

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102112121 A

(43) 申请公布日 2011.06.29

(21) 申请号 200980117485.X

A61P 29/00(2006.01)

(22) 申请日 2009.03.11

A61P 17/04(2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 31/245(2006.01)

61/069018 2008.03.11 US

A61K 31/381(2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.11.10

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/001541 2009.03.11

(87) PCT申请的公布数据

W02009/114139 EN 2009.09.17

(71) 申请人 哈佛大学校长及研究员协会

地址 美国马萨诸塞州

申请人 综合医院公司

(72) 发明人 B·P·比恩 C·J·伍尔夫

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

代理人 梁谋 李炳爱

(51) Int. Cl.

A61K 31/165(2006.01)

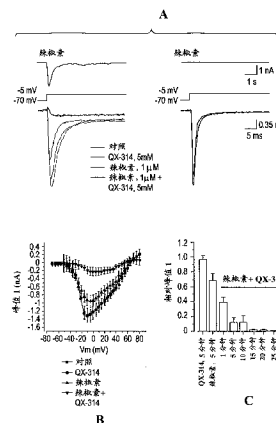
权利要求书 4 页 说明书 32 页 附图 11 页

(54) 发明名称

用于治疗疼痛和瘙痒的方法、组合物和药盒

(57) 摘要

本发明的特征在于通过小分子量药物分子选择性抑制疼痛感觉神经元和瘙痒感觉神经元(伤害感受器和瘙痒感受器)的方法、组合物和药盒,同时使对非疼痛感觉神经元或其它类型的细胞的作用降到最低。



1. 一种用于治疗患者的疼痛或瘙痒的方法,所述方法包括给予所述患者:

(i) 第一化合物,所述第一化合物激活存在于伤害感受器或瘙痒感受器上的通道形成受体;和

(ii) 第二化合物,所述第二化合物当用于所述通道的内面时抑制一种或多种电压门控离子通道但当用于所述通道的外面时基本不抑制所述通道,其中当所述通道形成受体被激活时所述第二化合物能够通过所述受体进入伤害感受器或瘙痒感受器。

2. 一种用于治疗患者的疼痛或瘙痒的方法,所述方法包括给予所述患者:

(i) 第一化合物,所述第一化合物激活存在于伤害感受器或瘙痒感受器上的通道形成受体;

(ii) 第二化合物,所述第二化合物当用于所述通道的内面时抑制一种或多种电压门控离子通道但当用于所述通道的外面时基本不抑制所述通道,其中当所述通道形成受体被激活时所述第二化合物能够通过所述受体进入伤害感受器或瘙痒感受器;和

(iii) 第三化合物,所述第三化合物抑制一种或多种电压门控离子通道,其中所述第三化合物是膜通透性的。

3. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述第一化合物激活选自 TRPV1、P2X(2/3)、TRPA1 和 TRPM8 的通道形成受体。

4. 权利要求 3 的方法,其中所述第一化合物是 TRPV1 受体的激活剂,所述激活剂选自辣椒素、二氢辣椒素和去甲二氢辣椒素、利多卡因、阿替卡因、普鲁卡因、丁卡因、甲哌卡因、布比卡因、丁香酚、樟脑、克霉唑、arvanil(N-花生四烯酰香草胺)、花生四烯酰乙醇酰胺、2-氨基乙氧基二苯基硼酸酯(2APB)、AM404、树脂毒素、佛波醇 12-苯基乙酸酯 13-乙酸酯 20-高香草酸酯(PPAHV)、奥伐尼(NE 19550)、OLDA(N-油酰多巴胺)、N-花生四烯酰多巴胺(NADA)、6'-碘树脂毒素(6'-IRTX)、C18N-酰基乙醇胺、脂加氧酶衍生物例如 12-氢过氧化二十碳四烯酸、诺香草胺、四氢异喹啉的脂肪酰胺抑制剂半胱氨酸结模体(ICK)肽(vanillotoxins)、胡椒碱、MSK195(N-[2-(3,4-二甲基苄基)-3-(新戊酰氧基)丙基]-2-[4-(2-氨基乙氧基)-3-甲氧基苄基]乙酰胺)、JYL79(N-[2-(3,4-二甲基苄基)-3-(新戊酰氧基)丙基]-N'-(4-羟基-3-甲氧基苄基)硫脲)、羟基- α -山椒素、2-氨基乙氧基二苯基硼酸酯、10-姜烯酚、油基姜醇、油基姜烯酚、SU200(N-(4-叔丁基苄基)-N'-(4-羟基-3-甲氧基苄基)硫脲)、阿普林定、苯佐卡因、布他卡因、可卡因、狄布卡因、恩卡尼、美西律、奥西卡因、丙胺卡因、丙美卡因、普鲁卡因胺、N-乙酰普鲁卡因胺、氯普鲁卡因、达克罗宁、依替卡因、左布比卡因、罗哌卡因、环美卡因、二甲卡因、丙氧卡因、三甲卡因和氨丁卡因。

5. 权利要求 3 的方法,其中所述第一化合物是 TRPA1 受体的激活剂,所述激活剂选自桂皮醛、异硫氰酸烯丙酯、二硫化二烯丙基、icilin、桂皮油、冬青油、丁子香油、丙烯醛、羟基- α -山椒素、2-氨基乙氧基二苯基硼酸酯、4-羟基壬烯醛、对羟基苯甲酸甲酯、芥子油、环己基氨基甲酸 3'-氨基甲酰基联苯-3-基酯(URB597)和硫代水杨酸法呢基酯。

6. 权利要求 3 的方法,其中所述第一化合物是 P2X 受体的激活剂,所述激活剂选自 ATP、2-甲硫基-ATP、2'-O-(4-苯甲酰基苯甲酰基)-ATP 和 3'-O-(4-苯甲酰基苯甲酰基)-ATP 及 ATP5'-O-(3-硫代三磷酸)。

7. 权利要求 3 的方法,其中所述第一化合物是 TRPM8 受体的激活剂,所述激活剂选自薄

荷脑、iciclin、桉树脑、芳樟醇、香叶醇和羟基香茅醛。

8. 权利要求 1-7 中任一项的方法,其中所述第二化合物抑制电压门控钠通道。

9. 权利要求 8 的方法,其中所述第二化合物是 QX-314、N- 甲基 - 普鲁卡因、QX-222、N- 辛基 - 胍、9- 氮吡啶、泮库溴铵或另一种当存在于细胞内时抑制电压门控钠通道的带电荷的低分子量分子。

10. 权利要求 1-7 中任一项的方法,其中所述第二化合物抑制电压门控钙通道。

11. 权利要求 10 的方法,其中所述化合物是 D-890(季铵型甲氧基维拉帕米)、CERM 11888(季铵型苄普地尔)或其它当存在于细胞内时抑制电压门控钙通道的带电荷的低分子量分子。

12. 权利要求 1-7 中任一项的方法,其中所述第二化合物是选自以下化合物的季铵衍生物或其它带电荷的衍生物:利鲁唑、美西律、苯妥英、卡马西平、普鲁卡因、妥卡尼、丙胺卡因、阿替卡因、布比卡因、甲哌卡因、丙吡胺、苄环烷、奎尼丁、溴苄胺、利法利嗪、拉莫三嗪、氟桂利嗪和氟司必林。

13. 权利要求 2-12 中任一项的方法,其中所述第三化合物抑制一种或多种电压门控离子通道并且是膜通透性的。

14. 权利要求 13 的方法,其中所述第三化合物选自利多卡因、阿替卡因、丁卡因、布比卡因、普鲁卡因和甲哌卡因。

15. 权利要求 2 的方法,其中所述第一化合物是辣椒素,所述第二化合物是 QX-314,所述第三化合物是利多卡因。

16. 权利要求 1-15 中任一项的方法,其中所述疼痛是神经病性疼痛。

17. 权利要求 1-15 中任一项的方法,其中所述疼痛是炎症性疼痛。

18. 权利要求 1-15 中任一项的方法,其中所述疼痛是伤害性疼痛。

19. 权利要求 1-15 中任一项的方法,其中所述疼痛是手术性疼痛。

20. 权利要求 1-15 中任一项的方法,其中所述疼痛是由食道癌、肠易激综合征 (IBS) 或特发性神经病引起的。

21. 一种组合物,所述组合物包含:

(i) 第一化合物,所述第一化合物激活存在于伤害感受器或瘙痒感受器上的通道形成受体;和

(ii) 第二化合物,所述第二化合物当用于所述通道的内面时抑制一种或多种电压门控离子通道但当用于所述通道的外面时基本不抑制所述通道,其中当所述通道形成受体被激活时所述第二化合物能够通过所述受体进入伤害感受器或瘙痒感受器。

22. 一种组合物,所述组合物包含:

(i) 第一化合物,所述第一化合物激活存在于伤害感受器或瘙痒感受器上的通道形成受体;

(ii) 第二化合物,所述第二化合物当用于所述通道的内面时抑制一种或多种电压门控离子通道但当用于所述通道的外面时基本不抑制所述通道,其中当所述通道形成受体被激活时所述第二化合物能够通过所述受体进入伤害感受器或瘙痒感受器;和

(iii) 第三化合物,所述第三化合物抑制一种或多种电压门控离子通道,其中所述第三化合物是膜通透性的。

23. 权利要求 21 或 22 的组合物,其中所述第一化合物激活选自 TRPV1、P2X(2/3)、TRPA1 和 TRPM8 的受体。

24. 权利要求 21-23 中任一项的组合物,所述组合物配制成用于口服、胃肠外(例如静脉内、肌内)、直肠、皮肤、皮下、局部、经皮、舌下、经鼻、阴道、鞘内、硬膜外或眼部给药;或者通过注射、吸入;或者与鼻黏膜或口腔黏膜直接接触。

25. 一种用于抑制细胞内的一种或多种电压门控离子通道的方法,所述方法包括使所述细胞与以下化合物接触:

(i) 第一化合物,所述第一化合物激活存在于伤害感受器或瘙痒感受器上的通道形成受体;和

(ii) 第二化合物,所述第二化合物当用于所述通道的内面时抑制一种或多种电压门控离子通道但当用于所述通道的外面时基本不抑制所述通道,其中当所述通道形成受体被激活时所述第二化合物能够通过所述受体进入伤害感受器或瘙痒感受器。

26. 一种用于抑制细胞内的一种或多种电压门控离子通道的方法,所述方法包括使所述细胞与以下化合物接触:

(i) 第一化合物,所述第一化合物激活存在于伤害感受器或瘙痒感受器上的通道形成受体;

(ii) 第二化合物,所述第二化合物当用于所述通道的内面时抑制一种或多种电压门控离子通道但当用于所述通道的外面时基本不抑制所述通道,其中当所述通道形成受体被激活时所述第二化合物能够通过所述受体进入伤害感受器或瘙痒感受器;和

(iii) 第三化合物,所述第三化合物抑制一种或多种电压门控离子通道,其中所述第三化合物是膜通透性的。

27. 权利要求 25 或 26 的方法,其中所述第一化合物激活选自 TRPV1、P2X(2/3)、TRPA1 和 TRPM8 的受体。

28. 一种用于鉴定可用于治疗疼痛或瘙痒的化合物的方法,所述方法包括以下步骤:

(a) 使表达 TRPV1、TRPA1、TRPM8 或 P2X(2/3) 的神经元的外面与以下化合物接触:

(i) 第一化合物,所述第一化合物激活 TRPV1、TRPA1、TRPM8 或 P2X(2/3) 受体;

(ii) 第二化合物,所述第二化合物当用于所述通道的内面时抑制一种或多种电压门控离子通道但当用于所述通道的外面时基本不抑制所述通道;和

(b) 确定所述第二化合物是否抑制所述神经元中的所述电压门控离子通道,其中所述第二化合物对所述电压门控离子通道的抑制使所述第二化合物被鉴定为可用于治疗疼痛或瘙痒的化合物。

29. 一种用于鉴定可用于治疗疼痛或瘙痒的化合物的方法,所述方法包括以下步骤:

(a) 使表达 TRPV1、TRPA1、TRPM8 或 P2X(2/3) 的神经元的外面与以下化合物接触:

(i) 第一化合物,所述第一化合物激活 TRPV1、TRPA1、TRPM8 或 P2X(2/3) 受体;

(ii) 第二化合物,所述第二化合物当用于所述通道的内面时抑制一种或多种电压门控离子通道但当用于所述通道的外面时基本不抑制所述通道;

(iii) 第三化合物,所述第三化合物抑制一种或多种电压门控离子通道,其中所述第三化合物是膜通透性的;和

(b) 确定所述第二化合物是否抑制所述神经元中的所述电压门控离子通道,其中所述

第二化合物对所述电压门控离子通道的抑制使所述第二化合物被鉴定为可用于治疗疼痛或瘙痒的化合物。

30. 一种选自以下化合物的季铵衍生物或其它永久或短暂带电荷的衍生物：利鲁唑、美西律、苯妥英、卡马西平、普鲁卡因、阿替卡因、布比卡因、甲哌卡因、妥卡尼、丙胺卡因、丙吡胺、苄环烷、奎尼丁、溴苄胺、利法利嗪、拉莫三嗪、氟桂利嗪和氟司必林。

31. 权利要求 30 的季铵衍生物或其它带电荷的衍生物，其中所述化合物具有式 (I)-(X) 中任一种的化学式。

32. 一种药物组合物，所述药物组合物包含 (i) 选自以下化合物的季铵衍生物或其它永久或短暂带电荷的衍生物：利鲁唑、美西律、苯妥英、卡马西平、普鲁卡因、阿替卡因、布比卡因、甲哌卡因、妥卡尼、丙胺卡因、丙吡胺、苄环烷、奎尼丁、溴苄胺、利法利嗪、拉莫三嗪、氟桂利嗪和氟司必林，和 (ii) 药学上可接受的赋形剂。

33. 权利要求 32 的组合物，其中所述化合物具有式 (I)-(X) 中任一种的化学式。

用于治疗疼痛和瘙痒的方法、组合物和药盒

[0001] 发明背景

[0002] 本发明的特征在于通过小分子量的药物分子选择性抑制疼痛感觉神经元和瘙痒感觉神经元（伤害感受器和瘙痒感受器（pruriceptor））的方法、组合物和药盒，同时使对非疼痛感觉神经元或其它类型的细胞的作用降到最低。按照本发明的方法，亲水性药物小分子通过存在于疼痛感觉神经元和瘙痒感觉神经元上的受体进入疼痛感觉神经元的胞内区室，但是在其它类型的神经元中，或者在其它类型的组织中的程度较低或根本不存在。

[0003] 局部麻醉药例如利多卡因和阿替卡因通过抑制神经元中的电压依赖性钠通道而起作用。这些麻醉药阻断钠通道，并因此阻断所有神经元而不只是疼痛感觉神经元（伤害感受器）的兴奋性。因此，虽然局部或区域麻醉的目的是阻断伤害感受器中信号的传递以防止疼痛，但是给予局部麻醉药还产生不需要或有害的作用，例如因阻断低阈压和触觉感受器而产生的全身麻木，因阻断运动原轴突而导致的运动缺陷和因阻断自主神经纤维（autonomic fiber）而产生的其它并发症。局部麻醉药是相对疏水性分子，通过扩散进入或穿过细胞膜进入其在钠通道中的阻断部位。这些化合物的永久性带电荷的衍生物（例如 QX-314，利多卡因的一种季氮衍生物）是膜不通透性的，当用于神经膜外表面时对神经元钠通道无作用，但是如果以某种方式引入细胞内便能阻断钠通道，例如借助于用于从分离神经元进行完整细胞电生理记录的微量移液管。疼痛感觉神经元在表达（在大多数情况下）TRPV1 受体 / 通道时不同于其它类型的神经元，TRPV1 受体 / 通道由引起疼痛的热（painful heat）或通过辣椒素（干辣椒中的刺激成分）激活。在各种类型的疼痛感觉神经元和瘙痒感觉（瘙痒感受器）神经元中选择性表达的其它类型的受体包括但不限于 TRPA1、TRPM8 和 P2X(2/3) 受体。

[0004] 神经病性疼痛、炎症性疼痛和伤害性疼痛在其病因、病理生理、诊断和治疗方面各有不同。在响应由强烈刺激或有害刺激激活的特定亚型的外周感觉神经元（伤害感受器）时发生伤害性疼痛。它一般是急性自限性的，通过起潜在或进行性组织损害的预警作用而提供保护性生物功能。它通常是精确定位的。伤害性疼痛的实例包括但不限于创伤或手术性疼痛、阵痛、扭伤、骨折、烧伤、肿块、挫伤、注射、牙科手术、皮肤活组织检查和梗阻。

[0005] 炎症性疼痛是存在组织损害或炎症时发生的疼痛，包括手术后疼痛、创伤后疼痛、关节炎性（类风湿性或骨关节炎）疼痛和关节、肌肉和肌腱损伤相关性疼痛，如轴式腰背疼痛（axial low back pain）。

[0006] 神经病性疼痛是慢性非恶性疼痛的普通类型，它是外周或中枢神经系统损伤或功能障碍的结果，没有保护性生物功能。据估计美国人口中有超过 160 万人受其所累。神经病性疼痛有许多不同的病因，可能由下列情形所致而发生：例如创伤、手术、椎间盘突出、脊髓损伤、糖尿病、带状疱疹（herpes zoster/shingles）感染、HIV/AIDS、晚期癌症、切断术（包括乳房切除术）、腕管综合征、长期饮酒、暴露于辐射和作为未意识到（unintended）的神经毒性治疗药的副作用，例如某些抗 HIV 和化疗药物。

[0007] 与伤害性疼痛不同，神经病性疼痛在性质上常被描述为“烧灼感”、“触电感”、“麻刺感”或“射痛感”。其特征常常在于慢性异常性疼痛（定义为由不是平常引起疼痛反应的

刺激（例如轻触）所导致的疼痛）和疼痛感觉过敏（定义为对普通疼痛刺激的敏感性增强），并且可在任何受损组织外在愈合之后持续数月或数年。

[0008] 疼痛可发生在癌症患者中，其可由多种原因造成：炎症、压迫、侵袭、转移扩散到骨或其它组织。

[0009] 有一些在有害刺激、组织损害或神经系统病变不存在时发生疼痛（称为功能障碍性疼痛）的病症，这些包括但不限于纤维肌痛、紧张型头痛、肠易激病（irritable bowel disorder）和红斑性肢痛病。

[0010] 偏头痛是与使脑膜受神经支配的感觉纤维的活化有关的头痛。

[0011] 瘙痒（Itch/pruritus）是一种皮肤疾病，可以是局部性和全身性的，可能与皮肤病变（皮疹、特应性湿疹、风团）有关。伴发瘙痒的许多病症包括但不限于应激、焦虑症、太阳的紫外辐射、代谢障碍和内分泌失调（例如肝病或肾病、甲状腺功能亢进）、癌症（例如淋巴瘤）、对药物或食物的反应、寄生虫感染和真菌感染、变态反应、血液病（例如真性红细胞增多）和皮肤疾病。瘙痒是由一亚类小直径初级感觉神经元（瘙痒感受器）介导的，其与伤害感受器神经元有许多共同的特征，包括但不限于 TRPV1 通道的表达。某些瘙痒介质——例如类二十烷酸、组胺、缓激肽、ATP 和各种神经营养蛋白具有 endovanilloid 功能。局部辣椒素抑制组胺诱发的瘙痒。因此，瘙痒感受器像伤害感受器一样是递送离子通道阻断剂的本方法的合适靶标。

[0012] 尽管开发出多种用于疼痛和瘙痒的疗法，但仍存在对其它药物的需求。

[0013] 发明背景

[0014] 在第一方面，本发明的特征在于通过给予患者第一化合物而用于治疗患者的疼痛和瘙痒（例如神经病性疼痛、炎症性疼痛、伤害性疼痛、特发性疼痛、癌症疼痛、偏头痛、功能障碍性疼痛或手术性疼痛（例如牙科手术、注射、骨折复位（setting fracture）、活组织检查）以及瘙痒症的方法，所述第一化合物激活第二化合物可通过的膜结合受体 / 离子通道，其中第二化合物当用于通道内面时抑制一种或多种电压门控离子通道，但当用于通道外面时基本不抑制该通道。当受体被激活时，所述第二化合物能够通过膜结合受体 / 离子通道进入神经元。在一个实施方案中，还给予患者抑制一种或多种电压门控离子通道的第三化合物，其中所述第三化合物是膜通透性的，并且阻断由第一化合物诱发的可能的刺激感。在进一步的实施方案中，在第二化合物进入胞内空间将第二化合物截留在细胞内后，由第一化合物所引起的通道形成受体的活化减弱或停止。在某些实施方案中，第一化合物激活第二化合物可通过的受体，所述受体选自 TRPV1、P2X(2/3)、TRPA1 和 TRPM8。疼痛或瘙痒的治疗可采用任何标准疼痛或瘙痒指数（例如本文所述指数）确定，或者可根据患者主观的疼痛或瘙痒评价来确定。如果患者报称疼痛减轻或者对应当引起疼痛的刺激的反应减弱以及瘙痒减轻，则患者被视为“受到治疗”。在某些实施方案中，为了确保受体（例如 TRPV1、P2X(2/3)、TRPA1 和 / 或 TRPM8 受体）被激活，需要给予第二化合物，因此可供第一化合物进入。在其它实施方案中，因为受体（例如 TRPV1、P2X(2/3)、TRPA1 和 / 或 TRPM8 受体）已被激活，所以不给予第二化合物。因此，第一化合物只进入具有被内源性激活的受体的神经元。在再进一步的实施方案中，受体（例如 TRPV1、P2X(2/3)、TRPA1 和 / 或 TRPM8 受体）通过诱导（indicating）激活这些受体的生理状态而被激活，因此可供第一化合物的进入。

[0015] 如有需要，可采用两种或多种激活 TRPV1、P2X(2/3)、TRPA1 和 / 或 TRPM8 受体的化

合物,正如可采用抑制一种或多种电压门控离子通道的两种或多种化合物一样。第一化合物和第二化合物最好彼此在4小时、2小时、1小时、30分钟或15分钟内给予患者,或者基本上同时给予。重要的是,可先给予两种化合物中的任一种。因此,在一个实施方案中,先给予一种或多种激活 TRPV1、P2X(2/3)、TRPA1 和 / 或 TRPM8 受体的化合物,而在另一个实施方案中,先给予当用于通道内面时抑制一种或多种电压门控离子通道而当用于通道外面时基本上不抑制该通道的一种或多种化合物。所述化合物可共同配制成单一组合物,或者可分别配制。可通过例如口服、胃肠外、静脉内、肌内、直肠、皮肤、皮下、局部、经皮、舌下、经鼻、阴道、鞘内、硬膜外或眼部给药;或者通过注射、吸入;或者与鼻黏膜或口腔黏膜直接接触,给予化合物的每一种。

[0016] TRPV1 受体的激活剂包括但不限于辣椒素、利多卡因、阿替卡因、普鲁卡因、丁香酚、樟脑、克霉唑、arvanil(N-花生四烯酰香草胺)、花生四烯酰乙醇酰胺、2-氨基乙氧基二苯基硼酸酯(2APB)、AM404、树脂毒素、佛波醇 12-苯基乙酸酯 13-乙酸酯 20-高香草酸酯(PPAHV)、奥伐尼(NE 19550)、OLDA(N-油酰多巴胺)、N-花生四烯酰多巴胺(NADA)、6'-碘树脂毒素(6'-IRTX)、C18 N-酰基乙醇胺、脂加氧酶衍生物例如 12-氢过氧化二十碳四烯酸、抑制剂半胱氨酸结模体(inhibitor cysteine knot, ICK)肽(vanillotoxins)、胡椒碱、MSK195(N-[2-(3,4-二甲基苄基)-3-(新戊酰氧基)丙基]-2-[4-(2-氨基乙氧基)-3-甲氧基苄基]乙酰胺)、JYL79(N-[2-(3,4-二甲基苄基)-3-(新戊酰氧基)丙基]-N'-(4-羟基-3-甲氧基苄基)硫脲)、羟基- α -山椒素、2-氨基乙氧基二苯基硼酸酯、10-姜烯酚、油基姜醇(oleylgingerol)、油基姜烯酚和 SU200(N-(4-叔丁基苄基)-N'-(4-羟基-3-甲氧基苄基)硫脲)。其它 TRPV1 受体的激活剂参见 O' Dell 等, Bioorg. Med. Chem. 15: 6164-6149(2007) 和 Sexton 等, FASEB J. 21:2695-2703(2007)。

