



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106580956 B

(45)授权公告日 2019.07.19

(21)申请号 201610984872.5

(22)申请日 2016.11.09

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 106580956 A

(43)申请公布日 2017.04.26

(66)本国优先权数据  
201510757364.9 2015.11.09 CN

(73)专利权人 李佩盈  
地址 201204 上海市浦东新区花木路718弄  
38号501室

(72)发明人 李佩盈 俞卫峰 杨立群 高艳琴  
蔡梦飞 王龙 周雨曦 陈江龙  
陈雪梅 焦英甫 甘愉

(74)专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266

代理人 刘妍璐 陈详

(51)Int.Cl.  
A61K 31/365(2006.01)  
A61P 9/10(2006.01)  
A61P 25/00(2006.01)

(56)对比文件  
CN 101795701 A,2010.08.04,  
US 2011/0136735 A1,2011.06.09,

审查员 高昶

权利要求书1页 说明书9页 附图4页

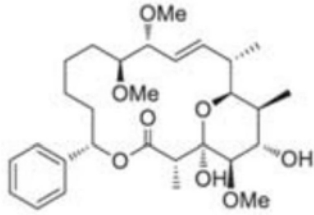
(54)发明名称

索拉芬A在缺血性脑损伤中的应用

(57)摘要

本发明提供了索拉芬A在缺血性脑损伤中的应用。具体地,本发明提供了索拉芬A在用于制备(i)预防和/或治疗缺血性脑损伤的药物组合物;和/或(ii)保护缺血性神经元的药物组合物中的用途。实验证明,索拉芬A能够有效控制急性脑卒中的进展,减少梗死面积、减缓神经元及血管水肿,并在长期的神经功能保护中也起到了积极的作用。

1. 索拉芬-A (Soraphen-A) 或其药学上可接受的盐的用途, 其特征在于, 用于制备 (i) 预防和/或治疗缺血性脑损伤的药物组合物; 和/或 (ii) 保护缺血性神经元的药物组合物, 其中, 所述索拉芬-A 具有式 I 所示结构:



式 I。

2. 如权利要求1所述的用途, 其特征在于, 所述的缺血性脑损伤包括急性缺血性脑损伤或慢性缺血性脑损伤。

3. 如权利要求2所述的用途, 其特征在于, 所述急性缺血性脑损伤包括发病时间为2小时-3天之间的缺血性脑损伤。

4. 如权利要求2所述的用途, 其特征在于, 所述慢性缺血性脑损伤包括发病时间3天之后的缺血性脑损伤。

5. 如权利要求1所述的用途, 其特征在于, 所述的缺血性脑损伤包括脑卒中、缺血-再灌注损伤、短暂性脑缺血发作、新生儿缺血缺氧性脑病。

6. 如权利要求1所述的用途, 其特征在于, 所述索拉芬-A的施用剂量为1-100mg/kg/天。

7. 如权利要求1所述的用途, 其特征在于, 所述的药物组合物含有索拉芬-A或其药学上可接受的盐作为活性成分, 和药学上可接受的载体。

8. 如权利要求7所述的用途, 其特征在于, 所述的药物组合物还含有溶栓剂和/或神经保护剂。

9. 如权利要求8所述的用途, 其特征在于, 所述的溶栓剂是rtPA。

10. 一种体外非治疗性保护缺血性神经元的方法, 其特征在于, 包括步骤: 在含有索拉芬-A或其药学上可接受的盐的条件下培养缺血性神经元, 和/或向经缺血性处理的神经元培养物中加入索拉芬-A, 从而保护缺血性神经元。

## 索拉芬A在缺血性脑损伤中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及医药生物领域。具体地,本发明涉及抗肿瘤药索拉芬A对缺血性脑损伤中的新用途。

### 背景技术

[0002] 最近的全国死因调查表明,缺血性脑损伤(cerebral ischemic injury)或缺血性脑卒中(ischemic stroke)已跃居为我国人口致残及死亡原因的第一位,且发病有逐年增多的趋势。急性缺血性脑卒中是最常见的脑卒中类型,占全部脑卒中的60%~80%。但是目前对急性脑卒中具有确切治疗效果的药物仅只有重组组织型纤溶酶原激活剂(recombinant tissue-plasminogen activator,rt-PA)一种。Rt-PA也是目前美国食品与药品管理局(US FDA)批准治疗急性脑卒中的唯一药品。但是rt-PA的治疗时间窗十分有限。为了避免发生rt-PA治疗相关的脑出血并发症,目前推荐其在急性脑卒中发病后4.5小时内应用。因而大约只有3%以下的急性脑卒中患者才有机会应用rt-PA进行治疗。

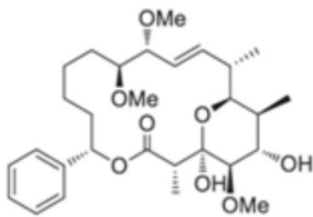
[0003] 因此,研究开发新的安全有效的脑卒中治疗策略显得越发迫切。

### 发明内容

[0004] 本发明提供了一种抗肿瘤药索拉芬-A的新用途,即其用于减轻缺血性脑卒中损伤的治疗策略。

[0005] 本发明第一方面,提供了一种索拉芬-A(Soraphen-A)或其药学上可接受的盐的用途,用于制备(i)预防和/或治疗缺血性脑损伤的药物组合物;和/或(ii)保护缺血性神经元的药物组合物,其中,所述索拉芬-A具有式I所示结构:

[0006]



[0007]

