神经保护剂及其适应症

相关申请的交叉引用

本申请要求 2014 年 4 月 25 日提交中国发明专利申请 201410170263.7 号的优先权，通过引用将其所有内容合并至本文中。

技术领域

本发明涉及化合物 5α-雄甾-3β,5,6β-三醇及其类似物的新的药物用途。

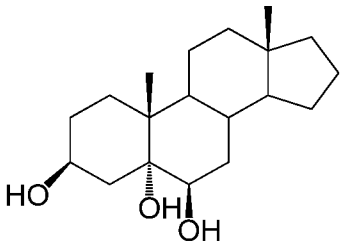
背景技术

随着海拔上升，大气压降低且氧分压降低，吸入气氧分压过低导致动脉血氧分压降低，氧含量减少，组织供氧不足。这种低压缺氧（hypobaric hypoxia, HH）主要发生在高原这一特殊环境，也被称作高原低氧（high altitude hypoxia）。

当个体近期到达超过海拔 2500 米以上地区，在急性低压缺氧（Acute Hypobaric Hypoxia）发生时，如果个体适应不了这种环境变化，会相继发生高原性头痛（High-altitude headache，HAH)、急性高原病（Acute mountain sickness，AMS)，并且 AMS 可进一步发展为高原脑水肿（High altitude cerebral edema，HACE)和高原肺水肿 (High-altitude pulmonary edema, HAPE)。已有大量报道，高原病根据程度不同主要表现出头痛、多言、失眠、步态不稳、受损伤的心智能力、嗜睡、神情恍惚麻木以及共济失调等神经功能上的症状。

目前，针对高原病药物的研发思路主要是靶向提高携氧能力和细胞因子、炎症反应，前者的代表性药物为碳酸酐酶抑制剂如乙酰唑胺，后者代表药物如糖皮质激素和一些抗氧化剂（Wright A, Brearey S, Imray C. High hopes at high altitudes: pharmacotherapy for acute mountain sickness and high-altitude cerebral and pulmonary oedema. Expert Opin Pharmacother 2008 Jan;9(1):119-27），但没有一种药物属于神经保护剂。

5α-雄甾-3β,5,6β-三醇是新发现的神经保护剂(中山大学（颜光美;胡海燕;冷田东;桑韩飞;张静夏;邱鹏新;周树佳;陈婕思;游秀华），5α-雄甾(烷)-3β,5,6β-三醇在制备神经元保护药物中的应用；中国发明专利号：ZL 2010 1 0224173.3)，其结构式为：

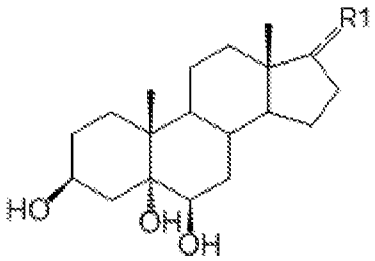


5α-雄甾-3β,5,6β-三醇的分子结构

我们的研究发现，5α-雄甾-3β,5,6β-三醇及其类似物出人意料地可以显著改善低压缺氧处理的神经功能学评分，保护低压缺氧造成的脑部病理损伤，从而有效预防或治疗低压缺氧引起的高原病。

发明内容

本发明的目的在于提供下式 A 的 3β,5α,6β-三羟基甾体化合物或其药学上可接受的盐在制备治疗或预防低压缺氧造成的高原病的药物组合物中的应用，从而为高原病的预防与治疗提供一种新药物：



