



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101658522 B

(45) 授权公告日 2013. 01. 02

(21) 申请号 200810142156. 8

审查员 卢立明

(22) 申请日 2008. 08. 26

(73) 专利权人 香港理工大学深圳研究院

地址 518057 广东省深圳市南山区高新技术产业园粤兴一道十八号香港理工大学产学研大学 205 室

(72) 发明人 韩怡凡 李文明 庞元平 罗加烈 陈新滋

(74) 专利代理机构 深圳市万商天勤知识产权事务所 (普通合伙) 44279

代理人 潘笑玲

(51) Int. Cl.

A61K 31/4747(2006. 01)

A61P 25/28(2006. 01)

A61P 25/16(2006. 01)

(56) 对比文件

李加荣等. 他克林二联体类似物的合成和药理研究进展. 《合成化学》. 2003, 第 11 卷 (第 3 期), 209 - 211.

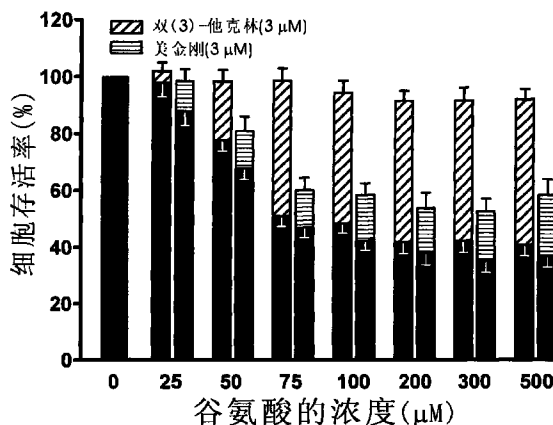
权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 6 页

(54) 发明名称

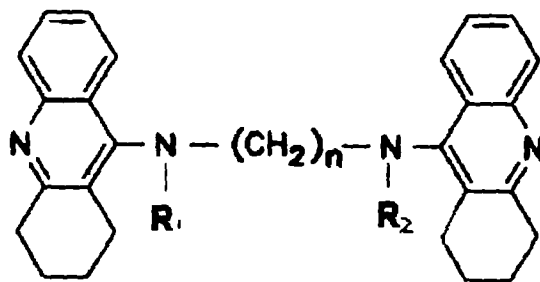
他克林短链二聚体类化合物在制备治疗神经退行性疾病药物中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种他克林短链二聚体类化合物在制备治疗神经退行性疾病的药物中的用途, 具体地说, 本发明涉及他克林短链二聚体在制备治疗包括中风和帕金森氏病方面的药物中的应用。

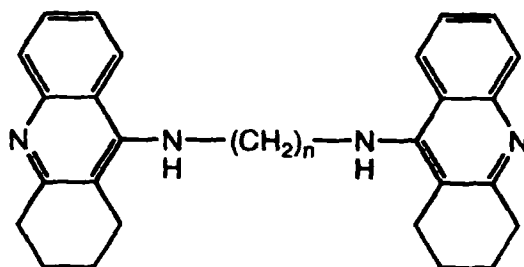


1. 他克林短链二聚体类化合物在制备治疗神经退行性疾病的药物中的用途,所述神经退行性疾病为中风和帕金森氏病;所述他克林短链二聚体类化合物为具有下述结构的化合物及其可药用的盐:



其中, R_1 、 R_2 是 H 或 (C_1-C_4) 的烷基, $n = 2, 3, 4$ 。

2. 按照权利要求 1 所述的用途,其特征是:所述他克林短链二聚体类化合物的结构为:



其中, $n = 2, 3, 4$ 。

他克林短链二聚体类化合物在制备治疗神经退行性疾病药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及化合物新的医药用途,尤其涉及他克林短链二聚体在制备治疗神经退行性疾病药物中的应用。

背景技术

[0002] 神经退行性疾病包括老年痴呆症 (Alzheimer's disease, AD), 帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 和中风 (Stroke) 等是当今严重危害数以百万计老年人的生活质量和寿命的重大疾病。随着社会老龄化的来临,问题变得越来越严重。不幸的是目前对大多数神经退行性疾病尚无有效的预防治疗药物。尽管神经退行性疾病的病理机制千差万别,但是它们具有一个共同的特征:功能性神经元进行性丢失。程序性细胞死亡(即凋亡)在功能性神经元进行性丢失过程中发挥重要作用。神经元凋亡在一定时间内是可逆的,因此,阻止神经元凋亡的神经保护剂能够有效控制神经退行性疾病的病程。

[0003] 他克林 (tacrine) 是第一个获美国食品及药物管理局批准用于治疗老年痴呆症的胆碱酯酶抑制剂,其结构式如图 1 所示,它对老年痴呆症的疗效肯定,但因其有较强的肝毒性,尤其会引起转氨酶水平升高,已近乎被临床淘汰。根据我们的研究,他克林的同二聚体可以通过降低剂量而减弱其毒性。另外,单纯胆碱酯酶抑制剂只能改善轻度老年痴呆而不能延缓神经元退行性病变,更不能对抗其他神经退行性疾病。越来越多的研究表明:二聚已有的药物是一类行之有效地获取高效、低毒、多靶点药物的手段。计算机模拟药物对接系统可以帮助设计新型同源或异源二聚体。因此,我们通过二聚化来获得一些针对包括胆碱酯酶, N-甲基-D-天门冬氨酸 (N-methyl-D-aspartic acid, NMDA) 受体和一氧化氮合酶 (Nitric oxide synthase, NOS) 等多靶点的新型药物。应用自动化的计算机对接系统,基于对胆碱酯酶的双位点作用原理,我们设计合成了一系列的二聚体型胆碱酯酶抑制剂,他克林二聚体具有针对乙酰胆碱酯酶 (Acetylcholinesterase, AChE) 更高的选择性,这一创新结果已申请美国专利 (US005783584A)。

[0004] 基于 N-甲基-D-天门冬氨酸受体研发“病理启动性”神经保护剂策略:

[0005] 虽然神经退行性疾病的发生及其发展的分子机制尚不明了,亦缺乏有效的预防治疗药物,但是越来越多的证据表明谷氨酸受体,尤其是 N-甲基-D-天门冬氨酸型谷氨酸受体的过度激活在神经退行性疾病中发挥重要作用。由于能量代谢障碍,突触释放的谷氨酸无法得到及时有效清除,甚至引起异常的释放,加之能量障碍导致离子稳态破坏,神经元出现持续的去极化,神经元的去极化削弱了镁离子 (Mg^{2+}) 对 N-甲基-D-天门冬氨酸受体的电压依赖性抑制作用,导致 N-甲基-D-天门冬氨酸受体的过度激活。这种过度激活引起 Ca^{2+} 的大量内流和细胞内自由基的生成(包括一氧化氮和活性氧),从而介导神经元死亡。过去很长一段时间 N-甲基-D-天门冬氨酸受体一直被视为神经保护剂开发的药物靶标,然而众多 N-甲基-D-天门冬氨酸受体的拮抗剂在临床实验中被淘汰,其临床应用受到极大限制。这主要是因为谷氨酸是细胞生命活动中的重要生物调节分子, N-甲基-D-天门冬氨酸受

体作为神经系统一个重要的谷氨酸神经递质受体也介导神经元的生存、神经系统的发育、兴奋性突触传递和突触可塑性等重要生理功能。N-甲基-D-天门冬氨酸受体拮抗剂干扰了这些正常生理功能必将引起一些严重的副作用,因此临床耐受性好的,安全有效的N-甲基-D-天门冬氨酸受体阻断剂是人们寻找的焦点。

