



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101610775 B

(45) 授权公告日 2012. 12. 12

(21) 申请号 200780045798. X

(22) 申请日 2007. 12. 25

(30) 优先权数据

353642/2006 2006. 12. 28 JP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009. 06. 11

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2007/001463 2007. 12. 25

(87) PCT申请的公布数据

W02008/081580 JA 2008. 07. 10

(73) 专利权人 国立大学法人御茶水女子大学

地址 日本东京都

(72) 发明人 室伏贵美子 金敷晴美

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 熊玉兰 李平英

(51) Int. Cl.

A61K 31/665(2006. 01)

A61P 25/04(2006. 01)

A61P 29/00(2006. 01)

(56) 对比文件

JP 特开 2004-10582 A, 2004. 01. 15, 权利要求 1, 说明书第 13 段.

Kimiko Murakami-Murofushi et al..

Biological functions of novel lipid mediator, cyclic phosphatidic acid.

《Biochimica et Biophysica Acta》. 2002, 第 1582 卷 1-7.

审查员 谢京晶

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 3 页

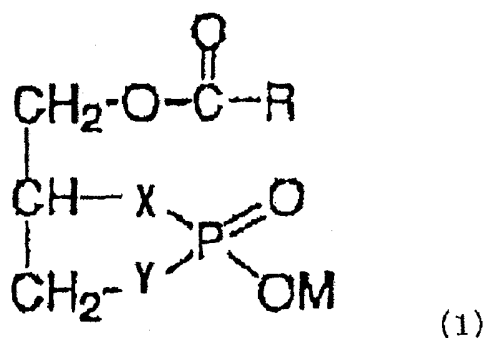
(54) 发明名称

含有环状磷脂酸衍生物的镇痛剂

(57) 摘要

本发明的目的在于阐明 cPA 的新生理活性之一的镇痛作用, 并提供新型镇痛剂。根据本发明, 提供含有作为磷脂的 1 种的环状磷脂酸衍生物的镇痛剂。

1. 通式 (1) 表示的化合物用于制备镇痛剂的用途：



式中, R 为碳原子数 1 ~ 30 的直链状或支链状烷基、碳原子数 2 ~ 30 的直链状或支链状烯基、或碳原子数 2 ~ 30 的直链状或支链状炔基, 这些基团含有或者不含有环烷烃环或芳香环; X 和 Y 分别独立地表示 -O- 或 -CH<sub>2</sub>-, X 和 Y 不同时为 -CH<sub>2</sub>-, M 为氢原子或反阳离子。

2. 权利要求 1 所述的用途, 所述通式 (1) 中, X 和 Y 为 -O-。

3. 权利要求 1 所述的用途, 所述通式 (1) 中, X 或 Y 为 -CH<sub>2</sub>-。

4. 权利要求 1 或 2 所述的用途, 其中以通式 (1) 表示的化合物为 1- 油酰基环状磷脂酸或 1- 棕榈油酰基环状磷脂酸。

## 含有环状磷脂酸衍生物的镇痛剂

### 技术领域

[0001] 本发明涉及含有作为磷脂的 1 种的环状磷脂酸衍生物的镇痛剂。

### 背景技术

[0002] 日本的“疼痛”治疗被认为处于低于欧美的水准。“疼痛”相关的基础研究的研究环境也远差于欧美,此外,社会或政府对“疼痛”理解的低下,使得疼痛无法与治疗联系起来。

[0003] 为打破这样的现状,改善“疼痛”医疗,日本有必要在医疗一线的医师和从事基础研究的研究者、政府相关的人们等的协作下推进活动。从致力于日本“疼痛”治疗的实况调查或对社会经济的影响调查等开始,到“疼痛”机理的阐明,和其治疗方法的开发,治疗方针的策定,教育现场的“疼痛”教育的强化,对正常人或患者的启发活动等,应当做的事情很多。即便是为不远将来的老龄化社会作准备,“疼痛”医疗的确立也被视为当务之急,这将关系到提高深受“疼痛”之苦的患者的生活质量,并减轻社会医疗负担,同时还抑制社会劳动生产力的损失,促进日本经济。

[0004] 已知的主要镇痛剂,大致分为麻药性镇痛药和解热性镇痛药。麻药性镇痛药主要作用于中枢,具有很强的镇痛作用。麻药性镇痛药作用于阿片受体。作为麻药性镇痛药,存在镇痛作用比较弱的弱阿片样物质(可待因等)和,镇痛作用比较强具有耐药性的强阿片样物质(吗啡等)。另一方面,作为解热性镇痛药,已知有阿司匹林、乙酰氨基酚、布洛芬、消炎痛等,主要作用于外周神经系统,具有缓和的镇痛作用。解热性镇痛药一般具有 COX 阻断引起的抗炎作用和镇痛解热作用,但也存在如乙酰氨基酚那样没有 COX 阻断作用的镇痛、解热药。

[0005] 另一方面,本发明人等一直来就以真性粘菌多头绒泡菌作为实验材料,进行着各种细胞生化学分析,清楚地揭示了真性粘菌根据外部环境的变化表现出形态变化,伴随其增殖、分化,在生物膜脂质的组成和代谢中可见显著的变化。1992 年从单倍体黏液变菌体分离、鉴定的新型脂质成分,结构解析的结果确认了该脂质成分是甘油骨架的 sn-1 位具有含环丙烷环的十六烷酸,在 sn-2 位和 3 位磷酸环状地形成酯键的物质(Murakami-Murofushi, K., 等;J. Biol. Chem., 267, 21512-21517 (1992))。该物质是来源于绒泡菌(Physarum)的 LPA 类似物,因此被命名为 PHYLPA。PHYLPA 抑制真核细胞的 DNA 聚合酶  $\alpha$  的活性,并由抑制了动物培养细胞的增殖的脂质组分得到,已确认 PHYLPA 显示上述生理活性。PHYLPA 具有特征性脂肪酸,但有机合成将该脂肪酸部分置换为其它一般脂肪酸的结构类似体,并调查它们的生理活性,结果显示与 PHYLPA 相同的生理作用(Murakami-Murofushi, K., 等;Biochem. Biophys. Acta, 1258, 57-60 (1995))。由此,推测对其生理作用重要的结构在于甘油 sn-2 位、3 位的环状磷酸结构。具有该结构的脂质统称为环状磷脂酸(cyclic phosphatidic acid;cPA)。进一步揭示了环状磷脂酸(cPA)是普遍存在于人血清中以及各种生物体中的生理活性脂质(Kobayashi, T., 等;Life Sci., 65, 2185-2191 (1999))。

