



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117257803 A

(43) 申请公布日 2023. 12. 22

(21) 申请号 202210671569.5

(22) 申请日 2022.06.15

(71) 申请人 中南大学湘雅三医院

地址 410013 湖南省长沙市岳麓区桐梓坡路138号

(72) 发明人 罗秀菊 彭靖杰 彭军 张议月 段丹清

(74) 专利代理机构 长沙正奇专利事务所有限责任公司 43113

专利代理师 胡凌云 马强

(51) Int. Cl.

A61K 31/496 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

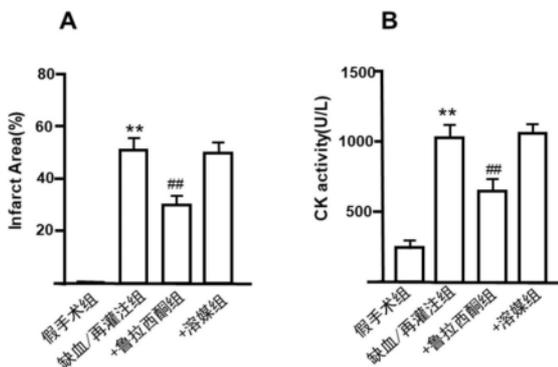
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

鲁拉西酮在制备治疗或预防缺血/再灌注损伤的药物和细胞保护药物中的应用

(57) 摘要

本发明涉及鲁拉西酮在制备治疗或预防缺血/再灌注损伤的药物和细胞保护药物中的应用。本发明发现鲁拉西酮可显著降低心肌梗死面积和脑梗死体积,降低血清肌酸激酶活性和改善神经学功能,减少心肌细胞和神经细胞死亡,具有心肌细胞和神经细胞保护作用,可用于治疗或预防心肌梗死和缺血性脑卒中。



1. 鲁拉西酮在制备治疗或预防缺血/再灌注损伤的药物中的应用。
2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述缺血/再灌注损伤包括心肌缺血/再灌注损伤、脑缺血/再灌注损伤、肝缺血/再灌注损伤、肾缺血/再灌注损伤、肺缺血/再灌注损伤、肠缺血/再灌注损伤中的一种或几种。
3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于,所述心肌缺血/再灌注损伤包括慢性心肌缺血综合征、心肌梗死中的一种或几种。
4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于,所述心肌缺血/再灌注损伤包括心肌梗死。
5. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于,所述脑缺血/再灌注损伤包括缺血性脑卒中。
6. 鲁拉西酮在制备细胞保护药物中的应用。
7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,所述细胞保护药物是指具有预防、抑制或治疗组织、器官和细胞的损伤、变性或功能障碍的作用的药物。
8. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,所述细胞保护药物是指预防、抑制或治疗心血管系统疾病、神经系统疾病、眼科疾病、呼吸系统和消化系统的药物;优选地,所述细胞包括心肌细胞和神经细胞中的一种或几种。
9. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于,所述器官包括脑、肺、心脏、血管、肾、肠、胰腺、皮肤、眼、角膜中的一种或几种。
10. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,所述细胞保护药物是用于心肌缺血/再灌注损伤和/或脑缺血/再灌注损伤中的药物。

鲁拉西酮在制备治疗或预防缺血/再灌注损伤的药物和细胞保护药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及鲁拉西酮(lurasidone)在制备治疗或预防缺血/再灌注损伤的药物和细胞保护药物中的应用,属于生物医药领域。本发明提供了鲁拉西酮的新用途和给药方式,包括抗心、脑缺血/再灌注损伤的作用(尤其是抗心肌梗死和缺血性脑卒中),减轻心、脑缺血/再灌注损伤,扩大了鲁拉西酮的适应症范围。

背景技术

[0002] 心肌梗死主要是由心脏缺血引起心肌细胞缺血缺氧,可导致心肌细胞不可逆地损伤。脑梗死也称缺血性脑卒中,是由多种原因导致的局部脑组织血液供应障碍,导致脑组织缺血、缺氧性坏死,神经功能缺失。缺血性脑卒中是严重危害人类健康的常见和多发病,在全球已成为第一致残和第三致死的原因,缺血性脑卒中的发病率约占脑血管病的80%左右。