[0006] 最近 Lipton 等人提出了一个开发临床耐受性好的,安全有效的神经保护剂的全新策略,这个策略的精髓在于这些药物选择性地作用于病理性启动的靶标,而不干扰正常的生理功能,被称这一类化合物为 PAT(Pathologically-activated therapy,病理性启动型治疗)药物。对于N-甲基-D-天门冬氨酸受体而言,病理性启动型药物主要包括一类反竞争性的,具有快速动力学特征的N-甲基-D-天门冬氨酸受体的通道阻断剂(uncompetitive antagonist with fast-off rate, UFO),这一类药物有望达到上述效果。因此,具有快速动力学和病理性启动特征的N-甲基-D-天门冬氨酸受体拮抗剂有望在神经退行性疾病的治疗中取得突破性的进展。

[0007] 基于神经退行性疾病相关的靶标研发“一药多靶”神经保护剂策略:

[0008] 传统“一药一靶位”(one-drug-one-target)的药物的治疗效果是非常有限的。这主要是因为神经退行性疾病都是一些多病因,多病理机制的疾病,他们需要多靶位元的干预措施来针对多方面的病因病理。这种多靶标的药物策略已经在传统医药(中国和其它国家)中存在几千年了,例如目前用鸡尾酒疗法来控制艾滋病的扩散。虽然联合应用多个针对不同靶位的药物可以达到这种效果,但是具有多靶位的药物显然可以避免多个单药物联合应用所涉及到的生物利用度,药代动力学方面的差异所造成的问题。“一药多靶位”(one-drug-multiple-target)药物在临床的治疗学上更具有明显优势,例如:(1)疗效更好,同时作用于多个靶位对抗疾病的发生发展;(2)克服药物联用的缺陷,尽管多个药物联用或许可以产生类似药效,但不同药物的生物利用度、药物代谢动力学等特性不尽相同,使得实现联用的目标比较困难;(3)极大提高患者的顺应性,用药单一显然便利使用。

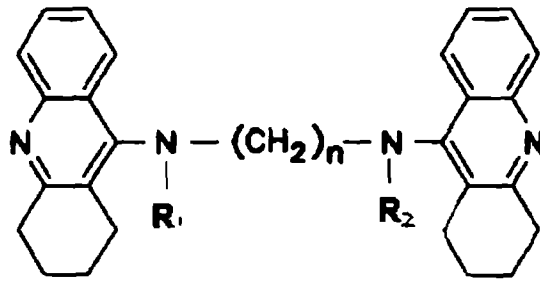
[0009] 而基于上述有关神经退行性疾病相关的靶标研发“一药多靶”神经保护剂、并应用于制备治疗神经退行性疾病,包括老年痴呆症(Alzheimer's disease, AD),帕金森病(Parkinson's disease, PD)和中风(Stroke),尚未见有报道。

发明内容

[0010] 本发明所要解决的技术问题是提供他克林短链二聚体的新的医药用途,即他克林短链二聚体在制备治疗神经退行性疾病药物中的应用;特别是在制备治帕金森病(Parkinson's disease, PD)和中风(Stroke)疾病药物中的应用。

[0011] 本发明所述他克林短链二聚体类化合物为具有下述结构的化合物及其可药用的盐:

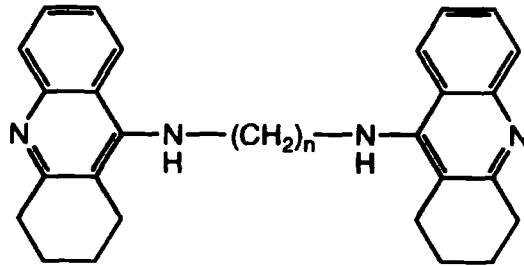
[0012]



[0013] 其中, R_1 、 R_2 是 H 或 (C_1 - C_4) 的烷基, $n = 2, 3, 4$ 。

[0014] 特别优选的例子为, 所述他克林短链二聚体类化合物的结构如下:

[0015]



[0016] 其中, $n = 2, 3, 4$ 。

[0017] 他克林 (tacrine): 化学名为四氢氨基吡啶, 是弱碱性化合物, 商品名为 **Cognex[®]**。他克林短链二聚体包括: 双 (2) 他克林 [bis(2)-tacrine]、双 (3) 他克林 [bis(3)-tacrine] 和双 (4) 他克林 [bis(4)-tacrine] 等三个弱碱性化合物, 与盐酸成盐后为白色粉末。

[0018] 本发明所述神经退行性疾病包括中风和帕金森氏病。

[0019] 本发明所涉及的他克林短链二聚体类化合物及其可药用的盐可以作为原料, 添加药学上可接受的辅料制成口服制剂或注射剂, 比如, 可加入适当的赋形剂制成片剂, 也可以用其药用盐配制成水针剂或者冻干粉针剂。

[0020] 本发明以目前最新最权威的神经退行性疾病的病理机制理论知识为基础, 借鉴研发治疗神经退行性疾病药物成功的经验和失败的教训, 针对疾病的多病因和病理过程的多环节为治疗靶标, 多学科结合研制“单分子多靶位”具有病理启动性特征的抗神经退行性疾病的新颖神经保护性药物。

[0021] 本发明克服现有技术的不足, 提供一种能同时拥有“病理启动性”和“一药多靶”特点的新型二聚体药物。为神经退行性疾病的治疗开拓新思路和新方法; 为神经退行性疾病治疗提供一类全新药物。本发明的目的是这样实现的:

[0022] 他克林短链二聚体在制备治疗神经退行性疾病药物中的应用; 特别是在制备治疗帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 和中风 (Stroke) 疾病药物中的应用。

[0023] 神经系统退行性疾病的发生及其发展的分子机制尚不明了, 亦缺乏有效的预防治疗药物, 故现在的治疗方法仍然以对症为主。由于这些治疗方法并没有从根本上消除神经系统退行性疾病的病因, 因此不能阻止病程进展, 疾病仍然会进行性恶化。随着人们对神经系统退行性疾病认识的深入和对高素质生活要求的提高, 对抗神经元凋亡的药物的需求大幅度增加。抗凋亡的药物对于保护神经元, 防止神经系统退行性疾病的发展和恶化, 改善患者症状和提高生活质量, 减轻社会负担都具有重要意义。随着世界及我国人口老龄化进程

加快,神经系统退行性疾病的患病群体越来越大。神经系统退行性疾病已成社会和家庭的沉重负担,它不仅是一个重大的医学问题,而且是一个社会问题。衰老不该再是人类无奈的等待,关注神经系统退行性疾病,岂容片刻迟缓!日益增多的研究表明:“单分子多靶位”的病理启动性药物是治疗神经系统退行性疾病最有希望的发展方向,其理论和实践也将有助进一步理解神经系统退行性疾病的发病机理。因此,开发多靶标治疗神经系统退行性疾病新药具有迫切的医疗需求,以及巨大的科学、经济和社会效益。

[0024] 本发明为他克林短链二聚体在医学上治疗老年痴呆症、中风和帕金森氏病方面提供了疗效确切、副作用较低的用药选择。

附图说明

[0025] 图 1 是本发明涉及的现有技术中他克林的结构式。

[0026] 图 2 是本发明涉及的他克林短链二聚体类化合物的结构式。

[0027] 图 3 是本发明其中一个实施例的他克林短链二聚体结构式。

[0028] 图 4 显示的是电脑分子对接的实验结果的模式图;

[0029] 图 5 显示的是第二张电脑分子对接的实验结果的模式示意图;

[0030] 图 6 是 $75 \mu\text{M}$ 的谷氨酸神经毒性及保护的四唑蓝 (MTT) 比色法的结果统计图,

[0031] 图 7 是不同浓度的谷氨酸神经毒性及保护的四唑蓝 (MTT) 比色法的结果统计图;

[0032] 图 8 是暂时性局部脑缺血 (MCAO) 脑片的氯化三苯四氮唑 (TTC) 染色结果;

[0033] 图 9 是上述图 8 染色结果的统计图 - 单脑片;