（式 A）

其中 R1 为 H 或具有 1 至 5 个碳原子的直链或支链的烷基或末端烯基。

在一个实施方式中，其中 R1 为 H，即所述化合物为 5α-雄甾-3β,5,6β-三醇（在本说明书及说明书附图中也被简称为“YC-6”）。

在本发明的一个实施方式中，所述高原病为由高原性急性低压缺氧引起的急性高原病。

在本发明的另一个实施方式中，所述高原病为高原脑水肿，具体是血管性水肿。

在本发明的另一个实施方式中，所述高原病为神经元损伤，具体是神经元的变性损伤，包括由高原性急性低压缺氧引起的神经元损伤和由高原性慢性低压缺氧引起的神经元损伤。

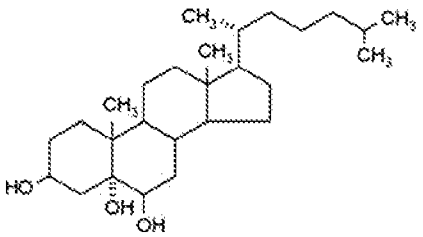
在本发明的另一个实施方式中，所述药物组合物包含额外的用于治疗或预防低压缺氧造成的高原病的活性成分，例如碳酸酐酶抑制剂（如乙酰唑胺）、糖皮质激素和抗氧化剂。

非人灵长类低压缺氧模型动物模型的研究表明，5α-雄甾-3β,5,6β-三醇处理可以显著

改善低压缺氧环境下的实验动物的神经功能学评分，对低压缺氧导致的神经功能损伤具有显著保护作用，表明 5α-雄甾-3β,5,6β-三醇对 AMS (High altitude cerebral edema)和 HACE（High-altitude pulmonary edema）具有预防和治疗效果。

进一步的研究表明，5α-雄甾-3β,5,6β-三醇显著阻断低压缺氧导致的脑含水量上升，电镜形态学和 HE 染色病理分析表明，5α-雄甾-3β,5,6β-三醇可以减少低压缺氧导致的脑血管源性水肿和神经元空泡样变性损伤，从而预防或治疗高原病。

在另外的实施方式中，R1 为-$CH(CH_3)(CH_2)_3CH(CH_3)_2$，即所述化合物为胆甾烷-3β，5α，6β-三醇（化合物 I）。研究表明，化合物 I 也具有神经保护作用(中山大学，胆甾烷-3β，5α，6β-三醇在制备神经元保护药物中的应用，中国发明专利号 ZL 200810198703.4)。相似地，我们发现，该化合物也能够有效减轻低压缺氧引起的血管性水肿及神经元变性损伤，从而用于高原病的预防或治疗。化合物 I 的结构式为：

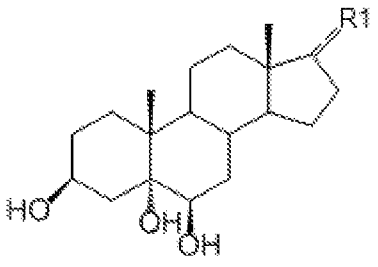


胆甾烷-3β，5α，6β-三醇的分子结构

同样类似地，通式 A 的其他化合物也具有神经保护作用(中山大学，3β,5α,6β-三羟基甾体化合物及其合成方法和应用，中国发明专利号 ZL 201110061235.8)。相似地，我们发现，这些化合物也能够有效减轻低压缺氧引起的血管性水肿，降低脑含水量上升，保护低压缺氧引起的神经元变性损伤，从而用于高原病预的防或治疗。

在具体的实施方式中，R1 为-$CHCH_2CH_3$、-$CH(CH_3)_2$ 或-$CH(CH_2)_3CH_3$，即所述化合物分别是 17-亚丙基-雄甾-3β,5α,6β-三醇（化合物 II）、17-异丙基-雄甾-3β,5α,6β-三醇（化合物 III）、17-丁基-雄甾-3β,5α,6β-三醇（化合物 IV）。

本发明的另一个方面提供一种治疗或预防低压缺氧造成的高原病的方法，包括向有需要的对象施用有效量的式 A 的 3β,5α,6β-三羟基甾体化合物或其药学上可接受的盐，



（式 A）

其中 R1 为 H 或具有 1 至 5 个碳原子的直链或支链的烷基或末端烯基。

在一个实施方式中，其中 R1 为 H，即所述化合物为 5α-雄甾-3β,5,6β-三醇。在另一个实施方式中， R1 为-$CH(CH_3)(CH_2)_3CH(CH_3)_2$，即所述化合物为胆甾烷-3β，5α，6β-三醇（化合物 I）。在其他实施方式中，R1 为-$CHCH_2CH_3$、-$CH(CH_3)_2$ 或-$CH(CH_2)_3CH_3$，即所述化合物分别是 17-亚丙基-雄甾-3β,5α,6β-三醇（化合物 II）、17-异丙基-雄甾-3β,5α,6β-三醇（化合物 III）、17-丁基-雄甾-3β,5α,6β-三醇（化合物 IV）。