[0003] 梗死治疗的主要措施之一是尽快恢复梗死组织灌注供血,但再灌注治疗往往伴随着一些组织损伤。由缺血和再灌注引起的损伤称为“缺血/再灌注(I/R)损伤”。I/R损伤涉及能量代谢障碍、钙超载、氧化应激、炎症反应等多种机制,导致细胞出现凋亡、坏死等多种死亡方式。研究表明,抑制凋亡和/或坏死,能够抑制缺血/再灌注导致的心肌细胞和神经细胞死亡,可减轻心、脑缺血/再灌注损伤的程度,缩小梗死范围。

[0004] 坏死样凋亡是一种caspase非依赖性调节性细胞坏死方式,主要由受体相互作用蛋白激酶(Receptor-interacting protein kinase,RIPK)1、RIPK3和混合连接激酶结构域样蛋白(mixed lineage kinase domain-like,MLKL)介导。坏死样凋亡与多种心、脑血管疾病密切相关,如心脑缺血/再灌注损伤、心力衰竭、药物引起的心肌毒性、动脉粥样硬化、肝肾损伤,神经退行性疾病等。因此,抑制RIPK1/RIPK3/MLKL依赖的坏死样凋亡可抑制或减轻上述疾病导致的细胞死亡和组织损伤。文献报道,RIPK1抑制剂necrostatin-1(Nec-1)能减小鼠的心、脑、肝、肾等缺血/再灌注损伤。然而,Nec-1仅作为工具药用于动物实验,目前临床上尚无针对RIPK1/RIPK3/MLKL药物用于临床治疗。

[0005] 鲁拉西酮(Lurasidone,商品名为Latuda)是一种非典型抗精神病药物,可拮抗多巴胺D2和5-羟色胺2A(5-HT_{2A})受体,用于精神分裂症患者的治疗,但是否具有抗缺血/再灌注损伤的作用尚未见报道。

[0006] 在本发明中,除非另有说明,“鲁拉西酮”应理解为“鲁拉西酮的化合物或它的半合成衍生物之一或它们的盐(化合物的盐或半合成衍生物的盐)之一或它们的酯(化合物的酯或半合成衍生物的酯)之一或它们的酯盐(化合物的酯的盐或半合成衍生物的酯的盐)之一”。

发明内容

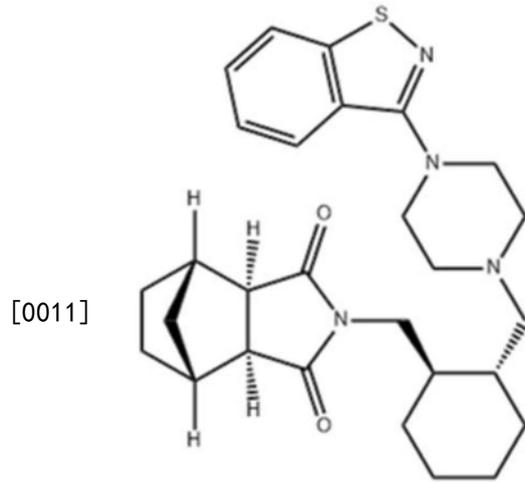
[0007] 针对现有技术的不足,本发明的目的在于提供鲁拉西酮在制备治疗或预防缺血/

再灌注损伤的药物中的应用;本发明的目的之二在于提供鲁拉西酮在制备细胞保护药物中的应用。

[0008] 为了解决上述技术问题,本发明的技术方案如下:

[0009] 鲁拉西酮在制备治疗或预防缺血/再灌注损伤的药物和细胞保护药物中的应用。

[0010] 本发明所述鲁拉西酮的化合物的结构式如式I所示,分子式为: $C_{28}H_{36}N_4O_2S$ 。



式 I

[0012] 进一步地,所述缺血/再灌注损伤包括心肌缺血/再灌注损伤、脑缺血/再灌注损伤、肝缺血/再灌注损伤、肾缺血/再灌注损伤、肺缺血/再灌注损伤和肠缺血/再灌注损伤中的一种或几种。

