

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 31/7084 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680009069.4

[43] 公开日 2008年5月14日

[11] 公开号 CN 101180066A

[22] 申请日 2006.2.1

[21] 申请号 200680009069.4

[30] 优先权

[32] 2005.2.3 [33] GB [31] 0502250.4

[86] 国际申请 PCT/GB2006/000343 2006.2.1

[87] 国际公布 WO2006/082397 英 2006.8.10

[85] 进入国家阶段日期 2007.9.20

[71] 申请人 伊姆太斯有限公司

地址 英国伦敦

[72] 发明人 A·D·米勒 M·赖特

J·A·坦纳 N·洛佐瓦亚

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 唐晓峰

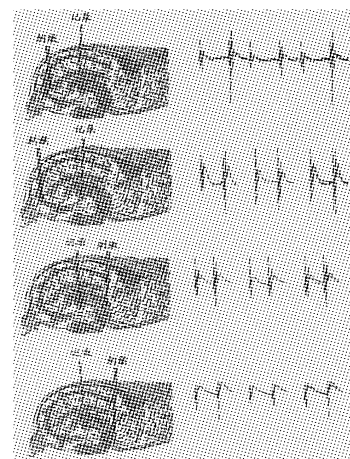
权利要求书 3 页 说明书 30 页 附图 23 页

[54] 发明名称

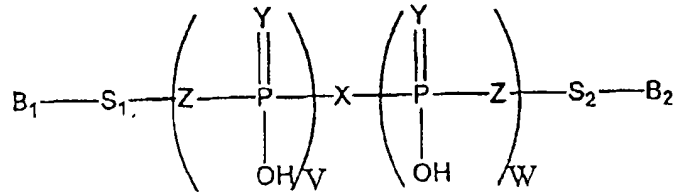
二核苷多磷酸衍生物的新应用

[57] 摘要

本发明提供了具有式(I)的二核苷多磷酸类似物和衍生物或其药学上可接受的盐在制备用于如下情况中的一种或多种的药剂中的应用: 治疗局部缺血、诱导局部缺血耐受、调节脑缺血、在局部缺血情况开始时延缓低氧去极化发作; 作为神经防护剂; 作为组织防护剂; 治疗疼痛; 和治疗炎症, 其中 X 选自: 其中 X¹ 和 X² 独立地选自 H、Cl、Br 和 F; Y 各自独立地选自 S 和 O; Z 各自独立地选自 -CX³X⁴、-NH-、-O-; 其中 X³ 和 X⁴ 选自 H、Cl、Br 和 F; B1 和 B2 独立地选自腺嘌呤、鸟嘌呤、黄嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶、胞嘧啶和肌苷; S₁ 和 S₂ 独立地选自核糖、开链核糖、2'-脱氧核糖、3'-脱氧核糖和阿拉伯呋喃糖苷; V 选自 0、1、2、3、4 和 5; W 选自 0、1、2、3、4 和 5; 且 V+W 为 2-6 的整数。



1. 式 (I) 的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于如下情况中的一种或多种的药剂中的应用:



治疗局部缺血;

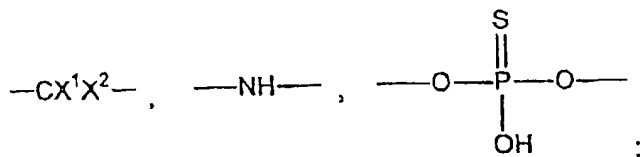
作为神经防护剂;

作为组织防护剂;

治疗疼痛; 和

治疗炎症,

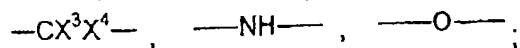
其中 X 选自:



其中 X^1 和 X^2 独立地选自 H、Cl、Br 和 F;

Y 各自独立地选自 S 和 O;

Z 各自独立地选自



其中 X^3 和 X^4 选自 H、Cl、Br 和 F;

B_1 和 B_2 独立地选自腺嘌呤、鸟嘌呤、黄嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶、胞嘧啶和肌苷;

S_1 和 S_2 独立地选自核糖、2'-脱氧核糖、3'脱氧核糖、阿拉伯呋喃糖苷及其开环形式;

V 选自 0、1、2、3、4 和 5;

W 选自 0、1、2、3、4 和 5; 且

V + W 为 2 - 6 的整数。

2. 权利要求 1 的式 (1) 的化合物的应用, 其中 B_1 和 B_2 中至少一个为腺嘌呤。

3. 权利要求 1 或 2 中任意一项的式 (1) 的化合物的应用, 其中 B_1 和 B_2 均为腺嘌呤。

4. 上述权利要求中任意项的式 (1) 的化合物的应用, 其中 S_1 和 S_2 相同。

5. 权利要求 4 的式 (1) 的化合物的应用, 其中其中 S_1 和 S_2 为核糖。

6. 上述权利要求中任意项的式 (1) 的化合物的应用, 其中 Z 各自为 O 。

7. 上述权利要求中任意项的式 (1) 的化合物的应用, 其中 V 为 2。

8. 上述权利要求中任意项的式 (1) 的化合物的应用, 其中 W 为 2。

9. 上述权利要求中任意项的式 (1) 的化合物的应用, 其中 X 为:
 $-CX^1X^2-$ 。

10. 上述权利要求中任意项的式 (1) 的化合物的应用, 其中 X^1 和 X^2 均为 H 。

11. 上述权利要求中任意项的式 (1) 的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于下列情况中的一种或多种的药剂中的应用:

(a) 治疗与 $P2$ -受体相关的疾病和医学情况;

(b) 治疗与 $A1$ 腺苷受体相关的疾病和医学情况;

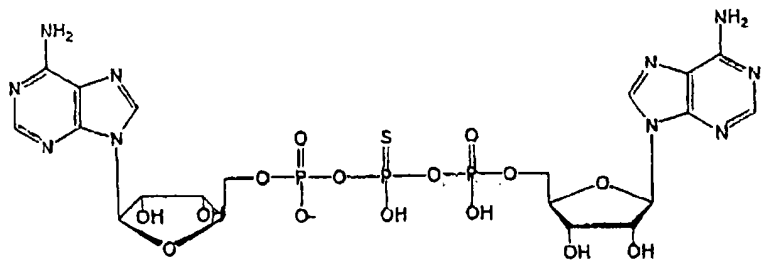
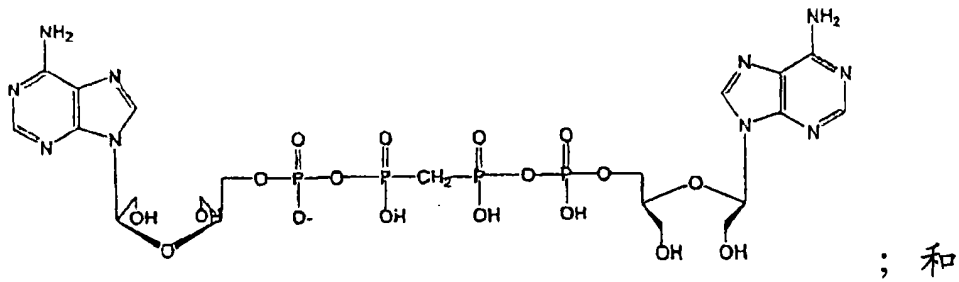
(c) 减缓 $P2$ -受体的活性;

(d) 减缓 $A1$ 腺苷受体的活性; 和

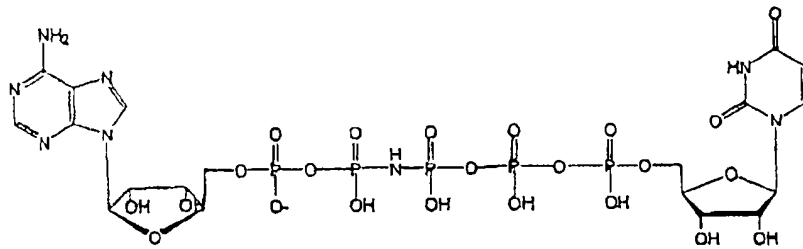
(e) 通过哺乳动物细胞中的 G 蛋白门控内向整流 K^+ ($GIRK$) 通道调节 K^+ 内向流量。

12. 选自如下的化合物:

(a) $App_s pA$

(b) A 二醇 ppCH₂ppA 二醇

(c) AppNHpppU



13. 基本上如本文所述的式(1)的化合物涉及实施例中的任意一个中的应用。

二核苷多磷酸衍生物的新应用

本发明涉及二核苷多磷酸类似物和衍生物的应用。

二核苷多磷酸为包含两个通过多磷酸桥连接的核苷部分的一组化合物。二核苷多磷酸形成重要族的化合物并且认为它们具有胞内和胞外生物作用^{1,2}。

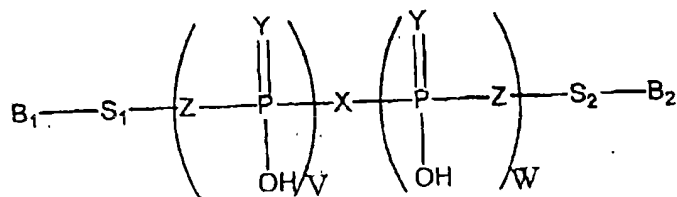
特别关注的一种二核苷多肽为二腺苷 5', 5'''-P¹, P⁴-四磷酸酯 (Ap₄A)。认为 Ap₄A 在原核生物和低等真核生物中起对细胞增殖和环境应激的反应的作用并且在高级真核生物 (eukaryotes) 的胞外信号传导中起作用^{3,4}。还报导了 Ap₄A 可以在确定的中风和帕金森病大鼠模型的皮质和中脑中具有防护作用⁵。

已经报导了许多制备二核苷多磷酸的合成方法并且已经更具体地尝试进行了对其生物作用的研究^{6,7}。尽管如此, 并且实际上广泛发现了许多这些化合物且已知了它们许多年³, 但是经证实难以确定这类化合物的生物功能。实际上, 有关这类化合物作用上的混乱已经产生了不确定的提示, 即它们可以作为"友或敌"起作用⁸。一般而言, 在有二核苷多磷酸存在下获得体内或离体充分再现相关生物功能的结果相当困难, 其原因并不清楚, 但是可能与水解不稳定性相关³。

有关研究和利用二核苷多肽类的尝试还受到了从天然来源中分离和纯化这类化合物中遇到的常见困难的阻碍。例如, 二腺苷多磷酸类 (Ap_nA; n = 2-6) 表现出对生物流体和组织样品中的特异性酶促和非特异性水解高度不稳定^{3,10}。

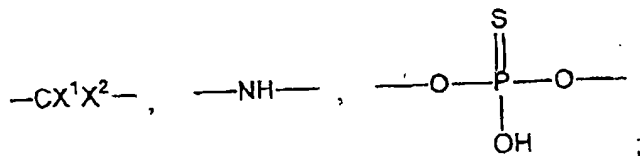
本发明解决了现有技术中的问题。

本发明在一个方面中提供了式 (I) 的化合物



或其药学上可接受的盐在制备用于如下情况中的一种或多种的药剂中的应用：

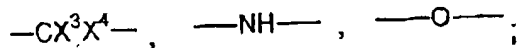
治疗局部缺血；
 作为神经防护剂；
 作为组织防护剂；
 治疗疼痛；和
 治疗炎症，
 其中 X 选自：



其中 X^1 和 X^2 独立地选自 H、Cl、Br 和 F；

Y 各自独立地选自 S 和 O；

Z 各自独立地选自



其中 X^3 和 X^4 选自 H、Cl、Br 和 F；

B_1 和 B_2 独立地选自腺嘌呤、鸟嘌呤、黄嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶、胞嘧啶和肌苷；

S_1 和 S_2 独立地选自核糖、2'-脱氧核糖、3'脱氧核糖、阿拉伯呋喃糖苷及其开环形式；

V 选自 0、1、2、3、4 和 5；

W 选自 0、1、2、3、4 和 5；且

V + W 为 2 - 6 的整数。

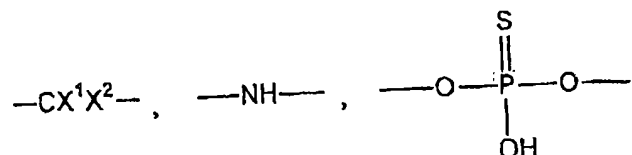
我们发现通过我们对 X 和 Z 基团的选择，我们提供了化合物(和新化合物)在有生物流体和组织样品存在下产生持久和可再现生物效果的应用。因此，提供了能够在体内可再现的应用和新化合物。

为便于参考，本发明的这些和其它方面在适当部分的标题中描述。然而，各部分中的教导不一定是对每一特定部分的限定。

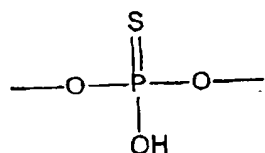
优选方面

X

X选自:

其中 X^1 和 X^2 独立地选自 H、Cl、Br 和 F。在一个方面中, X 为 $-NH-$ 。

在一个方面中, X 为:

在一个方面中, X 为 $-CX^1X^2-$ 。在一个方面中, X^1 和 X^2 的至少一个为 H。在一个方面中, X^1 和 X^2 中至少一个为 Cl。在一个方面中, X^1 和 X^2 中至少一个为 Br。在一个方面中, X^1 和 X^2 中至少一个为 F。优选 X^1 和 X^2 均为 H。优选 X 为 $-CX^1X^2-$ 且 X^1 和 X^2 均为 H。

Y

Y 各自独立地选自 S 和 O;

在一个方面中, 至少一个 Y 为 S。

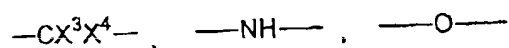
在一个方面中, Y 各自为 S。

在一个方面中, 至少一个 Y 为 O。

优选 Y 各自为 O。

Z

Z 各自独立地选自:



其中 X^3 和 X^4 选自 H、Cl、Br 和 F;

在一个方面中, 至少一个 Z 为 $-CX^3X^4-$;

在一个方面中, Z 各自为 $-CX^3X^4-$;

在一个方面中, X^3 和 X^4 中至少一个为 H。

在一个方面中, X^3 和 X^4 中至少一个为 Cl。

在一个方面中, X^3 和 X^4 中至少一个为 Br。

在一个方面中, X^3 和 X^4 中至少一个为 F。

优选 X^3 和 X^4 均为 H。

优选 Z 为 $-CX^3X^4-$ 且 X^3 和 X^4 均为 H。

在一个方面中, 至少一个 Z 为 $-NH-$ 。

在一个方面中, Z 各自为 $-NH-$ 。

在一个方面中, 至少一个 Z 为 $-O-$ 。

优选 Z 各自为 $-O-$ 。

B_1 和 B_2

B_1 和 B_2 独立地选自腺嘌呤、鸟嘌呤、黄嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶、胞嘧啶和肌苷;

在一个方面中, B_1 和 B_2 中至少一个为尿嘧啶。

在一个方面中, B_1 和 B_2 中至少一个为鸟嘌呤。

优选 B_1 和 B_2 中至少一个为腺嘌呤。

优选 B_1 和 B_2 中至少一个为腺嘌呤且 B_1 和 B_2 中的另一个为鸟嘌呤。

优选 B_1 和 B_2 中至少一个为腺嘌呤且 B_1 和 B_2 中的另一个为尿嘧啶。

优选 B_1 和 B_2 均为腺嘌呤。

S_1 和 S_2

S_1 和 S_2 独立地选自核糖、2'-脱氧核糖、3'脱氧核糖、阿拉伯呋喃糖苷及其开环形式。

优选 S_1 和 S_2 中至少一个为核糖。

优选 S_1 和 S_2 中至少一个为核糖的开环形式。

优选 S_1 和 S_2 中至少一个为核糖且 S_1 和 S_2 中的另一个为核糖的开环形式。

优选 S_1 和 S_2 相同。

优选 S_1 和 S_2 为核糖。

V 和 W

V 选自 0、1、2、3、4 和 5。

W 选自 0、1、2、3、4 和 5。

V + W 为 2 - 6 的整数，即 V 和 W 之和可以为 2、3、4、5 或 6。

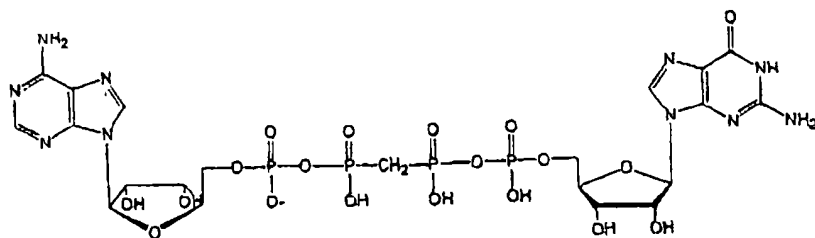
优选 V 为 2。

优选 W 为 2。

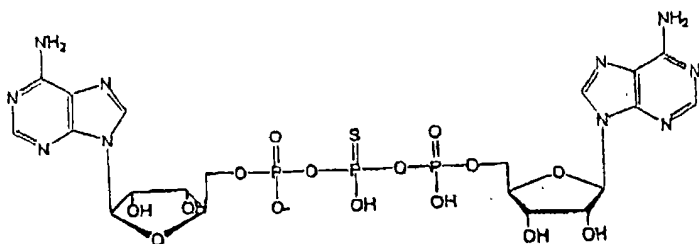
优选 V + W 为 4。

其它方面和特征

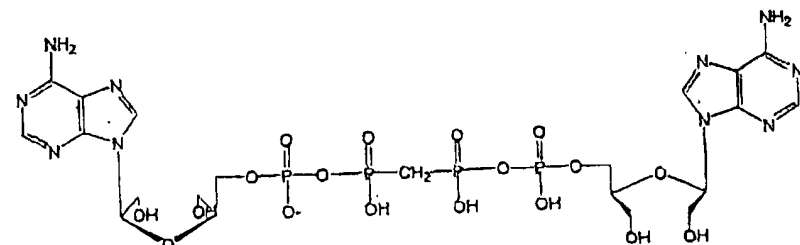
优选式 (1) 的化合物为：



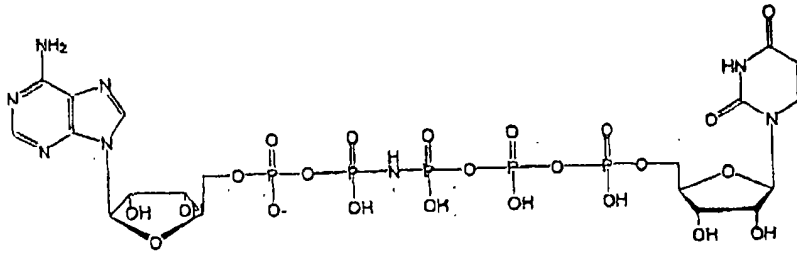
优选式 (1) 的化合物为：



优选式 (1) 的化合物为：



优选式 (1) 的化合物为：

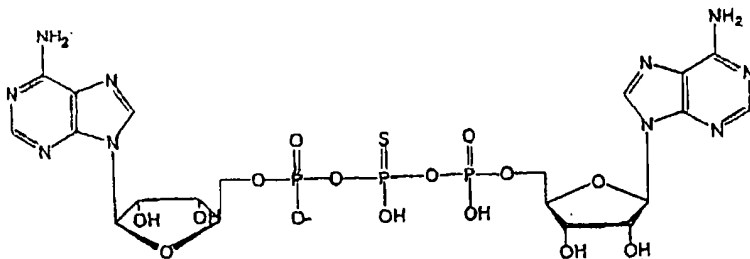


本发明的另一个方面提供了如上文所述的式(1)的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于如下情况中的一种或多种的药剂中的应用:

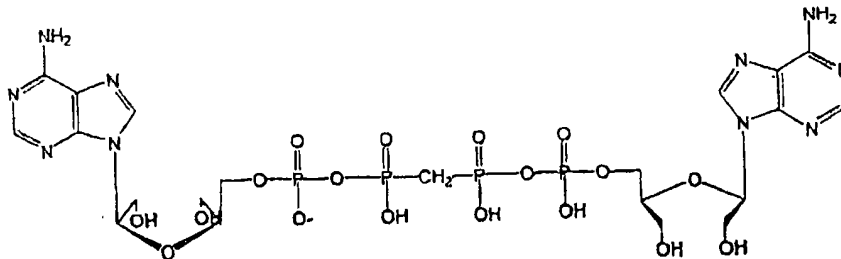
- (a) 治疗与 P2-受体相关的疾病和医学情况;
- (b) 治疗与 A1 腺苷受体相关的疾病和医学情况;
- (c) 减缓 P2-受体的活性;
- (d) 减缓 A1 腺苷受体的活性; 和
- (e) 通过哺乳动物细胞中的 G 蛋白门控内向整流 K^+ (GIRK) 通道调节 K^+ 内向流量。

本发明在另一个方面中提供了选自如下的化合物:

- (a) App₅pA

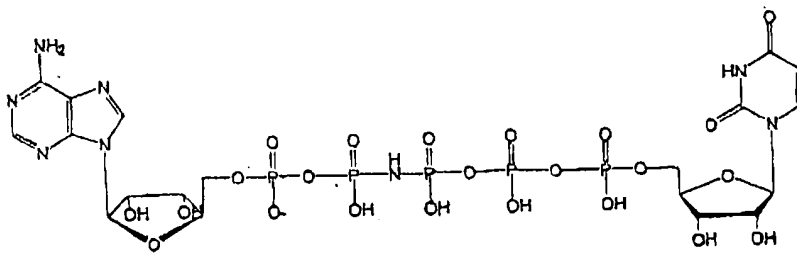


- (b) A_{二醇}ppCH₂ppA_{二醇}



; 和

- (c) AppNHpppU



优选化合物为 App_spA。

优选化合物为 A_{二醇}ppCH₂ppA_{二醇}。

优选化合物为 AppNHpppU。

局部缺血

在一个方面中，本发明涉及治疗局部缺血和局部缺血相关疾病和病症的方法。这些治疗方法可以包括诱导局部缺血耐受，调节脑缺血并且在局部缺血情况开始时延缓低氧去极化阶段的发作。局部缺血情况在对人或动物体的器官或部分供血不足时发生。作为这种供血不足的结果，身体的器官或部分缺氧和营养物，诸如葡萄糖。这可以导致身体器官或部分受损。例如，如果对中枢神经系统(CNS)的任何部分的供血中断，那么CNS该部分的神经细胞(或神经元)会快速变性。

特别地，本发明可以涉及化合物在制备用于治疗下列病症的药剂中的应用：局部缺血；整体缺血；脑缺血；神经细胞缺血，诸如与脊柱损伤和头部创伤相关的神经细胞缺血；心肌缺血；心血管疾病，选自：高血压、心绞痛、稳定和不安的心绞痛、普林兹迈(Prinzmetal)心绞痛、心律失常、血栓形成、栓塞和充血性心力衰竭，包括慢性或急性充血性心力衰竭；或特征在于因外周血管疾病导致的双下肢局部缺血的疾病，包括间歇性跛行；特征在于平滑肌痉挛的疾病，选自：输尿管痉挛、膀胱痉挛、子宫痉挛和肠易激综合征；或预防外科手术过程中的血管收缩和/或缺血组织损伤，选自：旁道移植、血管造影术、血管成形术、移植过程中的器官保护、高血压危象或术后高血压。

神经性疾病和障碍

本发明可以用于治疗神经性疾病和障碍，特别是治疗神经元细胞。

这类治疗包括治疗脑外伤、脑或脑血管缺血、神经变性疾病、神经元细胞中毒和保护神经移植物。

神经变性疾病为特征在于正常神经功能改变的一组病症，可以导致神经元死亡(这些疾病中的大部分,尤其是晚期阶段与严重神经元缺失有关)。这些神经变性疾病可以包括肌萎缩性侧索硬化、阿尔茨海默病、帕金森病和亨廷顿舞蹈病。

疼痛

在另一个方面中,本发明可以用于治疗疼痛。这类治疗包括治疗与关节疾病(诸如类风湿性关节炎和骨关节炎)相关的疼痛,与癌症相关的疼痛,术后痛,产后痛,与牙病(诸如龋齿和龈炎)相关的疼痛,与灼伤(包括晒伤)相关的疼痛,治疗骨病(诸如骨质疏松症、恶性高钙血症和佩吉特病),与运动损伤和扭伤相关的疼痛。

炎症

在另一个方面中,本发明可以涉及治疗炎症。炎症可以因各种情况导致,由此,例如本发明可以涉及治疗关节炎、心肌炎、脑炎、移植排斥、系统性红斑狼疮、痛风、皮炎、炎症性肠病、肝炎或甲状腺炎。

应激

在另一个方面中,本发明涉及治疗化学品和/或环境应激。特别地,本发明可以涉及化合物在诱导神经预调节中的应用。在给予合适的化合物后,这类神经预调节能够使神经组织耐受通常证明为致命性的化学品和/或环境应激水平和/或在其中存活。本发明中所述化合物的这种应用可以涉及这些化合物产生一氧化氮(NO)中的应用,而一氧化氮可以作为组织对化学品和/或环境应激预调节中的介质起作用。

现在借助于实施例并且仅参照附图来进一步详细描述本发明,其中:

附图 1 表示 AppCH₂ppG 的合成;

附图 2 表示 AppNHpppU 的合成;

附图 3 表示 A_{二醇}ppCH₂ppA_{二醇}的合成。

附图 4 表示顺向(上 2)和逆向(下 2)诱导的尖峰信号群的概况图,解释了电极的位置;

附图 5 表示增加量的 AppCH₂ppA 对顺向诱导的尖峰信号群(附图 5A),逆向诱导的尖峰信号群(附图 5B)和激发突触后电流 EPSCs(附图 5C)的作用;

附图 6 表示吡哆醛-磷酸-6-偶氮苯基-2',4'-二磺酸(PPADS)和 AppCH₂ppA 对顺向尖峰信号的影响;

附图 7 表示环戊基 teophylline (CPT)和 AppCH₂ppA 对顺向尖峰信号的影响;

附图 8 表示 α , β -亚甲基-ATP 对顺向尖峰信号的作用;

附图 9 表示增加量的 ATP γ S 对顺向尖峰信号的作用;

附图 10 表示二肌苷四氢磷酸酯(Ip₄I)和 AppCH₂ppA 对顺向尖峰信号的影响;

附图 11 表示二肌苷四氢磷酸酯(Ip₄I)和 AppCH₂ppA 对逆向尖峰信号的影响;

附图 12 表示 2-苯基-4,4,5,5-四甲基咪唑啉-1-氧基 3-氧化物(PTIO)和 AppCH₂ppA 对顺向尖峰信号的影响;

附图 13 表示在 22℃ 下 AppCH₂ppA 对顺向尖峰信号的影响;

附图 14 表示在 36℃ 下 AppCH₂ppA 对顺向尖峰信号的影响。

现在在下列实施例中进一步详细描述本发明。

实施例

将在 Bruker Esquire 3000 机器上进行的电喷雾质谱(ES-MS)设定在 100%碎片强度。在包含 0.1%乙酸的 1:1 乙腈:水中上样。在 400 MHz Bruker Ultrashield 上记录质子和磷 NMR 光谱,其中在 D₂O 中样品在 300K。将 64 次扫描用于质子光谱,1024 次扫描用于磷。为了简单性,

仅描述用于化合物鉴定的那些 ^1H NMR 信号。

化合物的制备

AppCH₂ppG

将 10 x 1ml 的 LysU 反应混合物部分制成等分部分。该混合物包含在 pH 8.0 的 50 mM Tris-HCl 缓冲液中的 2 mM L-赖氨酸、10 mM MgCl₂、160 μM ZnCl₂ 和 6U 焦磷酸酶^{7,11}。将核苷酸加入到 8 mM ATP 和 4 mM GMPPCP (α , β -亚甲基-鸟苷 5'-三磷酸) 中, 涡旋该混合物并且将 LysU 加入至 9 μM 浓度(二聚体)。然后将该混合物在 38°C 下孵育并且通过使用 2 ml SOURCE 15Q (Amersham Biosciences) 离子交换柱的 HPLC 监测反应, 所述的柱用 50 mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 装填并且用 0 - 0.5 M 梯度的盐以 2ml/分钟在 5 分钟内洗脱⁹。25 分钟后, ATP 和 GMPPCP 的峰(预先在 5.5 分钟和 5.2 分钟时观察)消失并且在 7.2 分钟时被 Ap₄A 峰取代并且在 6.8 分钟时被靶标取代。持续孵育在 1 小时后将 Ap₄A 转化成 Ap₃A (5.1 分钟), 无靶标降解。使用装填了水的 60 ml SOURCE Q 柱纯化 AppCH₂ppG, 用 0 - 2M 梯度的 TEAB (碳酸氢三乙铵缓冲液) 以 8 ml/分钟在 30 分钟内洗脱并且冻干以便在 -20°C 下储存^{9,12}。SoQ/NaCl HPLC 显示单峰并且产物具有 848.9 m/z 的 ES-MS (M-H)。

^1H NMR: 8.39 (1H, s, 8-H-AD), 8.15 (1H, s, 2-H-Ad), 8.03 (1H, s, 8-H-Gu), 6.04 (1H, s, 1'-H-rib[Ad]), 5.82 (1H, s, 1'-H-rib[Gu]), 2.46 (2H, t, O-CH₂-O).

未观察到 2-H-Gu 推测的不稳定,

^{31}P NMR: 8.74 (2P, m, β -P), - 10.63 (2P, m, α -P).

产率为 90%+

AppNHpppU

AppNHpppU 的 LysU 合成需要 NH 取代的腺苷四磷酸, 它并非可得到的。因此, 我们使用了基于脱水剂 EDC (1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)

碳-二亚胺)的化学偶联¹³。AMPPNHP(腺苷 5'-(β , γ -亚氨基)三磷酸, 50 mg)和 UDP(尿苷二磷酸, 150 mg)溶于 10x 1 ml 等分部分中包含 75 mM MgCl₂的 pH 6.5 的 2 M HEPES。将 400 mg EDC 加入到各等分部分中并且将该混合物在 37°C 下孵育, 通过 SoQ/NaCl HPLC (UDP 3.8 分钟, AMPPNHP 4.7 分钟)再次进行监测。12 小时后, 在 6.1 分钟和 7.0 分钟观察到两个产物峰。用 SoQ/TEAB 柱提取它们并且冻干^{9, 12}。通过 SoQ/NaCl HPLC 证实两个产物均显示出单一谱带, 6.1 分钟具有 788.6 m/z 的 ES-MS (M-H) 并且鉴定为 Up₄U, 而 7.0 分钟具有与 ApppNHppU 相匹配的 890.7 m/z。

ApppNHppU ¹H NMR: 8.52 (1H, s, 8-H-Ad), 8.21
(1H, s, 2-H-Ad), 7.87 (1H, s, 6-H-Ur), 6.08 (1H, s, 1'-H-rib[Ad]), 5.90 (2H, d 1'-H-rib[Ur]
和 5-H-Ur),

未观察到 3-H-Ur (推测不稳定), 0-NH-0 模糊, ³¹P NMR: 复杂多重性的三个接近谱带, -10.89, -10.97 和 -11.25。将后者暂时鉴定为 α -P, β -P 和 ϵ -P 重叠。Up₄U ¹H NMR: 7.91 (2H, s, 6-H-Ur), 5.93 (4H, s, 1'-H-rib 和 5-H-Ur) ³¹P NMR: 在 -11.46 ppm 观察到单谱带 (dm)。与起始 AMPPNHP 相比产率为 45% (但是仍然回收了一定的原料)。

A_{二醇} ppCH₂ppA_{二醇}

将 AppCH₂ppA (100mg, 预先通过 LysU 偶联由 ATP 和 AMPPCP [α , β -亚甲基-腺苷 5'-三磷酸]制备)⁹溶于 2 ml 蒸馏水。加入 150 μ l 0.3 M 高碘酸钠水溶液, 10 分钟后加入 50 μ l 0.5 M 硼氢化钠水溶液 (警告: H₂ 放出)。通过作为标准的 SoQ/NaCl HPLC 监测反应, 伴 AppCH₂ppA 在 5.8 分钟的峰在氧化成二醛时为向上移动至 6.2 分钟并且在还原成二醇时下落至 4.4 分钟。通过 SoQ/TEAB^{9, 12} 分离得到两个主要的谱带, 提取它们并且冻干。通过 SoQ/NaCl HPLC 发现两者均显示单峰, 其中较大的产物具有 836.9 m/z 的 ES-MS (M-H), 而较少的产物具有 585.7 m/z。它们分别与 A_{二醇} ppCH₂ppA_{二醇} 和 A_{二醇} ppCH₂pp 相匹配。A_{二醇} ppCH₂ppA

二醇

^1H NMR: 8.34 (2H, s, 8-H-Ad), 8.13 (2H, s, 2-H-Ad), 5.96 (2H, s, 1'-H-rib), 3.97 (4H, s, 2'-H-rib), 3.80 (4H, s, 3'-H-rib), 3.70 (4H, s, rib-CH₂-O), 2.31 (2H, t, O-CH₂-O) ^{31}P NMR: 7.17 (2P, q, β -P), -11.16 (2P, d, α -P).

A-二醇 ppCH₂pp ^1H NMR: 8.41 (1H, s, 8-H-Ad), 8.22 (1H, s, 2-H-Ad), 6.01 (1H, s, 1'-H-rib), 4.01 (2H, s, 2'-H-rib), 3.74 (4H, m, 3'-H-rib 和 rib-CH₂-O), 2.36 (2H, t, O-CH₂-O) ^{31}P NMR: 7.50 (1P, m, β -P), 6.45 (1P, q d, γ -P), -10.56 (1P, d, δ -P), -11.21 (1P, d m, α -P).

产率为 80%。

生物试验

需要下列生物数据以便确定二核苷多磷酸类似物的作用和机理。关键的是，如果证实化合物为 P2 和/或 A1 受体激动剂，那么可以预计它们具有令人印象深刻范围的潜在治疗特性。在过去的 25 年中，已经进行的许多研究提示用于中枢神经系统 (CNS) 和外周神经系统 (PNS) 的 P2 和/或 A1 受体激动剂促进各种 CNS 活性药物的作用或与之发生协同作用，所述的药物包括止痛药、抗精神病药、抗抑郁药、抗焦虑药、促智药/认知促进剂和各种对与中风相关的 CNS 损伤有效的活性剂。此外，这类受体激动剂还在其正确的方向上表现为有效的神经学化合物。

抗中风和局部缺血

作为 A1 受体激动剂起作用的化学活性剂表现出促进导致神经元兴奋性和兴奋性氨基酸 (EAA) 释放的稳定的神经膜电位²²。阻断 EAA 释放由此防止了与 N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 受体活化相关的神经中毒后遗症。A1 受体激动剂还可以减少与中风相关的细胞死亡和海马神经变性²²。

抗癫痫

作为 A1 受体激动剂起作用的化学活性剂在动物模型中降低各种化学和电刺激诱发的癫痫发作活动^{23,24}。在电引起的发作模型中，A1 受体激动剂为减轻癫痫发作严重程度和缩短期限而没有明显改变癫痫

发作阈值的抗惊厥剂²³。

抗神经变性

与局部缺血、低氧和癫痫相关的神经元超兴奋性也基于与老化相关的神经变性过程是广泛可接受的。作为 P2 和/或 A1 受体激动剂起作用的化学活性剂减轻 EAA 神经毒性并且产生的导致神经细胞死亡的钙动态平衡改变可以反映出与阿尔茨海默病 (AD) 和帕金森病 (PD) 相关的更敏锐的长期改变的急性表现²⁵。激动剂为起抑制自由基产生作用的有效的抗炎药²⁶且由此可以在提供可能的 AD 治疗中提供超过并且高于上述对神经递质介导的神经情况的直接作用的额外有益性。A1 受体激动剂可以减少纹状体多巴胺 (DA) D1 受体的高度亲和力²⁷。在功能上, A1 激动剂阻断 DA D1 受体-介导的利血平化的小鼠的运动活跃。或者, 激动剂可以减弱家兔中选择性 DA D1 活化诱导的口周运动障碍。精神运动功能的神经化学中的多巴胺能与嘌呤能 (purinergic) 系统之间的这种动态相互关系为通过 A1 受体调节改善多巴胺能机能障碍提供了新的可能性。

抗失眠

将作为 A1 受体激动剂起作用的化学活性剂直接给药入大脑引起了类似于在深度睡眠中观察到的 EEG 分布型, 表现为 REM 睡眠增加与导致总体睡眠增加的 REM 睡眠潜伏期减少²⁸。A1 选择性激动剂可以在引起慢波睡眠 (SWS) 增加前抑制 SWS 和反常睡眠 (PS)。

止痛

将 ATP 施用于感觉传入神经产生超兴奋性和强烈疼痛感觉。核苷酸还可以在给药局部位点上诱导感受伤害反应并且可以促进对其它有害刺激的感受伤害反应²⁹。ATP 的前感受伤害作用由存在于感觉传入神经上和脊髓中的 P2X 受体介导。同源 P2X3 和异源 P2X2/3 受体显然位于特异性传递感受伤害信号的感觉神经上³⁰。ATP 从大量细胞类型中释

放(例如交感神经、内皮细胞、内脏平滑肌)作为对创伤的反应³¹并且存在大量证据,即 P2X3 受体活化可以启动和促使于内脏伤害感受相关的外周和中枢致敏³¹。P2X3 受体表达在外周感觉纤维受损后在感觉传入神经和脊髓中得到增量调节³²。因此,可以预计研发选择性生物可利用的 P2X3 受体拮抗剂为治疗疼痛提供了新的化合物。

相反,作为 A1 受体激动剂起作用的化学活性剂的给药在广泛动物模型中提供了疼痛缓解(例如小鼠热板试验、小鼠-尾摇摆试验、大鼠福尔马林试验、小鼠腹部收缩试验^{29, 33, 34, 35}。A1 激动剂还有效地缓解大鼠模型的神经过疼痛³⁶并且抑制因脊柱注射 P 物质和谷氨酸激动剂 NMDA 引起的与疼痛相关的行为。在机制方面,已知 A1 受体激动剂可抑制谷氨酸释放入脊髓液并且还降低大鼠 P 物质的脑脊液水平^{29, 37, 38}。谷氨酸为与临床疼痛状态相关的脊髓背侧角神经元异常超兴奋性的关键介质(中枢致敏)³⁹。P 物质为伤害感受反应的另一种关键介质^{29, 37, 38}。A1 激动剂还表现出在缓解人疼痛中的应用³⁸。A1 激动剂的脊柱给药缓解了神经性疼痛患者的异常性疼痛,而不会影响正常的感觉。输注改善了临床疼痛模型中的疼痛症状,从而减轻了患有神经性疼痛的患者的自发性疼痛、进行性痛觉过敏和异常性疼痛。此外,手术过程中低剂量输注激动剂可以减少对挥发性麻醉药和术后阿片类止痛药的需求^{37, 40}。

