



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107573404 B

(45) 授权公告日 2022.04.12

(21) 申请号 201710865584.2

(22) 申请日 2017.09.22

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107573404 A

(43) 申请公布日 2018.01.12

(73) 专利权人 南京优科生物医药研究有限公司
地址 210046 江苏省南京市经济技术开发区恒竞路28号

专利权人 南京优科生物医药集团股份有限
公司
南京优科制药有限公司
南京力博维制药有限公司

(72) 发明人 张峰 朱素华 聂鑫 张建华
薛峪泉 刘春猛

(51) Int. Cl.

C07K 5/068 (2006.01)

C07K 1/02 (2006.01)

C07K 1/18 (2006.01)

A61K 38/05 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

审查员 黎舒婷

权利要求书1页 说明书8页

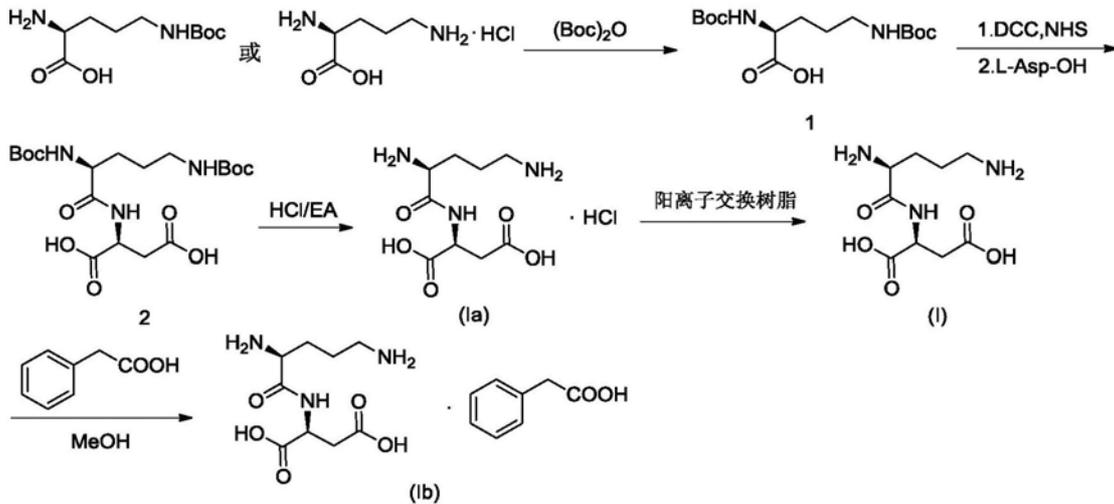
(54) 发明名称

鸟氨酸与门冬氨酸的二肽化合物的活性盐及其应用

(57) 摘要

本发明提供了鸟氨酸与门冬氨酸二肽化合物的活性盐,其制备方法、包含所述活性盐的药物组合物,以及所述二肽化合物或其活性盐在制备预防或治疗高血氨症或肝病尤其是肝性脑病的药物中的用途。试验结果明确显示,本发明所述鸟氨酸与门冬氨酸二肽化合物及其活性盐在给药后可显著降低血氨浓度,并可明显改善TAA诱发的大鼠肝损伤后继发的记忆障碍,说明所述二肽化合物及其活性盐对于高血氨症或肝病尤其是肝性脑病具有一定的治疗效果。

1. 制备式 (Ib) 化合物的方法, 其特征在于, 反应式为:



具体包括如下步骤:

(1) N- δ -Boc-L-鸟氨酸或L-鸟氨酸盐酸盐在缚酸剂存在下与Boc酸酐于室温下搅拌反应得到中间体1;

(2) 将含中间体1、N-羟基琥珀酰亚胺NHS和溶剂的混合液搅拌至温度降至0℃左右, 加入二环己基碳二亚胺DCC后搅拌反应, 反应完毕抽滤, 滤液留用; 在碱存在下, L-门冬氨酸与之前所得的滤液于室温下搅拌反应得到中间体2;

(3) 中间体2与饱和HCl气体的乙酸乙酯溶液于室温下搅拌反应得到化合物 (Ia);

(4) 式 (Ia) 化合物经阳离子交换树脂处理得到式 (I) 化合物;

(5) 式 (I) 化合物与苯乙酸在溶剂中加热反应得到式 (Ib) 化合物;

其中, 步骤 (1) 的缚酸剂选自氢氧化钠; N- δ -Boc-L-鸟氨酸、Boc酸酐与缚酸剂的用量摩尔比为1: (1.1-1.5): (2-4); L-鸟氨酸盐酸盐与Boc酸酐的用量摩尔比为1: (2.5-4): (4-6);

