

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 31/6

A61P 7/0

//(A61K31/60,31:

122

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00123466.8

[43] 公开日 2001 年 2 月 14 日

[11] 公开号 CN 1283460A

[22] 申请日 2000.8.17 [21] 申请号 00123466.8

[71] 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

[72] 发明人 徐建兴

[74] 专利代理机构 北京万科园专利事务所

代理人 张亚军 曹诗健

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图页数 1 页

[54] 发明名称 呼吸链泛醌抑制剂在克服溶栓再灌注损伤的应用

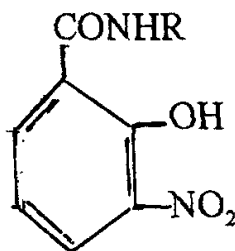
[57] 摘要

本发明是一种呼吸链泛醌抑制剂在克服溶栓再灌注损伤方面的应用,所述的呼吸链泛醌抑制剂包括硝基水杨酰胺类化合物和醌类化合物。本发明的泛醌抑制剂可减少氧自由基的生成,从而达到使再灌注损伤减小或不再发生,它们可以作为筛选溶栓辅助药物的原材料。

权 利 要 求 书

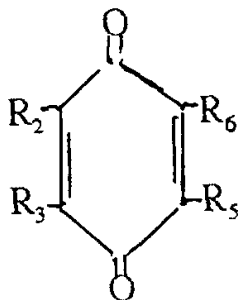
1. 一种呼吸链泛醌抑制剂在克服溶栓再灌注损伤的应用，其特征在于所述的抑制剂包括硝基水杨酰胺类化合物和醌类化合物。

2. 按照权利要求 1 所述的呼吸链泛醌抑制剂在克服溶栓再灌注损伤的应用，其特征在于所述的硝基水杨酰胺类化合物的通式为：

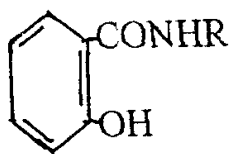


式中 R 为 C₁₋₂₀ 烷基。

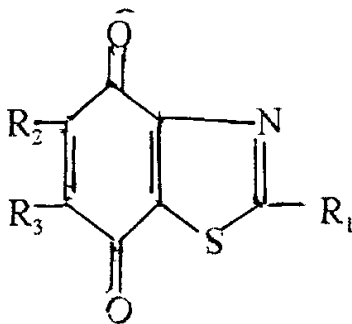
3. 按照权利要求 1 所述的呼吸链泛醌抑制剂在克服溶栓再灌注损伤的应用，其特征在于所述的醌类化合物包括卤代醌、酰胺吡啶醌、噻唑醌，所述的卤代醌通式为：



式中，R₂、R₃、R₅ 为甲基或氯、溴取代基，R₆ 为 C₁₋₂₀ 烷基，所述的酰胺吡啶醌通式为：



式中 R 为 C₁₋₂₀ 烷基，所述的噻唑醌通式为：



式中，R₁ 为 H、卤素，R₂ 为 C₁₋₂₀ 烷基或硫烷基，R₃ 为 C₁₋₄ 烷基或硫氧基、羟基、卤素。

说 明 书

呼吸链泛醌抑制剂在克服溶栓再灌注损伤的应用

本发明是一种呼吸链泛醌抑制剂在克服溶栓再灌注损伤方面的应用。

人体吸入的氧 90%以上在线粒体中被用掉，线粒体消耗氧分子主要是用于合成三磷酸腺苷(ATP)，ATP 是供给机体能量需求的主要能源分子。线粒体制造 ATP 是氧化磷酸化过程的结果，氧化是指呼吸链将底物电子传递给氧的过程，磷酸化是指 ATP 酶催化 ADP+P 生成 ATP 的过程，两个过程的偶联就是氧化磷酸化过程。

近年来科学家发现呼吸链传递电子并不是像一条绝缘很好的导线，而是像一条漏电的导线。在呼吸链的特定部位有电子漏出，漏出的电子没有进入合成 ATP 的氧化磷酸化过程，而是和氧分子直接反应生成了超氧自由基。超氧自由基可以歧化成双氧水并进一步产生其他一些有害的活性氧分子，活性氧分子水平过高常导致生物分子的氧化损伤即所谓自由基损伤。