[0006] 非专利文献 1:Murakami-Murofushi, K., 等;J. Biol. Chem., 267, 21512-21517 (1992)

[0007] 非专利文献 2:Murakami-Murofushi, K., 等;Biochem. Biophys. Acta, 1258, 57-60 (1995)

[0008] 非专利文献 3:Kobayashi, T., 等;Life Sci., 65, 2185-2191 (1999)

### 发明内容

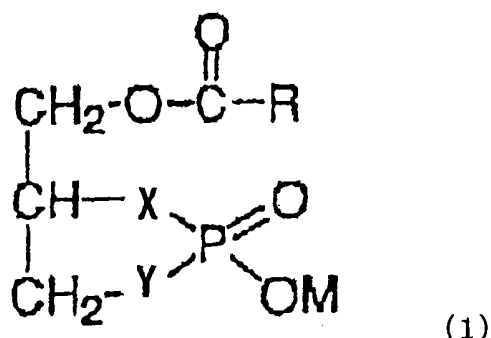
[0009] 本发明要解决的课题在于阐明 cPA 的新生理活性之一的镇痛作用,并提供新型镇痛剂。

[0010] 本发明人由各种真核生物发现作为生理活性磷脂的环状磷脂酸 (cPA),并对其生理作用持续进行了十几年的研究,结果发现 cPA 具有显著的镇痛效果。在目前为止所采用的检验方法中,显示具有不次于吗啡程度的镇痛作用。此外, cPA 原本就包含在生物体内,从生物体外部给药时不显示毒性或成瘾性的事实,由动物实验可知这一点。cPA 的疼痛抑制效果的实验结果的概要如下所述。

[0011] 即,本发明人使用中枢神经系统无伤的麻醉大鼠,以通过后肢躯体性传入神经(後肢性求心性神经)的电刺激诱发的(1)心率增加反应和(2)交感神经心脏分支反射电位两者作为指标,研究了 cPA 的静脉内给药引起镇痛效果的可能性。其结果,通过上述两种方法,可证实 cPA 具有明显的镇痛效果,并且其作用有可能由阿片受体介导。具体地,首先以大鼠感到疼痛的程度施加电脉冲,引起心率上升,研究通过 cPA 的给药来抑制心率上升的可能性。进一步地,将心神经露出,利用测定神经纤维放电水平的实验系统,研究通过 cPA 的给药来降低由电脉冲引起的放电水平的可能性。其结果显示, cPA 剂量依赖性地抑制放电水平,并且 cPA 具有作为镇痛剂的高潜力。本发明基于上述发现而完成。

[0012] 即,本发明提供含有以通式 (1) 表示的化合物作为有效成份的镇痛剂:

[0013]



[0014] (式中, R 为碳原子数 1 ~ 30 的直链状或支链状烷基、碳原子数 2 ~ 30 的直链状或支链状烯基、或碳原子数 2 ~ 30 的直链状或支链状炔基,这些基团也可含有环烷烃环或芳香环。X 和 Y 分别独立地表示 -O- 或 -CH<sub>2</sub>-, X 和 Y 不同时为 -CH<sub>2</sub>-。M 为氢原子或反阳离子。)

[0015] 优选通式 (1) 中 X 和 Y 为 -O-。

[0016] 更优选通式 (1) 中 X 或 Y 为 -CH<sub>2</sub>- (称前者为 2 卡巴 (carba) cPA (缩写为 2ccPA), 后者为 3 卡巴 cPA (缩写为 3ccPA))。特别地,更优选 X 为 -CH<sub>2</sub>-, Y 为 -O- (2 卡巴体)。

[0017] 此外,优选通式 (1) 表示的化合物为 1-油酰基环状磷脂酸或 1-棕榈油酰基环状磷脂酸。

[0018] 本发明的另一方面是提供抑制疼痛的方法,其包括对包括人在内的哺乳动物给药

有效量的上述通式 (1) 表示的化合物。

[0019] 本发明的另一方面是提供上述通式 (1) 表示的化合物在镇痛剂的制备中的用途。

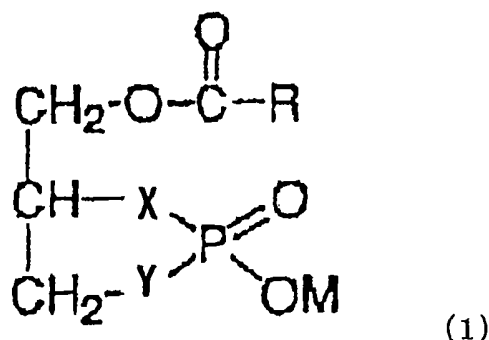
[0020] 本发明确认了通式 (1) 表示的化合物具有镇痛作用。因此,清楚揭示了本发明中所用的通式 (1) 表示的化合物可以适合用作镇痛剂。根据本发明,提供新型镇痛剂。

### 具体实施方式

[0021] 以下,对本发明的实施形态详细地进行说明。

[0022] 本发明的镇痛剂含有下述通式 (1) 表示的化合物作为有效成分。

[0023]



[0024] (其中, R 为碳原子数 1 ~ 30 的直链状或支链状烷基、碳原子数 2 ~ 30 的直链状或支链状烯基、或碳原子数 2 ~ 30 的直链状或支链状炔基,这些基团也可含有环烷烃环或芳香环。X 和 Y 分别独立地表示 -O- 或 -CH<sub>2</sub>-, X 和 Y 不同时为 -CH<sub>2</sub>-。M 为氢原子或反阳离子。)

[0025] 通式 (1) 中,作为取代基 R 表示的碳原子数 1 ~ 30 的直链状或支链状烷基的具体例子,可举出例如:甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十五烷基、十八烷基等。

[0026] 作为取代基 R 表示的碳原子数 2 ~ 30 的直链状或支链状烯基的具体例子,可举出例如:烯丙基、丁烯基、辛烯基、癸烯基、十二碳二烯基、十六碳三烯基等,更具体地可举出:8- 癸烯基、8- 十一碳烯基、8- 十二碳烯基、8- 十三碳烯基、8- 十四碳烯基、8- 十五碳烯基、8- 十六碳烯基、8- 十七碳烯基、8- 十八碳烯基、8- 二十碳烯基、8- 二十二碳烯基、十七碳-8,11-二烯基、十七碳-8,11,14-三烯基、十九碳-4,7,10,13-四烯基、十九碳-4,7,10,13,16-五烯基、二十一碳-3,6,9,12,15,18-六烯基等。

