

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 31/404 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610033791.3

[43] 公开日 2007 年 8 月 29 日

[11] 公开号 CN 101023944A

[22] 申请日 2006.2.23

[21] 申请号 200610033791.3

[71] 申请人 黎明涛

地址 510089 广东省广州市中山二路 74 号中山大学基础医学院药理教研室

共同申请人 韩怡凡 陈汝筑 李文明

[72] 发明人 黎明涛 韩怡凡 陈汝筑 李文明

[74] 专利代理机构 广州三环专利代理有限公司

代理人 刘孟斌

权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图 3 页

[54] 发明名称

靛玉红衍生物在制备治疗神经退行性变疾病药物中的应用

[57] 摘要

本发明涉及靛玉红衍生物(IO) 在制备治疗神经退行性变疾病药物中的应用，特别是在制备治疗帕金森病药物中的应用。 本发明旨在以靛玉红衍生物为抑制剂，以它抑制的三种介导凋亡的激酶——JNK/CDK5/GSK3 β 为明确靶点，创新性地研究和开发出一类靶点明确、毒性小、特异性高、作用强的治疗帕金森病和其它神经退行性变疾病的新药物，提高上述疾病患者的生活质量，为家庭和社会解除沉重负担，具有巨大的社会效益，并能创造巨大的经济效益。

- 1、靛玉红衍生物在制备治疗神经退行性变疾病药物中的应用。
- 2、靛玉红衍生物在制备治疗帕金森病药物中的应用。

靛玉红衍生物在制备治疗神经退行性变疾病药物中的应用

[技术领域]

本发明涉及靛玉红衍生物(IO)在制备治疗神经退行性变疾病药物中的应用，特别是在制备治疗帕金森病药物中的应用。

[背景技术]

帕金森病(Parkinson's Disease, PD)是一种常见的，以黑质、纹状体和核团的多巴胺能神经元进行性丢失为特征的神经系统变性疾病。程序化细胞死亡（即凋亡）在帕金森病的神经元变性过程中发挥重要作用。临床上对帕金森病的治疗主要是给予多巴胺前体药左旋多巴跟外周脱羧酶抑制剂联合对症治疗以缓解帕金森病的症状。近年来研究大热的还有帕金森病的基因治疗和干细胞治疗。但由于基因治疗存在着靶基因选择、载体和基因可控性问题；干细胞治疗存在着移植干细胞大量凋亡以至不能产生治疗浓度的多巴胺等问题，使得后两种方法现在还只是处于研究阶段。所以目前临床上对帕金森病的治疗主要还是依赖于药物。但是，由于左旋多巴的应用只是对症治疗，并不能有效地控制帕金森病的自然病变进程，而且还有许多严重的副作用，例如开关现象和运动障碍。更令人失望的是，左旋多巴的治疗作用只能维持两年左右。如果长期使用，左旋多巴还会损伤神经元，加速神经

元的凋亡。因此,现在迫切需要能够有效控制帕金森病病程的神经元保护性药物:一方面既能抑制“原发性”黑质多巴胺神经元进行性丢失,另一方面又能保护性干预左旋多巴引起的“药源性”神经元凋亡,从而达到有效治疗帕金森病的目的。

既然黑质多巴胺神经元进行性凋亡是帕金森病(PD)发生的根本原因,那么,怎样有效地保护性干预多巴胺神经元凋亡的发生就成为治疗帕金森病的关键。申请人根据JNK是帕金森病黑质多巴胺神经元凋亡的关键性激酶这一事实,确定以c-Jun N-末端激酶(Jun N-terminal kinase, JNK)为靶点治疗帕金森病。实验证实: JNK介导了黑质多巴胺神经元凋亡并参与帕金森病的发生; JNK抑制剂SP600125通过抑制黑质多巴胺神经元凋亡而发挥治疗帕金森病动物的作用。然而, JNK通路并非介导黑质多巴胺神经元凋亡的单一信号通路。已有多篇报道证明细胞周期素依赖激酶5(cyclin-dependent kinase5,CDK5)在黑质多巴胺神经元凋亡中发挥重要作用。最近,申请人还首次观察到:促凋亡激酶——糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β ,GSK-3 β)介导了黑质多巴胺神经元凋亡;抑制GSK3 β 对原代培养的黑质多巴胺神经元的凋亡具有保护性干预作用、对帕金森病动物具有治疗作用。这些研究表明, GSK3 β 在帕金森病发生中发挥重要作用,可能成为潜在的治疗帕金森病的新的药物靶点。