在本发明的实施方式中，所述高原病选自急性高原病、高原脑水肿、急性低压缺氧引起神经元损伤或慢性低压缺氧引起的神经元损伤。

在本发明的实施方式中，所述对象为哺乳动物，例如人。

5α-雄甾-3β,5,6β-三醇及其类似物在结构上的特征都是 3β,5α,6β-三羟基甾体类化合物，功能上的特征在于都具备神经保护作用。本发明发现上述 5α-雄甾-3β,5,6β-三醇类似物同样能够有效预防或治疗低压缺氧引起的高原病。

附图说明

图 1: 5α-雄甾-3β,5,6β-三醇显著改善急性低压缺氧的食蟹猴的神经功能损伤。*：5α-雄甾-3β,5,6β-三醇处理组与溶剂对照组比较，$P<0.05$。

图 2：5α-雄甾-3β,5,6β-三醇减轻急性低压缺氧食蟹猴脑皮层组织的血管性水肿（透射电镜，3900×）。Con：平原对照组；H/R+V：溶剂对照组；H/R+YC-6：5α-雄甾-3β,5,6β-三醇处理组。粗箭头指示大脑额叶皮层组织内的毛细血管，细箭头指示血管周隙 VRS。

图 3：5α-雄甾-3β,5,6β-三醇减轻低压缺氧食蟹猴脑皮层神经元的变性损伤（HE 染色，400×）。Con：平原对照组；H/R+V：溶剂对照组；H/R+YC-6：5α-雄甾-3β,5,6β-三醇处理组。箭头指示变性受损的神经元。

具体实施方式

下面通过具体实施例进一步解释本发明，但是本发明不仅限于实施例中。

5α-雄甾-3β,5,6β-三醇的新用途验证

1. 动物：健康雄性食蟹猴（Macaca fascicularis）17 只，6 至 6.5 岁，体重 6.8-7.5Kg。实验动物的使用经过实验动物管理与使用委员会和实验动物伦理委员会批准，实验方案符合动物保护、动物福利和伦理原则和规定。

17 只雄性食蟹猴随机分为 3 组（表 1）

表 1. 实验动物分组说明

组别	处理
1（n=6）	平原对照
2（n=5）	溶剂对照：葡萄糖生理盐水（模拟海拔 7500 米急性高原缺氧）
3（n=6）	5α-雄甾-3β,5,6β-三醇处理：10 mg/kg 5α-雄甾-3β,5,6β-三醇（模拟海拔 7500 米急性高原缺氧）

2. 主要仪器与参数：高原环境模拟低压舱群是模拟高原环境低温低压实验平台体系，可以自动化控制模拟 1 万米以下任意海拔高度、-30℃以上任意温度的低温低压环境。上升速度为 3 米/秒（0 至 6000m）；下降时为 2 米/秒（6000 至 7500m），舱内温度恒定于 22℃，平均空气流速为 150 m^3/h。

3. 食蟹猴急性低压缺氧模型的制作及给药：

（1）采用低压舱控制模拟 7500 米海拔高度造成食蟹猴急性缺氧。将饲养于动物房的食蟹猴做好标识然后放入低压舱内饲养 1 天以适应实验环境。实验开始后通过调节低压舱内气压来模拟 3000、4500、6000 米海拔高度，每个高度停留 30 分钟后，以及模拟 7500 米处理 24 小时后，按设计剂量和方式给药。7500 米处理 48 小时后，以 3 米/秒速度将模拟海拔下降到 6000 米，氯胺酮麻醉后放血处死动物，并进行解剖、取材、固定。平原对照组的食蟹猴一直饲养于海拔高度为 350 米的动物房，直到评价和麻醉处死取材。

（2）5α-雄甾-3β,5,6β-三醇处理组的动物在未开始模拟升高前、模拟升至 3000 米停留 30 分钟后以及模拟升至 4500 米停留 30 分钟后，按 10 mg/kg 的剂量分别静脉推注葡萄糖生理盐水稀释的 5α-雄甾-3β,5,6β-三醇 10 mL；溶剂对照组只静脉推注葡萄糖生理盐水 10 mL。