[0034] 图 10 是图 8 染色结果的统计图 - 总缺血区;

[0035] 图 11 表明他克林短链二聚体 bis(3)-tacrine 具有高效的体内神经保护作用。

[0036] 图 12 是 NMDA 诱导的体外培养的海马细胞的电流图 (B3T $0.3 \mu\text{M}$ 、NMDA $30 \mu\text{M}$);

[0037] 图 13 是 NMDA 诱导的体外培养的海马细胞的电流图;

[0038] 图 14 是受体配体竞争性结合实验图;表明短链二聚体 bis(3)-tacrine 在 MK-801 位点阻断 NMDA 受体。

[0039] 图 15 是高频刺激诱导的海马长时程增强图;表明短链二聚体 bis(3)-tacrine 不影响 NMDA 受体介导长时程增强 (LTP, 生理性) 效应。

[0040] 另外,在本发明说明书中,B3T 是他克林短链二聚体 bis(3)-tacrine 的简称。

具体实施方式

[0041] 下面通过结合附图和实施例详细描述本发明:

[0042] 一、本发明借助于分子对接技术设计和合成新型二聚体

[0043] 我们在已申请的美国专利 (US005783584A) 的基础上,应用 ICM-Pro 3.4-8a 程序 (Molsoft) 研究蛋白质-配体相互作用从而指导新型具有快速动力学特征反竞争性的 N-甲基-D-天门冬氨酸受体拮抗剂的合成。通过这种方法,我们根据受体蛋白的结构特征和药物分子的结构以及他们相互作用的特点研究药物的功能,从而筛选出具有开发前途的化合物。根据分子对接的实验结果,我们发现短链二聚体双(3)他克林对 N-甲基-D-天门冬氨酸受体的结合力较 MK-801 弱,如图 4 及图 5 所示,具体来说,图 4:ICM-Pro 3.4-8a 程序 (Molsoft) 演示双(3)他克林与 N-甲基-D-天门冬氨酸受体的 NR1 和 NR2B 异二聚体的分

子对接结果 ;图 5 演示 :他克林短链二聚体与 N- 甲基 -D- 天门冬氨酸受体细胞外前庭区的相互作用 ;受体胞外区的 M3 和 M1 残基对二聚体的结合力影响较小,也就是说,它们对二聚体与 N- 甲基 -D- 天门冬氨酸受体结合并不十分关键,表明二聚体 [如双 (3) 他克林] 对 N- 甲基 -D- 天门冬氨酸受体的结合能力较 MK-801 弱。

[0044] 另外,双 (3) 他克林与一氧化氮合酶的分子对接模拟分析表明其可以结合于神经型一氧化氮合酶或诱导型一氧化氮合酶活性区的精氨酸残基。这些结果表明他克林短链二聚体是一个潜在多靶点的病理启动型药物。

[0045] 二、他克林短链二聚体是“病理启动性”和“一药多靶”融合型神经保护剂

[0046] 胆碱酯酶,谷氨酸和一氧化氮是细胞生命活动中的重要生物调节分子,然而,他们在老年痴呆症的发病机理中也发挥重要的作用,比如过度表达的胆碱酯酶及浓度异常升高的谷氨酸和一氧化氮能介导细胞毒性作用。因此抑制过度激活的 N- 甲基 -D- 天门冬氨酸受体和一氧化氮合酶而不影响谷氨酸和一氧化氮的正常生理功能就显得尤为重要。我们期望新型二聚体可以通过中度亲和力与相应的靶点作用,成为很有前景的病理启动型药物。为了证实这一点,我们在不同的生理和病理条件下检测这些二聚体对相应靶点的作用。同时,大量的证据显示一药多靶点的药物具有优于单个靶点药物的特性,而且这样的药物很难通过有意设计而获得,但可以通过多方筛选得到。利用分子对接模拟,我们可以研究药物和胆碱酯酶或 N- 甲基 -D- 天门冬氨酸受体的作用,从而设计合成一些具有开发前景的病理启动型二聚体。首先,我们发现他克林短链二聚体具有高效的体内外神经保护作用,如图 6、图 7 和图 8、图 9、图 10、图 11 所示 ;具体来说,图 6 表明 :大鼠小脑颗粒神经元 (cerebellar granule neurons, CGNs) 用不同浓度的双 (3) 他克林预处理两个小时,然后暴露于 $75 \mu\text{M}$ 的谷氨酸,用四唑蓝 (MTT) 比色法于谷氨酸暴露的 24 小时检测细胞存活率。检测结果表明 :双 (3) 他克林浓度依赖性对抗谷氨酸诱导的神经元毒性 ;图 7 表明 :大鼠小脑颗粒神经元 (CGNs) 用 $3 \mu\text{M}$ 的双 (3) 他克林或 $3 \mu\text{M}$ 的美金刚预处理两个小时,然后暴露于不同浓度的谷氨酸,用四唑蓝 (MTT) 比色法于谷氨酸暴露的 24 小时检测细胞存活率 ;细胞的存活率表示为对照组 (未处理组) 的百分率 (%)。检测结果表明 :谷氨酸浓度越高双 (3) 他克林的保护能力越强,明显优于美金刚组。

[0047] 其次,通过研究这些二聚体对胆碱酯酶和一氧化氮合酶的作用,我们发现双 (3) 他克林能够中度抑制胆碱酯酶 ($\text{IC}_{50} : 0.25 \mu\text{M}$) 和神经型一氧化氮合酶 ($\text{IC}_{50} : 43 \mu\text{M}$)。更有意思的是,膜片钳和放射性配基结合实验结果显示双 (3) 他克林能够中度反竞争性地抑制 N- 甲基 -D- 天门冬氨酸受体,如图 12、图 13 和图 14 所示 ;同时,我们的结果显示双 (3) 他克林并不影响 N- 甲基 -D- 天门冬氨酸受体介导的长时程增强现象,如图 15 所示 ;表明该二聚体不会干扰 N- 甲基 -D- 天门冬氨酸受体的正常生理功能,而且他对谷氨酸诱导的神经元死亡的保护作用随着谷氨酸的浓度升高而增强,如图 7 所示 ;表明他确实可以对抗病理启动的 N- 甲基 -D- 天门冬氨酸受体。这些结果证明他克林短链二聚体是一类具有病理启动型特性和多靶点的化合物。

[0048] 他克林短链二聚体包括 :双 (2) 他克林、双 (3) 他克林和双 (4) 他克林等三个弱碱性化合物,与盐酸成盐后为白色粉末,其盐酸盐可溶于水 (11.3 至 13.7mg/ml),性质稳定,粉末可室温保存 5 年以上。

[0049] 根据动物实验 (有效剂量和药代学特点),推算对治疗老年痴呆症 (Alzheimer's

disease, AD) 病人的剂量为 5mg/天, 为方便使用, 他克林短链二聚体的盐酸盐与相应的赋形剂可制成 2.5 和 5mg 的片剂, 供口服用; 推算对中风 (Stroke) 剂量为 10mg 每次, 为急救使用, 他克林短链二聚体的盐酸盐可制成 5 和 10mg 的针剂, 供静脉或肌肉注射用。

[0050] 根据已经得到的资料表明: 在细胞水平, 100 μ M 或以下浓度的他克林短链二聚体对原代培养的神经元无毒性作用。在动物水平, 20mg/kg 或以下剂量的他克林短链二聚体对鼠类无明显的毒副作用。另外, 现有研究资料证明二聚他克林可以降低他克林原有的毒副作用。

[0051] 他克林短链二聚体抗大脑中动脉阻塞 / 再灌损伤分析 (动物实验)。大脑中动脉阻塞 / 再灌的实验动物模型建立及他克林短链二聚体抗大鼠局灶性脑缺血面积、脑水肿及行为功能障碍的分析按照实施例 1 进行。