[0017] TRPA1 受体的激活剂包括但不限于桂皮醛、异硫氰酸烯丙酯、二硫化二烯丙基、icilin、桂皮油、冬青油、丁子香油、丙烯醛、羟基- α -山椒素、2-氨基乙氧基二苯基硼酸酯、4-羟基壬烯醛、对羟基苯甲酸甲酯、芥子油和环己基氨基甲酸 3'-氨基甲酰基联苯-3-基酯(URB597)。其它 TRPA1 受体的激活剂参见 Taylor-Clark 等, Mol. Pharmacol. PMID:18000030(2007); Macpherson 等, Nature 445:541-545(2007); 以及 Hill 等, J. Biol. Chem. 282:7145-7153(2007)。

[0018] P2X 受体的激活剂包括但不限于 ATP、2-甲硫基-ATP、2'-O-(4-苯甲酰基苯甲酰基)-ATP、3'-O-(4-苯甲酰基苯甲酰基)-ATP 和 ATP5'-O-(3-硫代三磷酸)。

[0019] TRPM8 受体的激活剂受体包括但不限于薄荷脑、icilin、桉树脑、芳樟醇、香叶醇和羟基香茅醛。

[0020] 在某些实施方案中,第二化合物抑制电压门控钠通道。这一类的示例性抑制剂为 QX-314、N-甲基-普鲁卡因、QX-222、N-辛基-胍、9-氨吡啶和泮库溴铵。

[0021] 在另外其它的实施方案中,第二化合物抑制电压门控钙通道。这一类的示例性抑制剂为 D-890(季铵型甲氧基维拉帕米(quaternary methoxyverapamil)) 和 CERM 11888(季铵型苄普地尔)。

[0022] 在再进一步的实施方案中,第二化合物为选自以下化合物的季铵衍生物或其它带电荷的衍生物:利鲁唑、美西律(mexilitine)、苯妥英、卡马西平、普鲁卡因、阿替卡因、布比卡因、甲哌卡因、妥卡尼、丙胺卡因、丙吡胺(diisopyramide)、苄环烷、奎尼丁、溴苄胺、利

法利嗪、拉莫三嗪、氟桂利嗪和氟司必林。本文中描述了示例性的衍生物。

[0023] 在某些实施方案中,第三化合物当存在于细胞内时可抑制一种或多种电压门控离子通道(例如钠和/或钙通道)。在一个优选的实施方案中,第三化合物为利多卡因。

[0024] 本发明的特征还在于选自以下化合物的季铵衍生物或其它带电荷的衍生物:利鲁唑、美西律、苯妥英、卡马西平、普鲁卡因、阿替卡因、布比卡因、甲哌卡因、妥卡尼、丙胺卡因、丙吡胺、苄环烷、奎尼丁、溴苄胺、利法利嗪、拉莫三嗪、氟桂利嗪和氟司必林。

[0025] 在一个相关方面,本发明的特征在于包括选自以下化合物的季铵衍生物或其它带电荷的衍生物的药物组合物:利鲁唑、美西律、苯妥英、卡马西平、普鲁卡因、阿替卡因、布比卡因、甲哌卡因、妥卡尼、丙胺卡因、丙吡胺、苄环烷、奎尼丁、溴苄胺、利法利嗪、拉莫三嗪、氟桂利嗪和氟司必林及药学上可接受的赋形剂。

[0026] 本发明的特征还在于包括以下的组合物:(i) 第一化合物,所述第一化合物激活选自 TRPV1、P2X(2/3)、TRPA1 和 TRPM8 的受体;和(ii) 第二化合物,所述第二化合物当用于这些通道的内面时抑制一种或多种电压门控离子通道但当用于其外面时基本不抑制该通道,其中所述第二化合物能够在 TRPV1、P2X(2/3)、TRPA1 和/或 TRPM8 受体被激活时通过这些受体进入疼痛感觉神经元。在一个实施方案中,第二化合物当用于外面时活性降低或具有部分活性,但当用于内面时具有较大活性。在某些实施方案中,还给予患者抑制一种或多种电压门控离子通道的第三化合物,其中所述第三化合物是膜通透性的,可以阻断由第一化合物引起的刺激感。组合物可配制例如用于口服、静脉内、肌内、直肠、皮肤、皮下、局部、经皮、舌下、经鼻、阴道、鞘内、硬膜外或眼部给药;或者通过注射、吸入;或者与鼻黏膜或口腔黏膜直接接触。如有需要,组合物可含有两种或更多种激活 TRPV1、P2X(2/3)、TRPA1 和/或 TRPM8 受体的化合物,和/或抑制一种或多种电压门控离子通道的两种或更多种化合物。

[0027] 本发明的特征还在于通过使细胞与以下化合物接触而在细胞内抑制一种或多种电压门控离子通道的方法:(i) 第一化合物,所述第一化合物激活选自 TRPV1、P2X(2/3)、TRPA1 和 TRPM8 的受体;和(ii) 第二化合物,所述第二化合物当用于通道内面时抑制一种或多种电压门控离子通道,但当用于通道外面时基本不抑制该通道,其中所述第二化合物在受体被激活时能够通过受体进入疼痛感觉神经元。在进一步的实施方案中,还给予患者抑制一种或多种电压门控离子通道的第三化合物,其中所述第三化合物是膜通透性的。上文中提供了合适的化合物。

[0028] 本发明的特征还在于鉴定作为可用于治疗疼痛和瘙痒的化合物的方法。该方法包括以下步骤:(a) 使表达 TRPV1、TRPA1、TRPM8 和/或 P2X(2/3) 的神经元的外面与以下化合物接触:(i) 第一化合物,所述第一化合物激活 TRPV1、TRPA1、TRPM8 或 P2X(2/3) 受体;和(ii) 第二化合物,所述第二化合物当用于通道内面时抑制一种或多种电压门控离子通道但当用于通道外面时基本不抑制该通道,和(b) 确定第二化合物是否抑制神经元中的电压门控离子通道。在某些实施方案中,还给予患者抑制一种或多种电压门控离子通道的第三化合物,其中所述第三化合物是膜通透性的。第二化合物对电压门控离子通道的抑制使第二化合物被鉴定为可用于治疗疼痛和/或瘙痒的化合物。

[0029] 所述方法、组合物和药盒还可用于选择性阻断在表达 TRPV、TRPA、TRPM 和 P2X 受体家族不同成员的其它神经元类型的神经元活性,其中第一化合物是存在于那些类型神经元

中特定的 TRPV、TRPA、TRPM 和 P2X 受体的激动剂,第二化合物通常是膜不透性的钠或钙通道阻断剂。

[0030] 本发明的方法、组合物和药盒无需改变轻触或运动控制便允许止住疼痛或瘙痒。例如,患者接受时,硬膜外将不会完全丧失感觉输入。

[0031] 术语“疼痛”在本文中以最广义使用,是指全部类型的疼痛,包括急性疼痛和慢性疼痛,例如躯体性疼痛和内脏性疼痛等伤害性疼痛;炎症性疼痛;功能障碍性疼痛;特发性疼痛;神经病性疼痛,例如中枢产生性疼痛(centrally generated pain)和外周产生性疼痛、偏头痛;以及癌症疼痛。

[0032] 术语“伤害性疼痛”用来包括所有由危及或实际损害身体组织的有害刺激引起的疼痛,包括而不仅限于因割伤、挫伤、骨折、挤压伤、烧伤等引起的疼痛。组织损伤的疼痛受体(伤害感受器)多位于皮肤、肌肉骨骼系统或内脏。

[0033] 术语“躯体性疼痛”用来指由骨、关节、肌肉、皮肤或结缔组织引起的疼痛。这一类型的疼痛通常是精确定位的。

[0034] 术语“内脏性疼痛”本文用来指由呼吸道、胃肠道和胰脏、泌尿道和生殖器官等脏器引起的疼痛。内脏性疼痛包括由器官囊受肿瘤之累所引起的疼痛。另一种类型的内脏性疼痛通常由空腔脏器梗阻引起,其特征在于间歇性绞痛和部位不易确定的疼痛。内脏性疼痛可能与像膀胱炎或反流性食管炎一样的炎症有关。

[0035] 术语炎症性疼痛包括疼痛与可能由创伤、手术、感染和自身免疫病引起的活动性炎症有关。

[0036] 术语“神经病性疼痛”本文用来指由因外周或中枢神经系统病变而发生的这些系统的感觉输入加工异常所引起的疼痛。

[0037] 术语“手术性疼痛”是指因内科、牙科或外科手术引起的疼痛,其中手术通常按计划进行或者与急性创伤有关。

[0038] 术语“瘙痒”在本文中以最广义使用,是指全部类型的局限性和全身性、急性间歇性和持续性痒觉和针刺觉。瘙痒可以是特发性、变应性、代谢性、感染性、药物诱导性的,由肝、肾病或癌症而引起。“瘙痒症”是严重的瘙痒。

[0039] 所述“患者”是指任何动物。在一个实施方案中,患者是人。可使用本发明的方法、组合物和药盒治疗的其它动物包括但不限于非人类灵长类(例如猴、大猩猩、黑猩猩)、驯养动物(例如马、猪、山羊、兔、绵羊、牛、美洲驼)和陪伴动物(例如豚鼠、大鼠、小鼠、蜥蜴、蛇、狗、猫、鱼、仓鼠和鸟)。

[0040] 可用于本发明的化合物包括但不限于本文描述的以其药学上可接受的形式任何一种化合物,包括本文所述化合物的异构体,例如非对映体和对映体、盐、酯、酰胺、硫酸酯、溶剂化物及其多晶型物,以及外消旋混合物和纯异构体。

[0041] 所谓“低分子量”是指小于约 500 道尔顿。

[0042] 术语“药学上可接受的盐”表示在合理医学判断内,适用于与人和低等动物组织接触而无过度毒性、刺激性、变态反应等,并与合理的利益/风险比相称的盐。药学上可接受的盐是本领域众所周知的。盐可在本发明化合物的最终分离和纯化期间原位制备,或通过使游离碱官能团与合适的有机酸反应分别制备。代表性酸加成盐包括但不限于乙酸盐、己二酸盐、藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、

樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚糖酸盐、己酸盐、氢溴酸盐、盐酸盐、氢碘酸盐、2-羟基-乙磺酸盐、依西酸盐、乳糖酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、十二烷基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐 (mesylate/methanesulfonate)、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐、十一烷酸盐、戊酸盐等。代表性碱金属盐或碱土金属盐包括但不限于钠、锂、钾、钙、镁等盐,以及无毒铵、季铵和胺阳离子,包括但不限于铵、四甲基铵、四乙基铵、甲胺、二甲胺、三甲胺、三乙胺、乙胺等。

[0043] 在本发明化合物的通用描述中,一般给出取代基中特定类型的原子数的范围,例如含有 1-4 个碳原子的烷基或 C_{1-4} 烷基。当提及这个范围时是指包括具体提及具有在范围内的原子整数中每一个的基团。例如,1-4 个碳原子的烷基包括 C_1 、 C_2 、 C_3 和 C_4 中的每一个。例如, C_{1-12} 杂烷基除一个或多个杂原子以外还包括 1-12 个碳原子。其它数目的原子和其它类型的原子可以类似方式表示。

[0044] 本文所使用的术语“烷基”和前缀“烷-”包括直链和支链基团两者及环状基团,即环烷基。环状基团可以为单环或多环,优选具有 3-6 个环碳原子 (3 和 6 也包括在内)。示例性的环状基团包括环丙基、环丁基、环戊基和环己基。

[0045] “ C_{1-4} 烷基”是指具有 1-4 个碳原子的支链或无支链烃基。 C_{1-4} 烷基可以是取代或未取代的。示例性的取代基包括烷氧基、芳氧基、巯基、烷硫基、芳硫基、卤化物、羟基、氟代烷基、全氟烷基、氨基、氨基烷基、二取代氨基、季氨基 (quaternary amino)、羟基烷基、羧基烷基和羧基。 C_{1-4} 烷基包括而限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、环丙基、环丙基甲基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基和环丁基。

[0046] “ C_{2-4} 烯基”是指含有一个或多个双键并且具有 2-4 个碳原子的支链或无支链烃基。 C_{2-4} 烯基可任选包括单环或多环,其中每个环最好具有 3-6 元。 C_{2-4} 烯基可以是取代或未取代的。示例性的取代基包括烷氧基、芳氧基、巯基、烷硫基、芳硫基、卤化物、羟基、氟代烷基、全氟烷基、氨基、氨基烷基、二取代氨基、季氨基、羟基烷基、羧基烷基和羧基。 C_{2-4} 烯基包括而限于乙烯基、烯丙基、2-环丙基-1-乙烯基、1-丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、3-丁烯基、2-甲基-1-丙烯基和 2-甲基-2-丙烯基。

[0047] “ C_{2-4} 炔基”是指含有一个或多个三键并且具有 2-4 个碳原子的支链或无支链烃基。 C_{2-4} 炔基可任选包括单环、二环或三环,其中每个环最好具有 5 或 6 元。 C_{2-4} 炔基可以是取代或未取代的。示例性的取代基包括烷氧基、芳氧基、巯基、烷硫基、芳硫基、卤化物、羟基、氟代烷基、全氟烷基、氨基、氨基烷基、二取代氨基、季氨基、羟基烷基、羧基烷基和羧基。 C_{2-4} 炔基包括而限于乙炔基、1-丙炔基、2-丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基和 3-丁炔基。

[0048] “ C_{2-6} 杂环基”是指稳定的饱和、部分不饱和或不饱和的 (芳族的) 5-7 元单环杂环或 7-14 元二环杂环,由 2-6 个碳原子和 1、2、3 或 4 个独立选自 N、O 和 S 的杂原子组成,并且包括其中任何上述杂环与苯环稠合的任何二环基团。杂环基可以是取代或未取代的。示例性的取代基包括烷氧基、芳氧基、巯基、烷硫基、芳硫基、卤化物、羟基、氟代烷基、全氟烷基、氨基、氨基烷基、二取代氨基、季氨基、羟基烷基、羧基烷基和羧基。氮和硫杂原子可任选被氧化。杂环可通过导致稳定结构的任何杂原子或碳原子共价连接,例如,咪唑啉基

环可在环碳原子位置或在氮原子上连接。杂环中的氮原子可任选被季铵化。优选当杂环中 S 和 O 原子的总数超过 1 时,则这些杂原子互不相邻。杂环包括而限于 1H- 吡啶基、2- 吡咯烷酮基、2H,6H-1,5,2- 二噻嗪基、2H- 吡咯基、3H- 吡啶基、4- 哌啶酮基、4aH- 咪唑、4H- 噻嗪基、6H-1,2,5- 噻二嗪基、吡啶基、氮杂环辛烯基、苯并咪唑基、苯并呋喃基、苯并噻吩基 (benzothiofuranyl/benzothiophenyl)、苯并噁唑基、苯并噻唑基、苯并三唑基、苯并四唑基、苯并异噁唑基、苯并异噻唑基、苯并咪唑酮基、咪唑基、4aH- 咪唑基、b- 咪唑基、苯并二氢吡喃基、色烯基 (chromenyl)、噌啉基、十氢噌啉基、2H,6H-1,5,2- 二噻嗪基、二氢呋喃并 [2,3-b] 四氢呋喃、呋喃基、呋喃基、咪唑烷基、咪唑啉基、咪唑基、1H- 吡啶基、假吡啶基 (indolenyl)、二氢吡啶基、吡啶基、吡啶基、异苯并呋喃基、异苯并二氢吡喃基、异吡啶基、异二氢吡啶基、异吡啶基、异噻啉基、异噻唑基、异噁唑基、吗啉基、蔡啶基、八氢异噻啉基、噁二唑基、1,2,3- 噁二唑基、1,2,4- 噁二唑基、1,2,5- 噁二唑基、1,3,4- 噁二唑基、噁唑烷基、噁唑基、噁唑烷基、吡啶基、菲啶基、菲咯啉基、吩吡嗪基、吩嗪基、吩噻嗪基、吩噻噁基 (phenoxathiinyl)、吩噁嗪基、酞嗪基、哌嗪基、哌啶基、蝶啶基、哌啶酮基、4- 哌啶酮基、蝶啶基、嘌呤基、吡喃基、吡嗪基、吡唑烷基、吡唑啉基、吡唑基、哒嗪基、吡啶并噁唑、吡啶并咪唑、吡啶并噻唑、吡啶基 (pyridinyl/pyridyl)、嘧啶基、吡咯烷基、吡咯啉基、吡咯基、噻唑啉基、噻啉基、4H- 噻嗪基、噻啉基、奎宁环基、咪唑基、四氢呋喃基、四氢异噻啉基、四氢噻啉基、6H-1,2,5- 噻二嗪基、1,2,3- 噻二唑基、1,2,4- 噻二唑基、1,2,5- 噻二唑基、1,3,4- 噻二唑基、噻萘基、噻唑基、噻吩基、噻吩并噻唑基、噻吩并咪唑基、噻吩基、三嗪基、1,2,3- 三唑基、1,2,4- 三唑基、1,2,5- 三唑基、1,3,4- 三唑基、咕吨基。优选的 5-10 元杂环包括但不限于吡啶基、嘧啶基、三嗪基、呋喃基、噻吩基、噻唑基、吡咯基、吡唑基、咪唑基、噁唑基、异噁唑基、四唑基、苯并呋喃基、苯并噻吩基、吡啶基、苯并咪唑基、1H- 吡啶基、噁唑烷基、异噁唑烷基、苯并三唑基、苯并异噁唑基、羟吡啶基、苯并噁唑啉基、噻啉基和异噻啉基。优选的 5-6 元杂环包括但不限于吡啶基、嘧啶基、三嗪基、呋喃基、噻吩基、噻唑基、吡咯基、哌嗪基、哌啶基、吡唑基、咪唑基、噁唑基、异噁唑基和四唑基。

[0049] “C₆₋₁₂ 芳基”是指由具有共轭 π 电子的碳原子组成的环系的芳族基团 (例如苯基)。芳基具有 6-12 个碳原子。芳基可任选包括单环、二环或三环,其中每个环最好具有 5 元或 6 元。芳基可以是取代或未取代的。示例性的取代基包括烷基、羟基、烷氧基、芳氧基、巯基、烷硫基、芳硫基、卤化物、氟代烷基、羧基、羟基烷基、羧基烷基、氨基、氨基烷基、一取代氨基、二取代氨基和季氨基。

[0050] “C₇₋₁₄ 烷芳基”是指具有 7-14 个碳原子的被芳基 (例如苄基、苯乙基或 3,4- 二氯苯乙基) 取代的烷基。

[0051] “C₃₋₁₀ 烷杂环基”是指除一个或多个杂原子外还具有 3-10 个碳原子的烷基取代的杂环基 (例如 3- 呋喃基甲基、2- 呋喃基甲基、3- 四氢呋喃基甲基或 2- 四氢呋喃基甲基)。

[0052] “C₁₋₇ 杂烷基”是指除 1,2,3 或 4 个独立选自 N、O、S 和 P 的杂原子以外还具有 1-7 个碳原子的支链或无支链烷基、烯基或炔基。杂烷基包括而限于叔胺、仲胺、醚、硫醚、酰胺、硫代酰胺、氨基甲酸酯、硫代氨基甲酸酯、脘、亚胺、磷酸二酯、氨基磷酸酯、磺酰胺和二硫化物。杂烷基可任选包括单环、二环或三环,其中每个环最好具有 3-6 元。杂烷基可以是取代或未取代的。示例性的取代基包括烷氧基、芳氧基、巯基、烷硫基、芳硫基、卤化物、羟

基、氟代烷基、全氟烷基、氨基、氨基烷基、二取代氨基、季氨基、羟基烷基、羧基烷基和羧基。C₁₋₇ 杂烷基的实例包括而限于甲氧基甲基和乙氧基乙基。

[0053] “卤化物”是指溴、氯、碘或氟。

[0054] “氟代烷基”是指被氟原子取代的烷基。

[0055] “全氟烷基”是指仅由碳和氟原子组成的烷基。

[0056] “羧基烷基”是指具有式 -(R)-COOH 的化学部分,其中 R 选自 C₁₋₇ 烷基、C₂₋₇ 烯基、C₂₋₇ 炔基、C₂₋₆ 杂环基、C₆₋₁₂ 芳基、C₇₋₁₄ 烷芳基、C₃₋₁₀ 烷杂环基或 C₁₋₇ 杂烷基。“羟基烷基”是指具有式 -(R)-OH 的化学部分,其中 R 选自 C₁₋₇ 烷基、C₂₋₇ 烯基、C₂₋₇ 炔基、C₂₋₆ 杂环基、C₆₋₁₂ 芳基、C₇₋₁₄ 烷芳基、C₃₋₁₀ 烷杂环基或 C₁₋₇ 杂烷基。

[0057] “烷氧基”是指式 -OR 的化学取代基,其中 R 选自 C₁₋₇ 烷基、C₂₋₇ 烯基、C₂₋₇ 炔基、C₂₋₆ 杂环基、C₆₋₁₂ 芳基、C₇₋₁₄ 烷芳基、C₃₋₁₀ 烷杂环基或 C₁₋₇ 杂烷基。

[0058] “芳氧基”是指式 -OR 的化学取代基,其中 R 为 C₆₋₁₂ 芳基。

[0059] “烷硫基”是指式 -SR 的化学取代基,其中 R 选自 C₁₋₇ 烷基、C₂₋₇ 烯基、C₂₋₇ 炔基、C₂₋₆ 杂环基、C₆₋₁₂ 芳基、C₇₋₁₄ 烷芳基、C₃₋₁₀ 烷杂环基或 C₁₋₇ 杂烷基。

[0060] “芳硫基”是指式 -SR 的化学取代基,其中 R 为 C₆₋₁₂ 芳基。

[0061] “季氨基”是指式 -(R)-N(R')(R'')(R''')⁺ 的化学取代基,其中 R、R'、R'' 和 R''' 各自独立地为烷基、烯基、炔基或芳基。R 可以是连接季氨基氮原子的烷基,作为取代基与另一部分连接。氮原子 N 与烷基、杂烷基、杂芳基和 / 或芳基的 4 个碳原子共价连接,导致在氮原子上形成正电荷。

[0062] “带电荷部分”是指在生理 pH 下获得一个质子从而变成带有正电荷的部分(例如铵、胍𩶛或脒𩶛(amidinium))或包括无质子化的净形式正电荷的部分(例如季铵)。带电荷部分可以是永久带电荷的或短暂带电荷的。

[0063] 本文所使用的术语“母体”是指通道阻断化合物,可通过使母体化合物上存在的胺氮原子季铵化或胍基化(guanylation)而被修饰。季铵化和胍基化(guanylated)化合物是母体化合物的衍生物。本文所述胍基衍生物以其不带电荷的碱形式存在。这些化合物可作为盐(即酸加成盐)或以其不带电荷的碱形式(原位进行质子化形成带电荷部分)给予。