（3）5α-雄甾-3β,5,6β-三醇处理组的动物在低压舱内模拟高度 6000 米停留 30 分钟后，5α-雄甾-3β,5,6β-三醇缓释剂按 30 mg/kg 的剂量分成 5 点进行骨骼肌肌肉注射；急性高原缺氧模型组只静脉推注葡萄糖生理盐水 10mL。

（4）5α-雄甾-3β,5,6β-三醇处理组的动物在低压舱内模拟高度 7500 米停留 24 小时后，5α-雄甾-3β,5,6β-三醇注射液按 10 mg/kg 的剂量用葡萄糖生理盐水稀释至 10 mL，一次性静脉推注，并且 5α-雄甾-3β,5,6β-三醇缓释剂按 30 mg/kg 的剂量分成 5 点进行骨骼肌肌肉注射。急性高原缺氧模型组只静脉推注葡萄糖生理盐水 10mL。

4. 检测指标

4.1 动物神经功能评分

根据本实验的特点，动物在低压舱内模拟海拔 7500 米停留 24 小时后，以 3 米/秒速度下降到模拟海拔 6000 米，按照文献(朱华,卢珊,冯铭,李秦等，一种改进的非人灵长类神经功能缺损评价方法, 中国比较医学杂志, 2011, 21 (9): 58-62)的方法评估并记录食蟹猴的神经功能评分。由两位不了解分组情况且未参与给药的经培训的观察者评估并记录神经功能评分，按平均评分计分。

4.2 左半球脑含水量测量

根据文献(Patir H, Sarada SK, Singh S, Mathew T, Singh B, Bansal A. Quercetin as a prophylactic measure against high altitude cerebral edema. Free Radic Biol Med 2012 Aug 15;53(4):659-68)介绍的方法进行脑含水量测量。低压舱模拟高度 7500 米停留 48 小时后以及平原对照组实验猴，由不了解分组情况且未参与给药的实验者麻醉放血处死，迅速取出猴脑，切取左半脑，称取其湿重。然后将左半脑置于 60℃干燥箱，每天固定时间称取脑重，直至脑重数值不再变化，记录终点脑重。含水量百分比=（左半脑湿重－左半脑干重）/ 左半脑湿重×100%。

4.3 大脑额叶皮层组织的透射电镜分析

实验猴大脑额叶皮层组织取出后切出 1 mm^3 脑块，固定于 2.5%戊二醛电镜固定液后制作超薄切片，用透射电镜观察分析以下项目：神经元的形态和血管的结构等。

4.4 大脑额叶皮层组织的 HE 染色分析

实验猴大脑额叶皮层组织取出后切出 1 cm^3 的方块后固定于 4%多聚甲醛中。之后按照常规 HE 染色步骤，进行石蜡包埋，切片，苏木素伊红染色后在显微镜下观察。

4.5 统计学处理

实验结果以均数±标准差表示，采用 SigmaPlot 软件进行统计分析。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

结果表明，5α-雄甾-3β,5,6β-三醇显著保护低压缺氧环境食蟹猴的神经功能。实验猴在低压舱模拟海拔 6000 米环境下停留 30 分钟后，行为活动明显减少，对威迫刺激的反应也有所降低。将模拟海拔提高到 7500 米 24 小时后，溶剂对照组食蟹猴出现明显的意识抑制，行为活动大为减少，且出现运动、感觉系统的功能障碍，神经功能评分为 31.6±4.2；与之相比，5α-雄甾-3β,5,6β-三醇处理组的动物的神经功能评分为 20.5±5.7（$P<0.01$），显示神经功能得到有效保护（图 1）。

5α-雄甾-3β,5,6β-三醇显著减少低压缺氧环境下食蟹猴脑含水量的增加。计算并分析脑含水量百分比后显示，平原对照组食蟹猴的脑含水量为 76.155%，与之相比，在低压舱