[0052] 他克林短链二聚体抗谷氨酸诱导的原代培养的神经元凋亡 (细胞实验)。谷氨酸过度激活 N-甲基-D-天门冬氨酸受体介导兴奋毒性在神经退行性疾病的病理过程中发挥重要作用。建立体外谷氨酸介导兴奋毒性模型对研究神经退行性疾病的病理机制及筛选神经保护性药物有重要意义。谷氨酸介导兴奋毒性模型在原代培养的神经元建立及他克林短链二聚体抗谷氨酸诱导的神经元凋亡效应及机制的分析按照实施例 2 进行。

[0053] 实施例 1:

[0054] 他克林短链二聚体对 SD 大鼠大脑中动脉阻塞缺血 / 再灌注损伤实验动物模型中局灶性脑缺血面积、脑水肿及行为功能障碍的保护性干预作用:

[0055] 线栓法阻塞大脑中动脉模型是急性局灶性脑缺血 / 再灌注损伤的经典模型, 能较合理地模拟颈部、颅内大血管手术等围术期急性局灶性脑缺血再灌注损伤的病理生理过程。实验动物选择及分组: 健康雄性 SD 大鼠, 体重 280-320g。随机分成 4 组: 假手术组 (S 组, $n = 10$ 只)、生理盐水组 (NS 组, $n = 10$ 只)、他克林短链二聚体处理组 [T1 (0.1mg/Kg) 和 T2 (0.3mg/Kg) 组, 每组 $n = 10$ 只]。大鼠局灶性脑缺血 / 再灌注模型的制备, 参照 Longa 等方法建立大脑中动脉阻塞模型 [Neuroscience Lett. 439 (2008): 160-164]。10% 水合氯醛 (350mg/kg) 腹腔注射麻醉后, 沿大鼠的颈正中中线切开, 分离右侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉, 结扎并剪断颈外动脉主干以备。动脉夹暂时阻断颈内动脉远心端、颈总动脉近心端, 于近分叉处的颈外动脉插入涂有硅胶的渔线 (直径约 0.28mm), 随后松开颈内动脉远心端动脉夹, 插入至 1.8-2.0mm 遇有轻微阻力时停止。120min 后将渔线拔出, 恢复大脑中动脉灌注。扎紧切口、松开动脉夹并缝合皮肤。假手术组大鼠手术操作相同, 渔线仅置入约 1.0cm。术前术中全程激光多普勒血流仪监控; 术后大鼠维持体温在 $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 。

[0056] 他克林短链二聚体减少大脑中动脉阻塞引起的脑缺血体积和脑水肿: 1、2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑 (TTC) 是脂溶性光敏感复合物, 1894 年首次合成用来检测种子的生存能力, 1958 年开始用来染色检测哺乳动物组织的缺血梗塞。它是呼吸链中吡啶-核苷结构酶系统的质子受体, 与正常组织中的脱氢酶反应而呈红色, 而缺血组织内脱氢酶活性下降, 不能反应, 故不会产生变化呈苍白。2、取脑: 可麻醉后直接取脑或经生理盐水灌注后取脑。因为脑组织未用多聚甲醛固定, 所以较软, 取脑时更应仔细, 保持大脑的完整性。3、-20 度冰箱中速冻 20 分钟左右, 便于切片。4、切片: 一般切成 7 片, 用专门的脑槽; 每隔 2mm 切一片。第一刀在脑前极与视交叉连线中点处; 第二刀在视交叉部位; 第三刀在漏斗柄部位; 第四刀在漏斗柄与后叶尾极的之间。5、将切片置于 TTC 中, 常规浓度为 2%, 也有用 1% 或更

低浓度的。6、用锡箔纸盖住后,放入 37℃ 温箱 15 ~ 30min,不时翻动脑片,使均匀接触到染色液。7、染色后效果:苍白区为皮层下梗死。8、扫描:用图像分析软件来计算梗死体积和脑水肿等。苍白区为缺血损伤区,按公式: $V = (S_1 + S_2 + \dots + S_n) \times 0.5$ 计算缺血损伤体积(式中 V 为缺血损伤体积, $S_1 \sim S_n$ 为各切片椭圆面积,0.5 为常数)。结果显示他克林短链二聚体双(3)他克林可显著减少大脑中动脉阻塞引起的脑缺血体积和脑水肿(图 4)。

[0057] 他克林短链二聚体缓解大脑中动脉阻塞的行为功能障碍:大鼠脑缺血/再灌注损伤后出现神经功能缺失症状和行为学改变,进食显著减少,体重明显减轻,活动减少,反应迟钝。参照 Longa 等分级法于再灌注相应时间点进行神经症状评分。0:无症状;1:提尾时损伤对侧前肢不能伸直;2:行走时向损伤对侧旋转;3:行走时向损伤对侧倾倒;4:无自发活动或死亡。脑缺血再灌注 22 小时后,各组大鼠神经症状缺失的评分:假手术组(S 组),n = 10 只)为 0 ± 0.31 ;生理盐水组(NS 组,n = 10 只)为 2.3 ± 0.43 ;他克林短链二聚体处理组 [T1(0.1mg/Kg),n = 10 只] 为 1.6 ± 0.31 和 [T2(0.3mg/Kg,n = 10 只)] 为 0.3 ± 0.45 。

[0058] 实施例 2:他克林短链二聚体抗谷氨酸诱导的神经元死亡

[0059] 小脑颗粒神经元原代培养按本实验室发表文章方法进行(JBC,280(2005):18179-88)。取出生 7 ~ 8 天,体重约 15 ~ 20g 的清洁级 SD 大鼠,无菌条件下断头、开颅、取小脑,置于解剖液中去除脑膜和血管;吸去解剖液,将脑组织置于切板上,然后用电动切片切片机切成 0.5mm^3 大小的组织块;将切碎的脑组织置于解剖液中重悬后,1500rpm 离心 3 分钟以去除杂质;取沉淀,置于含有 0.25mg/ml 胰酶的解剖液中,置于 37℃ 水浴 15 分钟以消化细胞外结缔组织,每 5 分钟摇匀以促消化均匀;加入含有胰酶抑制剂和 DNA 酶的解剖液,摇匀后 1500rpm 离心 3 分钟以中止消化和除去细胞破碎释放的 DNA;加入 5ml 解剖液重悬沉淀,并分装于两个 15ml 离心管中,每管用吸管吹打 20 次以将聚集成团的细胞吹散成单个细胞,然后每管加解剖液混匀并静置,15 分钟后,组织碎片和未被吹散的细胞团沉淀,上清即为单个细胞悬液;静置后取含有单个细胞的上清,1500rpm 离心 3 分钟,沉淀即为细胞;用 10ml 完全培养基重悬细胞沉淀,稀释计数后,按 $1.5-1.8 \times 10^6/\text{ml}$ 的密度接种于经多聚赖氨酸包被的培养板中,置于 5% CO_2 及 37℃ 培养箱中培养。接种后 24 小时加入 $12 \mu\text{mol/L}$ 阿糖胞苷以抑制胶质细胞的生长和增殖,培养第 5 天加入 5mmol/L 葡萄糖以补充细胞代谢所需能量。7 天后,神经元分化成熟。此法培养的小脑颗粒神经元纯度大于 95%。培养的第 8 日,以双(3)他克林,浓度在 0.1 到 $30 \mu\text{M}$] 预处理小脑颗粒神经元两个小时,然后分别与 $75 \mu\text{M}$ 谷氨酸共孵育 24 小时,或以双(3)他克林($3 \mu\text{M}$) 预处理小脑颗粒神经元两个小时,然后分别与谷氨酸(25 到 $500 \mu\text{M}$) 共孵育 24 小时。用四唑蓝比色法方法检查细胞的生存率。结果表明双(3)他克林剂量依赖性地阻止谷氨酸诱导的神经元死亡,如图 6 所示。更重要地是双(3)他克林对浓度越高的谷氨酸显现更强的保护效应,如图 7 所示。