由此可见,促凋亡激酶JNK、CDK5和GSK3 β 均参与了多巴胺神经元凋亡的发生,同时阻断这几个激酶将能达到有效治疗帕金森病和其它神经退行性变疾病的目的。因此,申请人提出了以

JNK/CDK5/GSK3 β 为靶点治疗上述疾病的新方案。

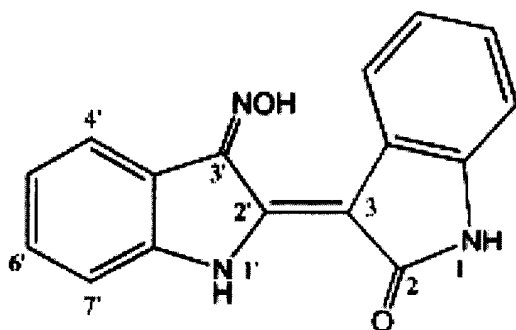
以JNK/CDK5/GSK3 β 为靶点治疗帕金森病和其它神经退行性变疾病的最简单的方法就是联合使用这三种激酶的抑制剂, 但最理想的方法莫过于“一石三鸟”——即以单一药物同时阻断这三个关键的促凋亡激酶。因此, 找到符合这一标准的抑制剂便成了完成本发明技术方案的关键。

[发明内容]

本发明的目的在于克服现有技术的不足之处, 提供一种能同时阻断JNK/CDK5/GSK3 β 这三种促神经细胞凋亡激酶的抑制剂, 为帕金森病的治疗开拓新思路、新方法; 为帕金森病和其它神经退行性变疾病治疗提供一类全新药物。

中药青黛以往被用于抗白血病的治疗。申请人的前期工作证明: 我国中药青黛中可提取出一个单体靛玉红(Indirubin), 其衍生物 Indirubin-3'-oxime (IO)是JNK/CDK5/GSK3 β 的抑制剂。

靛玉红衍生物(IO), 化学结构如下所示:



Indirubin-3'-oxime

本发明的目的是这样实现的：

靛玉红衍生物(IO)在制备治疗神经退行性变疾病药物中的应用。

靛玉红衍生物(IO)在制备治疗帕金森病药物中的应用。

本发明旨在以靛玉红衍生物为抑制剂，以它抑制的三种介导凋亡的激酶——JNK/CDK5/GSK3 β 为明确靶点，创新性地研究和开发出一类靶点明确、毒性小、特异性高、作用强的治疗帕金森病和其它神经退行性变疾病的新药物，提高上述疾病患者的生活质量，为家庭和社会解除沉重负担，具有巨大的社会效益，并能创造巨大的经济效益。

[附图说明]

图 1. 靛玉红衍生物(IO)保护了 MPTP 诱导的黑质多巴胺能神经元的丢失。

图 2. 靛玉红衍生物 (IO) 提高了 MPTP 降低的纹状体多巴胺水平。

图 3. 靛玉红衍生物(IO)改善了帕金森病小鼠的行为学异常。

图 4 . 靛玉红衍生物 (IO) 抑制 MPP^+ 诱导的体外培养黑质多巴胺能神经元。

[具体实施方式]

1. 靛玉红衍生物 (IO) 抗帕金森病实验动物多巴胺神经元凋亡分析 (细胞实验)

神经毒素 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)诱导帕金森病动物模型建立及靛玉红衍生物(IO)抗动物多巴胺能神经元凋亡分析按照实施例 1 进行。

2. 靛玉红衍生物(IO)抗体外多巴胺神经元凋亡分析(细胞实验)

体外黑质多巴胺神经元培养以及抑制剂神经元凋亡分析仍然按照实施例 2 进行。

实施例 1.