[0064] 从下面详尽的说明书和权利要求书来看,本发明的其它特征和优势将是显而易见的。

[0065] 附图详述

[0066] 图 1. 胞外 QX-314(5mM) 和辣椒素(1 μM) 的共同使用在辣椒素反应性背根神经节(DRG) 感觉神经元中选择性阻断钠电流。(a) 在小(24 μm) 辣椒素敏感性成体培养的 DRG 神经元中,仅 5mM QX-314(红色迹线)、仅 1 μM 辣椒素(绿色迹线)及 5mM QX-314 和 1 μM 辣椒素共同使用(蓝色迹线)的 10 分钟洗入(wash-in)对钠电流(由 -70mV 至 -5mV 的阶跃引起)的作用。上图:在该神经元中短暂使用辣椒素引起延长的内向电流(保持电压 -70mV)。(b) 大(52 μm) 辣椒素不敏感性神经元上同一系列药物应用对钠电流的作用。(c) 作为在对照(黑色符号)、仅 5mM QX-314 存在时(红色符号)、仅 1 μM 辣椒素(绿色符号)和共同使用 5mM QX-314 和 1 μM 辣椒素(蓝色符号)时记录的试验脉冲函数的峰值内向电流。符号表示 25 个小辣椒素敏感性神经元上进行实验的平均值 ± SEM。从 -70mV 的保持电位以 5mV 增幅到试验电位的范围通过 20ms 去极化阶跃而引起电流。(d) 辣椒素和

QX-314 的组合对峰值钠电流作用的时程。对相对于对照峰值归一化的钠电流峰值的平均值 \pm SEM 作柱状图 ($n = 25$)。

[0067] 图 2. 共同使用 QX-314 和辣椒素阻断伤害感受样 DRG 神经元的兴奋性。(a) 用于小 ($23 \mu\text{m}$) DRG 神经元的去极化电流阶跃 (250pA , 4ms) 引起伤害感受器样宽幅动作电位, 其中下降相 (箭头) 有明显偏转。QX-314 (5mM) 的 2 分钟洗入没有作用 (第二图)。辣椒素 ($1 \mu\text{M}$) 降低动作电位幅度 (第三图), 可能由图 1 中所示的由辣椒素产生的钠电流轻微减少与继由辣椒素产生的去极化而发生的钠电流失活的联合作用所致。即使用大得多的刺激电流注入, 共同使用 QX-314 和辣椒素可完全消除动作电位产生。(b) 动作电位幅度的平均值 \pm SEM (对于 QX-314, $n = 25$, 对于辣椒素和辣椒素 + QX-314, $n = 15$)。

[0068] 图 3. 辣椒素 ($10 \mu\text{g}/10 \mu\text{L}$) 与 QX-314 (2% , $10 \mu\text{L}$) 一起经足跖内注射导致对机械 (von Frey 细丝) 和热有害刺激的局部麻醉延长。(a) 在足跖处仅注射 QX-314 (2% , $10 \mu\text{L}$; 绿色符号)、仅辣椒素 ($10 \mu\text{g}/10 \mu\text{L}$; 黑色符号) 或 QX-314 和辣椒素同时使用 (红色符号) 后, 在响应强度递增的 von Frey 毛时缩爪的机械阈值。对最高值 (57g , 箭头) 完全不响应的动物数表示具有最大作用的时间点 ($* = p < 0.05$, 对于各组 $n = 6$)。(b) 对于缩爪的热 (辐射热) 阈值也相同。箭头表示截止值, 对最强刺激无响应的动物数目表示具有最大作用的时间点 ($* = p < 0.05$, 对于各组 $n = 6$)。

[0069] 图 4. 在接近坐骨神经处注射 QX-314 接着注射辣椒素使动物的后肢在不产生任何运动缺陷的情况下对有害机械刺激和热刺激无知觉。(a) 在坐骨神经仅注射 QX-314 (0.2% , $100 \mu\text{L}$)、仅辣椒素 ($0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, $100 \mu\text{L}$) 或在辣椒素之前 10 分钟注射 QX-314 后, 在响应强度递增的 von Frey 细丝时缩爪的机械阈值。对最高值 (57g , 箭头) 完全不响应的动物数表示具有最大作用的时间点 ($* = p < 0.05$, $** = p < 0.01$, 对于各组 $n = 6$)。(b) 对于缩爪的热 (辐射热) 阈值也相同。(c) 在坐骨神经注射利多卡因 (2% ; 0.2%)、QX-314 (0.2%)、辣椒素 ($5 \mu\text{g}/10 \mu\text{L}$) 和 QX-314 接着注射辣椒素后, 对运动功能改变 (分值: $2 =$ 完全麻痹; $1 =$ 部分麻痹; $0 =$ 无损害) 的评价。各栏上方表示受注射影响的动物数目。

[0070] 图 5. 小背根神经节神经元中钠通道电流的电压钳记录。数据显示仅丁香酚对钠电流具有适度抑制作用 ($10\text{--}20\%$ 抑制)。丁香酚和 QX-314 的共同使用产生可在 7 分钟后完成的逐步阻断。绘出两个实例, 是 10 次具有类似结果的代表性实验。

[0071] 图 6. 共同使用 TRPA 激动剂芥子油 (MO) ($50 \mu\text{M}$) 和 QX-314 (5mM)。仅 MO 降低钠电流达 $20\text{--}30\%$, 并且在大约 3 分钟后到达平稳期。共同使用 MO 和 QX-314 极大地降低了钠电流。

[0072] 图 7. 利多卡因 (膜可通透性钠通道抑制剂) 与 QX-314 和辣椒素一起共同使用。(a) 坐骨神经仅注射 QX-314 (2%)、仅利多卡因 (1%) 或 QX-314 和利多卡因共同注射后, 缩爪的热潜伏期 (辐射热) 阈值。(b) 在坐骨神经仅注射 QX-314 (2%)、仅利多卡因 (1%) 或 QX-314 和利多卡因共同注射后, 在响应强度递增的 von Frey 细丝时缩爪的机械阈值。(c) 在坐骨神经仅注射利多卡因 (1%)、仅 QX-314 (2%)、利多卡因和 QX-314 共同注射及辣椒素 ($1 \mu\text{g}/10 \mu\text{L}$)、利多卡因和 QX-314 共同注射后, 缩爪的热潜伏期 (辐射热) 阈值。(d) 在坐骨神经仅注射利多卡因 (1%)、仅 QX-314 (2%)、利多卡因和 QX-314 共同注射以及辣椒素 ($1 \mu\text{g}/10 \mu\text{L}$)、利多卡因和 QX-314 共同注射后, 在响应强度递增的 von Frey 细丝时缩

爪的机械阈值。每栏上方表示通过注射完全阻断伤害感受的动物数目。

[0073] 图 8. 辣椒素在注射到后爪后立即引起急性疼痛相关反应,以缩回来衡量。这在注射后持续约 15 分钟。辣椒素和 QX-314 的组合不阻断由辣椒素产生的急性疼痛激发反应,尽管之后接着是长期的疼痛感觉缺失。相反,注射辣椒素、QX-314 和利多卡因的组合提供强的疼痛感觉缺失,包括阻断仅由辣椒素引起的急性疼痛激发反应。

[0074] 发明详述

[0075] 疼痛感觉神经元中的电压依赖性离子通道目前在开发治疗疼痛的药物中引起极大关注。阻断疼痛感觉神经元的电压依赖性钠通道可以通过中断动作电位的引发和传递而阻断疼痛信号,而且阻断钙通道可阻止疼痛信号经神经传递至脊椎中的二级神经元。在此之前,在设计阻断钠通道或钙通道的有机小分子中的限制是当从外部用于靶细胞时它们必须是有活性的。大多数这类外部使用的分子是疏水性的,并且可通过细胞膜。因为这样,它们可进入所有细胞,因此没有只影响疼痛感觉神经元的选择性。然而,已知一些阻断剂(例如 QX-314)当在细胞内存在时才有效。至今,这类阻断剂主要用电生理记录技术进行研究,例如通过对膜进行机械破裂而允许在细胞内的透析的完整细胞膜片钳。在不杀死细胞的情况下机械破裂的困难和随后在细胞内可逆地使用阻断剂的困难,妨碍了可在细胞内起作用的药物分子的高通量筛选测定法的开发。

[0076] 我们发现了将电压门控离子通道的抑制剂递送至伤害感受神经元的方法。通过提供使这些抑制剂进入伤害感受神经元的途径,本发明允许在筛选和在治疗两方面使用作为药物阻断剂在细胞内部是有活性但不必是膜通透性的一整类分子。此外,在治疗条件下限制这类阻断剂进入疼痛感觉神经元允许这类药物的使用,即与其它类型的细胞相比,所述药物不一定对疼痛感觉神经元中的离子通道具有固有选择性,相反通过允许优先于神经系统和心血管系统中的其它细胞进入疼痛感觉神经元而获得它们对疼痛感觉神经元的选择性作用。另外,因为 TRPV1 受体尤其在与疼痛(例如炎症)相关的组织条件下常常更具有活性,因此优先进入与产生疼痛的组织最密切相关的特定感觉神经元。瘙痒敏感性初级感觉神经元还表达 TRP 通道,特别是 TRPV1,并且也适于该方法。

[0077] 下面将对本发明进行更详细的描述。

[0078] 电压门控离子通道的抑制剂

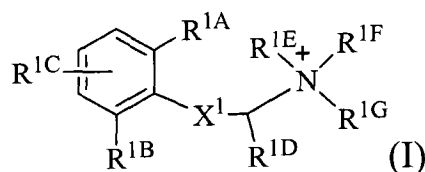
[0079] 当用于通道内面时用作电压门控离子通道的抑制剂但当用于通道外面时基本不抑制该通道且适用于本发明的方法、组合物和药盒的化合物最好是带正电荷的亲水化合物。在一个实施方案中,化合物是永久带电荷的(即具有不是短暂的电荷)。在另一个实施方案中,化合物是短暂带电荷的或部分带电荷的。电压门控钠通道的合适抑制剂包括但不限于 QX-314、N-甲基-普鲁卡因(QX-222)、N-辛基-胍、9-氨吡啶和泮库溴铵。电压门控钙通道的合适抑制剂包括但不限于 D-890(季铵型甲氧基维拉帕米)和 CERM 11888(季铵型苄普地尔)。

[0080] 另外,有许多已知的电压门控离子通道的抑制剂,其具有可用于本发明方法的适当大小(例如约 100-4,000Da、100-3,000Da、100-2,000Da、150-1,500Da 或甚至 200-1,200Da)并且具有胺基团,或者可经修饰以含有可易于修饰成带电荷的胺基团(例如像带正电荷的季胺基一样,或像短暂带电荷的胍基化合物一样)。这类抑制剂包括但不限于利鲁唑、美西律、苯妥英、卡马西平、普鲁卡因、妥卡尼、丙胺卡因、丙吡胺、苄环烷、奎尼

丁、溴苄胺、利法利嗪、拉莫三嗪、氟桂利嗪、阿替卡因、布比卡因、甲哌卡因和氟司必林。

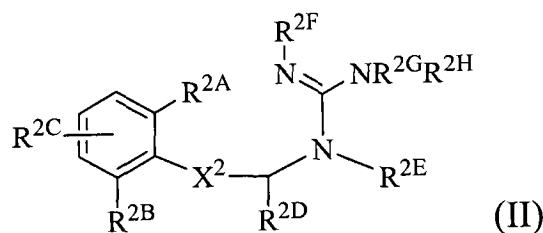
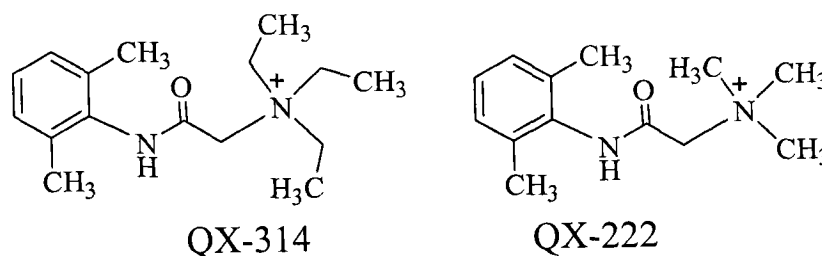
[0081] 可用于本发明的组合物、药盒和方法的化合物包括下式 I-X 的化合物：

[0082]



[0083] 式 I 中, R^{1A} 、 R^{1B} 和 R^{1C} 中的每一个独立选自 H、卤素、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基、 OR^{1H} 、 $NR^{1I}R^{1J}$ 、 $NR^{1K}C(O)R^{1L}$ 、 $S(O)R^{1M}$ 、 $SO_2R^{1N}R^{1O}$ 、 $SO_2NR^{1P}R^{1Q}$ 、 SO_3R^{1R} 、 CO_2R^{1S} 、 $C(O)R^{1T}$ 和 $C(O)NR^{1U}R^{1V}$ ； R^{1H} 、 R^{1I} 、 R^{1J} 、 R^{1K} 、 R^{1L} 、 R^{1M} 、 R^{1N} 、 R^{1O} 、 R^{1P} 、 R^{1Q} 、 R^{1R} 、 R^{1S} 、 R^{1T} 、 R^{1U} 和 R^{1V} 中的每一个独立选自 H、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基和 C_{2-4} 杂烷基, X^1 选自 $-CR^{1W}R^{1X}-$ 、 $-NR^{1Y}C(O)-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)NR^{1Z}-$ 、 $-CO_2-$ 和 $-OC(S)-$ ； R^{1W} 、 R^{1X} 、 R^{1Y} 和 R^{1Z} 中的每一个独立选自 H、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基和 C_{2-4} 杂烷基； R^{1D} 选自 H、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基和 C_{2-4} 杂烷基； R^{1E} 、 R^{1F} 和 R^{1G} 中的每一个独立选自 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基和 C_{2-4} 杂烷基；或者 R^{1D} 和 R^{1G} 一起构成具有至少一个氮原子的杂环。在一个优选的实施方案中, X^1 为 $NHC(O)-$ 。式 I 的示例性化合物包括麻醉药的甲基化季铵衍生物, 例如 N-甲基利多卡因、N,N-二甲基丙胺卡因、N,N,N-三甲基妥卡尼、N-甲基依替卡因、N-甲基罗哌卡因、N-甲基布比卡因、N-甲基左布比卡因、N-甲基甲哌卡因。这些衍生物可采用类似于流程 1 中所描述的方法制备。式 I 化合物包括 QX-314 (CAS 21306-56-9) 和 QX-222 (CAS 21236-55-5) (见下)。

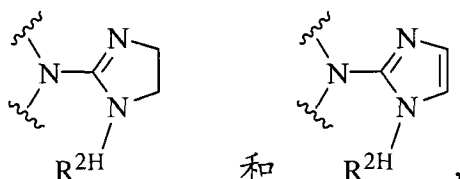
[0084]



[0085] 式 II 中, R^{2A} 、 R^{2B} 和 R^{2C} 中的每一个独立选自 H、卤素、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基、 OR^{2I} 、 $NR^{2J}R^{2K}$ 、 $NR^{2L}C(O)R^{2M}$ 、 $S(O)R^{2N}$ 、 $SO_2R^{2O}R^{2P}$ 、 $SO_2NR^{2Q}R^{2R}$ 、 SO_3R^{2S} 、 CO_2R^{2T} 、 $C(O)R^{2U}$ 和 $C(O)NR^{2V}R^{2W}$ ； R^{2I} 、 R^{2J} 、 R^{2K} 、 R^{2L} 、 R^{2M} 、 R^{2N} 、 R^{2O} 、 R^{2P} 、 R^{2Q} 、 R^{2R} 、 R^{2S} 、 R^{2T} 、 R^{2U} 、 R^{2V} 、 R^{2W} 中的每一个独立选自 H、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基和 C_{2-4} 杂烷基； X^2 选自 $-CR^{2X}R^{2Y}-$ 、 $-NR^{2Z}C(O)-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)NR^{2AA}-$ 、 $-CO_2-$ 和 $-OC(S)-$ ； R^{2X} 、 R^{2Y} 、 R^{2Z} 和 R^{2AA} 中的每一个独立选自 H、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基和 C_{2-4} 杂烷基； R^{2D} 选自 H、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基和 C_{2-4} 杂烷基； R^{2E} 为 H 或 C_{1-4} 烷基； R^{2F} 、 R^{2G} 和 R^{2H} 中的每一个独立选自 H、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基和 C_{2-4} 杂烷基；或者 R^{2F} 和 R^{2G} 一起构成具有两个氮原子的杂环。其中 R^{2F} 和 R^{2G} 形成具有两个氮原子的杂环, 所

得胍基最好选自：

[0086]

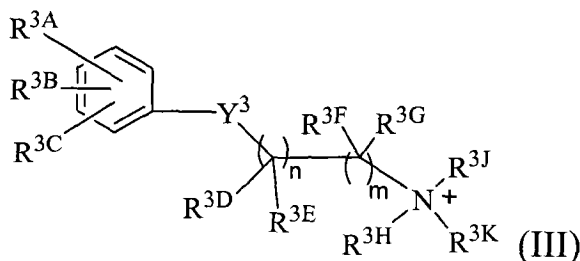


[0087] 其中 R^{2H} 为 H 或 CH_3 。 R^{2F} 和 R^{2G} 最好结合形成 2-4 个碳原子的亚烷基或亚烯基，例如 5、6 和 7 元环的环系。在一个优选的实施方案中， X^2 为 $NHC(O)-$ 。式 II 的示例性化合物包括麻醉药的 N- 胍基衍生物（例如 $-C(NH)NH_2$ 衍生物），例如脱乙基 -N- 胍基利多卡因、N- 胍基丙胺卡因、N- 胍基妥卡尼、脱乙基 -N- 胍基依替卡因、脱丁基 -N- 胍基罗哌卡因、脱丁基 -N- 胍基布比卡因、脱丁基 -N- 胍基左布比卡因、脱甲基 -N- 胍基甲哌卡因。这些衍生物可采用类似于流程 2-5 中所描述的方法制备。

[0088] 本文所述的胍基衍生物（例如式 II 化合物）以其不带电荷的碱形式提供。这些化合物可作为盐（即酸加成盐）或以其不带电荷的碱形式给予，其原位进行质子化形成带电荷部分。

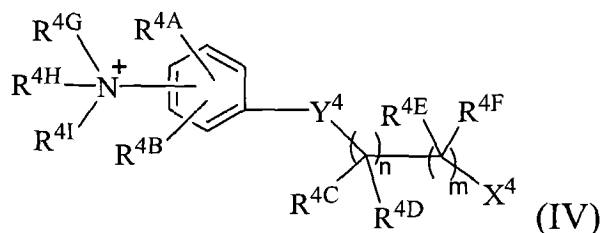
[0089] 式 I 和式 II 的母体药物的合成在文献中有记载。参见例如美国专利第 2, 441, 498 号（利多卡因的合成）、美国专利第 3, 160, 662 号（丙胺卡因的合成）、德国专利第 2235745 号（妥卡尼的合成）、德国专利第 2162744 号（依替卡因的合成）、PCT 公布号 W085/00599（罗哌卡因的合成）、美国专利第 2, 955, 111 号（布比卡因和左布比卡因的合成）和美国专利第 2, 799, 679 号（甲哌卡因的合成）。

[0090]



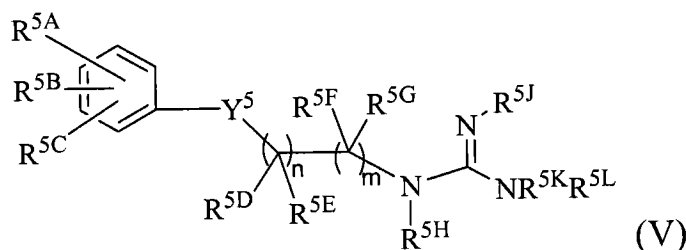
[0091] 式 III 中， $n = 0-3$ ， $m = 0-3$ ，其中 $(n+m) = 0-6$ ； R^{3A} 、 R^{3B} 和 R^{3C} 中的每一个独立选自 H、卤素、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基、 C_{2-4} 杂烷基、 OR^{3L} 、 $NR^{3M}R^{3N}$ 、 $NR^{3O}C(O)R^{3P}$ 、 $S(O)R^{3Q}$ 、 $SO_2R^{3R}R^{3S}$ 、 $SO_2NR^{3T}R^{3U}$ 、 SO_3R^{3V} 、 CO_2R^{3W} 、 $C(O)R^{3X}$ 和 $C(O)NR^{3Y}R^{3Z}$ ； R^{3L} 、 R^{3M} 、 R^{3N} 、 R^{3O} 、 R^{3P} 、 R^{3Q} 、 R^{3R} 、 R^{3S} 、 R^{3T} 、 R^{3U} 、 R^{3V} 、 R^{3W} 、 R^{3X} 、 R^{3Y} 、 R^{3Z} 中的每一个独立选自 H、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基和 C_{2-4} 杂烷基； Y^3 选自 $-CR^{3AA}R^{3AB}-$ 、 $-NR^{3AC}C(O)-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)NR^{3AD}-$ 、 $-CO_2-$ 和 $-OC(S)-$ ； R^{3AA} 、 R^{3AB} 、 R^{3AC} 和 R^{3AD} 中的每一个独立选自 H、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基和 C_{2-4} 杂烷基； R^{3D} 、 R^{3E} 、 R^{3F} 和 R^{3G} 中的每一个独立选自 H、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基、 C_{2-4} 杂烷基、 C_{2-6} 杂环基、 C_{6-12} 芳基、 C_{7-14} 烷芳基和 C_{3-10} 烷杂环基； R^{3H} 、 R^{3J} 和 R^{3K} 中的每一个独立选自 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基和 C_{2-4} 杂烷基。式 III 中的季氮在本文中用 N' 识别。式 III 的示例性化合物包括麻醉药的甲基化季铵衍生物，例如 N' - 甲基普鲁卡因、N' - 甲基丙美卡因、N' - 甲基奴佛卡因、N' - 甲基恩卡尼、N' - 甲基普鲁卡因胺、N' - 甲基甲氧氯普胺、N' - 甲基斯妥伐因、N' - 甲基丙氧卡因、N' - 甲基氯普鲁卡因、N', N' - 二甲基氟卡尼和 N' - 甲基丁卡因。这些衍生物可采用类似于流程 1 中所描述的方法制备。

[0092]