呼吸链漏电的程度与呼吸链的还原状态有关，电子充斥时的高还原状态是呼吸链容易漏电的状态。血管栓塞意味着病灶缺血，缺血即缺氧，缺氧使得呼吸链处于容易漏电的高还原态。溶栓意味着给易漏电的呼吸链充氧，有如火上浇油，加速了超氧自由基的生成，使溶栓瞬间造成严重的氧自由基损伤，这就是所说的溶栓再灌注损伤的分子机制。

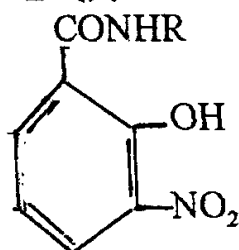
目前尚无有效的临床手段克服溶栓时出现的再灌注损伤问题，文献报道(杨卫东等,“电子自旋共振直接检测心肌缺血再灌注产生的氧自由基和复方丹参对氧自由基的清除作用”,中华心血管杂志,7,178-194(1989)),采用自由基清除剂的方法达到减少再灌注损伤的目的,但氧自由基一旦瞬间大量生成就很难用自由基清除剂的手段达到完全抵偿它们的有害作用的目的。

本发明的目的是提出用具有抑制呼吸链泛醌反应的抑制剂来克服溶栓再灌注损伤。

实现本发明目的的基本原理：体内生成氧自由基的主要部位是线粒体，呼吸链漏电是线粒体生成氧自由基的基本方式。本发明提出用呼吸链底物端抑制剂限制电子漏出的数量以达到减少氧自由基生成和避免产生再灌注损伤的目的，实验证明，呼吸链泛醌抑制剂具有这种功能。

本发明提出的泛醌抑制剂包括硝基水杨酰类化合物和醌类化合物：

一、硝基水杨酸类，通式为：



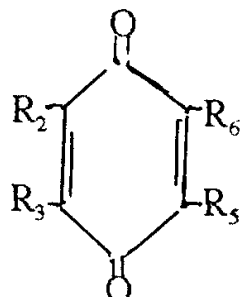
式中：R 为 C₁₋₂₀ 烷基。

具体化合物包括 3-硝基-N-甲基水杨酰胺、5-硝基-N-甲基水杨酰胺、3-硝基-N-癸基水杨酰胺。

该类化合物的制备方法见《生物化学与分子生物学学报》，15（2）：308，1999。

二. 醌类化合物包括下列化合物：

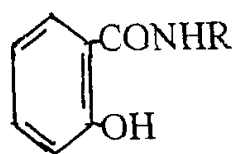
(1) 卤代醌，其通式为：



式中， R_2 、 R_3 、 R_5 为甲基或氯、溴取代基； R_6 为 C_{1-20} 烷基。

具体化合物包括 2, 3—二甲氧基-5-溴甲基-1, 4—苯醌；2, 3—二甲氧基-5-溴甲基-6-癸基-1, 4-苯醌；2, 3—二甲氧基-5-甲基-6-（1'-溴-癸基）-1, 4-苯醌；2, 3—二甲氧基-5-溴甲基-6-（1'-溴-癸基）-1, 4-苯醌；2, 3—二甲氧基-6-（1'-溴-癸基）-1, 4-苯醌。它们的制备方法见“《生物化学与生物物理学报》，30（2）：212-215，1998”。

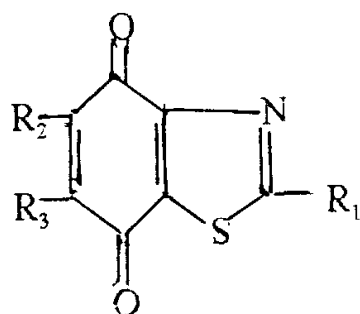
(2) 酰胺吡啶醌，其通式为：



式中 R 为 C_{1-20} 烷基。

具体化合物包括：2-羟基-3-N-十二烷基酰胺吡啶，2-羟基-6-甲基-3-N 十二烷基酰胺吡啶，3-羟基-2-N-十二烷基酰胺吡啶。它们的制备方法见“《生物化学与生物物理学报》，24（6）：575-579，1992”。

(3) 噻唑醌，其通式为：



式中， R_1 为 H、卤素， R_2 为 C_{1-20} 烷基或硫烷基， R_3 为 C_{1-4} 烷基或硫氧基、羟基、卤素。

具体化合物包括 2-氯-5-正十二硫烷基-6-甲基-4, 7-苯并噻唑醌（2-CL-DMMDBT）、2-氯-5-正丁烷氨基-6-甲基-4, 7-苯并噻唑醌（2-CL-BAMDBT）。它们的制备方法见“《生物化学与生物物理进展》，22（6）：536-540，1995”

