

卤代氧化苯砷化合物及其应用

技术领域

本公开属于化学合成领域，具体涉及一种新型卤代氧化苯砷化合物及其制备方法和应用。

背景技术

氧化苯砷（PhenylarsineOxide，PAO）是一种已知的生物抑制剂，该分子中砷原子对生物分子中巯基的硫原子具有高亲和性。最近的研究发现，氧化苯砷是一种 PI4KIII α 抑制剂，能够用于治疗阿尔茨海默病。氧化苯砷是否能够治疗其他疾病，需要开展更多的研究工作。

氘替代可以改变药物的半衰期，减少服药次数，同时保持原有的活性和选择性。氘代药物已经成为是一种新药研发的新方向和药物开发模式。2017 年，美国食品药品监督管理局通过世界上首个氘代药物即氘代丁苯那唑（AUSTEDOTM，治疗亨廷顿舞蹈症及其相关的运动功能障碍）。目前已有多个氘代药物进入临床研究。然而，卤素对苯环上的氢原子进行替代，取代修饰后的氧化苯砷的体内活性及体内代谢性质是否会改变，仍需要进一步研究。

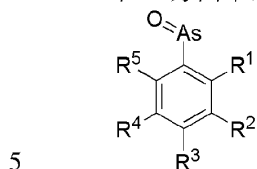
放射治疗是治疗恶性肿瘤的主要手段之一，是其主要原理是利用高能射线破坏癌细胞的染色体，从而使癌细胞（尤其是正在生长分裂的细胞）坏死，从而达到抑制肿瘤发展的结果。放射线包括放射性同位素产生的 α 、 β 、 γ 射线和各类 x 射线治疗机或加速器产生的 x 射线、电子线、质子束及其他粒子束等。70% 的癌症患者在治疗过程中需要用放射治疗，40% 的癌症可以用放射治疗根治，因此放射治疗是一些肿瘤类型的首选以及主要的治疗手段，如口腔部癌、鼻咽癌、中期的食管癌、不能手术的肺癌、皮肤癌、早期的淋巴瘤。神经系统肿瘤大部分需手术后进行放射治疗。对于放射高度敏感的肿瘤如恶性淋巴瘤、睾丸精原细胞瘤、肾母细胞瘤、神经母细胞瘤、髓母细胞瘤、小细胞肺癌、晚期肺癌、食管癌等类型，联合放疗可以明显提高疗效。因为射线具有穿透性，在穿过正常组织到达癌细胞之前，会引起正常细胞的损伤或坏死，因而会引起不同程度的副作用，如皮肤损伤、呕吐、脱发、头痛、发热、咳嗽、吞咽困难、食欲降低、口腔变化（干燥）、腹泻、组织坏死与纤维化、外周血象下降等。一些副作用会消失，但有一些是长久的甚至是永久的。副作用一方面会影响治疗效果，甚至可以导致治疗无效最终导致死亡。因此在放疗过程中施以辅助治疗（包括药物），可对正常细胞进行保护，由此通过提升病人的体质来提升治疗效果。

当前临床主要运用氨磷汀作为正常细胞保护剂，免于肿瘤治疗引起的细胞损伤。它在组织中经碱性磷酸酶作用脱去磷酸，成为具有药理活性的游离硫醇代谢产物，此代谢产物可以减轻放疗化疗引起的毒性。但是其使用范围局限于几类癌种，对放疗引起的损伤的保护作用

报道很有限，同时它的使用会引起较多的副作用。因此寻找更安全有效的正常细胞保护剂，是当今提高肿瘤治疗效率的当务之急。

发明内容

在一方面中，本公开提供了一种式 I 化合物或其药学上可接受的盐，



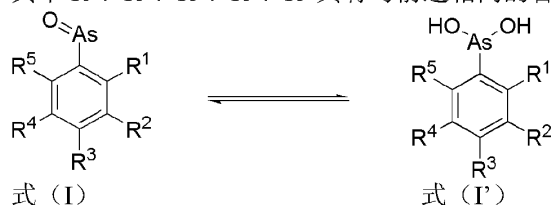
式 (I)

其中， R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 独立地选自氢、氘、氟、氯、溴、碘、甲基、氨基、硝基、一氘代甲基、二氘代甲基、三氘代甲基、一氟代甲基、二氟代甲基或三氟代甲基，且 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 中至少一个为卤素或氘。

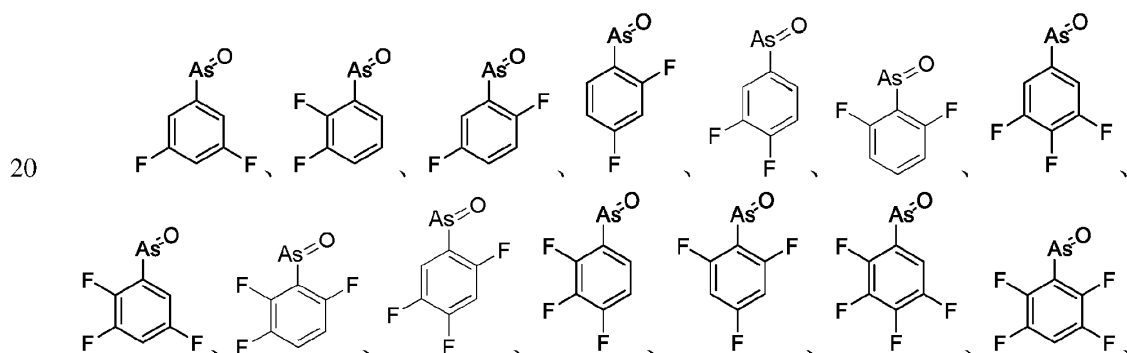
10 优选地， R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 独立地选自氢、氘、氟、氯、溴、碘、甲基、氨基、硝基、一氟代甲基、二氟代甲基或三氟代甲基，且 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 中至少一个为氟或氟代的。

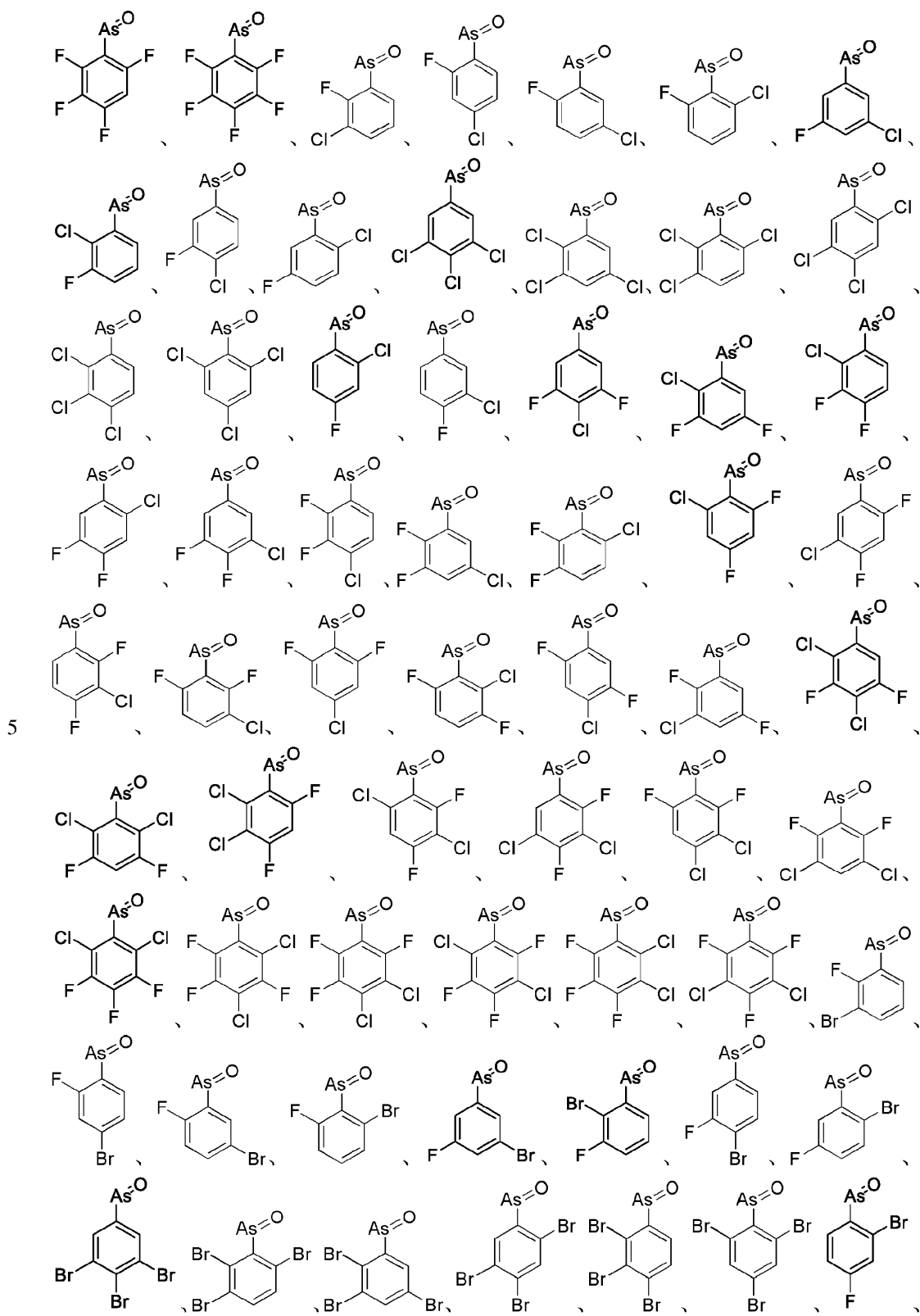
在一个实施方案中， R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 独立地选自氢或氘或卤素，且 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 中至少一个为卤素，至少两个为卤素，优选地至少一个为氟，优选地至少两个、三个、四个或五个为氟。

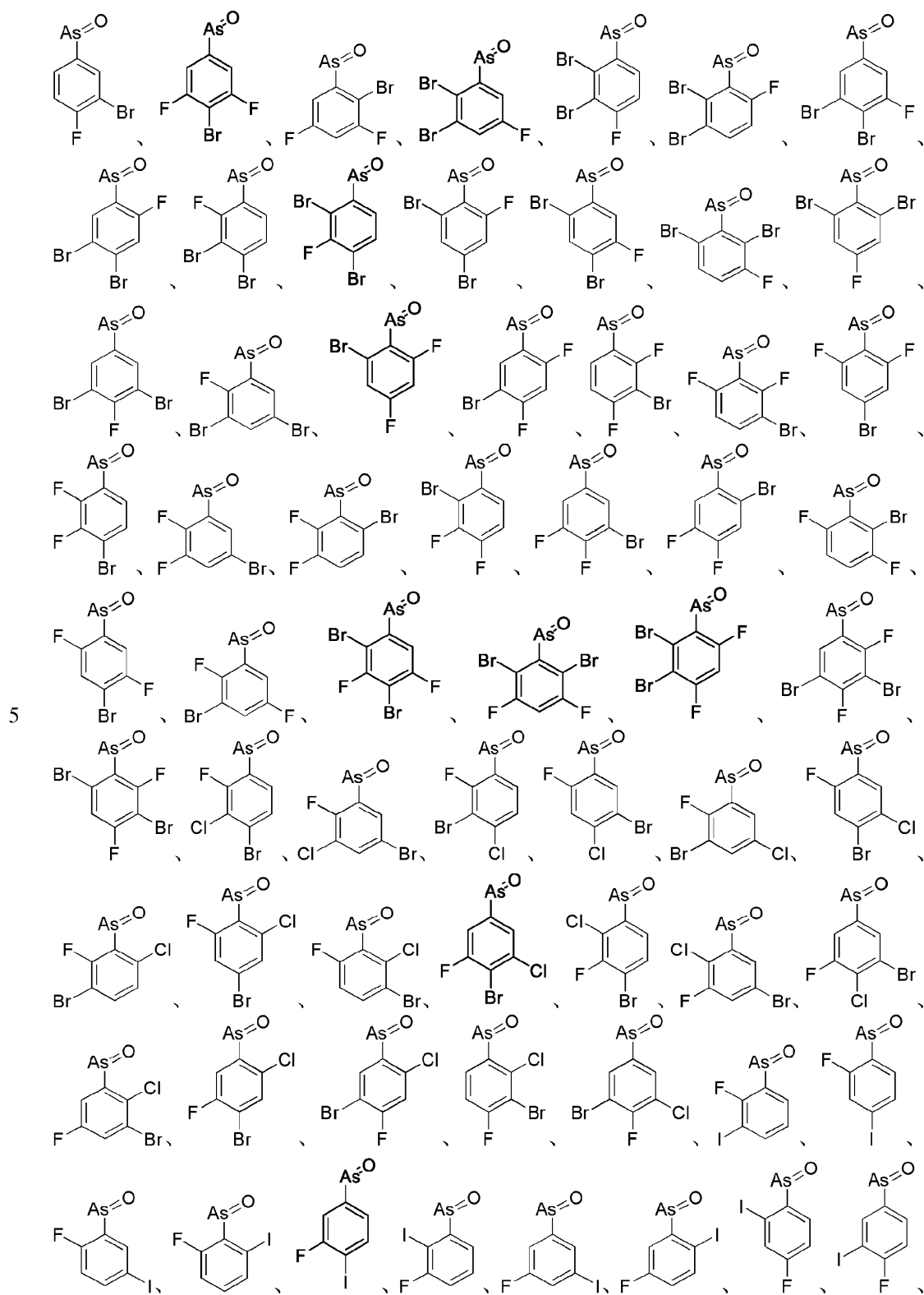
15 在一个实施方式中，式 I 化合物在溶于溶剂、特别是含水溶剂中时任选形成式 I' 的化合物，其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 具有与前述相同的含义。

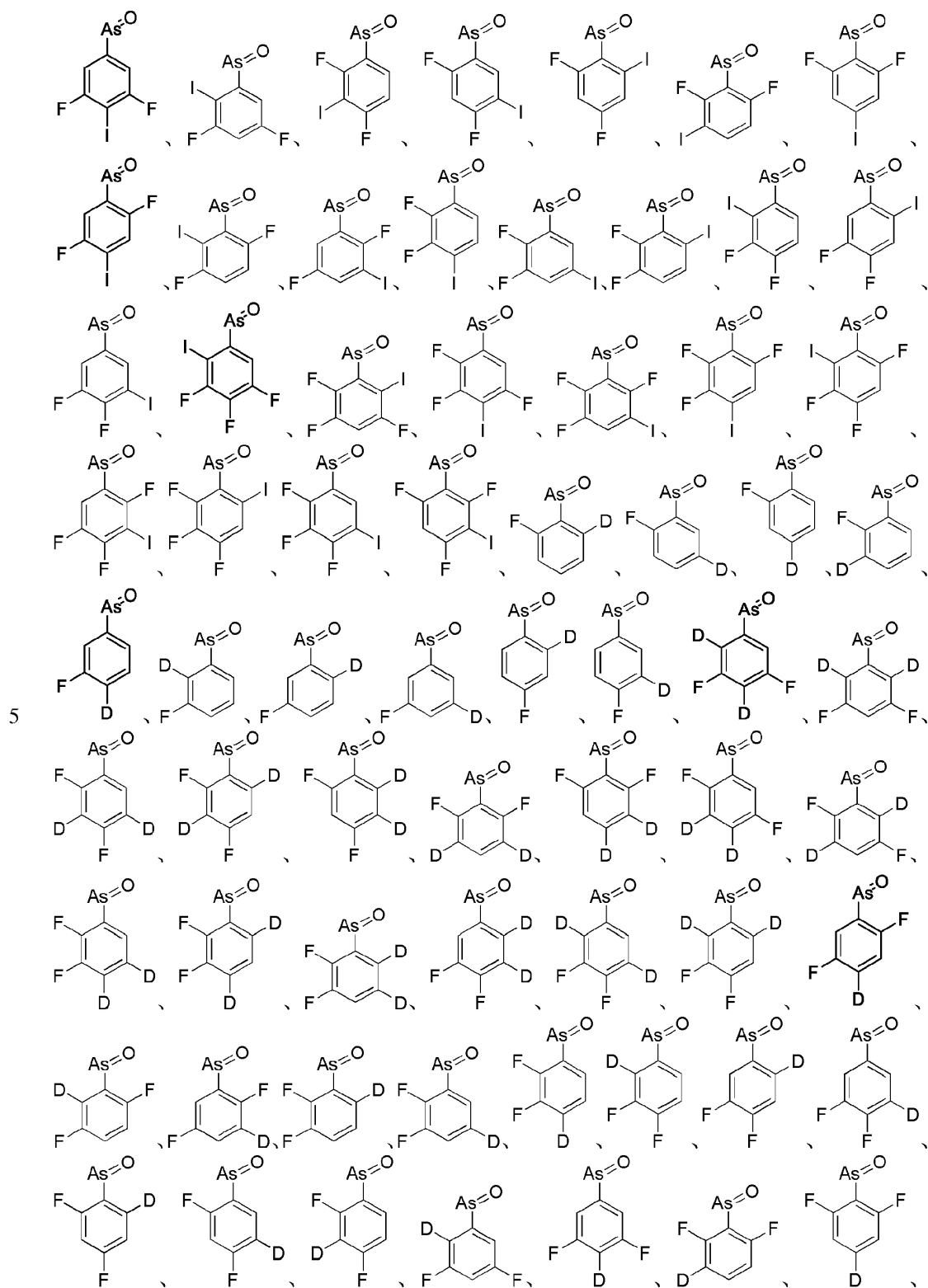


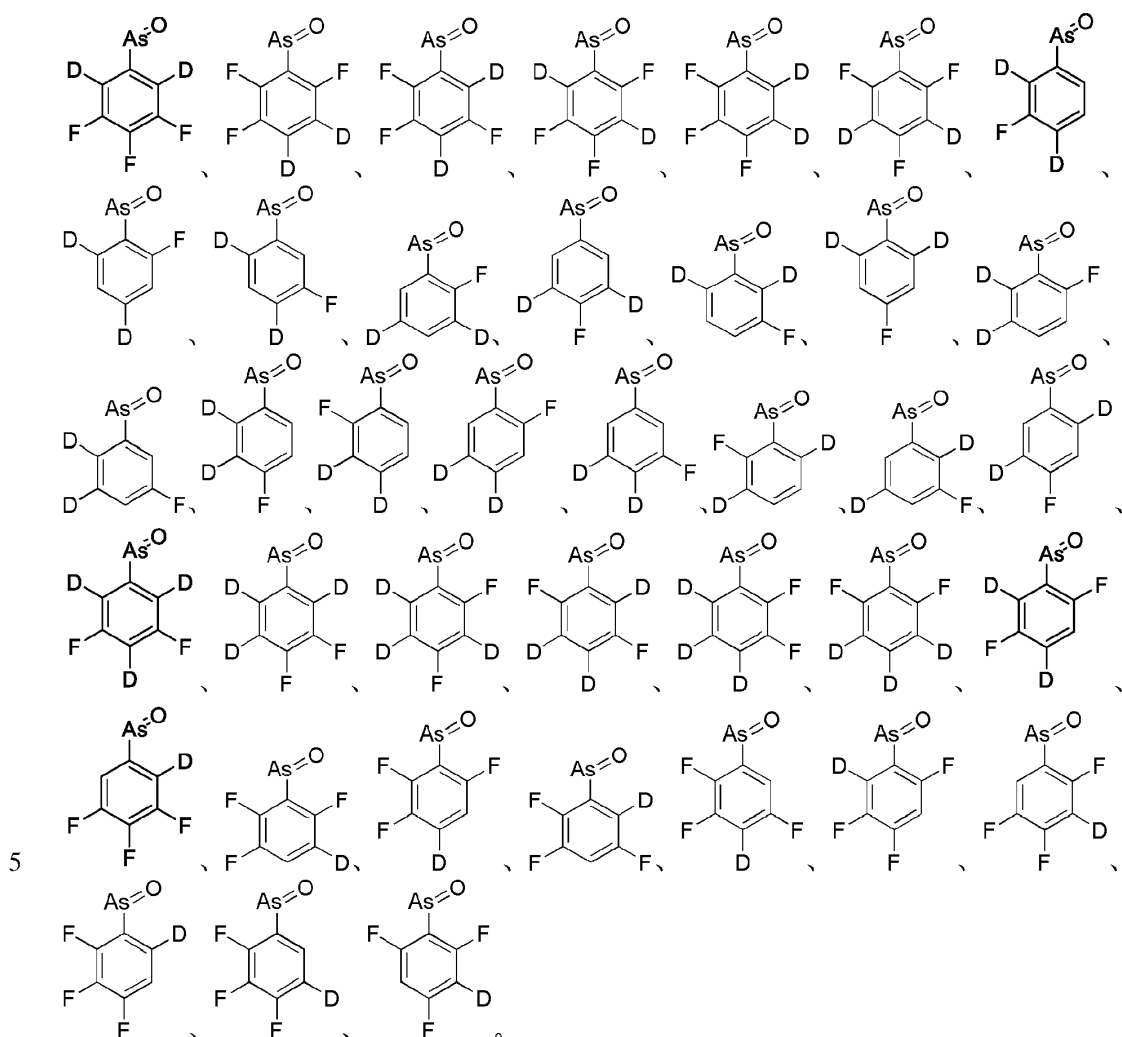
在一个具体实施方案中，所述化合物选自以下化合物组成的组：











另一方面，本公开提供了前述化合物或其药学上可接受的盐在制备预防或治疗受试者疾病或病理反应的药物中的用途。

10 在一个实施方案中，所述疾病选自肿瘤、恶病质诸如恶性肿瘤或治疗肿瘤的化疗药物引起的恶病质、阿尔兹海默症、细胞内蛋白错误折叠相关疾病、溶酶体贮积病、炎症反应、组织器官纤维化、病毒感染的疾病、神经症、微生物感染例如细菌感染或真菌感染，优选耐药细菌或耐药真菌的感染、放射性射线照射导致的细胞组织损伤、动脉粥样硬化、糖尿病、哮喘中的至少一种。

在一个实施方案中，所述受试者是人或非人哺乳动物。

15 在一个具体实施方案中，所述肿瘤选自淋巴瘤诸如急性非 B 或非 T 细胞淋巴瘤、宫颈癌、子宫内膜癌、肝癌、乳腺癌诸如三阴性乳腺癌、肺癌诸如非小细胞肺癌或小细胞肺癌、结直肠癌、胃癌、皮肤癌诸如黑色素瘤、骨癌、骨肉瘤、骨髓瘤、血癌诸如急性或慢性白血病、

卵巢癌、前列腺肿瘤、脑瘤诸如脑星型胶质细胞瘤、神经母细胞瘤、甲状腺癌、恶性胚胎横纹肌瘤。

在一个具体实施方案中，所述细胞内蛋白错误折叠相关疾病为帕金森氏病、路易体痴呆症、多系统萎缩症、包涵体肌炎、额颞痴呆、亨廷顿疾病、多聚谷氨酰胺病、肌萎缩性侧索硬化症、或朊病毒疾病。

在一个具体实施方案中，所述溶酶体贮积病为鞘脂类代谢障碍诸如戈谢病、C型尼曼氏病、黏多糖病、糖原贮存病、糖蛋白贮积病、脂类储存疾病、翻译后修饰缺陷症、内在膜蛋白缺失失调症、神经元蜡样质脂褐质沉积病、或溶酶体相关细胞器紊乱症。

在一个具体实施方案中，其中所述炎症反应为局部组织或者全身血液中炎症因子诸如 TNF α 或 IL-6 增加。所述的炎症是病原体诸如细菌、真菌、病毒或寄生虫引起的炎症，或所述的炎症是非病原体诸如肿瘤、过敏、损伤等引起的炎症。

在一个具体实施方案中，其中所述组织器官纤维化选自心纤维化、肾纤维化、肺纤维化、肝纤维化、伤口愈合时的纤维化或瘢痕形成或动脉放置支架后的纤维化所致的再狭窄。

在一个具体实施方案中，所述病毒包括冠状病毒和非冠状病毒，优选所述冠状病毒选自鸡传染性支气管炎病毒、猪流行性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒、猪血凝性脑脊髓炎病毒，猪 δ 冠状病毒、犬呼吸道型冠状病毒、小鼠肝炎病毒、猫冠状病毒、人冠状病毒、人乳头瘤病毒、严重急性呼吸综合征病毒、中东呼吸综合征病毒、或新型冠状病毒；所述的非冠状病毒选自丙肝病毒或艾滋病毒。

在一个具体实施方案中，所述神经症选自神经衰弱、焦虑症、抑郁症、或躁狂症。

在一个实施方案中，所述的放射性射线照射导致的细胞组织损伤选自放射性同位素产生的 α 、 β 、 γ 射线、各类 x 射线治疗机或加速器产生的 x 射线、电子线、质子束或其他粒子束等导致所照射部位的正常细胞、组织和器官的结构和功能改变，例如正常细胞的损伤或坏死，例如选自 X 射线照引起的细胞或组织器官损伤。

在一个实施方案中，微生物感染选自细菌或真菌感染，优选为耐药细菌感染或耐药真菌感染，更优选地其中所述微生物选自鲍氏不动杆菌、阴沟肠杆菌、大肠杆菌、产酸克雷伯氏杆菌、肺炎杆菌、摩氏摩根氏菌、绿脓杆菌、粘质沙雷氏菌、金黄葡萄球菌、粪肠球菌、屎肠球菌、肺炎链球菌、白色念珠菌、近平滑白念珠菌、烟曲霉、淋球菌、破伤风梭菌、痤疮丙酸杆菌、新型隐球菌、幽门螺杆菌、脆弱拟杆菌、艰难梭菌、阴道加德纳菌、阴道阿托波氏菌、厌氧消化链球菌、阴道毛滴虫以及上述菌的耐药菌中的至少一种。或者，优选地，所述微生物感染选自体表或粘膜处感染的微生物，诸如痤疮、青春痘、外伤、烧伤或烫伤等处的微生物感染。

在一个实施方案中，所述的放射性射线照射导致的细胞组织损伤的症状选自：X 射线照引起的唾液腺损伤所致的唾液分泌减少、口腔干燥、粘膜炎、以及 X 射线照引起的白细胞下降中的至少一种。

又一方面，本公开提供了前述化合物或其药学上可接受的盐在制备预防或治疗受试者疾病的药物中的用途，其进一步包括向需要其的受试者施用第二试剂。本公开提供了前述化合物或其药学上可接受的盐和第二试剂在制备预防或治疗受试者疾病的联合用药的药物中的用途。

在一个实施方案中，所述疾病选自肿瘤，所述第二试剂是用于治疗自肿瘤的试剂。

在一个实施例中，所述治疗肿瘤的药物优选为干扰有丝分裂的抗肿瘤药诸如紫杉醇或白蛋白紫杉醇、直接影响 DNA 结构和功能药物诸如卡铂或顺铂、或 Kras 抑制剂

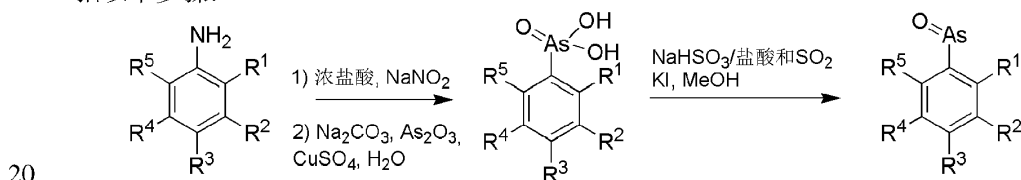
在一个具体实施方案中，其中所述疾病选自肺纤维化，所述第二试剂是用于治疗自肺纤维化的试剂。

在一个实施方案中，前述化合物或其药学上可接受的盐在所述第二试剂之前、之后或同时施用。

又一方面，本公开提供了一种药物组合物，包含前述的化合物或其药学上可接受的盐，和药物学上可接受的载体。

在一个实施方案中，所述药物组合物进一步包括治疗肿瘤的药物。

又一方面，本公开提供了一种如前所述的化合物或其药学上可接受的盐的制备方法，包括以下步骤：



1) 在 $0^\circ\text{C}\sim 10^\circ\text{C}$ 下在与式 (I) 对应结构的苯胺或其盐的水溶液中依次加入浓盐酸、亚硝酸钠水溶液，保持温度在 5°C 以下；

2) 将碳酸钠、三氧化二砷、硫酸铜的水溶液加热至 $90\sim 100^\circ\text{C}$ 后降温，在该水溶液中加入上述第 1) 步制备好的溶液，搅拌、过滤，滤液中加入酸调节 pH 值，分离所析出的固体；

25 3) 将上述析出的固体、碘化钾以及亚硫酸氢钠或盐酸和二氧化硫在甲醇中搅拌至反应完全，进行后处理得到所述化合物。

在一个实施方案中，步骤 3) 中的后处理包括用酸或碱调节 pH 值至适当的值，用乙酸乙酯萃取，合并有机相并蒸发至干。

再一方面,本公开提供了 PI4KIII α 特异性抑制剂在制备用于预防或治疗组织器官纤维化诸如心脏纤维化的药物中的用途。

PI4KIII α 特异性抑制剂在制备在肿瘤患者中用于预防或治疗放射性射线照射导致的细胞组织损伤的药物中的用途。

- 5 PI4KIII α 特异性抑制剂在制备用于预防或治疗动脉粥样硬化或动脉粥样硬化所引起的疾病的药物中的用途,其中所述动脉粥样硬化所引起的疾病优先为冠心病、心梗或脑梗。

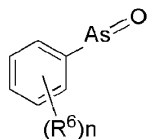
PI4KIII α 特异性抑制剂在制备在肿瘤患者中用于预防或治疗糖尿病的药物中的用途。

- PI4KIII α 特异性抑制剂在制备在用于预防或治疗微生物感染的药物中的用途,其中微生物感染选自细菌或真菌感染,优选为耐药细菌感染或耐药真菌感染,更优选地其中所述微生物选自鲍氏不动杆菌、阴沟肠杆菌、大肠杆菌、产酸克雷伯氏杆菌、肺炎杆菌、摩氏摩根氏菌、绿脓杆菌、粘质沙雷氏菌、金黄葡萄球菌、粪肠球菌、屎肠球菌、肺炎链球菌、白色念珠菌、近平滑白念珠菌、烟曲霉、淋球菌、破伤风梭菌、痤疮丙酸杆菌、新型隐球菌、幽门螺杆菌、脆弱拟杆菌、艰难梭菌、阴道加德纳菌、阴道阿托波氏菌、厌氧消化链球菌、阴道毛滴虫以及上述菌的耐药菌中的至少一种。或者,优选地,所述微生物感染选自体表或粘膜处感染的微生物,诸如痤疮、青春痘、外伤、烧伤或烫伤等处的微生物感染。
- 10 15

PI4KIII α 特异性抑制剂在制备在用于预防或治疗哮喘的药物中的用途。

PI4KIII α 特异性抑制剂在制备在用于预防或治疗非酒精性脂肪性肝炎的药物中的用途。

- 在一个实施方案中,其中所述氧化砷及其衍生物是抗体、小分子化合物、RNAi 分子或者反义核酸,优选所述抗体是单克隆抗体或者多克隆抗体,更优选所述抗体是嵌合抗体、人源化抗体或者全人源抗体;优选所述 RNAi 分子是小干扰 RNA (siRNA)、短发夹 RNA (shRNA) 或微小 RNA (miRNA),更优选所述 RNAi 分子的长度为 18-100 碱基和/或 RNAi 分子被修饰以增强其稳定性;优选所述小分子化合物是氧化砷或其衍生物、G1 及其类似物、A1 及其类似物(J Med Chem 2014 Vol. 57 Issue 5 Pages 2091-106 和 J Biol Chem 2014 Vol. 289 Issue 9 Pages 6120-32)、或司美匹韦及其类似物(Int J Radiation Oncol Biol Phys, Vol. 96, No. 4, pp. 867e876, 2016)、TG-1478(Tyrphostin AG-1478, NSC-693255),更优选所述氧化砷及其衍生物具有式(II)所示的结构或者其药学上可接受的盐:
- 20 25



式(II)

- 其中, R^6 各自独立的选自(a) H、氘、甲基、一氘代甲基、二氘代甲基、三氘代甲基、卤素、硝基、氰基、羟基、氨基、氨基甲酰基、C1-6 烷基砷基、C1-6 烷基、C1-6 环烷基、
- 30

C2-6 炔基、C2-6 烯基、C1-6 烷氧基、C1-6 卤代烷基、C1-6 亚烷基-NH₂、C1-6 亚烷基-NH-C(O)H、-As(O)、-N=NH、N-(C1-6 烷基)氨基、N,N-(C1-6 烷基)₂ 氨基、-NH-C(O)H、-NH-S(O)₂H、-C(O)OH、-OC(O)H、-SH、-S(O)₂H、-S(O)₂-NH₂ 或杂环基，并且可选的被 R⁷ 或 R⁸ 取代，其中 R⁷ 和 R⁸ 各自独立的选自氨基、C1-6 烷基、C1-6 烷氧基、C1-6 卤代烷基、N-(C1-6 烷基)氨基、N-(6-12 元芳香基)氨基、N,N-(C1-6 烷基)₂ 氨基、C3-6 环烷基、6-12 元的芳香基或 3-12 元的杂环基，并且可选的被一个或多个卤素、硝基、氰基、羟基、氨基、氨基甲酰基、-NH-C(O)-R¹⁰、-C(O)OR⁹、6-12 元的芳香基、C1-6 烷基、C2-6 炔基、C2-6 烯基、C1-6 烷氧基、C1-6 卤代烷基、3-6 元的杂环基、C3-6 环烷基或 Bn-O-取代，并且 R⁹ 是 C1-6 的烷基，并且可选的被一个或多个卤素、硝基、氰基、羟基、氨基、氨基甲酰基、6-12 元的芳香基、C1-6 烷基、C2-6 炔基、C2-6 烯基、C1-6 烷氧基、C1-6 卤代烷基、3-6 元的杂环基、C3-6 环烷基或 Bn-O-取代，R¹⁰ 选自 H、C1-6 烷基、C2-6 炔基、C2-6 烯基、C1-6 烷氧基或 C1-6 卤代烷基，和/或

(b) 两个相邻碳原子上的 R⁶ 形成 5-12 元的环烷基、芳香基或杂环基，并且可选的被一个或多个卤素、硝基、氰基、羟基、氨基、氨基甲酰基、6-12 元的芳香基、C1-6 烷基、C2-6 炔基、C2-6 烯基、C1-6 烷氧基、C1-6 卤代烷基、3-6 元的杂环基、C3-6 环烷基或 Bn-O-取代，