式 I。

[0008] 在另一优选例中,所述的缺血性脑损伤包括急性缺血性脑损伤或慢性缺血性脑损伤。

[0009] 在另一优选例中,所述急性缺血性脑损伤包括发病时间为2小时-3天之间的缺血性脑损伤。

[0010] 在另一优选例中,所述慢性缺血性脑损伤包括发病时间3天之后的缺血性脑损伤。

[0011] 在另一优选例中,所述的缺血性脑损伤包括脑卒中、缺血-再灌注损伤、短暂性脑缺血发作、新生儿缺血缺氧性脑病。

[0012] 在另一优选例中,所述预防和/或治疗缺血性脑损伤包括以下一种或多种对缺血性脑损伤表现的改善:

- [0013] (a) 减少脑梗死范围,如减少梗死体积和/或面积;
- [0014] (b) 改善肢体对称性;
- [0015] (c) 改善肢体使用偏好性;
- [0016] (d) 改善神经感觉及运动功能损伤;
- [0017] (e) 增加梗死部位脑血流;
- [0018] (f) 改善脑损伤后记忆;
- [0019] (g) 减少脑缺血损伤后神经元的丢失。
- [0020] 在另一优选例中,所述索拉芬-A的施用剂量为1-100mg/kg/天。
- [0021] 在另一优选例中,所述索拉芬-A的施用剂量较佳地为,每天1-50mg/kg,更佳地为1-5mg/kg。
- [0022] 在另一优选例中,所述的药物组合物含有索拉芬-A或其药学上可接受的盐作为活性成分,和药学上可接受的载体。
- [0023] 在另一优选例中,所述的药物组合物还含有溶栓剂、rtPA和/或神经保护剂。
- [0024] 在另一优选例中,所述的药物组合物中还含有脑卒中血管内支架治疗药盒。
- [0025] 本发明第二方面,提供了一种体外非治疗性保护缺血性神经元的方法,包括步骤:在含有索拉芬-A或其药学上可接受的盐的条件下培养缺血性神经元,和/或向经缺血性处理的神经元培养物中加入索拉芬-A,从而保护缺血性神经元。
- [0026] 在另一优选例中,所述的保护包括预防性保护和/或治疗性保护。
- [0027] 本发明第三方面,提供了一种(i) 预防和/或治疗缺血性脑损伤;和/或保护缺血性神经元的方法,包括步骤,向所需要的对象施用安全有效量的索拉芬-A或其药学上可接受的盐,或含有索拉芬-A或其药学上可接受的盐作为活性成分的药物组合物。
- [0028] 在另一优选例中,所述所需要的对象包括患有缺血性脑损伤的哺乳动物,例如小鼠、大鼠或人。
- [0029] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

## 附图说明

- [0030] 图1显示了索拉芬-A在细胞代谢过程中的作用位点。
- [0031] 图2显示了应用激光散斑多普勒技术监测MCAO手术过程中的脑血流变化情况。其中,图2A-B显示Sham组小鼠行假手术后,双侧大脑半球脑血流无显著变化;而在DMSO组以及SorA组小鼠中,大脑中动脉的阻塞均造成了一侧大脑半球显著的脑血流减少,而脑血流的减少程度在这两组小鼠中并无显著性差异;图2C-D显示经SorA治疗小鼠的脑梗死体积明显小于DMSO对照小鼠。
- [0032] 图3显示了Sor-A治疗的脑缺血损伤小鼠向左转向的比例低于DMSO组的比例,代表治疗小鼠的肢体对称性优于对照小鼠。
- [0033] 图4A-B显示了与DMSO小鼠相比,经Sor-A治疗的脑缺血小鼠对侧前肢及后肢错步数占总错步数的百分比显著降低,并与sham组小鼠接近。
- [0034] 图5显示了脑缺血小鼠在损伤后,非损伤侧(右侧)肢体偏好使用比例显著升高,

Sor-A治疗小鼠肢体的偏好使用比例显著低于DMSO对照组。

[0035] 图6A为肢体本体感觉功能评分,图6B为攀爬试验评分,图6C为前肢行走实验评分,图6D为侧转实验评分,图6E为小鼠的综合评分,图6F为粘纸实验评分;上述结果表明: Sor-A治疗可显著提高小鼠的慢性缺血性脑损伤后神经功能综合评分。

[0036] 图7A-B显示了Morris水迷宫试验,结果表明, Sor-A显著提高了小鼠在目标象限中的停留时间,因此能够显著改善学习与记忆功能;图7C显示三组小鼠的游泳速度没有显著性差异。

[0037] 图8A-B显示了预先施用了索拉芬-A的小鼠的缺血区域内存活的神经元显著多于DMSO对照组小鼠。

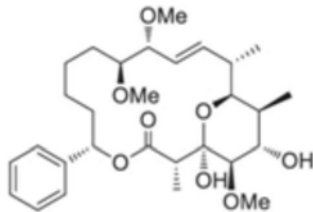
### 具体实施方式

[0038] 本发明人经过广泛而深入的研究,首次意外地发现,抗肿瘤药物索拉芬-A对于缺血性脑损伤后的大脑具有良好的神经保护作用。实验证明,对缺血性脑损伤急性期、慢性期以及缺血再灌注损伤均有较好的神经保护作用,提前使用索拉芬-A或在缺血性脑损伤发生后使用索拉芬-A,可以有效减少缺血灶面积、减轻缺血后血管性水肿,并对长期神经功能的修复具有非常有益的积极效果。在此基础上,完成了本发明。

[0039] 索拉芬A或其药学上可接受的盐

[0040] 如本文所用,术语“本发明活性成分”、“Sora-A”、“索拉芬A”可互换使用,指的是具有式I所示结构的化合物或其药学上可接受的盐。

[0041]



式 I

[0042] 索拉芬-A (Sorafenib-A) 是近年来肿瘤学及免疫学研究中发现的一种可以抑制高代谢细胞生长增殖的化合物,可特异性抑制细胞代谢过程中乙酰辅酶A羧化酶-1 (Acetyl coenzyme (CoA) carboxylase-1, ACC-1) 的活性,