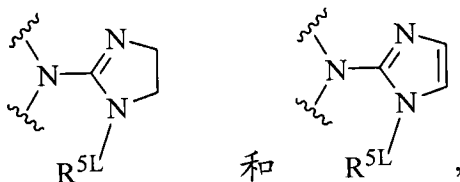
[0093] 式 IV 中, $n = 0-3$, $m = 0-3$, 其中 $(n+m) = 0-6$; R^{4A} 和 R^{4B} 中的每一个独立选自 H、卤素、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基、 C_{2-4} 杂烷基、 OR^{4L} 、 $NR^{4M}R^{4N}$ 、 $NR^{4O}C(O)R^{4P}$ 、 $S(O)R^{4Q}$ 、 $SO_2R^{4R}R^{4S}$ 、 $SO_2NR^{4T}R^{4U}$ 、 SO_3R^{4V} 、 CO_2R^{4W} 、 $C(O)R^{4X}$ 和 $C(O)NR^{4Y}R^{4Z}$; R^{4L} 、 R^{4M} 、 R^{4N} 、 R^{4O} 、 R^{4P} 、 R^{4Q} 、 R^{4R} 、 R^{4S} 、 R^{4T} 、 R^{4U} 、 R^{4V} 、 R^{4W} 、 R^{4X} 、 R^{4Y} 和 R^{4Z} 中的每一个独立选自 H、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基和 C_{2-4} 杂烷基; Y^4 选自 $-CR^{4AA}R^{4AB}-$ 、 $-NR^{4AC}C(O)-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)NR^{4AD}-$ 、 $-CO_2-$ 和 $-OC(S)-$; R^{4AA} 、 R^{4AB} 、 R^{4AC} 和 R^{4AD} 中的每一个独立选自 H、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基和 C_{2-4} 杂烷基; R^{4C} 、 R^{4D} 、 R^{4E} 和 R^{4F} 中的每一个独立选自 H、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基、 C_{2-4} 杂烷基、 C_{2-6} 杂环基、 C_{6-12} 芳基、 C_{7-14} 烷芳基和 C_{3-10} 烷杂环基; X^4 选自 H、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基和 $NR^{4J}R^{4K}$; R^{4J} 和 R^{4K} 中的每一个独立选自 H、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基和 C_{2-4} 杂烷基; R^{4G} 、 R^{4H} 和 R^{4I} 中的每一个独立选自 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基和 C_{2-4} 杂烷基。式 IV 中的季氮在本文中以 N^+ 识别。式 III 的示例性化合物包括麻醉药的甲基化季铵衍生物, 例如 N^+ , N^+ , N^+ -三甲基普鲁卡因、 N^+ , N^+ , N^+ -三甲基丙美卡因、 N^+ , N^+ , N^+ -三甲基普鲁卡因胺、 N^+ , N^+ , N^+ -三甲基甲氧氯普胺、 N^+ , N^+ , N^+ -三甲基丙氧卡因、 N^+ , N^+ , N^+ -三甲基氯普鲁卡因、 N^+ , N^+ -二甲基丁卡因、 N^+ , N^+ , N^+ -三甲基苯佐卡因和 N^+ , N^+ , N^+ -三甲基氨苯丁酯。这些衍生物可采用类似于流程 1 中所描述的方法制备。

[0094]



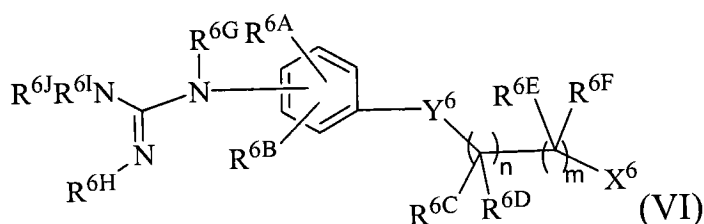
[0095] 式 V 中, $n = 0-3$, $m = 0-3$, 其中 $(n+m) = 0-6$; R^{5A} 、 R^{5B} 和 R^{5C} 中的每一个独立选自 H、卤素、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基、 C_{2-4} 杂烷基、 OR^{5M} 、 $NR^{5N}R^{5O}$ 、 $NR^{5P}C(O)R^{5Q}$ 、 $S(O)R^{5R}$ 、 $SO_2R^{5S}R^{5T}$ 、 $SO_2NR^{5U}R^{5V}$ 、 SO_3R^{5W} 、 CO_2R^{5X} 、 $C(O)R^{5Y}$ 和 $C(O)NR^{5Z}R^{5AA}$; R^{5M} 、 R^{5N} 、 R^{5O} 、 R^{5P} 、 R^{5Q} 、 R^{5R} 、 R^{5S} 、 R^{5T} 、 R^{5U} 、 R^{5V} 、 R^{5W} 、 R^{5X} 、 R^{5Y} 、 R^{5Z} 和 R^{5AA} 中的每一个独立选自 H、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基和 C_{2-4} 杂烷基; Y^5 选自 $-CR^{5AB}R^{5AC}-$ 、 $-NR^{5AD}C(O)-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)NR^{5AE}-$ 、 $-CO_2-$ 和 $-OC(S)-$; R^{5AB} 、 R^{5AC} 、 R^{5AD} 和 R^{5AE} 中的每一个独立选自 H、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基和 C_{2-4} 杂烷基; R^{5D} 、 R^{5E} 、 R^{5F} 和 R^{5G} 中的每一个独立选自 H、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基、 C_{2-4} 杂烷基、 C_{2-6} 杂环基、 C_{6-12} 芳基、 C_{7-14} 烷芳基和 C_{3-10} 烷杂环基; R^{5H} 为 H 或 C_{1-4} 烷基; R^{5J} 、 R^{5K} 和 R^{5L} 中的每一个独立选自 H、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基和 C_{2-4} 杂烷基; 或者 R^{5J} 和 R^{5K} 一起构成具有两个氮原子的杂环。其中 R^{5J} 和 R^{5K} 形成具有两个氮原子的杂环, 所得胍基最好选自:

[0096]



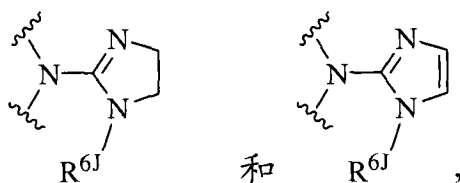
[0097] 其中 R^{5L} 为 H 或 CH_3 。 R^{5J} 和 R^{5K} 最好结合形成 2-4 个碳原子的亚烷基或亚烯基, 例如 5、6 和 7 元环的环系。式 V 中的胍基化氮在本文中用 N' 识别。式 V 的示例性化合物包括麻醉药的 N-胍基衍生物 (例如 $-C(NH)NH_2$ 衍生物), 例如脱乙基-N'-胍基普鲁卡因、脱乙基-N'-胍基丙美卡因、脱乙基-N'-胍基奴佛卡因、脱甲基-N'-胍基恩卡尼、脱乙基-N'-胍基普鲁卡因胺、脱乙基-N'-胍基甲氧氯普胺、脱甲基-N'-胍基斯妥伐因、脱乙基-N'-胍基丙氧卡因、脱乙基-N'-胍基氯普鲁卡因、N'-胍基氟卡尼和脱乙基-N'-胍基丁卡因。这些衍生物可采用类似于流程 2-5 中所描述的方法制备。

[0098]



[0099] 式 VI 中, $n = 0-3$, $m = 0-3$, 其中 $(n+m) = 0-6$; R^{6A} 和 R^{6B} 中的每一个独立选自 H、卤素、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基、 C_{2-4} 杂烷基、 OR^{6K} 、 $NR^{6L}R^{6M}$ 、 $NR^{6N}C(O)R^{6O}$ 、 $S(O)R^{6P}$ 、 $SO_2R^{6Q}R^{6R}$ 、 $SO_2NR^{6S}R^{6T}$ 、 SO_3R^{6U} 、 CO_2R^{6V} 、 $C(O)R^{6W}$ 和 $C(O)NR^{6X}R^{6Y}$; R^{6K} 、 R^{6L} 、 R^{6M} 、 R^{6N} 、 R^{6O} 、 R^{6P} 、 R^{6Q} 、 R^{6R} 、 R^{6S} 、 R^{6T} 、 R^{6U} 、 R^{6V} 、 R^{6W} 、 R^{6X} 和 R^{6Y} 中的每一个独立选自 H、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基和 C_{2-4} 杂烷基; Y^6 选自 $-CR^{6Z}R^{6AA}$ 、 $-NR^{6AB}C(O)-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)NR^{6AC}-$ 、 $-CO_2-$ 和 $-OC(S)-$; R^{6Z} 、 R^{6AA} 、 R^{6AB} 和 R^{6AC} 中的每一个独立选自 H、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基和 C_{2-4} 杂烷基; R^{6C} 、 R^{6D} 、 R^{6E} 和 R^{6F} 中的每一个独立选自 H、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基、 C_{2-4} 杂烷基、 C_{2-6} 杂环基、 C_{6-12} 芳基、 C_{7-14} 烷芳基和 C_{3-10} 烷杂环基; X^6 选自 H、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基和 $NR^{6AD}R^{6AE}$; R^{6AD} 和 R^{6AE} 中的每一个独立选自 H、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基和 C_{2-4} 杂烷基; R^{6G} 为 H 或 C_{1-4} 烷基; R^{6H} 、 R^{6I} 和 R^{6J} 中的每一个独立选自 H、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基和 C_{2-4} 杂烷基; 或者 R^{6H} 和 R^{6I} 一起构成具有两个氮原子的杂环。其中 R^{6H} 和 R^{6I} 形成具有两个氮原子的杂环, 所得胍基最好选自:

[0100]

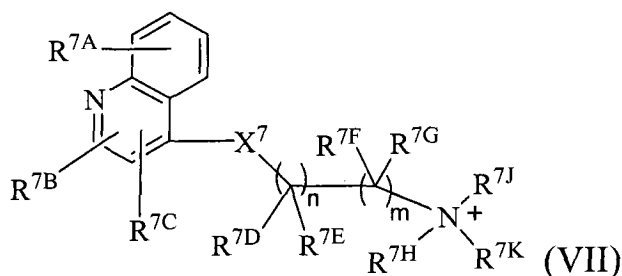


[0101] 其中 R^{6J} 为 H 或 CH_3 。 R^{6H} 和 R^{6I} 最好结合形成 2-4 个碳原子的亚烷基或亚烯基, 例如 5、6 和 7 元环的环系。式 V 中的胍基化氮在本文中用 N'' 识别。式 VI 的示例性化合物包括麻醉药的 N-胍基衍生物 (例如 $-C(NH)NH_2$ 衍生物), 例如 N'' -胍基普鲁卡因、 N'' -胍基丙美卡因、 N'' -胍基普鲁卡因胺、 N'' -胍基甲氧氯普胺、 N'' -胍基丙氧卡因、 N'' -胍基氯普鲁卡因、 N'' -胍基丁卡因、 N'' -胍基苯佐卡因和 N'' -胍基氨苯丁酯。这些衍生物可采用类

似于流程 2-5 中所描述的方法制备。

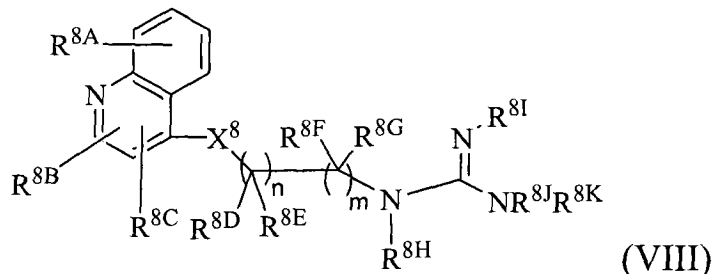
[0102] 式 III-VI 的母体药物的合成在文献中已有记载。参见例如美国专利第 812, 554 号 (普鲁卡因的合成); Clinton 等, J. Am. Chem. Soc. 74 :592(1952) (丙美卡因的合成); 美国专利第 2, 689, 248 号 (丙氧卡因的合成); Hadicke 等, Pharm. Zentralh. 94 :384(1955) (氯普鲁卡因的合成); 美国专利第 1, 889, 645 号 (丁卡因的合成); Salkowski 等, Ber. 28 : 1921(1895) (苯佐卡因的合成); Brill 等, J. Am. Chem. Soc. 43 :1322(1921) (氨基丁酯的合成); 美国专利第 3, 931, 195 号 (恩卡尼的合成); Yamazaki 等, J. Pharm. Soc. Japan 73 : 294(1953) (普鲁卡因胺的合成); 美国专利第 3, 177, 252 号 (甲氧氯普胺的合成); 美国专利第 3, 900, 481 号 (氟卡尼的合成) 和 Fourneau 等, Bull. Sci. Pharmacol. 35 :273(1928) (斯妥伐因的合成)。

[0103]



[0104] 式 VII 中, $n = 0-3$, $m = 0-3$, 其中 $(n+m) = 0-6$; R^{7A} 、 R^{7B} 和 R^{7C} 中的每一个独立选自 H、卤素、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基、 C_{2-4} 杂烷基、 OR^{7L} 、 $NR^{7M}R^{7N}$ 、 $NR^{7O}C(O)R^{7P}$ 、 $S(O)R^{7Q}$ 、 $SO_2R^{7R}R^{7S}$ 、 $SO_2NR^{7T}R^{7U}$ 、 SO_3R^{7V} 、 CO_2R^{7W} 、 $C(O)R^{7X}$ 和 $C(O)NR^{7Y}R^{7Z}$; R^{7L} 、 R^{7M} 、 R^{7N} 、 R^{7O} 、 R^{7P} 、 R^{7Q} 、 R^{7R} 、 R^{7S} 、 R^{7T} 、 R^{7U} 、 R^{7V} 、 R^{7W} 、 R^{7X} 、 R^{7Y} 和 R^{7Z} 中的每一个独立选自 H、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基和 C_{2-4} 杂烷基; X^7 选自 $-CR^{7AA}R^{7AB}-$ 、 $-NR^{7AC}C(O)-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)NR^{7AD}-$ 、 $-CO_2-$ 和 $-OC(S)-$; R^{7AA} 、 R^{7AB} 、 R^{7AC} 和 R^{7AD} 中的每一个独立选自 H、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基和 C_{2-4} 杂烷基; R^{7D} 、 R^{7E} 、 R^{7F} 和 R^{7G} 中的每一个独立选自 H、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基、 C_{2-4} 杂烷基、 C_{2-6} 杂环基、 C_{6-12} 芳基、 C_{7-14} 烷芳基和 C_{3-10} 烷杂环基; R^{7H} 、 R^{7J} 和 R^{7K} 中的每一个独立选自 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基和 C_{2-4} 杂烷基。在一个优选的实施方案中, X^7 为 $C(O)NH-$ 。式 VII 的示例性化合物包括麻醉药的甲基化季铵衍生物, 例如 N'-甲基狄布卡因。这些衍生物可采用类似于流程 1 中所描述的方法制备。

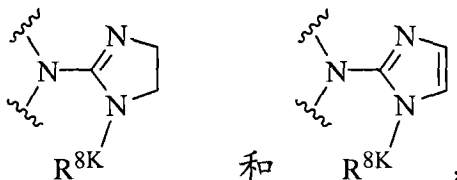
[0105]



[0106] 式 VIII 中, $n = 0-3$, $m = 0-3$, 其中 $(n+m) = 0-6$; R^{8A} 、 R^{8B} 和 R^{8C} 中的每一个独立选自 H、卤素、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基、 C_{2-4} 杂烷基、 OR^{8L} 、 $NR^{8M}R^{8N}$ 、 $NR^{8O}C(O)R^{8P}$ 、 $S(O)R^{8Q}$ 、 $SO_2R^{8R}R^{8S}$ 、 $SO_2NR^{8T}R^{8U}$ 、 SO_3R^{8V} 、 CO_2R^{8W} 、 $C(O)R^{8X}$ 和 $C(O)NR^{8Y}R^{8Z}$; R^{8L} 、 R^{8M} 、 R^{8N} 、 R^{8O} 、 R^{8P} 、 R^{8Q} 、 R^{8R} 、 R^{8S} 、 R^{8T} 、 R^{8U} 、 R^{8V} 、 R^{8W} 、 R^{8X} 、 R^{8Y} 和 R^{8Z} 中的每一个独立选自 H、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基和 C_{2-4} 杂烷

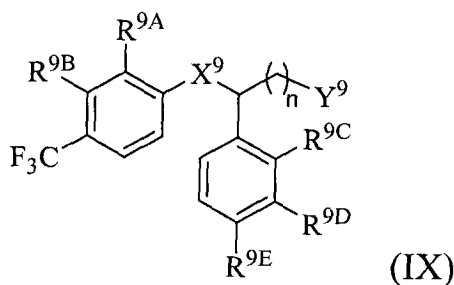
基; X^8 选自 $-CR^{8AA}R^{8AB}-$ 、 $-NR^{8AC}C(O)-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)NR^{8AD}-$ 、 $-CO_2-$ 和 $-OC(S)-$; R^{8AA} 、 R^{8AB} 、 R^{8AC} 和 R^{8AD} 中的每一个独立选自 H、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基和 C_{2-4} 杂烷基; R^{8D} 、 R^{8E} 、 R^{8F} 和 R^{8G} 中的每一个独立选自 H、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基、 C_{2-4} 杂烷基、 C_{2-6} 杂环基、 C_{6-12} 芳基、 C_{7-14} 烷芳基和 C_{3-10} 烷杂环基; R^{8H} 为 H 或 C_{1-4} 烷基; R^{8I} 、 R^{8J} 和 R^{8K} 中的每一个独立选自 H、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基和 C_{2-4} 杂烷基; 或者 R^{8I} 和 R^{8J} 一起构成具有两个氮原子的杂环。其中 R^{8I} 和 R^{8J} 形成具有两个氮原子的杂环, 所得胍基最好选自:

[0107]

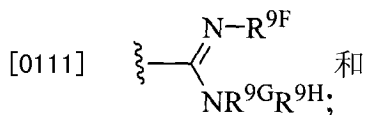


[0108] 其中 R^{8K} 为 H 或 CH_3 。 R^{8I} 和 R^{8J} 最好结合形成 2-4 个碳原子的亚烷基或亚烯基, 例如 5,6 和 7 元环的环系。式 V 中的胍基化氮在本文中用 N' 识别。在一个优选的实施方案中, X^8 为 $C(O)NH-$ 。式 VIII 的示例性化合物包括麻醉药的 N-胍基衍生物 (例如 $-C(NH)NH_2$ 衍生物), 例如脱乙基-N-胍基狄布卡因。这些衍生物可采用类似于流程 2-5 中所描述的方法制备。

[0109]

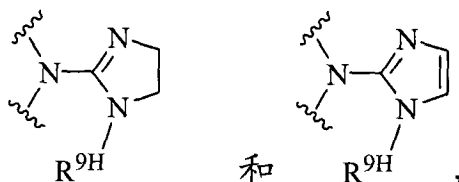


[0110] 式 IX 中, $n = 0-6$; R^{9A} 、 R^{9B} 、 R^{9C} 、 R^{9D} 和 R^{9E} 中的每一个独立选自 H、卤素、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基、 OR^{9I} 、 $NR^{9J}R^{9K}$ 、 $NR^{9L}C(O)R^{9M}$ 、 $S(O)R^{9N}$ 、 $SO_2R^{9O}R^{9P}$ 、 $SO_2NR^{9Q}R^{9R}$ 、 SO_3R^{9S} 、 CO_2R^{9T} 、 $C(O)R^{9U}$ 和 $C(O)NR^{9V}R^{9W}$; R^{9I} 、 R^{9J} 、 R^{9K} 、 R^{9L} 、 R^{9M} 、 R^{9N} 、 R^{9O} 、 R^{9P} 、 R^{9Q} 、 R^{9R} 、 R^{9S} 、 R^{9T} 、 R^{9U} 、 R^{9V} 和 R^{9W} 中的每一个独立选自 H、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基和 C_{2-4} 杂烷基; X^9 选自 $-CR^{9X}R^{9Y}-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 和 $-NR^{9Z}-$; R^{9X} 、 R^{9Y} 和 R^{9Z} 中的每一个独立选自 H、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基和 C_{2-4} 杂烷基; Y^9 为 $NR^{9AA}NR^{9AB}NR^{9AC}$ 或 $NR^{9AD}Z^9$; R^{9AA} 、 R^{9AB} 和 R^{9AC} 中的每一个独立选自 H、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基和 C_{2-4} 炔基; R^{9AD} 为 H 或 C_{1-4} 烷基; Z^9 为



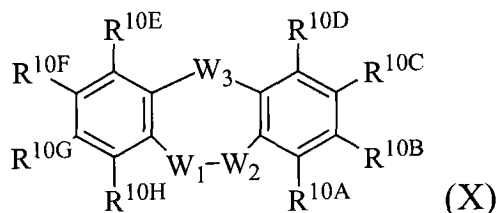
[0112] R^{9F} 、 R^{9G} 和 R^{9H} 中的每一个独立选自 H、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基和 C_{2-4} 炔基, 或者 R^{9F} 和 R^{9G} 一起构成具有两个氮原子的杂环。其中 R^{9F} 和 R^{9G} 形成具有两个氮原子的杂环, 所得胍基最好选自:

[0113]



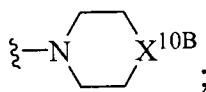
[0114] 其中 R^{9H} 为 H 或 CH_3 。 R^{9F} 和 R^{9G} 最好结合形成 2-4 个碳原子的亚烷基或亚烯基, 例如 5、6 和 7 元环的环系。在一个优选的实施方案中, $X^9 = -O-$ 。式 IX 的示例性化合物包括 N-胍基衍生物 (例如 $-C(NH)NH_2$ 衍生物), 例如 N-胍基氟西汀; 及甲基化季铵衍生物, 例如 N, N-二甲基氟西汀。这些衍生物可采用类似于流程 1-5 中所描述的方法制备。

[0115]

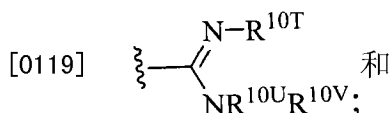


[0116] 式 X 中, W_3 为 O、NH、 NCH_2R^{10J} 、 $NC(O)CH_2R^{10J}$ 、 $CHCH_2R^{10J}$ 、 $C=CHR^{10J}$ 或 $C=CHR^{10K}$; W_1-W_2 为 S、O、 $OCHR^{10K}$ 、 $SCHR^{10K}$ 、 $N=CR^{10K}$ 、 $CHR^{10L}-CHR^{10K}$ 或 $CR^{10L}=CR^{10K}$; R^{10A} 、 R^{10B} 、 R^{10C} 、 R^{10D} 、 R^{10E} 、 R^{10F} 、 R^{10G} 和 R^{10H} 中的每一个独立选自 H、OH、卤化物、 C_{1-4} 烷基和 C_{2-4} 杂烷基; R^{10J} 为 $CH_2CH_2X^{10A}$ 或 $CH(CH_3)CH_2X^{10A}$; R^{10L} 为 H 或 OH; R^{10K} 为 H、OH 或以下基团:

[0117]

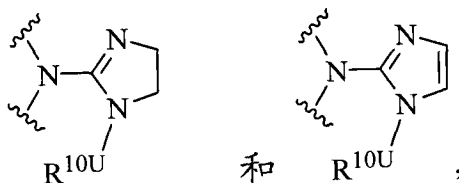


[0118] X^{10A} 为 $NR^{10M}R^{10N}R^{10P}$ 或 $NR^{10Q}X^{10C}$; X^{10B} 为 $NR^{10R}R^{10S}$ 或 NX^{10C} ; R^{10M} 、 R^{10N} 、 R^{10P} 、 R^{10R} 和 R^{10S} 中的每一个独立选自 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基和 C_{2-4} 杂烷基, 或者 R^{10R} 和 R^{10S} 一起构成具有至少一个氮原子的杂环; R^{10Q} 为 H 或 C_{1-4} 烷基; X^{10C} 为



[0120] R^{10T} 、 R^{10U} 和 R^{10V} 中的每一个独立选自 H、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基和 C_{2-4} 炔基, 或者 R^{10T} 和 R^{10V} 一起构成具有两个氮原子的杂环。其中 R^{10T} 和 R^{10V} 形成具有两个氮原子的杂环, 所得胍基最好选自:

[0121]



[0122] 其中 R^{10U} 为 H 或 CH_3 。 R^{10T} 和 R^{10V} 最好结合形成 2-4 个碳原子的亚烷基或亚烯基, 例如 5、6 和 7 元环的环系。式 X 的示例性化合物包括 N-胍基衍生物 (例如 $-C(NH)NH_2$ 衍生物) 和甲基化季铵衍生物。式 X 的 N-胍基衍生物包括而限于 N-胍基阿莫沙平、脱甲基-N-胍基曲米帕明、脱甲基-N-胍基度硫平、脱甲基-N-胍基多塞平、脱甲基-N-胍基阿米替林、N-胍基普罗替林、N-胍基地昔帕明、脱甲基-N-胍基氯米帕明、脱甲基-N-胍基氯