其中，n 为 0-5 的整数。

在一个实施方案中，其中 n 为 0-2 的整数，所述 R⁶ 各自独立的选自 H、氘、甲基、一氘代甲基、二氘代甲基、三氘代甲基、卤素、硝基、氰基、羟基、氨基、氨基甲酰基、C1-6 烷基砜基、C1-6 烷基、C1-6 环烷基、C1-6 烷氧基、C1-6 卤代烷基、-As(O)、N-(C1-6 烷基)氨基、N,N-(C1-6 烷基)₂ 氨基、-NH-C(O)H 或 -NH-S(O)₂H，并且可选的被所述 R⁷ 或 R⁸ 取代。

在一个实施方案中，其中 n 为 0-2 的整数，所述 R⁶ 各自独立的选自 H、氘、甲基、一氘代甲基、二氘代甲基、三氘代甲基、卤素、硝基、氰基、羟基、氨基、C1-6 烷基砜基、C1-6 烷基、C1-6 环烷基、C1-6 烷氧基、C1-6 卤代烷基、-As(O)、-NH-C(O)H 或 -NH-S(O)₂H，并且可选的被所述 R⁷ 或 R⁸ 取代。

在一个实施方案中，其中 n 为 1 或 2，所述 R⁶ 各自独立的选自 H、氘、甲基、一氘代甲基、二氘代甲基、三氘代甲基、卤素、氨基、C1-6 烷基砜基、C1-6 环烷基、C1-6 烷氧基、C1-6 卤代烷基、-NH-C(O)R⁷ 或 -NH-S(O)₂R⁸，其中 R⁷ 为 C1-6 烷基，可选的被一个 6-12 元芳香基取代，R⁸ 为 6-12 元芳香基，可选的被一个卤素、C1-6 烷氧基或 C1-6 卤代烷基取代。

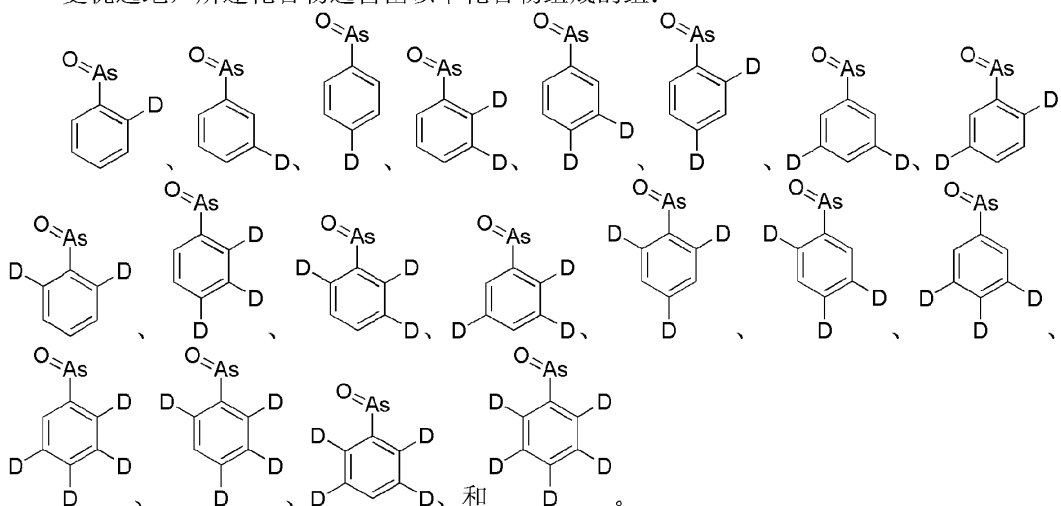
在一个实施方案中，其中所述 R⁶ 位于 -As(O) 基团的邻位和/或者对位。

在一个实施方案中，其中 n 是 0。

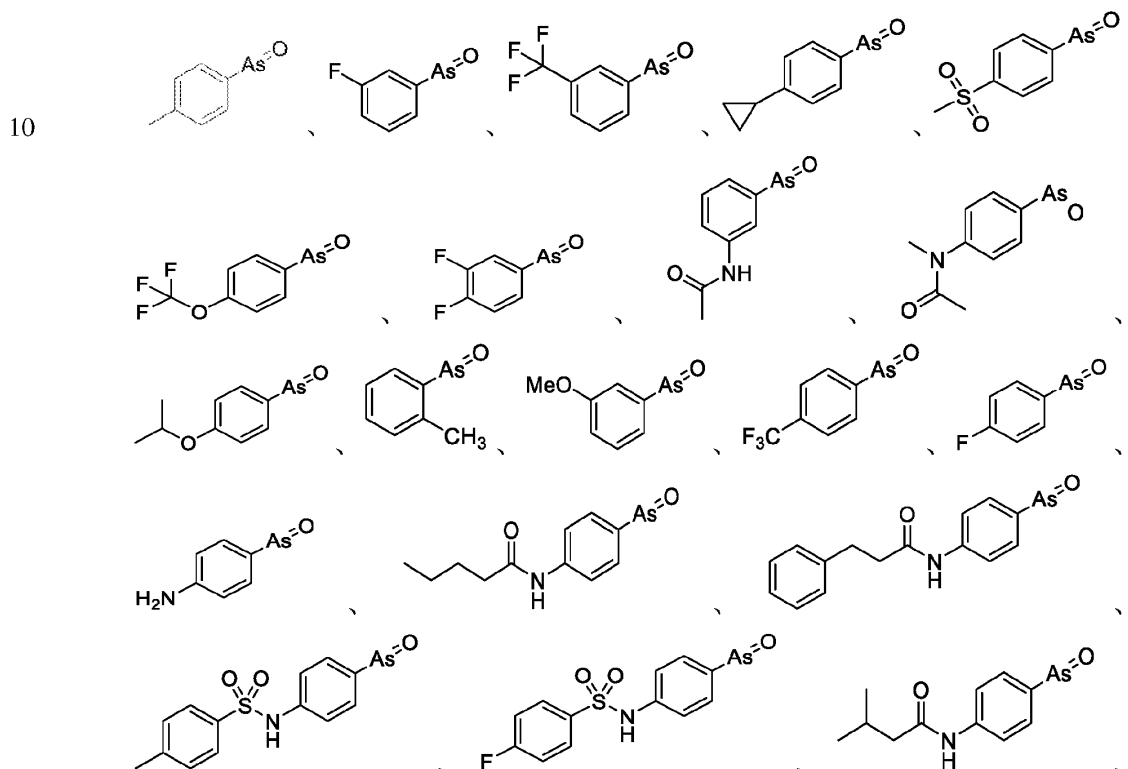
在一个实施例方案中，其中， R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 独立地选自氢、氘、卤素、甲基、一氘代甲基、二氘代甲基或三氘代甲基，且 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 中至少一个为氘或氘代的；

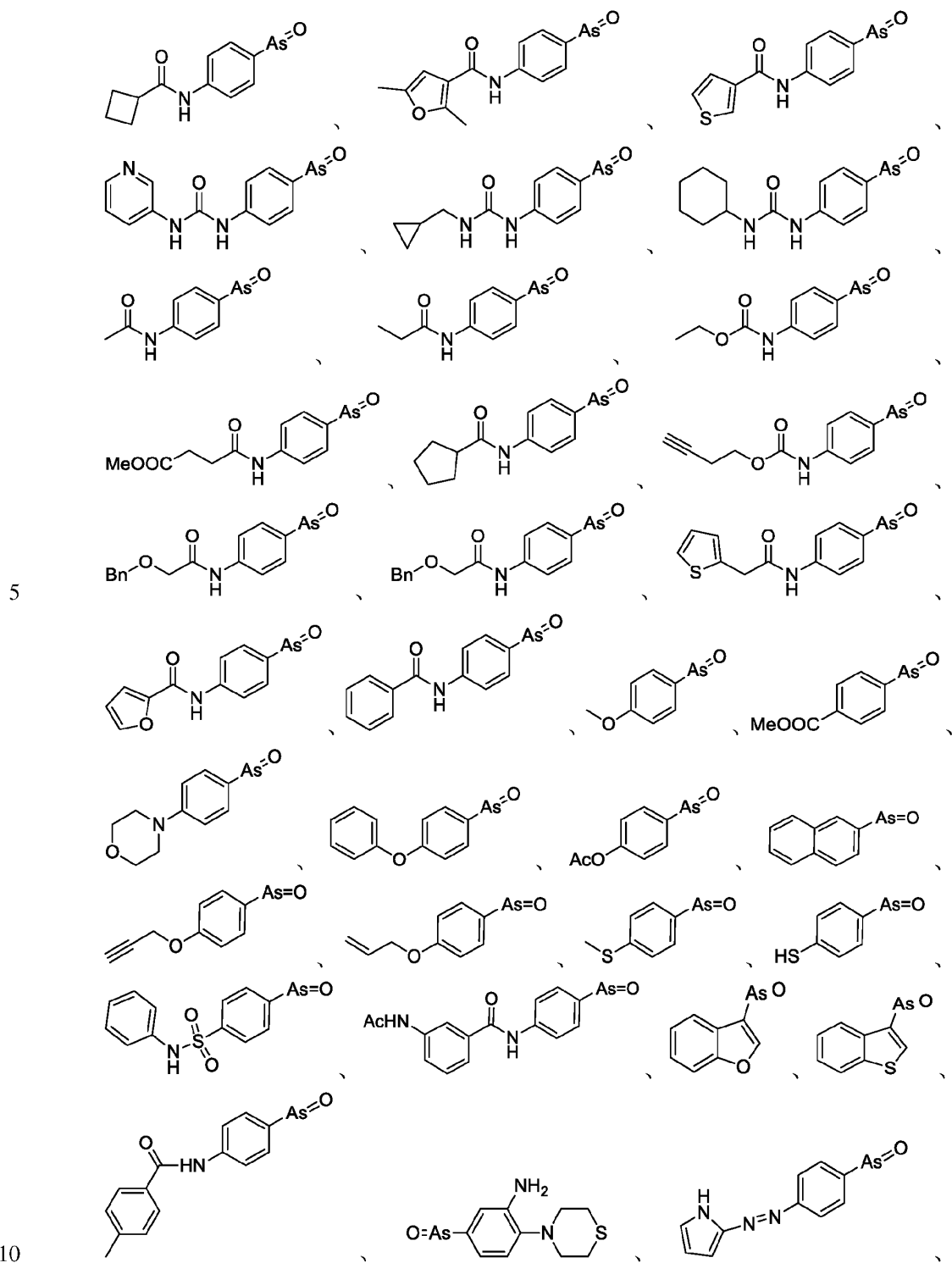
优选地， R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 独立地选自氢或氘，且 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 中至少一个为氘，至少两个为氘，优选地至少三个、四个或五个为氘；

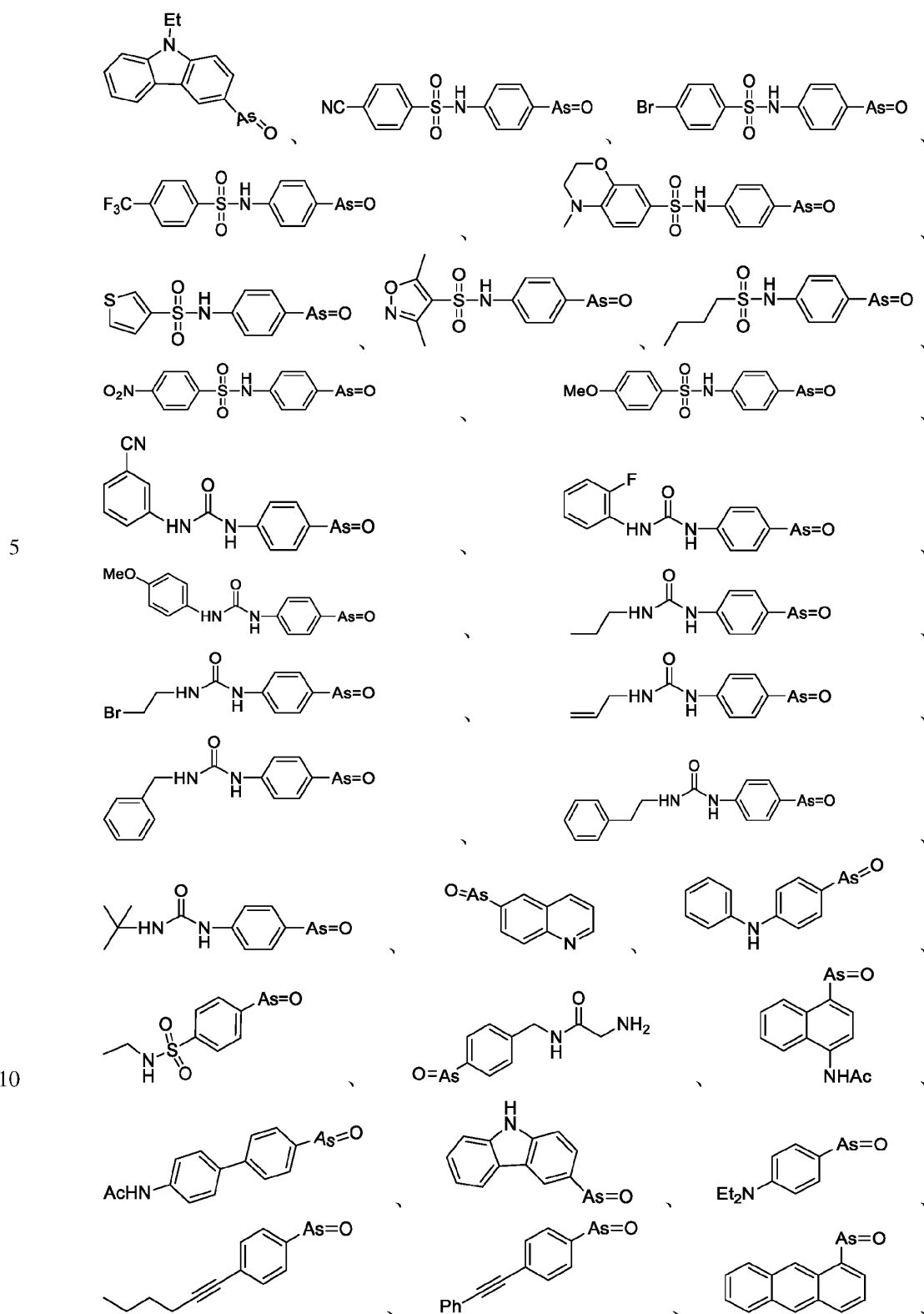
5 更优选地，所述化合物选自以下化合物组成的组：

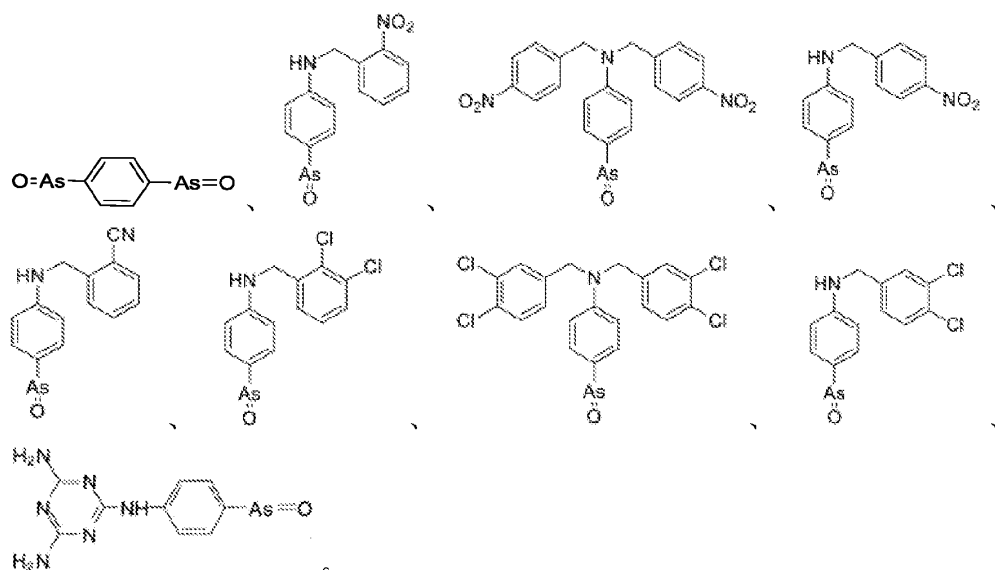


在一个实施方案中，所述化合物选自以下化合物组成的组：









在一个实施方案中，所述客体是人或者哺乳动物。

- 5 在一个实施方案中，所述的放射性射线照射导致的细胞组织损伤选自 X 射线照引起的细胞或组织器官损伤。

在一个实施方案中，所述的放射性射线照射导致的细胞组织损伤的症状选自：X 射线照射引起的唾液腺损伤所致的唾液分泌减少、口腔干燥、粘膜炎、组织器官纤维化以及 X 射线照射引起的白细胞下降中的至少一种。

- 10 在一个实施方案中，其中所述肿瘤选自淋巴瘤诸如急性非 B 或非 T 细胞淋巴瘤、宫颈癌、子宫内膜癌、肝癌、乳腺癌诸如三阴性乳腺癌、肺癌诸如非小细胞肺癌或小细胞肺癌、结直肠癌、胃癌、皮肤癌诸如黑色素瘤、骨癌、骨肉瘤、骨髓瘤、血癌诸如急性或慢性白血病、卵巢癌、前列腺肿瘤、脑瘤诸如脑星型胶质细胞瘤、神经母细胞瘤、甲状腺癌、恶性胚胎横纹肌瘤。

- 15 在一个实施方案中，其进一步包括向需要其的客体施用第二试剂，优选所述第二试剂是用于治疗肿瘤的试剂。

在一个实施方案中，其中所述第二试剂是用于治疗肿瘤的试剂。

在一个实施方案中，所述治疗肿瘤的药物优选为干扰有丝分裂的抗肿瘤药诸如紫杉醇或白蛋白紫杉醇、直接影响 DNA 结构和功能药物诸如卡铂或顺铂、或 Kras 抑制剂

- 20 在一个实施方案中，其中所述化合物在所述第二试剂之前、之后或同时施用。

本方法进一步公开了一种筛选用于预防或治疗疾病的药物的方法，包括将备选药物与 PI4KIII α 蛋白或者核酸或者 PI4KIII α 接触，并检测备选药物是否能够抑制 PI4KIII α 的形成或

者活性，所述疾病选自心脏纤维化、放射性射线照射导致的细胞组织损伤、动脉粥样硬化或动脉再狭窄、糖尿病或哮喘。

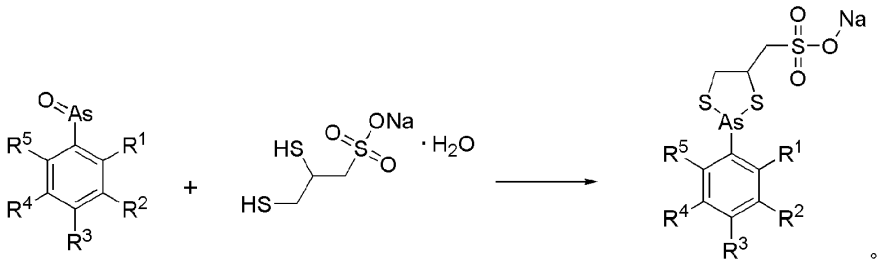
本方法进一步公开了一种测定血液中 PAO 或其衍生物浓度的分析方法，所述衍生物包括式 I 或式 II 化合物，其包括如下步骤：

5 第一步：分别将 PAO 或其衍生物、对照标准品和 2,3-二巯基丙磺酸钠在单独容器中溶解，制备三种储备液；

第二步：将待测的包含 PAO 或其衍生物的血液、2,3-二巯基丙磺酸钠的储备液混合，将溶液调至酸性，在 25-80°C 下孵育适当时间；

10 第三步：在第二步所得溶液中加入对照标准品的储备液，振摇一段时间并离心，取上清液检测 PAO 或其衍生物的衍生化的产物。

其中在第二步中孵育 10-80 分钟，所述酸性是指 pH 小于 6，加入适量的酸例如甲酸、磷酸氢钾、醋酸或盐酸将溶液调整至酸性，且在第二步中发生的反应如下：



15 其中在第一步中，将 PAO 或其衍生物和对照标准品溶于 DMSO 中，并将对照标准品的 DMSO 溶液用乙腈稀释，将 2,3-二巯基丙磺酸钠溶于纯水中。

其中所述对照标准品为甲苯磺丁脲，在第三步中利用液相色谱-质谱方法检测 PAO 或其衍生物的衍生化的产物。

所述 PAO 衍生物选自氘代或卤素取代的化合物，例如式 I 或式 II 所式的化合物，或如前所述的任意 PAO 衍生物。

20 附图说明

图 1 示出在雄性 SD 大鼠中单次静脉注射 0.1 mg/Kg PAO、d5PAO（或 d5-PAO）和 F2m-PAO（或 F2mPAO），药代动力学的药时曲线图。

图 2 示出在雄性 SD 大鼠中单次口服灌胃 0.2 mg/Kg PAO、d5PAO 和 F2m-PAO，药代动力学的药时曲线图。

25 图 3 示出 MRC-5 细胞处理经氘代系列化合物处理 4 小时和 24 小时细胞活力。MRC-5 细胞使用含有 5ng/mL TGF-β1，并根据分组同时加入含有不同浓度氘代系列化合物的 MEM 培养基（无 FBS）培养 4 小时或 24 小时。使用 MTT 检测细胞活力。（A）不同浓度的各氘

代化合物处理 4 小时检测细胞活力统计；(B) 不同浓度的各氟代化合物处理 24 小时检测细胞活力统计。与 5ng/mL TGF- β 1 处理组比较，*表示 $p<0.03$ 。

图 4 示出氟代系列化合物抑制 I 型胶原蛋白、 α -SMA 和 Calponin1 在 MRC-5 模型细胞中的表达。(A) 蛋白质免疫印迹法检测 α -SMA、Calponin1 和 I 型胶原蛋白的表达水平。(B) 5 各组 I 型胶原蛋白表达量统计分析结果。(C) 各组 α -SMA 表达量统计分析结果。(D) 各组 Calponin1 表达量统计分析结果。使用 Image J 软件分析蛋白质信号强度，以 ctrl 组信号强度为 1, $n=3$, 使用单因素分析(One-way ANOVA)处理, 数据用 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示, 与 5 ng/mL TGF- β 1 处理组比较 * $p<0.03$, ** $p<0.001$, *** $p<0.0001$, 与 ctrl 组比较 # $p<0.03$ 。

图 5 示出氟代系列化合物抑制 α -SMA 在 MRC-5 模型细胞中的表达。(A) 各组 α -SMA 10 免疫荧光图, 绿色: α -SMA, 蓝色: DAPI (核)。标尺: 50 μm 。(B) α -SMA 免疫荧光强度统计结果分析。以 ctrl 组平均值为 1, $n=5$, 使用单因素分析 (One-way ANOVA) 处理, 数据用 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示, 与 5 ng/mL TGF- β 1 处理组比较 ** $p<0.001$, *** $p<0.0001$ 。

图 6 示出氟代系列化合物抑制 Calponin1 在 MRC-5 模型细胞中的表达。(A) 各组 Calponin1 免疫荧光图, 红色: Calponin1, 蓝色: DAPI (核)。标尺: 50 μm 。(B) Calponin1 15 免疫荧光强度统计结果分析。以 ctrl 组平均值为 1, $n=5$, 使用单因素分析 (One-way ANOVA) 处理, 数据用 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示, 与 5 ng/mL TGF- β 1 处理组比较 * $p<0.03$, ** $p<0.001$, *** $p<0.0001$ 。

图 7 示出 shRNA 干扰慢病毒载体使 PI4KIII α 表达减少。shRNA 干扰慢病毒载体与 MRC-5 细胞共孵育 48 小时, 收集蛋白进行蛋白免疫印迹实验。(A) 检测 PI4KIII α 蛋白; (B) 对 20 数据使用 Image J 软件进行分析, 以 sh-ctrl 组为 1 进行归一化处理, $n=3$, 数据用 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示, 与 sh-ctrl 组比较 *** $p<0.0001$ 。

图 8 示出敲减 PI4KA 抑制 Calponin1 和 α -SMA 在 TGF- β 1 处理的 MRC-5 细胞中表达。MRC-5 细胞贴壁后加入不同序列的慢病毒载体培养 24 小时, 根据分组加入或不加入 5ng/mL TGF- β 1 处理 24 小时, 进行免疫荧光染色观察。(A) 各组 α -SMA 免疫荧光染色, 红色: α -SMA, 25 蓝色: DAPI (核), 绿色: 绿色荧光蛋白 GFP。标尺: 50 μm 。(B) 各组 Calponin1 免疫荧光染色, 红色: Calponin1, 蓝色: DAPI (核), 绿色: 绿色荧光蛋白 GFP。标尺: 50 μm 。 α -SMA (C) 和 Calponin1 免疫荧光强度统计结果分析, 以 sh-ctrl 组平均值为 1 进行归一化处理, $n=5$, 数据用 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示, 与 sh-ctrl 加 5 ng/mL TGF- β 1 共同处理组比较 * $p<0.03$, *** $p<0.0001$, 与 sh-ctrl 组比较, ## $p<0.001$, ### $p<0.0001$ 。

图 9 示出不同浓度的 d5PAO 和 PAO 对培养心肌成纤维细胞的影响。 $n=3$, 使用单因素 30 方差分析 (one-way ANOVA) 处理, 各组间使用 T-test 分析, 数据用 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示, 与

缺氧 24 小时处理组相比, 100nmol/L 的 d5PAO 和 PAO 对心肌成纤维细胞增殖和迁移 (** $p < 0.0001$)。

图 10 示出 PAO 抑制缺氧刺激诱导的细胞 α -SMA 和 Col 1A 基因的表达量 qPCR 结果分析图。n=3, 使用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 处理, 各组间使用 T-test 分析, 数据用 mean $\pm$ SEM 表示, 与缺氧 24 小时处理组相比, 50nmol/L 和 100nmol/L 的 PAO 对抑制心肌成纤维细胞的纤维化可能有一定作用 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$)。

图 11 示出缺氧 24 小时可显著提高心肌细胞中 Collagen-1 蛋白的表达量 WB 结果。(A, B) 为 α -SMA 和 1 型胶原蛋白的信号强度值, (C) 为各浓度 PAO 的 WB 结果图。n=3, 使用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 处理, 各组间使用 T-test 分析, 数据用 mean $\pm$ SEM 表示, 与缺氧 24 小时处理组相比, 20nmol/L, 50nmol/L 和 100nmol/L 的 PAO 对抑制心肌成纤维细胞的纤维化可能有一定作用 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$)。

图 12 示出 A1 和 G1 抑制缺氧刺激诱导的细胞 Collagen-1 和 α -SMA 蛋白表达量。(A, B) 为 α -SMA 和 1 型胶原蛋白的信号强度值; (C) 为 100 nmol/L 的 A1 和 G1 的 WB 结果图。n=3, 使用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 处理, 各组间使用 T-test 分析, 数据用 mean $\pm$ SEM 表示, 与缺氧 24 小时处理组相比 100nmol/L 的 A1 和 G1 对抑制心肌成纤维细胞的纤维化可能有一定作用 (** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$)。

图 13 示出 PAO 和 d5PAO 抑制缺氧诱导的心肌成纤维细胞迁移能力。(A, C):100nmol/L 的 d5PAO/PAO 在细胞划痕实验中的表现, (B, D) 为其统计分析: n=3, 各组间使用 T-test 分析, 数据用 mean $\pm$ SEM 表示, 与缺氧 24 小时处理组相比 100nmol/L 的 d5PAO 和 PAO 对抑制心肌成纤维细胞的纤维化可能有一定作用 (* $p < 0.05$)。

图 14 示出 PAO 有效抑制心梗区 α -SMA 和 Collagen-1 蛋白表达的增强。(A, B) 为 α -SMA 和 1 型胶原蛋白的信号强度值; (C) 0.3mg/kg PAO 的 WB 结果图。n=3, 各组间使用 T-test 分析, 数据用 mean $\pm$ SEM 表示, 与心梗造模组比较, 0.3mg/kg PAO 对抑制心肌成纤维细胞的纤维化可能有一定作用 (* $p < 0.05$)。

图 15 示出 PAO 有效抑制心梗区纤维化面积含 Collagen 区域面积的增大。(A, B) HE 和马松染色结果统计图; (C): HE 染色和马松染色结果图。n=5, 各组间使用 T-test 分析, 数据用 mean $\pm$ SEM 表示, 与心梗造模组比较, 0.3mg/kg PAO 对抑制心肌成纤维细胞的纤维化可能有一定作用 (** $p < 0.001$)。

图 16 示出 α -synuclein 过表达质粒信息。

图 17 示出样品标曲配制图。

图 18 示出氟代系列化合物对细胞活力影响并促进 α -synuclein 外排。SH-sy5y 细胞经 Eugene HD 转染试剂转染空载 (vehicle) 质粒或 α -synuclein 过表达质粒, 转染 24 小时后饥饿处理 24 小时, 根据分组分别给予不同浓度的 F2mPAO, F2oPAO 和 F3PAO 处理。(A) 不同浓度的氟代系列化合物处理 4 小时经 MTT 检测细胞活力; (B) 不同浓度的氟代系列化合物处理 24 小时经 MTT 检测细胞活力; (C) ELISA 试剂盒检测培养液上清中 α -synuclein 含量, 并通过标准曲线计算各组 α -synuclein 浓度; (D) 将数据归一化处理, 以空载质粒 (vehicle) 组 α -synuclein 浓度平均值为 1, $n=3$, $\text{mean} \pm \text{SEM}$, One-way ANOVA, 与 α -synuclein 过表达 (α -syn OE) 组比较 $*p<0.03$, $**p<0.001$ 。

图 19 示出氟代系列化合物不影响稳转 APP (SW) HEK293 细胞活力并促进 $A\beta$ 释放。
10 (A) MTT 检测一定浓度氟代系列化合物处理稳转 APP (SW) HEK293 细胞 4 小时的细胞活力; (B) MTT 检测一定浓度氟代系列化合物处理稳转 APP (SW) HEK293 细胞 24 小时的细胞活力, $n=5$, $\text{mean} \pm \text{SEM}$, One-way ANOVA; (C) ELISA 试剂盒检测培养液上清中 $A\beta_{42}$ 含量, 并通过标准曲线计算各组 $A\beta_{42}$ 值; (D) 将数据归一化处理, 以对照组 (ctrl) $A\beta_{42}$ 浓度平均值为 1, 计算各组 $A\beta_{42}$ 含量变化的倍数, $n=3$, $\text{mean} \pm \text{SEM}$, One-way
15 ANOVA, 与对照组比较 $*p<0.03$ 。

图 20 示出 H14734 空载体图谱。

图 21 示出 H14734 全图谱。

图 22 示出 H303 pcDNA3.1 空载体图谱。

图 23 示出 H303 pcDNA3.1 全图谱。

20 图 24 示出氟代系列化合物促进 HTT 分泌。(A) 细胞系过表达 HTT 24 小时后饥饿 24 小时, 再经不同浓度氟代系列化合物孵育 24 小时, 加入 MTT 孵育 4 小时, 检测吸光度值。 $n=5$, 数据以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示, One-way ANOVA, 与对照组比较, $***p<0.0001$ 。(B) 细胞系过表达 HTT 24 小时后饥饿 24 小时, 再经不同浓度氟代系列化合物孵育 4 小时, 收集细胞培养基上清, ELISA 检测 HTT 蛋白浓度。 $n=3$, 数据以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示, One-way ANOVA,
25 与对照组比较 $*p<0.03$, $***p<0.01$ 。

图 25 示出氟代系列化合物促进 SOD1 分泌。(A) 细胞系过表达 SOD1 24 小时后饥饿 24 小时, 再经不同浓度氟代系列化合物孵育 24 小时, 加入 MTT 孵育 4 小时, 检测吸光度值。 $n=5$, 数据以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示, One-way ANOVA, 与对照组比较, $***p<0.0001$ 。(B) 细胞系过表达 SOD1 24 小时后饥饿 24 小时, 再经不同浓度氟代系列化合物孵育 4 小时, 收集细胞培养基上清, ELISA 检测 SOD1 蛋白浓度。 $n=3$, 数据以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示, One-way
30 ANOVA。

图 26 示出氟代系列化合物在 CBE 构建的 SH-SY5Y 细胞模型中发挥保护作用。100 μ M CBE 处理 SH-SY5Y 细胞 24 小时，饥饿（不含 FBS 高糖 DMEM）和 100 μ M CBE 处理共同处理 24 小时，再给予不同浓度氟代系列化合物处理 24 小时，通过 MTT 实验检测细胞活力， $n=5$ ，数据以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示，与 100 μ M CBE 处理组比较 * $p < 0.03$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$ 。

- 5 图 27 示出氟代系列化合物抑制 CBE 诱导的溶酶体贮积。(A) SH-SY5Y 细胞与 lysosome tracker 共孵育 30 分钟，再吸去上清更换为含有不同浓度的 PAO 并孵育 10 分钟，通过免疫荧光方法观察 Lyso-tracker; (B) 统计分析各组 Lyso-tracker 荧光强度; $n=5$; One-way ANOVA 分析，与 100 μ M CBE 处理组比较 * $p < 0.03$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$ 。

- 10 图 28 示出氟代系列化合物处理细胞 12 小时明场 (bright field)。BV2 细胞培养 48 小时，去除培养基并更换为含有 1 μ g/mL LPS 的高糖 DMEM 培养基，同时根据分组给予不同浓度氟代系列化合物共孵育 12 小时，使用奥林巴斯 IX50 荧光显微镜 (Olympus, Japan) 拍照。标尺: 200 μ m。

- 15 图 29 示出氟代系列化合物抑制 TNF- α 并促进 CD206 在 BV2 细胞模型中的表达。BV2 细胞培养 48 小时，去除培养基并更换为含有 1 μ g/mL LPS 的高糖 DMEM 培养基，同时根据分组给予不同浓度氟代系列化合物共孵育 12 小时。(A) 不同处理组免疫荧光染色图; 蓝色: DAPI, 红色: TNF- α , 绿色: CD206。标尺: 50 μ m。(B) TNF- α 免疫荧光强度统计结果分析。(C) CD206 免疫荧光强度统计结果分析。以 ctrl 组平均值为 1, $n=5$ ，使用单因素分析 (One-way ANOVA) 处理，数据用 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示，与 1 μ g/mL LPS 处理组比较 * $p < 0.03$ 。

- 20 图 30 示出 CD206 荧光强度与 TNF- α 荧光强度比值。将 CD206 免疫荧光强度与对应的 TNF- α 免疫荧光强度进行比值，以 ctrl 组比值的平均值为 1 进行归一化处理， $n=5$ ，使用单因素分析 (One-way ANOVA) 处理，数据用 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示，与 1 μ g/mL LPS 处理组比较 * $p < 0.03$ 。