靛玉红衍生物(IO)对 MPTP 诱导的 C57 小鼠帕金森病动物模型中脑腹侧黑质多巴胺能神经元凋亡有保护性干预作用

1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)是一种白色粉末状神经毒素,可特异地破坏多巴胺神经细胞,从而损害大脑内黑质纹状体通路,使人与动物出现酷似帕金森病的症状。MPTP 用生理盐水配成所需浓度。

参照 Tatton N.A.和 Kish S.J.等的实验方法 (Neuroscience, 1997; 77: 1037-1048), 选取雄性 C₅₇BL/6N 型小鼠 90 只, 随机分为生理盐水(NS)组、MPTP(M)组、MPTP+IO 三个剂量组, 每组 15 只。实验第一天, IO 组分别腹腔注射 0.3mg/ml、1mg/ml、3mg/ml IO 10ml/kg, NS 组和 M 组均腹腔注射 3%DMSO 10ml/kg; 第二天 IO 组先腹腔注射 IO (剂量均同第一天), 其余组腹腔注射 3% DMSO

10ml/kg。30 min 后 IO 组、M 组一起腹腔注射 6mg/ml MPTP 5ml/kg, NS 组腹腔注射等容量的生理盐水, 连续 5 天 (共 6 天)。在 MPTP 注射的第二天, MPTP 注射后仔细观察并记录实验动物出现震颤麻痹症状的潜伏期和维持时间。潜伏期: 自注射 MPTP 完毕开始至出现震颤麻痹症状为止; 维持时间: 自出现震颤麻痹症状开始至震颤麻痹症状完全消失为止。在 MPTP 末次注射第 7 天, 每实验组取两只小鼠, 用 10%水合氯醛麻醉后, 从左心室进针进入主动脉, 顺序灌注血管冲洗液和 4%PFA 各 50 ml。血管冲洗液成分为: PBS 1000ml, 1%NaNO₂ 2ml, 肝素 0.02g 和 NaCl 9g。小鼠断头取全脑, 在 4%PFA 中室温浸泡 2 小时后转移至 30%蔗糖溶液中 4℃过夜。利用冰冻切片机于黑质致密部切取 35 μm 的脑片, 悬浮于 24 孔板内的 PBS 液中。每隔 5 片取一片做 ABC 染色以检测黑质神经元内酪氨酸羟化酶(TH)的含量。分析黑质内残存神经元的情况; MPTP 末次注射后第 10 天, 各实验组的小鼠在完成了行为学的检测后, 颈椎脱臼致死。取全脑, 沸水中煮 2 分钟后, 小心地剥离纹状体, 称重后保存于-70℃, 准备利用高效液相分析纹状体内多巴胺含量。

观察指标有黑质残存多巴胺神经元计数, 纹状体多巴胺含量和行为学的评分。

(1) 靛玉红衍生物(IO)保护了 MPTP 诱导的黑质多巴胺能神经元的丢失

图 1 为 IO 保护了 MPTP 诱导的黑质多巴胺能神经元的丢失的实验结果图。

多巴胺神经元以酪氨酸羟化酶(TH)的免疫组化来鉴定。MPTP 末次注射后第 7 天,各实验组中脑组织固定后切成厚度为 $35\mu\text{m}$ 的冰冻切片。(a) 溶剂对照组; (b) MPTP 处理组; (c-e) MPTP 和不同浓度的 IO 处理组。注意 MPTP 注射后,黑质 TH 阳性细胞数目明显减少(a vs. b),而 IO 可浓度依赖地增加黑质 TH 阳性细胞的数目(c-e)。图片来源于三次独立实验(放大: $40\times$)。 (f) 计数和统计结果。结果显示: IO 在浓度为 3,10,30mg/kg 就可明显保护 MPTP 诱导的 TH 阳性细胞,使其不致凋亡(图 1f, $p<0.01$, IO 和 MPTP 组相比)。

在 MPTP 末次注射后 7 天,用 ABC 法检测黑质内残余多巴胺神经元的数目。结果发现:与溶剂对照组相比, MPTP 导致黑质内多巴胺神经元的大量丢失(图 1.b),大约只残留对照组的 50.06 ± 6.35 ($P<0.01$) (图 1.f); 而 IO 以浓度依赖性的方式减少了因 MPTP 毒性所引起的多巴胺神经元的丢失(图 1.c-e)。在 IO 的高浓度组(30mg/kg),黑质内多巴胺神经元的数目与溶剂对照组的相近,即达到了正常水平。

(2) 靛玉红衍生物(IO)提高了 MPTP 降低的纹状体多巴胺水平

图 2 为 IO 提高了 MPTP 降低的纹状体多巴胺水平的结果图。其中图 2A 为计数图,图 2B 为对数量效曲线图。

在 MPTP 末次注射后十天,用高效液相色谱测定纹状体多巴胺含量。图 2A 为 IO 影响纹状体多巴胺浓度的计数图,图 2B 为 IO 影响纹状体多巴胺浓度的半对数量效曲线图。数据以平均值 \pm 标准误形式