步骤 (2) 的碱选自碳酸氢钠; 中间体1与NHS、DCC的用量摩尔比为1: (1-1.5): (1-1.5); 中间体1与L-天冬氨酸、碱的用量摩尔比为1: (1-1.5): (2-5);

步骤 (3) 的中间体2与饱和HCl气体的乙酸乙酯溶液的用量比为1g: (10-15) mL;

步骤 (4) 中离子交换树脂处理的具体操作为: 将式 (Ia) 化合物溶于少量水中, 将溶液加至处理好的离子交换柱上, 用蒸馏水冲洗至洗脱液无硝酸银试液显色后改用氨水: 蒸馏水 = 1:10洗脱, 监测到洗脱液pH变为碱性时开始收集, 待监测无产物时停止收集, 所收集的洗脱液减压浓缩至干得粗品, 进一步重结晶得到式 (I) 化合物纯品;

步骤 (5) 中式 (I) 化合物与苯乙酸的用量摩尔比为1:1, 反应温度为45-55℃。

鸟氨酸与门冬氨酸的二肽化合物的活性盐及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于医药领域,具体而言涉及鸟氨酸与门冬氨酸二肽化合物的活性盐,其制备方法、包含所述活性盐的药物组合物,以及所述二肽化合物或其活性盐在制备预防或治疗高血氨症或肝病尤其是肝性脑病的药物中的用途。

背景技术

[0002] 肝性脑病 (hepatic encephalopathy, HE) 是一种发生于多种临床条件例如急性或慢性肝病和自发性门体静脉分流中的复杂神经性精神病症。在肝性脑病早期,会发生些微精神变化例如思维不集中、意识错乱和定向障碍。在严重的情况下,肝性脑病可导致木僵、昏迷、脑肿胀 (脑水肿) 和死亡。氨的蓄积被认为在肝性脑病和多器官衰竭 (呼吸衰竭、心血管衰竭、肾衰竭) 的进程中具有重要的作用。

[0003] 对肝性脑病患者的通常疗法包括使氨浓度减小的方法。这些方法包括限制膳食蛋白质的摄入,给予乳果糖、新霉素、L-鸟氨酸L-门冬氨酸 (L-ornithine-L-aspartate, LOLA) 或苯甲酸钠,和清洁灌肠。

[0004] LOLA属于一种L-鸟氨酸和L-门冬氨酸的氨基酸复合盐,它是一种已上市的高血氨症治疗药物,可通过刺激谷氨酰胺的合成而降低血氨,是目前被证实较为有效的降低血氨静脉用药。然而,尽管LOLA对于肝硬化的患者降氨作用有效,但是对于急性肝衰竭的病人,其降氨作用并不好,可能是急性肝衰竭患者的体内存在鸟氨酸循环障碍,其降低的血氨只是氨与谷氨酸结合生成谷氨酰胺,而谷氨酰胺在肾脏和肠道中能被谷氨酰胺酶催化重新分解生成氨,使得血氨回升。此外,文献 (A critical analysis of studies assessing L-ornithine-L-aspartate (LOLA) in hepatic encephalopathy treatment. Soárez PC, et al. Arq Gastroenterol, 46 (3), 241-247, 2009年) 表明,尽管该药可降血氨,但没有足够的证据证明其对HE有效;而美国肝病研究协会和欧洲肝脏研究协会2014实践指南 (2014 Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases and the European Association for the Study of the Liver) 也并不推荐LOLA用于HE的治疗。

[0005] 另有文献显示,L-鸟氨酸苯乙酸盐 (Ornithine phenylacetate, OP) 对治疗HE尤其是降低血氨和减弱脑水肿有相当良好的疗效。目前,OP用于治疗HE的二期临床研究已经结束,用于治疗急性肝衰竭的二期临床研究正在进行中。

[0006] 近年来对活性小分子肽的研究发现,与氨基酸运输体系相比,小分子肽具有吸收快速、生物利用效率高、耗能低、不易饱和等特点。

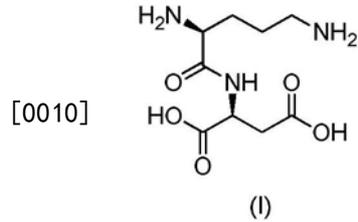
[0007] 现有技术未公开鸟氨酸与门冬氨酸二肽化合物的活性盐,也未公开其在制备预防或治疗高血氨症或肝病尤其是肝性脑病的药物中的用途。