[0060] 下面对本发明实验结果的主要图形作进一步解释:

[0061] 如图 4、图 5 所示,分子对接的实验结果表明二聚体双(3)他克林对 N-甲基-D-天门冬氨酸受体的结合力较 MK-801 弱。

[0062] 具体来说,图 4:ICM-Pro 3.4-8a 程序(Molsoft)演示双(3)他克林与 N-甲基-D-天门冬氨酸受体的 NR1 和 NR2B 异二聚体的分子对接结果;图 5 演示:他克林短链二聚体与 N-甲基-D-天门冬氨酸受体细胞外前庭区的相互作用:受体胞外区的 M3 和 M1 残基对二聚体的结合力影响较小,也就是说,它们对二聚物与 N-甲基-D-天门冬氨酸受体结合

并不十分关键,表明二聚体 [如双 (3) 他克林] 对 N- 甲基 -D- 天门冬氨酸受体的结合能力较 MK-801 弱。

[0063] 图 6、图 7. 短链二聚体的双 (3) 他克林具有高效的体外神经保护作用。

[0064] 具体来说,图 6 表明:大鼠小脑颗粒神经元 (cerebellar granule neurons, CGNs) 用不同浓度的双 (3) 他克林预处理两个小时,然后暴露于 $75 \mu\text{M}$ 的谷氨酸,用四唑蓝 (MTT) 比色法于谷氨酸暴露的 24 小时检测细胞存活率。检测结果表明:双 (3) 他克林浓度依赖性地对抗谷氨酸诱导的神经元毒性;图 7 表明:大鼠小脑颗粒神经元 (CGNs) 用 $3 \mu\text{M}$ 的双 (3) 他克林或 $3 \mu\text{M}$ 的美金刚预处理两个小时,然后暴露于不同浓度的谷氨酸,用四唑蓝 (MTT) 比色法于谷氨酸暴露的 24 小时检测细胞存活率;细胞的存活率表示为对照组 (未处理组) 的百分率 (%)。检测结果表明:谷氨酸浓度越高双 (3) 他克林的保护能力越强,明显优于美金刚组。

[0065] 图 8、图 9、图 10、图 11 短链二聚体的双 (3) 他克林具有高效的体内神经保护作用。

[0066] 具体来说,图 8 演示暂时性局部脑缺血 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 脑片的氯化三苯四氮唑 (TTC) 染色结果:左列是假手术组,中列是溶剂对照组,右列是双 (3) 他克林 ($0.3\text{mg}/\text{kg}$) 组,白色为中风大鼠脑的缺血区,图中显示:药物和生理盐水在暂时性局部脑缺血后 15 分钟处理中风大鼠,24 小时评估缺血程度,与对照组对比,双 (3) 他克林 ($0.3\text{mg}/\text{kg}$) 组的缺血区更小。图 9 演示:在暂时性局部脑缺血后 15 分钟处理中风大鼠,24 小时评估缺血程度,生理盐水组和双 (3) 他克林 ($0.3\text{mg}/\text{kg}$) 组从前至后七块脑的缺血体积的统计结果。图 10:药物 [双 (3) 他克林 ($0.1, 0.3\text{mg}/\text{kg}$), 美金刚 ($20\text{mg}/\text{kg}$)] 和生理盐水在暂时性局部脑缺血后 15 分钟处理中风大鼠,24 小时评估缺血程度,各组总缺血区的缺血区体积统计结果,表明双 (3) 他克林组能够显著减少缺血区。图 11 表明:药物 [双 (3) 他克林 ($0.1, 0.3\text{mg}/\text{kg}$), 美金刚 ($20\text{mg}/\text{kg}$)] 和生理盐水在暂时性局部脑缺血后 15 分钟处理中风大鼠,22 小时评估中风大鼠的神经行为功能,结果表明:双 (3) 他克林 ($0.3\text{mg}/\text{kg}$) 比美金刚 ($20\text{mg}/\text{kg}$) 更显著改善暂时性局部脑缺血 (MCAO) 引起的行为障碍 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与对照组比较)。

[0067] 图 12、图 13. 短链二聚体的双 (3) 他克林适度反竞争性阻断 N- 甲基 -D- 天门冬氨酸受体。

[0068] 具体来说,图 12 表明:双 (3) 他克林激动剂 (N- 甲基 -D- 天门冬氨酸) 依赖性地阻断 N- 甲基 -D- 天门冬氨酸受体。图 13 表明:双 (3) 他克林电压依赖性阻断 N- 甲基 -D- 天门冬氨酸受体,在细胞电压从 -70 到 $+50\text{mV}$ 之间时,电压越低,双 (3) 他克林阻断 N- 甲基 -D- 天门冬氨酸受体的能力越强 (即他克林适度反竞争性阻断 N- 甲基 -D- 天门冬氨酸受体)。注:图中电流的幅度是根据 $30 \mu\text{M}$ N- 甲基 -D- 天门冬氨酸组 (标星号者) 的电流标准化的结果。

[0069] 图 14 短链二聚体的双 (3) 他克林在 MK-801 位点阻断 N- 甲基 -D- 天门冬氨酸受体。

[0070] 具体来说,图 14 表明:用小脑皮质的膜蛋白与 $[^3\text{H}]$ MK-801 (4nM) 及逐渐增加浓度的双 (3) 他克林共同孵育 30 分钟,检测双 (3) 他克林对 MK-801 竞争性与 N- 甲基 -D- 天门冬氨酸受体的结合能力。结果表明:双 (3) 他克林能竞争性结合于 N- 甲基 -D- 天门冬氨酸受体的 MK-801 位点。双 (3) 他克林对 MK-801 的竞争参数 K_i 是利用公式 $K_i = \text{IC}_{50} / (1 + [\text{配}$

体] $/K_d$) 根据相应的半数抑制量 IC_{50} , 而 IC_{50} 值是利用至少八个逐渐增加浓度的双 (3) 他克林与 [3H]MK-801 (4nM) 的共同孵育 30 分钟获得 (每个样本重复三次)。

[0071] 图 15 短链二聚体的双 (3) 他克林不影响 N-甲基-D-天门冬氨酸受体介导长时程增强效应。

[0072] 大鼠海马脑片制备和体外电生理技术按文献 [J Neuroscience 2004, 24(13): 3370-3378] 进行。图 15 演示: 在海马脑片, 记录 200Hz 刺激后的对照组和 $3\mu M$ 双 (3) 他克林处理组的长时程增强 (Long term potentiation, LTP, 生理性) 效应; 60 分钟时, 对照组和双 (3) 他克林组的 LTP 分别为 $149\pm 8\%$ 和 $152\pm 9\%$; 结果表明: 双 (3) 他克林不影响 200Hz 刺激后的长时程增强效应。