表达。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ 与对照相比; *** $P < 0.01$ 与 MPTP 处理组相比。回归方程: $Y = 0.70 + 1.02X$, $r = 0.96$ 。

在 MPTP 末次注射后十天, 我们检测了纹状体多巴胺的浓度。与对照组 (7.80 ± 1.07 ng/mg) 相比, MPTP 引起了纹状体多巴胺浓度的大幅度下降, 只有 1.47 ± 0.29 ng/mg ($P < 0.01$); 而 IO 却能浓度依赖性地提高纹状体多巴胺的含量 (图 2A), IO 3、10、30 mg/kg 分别使多巴胺浓度上升至 1.73 ± 0.18 、 2.36 ± 0.30 和 2.50 ± 0.78 ($P < 0.01$)。

(3) 靛玉红衍生物(IO)改善了帕金森病小鼠的行为学异常

在 MPTP 末次注射后十天进行实验鼠的行为学测试。爬杆和悬挂实验的实施和评分按照方法学介绍进行。数据以平均值 \pm 标准误形式表达。(*: $P < 0.01$ 与对照组相比; **: $P < 0.01$ 与 MPTP 处理组相比)。

在 MPTP 末次注射后十天, 对帕金森病小鼠实施行为学检查。检查内容为爬杆试验(pole test)和悬挂试验(traction test)。

① 爬杆实验(pole test)

目的: 检测小鼠肢体运动协调情况。

方法: 将一直径为 2.5 厘米的软木小球固定于一根长 50 厘米粗 1 厘米的木杆顶端, 木杆上缠上纱布以防打滑, 然后将被测小鼠放到小球上, 并记录以下几个时间: 小鼠在顶球上停留的时间; 小鼠爬完杆子的上半部分所用的时间; 小鼠爬完杆子的下半部分所用的时间。然后按以下标准计分: 3 秒内完成上述某一动作的记 3 分; 6 秒内完成

的记 2 分；超过 6 秒的记 1 分。最后计算三项累计得分情况，并作统计学分析。

②悬挂实验 (traction test):

目的：检测小鼠肢体运动协调情况。

方法：将受试小鼠两前爪悬于一水平电线上，如小鼠用两后爪抓住电线则记 3 分；如用一后爪抓住电线则记 2 分。如果小鼠两后爪均抓不住电线则记 1 分，最后计算得分情况，并作统计学分析。

实验结果显示：在 MPTP 撤离后，我们能够从爬杆试验和悬挂试验中清楚地观察到实验动物肢体运动的不协调性（图 3）。在爬杆试验中，对照组小鼠爬完杆子的上半部分所用的时间和爬完杆子的下半部分所用的时间要比 MPTP 组的少得多。其中，对照组小鼠爬完杆子的上半部分和下半部分所用的时间分别为 2.61 秒和 3.94 秒；而 MPTP 组小鼠则分别用了 7.21 秒和 8.63 秒 ($P<0.01$)。与 MPTP 组相比，IO 使所用时间明显减少，高浓度组 (30mg/kg) 所用的时间与对照组相仿。

在悬挂试验中，对照组小鼠用四肢抓住电线，而 MPTP 组小鼠却只能用前爪抓住电线，后爪无力；IO 处理的小鼠虽然有的后爪仍然运动受阻，但至少可以用一只后爪抓住电线，表明后肢运动有所改善。

实施例 2.

靛玉红衍生物 (IO) 对 1-甲基-4-苯基吡啶离子 (1-methyl-4-phenylpyridiniumion, MPP^+) 诱导的体外培养的中脑腹侧黑质多巴胺能神经元凋亡有保护性干预作用

如图 4, 用孕 14 天胎鼠体外培养黑质多巴胺能神经元。体外培养第 7 天, 用 $10\ \mu\text{M}$ MPP^+ 诱导神经元凋亡。特异性酪氨酸羟化酶抗体检测 TH 阳性细胞 (a) 溶剂对照组, 红色荧光为 TH 阳性细胞; (b) $10\ \mu\text{M}$ MPP^+ 使 TH 阳性细胞数目减少; IO $1\ \mu\text{M}$ (c) 和 $3\ \mu\text{M}$ (d) 挽救了神经元的凋亡。(放大: $\times 200$)。