一般方法

海马切片制备

本研究针对 21-日龄的 Wistar 大鼠(WAG/GSto, Moscow, Russia)进行。在快速断头后,即刻将大鼠大脑转移至培养皿中,其中包含冷却的(4℃) 120 mM NaCl、5mM KCl、26mM NaHCO₃、2mM MgCl₂和 20 mM 葡萄糖的组合物溶液。可以不使用钙盐以减少可能的神经元损害。用 95%O₂/5%CO₂ 气体混合物使该溶液恒定发泡以便维持 pH 7.4。用剃刀刀片沿泡状纤维手动切下海马切片(300-400μM 厚度)以保护兴奋连接的片层结构。在预孵育和实验过程中,将切片完整地保持浸入 pH7.4 的

胞外溶液，它由 135mM NaCl、5mM KCl、26mM NaHCO₃、1.5mM CaCl₂、1.5mM MgCl₂和 20mM 葡萄糖组成，其中在 30-31℃下用 95% O₂/5% CO₂使该溶液持续发泡。在实验过程中，所述的胞外溶液还包括 25-50mM 印防己毒素(RBI, Natick, MA, USA)，以便抑制中间神经元的抑制活性。电生理测量值为预孵育至少 2 小时后的记录。

电生理测量

用海马的 CA1 分支区域中的标准全细胞膜片钳技术记录作为对 Schaffer 侧枝/联接途径刺激反应的兴奋性突触后电流(EPSCs)。为了防止 CA3 区域传播电活性，通过制备与延伸至苔藓纤维层的锥体层成直角的切片制备小-切片。用于膜片吸移管的 pH 7.2 的胞内溶液由 100mM CsF (Merck, Darmstadt, FRG)、40mM NaH₂PO₄、10mM HEPES-CsOH、10mM Tris-HCl 组成。通常将 2-3mM N-(2,6-二甲基-苯基氨基甲酰基甲基)-三乙基铵溴化物(QX-314; Tocris Cookson, Bristol, UK)加入到胞内溶液中以便阻断电压控制的钠电导。在两极水平拔具上从软硼硅酸盐玻璃中拉出膜片吸移管。当火焰抛光的和填充胞内溶液时，它们具有的电阻为 2-3MΩ。为了使 CA1 锥体神经元的细胞体显现，使用从微量吸移管中喷出的盐水除去 oriens 层和海马白质。在 400ms 间隔，用 12-指 ADC 宽对电流进行数字取样，在 3kHz 处过滤并且将数据储存在硬盘上以便进一步分析。在整个实验过程中监测存储电阻并且一般在 6-9MΩ。弃去来自实验过程中存储电阻改变 25%以上的细胞的数据。使用 Ni/Cr 电极记录胞外区域电位。将尖峰信号群数字化并且储存在计算机磁盘上。将拮抗剂的受体激动剂作用测定为平均比值 I/I_0 ，其中 I 为物质作用下的电流并且 I_0 为对照组盐水中的电流。为了刺激 Schaffer 侧枝/联接途径输入，双极 Ni/Cr 电极位于切片表面。通过隔离的刺激器 HG 203 (Hi-Med, London, UK)在 0.066-0.2Hz 下递送 0.1-1 ms 期间的电流脉冲(10-100pA)。

实验 1

测定按照一般操作步骤制备的大鼠海马切片 CA1 区中顺向诱导的尖峰信号群(附图 5A)、逆向诱导的尖峰信号群(附图 5B)和兴奋性突触后电流 EPSCs(附图 5C)中振幅改变的时程。随时间的改变,将增加量的 $Ap_2CH_2p_2A$ 施加在大鼠海马切片上。因此,在 10 分钟后施加 $1.9\mu m$ $Ap_2CH_2p_2A$,在 14 分钟后增加至 $3.7\mu m$ 并且在 18 分钟后增加至 $7.4\mu m$ 。

在本实验中用于诱导顺向(上 2)和逆向(下 2)诱导的尖峰信号群的电极位置如附图 4 中所示。发现 $AppCH_2ppA$ 在包括 CA3-CA1 突触的海马中(附图 5A)的所有突触途径中(附图 4)可再现地产生顺向引起的场电位的快速并且可逆抑制。附图 5A 中在右侧的时程显示尖峰信号群的起始痕量(5-倍平均值),相当于时程中的点 1(对照组)和 2($Ap_2CH_2p_2A$ 作用)。

与顺向引起的场电位相反,在 CA1 锥体神经元(附图 5C)中记录的逆向尖峰信号振幅(此处和下文中的 CA3-CA1 突触)(附图 5B)以及 EPSCs 保持不变。EPSC 衰变也未改变,提示 $AppCH_2ppA$ 也不调节 EPSCs 的 NMDA 成分(附图 5C)。

相反,文献表示 Ap_4A 诱导兴奋性突触后电流和顺向引起的场电位抑制¹⁴。这些结果还证实难以再现并且不可靠。

实验 2

测定按照一般操作步骤制备的大鼠海马切片 CA1 区中顺向诱导的尖峰信号群中振幅改变的时程。8 分钟后,施加吡哆醛-磷酸-6-偶氮苯基-2',4'-二磺酸(PPADS)($20\mu M$)。然后在 12 分钟后应用 $Ap_2CH_2p_2A$ 。

发现使用吡哆醛-磷酸-6-偶氮苯基-2',4'-二磺酸(PPADS)完全消除了 $AppCH_2ppA$ 对顺向尖峰信号的阻断作用(附图 6)。附图 6 在左侧表示了顺向诱导的尖峰信号群中振幅改变的时程并且在右侧上显示了尖峰信号群的起始痕量(5-倍平均值),相当于时程中的点 1(对照组)和 2($Ap_2CH_2p_2A/PPADS$ 作用)。由于 PPADS 为众所周知的宽带 P2-受体族拮抗剂^{15,16},所以这一结果提示观察到的 $AppCH_2ppA$ 作用可以由新 P2-族受体以非常规的药理学机制介导。

实验 3

测定按照一般操作步骤制备的大鼠海马切片 CA1 区中顺向诱导的尖峰信号群中振幅改变的时程。9 分钟后，施加 α, β -亚甲基-ATP ($100\mu\text{M}$) (附图 8)。

实验 4

测定按照一般操作步骤制备的大鼠海马切片 CA1 区中顺向诱导的尖峰信号群中振幅改变的时程。随时间的改变，将增加量的 ATP γ S 施加在大鼠海马切片上 (附图 9)。因此，在 10 分钟后施加 $10\mu\text{M}$ ATP γ S；在 15 分钟后增加至 $20\mu\text{M}$ ；21 分钟后增加至 $50\mu\text{M}$ ；并且在 29 分钟后增加至 $100\mu\text{M}$ 。

实验 3 和 4 为使用公知 P2X 和/或 P2Y-族受体激动剂的激动剂实验。然而， α, β -亚甲基-ATP (附图 8) 和 ATP γ S (附图 9) 不能按照与 AppCH₂ppA 相同的方式抑制顺向引起的场电位。仅观察到的作用为在极高核苷酸浓度 ($100\mu\text{M}$) 下弱的缓慢发生抑制。由于使用了高浓度的激动剂，所以这类作用至多为非特异性的。因此，显然 AppCH₂ppA 作用不能由主要的 P2X 或 P2Y-族受体介导。考虑到 Ap_nAs 作为 P2X₁₋₄、P2Y₁、P2Y₂ 和 P2Y₄ 受体激动剂在神经组织中起作用的已知能力，所以这一结果可能令人意外¹⁵。

实验 5

测定按照一般操作步骤制备的大鼠海马切片 CA1 区中顺向诱导的尖峰信号群中振幅改变的时程 (附图 10)。10 分钟后施加二肌苷四磷酸 (Ip₄I) ($20\mu\text{M}$)。然后在 20 分钟后，施加 Ap₂CH₂p₂A ($7.4\mu\text{M}$)。

实验 6

测定按照一般操作步骤制备的大鼠海马切片 CA1 区中逆向诱导的尖峰信号群中振幅改变的时程 (附图 11)。10 分钟后施加二肌苷四磷酸

(Ip_4I) ($20\mu\text{M}$)。然后在 16 分钟后，施加 $\text{Ap}_2\text{CH}_2\text{p}_2\text{A}$ ($7.4\mu\text{M}$)。

在实验 5 和 6 中评价了预先在大鼠脑突触末端上鉴定的 P4-二核苷酸受体可以介导 AppCH_2ppA 的作用的可能性¹⁷。然而，发现甚至添加高浓度的 P4 拮抗剂二肌苷四磷酸 (Ip_4I) ($20\mu\text{M}$) 不改变 AppCH_2ppA 对顺向诱导的尖峰信号群中振幅的改变的作用 (附图 10)。此外，发现添加 Ip_4I ($20\mu\text{M}$) 不导致 AppCH_2ppA 对逆向诱导的尖峰信号中振幅改变具有作用 (附图 11)。这些结果完全排除了 P4-二核苷酸受体介导的可能性。因此，这些结果提示新的 P2-族受体可以介导观察到的 AppCH_2ppA 作用。

实验 7

测定按照一般操作步骤制备的大鼠海马切片 CA1 区中顺向诱导的尖峰信号群中振幅改变的时程。10 分钟后施加荷包牡丹碱 ($50\mu\text{M}$)。然后在 20 分钟后，施加 $\text{Ap}_2\text{CH}_2\text{p}_2\text{A}$ ($7.4\mu\text{M}$)。

荷包牡丹碱的存在不影响 AppCH_2ppA 诱导的对顺向引起的场电位的抑制。

实验 8

测定按照一般操作步骤制备的大鼠海马切片 CA1 区中顺向诱导的尖峰信号群中振幅改变的时程。10 分钟后施加六甲季铵 ($100\mu\text{M}$)。然后在 20 分钟后，施加 $\text{Ap}_2\text{CH}_2\text{p}_2\text{A}$ ($7.4\mu\text{M}$)。

六甲季铵的存在不影响 AppCH_2ppA 诱导的对顺向引起的场电位的抑制。

实验 9

测定按照一般操作步骤制备的大鼠海马切片 CA1 区中顺向诱导的尖峰信号群中振幅改变的时程 (附图 7)。10 分钟后施加士的宁 (500nM)。然后在 20 分钟后，施加 $\text{Ap}_2\text{CH}_2\text{p}_2\text{A}$ ($7.4\mu\text{M}$)。

士的宁的存在不影响 AppCH_2ppA 诱导的对顺向引起的场电位的抑

制。

实验 10

测定按照一般操作步骤制备的大鼠海马切片 CA1 区中顺向诱导的尖峰信号群中振幅改变的时程。10 分钟后施加环戊基 teophylline (CPT) ($1\mu\text{M}$)。然后在 26 分钟后，施加 $\text{Ap}_2\text{CH}_2\text{p}_2\text{A}$ ($7.4\mu\text{M}$)。

CPT 的存在消除了 AppCH_2ppA 诱导的对顺向引起的场电位的抑制。

实验 7、8、9 和 10 研究了介导 AppCH_2ppA 作用的受体的位置。可以推定对顺向尖峰信号的精确抑制必定因单独调节突触后神经元兴奋性而产生，这是因为 AppCH_2ppA 完全不调节突触传递。此外，如果逆向引起的场电位不受 AppCH_2ppA 调节，那么调节位点必须位于突触后 CA1 树突中。众所周知 CA1 锥体神经元树突为通过大量受体，包括胆碱能和 GABA 能受体介导的皮质调节的重要靶标。因此，这些实验使用已知的 γ -氨基丁酸 (GABA) 拮抗剂 (实验 7)、毒蕈碱性 (实验 8) 和甘氨酸受体 (实验 9)。然而，这些拮抗剂中没有一种影响 AppCH_2ppA 诱导的对顺向引起的场电位的抑制。相反，观察到给予 A1 腺苷受体拮抗剂 CPT 可消除 AppCH_2ppA 的作用 (附图 7)，由此提示 AppCH_2ppA 的作用由 PPADS-敏感性 P2 受体活化的 A1 腺苷受体活化下游介导。

这一提示得到了如下事实的支持，即预先已经证实对海马切片给予腺苷 ($5\mu\text{M}$) 以与 AppCH_2ppA 类似的方式抑制顺向尖峰信号¹⁸。然而，还证实腺苷给药以与 AppCH_2ppA 给药后观察到的作用相反的方式消除了 EPSC 振幅¹⁹ (附图 5C)。因此， AppCH_2ppA 介导的作用完全比单独的腺苷更具有选择性。

实验 11

测定按照一般操作步骤制备的大鼠海马切片 CA1 区中顺向诱导的尖峰信号群中振幅改变的时程。5 分钟后施加 2-苯基-4, 4, 5, 5-四甲基咪唑啉-1-氧基 3-氧化物 PTIO (1mM) (附图 12)。然后在 11 分钟后，施加 $\text{Ap}_2\text{CH}_2\text{p}_2\text{A}$ ($2.5\mu\text{M}$)。

PTIO 的应用将 AppCH₂ppA-介导的对顺向引起的场电位的抑制程度减少了 50%以上(附图 12)。

已经证实一氧化氮(NO)介导对 P2-受体活化的反应的腺苷流出²⁰。因此, 预计已知的 NO 特异性清除剂 PTIO 的应用影响 AppCH₂ppA-介导的对顺向引起的场电位的抑制, 只要它涉及 P2 受体。在这种情况下, 观察到的减少与具有直接作用的 P2 受体一致。因此, 可以推定 AppCH₂ppA-介导的作用通过连接因结合 AppCH₂ppA 产生的 PPADS-敏感性 P2 受体活化的途径进行, 其中产生的 NO 随后刺激腺苷的胞内合成, 由此导致排他的突触后 A1 受体活化。

实验 12

测定按照一般操作步骤制备的大鼠海马切片 CA1 区中顺向诱导的尖峰信号群中振幅改变的时程。10 分钟后施加腺苷脱氨酶(约 2U/ml)。然后在 20 分钟后, 施加 Ap₂CH₂p₂A (7.4 μM)。

存在的腺苷脱氨酶消除了 AppCH₂ppA 诱导的对顺向引起的场电位的抑制。

在早前研究中已经观察到核苷-活化的受体使得海马神经元中谷氨酸释放的突触前抑制²¹。该过程由所谓的 P3 受体(P2Y-茶碱-敏感性受体)介导并且具有与观察到的 AppCH₂ppA 作用的一定相似。然而, AppCH₂ppA 作用被腺苷脱氨酶消除这一事实与 P3 机理不一致, 表明 AppCH₂ppA 作用并不通过类似的途径介导。

实验 13

在 22℃(附图 13)和 36℃(附图 14)下添加 Ap₂CH₂p₂A (2.5 μM)前后测定按照一般操作步骤制备的大鼠海马切片 CA1 区中顺向诱导的尖峰信号群中振幅改变的时程。

这种作用的温度依赖性与涉及小分子介质, 诸如腺苷的扩散的信号传导途径一致。

实验 14

通过二腺苷多磷酸的不能水解的类似物调节 NMDA-受体介导的电流

二腺苷多磷酸为可以在中枢神经系统突触末端中起神经递质作用的天然化合物。我们在本文中证实二腺苷多磷酸的不能水解的类似物 AppCH₂ppA 可以影响 NMDA-受体-介导的通道的功能。在分离的海马锥体神经元中，以低微摩尔浓度施用的 AppCH₂ppA 以浓度依赖性方式增加 NMDA-活化的电流的振幅。AppCH₂ppA 的这些作用在有嘌呤 P2 受体拮抗剂 PPADS 和活性蓝存在下得到消除，从而提示 AppCH₂ppA 的作用被嘌呤受体活化介导。AppCH₂ppA 的作用在有 EDTA 存在下被除去，表明主要以微量存在于胞外溶液中的某些二价阳离子涉及 P2-受体活化下游观察到的作用。此外，AppCH₂ppA 的作用在用酪氨酸蛋白激酶抑制剂染料木黄酮 (genestein) 的非特异性抑制剂预处理神经元后得以消除。这些数据能够共同提示 AppCH₂ppA 强化的 NMDA-电流因通过经某些二价阳离子，最可能的是 Zn²⁺ 减少对 NMDA 受体的强烈抑制的酪氨酸激酶 P2 受体-依赖性活化所致。

结果如附图 15 和 16 中所示。

附图 15 表示嘌呤 P2 受体介导 AppCH₂ppA (1 μM) 对分离海马锥体神经元中记录的 NMDA 受体-活化的电流的调节。

NMDA 受体-活化的电流由 1-2 秒长的共同施用天冬氨酸 (ASP) (1 mM) 和甘氨酸 (10 μM) 引起。在不含 Mg²⁺ 溶液中 V_h = -100 mV。

(a) 在对照组、有 AppCH₂ppA 存在和洗涤掉 AppCH₂ppA 后的 NMDA-活化电流的有代表性的痕量。

(b) AppCH₂ppA 和其它嘌呤激动剂 ADP (1 μM)、UTP (1 μM)、UDP (1 μM) 对 NMDA-电流的峰值振幅的作用的统计。

(c) 非特异性嘌呤 P2 受体拮抗剂 PPADS 对 NMDA-电流的 AppCH₂ppA-介导的强化的抑制。

(d) AppCH₂ppA 对对照组条件和有 P2 拮抗剂 PPADS 存在下 NMDA-电流的峰值振幅的作用的统计。

(e) P2Y 受体拮抗剂活性蓝 (RB) 对 AppCH₂ppA-介导的作用的抑制。

附图 16 表示 AppCH₂ppA 调节 NMDA 受体-活化的电流因二价阳离子产生的强烈抑制解除所介导。

(a) 在有二价阳离子螯合剂 EDTA 存在下消除 NMDA-活化的电流的增强。在对照组、有 EDTA 存在、有 AppCH₂ppA 和 EDTA 存在下 NMDA-活化电流的有代表性的痕量。

(b) AppCH₂ppA 对对照组条件和预先施用 EDTA 后 NMDA-电流的峰值振幅的作用的统计。

(c) 通过酪氨酸蛋白激酶染料木黄酮的非特异性抑制剂抑制 AppCH₂ppA-介导的对 NMDA-电流的增强。

(d) AppCH₂ppA 在对照组条件下和染料木黄酮预处理后 NMDA-电流峰值振幅的作用的统计。

材料和方法

材料

所有用于胞内和胞外溶液的化学品均购自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)。

细胞制备

在乙醚麻醉下对 Wistar 大鼠 (12-17-日龄断头并且取出海马 (或小脑)。在溶液中将其切成切片 (300-500 μm)，所述的溶液包含 (按 mM 计): 150 NaCl; 5 KCl; 1.25 NaH₂PO₄; 26 NaHCO₃; 1.1 MgCl₂; 10 葡萄糖; pH 7.4。然后将切片在 32℃ 下与来自米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 的 0.5 mg/ml 蛋白酶 (XXIII 型) 一起孵育 10 分钟。通过在锥体层 CA3 中局部振动分离从 CA1 和 CA3 锥体层中分离单一锥体细胞并且根据其特征形式和部分保存的树突羊齿状结晶鉴定 CA1 海马锥体神经元。

在分离后，细胞通常适合于记录 2-4 小时。在整个操作步骤过程中，持续用 95% O₂ 和 5% CO₂ 气体混合物饱和有切片的溶液以便维持 pH 7.4。将测试物质溶于 DMSO 而得到 10 mM 的储备溶液浓度并且保持

冷冻在 -40°C 下的每日等分部分中。将这些物质溶于外部盐水至其即刻实验前的终浓度。

电流记录

使用计算机化的"Pharma-Robot"设置(Pharma-Robot, Kiev), 通过在"浓度钳"模式中分步施用天冬氨酸(1 mM)和甘氨酸(1 mM)诱导分离的神经元中的NMDA-活化的电流(Krishtal等, 1983)。

