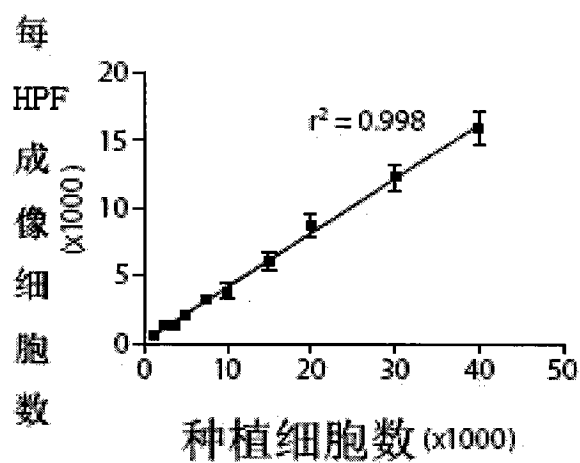


图 2A

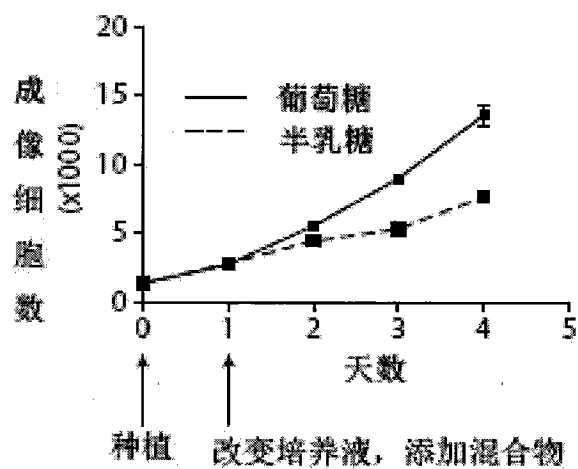


图 2B

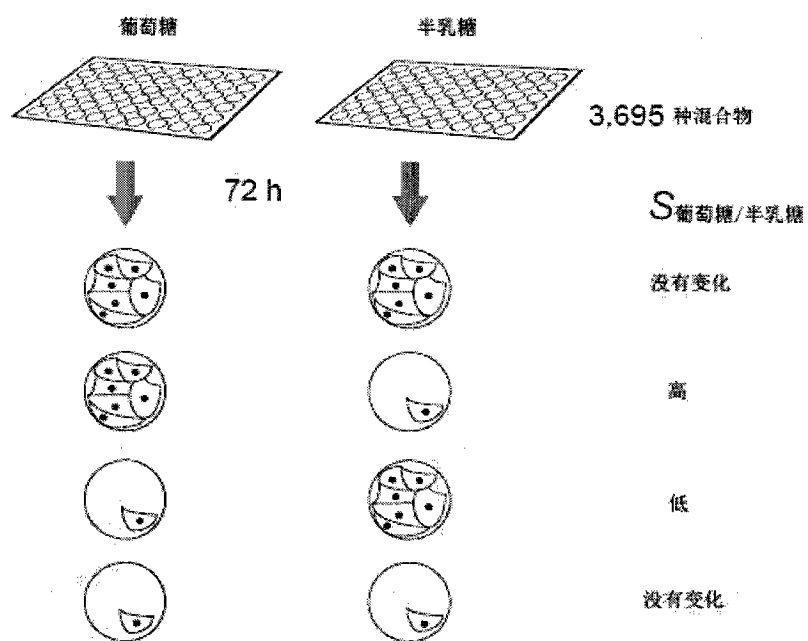


图 2C

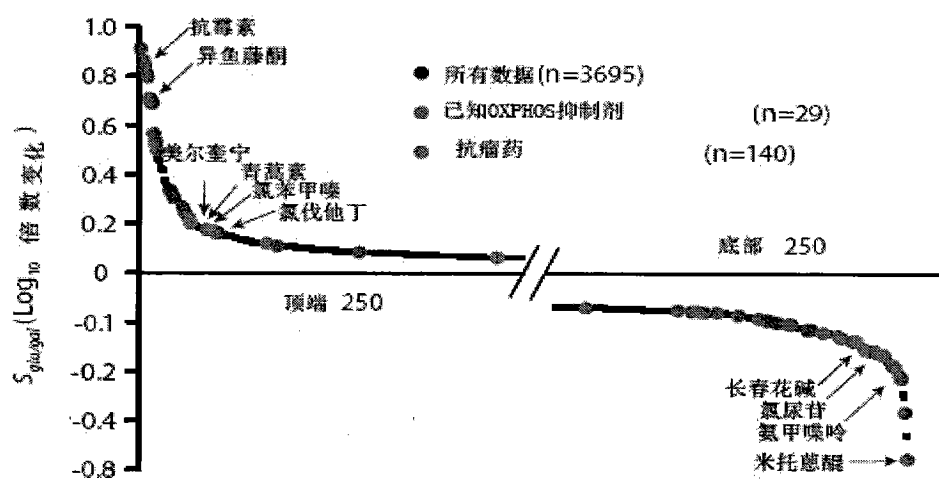


图 2D

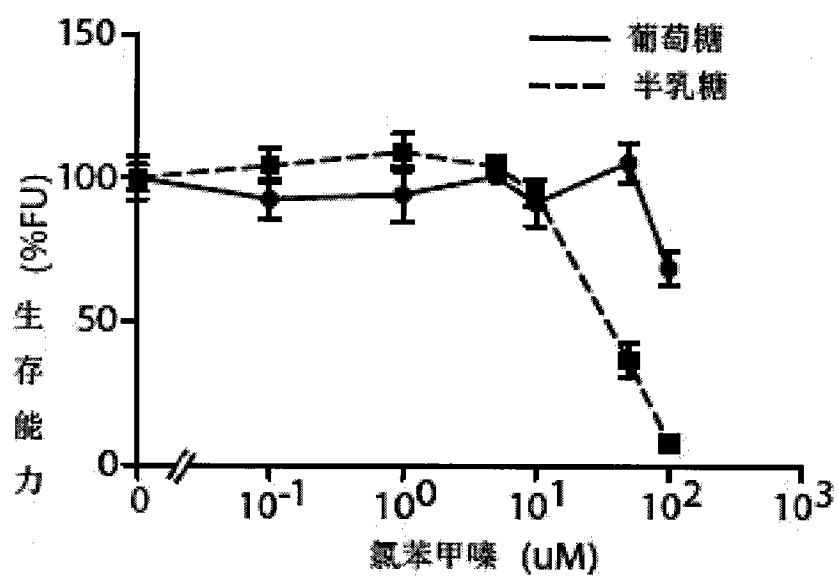


图 3A

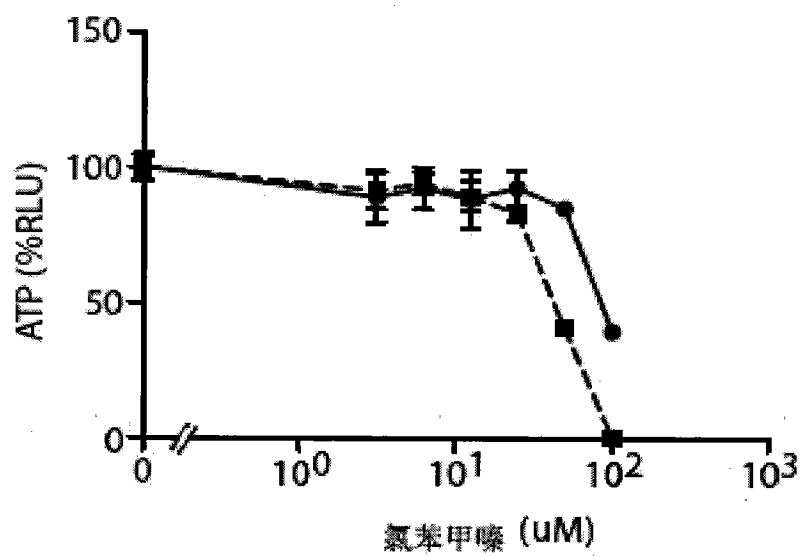


图 3B

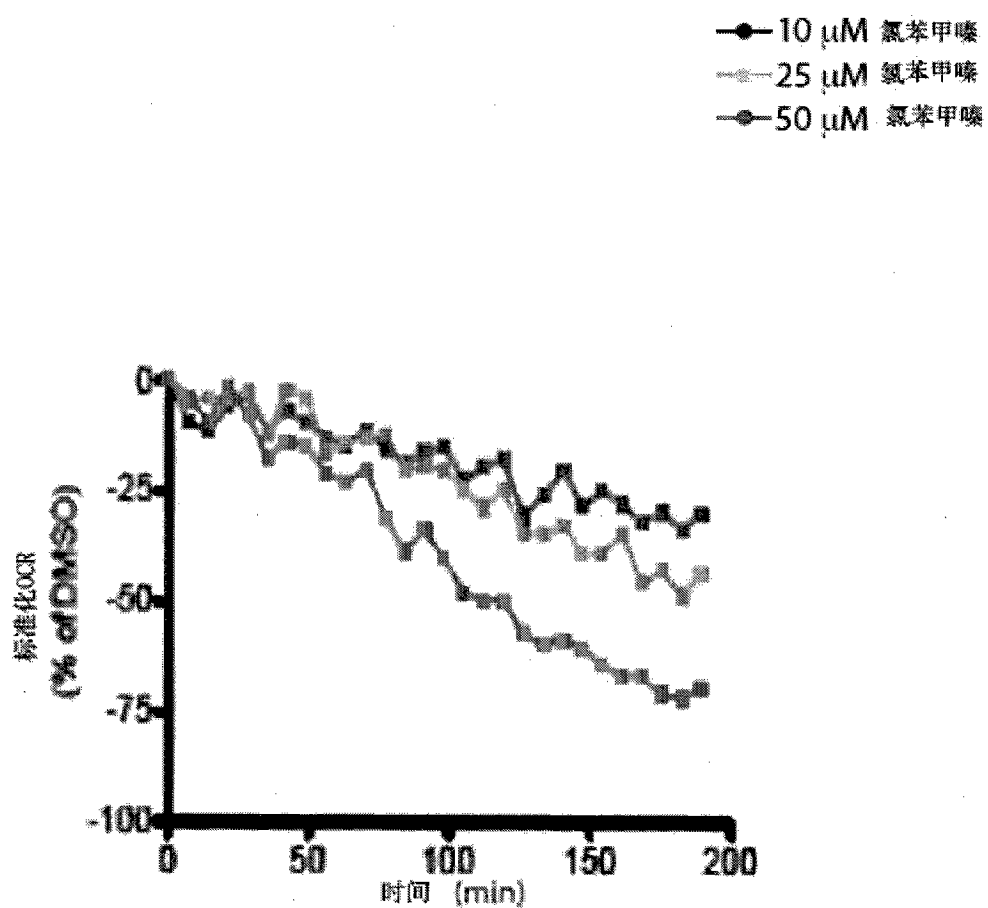


图 3C

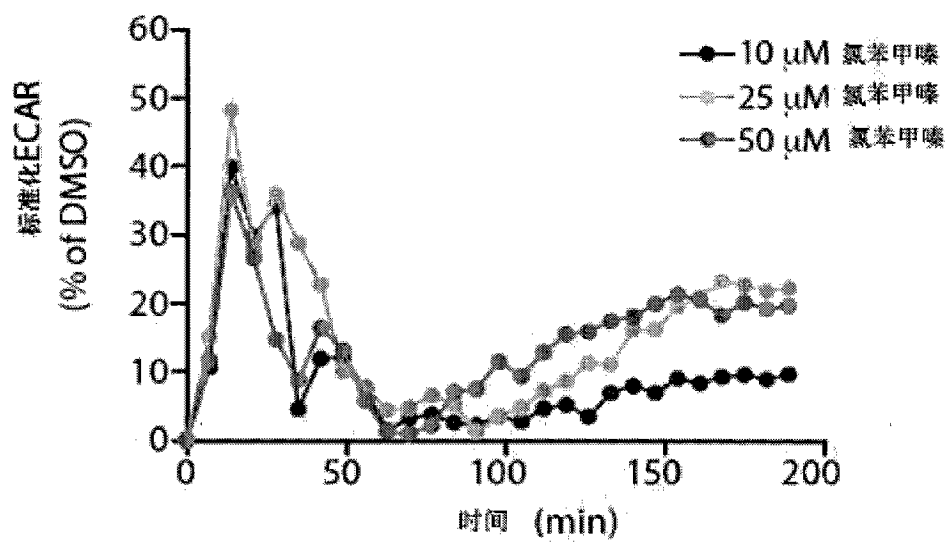


图 3D

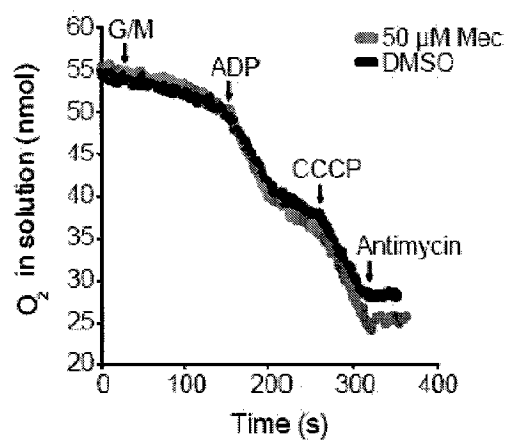


图 3E

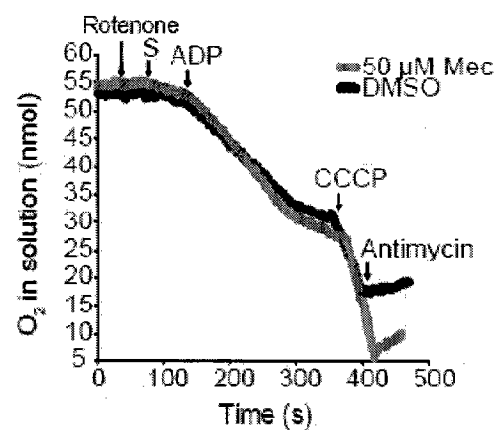


图 3F

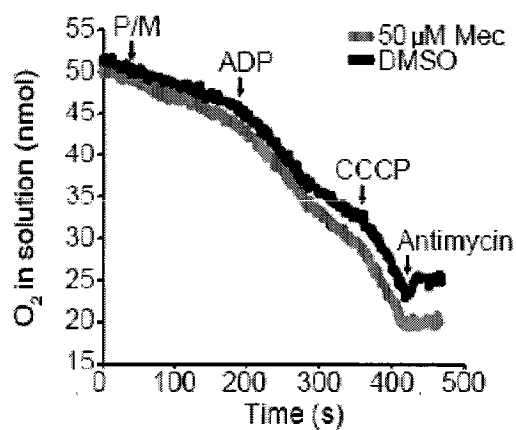


图 3G

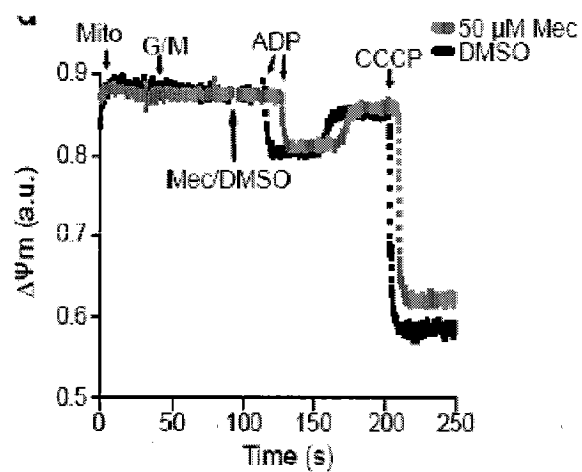


图 3H

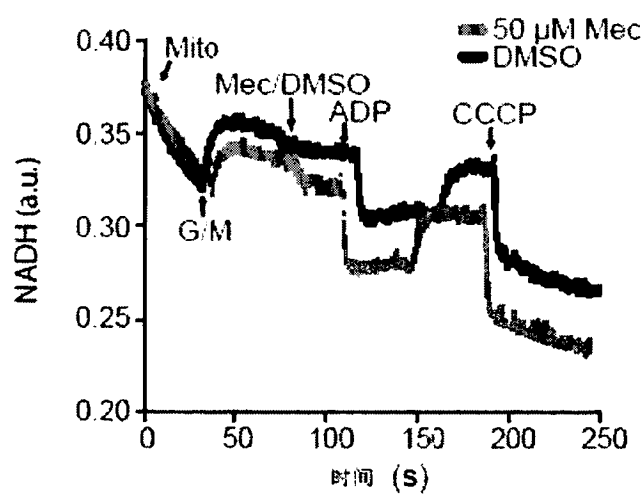


图 3I

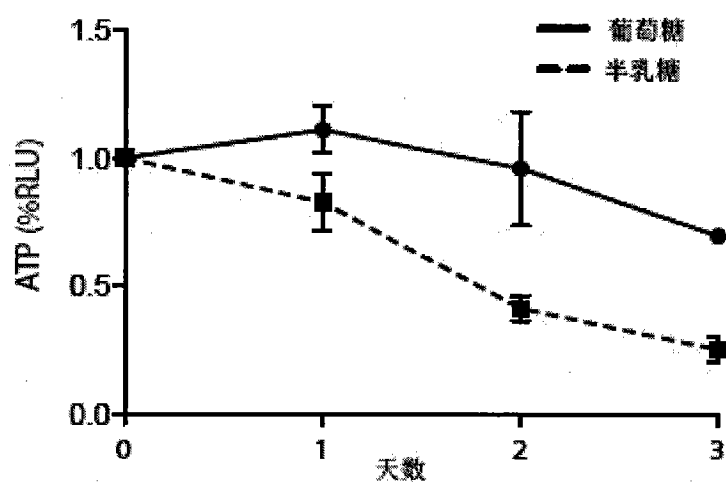


图 3J

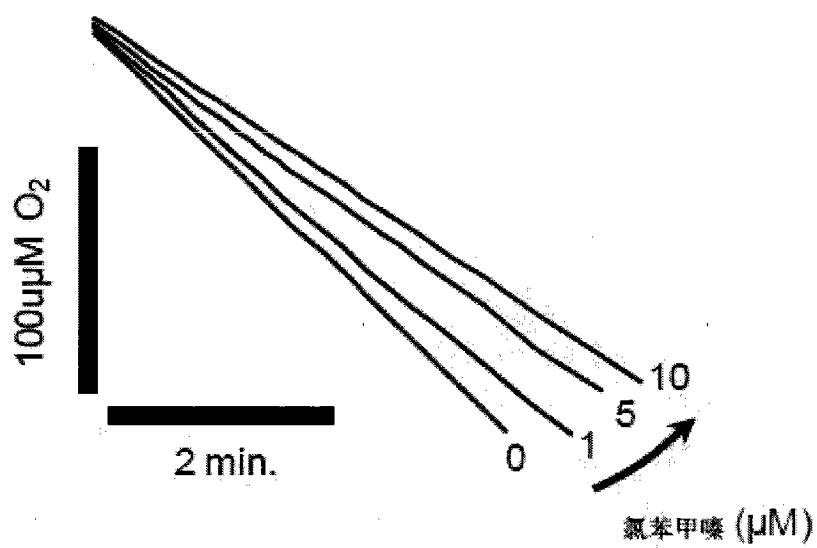