氮平、脱甲基-N-胍基洛沙平、N-胍基去甲替林、脱甲基-N-胍基环苯扎林、脱甲基-N-胍基赛庚啉、脱甲基-N-胍基奥洛他定、脱甲基-N-胍基异丙嗪、脱甲基-N-胍基阿利马嗪、脱甲基-N-胍基氯普噻吨、脱甲基-N-胍基氯丙嗪、脱甲基-N-胍基丙酰马嗪、脱甲基-N-胍基丙氯拉嗪、脱甲基-N-胍基硫乙拉嗪、脱甲基-N-胍基三氟拉嗪、脱乙基-N-胍基乙沙西嗪和脱甲基-N-胍基丙米嗪。式 X 的甲基化季铵衍生物包括而不限于 N,N-二甲基阿莫沙平、N-甲基曲米帕明、N-甲基度硫平、N-甲基多塞平、N-甲基阿米替林、N,N-二甲基普罗替林、N,N-二甲基地昔帕明、N-甲基氯米帕明、N-甲基氯氮平、N-甲基洛沙平、N,N-二甲基去甲替林、N-甲基环苯扎林、N-甲基赛庚啉、N-甲基奥洛他定、N-甲基异丙嗪、N-甲基阿利马嗪、N-甲基氯普噻吨、N-甲基氯丙嗪、N-甲基丙酰马嗪、N-甲基莫雷西嗪、N-甲基丙氯拉嗪、N-甲基硫乙拉嗪、N-甲基氟奋乃静、N-甲基奋乃静、N-甲基三氟噻醇 (flupenthixol)、N-甲基醋奋乃静、N-甲基三氟拉嗪、N-甲基乙沙西嗪和 N-甲基丙米嗪。这些衍生物可采用类似于流程 1-5 中所描述的方法制备。

[0123] 如本文所述可胍基化或季铵化的可含有胺氮的其它离子通道阻断剂包括而不限于奥芬那君、芬苯扎胺 (phenbenzamine)、苄普地尔、匹莫齐特、五氟利多、氟桂利嗪、氟司必林、丙哌维林、丙吡胺、美沙酮、托特罗定、三乙己苯胺盐 (tridihexethyl salt)、曲吡那敏、美吡拉敏、溴苯那敏、氯非尼拉敏、右氯苯那敏、卡比沙明、左醋美沙朵、戈洛帕米、维拉帕米、地伐帕米、噻帕米、依莫帕米、达克罗宁、普莫卡因、拉莫三嗪、米贝拉地尔、加巴喷丁、阿米洛利、地尔硫草、硝苯地平、尼莫地平、尼群地平、可卡因、美西律、普罗帕酮、奎尼丁、奥西卡因、阿替卡因、利鲁唑、苄环烷、利法利嗪和士的宁。可对另外其它的离子通道阻断剂进行修饰以掺入适于季铵化或胍基化的氮原子。这些离子通道阻断剂包括而不限于磷苯妥英、乙苯妥英、苯妥英、卡马西平、奥卡西平、托吡酯、唑尼沙胺和丙戊酸盐。

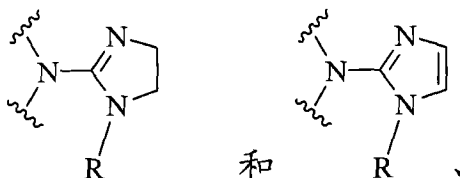
[0124] 合成

[0125] 电荷修饰的离子通道阻断剂的合成可包括母体离子通道阻断剂、连接基、大位阻基团 (bulky group) 和 / 或带电荷基团的醇、胺、酮、巯基或羧基官能团的选择性保护和脱保护。例如,胺的常用保护基包括氨基甲酸酯,例如叔丁酯、苄酯、2,2,2-三氯乙酯、2-三甲基甲硅烷基乙酯、9-苄基甲酯、烯丙基和间硝基苄酯。其它胺的常用保护基包括酰胺,例如甲酰胺、乙酰胺、三氟乙酰胺、磺酰胺、三氟甲磺酰胺、三甲基甲硅烷基乙磺酰胺和叔丁基磺酰胺。羧基的常用保护基的实例包括酯,例如甲酯、乙酯、叔丁酯、9-苄基甲酯、2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基甲酯、苄酯、二苄基甲酯、邻硝基苄酯、原酸酯和卤代酯。醇的常用保护基的实例包括醚,例如甲基醚、甲氧基甲基醚、甲氧基乙氧基甲基醚、甲硫基甲基醚、苄氧基甲基醚、四氢吡喃基醚、乙氧基乙基醚、苄基醚、2-萘基 (naphthyl) 甲基醚、邻硝基苄基醚、对硝基苄基醚、对甲氧基苄基醚、9-苄基咕吨基醚、三苯甲基 (包括甲氧基-三苯甲基) 醚和甲硅烷基醚。巯基的常用保护基的实例包括多种用于羟基的相同保护基。另外,可以还原形式 (例如二硫化物) 或氧化形式 (例如磺酸、磺酸酯或磺酰胺) 将巯基保护起来。可以选择保护基,使得需要选择性条件 (例如酸性条件、碱性条件、由亲核试剂引起催化、由路易斯酸 (lewis acid) 引起催化或者氢化) 以脱去每个保护基 (不包括分子上的其它保护基)。将保护基加到胺、醇、巯基和羧基官能团上所必须的条件及其脱去保护基所必须的条件详情可参见 T. W. Green 和 P. G. M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis (第 2 版), John Wiley & Sons, 1991 和 P. J. Kocienski, Protecting Groups, Georg Thieme

Verlag, 1994。

[0126] 电荷修饰的离子通道阻断剂可采用本领域技术人员所熟知的技术制备。例如,修饰可采用文献所述技术对母体离子通道阻断剂进行烷基化 (J. March, Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure, John Wiley & Sons, Inc., 1992, 第 617 页)。氨基向胍基的转化可采用标准合成方案进行。例如, Mosher 披露了通过使氨基亚氨基甲磺酸与胺反应来制备一取代胍的通用方法 (Kim 等, *Tetrahedron Lett.* 29: 3183 (1988))。Bernatowicz 采用 1H-吡唑-1-甲脒盐酸盐、1H-吡唑-1-(N,N'-双(叔丁氧基羰基)甲脒或 1H-吡唑-1-(N,N'-双(苄氧基羰基)甲脒, 开发出更方便地使伯胺和仲胺胍基化的方法。这些试剂与胺反应, 得到一取代胍 (参见 Bernatowicz 等, *J. Org. Chem.* 57: 2497 (1992); 以及 Bernatowicz 等, *Tetrahedron Lett.* 34: 3389 (1993))。另外, 有研究表明硫脲和 S-烷基-异硫脲在取代胍合成中是有用的中间体 (Poss 等, *Tetrahedron Lett.* 33: 5933 (1992))。在某些实施方案中, 胍是具有两个氮原子的杂环的组成部分 (参见例如下列结构)。环系可包括亚烷基或

[0127]

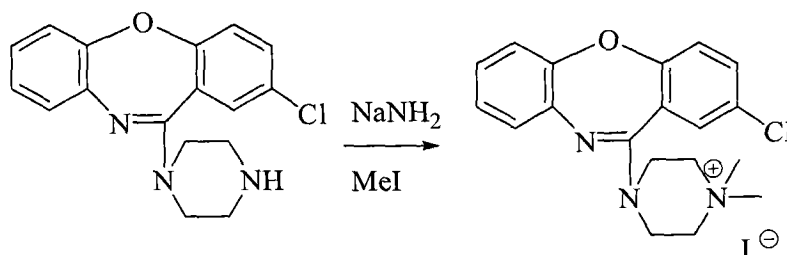


[0128] 2-4 个碳原子的亚烯基, 例如 5、6 和 7 元环的环系。这类环系可采用例如 Schlama 等人公开的方法制备 (Schlama 等, *J. Org. Chem.*, 62: 4200 (1997))。

[0129] 电荷修饰的离子通道阻断剂可通过使流程 1 中所示的母体化合物的胺氮烷基化而制备:

[0130] 流程 1

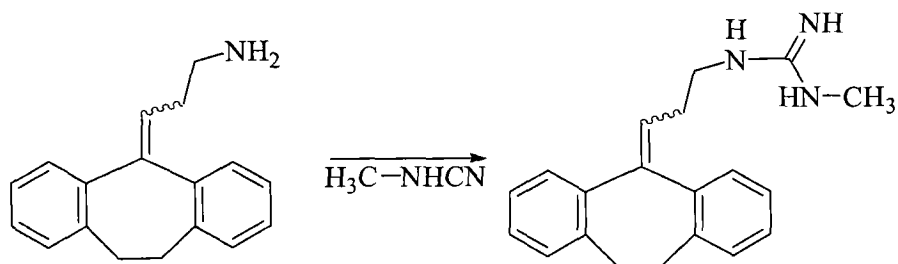
[0131]



[0132] 或者, 电荷修饰的离子通道阻断剂可通过引入胍基团来制备。可使母体化合物与氨脒 (cyanamide) 反应, 氨脒例如流程 2 中所示的甲基氨脒, 或如流程 3 中所示的吡唑-1-甲脒衍生物, 其中 Z 为 H 或合适的保护基。或者, 可使母体化合物与溴化氰反应, 接着与如流程 4 中所示的甲基氯氨基铝 (methylchloroaluminum amide) 反应。还可使用 2-(甲硫基)-2-咪唑啉等试剂来制备适当官能化的衍生物 (流程 5)。

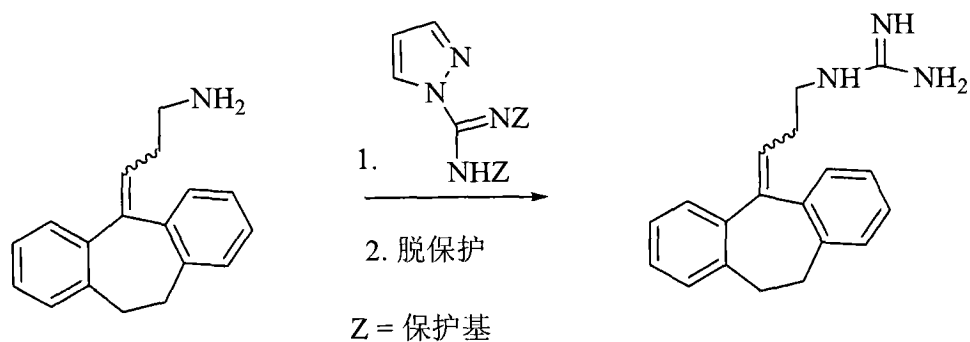
[0133] 流程 2

[0134]



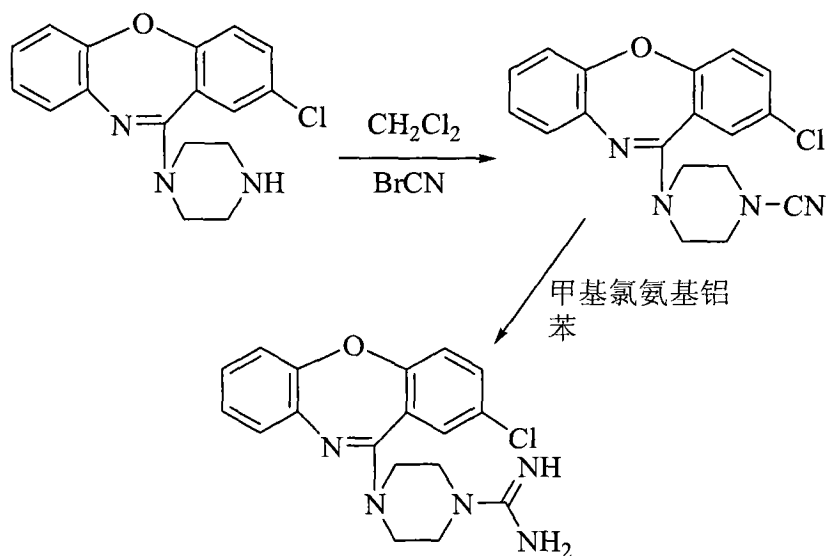
[0135] 流程 3

[0136]



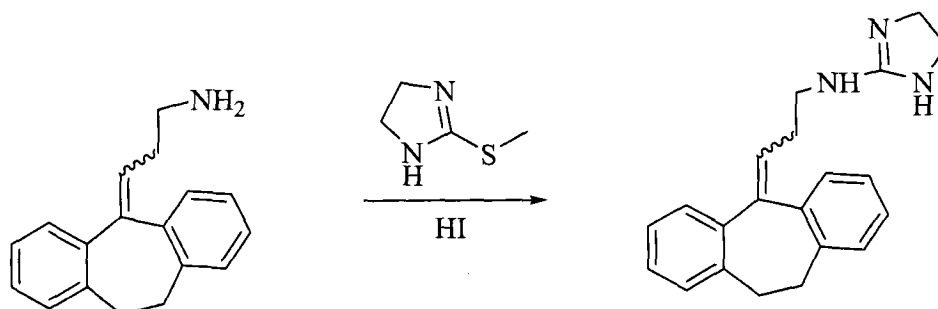
[0137] 流程 4

[0138]



[0139] 流程 5

[0140]



[0141] 含有胺氮原子的任何离子通道阻断剂均可按流程 1-5 中所示方法修饰。

[0142] TRPV1 激动剂

[0143] 可用于本发明的方法、组合物和药盒的 TRPV1 激动剂包括但不限于激活伤害感受器上的 TRPV1 受体并允许至少一种电压门控离子通道抑制剂进入的任何激动剂。合适的 TRPV1 激动剂包括但不限于辣椒素、二氢辣椒素和去甲二氢辣椒素、利多卡因、阿替卡因、普鲁卡因、丁卡因、甲哌卡因、布比卡因、丁香酚、樟脑、克霉唑、arvanil(N-花生四烯酰香草胺)、花生四烯酰乙醇酰胺、2-氨基乙氧基二苯基硼酸酯(2APB)、AM404、树脂毒素、佛波醇 12-苯基乙酸酯 13-乙酸酯 20-高香草酸酯(PPAHV)、奥伐尼(NE 19550)、OLDA(N-油酰多巴胺)、N-花生四烯酰多巴胺(NADA)、6'-碘树脂毒素(6'-IRTX)、C18 N-酰基乙醇胺、脂加氧酶衍生物例如 12-氢过氧化二十碳四烯酸、抑制剂半胱氨酸结模体(ICK)肽(vanillotoxins)、胡椒碱、MSK195(N-[2-(3,4-二甲基苄基)-3-(新戊酰氧基)丙基]-2-[4-(2-氨基乙氧基)-3-甲氧基苄基]乙酰胺)、JYL79(N-[2-(3,4-二甲基苄基)-3-(新戊酰氧基)丙基]-N'-(4-羟基-3-甲氧基苄基)硫脲)、羟基- α -山椒素、2-氨基乙氧基二苯基硼酸酯、10-姜烯酚、油基姜醇、油基姜烯酚、SU200(N-(4-叔丁基苄基)-N'-(4-羟基-3-甲氧基苄基)硫脲)诺香草胺和四氢异喹啉的脂肪酰胺。

[0144] 可用作 TRPV1 激动剂的其它化合物为阿普林定、苯佐卡因、布他卡因、可卡因、狄布卡因、恩卡尼、美西律、奥西卡因(oxethacaine)、丙胺卡因、丙美卡因、普鲁卡因胺、N-乙酰普鲁卡因胺、氯普鲁卡因(盐酸氯普鲁卡因(nesacaine/nescaine)、达克罗宁、依替卡因、左布比卡因、罗哌卡因、环美卡因、二甲卡因(larocaine)、丙氧卡因、三甲卡因和氨丁卡因。

[0145] TRP1A 激动剂

[0146] 可用于本发明的方法、组合物和药盒的 TRP1A 激动剂包括激活伤害感受器或瘙痒感受器上的 TRP1A 受体并允许至少一种电压门控离子通道抑制剂进入的任何激动剂。合适的 TRP1A 激动剂包括但不限于桂皮醛、异硫氰酸烯丙酯、二硫化二烯丙基、icilin、桂皮油、冬青油、丁子香油、丙烯醛、羟基- α -山椒素、2-氨基乙氧基二苯基硼酸酯、4-羟基壬烯醛、对羟基苯甲酸甲酯、芥子油、环己基氨基甲酸 3'-氨基甲酰基联苯-3-基酯(URB597)和硫代水杨酸法呢基酯。

[0147] P2X 激动剂

[0148] 可用于本发明的方法、组合物和药盒的 P2X 激动剂包括激活伤害感受器或瘙痒感受器上的 P2X 受体并允许至少一种电压门控离子通道抑制剂进入的任何激动剂。合适的 P2X 激动剂包括但不限于 2-甲硫基-ATP、'-O-(4-苯甲酰基苯甲酰基)-ATP、'-O-(4-苯甲酰基苯甲酰基)-ATP 和 ATP5'-O-(3-硫代三磷酸)。

[0149] TRPM8 激动剂

[0150] 可用于本发明的方法、组合物和药盒的 TRPM8 激动剂包括激活伤害感受器或瘙痒感受器上的 TRPM8 受体并允许至少一种电压门控离子通道抑制剂进入的任何激动剂。合适的 TRPM8 激动剂包括但不限于薄荷脑、iciclin、桉树脑、芳樟醇、香叶醇和羟基香茅醛。电压门控离子通道的膜通透性抑制剂

[0151] 还可使用电压门控离子通道的膜通透性抑制剂。这类抑制剂包括但不限于利多卡因、可卡因、卡马西平、丙吡胺、拉莫三嗪、普鲁卡因胺、苯妥英、奥卡西平、托吡酯、唑尼沙胺、丁卡因、苯佐卡因、丙胺卡因、磷酸丙吡胺、醋酸氟卡尼、美西律、普罗帕酮、葡糖酸奎尼丁、聚半乳糖醛酸奎尼丁、氯普鲁卡因、狄布卡因、达克罗宁、甲哌卡因、普莫卡因、普鲁卡

因、丁卡因、奥西卡因、丙胺卡因 (propitocaine)、左布比卡因、布比卡因、利多卡因、莫雷西嗪、妥卡尼、丙美卡因、罗哌卡因、硫酸奎尼丁、恩卡尼、罗哌卡因、依替卡因、莫雷西嗪、奎尼丁、恩卡尼、氟卡尼、妥卡尼、磷苯妥英、氯普鲁卡因、达克罗宁、L-(-)-1-丁基-2',6'-甲基哌啶酸二甲基苯胺 (pipecoloxylidide) 和普莫卡因。

[0152] 其它药物

[0153] 本发明的方法、组合物和药盒可用来治疗疼痛（例如神经病性疼痛、伤害性疼痛、特发性疼痛、炎症性疼痛、功能障碍性疼痛、偏头痛或手术性疼痛）和瘙痒（例如皮肤疾病如特应性湿疹或牛皮癣、寄生虫感染和真菌感染的瘙痒、药物诱发性瘙痒、变应性瘙痒、代谢性瘙痒、癌症或肝肾衰竭的瘙痒）。如有需要，在本文所描述的方法、组合物和药盒中，常用于治疗疼痛的一种或多种其它药物可与本发明的联合药物联用。这类药物包括但不限于 NSAID、阿片类镇痛药、三环类抗抑郁药、胺转运蛋白抑制剂、抗惊厥药。如有需要，在本文所描述的方法、组合物和药盒中，常用于治疗疼痛的一种或多种其它的药物可与本发明的组合药物联用。这类药物包括局部或口服类固醇和抗组胺药。

[0154] 组合物的配制

[0155] 本发明联合药物的给予可以通过引起靶区疼痛感觉减轻的任何合适的方法。电压门控离子通道的抑制剂和 TRPV1/TRPA1/P2X/TRPM8 受体激动剂可以任何合适的量包含在任何合适的载体物质中，存在的量以重量计共计占组合物总重量的 1-95%。可以适于口服、胃肠外（例如静脉内、肌内）、直肠、皮肤、皮下、局部、经皮、舌下、经鼻、阴道、鞘内、硬膜外或眼部给药；或者通过注射、吸入；或者与鼻黏膜或口腔黏膜直接接触的剂型提供组合物。

[0156] 因此，组合物可为以下形式：例如片剂、胶囊剂、丸剂、散剂、颗粒剂、混悬剂、乳剂、溶液剂、凝胶剂（包括水凝胶）、糊剂、软膏剂、乳膏剂、药用硬膏剂 (plaster)、兽用顿服药、渗透递送装置、栓剂、灌肠剂、注射剂、植入片、喷雾剂或气雾剂。组合物可按照常规制药规程配制（参见例如 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第 20 版, 2000, 主编 A. R. Gennaro, Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, 及 Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, 主编 J. Swarbrick 和 J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York）。

[0157] 可按本领域已知的各种方法配制联合药物中的每种化合物。例如，第一药物和第二药物可同时或分开配制。第一药物和第二药物最好是同时配制用于同时或几乎同时给药。

[0158] 各个或分别配制的药物可包装在一起作为一个药盒。非限制实例包括但不限于装有例如两种丸剂、丸剂和散剂、栓剂和小瓶中的液体制剂、两种局部乳膏剂等药盒。药盒可包括有助于给予患者单位剂量的任选组分，例如用于粉针剂复溶的小瓶、用于注射的注射器、定制的静脉递药系统、吸入器等。另外，单位剂量药盒可装有用于配制和给予组合物的说明书。

[0159] 药盒可制成一患者一次使用的单位剂量、一患者多次使用（以恒定剂量，或其中随着治疗进行，各种化合物的功效可能发生改变）；或者药盒可装有适于给予多名患者的多剂量（“散装”）。药盒组分可被装入纸板盒、泡罩包装、瓶、管中等。

[0160] 用于口服使用的固体剂型

[0161] 用于口服使用的剂型包括在与无毒的药学上可接受的赋形剂的混合物中含有活性成分的片剂。这些赋形剂可以为例如惰性稀释剂或填充剂（例如蔗糖和山梨醇）、润滑剂、助流剂和抗粘合剂（例如硬脂酸镁、硬脂酸锌、硬脂酸、二氧化硅、氢化植物油或滑石粉）。

[0162] 可将一种或多种化合物在片剂、胶囊剂或其它溶媒中混合在一起，或也可分隔开来。在一个实施例中，第一化合物包含在片剂内部，第二化合物包含在外部，使得第二化合物相当大的部分在第一化合物释出之前就已释出。

[0163] 用于口服使用的剂型还可作为咀嚼片或作为硬明胶胶囊剂（其中活性成分与惰性固体稀释剂相混合）、或作为软明胶胶囊剂（其中活性成分与水或油介质相混合）提供。

[0164] 一般来讲，当给予人时，本发明联合药物中化合物的任一种的口服剂量将取决于化合物的性质，本领域技术人员可容易地加以确定。通常，这类剂量一般为每天约 0.001mg ~ 2000mg，理想的是每天约 1mg ~ 1000mg，更理想的是每天 5mg ~ 500mg。每天高至 200mg 的剂量可能是有必要的。给予激活 TRPV1/TRPA1/P2X/TRPM8 受体所需的最低治疗剂量可能是有益的，这可采用标准技术加以确定。