该仪器能够在15 ms内完全改变盐水。使用常规的膜片钳技术在完整的细胞构型中记录跨膜电流。使用水平拔具(Sutter Instruments)拉出膜片钳电极并且它具有 $1.4 - 1.8 \mu\text{m}$ 的内部尖端直径和 $2.5 - 5 \text{M}\Omega$ 的尖端电阻。胞内溶液包含(按mM计): 70 Tris- PO_4 ; 5 EGTA; 40 TEA-Cl(氯化四乙基铵); 30 Tris-Cl; 5 Mg-ATP; 0.5 GTP; pH 7.2。胞外溶液的组成为(按mM计): 130 NaCl; 3 CaCl_2 ; 5 KCl; 2 MgCl_2 ; 10 HEPES-NaOH; $0.1 \mu\text{M}$ TTX; pH 7.4。使用膜片钳放大器(DAGAN, USA)记录电流。在3 kHz过滤跨膜电流, 储存并且使用应用自带软件的IBM-PC计算机分析。使用3分钟间隔记录NMDA响应值。所有实验均在室温下进行($19 - 24^{\circ}\text{C}$)。

实验 15

AppCH₂ppA 的抗伤害感受活性

实验操作步骤:

CFA-诱导的热痛觉过敏。通过将 $100 \mu\text{l}$ CFA (Sigma)在生理盐水中的50%溶液注入大鼠右后爪的跖表面诱发单侧炎症。在使用如下文对有害急性热试验所述的相同设备进行CFA注射后48小时测定对热刺激的痛觉过敏。

热敏感性: 在机械测试后的每天, 将大鼠放入热测试仪(Plantar test, Ugo Basile, Italy), 其中使它们自由活动。在适应30分钟后, 使恒定能量的IR刺激通过玻璃基底集中在足底部并且如Hargreaves等1988所述通过光电监测器自动记录反射性足退缩的潜伏期。

在每一试验期限过程中,在约 15 分钟间隔的三次依次试验中测试每只大鼠(来自 6 只测试大鼠)。

结果

AppCH₂ppA 的抗伤害感受活性。为了表征 AppCH₂ppA 的抗伤害感受活性,在皮下给药后在 CFA-诱导的热痛觉过敏动物模型中评价该化合物的作用。AppCH₂ppA 显然可有效减轻热痛觉过敏(附图 17)。

足内给予 CFA 诱导炎症 48 小时后, AppCH₂ppA 完全阻断热痛觉过敏(附图 17)。AppCH₂ppA 的抗伤害感受作用对受损爪具有特异性,因为 AppCH₂ppA 在测试剂量下对未受损伤的爪的爪退缩潜伏期改变的有效性较低。AppCH₂ppA 在受损爪中的抗伤害感受作用延迟发作并且在注射后 3 小时后出现。

附图 17 - AppCH₂ppA 增加足内给予 CFA 后 48 小时的爪退缩潜伏期。在对照组和 CFA-注射的爪中的响应值(爪退缩潜伏期(平均值±SEM))。

AppCH₂ppA (50 μmol/kg 皮下)减弱了 CFA-诱导的大鼠热痛觉过敏。

附图 18 - AppCH₂ppA 增加对侧(未发炎的)的爪中 48 小时的爪退缩潜伏期。在对照组和对侧爪中的响应值(爪退缩潜伏期(平均值±SEM))。

AppCH₂ppA (50 μmol/kg 皮下)减弱了大鼠热痛觉过敏。

* P<0,05 CFA vs CFA+AP4 50 μM

\$ P<0,05 CFA vs 对照组

** P<0,05 CFA vs 对侧爪 CFA+AppCH₂ppA 50 μM

P 对照组 vs CFA 1.58E-12

P CFA vs CFA+AP4 50μM 0.000314

P CFA vs CFA+AP4 50 μM 0.000501

P CFA vs 对侧爪 CFA+AP4 50 μM 0.0043

P CFA vs 对侧爪 CFA+AP4 50 μM 0.000335

P CFA vs 对侧爪 CFA+AP4 50 μM 3.67E-06

P CFA vs 对侧爪 CFA+AP4 50 μM 1.53E-07

P CFA vs 对侧爪 CFA+AP4 50 μM 6.54E-05

仪器描述

7370 足部试验

未受到限制的动物对热刺激的痛觉过敏测定特征:

- 行为端点的自动检测
- 通过反复测试未受影响的可靠性
- 生物测定灵敏度大于其它热或机械试验
- 将每只动物用作其自身的对照组

仪器主要由下列部分组成:

- 可运动的 I. R. (红外)源
- 大鼠围绕物位于的玻璃方格
- 控制器

装配 3-室围绕物以便在包含大量动物时加速试验。在每一室内,动物不受约束。

在适应期后,由操作者将位于玻璃底部下的 I. R. 源(参见图)直接定向于后爪下。通过按压启动 I. R. 源的键开始试验并且启动数字固态定时器。

当大鼠感觉疼痛并且退缩其爪时,骤然下降反射光而关闭 I. R. 源并且终止反应时间计数器。

测定退缩潜伏期最接近 0.1 s。

校准放射计

通过 I. R. 放射计精确校准各足部试验以确保其 I. R. 源递送相同的能量输出(以 mW/平方 cm 计)和由此相同强度的伤害感受刺激。

最终使用者应考虑这种极其有用的辅助物热流 I. R. 源放射计 Cat.

37300, 它为电池操作自身完备的仪器, 配有完整的 I.R. 探头, 数字计量器和用于摇尾和足部试验的适配器, 所有部件均整齐地排列在带有穿孔的泡沫衬垫的完整的塑料箱中。

37300 放射计能够使实验者:

i) 检查(且如果必要调整) I.R. 发射。实际上, 足部试验的 I.R. 输出在 1-2 年过程中可以进行至减少 2-3%, 这是因为粉尘聚集在光学镜头上, 使 I.R. 灯泡变黑, 意外的敲击, 因热循环导致的部件老化等。

此外, 就替换灯泡或维修电子设备而言, 更明显等级的输出改变, 即 8-10% 可能发生。

ii) 确保两个或多个足部试验部件确切递送相同强度的伤害感受刺激。如果必要, 平衡它们。

iii) 已知绝对项中的 I.R. 能(1s 期限的 1 mW 相当于 1 mJ), 即比较任何文献中所述的相同或不同方法/仪器的有用数据。

文献目录

方法论文:

- K.M. Hargreaves, R. Dubner, F. Brown, C. Flores 和 J. Joris: "A New and Sensitive Method for Measuring Thermal Nociception in Cutaneous Hyperalgesia." Pain 32: 77-88, 1988.

额外的论文:

- K.M. Hargreaves, R. Dubner 和 J. Joris: "Peripheral Action of Opiates in the Blockade of Carrageenan-Induced Inflammation" Pain Research and Clinical Management. Vol. 3. Elsevier Science Publishers, Amsterdam: 55-60, 1988

- G. Benneth 和 Y. K. Xie: "A Peripheral Neuropathy in Rat that Produces Disorders of Pain Sensation Like Those Seen in Man" Pain 33: 87-107, 1988.

- M. Iadarola 和 G. Draisci: "Elevation of Spinal Cord

Dynorphin mRNA Compared to Dorsal Root Ganglion Peptide mRNAs During Peripheral Inflammation" In: The Arthritic Rat as a Model of Clinical Pain? by J. Besson 和 G. Guilbaud (eds.) Elsevier Press, Amsterdam: 173-183, 1988.

- A. Costello 和 K. M. Hargreaves: "Suppression of Carrageenan-Induced Hyperalgesia, Edema and Hyperthermia by a Bradykinin Antagonist" European J. Pharmacol., 1989.

- K.M. Hargreaves, R. Dubner 和 A. Costello: "Corticotropin Releasing Factor (CRF) has a Peripheral Site of Action for Antinociception" European J. Pharmacol., 1989.

- J. Hylden, R. Nahin, R. Traub 和 R. Dubner: "Expansion of Receptive Fields of Spinal Lamina I Protection Neurons in Rats with Unilateral Adjuvant-Induced Inflammation: The Contribution of Central Dorsal Horn Mechanisms" Pain 37: 229-244, 1989.

此外，美国（例如 Society for Neuroscience）和国际（例如 International Association for the Study of Pain）科学会议上已经提出了使用该装置的 30 篇以上的摘要：

<http://www.ugobasile.com/site/manuals/condensed-catalogue.pdf>

<http://www.ugobasile.com/site/product2.asp?ID=3>

将上述说明书中所述的所有公开文献引入本文作为参考。本领域技术人员显然可以在不脱离本发明范围和实质的情况下对本发明的方法和系统做出各种变型和变化。尽管已经结合具体的优选实施方案描述了本发明，但是应理解请求保护的本发明不应过度限于这类具体的实施方案。实际上，可以对实施本发明的所述方式进行各种变型，认为它们均属于下列权利要求的范围内，这对化学、生物学领域或相关领域技术人员而言显而易见。

参考文献

1. Pintor, J.; Gualix, J.; Miras-Portugal, MT. *Mol. Pharm.*, 1997, 51, 277-284.
2. Oaknin, S.; Rodriguez-Ferrer, C.R.; Aguilar, J. S.; Ramos, A.; Rotllan, P. *Neurosci. Lett.*, 2001, 309, 177-180.
3. Ap4A and other dinucleoside poluphosphates, Ed. A. G. McLennan, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1992.
4. Plateau, P.; Blanquet S., *Adv. Micro. Physiol.*, 1994, 36, 81.
5. Wang, Y., Chang, C. F., Morales, M., Chiang, Y. H., Harvey, B. K., Su, T. P., Tsao, L. I., Chen, S., Thiemermann, C. J. *Neuroscience* 2003, 23, 7958-65.
6. Ortiz, B.; Sillero, A.; Gunther Sillero, M. A.; *Eur. J. Biochem.*, 1993, 212, 263.
7. Theoclitou, M.-E.; Wittung, E. P. L; Hindley, A. D.; El-Thaher, T. S. H.; Miller, A. D. *J. Chem. Soc, Perkin Trans. 1*, 1996, 2009-2019.
8. McLennan, A. G. *Pharmacol Ther*, 2000, 87, 73-89. 9. Wright, M., Tanner, J. A., 和 Miller, A. D. *Anal Biochem*, 2003, 316, 135-138.
10. Guranowski, A. *Pharmacol Ther*, 2000, 87, 117-39.
11. Theoclitou, M. E.; El-Thaher, T. S. H.; Miller, A. D. *J. Chem. Soc, Chem. Commun.*, 1994, 659-661.
12. Wright, M.; Miller, A. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004, 14, 2813-2816. 13. Ng, K. E.; Orgel, L. E. *Nucleic Acids. Res.*, 1987, 15 (8), 3573-3580.
14. Klishin, A.; Lozovaya, N.; Pintor, J.; Miras-Portugal, M. T.; Krishtal, O. *Neuroscience*, 1994, 58, 235-6.

15. Pintor, J. ; Diaz-Hernandez, M. ; Gualix, J. ; Gomez-Villafuertes, R. ; Hemando, F. ; Miras-Portugal, M. T. *Pharmacol Ther*, 2000, 87, 103-15.

16. Bianchi, B. R. ; Lynch, K. J. ; Touma, E. ; Niforatos, W. ; Burgard, E. C ; Alexander, K. M. ; Park, H. S. ; Yu, H. ; Metzger, R. ; Kowaluk, E. ; Jarvis, M. F. ; van Biesen, T. *Eur J Pharmacol*, 1999, 376, 127-38.

17. Pintor, J. ; Miras-Portugal, M. T. *Br J Pharmacol*, 1995, 115, 895-902.

18. Greene, R. W. ; Haas, H. L. *Prog Neurobiology*, 1991, 36, 329-41.

19. Klishin, A. ; Lozovaya, N. ; Krishtal, O. *Neuroscience*, 1995, 65, 947-53. 20. Juranyi, Z. ; Sperlagh, B. ; Vizi, E. S. *Brain Res*, 1999, 823, 183-90.

21. Mendoza-Fernandez, V. ; Andrew, R. D. ; Barajas-Lopez, C. 2000 *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, 293, 172-9.

22. Rudolphi K ; Schubert P ; Parkinson F. E. ; Fredholm B. B. *Trends Pharmacol ScL* 1992, 13, 439 - 445.

23. Knutsen L. J. S. ; Murray T. F. Adenosine 和 ATP in epilepsy. In *Purinergic Approaches in Experimental Therapeutics*. Eds. Jacobson K. A. ; Jarvis M. F. Wiley-Liss, New York, 1997, pp. 423 - 447.

24. Dragunow M. . Adenosine and adenine Nucleotides as Regulators of Cellular Function. Ed. Phillis J. W., Boca Raton, FL, CRC Press, 1991, 367 - 379.

25. Uzerman A. P. ; van der Wenden N. M. *Purinergic Approaches in Experimental Therapeutics* Ed. Jacobson, K. A. ; Jarvis, M. F., Wiley-Liss, Inc. New York, 1997, 129- 148.

26. Firestein G. *Drug Dev. Res.* 1996; 39: 371-376.

27. Ferre S.; Fredholm B. B.; Morelli M.; Popoli P.; Fuxe K. Trends Neurosci 1997; 20:482-487.

28. Carley D.; Radulovacki M.; Purinergic Approaches in experimental Therapeutics. Eds. Jacobson K. A.; Jarvis M. F., Wiley-Liss, New York, pp.515-526.

29. Sawynok J. Eur J Pharmacol 1998; 347: 1-11.

30. Cook S. P.; Vulchanova L.; Hargreaves K. M.; Elde R.; McCleskey E. W. Nature 1997; 387:505-508.

31. Burnstock G. A. Lancet 1996, 347, 1604-1605.

32. Vulchanova L.; Arvidsson U.; Riedl M.; Wang J.; Buell G.; Surprenant A.; North R. A.; Elde R.; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1996, 93, 8063-8067.

33. Keil G. J.; DeLander G. E. Life Sci 1992; 51:L171-L176.

34 Kowaluk E. A.; Bhagwat S. S.; Jarvis M. F. Curr. Pharmaceut. Design 1998; 4: 403-416.

35. Poon A.; Sawynok J. Pain 1998; 74:235-245.

36. Lee Y. W.; Yaksh T. L. J Pharmacol Exp Ther 1996; 277: 1642-1648.

37. Segerdahl M.; Ekblom A.; Sandelin K.; Wickman M.; Sollevi A. Anesth Analg 1995; 80:1145-1149.

38. Sollevi A. Acta Anaesthesiol Scand Suppl 1997; 110:135-136.

39. Woolf, C.J. Textbook of Pain, 3rd Ed. Eds Wall, P.; Melzack, R. D., Churchill Livingstone, Edinburgh, 1994, 101-112.

40. Fukunaga A. F. Purinergic Approaches in Experimental Therapeutics. Eds Jacobson K. A., Jarvis M. F., Wiley-Liss, New York, 1997, pp. 471 - 493.