[0043] 乙酰辅酶A羧化酶 (Acetyl coenzyme (CoA) carboxylase) 可以催化乙酰辅酶A (acetyl CoA) 转化为丙二酰辅酶A (malonyl CoA)。丙二酰辅酶A可以调控长链脂肪酸的生物合成以及降解。体内有两种亚型的ACC,即ACC1和ACC2。ACC1主要位于细胞浆内,ACC2主要位于线粒体。在细胞浆内由ACC1催化合成的丙二酰辅酶A是脂肪酸合成酶催化的长链脂肪酸合成的重要碳元素供体,索拉芬-A在细胞代谢过程中的作用位点见图1。而在线粒体表面的ACC2催化合成的丙二酰辅酶A则可以抑制肉碱脂酰转移酶I,从而调控长链脂肪酸进入线粒体进行beta氧化。

[0044] 近年来,有越来越多的研究都将ACC1作为一个有望治疗代谢性疾病以及肿瘤的靶分子。通过肝脏特异性基因敲除ACC1可以有效减少脂肪酸的重新合成以及甘油三酯的累积,而脂肪特异性敲除ACC1则减少了骨骼肌生长的迟滞。而在转移性肿瘤中,ACC1或脂肪酸合成酶的表达都有所增高。

[0045] 本发明提供了索拉芬-A的一种新用途,即用于缺血性脑损伤之后的脑保护作用。

[0046] 本发明索拉芬-A还可以以由药学上或生理学可接受的酸或碱衍生的盐形式使用。这些盐包括(但不限于)与如下酸形成的盐:氢氯酸、氢溴酸、硫酸、柠檬酸、酒石酸、磷酸、乳酸、丙酮酸、乙酸、琥珀酸、草酸、富马酸、马来酸、草酰乙酸、甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、或羟乙磺酸。其他盐包括:与碱金属或碱土金属(如钠、钾、钙或镁)形成的盐,以及以酯、氨基甲酸酯或其他常规的“前体药物”的形式。

[0047] 缺血性脑损伤

[0048] 如本文所用,术语“缺血性脑损伤”、“缺血性脑血管病”可互换使用,指的是局部脑组织,包括神经细胞、胶质细胞以及联系纤维由于供血障碍发生的变性、坏死或一过性功能丧失。是一种临床常见的高致死性、致残性脑血管疾病。

[0049] 通常缺血性脑损伤可以由于局部组织缺血、缺血后再灌注或出血后造成局部缺氧等多种原因造成。

[0050] 本发明索拉芬-A所适用的缺血性脑损伤没有特别限制,可以包括任何局部脑缺血并伴有或不伴有神经功能障碍的脑损伤性疾病。常见的缺血性脑损伤包括:脑卒中、缺血-再灌注损伤、短暂性脑缺血发作、新生儿缺血缺氧性脑病。

[0051] 在缺血性脑损伤中,最常见的病理表现即神经元的水肿、血脑屏障的破坏,外周免疫细胞的脑组织浸润,神经血管单元的重建。因此,本发明还提供了一种抑制外周免疫细胞中枢浸润的方法。实验证明,在施用了本发明索拉芬-A之后,脑缺血急性期的中枢的外周免疫细胞浸润明显减少,血脑屏障破坏减轻。从慢性期的修复来看,索拉芬-A可通过抑制神经炎症反应,起到促进神经血管单元重建的作用。缺血性脑卒中后可造成外周免疫系统功能的紊乱,在缺血早期表现为免疫细胞过度激活,浸润至脑组织。在损伤后期出现免疫系统功能下降,造成感染相关并发症。索拉芬-A可通过调控免疫细胞的激活,减轻缺血后期的免疫功能抑制,从而减少脑卒中后的感染相关并发症,改善脑卒中患者的预后。

[0052] 药物组合物和施用方法

[0053] 本发明还提供了一种用于治疗缺血性脑损伤的药物组合物,所述的药物组合物中含有安全有效量的索拉芬-A或其药学上可接受的盐,和药学上可接受的载体。此外,本发明药物组合物还可含有其他治疗缺血性脑损伤的药物,例如溶栓剂、神经保护剂等。

[0054] 通常,可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中,其中pH通常约为5~8,较佳地pH约为6~8,尽管pH值可随被配制物质的性质以及待治疗的病症而有所变化。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药,其中包括(但不限于):口服、肌内、静脉内、皮下、皮内、或局部给药。

[0055] 当本发明索拉芬-A用于上述用途时,可与一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂混合,如溶剂、稀释剂等,优选可以无菌可注射溶液或悬浮液形式(在等渗介质中含有约0.05-5%悬浮剂)进行非肠胃给药。例如,这些药物制剂可含有与载体混合的约0.01-99%,更佳地约为0.1%-90%(重量)的活性成分。

[0056] 所用的活性成分的有效剂量可随所用的化合物、给药的模式和待治疗的疾病的严重程度而变化,这通常可以由本领域技术人员根据实际情况以及有限的实验进行调整。然而,通常当本发明的化合物每天以约0.5-1000mg/kg动物体重的剂量给予时,能得到令人满意的效果,较佳地每天以1-4次的剂量给予。对大部分大型哺乳动物而言,每天的总剂量约

为1-100mg/kg, 较佳地约为2-100mg/kg。可调节此剂量方案以提供最佳治疗应答。例如, 由治疗状况的迫切要求, 可每天将剂量按比例地增加或减少。

[0057] 一种优选的活性成分的浓度或剂量约为每天1-100mg/kg, 较佳地为1-50mg/kg, 更佳地为1-5mg/kg。优选地, 所述剂量可以根据本领域已知的小鼠和人体重及体表面积之间的公式进行换算。