- 25 图 31 示出氟代系列化合物抑制 TNF- α 外排。BV2 细胞培养 48 小时，去除培养基并更换为含有 1 μ g/mL LPS 的高糖 DMEM 培养基，同时根据分组给予不同浓度氟代系列化合物共孵育 4 小时，收集上清进行 ELISA 实验。(A) 细胞培养上清中 TNF- α 浓度，并据标准曲线计算 TNF- α 含量 (pg/mL); (B) 以 ctrl 组浓度平均值为 1，计算各组 TNF- α 相对浓度变化。 $n=3$ ，使用单因素分析 (One-way ANOVA) 处理，数据用 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示，与 1 μ g/mL LPS 处理组比较 * $p < 0.03$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$ 。

图 32 示出油红 O 染色的明场图。

- 30 图 33 示出被 ox-LDL 处理分化后的 THP-1 细胞 (model) 的油红 O 染色的信号比未被 ox-LDL 处理的细胞 (control) 强。

图 34 示出 F3PAO 和 d5PAO 对高脂饮食喂养的 ApoE^{-/-}小鼠体重的影响。T 检验, *p<0.05 和 **p<0.001 (与 MCT 组相比)。

图 35 示出 PAO 对高脂饮食喂养的 ApoE^{-/-}小鼠体重的影响。T 检验, *p<0.05 (与 MCT 组相比)。

- 5 图 36 示出 PAO、F3PAO 和 d5PAO 对高脂饮食喂养的 ApoE^{-/-}小鼠的空腹血糖的影响。T 检验, **p<0.01 和 ***p<0.001 (与 MCT 组相比)。

图 37 示出利用二巯基丙磺酸钠对 PAO 进行衍生化反应。

图 38 示出代表性的 SD 大鼠全血中加入 PAO (1000 ng/mL) 衍生化后的 LC-MS/MS 色谱图。

- 10 图 39 示出代表性的 SD 大鼠全血中加入 PAA (1000 ng/mL) 衍生化后的 LC-MS/MS 色谱图。

图 40 示出 PAO 单次灌胃给药后在 SD 大鼠的组织分布特征。

图 41 示出小鼠动脉粥样硬化斑块油红 O 染色显示 PAO 可减少动脉粥样硬化斑块量减少。

- 15 图 42 示出 PAO 减少高脂喂养 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化斑块面积所占比例。n=4-6, *: P<0.05。

图 43 示出 PAO 对哮喘模型小鼠的体重变化的影响。

图 44 示出 PAO 能够改善哮喘模型组小鼠的呼吸功能: 气道反应性监测-Penh Value 统计分析。

- 20 图 45 示出 PAO 能够抑制哮喘模型组小鼠白细胞总数上升。

图 46 示出 PAO 抑制抑制哮喘模型组小鼠不同类型白细胞的上升。

图 47 示出 PAO 改善哮喘造模导致的呼吸道病理改变。

图 48 示出 PAO, d5PAO 和 F3PAO 降低油酸所导致的脂滴和甘油三酯在肝细胞中的蓄积。

- 25 图 49 示出 F3PAO 抑制 Ang2 诱导平滑肌 A7R5 细胞的增殖。

图 50 示出 F3PAO 抑制 Ang2 诱导的 A7R5 细胞 PCNA, MMP9 基因的表达量。

图 51 示出 F3PAO 抑制 Ang2 诱导的 A7R5 细胞内 PCNA 和 MMP9 蛋白的表达量(WB)。

图 52 示出 PAO/F3PAO/GSK-A1 (A1) 抑制 Ang2 刺激诱导的细胞 Collagen-1 蛋白表达量 (WB)。

- 30 图 53 示出 F3PAO 抑制 Ang2 诱导的血管平滑肌细胞迁移能力的增强 (划痕实验)。

具体实施方式

以下根据实施例，并且结合附图，详细描述本公开。从下文的详细描述中，本公开的上述方面和本公开的其他方面将是明显的。本公开的范围不局限于下列实施例。

本文中使用的术语“化合物”旨在包括所示结构的所有立体异构体（例如对映体和非对映体）、几何异构体、互变异构体和同位素。

5 本文所述的化合物可以是不对称的（例如具有一个或多个立体中心）。除非另外指明，所有的立体异构体，例如对映体和非对映体，都旨在包含在内。在本文所述的化合物中还可以存在烯烃、碳-碳双键等多种几何异构体，并且在本文中已经考虑了所有的这些稳定异构体。本文描述了化合物的顺式和反式几何异构体并且其可以以异构体的混合物或单独的异构体形式分离。

10 本文的化合物还包括互变异构形式。互变异构形式是由同时伴有质子的迁移的单键与相邻双键的对换导致的。互变异构形式包括具有相同化学式和总电荷的异构质子化状态的质子的互变异构体。质子互变异构体的示例包括酮-烯醇对、酰胺-亚胺酸对、内酰胺-内酰亚胺对、烯胺-亚胺对和环状的形式，其中质子能够占据杂环系统的两个或多个位置，例如 1H-和 3H-咪唑、1H-、2H-和 4H-1,2,4-三唑、1H-和 2H-异吡啶以及 1H-和 2H-吡唑。互变异构形式通过
15 适宜的取代能够平衡或空间锁定成一种形式。

在某些实施方案中，本文的小分子化合物可以通过有机合成获得。可以使用任意公知的有机合成技术制备并且可以根据多种可能的合成途径合成本文的化合物，包括其盐、酯、水合物或溶剂化物。

PI4KIII α 特异性抑制剂

20 本文中所用的术语“PI4KIII α 特异性抑制剂”是指能够特异性降低、减少、消除 PI4KIII α 基因的转录或翻译，和/或 PI4KIII α 蛋白活性的各类物质。在一些实施方案中，所述 PI4KIII α 特异性抑制剂能够将 PI4KIII α 的活性降低至少 5%、10%、20%、40%、50%、80%、90%、95%或更多。在本文中，当“活性”与增加或降低一同使用的时候，是指检测到的功能活性，其可以表现为含量变化、或者含量不变但是功能活性变化。

25 本文中，PI4KIII α 的活性是指 PI4KIII α 蛋白将磷酸肌醇（PI）在特定位置磷酸化（例如，转化为 4-磷酸磷脂酰肌醇（PI4P））的活性。所述 PI4KIII α 特异性抑制剂与 PI4KIII α 蛋白的结合常数为其与其他非特异性结合蛋白的结合常数的至少 2 倍以上。在一些实施方案中，PI4KIII α 特异性抑制剂能够在复杂混合物中优选识别 PI4KIII α 蛋白，包括与其他 PI4 看亚型蛋白的混合物。

30 在一些实施方案中，相比于其他 PI4K 蛋白的亚型（例如，PI4K 蛋白，包括 PI4KII α 或 PI4KII β ），所述 PI4KIII α 特异性抑制剂对 PI4KIII 的抑制强至少 1 倍、2 倍、4 倍、5 倍、10

倍、20 倍、30 倍、50 倍、100 倍、200 倍、500 倍或 10000 倍。例如，在一些实施方案中，PI4KIII α 特异性抑制剂基本上不抑制 PI4KII（例如，PI4KII α 或 PI4KII β ），例如，其 IC₅₀ 大于或等于 10 μ M、20 μ M、30 μ M、40 μ M、50 μ M、60 μ M、80 μ M、100 μ M、150 μ M、200 μ M 或 500 μ M。

- 5 在一些实施方案中，相比于对 PI4KIII 的其他亚型（例如 PI4KIII β ），PI4KIII α 特异性抑制剂对 PI4KIII α 的抑制强至少 1 倍、2 倍、4 倍、5 倍、10 倍、20 倍、30 倍、50 倍、100 倍、200 倍、500 倍或 10000 倍。

在一些实施方案中，PI4KIII α 特异性抑制剂对 PI4KIII α 的 IC₅₀ 小于或等于 100 μ M、80 μ M、50 μ M、30 μ M、20 μ M、10 μ M、5 μ M、3 μ M、2 μ M、1 μ M、0.5 μ M、0.2 μ M、0.1 μ M、
10 0.05 μ M、0.02 μ M、0.01 μ M、0.005 μ M、0.002 μ M 或 0.001 μ M。在一些实施方案中，所述 PI4KIII α 特异性抑制剂是抗体、小分子化合物、RNAi 分子或者反义核酸。

在一些实施方案中，所述 PI4KIII α 特异性抑制剂是抗体。

本文所用的术语“抗体”包含可结合某特定抗原的任意免疫球蛋白、单克隆抗体、多克隆抗体、多价抗体、双价抗体、单价抗体或抗体。本文中的“抗体”一词旨在广泛地涵盖常规的
15 四链抗体以及不具有四条链的较不常规的抗体（例如，天然缺乏轻链的抗体）。

一个常规的完整抗体是异四聚体，其包含两条重（H）链和两条轻（L）链。哺乳动物的重链可分为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ ，每条重链由一可变区（VH）和第一、第二、第三恒定区（分别为 CH1、CH2、CH3）组成；哺乳动物的轻链可分为 λ 或 κ ，每条轻链由一可变区（VL）和一恒定区组成。常规抗体呈“Y”型，“Y”型结构的颈部由两条重链的第二和第三恒定区组成，
20 其通过二硫键结合。“Y”型结构的每条臂包含其中一条重链的可变区和第一恒定区，其与一条轻链的可变区和恒定区结合。轻链和重链的可变区决定抗原的结合。每条链的可变区均含有三个高变区，称互补决定区（CDR）（轻链的 CDR 包含 LCDR1、LCDR2、LCDR3，重链的 CDR 包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3）。其中，三个 CDR 由被称为框架区（FR）的侧面连续部分间隔开，框架区比 CDR 更加高度保守并形成一个支架支撑超变环。重链和轻
25 链的恒定区与抗原结合无关，但具有多种效应功能。

在本公开的一些实施方案中，所述抗体是全长抗体或抗原结合片段。

本文中使用的术语“抗原结合片段”指由含有一个或多个 CDR 的抗体部分但不具有完整抗体结构的抗体片段所形成的一种抗体片段。抗原结合片段的例子包括但不限于 Fab 片段、Fab'片段、F(ab')₂ 片段、Fv 片段、单链抗体分子（scFv）、scFv 二聚体、骆驼化单域抗体
30 （camelized single domain antibody）和纳米抗体。抗原结合片段可以与母体抗体结合相同的抗原。

抗体的“Fab”片段是指由一条轻链（包括可变区和恒定区）和一条重链的可变区和第一恒定区经二硫键结合起来的那部分抗体。

“Fab”片段是指包含了部分铰链区的 Fab 片段。

“F(ab')₂”片段是指 Fab'的二聚体。

5 抗体的“Fv”片段由一条轻链的可变区和一条重链的可变区组成。

“单链抗体分子”或“scFv”是指由轻链可变区与重链可变区直接相连或通过一个肽链连接而成的工程抗体。详细介绍可以参见例如 Huston JS 等，Proc Natl Acad Sci USA、85:5879(1988)。

“scFv 二聚体”是指由两个 scFv 形成的聚合体。

10 “骆驼化单域抗体（Camelized single domain antibody）”（又称为“重链抗体”或“HCAb（Heavy-chain-only antibodies, HCAb）”）是指含有两个重链可变区而不含有轻链的抗体。重链抗体最初从驼科（骆驼、单峰驼和美洲驼）衍生得到。虽然缺失轻链，但是骆驼化抗体具有抗原结合的全部功能。

“纳米抗体”是由一个来自重链抗体的重链可变区和两个恒定区 CH₂ 和 CH₃ 组成。

15 在一些实施方案中，所述抗体是单克隆抗体或者多克隆抗体。

在一些实施方案中，所述抗体是鼠源抗体、兔源抗体、嵌合抗体、人源化抗体或者全人源抗体。

本文中使用的术语“全人源”当用于抗体或抗原结合片段时，是指所述抗体或抗原结合片段的氨基酸序列对应于由人或人免疫细胞生产的、或从例如利用人源抗体库的转基因非人动物等非人来源衍生的抗体的氨基酸序列，或者其他编码人源抗体的序列。

本文中使用的术语“人源化”当用于抗体或抗原结合片段时，是指包括来源于非人动物的 CDR、来源于人的 FR 区，以及来源于人的恒定区（当适用时）的抗体或抗原结合片段。由于人源化的抗体或抗原结合片段具有更低的免疫原性，其在某些实施方式中可用作人的治疗剂。在某些实施方式中，所述非人动物是哺乳动物（例如，小鼠、大鼠、兔、山羊、绵羊、豚鼠或仓鼠）。在某些实施方式中，所述人源化抗体或抗原结合片段除了 CDR 序列是非人源的以外，基本上全部由人源序列组成。

本文中使用的术语“嵌合”当用于抗体或抗原结合片段时，是指具有来源于一种物种的重链和/或轻链的一部分，而所述重链和/或轻链其余部分来源于不同物种的抗体或抗原结合片段。在一些实施方式中，嵌合抗体可以包括来源于人的恒定区和来源于非人动物（例如小鼠或兔）的可变区。

在一些实施方式中，本文所述抗体是单特异性抗体、双特异性抗体或多特异抗体。

在一些实施方式中，本文所述抗体可以进一步地被标记。

在一些实施方案中，所述 PI4KIII α 特异性抑制剂是 RNAi 分子。

本文所用的术语“RNAi 分子”是指 RNA 或其类似物，其具有与靶 RNA 充分的序列互补性，以指导 RNA 干扰。在一些实施方式中，还包括可用于生成 RNA 的 DNA。RNA 干扰 (RNAi) 是指序列特异或选择的过程，通过该过程下调了靶分子（例如，靶基因、蛋白或 RNA）。

在一些实施方案中，所述 RNAi 分子能够降低 PI4KIII α 的表达，例如，敲减 PI4KA 基因。

在一些实施方案中，所述 RNAi 分子的长度为 18-100 碱基。

在一些实施方案中，所述 RNAi 分子被修饰以增强其稳定性。

10 在一些实施方案中，所述 RNAi 分子是小干扰 RNA (siRNA)、短发夹 RNA (shRNA) 或微小 RNA (miRNA)。

本文所用的术语“小干扰 RNA (siRNA)”是指一种 RNA 分子，优选双链分子，具有约 10~50 个核苷酸的长度，优选约 15~25 个核苷酸的长度，更优选约 17、18、19、20、21、22、23、24 或 25 个核苷酸的长度，所述链任选地具有包括例如 1、2 或 3 个突出的核苷酸（或核苷酸类似物）的突出末端，其能够指导或介导 RNA 的降解。

本文所用的术语“短发夹 RNA (shRNA)”是指具有茎环结构的 RNA 分子，其包括互补序列的第一区域和第二区域，互补的程度以及区域的方向足以使碱基对出现在区域之间，第一区域和第二区域被环区域连接，环由环区域中的核苷酸（或核苷酸类似物）之间缺少碱基配对而产生。

20 本文所用的术语“微小 RNA (microRNA 或 miRNA)”是一种短的、天然存在的非编码的单链 RNA 分子，长度约为 16-26 个核苷酸 (nt)（例如约 16-29nt, 19-22nt, 20-25nt, 或 21-23nt），通常在体内参与调控基因表达。在真核细胞中，miRNA 基因通过 DNA 转录酶 II (DNA transcriptase II) 转录为“初产物” (pri-miRNA)，pri-miRNA 很快被一种核糖核酸酶 III (Drosha) 加工为 miRNA“前体” (pre-miRNA)，pre-miRNA 从细胞核转运到细胞质中，
25 然后经另一种核糖核酸酶 III (Dicer) 识别剪切为成熟的 miRNA。成熟的 miRNA 分子与一种或多种 mRNA 部分互补，并且调控蛋白的表达。已知的 miRNA 的序列可以通过公开的数据库获得，例如 miRBase 数据库 (www.mirbase.org)，其中提供了包括 miRNA 序列信息、功能注释、以及预测的基因靶标等信息。在本公开中，miRNA 还包括由人工合成的质粒在细胞中表达的具有类似天然 miRNA 的结构和功能的 RNA 分子，能像天然 miRNA 靶向对应的 mRNA，阻碍其翻译成蛋白质。

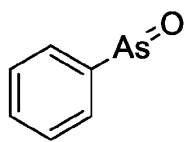
在一些实施方案中，所述 PI4KIII α 特异性抑制剂是反义核酸。

本文所用的术语“反义核酸”包括与靶序列完全互补的核苷酸以及具有一个或多个核苷酸错配的那些核苷酸，只要该反义核酸能与所述靶序列特异性杂交即可。例如，本文的反义核酸包括在至少 15 个连续核苷酸的长度上具有至少 70%或更高，优选 80%或更高，更优选 90%或更高，甚至更优选 95%或更高同源性的多核苷酸。由于形成杂交体，靶基因转录和/或靶 mRNA 翻译减少或被阻断。。

在一些实施方案中，所述 PI4KIII α 抑制剂是小分子化合物。

本文所用的术语“小分子化合物”是指一种分子量小于 3000、2500、2000、1500、1000 或 500 道尔顿的有机化合物，该有机化合物可以是天然的或者是化学合成的。

本文中使用的术语“氧化苯砷”（PAO）是指具体化学结构如下的小分子化合物：



10

本文中所述的术语“取代”，当指化学基团时，指所述化学基团的一个或多个氢原子被去除并且被取代基取代。

本文中所述的术语“取代基”具有本领域公知的通常含义，指共价连接至或者在适合的情况下耦合至母体基团的化学部分。

15 本文中使用的术语“C_n-C_m”表示碳原子数的范围，其中 n 和 m 是整数并且碳原子数的范围包括端点（即 n 和 m）和其间的各整数点。例如，C₁-C₆ 表示 1 至 6 个碳原子的范围，包括 1 个碳原子、2 个碳原子、3 个碳原子、4 个碳原子、5 个碳原子和 6 个碳原子。

本文中使用的术语“烷基”，无论是作为其他术语的一部分还是单独使用，指饱和的烃基基团，其可以是直链的或支链的。术语“C_n-C_m 烷基”指具有 n 至 m 个碳原子的烷基。在某些实施方案中，烷基基团含有 1 至 12、1 至 8、1 至 6、1 至 4、1 至 3 或 1 至 2 个碳原子。烷基基团的示例包括但不限于化学基团如甲基、乙基、n-丙基、异丙基、n-丁基、叔丁基、异丁基、仲丁基、2-甲基-1-丁基、n-戊基、3-戊基、n-己基、1,2,2-三甲基丙基等。

本文中使用的术语“烯基”，无论是作为其他术语的一部分还是单独使用，指不饱和的烃基基团，其可以是直链的或支链的，具有至少一个碳-碳双键。在某些实施方案中，烯基基团含有 2 至 12、2 至 10、2 至 8、2 至 6、2 至 5、2 至 4 或 2 至 3 个碳原子。在某些实施方案中，烯基基团还能有 1 至 6、1 至 5、1 至 4、1 至 3、1 至 2 或 1 个碳碳双键。烯基基团的示例包括但不限于化学基团如乙烯基、n-丙烯基、异丙烯基、n-丁烯基、仲丁烯基等。

本文中使用的术语“炔基”，无论是作为其他术语的一部分还是单独使用，指不饱和的炔基基团，其可以是直链的或支链的，具有至少一个碳-碳三键。在某些实施方案中，炔基基

团含有 2 至 12、2 至 10、2 至 8、2 至 6、2 至 5、2 至 4 或 2 至 3 个碳原子。在某些实施方案中，炔基基团还能有 1 至 6、1 至 5、1 至 4、1 至 3、1 至 2 或 1 个碳碳三键。炔基基团的示例包括但不限于化学基团如乙炔基、丙炔基、丁炔基等。

本文中使用的术语“环烷基”指至少由 3 个原子组成的环系烷基。术语“n-m 元环烷基”指具有 n 至 m 个形成环的成员的环烷基。此外，该环还可以具有一个或多个双键，但不具有完全共轭的系统。在某些实施方案中，环烷基具有 3 至 8、3 至 6 或 4 至 6 个形成环的碳原子。环烷基的示例包括但不限于环丙烷、环丁烷、环戊基等。

本文中使用的术语“杂环基”指在环系中的至少一个原子是杂原子而其余环原子是碳原子的环基。术语“n-m 元杂环基”指具有 n 至 m 个形成环的成员的杂环基。本文中使用的术语“杂环基”包括杂芳基和杂环烷基。此外，该环还可以具有一个或多个双键。在某些实施方案中，杂环基是饱和的杂环烷基。杂原子的示例包括但不限于氧、硫、氮、磷等。

本文中使用的术语“杂环烷基”指在环系中的至少一个原子是杂原子而其余环原子是碳原子的环烷基。术语“n-m 元杂环烷基”指具有 n 至 m 个形成环的成员的杂环烷基。此外，该环还可以具有一个或多个双键，但不具有完全共轭的系统。在某些实施方案中，杂环烷基是饱和的杂环烷基。杂原子的示例包括但不限于氧、硫、氮、磷等。在某些实施方案中，杂环烷基具有 3 至 8、3 至 6 或 4 至 6 个形成环的碳原子。杂环烷基的示例包括但不限于氮杂环丁烷、氮丙啶、吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基、硫代吗啉、高哌嗪等。

本文中使用的术语“芳基”或“芳香基”，无论是作为其他术语的一部分还是单独使用，指在形成环的碳原子之间具有交替的双键和单键的单-或多-碳环环系基团。术语“C_n-C_m 芳基”指具有 n 至 m 个形成环的碳原子的芳基。在某些实施方案中，芳基环系在一个或多个环中具有 6 至 12、6 至 10 或 6 至 8 个碳原子。在某些实施方案中，芳基环系具有稠合在一起的 2 个或多个环。芳基基团的示例包括但不限于化学基团如苯基、萘基、四氢萘基、茚满基、茚基等。

本文中使用的术语“杂芳基”指其中在芳环中的至少一个环原子是杂原子并且其余的环原子是碳原子的芳基基团。术语“n-m 元杂芳基”指具有 n 至 m 个形成环的成员的杂芳基。杂原子的示例包括但不限于氧、硫、氮、磷等。在某些实施方案中，杂芳基可以具有 5 至 10、5 至 8 或 5 至 6 个形成环的成员。在某些实施方案中，杂芳基是 5 元或 6 元杂芳基。杂芳基的示例包括但不限于呋喃基、噻吩基、吡啶基、喹啉基、吡咯基、N-低级烷基吡咯基、吡啶基-N-氧化物、嘧啶基、吡嗪基、咪唑基、吡唑基等。

本文中使用的术语“烷氧基”，无论是作为其他术语的一部分还是单独使用，指式“-O-烷基”所示的基团。术语“C_n-C_m 烷氧基”指烷氧基的烷基部分具有 n 至 m 个碳原子。在某些实

施方案中，烷基部分具有 1 至 6、1 至 4 或 1 至 3 个碳原子。烷氧基基团的示例包括但不限于化学基团如甲氧基、乙氧基、丙氧基（例如 n-丙氧基和异丙氧基）、t-丁氧基等。

本文中使用的术语“卤代烷基”，无论是作为其他术语的一部分还是单独使用，指式“-烷基-X”所示的基团，其中 X 为卤素，选自氟、氯、溴和碘的原子。术语“C_n-C_m 卤代烷基”指
5 卤代烷基的烷基部分具有 n 至 m 个碳原子。在某些实施方案中，烷基部分具有 1 至 6、1 至 4 或 1 至 3 个碳原子。卤代烷基基团的示例包括但不限于化学基团如卤代甲基、卤代乙基、卤代丙基（例如 n-卤代丙基和异卤代丙基）、t-卤代丁基等。

本文中使用的术语“n 元”，其中 n 是整数，其通常与环系一起使用以描述环系中形成环的原子数。例如，哌啶基为 6 元杂环烷基环的一个示例，吡唑基为 5 元杂芳基环的一个示例，
10 吡啶基为 6 元杂芳基环的一个示例而 1,2,3,4-四氢-萘为 10 元芳基的一个示例。本文中使用的术语“n-m 元”通常与环系一起使用以描述环系中形成环的成員的数量，其中 n 和 m 是整数并且形成环的成員的范围包括端点（即 n 和 m）和其间的各整数点。例如，3-8 元表示 3 至 8 个形成环的成員的范围，包括 3 个成員、4 个成員、5 个成員、6 个成員、7 个成員和 8 个成員。

15 本文中使用的术语“卤素”指选自氟、氯、溴和碘的原子。

本文中使用的术语“氰基”指式“-CN”所示的基团。

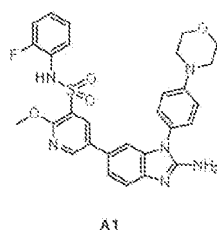
本文中使用的术语“羟基”指式“-OH”所示的基团。

本文中使用的术语“硝基”指式“-NO₂”所示的基团。

本文中使用的术语“氨基”指式“-NH₂”所示的基团。

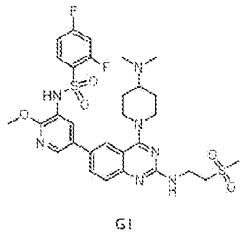
20 本文中使用的术语“氨基甲酰基”指式“-HNCONH₂”所示的基团。

本文中使用的术语“A1”和“G1”均为 PI4KIII α 蛋白的小分子化合物抑制剂，具有较类似的结构。其中，A1 的化合结构式为：



5-(2-氨基-1-(4-(4-吗啉基)苯基)-1H-苯并咪唑-6-基)-N-(2-氟代苯基)-2-甲氧基-3-吡啶磺酰
25 胺

G1 的化学结构式为：



(aS)-5-(2-氨基-4-氧代-3-(2-(三氟甲基)苯基)-3,4-二氢喹啉-6-基)-N-(2,4-二氟代苯基)-2-甲氧基吡啶-3-磺酰胺。

放射性射线照射导致的细胞组织损伤

5 放射治疗是治疗恶性肿瘤的主要手段之一，是其主要原理是利用高能射线破坏癌细胞的染色体，从而使癌症细胞（尤其是正在生长分裂的细胞）坏死，从而达到抑制肿瘤发展的结果。放射线包括放射性同位素产生的 α 、 β 、 γ 射线和各类 x 射线治疗机或加速器产生的 x 射线、电子线、质子束及其他粒子束等。70% 的癌症患者在治疗过程中需要用放射治疗，40% 的癌症可以用放射治疗根治，因此放射治疗是一些肿瘤类型的首选以及主要的治疗手段，如

10 口腔部癌、鼻咽癌、中期的食管癌、不能手术的肺癌、皮肤癌、早期的淋巴瘤。神经系统肿瘤大部分需手术后进行放射治疗。对于放射高度敏感的肿瘤如恶性淋巴瘤、睾丸精原细胞瘤、肾母细胞瘤、神经母细胞瘤、髓母细胞瘤、小细胞肺癌、晚期肺癌、食管癌等类型。

本文中的“放射性射线”包括放射性同位素产生的 α 、 β 、 γ 射线、各类 x 射线治疗机或加速器产生的 x 射线、电子线、质子束或其他粒子束等。

15 本文中的“放射性射线照射导致的细胞组织损伤”是指放射性射线导致所照射部位的正常细胞、组织和器官的结构和功能改变例如正常细胞的损伤或坏死，放射性射线照射导致的细胞组织损伤的症状表现为皮肤损伤、呕吐、脱发、头痛、发热、咳嗽、吞咽困难、食欲降低、口腔变化(干燥)、腹泻、组织坏死、外周血象下降等，例如 X 射线照射头颈部位所引起的唾液腺损伤所致的唾液分泌减少，口腔干燥，粘膜炎，以及 X 射线照引起的白细胞下降等。

细胞内蛋白错误折叠相关疾病

20 本文所用的术语“细胞内蛋白错误折叠相关疾病”是指由胞浆内非正常折叠的蛋白聚集所成为标志性特征的疾病，也被诊断为蛋白聚集（aggregation, accumulation）或蛋白错误折叠（misfolding）疾病。此外，术语“细胞内蛋白错误折叠相关疾病”也包括一些细胞内包涵体病变，比如蛋白质包涵体积累病，这一类包涵体主要由一种因折叠错误而聚集的核心蛋白，

25 外附各种参与响应非折叠蛋白的应激蛋白。

细胞内蛋白错误折叠相关疾病包括但不限于帕金森氏病（PD）、路易体痴呆症（LBD）、多系统萎缩症（MSA）、包涵体肌炎（IBM）、额颞痴呆（FTD）、亨廷顿疾病（HD）、多聚谷氨酰胺病（PolyQ）、肌萎缩性侧索硬化症（ALS）、朊病毒疾病。

溶酶体贮积病

本文所用的术语“溶酶体贮积病”是指因各种原因导致一些内源或外源的物质在溶酶体内积累引起的疾病，包括但不限于因溶酶体内的酶活性不足、激活蛋白、转运蛋白或溶酶体蛋白加工校正酶的缺乏而引起溶酶体功能缺陷，造成次级溶酶体内相应底物不能被消化，

5 底物积蓄，代谢障碍，形成贮积性疾病等。

溶酶体贮积病包括但不限于鞘脂类代谢障碍、黏多糖病、糖原贮存病、糖蛋白贮积病、脂类储存疾病、翻译后修饰缺陷症、内在膜蛋白缺失失调症、神经元蜡样质脂褐质沉积病、或溶酶体相关细胞器紊乱症。其中，鞘脂类代谢障碍包括但不限于法布雷病，代谢障碍皮肤病（Farbe 病），戈谢病 I、II、III 型及产前死亡型，GM1 神经节苷脂沉积症 I、II、III 型，

10 GM2 神经节苷脂沉积症（家族性黑蒙性白痴），GM2 神经节苷脂沉积症，类球状脑白质营养不良（克拉伯病），异染性脑白质营养不良，尼曼匹克症 A 和 B 型；黏多糖病包括但不限于贺勒-施艾氏症候群和施艾氏症（ML I）、亨特综合症（MPS II）、圣菲利柏氏症 A（MPS IIIA）、圣菲利柏氏症 B（MPS IIIB）、圣菲利柏氏症 C（MPS IIIC）、圣菲利柏氏症 D（MPS IIID）、离心性骨软骨发育不良综合症（MPS IVA）、离心性骨软骨发育不良综合症（MPS IVB）、

15 粘多糖病第六型（拉米氏症，MPS VI）、Sly 病（MPS VII）、MPS IX；糖原贮存病包括但不限于罕见病庞贝氏症（GSD II）；糖蛋白贮积病包括但不限于 α -甘露糖苷贮积病、 β -甘露糖苷贮积病、岩藻糖苷贮积症、门冬酰葡萄糖胺尿症、辛德勒疾病 I 型（婴儿期发病神经轴索营养不良症）、辛德勒疾病 II 型（Kanzaki 疾病）、辛德勒疾病 III 型（中等严重度）、唾液酸贮积症 I 型（樱桃红点状肌阵挛综合征）、唾液酸贮积症 II 型（粘多糖症 I）、半乳糖涎

20 酸贮积症；脂类储存疾病包括但不限于酸脂酶缺乏诸如 Wolman 病和胆固醇酯沉积病；翻译后修饰缺陷症包括但不限于多发性硫酸脂酶缺乏症、粘脂累积病 II α / β （I-细胞症）、粘脂累积病 II α / β （假赫勒氏综合症）、粘脂累积病 III γ 型（假赫勒氏综合症变体）；内在膜蛋白缺失失调症包括但不限于胱氨酸过多症、Danon 病、肌阵挛肾衰竭综合症、唾液酸贮积症诸如 ISSD、Salla 症和中度严重 Salla 症、尼曼-皮克症 C1 和 C2 型、粘脂累积病 IV 型；神经元蜡

25 样质脂褐质沉积病包括但不限于蜡样脂质褐质沉积病 1 型（Haltia-Santavuori 症和 INCL）、神经元蜡样质脂褐质沉积病 2 型（Jansky-Bielschowsky 症）、蜡样脂质褐质沉积病 3 型（Batten-Spielmeyer-Sjogren 症）、蜡样脂质褐质沉积病 4 型（Parry 病和 Kufs A 和 B 类）、蜡样脂质褐质沉积病 5 型（晚期婴儿芬兰异型）、蜡样脂质褐质沉积病 6 型（Lake-Cavanagh 或印第安异型）、蜡样脂质褐质沉积病 7 型（土耳其异型）、蜡样脂质褐质沉积病 8（北方

30 癫痫、癫痫智能障碍）、蜡样脂质褐质沉积病 9、蜡样脂质褐质沉积病 10、蜡样脂质褐质沉积病 11、蜡样脂质褐质沉积病 12、蜡样脂质褐质沉积病 13、蜡样脂质褐质沉积病 14；溶酶

体相关细胞器紊乱症包括但不限于 Hermansky-Pudlak 病 1 型、Hermansky-Pudlak 病 2 型、Hermansky-Pudlak 病 3 型、Hermansky-Pudlak 病 4 型、Hermansky-Pudlak 病 5 型、Hermansky-Pudlak 病 6 型、Hermansky-Pudlak 病 7 型、Hermansky-Pudlak 病 8 型、Hermansky-Pudlak 病 9 型、Griscelli 综合症 1 (Elejalde 综合症)、Griscelli 综合症 2、
5 Chédiak-Higashi 病。

药物施用和医药用途

本文中使用的术语“药学上可接受的”指在合理的医学判断范围内适宜用于与人和动物的组织接触而无过度的毒性、刺激、过敏反应或者其他问题或并发症，具有合理的收益/风险比的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。在某些实施方案中，药学上可接受的化合物、材料、组合物和/或剂型指由管理机构批准（如美国食品药品监督管理局、中国食品药品监督管理局或欧洲药品局）或者列于普遍认可的药典中（如美国药典、中国药典或欧洲药典）的用于动物（更特别地用于人）的那些。

本文中所用的术语“客体”可以包括人类和非人动物。非人动物包括所有的脊椎动物，例如哺乳动物和非哺乳动物。“客体”也可以是家畜动物（例如，牛、猪、羊、鸡、兔或马），
15 或啮齿类动物（例如，大鼠或小鼠），或灵长类动物（例如，大猩猩或猴子），或家养动物（例如，狗或猫）。“客体”可以是雄性或者雌性，也可以是不同年龄阶段。人类“客体”可以是高加索人、非洲人、亚洲人、闪族人，或其他种族，或不同种族的杂合体。人类“客体”可以是老年、成年、青少年、儿童或者婴儿。

在一些实施方案中，本文所述的客体是人或者非人灵长类动物。

本文中公开的氘代氧化苯砷可通过本领域公知的给药途径进行施用，例如注射给药（如，皮下注射、腹腔注射、静脉注射（包括静脉滴注或静脉输注）、肌肉注射或皮内注射）或非注射给药（如，口服给药、鼻腔给药、舌下给药、直肠给药或外用给药）。在一些实施方案中，本文所述的氘代氧化苯砷通过口服、皮下、肌肉或静脉施用。在一些实施方案中，本文所述的氘代氧化苯砷通过口服施用。