本发明的泛醌抑制剂可以注射使用。

为了说明泛醌抑制剂减少再灌注损伤的效果，我们建立了大鼠脑栓塞模型。检测了缺血再灌注（即栓塞一定时间后进行溶栓）期间大鼠脑线粒体生成活性氧（以 H_2O_2 的生成为指标）、以及线粒体受到氧化损伤的情况（生成的脂过氧化产物丙二醛（MDA）为指标）。观察了呼吸链泛醌抑制剂限制病灶组织线粒体生成氧自由基的程度和减少氧化损伤的效果。表 1 给出了大鼠脑线粒体在缺血再灌注期间生成 H_2O_2 及 MDA 的情况。

表 1 缺血再灌注期间大鼠脑线粒体 H_2O_2 的产生量及 MDA 含量的变化

组别	次数	H_2O_2 的产生量 (pmol/mg pro./min)	MDA 含量 (nmol/100mg pro.)
Sham	6	26.0±10.7	40.8±7.7
1/2h	6	34.2±16.0	60.8±21.8
R/30m	6	31.0±7.6	43.0±6.6
R/1h	6	39.0±8.1*	58.0±20.3
R/2h	6	31.8±11.4	67.4±15.1*
R/4h	6	30.7±7.7	63.8±23.0*

注:缺血组 1/2h 和再灌注各组 R/均与假手术组 (Sham) 相比较;*P<0.05。

大鼠缺血后会出现缺血损伤，通常大鼠缺血两小时（1/2h） H_2O_2 的产生量（34.2±16.0）假手术组 Sham（26.0±10.7），说明电子漏程度增高约 30%。线粒体损伤程度 1/2h（60.8±21.8）假手术组 Sham（40.8±7.7），氧化损伤程度高约 49%。

溶栓后可发现再灌注损伤，再灌注一小时出现氧自由基产生的高峰值达 39.0±8.1*，说明电子漏程度比假手术组高出 50%。线粒体损伤在再灌注 2 小时后明显增高，R/2h 达 67.4±15.1*，比假手术组高出 65%。再灌注 4 小时 R/4h 依然高达 63.8±23.0*，比假手术组还高出 56%。

如果在溶栓前先注射一定计量的泛醌反应抑制剂，溶栓后就不再出现双氧水生成量的高峰和 MDA 含量的增高，这说明泛醌抑制剂具有减少或避免再灌注损伤的效果。

下面通过具体实例进一步说明本发明特点。

实例 1

本实例为硝基水杨酰胺类化合物对泛醌反应的抑制作用，详见图 1-图 3，其中 3-硝基-N-甲基水杨酰胺抑制剂（3-NSMA）和 5-硝基-N-甲基水杨酰胺（5-NSMA）抑制剂对琥珀酸泛醌还原酶和泛醌细胞色素 C 还原酶均有 50% 的抑制作用（见图 1）。而长侧链的硝基-N-癸基水杨酰胺可以抑制接近完全（见图 2）。

图 1 为 3-硝基-N-甲基水杨酰胺（I）和 5-硝基-N-甲基水杨酰胺（II）对泛醌-细胞色素 C 还原酶的抑制作用。图中·—·曲线为 3 硝基-N-甲基水杨酰胺；0-0 曲线为 5-硝基-N-甲基水杨酰胺。

检测条件：(A) 1.2ml 反应液中含 0.1 摩尔磷酸缓冲液（PH=7.4）、20 毫摩尔

琥珀酸钠、0.3 毫摩尔 EDTA (乙二胺四乙酸钠盐)、0.1 毫摩尔细胞色素 C、30 微摩尔 Q_2H_2 (还原型短链) 和指定量的 I 和 II。(注: 泛醌 Q_2 为含两个异戊二烯侧链)。

图 2 为 3-硝基-N-癸基水杨酰胺对电子从琥珀酸到 2,6-二氯酚吲哚酚的抑制效应。图中 0-0 曲线用琥珀酸-细胞色素 C 还原酶测定的; Δ - Δ 曲线是用心肌制剂测定的。检测条件: 反应液含 0.1 摩尔磷酸缓冲液 (PH=7.4)、20 毫摩尔琥珀酸钠、0.053 毫摩尔 2,6-二氯酚吲哚酚。