图 3K

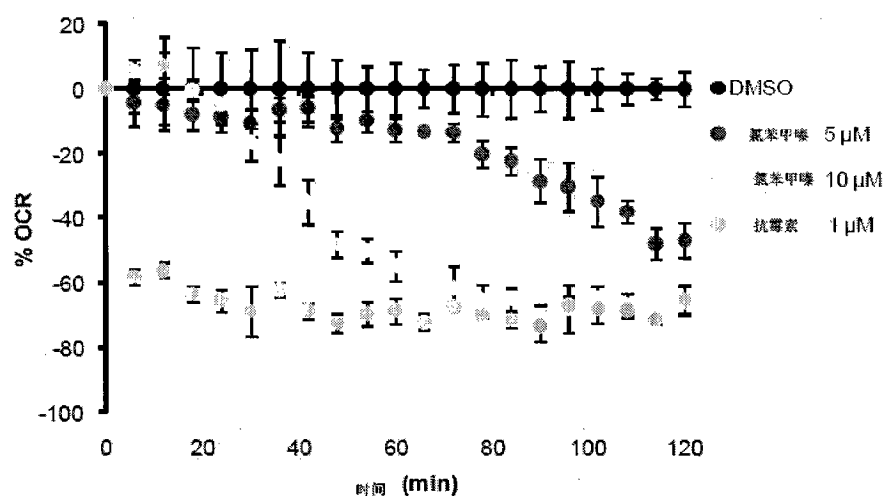


图 3L

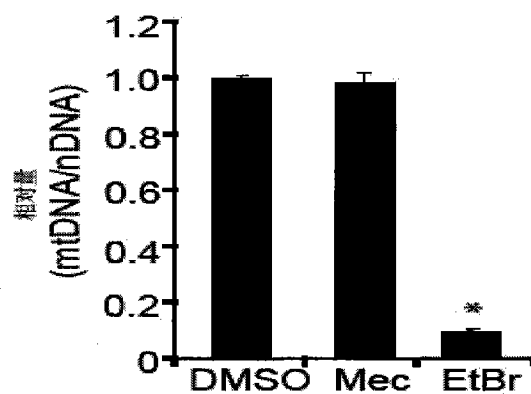


图 3M

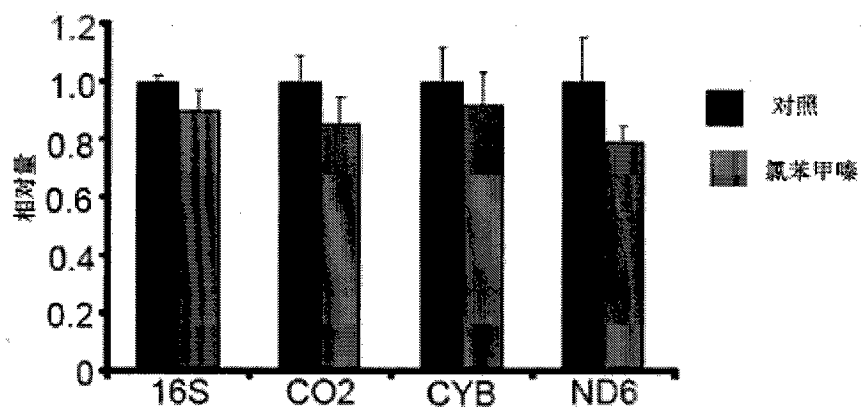


图 3N

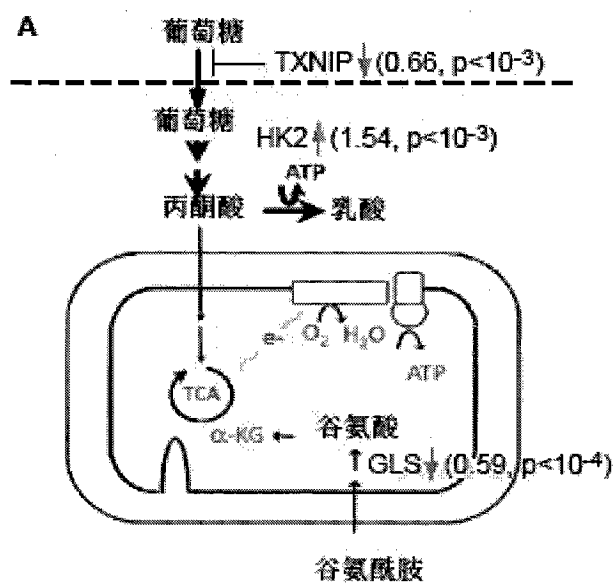


图 4A

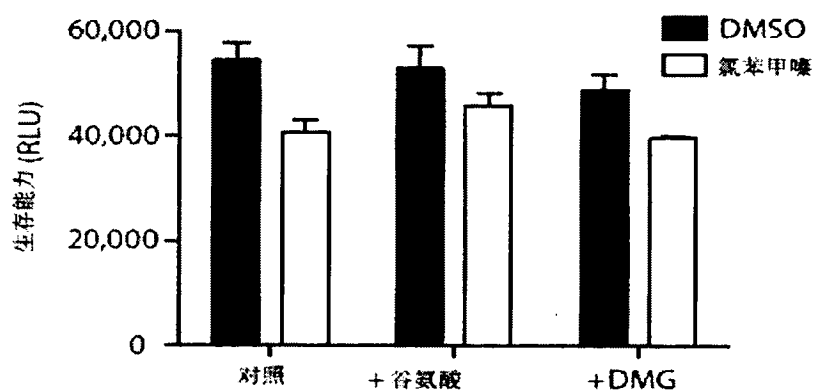


图 4B

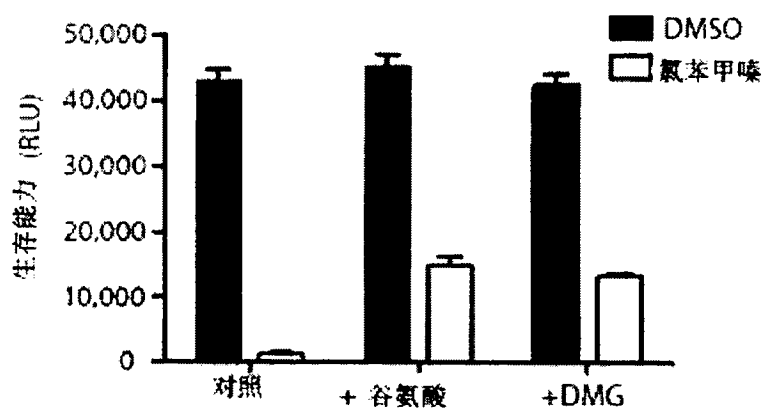


图 4C

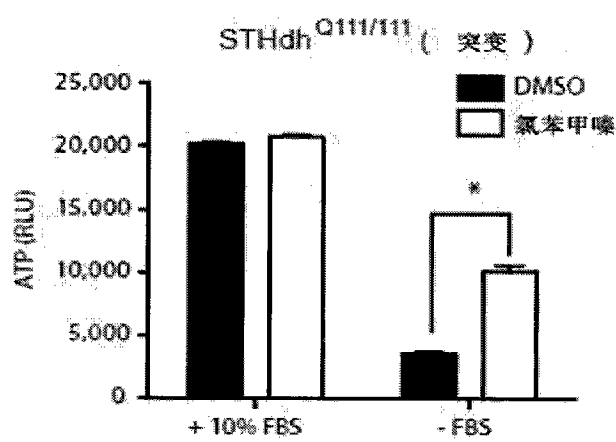


图 5A

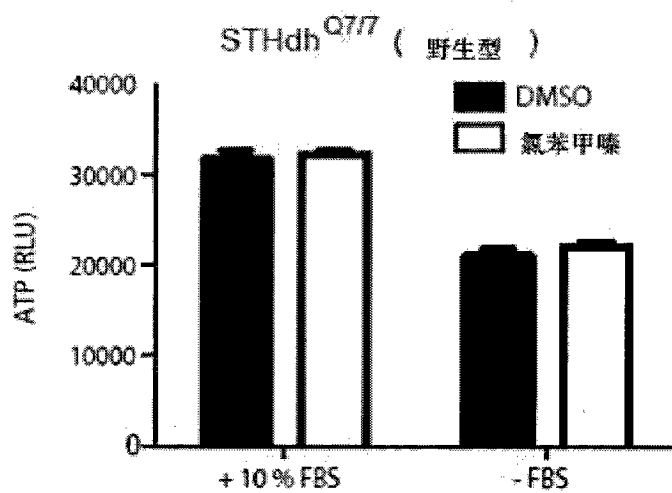


图 5B

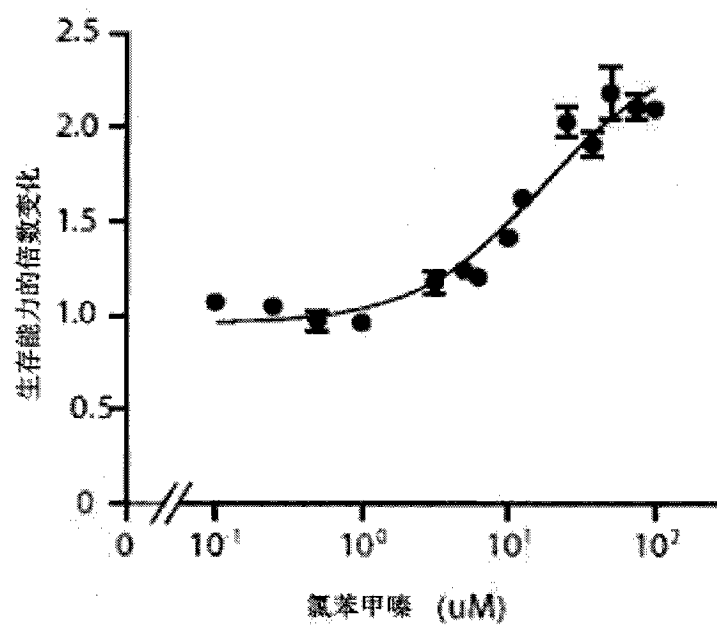


图 5C

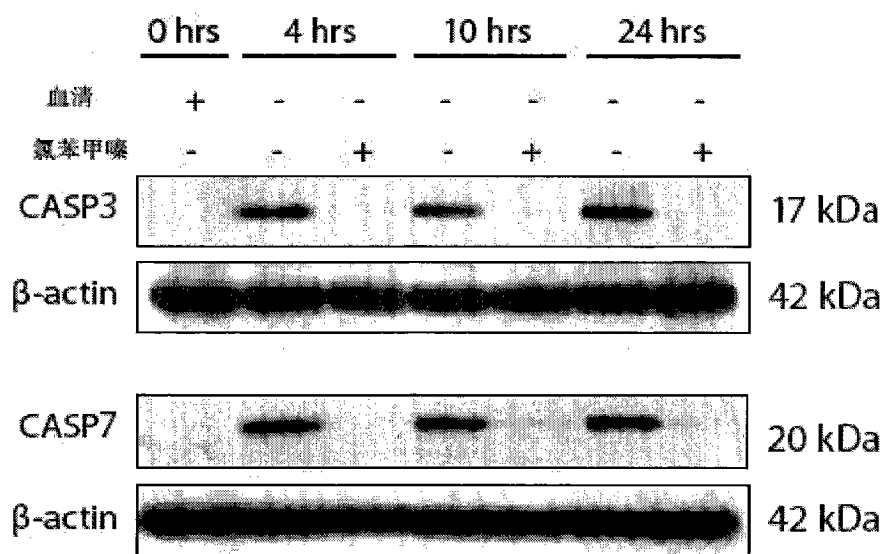


图 5D

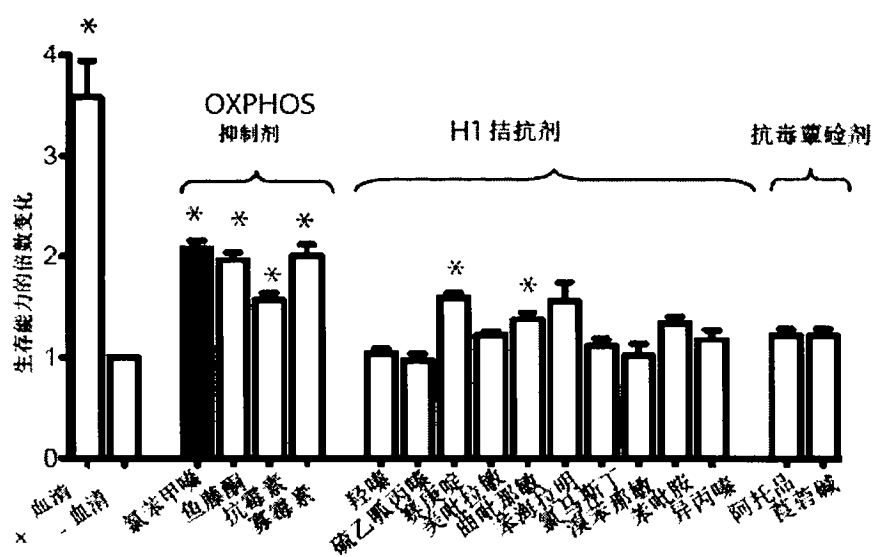


图 5E

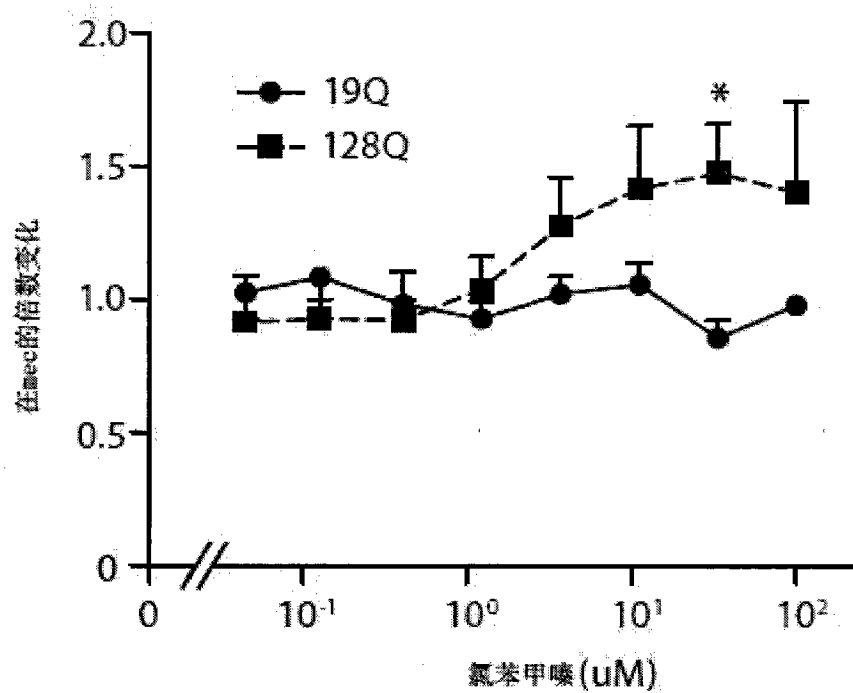


图 5F

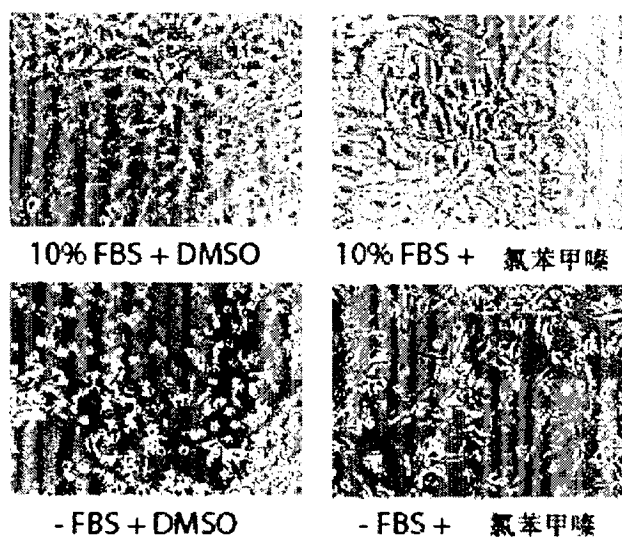


图 5G

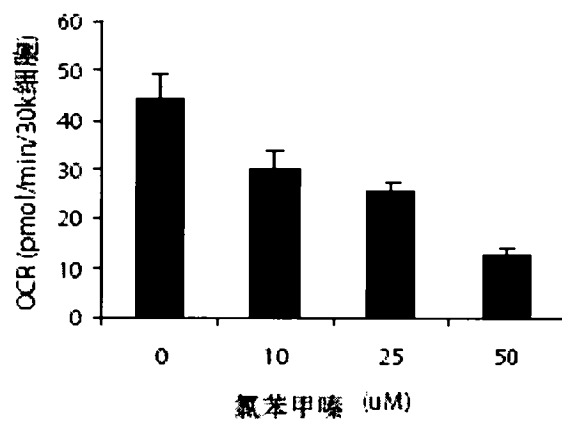


图 6A

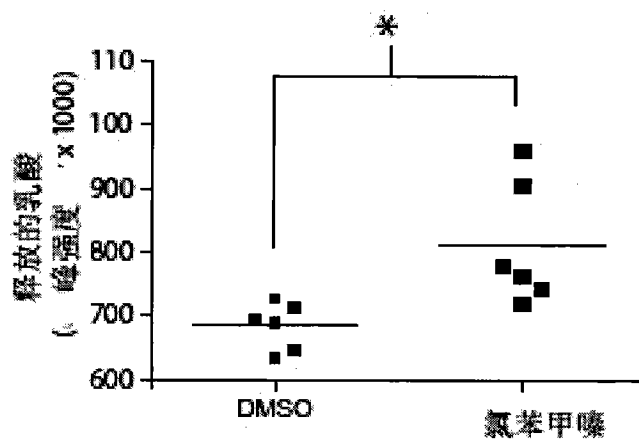