[0058] 本发明化合物或药物组合物优选通过静脉内等途径给药。液态载体包括: 无菌水、聚乙二醇、丙二醇、乙醇、二甲基亚砷、非离子型表面活性剂等, 只要适合活性成分的特性和所需的特定给药方式。在制备药物组合物中通常使用的佐剂也可有利地被包括, 例如防腐剂和抗氧化剂如维生素E、维生素C、枸橼酸、BHT和BHA。

[0059] 适应于注射的药物形式包括: 无菌水溶液或分散液和无菌粉(用于临时制备无菌注射溶液或分散液)。在所有情况中, 这些形式必须是无菌的且必须是流体以易于注射器排出流体。在制造和储存条件下必须是稳定的, 且必须能防止微生物(如细菌和真菌)的污染影响。载体可以是溶剂或分散介质, 其中含有如水、醇(如甘油、丙二醇和液态聚乙二醇)、它们的适当混合物和植物油。

[0060] 临床应用

[0061] 本发明提供了索拉芬-A临床应用的新适应症。动物实验表明, 在预先施用索拉芬-A后, 小鼠对脑缺血的耐受程度明显增强, 能够明显减轻诱发的脑卒中严重程度, 而在已经发生脑卒中的动物中, 施用索拉芬A能够有效控制急性脑卒中的进展, 减少梗死面积、减缓神经元及血管水肿, 并在长期的神经功能保护中也起到了积极的作用。

[0062] 本发明有益效果

[0063] 本发明提供了抗肿瘤药索拉芬-A在缺血性脑损伤中的新用途, 可以作为预防性用药, 更可在急性发作期和慢性恢复期中应用, 延长了脑卒中等缺血性脑损伤的治疗时间窗, 其可明显减轻脑卒中的进展, 改善脑神经元的功能, 对脑卒中患者预后提供了更有利的支持。

[0064] 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, 例如Sambrook等人, 分子克隆: 实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件, 或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明, 否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

[0065] 实施例1索拉芬-A对大脑中动脉阻塞引起的急性缺血性脑损伤具有神经保护的作用

[0066] 实验方法:

[0067] 1) 选择8-12周雄性C57/BL6野生型小鼠(购自史莱克实验动物公司), 随机分成5组, Sham组(n=8), DMSO组(n=8), SorA-1组(n=8), SorA-5组(n=8), SorA-25组(n=8)。

[0068] 2) 分别予各组小鼠建立动物模型, Sham组小鼠行假手术, 分离血管, 不置入线栓。DMSO以及三个剂量组的SorA组小鼠行大脑中动脉阻塞手术(MCAO)。MCAO手术过程如下: 将小鼠用1.5%异氟醚麻醉后, 仰卧固定。暴露颈部, 正中切口约3cm, 钝性分离、暴露气管, 钝性分离两侧甲状腺, 暴露右侧胸锁乳突肌和胸骨舌骨肌间的三角区。分离颈内动脉至鼓泡, 仔细分离并结扎翼腭动脉。电凝右侧颈外动脉远心端后, 用显微动脉夹暂时夹闭颈总动

脉,将颈外动脉残端牵向外下方,使之与颈内动脉呈一条直线,在颈外动脉残端剪一小口,将直径为0.23mm的8号线栓自颈外动脉插入颈内动脉,轻柔缓慢向前推进至遇阻力,将线栓与颈外动脉共同结扎以固定线栓,松开动脉夹,缝合切口。此时封闭了大脑中动脉开口,阻断了大脑中动脉的血流,制成MCAO模型。阻断60分钟后暴露颈部切口,缓慢拔出线栓实现再灌注。

[0069] 小鼠的MCAO模型能导致额顶叶皮层和尾状核的梗死,死亡率低(<10%),适合于长期行为功能评估。

[0070] 为了减少生理变量对缺血性脑损伤愈后的潜在影响,在实验期间将直肠温度和生理指标控制在正常范围内。应用Speckle激光多普勒半定量监测缺血期间的局部脑血流(rCBF)。若小鼠MCAO期间皮层rCBF下降<20%,将被剔除在外。

[0071] 3) 血流阻断60分钟后,拔除线栓,实现脑血流再灌。再灌1小时后,根据分组给予腹腔给药:DMSO组小鼠给予200ulDMSO;SorA-1组给予索拉芬-A1mg/kg溶解于200ul的10%的DMSO中;SorA-5组给予索拉芬-A 5mg/kg溶解于200ul的10%的DMSO中;SorA-25组给予索拉芬-A 25mg/kg溶解于200ul的10%的DMSO中。

[0072] 4) 手术后1天,2天及3天,分别测定小鼠神经功能缺陷评分,评分标准如下:分为0-5分:0分为无神经功能障碍;1分为右侧前爪不能完全伸展;2分为向右转圈;3分为向右侧倾倒;4分为不能行走;5分为死亡。

[0073] 5) 手术后第三天,处死小鼠,取脑后应用小鼠脑切片模具自尾状核前部到海马后部之间组织做连续冠状切片(厚度为1mm)。将脑片浸润于2%TTC(2,3,5-氯化三苯基四氮唑)。由于TTC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。因此TTC染色可以用来染色检测哺乳动物组织的缺血梗塞。染色后应用4%的多聚甲醛固定过夜,第二天可取出拍摄TTC染色照片。根据Swanson的方法,基于缺血侧和非缺血侧未梗死组织,分析每张脑片上的梗死区域,可避免梗死区血管性水肿的混淆作用。梗死体积=梗死面积总和×所有脑片厚度。

[0074] 实验结果:

[0075] 应用激光散斑多普勒技术监测MCAO手术过程中的脑血流变化情况,如图2A-B,小鼠行假手术后,双侧大脑半球脑血流无显著变化;在DMSO组以及SorA组小鼠中,大脑中动脉的阻塞均造成了一侧大脑半球显著的脑血流减少,而脑血流的减少程度在这两组小鼠中并无显著性差异(图2B)。通过TTC染色的方法,计算了缺血脑组织的体积,并且发现经SorA(1、5、25)治疗的小鼠的脑梗死体积明显小于DMSO对照小鼠(图2C-D)。因此,通过这一实验证明,SorA对急性缺血性脑损伤具有保护作用。