[0027] 作为取代基 R 表示的碳原子数 2 ~ 30 的直链状或支链状炔基的具体例子,可举出例如:8- 癸炔基、8- 十一碳炔基、8- 十二碳炔基、8- 十三碳炔基、8- 十四碳炔基、8- 十五碳炔基、8- 十六碳炔基、8- 十七碳炔基、8- 十八碳炔基、8- 二十二碳炔基、十七碳-8,11-二炔基等。

[0028] 作为上述烷基、烯基或炔基中可以包含的环烷烃环的具体例子,可举出例如:环丙烷环、环丁烷环、环戊烷环、环己烷环、环辛烷环等。环烷烃环也可含有 1 个以上的杂原子,作为这样的实例,可举出例如:环氧乙烷环、环氧丙烷环、四氢呋喃环、N- 甲基前赖氨酸(プロリジン)环等。

[0029] 作为上述烷基、烯基或炔基中可以包含的芳香环的具体例子,可举出例如:苯环、萘环、吡啶环、咪唑环、噻吩环等。

[0030] 因此,作为取代基 R 为被环烷烃环取代的烷基时的具体例子,可举出例如:环丙基甲基、环己基乙基、8,9-桥亚甲基十五烷基等。

[0031] 作为取代基 R 为被芳香环取代的烷基时的具体例子,可举出例如:苯甲基、苯乙基、对戊基苯基辛基等。

[0032] 通式 (1) 表示的化合物中的 X 和 Y 分别独立地表示 -O- 或 -CH<sub>2</sub>-, 但 X 和 Y 不同时为 -CH<sub>2</sub>-. 即, X 和 Y 的组合为以下 3 种:

[0033] (1) X 为 -O-, Y 为 -O-。

[0034] (2) X 为 -CH<sub>2</sub>-, Y 为 -O-。

[0035] (3) X 为 -O-, Y 为 -CH<sub>2</sub>-。

[0036] 通式 (1) 表示的化合物中的 M 为氢原子或反阳离子。作为 M 为反阳离子时的例子,可举出例如:碱金属原子、碱土金属原子、取代或未取代铵基。作为碱金属原子,可举出例如:锂、钠、钾等,作为碱土金属,可举出例如:镁、钙等。作为取代铵基,可举出例如:丁基铵基、三乙基铵基、四甲基铵基等。

[0037] 作为本发明所用的通式 (1) 表示的 cPA 的具体例子,优选油酰基 cPA (Ole-cPA), 特别优选棕榈油酰基 2 卡巴 cPA ( $\Delta$  Pal-2ccPA)、棕榈油酰基 3 卡巴 cPA ( $\Delta$  Pal-3ccPA)。

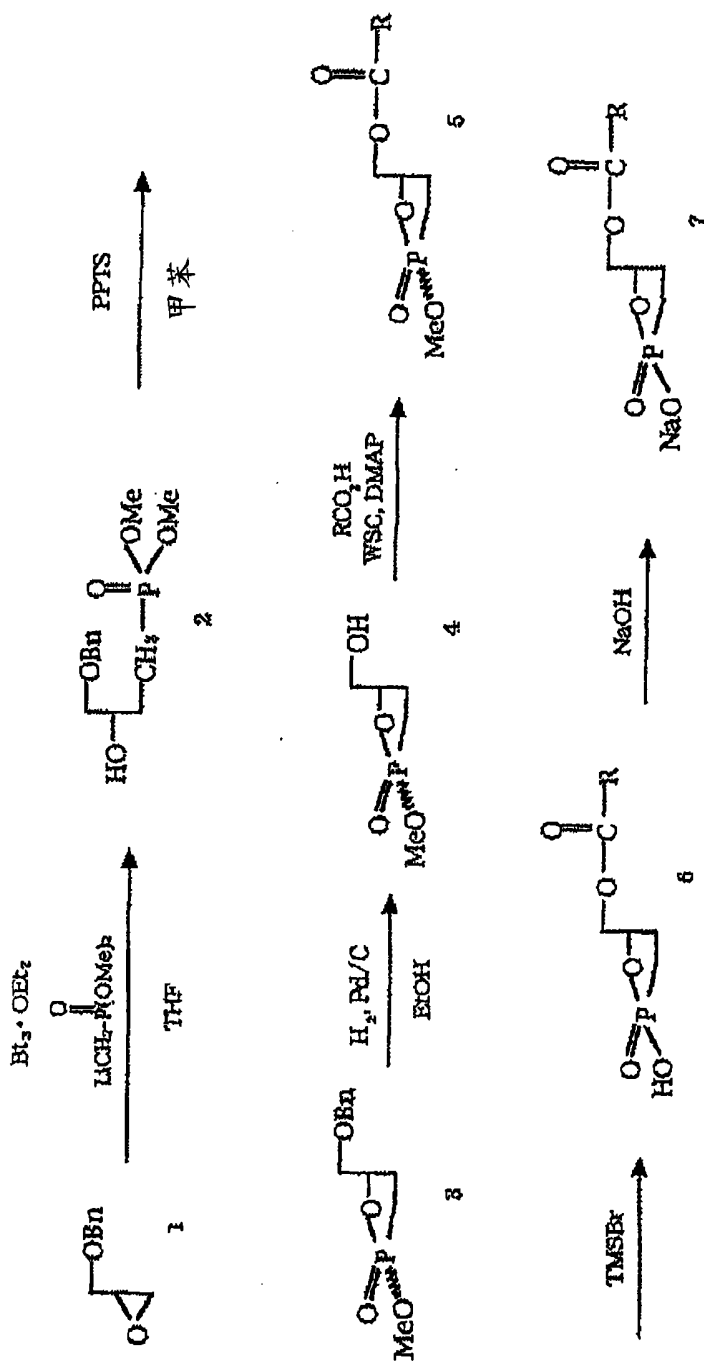
[0038] 通式 (1) 表示的化合物之中, X 和 Y 为 -O- 的化合物可以根据例如日本特开平 5-230088 号公报、日本特开平 7-149772 号公报、日本特开平 7-258278 号公报、日本特开平 9-25235 号公报中记载的方法化学合成。