MPP^+ 是 MPTP 在体内的活性代谢产物, MPP^+ 可诱导的体外培养的胎鼠腹侧中脑多巴胺神经元凋亡。

参考文献的细胞培养方法(J Neurosci, 1998; 18(13):4929-37. Restor Neurol Neurosci. 2003;21(1-2):29-37.), 取孕 14 天的大鼠, 用 CO_2 窒息后颈椎脱臼致死。乙醇消毒腹部后用剪刀垂直剪开腹部, 暴露腹腔内容物, 向两边延长切口至肋肋。无菌条件下取出子宫, 用冰 D-Hank 液洗净, 再经 75% 酒精洗浴 30s, 置于盛有冰 D-Hank 液的平皿中。用小剪刀沿子宫系膜对侧缘剪开子宫, 取出胚胎, 于解剖显微镜下检查胎鼠的顶臀距 (CRL) 为 10—12mm, 置于盛有冰 D-Hank 液的平皿中待用。用解剖刀从眼睛经过嘴巴直到腹侧的中脑褶皱切一刀; 滚动胎儿使其背向下, 从脑干祛除前脑, 暴露侧脑室系统和它作为第三脑室及中央导水管在脑干的延伸; 用分离剪向背面剪去两边的脑室, 接着近尾部剪一刀, 在中脑皱褶的底部再剪一刀; 腹侧中脑 (ventral mesencephalon, VM) 的残余就与脑的其他部分分离了。用镊子将上面的脑膜清除后将分离的 VM 放入另一个装有冷解剖液 (500ml 中含有氯化钠 36.25g, 氯化钾 2g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.91g, 葡萄糖 13g, 酚红 50mg, HEPES 29.7g, pH 7.4) 的血中。剥去脑膜,

用组织切片机切碎组织后加入 0.1%胰酶溶液（必须在 37℃浴槽内预热）20ml，在 37℃下消化 15min 后加入 10ml 预热的 DNA 酶和胰酶抑制剂终止反应。1500rpm 离心 5min 后吸去上清液，加入破碎液 15ml（含 1.2mg DNase I，7.8mg 胰酶抑制剂，15ml 解剖液，150 μ l 3.82% MgSO_4 ）；用吸管轻轻吹打 10 次，制成细胞悬液。静置 15min，将上清（约为总体积的 9/10）吸至另一试管中。1500rpm 离心 5min，用培养基稀释细胞悬液至 5×10^5 个/ml。将细胞悬液接种在预先用 Poly-Lysine 包被的 24 孔板（每孔 0.5ml）内。置 37℃，5% CO_2 培养箱内培养，24 h 后在培养液内加入 5 μ M Ara-C 以抑制胶质细胞生长。每 3 天换一次培养液，在倒置相差显微镜下动态观察细胞生长情况。

在培养的第五天，不同浓度的 IO 预孵 2 h 后，在培养基中加入终浓度为 10 μ M 的 MPP⁺，48 h 后做 TH 染色，观察 IO 对 MPP⁺诱导凋亡的黑质神经元的保护作用。对照组加等体积的 DMSO，阴性对照组直接加 10 μ M 的 MPTP。观察指标主要是酪氨酸羟化酶染色阳性的 TH 细胞计数。