[0076] 实施例2索拉芬-A可改善缺血性脑损伤后长期的神经功能

[0077] 本实验采用了一系列啮齿类动物有效、灵敏、重复性好的行为学检测方法来评估缺血性脑损伤后的神经功能障碍。所有评估方法在MCAO手术后或假手术后1周开始每周进行测试。

[0078] 1) Corner测试:Corner测试能检测出MCAO后至90天的感觉运动功能损伤。将实验动物置于30°的夹板入口,使其自行向角落前进。在小鼠前进至夹角头端时,会向左或向右转向,然后将小鼠取出重新置于夹板入口,重复以上步骤。每个小鼠给予10次前进转向机



会,记录向左转向的次数作为角落实验的评估指标。

[0079] 2) 错步试验:用于评价前肢和后肢功能。小鼠被放在30(长)×35(宽)×31(高)cm的网格上(网格为2.5cm<sup>2</sup>)。小鼠踩着钢丝在网格上移动。爪子掉落或踩空就记为一次错步。每个动物测试1min,共3次,每次间隔1min。计算对侧肢体错步数占总错步数的百分比。

[0080] 3) 圆筒试验(Cylinder Test):圆筒实验可评估长期的感觉与运动功能损害以及肢体对称性,本研究中在小鼠术后3天、5天、7天、10天、14天、21天以及28天进行检测。具体如下:将实验动物放入直径8cm,高15cm的透明塑料圆筒内,每次放置2-4只动物,保证每只圆筒内放置一只小鼠。做好标记后录像5分钟。完成所有录像工作后,由一名对实验分组不知情的观者对录像中小鼠5分钟内上肢向上接触圆筒壁的次数进行技术。最终评估指标表达为非损伤侧(右侧)肢体偏好使用比例,即(右侧-左侧)/(右侧+左侧+双侧)接触次数×100。

[0081] 4) 神经感觉与运动功能评估:

[0082] a) 肢体感觉功能评分:用一根钝棒接触小鼠的每一侧肢体,并观察其对刺激的反应。评分标准如下:3、小鼠对两侧的刺激同样敏感,并有转头的反应;2、双侧反应减弱或对侧反应减弱;1、小鼠对左侧的刺激反应迟钝;和0,小鼠对左侧的刺激无反应。

[0083] b) 攀爬实验:把小鼠放在铁丝笼上。通常情况下,小鼠用所有的四条腿爬上铁丝笼墙面。当小鼠从铁丝笼中取下后,记录小鼠抓住铁丝笼的肌力。评分标准如下:3、老鼠轻松地爬上,紧紧抓住铁丝网;2,左侧受损,左侧肌力弱于右侧;1,小鼠无法向上爬,或原地转圈。

[0084] c) 前肢行走实验:提起小鼠的尾巴,使其后肢离开地面,仅用前肢走路。3、轻快地向前走并对称;2、向一侧偏移;1、转圈;0、前肢运动不能。

[0085] d) 侧转实验:小鼠被提起在空中离桌面10厘米以上以观察小鼠的侧转能力,评分标准如下:3.向双侧平等侧转,且侧转角度>45度;2.向双侧平等侧转,但侧转角度<45度;1、不平等侧转;0、无侧转。

[0086] e) 总体神经功能评分:将以上评分相加而得。

[0087] f) 粘纸实验:在小鼠的前肢的掌心贴上粘纸,并测定小鼠感觉到粘纸的存在后其肢体任何部位接触到粘纸的时间以及将粘纸移除所需的时间。若小鼠在120s内仍无法移除粘纸,则记录移除粘纸的最长时间为120s。

[0088] 5) Morris水迷宫试验评估长期认知功能的障碍:检测MCAO小鼠受损的学习和记忆功能:小鼠在开放的Morris水迷宫中学习寻找隐藏的平台从而逃离被迫的游泳任务。术后13天将小鼠放在无平台的水迷宫中让其适应,共两次。此后,在术后第2,4,6和8周每天行水迷宫测试,每天4次。记录动物到达下潜平台的所需时间(潜伏期)。最后两次训练时,撤除平台,让小鼠随意游泳30秒,并记录小鼠在目标相限(平台曾放置的相限)内停留时间和游泳速度。

[0089] 结果

[0090] 1) Corner测试:在小鼠的10次前进转向机会中,经Sor-A治疗的脑缺血损伤小鼠向左转向的比例低于DMSO组的比例,代表治疗小鼠的肢体对称性优于对照小鼠。见图3。

[0091] 2) 错步试验:与DMSO小鼠相比,经Sor-A治疗的脑缺血小鼠对侧前肢及后肢错步数占总错步数的百分比显著降低,并与sham组小鼠接近。见图4。

[0092] 3) 圆筒试验:脑缺血小鼠在损伤后,非损伤侧(右侧)肢体偏好使用比例显著升高,Sor-A治疗小鼠肢体的偏好使用比例显著低于DMSO对照组。见图5。

[0093] 4) 神经感觉与运动功能评估:

[0094] a) 肢体感觉功能评分: Sor-A治疗的脑缺血小鼠损伤对侧对刺激的反应显著高于DMSO组,见从。

[0095] b) 攀爬实验:脑缺血损伤后,小鼠的攀爬能力显著降低,经Sor-A治疗,其攀爬能力高于DMSO组,见图6B。

[0096] c) 前肢行走实验:脑缺血损伤后小鼠的前肢行走能力显著下降,经Sor-A治疗的小鼠下降幅度减小,见图6C。

[0097] d) 侧转实验:小鼠被提起在空中离桌面10厘米以上以观察小鼠的侧转能力时发现经Sor-A治疗的小鼠与DMSO对照组小鼠相比,其侧转能力有显著提高,见图6D。