[0039] 此外,通式 (1) 表示的化合物之中, X 和 Y 为 -O- 的化合物可以根据日本特开 2001-178489 号公报中记载的方法,通过使磷脂酶 D 与溶血型磷脂作用来合成。此处所用溶血型磷脂只要能与磷脂酶 D 作用即可,而没有特别限定。溶血型磷脂已知有许多种类,已知有脂肪酸种类不同的,具有醚或者乙烯基醚键的分子种类等,它们可作为市售品获得。作为磷脂酶 D,来源于卷心菜或花生等高等植物的磷脂酶 D 或来源于色褐链霉菌 (*Streptomyces chromofuscus*)、马杜拉放线菌 (*Actinomadura* sp.) 等微生物的磷脂酶 D 可作为市售品获得,但来源于马杜拉放线菌 No. 362 的酶极具选择性地合成 cPA (日本特开平 11-367032 号说明书)。溶血型磷脂和磷脂酶 D 的反应,只要在酶可表达活性的条件下即可没有特别的限定,例如,在含有氯化钙的醋酸缓冲液 (pH 为 5 ~ 6 左右) 中在室温至加热条件下 (优选 37°C 左右) 使之反应 1 至 5 小时左右。生成的 cPA 衍生物可按照常法通过萃取、柱层析、薄层色谱 (TLC) 等来进行精制。

[0040] 此外,通式 (1) 表示的化合物之中, X 为 -CH<sub>2</sub>-, Y 为 -O- 的化合物可通过日本特开 2004-010582 号公报中记载的方法来合成。

[0041] 此外,通式 (1) 表示的化合物之中, X 为 -O-, Y 为 -CH<sub>2</sub>- 的化合物可以根据文献记载的方法 (Kobayashi, S., 等, *Tetrahedron Letters* 34, 4047-4050 (1993)); 以及“日本药学会第 23 次反应和合成的进步座谈会 1997 年 11 月 17、18 日 (熊本市民会馆) 环状磷脂酸和卡巴体衍生物的合成和生理作用,概要 (第 101-104 页)”来合成,还可根据国际公开 W02002/094286 号公报中记载的方法来进行合成。具体合成路线的一例如下所示。

[0042]



[0043] 上述合成路线中,首先用  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  使市售的 (R)- 苯甲基缩水甘油醚 (1) 活化,通过使甲基磷酸二甲酯与  $n\text{-BuLi}$  作用而得的锂衍生物反应,得到醇 (2)。

[0044] 使所得醇 (2) 在甲苯中与过量的对甲苯磺酸的吡啶盐在  $80^\circ\text{C}$  下反应,由此得到环氧化物 (3)。将该环氧化物在氢气氛围下用 20%  $\text{Pd}(\text{OH})_2\text{-C}$  加氢分解,进行脱苯甲基化 (4)。使用 1- 乙基 -3-(3- 二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐作为缩合剂,使之与脂肪酸反应得到偶合物 (5)。随后,使用溴三甲硅烷作为亲核试剂,位置选择性地单独除去甲基,得到环状磷酸 (6)。用醚将该环状磷酸 (6) 转移到分液漏斗中,滴加少量 0.02N 的氢氧化钠水溶液,进行分液操作,以钠盐 (7) 的形式萃取目的化合物并精制。

[0045] 本发明中作为有效成分使用的式 (1) 表示的化合物具有镇痛作用。因此,根据本发明,提供含有该化合物作为有效成分的镇痛剂。

[0046] 本说明书中以下记载的实施例中,作为镇痛效果的评价方法,使用中枢神经系统无伤的麻醉大鼠,以通过后肢躯体性传入神经的电刺激诱发的(1)心率增加反应,和(2)交感神经心脏分支反射电位两者作为指标,研究了cPA的静脉内给药引起镇痛效果的可能性。本次所用的两个实验体系基本上是根据研究吗啡效果的Uchida等(Neurosci Lett 269:161,1999)的方法进行的。

[0047] 作为研究镇痛物质效果的方法,大多使用人的镇痛效果的评价或使用动物以对各种伤害性刺激,例如尾部的掐捏或加热的动物的逃避行为作为指标的方法。然而,对无麻醉动物施加伤害性刺激会给动物的情绪带来影响,因而镇痛效果的定量评价困难,而且给动物造成痛苦还产生伦理性问题。

[0048] 即便是在经麻醉的动物中,伤害性刺激也能诱发各种反应。例如,使外周伤害感受性初级传入神经纤维活动,使中枢神经系统的伤害感受性神经元活动,进而可引起各种反射性反应。熟知的麻醉下的反射性反应有伤害性屈曲反射等躯体性运动反射,如伤害性升压反射的自律神经性反射,如伤害性血中儿茶酚胺水平上升的内分泌性反射等。

[0049] 本次所用(1)“后肢躯体性传入神经的频繁电刺激诱发的(1)心率增加反应”,不是以仅使粗有髓A·纤维兴奋程度的弱刺激强度(0.2V)来诱发,而是以使细有髓A·纤维的兴奋阈值以上的刺激强度(1V)来诱发的。进一步增强刺激(10V)使无髓C纤维兴奋时,心率增加反应的振幅增大达到最大(Sato et al, J Auton Nerv Syst 4:231,1981;Uchida et al, Neurosci Lett 269:161,1999)。伤害性信号通过A·纤维和C纤维传导,因此躯体性传入A·纤维和C纤维的兴奋引起的心率增加反应可作为评价镇痛效果的一个指标。

[0050] 本次所用(2)“后肢躯体性传入神经的单次电刺激诱发的交感神经心脏分支反射电位”之中,潜伏期短的A反射电位主要由A·纤维的兴奋诱发,随A·纤维的兴奋而增大。若加强刺激的强度,使无髓C纤维兴奋时,在上述A反射电位之后,诱发延后的C反射电位(Ito et al, Neurosci Lett 39:169,1983;Adachi et al, Neurosci Res 15:281,1992)。

[0051] C反射电位由参与伤害性信号的传导、特别是灼烧那样的延迟疼痛传导的无髓C纤维的兴奋特异性地诱发,因此以C反射电位作为指标的方法在评价镇痛药的作用上十分优异。在各种疼痛中,通过C纤维传导的延迟疼痛造成的不适感强,在临床上特别重要。佐藤等人在麻醉猫中使用该模型,证明吗啡仅选择性地抑制C反射电位,报道了躯体性传入C纤维的兴奋诱发的C反射电位可作为镇痛效果研究的一个指标5(参见Pain Clinic 10(5)605,1989)。该方法不仅可长时间稳定地进行测定,还可以分钟为单位连续地调查效果,因此也是评价药物效果随时间变化的优异方法。