内模拟海拔 7500 米处理 48 小时后，溶剂对照组食蟹猴的脑含水量增加为 76.714%（*P*<0.05）。升至 7500 米前给予 5α-雄甾-3β,5,6β-三醇并在 7500 米维持 24 小时后再次给予 5α-雄甾-3β,5,6β-三醇，食蟹猴的脑含水量降低至 76.283%（*P*<0.05），表明给予 5α-雄甾-3β,5,6β-三醇可以抑制急性高原缺氧环境下食蟹猴脑含水量的增加（表 2）。

表 2. 5α-雄甾-3β,5,6β-三醇对低压缺氧环境下的食蟹猴脑含水量的影响

组别	脑含水量（%）
平原对照	76.155 ± 0.302
溶剂对照	76.714 ± 0.262 #
5α-雄甾-3β,5,6β-三醇处理	76.283 ± 0.235 *

#：与平原对照组比较，*P*<0.05；*：与溶剂对照组比较，*P*<0.05。

5α-雄甾-3β,5,6β-三醇减轻低压缺氧引起的血管性水肿。在透射电镜下观察，与平原对照组比较，溶剂对照组食蟹猴大脑额叶皮层毛细血管外出现明显加宽的血管周隙（Virchow Robin Space，VRS），表明出现严重的血管性水肿渗出；而经 5α-雄甾-3β,5,6β-三醇处理的食蟹猴脑组织血管周隙趋于正常，显示并未发生明显的血管性水肿（图 2）。

5α-雄甾-3β,5,6β-三醇减轻低压缺氧处理引起的神经元变性损伤。经 HE 染色后观察，溶剂对照组大脑额叶皮层组织结构明显疏松，血管周围出现水肿液，压迫管腔；部分神经元变性，胞体皱缩、核固缩，细胞出现空泡样变性改变（箭头所示）；5α-雄甾-3β,5,6β-三醇处理组的血管性水肿不明显，与平原对照组近似神经元空泡样变性损伤减轻，表明 5α-雄甾-3β,5,6β-三醇对低压缺氧环境下的神经元具有保护作用（图 3）。

药物组合物

本实施例中使用的是 5α-雄甾-3β,5,6β-三醇注射剂与缓释混悬剂，在制备预防或治疗低压缺氧引起的高原病时的药物剂型包括但不限于注射剂、缓释混悬剂、口服胶囊(丸) 、栓剂以及皮下埋植剂及外贴膏药型制剂等。

（1）5α-雄甾-3β,5,6β-三醇（YC-6）注射剂的制备

20% HP-β-CD 溶液的配制：称取 20.0 g HP-β-CD，加入 80 mL 生理盐水，搅拌使其溶解。加生理盐水至 100 ml，经 0.22μm 微孔滤膜精滤，分装于 15 mL 离心管中，密封于 4℃下保存。

2 mg/ml YC-6 溶液的配制：称取 6.0 g HP-β-CD，加 24 mL 去离子水，搅拌使其溶解。称取 YC-6 0.060 g，加至上述 HP-β-CD 溶液中，搅拌使其溶解。称取氯化钠 0.270 g，加

入其中，搅拌使其溶解，加去离子水至 30mL。经 0.22μm 微孔滤膜精滤，分装于 1.5 mL Eppendorf 管中，密封于 4℃下保存待用。使用时按 10 ml/kg 液量给药，换算为 20 mg/kg 给药量。

（2）5α-雄甾-3β,5,6β-三醇（YC-6）缓释剂的制备

缓释混悬剂的处方是：YC-6 12.5g，甘油 30mL，HP-β-CD 50g，CMC-Na 0.48g，注射用水加至 250mL。

制备方法：0.8% CMC-Na 溶液的配制，称取 CMC-Na 消 0.8g CMC-Na，分多次加到 90 mL 的 90 度的水中，边加边搅，直至全部加入并溶解。放至室温，加水至 100mL，搅匀。3000r/min 离心 15min，取上清液，备用。

40% HP-β-CD 溶液的配制：称取 HP-β-CD 80 g，加到约 100mL 水中，搅拌溶解，加水至 200mL，备用。

称取 YC-6 约 12.5g，置乳钵中，将颗粒研细研匀。加入 30 mL 甘油，继续研匀，使成乳白色润滑液，成细腻糊状。取 125mL 的 40% HP-β-CD 水溶液，逐量边加入边研磨。0.8% CMC-Na，取 60mL 边加入边研匀，避免产生过多的气泡。转移至定量管，补注射用水至 250 mL，摇晃使均匀。