[0098] e) 将上述评分累加后,小鼠的综合评分显示,Sor-A治疗可显著提高小鼠的神经功能综合评分,见图6E。

[0099] f) 粘纸实验:小鼠在脑缺血以后,将掌心的粘纸移除所需的时间显著增加,Sor-A治疗小鼠移除粘纸所需的时间显著降低,见图6F。

[0100] 5) Morris水迷宫试验:水迷宫内小鼠在目标象限的停留时间在脑缺血损伤后显著降低,Sor-A治疗显著增加了其在目标象限的停留时间。而三组小鼠的游泳速度没有显著性差异。见图7。

[0101] 综上所述,行为学检测结果显示,索拉芬A可改善缺血性脑损伤后长期的感觉,运动,肢体对称性以及学习与记忆功能。

[0102] 实施例3索拉芬-A可预防缺血性脑损伤后(或缺血性神经元)的神经功能损伤

[0103] 选择8-12周雄性C57/BL6野生型小鼠(购自史莱克实验动物公司),随机分成3组,Sham组(n=8),DMSO组(n=8),SorA组(n=8)。SorA组给予1mg/kg/d,腹腔注射,预处理3天后接受Sham或MCAO手术。

[0104] 术后3天,5天,7天,14天,28天行动物行为学检测。方法同上。在术后3天处死小鼠,灌注取脑后进行NeuN免疫荧光染色,测定神经元的存活状态。

[0105] 实验结果表明,预先施用了索拉芬-A的小鼠的缺血区域内存活的神经元显著多于DMSO对照组小鼠,见图8。

[0106] 实施例4索拉芬-A的剂量筛选实验

[0107] 本实验取实施例1相同小鼠,并将小鼠分为6组;n=8,每组采用的索拉芬A剂量分别为:G0安慰剂作为对照;G1索拉芬-A 0.1/kg mg;G2索拉芬-A 1/kg mg;G3索拉芬-A 5/kg mg;G4索拉芬-A 25/kg mg;G5索拉芬-A 50/kg mg。G0-G5重复了实施例1-3的实验内容。

[0108] 结果(未示出)表明,当索拉芬A的小鼠剂量为0.1或1/kg mg时,索拉芬A对急性或慢性缺血性脑损伤具有一定效果,但与对照G0组相比没有显著性差异;

[0109] 当索拉芬A的小鼠剂量为5、25、50/kg mg时,索拉芬A对剂型或慢性缺血性脑损伤均有显著的改善效果(运动神经、感觉神经均有显著恢复),但是G3、G4、G5之间的结果无显著性差异。

[0110] 因此,索拉芬A在小剂量时对于缺血性脑损伤后的神经恢复具有微弱的效果,但当剂量上升到5mg/kg时,则开始产生显著的作用,而加大剂量后作用并没有明显上升。