图 6B

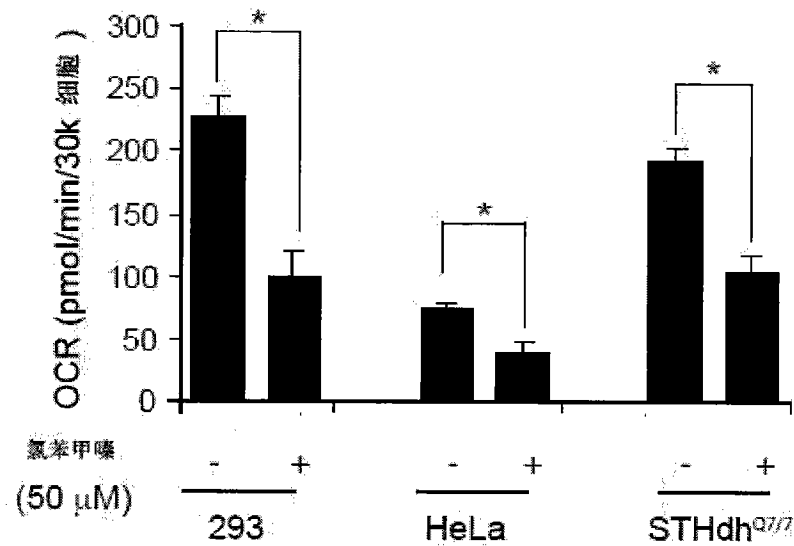


图 7A

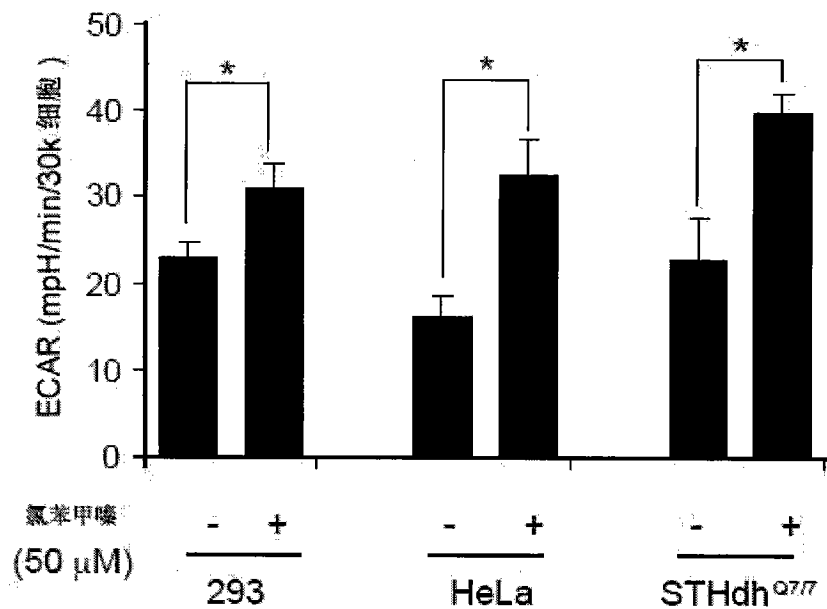


图 7B

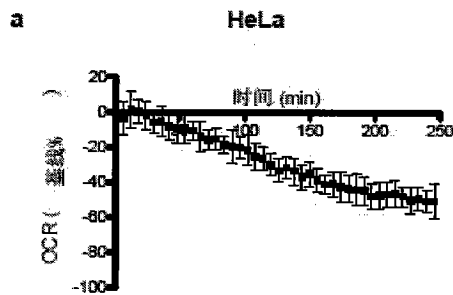


图 8A

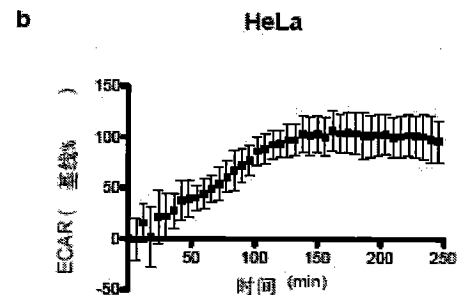


图 8B

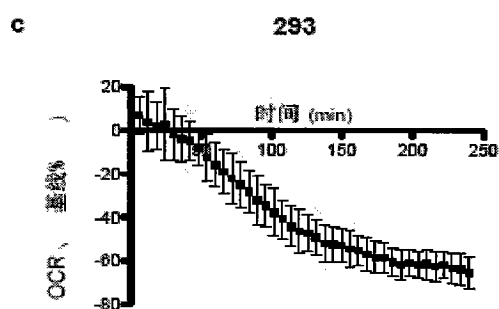


图 8C

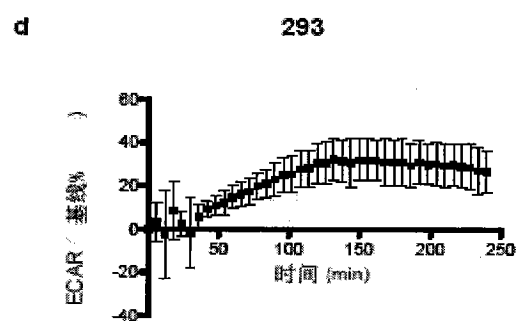


图 8D

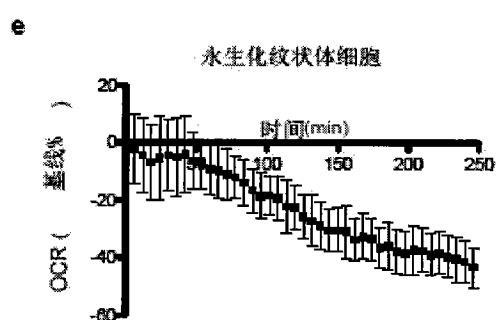


图 8E

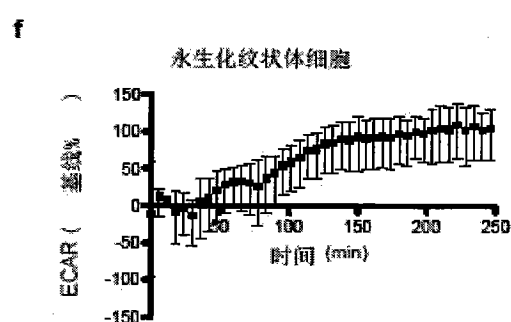


图 8F

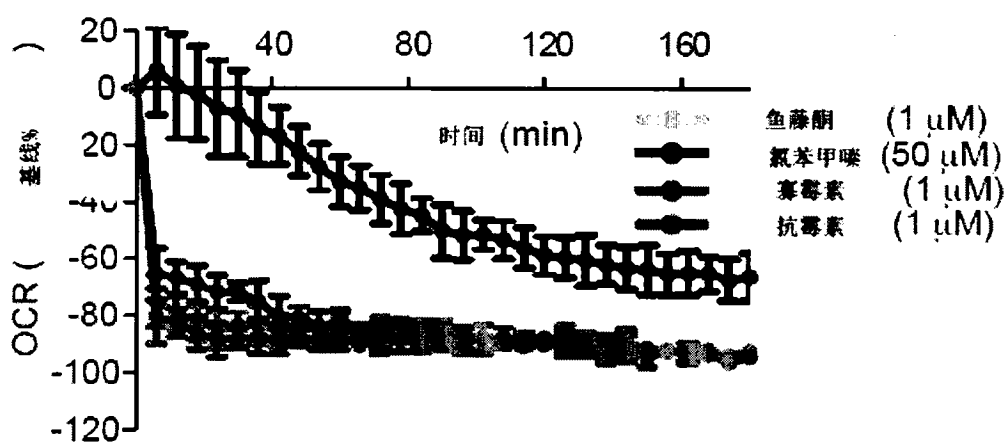


图 9

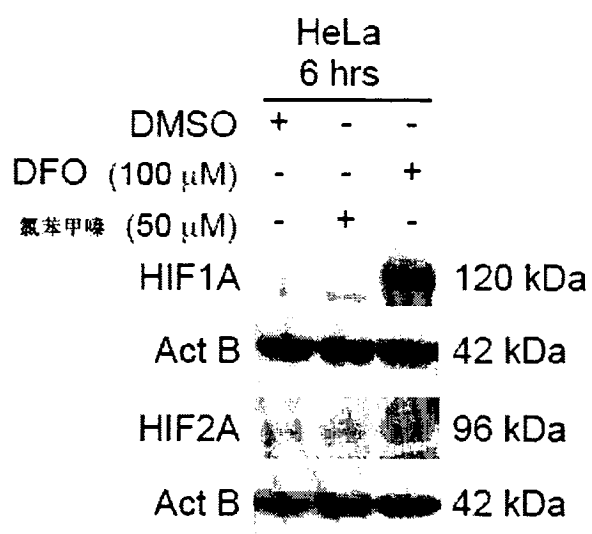


图 10A

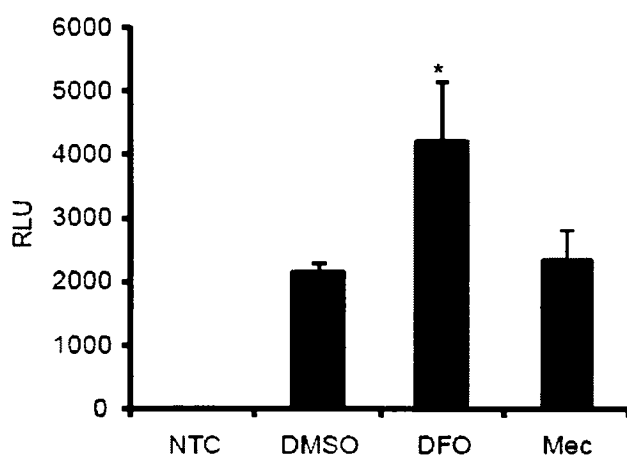


图 10B

标记基因	倍数变化
LOC401805	1.66
DUSP6	1.49
ERRFI1	1.46
VEGFA	1.34
PVR	1.27
HIF3A	1.20
TUBB3	1.04
UGP2	0.86
RAPGEF6	0.85
SLC38A6	0.79
TXNIP	0.60
→ GLS	0.58
INSIG1	0.52
LDLR	0.46