发明内容

[0008] 本发明所要解决的技术问题是针对上述现有技术现状提供具有高血氨症或肝病

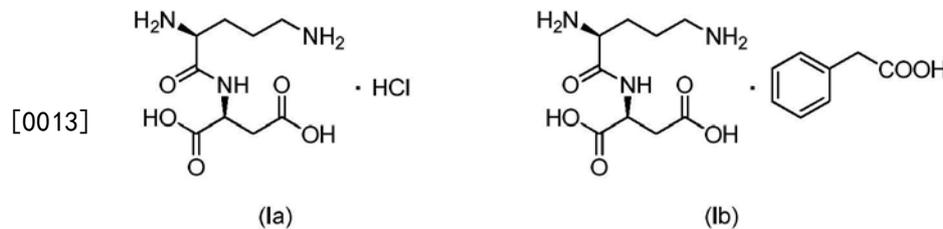
尤其是肝性脑病预防与治疗活性的鸟氨酸与门冬氨酸二肽化合物的活性盐,其制备方法,其医药用途以及包含其的药物组合物。

[0009] 本发明的第一方面在于提供鸟氨酸与门冬氨酸二肽化合物的活性盐,所述鸟氨酸为L-鸟氨酸,所述门冬氨酸为L-门冬氨酸,所述活性盐为酸加成盐,所述二肽化合物优选为如下式(I)化合物:



[0011] 所述酸加成盐的酸部分的例子有:硫酸、盐酸、硝酸、磷酸等无机酸,或苯甲酸、苯乙酸、苯丁酸、三氟乙酸、马来酸、甲磺酸、对甲苯磺酸等有机酸。

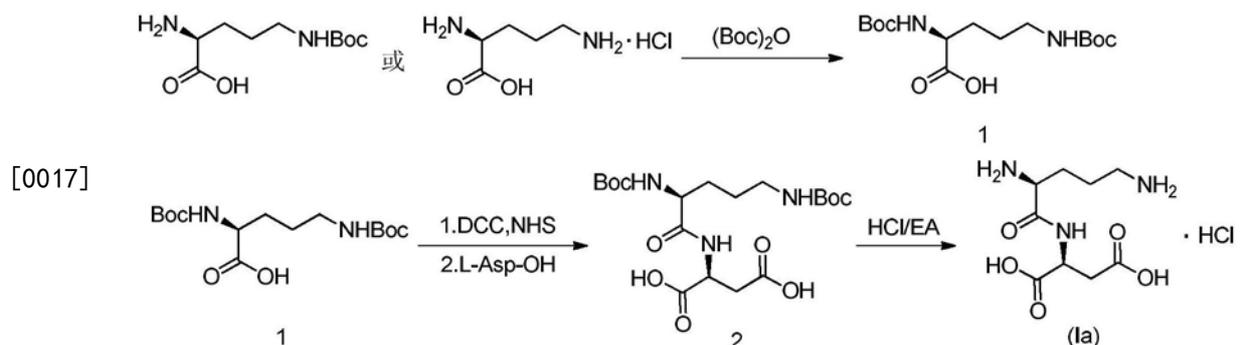
[0012] 进一步地,所述酸加成盐优选盐酸盐和苯乙酸盐,优选为如下式(Ia)和式(Ib)所示结构:



[0014] 本发明所述活性盐可给药于人,可以口服、直肠、肠胃外(静脉内、肌肉内或皮下)给药。所述活性盐可以单独给药,或者与其他药学上可接受的化合物联合给药。

[0015] 本发明的另一方面在于提供所述式(Ia)或(Ib)化合物的制备方法。

[0016] 所述式(Ia)化合物的制备方法如下:



[0018] 具体包括如下步骤:

[0019] (1) N- δ -Boc-L-鸟氨酸或L-鸟氨酸盐酸盐在缚酸剂存在下与Boc酸酐搅拌反应得到中间体1;

[0020] (2) 将含中间体1、N-羟基琥珀酰亚胺NHS和溶剂的混合液搅拌至温度降至0℃左右,加入二环己基碳二亚胺DCC后搅拌反应,反应完毕抽滤,滤液留用;在碱存在下,L-门冬氨酸与之前所得的滤液于室温下搅拌反应得到中间体2;

[0021] (3) 中间体2与饱和HCl气体的乙酸乙酯溶液于室温下搅拌反应得到化合物(Ia)。

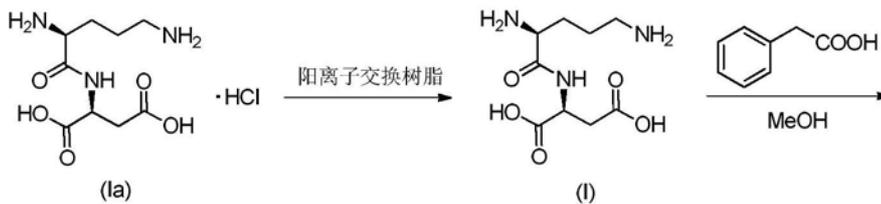
[0022] 其中,上述步骤(1)的缚酸剂可选自氢氧化钠、氢氧化钾、碳酸钾、碳酸钠、碳酸氢