[0111] 所有实验小鼠均没有产生明显或严重的不良反应。

[0112] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

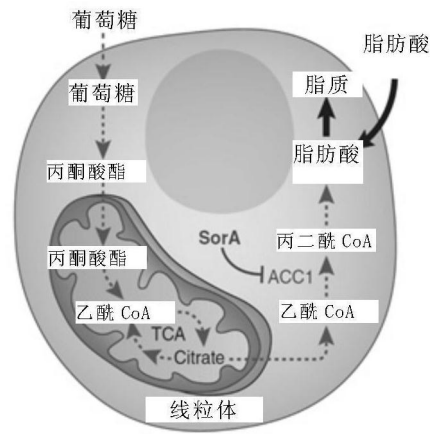


图1

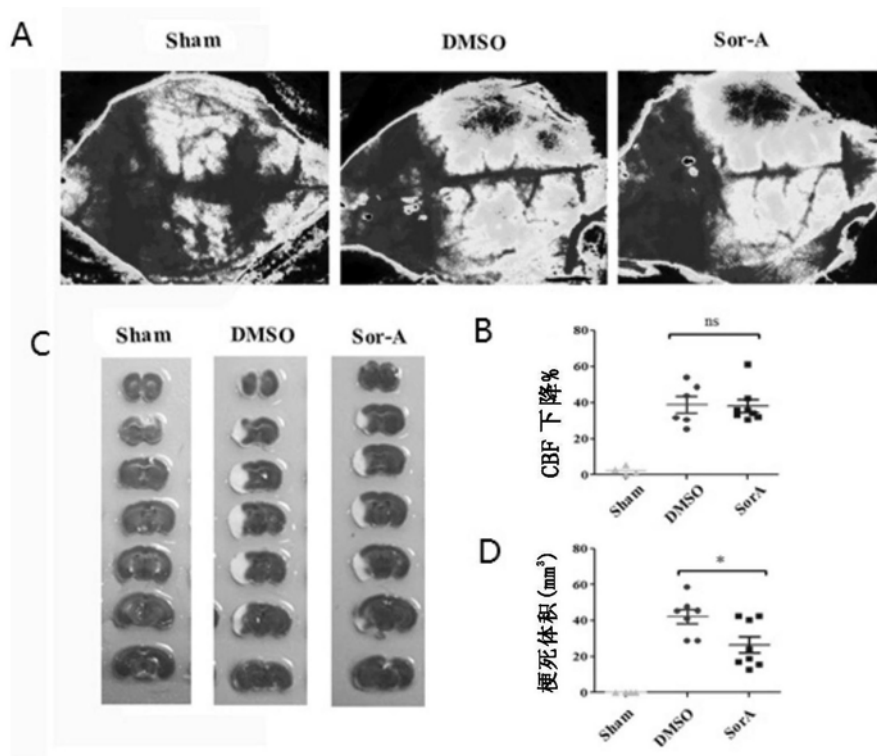


图2

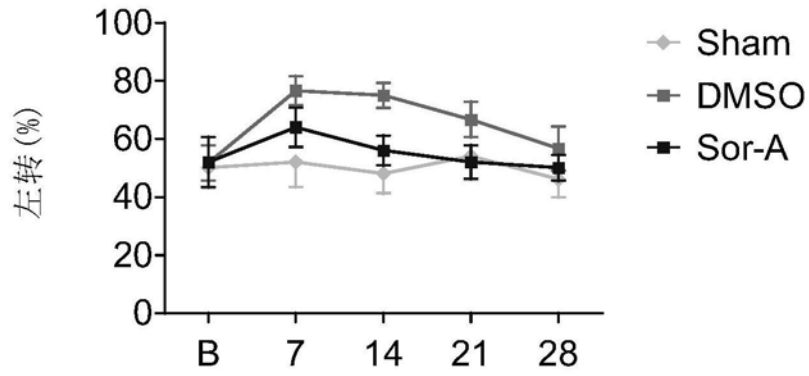


图3