图 3 为 3-硝基-N-癸基水杨酰胺对电子从泛醌到细胞色素 C 传递的抑制效应。图中 \cdot - \cdot 曲线是用琥珀酸-细胞色素 C 还原酶测定的; \blacktriangle - \blacktriangle 曲线是用心肌制剂测定的。检测条件: 反应液含 0.1 摩尔磷酸缓冲液 (PH=7.4)、0.1 毫摩尔细胞色素 C、30 微摩尔 Q_2H_2 。

实例 2

本实例是 2,3-二甲氧基-5-溴甲基-1,4-苯醌 (I)、2,3-二甲氧基-5-溴甲基-6-癸基-1,4-苯醌 (II)、2,3-二甲氧基-5-甲基-6-(1'-溴-癸基)-1,4-苯醌 (III)、2,3-二甲氧基-5-溴甲基-6-(1'-溴-癸基)-1,4-苯醌 (IV)、2,3-二甲氧基-6-(1'-溴-癸基)-1,4-苯醌 (V) 对琥珀酸泛醌还原酶的抑制作用。检测结果见表 2 和表 3。

表 2 中数据检测条件: 1 毫升反应液中含 50 毫摩尔磷酸缓冲液 (PH 为 7.4)、20 毫摩尔琥珀酸钠、0.2 毫摩尔 EDTA、0.05 毫摩尔 2,6-二氯酚吲哚酚、0.3 毫摩尔 $Q_0C_{10}H_2$ (一种代替 Q_{10} 作为底物的醌类似物, Q_{10} 为含十个异戊二烯侧链)。加 0.5 克/升的酶制剂 20 微升启动反应, 600nm 波长监测 2,6-二氯酚吲哚酚的还原速率。

表 3 中数据检测条件: 1 毫升反应液中含 50 毫摩尔磷酸缓冲液 (PH 为 7.4)、20 毫摩尔琥珀酸钠、0.2 毫摩尔 EDTA、0.1 毫摩尔细胞色素 C 和 0.3 毫摩尔 $Q_0C_{10}H_2$ 、加 0.5 克/升的泛醌-细胞色素 C 还原酶 20 微升启动反应, 550nm 波长监测的细胞色素 C 还原速率。

表 2 溴代醌类化合物对琥珀酸-泛醌还原酶的抑制作用

溴代醌	抑制剂浓度 (μ mol/L)	抑制百分数, %
对照	0	0
I	60	12
II	60	20
III	60	72
IV	60	92
V	60	86

表 3 溴代醌类化合物对泛醌-细胞色素 C 还原酶的抑制作用

溴代醌	抑制剂浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	抑制百分数, %
对照	0	0
I	60	3
II	60	3
III	60	5
IV	60	8
V	60	6

实例 3

本实例是酰胺吡啶类化合物:2-羟基-3-N-十二烷基酰胺吡啶(A)、2-羟基-6-甲基-3-N-十二烷基酰胺吡啶(B)、3-羟基-2-N-十二烷基酰胺吡啶(C)对呼吸链酶反应的抑制作用。检测结果见表 4。

检测条件同实例 1。表 4 中 SCR 代表琥珀酸细胞色素 C 还原酶, SQR 代表琥珀酸泛醌还原酶, NCR 代表 NADH 细胞色素 C 还原酶, NQR 代表 NADH 泛醌还原酶, QCR 代表泛醌细胞色素 C 还原酶。

表 4 酰胺吡啶类化合物对呼吸链酶反应的抑制作用

抑制剂	抑制剂浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	抑制百分数, %				
		SCR	SQR	NCR	NQR	QCR
A	10	86	70	80	40	83
B	10	50	48	30	--	--
C	10	20	10	10	--	--

实例 4

本实例为苯并噻唑醌类化合物 2-氯-5-正十二烷基-6-甲基-4,7-苯并噻唑醌(2-CL-DMMDBT)和 2-氯-5-正丁烷基-6-甲基-4,7-苯并噻唑醌(2-CL-BAMDBT)对呼吸链的抑制作用。检测结果见图 4。图 4 为 2-CL-DMMDBT 和 2-CL-BAMDBT 对心肌制剂琥珀酸氧化酶活力的抑制浓度曲线。图中 0-0 曲线为 2-CL-DMMDBT 抑制剂; X-X 曲线为 2-CL-BAMDBT 抑制剂。