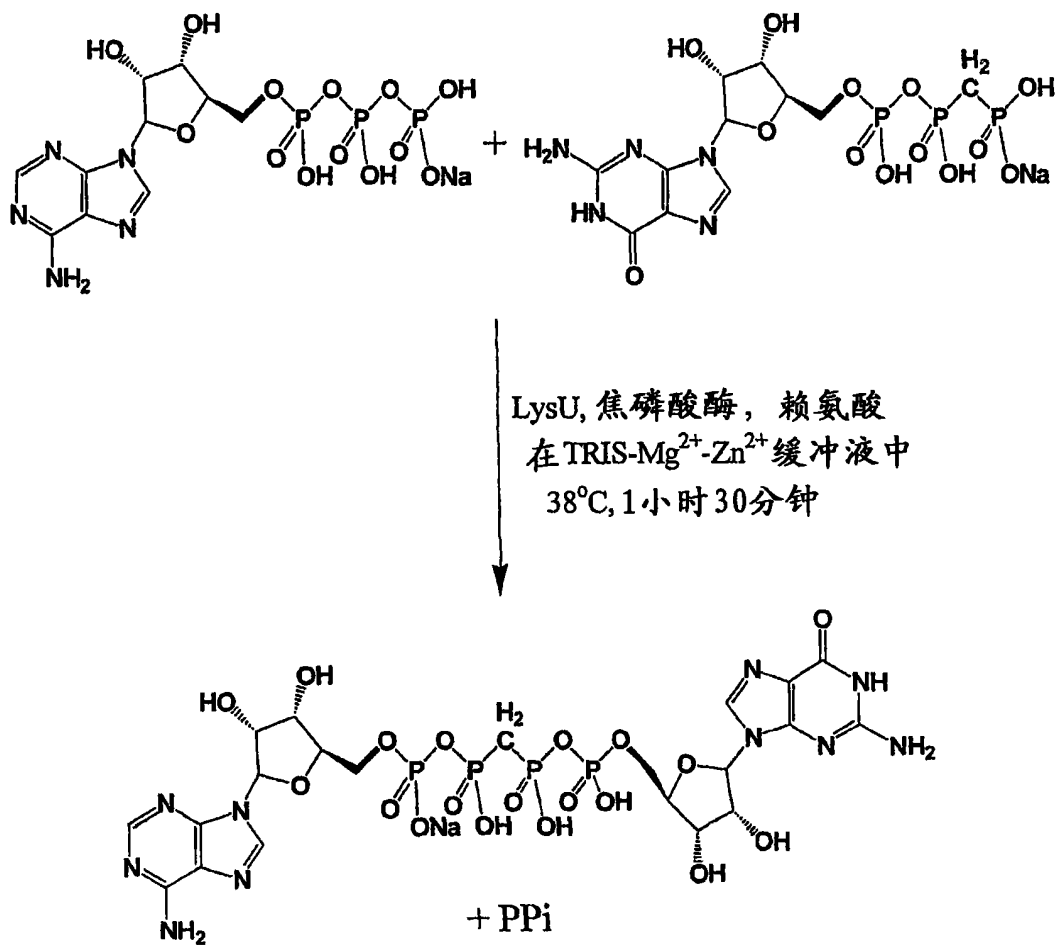


图1

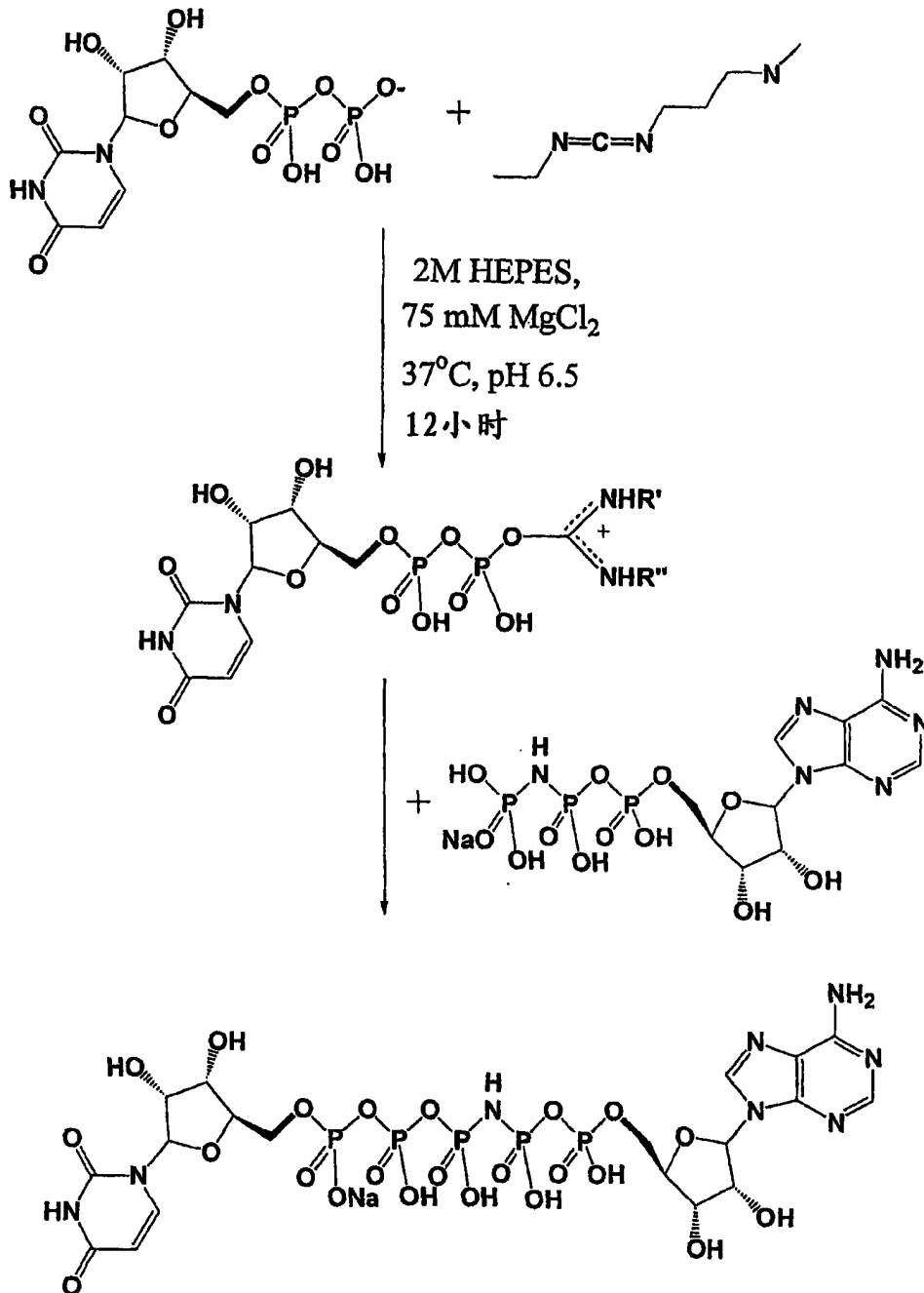


图2

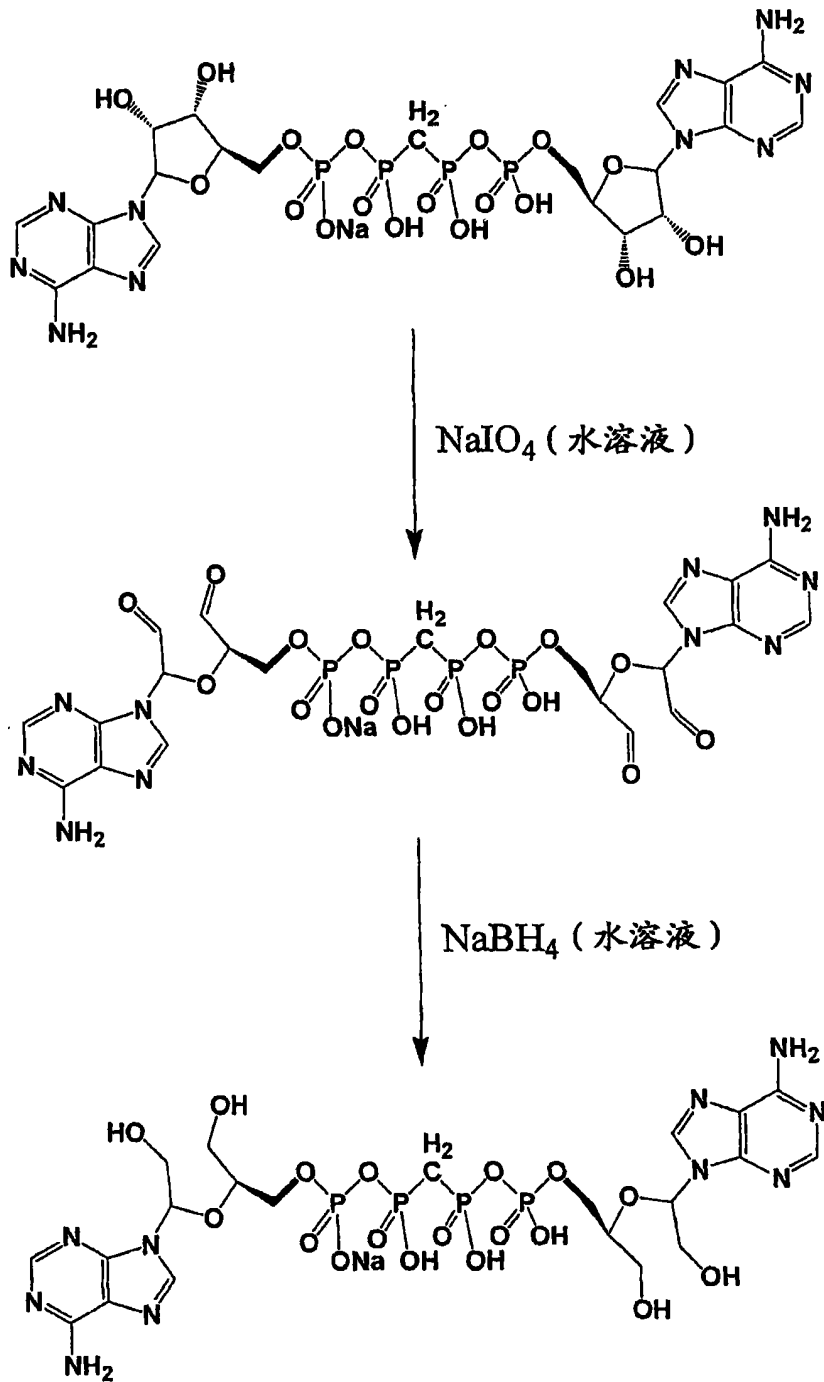


图 3

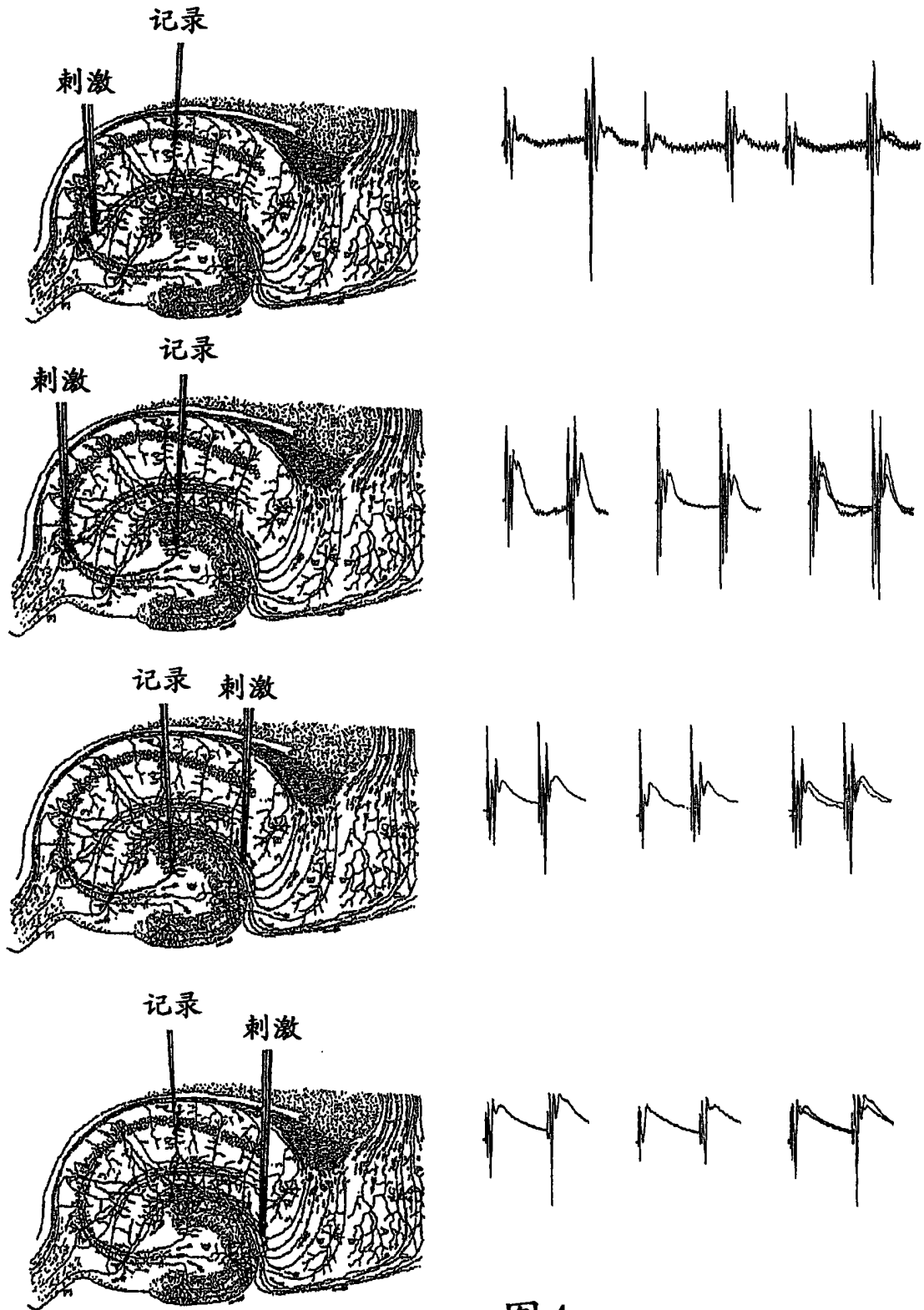


图4

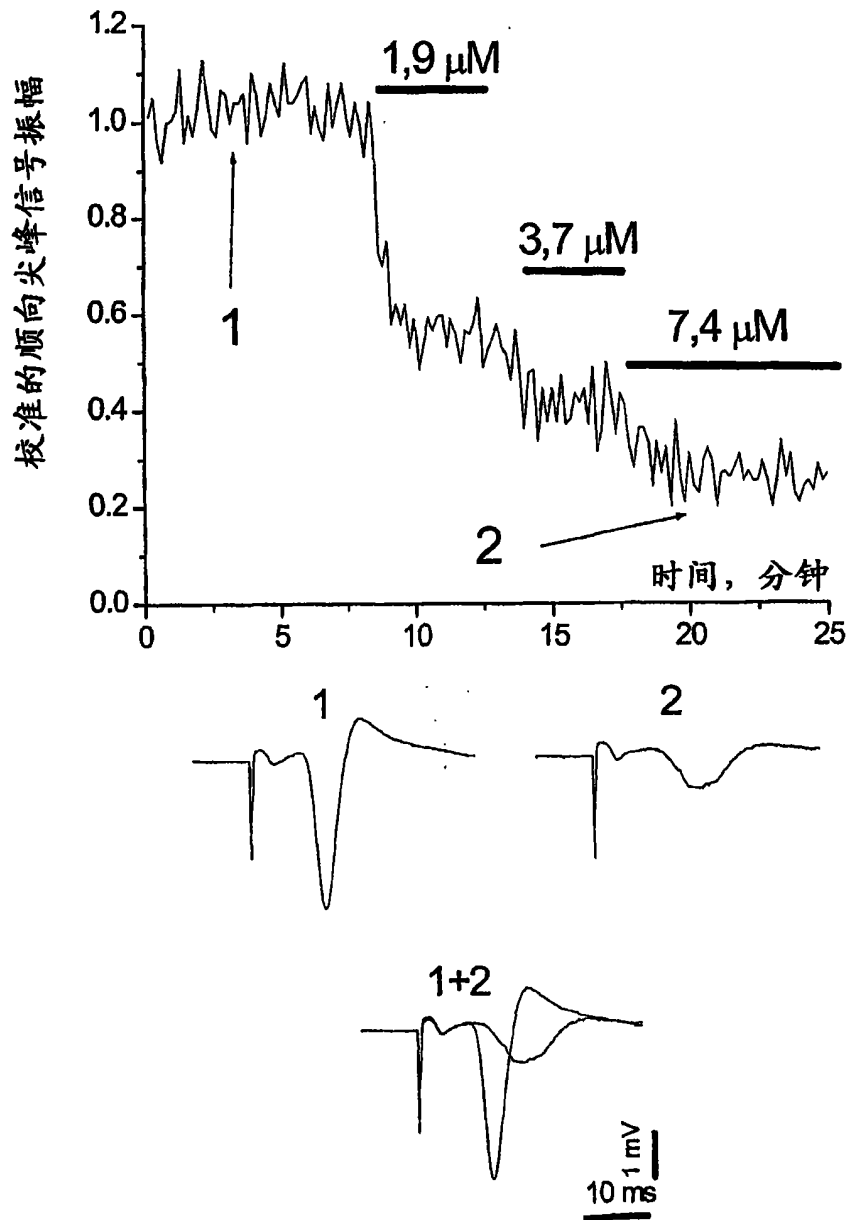


图 5a

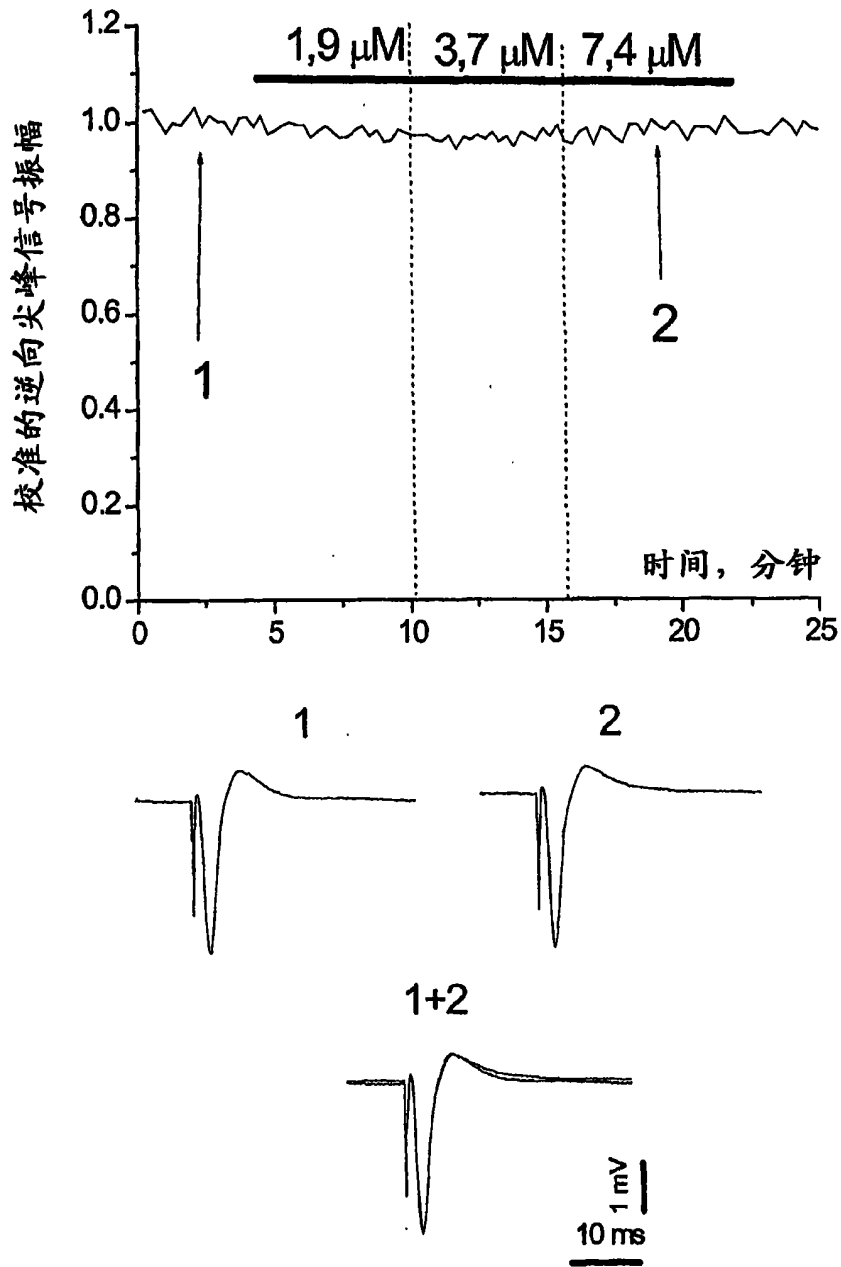