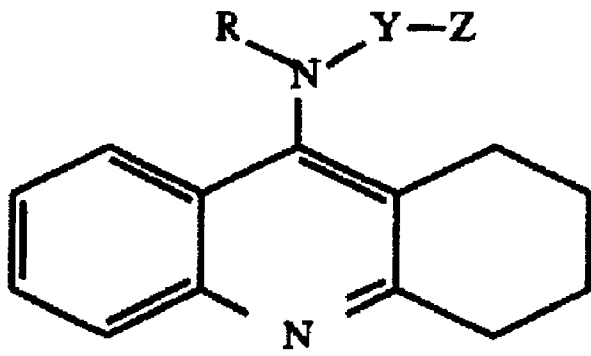


图 1

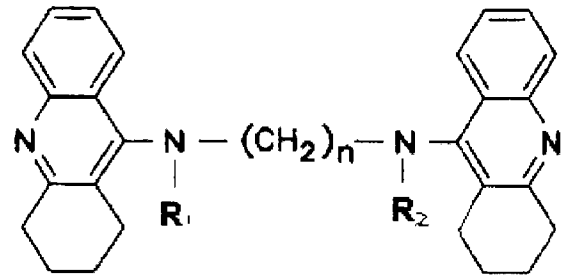


图 2

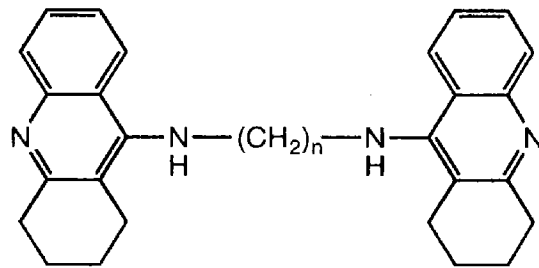


图 3

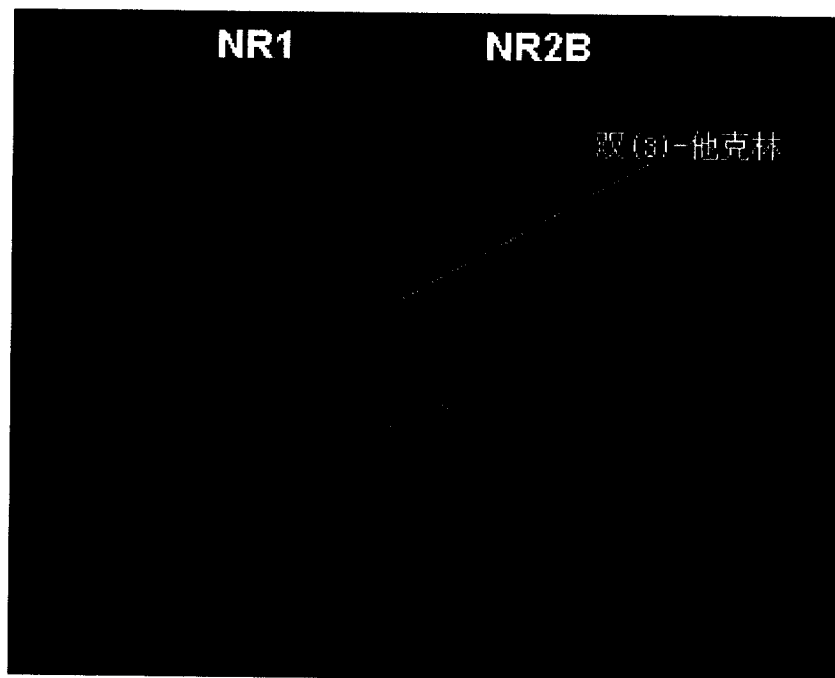


图 4

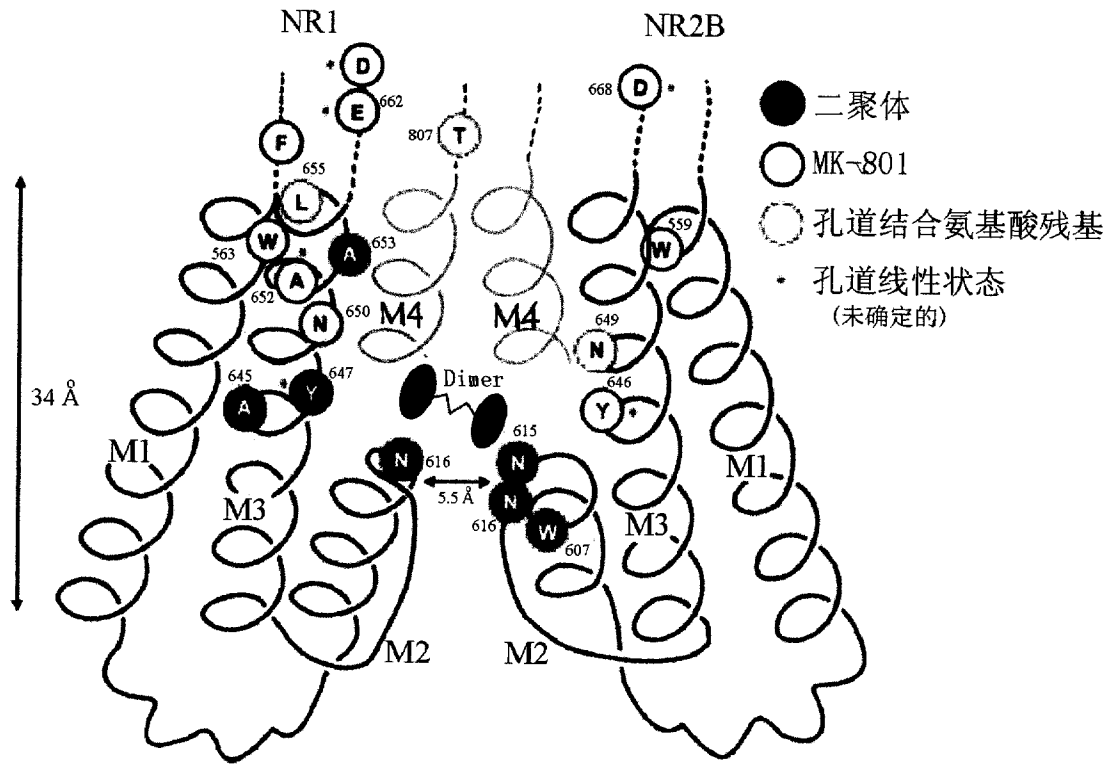


图 5