[0013] 进一步地,所述心肌缺血/再灌注损伤包括慢性心肌缺血综合征、心肌梗死中的一种或几种。

[0014] 进一步地,所述慢性心肌缺血综合征包括隐匿性冠心病、稳定性心绞痛、缺血性心肌病中的一种或几种。

[0015] 进一步地,所述心肌缺血/再灌注损伤包括心肌梗死。

[0016] 进一步地,所述脑缺血/再灌注损伤包括缺血性脑卒中(也称脑梗死)。

[0017] 基于同一发明构思,本发明还提供鲁拉西酮在制备细胞保护药物中的应用。

[0018] 进一步地,所述细胞保护药物是指具有预防、抑制或治疗组织、器官和细胞的损伤、变性或功能障碍作用的药物。

[0019] 进一步地,所述细胞保护药物是指预防、抑制或治疗心血管系统疾病、神经系统疾病、眼科疾病呼吸系统和消化系统的药物;优选地,所述细胞包括心肌细胞和神经细胞中的一种或几种。

[0020] 进一步地,所述器官包括脑、肺、心脏、血管、肾、肠、胰腺、皮肤、眼、角膜中的一种或几种。

[0021] 进一步地,所述细胞保护药物是用于心肌缺血/再灌注损伤和/或脑缺血/再灌注损伤中的药物。

[0022] 本发明人发现,鲁拉西酮可减少心肌缺血和脑缺血导致的心肌细胞和神经细胞死

亡,显著降低心、脑缺血梗死体(面)积,降低血清肌酸激酶活性及改善神经学功能,减少心肌细胞和神经细胞死亡,具有心肌细胞和神经细胞保护作用,其减轻心、脑缺血/再灌注损伤的作用优于目前常用的心、脑血管药物。

[0023] 进一步地,所述药物的给药方式为肌肉注射、皮下注射、静脉注射、腹腔注射、口服给药、舌下含服、病灶内或脑内或植入的递送、喷雾给药中的一种或几种,优选为肌肉、皮下注射、静脉注射。

[0024] 进一步地,所述药物的给药方式为肌肉、皮下或静脉注射给药。

[0025] 进一步地,所述药物可以制备成药剂学上可以接受的任意一种剂型。

[0026] 进一步地,所述剂型包括注射剂、胶囊剂、片剂、颗粒剂、混悬剂、乳剂、喷雾剂、散剂、脂质体、口服液、滴丸中的一种,其中优选剂型为注射剂。

[0027] 可选的,鲁拉西酮为其药学上可接受的盐,所述药学上可接受的盐为药学上常用的盐,进一步地,所述盐选自乙酸盐、盐酸、氢溴酸、硝酸、硫酸、磷酸、苯甲酸盐、富马酸盐、马来酸盐、琥珀酸、酒石酸、柠檬酸盐、草酸、乙醛酸、天冬氨酸、酒石酸盐、2,5-二羟基苯甲酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、月佳基磺酸盐、氢醌磺酸盐和对甲苯磺酸盐中的一种或几种。

[0028] 本发明人研究发现能鲁拉西酮特异性下调RIPK1、RIPK3、MLKL表达和磷酸化水平,可用作RIPK1、RIPK3、MLKL抑制剂,抑制细胞坏死样凋亡,可减少细胞死亡。

[0029] 本发明人意外地发现,鲁拉西酮减少心肌缺血/再灌注和脑缺血/再灌注导致的心肌细胞和神经细胞死亡,显著降低心、脑缺血梗死体(面)积,降低血清肌酸激酶活性及改善神经学功能,具有下调RIPK1、RIPK3、MLKL表达和磷酸化水平的作用,具有保护心肌细胞和神经细胞作用。本发明的药物减轻心、脑缺血/再灌注损伤的作用优于目前常用的脑血管药物,可用于治疗心肌梗死和缺血性脑卒中,具有良好的开发应用前景。