[0052] 另一方面,对A反射电位而言,有髓纤维中,参与伤害性信号的传达的A·纤维的刺激引起的反射与A·纤维引起的反射重叠,因此难以研究药物对于仅由强烈而迅速的疼痛相关的A·纤维引起的反射的效果。

[0053] 本次所用的两种方法均使用经麻醉的动物,因此可施加不伴随疼痛的伤害性刺激,并且具有可研究伤害性刺激诱发的特异性反射的优点,因而可作为客观的测定方法评价镇痛效果。

[0054] 本发明的镇痛剂优选以药物组合物的形式提供,所述药物组合物含有1种或2种以上可药用的制剂用添加剂和作为有效成分的通式(1)表示的化合物。

[0055] 本发明的镇痛剂可以各种形式给药,但作为优选的给药形式,可以是口服给药或



非口服给药（例如：向静脉内、肌肉内、皮下或皮内等的注射、直肠内给药、经粘膜给药等）。作为适合于口服给药的药物组合物，可举出例如：片剂、颗粒剂、胶囊剂、散剂、溶液剂、混悬剂、糖浆剂等；作为适合于非口服给药的药物组合物，可举出例如：注射剂、输液剂、栓剂、透皮吸收剂等，但本发明的镇痛剂的剂型不限于这些。进一步地，也可通过公知的技术制为长效制剂。

[0056] 制备本发明的镇痛剂时使用的制剂用添加剂的种类没有特别限定，本领域技术人员可适当选择。可使用例如：赋形剂、崩解剂或崩解助剂、粘合剂、润滑剂、包衣剂、基质、溶解剂或助溶剂、分散剂、混悬剂、乳化剂、缓冲剂、抗氧化剂、防腐剂、等渗剂、pH 调节剂、溶解剂、稳定剂等，这些按目的使用的各种具体成分是本领域技术人员所公知的。

[0057] 作为可在口服给药用制剂的制备中使用的添加剂，可使用例如：葡萄糖、乳糖、D-甘露糖、淀粉或结晶纤维素等赋形剂；羧甲基纤维素、淀粉或羧甲基纤维素钙等崩解剂或崩解助剂；羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮或明胶等粘合剂；硬脂酸镁或滑石等润滑剂；羟丙基甲基纤维素、白糖、聚乙二醇或氧化钛等包衣剂；凡士林、液体石蜡、聚乙二醇、明胶、高岭土、纯水或固体脂肪等基质。

[0058] 作为可在注射或输液制剂的制备中使用的添加剂，可使用注射用蒸馏水、生理盐水、丙二醇等可构成水性或即用即溶型注射剂的溶解剂或溶解助剂；葡萄糖、氯化钠、D-甘露糖、甘油等等渗剂；无机酸、有机酸、无机碱或有机碱等 pH 调节剂等制剂用添加剂。

[0059] 本发明的镇痛剂可对包括人在内的哺乳动物进行给药。

[0060] 本发明的镇痛剂的给药量应根据患者的年龄、性别、体重、症状和给药途径等条件而适当增减，但一般而言，成人一天的有效成分的量为一  $\mu\text{g}/\text{kg}$  至  $1,000\text{mg}/\text{kg}$  左右的范围，优选为一  $10\mu\text{g}/\text{kg}$  至  $100\text{mg}/\text{kg}$  左右的范围。上述给药量的镇痛剂可一天一次给药，也可分数次（例如，2～4 次左右）给药。

[0061] 本发明的镇痛剂也可与其它镇痛剂等合用。

[0062] 需要说明的是，本发明中作为有效成分的 cPA 本身就是哺乳类的血清或脑等中存在的物质，可认为对生物体是安全的。

[0063] 通过以下实施例来具体地说明本发明，但本发明并不受实施例的限定。

#### [0064] 实施例

##### [0065] (1) 实验方法

##### [0066] 生物材料

[0067] 使用 Wister 系雄性大鼠（体重 300-375g）。

##### [0068] 麻醉

[0069] 初次腹腔给药乌拉坦  $1.1\text{g}/\text{Kg}$ ，进行麻醉。由血压和心率的变化来观察麻醉深度，每 1-2 小时皮下给药初次给药量的  $1/20$ - $1/10$ ，以维持麻醉深度。

##### [0070] 呼吸的维持

[0071] 切开大鼠的气管，插入气管插管，使用人工呼吸器（SN-480-7, Shinano, Tokyo）维持呼吸。使用呼气气体监测仪（1H26, NEC San-ei, Tokyo）监测呼气中的二氧化碳浓度，实验中调节呼吸量为约 3%。

##### [0072] 体温的维持

[0073] 向直肠内插入热敏电阻，不断地监测深部体温，使用体温控制器（ATB-1100, Nihon

Kohden) 将体温维持在 35℃。

[0074] 血压测定、补液

[0075] 向右大腿动脉插入插管。由动脉插管,通过压力传感器 (TP-400T,Nihon Kohden, Tokyo) 连续地记录动脉压。

[0076] 心率的测定

[0077] 将血压波形连接到脉冲转速计 (AT601-G,Nihon Kohden),连续地记录心率。

[0078] 交感神经心脏分支活动的记录

[0079] 以仰卧位除去左侧第 2 肋骨。尽量在靠近心脏处分离并切断从星状神经节出发到心脏的左交感神经心脏分支。将神经浸于石蜡油中使其不干燥。将分离出的神经的中枢端置于铂铍电极上,导出交感神经心脏分支的传出神经活动,并用放大器 (S-0476,Nihon Kohden,时间常数 0.33s) 放大。后肢躯体性传入神经的电刺激诱发的反射性反应使用加法运算装置 (ATAC3700,Nihon Kohden) 加法运算 50 次。平均后的反应显示在屏幕上,并记录在微型记录器中。反射性反应的大小根据诱发的反应的面积的计量来评价,按相对于 cPA 给药前的对照大小以 % 来表示。记录交感神经活动时,为了避免有可能妨害稳定的神经活动记录的躯体运动,给予了肌松弛药加拉碘铵 (20mg/kg, i. v.)。