钠或碳酸氢钾,优选碳酸氢钠;反应温度为0℃至室温;反应溶剂选自四氢呋喃、四氢呋喃/水、甲苯、N,N-二甲基甲酰胺;N- δ -Boc-L-鸟氨酸、Boc酸酐与缚酸剂的用量摩尔比为1:(1.1-1.5):(2-4);L-鸟氨酸盐酸盐与Boc酸酐的用量摩尔比为1:(2.5-4):(4-6)。

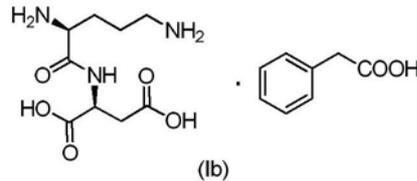
[0023] 上述步骤(2)的碱可选自碳酸氢钠、碳酸氢钾、碳酸钠、碳酸钾、氢氧化钠、氢氧化钾,优选碳酸氢钠;反应温度为0℃至室温;反应溶剂选自四氢呋喃、四氢呋喃/水、甲苯、N,N-二甲基甲酰胺;中间体1与NHS、DCC的用量摩尔比为1:(1-1.5):(1-1.5);中间体1与L-天冬氨酸、碱的用量摩尔比为1:(1-1.5):(2-5)。

[0024] 上述步骤(3)中,中间体2与饱和HCl气体的乙酸乙酯溶液的用量比为1g:(10-15)mL。

[0025] 所述式(Ib)化合物的制备方法如下:



[0026]



[0027] 具体包括如下步骤:

[0028] (1) 式(Ia)化合物经阳离子交换树脂处理得到式(I)化合物;

[0029] (2) 式(I)化合物与苯乙酸在溶剂中加热反应得到式(Ib)化合物。

[0030] 其中,上述步骤(1)中离子交换树脂处理的具体操作为:将式(Ia)化合物溶于少量水中,将溶液加至处理好的离子交换柱上,用蒸馏水冲洗至洗脱液无硝酸银试液显色后改用氨水:蒸馏水=1:10洗脱,监测到洗脱液pH变为碱性时开始收集,待监测无产物时停止收集,所收集的洗脱液减压浓缩至干得粗品,进一步重结晶得到式(I)化合物纯品。

[0031] 上述步骤(2)中,式(I)化合物与苯乙酸的用量摩尔比为1:1,反应温度为45-55℃;反应溶剂选自无水甲醇、二氯甲烷或N,N-二甲基甲酰胺。

[0032] 本发明的另一方面在于提供一种药物组合物,它含有治疗上有效量的上述二肽化合物的活性盐,以及任选包括一种或多种药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。进一步地,所述治疗上的有效量为20-40g。

[0033] 所述活性盐可以被制备为片剂、胶囊剂、微片剂、丸剂、微丸剂、颗粒剂、散剂或糖浆剂等形式的口服制剂,口服制剂可以任选被肠溶包衣或薄膜包衣包被,胶囊可以是软或硬的明胶胶囊;也可以被制备为注射用冻干粉、注射液等注射剂,或者栓剂。

[0034] 这些制剂可以通过已知方法用下述添加剂进行制造:赋形剂(如乳糖、白糖、葡萄糖、甘露醇、山梨醇等糖衍生物;玉米淀粉、马铃薯淀粉、 α -淀粉、糊精等淀粉衍生物;甲基纤维素等纤维素衍生物;阿拉伯树胶、右旋糖酐、普鲁兰等有机赋形剂;以及轻质硅酸酐、合成硅酸铝、硅酸钙、硅酸铝镁等硅酸盐衍生物;磷酸氢钙等磷酸盐;碳酸钙等碳酸盐;硫酸钙等硫酸盐等的无机赋形剂)、润滑剂(如:硬脂酸、硬脂酸钙、硬脂酸镁等硬脂酸金属盐;滑石、