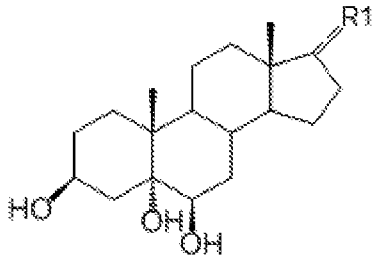
5α-雄甾-3β,5,6β-三醇类似物的新用途验证

将 YC-6 替换为上述化合物 I、II、III、IV，在相同条件下重复上述食蟹猴急性低压缺氧模型的实验。结果表明，相似地，经过化合物 II、III、IV 处理的食蟹猴的神经功能得到有效保护，脑含水量的增加被抑制，没有发生明显的血管性水肿，并且血管性水肿不明显。可见 5α-雄甾-3β,5,6β-三醇类似物特别是化合物 I 和具有通式 A 的化合物（特别是化合物 II、III、IV）也能够有效预防或治疗低压缺氧引起的高原病。

以上所述仅为本发明的优选实施方式，并不以此限定本发明的范围。本领域技术人员可以基于本发明的公开内容对其作出修改或修饰，而不超出本发明权利要求界定的范围。

权 利 要 求

1. 下式 A 的 3β,5α,6β-三羟基甾体化合物或其药学上可接受的盐在制备治疗或预防低压缺氧造成的高原病的药物组合物中的应用，



（式 A）

其中 R1 为 H 或具有 1 至 5 个碳原子的直链或支链的烷基或末端烯基。

2. 如权利要求 1 所述的应用，其中 R1 为 H。

3. 如权利要求 1 所述的应用，其中 R1 选自：$-CHCH_2CH_3$、$-CH(CH_3)_2$、$-CH(CH_2)_3CH_3$和$-CH(CH_3)(CH_2)_3CH(CH_3)_2$。

4. 根据权利要求 1 所述的应用，其中所述高原病为急性高原病。

5. 根据权利要求 1 所述的应用，其中所述高原病为高原脑水肿。

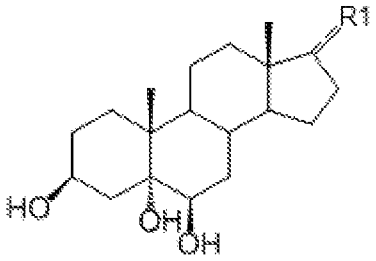
6. 根据权利要求 1 所述的应用，其中所述高原病为神经元损伤。

7. 根据权利要求 6 所述的应用，其中所述高原病为由高原性急性低压缺氧引起的神经元损伤。

8. 根据权利要求 6 所述的应用，其中所述高原病为由高原性慢性低压缺氧引起的神经元损伤。

9. 根据权利要求 1 所述的应用，所述药物组合物包含额外的用于治疗或预防低压缺氧造成的高原病的活性成分。

10. 一种治疗或预防低压缺氧造成的高原病的方法，包括向有需要的对象施用有效量的式 A 的 3β,5α,6β-三羟基甾体化合物或其药学上可接受的盐，



（式 A）

其中 R1 为 H 或具有 1 至 5 个碳原子的直链或支链的烷基或末端烯基。

11. 如权利要求 10 所述的方法，其中 R1 为 H。

12. 如权利要求 10 所述的方法，其中 R1 选自：$-CHCH_2CH_3$、$-CH(CH_3)_2$、$-CH(CH_2)_3CH_3$ 和 $-CH(CH_3)(CH_2)_3CH(CH_3)_2$。

13. 如权利要求 10 所述的方法，其中所述高原病选自急性高原病、高原脑水肿、急性低压缺氧引起神经元损伤或慢性低压缺氧引起的神经元损伤。

14. 如权利要求 10 所述的方法，所述对象为哺乳动物。

15. 如权利要求 14 所述的方法，所述哺乳动物是人。