图 5b

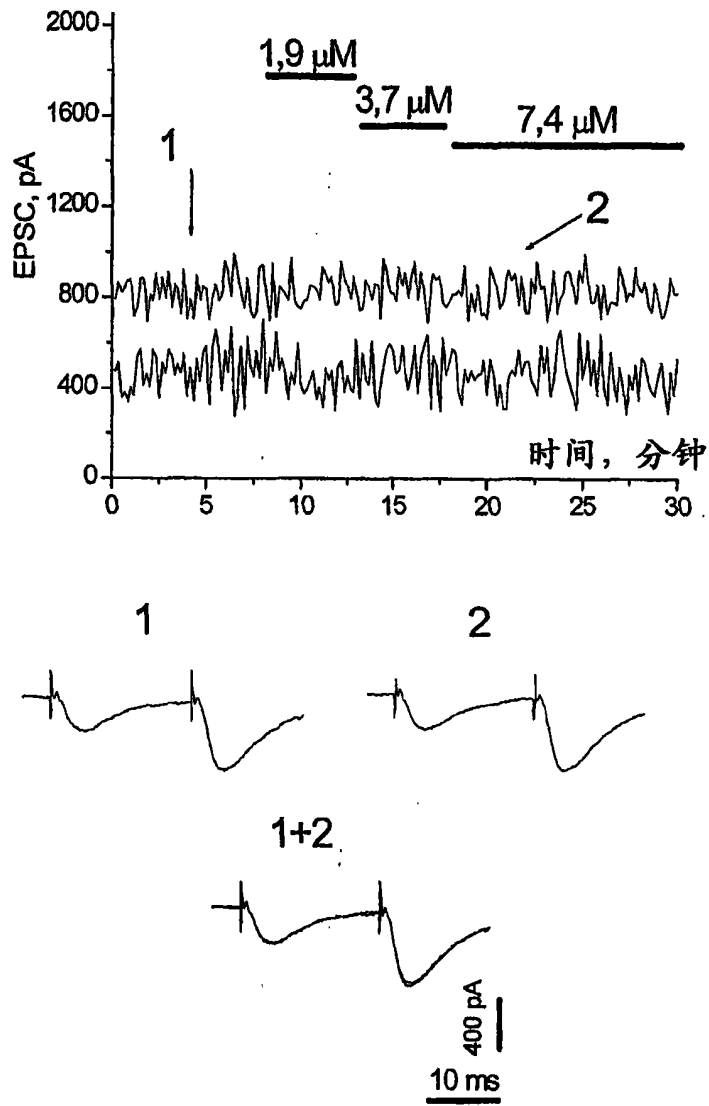


图 5c

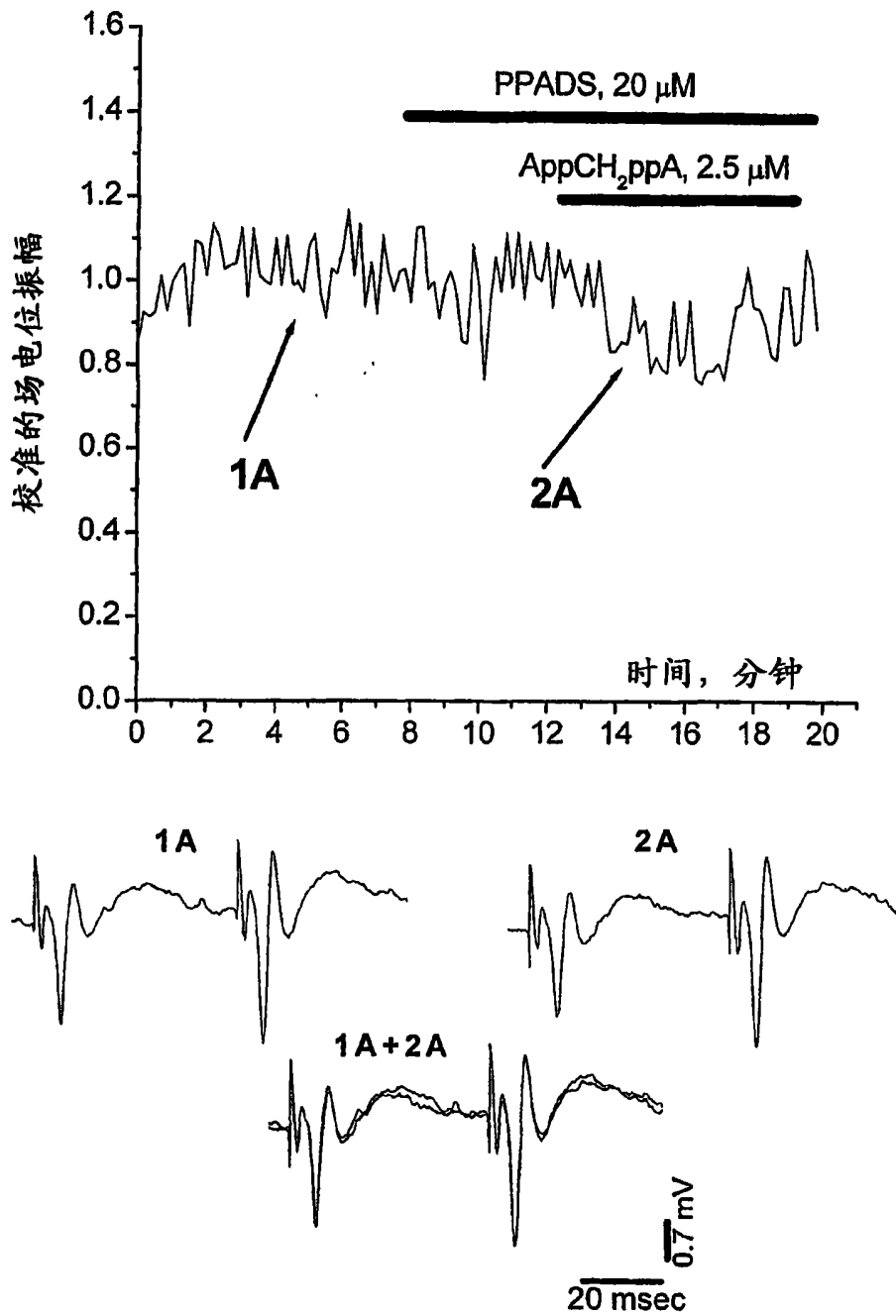


图 6

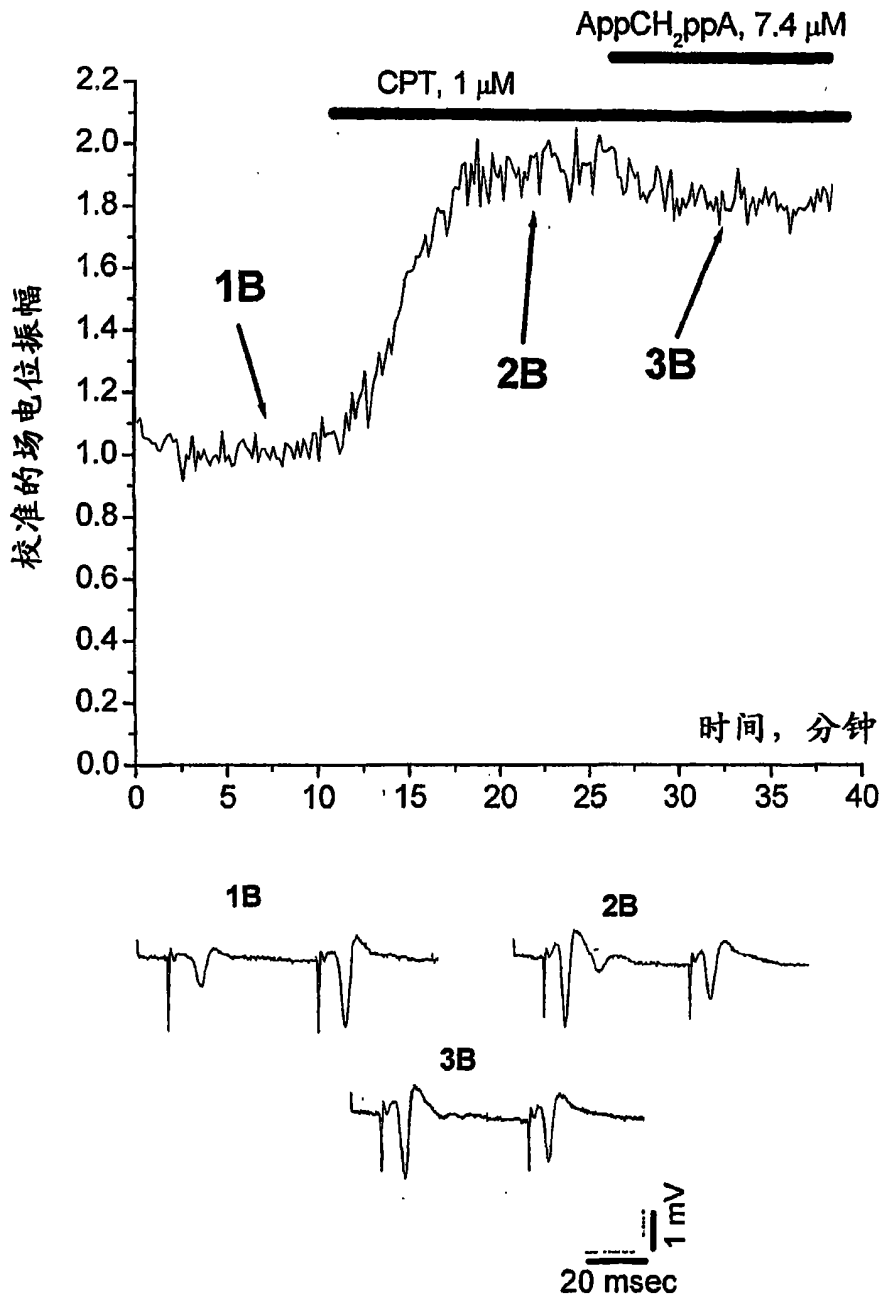


图 7

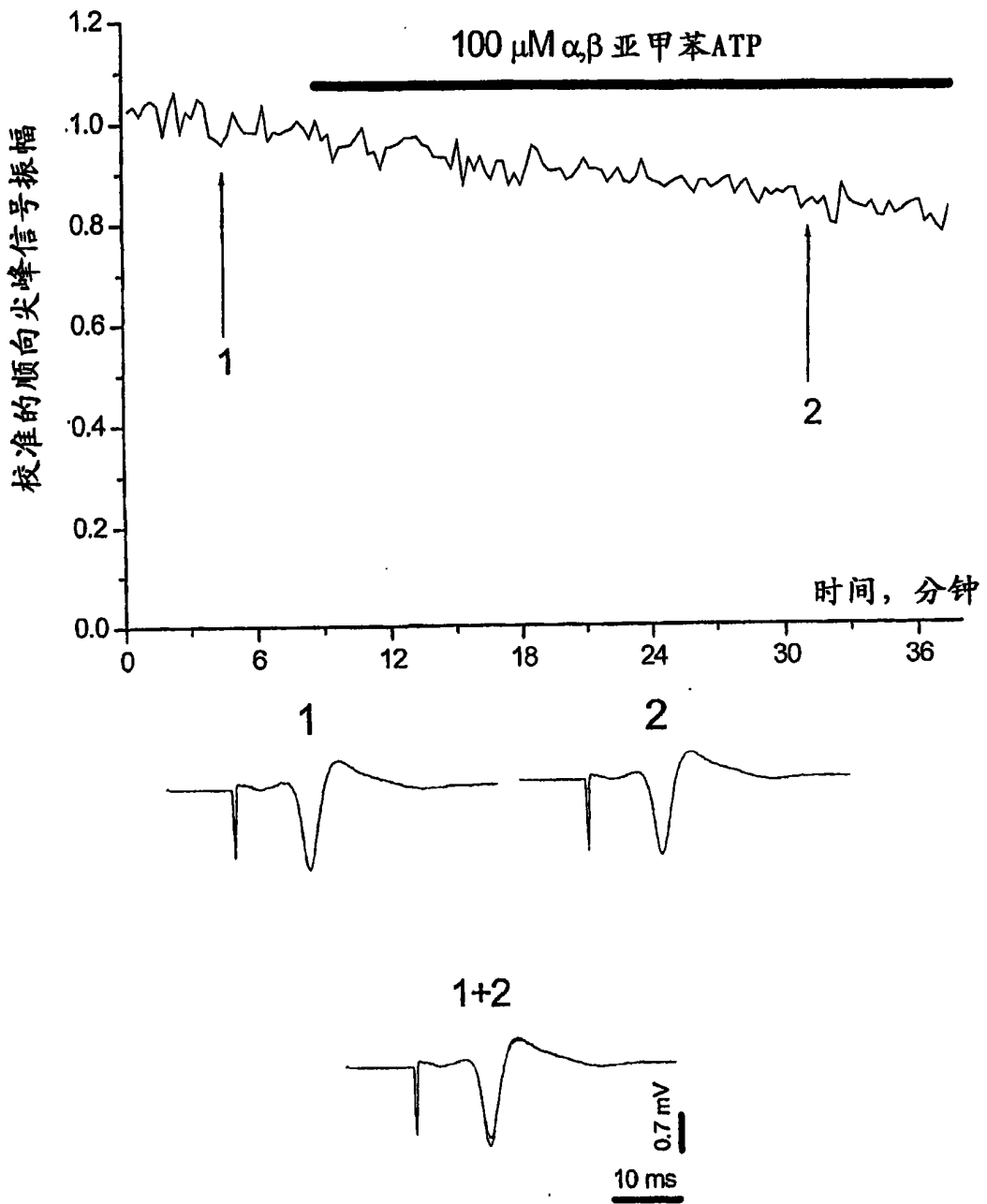


图 8

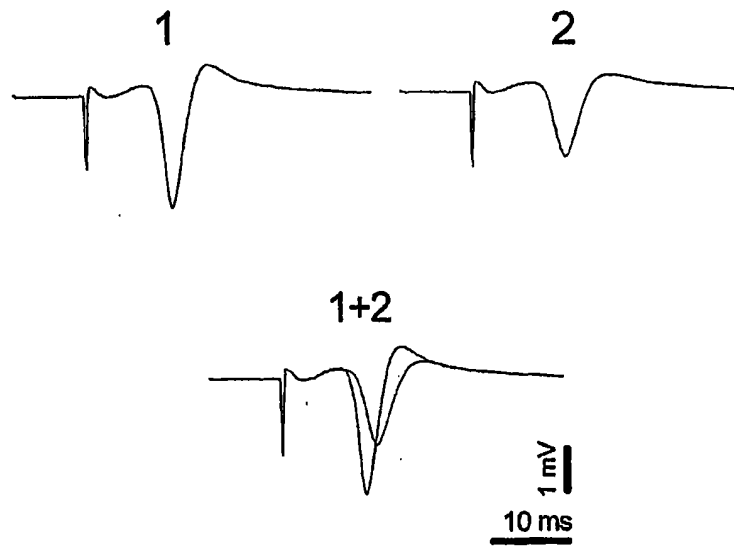
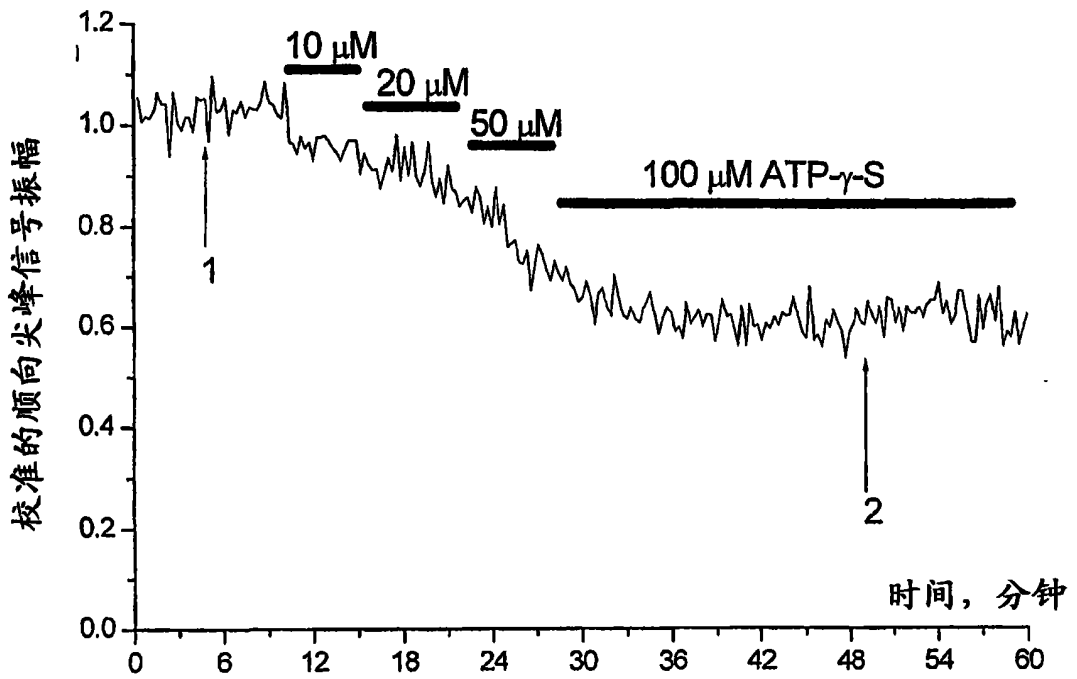