[0165] 联合药物中每种药物的给药可独立地为每日 1-4 次持续一天至一年，甚至可持续到患者终身。在多种情况下持续的长期给药是必要的。局部剂型

[0166] 组合物还可适用于局部使用，其中局部溶媒含有介于 0.0001% 和 25%（重量/重量）之间或更多的活性成分。

[0167] 在一种优选的联合药物中，活性成分优选各自介于 0.0001% ~ 10%（重量/重量）之间，更优选介于 0.0005% ~ 4%（重量/重量）活性剂之间。乳膏剂可每日涂用 1-4 次，或按需使用。例如对于适于局部给药的泼尼松龙，局部溶媒可含 0.01% ~ 5%（重量/重量），优选 0.01% ~ 2%（重量/重量），更优选 0.01% ~ 1%（重量/重量）。

[0168] 实施本文所述方法时，优选将含有本发明联合药物的局部溶媒涂在受治疗者的不适部位。例如，可将乳膏剂涂在患手指关节炎 (arthritic finger) 的受治疗者的手上。

[0169] 缀合物

[0170] 如有需要，用于本文所述任何联合药物中的药物可彼此连接形成式 (XI) 的缀合物。

[0171] (A)-(L)-(B) (XI)

[0172] 式 (XI) 中，(A) 为激活存在于伤害感受器和 / 或瘙痒感受器上的通道形成受体的化合物；(L) 为连接基；和 (B) 为当用于通道内面时抑制一种或多种电压门控离子通道但当用于通道外面时基本不抑制该通道，并且当受体被激活时能够通过通道形成受体进入伤害感受器或瘙痒感受器中的化合物。

[0173] 本发明的缀合物可为前药，当例如缀合物被胞内酶和胞外酶（例如酰胺酶、酯酶和磷酸酶）切割时释放出药物 (A) 和药物 (B)。还可以将本发明的缀合物设计成在体内很大程度上保持完整，经得住胞内酶和胞外酶的切割，只要当受体被激活时，缀合物能够通过通道形成受体进入伤害感受器或瘙痒感受器中即可。在缀合物合成期间，体内缀合物的降解可受控于连接基 (L) 的设计及与化合物 (A) 和化合物 (B) 形成的共价键。

[0174] 缀合物可采用本领域技术人员所熟知的技术制备。例如，缀合物可采用 G. Hermanson 公开的方法制备 (G. Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press,

Inc., 1996)。缀合物的合成可能涉及药物 (A)、连接基和 / 或药物 (B) 的醇、胺、酮、巯基或羧基官能团的选择性保护和脱保护。例如, 胺的常用保护基包括氨基甲酸酯, 例如叔丁基、苄基、2, 2, 2-三氯乙基、2-三甲基甲硅烷基乙基、9-苄基甲基、烯丙基和间硝基苯基酯。胺的其它常用保护基包括酰胺, 例如甲酰胺、乙酰胺、三氟乙酰胺、磺酰胺、三氟甲磺酰胺、三甲基甲硅烷基乙磺酰胺和叔丁基磺酰胺。羧基的常用保护基的实例包括酯, 例如甲酯、乙酯、叔丁酯、9-苄基甲酯、2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基甲酯、苄酯、二苯基甲酯、邻硝基苄酯、原酸酯和卤代酯。醇的常用保护基的实例包括醚, 例如甲基醚、甲氧基甲基醚、甲氧基乙氧基甲基醚、甲硫基甲基醚、苄氧基甲基醚、四氢吡喃基醚、乙氧基乙基醚、苄基醚、2-萘基甲基醚、邻硝基苄基醚、对硝基苄基醚、对甲氧基苄基醚、9-苄基占吨基醚、三苯甲基(包括甲氧基-三苯甲基)醚和甲硅烷基醚。巯基的常用保护基的实例包括多种用于羟基的相同保护基。另外, 可以还原形式(例如二硫化物)或氧化形式(例如磺酸、磺酸酯或磺酰胺)将巯基保护起来。可以选择保护基, 使得需要选择性条件(例如酸性条件、碱性条件、由亲核试剂引起的催化、由路易斯酸引起的催化或氢化)以脱去每个保护基(不包括分子上的其它保护基)。将保护基加到胺、醇、巯基和羧基官能团上所需的条件及其脱去保护基所需的条件的详情可参见 T. W. Green 和 P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis* (第2版), John Wiley&Sons, 1991 和 P. J. Kocienski, *Protecting Groups*, Georg Thieme Verlag, 1994。下文中提供了另外的合成详情。

[0175] 连接基

[0176] 本发明最简单的连接基组分是化合物 (A) 和化合物 (B) 之间的化学键, 但通常提供线性、环状或支链分子骨架, 具有使化合物 (A) 与化合物 (B) 共价连接的侧基。因此, 化合物 (A) 与化合物 (B) 的连接通过共价方式实现, 包括与位于化合物 (A) 和化合物 (B) 上的一个或多个官能团形成化学键。可用于此目的的化学反应性官能团的实例包括而不仅限于氨基、羟基、巯基、羧基、羰基、糖基、连位二醇、硫醚、2-氨基醇、2-氨基硫醇、胍基(guanidinyI)、咪唑基和酚基。

[0177] 化合物 (A) 和化合物 (B) 的共价连接可使用连接基进行, 所述连接基含有能够与存在于化合物 (A) 和化合物 (B) 上的这类官能团进行反应的反应部分。例如, 化合物 (A) 的胺基可与连接基的羧基或其活化衍生物反应, 导致在两者间形成酰胺键。

[0178] 能够与巯基反应的部分的实例包括 XCH_2CO- (其中 $X = Br, Cl$ 或 I) 类型的 α -卤代乙酰基化合物, 它对巯基具有特殊的反应性, 但它也可用来修饰咪唑基、硫醚、苯酚和氨基, 参见 Gurd, *Methods Enzymol.* 11 :532 (1967)。N-马来酰亚胺衍生物也视为对巯基有选择性, 但在某些条件下还可用于与氨基偶联。如果连接通过二硫键形成而发生, 则通过氨基转换引入巯基的试剂例如 2-亚氨基噻烷 (Traut 等, *Biochemistry* 12 :3266 (1973)) 可视为巯基试剂。

[0179] 能够与氨基反应的反应性部分的实例包括例如烷化剂和酰化剂。代表性烷化剂包括:

[0180] (i) α -卤代乙酰基化合物, 它在反应性巯基不存在并且为 XCH_2CO- (其中 $X = Cl, Br$ 或 I) 类型时, 对氨基具有特异性, 例如参见 Wong *Biochemistry* 24 :5337 (1979);

[0181] (ii) N-马来酰亚胺衍生物, 通过迈克尔型反应 (Michael type reaction) 或通过酰化经加入到环羰基上而与氨基反应, 例如参见 Smyth 等, *J. Am. Chem. Soc.* 82 :4600 (1960)

和 *Biochem. J.* 91 :589(1964) ;

[0182] (iii) 芳基卤化物,例如反应性硝基卤代芳香族化合物 ;

[0183] (iv) 烷基卤化物,参见例如 McKenzie 等, *J. Protein Chem.* 7 :581(1988) ;

[0184] (v) 能够与氨基形成席夫碱 (Schiff' s base) 的醛和酮,通常所形成的加合物通过还原而稳定,得到稳定的胺 ;

[0185] (vi) 环氧化物衍生物,例如可与氨基、巯基或酚羟基反应的表氯醇和双环氧乙烷 ;

[0186] (vii) s- 三嗪的含氯衍生物,它对亲核试剂例如氨基、巯基和羟基的反应性极强 ;

[0187] (viii) 基于上述 s- 三嗪化合物的氮杂环丙烷,例如参见 Ross, *J. Adv. Cancer Res.* 2 :1(1954),它通过开环与亲核试剂 (例如氨基) 反应 ;

[0188] (ix) 方形酸二乙酯,参见 Tietze, *Chem. Ber.* 124 :1215(1991) ;和

[0189] (x) α - 卤代烷基醚,它是比正烷基卤化物更具有反应性的烷化剂,因为活化是由醚氧原子引起的,参见 Benneche 等, *Eur. J. Med. Chem.* 28 :463(1993) 。

[0190] 代表性氨基反应性酰化剂包括 :

[0191] (i) 异氰酸酯和异硫氰酸酯,尤其是芳族衍生物,它分别形成稳定的脲和硫脲衍生物 ;

[0192] (ii) 磺酰氯,可参见 Herzig 等, *Biopolymers* 2 :349(1964) ;

[0193] (iii) 酰基卤 ;

[0194] (iv) 活性酯,例如硝基苯酯或 N- 羟基琥珀酰亚胺酯 ;

[0195] (v) 酸酐,例如混合酸酐、不对称酸酐 ;或 N- 羧基酐 ;

[0196] (vi) 用于酰胺键形成的其它有用的试剂,例如参见 M. Bodansky, *Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, 1984 ;

[0197] (vii) 酰叠氮,例如其中叠氮基使用亚硝酸钠由预制成的酰肼衍生物产生,参见 Wetz 等, *Anal. Biochem.* 58 :347(1974) ;和

[0198] (viii) 亚氨酸酯,它在与氨基反应时形成稳定的脞,例如参见 Hunter 和 Ludwig, *J. Am. Chem. Soc.* 84 :3491(1962) 。

[0199] 可与胺反应形成席夫碱的醛和酮,有利的是它可通过还原性胺化而稳定。烷氧基氨基部分易与酮和醛反应以产生稳定的烷肟胺 (alkoxamine),例如参见 Webb 等,载于 *Bioconjugate Chem.* 1 :96(1990) 。

[0200] 能够与羧基反应的反应性部分的实例包括重氮基化合物例如重氮基乙酸酯和重氮基乙酰胺,它进行高特异性反应以产生酯基,例如参见 Herriot, *Adv. Protein Chem.* 3 :169(1947) 。

还可使用羧基修饰试剂,例如碳二亚胺,它通过形成 O- 酰基脲接着形成酰胺键进行反应。

[0201] 应当了解的是,如有需要,化合物 (A) 和 / 或化合物 (B) 中的官能团在反应之前可转换成其它官能团以赋予例如额外的反应性或选择性。用于该目的的方法的实例包括使用二羧酸酐等试剂将胺转换成羧基 ;使用 N- 乙酰高半胱氨酸硫内酯、S- 乙酰基巯基琥珀酸酐、2- 亚氨基噻烷或含巯基的琥珀酰亚胺基衍生物等试剂将胺转换成巯基 ;使用 α - 卤代乙酸酯等试剂将巯基转换成羧基 ;使用乙烯亚胺或 2- 溴乙胺等试剂将巯基转换成胺 ;使用碳二亚胺等试剂接着用二胺将羧基转换成胺 ;以及使用甲苯磺酰氯等试剂接着用硫代乙酸

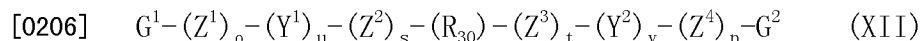
酯进行酯交换并用乙酸钠水解成巯基而将醇转换成巯基。

[0202] 如有需要,可按照本发明使用所谓的零长连接基,所述零长连接基是指化合物(A)的反应性化学基团与化合物(B)的反应性化学基团直接共价连接而不引入额外连接材料。

[0203] 然而,最常见的是,连接基可包括用间隔基组件连接的两个或多个如上所述的反应性部分。这类间隔基的存在允许双官能连接基与化合物(A)和化合物(B)内的特定官能团反应,导致两者间共价连键。连接基中的反应性部分可相同(同双官能连接基)或不同(异双官能连接基,或者其中存在若干不同的反应部分的异多官能连接基),这就提供了多种可能的可使化合物(A)和化合物(B)共价连接的试剂。

[0204] 连接基中的间隔基组件通常由直链或支链组成,可包括 C₁₋₁₀ 烷基、C₂₋₁₀ 烯基、C₂₋₁₀ 炔基、C₂₋₆ 杂环基、C₆₋₁₂ 芳基、C₇₋₁₄ 烷芳基、C₃₋₁₀ 烷杂环基或 C₁₋₁₀ 杂烷基。

[0205] 在一些情况下,连接基用下式(XII)表示:



[0207] 式(XII)中,G¹为化合物(A)与连接基之间的化学键;G²为连接基与化合物(B)间的化学键;Z¹、Z²、Z³和Z⁴各自独立选自O、S和NR₃₁;R₃₁为氢、C₁₋₄烷基、C₂₋₄烯基、C₂₋₄炔基、C₂₋₆杂环基、C₆₋₁₂芳基、C₇₋₁₄烷芳基、C₃₋₁₀烷杂环基或C₁₋₇杂烷基;Y¹和Y²各自独立选自羰基、硫代羰基、磺酰基或磷酰基;o、p、s、t、u和v各自独立地为0或1;R₃₀为C₁₋₁₀烷基、C₂₋₁₀烯基、C₂₋₁₀炔基、C₂₋₆杂环基、C₆₋₁₂芳基、C₇₋₁₄烷芳基、C₃₋₁₀烷杂环基或C₁₋₁₀杂烷基或连接G¹-(Z¹)_o-(Y¹)_u-(Z²)_s与-(Z³)_t-(Y²)_v-(Z⁴)_p-G²的化学键。

[0208] 用于制备本发明的缀合物的同双官能连接基的实例包括而限于选自以下的二胺和二醇:乙二胺、丙二胺和六亚甲基二胺、乙二醇、二甘醇、丙二醇、1,4-丁二醇、1,6-己二醇、环己二醇和聚己内酯二醇。示例性用途

[0209] 本发明的方法、组合物和药盒可用于治疗与多种疾病的任一种有关的疼痛,包括背颈部疼痛、癌症疼痛、妇科疼痛和阵痛、纤维肌痛、关节炎疼痛和其它风湿病疼痛、整形术疼痛、疱疹后神经痛和其它神经病性疼痛、镰状细胞危象、间质性膀胱炎、尿道炎和其它尿道疼痛、牙痛、头痛、手术后疼痛和手术性疼痛(即与注射、排脓、手术、牙科手术、眼科手术、关节镜检查和使用其它医疗器械、整容外科手术、皮肤手术、骨折复位、活组织检查等有关的疼痛)。

[0210] 由于一亚类伤害感受器介导瘙痒感觉,因此本发明的方法、组合物和药盒还可用于治疗患有像皮炎、感染、寄生物、虫咬、妊娠、代谢障碍、肝衰竭或肾衰竭、药物反应、变态反应、湿疹和癌症等疾病的患者的瘙痒。

[0211] 疼痛和功能指数

[0212] 为了测定本发明的方法、组合物或药盒中任一种的功效,可以采用测量指数。可用于本发明的方法、组合物和药盒以测量与肌肉骨骼疾病、免疫炎症性疾病和神经病性疾病有关的疼痛的指数包括直观类比量表(visual analog scale、VAS)、利克特量表(Likert scale)、分类疼痛量表(categorical pain scale)、描述量表(descriptor)、Lequesne指数、WOMAC指数和AUSCAN指数,这些中的每一种都是本领域众所周知的。这类指数可用来测量疼痛、瘙痒、功能、僵硬或其它变量。

[0213] 直观类比量表(VAS)提供对一维量的衡量。VAS一般利用距离图,例如按有规律的距离间隔(例如10个1cm间隔)画上散列符号的直线图。例如,可要求患者选择线上

与疼痛或瘙痒感觉最相符的点,来给疼痛或瘙痒感觉分等级,其中线的一个末端相当于“无疼痛”(0cm的分值)或“无瘙痒”,线的另一端相当于“难以忍受的疼痛”或“难以忍受的瘙痒”(10cm的分值)。该方法提供简单快速的方法,可获得有关患者经受怎样的疼痛或瘙痒的定量信息。VAS量表及其用途参见例如美国专利第6,709,406和6,432,937号。

[0214] 利克特量表同样提供对一维量的衡量。一般地讲,利克特量表具有分散的整数值,范围由低值(例如0,表示无疼痛)到高值(例如7,表示极度疼痛)。要求遭受疼痛的患者在低值和高值之间选择一个数代表所遭受的疼痛的程度。利克特量表及其用途参见例如美国专利第6,623,040和6,766,319号。

[0215] Lequesne指数和西安大略和麦克马斯特大学(Western Ontario and McMaster Universities,WOMAC)骨关节炎指数利用自填式问卷评价OA患者的膝和臀部的疼痛、功能和僵硬。WOMAC包括了膝和臀部两方面,Lequesne问卷有一份用于膝,单独的一份用于臀部。这些问卷是有益的,因为它们包含更多的与VAS或Likert相比较的信息内容。WOMAC指数和Lequesne指数问卷两者在OA中,包括在手术设置(surgical setting)(例如膝和臀部关节成形术)中已得到广泛证实。它们的度量特征无显著不同。

[0216] AUSCAN(澳大利亚/加拿大关节炎)指数采用有效、可靠和反应灵敏的患者自陈式问卷。在一种情况下,该问卷包含三方面15个问题(疼痛,5个问题;僵硬,1个问题;生理功能,9个问题)。AUSCAN指数可利用例如Likert量表或VAS量表。

[0217] 可用于本发明的方法、组合物和药盒以测量疼痛的指数包括疼痛描述量表(Pain Descriptor Scale,PDS)、直观类比量表(VAS)、词语描述量表(Verbal Descriptor Scale,VDS)、数字疼痛强度量表(Numeric Pain Intensity Scale,NPIS)、神经病性疼痛量表(Neuropathic Pain Scale,NPS)、神经病性疼痛症状调查表(Neuropathic Pain Symptom Inventory,NPSI)、现时疼痛调查表(Present Pain Inventory,PPI)、老年人疼痛测量(Geriatric Pain Measure,GPM)、McGill疼痛问卷(McGill Pain Questionnaire,MPQ)、平均疼痛强度(描述差异量表(Descriptor Differential Scale))、数字疼痛量表(numeric pain scale,NPS)、整体评价分值(global evaluation score,GES)、简易格式McGill疼痛问卷、明尼苏达多相人格调查表(Minnesota Multiphasic Personality Inventory)、疼痛分布和 multidimensional 疼痛调查表、儿童健康问卷和儿童评价问卷。

[0218] 瘙痒可通过主观测量法(VAS、Lickert、描述量表)测量。另一种方法是使用振动传感器或运动敏感性仪表测量与瘙痒在客观上相关的搔抓。

[0219] 筛选

[0220] 我们发现由伤害感受器和瘙痒感受器表达并存在于伤害感受器和瘙痒感受器的某些通道允许抑制电压门控离子通道的化合物进入靶细胞,这就为鉴定可用于治疗疼痛和瘙痒的化合物提供了方法。在一个实施例中,使伤害感受器或瘙痒感受器与一种、两种或更多种激活TRPV1、TRPA1、TRPM8和/或P2X(2/3)受体的化合物接触。还使相同的伤害感受器或瘙痒感受器与第二化合物接触,所述第二化合物当用于伤害感受器的内面时(例如在完整细胞膜片钳技术中通过微量吸液管而在细胞内使用)抑制一种或多种电压门控离子通道,但当用于细胞外面时不抑制(因为化合物不能够穿过细胞膜)。伤害感受器或瘙痒感受器中离子通道的抑制将阻止细胞传播动作电位和/或信号转导至二级神经元,在任一种情况下,都阻断疼痛信号的传递,因此,将第二化合物抑制伤害感受器中电压门控离子通道

的能力使该化合物被鉴定为可与激活 TRPV1、TRPA1、TRPM8 和 / 或 P2X (2/3) 受体的化合物联用的化合物以治疗治疗疼痛或瘙痒。

[0221] 下列实施例欲用来对本发明进行说明,而非对其进行限制。

[0222] 实施例 1

[0223] 使用成年大鼠 DRG 神经元的完整细胞电压钳记录,我们记录了通过电压依赖性钠通道的电流。为了选出伤害感受器,我们从小 ($24 \pm 5 \mu\text{m}$; $n = 25$) 神经元记录,通过短暂 (1 秒种) 使用 $1 \mu\text{M}$ 辣椒素测定了神经元的 TRPV1 受体表达。在 25/25 个所测试的小神经元中,辣椒素产生延长的 (10 ± 3 秒) 内向电流 (图 1A, 上图), 与作为伤害感受器的神经元一致。由保持电位 -70mV 经去极化步骤引起钠电流。仅使用 5mM QX-314 的浴应用对钠电流具有最低作用 (5 分钟使用后降低 $3 \pm 0.5\%$, $n = 25$) (图 1A, 左 ;b)。仅使用辣椒素 ($1 \mu\text{M}$ 达 1-10 分钟) 适度降低钠电流 ($31 \pm 9\%$ 抑制 ($n = 25$))。然而,当 QX-314 与辣椒素同时使用时,钠电流几乎被完全消除 (抑制达 $98 \pm 0.4\%$, $n = 25$) (图 1A, 左 ;b)。如果钠电流的阻断正如预期是由 QX-314 通过 TRPV1 受体逐步进入而产生的,则抑制在几分钟内发生,并且在 15 分钟后几乎完成 (图 1C)。

[0224] 为了测定共同使用辣椒素和 QX-314 抑制钠电流的能力对表达 TRPV1 受体的细胞是否是选择性的,我们还对大 DRG 神经元 (体细胞直径 $> 40 \mu\text{m}$) 进行了记录 (图 1A, 右)。在这些神经元中,辣椒素不会引起内向电流 (10/10)。对于小直径神经元,单独用 QX-314 对钠电流几乎没作用或无作用 (10 分钟使用后电流增加 $8 \pm 4\%$, $n = 10$)。与小直径神经元不同,在大直径神经元中辣椒素对钠电流无作用 (10 分钟使用后平均增加 $3 \pm 2\%$, $n = 10$)。最明显的是,共同使用 QX-314 和辣椒素在大直径神经元中对钠电流几乎没有作用或无作用 (10 分钟使用后降低 $9 \pm 5\%$, $n = 10$)。因此,共同使用 QX-314 和辣椒素抑制钠电流的能力对表达 TRPV1 受体的神经元具有高选择性,正如假设 QX-314 通过 TRPV1 受体进入神经元所预料的一样。

[0225] 我们还研究了使用生理内部溶液和外部溶液,在电流钳中共同使用 QX-314 和辣椒素的作用。正如所料,从电压钳结果来看,共同使用 QX-314 和辣椒素抑制小直径神经元的兴奋性,完全阻断动作电位产生 (图 2, 15/15 神经元)。

[0226] 我们接着研究了辣椒素和 QX-314 的组合是否可在体内减轻疼痛行为。仅将 QX-314 ($10 \mu\text{L} 2\%$ 溶液) 注射到成年大鼠后爪对引起缩回反应的机械阈值没有显著作用,正如通过 von Frey 毛测定的一样 ($p = 0.33$) (图 3A)。仅辣椒素 ($10 \mu\text{g}/10 \mu\text{L}$) 引起本能的退缩 (在 5 分钟内 40 ± 6 次退缩), 正如预期地反映出辣椒素对伤害感受器的直接刺激性作用,15 分钟和 30 分钟后显著降低机械阈值 ($p < 0.05$) (图 3a)。在注射后头 5 分钟内,辣椒素和 QX-314 一起注射不会显著改变退缩次数 (30 ± 7 , $p = 0.24$)。然而,该组合完全消除仅由辣椒素通常产生的机械阈值的后期降低 ($p = 0.14$, 在 15 分钟测量)。此外,在联合注射辣椒素和 QX-314 后 60 分钟,机械阈值实际上增加达到基线值的两倍,注射后 2 小时 ($46 \pm 5\text{g}$ 与 $24 \pm 3\text{g}$, $p < 0.05$)。在这三只动物中,脚爪甚至对 von Frey 细丝最高值 (57g) 都不敏感。机械阈值提高持续约 3 小时,然后 4 小时后逐步返回到基础水平 (图 3A)。

[0227] 对标准化有害辐射热刺激的敏感性的研究观察到同样的作用。预料不到的是,在注射后 30 分钟,仅 QX-314 短暂降低热反应潜伏期 (30 分钟时, $p < 0.01$; 所有其它时间点, $p > 0.05$) (图 3B)。仅辣椒素 ($10 \mu\text{g}/10 \mu\text{L}$) 也如所料一样降低热反应潜伏期 ($p < 0.01$,