本文中使用的术语“治疗有效量”是指，可以缓解或者消除客体的疾病或症状，或者可以预防性地抑制或防止疾病或症状发生的药物的量。治疗有效量可以是将客体的一种或多种疾病或症状缓解到一定程度的药物的量；可以将那些跟疾病或症状成因相关的一种或多种生理或生物化学参数部分或完全恢复到正常的药物的量；和/或可以降低疾病或症状发生的可能性的药物的量。在一些实施方案中，本文中使用的术语“治疗有效量”是指，可以缓解或者消除
30 客体的细胞内蛋白错误折叠相关疾病或溶酶体贮积病的药物的量。

本文中提供的氩代氧化苯砷的治疗有效剂量依赖于本领域公知的多种因素，例如体重、年龄、过往病史、目前正在接受的治疗、对象的健康状况和药物相互作用的强度、过敏、超敏和副作用，以及给药途径和疾病发展的程度。本领域熟练人员（例如医生或兽医）可根据这些或其它条件或要求相应降低或升高剂量。

5 在一些实施方案中，治疗进一步包括向需要其的客体施用第二试剂。

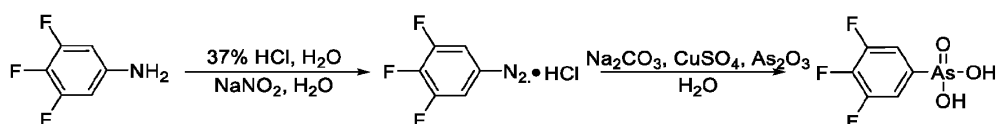
在一些实施方案中，所述第二试剂是用于治疗细胞内蛋白错误折叠相关疾病的试剂，包括但不限于左旋多巴、力鲁唑。

在一些实施方案中，所述氟代或氩代氧化苯砷在所述第二试剂之前、之后或同时施用。

实施例 1. 卤代化合物的合成及其物理特性

10 1. 卤代 PAO 化合物的合成和理化性质

1.1 3,4,5-三氟-PAO（简称 F3PAO）的制备



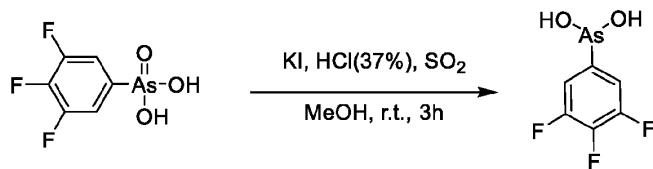
往 100 mL 带有磁力搅拌子的圆底瓶中加入 3,4,5-三氟苯胺（18 mmol， 1.0 eq.）并加水
15 5 mL，降温至 0–5 °C，并于该温度下，缓慢加入 37% 的盐酸水溶液（4.1 mL，41.5 mmol），加入水 10 mL 稀释，继续搅拌，反应 30 分钟，再向该反应液中缓慢加入 NaNO₂ 水溶液（1.3 g，18.9 mmol，10 mL H₂O），控制反应温度在 0–5 °C，30-40 分钟内滴加完，溶液变黄色，继续低温下搅拌反应 2 小时。

往 100 mL 圆底反应瓶中加入 Na₂CO₃（7.25 g，68.4 mmol，3.8 eq.），As₂O₃（3.6 g，18.0
20 mmol，1.0 eq.），CuSO₄·5H₂O（0.27 g，1.08 mmol，0.06 eq.），H₂O（25 mL），95 °C 反应 45 分钟，溶液为淡蓝色悬浮液，降温至 0–5 °C。

向第 2 步反应液中缓慢滴加第 1 步制备好的偶氮盐酸盐，控制反应体系温度低于 5 °C，在滴加的过程中产生泡沫，加入少量丙酮除泡沫，待泡沫消失后继续滴加。1 小时内滴加完毕，滴加完毕后自然升温，过夜搅拌。

25 硅藻土过滤，滤饼用冰水（8 mL×2）淋洗。水相于 50 °C 减压浓缩至 15 mL。于冰水浴中滴加入 2.8 mL 6N 的 HCl 调节 pH 至 8，出现少量黄褐色固体，抽滤，2 mL 冰水洗涤，弃去固体。滤液滴加入 8 mL 6N 的 HCl 调节 pH 至 7，出现白色固体。抽滤，并用 2 mL 冰水洗涤，收集固体。所得滤液浓缩至 11 mL，加入 6N HCl 1.5 mL 调节 pH 至 3，出现大量固体，抽滤，收集固体。母液继续滴加 6N HCl 3 mL 调节 pH 至 1 体系继续出现灰白固体，抽滤，

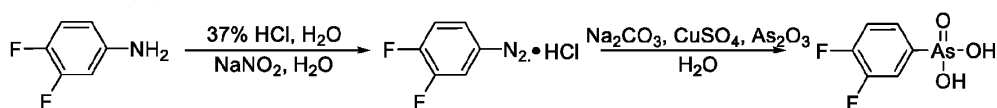
收集固体 3,4,5-三氟苯砷酸。该固体该产物中含产物和有无机盐，未经纯化，直接用于下一步反应。



往 25 mL 三颈瓶中依次加入 3,4,5-三氟苯砷酸 (4.9 mmol, 1.0 eq.)，KI (18.7 mg, 0.11 mmol, 0.023 eq.)，37% HCl (1.8 mL, 22.5 mmol, 4.6 eq.)，MeOH (7 mL)，室温搅拌 5–10 分钟，持续通入 SO₂，反应 3 小时，TLC 监测反应完全。

反应液抽滤，并用 MeOH (2 mL × 2) 洗涤。液体于冰水浴中滴加入质量分数为 17% 的 NaOH 溶液 7 mL，调节 pH 至 7，此时瓶壁出现黄色油状物。用乙酸乙酯 (25 mL × 2) 萃取，合并有机相，并用无水 NaSO₄ 干燥，过滤，低温 (20–28°C) 旋干。固体干法上样，硅胶装柱 7 cm，以 EA 为洗脱液过柱，得到约 500 mg 液体。取 500 mg 液体于 25 mL 圆底烧瓶中加入约 1 mL 的乙醚，用刮刀进行剧烈搅动得到白色固体 3,4,5-三氟 PAO 350 mg。¹H NMR (δ, DMSO-d₆): 7.47 (t, 2H), 7.02 (s, 2H), MS ES[−] (m/z): 239.0 [(M-H)[−]].

1.2 3,4-二氟-PAO (简称 F2oPAO) 的制备



往 100 mL 带有磁力搅拌子的圆底瓶中加入 3,4-二氟苯胺 (18 mmol, 1.0 eq.) 并加水 5 mL，降温至 0–5 °C，并于该温度下，缓慢加入 37% 的盐酸水溶液 (4.1 mL, 41.5 mmol)，加入水 10 mL 稀释，继续搅拌，反应 30 分钟。再向该反应液中缓慢加入 NaNO₂ 水溶液 (1.3 g, 18.9 mmol, 10 mL H₂O)，控制反应温度在 0–5 °C，30–40 分钟内滴加完，溶液变黄色，继续低温下搅拌反应 2 小时。

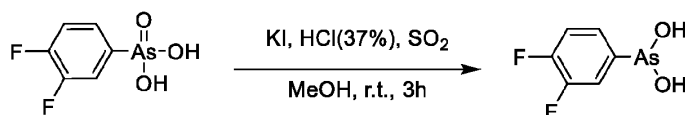
往 100 mL 圆底反应瓶中加入 Na₂CO₃ (7.25 g, 68.4 mmol, 3.8 eq.)，As₂O₃ (3.6 g, 18.0 mmol, 1.0 eq.)，CuSO₄·5H₂O (0.27 g, 1.08 mmol, 0.06 eq.)，H₂O (25 mL)，95 °C 反应 45 分钟，溶液为蓝白色悬浮液，降温至 0–5 °C。

向第 2 步反应液中缓慢滴加第 1 步制备好的偶氮盐酸盐，控制反应体系温度低于 5 °C，在滴加的过程中产生泡沫，加入少量丙酮除泡沫，待泡沫消失后继续滴加。1 小时内滴加完毕，滴加完毕后自然升温，过夜搅拌。

反应液用硅藻土过滤，滤饼用冰水 (5 mL × 2) 淋洗。水相于 50 °C 减压浓缩至 15 mL。于冰水浴中滴加入 1.4 mL 6N 的 HCl 调节 pH 至 8，出现少量黄褐色固体，抽滤，2 mL 冰水洗涤，弃去固体。滤液滴加入 3 mL 6N 的 HCl 调节 pH 至 7，出现白色固体。抽滤，并用 2 mL

冰水洗涤，收集固体。所得滤液浓缩至 11 mL，滴加入 6N HCl 3 mL 调节 pH 至 3，出现大量固体，抽滤，收集固体。母液继续滴加 6N HCl 1 mL 调节 pH 至 1 体系继续出现白色固体，抽滤，母液洗涤 2-3 次，收集固体。共得固体 3,4-二氟苯砷酸 5.06 g，该固体中含有产物和无机盐，不经纯化，直接用于下一步反应。

5

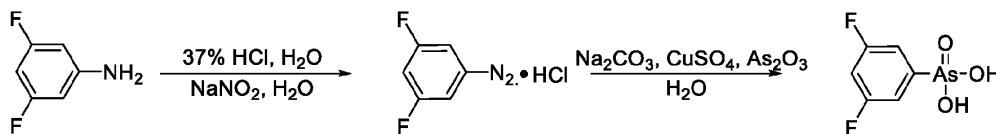


往 25mL 三颈瓶中依次加入 3,4-二氟苯砷酸 (6.4 mmol, 1.0 eq.)，KI (24.9 mg, 0.15 mmol, 0.023 eq.)，37% HCl (2 mL, 29.5mmol, 4.6 eq.)，MeOH (8.6 mL)，室温搅拌 5 - 10 分钟，持续通入 SO₂，反应 3 小时，TLC 监测。

10 反应液抽滤，并用 MeOH (2 mL × 2) 洗涤。液体于冰水浴中加入质量分数为 17% 的 NaOH 溶液 8.5 mL，调节 pH 至 7，此时瓶壁出现黄色液体。用乙酸乙酯 (30 mL × 2) 萃取，合并有机相，并用无水 Na₂SO₄ 干燥，过滤，低温 (20-28℃) 旋干。柱层析纯化，得到约 200 mg 液体。取 200 mg 液体于 25 mL 圆底烧瓶中加入 1 mL 的乙醚扰动得到白色固体 200 mg，即为产品 3,4-二氟 PAO。¹H NMR (δ, DMSO-d₆): 7.47 (t, 1H), 7.45-7.43 (m, 2H), 6.89 (s, 2H)。MS ES⁻ (m/z): 221.0 [(M-H)⁻].

15

1.3 3,5-二氟-PAO (简称 F2mPAO) 的制备



往 100 mL 带有磁力搅拌子的圆底瓶中加入 3,5-二氟苯胺 (18 mmol, 1.0 eq.) 并加水 5 mL，降温至 0 - 5 °C，并于该温度下，缓慢加入 37% 的盐酸水溶液 (4.1 mL, 41.5 mmol)，加入水 10 mL 稀释，并加入 4.8 mL 丙酮，继续搅拌，反应 30 分钟。再向该反应液中缓慢加入 NaNO₂ 水溶液 (1.3 g, 18.9 mmol, 10 mL H₂O)，控制反应温度在 0 - 5 °C，30-40 分钟内滴加完，补加冰水 5 mL，溶液变黄白色，继续低温下搅拌反应 2 小时。

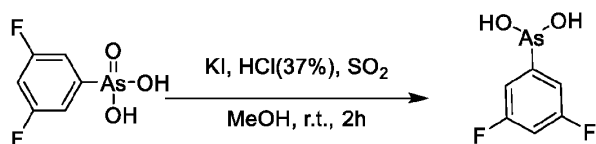
20

往 100 mL 圆底反应瓶中加入 Na₂CO₃ (7.25 g, 68.4 mmol, 3.8 eq.)，As₂O₃ (3.6 g, 18.0 mmol, 1.0 eq.)，CuSO₄·5H₂O (0.27 g, 1.08 mmol, 0.06 eq.)，H₂O (25 mL)，95 °C 反应 45 分钟，溶液为蓝白色悬浮液，降温至 0 - 5 °C。

25

向第 2 步反应液中缓慢滴加第 1 步制备好的偶氮盐酸盐，控制反应体系温度低于 5 °C，在滴加的过程中产生泡沫，待泡沫消失后继续滴加。1 小时内滴加完毕，滴加完毕后自然升温，过夜搅拌。

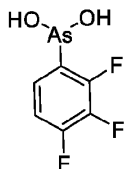
反应液硅藻土过滤，滤饼用冰水（5 mL × 2）淋洗。水相于 50°C 减压浓缩至 25 mL。于冰水浴中加入 7.6 mL 6N 的 HCl 调节 pH 至 7-8，出现灰色固体。抽滤，并用 2 mL 冰水洗涤，弃去固体。所得滤液浓缩至 11 mL，体系出现黄白色固体，加入 6N 盐酸 3 mL 调节 pH 至 3，抽滤，所得固体用 3 mL 冰水洗涤，得固体 3,5-二氟苯肿酸 4.4g。该固体含有产物和无机盐，直接用于下一步反应。



往 25 mL 三颈瓶中依次加入 3,5-二氟苯肿酸（5.2 mmol, 1.0 eq.），KI（20 mg, 0.12 mmol, 0.023 eq.），37% HCl（2 mL, 24 mmol, 4.6 eq.），MeOH（7 mL），室温搅拌 5 – 10 min，持续通入 SO₂，溶液由橙黄色变为黄白色，反应 2 小时，TLC 监测反应完全。

反应液抽滤，并用 MeOH（2 mL × 2）洗涤。液体于冰水浴中滴加入质量分数为 17% 的 NaOH 溶液 6.7 mL，调节 pH 至 7，此时瓶壁出现黄色油状液体。用乙酸乙酯（25 mL × 2）萃取，合并有机相，并用无水 NaSO₄ 干燥，过滤，低温（20-28°C）旋干。取固体 400 mg 用乙醇 4 mL 于 50-60°C 重结晶，得到 240 mg 固体 3,5-二氟 PAO，产率约 20.8%。¹H NMR (δ, DMSO-d₆): 7.28-7.18 (m, 3H), 6.98 (s, 2H). MS ES⁻ (m/z): 221.0 [(M-H)⁻].

1.4 2,3,4-三氟-PAO 的制备



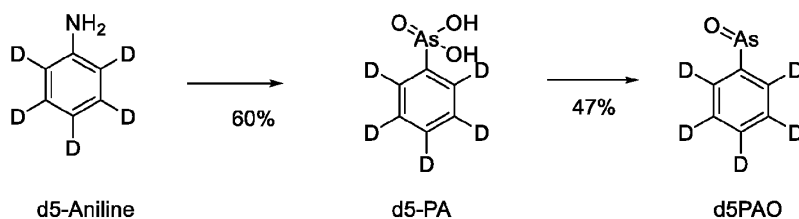
2,3,4-三氟-PAO 的制备采用类似于 3,4,5-三氟-PAO 的制备方法，¹H NMR (δ, DMSO-d₆): 7.52-7.46 (m, 1H), 7.38-7.32 (m, 1H), 7.07 (s, 2H).

实施例 2. 氘代化合物和 PAO 的合成及其物理特性

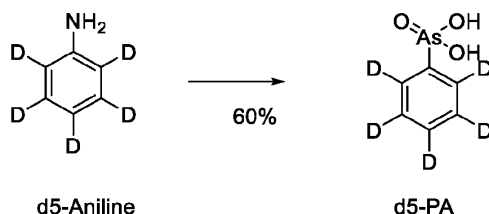
1. d5PAO（五氘代氧化苯砷）的合成及其物理特性

1.2 d5PAO 合成

d5PAO 的合成线路如下：



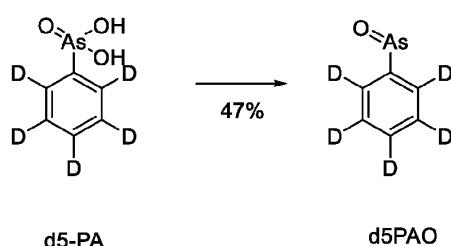
第一步：d5-PA 的合成方法：



往一个三口瓶中加入 91.35 mL 水，18.27 g 的五氘代苯胺（d5-Aniline），搅拌、降
 5 温至 0°C~10°C，滴加 37.45 mL 浓盐酸。滴加完毕盐酸后，滴加亚硝酸钠水溶液（13.43 g
 固体亚硝酸钠溶于 36.5 mL 水中），保持温度不超过 5°C；滴加完毕，保温 2-3 小时左
 右。完成重氮盐的制备。

另一容器加入 274 mL 纯化水，69.06 g 碳酸钠，36.82 g 三氧化二砷，2.83 g 五水硫
 酸铜（CuSO₄·5H₂O），加热至 90~100°C 并保温搅拌 30 分钟，后降温至 5~15°C。分批
 10 缓慢加入上述已制备好的重氮盐，控温低于 15°C。搅拌 2~3 小时，随后自然升至室温搅
 拌过夜。过滤，滤饼用水淋洗。合并滤液，缓慢加入浓盐酸调节体系 pH 值为 3.0，有少
 量棕色絮状物析出。抽滤。滤液用 100 mL 乙酸乙酯洗涤三次，将水相于 50~60°C 减压
 浓缩至剩余约 170 mL 左右，析出大量白色固体。抽滤，滤饼用冷水淋洗，抽干，直接
 将固体于鼓风烘箱 50 度烘料 18 小时，得到 35 克类白色固体 d5-PA，收率：90.83 %，MS
 15 ES+ (m/z): 208.0 [(M+H)⁺]。

第二步：d5PAO（或 d5-PAO）的合成方法：



往一个三口瓶中加入 400 mL 纯化水，25 g d5-PA，75.4 g 亚硫酸氢钠，0.32 g 碘化
 钾，125 mL 甲醇开启搅拌；于 30~40°C 反应过夜，原料基本反应完全，停止反应。将此
 20 溶液控制温度在 30°C 以下，用浓盐酸调 pH 值为 7.0。用乙酸乙酯萃取 4 次，合并萃取
 后有机相。将其于 35~45°C 浓缩至干，得到 20 g 白色固体湿品。将固体用 240 mL 叔丁
 基甲基醚升温回流 1 小时，降温，抽滤，滤饼用冷的 MTBE 洗涤。滤饼在 50°C 下用鼓
 风烘箱干燥过夜，得到 8.7g 白色固体 d5PAO，¹³C-NMR (δ, DMSO-d₆): 149.9, 129.6, 129.4,
 128.2, MS ES+ (m/z) : 173.99 [(M+H)⁺]。

1.3 d5PAO 理化性质

1.2.1 仪器

Agilent 1260 Prime 高效液相色谱仪，Mettler Toledo XS105 型天平（0.01 mg），KQ5200B 型超声仪（昆山市超声仪器有限公司），BR2000-GM 型可变速振荡器（VWR International），0.45 μm 滤膜（上海青阳生物科技有限公司）。

1.2.2 实验用药

d5PAO（纯度 97.9%），乙腈为色谱纯（国药集团化学试剂有限公司），盐酸、DMSO 均为分析纯（国药集团化学试剂有限公司）。

1.2.3 溶液配制

取 0.1 M 的盐酸溶液 2 mL，加入去离子水稀释到 20 mL，得到 0.01 M 的盐酸溶液，用精密 pH 试纸测定 pH2。

取 0.01 M 的盐酸溶液 2mL，加入去离子水稀释到 20 mL，得到 0.001 M 的盐酸溶液。

取 0.001 M 的盐酸溶液 2 mL，加入去离子水稀释到 20mL，得到 0.0001 M 的盐酸溶液。用精密 pH 试纸测定该溶液的 pH 为 4。

取 20 mL 去离子水，测定 pH 为 6。

取 7.5mg d5PAO，于离心管中，加入 1 mL DMSO，超声振荡，溶解。再用乙腈/水（1/1）混合液稀释到 10 mL，得到 0.75mg/mL 的 d5PAO 储备液。将 d5PAO 储备液稀释成 0.3mg/mL、0.15mg/mL、0.075 mg/mL、0.03 mg/mL、0.015 mg/mL 的不同 d5PAO 工作液。

1.2.4 色谱条件

液相色谱仪：安捷伦 1260 Infinity II Prime 超高效液相色谱系统。

色谱柱：ACQUITY UPLC® Peptide C18 130Å 2.1*100 mm ID.，1.7 μm（Waters）。

流动相 A：含 0.01% AA 和 2 mmol/L NH4OAc 的 Water: ACN（v: v, 95: 5）溶液。

流动相 B：含 0.01% AA 和 2 mmol/L NH4OAc 的 Water: ACN（v: v, 5: 95）溶液。

洗脱梯度：

时间（分钟）	流速（mL/分钟）	A（%）	B（%）
Initial	0.400	95	5
2.00	0.400	2	98
3.00	0.400	2	98
3.20	0.400	95	5
4.00	0.400	95	5

柱温：40 °C

进样量：4 μL

检测波长：254 nm

1.2.5 方法学考察

5 线性关系的考察

取 0.75mg/mL、0.3 mg/mL、0.15 mg/mL、0.075 mg/mL、0.03 mg/mL、0.015 mg/mL 的不同 d5PAO 溶液液；分别按照上述色谱条件进样测定，记录色谱图。以峰面积对进样浓度进行线性回归，得回归方程：

$y = 1647.7x + 0.9623, R^2 = 0.9999$

10 结果表明 d5PAO 进样浓度在 0.015~0.75mg·mL⁻¹ 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

1.2.6 平衡溶解度的测定

吸取不同 pH 缓冲液各 2 mL，分别置 3 mL 离心管中，加入过量的 d5PAO 药粉末至溶液中出现大量白色不溶性沉淀，超声 30 分钟，置恒温振荡器中，在 25°C 条件下振摇
15 24 h，再超声 30 分钟，0.45 μm 滤膜滤过，吸取续滤液，加水稀释 10 倍，按上述色谱条件进样测定，记录色谱图，计算 d5PAO 在不同 pH 缓冲液中溶解度分别为 5.36 mg/mL、5.39 mg/mL、5.98 mg/mL。

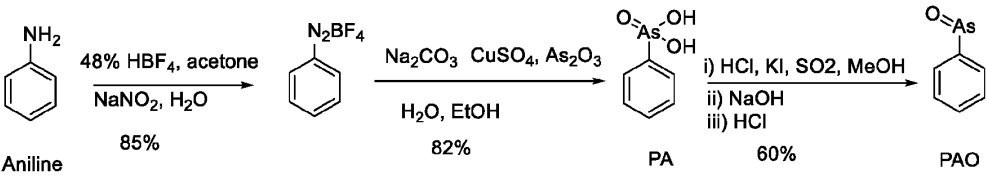
表 1. d5PAO 的溶解度

药物	pH	峰面积	对应溶解度 (mg/mL)
d5PAO	6	884.20	5.36
d5PAO	4	889.51	5.39
d5PAO	2	986.70	5.98

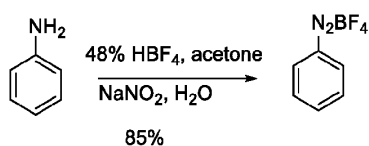
2. PAO 的合成及其物理特性

20 2.1 PAO 的合成

合成路线：

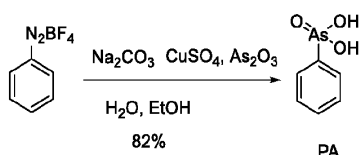


第一步：



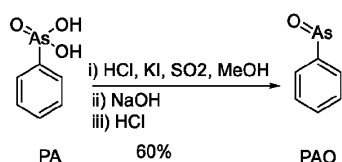
250 mL 单口瓶中，加入苯胺（10.0 g，107 mmol，1.0 eq.）及丙酮（20 mL）。冷却至-15 °C左右（高温会导致产物颜色较深），慢慢加入 48% HBF₄（30 mL，29.5 g，161 mmol，1.5 eq.）。将 NaNO₂（11.0 g，161 mmol，1.5 eq.）溶于 H₂O（20 mL）中，缓慢滴加至以上溶液中。加料完毕，先在-15 °C下保温 2 小时，然后在 0 °C下搅拌反应 1 小时左右。固体（白色）过滤，异丙醚（50 mL × 2）洗涤。产品真空干燥（温度 30 °C），称重：17.5 g，产率：85%，粉红色固体。直接用于下一步反应。

第二步：



250 mL 烧瓶中，加入 Na₂CO₃（21.2 g，200.6 mmol，3.85 eq.）、As₂O₃（11.3 g，57.3 mmol，1.1 eq.）、CuSO₄·5H₂O（800 mg，3.13 mmol，0.06 eq.）以及 H₂O（60 mL），悬浊液加热至 90 °C 左右，保持 20 分钟左右，使大部分固体溶解。冷却至 0 °C -15 °C 左右，分批缓慢加入偶氮苯氟硼酸盐（10.0 g，52.1 mmol，1.0 eq.）与 H₂O（60 mL）的悬浊液，加入少许丙酮以降低泡沫的集聚。加料完毕，混合物在室温下搅拌 12 小时左右。铺硅藻土，过滤，H₂O 洗（20 mL × 3），滤液如颜色太深，可加入活性炭脱色，过滤。向滤液加入浓盐酸（12 N，40 mL）中和，进一步调整反应液至酸性。滤液浓缩至混合物体积 50 mL 左右。固体过滤，用冷水洗一次；滤液浓缩，生成固体过滤，冷水洗一次。固体合并烘干，白色固体，称重：8.6 g，产率：82%。MS ES⁺ (*m/z*): 202.9 [(M+H)⁺].

第三步：



将苯砷酸（8.0 g，40 mmol，1.0 eq.）、甲醇（40 mL）、浓盐酸（15 mL）及催化量 KI（50 mg）混合物中通入 SO₂ 至饱和，室温下搅拌 2 小时。向混合物中加入 NaOH 溶

液（2N）至溶液透明。向其中加入浓盐酸中和。析出固体，过滤，白色固体。固体经水/乙醇（1/5）重结晶，干燥，称重：4.0 g，产率：60%。产品为白色粉状固体。¹H NMR (δ, CDCl₃): 7.41-7.62 (m, 3H), 7.75-7.78 (m, 2H). MS ES⁺ (m/z): 168.8 [(M+H)⁺].

2.2 PAO 的理化性质

5 PAO 的分子式为 C₆H₅AsO，分子量为 168.03.

2.2.1 仪器

Agilent 1260 Prime 高效液相色谱仪，Mettler Toledo XS105 型天平（0.01 mg），KQ5200B 型超声仪（昆山市超声仪器有限公司），BR2000-GM 型可变速振荡器（VWR International），0.45 μm 滤膜（上海青阳生物科技有限公司）。

10 2.2.2 实验用药

PAO（纯度 98%），乙腈为色谱纯（国药集团化学试剂有限公司），盐酸、DMSO 均为分析纯（国药集团化学试剂有限公司）。

2.2.3 溶液配制

15 取 0.1 M 的盐酸溶液 2 mL，加入去离子水稀释到 20 mL，得到 0.01 M 的盐酸溶液，用精密 pH 试纸测定 pH2。

取 0.01 M 的盐酸溶液 2mL，加入去离子水稀释到 20 mL，得到 0.001 M 的盐酸溶液。

取 0.001 M 的盐酸溶液 2 mL，加入去离子水稀释到 20 mL，得到 0.0001 M 的盐酸溶液。用精密 pH 试纸测定该溶液的 pH 为 4。

取 20 mL 去离子水，测定 pH 为 6。

20 取 7.5 mg PAO，于离心管中，加入 1 mL DMSO，超声振荡，溶解。再用乙腈/水（1/1）混合液稀释到 10mL，得到 0.75 mg/mL 的 PAO 储备液。将 PAO 储备液稀释成 0.3 mg/mL、0.15 mg/mL、0.075 mg/mL、0.03 mg/mL、0.015 mg/mL 的不同 PAO 工作液。

2.2.4 色谱条件

液相色谱仪：安捷伦 1260 Infinity II Prime 超高效液相色谱系统。

25 色谱柱：ACQUITY UPLC® Peptide C18 130Å 2.1*100 mm ID., 1.7 μm（Waters）。

流动相 A：含 0.01% AA 和 2 mmol/L NH₄OAc 的 Water: ACN（v: v, 95: 5）溶液。

流动相 B：含 0.01% AA 和 2 mmol/L NH₄OAc 的 Water: ACN（v: v, 5: 95）溶液。

洗脱梯度：

	时间（分钟）	流速（mL/分钟）	A（%）	B（%）
30	Initial	0.400	95	5
	2.00	0.400	2	98

3.00	0.400	2	98
3.20	0.400	95	5
4.00	0.400	95	5

柱温：40℃

5 进样量：4 μL

检测波长：254 nm

2.2.5 方法学考察

线性关系的考察

取 0.75 mg/mL、0.3 mg/mL、0.15 mg/mL、0.075 mg/mL、0.03 mg/mL、0.015 mg/mL 10 的不同 PAO 溶液液；分别按照上述色谱条件进样测定，记录色谱图。以峰面积对进样浓度进行线性回归，得回归方程：

$y = 1834.8x - 4.2355 \quad R^2=1$

结果表明 PAO 进样浓度在 0.015~0.75mg·mL⁻¹ 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.2.6 平衡溶解度的测定

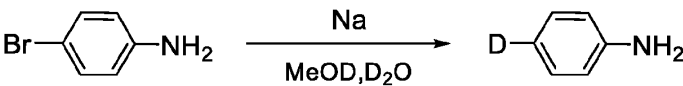
15 吸取不同 pH 缓冲液各 2 mL，分别置 3 mL 离心管中，加入过量的 PAO 药粉末至溶液中出现大量白色不溶性沉淀，超声 30 分钟，置恒温振荡器中，在 25℃条件下振摇 24 h，再超声 30 分钟，0.45 μm 滤膜滤过，吸取续滤液，加水稀释 10 倍，按上述色谱条件进样测定，记录色谱图，计算 PAO 在不同 pH 缓冲液中溶解度分别为 1.15 mg/mL、3.38 mg/mL、4.52 mg/mL。

20 表 2. PAO 的溶解度

药物	pH	峰面积	对应溶解度 (mg/mL)
PAO	6	207.25	1.15
PAO	4	616.40	3.38
PAO	2	824.35	4.52

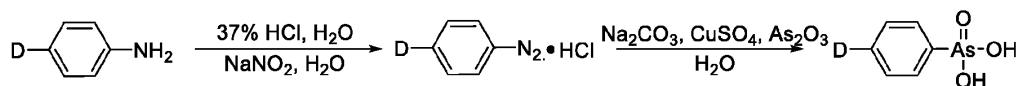
3. 氘代化合物 d1PAO、d2PAO 和 d3PAO 的合成和理化性质

3.1 d1PAO 的制备

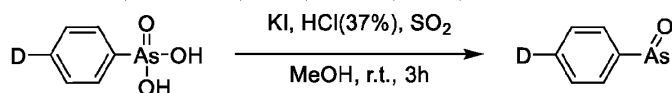


25 氮气条件下，将对溴苯胺（3.44g）溶于氘代甲醇（5 mL）中，回流 30 分钟，旋干，重复 3 次，旋干抽干待用。将 3 克金属钠分批加入到氘代甲醇（10 mL）中，待其反应完毕，缓慢加入重水（30 mL），制得 10%的氘氧化钠的重水溶液。氮气条件下，

将第一步的产品溶于氘代甲醇（5 mL），加入锌粉（6.5g）和制备好的 10%的氢氧化钠的重水溶液，加热回流 3 小时，点板监测对溴苯胺消失，冷却至室温，乙醚萃取，低温旋干，得到产品对氘苯胺。



- 5 往带有磁力搅拌子的圆底瓶中加入由上步得到的对氘苯胺（0.94 g）并加水 5 mL，降温至 0 – 5 °C，并于该温度下，缓慢加入 37%的盐酸水溶液（2 mL），加入水 5 mL 稀释，继续搅拌，反应 30 分钟。再向该反应液中缓慢加入 NaNO₂ 水溶液（724.5 mg，10.5 mmol，3 mL H₂O），控制反应温度在 0 – 5°C，30-40 分钟内滴加完，溶液呈棕黄色，继续低温下搅拌反应 2 小时。往另一个圆底反应瓶中加入 Na₂CO₃（4.0 g，38.0 mmol，10 3.8 eq.），As₂O₃（1.0 g，5.0 mmol，0.5 eq.），CuSO₄·5H₂O（150 mg，0.6 mmol，0.06 eq.），H₂O（13 mL），95°C反应 45 分钟，溶液为绿色溶液，降温至 0–5°C。向第 2 步反应液中缓慢滴加第 1 步制备好的偶氮盐酸盐，控制反应体系温度低于 5°C，在滴加的过程中产生泡沫，加入少量丙酮除泡沫，待泡沫消失后继续滴加，1 小时内滴加完毕，滴加完毕后自然升温，过夜搅拌。反应液通过硅藻土过滤，滤饼用冰水（2 mL × 2）淋洗。水 15 相于 50°C减压浓缩至 10 mL。于冰水浴中滴加入 4 mL 的 6N 的 HCl 调节 pH 至 7-8，出现少量黄褐色固体，抽滤，2 mL 冰水洗涤，弃去固体。滤液滴加入 2.5 mL 的 6N 的 HCl 调节 pH 至 2-3，出现大量气泡。该滤液减压浓缩，当体系出现大量固体时降温，抽滤，收集固体。所得滤液加入 6N HCl 调节 pH 至 1，旋蒸，当体系出现大量固体时降温抽滤。母液洗涤 2 次，收集固体。共得纯品固体对氘苯肿酸 900 mg，产率为 44 %。¹H NMR (δ, 20 DMSO-d₆): 7.60 (d, 2H), 7.53 (d, 2H)。

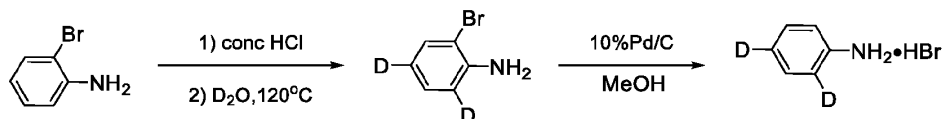


d1PAO

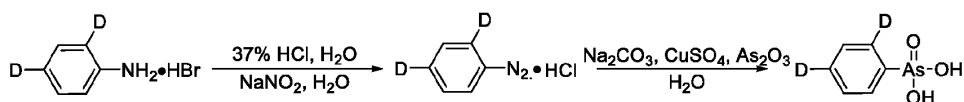
- 往 25 mL 三颈瓶中依次加入对氘苯肿酸（880mg，4.3 mmol，1.0 eq.），KI（16.6 mg，0.1 mmol，0.023 eq.），37% HCl（1.7 mL，20.0 mmol，4.6 eq.），甲醇（5.8 mL），室温搅拌 5 – 10 分钟，持续通入二氧化硫气体，反应 3 小时，TLC 监测反应完全。反应 25 液抽滤，并用甲醇（1.5 mL × 2）洗涤。液体于冰水浴中滴加入质量分数为 15%的 NaOH 溶液，调节 pH 至 14，此时体系呈橙色浊液。用乙酸乙酯（50 mL × 2）萃取，合并有机相，并用无水 Na₂SO₄干燥，过滤，低温（20-28°C）旋干，得到粗产物。向粗产物中加入约 4 mL 的乙醚打浆约 30 分钟后过滤，抽干，得到类白色固体的 d1PAO 约 430 mg。¹H NMR (δ, DMSO-d₆): 7.70 (d, 2H), 7.46 (d, 2H), MS ES⁺ (m/z): 169.9 [(M+H)⁺].