图9

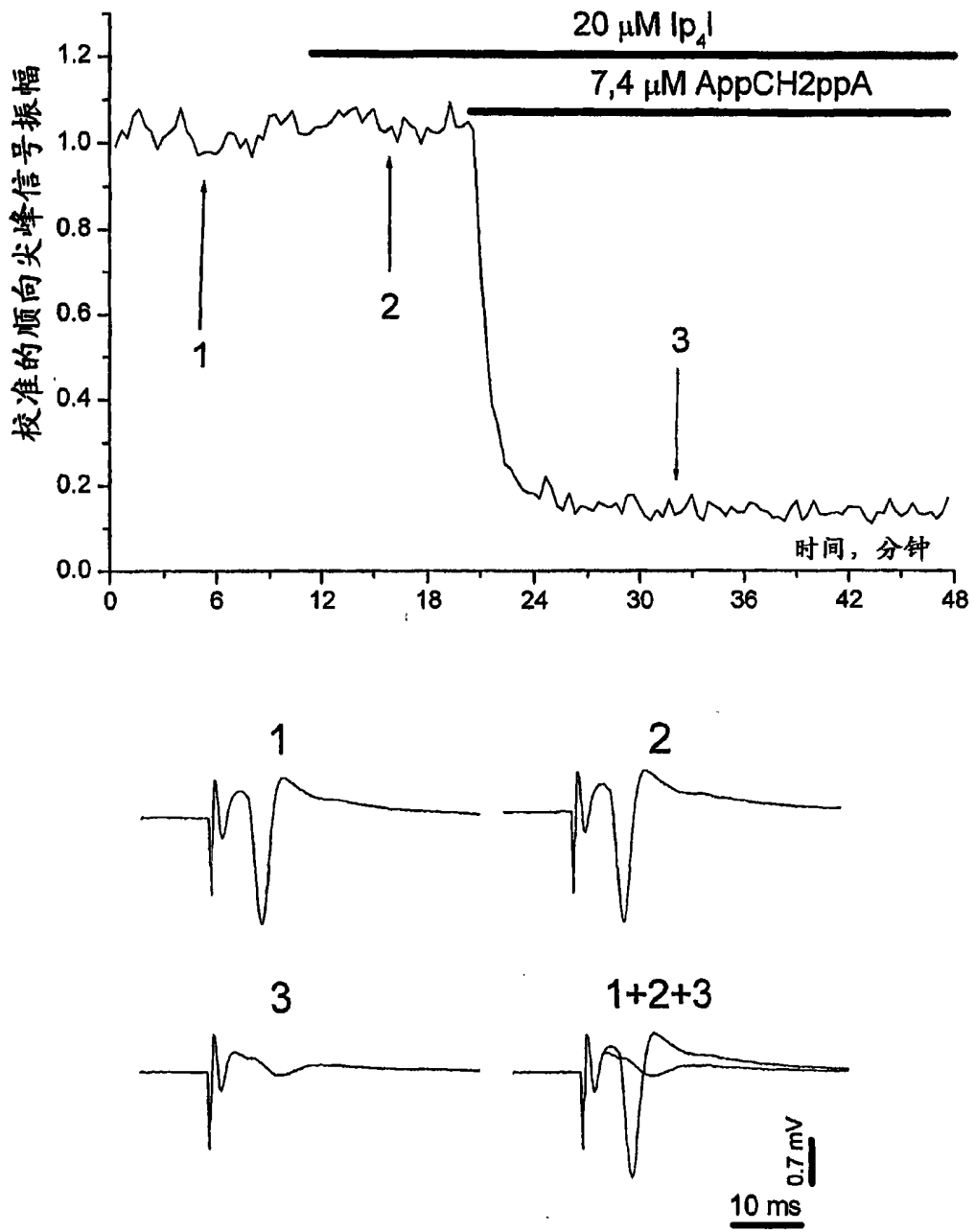


图10

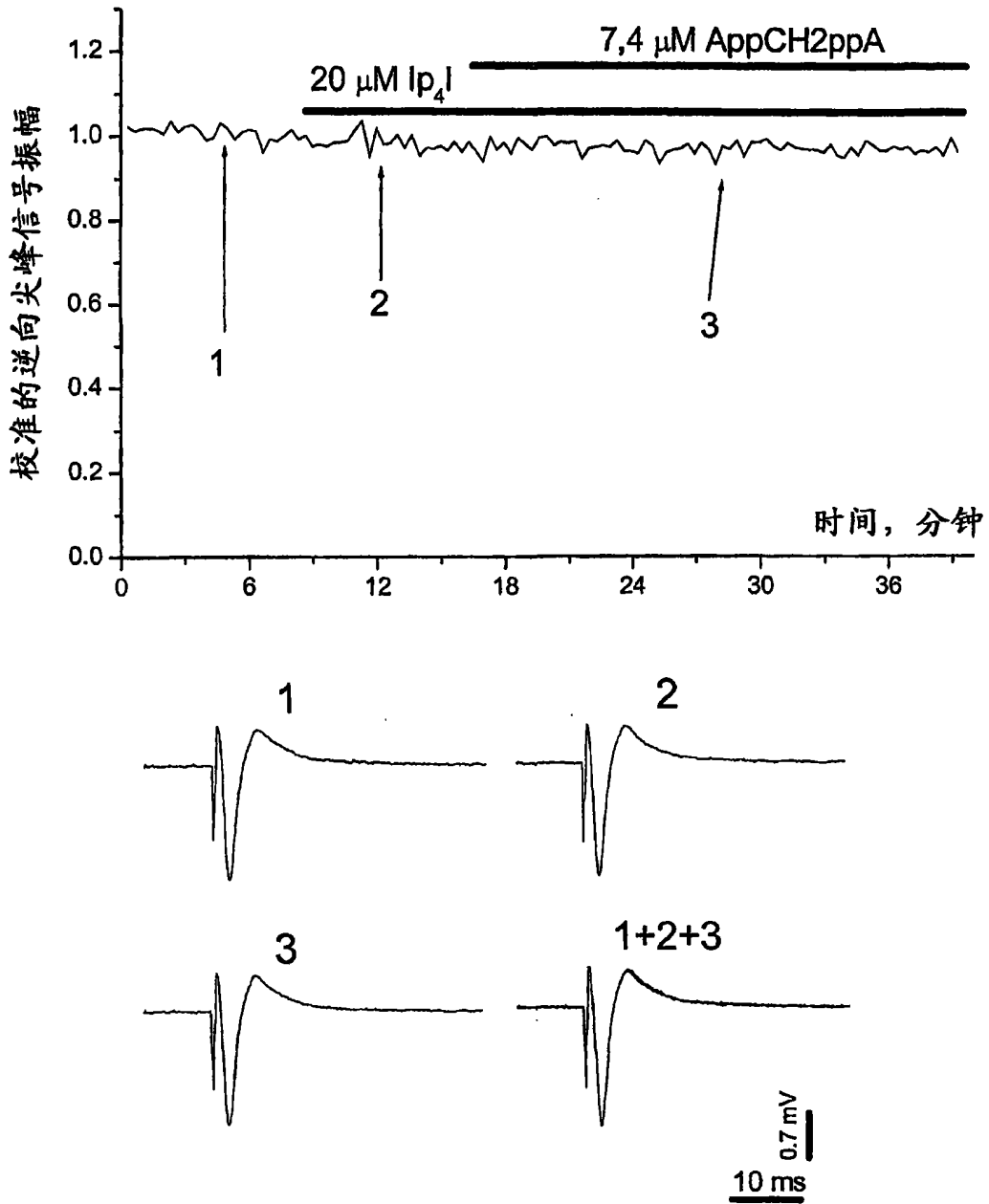


图11

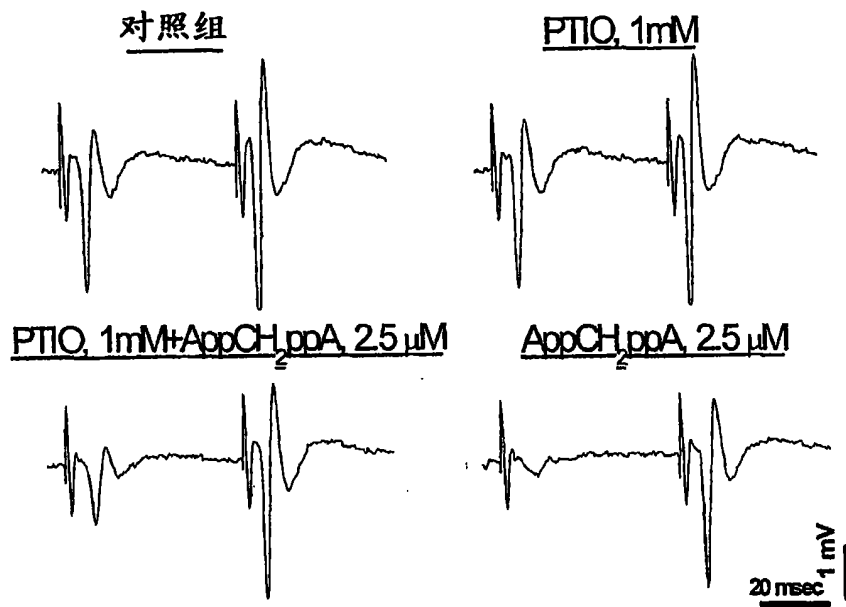
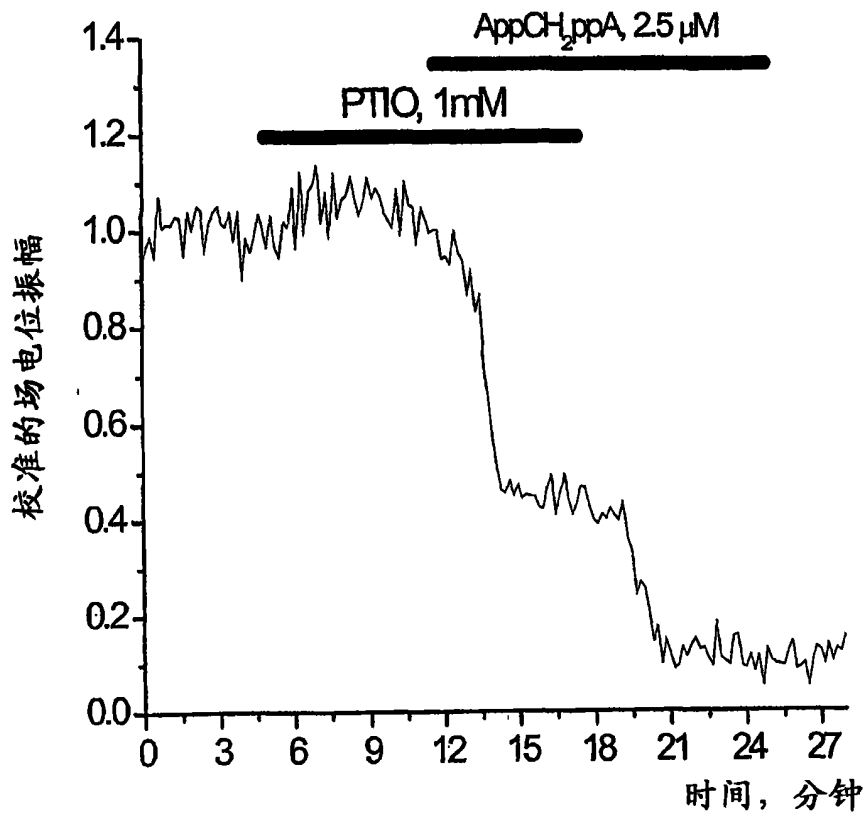


图 12

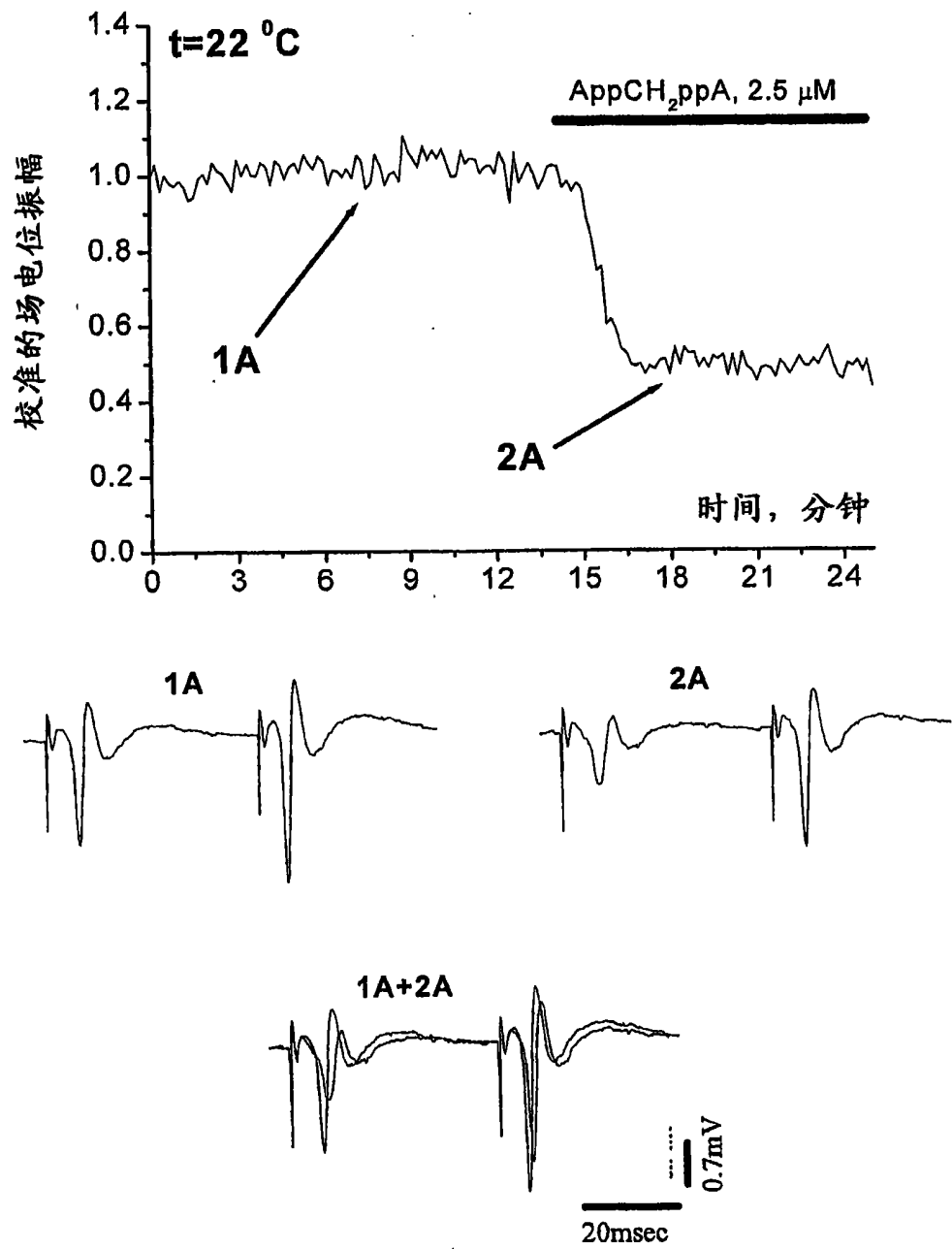


图13

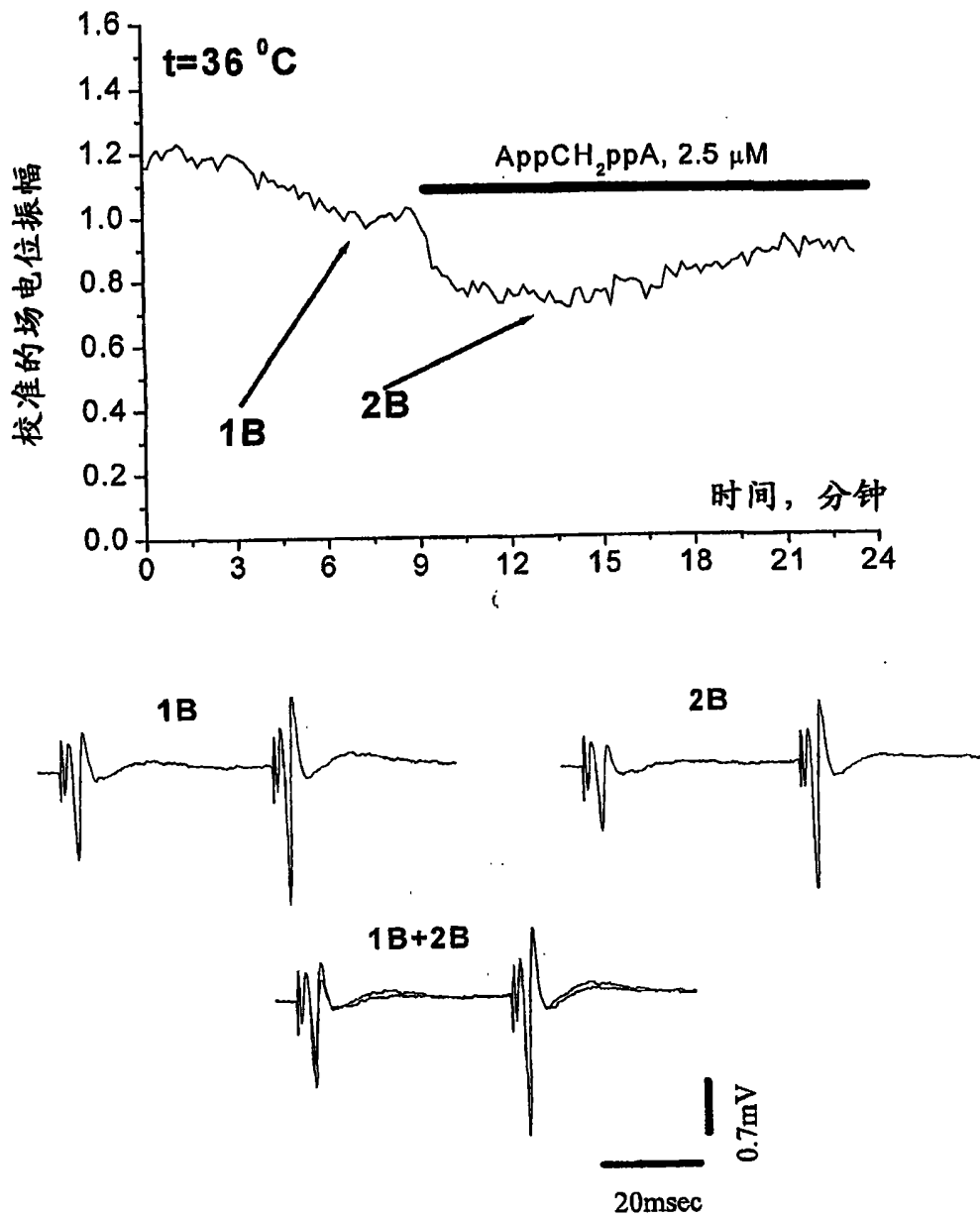


图 14

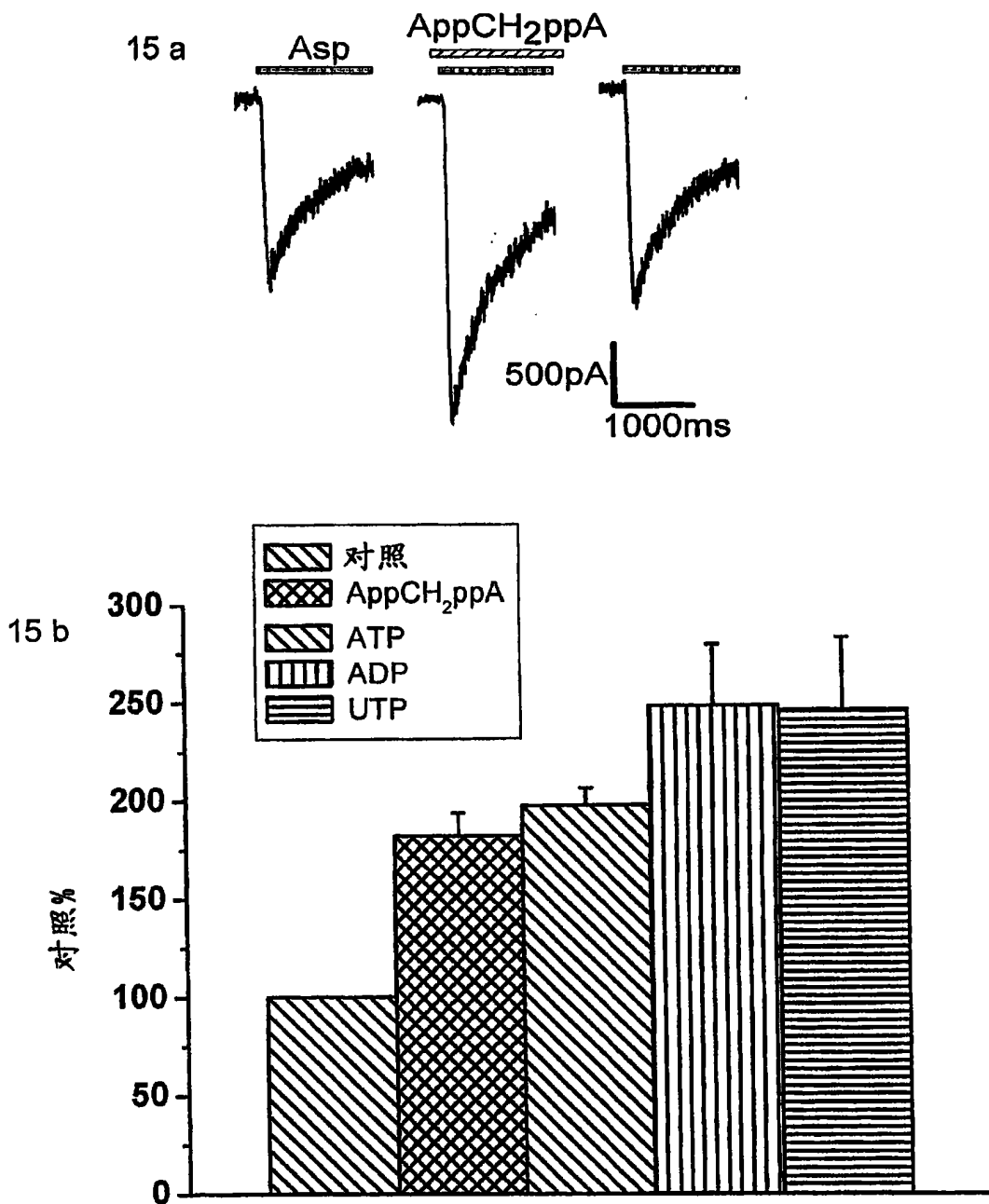


图15a&b

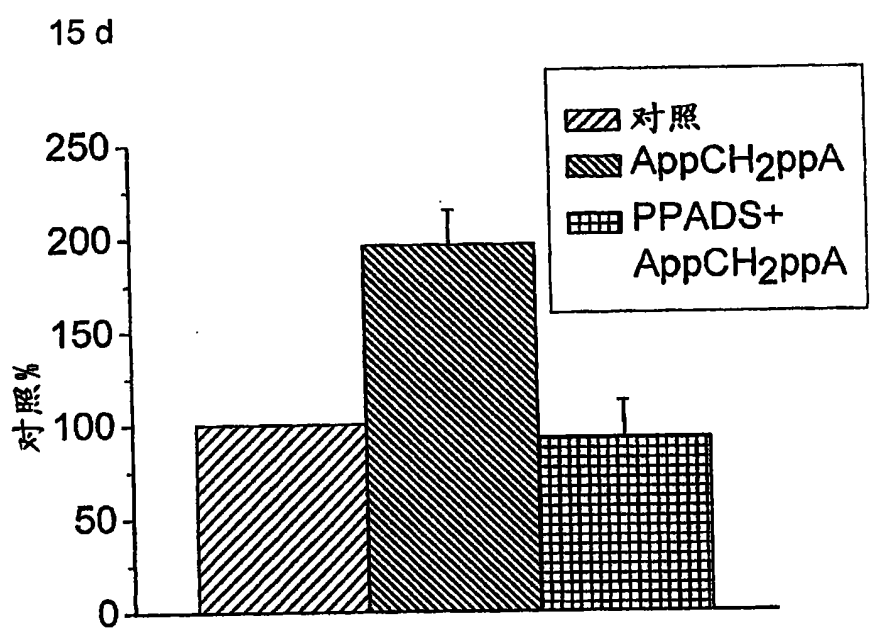
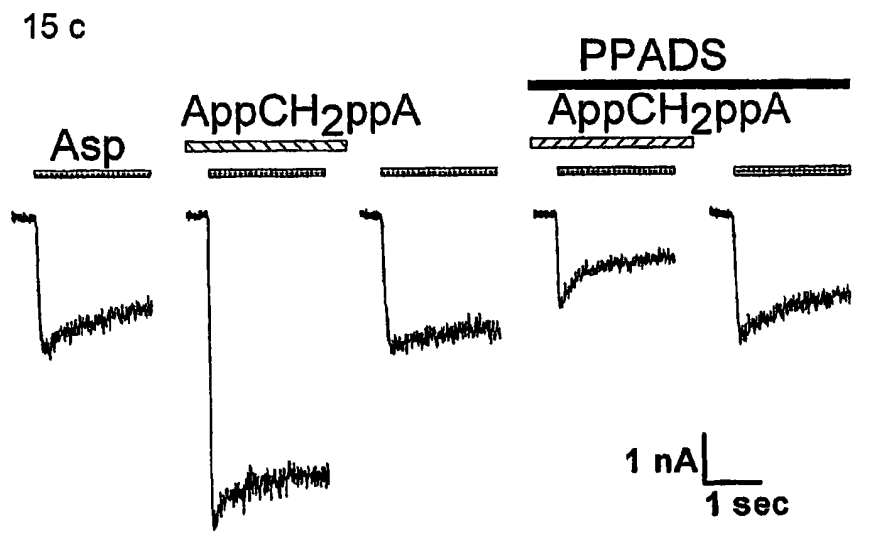