图 11A

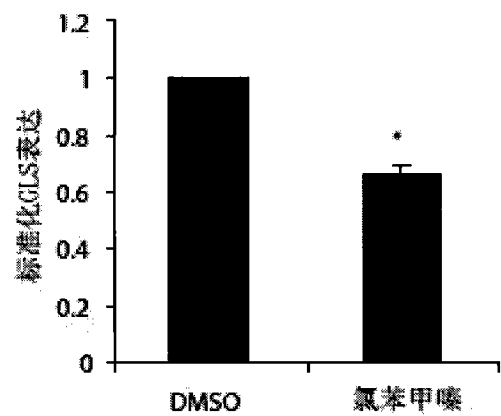


图 11B

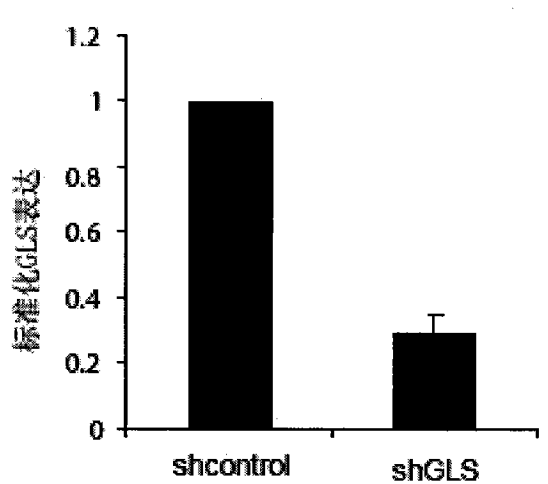


图 12A

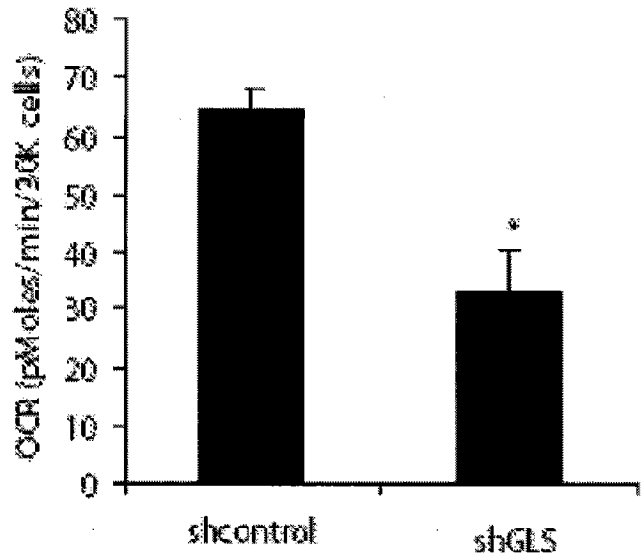


图 12B

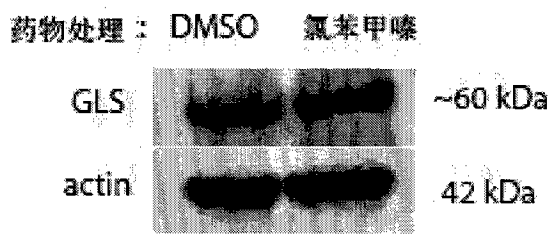


图 13



图 14A

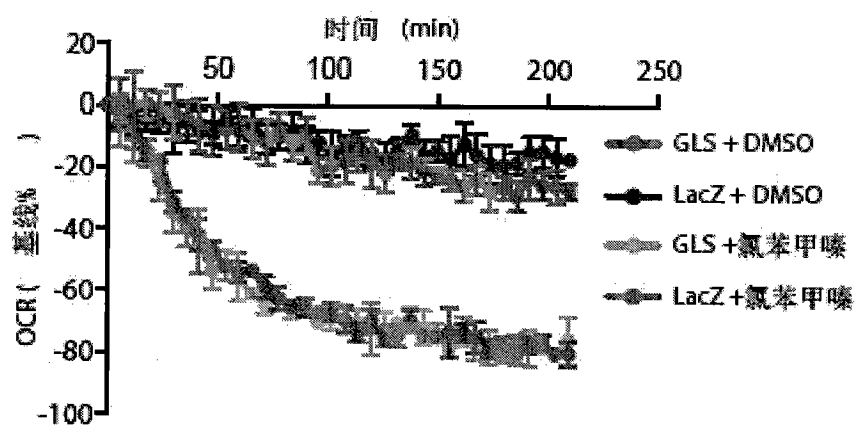


图 14B

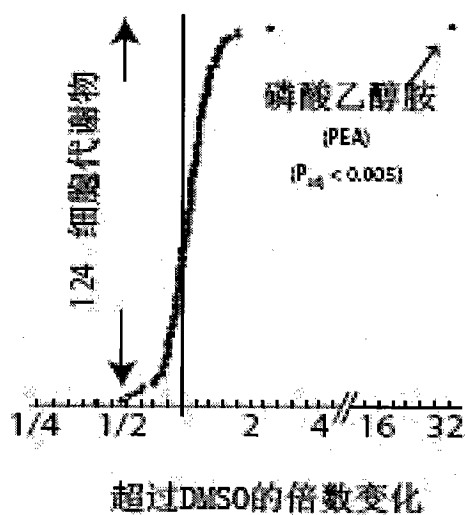


图 15A

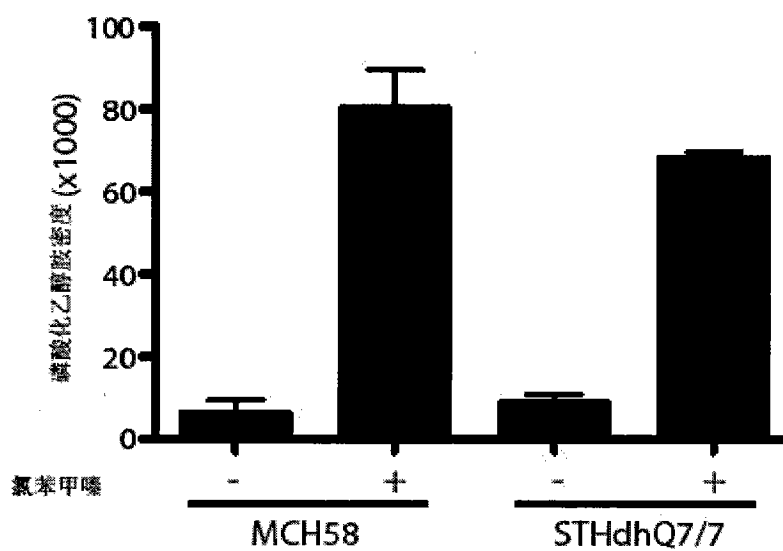


图 15B

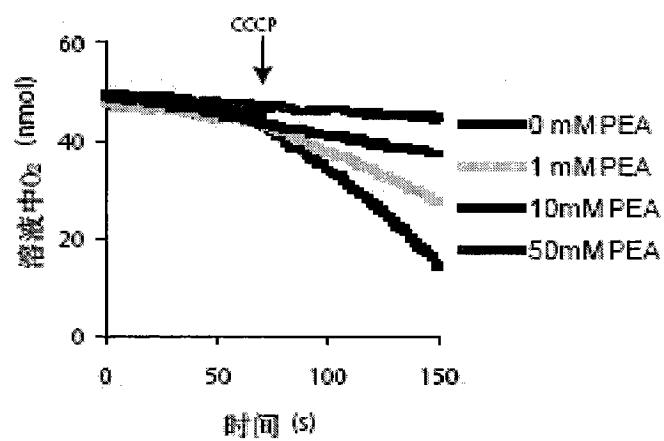


图 16A

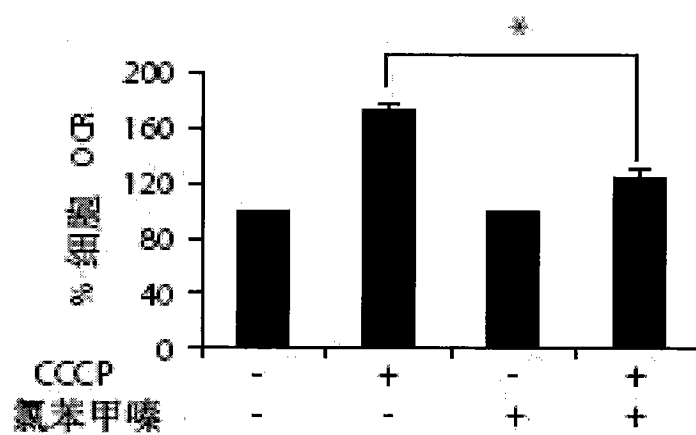


图 16B

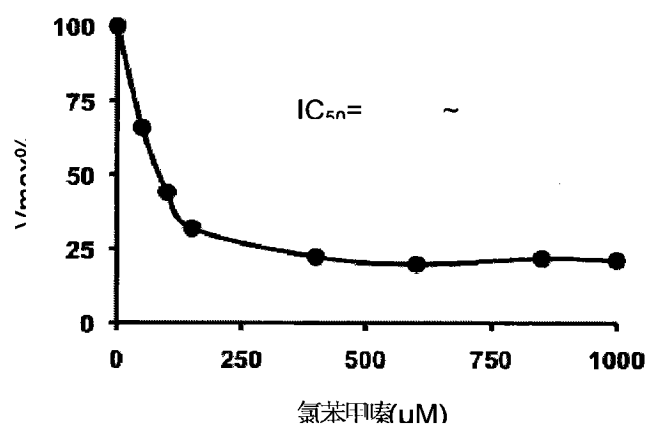


图 16C

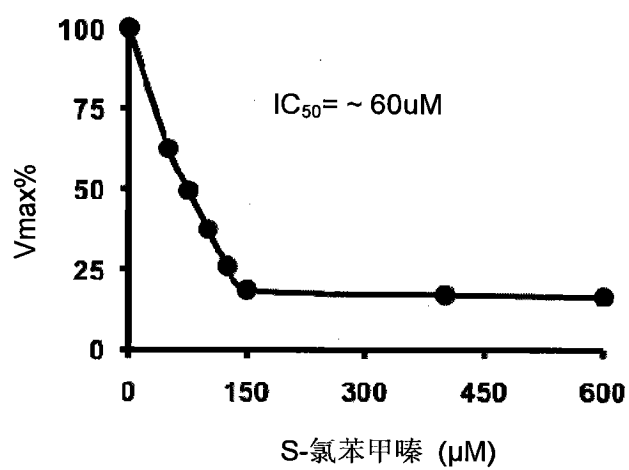


图 16D

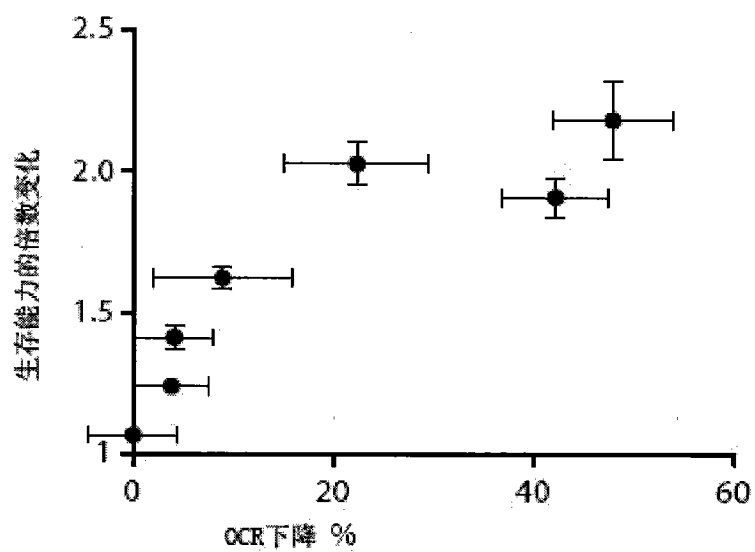