产率约 59%。

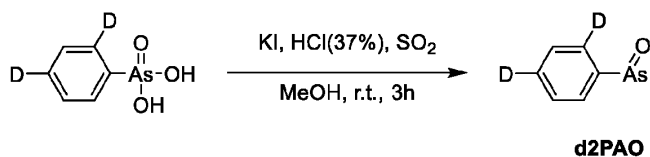
3.2 d2PAO 的制备



将浓盐酸（5 mL）滴加到邻溴苯胺（3.44g）的乙醚溶液中，有固体产生，砂芯漏
斗抽滤，乙醚洗涤，抽干得到苯胺的盐酸盐。氮气条件下，在封管中将固体溶于重水（7
mL），加热到 120°C，反应 24 小时，重水旋干，置换氮气，重新加入重水（7 mL），
反应 48 小时，冷却至室温，使用 30% 的氢氧化钠调节 pH = 7，乙醚萃取，无水硫酸钠
干燥，旋干可得到 2-溴-4, 6-二氘-苯胺。氮气条件下，将 22 毫升的甲醇加入到 2-溴-4,
6-二氘-苯胺和 10% Pd/C（300 mg）的混合物中，将氮气置换为氢气，反应 3 小时，点
板监测到 2-溴-4, 6-二氘-苯胺消失，硅藻土过滤，少量甲醇洗涤，直接旋干可得到 2,
4-二氘-苯胺的氢溴酸盐。

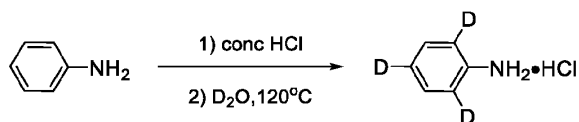


往 25 mL 带有磁力搅拌子的圆底瓶中加入由上步得到的 2, 4-二氘-苯胺的氢溴酸盐
并加水 5 mL，降温至 0-5°C，并于该温度下，缓慢加入 37% 的盐酸水溶液（1.1 mL），
加入水 5 mL 稀释，继续搅拌，反应 30 分钟。再向该反应液中缓慢加入 NaNO₂ 水溶液
（724.5 mg，10.5 mmol，3 mL H₂O），控制反应温度在 0-5°C，30-40 分钟内滴加完，
溶液呈棕黄色，继续低温下搅拌反应 2 小时。往 50 mL 圆底反应瓶中加入 Na₂CO₃（4.0 g，
38.0 mmol，3.8 eq.），As₂O₃（1.0 g，5.0 mmol，0.5 eq.），CuSO₄·5H₂O（150 mg，0.6 mmol，
0.06 eq.），H₂O（13 mL），95 °C 反应 45 分钟，溶液为绿色溶液，降温至 0-5 °C。向
第 2 步反应液中缓慢滴加第 1 步制备好的偶氮盐酸盐，控制反应体系温度低于 5 °C，在
滴加的过程中产生泡沫，加入少量丙酮除泡沫，待泡沫消失后继续滴加，1 小时内滴加
完毕，滴加完毕后自然升温，过夜搅拌。反应液通过硅藻土过滤，滤饼用冰水（2 mL ×
2）淋洗。水相于 50°C 减压浓缩至 10 mL。于冰水浴中滴加入 4 mL 的 6N 的 HCl 调节
pH 至 7-8，出现少量黄褐色固体，抽滤，2mL 冰水洗涤，弃去固体。滤液滴加入 2 mL 的
6 N 的 HCl 调节 pH 至 3-4，出现粘稠状固体。抽滤，弃去固体（核磁显示这部分固体不
含产物）。所得滤液浓缩至 8 mL，加入 6 N HCl（0.5 mL）调节 pH 至 2-3，出现大量固
体，抽滤，得 2, 4-二氘-苯膦酸固体 1.15 g，产率为 56.4 %。¹H NMR (δ, DMSO-d₆): 7.72
(d, 1H), 7.56-7.59 (m, 2H)。

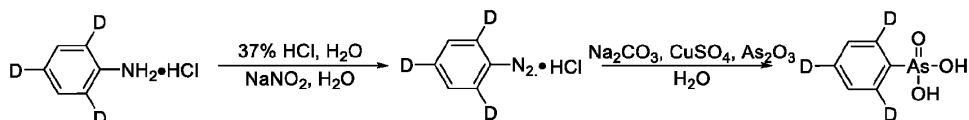


往25 mL三颈瓶中依次加入2, 4-二氘-苯膦酸 (1.1g, 5.4 mmol, 1.0 eq.), KI (20.6 mg, 0.124 mmol, 0.023 eq.), 37% HCl (2.1 mL, 25.0 mmol, 4.6 eq.), MeOH (7.3 mL), 室温搅拌5-10 分钟, 持续通入二氧化硫气体, 反应3 小时, TLC监测反应完全。冰水浴下, 滴加入质量分数为15%的NaOH溶液, 调节pH至7, 此时体系出现大量不溶物。用乙酸乙酯 (50 mL × 2) 萃取, 合并有机相, 并用无水Na₂SO₄干燥, 过滤, 低温 (20-28°C) 旋干, 得到粗产物。向粗产物中加入约3 mL乙酸乙酯打浆约30 分钟后过滤, 抽干, 得到类白色固体d2PAO约400mg。¹H NMR (δ, DMSO-d₆): 7.58 (d, 1H), 7.36-7.39 (m, 2H). MS ES+ (m/z): 170.7 [(M+H)+]. 产率约48%。

10 3.3 d3PAO 的制备

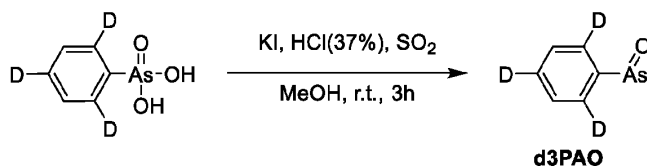


将浓盐酸(5 mL)滴加到苯胺溶液 (2.65g 苯胺, 7 mL 重水) 中, 有固体产生, 砂芯漏斗抽滤, 乙醚洗涤, 抽干得到苯胺的盐酸盐, 直接用于下一步。氮气条件下, 在封管中将固体溶于重水 (7 mL), 加热到 120°C, 反应 24 小时, 旋干重水, 置换氮气, 重新加入重水 (7 mL), 反应 48 小时, 所得 2, 4, 6-三氘-苯胺重水溶液直接用于下一步。



往 25 mL 带有磁力搅拌子的圆底瓶中加入 2, 4, 6-三氘-苯胺重水溶液 (4.33 mL) 并加水 2.5 mL, 降温至 0-5 °C, 并于该温度下, 缓慢加入 37%的盐酸水溶液 (1.1 mL), 加入水 5 mL 稀释, 继续搅拌, 反应 30 分钟. 再向该反应液中缓慢加入 NaNO₂ 水溶液 (724.5 mg, 10.5 mmol, 3 mL H₂O), 控制反应温度在 0-5°C, 30-40 分钟内滴加完, 溶液由紫色变黄色, 继续低温下搅拌反应 2 小时。往 50 mL 圆底反应瓶中加入 Na₂CO₃ (4.0 g, 38.0 mmol, 3.8 eq.), As₂O₃ (1.0 g, 5.0 mmol, 0.5 eq), CuSO₄·5H₂O (150 mg, 0.6 mmol, 0.06 eq), H₂O (13 mL), 95 °C反应 45 分钟, 溶液为绿色溶液, 降温至 0-5 °C。向第 2 步反应液中缓慢滴加第 1 步制备好的偶氮盐酸盐, 控制反应体系温度低于 5 °C, 在滴加的过程中产生泡沫, 加入少量丙酮除泡沫, 待泡沫消失后继续滴加。1 小时内滴加完毕, 滴加完毕后自然升温, 过夜搅拌。反应液通过硅藻土过滤, 滤饼用冰

水 (2 mL × 2) 淋洗。水相于 50 °C 减压浓缩至 10 mL。于冰水浴中滴加入 1.8 mL 的 6 N 的 HCl 调节 pH 至 7-8, 出现少量黄褐色固体, 抽滤, 2 mL 冰水洗涤, 弃去固体。滤液滴加入 1.8 mL 的 6 N 的 HCl 调节 pH 至 3, 出现淡黄色固体。抽滤, 并用 2 mL 冰水洗涤, 收集固体。所得滤液浓缩至 8 mL, 加入 6 N HCl 0.8 mL 调节 pH 至 1, 出现大量固体, 抽滤, 收集固体。共得固体 2, 4, 6-三氘-苯肿酸 860 mg, 产率为 39 %。¹H NMR (δ, DMSO-d₆): 7.56 (s, 2H)。



往 25mL 三颈瓶中依次加入 2, 4, 6-三氘-苯肿酸 (3.9 mmol, 1.0 eq.), KI (15 mg, 0.09 mmol, 0.023 eq.), 37% HCl (1.3 mL, 18.0 mmol, 4.6 eq.), 甲醇 (5.3 mL), 室温搅拌 5-10 分钟, 持续通入 SO₂, 反应 3 小时, TLC 监测反应完全。反应液抽滤, 并用甲醇 (1.5 mL × 2) 洗涤。冰水浴下, 滴加入质量分数为 17% 的 NaOH 溶液 4.3 mL, 调节 pH 至 7, 此时瓶壁出现黄色油状物。用乙酸乙酯 (25 mL × 2) 萃取, 合并有机相, 并用无水 NaSO₄ 干燥, 过滤, 低温 (20-28°C) 旋干。向所得固体中加入约 3 mL 乙酸乙酯打浆约 30 分钟后过滤, 抽干, 得到类白色固体 d3PAO 约 200 mg。将上步所得母液旋干, 得到的固体加入约 1.5 mL Et₂O 打浆约 30 分钟后过滤, 抽干, 得到类白色固体 d3PAO 约 170 mg。d3PAO 合并后, 产率约 55%。¹H NMR (δ, DMSO-d₆): 7.46 (s, 2H). MS ES⁺ (m/z): 171.9 [(M+H)⁺].

实施例 3. 化合物的药代动力学研究

F2mPAO 由实施例 1 所述的方法制备得到, d5PAO (d5-PAO) 和 PAO (PAO) 由实施例 2 所述的方法制备得到。在受试成年雄性大鼠中单次静脉注射 PAO, d5PAO 和 F2mPAO (施用剂量为 0.1mg/Kg, 化合物溶于 0.1% DMSO) 或单次口服胃灌流以上试剂混合物 (施用剂量为 0.2 mg/Kg) 后, 分别在摄药后 0、0.083、0.25、0.5、1、2、4、6、8、24、32、48 小时抽取静脉血, 用于药代动力学测试。通过蛋白沉淀的方法提取试验样品中的 PAO 和 d5PAO, 处理后的样品进样到液质联用 (LC-MS/MS) 中, 经液相分离后采用 ESI 负离子模式检测。

样品处理 (血样本):

- 1) 将 40 μL 未知样品、校准标准品、质量控制、单个空白样品、双空白样品加入 96 孔板中;
- 2) 每个样品中加入 120 μL 的 0.1mg/mL 溶解于水的二巯基丙磺酸钠;

- 3) 每个样品中加入 40 μL 的溶解于水的 0.2%甲酸。混合均匀后在 45 $^{\circ}\text{C}$ 环境中震荡孵育 15 分钟，4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 分钟 ($\times 3220\text{ g}$)；
- 4) 每个样品（双空白除外）用 200 μL IS1 淬灭（双空白样品用 240 μL MeOH 淬灭），震荡混合 15 分钟后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 环境中离心 15 分钟 ($\times 3220\text{ g}$)；
- 5) 50 μL 上清液转入到 96-孔板中 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 分钟 ($\times 3220\text{ g}$)，然后将上清液用于 LC-MS/MS 分析。分析由通过 Triple Quad 6500+ LC-MS/MS (SCIEX)系统完成。

实验结果：

雄性 SD 大鼠 ($n=3$) 单次静脉注射同剂量 (0.1 mg/Kg) 或单次口服灌胃给予同剂量的 PAO、d5PAO 和 F2mPAO (0.2 mg/Kg)，PAO 和 d5PAO 的药代动力学指标无显著差异，然而 F2mPAO 在生物利用度、最大血药浓度、半衰期、系统暴露量等指标都明显优于 PAO 与 d5PAO（参见表 3、表 4 和图 1 和图 2）。

PK Parameters	PAO (0.11mg/kg, IV)			F2mPAO (0.08mg/kg, IV)			d5PAO (0.09mg/kg, IV)		
	Mean	SD	CV (%)	Mean	SD	CV (%)	Mean	SD	CV (%)
No. points used for $T_{1/2}$	3	--	--	3	--	--	3.00	--	--
C_0 (ng/mL)	1345	211	15.7	1943	375	19.3	1488	142	9.53
$T_{1/2}$ (h)	11.4	0.300	2.63	17.0	2.858	16.81	12.4	0.651	5.23
Vd_{ss} (L/kg)	0.163	0.0161	9.88	0.155	0.01044	6.74	0.155	0.0219	14.1
Cl (mL/min/kg)	0.411	0.0256	6.22	0.239	0.0046	1.92	0.379	0.0230	6.07
T_{last} (h)	48.0	--	--	48.0	--	--	48.0	--	--
AUC_{0-last} (ng.h/mL)	4010	253	6.30	6636	58	0.88	4337	281	6.47
AUC_{0-inf} (ng.h/mL)	4062	258	6.35	6976	145	2.08	4404	276	6.26
MRT_{0-last} (h)	5.84	0.436	7.46	7.62	0.628	8.25	5.87	0.488	8.32
MRT_{0-inf} (h)	6.58	0.445	6.76	10.81	0.878	8.12	6.79	0.648	9.54
AUC_{Extra} (%)	1.27	0.0513	4.05	4.86	1.1433	23.51	1.54	0.272	17.7
$AUMC_{Extra}$ (%)	12.5	0.666	5.34	32.7	7.481	22.90	14.9	1.457	9.80

表 4. 雄性 SD 大鼠单次口服灌胃 (0.2 mg/Kg) 药代动力学指标

PK Parameters	PAO (0.22mg/kg, PO)			F2mPAO (0.17mg/kg, PO)			d5PAO (0.19mg/kg, PO)		
	Mean	SD	CV (%)	Mean	SD	CV (%)	Mean	SD	CV (%)
No. points used for $T_{1/2}$	3	--	--	3	--	--	3	--	--
C_{max} (ng/mL)	156	12.5	8.03	356	53.1	14.9	161	10.4	6.48
T_{max} (h)	8.00	0.00	0.00	8.00	0.00	0.00	7.33	1.15	15.7
$T_{1/2}$ (h)	6.87	0.942	13.7	8.99	1.34	15.0	7.19	0.778	10.8
T_{last} (h)	48.0	--	--	48.0	--	--	48.0	--	--
AUC_{0-last} (ng.h/mL)	2314	420	18.1	6194	774	12.5	2445	475	19.4
AUC_{0-inf} (ng.h/mL)	2341	426	18.2	6406	746	11.7	2479	483	19.5
MRT_{0-last} (h)	12.5	0.611	4.88	14.8	1.31	8.86	12.6	0.777	6.15
MRT_{0-inf} (h)	13.0	0.751	5.76	16.3	1.68	10.3	13.3	0.902	6.80
AUC_{Extra} (%)	1.16	0.467	40.4	3.37	1.31	38.8	1.35	0.444	32.8
$AUMC_{Extra}$ (%)	5.09	1.99	39.0	12.5	4.49	36.0	5.92	1.80	30.3
Bioavailability (%) ^a	28.8	--	--	45.9	--	--	28.1	--	--

15 实施例 4. 氟代化合物对肺纤维化的抑制作用研究

肺纤维化 (pulmonary fibrosis, PF) 是一类可由多种原因引起的、慢性、纤维化性肺疾病，主要表现为干咳以及进行性的呼吸困难，预后较差，目前仍难以治愈。PF 主要病理特征是正常肺组织结构破坏后的过度瘢痕修复，最终导致呼吸功能不全。虽然有关

肺纤维化病理生理机制的研究已取得较大进展，但其发病机制尚未完全阐明。

人胚肺成纤维细胞 MRC-5 细胞是研究 PF 的病理变化和进行药物研发的重要工具细胞。在 PF 的发生发展过程中，相关转录因子如转化生长因子- β 1 (transforming growth factor-1, TGF- β 1) 等可通过调控成纤维细胞异常活化、增殖和迁移，引起细胞外基质的异常沉积和肺泡结构的破坏，最终导致 PF 的形成。TGF- β 1 是诱导 PF 的关键因子之一，其能够通过与其相应受体结合调控成纤维细胞的转化为肌成纤维细胞，因此实验过程中通常使用一定浓度 TGF- β 1 处理 MRC-5 细胞促使其发生纤维化。

1. 材料

MRC-5 细胞购买自中国科学院分子细胞科学卓越创新中心。人源重组 TGF- β 1 蛋白购买自 Proteintech Group (货号: HZ-1011)。兔抗 Calponin1 一抗购买自 Cell Signaling Technology (货号: #17819)。兔抗 α -Smooth Muscle Actin 一抗购买自 Cell Signaling Technology (货号: #19245)。Alexa Flour 555 山羊抗兔 IgG 购自 Molecular Probes。高糖 DMEM 培养基、MEM 培养基和胎牛血清 FBS 均购自 Gibco 公司。奥林巴斯 FV1000 倒置荧光显微镜购自 Olympus (Tokyo, Japan)。封片剂 Dako Cytomation fluorescent mounting medium 购自 Dako (Copenhagen, Denmark)。

2. 方法

2.1 MRC-5 细胞培养和处理

MRC-5 细胞根据细胞培养指导说明用含有 10%胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的 DMEM 培养基在恒温 37°C, 5%CO₂, 饱和湿度的培养箱中培养，培养 24 小时使其贴壁。次日，加入含有 5 ng/mL TGF- β 1，并同时含有根据分组分别加入不同浓度 F2oPAO、F2mPAO 或 F3PAO 的 DMEM 培养基 (无 FBS)，根据实验需要继续培养 24 小时。分组如下：对照 (ctrl) 组，5 ng/mL TGF- β 1 组，5 ng/mL TGF- β 1 和 12.5 nM F2oPAO 共同处理组 (5 ng/mL TGF- β 1+12.5 nM F2oPAO 组)，5 ng/mL TGF- β 1 和 25 nM F2oPAO 共同处理组 (5 ng/mL TGF- β 1+25 nM F2oPAO 组)，5 ng/mL TGF- β 1 和 50 nM F2oPAO 共同处理组 (5 ng/mL TGF- β 1+50 nM F2oPAO 组)，5 ng/mL TGF- β 1 和 12.5 nM F2mPAO 共同处理组 (5 ng/mL TGF- β 1+12.5 nM F2mPAO 组)，5 ng/mL TGF- β 1 和 25 nM F2mPAO 共同处理组 (5 ng/mL TGF- β 1+25 nM F2mPAO 组)，5 ng/mL TGF- β 1 和 50 nM F2mPAO 共同处理组 (5 ng/mL TGF- β 1+50 nM F2mPAO 组)，5 ng/mL TGF- β 1 和 12.5 nM F3PAO 共同处理组 (5 ng/mL TGF- β 1+12.5 nM F3PAO 组)，5 ng/mL TGF- β 1 和 25 nM F3PAO 共同处理组 (5 ng/mL TGF- β 1+25 nM F3PAO 组)，5 ng/mL TGF- β 1 和 50 nM F3PAO 共同处理组 (5 ng/mL TGF- β 1+50 nM F3PAO 组)。

2.2 噻唑蓝 (MTT) 法检测细胞活力

给药处理 24 小时, 加入终浓度为 0.5 mg/mL 的 MTT, 孵育 4 小时后吸去培养液, 加入 100 μ L DMSO 溶解吸附的 MTT, 振荡 15 分钟后读取吸光度值。

2.3 免疫荧光染色

5 MRC-5 细胞处理 24 小时后吸去上清, 加入磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 清洗 3 次; 加入 4% 多聚甲醛 (Paraformaldehyde, PFA) 室温静置 30 分钟; 弃去 4% PFA, 经 PBS 清洗 3 次, 每次 10 分钟; 加入 0.3% 非离子型去垢剂 Triton-X (溶于 PBS), 室温静置 30 分钟; 吸除 0.3% Triton-X, 加入含有 10% 山羊血清 (goat serum, GS) 的 PBS 封闭液, 室温静置 1 小时; 4°C 孵育一抗过夜 (一抗使用 10% GS 封闭液进行稀释, α -Smooth Muscle Actin 稀释比例 1: 200, Calponin1 稀释比例 1: 100)。次日, 10 使用 PBS 清洗 3 次, 每次 10 分钟; 孵育二抗 Alexa Flour 555 山羊抗兔 IgG (使用封闭液稀释, 稀释比例为 1: 500, 并加入 1 μ g/mL 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI)), 室温静置 2 小时, 加入 PBS 清洗 3 次, 每次清洗 10 分钟。使用封片剂封片后通过显微镜观察。骨髓间充质干细胞的免疫荧光染色处理过程如上述相同。

15 2.4 统计

荧光强度处理使用 Image J 软件, 数据处理和统计采用 GraphPad Prism5 软件, 数据用平均值 $\pm$ 标准误 (mean $\pm$ SEM) 表示。比较组间差异用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 统计, $p < 0.03$ 认为有统计学差异。

3. 结果

20 3.1 氟代系列化合物抑制 Calponin1 和 α -Smooth Muscle Actin 在 TGF- β 1 处理的 MRC-5 细胞中表达

用含有 5 ng/mL TGF- β 1 的 DMEM (不含 FBS) 培养基处理 MRC-5 细胞 24 小时, 并根据分组分别给予不同浓度的氟代系列化合物处理。在 5 ng/mL TGF- β 1 处理 MRC-5 细胞 24 小时后, 按照不同分组分别加入不同浓度的 F2mPAO、F2oPAO 或 F3PAO, 孵育 4 小时或 24 25 小时后经 MTT 实验检测细胞活力, 结果显示: 氟代系列化合物处理 4 小时, 5 ng/mL TGF- β 1 处理组与对照组比较细胞活力显著下降 (图 3A), 其他组与 5 ng/mL TGF- β 1 处理组比较细胞活力没有明显改变; 氟代系列化合物处理 24 小时, 5 ng/mL TGF- β 1 处理组与对照组比较细胞活力显著下降 (图 3B), 与 5 ng/mL TGF- β 1 处理组比较, 5 ng/mL TGF- β 1 和 100 nM F2mPAO 共同处理组和 5 ng/mL TGF- β 1 和 100 nM F3PAO 均使细胞活力显著下降 (图 3B)。

30 α -平滑肌肌动蛋白 (α -Smooth Muscle Actin, α -SMA) 和肌动蛋白结合蛋白 Calponin1 是肌成纤维细胞的标志物, 为了研究氟代系列化合物对肺纤维化是否有调控作用, 在氟代系列

化合物处理 24 小时后分别对 α -SMA 和 Calponin1 进行了检测。蛋白质免疫印迹实验结果显示：与对照 (ctrl) 组比较，5 ng/mL TGF- β 1 处理组 α -SMA 表达量显著增多，提示 5 ng/mL TGF- β 1 处理 MRC-5 细胞 24 小时导致细胞纤维化，50 nM F2mPAO、25nM F2oPAO 以及 12.5 nM、25 nM 和 50 nM F3PAO 显著抑制 5 ng/mL TGF- β 1 诱导的 α -SMA 过度表达 (图 4A, C)。

5 Calponin1 的蛋白质免疫印迹实验结果与上述 α -SMA 的结果相似，5 ng/mL TGF- β 1 处理组 Calponin1 表达量与 ctrl 组比较显著增多，一定浓度的 F2mPAO、F2oPAO 或 F3PAO 与 5 ng/mL TGF- β 1 共同处理组中的 Calponin1 表达量与 5 ng/mL TGF- β 1 单独处理组比较显著减少 (图 4A, D)。研究表明，I 型胶原蛋白 (Collagen Type I, COL1) 是细胞外基质的重要组成成分之一，参与肺纤维过程发生发展。同样探究了氟代系列化合物在 MRC-5 细胞中对 COL1

10 的表达是否有调控作用。结果显示：I 型胶原蛋白的表达与上述 α -SMA 和 Calponin1 的结果相一致 (图 4A, B)。此外，免疫荧光结果也与蛋白质免疫印迹结果相一致，5 ng/mL TGF- β 1 处理组 α -SMA 表达量较对照组显著升高 (图 5A, B)。5 ng/mL TGF- β 1 和 25 nM F2mPAO、5 ng/mL TGF- β 1 和 50 nM F2mPAO、5 ng/mL TGF- β 1 和 25 nM F2oPAO、5ng/mL TGF- β 1 和 50nM F2oPAO、5ng/mL TGF- β 1 和 25nM F3PAO、以及 5 ng/mL TGF- β 1 和 50 nM F3PAO 共

15 同处理组 α -SMA 荧光信号强度与对照组比较没有明显差异，而与 5 ng/mL TGF- β 1 处理组比较显著降低 (图 5A, B)。肌动蛋白结合蛋白 Calponin1 的免疫荧光检测结果与上述 α -SMA 的结果相一致 (图 6A, B)。以上结果说明一定浓度 F2mPAO、F2oPAO 和 F3PAO 能够显著抑制 TGF- β 1 诱导的 MRC-5 细胞纤维化过程。

3.2 敲减 (或 *PI4KA*) 抑制 MRC-5 细胞纤维化

20 氟代系列化合物是根据其母核化合物改造的新型化合物，而前期研究显示，其母核化合物的代表化合物 PAO 在低浓度 (<5 μ M) 时主要作用于磷脂酰肌醇 4 激酶 PI4KIII α ，为了进一步探究相应作用靶点 PI4KIII α 在纤维化过程中的作用，设计了针对编码 PI4KIII α 蛋白的基因序列 *PI4KA* 的 shRNA 干扰慢病毒载体 (带有绿色荧光蛋白 GFP 表达序列)。蛋白质免疫印迹实验结果显示，三个针对 *PI4KA* 的 shRNA 干扰慢病毒载体在转染 MRC-5 细胞 48 小时

25 后，干扰序列 sh1、sh2、sh3 均使处理组 PI4KIII α 表达水平显著降低 (图 7A, B)。shRNA 干扰慢病毒载体处理 48 小时后通过免疫荧光观察 Calponin1 和 α -SMA 的表达。与载体对照 (sh-ctrl) 组比较，sh-ctrl 加 5 ng/mL TGF- β 1 共同处理组 α -SMA 表达水平显著升高。与 sh-ctrl 加 5 ng/mL TGF- β 1 共同处理组比较，sh1 加 5 ng/mL TGF- β 1 共同处理组和 sh3 加 5 ng/mL TGF- β 1 共同处理组 α -SMA 表达水平明显减少，sh2 加 5 ng/mL TGF- β 1 共同处理组 α -SMA

30 表达水平也有下降趋势 (图 8A, C)。Calponin1 的观察结果与 α -SMA 保持一致 (图 8B, D)，均说明敲减 *PI4KA* 抑制 MRC-5 细胞纤维化。

实施例 5. 氟代衍生物在 TGF-β 诱导的培养心、肝、肾成纤维细胞模型中的作用

1. 人源正常心室成纤维（NHCF-V）细胞

在 96 孔培养板（康宁）中种入 NHCF-V 细胞（人源正常心室成纤维细胞，密度为 5000 细胞/孔，2%FBS 完全培养基，200 μL/孔）。37°C/5% CO₂ 培养 24 小时。第 1 天，将细胞以 0.5%FBS-FGM 24 小时饥饿处理。第 2 天，在细胞培养液中加入药物，分别为：空白、Nintedanib（阳性对照）、F2mPAO、F2oPAO、F3PAO、AsIII（2-巯基丙-PAO）以及 A1（PI4KA 抑制剂，Naveen Bojjireddy et al. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 289, NO. 9, pp. 6120–6132, February 28, 2014）。所有处理组培养液均含有 TGF-β（为纤维化诱导物，最终浓度为 1 ng/mL）。继续在 37°C/5%CO₂ 中培养。第 3 天，TGF-β 处理 24 小时后，用冷 DPBS（无 Mg²⁺/Ca²⁺）清洗细胞。加入 50 μL 裂解液（0.5 μL DNase I +49.5 μL 裂解溶解液），室温水平摇床（900rpm）震荡孵育 5 分钟进行裂解。加入 5 μL 终止液后，继续孵育 2 分钟。在 16 μL 反转录母液中加入 4 μL 样本裂解物，混合均匀，在 PCR 仪器上运行逆转录。逆转录产物将用于随后的 RT-qPCR。分别制备目标基因（ACTA2, CTGF, PAI-1）以及内参对照基因（RPLP0）的 PCR 母液。将 8 μL PCR 母液和 2 μL 样本反转录产物在离心培养板上（1000 rpm，2 分钟）混合均匀，最后使用 Applied Biosystems™ ViiA7 仪器上进行 PCR 反应。每个样本重复两次测验。分析数据来源于 RT-PCR 实验所产生的 Ct 值。每个样本里各个基因扩增后所产生 Ct 值均被内参基因 RPLP0 标准化。数据处理方法同样用于以下实验。

实验结果：

TGF-β 加入 NHCF-V 细胞培养液中后,可提高细胞中编码 α-肌动蛋白（ACTA2）、结缔组织生长因子(CTGF)，以及纤溶酶原激活物抑制物(PAI-1)基因 mRNA 表达量（130%-300%不等，数据未显示），预示 TGF-β 可诱导培养细胞的纤维化。而溶液中同时加入转化生长因子 βI 型受体抑制剂 Nintedanib（阳性对照），则可逆转以上基因 mRNA 的表达量（见表 5）：Nintedanib 处理组 mRNA 表达量 TGF-β 处理组相比，三个基因 mRNA 的表达量分别下降了 67%、61%和 82%。同理，在 PAO 衍生物 F2mPAO、F2oPAO、F3PAO 以及 ASIII 处理组，这些基因 mRNA 的表达水平均在不同程度上被有所抑制，预示这些相关化合物可有效抑制 TGF-β 诱导的细胞成纤维化。此外，已知 PI4KA 抑制剂 A1 也可抑制 TGF-β 诱导的 ACTA2mRNA 表达升高，但对 CTGF 和 PAI-1mRNA 的表达量抑制作用，说明其抑制作用不如 PAO 衍生物强。

表 5. PAO 衍生物对 TGF-β 处理的成纤维细胞中基因 mRNA 表达量的影响

NHCF-V 细胞	mRNA 水平相对变化（vs.TGF-β 处理）		
测试物(100nM)	ACTA2	CTGF	PAI-1
Nintedanib	-67%	-61%	-82%

F2mPAO	-93%	-74%	-17%
F2oPAO	-69%	-51%	-35%
F3PAO	-94%	-72%	-9%
ASIII	-31%	7%	-19%
A1	-81%	7%	116%

2. 人源肝星形(LX-2)细胞

在 96 孔板板中种入 LX-2 细胞（人源肝星形细胞系，Sigma-Aldrich SCC064），密度为 20000 细胞/孔（2%FBS 完全培养基，200 μL/孔）。第 1 天，37°C 和 5%CO₂ 培养 24 小时。第 2 天，在细胞培养液中加入药物进行药物处理，分别为：空白、Nintedanib（阳性对照）、F2mPAO、F2oPAO、F3PAO、AsIII 以及 A1（PI4KA 抑制剂）。30 分钟后加入 TGF-β 进行纤维化诱导处理，TGF-β 最终浓度为 5 ng/mL。TGF-β 处理 24 小时后，用冷 DPBS（无 Mg²⁺/Ca²⁺）清洗细胞。加入 50 μL 裂解液（0.5 μL DNase I + 49.5 μL 裂解溶解液）进行裂解，室温摇床（900 rpm）震荡孵育 5 分钟。加入 5 μL 终止液，继续孵育 2 分钟。在 35 μL 反转录母液中加入 15 μL 样本裂解物，混合均匀后在 PCR 仪器上运行逆转录，所得逆转录产物用于随后的实时定量 PCR（RT-qPCR）。分别制备针对目标基因（ACTA2、COL1A1、TGFB1）以及内参对照基因（GAPDH）的 PCR 母液。将 8 μL PCR 母液和 2 μL 样本逆转录产物在离心板上离心（1000 rpm，2 分钟）混合均匀，最后在 Applied Biosystems™ QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR 仪器上进行 PCR 反应。分析数据来源于 RT-qPCR 实验所产生的 Ct 值。

实验结果：

TGF-β 加入 LX-2 细胞细胞培养液中后,可提高细胞中编码 α-肌动蛋白（ACTA2）、1 型胶原蛋白 α-1 链（COL1A），以及 1 型转化生长因子-β（TGFB1）基因 mRNA 的表达量（300%-400%不等，数据未显示），预示 TGF-β 可诱导培养星型肝细胞的纤维化。而溶液中如同时含有 Nintedanib（400nM），则可逆转以上基因的 mRNA 的表达量（见表 6）。而在 F2mPAO、F2oPAO、F3PAO 处理组，以上基因 mRNA 的表达水平均在不同程度被抑制，预示这些 PAO 衍生物可有效抑制 TGF-β 诱导的细胞成纤维化，但是 ASIII 则没有显示明显的抑制作用。PI4KA 抑制剂 A1 也可抑制 TGF-β 诱导的 A 多个基因 mRNA 表达的升高。

表 6. PAO 衍生物对 TGF-β 处理的星型肝细胞中基因 mRNA 表达量的影响

LX-2 细胞	mRNA 水平相对变化（vs.TGF-β 处理）		
测试物	ACTA2	COL1A1	TGFB1
Nintedanib (400nM)	-55%	-77%	-78%
F2mPAO (100nM)	-69%	-54%	-36%
F2oPAO (100nM)	21%	-15%	3%
F3PAO (100nM)	-65%	-54%	-29%