[0080] 后肢躯体性传入神经的电刺激

[0081] 将左胫骨神经从周围的组织切断。将切断中枢端置于刺激电极上,使用电刺激装置 (SEN-7103,Nihon Kohden),以超大的 (supramaximal) 矩形波脉冲 (脉冲宽度 0.5ms, 强度 10-20V) 进行电刺激。在调查心率增加反应的实验中,施加 5 秒时间的不间断电刺激 (10Hz)。在反射电位的实验中,施加每 3 秒一次的单次电刺激。

[0082] cPA 的制备和给药

[0083] Pal-cPA (16 : 0) (sn-1 位上结合棕榈酸)、 $\Delta$ Pal-cPA (16 : 1) (sn-1 位上结合棕榈油酸) 和 Ole-cPA (18 : 1) (sn-1 位上结合油酸),使用根据 Kobayashi, S., 等 :Tetradron Lett., 34, 4047-4050 (1993) 记载的方法合成的化学合成物,或根据日本特开 2001-178489 号公报记载的方法合成的酶合成物。经精制的化学合成物、酶合成物之间没有效果的差异。

[0084] 2 卡巴体和 3 卡巴体,前者是根据日本特开 2004-010582 号公报记载的方法,后者是根据国际公开 W02002/094286 号公报记载的方法合成的。

[0085] 将结晶溶解在乙醇中后,用氮气干燥固结为膜状。将其在即将给药前溶于生理盐水 (0.9% NaCl) 中,制备成 2.5mg/mL 或 0.5mg/mL 溶液。

[0086] cPA 经插入到右大腿静脉中的插管进行静脉内给药。给药量不足 1mg/Kg 体重时注入 0.5mg/mL 的溶液,给药量为 1mg/Kg 体重以上时注入 2.5mg/mL 的溶液。两者注入速度均为 150mL/分。

[0087] (2) 结果和讨论

[0088] cPA 对心率上升的作用

[0089] Ole-cPA 给药产生的对心率上升的抑制效果使用两只大鼠进行了验证。该抑制效果在给药量为 1mg/Kg 体重以上观察到,之后抑制效果浓度依存性地增大 (图 1)。给药量为 5mg/Kg 体重时,心率的上升变为对照的一半以下。对于抑制效果的持续时间,给药量若超过 1mg/Kg 体重,给药 20 分钟后也确认有抑制效果。之后抑制效果浓度依存性地增大,给药量为 5mg/Kg 时 20 分钟后也可观察到显著的抑制效果。如上所述,揭示了 Ole-cPA 的给

药显著地抑制了电刺激下肢神经诱发的心率的上升。

[0090] 另一方面, Pa1-cPA 的给药中, 虽然全面性地确认了上升抑制效果, 但没有发现一致的倾向。

#### [0091] cPA 给药对血压的影响

[0092] 使用两只大鼠, 与对心率上升的抑制效果同时进行了研究。01e-cPA 的给药量为 2mg/Kg 体重以下时, 血压大致在 90mmHg 恒定, 未见给药带来的影响。另一方面, Pa1-cPA 中, 给药 300mg/Kg 体重时, 血压暂时性地上升至 100mmHg 左右, 给药 2mg/Kg 体重后上升至 130mmHg。之后, 血压在 130mmHg 左右变得稳定, 给药 30 分钟之后也未见下降。

#### [0093] cPA 给药引起的心神经放电的变化

[0094] 心神经放电的水平使用 4 只大鼠进行了研究。由于 cPA 对刺激引起的心率上升的抑制效果在 01e-cPA 中显著地观察到, 而在 Pa1-cPA 中并不显著, 因而仅针对 01e-cPA 研究刺激引起的心神经放电水平的变化。cPA 给药前和给药后的典型电记录图如图 2 所示。cPA 的给药尤其降低 C 反射的水平。

[0095] cPA 给药后的放电水平的经时变化如图 3 所示。此处, 将放电水平(图 2 中的峰面积)表示为用 cPA 给药前的水平归一化得到的相对值。任何浓度均在给药 10~15 分钟之后使 C 反射的放电水平最大降低 40% (约 1mV)。放电水平在 20~25 分钟之后开始再次上升, 但以 2mg/Kg 给药时, 给药 30 分钟之后与给药前比较, 也维持了 20% 左右的降低状态。cPA 给药后的放电水平抑制的时间变化和心率上升抑制时观察到的时间变化大致一致, 此外, 就抑制水平而言, 也观察到了与心率上升的抑制效果同样的剂量依存性。

[0096] 另一方面, 对于 A $\delta$  反射, 虽然在 cPA 给药后观察到放电水平的变化, 但与 C 反射比较, 变化中却未见一致性。此外, 对实验中所用的 4 只大鼠各自而言, C 反射中 4 只大鼠显示了一致性的变化, 与此相对地, 可认为 A $\delta$  反射中的放电水平变化具有容易受到个体差异或生理条件影响的特性。

[0097] 用和天然 cPA 一样的方法, 调查了 2 卡巴 cPA(01e-, Pa1-,  $\Delta$ Pa1-), 3 卡巴 cPA(01e-, Pa1-,  $\Delta$ Pa1-) 对心率、血压、心神经放电水平的效果。

[0098] 对心率的效应, 在 01e-,  $\Delta$ Pa1- 卡巴 cPA 中, 观察到了与天然 01e-cPA 大致同样的对心率上升的抑制效果。

[0099] 对于血压, 所有情形中均未发现与 01e-cPA 同样的给药产生的影响。

[0100] 2 卡巴 cPA 之中, 给药棕榈油酰基-2 卡巴 cPA( $\Delta$ Pa1-2ccPA) 时, 观察到了心神经的去极化水平, 特别是 C 反射的显著的水平降低。

[0101] 对 50-500  $\mu$ g/Kg 浓度的  $\Delta$ Pa1-2ccPA 对 C 反射的去极化水平提供的效果进行分析时, 所有浓度下, 给药 10-15 分钟之后 C 反射的去极化水平降低, 在天然 01e-cPA 显示约 50% 降低的浓度 (2mg/Kg) 的 1/40 的浓度 50  $\mu$ g/Kg 时显示了 30% 以上的降低, 1/20 的浓度 100  $\mu$ g/Kg 时显示了约 60% 的降低, 1/10 的浓度 200  $\mu$ g/Kg 时显示了约 70% 的降低, 1/4 的浓度 500  $\mu$ g/Kg 时显示了约 80% 的降低。去极化水平在 20~25 分钟之后开始再次上升, 缓慢恢复至给药时的水平。