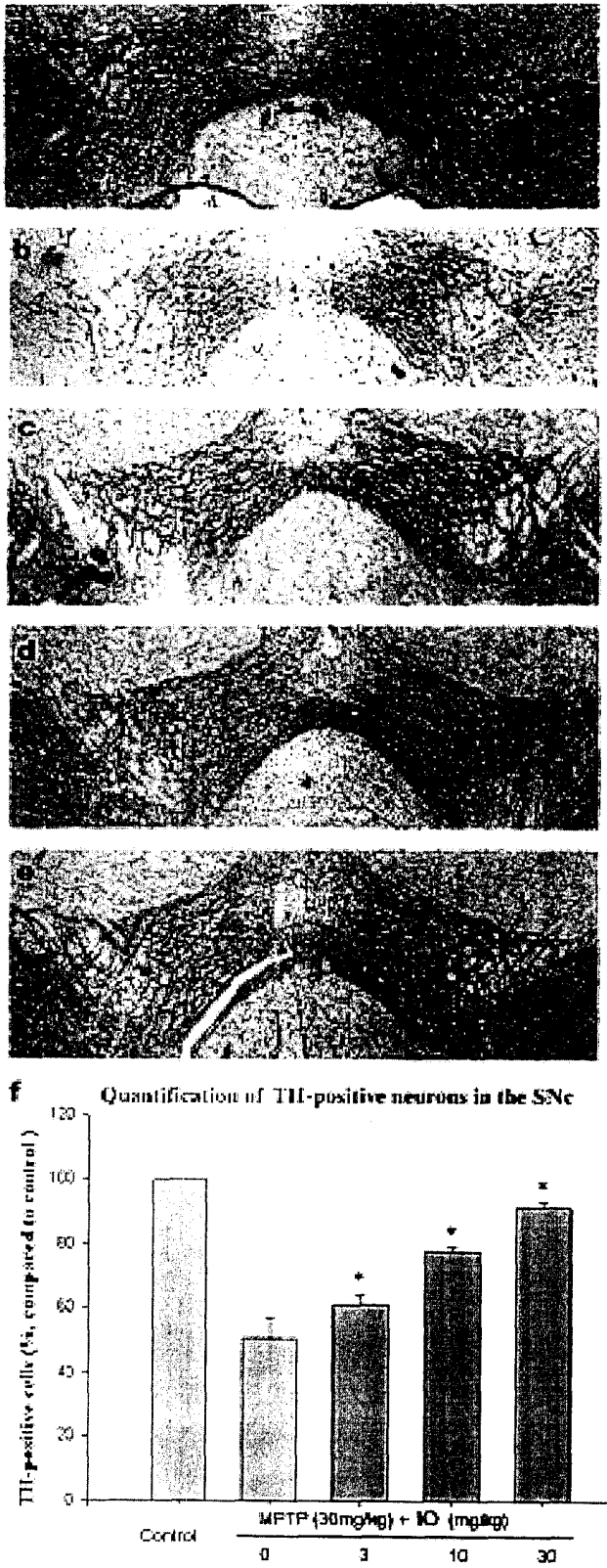


图 1

A

Treatment	n	dopamine concentrations in the striatum (ng/mg)
vehicle	10	7.80 ± 1.07
MPTP 30mg/kg	8	$1.47 \pm 0.29^{**}$
IO 1mg/kg	7	$1.73 \pm 0.18^{***}$
IO 10mg/kg	9	$2.36 \pm 0.30^{***}$
IO 30mg/kg	7	$2.50 \pm 0.78^{***}$