15 分钟和 30 分钟)(图 3B)。然而,虽然 QX-314 和辣椒素两者单用时增加热敏感性,但是 QX-314 和辣椒素共同使用使动物逐步对有害热能麻木,使得注射后 2 小时,没有动物对所使用的有害辐射热产生发应达 25 秒。这种作用在注射后保持 4 小时(图 3B)。

[0228] 接着我们研究了共同给予辣椒素和 QX-314 是否可用来产生区域神经阻断而无当用利多卡因产生局部麻醉时所观察到的运动作用。按照 0-2 的等级对运动作用进行评分,其中 0(无作用;正常步态和四肢放置(limb placement))、1(四肢运动,但无四肢放置和运动异常)或 2(完全丧失四肢运动)。在极为接近坐骨神经处注射 2%利多卡因(用于局部神经阻断的标准浓度),在 15 分钟进行测定时引起下肢完全麻痹(6/6 只动物),在 30 分钟时仍然存在完全或部分麻痹(平均运动分值 1.67 ± 0.2 , $p < 0.01$;图 4C)。在全部动物中触觉刺激引起的放置反射完全丧失持续至少 30 分钟,45 分钟时这些感觉和运动缺陷完全恢复(图 4)。在麻痹期间,无法测定感觉敏感性。在 QX-314 的试验性实验中,显而易见,当比利多卡因浓度低得多的 QX-314 与辣椒素一起使用时,可用来产生有效的局部麻醉。只注射 QX-314(0.2%, 100 μ L)对运动功能无作用(6/6 只动物;图 4C),而且对机械阈值($p = 0.7$)或热反应潜伏期($p = 0.66$)的任一种都无显著作用(图 4A、4B)。靠近神经仅注射辣椒素(0.5 μ g/ μ L, 100 μ L),在注射后 30 分钟降低机械阈值($p < 0.05$)和热潜伏期($p < 0.05$)(图 4A、4B)。在此期间,在 6 只动物中有 4 只显示经注射的四肢持续屈曲,导致轻微的行动受损(平均运动分值 0.7 ± 0.2 , $p < 0.01$),但是膝和臀部的运动以及放置反射未发生改变。我们把敏感性和运动原改变解释为产生持续屈曲反射的伤害感受器轴突的反射活化(reflecting activation)。对于将 QX-314 和辣椒素共同用于坐骨神经旁侧区,我们首先注射 QX-314,10 分钟后注射辣椒素,我们的想法是 QX-314 应存在于胞外,并且只要一被激活便易于进入 TRPV1 通道。实际上,当先注射 QX-314 时,对辣椒素注射几乎没有或没有行为反应,而且行为反应表明,对有害刺激具有有效麻醉。机械阈值有非常显著的增加,使得所有动物对最硬的 von Frey 毛(57g;相对于注射前对刺激的缩回平均为 15.2 ± 3.4 ; $p < 0.01$, $n = 6$)及同样在热反应潜伏期(22.3 ± 2.3 s 相对于 14.9 ± 0.4 s, $p < 0.05$, $n = 6$)中都无反应。对于机械刺激,这些改变在辣椒素注射后 15 分钟十分明显,对于热刺激在 30 分钟十分明显并持续 90 分钟(图 4A、图 4B)。6 只动物中有 5 只无论怎样都无运动缺陷,平均运动分值 0.17 ± 0.17 , $p = 0.34$ (图 4C),在放置反射中也无改变。1 只动物显示类似于只注射辣椒素时所观察到的持续屈曲,不过更为短暂。

[0229] 方法

[0230] 电生理学

[0231] 从 6-8 周龄 Sprague-Dawley 大鼠中取出背根神经节,放入含有 1%青霉素/链霉素(Sigma)的 Dulbecco 极限必需培养基中,然后用 5mg/ml 胶原酶、1mg/ml 分散酶 II(Roche, Indianapolis, IN)处理 90 分钟,用 0.25%胰蛋白酶处理 7 分钟,接着加入 2.5%胰蛋白酶抑制剂。在 DNA 酶 I 抑制剂(50U)存在下研磨细胞,用 15% BSA 离心(Sigma),重新悬浮于 1ml Neurobasal 培养基(Sigma)、10 μ M AraC、NGF(50ng/ml)和 GDNF(2ng/ml)中,按 8000-9000/孔接种到聚赖氨酸(500 μ g/ml)和层粘连蛋白(5mg/ml)包被的 35mm 组织培养皿(Becton Dickinson)中。将培养物在 37°C、5%二氧化碳下孵育。接种后 48 小时内做记录。作为可能的伤害感受器选出的小神经元的平均大小为 $23 \pm 6 \mu$ m($n = 50$),大神经元的平均大小为 $48 \pm 8 \mu$ m($n = 10$)。

[0232] 采用 Axopatch 200A 放大器 (Axon Instruments, Union City, CA) 和电阻 1-2M Ω 的膜片吸液管 (patch pipette), 进行了完整细胞电压钳或电流钳记录。对于电压钳记录, 用石蜡膜包裹钳柄 (shank) 或用 Sylgard (Dow Corning, Midland, MI) 涂覆钳柄, 降低吸液管电容。使用放大器电路补偿细胞电容, 使用 P/4 操作扣除线性泄漏电流。补偿串联电阻 (一般 3-7M Ω , 且总小于 10M Ω) 的 $\sim 80\%$ 。电压钳记录使用设计成通过阻断钾电流和钙电流分离出钠电流并且减少内部钠以改进电压钳的溶液。吸液管溶液为 110mM CsCl、1mM CaCl₂、2mM MgCl₂、11mM EGTA 和 10mM HEPES, 用 ~ 25 mM CsOH 调节 pH 至 7.4。外部溶液为 60mM NaCl、60mM 氯化胆碱、4mM KCl、2mM CaCl₂、1mM MgCl₂、0.1mM CdCl₂、15mM 四乙基氯化铵、5mM 4-氨基吡啶、10mM 葡萄糖和 10mM HEPES, 用 NaOH 调节 pH 至 7.4。对于小液接电位差 (-2.2mV) 未进行校正。

[0233] 采用 Axopatch 200A 放大器的快电流钳模式进行电流钳记录。吸液管溶液为 135mM 葡糖酸钾、2mM MgCl₂、6mM KCl、10mM HEPES、5mM Mg ATP、0.5mM Li₂GTP (用 KOH 调至 pH = 7.4)。外部溶液为 145mM NaCl、5mM KCl、1mM MgCl₂、2mM CaCl₂、10mM HEPES、10mM 葡萄糖 (用 NaOH 调节 pH 至 7.4)。膜电位做液接电位差 -15mV 的校正。

[0234] 使用与 pCLAMP 8.2 软件 (Axon Instruments, Union City, CA) 接口的 Digidata 1200A/D, 产生指令方案 (Command protocol) 并使数据数字化。电压钳电流记录在 2kHz 下是低通滤波的, 电流钳记录为 10kHz (-3dB, 4 极 Bessel 滤波器)。

[0235] 使用用户定制设计的置于距神经元约 200-250 μ m 的多管快速递药系统, 使用 QX-314 (5mM)、辣椒素 (1 μ M 或 500nM) 或其组合。在不到 1 秒钟内完成溶液交换。

[0236] 行为

[0237] 对于足跖注射, 使大鼠首先习惯操作, 由对治疗不知情的实验人员进行试验。溶媒 (20% 乙醇、5% 吐温 20 的盐溶液, 10 μ L)、辣椒素 (1 μ g/ μ L)、QX-314 (2%) 或辣椒素和 QX-314 的混合物经足跖注射到左后爪, 分别使用 von Frey 毛和辐射热测定了机械和热敏感性。

[0238] 对于坐骨神经注射, 使动物先习惯于操作 10 天。将利多卡因 (0.2% 或 2%, 100 μ L)、仅 QX-314 (0.2%, 100 μ L)、仅辣椒素 (50 μ g, 100 μ L) 或 QX-314 接着辣椒素 (10 分钟间隔) 注射到髋关节下的坐骨神经区。使用 von Frey 细丝和辐射热测定了机械阈值和热阈值。用下列分级评分, 每 15 分钟对经过注射的腿的运动功能进行了评价: 0 = 无; 1 = 部分阻断; 2 = 完全阻断。研究了步行、爬行、杆上步行和放置反射。当步态正常并且无明显四肢虚弱时, 被评为无运动阻断; 当四肢可运动但运动异常, 且不能支撑正常的姿势, 被评部分阻断; 当四肢衰弱并抵抗不住对四肢摊开时, 被评为完全阻断。所有实验均在实验人员不知情情况下进行。

[0239] 统计学分析

[0240] 采用 t 检验或单因素方差分析 (ANOVA), 随后适当时通过 Dunnett 检验, 对统计数据进行了分析。对于运动得分, 注射利多卡因 0.2% 后所得到的数据用作 Dunnett 检验的对照。数据表示为平均值 \pm SEM。

[0241] 实施例 2

[0242] 我们的研究还表明, 丁香酚 (C₁₀H₁₂O₂)、烯丙基链取代的愈创木酚、2-甲氧基-4-(2-丙烯基) 苯酚 (丁子香油中的活性成分和 TRPV1 受体的非刺激性激动剂) 通过

激活 TRPV1 通道促进 QX-314 进入背根神经节神经元。图 5 表示小背根神经节神经元中钠通道电流的电压钳记录。数据显示,仅丁香酚对钠电流具有适度抑制作用(10-20%抑制)。丁香酚和 QX-314 的共同使用产生可在 7 分钟后完成的逐步阻断。描述了两个实例,其是具有类似结果的 10 个实验的代表性实例。如上所述,外部仅 QX-314 无作用,虽然内部 QX-314 阻断钠通道。因此,这些实验表明,丁香酚通过激活 TRPV1 通道促进 QX-314 进入背根神经节神经元。

[0243] 实施例 3

[0244] 图 6 表示共同使用 TRPA 激动剂芥子油 (MO) (50 μ M) 和 QX-314(5mM) 的结果。仅 MO 降低钠电流达 20-30%,并在大约 3 分钟后达到平稳期。共同使用 MO 和 QX-314 显著降低钠电流。

[0245] 实施例 4

[0246] 通过共同给予辣椒素(大孔阳离子通道受体 TRPV1 的激动剂)与 QX-314(一种膜不渗透的电压门控通道抑制剂),进行仅靶向伤害感受器(疼痛感觉神经元)的疼痛感觉缺失的选择性产生。辣椒素激活 TRPV1 通道受体,并且允许 QX-314 通过该活化受体通道进入胞内空间。一旦处于胞内空间, QX-314 便可抑制钠电压门控通道,从而减轻或消除疼痛。

[0247] 又一种镇痛条件是通过提供利多卡因而而在神经元中实现的,利多卡因是一种膜可通透性电压门控通道抑制剂,同时还是 TRV1 激动剂。如图 7 所示,向仅 QX-314 中加入利多卡因,通过允许 QX-314 经由 TRPV1 进入细胞而显著增加这些化合物的镇痛性质,如通过提高的热潜伏期和机械疼痛阈值所测量。

[0248] 除了与 QX-314 一起起作用以产生通过其 TRPV1 激动剂作用产生长期的疼痛感觉缺失以外,利多卡因当与辣椒素一起给予时,也通过其局部麻醉性钠通道阻断作用而阻断辣椒素的刺激/疼痛产生作用。因此,同时给予利多卡因、辣椒素和 QX-314 防止仅用辣椒素和 QX-314 所观察到的短时疼痛产生作用,直到 QX-314 进入细胞并阻断钠通道为止。此外,比起任何单独或两种化合物的组合,这三种药物(辣椒素、利多卡因和 QX-314)的组合产生较久的持续作用。与辣椒素和 QX-314 一起使用利多卡因使得可忍受较大剂量的辣椒素,致使较多 QX-314 可进入伤害感受器,产生较大和较久的持续性疼痛感觉缺失。

[0249] 实施例 5

[0250] 通过与 QX-314 这种膜不渗透性电压门控通道抑制剂一起共同给予辣椒素这种大孔阳离子通道受体 TRPV1 的激动剂,通过选择性靶向伤害感受器(疼痛感觉神经元)而进行疼痛感觉缺失的选择性产生。辣椒素激活 TRPV1 通道受体,并且允许 QX-314 经过该活化的受体通道进入胞内空间。当 TRPV1 通道激活时,可减少或消除辣椒素的给予,减少任何不良副作用(例如疼痛)。QX-314 一旦进入胞内空间,便可抑制钠电压门控通道,从而减轻或消除疼痛。此时,辣椒素和 QX-314 可从胞外溶液中排除。随着 TRPV1 通道关闭, QX-314 由于是膜不渗透性的,因此被截留在细胞内。此后,其对钠通道和电兴奋的阻断作用可持续多个小时或多天,不再需要在胞外介质中存在辣椒素或 QX-314。通过使 TRPV1 通道脱敏,也可中止 TRPV1 通道的活化,通过另外存在的利多卡因,还可加强这种脱敏作用,使得利多卡因不仅可以增进 QX-314 的最初进入,而且还有助于将其截留在神经元内以产生较久的持续作用。为了将 QX-314 截留在神经元内并提高其在阻断电兴奋中的作用的持续时间,任选可加入化合物以特异性地阻断 TRPV1 通道。

[0251] 其它实施方案

[0252] 在不偏离本发明的范围和精神的情况下,本发明所述方法和系统的各种修饰和变化对本领域技术人员而言是显而易见的。虽然本发明结合具体理想的实施方案进行了描述,但是应当了解的是,要求保护的本发明不应过多地局限于这类具体的实施方案。实际上,对于医学、免疫学、药理学、内分泌学领域或相关领域技术人员是显而易见的用于实施本发明所述方法的各种修饰都落入本发明的范围内。