检测方法同实例 1。

实例 5

本实例选用 3-硝基-N-甲基水杨酰胺(NSMA)考察了泛醌抑制剂减少或避免再灌注损伤的效果。在溶栓前注射泛醌抑制剂硝基水杨酰胺(NSMA)240 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 大鼠体重,由表 5 可知,溶栓后没有出现双氧水生成量的高峰和 MDA 量的增高,这一结果说明泛醌抑制剂具有减少或避免再灌注损伤的效果。

表 5 NSMA 对缺血后再灌注不同时间线粒体
H₂O₂ 产生量及脂质过氧化水平的 (MDA 含量) 的影响

组别	次数	H ₂ O ₂ 的产生量 (pmol/mg pro./min)	MDA 含量 (nmol/100mg pro.)
S/30 m	6	53.6±9.5	51.8±24.5
D/30 m	6	48.5±8.7	37.4±12.1
S/1h	6	51.9±13.3	48.6±7.2
D/1h	6	50.4±9.4	52.3±13.9
S/2h	6	60.4±12.1	45.8±11.8
D/2h	6	59.1±3.2	50.0±20.0
S/4h	6	51.9±8.7	56.0±10.2
D/4h	6	52.2±8.5	50.7±13.8

注:D 组分别与相对应的 S 组比较无明显统计学差异 P>0.05。

说 明 书 附 图

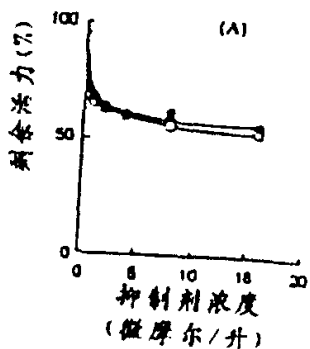


图 1

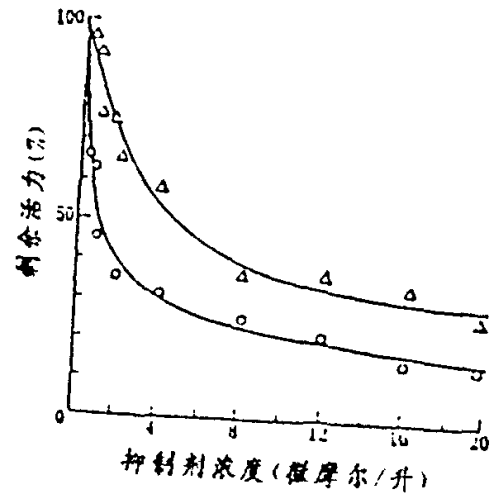


图 2

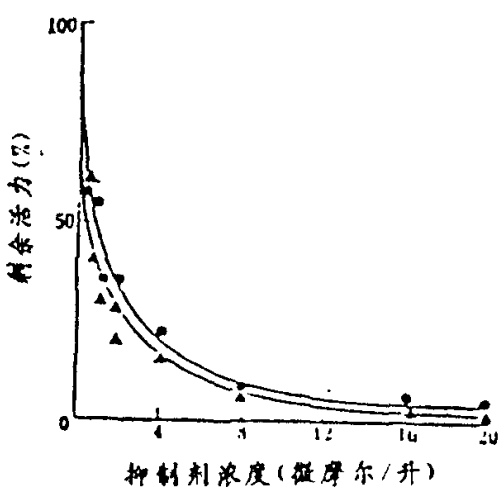


图 3

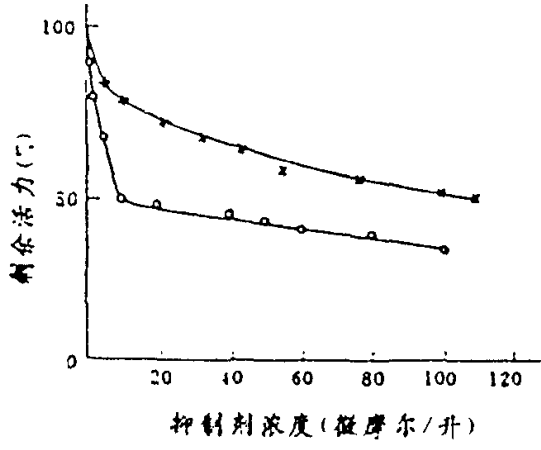


图 4