[0030] 本发明扩大了鲁拉西酮的适应症,尤其可适用于心肌梗死和缺血性脑卒中及细胞保护。

[0031] 本发明涉及鲁拉西酮在制备治疗或预防缺血/再灌注损伤药物中的应用,属于首次公开,可显著降低心肌梗死面积和脑梗死体积,降低血清肌酸激酶活性和改善神经学功能,减少心肌细胞和神经细胞死亡,具有心肌细胞和神经细胞的保护作用,是意想不到的,与鲁拉西酮的已知用途毫不相关,也不存在现有其他化合物给出相关启示,具备突出的实质性特点,用于治疗缺血/再灌注损伤及细胞保护具有显著的进步。

附图说明

[0032] 图1为实施例1中鲁拉西酮对大鼠心肌梗死面积及血清肌酸激酶活性的影响情况图;缺血30分钟给药,再灌24小时后检测相关指标,A-鲁拉西酮给药后,大鼠心肌组织TTC染色及梗死面积测定情况图,B-鲁拉西酮给药后,血清肌酸激酶活性情况。

[0033] 图2为实施例2中鲁拉西酮对大鼠脑梗死体积及神经学功能的影响情况图;缺血2h再灌1h后给药,再灌24小时后检测相关指标,A-大鼠脑组织TTC染色及梗死体积测定情况图,B-大鼠神经学功能评分情况图。

[0034] 图3实施例2中鲁拉西酮对大鼠脑组织中MLKL及磷酸化MLKL(p-MLKL)的调节作用情况图。

具体实施方式

[0035] 以下将结合实施例来详细说明本发明。

[0036] 鲁拉西酮在制备治疗缺血/再灌注损伤药物和细胞保护药物中的应用。

[0037] 材料和方法：

[0038] 为证明鲁拉西酮在抗缺血/再灌注损伤和细胞保护中作用，申请人采用心肌缺血/再灌注损伤大鼠模型和缺血性脑卒中大鼠模型，并在缺血/再灌注后不同时间点给予鲁拉西酮药物处理，再灌注24小时处死动物，用TTC染色和血清肌酸激酶活性检测心肌细胞损伤，用神经生物学评分及TTC染色检测神经细胞损伤。

[0039] 实验药品：鲁拉西酮(鲁拉西酮的化合物)购于试剂公司，按公司试剂说明书进行溶解和配制。

[0040] 实施例1

[0041] 动物实验：鲁拉西酮对心肌缺血/再灌注损伤大鼠模型的保护作用。

[0042] 实验动物：

[0043] 体重250~300g的健康雄性SD大鼠若干。将实验动物在温度25℃、相对湿度60%、自由饮水、定时定量的环境中饲养一周，然后按实验各分组要求给药。

[0044] 大鼠心肌缺血/再灌注模型建立方法：SPF级Sprague-Dawley大鼠用3%戊巴比妥钠(0.1mL/kg)进行腹腔注射麻醉后，固定于鼠板上，剔除颈部和左胸的毛发。将大鼠肢体连接到心电图机，观察手术过程中大鼠心电图的变化。钝性分离颈部肌肉，暴露气管，在气管上剪开一个“T”型切口，将与呼吸机连接的软管的另一端插入大鼠气管，并用丝线固定。呼吸机参数设置为潮气量为7mL/kg，频率每分钟53次。待大鼠呼吸平缓后，于左胸第三、四肋间处用止血钳钝性分离各层肌肉，固定胸骨，轻轻挑开心包膜，暴露整个心脏。待心跳恢复规律以后，快速挤出心脏，在肺动脉圆锥与左心耳之间可观察到明显的左冠状静脉，用5-0缝合线穿一截塑料软管结扎冠状动脉左前降支，或从左心耳下方2-3mm处穿针至肺动脉圆锥下方，迅速将心脏复位并快速结扎。监测大鼠心电图变化，以ST段抬高，并同时能肉眼观察到心尖处变白等指标判定心肌梗死。缺血1小时后，剪开心脏结扎处的塑料软管，结扎线即断开，心脏恢复血流灌注。再灌注3小时后，剪开开胸处的胸骨，心尖取血2-3mL。