图 17A

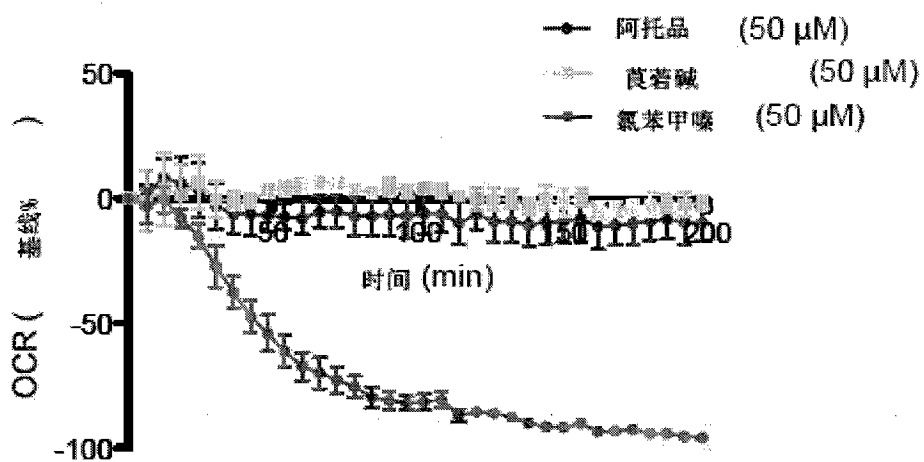


图 17B

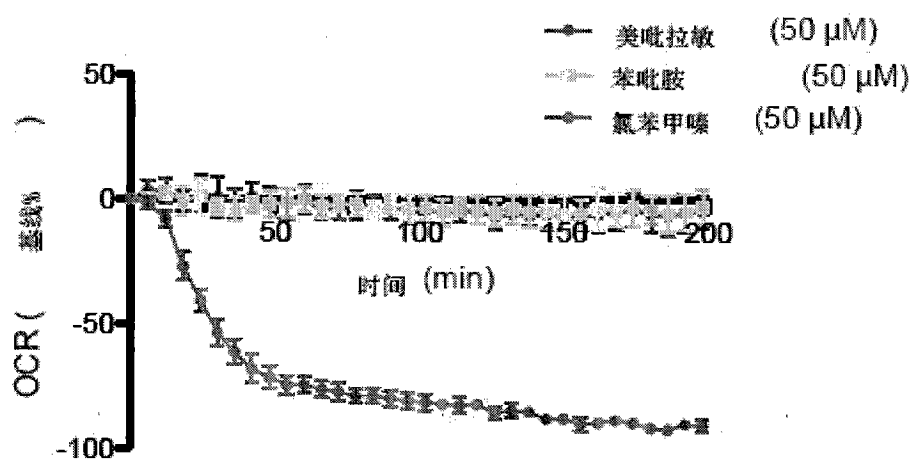


图 17C

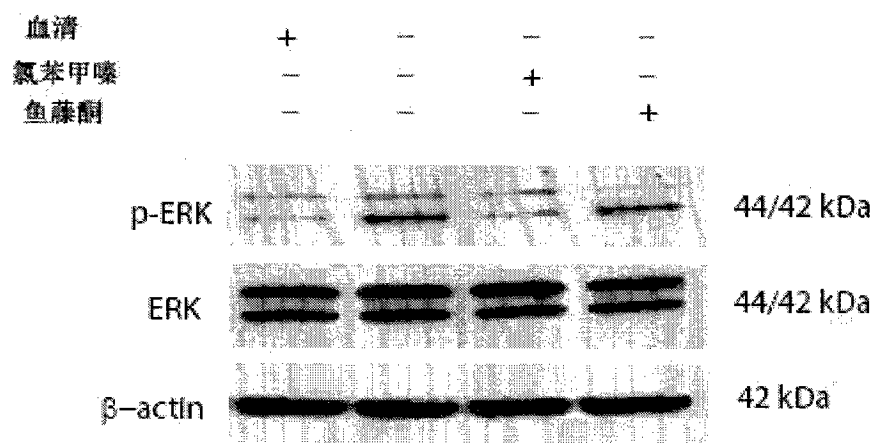


图 18A

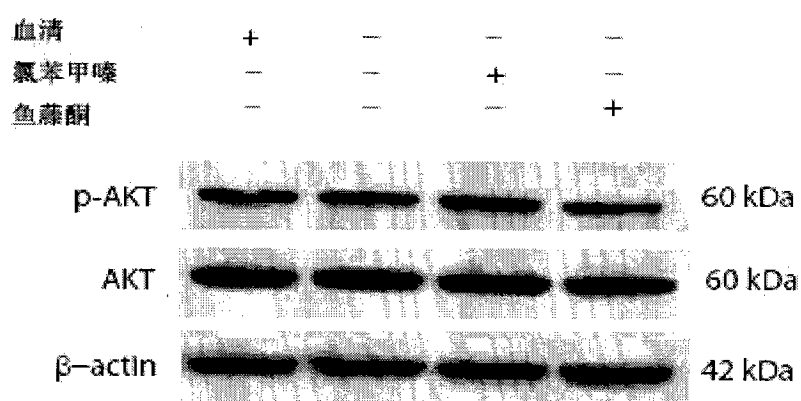


图 18B

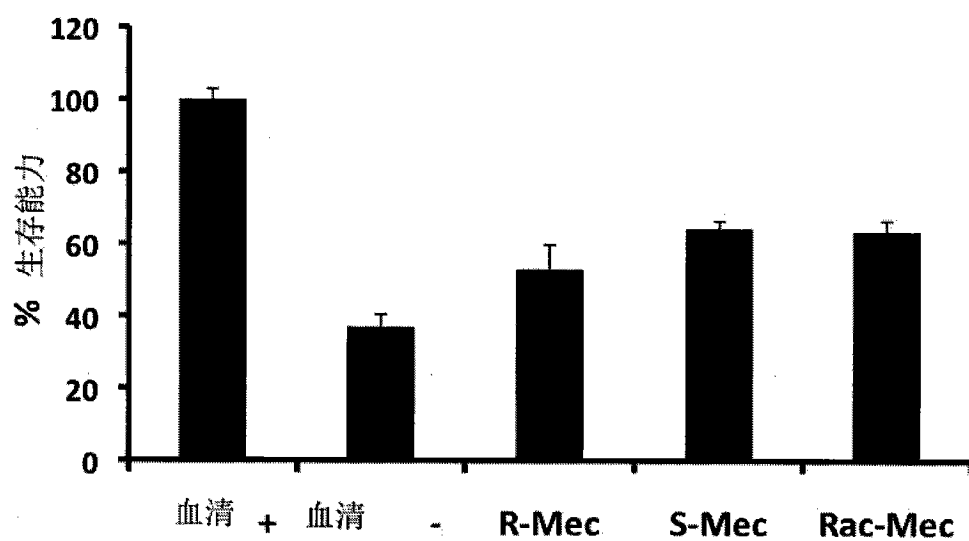


图 18C



图 19A

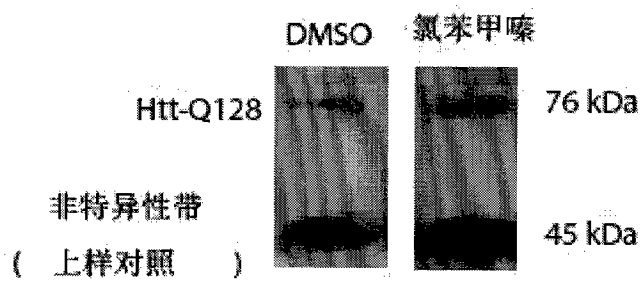


图 19B

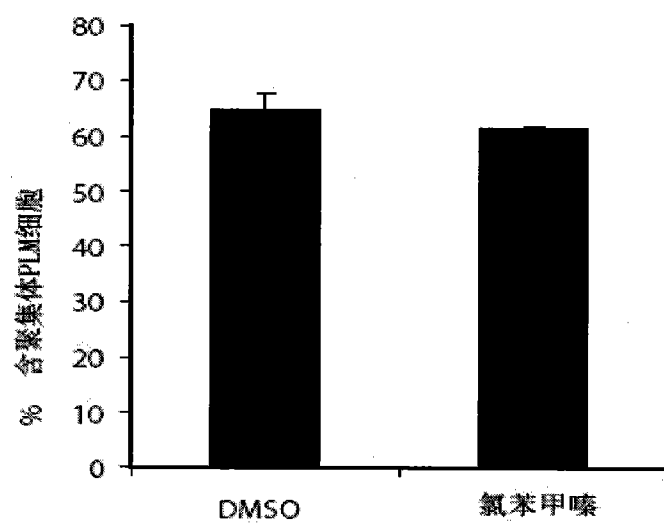


图 20

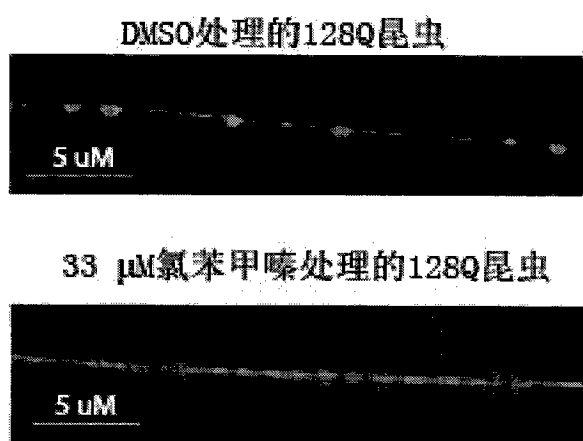


图 21A

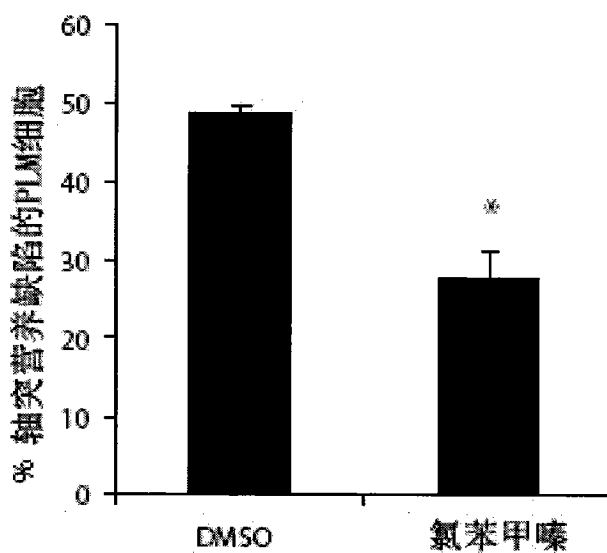


图 21B

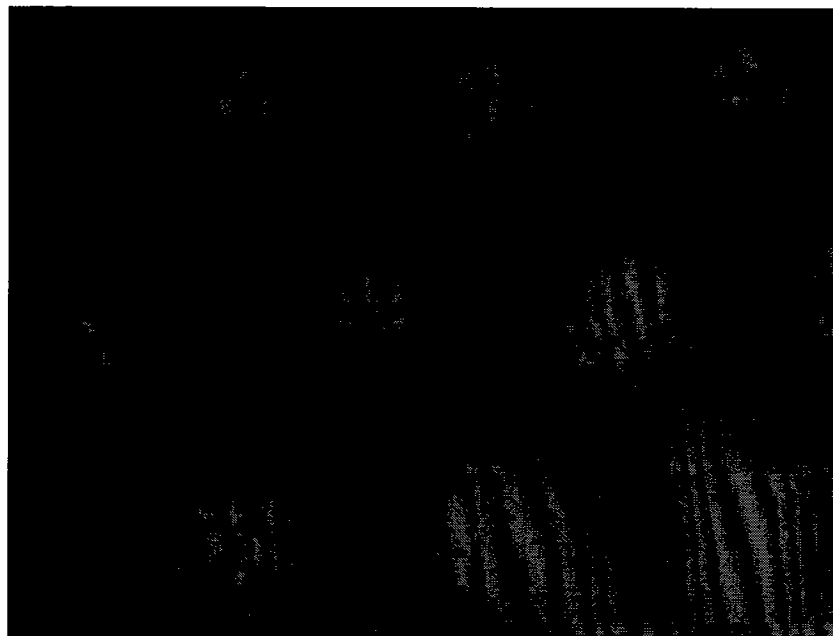
A**0天中蝇类小眼表达的突Htt (Q128/128)**

图 22A

B

在10天时蝇类小眼表达的突变Htt (Q128/128)