[0102] 3 卡巴 cPA 之中, 和 2 卡巴体同样, 棕榈油酰基-3 卡巴 cPA( $\Delta$ Pa1-3ccPA) 给药中, 观察到了心神经的去极化水平, 特别是 C 反射的显著的水平降低。其程度要比 2 卡巴体稍低, 但用浓度为 50-200  $\mu$ g/Kg 的  $\Delta$ Pa1-3ccPA 时, 给药 10-15 分钟之后 C 反射的去极化水

平降低。在天然  $01e-cPA$  显示约 50% 降低的浓度 (2mg/Kg) 的 1/40 的浓度  $50 \mu g/Kg$  时显示了约 30% 的降低, 1/20 的浓度  $100 \mu g/Kg$  时显示了约 50% 的降低, 1/10 的浓度  $200 \mu g/Kg$  时显示了约 60% 的降低。此时, 去极化水平也在 20 ~ 25 分钟之后开始再次上升, 缓慢恢复至给药时的水平。

[0103] 图 4 中表示了  $01e-cPA$  和  $\Delta Pa1-2ccPA$ 、 $\Delta Pa1-3ccPA$  的比较。

[0104] 以上示出了伴随电刺激的心率上升或心神经的去极化, 通过  $cPA$  或  $2ccPA$ 、 $3ccPA$  的给药而降低的结果。C 反射的去极化水平被认为反映慢性疼痛, 强烈暗示了  $cPA$  和其衍生物  $2ccPA$ 、 $3ccPA$  具有显著的镇痛效果。

[0105]  $cPA$  引起镇痛作用的预测机理

[0106] 作为  $cPA$  引起镇痛作用的作用机制, 预测有下述机制。

[0107] (1) 由于通过伤害感受器使用中枢侧的传入神经纤维的电刺激引起的反应进行评价, 因此排除了对伤害感受器周围的外周神经作用的可能性。

[0108] (2) 有可能阻断初级传入 C 纤维中的兴奋传导。

[0109] (3) 有可能抑制中枢神经内的伤害信号传导物质的释放, 例如抑制从脊髓后角中的初级传入 C 纤维末端释放谷氨酸盐或 P 物质。

[0110] (4) 有可能在中枢神经内, 例如在脊髓后角中, 通过内源性阿片样物质释放促进作用或阿片受体敏感性亢进作用, 来活化阿片样物质镇痛系统。

[0111] (5) 有可能活化血清素能下行抑制系统或去甲肾上腺素能下行抑制系统、GABA 介导的镇痛系统等非阿片类物质镇痛系统。

[0112] (6) 有可能拮抗 LPA 引起的产生疼痛的作用。

## 附图说明

[0113] 图 1: 图 1 表示  $cPA$  给药对下肢神经刺激后的心率变化的效果。

[0114] 图 2: 图 2 表示  $cPA$  给药前 (左) 和给药后 (右) 的电记录图的典型例。左右的峰分别表示  $A \delta$  反射、C 反射。

[0115] 图 3: 图 3 表示下肢神经刺激后的心神经中的  $A \delta$  和 C 反射水平的变化。各数据点表示每 5 分钟的平均值。将对各大鼠进行 2 ~ 3 次给药所得的应答水平的平均值进一步用 4 只大鼠来平均。棒表示标准误差。

[0116] 图 4: 图 4 表示将各种浓度 ( $\mu g/Kg$ ) 的  $\Delta Pa1-2ccPA$  给药和  $\Delta Pa1-3ccPA$  给药引起的下肢神经刺激后的心神经中的 C 反射水平变化, 与天然  $01e-cPA$  的效果比较的结果。测定 C 反射的峰面积, 将其结果作为各反射的去极化水平。各给药中, 以即将给药前 (0 分) 的去极化水平为基准, 计算相对去极化水平 (%)。图表表示给药后 10 ~ 15 分钟测定的相对去极化水平的平均值。