图 15c&d

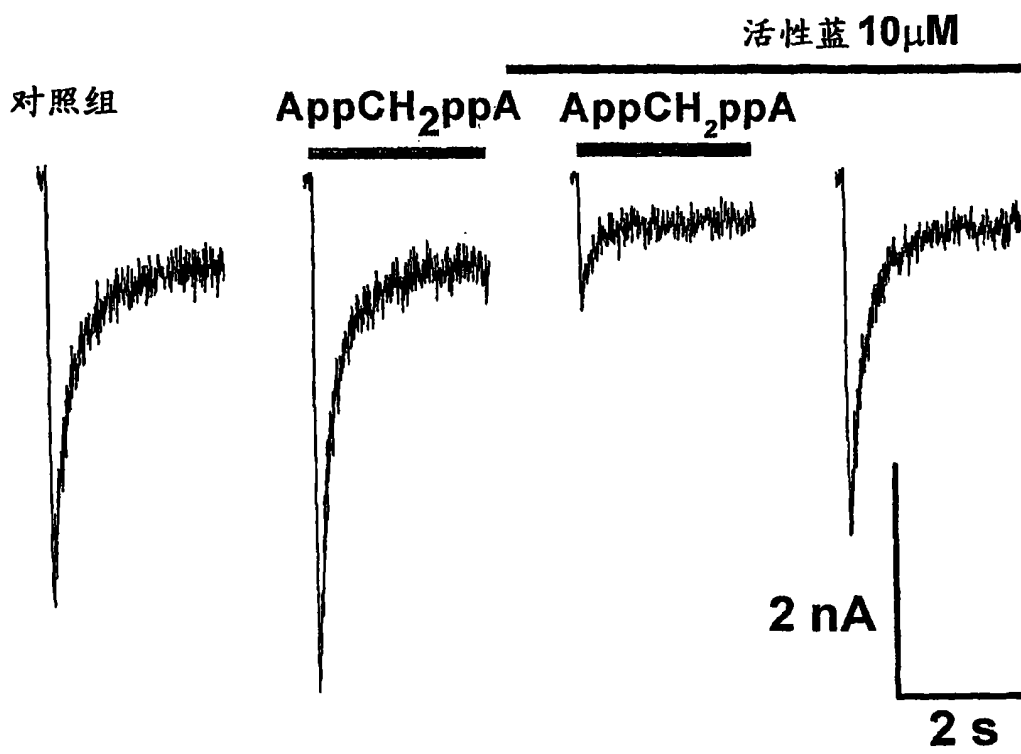
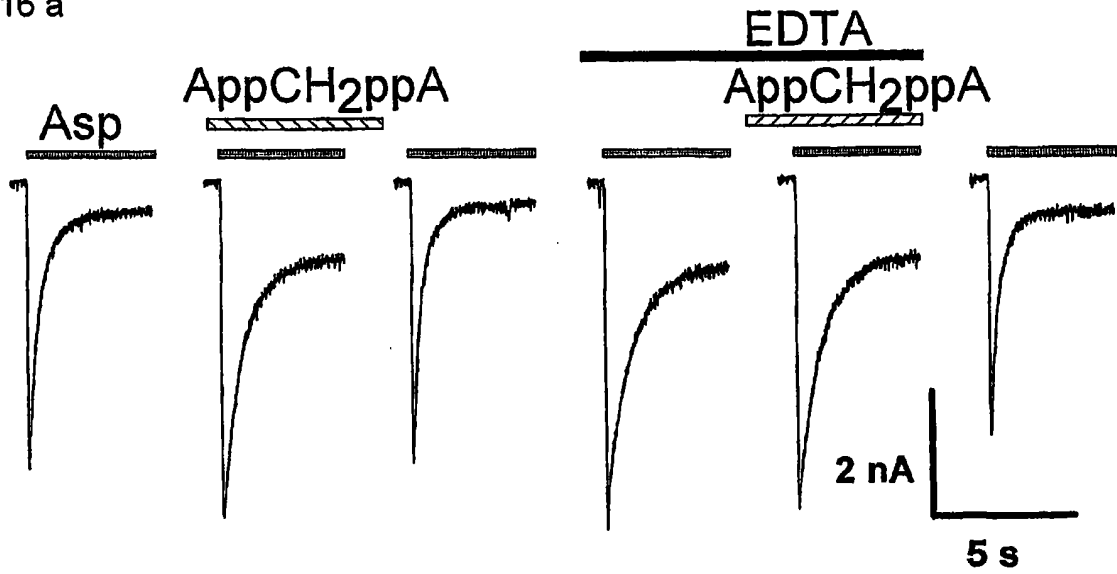


图15e

16 a



16 b

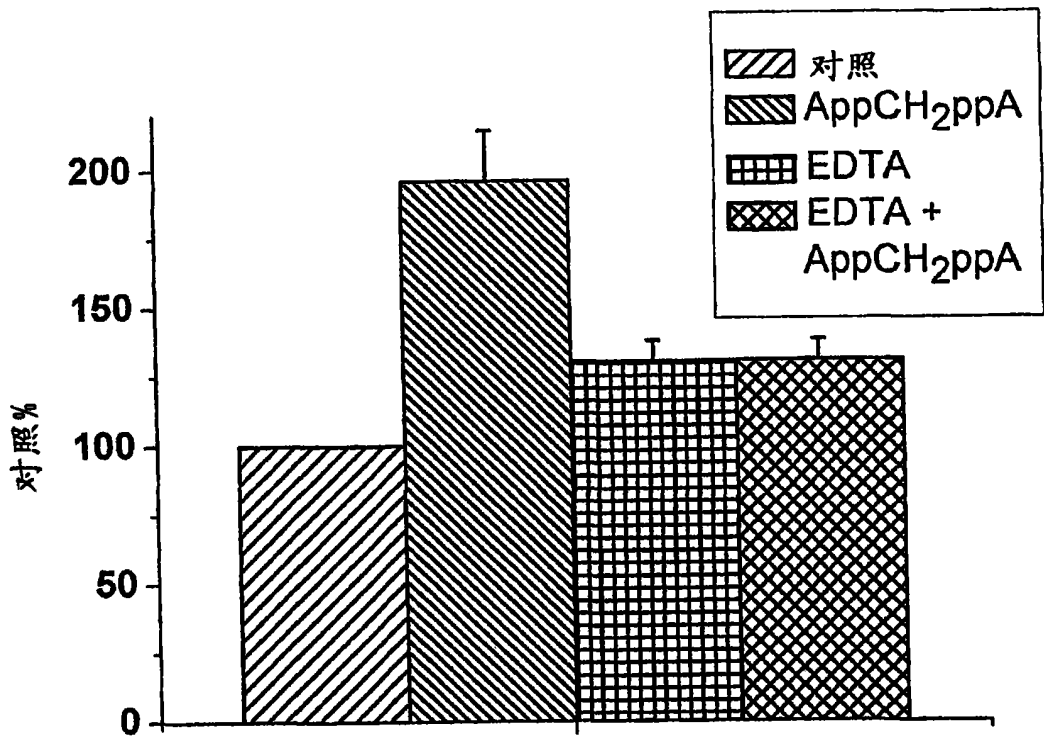


图 16a&b

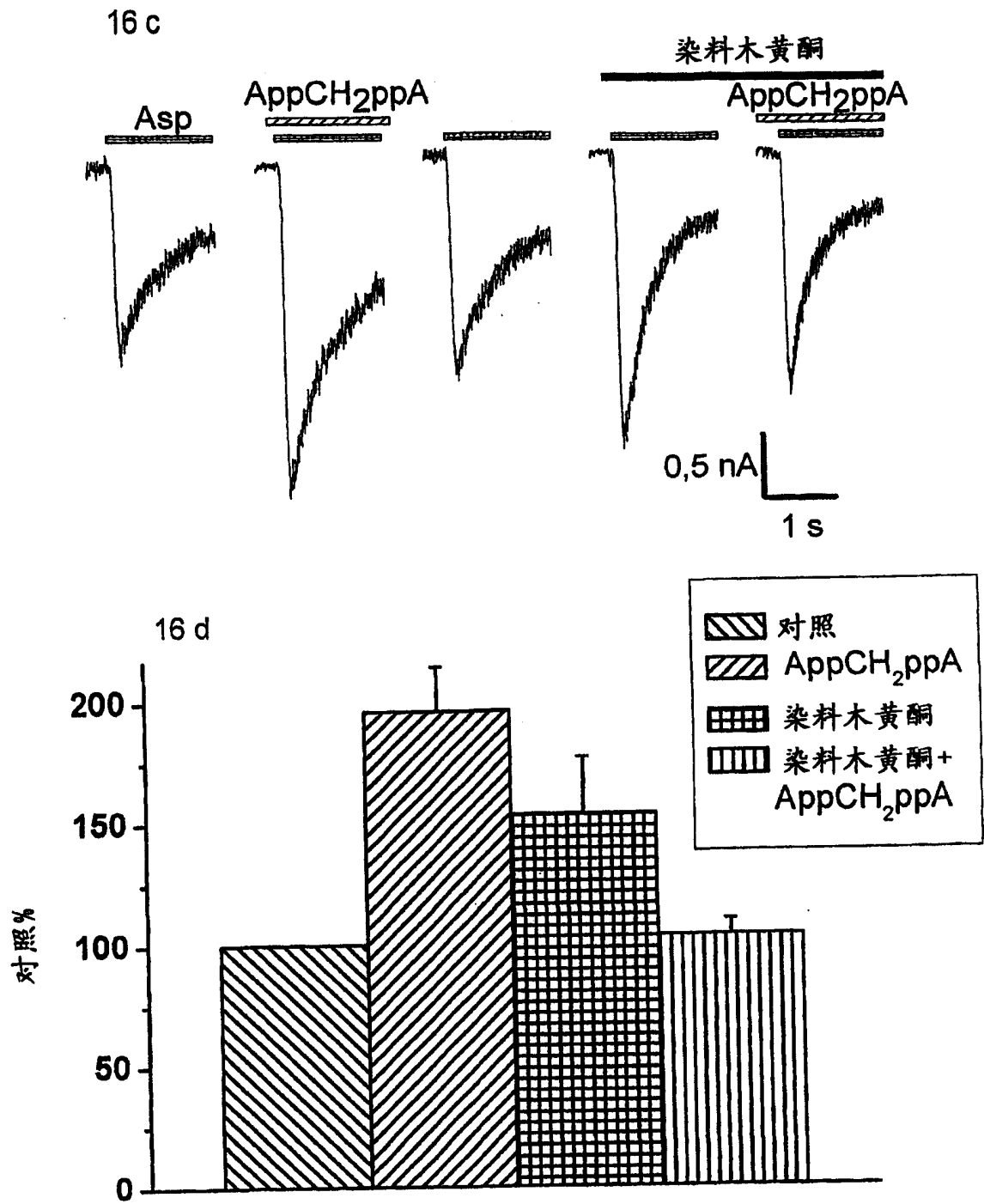


图 16c&d

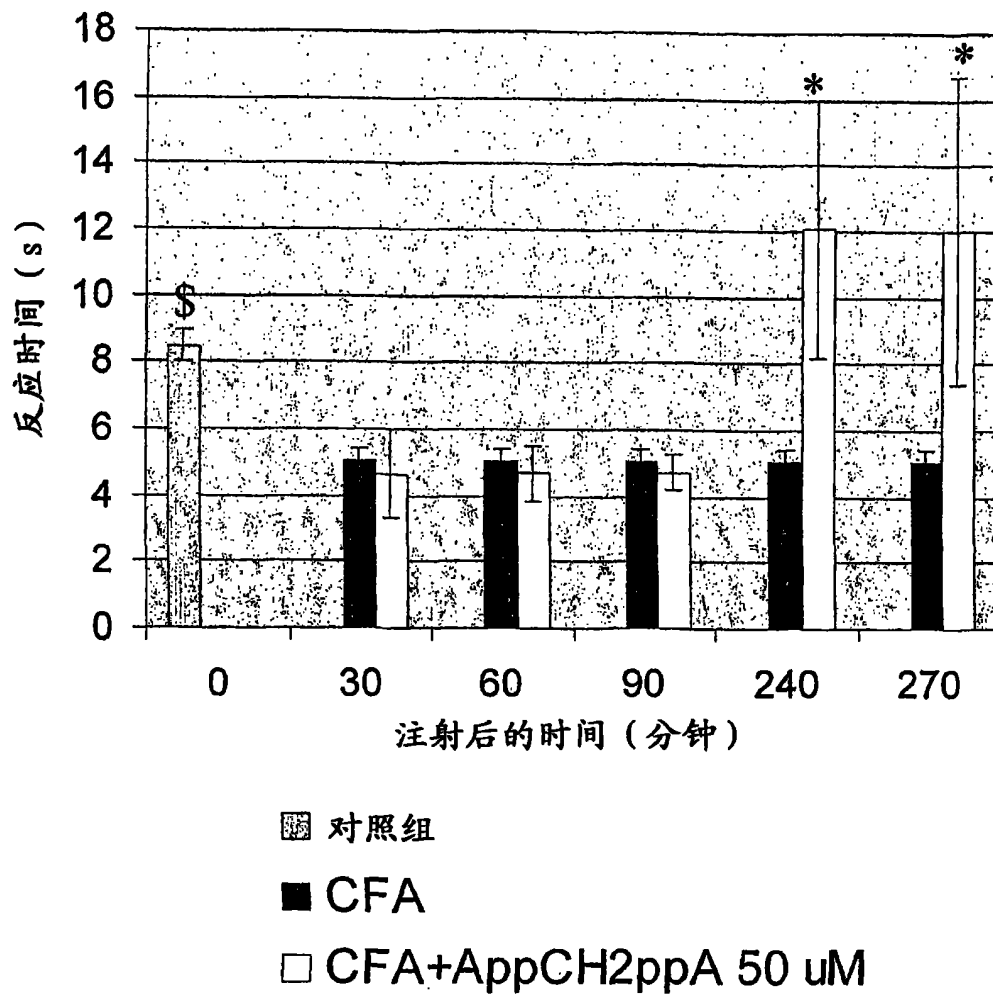


图17

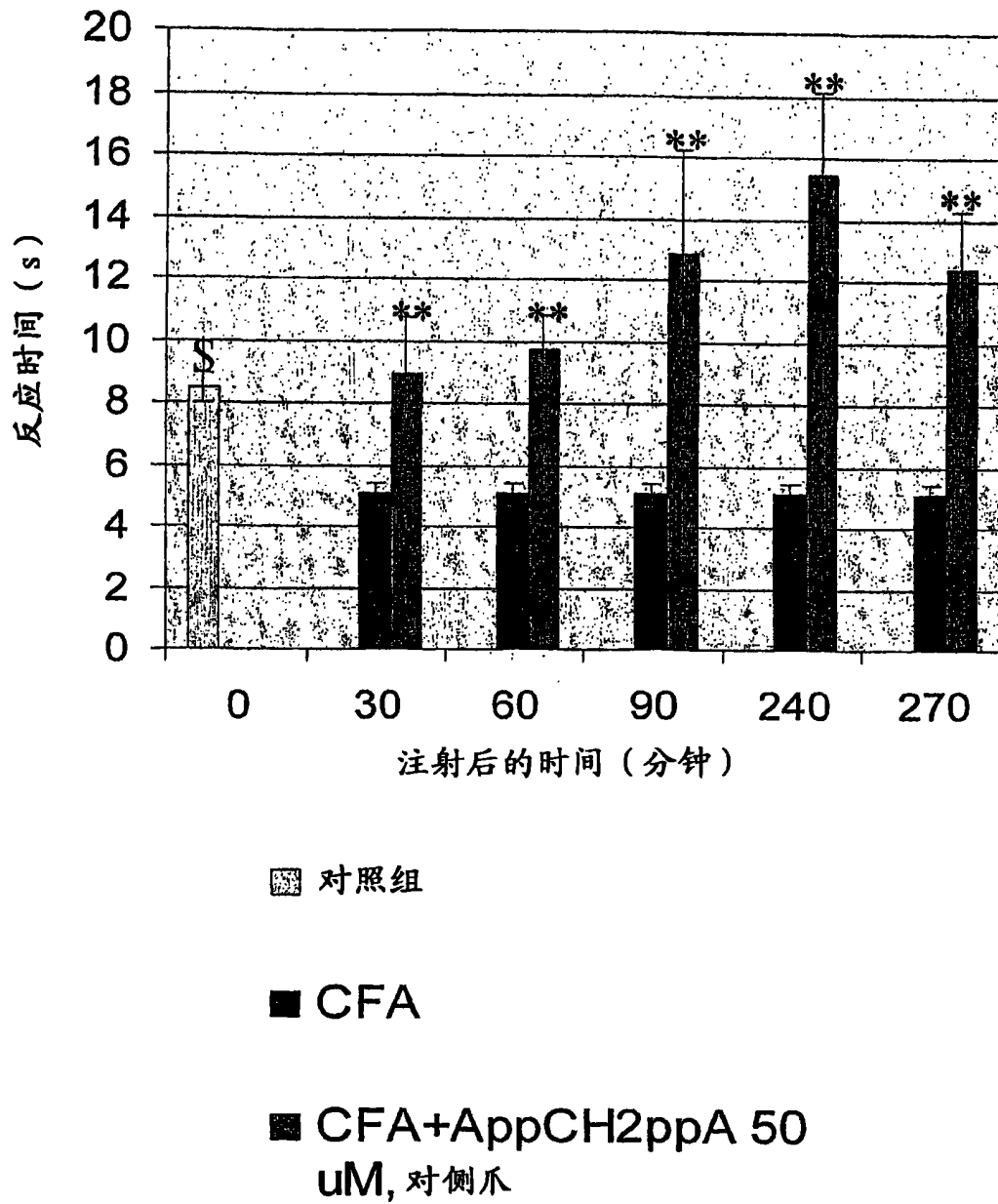


图 18