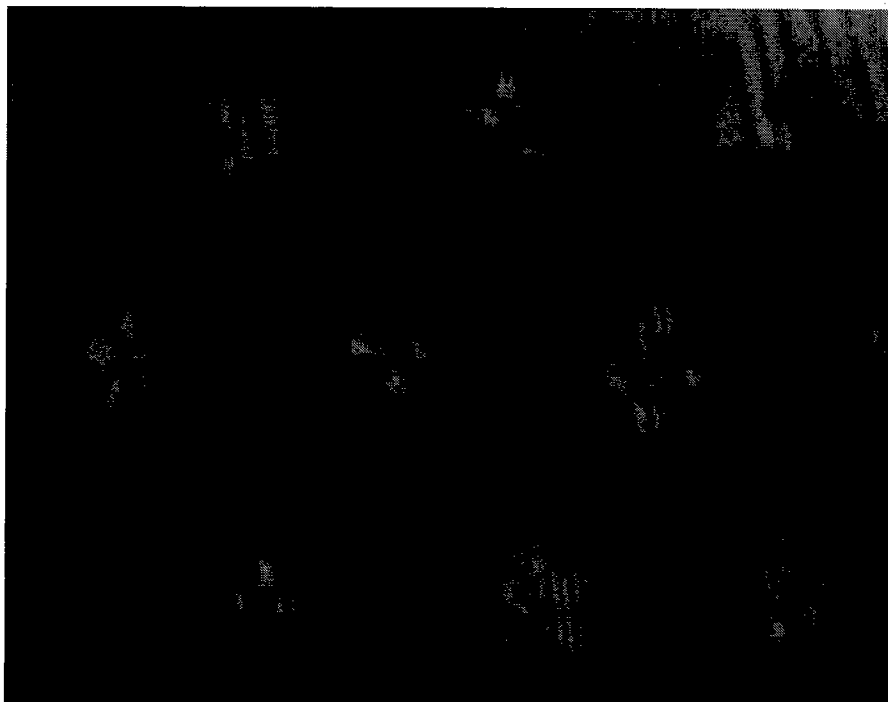


图 22B

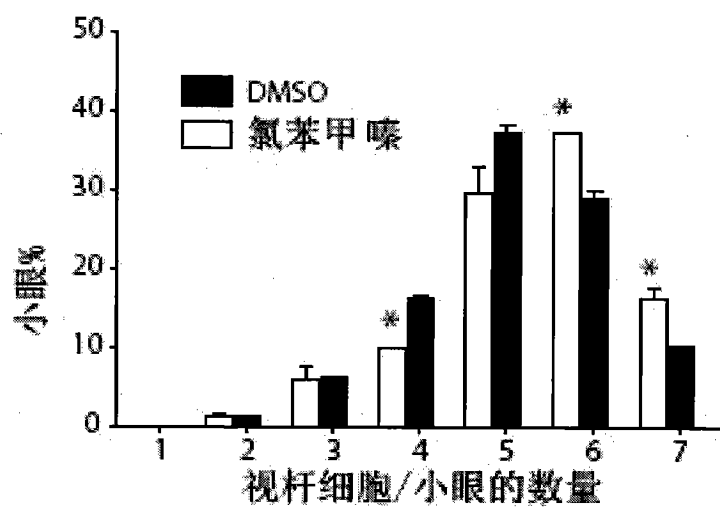


图 23

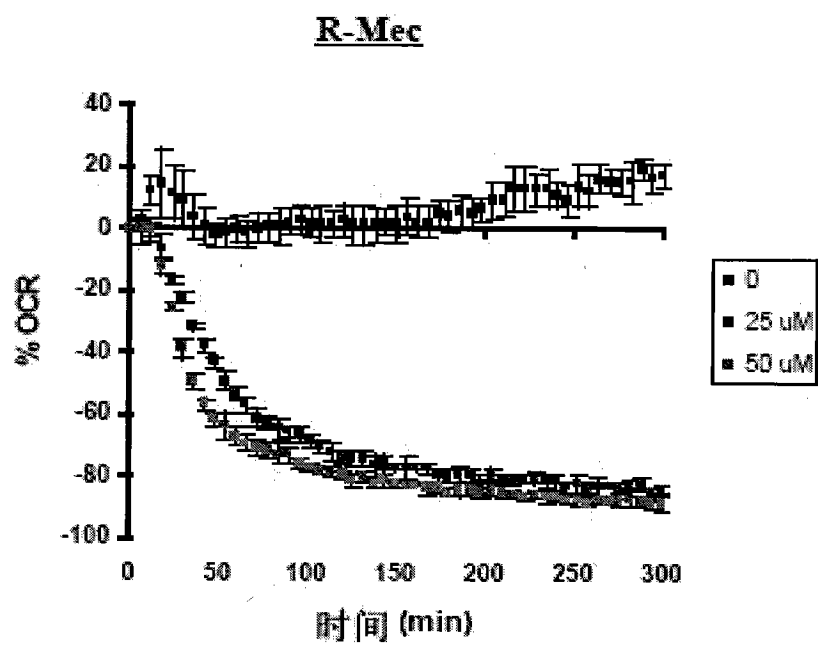


图 24A

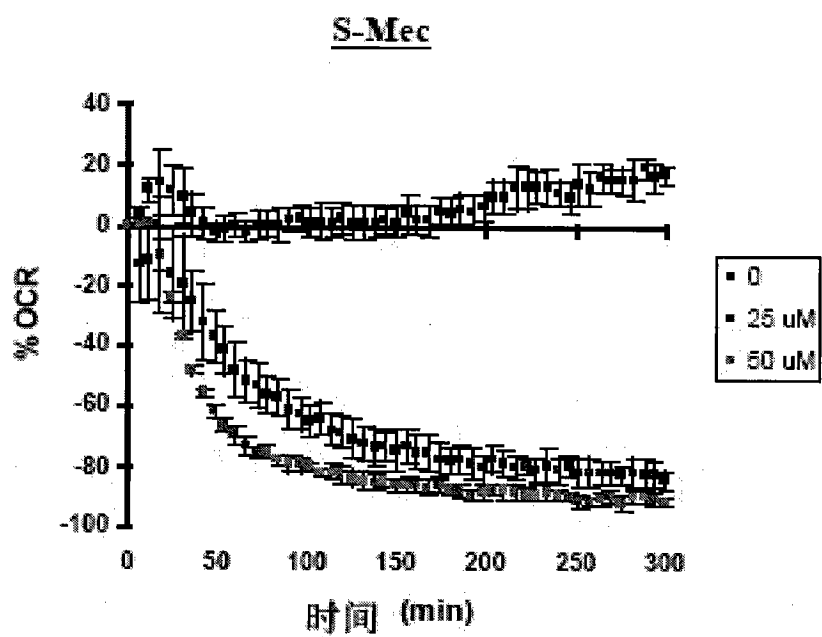


图 24B

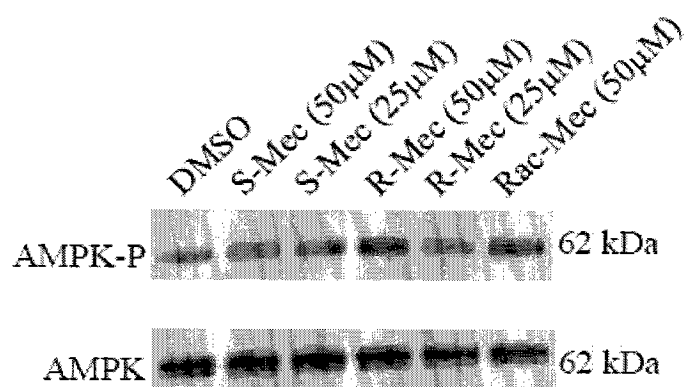


图 24C

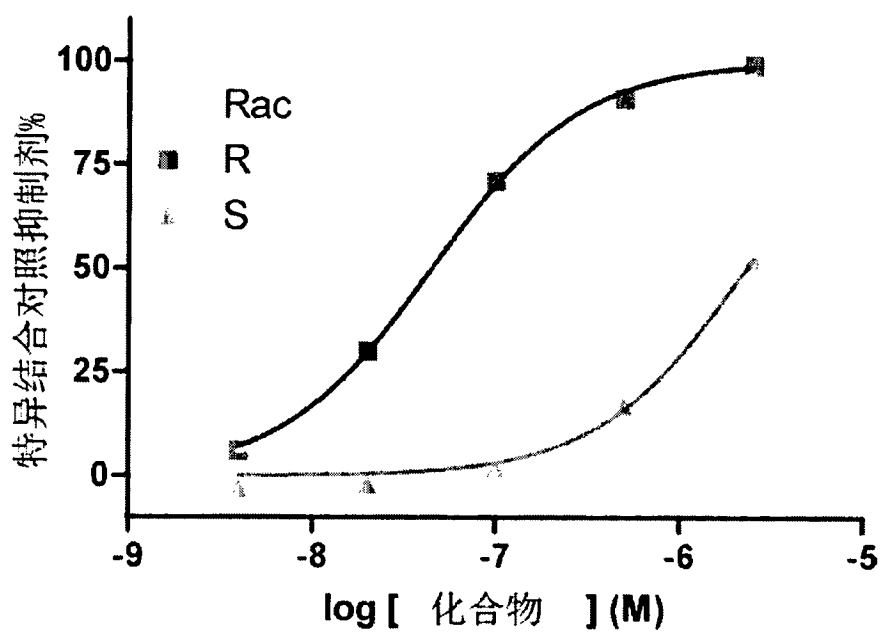


图 24D

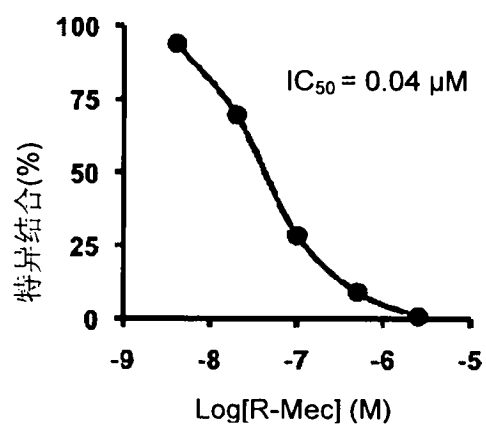


图 24E

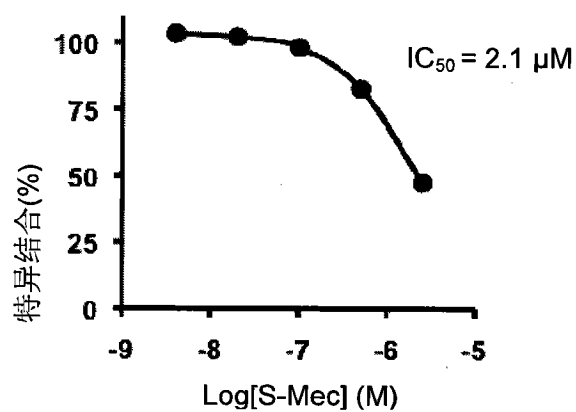


图 24F

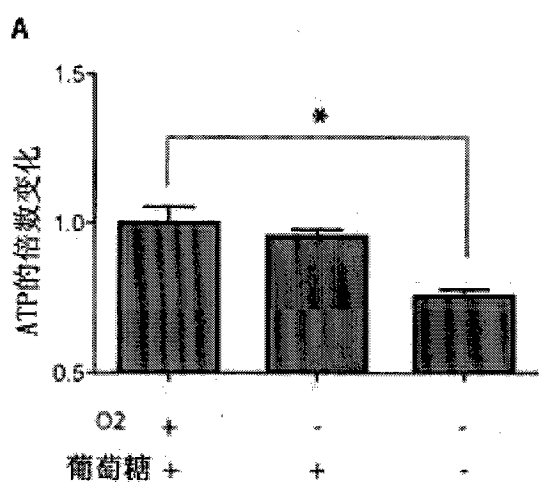


图 25A

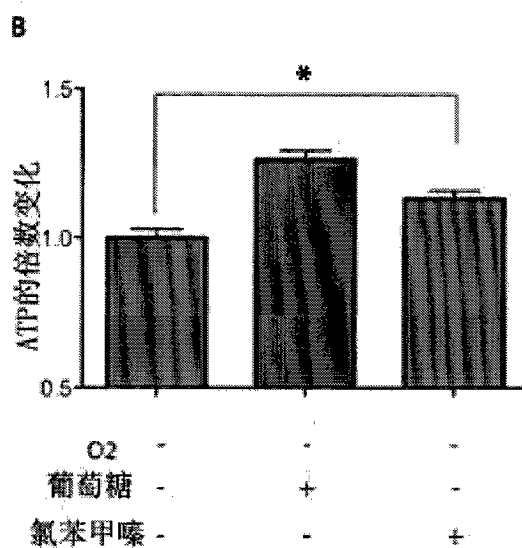


图 25B

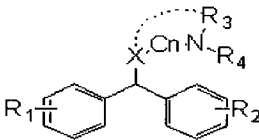
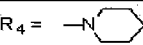
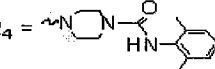
Subclass I								
								
化合物	R1	R2	X	n	R3	R4	Sglu/gal	FcAvg glu/gal
								
苯甲嗪	H	H	N	2	(CH ₂) ₂	CH ₃ -	0.01	1.03
氯环嗪	p-Cl	H	N	2		CH ₃ -	0.15	1.4
氯苯甲嗪	p-Cl	H	N	2		3-MePhCH ₂ -	0.16	1.45
安其敏	p-Cl	H	N	2		4-tBu-PhCH ₂ -		
羟嗪	p-Cl	H	N	2		HO(CH ₂) ₂ OCH ₂ CH ₂ -	0.00	1.01
西替利嗪	p-Cl	H	N	2		HO ₂ CCH ₂ OCH ₂ CH ₂ -	-0.03	0.93
杜利嗪	H	H	N	2		PhCH=CHCH ₂ -	0.05	1.11
氟桂嗪	p-F	p-F	N	2		PhCH=CHCH ₂ -	0.12	1.33
高氯环嗪	p-Cl	H				CH ₃ -	0.00	1.00
苯海拉明	H	H	O	2	CH ₃ -	CH ₃ -	-0.04	0.92
邻甲苯海明	o-Me	H	O	2	CH ₃ -	CH ₃ -	0.03	1.08
氯哌丁	p-Cl	H	O	2	-NR ₃ R ₄ = 		0.10	1.26
利多氟嗪	F	F	CH ₂	2	-NR ₃ R ₄ = 		0.06	1.16