蜂蜡、鲸蜡等蜡类；硼酸；己二酸；硫酸钠等硫酸盐；己二醇；反丁烯二酸；苯甲酸钠；DL-亮氨酸；十二烷基硫酸钠、十二烷基硫酸镁等十二烷基硫酸盐；硅酸酐、硅酸水合物等硅酸类；以及上述淀粉衍生物)、粘合剂(如：羟丙基纤维素、羟丙甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇以及上述赋形剂同样的化合物)、崩解剂(如：低取代羟丙基纤维素、羧甲基纤维素、羧甲基纤维素钙、内部交联羧甲基纤维素钠衍生物；羧甲基淀粉、羧甲基淀粉钠、交联聚乙烯吡咯烷酮等经化学改性的淀粉/纤维素类；上述的淀粉衍生物)、乳化剂(如：膨润土、V字胶等胶态粘土；氢氧化镁、氢氧化铝等金属氢氧化物；十二烷基硫酸钠、硬脂酸钙等阴离子表面活性剂；苯扎氯铵等阳离子表面活性剂；以及聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯、蔗糖脂肪酸酯等非离子表面活性剂)，稳定剂(如：羟苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯等对羟基苯甲酸酯类；三氯叔丁醇、苯甲醇、苯乙醇等醇类；苯扎氯铵、苯酚、甲酚等酚类；硫汞撒；脱氢乙酸；以及山梨酸)、矫味剂(如：通常使用的甜味料、酸味料、香料)、稀释剂等。

[0035] 本发明的再一方面在于提供所述鸟氨酸与门冬氨酸二肽化合物或其活性盐的医药用途，尤其是在制备预防或治疗高血氨症或肝病尤其是肝性脑病的药物中的用途。

[0036] 在本发明的某些具体实施方案中，以硫代乙酰胺(TAA)所致大鼠急性肝性脑病和慢性肝损伤模型来评价本发明所述鸟氨酸与门冬氨酸二肽化合物的活性盐的药理作用，并同时与其游离碱和LOLA进行比较。试验结果明确显示，本发明所述鸟氨酸与门冬氨酸二肽化合物及其活性盐在给药后可显著降低血氨浓度，并可明显改善TAA诱发的大鼠肝损伤后继发的记忆障碍，说明所述二肽及其活性盐对于高血氨症或肝病尤其是肝性脑病具有一定的治疗效果。

具体实施例

[0037] 下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件或按照制造厂商所建议的条件。

[0038] 除非另有说明，文中所使用的所有专业与科学用语与本领域技术人员所熟悉的意义相同。此外，任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明中。

[0039] 实施例1中间体1的制备

[0040] 向100ml反应瓶中加入氢氧化钠0.258g(6.45mmol, 3eq)、10ml纯化水和N- δ -Boc-L-鸟氨酸0.5g(2.15mmol, 1eq)，0~10℃下加入Boc酸酐0.563g(2.58mmol, 1.2eq)/10ml THF溶液，滴加完毕后，室温下搅拌。TLC监测反应至反应完全后，降温至10℃以下，滴加稀盐酸至pH 4~5，水相用乙酸乙酯(15ml×2)萃取，合并乙酸乙酯层，用纯化水洗涤一次，有机相用无水硫酸钠干燥，过滤后，减压浓缩至干，得到0.81g泡状固体粗品即中间体1，收率基本定量。

[0041] 实施例2中间体1的制备

[0042] 于500ml三颈瓶中加入氢氧化钠11.8g(296.5mmol, 5eq)和200ml纯化水，降温到0℃，加入L-鸟氨酸盐酸盐10g(59.3mmol, 1eq)，搅拌溶清，0℃左右滴加Boc-酸酐(38.8g, 177.9mmol, 3eq)的四氢呋喃(200ml)溶液，滴加完毕后，室温下反应。TLC监测至反应完毕后，45℃减压浓缩四氢呋喃，水相用1N盐酸调节至pH 4~5左右，乙酸乙酯萃取(100ml×2)，

合并乙酸乙酯层,纯化水洗涤两次,有机相用无水硫酸钠干燥,过滤后45℃下减压浓缩至干,得到20g白色泡状固体即中间体1,收率基本定量。

[0043] 实施例3中间体2的制备

[0044] 于500ml圆底烧瓶中,加入中间体1化合物18.0g (54.2mmol, 1eq),加入180ml四氢呋喃搅拌溶清,再加入N-羟基琥珀酰亚胺6.86g (59.6mmol, 1.1eq),搅拌至内温降至0℃左右,缓慢滴加DCC (12.3g, 59.6mmol, 1.1eq) 的四氢呋喃 (100ml) 溶液,滴加完毕后室温下搅拌,室温下慢慢有固体析出,TLC监测至反应完全后,抽滤,滤液留用。