ASIII (100nM)	48%	-3%	7%
A1 (100nM)	-92%	-53%	-20%

3. 人源肾系膜（HRMC）细胞

在 96 孔细胞培养板（康宁）中种入 HRMC 细胞（人源肾系膜细胞，密度为 6000 细胞/孔，2%FBS 完全培养基，100 μL/孔）。37°C 和 5% CO₂ 培养 24 小时。第 1 天，对细以 0.1% FBS 进行 6 小时饥饿处理。第 2 天，在细胞培养液中加入各个待测试药物(F2mPAO、F2oPAO、F3PAO、AsIII 以及 A1；含有 TGF-β，其最终浓度在 0.1%FBS 中为 1 ng/mL)。继续在 37°C 和 5%CO₂ 中培养。第 3 天，TGF-β 处理 24 小时后，用冷 DPBS（无 Mg²⁺/Ca²⁺）清洗细胞。加入 30μL 裂解液（0.3 μL DNase I + 29.7 μL 裂解溶解液），室温摇床（900 rpm）震荡孵育 5 分钟进行裂解。加入 3 μL 终止液，继续孵育 2 分钟。在 24 μL 反转录母液中加入 6 μL 样本裂解物，混合均匀后在 PCR 仪器上运行逆转录，所得逆转录产物用于随后的实时定量 PCR（RT-qPCR）。分别制备目标基因(COL4A1、COL16A1 和 CTGF)以及内参对照基因(RPLP0)的 PCR 母液。将 8 μL 各个 PCR 母液和 2 μL 裂解样本逆转录产物混合，离心培养板(1000 rpm，2 分钟)，然后在 Applied Biosystems ViiA7 仪器上进行 PCR 反应。

实验结果：

TGF-β 加入 HRMC 细胞培养液后,可提高细胞中编码 16 型胶原蛋白 Alpha 1 链 (COL16A1)、4 型胶原蛋白 Alpha 1 链 (COL4A1α-1)，以及结缔组织生长因子 (CTGF) 基因的 mRNA 表达量（200%-300%不等，数据未显示），预示 TGF-β 可诱导培养肾系膜细胞的纤维化。而溶液中如同时含有 Nintedanib 100 nM)，则可逆转以上基因 mRNA 的表达量（见表 7）。同浓度 F2mPAO、F2oPAO、F3PAO 处理组，以上基因 mRNA 的表达水平平均在不同程度被抑制，且抑制作用强于阳性对照 Nintedanib，预示这些 PAO 衍生物可有效抑制 TGF-β 诱导的细胞成纤维化，但是 ASIII 的抑制作用相对较弱。PI4KA 抑制剂 A1 只抑制了 TGF-β 诱导的 CTGF 基因 mRNA 表达的升高。

表 7. PAO 衍生物对 TGF-β 处理的肝脏成纤维细胞中基因 mRNA 表达量的影响。

HRMC 细胞	mRNA 水平相对变化 (vs.TGF-β 处理)		
测试物 (100nM)	COL16A1	COL4A1	CTGF
Nintedanib	-57%	-55%	-53%
F2mPAO	-63%	-55%	-81%
F2oPAO	-78%	-74%	-70%
F3PAO	-72%	-62%	-83%
ASIII	-28%	-7%	-20%
A1	2%	-2%	-66%

实施例 6. PAO 及其衍生物在抑制心脏纤维化中的研究

1. 心肌原代成纤维细胞细胞提取:

心肌原代成纤维细胞分离及培养:采用 0.2% 的 2 型胶原酶提取 C57BL/6J 乳鼠心肌原代成纤维细胞。

将出生后 0~3 天的 C57BL/6J 乳鼠 (雄鼠 上海吉辉) 置于 75% 乙醇中消毒, 分离乳鼠心脏后, 剪开皮肤和肋骨, 分离乳鼠心脏, 将分离的心脏放入灭菌的 PBS 中洗 3 次, 用剪刀将心脏剪成细小的组织块, 用 PBS 洗 3 次, 再用 0.025% 的胰蛋白酶 (Gibco) 4°C 消化过夜。

采用 0.2% 的 2 型胶原酶对清洗后的组织块在 37°C 中进行再消化 30 分钟; 使用含 10% 血清的 DMEM (Gibco) 培养基进行中和, 离心 5 分钟。轻轻弃掉上清, 用含 10% 血清的 DMEM 培养基将沉淀吹散, 种在 25 cm² 的培养瓶 (康宁) 中。贴壁 2 小时后, 更换培养基。于 24、48、72 小时显微镜下观察细胞贴壁及生长状态, 取第 2-3 代细胞用于实验。

2. 培养心肌成纤维细胞缺氧条件的确立:

实验分为对照组、缺氧 24 小时组和缺氧 24 小时+ d5PAO 或 PAO 干预组。将心肌原代成纤维细胞铺至六孔板中的细胞培养皿 (康宁) 中, 待细胞完全贴壁后并融合至 70%~80% 时, 用无血清培养基饥饿 24 小时后, 再换无血清培养基并加入各浓度的 d5PAO/PAO, 放入缺氧盒 (日本三菱) 中缺氧, 以微需氧缺氧包刺激细胞 24 小时 (使用日本三菱的缺氧包)。见缺氧指示剂由粉红色变为紫色再变为粉红色, 表示缺氧成功, 收集细胞备用。

3. 荧光定量 PCR 检测 α -SMA 及 Col 1A 基因表达:

用 RNA 提取试剂盒 (B0004DP, 苏州英泽生物医药有限公司) 提取细胞总 RNA。应用分光光度 (赛默飞) 计进行 RNA 浓度及纯度鉴定。采用反转录试剂盒 (上海翌圣) 对 1000 ng 总 RNA 进行反转录反应获取 cDNA。采用 SYBR Green 试剂盒 (上海翌圣) 对 cDNA 进行荧光定量 PCR 扩增 α -SMA 及 Col 1A 基因, GAPDH 基因为内参照。从 NCBI 网站上下载上述基因 cDNA 序列, PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成。引物序列如下:

α -SMA: 正向 GTCCCAGACATCAGGGAGTAA, 反向 TCGGATACTTCAGCGTCAGGA;

Col 1A: 正向 TAAGGGTCCCCAATGGTGAGA, 反向 GGGTCCCTCGACTCCTACAT;

GAPDH: 正向 CCAGGCGCCCAATACG, 反向 CCACATCGCTCAGACACCAT。

4. 细胞提取物免疫印记 (Western Blotting) 检测 SMA 以及 Col 1A 蛋白表达:

吸取培养基, 用 PBS 清洗 2 遍培养皿。根据培养细胞的总量加入适量含有蛋白酶抑制剂的 RIPA lysis (碧云天), 冰上裂解 30 分钟。期间涡旋震荡数次以保证蛋白裂解充分。然后将裂解物在 4°C, 12000g 离心 15 分钟, 上清即为获得的细胞总蛋白。采用 BCA 试剂盒 (碧云天) 对蛋白进行定量。应用 SDS-PAGE 胶试剂盒 (雅酶) 胶对 30 μ g 蛋白进行电泳。一抗采用 Col 1A 抗体 (Abcam), α -SMA (Abcam) 抗体; 二抗使用 HRP 标记的抗体 (碧云天),

GAPDH, Tubulin 为内参。应用 Image-Pro Plus6.0 软件对条带进行灰度分析。

5. CCK8 法检测培养心肌成纤维细胞的活力:

将第一代的心肌成纤维细胞铺至 96 孔板中(康宁),待细胞完全贴壁并融合至 70%~80% 时用无血清 DMEM 培养基饥饿 24 小时后,放入缺氧盒缺氧,以微需养缺氧包刺激细胞 24 小时。见缺氧指示剂由粉红色变为紫色再变为粉红色,表示缺氧成功,之后每孔加入 10 μ L CCK8 试剂(碧云天)和 90 μ L DMEM 培养基, 37°C 孵育 2 小时后应用酶标仪于 450 nm 波长处检测吸光度(OD)值,评价细胞增殖和细胞活力情况。每组设置 5 个复孔。

6. 心肌成纤维细胞迁移能力测试(划痕实验):

将心肌原带成纤维细胞接种于画好平行线的 6 孔板内,当细胞密度约为 80%时,饥饿(无血清培养基培养)24 小时后,用 200 μ L 的灭菌枪头沿之前画好的平行线制造划痕。用 PBS 溶液清洗 3 次,吸弃脱落细胞,后对细胞进行缺氧和药物干预,每组分别设 3 个复孔。分别在倒置显微镜下观察 0 小时、24 小时划痕区细胞的迁移情况,采用 ImageJ 软件对每个镜下视野迁移后的划痕宽度和划痕面积,迁移率以迁移后划痕面积占初始划痕面积的百分比进行计算。

7. 小鼠心梗模型构建:

采用 7-8 周的成年雄鼠(C57BL/6J 上海吉辉),术前 10 小时禁食禁水。脱毛备皮后,用异氟烷(400 ml/分钟)将其气体麻醉,剪开左侧胸部皮肤(约 0.5cm),暴露小鼠心脏,并用#7.0 无创缝线结扎小鼠左侧冠状动脉前降至近端,缝合胸腔,采集心电图和心超评估手术效果。

8. 小鼠心梗周边区纤维化程度检测(HE 染色及 Masson 染色):

心梗手术后第二天对小鼠予以 d5PAO/PAO 灌胃处理(0.3 mg/kg)干预,2 周后对各实验组小鼠进行气麻后脱颈处理,4%多聚甲醛灌流后,取出心脏组织后继续用 4%多聚甲醛固定 48 小时,再将组织进行石蜡包埋。切片并染色。

试剂和设备

试剂: 0.5%醇溶性伊红染液,改良的哈瑞(Harris)苏木素,0.5%盐酸酒精溶液。

1.1 伊红: 配制方法: 中性红 0.5 g, 80%酒精 100 mL,将伊红(sigma)溶于酒精内搅拌,全部溶解后即可使用。

1.2 苏木精: 配制方法: A 液: 苏木素(sigma) 1g, 无水酒精(国药) 10 mL; B 液: 硫酸铝钾(国药) 20 g, 蒸馏水 200 mL 两液分别溶解后混合,加热煮沸后,慢慢加入红色氧化汞 0.5 g, 此时有大量气泡产生,故容器要大,以防液体溢出,然后将染液迅速冷却,冷却后过滤,并每 100 mL 加入冰醋酸 6ml, 甘油 10 mL。

1.3 0.7%盐酸酒精溶液配制方法：盐酸 0.7 mL，70%酒精 100 mL。

试剂名称	生产商	货号	产地
酸性复红	国药	71019360	中国
丽春红	国药	71033761	中国
盐酸	国药	10011018	中国
无水乙醇	国药	10009218	中国
苯胺蓝	国药	71003644	中国
磷钼酸	沃凯	XW514297441	中国
冰醋酸	国药	10000208	中国

设备

- 半自动脱水机，生产商：Leica 型号：TP1020；
- 全自动石蜡包埋机，生产商：Leica 型号：EG1150；
- 5 全自动石蜡切片机，生产商：Leica 型号：RM2235；
- 尼康显微摄影图象处理软件 Nikon H500S 电子显微镜；
- NIS-Element 图像分析软件；
- 显微镜：Nikon Eclipse 50i 型号： H550S；
- 数码相机：Nikon 型号：DS-Fi1；
- 10 专业图像分析软件 Image pro plus 6.0。

实验方法

石蜡切片 HE 染色

- 1) 将 4 μm 石蜡切片置于烘箱中 60℃烤 1~2 小时，用常规二甲苯，乙醇脱蜡；
- 2) 用苏木素（Sigma）染 10 分钟，流水冲洗，去余色；
- 15 3) 用 0.7%盐酸乙醇（国药）分化数秒钟，流水冲洗；
- 4) 待切片变蓝约 15 分钟，在 7.95%乙醇中浸泡 30 秒钟；
- 5) 用酒精性伊红（Sigma）染 30 秒；
- 6) 用 95%乙醇固定 30+30 秒钟，然后用 100%乙醇（国药）固定 30+30 秒钟；
- 7) 用石碳酸二甲苯（1：4 石碳酸 1-二甲苯 4）处理 30 秒钟；
- 20 8) 用二甲苯处理 30 秒+30 秒钟；
- 9) 最后用中性树胶封片。

Masson 染色

- 1) 将石蜡切片置于烘箱中 60℃烤 1~2 小时；
- 2) 石蜡切片常规二甲苯，乙醇脱蜡至水；

3) Weigert 铁苏木素 (Weigert A 液和 Weigert B 液等体积混合液) 染 10 分钟, 流水下稍冲洗;

4) 1% 盐酸酒精分化, 流水下冲洗数分钟;

5) 酸性复红-丽春红液染色 5-10 分钟 (建议先试染色一张, 找到最佳的染色时间) 左右,

5 流水下稍冲洗;

6) 0.2% 醋酸水略洗;

7) 磷钼酸液分化染 3-5 分钟, 在镜下观察组织分化成不同程度的红色即可;

8) 0.2% 醋酸水略洗;

9) 苯胺蓝液染 1-5 分钟;

10 10) 0.2% 醋酸水略洗, 95% 酒精略洗;

11) 无水酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片, 镜检。

9. 动物组织提取物免疫印记 (WB) 检测 SMA 以及 Col 1A 蛋白表达

将构建完心梗的小鼠第二天予以 d5PAO/PAO 灌胃处理 (0.3 mg/kg) 干预, 2 周后

15 对各实验组小鼠进行气麻后脱颈处理, 4% 多聚甲醛灌流后, 取出心脏组织后继续用 4% 多聚

甲醛固定 48 小时, 再将组织进行石蜡包埋。切片并染色。取造模组的心梗区和干预组的心

梗区进行对比: 将组织剪碎, 加入适量含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂 (碧云天) 的 RIPA lysis

20 (碧云天) 对组织进行裂解, 期间涡旋震荡数次以保证蛋白裂解充分。然后将裂解物在 4°C,

12000g 离心 15 分钟, 上清即为获得的细胞总蛋白。采用 BCA 试剂盒 (碧云天) 对蛋白进

行定量。应用 SDS-PAGE 胶试剂盒 (雅酶) 胶对 30 μg 蛋白进行电泳。一抗采用 Col 1A 抗

25 (Abcam) 和 α-SMA (Abcam), 二抗使用 HRP 标记的抗体 (碧云天), GAPDH, tubulin 为

内参。应用 Image-Pro Plus6.0 软件对条带进行灰度分析。

10. 统计学处理

采用 SPSS22.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 t

检验; 计数资料以率 (%) 表示, 组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

11. 实验结果

表示与 control 比较, $^{\#}p < 0.05$, $^{##}p < 0.001$, $^{###}p < 0.0001$ 。* 表示与 model 比较, $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.001$, $^{***}p < 0.0001$ 。

d5PAO 和 PAO 对培养心肌成纤维细胞的影响

11.1 d5PAO 和 PAO 抑制缺氧刺激的培养心肌成纤维细胞的增殖 (CCK8 检测)

30 结果表明 (图 9), 在缺氧 24 小时培养条件下, 心肌成纤维细胞的增殖能力较之于对照

组有明显升高, 从对照组的 $100\% \pm 5.0\%$ 上升到缺氧组的 $137\% \pm 5.3\%$ 左右 ($^{###}p < 0.0001$) 说明

缺氧条件刺激了成纤维细胞的增殖和迁移（也证明纤维化模型的成功）。在缺氧的条件下分别加入不同浓度的 d5PAO/PAO，发现成纤维细胞的增殖和迁移能力也随之下降，当 d5PAO/PAO 的浓度达到 100 nM 的时候，与缺氧组相比有统计学意义（100 nM/L, $^{###}p<0.0001$ ）。低于 100 nM 的 PAO/d5PAO 对细胞存活率则没有明显改变。与 PAO 相似，100 nM 的 d5PAO 也可以抑制缺氧导致的成纤维细胞增殖和迁移（97.5%±3.9%， $^{###}p<0.0001$ ，与缺氧组相比）。实验说明 PAO 和 d5PAO 均可以有效抑制缺氧刺激的培养心肌成纤维细胞的生长。

11.2 PAO 抑制缺氧刺激诱导的细胞 SMA/Col 1A 基因的表达量（定量 PCR，Q-PCR）

SMA 和 Collagen-1 是典型的细胞纤维化标志蛋白。Q-PCR（图 10）揭示缺氧 24 小时可显著提高 SMA 基因的表达量（从 100%±0.9% 上升至 202%±10.2%， $P<0.0001$ ），而这个表达增强效应可被 PAO（25、50、100 nM）抑制，PAO 的抑制效应呈剂量依赖性：PAO 浓度越高，抑制效应越明显（SMA 表达量分别为 157%±6.9%， $P<0.05$ ；144%±5.5%， $P<0.001$ ；131%±8.5%， $P<0.001$ ）。

缺氧 24 小时亦可显著提高 Collagen-1 编码基因 Col 1A 的表达量（从 100%±0.6% 上升至 234%±9.8%），而这个表达增强效应可以被 PAO（50、100nM）抑制，PAO 的抑制效应亦呈剂量依赖性：PAO 浓度越高，抑制效应越明显（Col 1A 表达量分别为 171%±12.5%， $P<0.05$ ，163%±12%， $P<0.05$ ）。

11.3 PAO 抑制缺氧刺激诱导的细胞 Collagen-1 和 SMA 蛋白表达量（WB）

WB 结果（图 11）显示缺氧 24 小时可显著提高心肌细胞中 Collagen-1 蛋白的表达量（从 100%±0.6% 上升至 144%±7.0%， $P<0.005$ ），而这个表达增强效应可以被 PAO（12.5、25、50、100nM）抑制。PAO 的抑制效应呈剂量依赖性：PAO 浓度越高，抑制效应越明显，Collagen-1 的表达量分别为 118%±3.2%， $P<0.05$ ；114%±4.8%， $P<0.05$ ；112%±4.0%， $P<0.05$ ；105%±3.0%， $P<0.001$ 。

缺氧 24 小时亦可显著提高 SMA 蛋白表达量（从 100%±0.6% 上升至 131%±7.0%， $P<0.05$ ），而这个表达增强效应可以被 PAO（20、50、100nM）抑制，PAO 的抑制效应亦呈剂量依赖性：PAO 浓度越高，抑制效应越明显（SMA 表达量分别为 125%±6.4%， $P<0.05$ ，117%±4.6%， $P<0.001$ ，109%±8.7%， $P<0.001$ ）。

A1 和 G1 抑制缺氧刺激诱导的细胞 Collagen-1 和 SMA 蛋白表达量（WB）

WB 结果（图 12）显示缺氧 24 小时可显著提高心肌细胞中 Collagen-1 蛋白的表达量（从 100%±0.6% 上升至 125%±3.2%， $P<0.005$ ），而这个表达增强效应可以被 PI4KIIIα 的已知抑制剂 A1 和 G1（100nM/L）抑制。Collagen-1 的表达量分别为 104%±2.1%， $P<0.001$ ，83%±2.0%， $P<0.0001$ ；

缺氧 24 小时亦可显著提高 SMA 蛋白表达量(从 $100\% \pm 0.3\%$ 上升至 $127\% \pm 3.4\%$, $P < 0.05$), 而这个表达增强效应可以被 A1 和 G1 (100nM/L) 抑制, (SMA 表达量分别为 $41\% \pm 4.6\%$, $P < 0.0001$, $55\% \pm 8.7\%$, $P < 0.0001$)。考虑 A1 和 G1 为 PI4KIII α 的抑制剂, 从此 WB 的结果提示 PI4KIII α 很有可能和纤维化有密切的联系, 抑制 PI4KIII α 或 PI4KA 可能改善纤维化。

5 11.4 PAO 抑制缺氧诱导的心肌成纤维细胞迁移能力的增强 (划痕实验)

划痕实验表明(图 13), 缺氧 24 小时可显著提高细胞的迁移能力, 从对照组的 $100\% \pm 0.6\%$ 到 $140\% \pm 7.9\%$ ($P < 0.001$)。而 PAO (100 nM) 可有效抑制迁移能力的增长 ($113\% \pm 2.6\%$, $P < 0.05$)。d5PAO 也有相似功能, 在 100 nM 的浓度下有效抑制了缺氧诱导的迁移能力的增长 ($113\% \pm 3.8\%$, $P < 0.05$)。迁移率% = (初始划痕面积 - 24 h 后划痕面积) / 初始划痕面积 $\times 100\%$ 。

11.5 d5PAO 和 PAO 在心梗小鼠模型中的药效

1) PAO 有效抑制心梗区 SMA 和 Collagen-1 蛋白表达的增强

WB 结果 (图 14) 揭示心梗小鼠模型中心脏组织的 SMA 和 Collagen-1 蛋白表达量明显高于对照组, 从对照组到 $100\% \pm 0.6\%$ 增长到 $180\% \pm 11.2\%$ ($P < 0.001$), $162\% \pm 9.2\%$ ($P < 0.001$)。而 PAO (灌胃, 0.3 mg/Kg) 则可显著抑制这两个蛋白的增长, SMA 水平下降到 $138\% \pm 6.7\%$ ($P < 0.05$), 而 Collagen 水平则下降到 $128\% \pm 5.2\%$ ($P < 0.05$)。

2) PAO 有效抑制心梗区纤维化面积含 Collagen 区域面积的增大

心梗组 (MI) 的小鼠心脏呈现明显的创伤, 免疫组化染色显示心梗组的小鼠心脏的纤维化的面积大幅度升高 ($46.13\% \pm 2.0\%$, $P < 0.0001$), 而灌胃 PAO (0.3mg/Kg) 则可在一定程度上抑制纤维化的面积下降至 $32.9\% \pm 1.3\%$ ($P < 0.001$)。Masson 染色则显示 (图 15) 心梗组小鼠的心脏组织中含 Collagen 面积也大幅度增加 ($45.47\% \pm 1.7\%$, $P < 0.0001$), 同理, PAO 在一定程度上使得含 Collagen 面积下降至 $31.30\% \pm 1.48\%$ ($P < 0.001$)。

总结:

以上结果显示, PAO 和 d5PAO 可以抑制缺氧诱导的体外培养的心肌成纤维细胞的增殖。PAO 亦可抑制缺氧刺激诱导的细胞纤维化标志物 SMA 和 Collagen-1 蛋白及其编码基因 SMA 和 Col 1A 表达的增加, 以及受损后心肌细胞的迁移能力。PI4KIII α 或 PI4KA 的已知抑制剂 A1 和 G1 也可抑制缺氧诱导的 SMA 和 Collagen-1 蛋白增高。体内实验则表明 PAO 亦可有效抑制心梗区 SMA 和 Collagen-1 蛋白表达的增强, 以及心梗区纤维化面积含 Collagen 区域面积的增大。这些结果表明 PAO 和 d5PAO 可有效地阻止心脏在缺氧后的成纤维化, 从而成为潜在的治疗相关疾病的药物。

实施例 7. 氟代系列化合物对 α -synuclein 和 A β 42 的药学效作用比较

1. 实验材料

1.1 试剂和耗材

α -synuclein ELISA Kit 试剂盒购自 Thermo Fisher Scientific (Catalog No. KHB0061) ;

Amyloid beta 42 Human ELISA Kit 试剂盒购自 Thermo Fisher Scientific (Catalog No.

5 KHB3544) ;

Fugene HD 转染试剂购自 Promega (Beijing) Biotech Co., Ltd. (Catalog No.E2311) ;

α -synuclein 单克隆抗体 (Mouse monoclonal) 购自 Sigma-Aldrich (上海, Catalog No.S5566) ;

1.2 实验仪器

10 奥林巴斯 IX51 倒置显微镜, FV1000 激光共聚焦显微镜 购自 Olympus (Japan) 公司;

NovoStar 酶标仪购自 BMG (Germany) 公司;

1.3 质粒信息

质粒购自 Obio Technology (Shanghai) Corp., Ltd.

α -synuclein 过表达质粒信息如下:

15 序列:

ATGGATGTATTCATGAAAGGACTTTCAAAGGCCAAGGAGGGAGTTGTGGCTGCTGCTG
AGAAAACCAAACAGGGTGTGGCAGAAGCAGCAGGAAAGACAAAAGAGGGTGTTC
TATGTAGGCTCCAAAACCAAGGAGGGAGTGGTGCATGGTGTGGCAACAGTGGCTGAG
AAGACCAAAGAGCAAGTGACAAATGTTGGAGGAGCAGTGGTGACGGGTGTGACAGC
20 AGTAGCCCAAGACAGTGGAGGGAGCAGGGAGCATTGCAGCAGCCACTGGCTTTGT
CAAAAAGGACCAGTTGGGCAAGAATGAAGAAGGAGCCCCACAGGAAGGAATTCTGG
AAGATATGCCTGTGGATCCTGACAATGAGGCTTATGAAATGCCTTCTGAGGAAGGGTA
TCAAGACTACGAACCTGAAGCCTAA

载体图谱参见图 16。

25 2. 实验方法

2.1 细胞培养和给药处理:

SH-sy5y 的完全培养体系为 15%FBS 加入高糖 DMEM。使用 Fugene HD 转染试剂转染质粒, 培养 24 小时后饥饿处理, 即去除血清, 仅使用 DMEM 高糖培养基。培养 24 小时后更换为完全培养体系并给药处理。

30 稳转 APP (SW) HEK293 细胞系 (由中国科学院上海药物研究所章海燕课题组馈赠) 是转染瑞典双突变 APP695cDNA 的人胚胎肾细胞株, 在种板前需使用 20 μ g/mL 多聚赖氨酸 (Poly-D-Lysine, PDL) 处理孔板 24 小时。培养液为 10%FBS 加入高糖 DMEM, 并同时使用 200 μ g/mL G418 进行筛选。种板培养 48h 后饥饿处理, 即去除血清, 仅使用 DMEM 高糖培养基。培养 24 小时后更换为完全培养体系并给药处理。

35 2.2 噻唑蓝 (MTT) 法检测细胞活力

给药处理 12 小时，加入终浓度为 0.5 mg/mL 的 MTT，孵育 4 小时后吸去培养液，加入 100 μ L DMSO 溶解吸附的 MTT，振荡 15 分钟后读取吸光度值。

2.3 ELISA 检测

a) α -synuclein ELISA 检测

- 5 加 50 μ L Hu α -synuclein Detection Antibody solution 到各孔 (chromogen blanks empty 除外，即空白比色孔)，再加 50 μ L 样品及标曲 (标曲配制见图 17) 到各孔 (chromogen blanks empty 除外)，轻震荡混匀，盖膜 4°C 孵育过夜；用 1X Wash buffer 100 μ L 充分洗孔四次后，除空白比色孔外每孔加 100 μ L Anti-Rabbit IgG HRP 盖膜室温孵育 30 分钟再用 1X Wash buffer 充分清洗四次；加 100 μ L Stabilized Chromogen 到每孔，溶液变蓝，避光室温孵育 30 分钟；
- 10 加 100 μ L Stop Solution 到每孔。轻震荡混匀，溶液变黄，使用酶标仪 (波长 450nm) 读数。

b) A β ELISA 检测

- 于检测孔板对应孔中加入稀释标曲、空白对照和样本各 100 μ L。盖膜于 37°C 孵育 2 小时；弃去各孔中液体，加 100 μ L Detection Reagent A Working Solution 于各孔，盖膜于 37°C 孵育 1 小时；弃上清，用 1X Wash buffer 清洗各孔 3 次，每次 2 分钟且尽量无液体残留；加
- 15 100 μ L Detection Reagent B Working Solution 于各孔，盖膜于 37°C 孵育 1h；重复清洗操作 5 次；加 90 μ L Substrate Solution 到各孔，盖膜于 37°C 避光孵育 20 分钟。溶液变蓝；加 50 μ L Stop Solution 到每孔，轻震荡混匀，溶液变黄，尽快用酶标仪 (吸收波长 450nm) 读数。

2.4 统计分析

- 数据处理采用 GraphPad Prism 5 软件进行分析。使用单因素分析 (One-way ANOVA)
- 20 处理，mean $\pm$ SEM， $p < 0.03$ 有统计学差异。

3. 实验结果

3.1 氟代系列化合物对 SH-sy5y 细胞活力和对 α -synuclein 影响

- SH-sy5y 细胞使用含有 15%FBS 的高糖 DMEM 培养，经 Eugene HD 转染试剂转染空载 (vehicle) 质粒或 α -synuclein 过表达质粒，培养 24 小时后饥饿处理，即去除血清，仅使用
- 25 DMEM 高糖培养基培养 24 小时，根据分组分别给予不同浓度的 F2mPAO, F2oPAO 和 F3PAO 处理。分别于氟代系列化合物处理 4 小时和 24 小时后通过 MTT 实验检测细胞活力。实验结果显示：氟代系列化合物处理 4 小时后，各组与 α -synuclein 过表达 (α -syn OE) 组比较细胞活力均没有出现显著改变 (图 18A)；氟代系列化合物处理 24 小时后，100nM F2oPAO 和 100nM F3PAO 处理组与 α -syn OE 组比较细胞活力显著下降 (图 18B)。

- 30 不同浓度 F2mPAO、F2oPAO 或 F3PAO 处理 4 小时后收取细胞培养基上清，通过 ELISA 实验检测细胞培养基中 α -synuclein 含量。实验结果表明：与 α -synuclein 过表达 (α -syn OE)

组比较, α -syn OE 和 25 nM F2mPAO 共同处理组、 α -syn OE 和 50 nM F2mPAO 共同处理组以及 α -syn OE 和 25 nM F2oPAO 共同处理细胞培养上清中 α -synuclein 含量显著升高 (图 18C-D)

3.2 氟代系列化合物对稳转 APP (SW) HEK293 细胞活力和 A β 释放的作用

5 稳转 APP (SW) HEK293 细胞系 (由中国科学院上海药物研究所章海燕课题组馈赠) 是转染瑞典双突变淀粉样前体蛋白 (APP) 695cDNA 的人胚胎肾细胞株并带有 G418 筛选标记。在种板前需使用 20 μ g/mL 多聚赖氨酸 (Poly-D-Lysine, PDL) 处理孔板 24 小时。培养液为高糖 DMEM 加入 10%FBS, 并同时使用 200 μ g/mL G418 进行筛选。培养 48 小时后分别加入不同浓度的氟代化合物处理 4 小时或 24 小时, 通过 MTT 实验检测不同组细胞活力, 实验结果表明: 一定浓度 F2mPAO, F2oPAO 和 F3PAO 处理 HEK293 10 细胞系 4 小时和 24 小时对细胞活力没有明显影响 (图 19A-B)。

检测氟代系列化合物对稳转 APP (SW) HEK293 细胞 A β 释放的作用的实验中, 培养 48h 后饥饿处理 24 小时后更换为完全培养体系, 同时化合物处理 4 小时, 通过 ELISA 检测细胞培养上清中 A β 水平。实验结果: 与对照组比较, 50 nM 和 75 nM F3PAO 处 15 理组细胞上清中 A β 浓度显著增多 (图 19C-D)。

实施例 8. 氟代系列化合物对亨廷顿蛋白 (HTT) 和超氧化物歧化酶 1 (SOD1) 的作用

1. 实验材料

1.1 试剂和耗材

20 Human Superoxide Dismutase 1 试剂盒购自 Signalway Antibody LLC. (SAB, Catalog No.EK16688);

Human Huntingtin (HTT) ELISA Kit 试剂盒购自 Signalway Antibody LLC. (SAB, Catalog No. EK2869)。;

Fugene HD 转染试剂购自 Promega (Beijing) Biotech Co., Ltd. (Catalog No.E2311);

25 Fugene HD 转染试剂购自 Promega (Beijing) Biotech Co., Ltd. (Catalog No.E2311);

1.2 实验仪器

NovoStar 酶标仪购自 BMG (Germany) 公司;

1.3 质粒信息

以下质粒购自 Obio Technology (Shanghai) Corp.,Ltd.