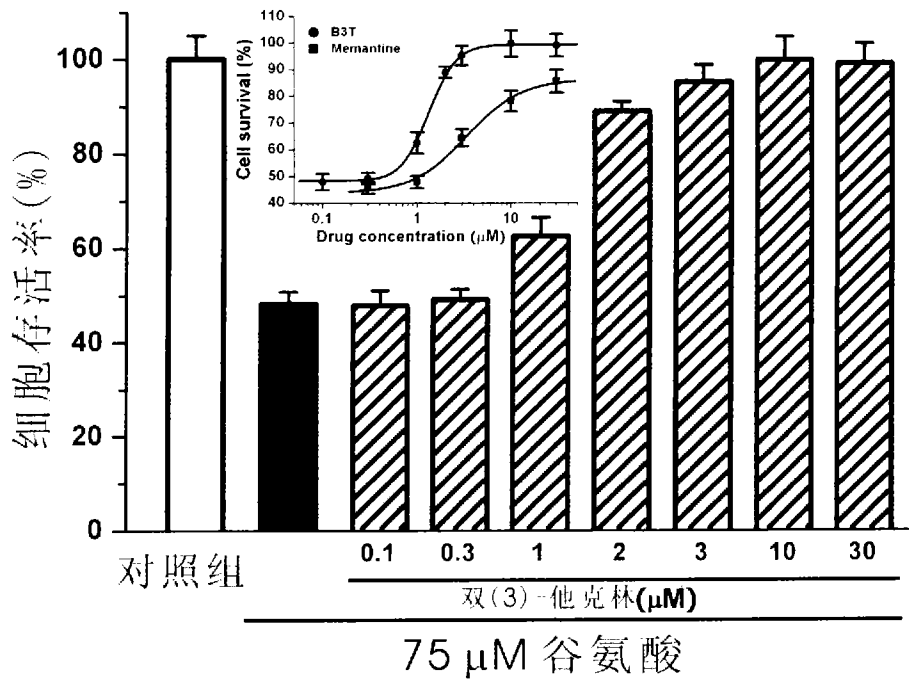


图 6

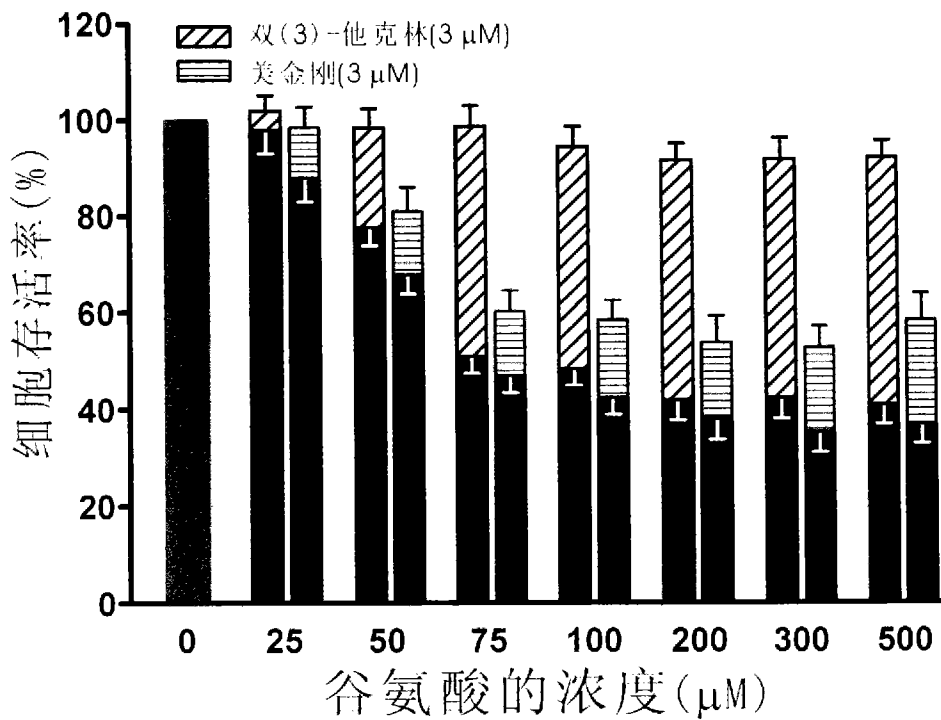


图 7

假手术组 生理盐水组 双(3) 他克林组

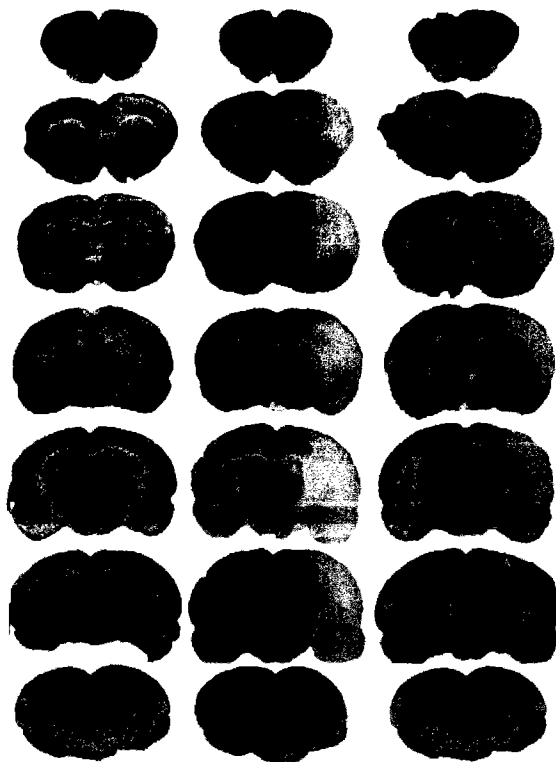


图 8

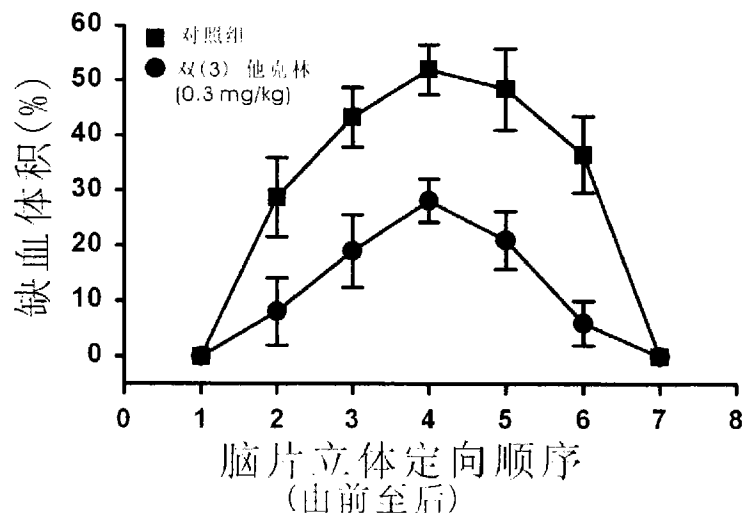


图 9

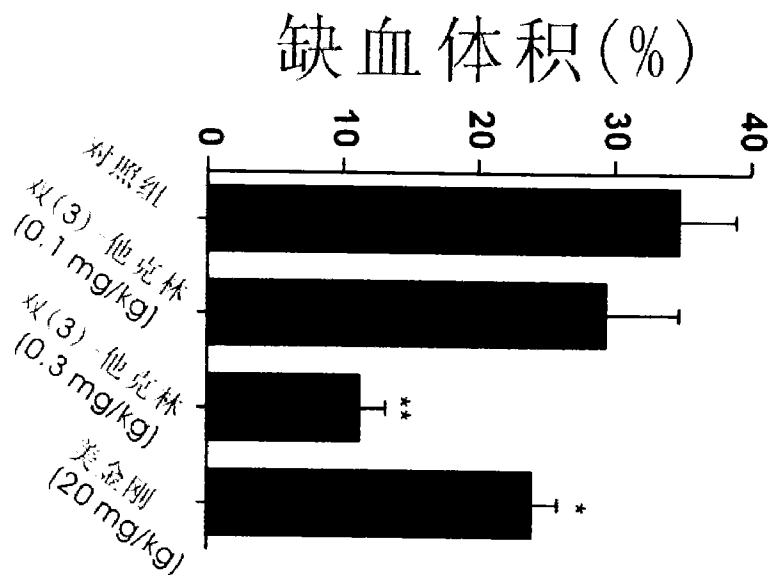


图 10