图 26

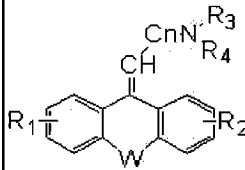
 Subclasss II	化合物	R1	R2	W	Cn	R3	R4	Sglu/gal	FcAvg glu/gal
	去甲阿米替丁	H	H	CH ₂ CH ₂	-(CH ₂) ₂ -	H	CH ₃ -	0.1	1.27
	阿米替丁	H	H			CH ₃ -	CH ₃ -	0.08	1.13
	氯普硫苈	2-Cl	H	S		CH ₃ -	CH ₃ -	0.19	1.55

图 27A

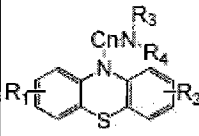
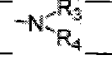
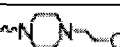
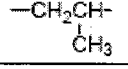
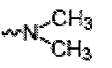
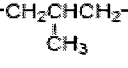
 Subclass III	化合物	R1	R2	Cn		Sglu/gal	FcAvg glu/gal
	硫乙哌丙嗪	2-CH ₃ CH ₂ S-	H	-(CH ₂) ₃ -		0.15	1.41
	氟奋乃静	2-CF ₃ -	H			-0.01	0.97
	异丙嗪	H	H			0.00	1.01
	阿列马嗪	H	H			-0.07	0.85

图 27B

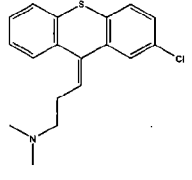
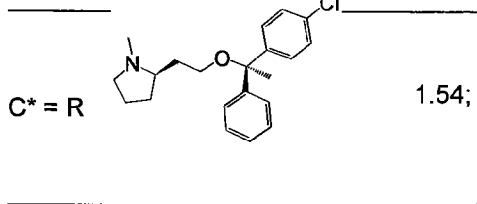
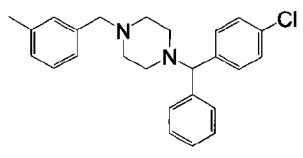
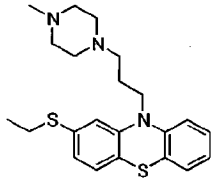
化学银行 ID	有机小分子活性数据_SID	有机小分子活性数据	化合物	结构	FcAvg glu/gal
801	11488673	2729	氯苯硫蒽盐酸盐		1.55; 0.85
927	11488505	26987	氯马斯丁延胡酸盐		1.54; 0.84
1035	11487926	4034	氯苯甲嗪		1.43; 1.08
318827 6	11468216	3085006	硫乙拉嗪苹果酸盐		1.41

图 28

化学银行 ID	有机小分子活性数据_SID	有机小分子活性数据	化合物	结构	FcAvg glu/gal
809	11488813	4543	去甲替林盐酸盐		1.27
1431	11489412	2805	氯哌丁盐酸盐		1.26; 1.17
1510	11489802	4098	氯苯甲嗪		1.2; 1.01
884	11489093	4761	苯吡胺马来酸盐		1.16; 0.94
1060	11467442	4822	匹美噻吨马来酸盐		1.15
1537011	11489426	6834	Brompheniramine 马来酸盐		1.12; 1.03
348034 1	11488465	2267	氮卓斯汀盐酸盐		1.1
746	11489075	2200	安他唑啉磷酸盐		1.1; 0.97
1443	11488854	4601	邻甲苯海明盐酸盐		1.1; 1.05

图 28

化学 行 ID	有机小 分子活 性数 据 _SID	有机小 分子活 性数 据	化合物	结构	FcAvg glu/gal
1434	11489019	4184	米安色林盐酸盐		1.09; 0.96
938	11488661	5588	曲普立啉盐酸盐		1.08; 0.84
1152	11488773	5587	曲吡那敏柠檬酸盐		1.08
100080 7	11488990	6726	苯甲嗪		1.04; 1.02
317410 2	11488816	25096	羟嗪 pamoate		1.04; 0.97
1590	11467286	5405	特非那定		1.04
304579 9	11488852	3325	法莫替丁		1.02
709	11489548	2247	阿司咪唑		1.02; 0.69

图 28

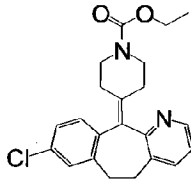
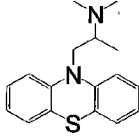
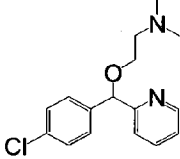
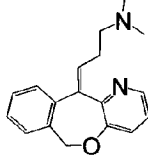
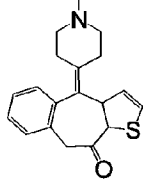
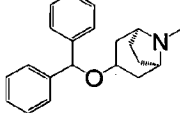
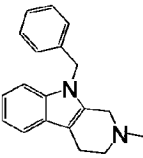
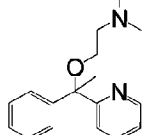
化学银行 ID	有机小分子活性数据_SID	有机小分子活性数据	化合物	结构	FcAvg glu/gal
1389	11489400	3957	氯雷他定		1.02
681	11488656	4927	异丙嗪盐酸盐		1.01; 0.89
1412	11488943	2564	卡比沙明马来酸盐		1.01
1059	11487949	3158	多虑平盐酸盐		0.99
771	11489014	3827	酮替芬盐酸盐		0.99; 0.97
1141	11487922	2344	苯托品		0.98
317410 1	11488496	5702169	mebhydrolin naphthalenesulfonate		0.98
1432	11487931	3162	抗敏安琥珀酸盐		0.98; 0.89

图 28

化学银行 ID	有机小分子活性数据 _SID	有机小分子活性数据	化合物	结构	FcAvg glu/gal
1130	11489015	3372	氟奋乃静盐酸盐		0.97
1068	11489241	5039	雷尼替丁		0.96; 0.92
885	11489061	2170	阿莫沙平 (amoxepine)		0.96; 0.9
317309 2	11488808	10660	茶苯海明		0.95
348010 6	11488995	3348	非索那定		0.95
206923 0	11487972	716121	chlorpheniramine (s) 马来酸盐		0.93; 0.84
1002	11488777	3100	Diphenhydramine 盐酸盐		0.93; 0.91
1441	11488798	3103	双苯拉林盐酸盐		0.92; 0.91
830	11489122	4992	美吡拉敏马来酸盐		0.91; 0.80

图 28

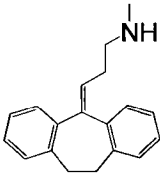
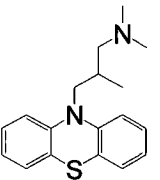
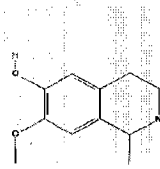
化学银行 ID	有机小分子活性数据_SID	有机小分子活性数据	化合物	结构	FcAvg glu/gal
809	11488813	4543	去甲阿米替丁		0.9
3044756	11488774	5702128	阿利马嗪酒石酸盐		0.85
1052338	11488356	46695	鹿尾草碱		0.85

图 28

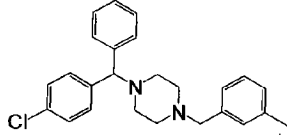
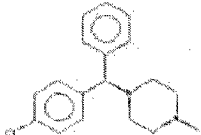
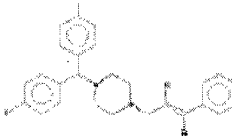
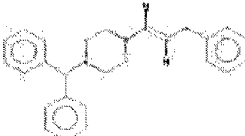
化学银行 ID	有机小分子 活性数据_SID	有机小分子活 性数据	化合物	结构 (Diphenylpiperazine)	FcAvg glu/gal	平均 FcAvg glu/gal
1035	1148792 6	4034	氯苯甲嗪		1.43; 1.08	Ave = 1.26
			chlorcyclizine		1.4	
			氟桂利嗪		1.33	
			桂利嗪		1.02, 1.2	Ave = 1.11

图 29

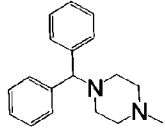
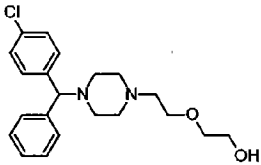
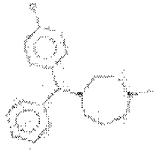
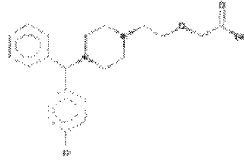
化学银行 ID	有机小分子 活性数据_SID	有机小分子 活性数据	化合物	结构 (Diphenylpiperazine)	FcAvg glu/gal	平均 FcAvg glu/gal
1000807	1148899 0	6726	苯甲嗪		1.04; 1.02	Ave = 1.03
3174102	1148881 6	25096	双羟萘羟嗪		1.04; 0.97	Ave = 1.01
			高氯环嗪		1	
			西替利嗪		0.93	
			SDZ- 201106			

图 29

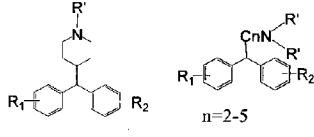
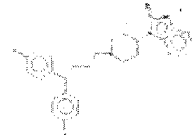
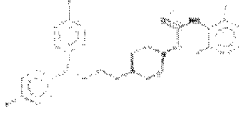
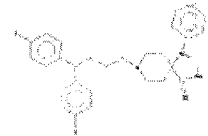
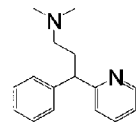
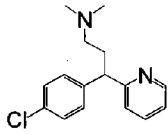
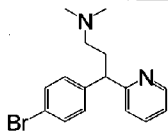
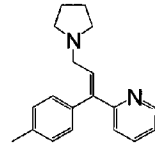
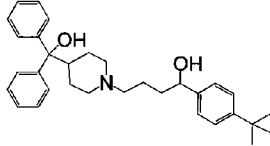
化学银行 ID	有机小分子 活性数据 _SID	有机小分子 活性数据	化合物	结构	FcAvg _{glu/gal} (AVG)
				 Diphenylalkyl	
			双氟苯丁哌啶苯并咪唑酮		1.31
			利多氟嗪		1.16
			Fluspirilen		1.1.2
884	11489093	4761	苯吡胺马来酸盐		1.16; 0.94 (1.05)
2069230	11487972	716121	chlorpheniramine (s) 马来酸盐		0.93; 0.84 (0.885)
1537011	11489426	6834	Brompheniramine 马来酸盐		1.12; 1.03 (1.075)
938	11488661	5588	曲普利啶盐酸盐		1.08; 0.84 (0.96)
1590	11467286	5405	特非那定		1.04

图 30

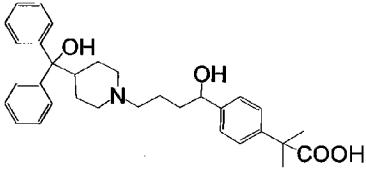
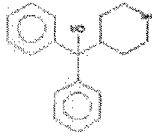
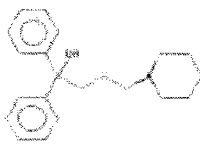
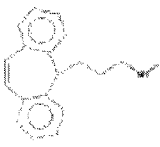
化学银行 ID	有机小分子活性数据_SID	有机小分子活性数据	化合物	结构	FcAvg _{glu/gal} (AVG)
3480106	11488995	3348	非索那定		0.95
			氮杂环醇		0.83
			地芬尼多		1.067
			普罗替丁		0.98

图 30

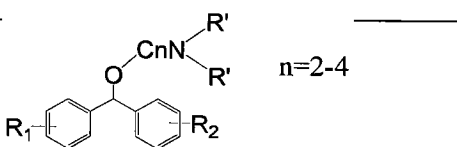
化学银行 ID	有机小分子活性数据 _SID	有机小分子活性数据	化合物	结构	FcAvg glu/gal (Avg)
				 $n=2-4$ Diphenylalkoxyl	

图 31

化学银行 ID	有机小分子活性数据 SID	有机小分子活性数据	化合物	结构	FcAvg glu/gal (Avg)
1431	11489412	2805	氯哌丁盐酸盐		1.26; 1.17 (1.22)
927	11488505	26987	氯马斯丁延胡索酸盐 $C^* = R$		1.54; 0.84 (1.19)
1443	11488854	4601	邻甲苯海明盐酸盐		1.1; 1.05 (1.08)
1412	11488943	2564	卡比沙明马来酸盐		1.01
1141	11487922	2344	苯托品		0.98
1432	11487931	3162	抗敏安琥珀酸盐		0.98; 0.89 (0.935)
3173092	11488808	10660	茶苯海明		0.95
1002	11488777	3100	苯海拉明盐酸盐		0.93; 0.91 (0.92)

图 31

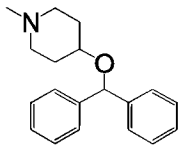
化学银行 ID	有机小分子活性数据 SID	有机小分子活性数据	化合物	结构	FcAvg glu/gal (Avg)
1441	11488798	3103	双苯拉林盐酸盐		0.92; 0.91 (0.92)

图 31

化学银行 ID	有机小分子 活性数据 SID	有机小 分子活 性数据	化合物	结构	FcAvg glu/gal (Avg)
				三环的	
801	11488673	2729	Chlorprothixee 盐酸盐		1.55; 0.85 (1.2)
1060	11467442	4822	匹美噻吨马来酸 盐		1.15
809	11488813	4543	去甲阿米替丁盐 酸盐		1.27; 0.9 (1.9)
1389	11489400	3957	氯雷他定		1.02
1059	11487949	3158	多虑平盐酸盐		0.99
771	11489014	3827	酮替酚延胡索 酸盐		0.99; 0.97
3188276	11468216	3085006	Thiethyl-perazin e 苹果酸盐		1.41
681	11488656	4927	异丙嗪盐酸盐		1.01; 0.89
3044756	11488774	5702128	阿利马嗪酒石 酸盐		0.85

图 32

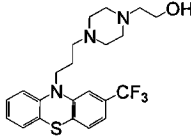
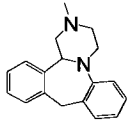
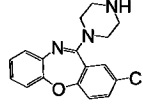
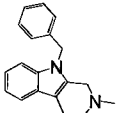
化学银行 ID	有机小分子 活性数据 SID	有机小 分子活 性数据	化合物	结构	FcAvg glu/gal (Avg)
1130	11489015	3372	氟奋乃静盐酸盐		0.97
1434	11489019	4184	米安色林盐酸盐		1.09; 0.96
885	11489061	2170	阿莫沙平 (amoxepine)		0.96; 0.9
3174101	11488496	5702169	mebhydrolin naphthalenesulf onate		0.98