[0253] 本说明书中所提及的所有出版物都通过引用结合到本文中,其程度与每个独立出版物具体而单独通过引用结合到本文中一样。

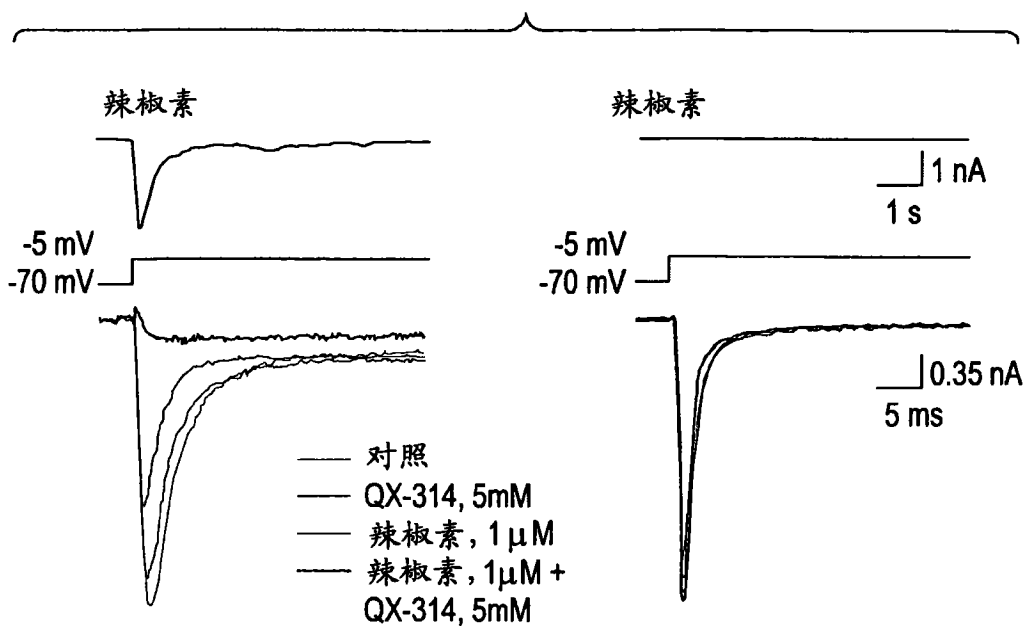


图 1A

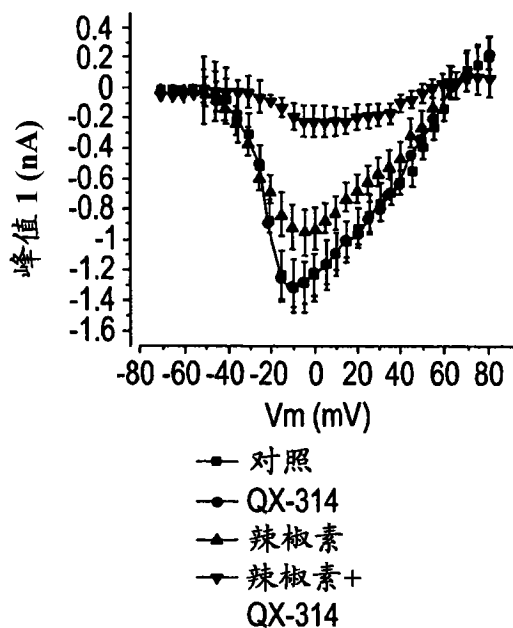


图 1B

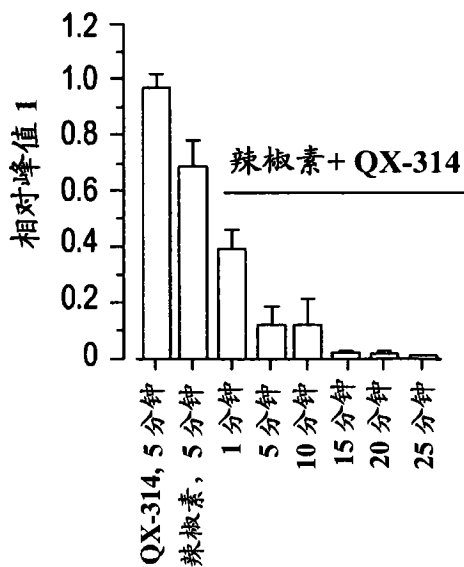


图 1C

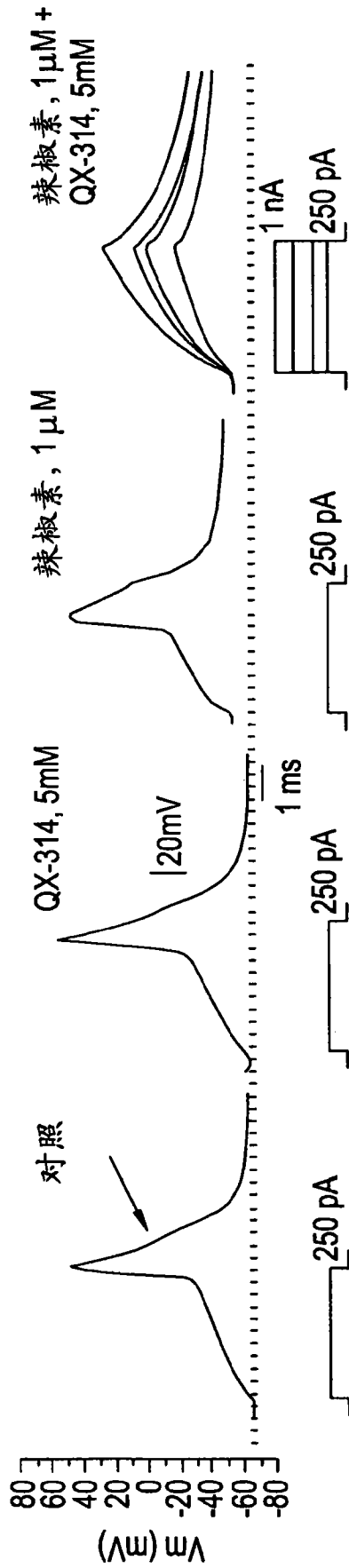


图 2A

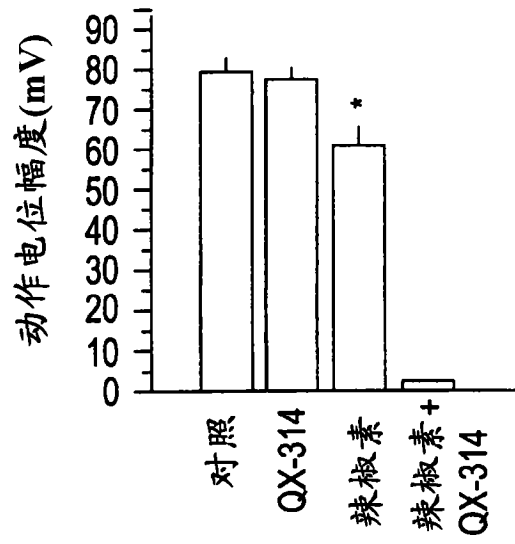


图 2B

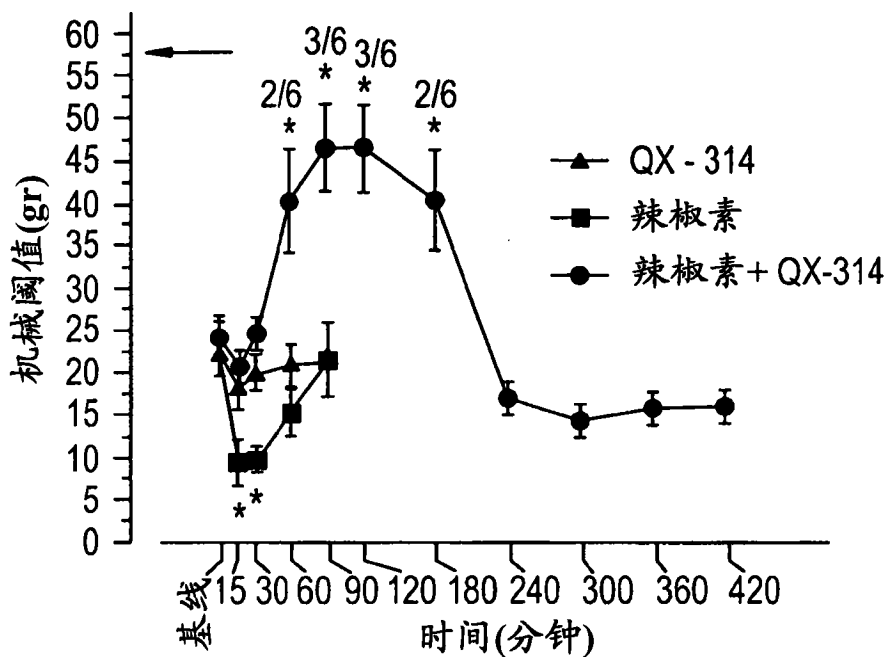


图 3A

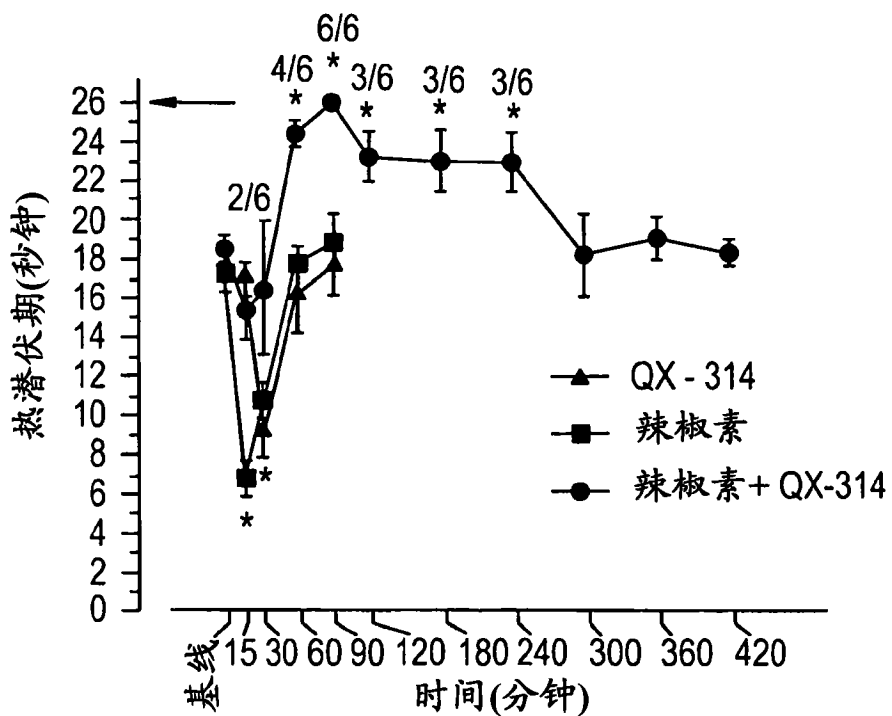


图 3B

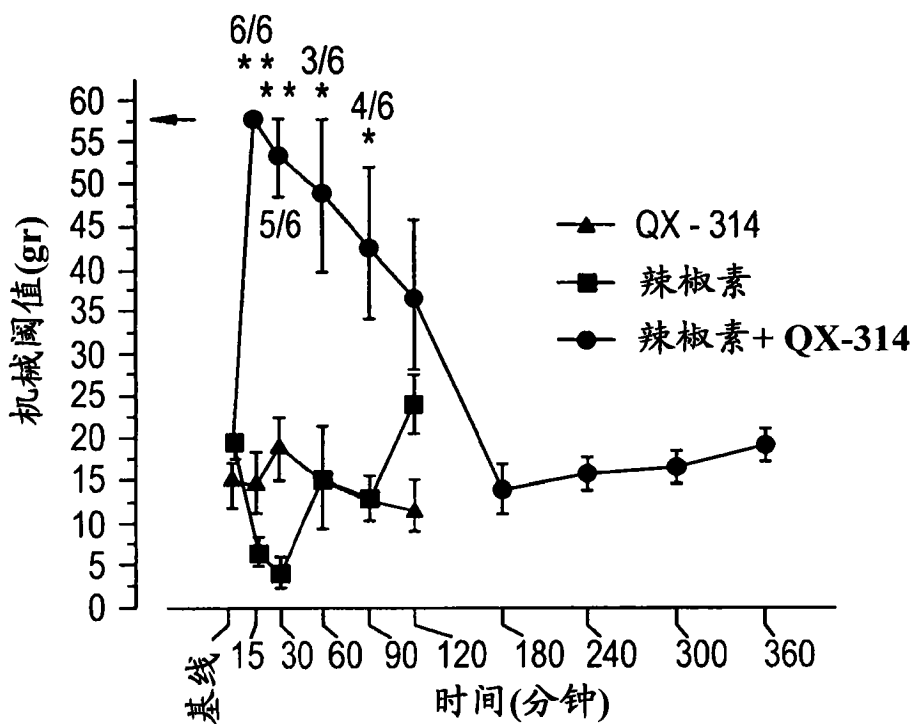


图 4A

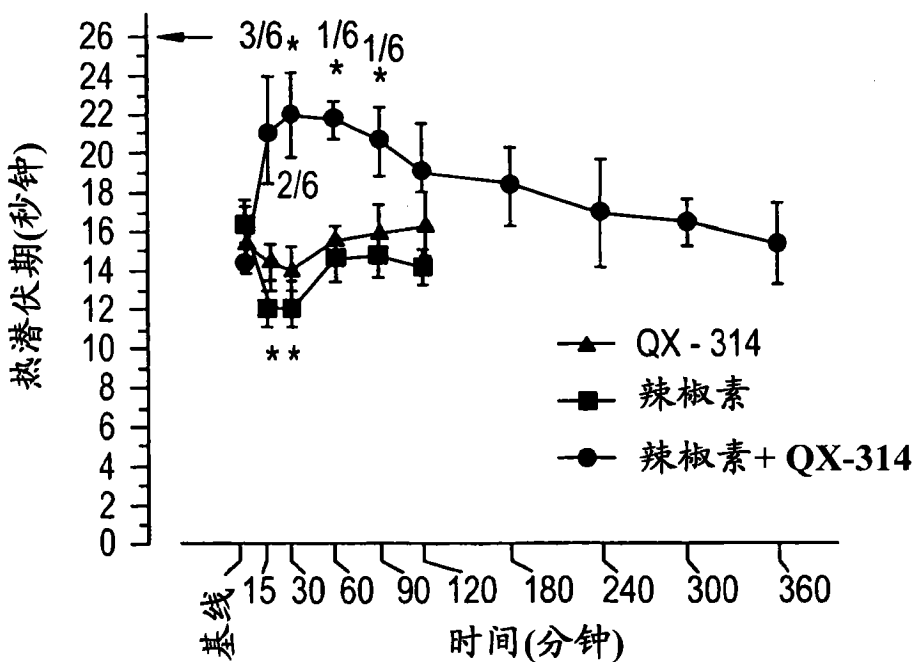


图 4B

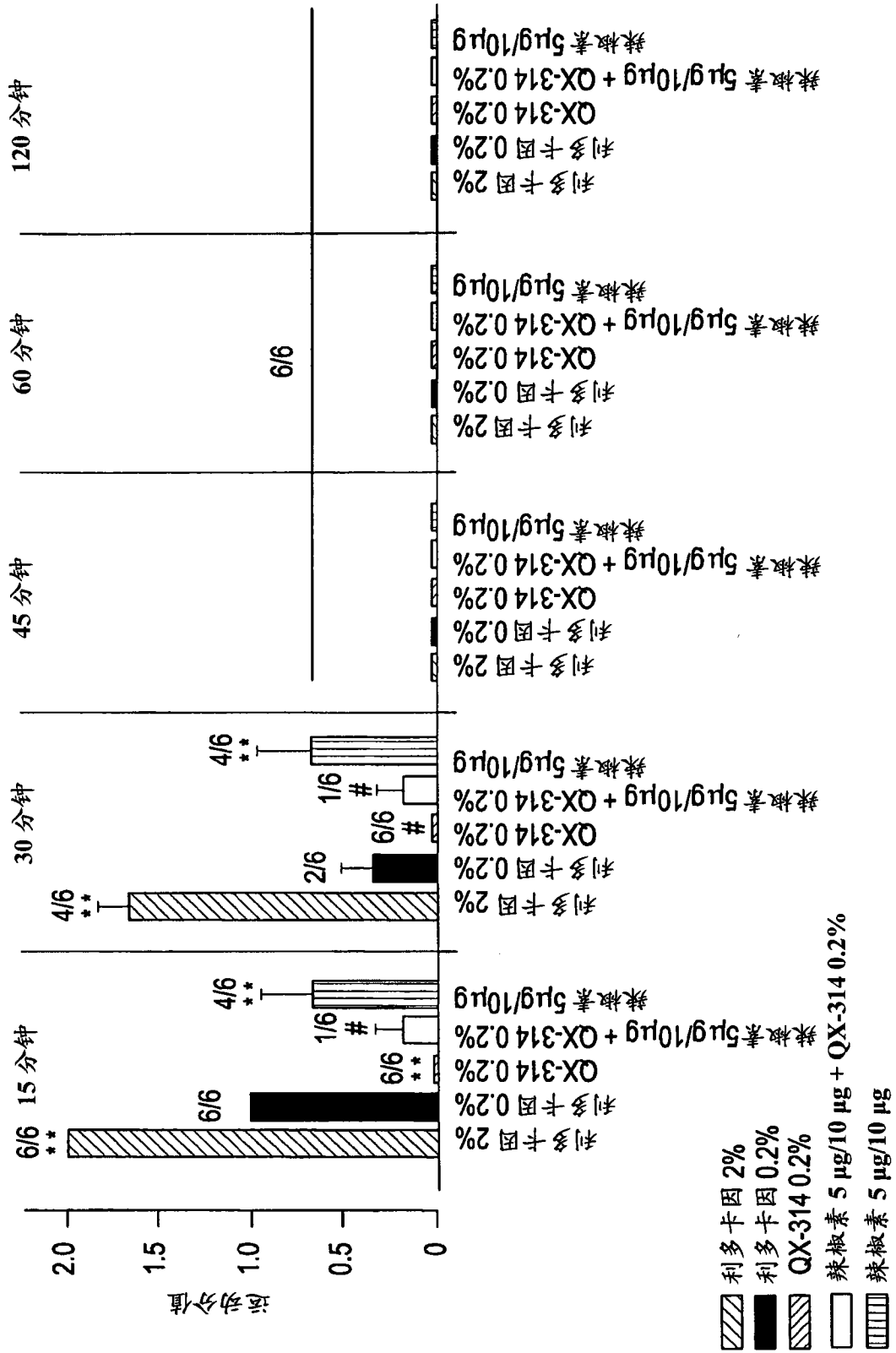


图 4C

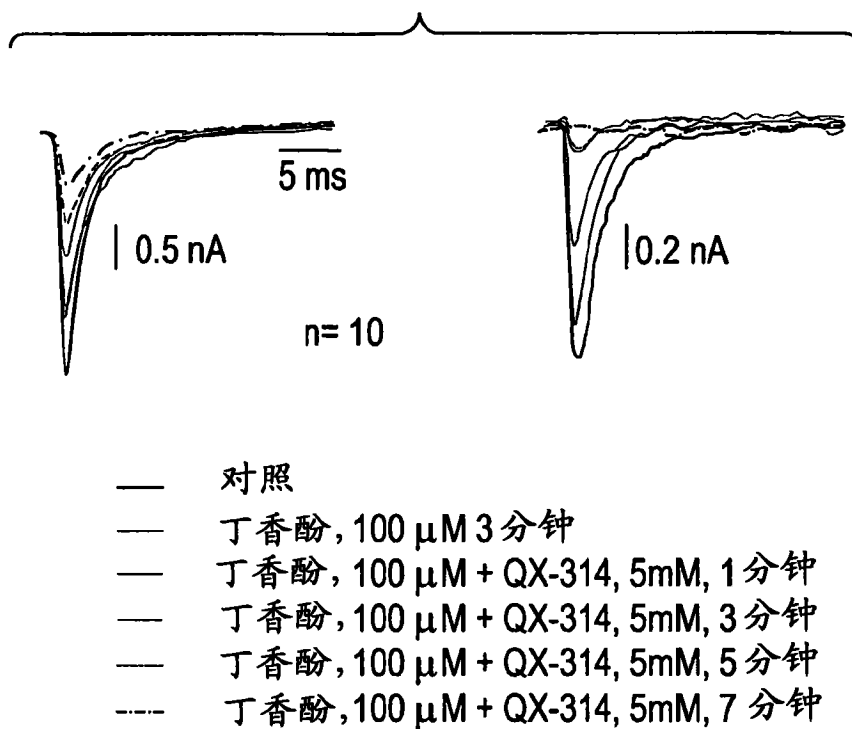


图 5

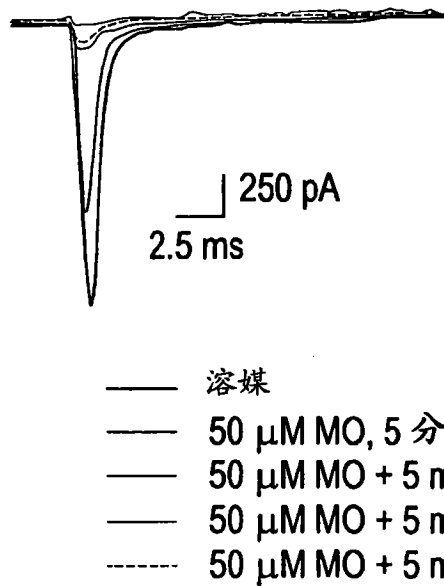


图 6

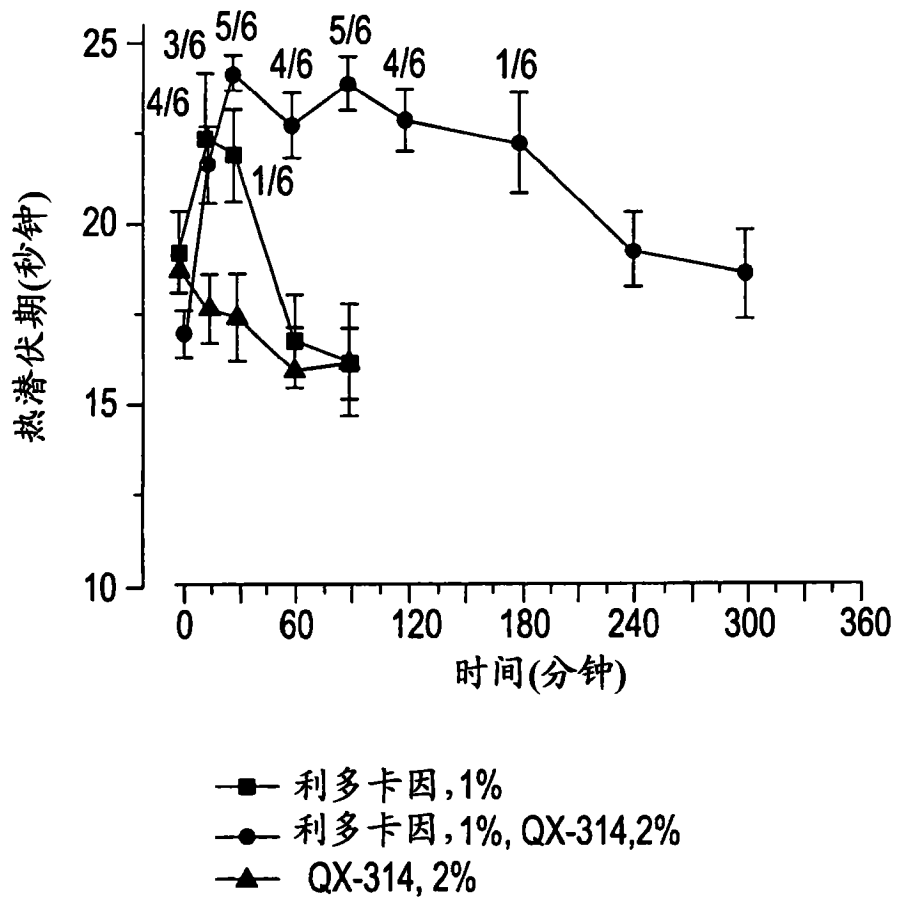


图 7A

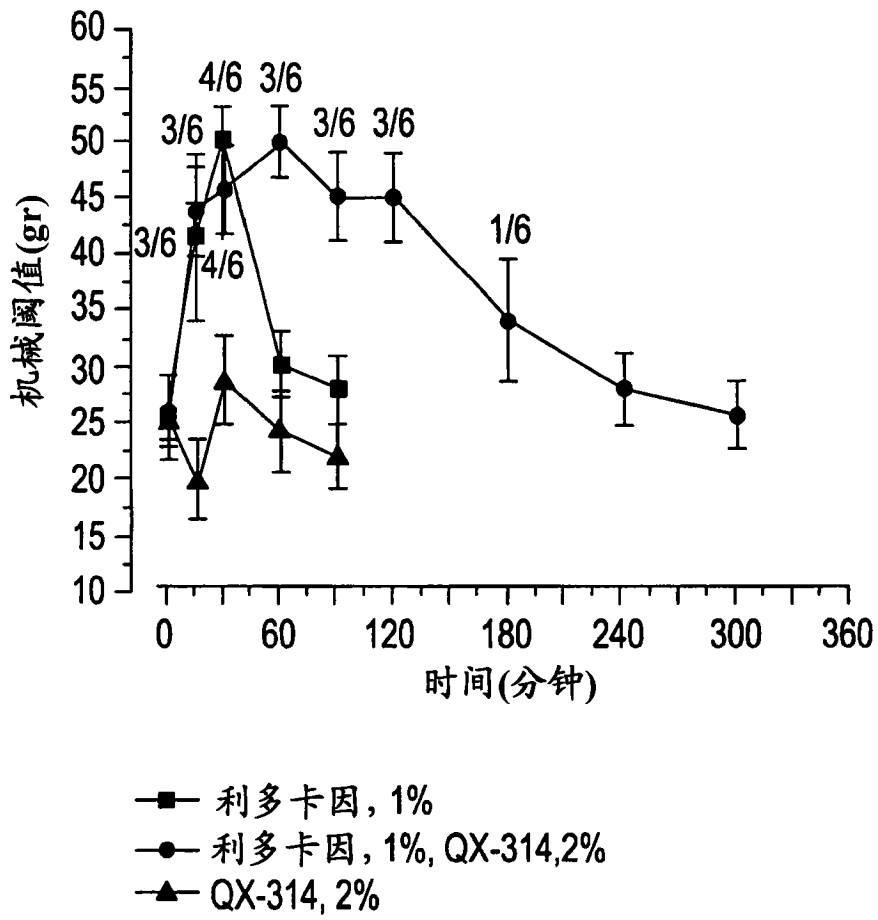


图 7B

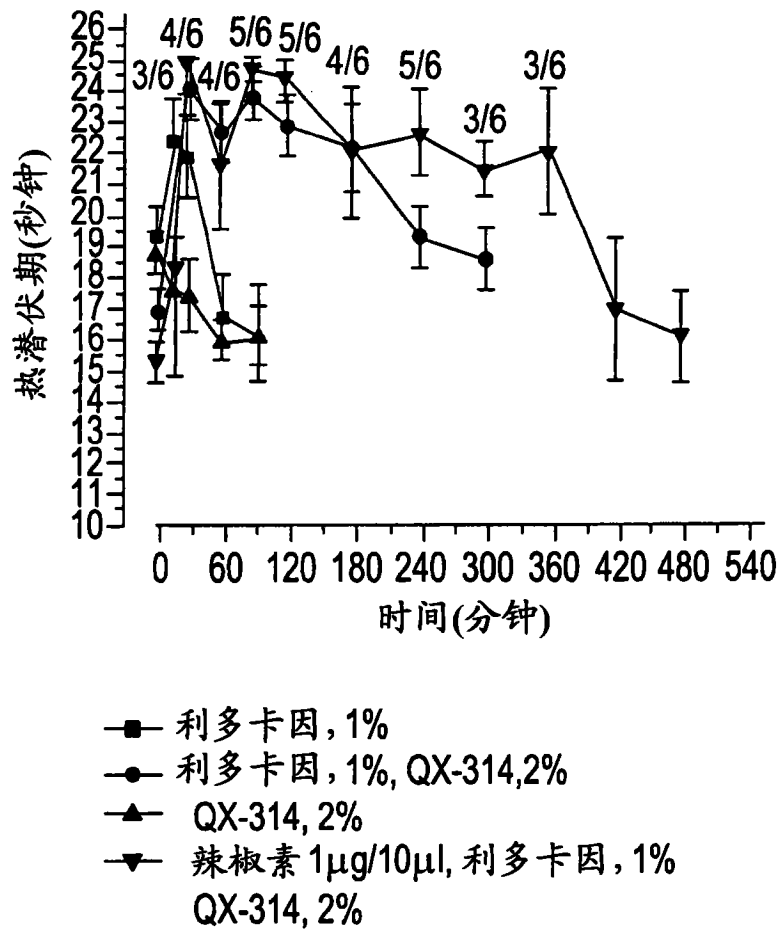


图 7C

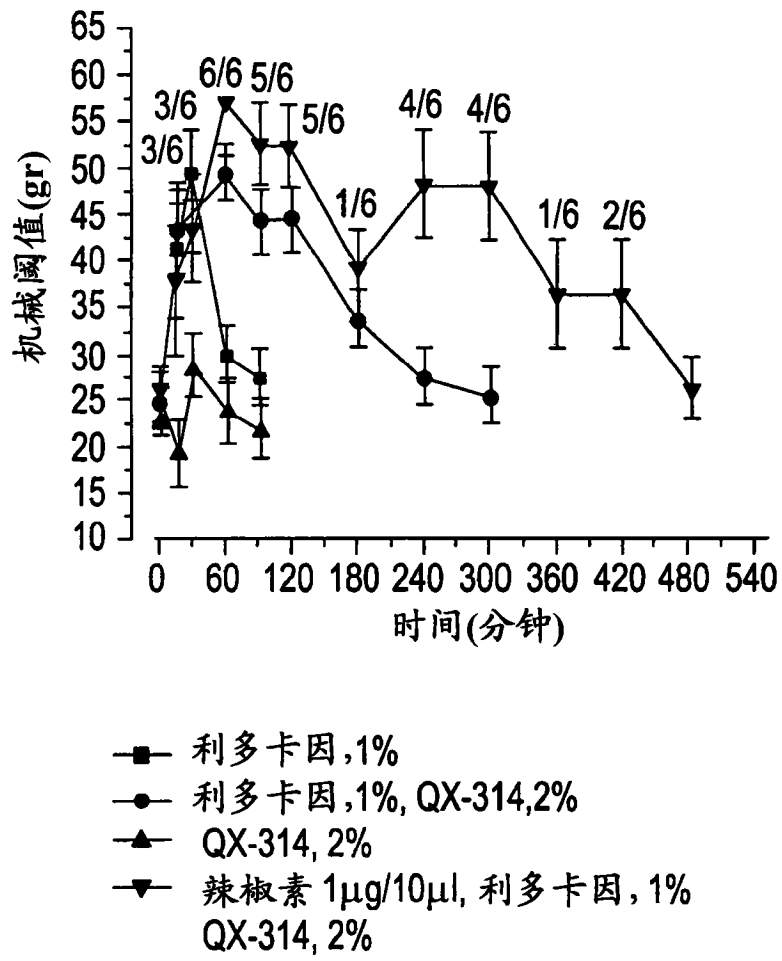


图 7D

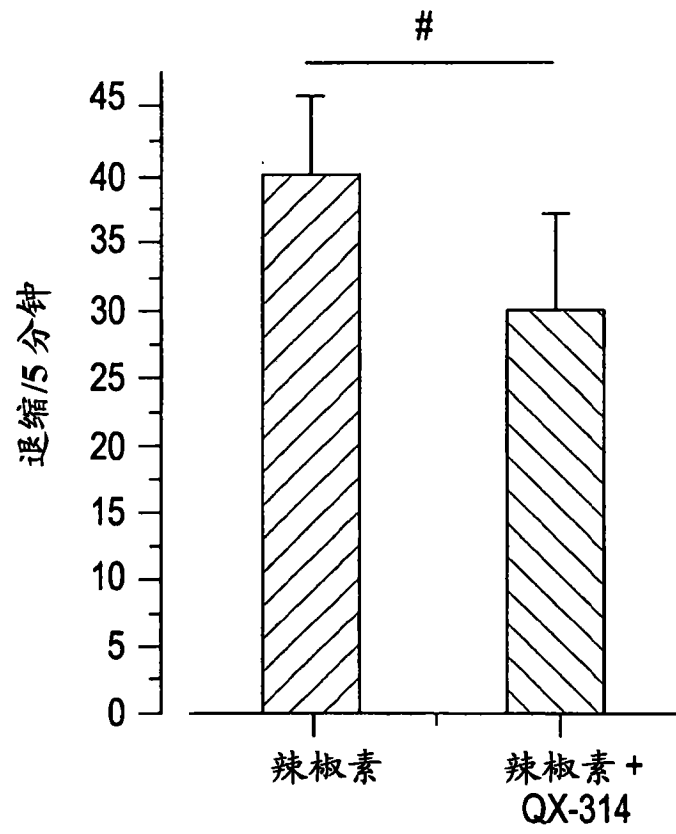


图 8