神经功能评分

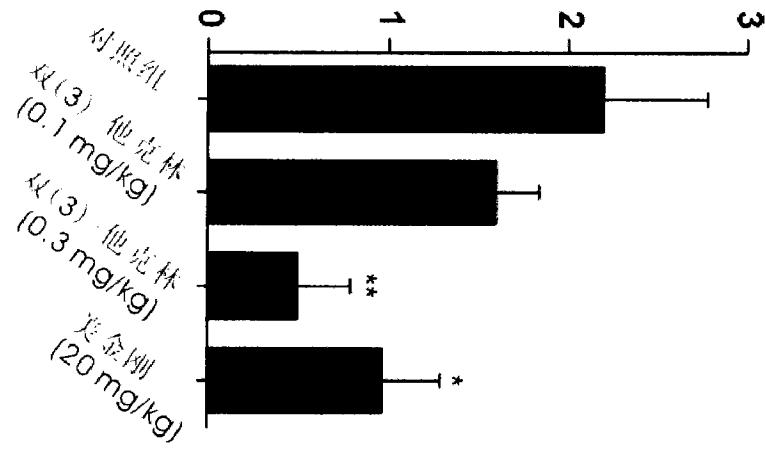


图 11

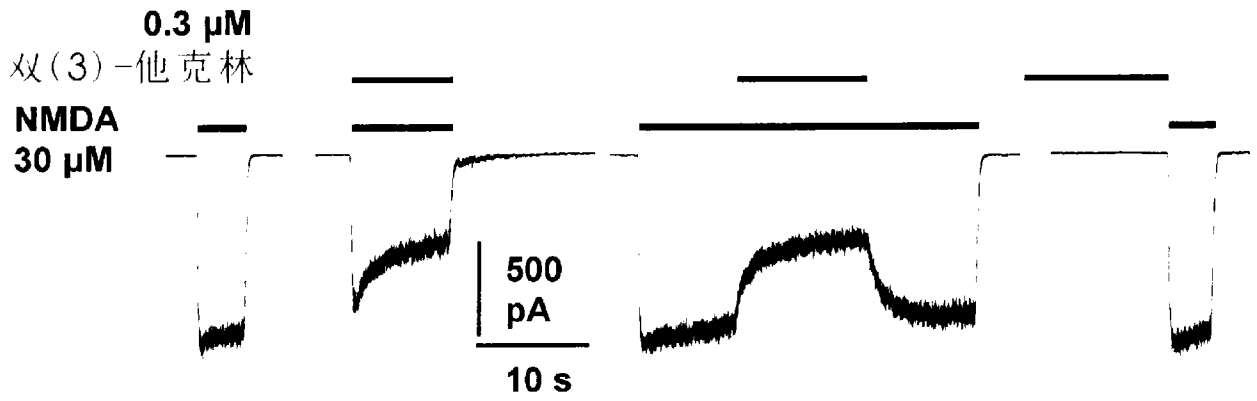


图 12

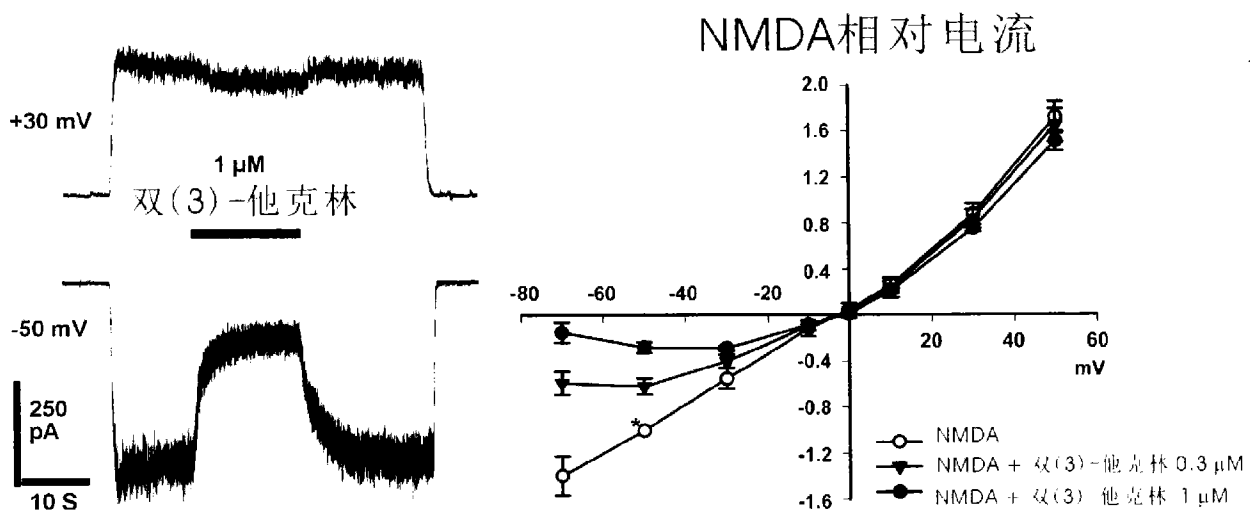


图 13

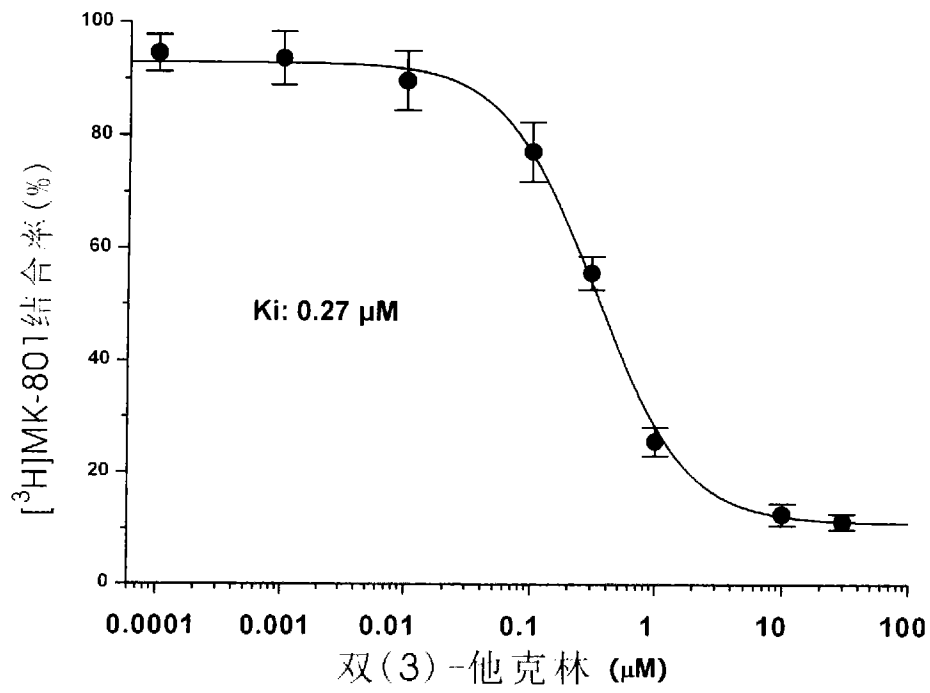


图 14

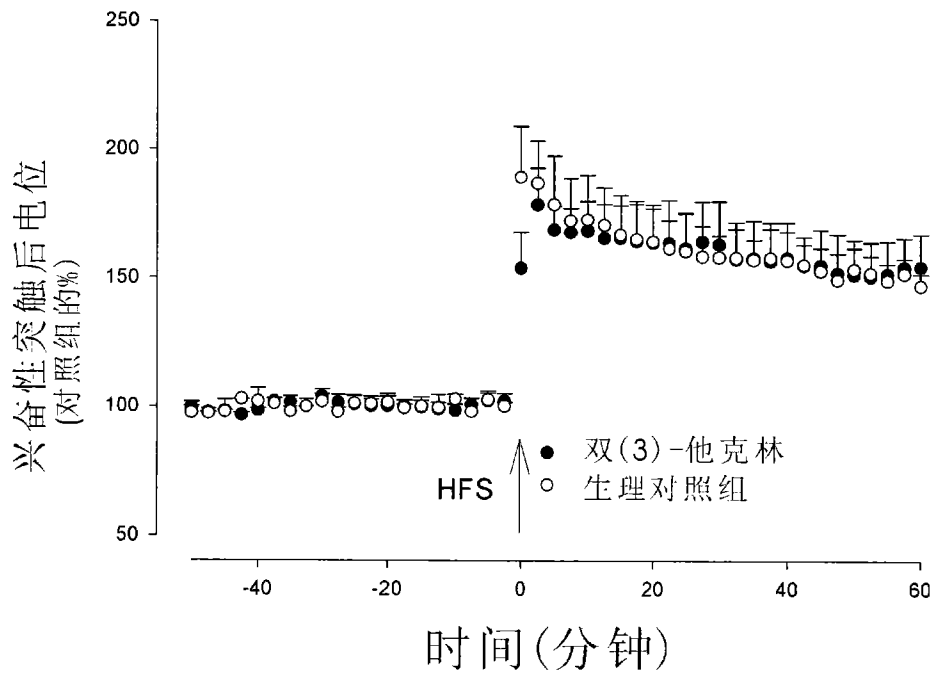


图 15