B

The effect of IO on striatal dopamine concentrations

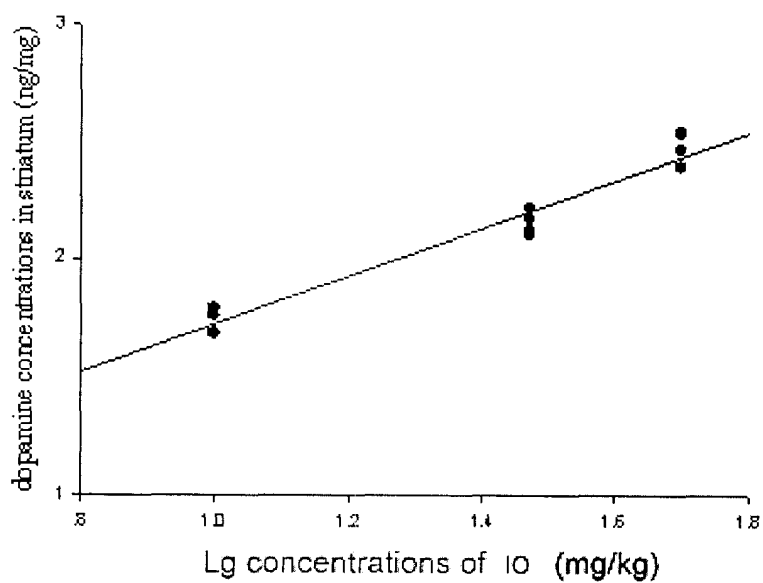


图 2

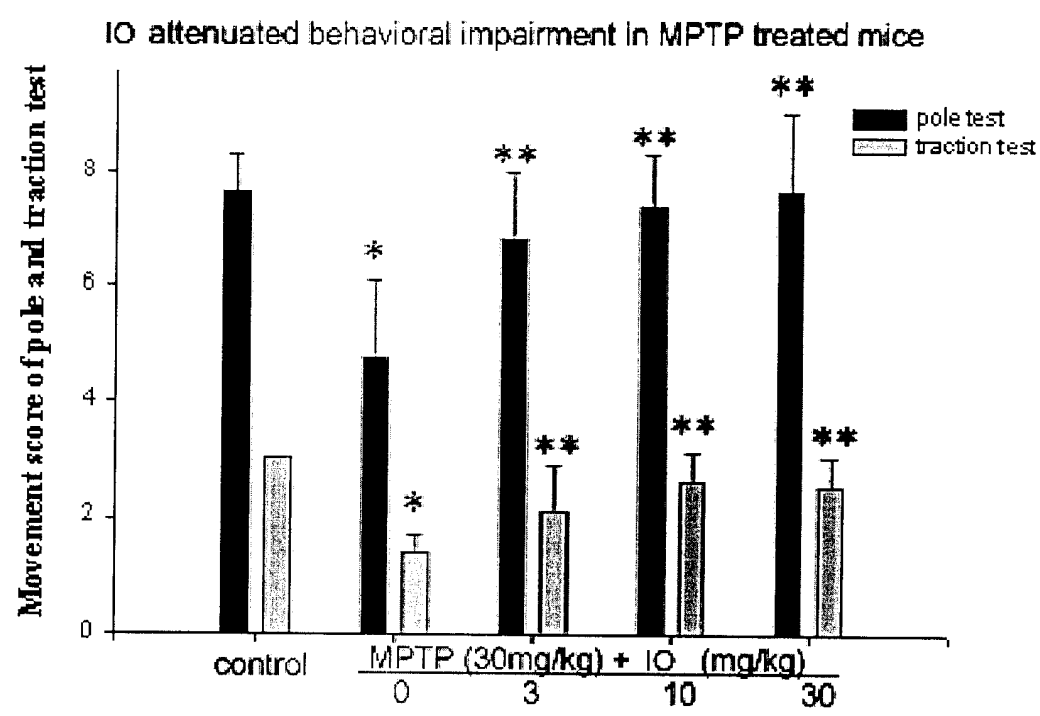


图 3

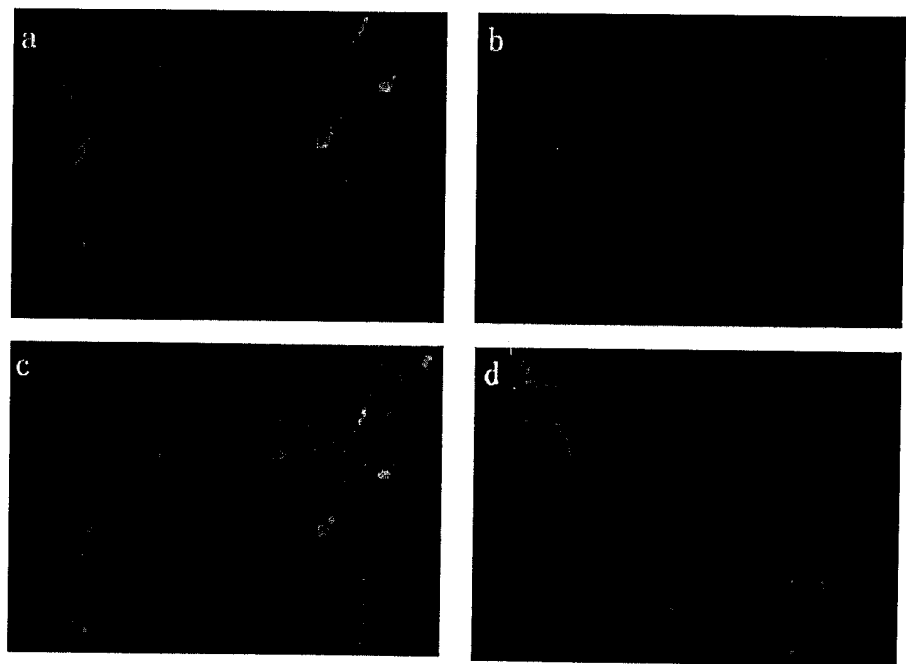


图 4