30 1) 基因名称: HTT(1-586aa); GenBank ID:NM_002111; 空载体图谱和全图谱如图 20-21 所示;

2) 基因名称: SOD1, 基因 ID: 6647; 空载体图谱和全图谱如图 22-23 所示。

2. 实验方法

2.1 细胞培养和给药处理:

SH-SY5Y 的完全培养体系为 15%FBS 加入高糖 DMEM。使用 Fugene HD 转染试剂转染质粒, 培养 24 小时后饥饿处理, 即去除血清, 仅使用 DMEM 高糖培养基。培养 24 小时后更换为完全培养体系并给药处理。

2.2 噻唑蓝 (MTT) 法检测细胞活力

给药处理 12 小时, 加入终浓度为 0.5 mg/mL 的 MTT, 孵育 4 小时后吸去培养液, 加入 100 μ L DMSO 溶解吸附的 MTT, 振荡 15 分钟后读取吸光度值。

2.3 ELISA 检测

a) SOD1 ELISA 检测

于检测孔板对应孔中加入稀释标曲、空白对照和样本各 100ul。盖膜于 37°C 孵育 2h; 弃去各孔中液体, 加 100ul Detection Reagent A Working Solution 于各孔, 盖膜于 37°C 孵育 1h; 弃上清, 用 1X Wash buffer 清洗各孔 3 次, 每次 2 分钟且尽量无液体残留; 加 100ul Detection Reagent B Working Solution 于各孔, 盖膜于 37°C 孵育 1 小时; 重复清洗操作 5 次; 加 90 μ L Substrate Solution 到各孔, 盖膜于 37°C 避光孵育 20 分钟。溶液变蓝; 加 50 μ L Stop Solution 到每孔, 轻震荡混匀, 溶液变黄, 尽快用酶标仪 (吸收波长 450nm) 读数。

b) Human Huntingtin ELISA 检测

于检测孔板对应孔中加入稀释标曲、空白对照和样本各 50 μ L; 立即加 50 μ L Detection A Working Solution 于各孔。轻柔震荡混匀后, 盖膜于 37°C 孵育 1h; 移去各孔中液体, 用 1X Wash buffer 清洗各孔 3 次, 每次 2 分钟且尽量无液体残留; 加 100ul Detection Reagent B Working Solution 于各孔。盖膜于 37°C 孵育 45 分钟, 重复清洗操作 5 次; 加 90 μ L Substrate Solution 到各孔。盖新膜于 37°C 避光孵育 10-20 分钟; 加 50 μ L Stop Solution 到每孔, 轻柔震荡混匀, 溶液变黄, 立即用酶标仪 (吸收波长 450 nm) 读数。

2.4 统计分析

数据处理采用 GraphPad Prism 5 软件进行分析。使用单因素分析 (One-way ANOVA) 处理, mean $\pm$ SEM, p<0.03 有统计学差异。

3. 实验结果

3.1 氟代系列化合物促进亨廷顿蛋白 (HTT) 分泌

SH-SY5Y 细胞系经完全培养基 (15%FBS 溶于高糖 DMEM) 培养并转染 HTT 过表达 (HTT-OE) 质粒处理 24 小时, 饥饿处理 (高糖 DMEM) 24 小时, 再给予氟代系列化合物

处理 24 小时。通过 MTT 实验检测各组细胞存活率,并与 HTT-OE 组比较,经 One-way ANOVA 分析,结果显示: HTT-OE 组细胞存活率显著低于对照 (ctrl) 组 (图 24A), 氟代系列化合物各处理组与 HTT-OE 组细胞存活率没有明显变化。

SH-SY5Y 细胞系使用 Fugene HD 转染 HTT 过表达质粒并培养 24 小时后饥饿处理 24 小时,根据分组经化合物处理 4 小时,通过 ELISA 检测细胞培养液上清中 HTT 水平。结果显示,与对照组比较,HTT-OE 组细胞培养基中 HTT 蛋白浓度显著升高;与 HTT-OE 组比较,HTT-OE 与 25nM F3PAO 共同处理组细胞培养基中 HTT 蛋白水平明显增多,其他处理组同样表现出促进 HTT 分泌的趋势 (图 24B),以上结果提示一定浓度氟代系列化合物能够促进 HTT 蛋白分泌。

10 3.2 氟代系列化合物促进超氧化物歧化酶 1 (SOD1) 分泌

SH-SY5Y 细胞系经完全培养基 (15%FBS 溶于高糖 DMEM) 培养并转染 SOD1 过表达 (SOD1-OE) 质粒处理 24 小时,饥饿处理 (高糖 DMEM) 24 小时,再给予氟代系列化合物处理 24 小时。通过 MTT 实验检测各组细胞存活率,并与 SOD1-OE 组比较,经 One-way ANOVA 分析,结果显示: SOD1-OE 组细胞存活率显著低于对照 (ctrl) 组 (图 25A), 氟代系列化合物各处理组与 HTT-OE 组细胞存活率没有明显变化。

SH-SY5Y 细胞系使用 Fugene HD 转染 SOD1 过表达质粒并培养 24 小时后饥饿处理 24 小时后根据分组经化合物处理 4 小时,通过 ELISA 检测细胞培养液上清中 SOD1 水平。结果显示,与对照组比较, SOD1-OE 组细胞培养基中 HTT 蛋白水平显著升高;与 SOD1-OE 组比较, 氟代系列化合物处理组表现出促进 SOD1 分泌的趋势 (图 25B)。

20 **实施例 9. 氟代系列化合物对戈谢病的治疗作用**

1. 细胞培养

SH-sy5y 的完全培养体系为 15%FBS 加入高糖 DMEM。100μM CBE 处理 SH-SY5Y 细胞 24 小时,饥饿 (不含 FBS 高糖 DMEM) 和 100 μM CBE 处理共同处理 24 小时,再给予不同浓度氟代系列化合物处理 24 小时。

25 2. 噻唑蓝 (MTT) 法检测细胞活力

给药处理 24 小时,加入终浓度为 0.5 mg/mL 的 MTT,孵育 4 小时后吸去培养液,加入 100 μL DMSO 溶解吸附的 MTT,振荡 15 分钟后读取吸光度值。

3. Lyso-tracker 染色

100 μM CBE 处理 SH-SY5Y 细胞 24 小时,饥饿 (不含 FBS 高糖 DMEM) 和 100 μM CBE 处理共同处理 24 小时,再给予不同浓度氟代系列化合物处理 24 小时,加入 Lyso-tracker 处理 30 分钟后更换新鲜培养液,同时加入不同浓度氟代系列化合物处理。孵育 10 分钟后使用

4%多聚甲醛处理 30 分钟后加入 PBS 清洗 3 次，每次清洗 10 分钟。使用封片剂封片后通过显微镜观察。

4. 实验结果

4.1 氟代系列化合物抑制 CBE 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡或死亡

5 Conduritol B epoxide (CBE) 是溶酶体葡糖脑苷脂酶 GBA 基因编码的 GBA1 酶的抑制剂，是常用于构建戈谢病 (Gaucher disease, GD) 的细胞和动物模型。100 μ M CBE 处理 SH-SY5Y 细胞 24 小时，根据不同分组加入一定浓度氟代系列化合物共孵育 24 小时，通过 MTT 实验检测细胞活力。实验结果显示，与 100 μ M CBE 处理组比较，50 nM F2mPAO 与 100 μ M CBE 共同处理组、50 nM F3PAO 与 100 μ M CBE 共同处理组细胞活力显著升高 (图 10 26)，提示一定浓度的氟代系列化合物对 CBE 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡或死亡有保护作用。

4.2 氟代系列化合物促进溶酶体外排

GD 是一类常见的溶酶体贮积病，通过溶酶体标志物 DND99 (Lyso-tracker red DND99) 研究氟代系列化合物是否减轻 CBE 导致的溶酶体贮积。实验结果显示，与对照组 (ctrl) 比较，100 μ M CBE 处理组与 100 μ M CBE Lyso-tracker 的荧光强度升高 (图 27A-B)，提示 CBE 15 处理导致 SH-SY5Y 细胞中溶酶体贮积。与 100 μ M CBE 处理组比较，50nM F2mPAO 与 100 μ M CBE 共同处理组、50 nM F2oPAO 与 100 μ M CBE 共同处理组、25nM F3PAO 与 100 μ M CBE 共同处理组以及 50 nM F3PAO 与 100 μ M CBE 共同处理组细胞活力显著升高使 Lyso-tracker 的荧光强度显著降低 (图 27A-B)。

实施例 10. 氟代系列化合物抑制炎症因子释放实验

20 BV2 细胞由小鼠小神经胶质细胞经逆转录病毒介导转染 v-raf/v-myc 获得永生化，并保留有小神经胶质细胞多种形态、表征和功能特征。在有关神经系统炎症的实验中，常用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激 BV2 细胞获得炎症细胞模型进行实验。本实验以 LPS 刺激 BV2 细胞为炎症细胞模型，观察氟代系列化合物对肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 和 CD206 等炎症因子表达和分泌的影响

25 1. 细胞培养及处理

BV2 细胞的培养基使用高糖 DMEM 加入 10%FBS，37 $^{\circ}$ C 5%CO₂ 细胞培养箱培养 48 小时，去除培养基并更换为含有 1 μ g/mL LPS (脂多糖，购自 Sigma，货号：L2880) 的高糖 DMEM 培养基 (无 FBS)，同时根据分组给予不同浓度氟代系列化合物共孵育。4 小时后，收取上清离心后供后续实验使用。

30 2. Mouse Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) ELISA 实验

Mouse Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF α) ELISA Kit 采购自 Signalway Antibody LLC，

货号 EK16997。按照产品说明进行以下实验：

- 1) 使用 Diluent buffer 配置标准品，浓度分别为：10 ng/mL，5 ng/mL，2.5 ng/mL，1.25 ng/mL，0.625 ng/mL，0.312 ng/mL，0.156 ng/mL，0。
- 2) 轻轻振荡 Detection Reagent A 和 Detection Reagent B，使用 Diluent buffer 分别稀释
- 5 Reagent A 和 Reagent B 至母液 1/100 达到工作液浓度。
- 3) 使用去离子水稀释 Wash solution 至母液的 1/30 形成工作液。
- 4) 分别向每孔中加入 100 μ L 待测样品或标准品，用封口膜封住孔板，37°C 孵育 2 小时；
- 5) 去除上清，不需要清洗；
- 6) 分别向每孔中加入 100 μ L Detection Reagent A 工作液，用封口膜封住孔板，37°C 孵育 1 小时；
- 7) 弃去上清，使用 300 μ L Wash solution 工作液清洗 3 次，每次静置 2 分钟，将孔板倒扣在吸水无尘纸上尽量去除清洗液；
- 8) 分别向每孔中加入 100 μ L Detection Reagent B 工作液，用封口膜封住孔板，37°C 孵育 1 小时；
- 9) 按照第 7) 步方法清洗孔板 5 次；
- 10) 分别向每孔中加入 90 μ L Substrate solution，观察孔板可见蓝色液体，用封口膜封住孔板，避光放置 37°C 孵育 20 分钟；
- 11) 分别向每孔中加入 50 μ L Stop solution，观察孔板可见蓝色液体变黄，用封口膜封住孔板，用摇床转摇混匀 10 分钟；
- 12) 使用酶标仪（NOVOstar 转液式酶标仪）读取样品在 450nm 波长吸光度值。

3. 免疫荧光染色实验

- BV2 细胞经处理 12 小时后吸去上清，加入磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)清洗 3 次；加入 4%多聚甲醛 (Paraformaldehyde, PFA) 室温静置 30 分钟；弃去 4% PFA，经 PBS 清洗 3 次，每次 10 分钟；加入 0.3%非离子型去垢剂 Triton-X (溶于 PBS)，室温静置 30 分钟；吸除 0.3%Triton-X，加入含有 10%山羊血清 (goat serum, GS) 的 PBS 封闭液，室温静置 1 小时；4°C 孵育一抗过夜（一抗使用 10%GS 封闭液进行稀释，TNF- α 稀释比例 1: 100，CD206 稀释比例 1: 100）。次日，使用 PBS 清洗 3 次，每次 10 分钟；孵育二抗 Alexa Flour 555 山羊抗兔 IgG (使用封闭液稀释，稀释比例为 1: 500，并加入 1 μ g/mL 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI))，室温静置 2 小时，加入 PBS 清洗 3 次，每次清洗 10 分钟。使用封片剂封片后通过显微镜观察。

4. 统计

数据处理和统计采用 GraphPad Prism5 软件, 数据用平均值 $\pm$ 标准误 (mean $\pm$ SEM) 表示。比较组间差异用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 统计, $p < 0.03$ 认为有统计学差异。

5. 实验结果

BV2 细胞使用高糖 DMEM 加入 10%FBS 培养基培养, 37°C 5%CO₂ 细胞培养箱培养 48 小时, 去除培养基并更换为含有 1 μ g/mL LPS 的高糖 DMEM 培养基, 同时根据分组给予不同浓度氟代系列化合物共孵育 12 小时 (图 28)。小胶质细胞是中枢神经最重要的固有免疫细胞和主要的效应细胞, 它在阿兹海默症、帕金森病以及多发性硬化等疾病的免疫反应中既能分泌神经毒性因子又能分泌神经营养因子, 表现出促炎及抗炎的双重作用, 表现为 M1 型或 M2 型两种极化状态, 为了考察氟代系列化合物在 LPS 诱导的 BV2 细胞模型中发挥的作用, 对 M1 型小胶质细胞标志物 TNF α 和抑炎作用的 M2 型小胶质细胞标志物 CD206 进行免疫荧光染色。结果表明: 1 μ g/mL LPS 处理组 BV2 细胞中 TNF α 表达水平与对照组比较显著升高, 而与 1 μ g/mL LPS 处理组比较, 25 nM F2mPAO 与 1 μ g/mL LPS 共同处理组, 12.5 nM F3PAO 与 1 μ g/mL LPS 共同处理组以及 25 nM F3PAO 与 1 μ g/mL LPS 共同处理组的 TNF α 表达水平明显下降 (图 29A-B)。与各处理中的 TNF α 表达水平不同, 1 μ g/mL LPS 处理组 BV2 细胞中 CD206 表达水平与对照组比较有减少趋势, 而与 1 μ g/mL LPS 处理组比较, 一定浓度的 F2mPAO、F2oPAO 和 F3PAO 与 1 μ g/mL LPS 共同处理组的 CD206 有下降趋势 (图 29A 和 29C)。此外, 通过统计 CD206 信号强度与对应的 TNF α 荧光强度比值, 分析发现: 与 1 μ g/mL LPS 处理组比较, 25 nM F2mPAO 与 1 μ g/mL LPS 共同处理组、12.5 nM F3PAO 与 1 μ g/mL LPS 共同处理组以及 25 nM F3PAO 与 1 μ g/mL LPS 共同处理组 CD206 荧光强度与 TNF- α 荧光强度比值显著升高, 说明一定浓度的氟代系列化合物促进 M1 型 BV2 细胞向 M2 型极化 (图 30)。

为了进一步检测氟代系列化合物是否具有抑制炎症的作用, 在 LPS 诱导的 BV2 细胞模型中考察炎症因子的释放, 使用 ELISA (酶联免疫吸附实验) 方法检测培养基中 TNF- α 的浓度。结果如下: 1 μ g/mL LPS 处理组与对照组比较, 细胞培养基中 TNF- α 浓度显著升高 (图 31), 而与 1 μ g/mL LPS 处理组比较, 25 nM F2mPAO 与 1 μ g/mL LPS 共同处理组、50 nM F2mPAO 与 1 μ g/mL LPS 共同处理组、12.5 nM F2oPAO 与 1 μ g/mL LPS 共同处理组、25 nM F2oPAO 与 1 μ g/mL LPS 共同处理组、50 nM F2oPAO 与 1 μ g/mL LPS 共同处理组、12.5 nM F3PAO 与 1 μ g/mL LPS 共同处理组、25 nM F3PAO 与 1 μ g/mL LPS 共同处理组以及 50 nM F3PAO 与 1 μ g/mL LPS 共同处理组细胞培养基中 TNF- α 浓度显著降低 (图 31)。

30 实施例 11. 氟代、氘代化合物在肿瘤细胞系中的药效研究

1. 实验方法:

细胞铺板

配制完全培养基，充分混匀。将复苏的肿瘤原生代细胞（上海睿智化学有限公司），传两代左右选择生长状态良好的细胞株。贴壁细胞：吸掉培养基，用胰酶洗一遍，弃掉废液，加 3ml 新鲜胰酶于培养瓶消化。待细胞松动要脱离瓶壁时，加 8 mL 完全培养基中止胰酶消化，并轻轻混匀。用移液管将细胞悬液移入离心管中，1000 rpm 的转速离心 4 分钟。悬浮细胞：吸取细胞悬液并移入离心管中，1000 rpm 的转速离心 4 分钟。弃上清。向离心管中加适当体积的培养基，轻柔吹打使细胞重悬均匀。使用 Vi-Cell XR 细胞计数仪计数。将细胞悬液调至合适浓度。

化合物板的配制及添加

待测化合物：化合物在 DMSO 中配制成 10 mM 溶液，化合物在 DMSO 中稀释成 0.5 mM 溶液。用 HPD300 仪器将化合物加入相应细胞孔中。在二氧化碳培养箱中孵育 72 小时。

试剂准备及检测

室温融化 CellTiter-Glo Buffer。将冻干 CellTiter Glo 底物平衡至室温。将 CellTiter-Glo Buffer 加入 CellTiter Glo 底物中并充分混匀。将细胞板取出平衡至室温。每孔中加入混匀后的 CellTiter Glo 试剂 100 μ L，避光振荡 10 分钟，孵育 10 分钟。将培养板放入 Envision 读板，记录 luminescence 读值结果；按下列公式计算抑制率：抑制率（%）= $(1 - (RLU \text{ compound} - RLU \text{ blank}) / (RLU \text{ DMSO} - RLU \text{ blank})) \times 100\%$ 。利用 XLFit 绘制药效抑制率曲线并计算 IC₅₀ 值。利用 4 参数模型[fit = (A+ ((B-A)/ (1+ (C/x) ^D)))]。

实验结果：

表 8. 氘代化合物在抑制肿瘤细胞增殖的作用比较

细胞系		d1PAO	d2PAO	d3PAO	星形孢菌素
		IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)
CCRF-CEM	急性淋巴 T 细胞白血病	33.51	31.92	23.85	8.05
KS-1	脑胶质母细胞瘤	43.47	45.94	30.94	2.25
NOMO-1	急性髓细胞白血病	58.08	59.40	40.98	16.02
RD	恶性胚胎横纹肌瘤	26.67	25.74	18.58	4.79
SUP-B15	急性淋巴 B 细胞白血病	34.24	33.57	22.94	10.78
TT	甲状腺髓样癌	109.41	107.06	75.39	83.92
CCF-STTG1	脑星型胶质细胞瘤	107.52	130.27	94.68	9.10
IMR-32	神经母细胞瘤	23.28	24.08	14.44	4.19
REH	急性非 B/非 T 细胞淋巴瘤	22.81	22.43	18.55	8.08
AN3 CA	子宫内膜腺癌	39.86	40.66	28.59	35.83

如表 8 所示：d1PAO、d2PAO、d3PAO 对所测试的肿瘤细胞都有抑制作用，d1PAO 与 d2PAO 两者的抑制作用 IC₅₀ 相近，而 d3PAO 优于前两者。三者对脑胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、急性淋巴 T 细胞白血病、急性非 B/非 T 细胞淋巴瘤、急性淋巴 B 细胞白血病、恶性胚胎横纹肌瘤，以及子宫内膜腺癌细胞的抑制作用最强，IC₅₀ 都小于 50 nM；对性髓细胞白血病细胞有较强的抑制作用，IC₅₀ 在 50-100nM；对状腺髓样癌和脑星型胶质细胞瘤细胞抑制作用最弱，IC₅₀>100 nM。

表 9. 氟代化合物在抑制肿瘤细胞增殖的作用比较。

细胞系		F2oPAO	F3PAO	星形孢菌素
		IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)
CCRF-CEM	急性淋巴 T 细胞白血病	33.79	34.81	8.05
KS-1	脑胶质母细胞瘤	42.15	36.27	2.25
NOMO-1	急性髓细胞白血病	60.18	48.23	16.02
RD	恶性胚胎横纹肌瘤	28.90	26.68	4.79
SUP-B15	急性淋巴 B 细胞白血病	25.86	25.99	10.78
TT	甲状腺髓样癌	119.51	94.77	83.92
CCF-STTG1	脑星型胶质细胞瘤	104.32	106.61	9.10
IMR-32	神经母细胞瘤	24.88	19.08	4.19
REH	急性非 B/非 T 细胞淋巴瘤	22.31	26.75	8.08
AN3 CA	子宫内膜腺癌	40.83	39.72	35.83

如表 9 所示：F2oPAO 和 F3PAO 对所测试的肿瘤细胞都有抑制作用，两者的抑制作用 IC₅₀ 相近。两者对脑胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、急性淋巴 T 细胞白血病、急性非 B/非 T 细胞淋巴瘤、急性淋巴 B 细胞白血病、恶性胚胎横纹肌瘤，以及子宫内膜腺癌细胞的抑制作用最强，IC₅₀ 都小于 50 nM；对急性髓细胞白血病细胞有较强的抑制作用，IC₅₀ 在 50-100nM；对甲状腺髓样癌和脑星型胶质细胞瘤细胞抑制作用最弱，IC₅₀ > 100 nM。

表 10. 氟代化合物在抑制肿瘤细胞增殖的作用比较

细胞系		F2oPAO	F2mPAO	F3PAO	星形孢菌素
		IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)
HeLa	宫颈癌	105.12	126.27	113.40	13.5
SK-HEP-1	肝癌	42.98	50.43	60.43	16.9
MCF7	乳腺癌	101.80	116.52	150.03	39.4
MDA-MB-231	乳腺癌	101.26	46.02	150.36	13.4
A549	肺癌	126.86	160.27	>200	13.1
NCI-H1299	肺癌	99.93	146.70	165.32	9.2

HT-29	结肠癌	92.66	139.68	155.07	15.5
A-431	皮肤癌	139.58	>200	>200	21.1
NCIN87 [N87]	胃癌	80.89	117.15	110.96	10.6
HCC827	肺癌	95.68	144.27	155.97	16.1
EL4	T 淋巴细胞癌	49.83	65.58	68.83	24
Daudi	血癌	40.84	59.16	69.53	15.5
U-2 OS	骨癌	29.23	42.36	44.92	5.3
Jurkat, Clone E6-1	血癌	72.48	74.96	105.05	21.4
K-562	骨髓癌	48.59	59.32	86.50	47
HL-60	血癌	53.72	48.23	64.85	24.5
SK-OV-3	卵巢癌	112.52	159.35	185.11	28
U-937	淋巴瘤	86.74	139.53	120.58	13.9
NAMALWA	血癌	31.27	39.30	48.80	19.9
KG-1	骨髓癌	84.22	85.27	118.49	15.6
A-375	黑色素癌	29.62	41.73	45.57	18

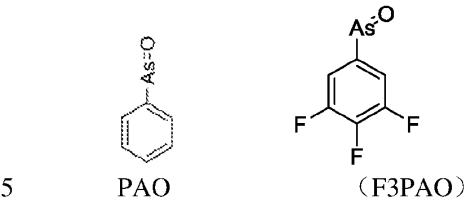
如表 10 所示：三个氟代化合物对所测试的肿瘤细胞都有抑制作用，且三者的抑制作用 IC₅₀ 相近，F2oPAO 的 IC₅₀ 稍低；三者对 U2-OS，NAMALWA，A-375 细胞的抑制作用最强，IC₅₀ 都小于 50 nM；对 SK-HEP-1、Daudi、K562，HL-60、Jurkat，Clone E6-1、NAMALWA 细胞都抑制作用较强，IC₅₀ 在 50-100 nM；对 A-431 细胞的抑制作用最弱。对其余细胞的 IC₅₀ 在 100-200 nM。

实施例 12. 下调 PI4KIII α 以及 PI4KIII α 抑制剂 PAO 和 F3PAO 对放射性射线照射导致的细胞组织损伤的作用评估

6 - 8 周龄，20 - 23g 的 C57BL/6 小鼠将被用于该实验。将小鼠按体重进行分组。分组后，将小鼠麻醉后，使用 X 射线对 G2 - G4 组小鼠给予 15 Gy 的一次性全身照射。造模当天定义为 Day 0。分组后当天、辐照后 1、3、5、7 天和取材当天，收集全部动物外周血进行白细胞计数。随后，每周对小鼠进行称重、检测小鼠唾液分泌。

试验材料与方法

受试物：氧化苯砷（PAO）和氟代氧化苯砷（F3PAO）



受试物制备:

因受试物对光敏感，实验过程中注意避免强光。

a.配置 F3PAO 母液（0.9 mg/mL）

弱光下，在称量纸上称取 F3 粉末 9 mg，放到棕色玻璃瓶中，加入溶媒中链脂肪酸(MCT) 10 mL，放入干净的搅拌子，避光超声 1 - 5 分钟混匀，避光（可用锡箔纸包裹）水浴（不高于 50℃）和磁力搅拌 1 - 2 小时，直到溶液澄清透明，把母液存放的条件为：避光冷藏（2 - 8℃）保存一年。

b.配置 F3PAO（0.15 mg/kg/day）剂量工作液（60 mL）0.015 mg/mL:

弱光下，取 F3 母液 1.0 mL，加入溶媒（MCT）59 mL 混匀。避光冷藏（2 - 8℃）保存一年。

c.配置 PAO 母液（0.9 mg/mL）

弱光下，在称量纸上称取 PAO 粉末 9 mg，放到棕色玻璃瓶中，加入溶媒中链甘油三酸酯（Medium chain triglycerides, MCT）（北京凤礼精求医药股份有限公司）10 mL，放入干净的搅拌子，避光超声 1 - 5 分钟混匀，避光（可用锡箔纸包裹）水浴（不高于 50℃）和磁力搅拌 1 - 2 小时，直到溶液澄清透明，把母液存放的条件为：避光冷藏（2 - 8℃）保存一年。

d.配置 PAO（0.3mg/kg/day）剂量工作液（90 mL）0.03 mg/mL:

弱光下，取 PAO 母液 3.0 mL，加入溶媒（MCT）87 mL 混匀。避光冷藏（2 - 8℃）保存一年。

动物、分组和给药方案

从上海吉辉购入共计 44 只 C57BL/6 小鼠，雄性，其中 4 只为备用动物，在澎立生物 SPF 动物房适应 3 天后，用于挑选合适体重范围的动物入组。分组后剩余的备用动物在试验终点接受过量二氧化碳的方式安乐死。动物均无携带特定病原，到达澎立生物动物房时约为 6 - 8 周。设计应用于动物的试验操作方案将由澎立生物 IACUC（试验动物管理和使用委员会）进行审批。

清洁级环境培养的约 7 月龄的 PI4KA（编码 PI4KIII α ）突变杂合子小鼠 [(Pi4kaGt(RRO073)^{Byg/+}]小鼠（MMRRC, Cat. #016351-UCD）及其同窝野生小鼠，分别 PI4K^{-/-}组和对照组。

根据动物体重，通过 BioBook 随机分配功能将动物随机分配到各个处理组中，以达到近似的各组均重，减少组间偏差。分组和给药信息详见下表

分组及给药方案

组 ^a	X 射线	灌胃	动物数	X 光(Gy/小鼠)	浓度	灌胃参数 ^a
----------------	------	----	-----	------------	----	-------------------

	照射		(只)		mg/mL	mL/kg	mg/kg
正常组	否	N/A	10	N/A	N/A	10	N/A
模型-溶酶组	是	MCT	10	15	N/A	10	N/A
PAO 组	是	PAO	10	15	0.03	10	0.3 p.o., qd
F3PAO 组	是	F3PAO	10	15	0.015	10	0.15 p.o., qd

a. 分组当天开始给药，持续 2 周。

X 射线照射

将小鼠麻醉 4 小时后，取血用于后续血液白细胞检测，然后使用 X 射线对各组小鼠分别给予 15 GY 剂量的照射。造模当天定义为 Day 0。

5 **X 射线照射后检测**

体重测量：X 射线照射前一周测体重 2 次，照射后每周三次，共 3 周；

唾液分泌：C57BL/6 小鼠分组后在造模前第-1 天、造模后第 7、14 和 90 天，分别注射毛果芸香碱（阿拉丁，批号：D1929095，货号：P129614）后，搜集 10 分钟内的唾液，测量唾液分泌量；

10 **白细胞计数：**动物接受 2 - 5%异氟烷麻醉后，所有的动物眼眶采 50 微升 EDTA-K₂ 抗凝全血，使用血常规仪器检测常规白细胞数量。血常规在分组后当天给药前、给药后 4 小时且在辐照前、辐照后第 3、5、7、14、30、60 和 90 天分别进行。

样本收集：在试验终点时（辐照后第 90 天），用 2 - 5%异氟烷麻醉后，所有的动物眼眶采最大量全血，EDTA-K₂ 抗凝，使用离心机在 1000 g，10 分钟，4℃条件下离心分离血浆，
15 -80℃保存备用。血样收集后，小鼠接受预冷的 PBS 和 4%的多聚甲醛经心灌流，然后剥离和收集唾液腺、肺组织等组织器官，拍照和称重、体外福尔马林再固定、脱水、石蜡包埋，用于后续的病理检测。

试验临床观察：试验中，若动物出现体重明显下降（下降超过 15%），或其他异常，则及时给予琼脂，并补葡萄糖生理盐水（10 mL/kg，皮下注射，每日 1 - 2 次），做好补液的记录。
20

统计分析

结果将以 Mean ± SEM 的方式呈现。将用相应的统计学方法进行检验。如果 P < 0.05，则认为有统计学显著性差异。

实验结果

如表 11 所示，X 射线照射后第 7 天，相对于正常组的唾液重量和体积，模型-溶媒组的都有显著下降，而 PAO 组的则都没无显著变化，且还显著高于模型-溶媒组的，F3PAO 组的唾液体积无显著变化，但唾液重量有显著下降，但是都比模型-溶媒组的有增高的趋势。X 射线照射后第 7 天，每只动物的唾液重量和体积与第-1 天自身的配对比较，正常组的都没有下降，且都还有显著增加，模型-溶媒组的都有大幅显著下降，PAO 组的都没有显著变化，F3PAO 组的有显著下降但幅度相对较小。这些结果说明 PAO 和 F3PAO 处理可减轻放射性照射导致唾液腺的损伤和唾液分泌减少。

如表 11 所示，X 射线照射后 3、5、7 天，模型-溶媒组、PAO 组和 F3PAO 组血液中的白细胞水平相对于正常组的都显著下降，其中第 3 天最低，第 5 和 7 天逐步恢复。但是第 3 和 5 天，PAO 组和 F3PAO 组血液中的白细胞水平相对于模型-溶媒组的白细胞显著增高或有增高的趋势，第 7 天时，模型-溶媒组、PAO 组和 F3PAO 组血液中的白细胞水平无明显差异。提示 PAO 和 F3PAO 处理可减轻放射性照射导致的白细胞下降。

如表 11 所示，X 射线照射后 3、5、7 天，模型-溶媒组、PAO 组和 F3PAO 组的体重正常组的体重组相对于正常组的都显著下降，其中第 5 天最低，第 7 天有所恢复。但是第 3 和 5 天，PAO 组和 F3PAO 组的体重相对于模型-溶媒组的体重显著增高或有增高的趋势。提示 PAO 和 F3PAO 处理可减轻放射性照射导致的体重下降。

由于 PAO 组的给予 PAO 剂量是 0.3mg/kg/day，F3PAO 组给予 F3PAO 的剂量是 0.15mg/kg/day，且 F3PAO 的分子量比 PAO 的高 30%，所以 F3PAO 组给药的摩尔量只是 PAO 组的 35%，所以上述结果不能表明 PAO 抗放射性射线引起损伤的作用比 F3PAO 强。

表 11. PAO 和 F3PAO 对 X 射线引起的组织细胞损伤的影响

时间	检测项目	正常组 (10 只)	模型-溶媒组 (10 只)	PAO 组 (10 只)	F3PAO 组 (10 只)
第-1 天	血白细胞 (10 ⁹ /L)	8.75 ± 0.6	9.36 ± 0.71	10.17 ± 0.82	9.95 ± 0.74
	体重 (克)	20.97 ± 0.19	20.89 ± 0.21	20.89 ± 0.19	20.94 ± 0.19
	唾液重量 (克)	0.147 ± 0.006	0.148 ± 0.004	0.146 ± 0.003	0.145 ± 0.002
	唾液体积 (μL)	95.3 ± 5.6	93.4 ± 3.5	92.0 ± 2.9	93.2 ± 2.3
第 0 天	血白细胞 (10 ⁹ /L)	8.25 ± 0.73	6.53 ± 0.45	8.67 ± 0.85	8.67 ± 0.54
第 3 天	血白细胞 (10 ⁹ /L)	8.05 ± 0.46	###0.42 ± 0.02	###0.71 ± 0.09*	###0.49 ± 0.07
	体重 (克)	20.42 ± 0.17	###18.82 ± 0.23	###19.23 ± 0.19	###19.4 ± 0.17
第 5 天	血白细胞 (10 ⁹ /L)	9.93 ± 0.54	###1.09 ± 0.1	###1.44 ± 0.13*	###1.15 ± 0.07
	体重 (克)	20.71 ± 0.21	###18.58 ± 0.18	###18.74 ± 0.23	###19.22 ± 0.19*

第 7 天	血白细胞 (10 ⁹ /L)	10.03 ± 0.52	###1.36 ± 0.11	###1.39 ± 0.14	###1.36 ± 0.13
	体重 (克)	21.15 ± 0.2	###19.13 ± 0.24	###19.31 ± 0.24	###19.2 ± 0.28
	唾液重量 (克)	0.178 ± 0.014 ^Y	###0.089±0.01 ^{YYY}	0.142 ± 0.013**	0.107 ± 0.016 ^Y
	唾液体积 (μL)	127.0 ± 12.3 ^Y	###47.1 ± 6.3 ^{YYY}	97.6 ± 11.5**	##64.3 ± 11.8 ^Y
第 14 天	血白细胞 (10 ⁹ /L)	8.66 ± 0.73	###1.13 ± 0.11	###1.09 ± 0.15	###1.17 ± 0.13
	体重 (克)	22.44 ± 0.29	###20.41 ± 0.25	###20.33 ± 0.28	###20.29 ± 0.29
	唾液重量 (克)	0.21 ± 0.02 ^Y	###0.09 ± 0.02	*0.14 ± 0.01***	*0.13 ± 0.01*
	唾液体积 (μL)	155.52±22.44 ^Y	###44.73 ± 3.75	*94.33± 9.12***	##81.99±12.06***

T 检验, “###”= P<0.001 和 “#”= P<0.05 (与正常组比较), “*”= P<0.1 和 “**”= P<0.01 (与模型-溶媒组比较), “YYY”= P<0.001 和 “Y”= P<0.05 (与第-1 天自身的配对比较)。

实施例 13. PAO 对动脉粥样硬化泡沫细胞形成的影响

动脉粥样硬化是心脑血管疾病中最为常见的一种, 以血管内膜形成粥样或纤维斑块为特征, 主要累及大动脉和中动脉, 导致管壁变硬, 管腔狭窄和弹性减弱, 引起相应器官缺血性改变。泡沫细胞的形成贯穿动脉粥样硬化发生发展, 是动脉粥样硬化标志点。泡沫细胞的形成是由脂质摄取、胆固醇酯化和胆固醇流出三个相互关联的主要生物过程的平衡失调造成的。脂质摄取和胆固醇酯化增加, 而胆固醇外流不足, 最终结果是巨噬细胞中胆固醇酯 (CE) 过度积累, 形成泡沫细胞。

动脉粥样硬化的病理机制中最核心的环节是由巨噬细胞所介导的。由于血液的低密度脂蛋白 (LDL) 透过动脉内皮的缝隙或通过被血管内皮细胞主动转运, 在血管内皮下沉积, 并被氧化生成氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL)。内皮下的 ox-LDL 可与巨噬细胞膜上的受体 (如 SR-A、CD36、LOX-1) 结合后被内吞到细胞内, 被溶酶体酸性脂肪酶降解出胆固醇酯。胆固醇酯可进一步生成游离胆固醇和游离脂肪酸。过量游离胆固醇对细胞有毒性作用。游离胆固醇又被乙酰辅酶 A 乙酰转移酶 1 (ACAT1) 和乙酰辅酶 A 乙酰转移酶 2 (ACAT2) 在内质网中再酯化为胆固醇酯, 从而形成泡沫细胞中大量存在的脂滴, 脂滴可被油红 O 染色显示。当巨噬细胞内胆固醇酯含量超过总胆固醇含量的 50%, 可形成巨噬细胞源性泡沫细胞。随着疾病的进展, 动脉中膜的平滑肌细胞经内弹力膜窗孔迁入内膜, 吞噬脂质形成肌源性泡沫细胞。平滑肌细胞增生迁移并合成细胞外基质, 形成纤维帽。泡沫细胞坏死崩解后形成粥样坏死物, 动脉粥样斑块形成。

1. PAO 及其衍生物降低巨噬细胞摄取的氧化低密度脂蛋白后形成脂滴。

实验方法:

1) 细胞培养: THP-1 细胞购于中国科学院上海细胞库, 使用 RPMI 1640 (Gibco

C11875500BT)+10% FBS (Gibco 10099141C), 置于 37°C、5%CO₂ 培养箱中, 每 3 天传代一次。

2) 诱导分化: 取对数期 THP-1 细胞, 充分吹打混匀, 向培养基中加入 PMA (Sigma P1585), 使 PMA 终浓度为 100 nM。将细胞悬液加入 24 孔板中, 37°C 培养 72 小时。随后在显微镜下观察细胞, 细胞由悬浮状态转为贴壁状态, 并伸出伪足。

3) 分组及处理: 诱导分化后的细胞随机分成六组, Control 组、Model 组、Model+10 nM PAO、Model+20 nM PAO、Model+40 nM PAO、Model+60 nM PAO。Control 组使用无血清培养基培养 2 天。Model 组使用含有 60 ug/ml ox-LDL (广州奕元生物, YB-002) 的无血清培养基培养 2 天。给药组使用含有 60 ug/ml ox-LDL 的无血清培养基培养 1 天, 随后更换为含有 60 ug/ml ox-LDL 及不同浓度 PAO 的无血清培养基继续培养 1 天。

4) 油红 O 染色: 处理结束后, 使用 PBS 冲洗两遍, 加入 4%多聚甲醛溶液室温固定 30 分钟, 固定结束后 PBS 冲洗两遍。随后使用改良油红 O 试剂盒 (碧云天 C0158S) 染色。加入染色洗涤液覆盖细胞 20 秒。吸除染色洗涤液, 加入油红 O 染色工作液, 室温染色 30 分钟。去除油红 O 染色工作液, 加入适量染色洗涤液, 静置 30 秒, 然后去除染色洗涤液, 用 PBS 洗涤 20 秒。加入 PBS, 均匀覆盖细胞, 显微镜下观察和拍照。

实验结果:

如图 32 所示, 被 ox-LDL 处理分化后的 THP-1 细胞 (model) 的油红 O 染色的信号比未被 ox-LDL 处理的细胞 (control) 强, 提示细胞内脂滴蓄积, 这种细胞内的脂滴蓄积可被 PAO 明显减轻, 且呈剂量依赖性 (M+PAO)。F2mPAO 和 F3PAO 也具有同样的功能

2. PAO 及其衍生物促进被巨噬细胞摄取的荧光标记的氧化低密度脂蛋白的清除

实验方法:

1) 细胞培养: THP-1 细胞购于中国科学院上海细胞库, 使用 RPMI 1640 (Gibco C11875500BT)+10% FBS (Gibco 10099141C), 置于 37°C、5%CO₂ 培养箱中, 每 3 天传代一次。

2) 诱导分化: 取对数期 THP-1 细胞, 充分吹打混匀, 向培养基中加入 PMA (Sigma P1585), 使 PMA 终浓度为 100 nM。将细胞悬液加入放有细胞爬片的 24 孔板中, 37°C 培养 72 小时。随后在显微镜下观察细胞, 细胞由悬浮状态转为贴壁状态, 并伸出伪足。

3) 分组及处理: 诱导分化后, 使用无血清培养基处理细胞 18 小时, 随后将细胞分为 4 组, Dil-ox-LDL 组、PAO 20 nM 组、PAO 40 nM 组、PAO 60 nM 组。其中 Dil-ox-LDL 组用含有 40 ug/mL Dil-ox-LDL (广州奕元生物, YB-010) 的无血清培养基培养 7 小时, 给药组用含有 40 ug/mL Dil-ox-LDL 的无血清培养基培养 6 小时, 随后向培养基中加入不同浓度的

PAO, 继续培养 1 小时。

4) 固定及制片: 处理结束后, 使用 PBS 冲洗两次, 4%多聚甲醛溶液室温固定 30 分钟, 固定后使用 PBS 冲洗两次。使用 DAPI 染色液室温下染色 10 分钟, 结束后使用 PBS 冲洗两次。将爬片从 24 孔板中取出制片。

5) 激光共聚焦显微镜观察拍照。

实验结果:

如图 33 所示, THP-1 细胞能摄取大量的荧光标志的 ox-LDL (DiI-ox-LDL), PAO 能促进 THP-1 细胞内 DiI-ox-LDL 的清除, 且呈剂量依赖性。

实施例 14. PAO 及其衍生物体外抑菌活性

待测试菌株以及测试均由上海药明康德提供和实施。测试物 PAO、d5PAO 以及 F3PAO 均配制成 64 $\mu\text{g/mL}$ 的母液, 然后进行梯度稀释加入到病原菌培养皿中。化合物对病原菌的体外最小抑菌浓度 (Minimum inhibitory concentration, MIC) 测试参考美国临床和实验室标准协会 (The Clinical & Laboratory Standards Institute, CLSI) 提供的标准方法。对需氧菌的体外药敏测试参考 CLSI M07, M100; 对厌氧菌的体外药敏测试参考 CLSI M11, M100; 对幽门螺杆菌的体外药敏测试参考 CLSI M100; 对真菌的体外药敏测试参考 CLSI M27, M38, M60; 对阴道滴毛虫的 MIC 测试参考文献 (Mohammad MATINI & Amir Hossein MAGHSOOD. 2016. *In Vitro Susceptibility of Iranian Isolates of Trichomonas vaginalis to Metronidazole*. Iran J Parasitol. Vol. 11, No. 1, Jan -Mar 2016, pp. 46-51. UPCROFT, J.A. & UPCROFT P. 2001. Drug susceptibility testing of anaerobic protozoa. Antimicrob Agents Chemother, 45, 1810-4.)