[0045] 心尖采血后取出心脏，剪掉结扎处上方的所有心肌组织，除去右心室及室间隔。于-20℃冰箱冷冻30min后，取出，将心脏切成厚薄均匀的片块，加入1% TTC染液(PBS配制)于37℃条件下共孵育15min。染色结束，去除染液，PBS洗涤一次，4%多聚甲醛固定24小时后取出心脏切片，观察染色情况并拍照。梗死区域呈现白色，通过ImageJ软件测定心肌梗死面积和危险区面积，计算每一切片梗死面积百分比(Infarct Area, 梗死区与危险区面积的比值)。

[0046] 实验分组：将实验动物随机分为4组，即：

[0047] 假手术组(Sham组)：对大鼠心脏进行手术，但不做血管结扎；

[0048] 心肌缺血/再灌注组(I/R组)：结扎左冠状动脉前降支1小时，剪线，再灌注3小时；

[0049] 鲁拉西酮+心肌缺血/再灌注组(Lurasidone+I/R)：在大鼠心肌缺血30min后，给予腹腔注射鲁拉西酮(鲁拉西酮给予量15mg/kg)处理。

[0050] 溶媒+心肌缺血/再灌注组(Vehicle+I/R)：在大鼠心肌缺血30min后给予相同体积的溶媒。

[0051] 收集血及心肌组织并测定相关指标:大鼠心肌梗死面积测定及血清肌酸激酶活性检测。

[0052] 血清肌酸激酶活性(Creatine Kinase,CK activity)检测

[0053] 缺血/再灌注手术结束后,心尖采血1-2mL,3000rpm,4℃,离心10min后取上清,-40℃保存。按照市购试剂盒说明书测定血清CK活性步骤如下:取10mL R2溶解一瓶R1配成工作液,取4μL血清,加到200μL CK试剂盒工作液中,于37℃条件下孵育2min,酶标仪下波长设定为340nm,分别在0、1、2、3min时读取吸光度 A_0, A_1, A_2, A_3 ,计算每分钟平均吸光度的变化(ΔA),并计算血清中CK的浓度(U/L)。

[0054] 实验结果:

[0055] 鲁拉西酮具有抗大鼠心肌缺血/再灌注损伤作用,减少大鼠心肌组织梗死面积,降低血清肌酸激酶活性,减少心肌细胞死亡。

[0056] 如图1中的A所示,缺血30分钟给予鲁拉西酮给药可有效减少大鼠心缺血/再灌注导致的心肌组织梗死面积;如图1中的B所示,给予鲁拉西酮可明显降低血清肌酸激酶活性,数据表示为均数±标准误,n=6,**P<0.01vs Sham,^{###}P<0.01vs I/R。

[0057] 实验结论:

[0058] 鲁拉西酮可减少大鼠心肌细胞死亡,减轻心肌缺血/再灌注损伤,具有保护心肌细胞作用,能应用于制备治疗心肌缺血/再灌注损伤的药物。

[0059] 实施例2

[0060] 动物实验:鲁拉西酮对缺血性脑卒中大鼠模型的保护作用。

[0061] 实验动物:体重250~300g的健康雄性SD大鼠。将实验动物在温度25℃、相对湿度60%、自由饮水、定时定量的环境中饲养一周,然后按实验各分组要求给药。

[0062] 建模方法:用脑中动脉阻塞(MCAO)法制备大鼠脑缺血/再灌注损伤模型。步骤如下:(1)分离出大鼠左侧的颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)与颈内动脉(ICA);(2)用眼科镊暂时夹闭ECA和ICA,并结扎CCA近心端;(3)于CCA远心端放置一打好结的备用丝线,在此线下端剪一小口,将栓线插入至颈内动脉,收紧丝线,放开ECA和ICA上的动脉夹,顺ICA将栓线送至颅内;(4)遇阻力而止,从CCA分叉处算起,插入深度约为18~20mm;(5)缺血120min后,将栓线拔出,缝好皮肤,再灌注24h后处理动物。

[0063] 模型成功评判标准采用Longa“5分法”对大鼠脑缺血损伤的神经功能缺损进行评分。0分:无神经缺损症状;1分:右前肢不能完全伸直;2分:大鼠行走向右侧旋转;3分:行走向右侧倾倒;4分:不能自发行走,意识丧失。1~4分为有效模型。