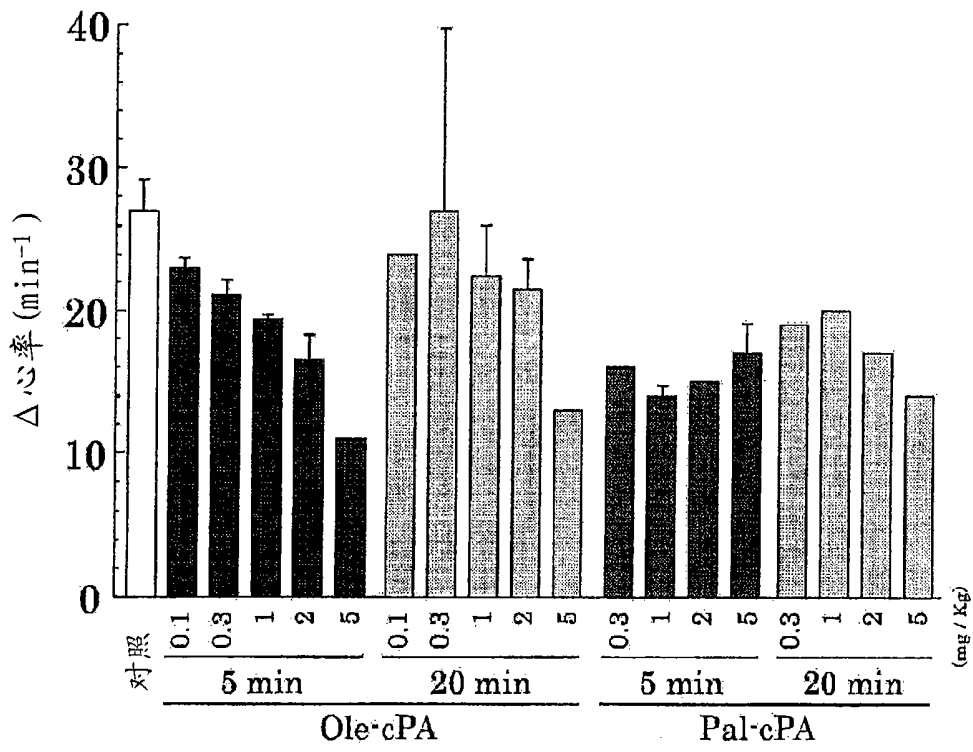


图 1

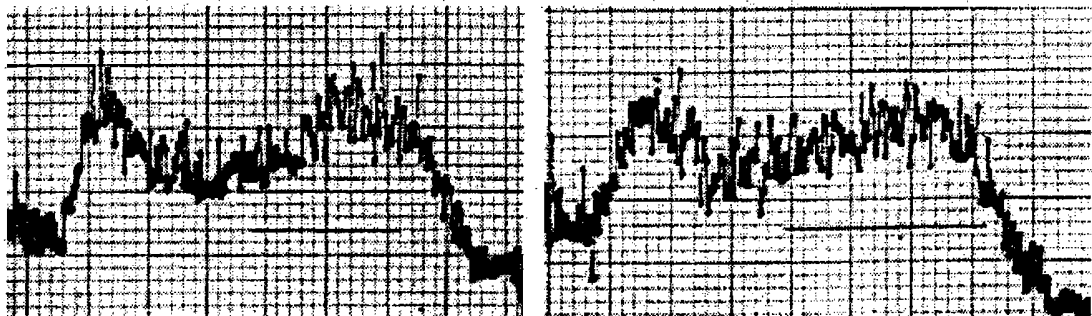


图 2

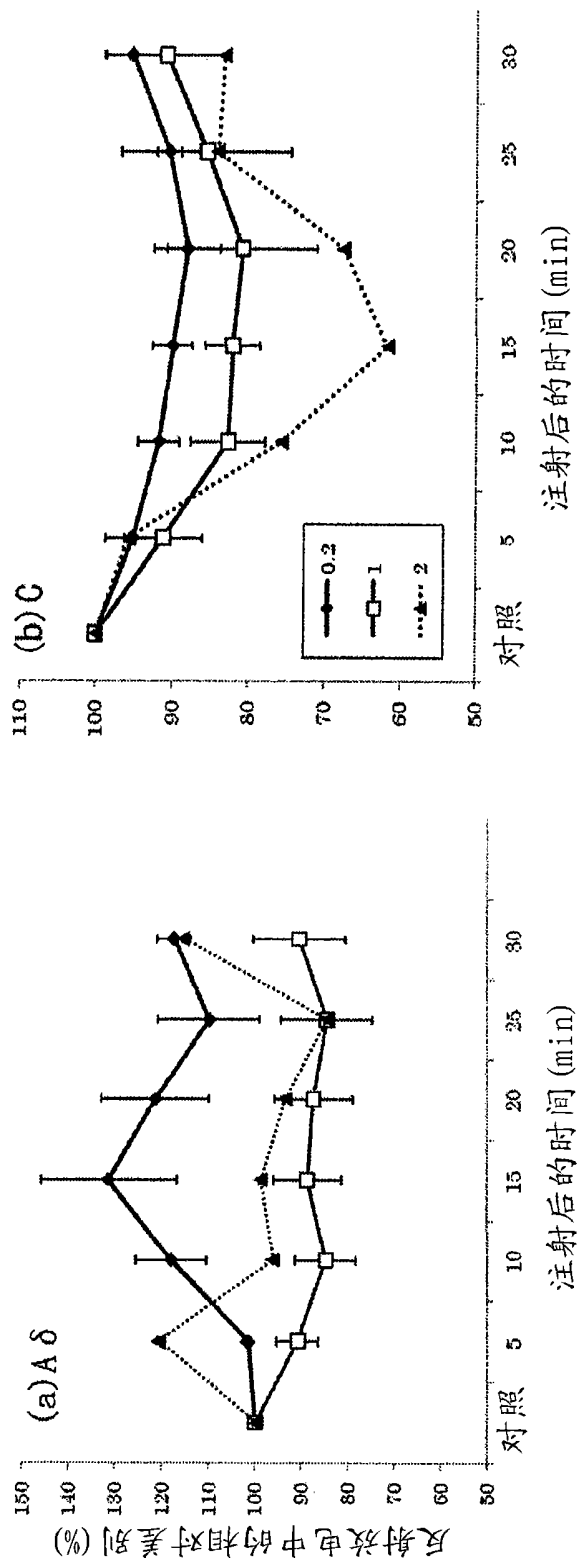


图 3

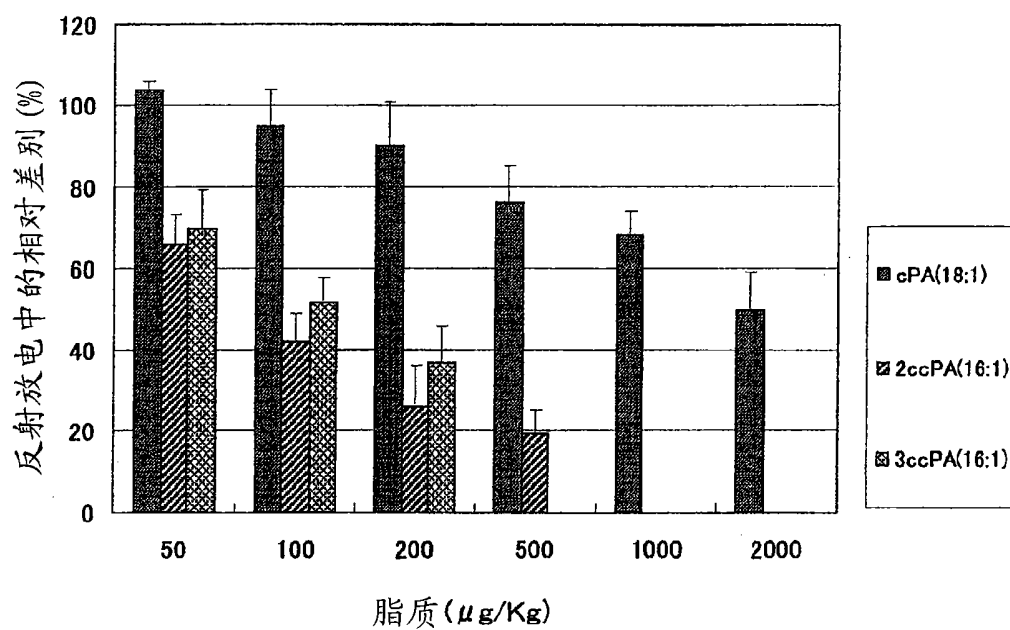


图 4