[0045] 另取1000ml三颈瓶,加入L-门冬氨酸7.9g (59.35mmol, 1.1eq)、200ml纯化水、碳酸氢钠18.2g (21.66mmol, 4eq) 搅拌至固体溶清后,室温下滴加上一步所得留用的滤液(即制备的活化酯溶液),滴加完毕后,室温搅拌过夜,TLC监测至反应完全后,40℃下减压浓缩四氢呋喃,加入20ml纯化水,乙酸乙酯洗涤 (15ml×2),水相用2N盐酸调节至pH7,60℃下减压浓缩至剩余30ml,冷却至10℃以下,用1N盐酸调节至pH 4左右,乙酸乙酯萃取 (100ml×2),合并有机相,无水硫酸钠干燥,过滤,滤液减压浓缩至干,得泡状固体粗品24g,快速柱层析,得白色固体17.5g,收率72.2%。

[0046] 实施例4式 (Ia) 化合物的制备

[0047] 将中间体2化合物6.0g (13.4mmol) 加入100ml圆底烧瓶中,室温下慢慢加入60ml HCl/乙酸乙酯混合溶液(自制)至固体溶清,室温下搅拌,慢慢有固体析出,TLC监测至反应完毕后,静置倾倒去乙酸乙酯,加入20ml乙酸乙酯搅拌,静置后倾倒去乙酸乙酯,再重复一次,再加入20ml乙酸乙酯,50℃下减压浓缩至干得白色泡状固体,进一步于60℃下真空干燥,即得固体3.1g,为盐酸盐,收率81.5%,HPLC含量98.5%。

[0048] 其中HCl/乙酸乙酯溶液的制备过程为:向1L三口烧瓶中加入氯化钠50g、浓盐酸500ml,滴加浓硫酸,将产生的HCl气体干燥后通入乙酸乙酯,至饱和,即得。

[0049] ESI-MS m/z : 248 $[M+H]^+$.

[0050] $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 12.59 (s, 2H), 9.01 (dd, $J=41.9, 7.8\text{Hz}$, 1H), 8.37 (s, 3H), 8.11 (s, 3H), 4.57 (dd, $J=13.2, 6.2\text{Hz}$, 1H), 3.89 (s, 1H), 2.81 (s, 2H), 2.71 (dd, $J=10.3, 6.6\text{Hz}$, 2H), 1.90~1.70 (m, 4H).

[0051] 实施例5式 (I) 化合物的制备

[0052] 按照732阳离子树脂:式 (Ia) 化合物=25~30:1(重量比)的用量准备阳离子交换树脂,并对阳离子交换树脂柱进行如下预处理:将分析纯732阳离子交换树脂用去离子水浸泡4-8h使之溶胀,用纯化水漂洗几次至出水清澈无浑浊,然后用相当于树脂体积4倍的4% HCl溶液浸泡2-4h后用纯化水冲洗至中性;再用相当于树脂体积4倍的4% NaOH溶液浸泡2-4h后用纯化水冲洗至中性,重复酸浸泡和碱浸泡步骤一次;用4% HCl溶液处理得到氢型732阳离子交换树脂,而后用纯化水冲洗至pH7。

[0053] 用尽可能少量的水溶解待脱盐的式 (Ia) 化合物 (5.0g, 17.6mmol)。将溶液缓慢加至已经处理好的离子交换柱上。用蒸馏水冲洗至洗脱液无硝酸银试液显色后改用氨水:蒸馏水=1:10洗脱。监测到洗脱液的pH由7变为碱性范围时开始收集洗脱液。待监测无产物时停止收集。所收集的洗脱液于50℃下减压浓缩至干,得到残留的油状液体。向其中加入无水乙醇100ml,50℃水浴搅拌,有白色粘稠固体在瓶底析出。降温至0℃后,倒去溶剂,得式 (I) 化合物粗品(类白色粘状固体,局部微黄)。粗品分散于60ml的甲醇/THF (1:1) 混合溶液中,

搅拌下加热至50℃达半小时后,缓慢降温至室温,再降温至0℃,搅拌半小时,抽滤。滤饼用少量THF洗涤,然后滤饼于60℃下真空干燥,即得精制后的式(I)化合物,得白色粉末3.7g,收率85.0%。

[0054] 实施例6式(Ib)化合物的制备

[0055] 称取式(I)化合物3.5g(14.2mmol),溶于100ml无水甲醇中,于50℃下加热搅拌。称取苯乙酸2.0g(14.7mmol,1.04eq),用尽可能少量的无水甲醇溶解后,逐滴滴加至反应瓶。滴加时,析出白色絮状物,滴毕搅拌半小时,然后停止搅拌,静置冷却。抽滤,滤饼用少量无水甲醇洗涤,然后滤饼于60℃下真空干燥,得白色粉末4.6g,收率84.8%,HPLC含量98.0%。