[0064] 大鼠脑TTC染色和梗死体积测定。大鼠麻醉后,迅速将脑取出,去掉嗅球及后脑,从额极开始将脑组织切成厚约2mm的冠状脑片,立刻置于1%TTC溶液中,37℃避光孵育30min。然后用10%多聚甲醛溶液浸泡固定。梗死区呈现白色,非梗死区呈现红色。将每组脑片排列整齐后进行扫描。再应用ImageJ测出各脑片的梗死面积,根据公式:梗死体积=[(各片正面梗死面积+各片反面梗死面积)/2]×每片厚度,同样方法计算出全脑梗死体积即所有脑片梗死体积之和。

[0065] Western blot(WB)检测MLKL及磷酸化MLKL表达水平。取适量脑组织,加入预冷的PBS清洗。往匀浆管内加入磁珠,置于冰上预冷,将清洗后的脑组织加入匀浆管内匀浆(70Hz,180s)。4℃,12000rpm离心10min,留上清。用BCA法测蛋白浓度后,取20~40ug蛋白用

8-10%的SDS-PAGE胶分离并转膜到PVDF膜上,并用MLKL及p-MLKL(Abcam, Cambridge, UK)抗体和 β -actin(Beyotime, 江苏)抗体进行过夜孵育,去除抗体后洗膜,加相应二抗孵育后经Molecular Imager ChemiDoc XRS System(Bio-Rad, Philadelphia, PA)显影, β -actin作为内参。通过Image J软件测定蛋白灰度值以评价蛋白表达水平。

[0066] 实验分组:将实验动物随机分为4组,即:

[0067] 假手术组(Sham组):进行颈内、外动脉分离手术,不插栓线入动脉。

[0068] 脑缺血/再灌注组(I/R组):脑缺血2h,再灌注24h。

[0069] 鲁拉西酮+脑缺血/再灌注组(鲁拉西酮+I/R):缺血2h、再灌1h、6h后分别给予肌肉注射鲁拉西酮(鲁拉西酮的每次给予量为10mg/kg)处理。

[0070] 溶媒+脑缺血/再灌注组(Vehicle+I/R):缺血2h、再灌1h、6h后分别给予相同体积的溶媒处理。

[0071] 检测大鼠神经功能评分和测定脑梗死体积。

[0072] 结果:

[0073] 鲁拉西酮具有抗大鼠脑缺血/再灌注损伤作用,减少脑梗死体积,改善神经功能缺损症状,减少神经细胞死亡。

[0074] 图2中的A所示,I/R组有明显的白色梗死灶,缺血2h、再灌1h、6h后给予鲁拉西酮大鼠脑梗死体积显著缩小,明显缓解脑缺血/再灌注损伤。图2中的B所示,鲁拉西酮可明显改善神经功能缺损症状($n=6$,** $P<0.01$ vs Sham,^{###} $P<0.01$ vs I/R)。

[0075] 图3所示,脑缺血/再灌注诱导大鼠脑组织MLKL及p-MLKL(磷酸化MLKL)上调,而鲁拉西酮显著抑制MLKL及p-MLKL上调。

[0076] 结论:鲁拉西酮具有抑制坏死样凋亡作用,可减少神经细胞死亡,可减轻脑缺血/再灌注损伤,能应用于制备减轻脑缺血/再灌注损伤药物,用于治疗缺血性脑卒中。

[0077] 但本发明不局限于心、脑缺血/再灌注损伤,因肝、肾、肺和肠缺血/再灌注损伤与心、脑缺血/再灌注损伤机制具有相似之处,故该药物同样适用于治疗肝、肾、肺和肠缺血/再灌注损伤。

[0078] 上述实施例阐明的内容应当理解为这些实施例仅用于更清楚地说明本发明,而并不用于限制本发明的范围,在阅读了本发明之后,本领域技术人员对本发明的各种等价形式的修改均落入本申请所附权利要求所限定的范围。