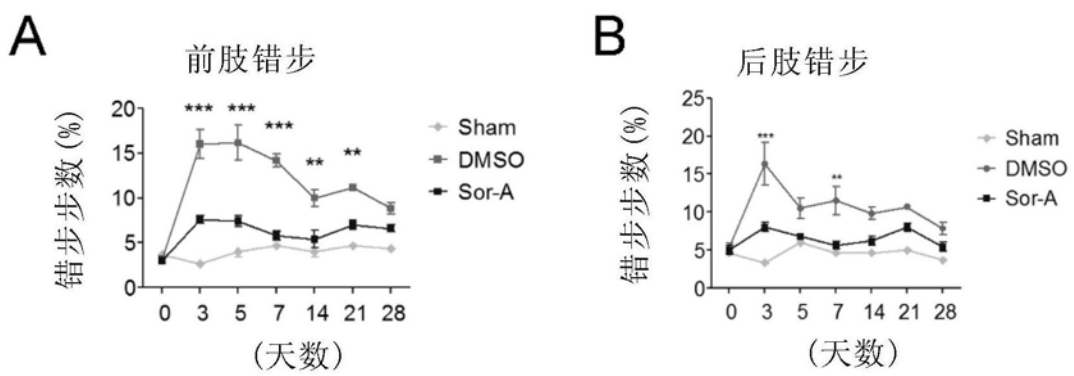


图4

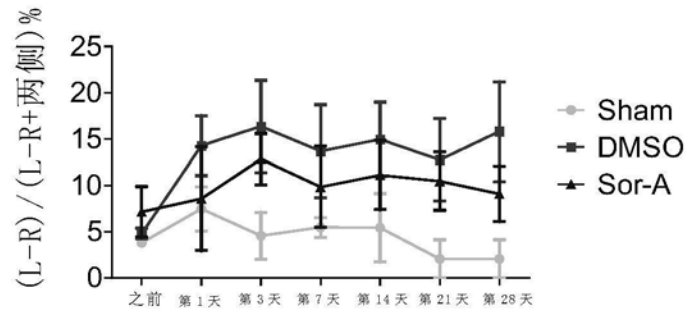


图5

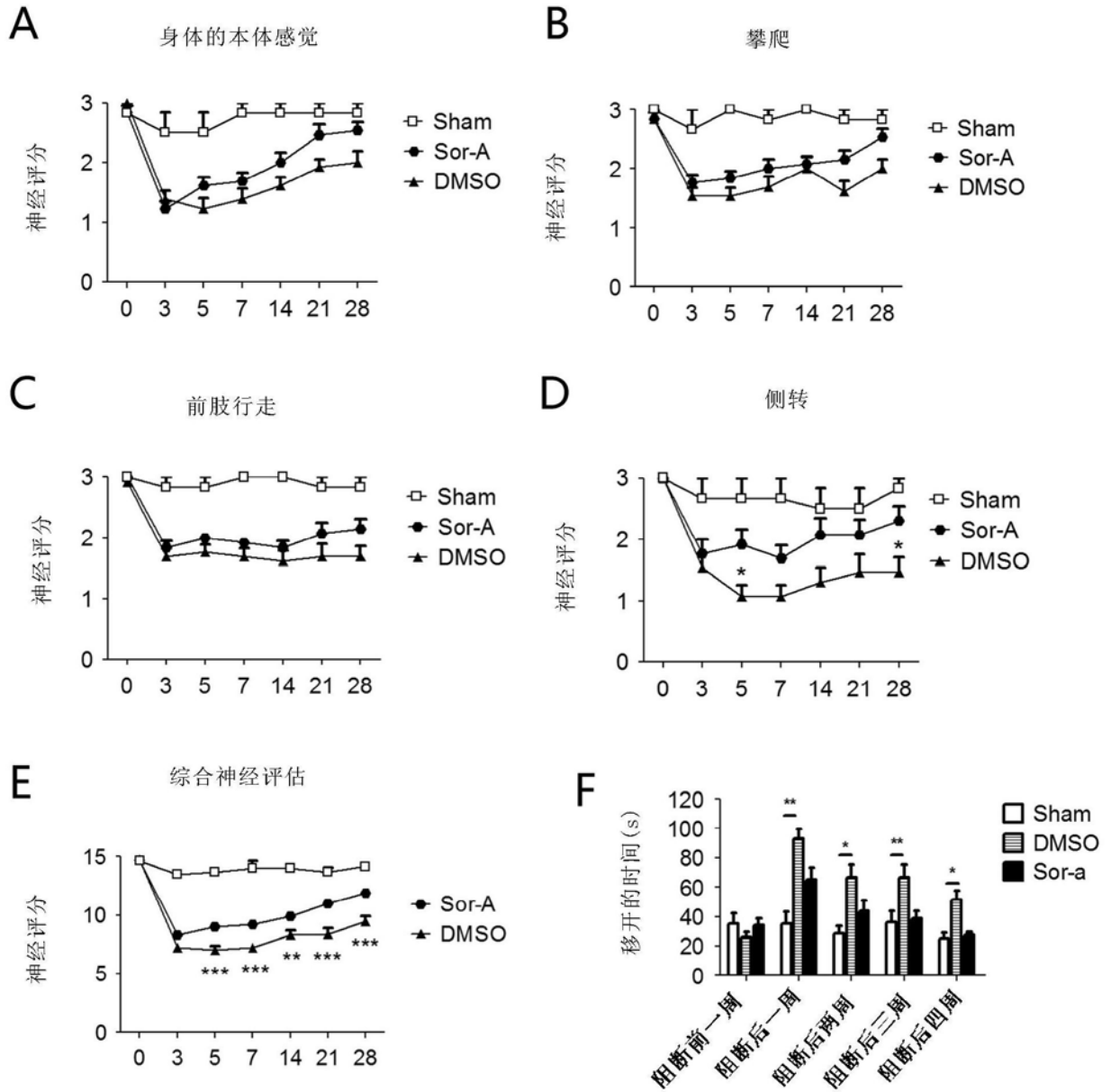


图6

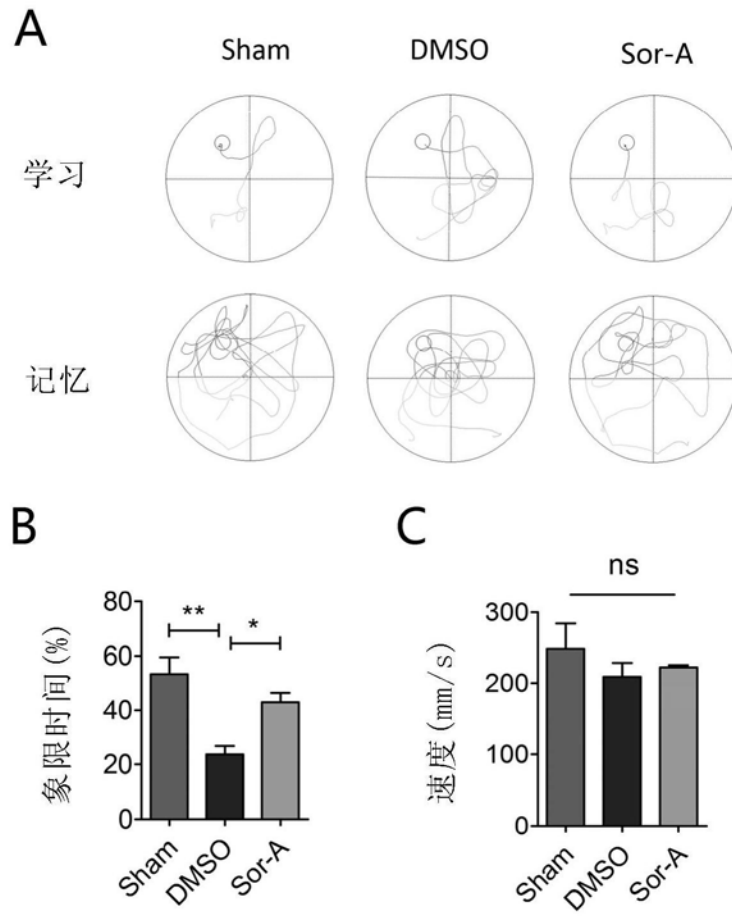


图7

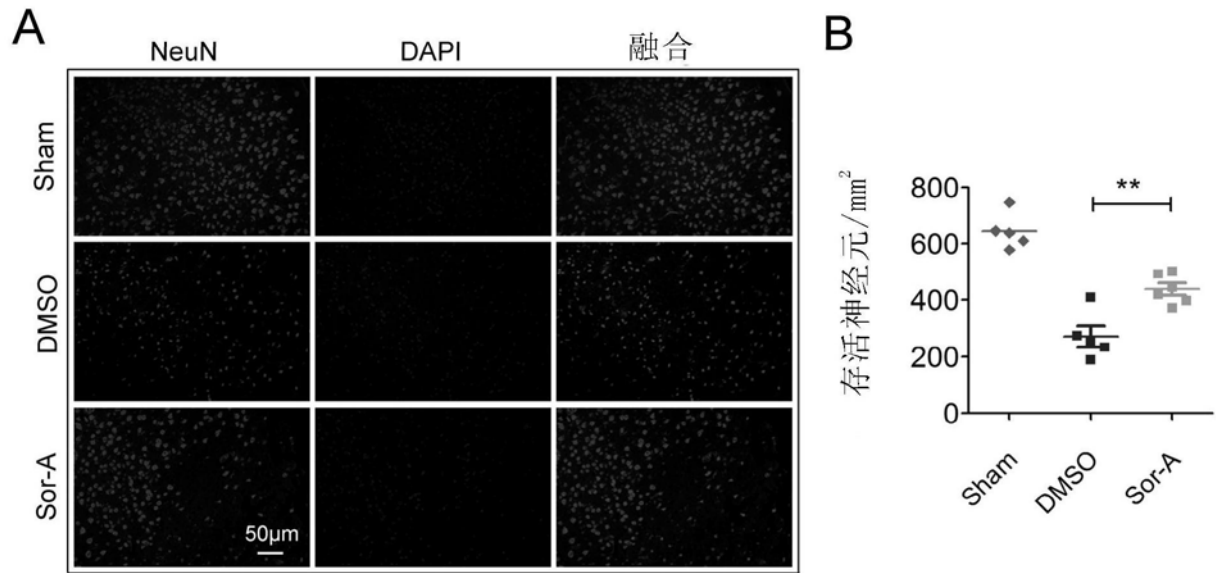


图8