[0056] ESI-MS m/z :248[M+H]⁺。

[0057] ¹H-NMR(500MHz,CDCl₃) δ ppm:9.24(s,3H),7.41-7.20(m,6H),4.80(t,J=7.7Hz,1H),4.01(s,2H),3.48(t,J=7.6Hz,1H),3.21(s,1H),3.17(s,1H),2.92(dd,J=12.5,7.7Hz,1H),2.79(t,2H),2.32(dd,J=12.5,7.7Hz,1H),2.07(m,2H),1.81(m,2H)。

[0058] 同时经HPLC分析,析出物中含有苯乙酸峰,而经对照检测式(I)化合物在HPLC中无稳定单峰。此外,式(I)化合物经溶解试验确定基本不溶于水,而上述所得白色粉末极易溶于水,因此确定其为式(Ib)化合物。

[0059] 实施例7对硫代乙酰胺(TAA)诱导的急性肝性脑病大鼠模型的活性研究

[0060] 1.溶液配制:

[0061] (1)给药剂量300mg/kg的TAA溶液的配制:按每只大鼠100g给予0.5ml的体积,称取6.0g TAA粉末,以生理盐水为溶媒溶解,并定容至100ml,即得(给药时按每100g体重给予0.5ml量取);

[0062] (2)给药剂量2g/kg的LOLA溶液的配制:按每只大鼠100g给予0.5ml的体积,称取20g LOLA粉末,以生理盐水为溶媒并定容至50ml,即得(给药时按每100g体重给予0.5ml量取);

[0063] (3)给药剂量2g/kg的式(I)、式(Ia)或式(Ib)化合物溶液的配制:与上述给药剂量2g/kg的LOLA溶液同法配制。

[0064] 2.分组和给药:

[0065] 将36只健康雄性SD大鼠(购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号:11400700171427,体重范围230-300g)随机分为6组,每组6只。分别为空白对照组、模型组、LOLA给药组、式(I)给药组、式(Ia)给药组和式(Ib)给药组。空白对照组正常饮水和摄食,并按5ml/kg的剂量腹腔注射生理盐水,每天早上9点开始给药,连续2天。模型组以及相应的各给药组给予TAA(剂量300mg/kg),每天早上9点开始给药,连续2天;其中LOLA给药组、式(I)给药组、式(Ia)给药组和式(Ib)给药组动物在第二天造模给予TAA 1h后即开始按2g/kg的剂量给予相应的药物,并在初次给予相应药物后的3h、6h、9h、12h、24h、27h、30h的时间点再次以相同剂量给予同种药物。给药方式均为腹腔注射给药。每天记录一次体重和饮食饮水量。饲养过程中,每天早晚检查动物的摄食和饮水情况。

[0066] 3.采血及血浆的收集:

[0067] SD雄性大鼠在给予TAA前,所有组别大鼠经乙醚麻醉,采用毛细管眼球取血(0.5ml),放入已加入肝素钠(30 μ l)的1.5ml EP管中。在第二次给予TAA 30min后,所有组别大鼠采用眼球取血收集血浆;在LOLA给药组、式(I)给药组、式(Ia)给药组和式(Ib)给药组

初次给药后6h、12h、24h、30h给予相应药物后,所有组别大鼠采用眼球取血收集血浆。在末次给药后24h,处死动物。

[0068] 4. 血氨的测定:

[0069] 取出-20℃保存的血浆样品,取50μl血浆样品置于1.5ml EP管中,依次加入250μl的试剂一和试剂二(来自A086血氨测定试剂盒,南京建成生物),充分混匀,于3500转/min下离心10min,收集上清液。取上清液250μl置于1.5ml EP管中,随后向EP管中依次加入250μl的试剂三和试剂四(来自A086血氨测定试剂盒,南京建成生物),充分混匀后37℃水浴20min,可观察到显现蓝色液体,取出250μl到96孔板中,用酶标仪在630nm处测量吸光值。

[0070] 5. 统计分析:

[0071] 数据结果用平均值±标准差表示,选用One-Way ANOVA结合Post-Hoc (Tukey法)方法进行组间差异分析。以P<0.05表示统计学差异显著性。

[0072] 6. 实验结果:

[0073] 6.1 体重数据

[0074] 体重测量结果表明,正常对照组大鼠体重逐渐升高;模型组大鼠体重基本呈下降趋势,并在第4天稍有回升;而LOLA、式(I)、式(Ia)和式(Ib)化合物组则一直呈下降趋势,表明TAA确实能使大鼠体内肝脏等器官受损,具有明显的毒性作用。结果如下表1所示。

[0075] 表1供试品对动物体重的影响(平均值±标准差)(单位:mg)