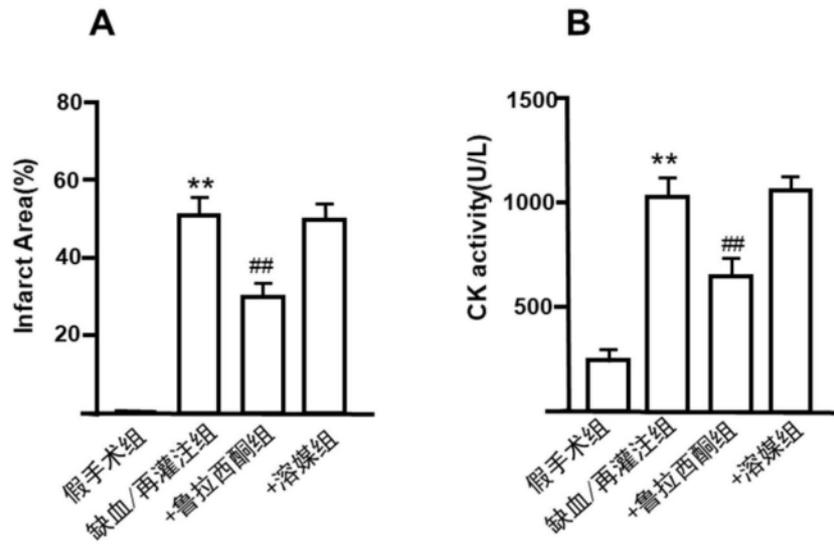


图1

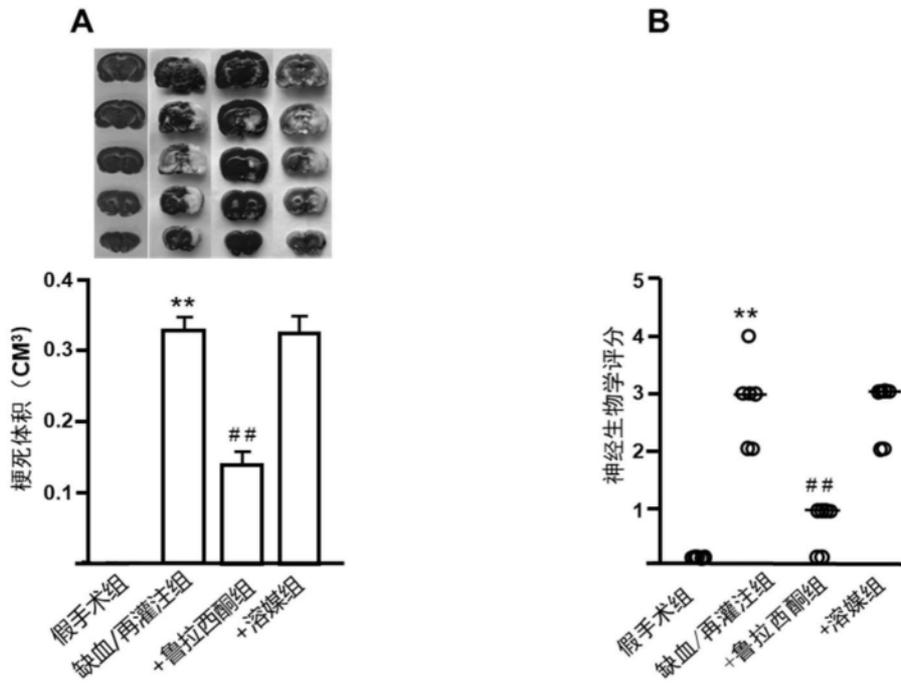


图2

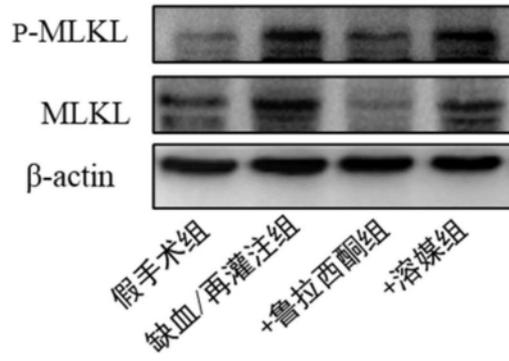


图3