图 32

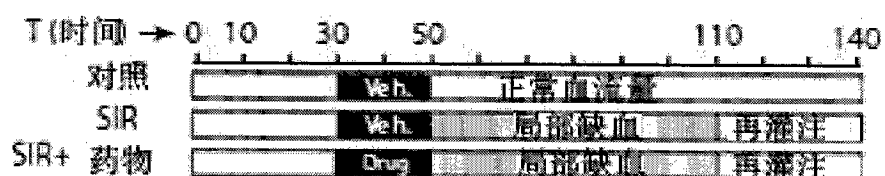


图 33A

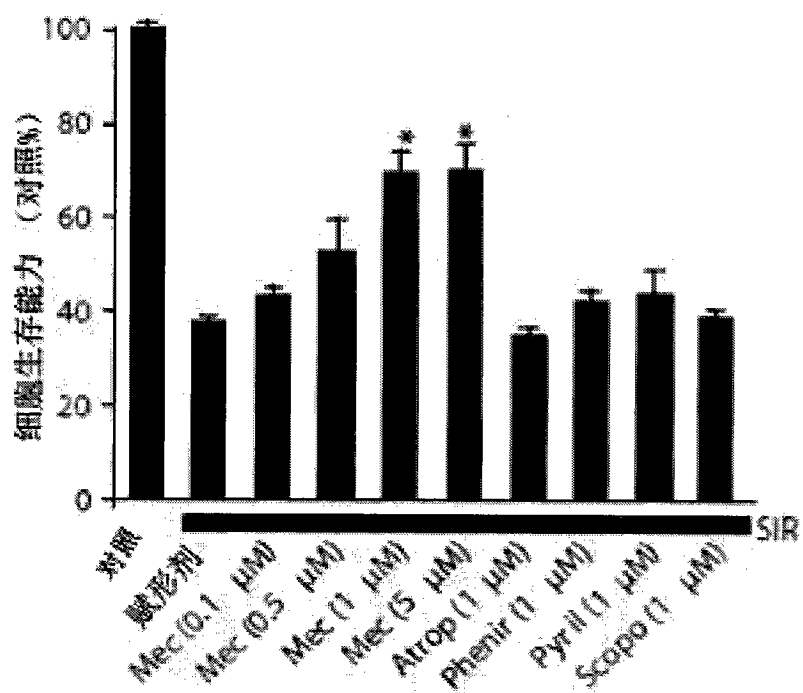


图 33B

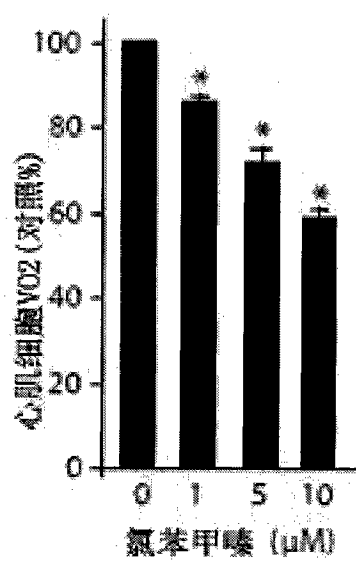


图 33C

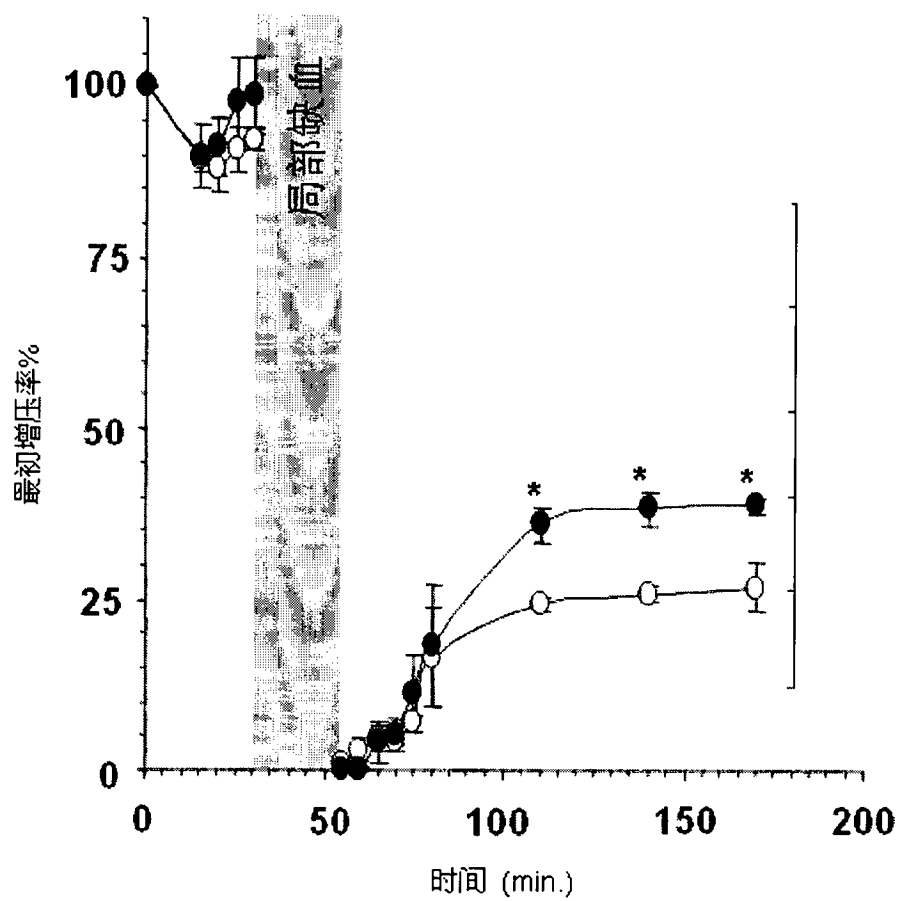


图 34A

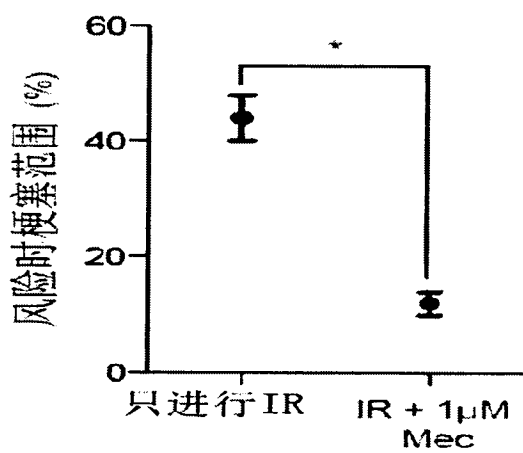


图 34B

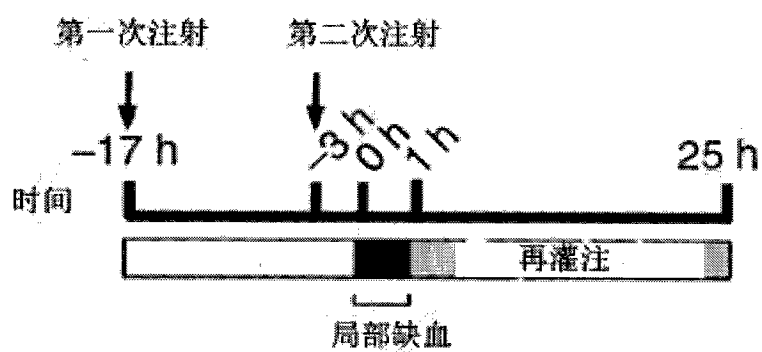


图 35A

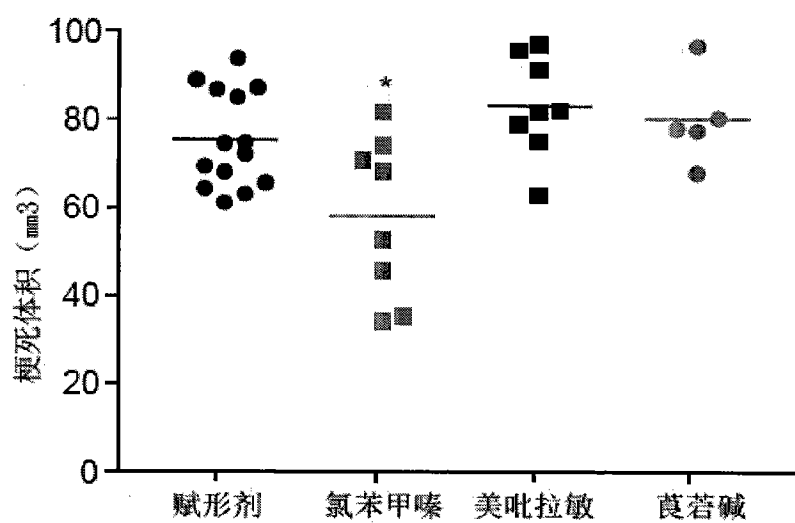


图 35B

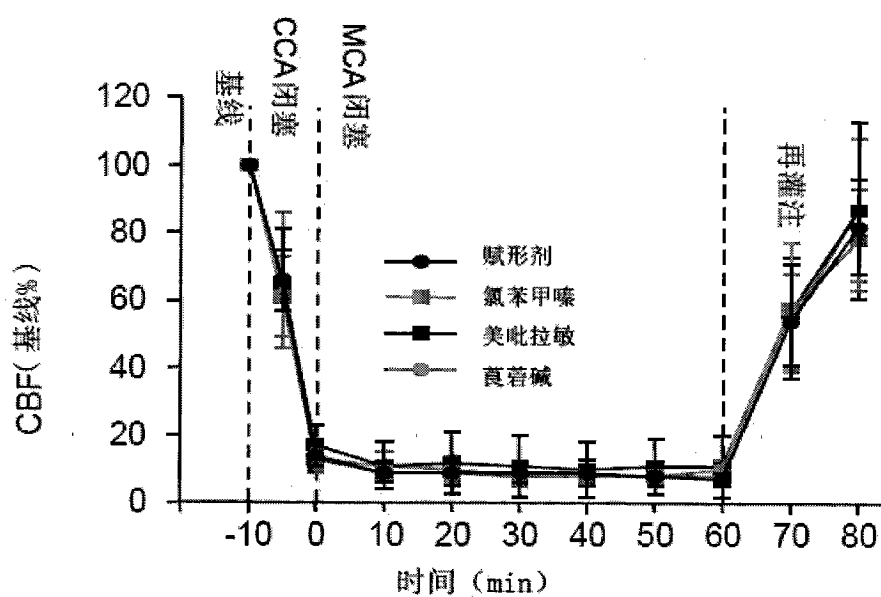


图 35C

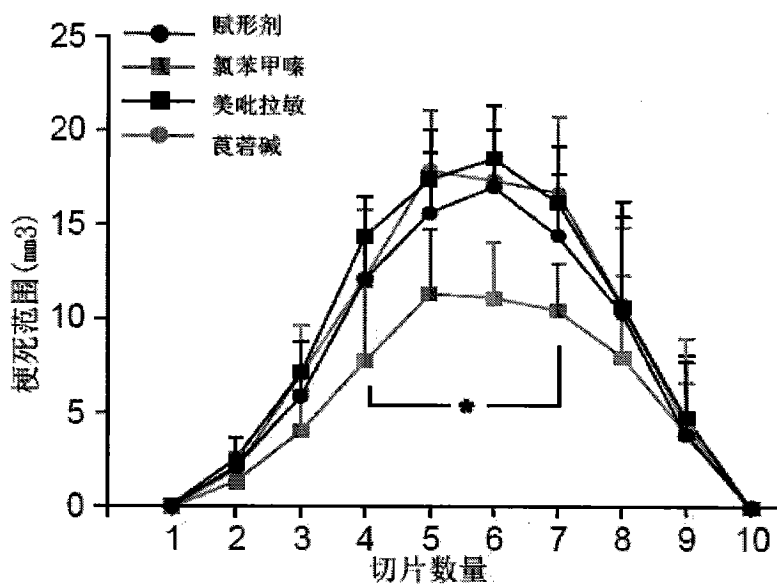


图 35D

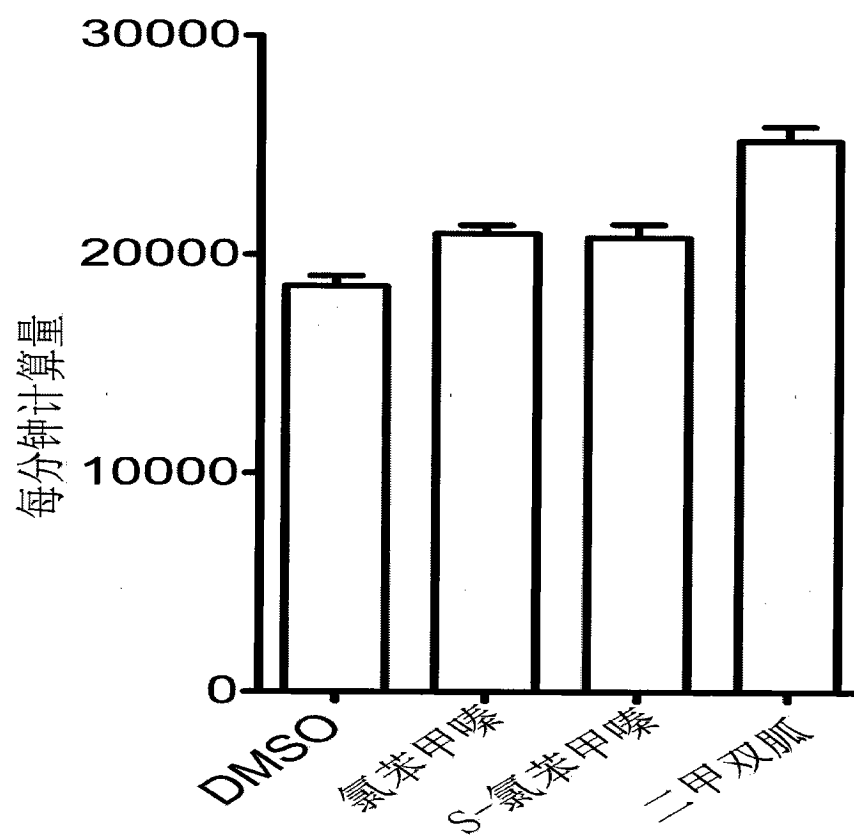


图 36