组别	初体重	第1天	第2天	第3天	第4天
空白对照组	258.0±4.0	270.7±3.9	281.0±3.5	284.8±3.1	294.5±3.6
模型组	260.7±7.5	247.7±9.2	249.0±12.3	238.5±13.7	240.7±18.6
[0076] LOLA	266.2±11.0	251.3±7.6	248.2±8.0	243.8±11.4	241.8±10.9
式(I)	258.2±7.3	247.8±7.4	244.7±8.5	239.2±12.2	238.9±9.5
式(Ia)	259.4±6.8	249.0±7.1	245.8±7.9	241.0±9.3	240.2±8.4
式(Ib)	263.5±8.2	253.2±7.8	249.9±9.1	244.9±8.1	244.1±8.9

[0077] 6.2 血氨浓度测定数值

[0078] 血氨浓度测定结果表明,与正常对照组相比,在连续2天给予TAA后,模型组大鼠在6h给药后的血氨浓度显著升高。与模型组相比,LOLA组在6h给药后的血氨浓度没有显著降低,而12h给药后的血氨浓度则显著降低,提示其发挥降血氨效应可能是一种缓慢而非瞬时的过程。此外,相较于模型组,LOLA、式(I)、式(Ia)和式(Ib)化合物组均表现出一定程度的持续降血氨作用,并且式(Ib)化合物起效较LOLA快,并且降血氨幅度更为明显。结果如下表2所示。

[0079] 表2供试品对血氨浓度的影响

组别	原始血氨	造模后	6h 给药后	12h 给药后	24h 给药后	30h 给药后
C	83.89±27.03	82.50±14.12	78.15±11.19	73.63±12.72	75.37±13.52	79.17±12.97
M	87.26±11.90	116.07±25.46#	141.93±13.70##	136.07±13.82##	134.39±17.75##	130.23±19.90##
[0080] LOLA	86.87±14.60	114.53±16.56	130.97±15.85	117.25±16.81*	109.63±21.03**	102.75±18.89**
式(I)	83.38±9.89	111.63±9.55	126.42±13.16*	111.27±10.93**	107.35±14.88**	100.57±12.06**
式(Ia)	89.53±11.76	115.06±13.18	122.87±12.02*	110.49±15.41**	104.81±10.39**	97.96±15.30**
式(Ib)	88.63±15.21	116.72±10.55	120.35±10.67*	107.91±9.96**	99.27±15.43**	92.63±13.87**

[0081] 注:C-正常对照组,M-模型组;

[0082] 原始血氨指初次给予TAA前采血得到的血氨测定值;除正常对照组外,其他各组的造模后血氨指第二次给予TAA 30min后采血得到的血氨测定值;

[0083] 与空白对照组相比较,#P<0.05,##P<0.01;与模型组相比较,*P<0.05,**P<0.01。

[0084] 实施例8对TAA所致大鼠慢性肝损伤后学习能力的影响

[0085] 1.方法:将健康雄性SD大鼠随机分为空白对照组、模型组、LOLA给药组、式(I)给药组、式(Ia)给药组和式(Ib)给药组,每组6只。除空白对照组外其他各组动物自由饮用含有0.1%TAA的水,连续50天,在饮用TAA水30天时开始按2g/kg的剂量灌胃给药,每日1次,连续15天。在给药第12天令每只大鼠在水迷宫内学习寻找生存岛的位置,连续3天。末次给药1h后进行测试,观察大鼠在水迷宫中找到生存岛的时间以及在2min内上岛次数。

[0086] 2.结果:慢性TAA中毒可导致大鼠肝损伤后继发记忆障碍及学习能力下降。通过对大鼠为期2周口服给药LOLA、式(I)化合物、式(Ia)化合物和式(Ib)化合物,上述现象有所改善。并且,式(I)、式(Ia)、式(Ib)化合物均可明显改善TAA诱发的大鼠肝损伤后继发的记忆障碍,且式(Ia)、式(Ib)化合物的改善程度相较于模型组而言具有统计学显著性。

[0087] 表3对TAA致肝损伤大鼠学习能力的影响(平均值±标准差)

组别	N	剂量 (g/kg)	时间 (s)	次数
空白对照组	6	-	57.66±24.84	3.45±2.32
模型组	6	0.1%TAA	72.52±31.58	1.52±0.94##
[0088] LOLA 给药组	6	2	45.98±33.58	4.52±2.56**
式(I)给药组	6	2	40.32±28.98	4.76±2.49**
式(Ia)给药组	6	2	32.83±20.76**	5.08±1.91**
式(Ib)给药组	6	2	28.85±19.55**	5.32±1.73**

[0089] 注:与空白对照组相比较,#P<0.05,##P<0.01;

[0090] 与模型组相比较,*P<0.05,**P<0.01。