微量液体稀释法: 细菌在含梯度稀释化合物的培养基 (如离子调节的米勒-辛顿肉汤培养基) 中培养后, 肉眼观察细菌生长状态。目测细菌生长被明显或完全抑制的最低化合物浓度点被定义为该化合物的最小抑菌浓度。

琼脂稀释法: 细菌在含梯度稀释化合物的固体培养基平板 (如添加 5 $\mu\text{g/mL}$ hemin, 1 $\mu\text{g/mL}$ vitamin K1 以及 5% 无菌脱纤维裂解马血的布鲁氏固体培养基) 上培养后, 肉眼观察细菌生长状态。目测细菌生长被明显或完全抑制的最低化合物浓度点被定义为该化合物的最小抑菌浓度。

不同菌株实验采用不同类别的、在临床上常规运用的广谱抗菌素作为阳性对照。**利奈唑胺**是抑制革兰阳性(G+)球菌引起的感染抗菌素;**粘杆菌素**抗菌谱范围宽广, 特别对革兰氏阴性细菌作用颇强, 毒性较弱。**伏立康唑**是三唑类抗真菌化合物, 可作用于严重的真菌感染。**环丙沙星**是喹诺酮类抗菌药物, 具广谱抗菌活性, 对肠杆菌、绿脓杆菌、流感嗜血杆菌、淋

球菌、链球菌、军团菌、金黄色葡萄球菌具有抗菌作用。**克拉霉素**抗菌谱与红霉素相似。**克林霉素**临床上主要用于厌氧菌引起的腹腔和妇科感染，是金黄色葡萄球菌骨髓炎首选治疗药物。**甲硝唑**主要用于治疗或预防厌氧菌引起的系统或局部感染，对败血症、心内膜炎、脑膜感染以及使用抗生素引起的结肠炎也有效。

5 试验结果:

表 12. d5PAO、PAO、以及 F3PAO 对病原菌的最小抑制浓度 MIC ($\mu\text{g/mL}$) 列表

耐药菌株名称和菌种编号	*d5PAO	PAO	F3PAO	利奈唑胺	粘杆菌素	伏立康唑	环丙沙星
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51575 (粪肠球菌)	0.125	0.125	0.25	2	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 700221 (屎肠球菌)	0.125	0.25	0.25	4	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> NRS 384 (金黄色葡萄球菌)	≤ 0.0625	≤ 0.002	≤ 0.002	4	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> VRS1 (金黄色葡萄球菌)	≤ 0.002	≤ 0.002	≤ 0.002	4	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35983 (金黄色葡萄球菌)	≤ 0.002	≤ 0.002	≤ 0.002	2	-	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC-BAA-1605 (鲍曼不动杆菌)	2	1	0.5	-	0.5	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC BAA-2469 (大肠杆菌)	≤ 0.0625	≤ 0.0625	0.125	-	0.25	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC BAA-1705 (肺炎克雷伯菌)	0.5	0.25	1	-	0.5	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC BAA-1143 (阴沟肠杆菌)	1	1	1	-	0.25	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 13437 (铜绿假单胞杆菌)	0.25	0.25	1	-	0.5	-	-
<i>Candida albicans</i> ATCC MYA-2876 (白念珠菌)	2	2	0.5	-	-	0.03	-
<i>Candida albicans</i> ATCC-MYA-574 (白念珠菌)	2	2	1	-	-	1	-
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019 (近平滑白念珠菌)	1	1	1	-	-	0.03	-
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC MYA-4609 (烟曲霉)	8	4	2	-	-	1	-
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC 49226 (淋病奈瑟氏菌)	≤ 0.0625	≤ 0.0625	0.125	-	-	-	0.008
耐药菌株名称和编号	*d5PAO	PAO	F3PAO	伏立康唑	克拉霉素	克林霉素	甲硝唑
<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 208821 (新型隐球菌)	0.06	0.06	0.016	0.03	-	-	
<i>Helicobacter pylori</i> ATCC	0.125	0.25	0.25	-	0.03	-	

43504 (幽门螺杆菌)							
<i>Helicobacter pylori</i> ATCC 700392 (幽门螺杆菌)	0.125	0.125	0.25	-	0.03	-	
<i>Helicobacter pylori</i> ATCC 700824 (幽门螺杆菌)	0.25	0.25	0.25	-	0.03	-	
<i>Bacterioides fragilis</i> ATCC 25285 (脆弱拟杆菌)	0.125	0.125	0.25	-	-	1	
<i>Clostridium difficile</i> ATCC 700057 (艰难梭菌)	0.5	0.5	0.5	-	-	>2	
<i>Clostridium tetani</i> ATCC 17891 (破伤风梭菌)	0.125	0.125	0.25	-	-	0.03	
<i>Gardnerella vaginalis</i> (Gardner and Dukes) ATCC 14018 (阴道加德纳菌)	0.125	0.125	0.25	-	-	0.125	
<i>Propionibacterium acnes</i> (<i>Cutibacterium acnes</i>) ATCC 11827 (痤疮丙酸杆菌)	0.125	0.125	0.25	-	-	0.0625	
<i>Atopobium vaginae</i> Rodriguez Jovita et al. ATCC BAA-55 (阴道阿托波氏菌)	0.006	0.003	0.006	-	-	0.008	
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> ATCC 27337 (厌氧消化链球菌)	0.25	0.25	0.25	-	-	0.5	
<i>Trichomonas vaginalis</i> ATCC 30236 (阴道毛滴虫)	0.25	0.25	0.125	-	-	-	0.25
耐药菌株名称和编号	d5PAO	PAO	F3PAO	粘菌素	左氧氟沙星		
<i>Escherichia coli</i> ATCC BAA-2469 (大肠杆菌)	0.0625	0.0625	0.25	0.5	16		
<i>Acinetobacter baumannii</i> WX-AB003 (鲍氏不动杆菌)	0.125	0.125	0.25	0.5	16		
<i>Acinetobacter baumannii</i> WX-AB004 (鲍氏不动杆菌)	0.25	0.125	0.25	1	0.125		
<i>Acinetobacter baumannii</i> WX-AB006 (鲍氏不动杆菌)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25		
<i>Acinetobacter baumannii</i> WX-AB019 (鲍氏不动杆菌)	0.25	0.125	0.25	0.25	1		
<i>Citrobacter kirschner</i> WX-C.kirschner001	≤0.0625	≤0.0625	0.25	0.25	>16		
<i>Enterobacter cloacae</i> WX-E.cloacae001 (阴沟肠杆菌)	≤0.0625	0.125	0.25	0.25	0.0625		
<i>Enterobacter cloacae</i> WX-E.cloacae002 (阴沟肠杆菌)	2	2	2	0.25	0.03125		
<i>Enterobacter cloacae</i> WX-E.cloacae003 (阴沟肠杆菌)	0.125	0.125	0.25	0.25	0.5		

<i>Escherichia coli</i> WX-EC008 (大肠杆菌)	≤0.0625	0.125	0.125	0.5	16		
<i>Escherichia coli</i> WX-EC018 (大肠杆菌)	≤0.0625	≤0.0625	0.25	0.25	16		
<i>Escherichia coli</i> WX-EC021 (大肠杆菌)	1	1	1	0.25	16		
<i>Escherichia coli</i> WX-EC022 (大肠杆菌)	0.125	0.125	0.25	0.25	0.5		
<i>Klebsiella oxytoca</i> WX-K.oxytoca001 (产酸克 雷伯氏杆菌)	0.125	0.125	0.5	0.25	16		
<i>Klebsiella oxytoca</i> WX-K.oxytoca002 (产酸克 雷伯氏杆菌)	0.125	0.125	0.5	0.25	0.5		
<i>Klebsiella oxytoca</i> WX-K.oxytoca003 (产酸克 雷伯氏杆菌)	0.125	0.125	0.5	0.25	0.5		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> WX-KP013 (肺炎杆菌)	0.5	0.5	1	0.5	>16		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> WX-KP021 (肺炎杆菌)	0.125	0.125	0.5	0.25	0.0625		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> WX-KP037 (肺炎杆菌)	≤0.0625	0.125	0.25	0.25	>16		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> WX-KP041 (肺炎杆菌)	≤0.0625	≤0.0625	1	0.25	1		
<i>Morganella morganii</i> WX-M.morganii001 (摩根氏 摩根氏菌)	0.5	0.5	2	>16	1		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> WX-PA008 (绿脓杆菌)	0.5	0.5	4	1	>16		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> WX-PA013 (绿脓杆菌)	0.5	0.5	2	1	1		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> WX-PA015 (绿脓杆菌)	0.5	0.5	1	1	1		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> WX-PA025 (绿脓杆菌)	1	1	32	1	8		
<i>Serratia marcescens</i> WX-S.marcescens001 (粘质 沙雷氏菌)	0.5	0.5	4	>16	0.25		
菌株名称和编号	d5PAO	PAO	F3PAO	利奈唑酮	左氧氟沙 星	伏立康 唑	
<i>Staphylococcus aureus</i> WX-SA007 (金黄葡萄球菌)	≤0.06	≤0.06	≤0.06	8	-	-	
<i>Staphylococcus aureus</i> WX-SA008 (金黄葡萄球 菌)	≤0.06	≤0.06	≤0.06	8	-	-	
<i>Staphylococcus aureus</i> WX-SA012 (金黄葡 萄球菌)	≤0.06	≤0.06	≤0.06	8	-	-	
<i>Staphylococcus aureus</i> WX-SA033 (金黄葡萄球 菌)	≤0.06	≤0.06	≤0.06	4	-	-	
<i>Enterococcus faecalis</i>	0.125	0.125	0.125	8	-	-	

WX-E.faecalis002 (粪肠球菌)							
Enterococcus faecalis WX-E.faecalis007 (粪肠球菌)	0.25	0.125	0.125	4	-	-	
Enterococcus faecalis WX-E.faecalis007 (粪肠球菌)	0.125	0.125	≤0.06	4	-	-	
Enterococcus faecalis WX-E.faecium010 (粪肠球菌)	0.25	0.25	0.25	4	-	-	
Streptococcus pneumoniae WX-SP001 (肺炎链球菌)	0.125	0.125	0.125	1	1	-	
Streptococcus pneumoniae WX-SP002 (肺炎链球菌)	0.125	0.125	0.25	1	1	-	
Candida albicans WX-CA007 (白色念珠菌)	64	64	8	-	-	0.0039	
Candida albicans WX-CA008 (白色念珠菌)	64	64	8	-	-	0.0078	
Candida albicans WX-CA009 (白色念珠菌)	64	64	8	-	-	0.5	
Candida albicans WX-CA011 (白色念珠菌)	64	64	8	-	-	0.5	
菌株名称和编号	d5PAO	PAO	F3PAO	环丙沙星	克林霉素		
Neisseria gonorrhoeae ATCC 700825 (淋球菌)	≤0.06	≤0.06	≤0.06	0.008	-		
Neisseria gonorrhoeae 35/02 (淋球菌)	≤0.06	≤0.06	0.125	1	-		
Neisseria gonorrhoeae FA6140 (淋球菌)	≤0.06	≤0.06	≤0.06	0.03	-		
Neisseria gonorrhoeae FA19 (淋球菌)	≤0.06	≤0.06	≤0.06	0.008	-		
Neisseria gonorrhoeae ATCC 49226 (淋球菌)	0.03	0.03	0.06	0.008	-		
Clostridium tetani ATCC 454 (破伤风梭菌)	0.125	0.125	0.125	-	0.016		
Clostridium tetani ATCC 10779 (破伤风梭菌)	0.125	0.125	0.125	-	0.016		
Clostridium tetani ATCC BAA-1870 (破伤风梭菌)	1	1	1	-	>2		
Clostridium tetani ATCC 19406 (破伤风梭菌)	0.125	0.125	0.125	-	0.016		
Clostridium tetani ATCC 43255 (破伤风梭菌)	0.5	0.5	1	-	0.5		
Clostridium tetani ATCC BAA-1382 (破伤风梭菌)	0.5	0.5	0.5	-	>2		
Propionibacterium acnes ATCC 6919 (痤疮丙 酸杆菌)	0.5	0.5	0.5	-	0.06		
Clostridium tetani ATCC 453 (破伤风梭菌)	0.125	0.125	0.5	-	0.016		

实验结果表明,实验结果表明,PAO及其氘代衍生物d5PAO,以及氟代衍生物F3PAO,对所测的不同种类的菌株,特别是耐药菌株均显示出抑制作用。其最小抑制浓度MIC的小于8 $\mu\text{g/mL}$,大部分的MIC在0.06-1 $\mu\text{g/mL}$ 之间,因此具有广谱性抑制作用。三者之间,PAO和氘代PAO比氟代PAO显示出类似或更强的抑制效应。

5 在对某些菌类的抑制作用上,相较于阳性对照抗菌素,这些化合物显示出明显的优势,如:利奈唑胺对粪肠球菌、屎肠球菌、金黄色葡萄球菌的最低抑制浓度MIC为2-4 $\mu\text{g/mL}$,而PAO及其衍生物对这些菌类的MIC大多小于或等于0.0625 $\mu\text{g/mL}$ 。相对于粘杆菌素,这些测试物对大肠杆菌也有明显的抑制优势。相对于克林霉素,他们对脆弱拟杆菌、艰难梭菌也有较强的优势。

10 PAO所测化合物对一些菌类,如鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞杆菌、淋病奈瑟氏菌、新型隐球菌、阴道加德纳菌、痤疮丙酸杆菌、厌氧消化链球菌,以及阴道毛滴虫,也有较好的抑制效果,其效果与对照抗菌素相似。

最后,所测化合物对诸如阴沟肠杆菌、白念珠菌、幽门螺杆菌、破伤风梭菌、阴道阿托波氏菌未能显示明显的优势。

15 综上所述,PAO及其氘代以及氟代衍生物具有广谱性的抗病原体作用。对很多菌种具有比临床上广泛使用的抗菌素更好的抑制效应。

实施例15. d5PAO、PAO和F3PAO对糖尿病动物模型的血糖水平/体重的调控

ApoE^{-/-}小鼠是研究糖尿病形成以及预防治疗的模型之一。本实验采用成年鼠龄8周的ApoE^{-/-}雄性小鼠(赛业生物)。中链脂肪酸MCT作为溶媒,用于溶解PAO、d5PAO和F3PAO:

20 PAO(0.015 mg/mL)、d5PAO(0.015 mg/mL)和F3PAO(0.015 mg/mL)。小鼠喂以高脂饲料(Dyets,高脂(40 kcal%)高胆固醇(1.5%))。将ApoE^{-/-}雄性小鼠随机分为4组,分别为MCT空白对照组(MCT, n=6),PAO组(0.15mg/kg/day, po, n=8),d5PAO组(0.15mg/kg/day, po, n=8),以及F3PAO组(0.05mg/kg/day, po, n=7),4组之间的平均体重无明显差别。之后,给予4组ApoE^{-/-}小鼠相同的居住环境以及饮食饮水条件。灌胃给药,灌药剂量为0.2 mL,每周周一至周五给药,周末停药。高脂喂养和给药12周后,测量

25 小鼠体重和测血糖。测血糖时,用手抓持小鼠剪小鼠尾静脉取血,用罗氏血糖试纸及血糖仪测定血糖并记录,此为随机血糖;断食不断水24小时后以相同手法测量抓持小鼠剪小鼠尾静脉取血,用罗氏血糖试纸及血糖仪测定血糖并记录,此为空腹血糖;饥饿24小时后统一恢复高脂饮食供给,2小时后相同手法抓持小鼠剪小鼠尾静脉取血,用罗森血糖试纸及血糖

30 仪测定血糖并记录,此为餐后2小时血糖。

采用 SPSS22.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较采用独立样本 T 检验；计数资料以率(%)表示，组间比较采用 χ^2 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

实验结果

1) F3PAO 和 d5PAO 减轻受测 ApoE^{-/-}小鼠的体重

5 如图 34 所示，F3PAO 和 d5PAO 给药 12 周后对高脂饮食喂养的 ApoE^{-/-}小鼠平均体重显著比 MCT 组轻。

2) PAO 减轻受测 ApoE^{-/-}小鼠的体重

如图 35 所示，PAO 给药 20 周后对高脂饮食喂养的 ApoE^{-/-}小鼠平均体重显著比 MCT 组轻。

10 3) PAO、F3PAO 和 d5PAO 可降低 ApoE^{-/-}小鼠的血糖水平

如图 36 所示，喂药 12 周后，F3PAO 和 d5PAO 组的平均空腹血糖显著比 MCT 组的低，PAO 组的与 MCT 组相比也有下降。

以上结果表明，受 PAO，F3PAO 或 d5PAO 的干预，高脂高胆固醇喂养的 ApoE^{-/-}小鼠的体重增长受到明显的抑制。PAO、d5PAO 和 F3PAO 对 ApoE^{-/-}小鼠的随机、餐后和空腹
15 血糖都有降低或降低趋势，特别是 d5PAO 和 F3PAO 对空腹血糖的降低作用尤其明显。其中 F3PAO 的作用强度是 d5PAO 作用强度的 3 倍或更高。虽然未显示统计学意义的显著性，PAO 也呈现出高脂喂养的 ApoE^{-/-}小鼠的空腹血糖水平的抑制效应的趋势。此外，有证据显示这些化合物对另一个糖尿病动物模型 Db/Db 小鼠也有类似的作用。

实施例 16. 定量分析生物样品中砷化合物的方法

20 由于生物样品及环境样品中还有许多含砷化合物，对这些样品中的砷化合物，特别是对有机砷化合物，比如苯砷类化合物 (phenylarsenic compound) 进行定量分析一直存在难以克服的困难。首先，一些含砷化合物与蛋白质紧密结合，特别是通过共价键与蛋白结合 (比如化合物中砷与蛋白中的相邻的二巯基形成共价键) 导致分析时出现：一方面萃取率低；其次，在进行液相色谱分离时，有机砷化合物极性大，样品中大量未知砷化合物的干扰使得有机砷化合物的分离难以实现。于是，衍生化方法被采用。Cathum 等于 2007 采用二巯基丙醇
25 对样品中的砷化物进行衍生化后，利用高效液相色谱检查，改善了萃取率。但是分辨率仅为 1.0-2.0 $\mu\text{g/g}$ (Cathum, 2007 #5256)，Eom 等于 2015 年采用二巯基甲苯 (toluene-3,4-dithiol) 对样品中的砷化物进行衍生化后，利用高效液相色谱检查，把分辨率提高了一些，以砷化物中的砷的含量计算分辨率，定量分析的下限约为 0.06-0.21 $\mu\text{g/g}$ (Eom, 2015 #3263)。

30 本公开采用了二巯基丙磺酸钠等 ($\text{C}_n\text{H}_{(2n+1)}\text{NaO}_3\text{S}_3$) 对样品中的砷化合物进行了衍生化，大大提高了分辨率 (见图 37)。以砷化物中的砷的含量计算分辨率，对氧化苯砷 (phenylarsine

oxide, PAO) 的定量分析的下限可低至 0.45 ng/mL。然而, 由于不同的化合物衍生化后会产生同样的衍生产物, 衍生化方法有一定的缺陷, 比如 PAO 与苯肿酸(phenylarsonic acid, PAA) 都可能被二巯基丙磺酸钠衍生化而产生同样的衍生产物。出乎意料的是, 在血液样品中, 二巯基丙磺酸钠只能对 PAO 而不能对 PAA 进行衍生化。从而, 采用二巯基丙磺酸钠进行衍生化能高分率地和特异检测血液中的 PAO。

一、EDTA-K2 全血中 PAO 浓度测定的液相色谱-质谱 (LC-MS/MS) 方法

本文描述了液相色谱-质谱 (LC-MS/MS) 方法测定 SD 大鼠全血中 PAO 浓度的分析方法的部分验证。试验结果包括线性、批内和批间精密度和准确度、灵敏度、特异性、基质效应、稀释可靠性、提取回收率、残留、系统适用性、处理后样品重复进样的稳定性。在 30 μ L SD 大鼠全血用量时, 本分析方法的线性范围为 1.00 ng/mL ~ 500 ng/mL。验证结果表明该分析方法可靠, 适用于测定 SD 大鼠全血基质中 PAO 的浓度。

方法学验证项目	方法学验证结果	用表
分析方法描述	建立了测定 SD 大鼠 全血中 PAO 浓度的液相色谱-质谱方法。以甲苯磺丁脲作为内标, 采用乙腈溶液蛋白沉淀的提取方法。反相色谱柱为 ACQUITY UPLC® Peptide C18 130 Å 2.1*100 mm I.D., 1.7 μ m (Waters), 电喷雾负离子模式, PAO 监测离子对为 m/z 336.8 $\rightarrow$ 152.9, 内标监测离子对为 m/z 269.0 $\rightarrow$ 169.8。	-
样品体积	30 μ L	-
分析物	PAO	-
内标	甲苯磺丁脲	-
线性范围	1.00 ~500 ng/mL	表 14
定量下限 (LLOQ)	1.00 ng/mL	
回归模式	线性回归	表 15
权重系数	1/ x^2	
决定系数	$R^2 \geq 0.9944$	
质控样品浓度	3.00、80.0 和 400 ng/mL	表 16
批内准确度范围 (%偏差)	-15.5% ~7.8%	
批内精密度范围 (%变异系数)	4.1% ~8.3%	
批间准确度范围 (%偏差)	-5.9% ~7.4%	
批间精密度范围 (%变异系数)	4.6% ~9.9%	表 17
稀释可靠性	4000 ng/mL, 10 倍的稀释可靠性被验证	
特异性	六个不同批次的 SD 大鼠空白全血基质在分析物和内标的保留时间处无定量干扰峰	表 18
	在 SD 大鼠空白全血基质中分析物和内标无相互干扰	表 19
基质效应	六个不同批次 SD 大鼠全血无明显基质效应	表 20
提取回收率 (总的%变异系数)	5.2%	表 21
残留 (%)	分析物和内标残留符合接受标准	表 22
分析物在处理样品中的重复进样稳定性	在 10°C 至少 53 小时稳定	表 23

缩写:

LC-MS/MS	液相色谱串联三重四极质谱
HPLC	高效液相色谱
V	伏特
eV	电子伏特
psi	磅每平方英寸
m/z	质荷比
msec.	毫秒
ACN	乙腈
MeOH	甲醇
IPA	异丙醇
TFA	三氟乙酸
FA	甲酸
DMSO	二甲基亚砷
NH ₄ OAc	醋酸铵
AR	分析纯试剂
MΩ	兆欧姆
mM	毫摩尔每升
mol/L	摩尔每升
μm	微米
μg/mL	微克每毫升
v	体积
ng/mL	纳克每毫升
rpm	每分钟转数
g	克
<i>g</i>	离心力
R ²	决定系数
MF	基质因子
LLOQ	定量下限
ULOQ	定量上限

本公开建立了一个液相色谱-质谱（LC-MS/MS）分析方法并按照分析研究计划“液相色谱-质谱（LC-MS/MS）方法测定 SD 大鼠全血中 PAO 浓度的方法学验证”进行该分析方法的
5 部分验证。

分析物在储备液和工作液中的稳定性以及SD大鼠全血样品中PAO的湿冰条件下放置的稳定性、超低温冰箱条件下储存的稳定性和4次冷冻和融化稳定性可参考苏州 GLP BAS 方案。

1. 试验材料和分析方法

1.1 对照标准品和内标标准品

对照标准品信息	
对照标准品名称	PAO
分子式/分子量	C ₆ H ₅ AsO/168.03
校正因子	1.005
来源	凯惠药业上海有限公司
批号	SP-0020182-007
含量	99.5%
储存条件	常温密封保存

内标标准品信息	
对照标准品名称	甲苯磺丁脲
分子式/分子量	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O ₃ S/270.35
来源	Sigma
批号	MKBR6717V
纯度	99.9%
储存条件	密封冷藏干燥保存

1.2 试剂

试验试剂信息	
二 甲 基 亚 砷 / DMSO	HPLC 级试剂, Sigma, 批号 STBH8372
乙腈/ ACN	HPLC 级试剂, Merck, 批号 JA083330
甲醇/ MeOH	HPLC 级试剂, Merck, 批号 I1003307913
甲酸/ FA	HPLC 级试剂, Honeywell Fluka, 批号 I240DIL
乙酸/ AA	HPLC 级试剂, Sigma, 批号 SHBJ2597
异丙醇/ IPA	HPLC 级试剂, Sigma, 批号 WXBD0243V
三氟乙酸/ TFA	HPLC 级试剂, Fluka, 批号 I2550IL
醋酸铵/ NH ₄ OAc	HPLC 级试剂, Sigma, 批号 SLBV5241
试验用水/ Water	ELGA PureLabUVF+OptionS15 (≥18.2MΩ), 上海药明康德自制

1.3 空白基质制备

空白基质	
基质	SD 大鼠空白 EDTA-K ₂ 全血
供应商	上海药明康德实验室制备
储存条件	<-60°C

5 1.4 储备液配制

PAO储备液制备： 精确称取两份适量对照标准品，置于棕色玻璃瓶中，用DMSO配成浓度为1.00 mg/mL的对照品储备液。储备液充分涡旋至完全溶解，储存于-20°C冰箱。一份作为校正标样储备液；另一份作为质控样品储备液。

10 甲苯磺丁脲内标储备液制备： 精确称取适量内标，置于棕色玻璃瓶中，用 DMSO 配成浓度为 1.00 mg/mL 的内标储备液。储备液充分涡旋至完全溶解，储存于-20°C 冰箱中。

2,3-二巯基丙磺酸钠衍生试剂贮备液的制备：精确称取适量的 2,3-二巯基丙磺酸钠标准品粉末，置于玻璃瓶中，用纯水配成浓度为 1.00 mg/mL 的储备液，储备液充分涡旋至完全溶解，并储存于室温。

1.5 校正标样、质控样品和内标工作液的配制

5 校正标样的工作液（CWS）和质控样品工作液（WS）配制过程如下，并储存于-20℃冰箱。

备注：配制的体积可根据实际需要进行调整，但需保持终浓度不变。

溶液来源			工作液（溶剂：水:乙腈（v: v, 50:50））		
溶液来源编号	浓度 (µg/mL)	移液体积 (µL)	最终体积 (µL)	浓度(µg/mL)	工作液编号
校正标样储备液	1000	20	800	25.0	CWS-C1
校正标样储备液	1000	22	1000	22.0	CWS-C2
校正标样储备液	1000	12	1000	12.0	CWS-C3
CWS-C1	25.0	100	500	5.00	CWS-C4
CWS-C1	25.0	60	600	2.50	CWS-C5
CWS-C1	25.0	20	1000	0.500	CWS-C6
CWS-C4	5.00	10	500	0.100	CWS-C7
CWS-C4	5.00	10	1000	0.0500	CWS-C8
质控样品储备液	1000	16	800	20.0	WS-HQC
质控样品储备液	1000	4	1000	4.00	WS-MQC
WS-MQC	4.00	15	400	0.150	WS-LQC
WS-LQC	0.150	100	300	0.0500	WS-LLOQ
质控样品储备液	1000	20	100	200	WS-DQC

甲苯磺丁脲（1.00 mg/mL 在 DMSO 中）内标储备液用乙腈溶液进一步稀释，配制成浓度为 10.0 ng/mL 的内标工作液，室温下储存。

10 1.6 校正标样和质控样品配制

校正标样和质控样品在全血基质中的配制过程如下，需在稳定性有效期内使用。

备注：配制的体积可根据实际需要进行调整，但需保持终浓度不变。

工作液编号	浓度 (µg/mL)	移液体积 (µL)	基质体积 (µL)	浓度 (ng/mL)	校正标样/质控样品编号
CWS-C1	25.0	2	98	500	C1
CWS-C2	22.0	2	98	440	C2
CWS-C3	12.0	2	98	240	C3
CWS-C4	5.00	2	98	100	C4
CWS-C5	2.50	2	98	50.0	C5
CWS-C6	0.500	2	98	10.0	C6
CWS-C7	0.100	2	98	2.00	C7
CWS-C8	0.0500	2	98	1.00	C8

WS-HQC	20.0	2	98	400	HQC
WS-MQC	4.00	2	98	80.0	MQC
WS-LQC	0.150	2	98	3.00	LQC
WS-LLOQ	0.0500	2	98	1.00	LLOQ
WS-DQC	200	2	98	4000	DQC

1.7 样品前处理

备注：取样的体积可根据实际需要进行调整，但需保持终浓度不变。可以使用聚乙烯离心管替代 96 孔板进行样品处理，但需确保校正标样、质控样品和样本的处理所用容器类型保持一致。

5 取 30 μ L 全血样品加入 96 孔板中，加入 90 μ L 1.00 mg/mL 2,3-二巯基丙磺酸钠水溶液和 30 μ L 0.2% 甲酸水溶液，混匀，随后在 45°C 条件下孵育 15 分钟，加入 240 μ L 内标工作液（10.0 ng/mL 甲苯磺丁脲在乙腈溶液中）沉淀蛋白，将 96 孔板振摇 15 分钟，随后在 4°C、3220 g 条件下离心 15 分钟。取上清液 160 μ L 置于新的 96 孔板中，然后将其在 4°C、3220 g 条件下离心 5 分钟，样品直接进样。

10 1.8 试验仪器和条件

液相分析条件

液相色谱仪：沃特世 ACQUITY 超高效液相色谱系统

色谱柱：ACQUITY UPLC® Peptide C18 130 Å 2.1*100 mm I.D., 1.7 μ m (Waters)

流动相 A：0.01% AA 和 2 mmol/L NH₄OAc 的 Water: ACN (v: v, 95: 5) 溶液

15 流动相 B：0.01% AA 和 2 mmol/L NH₄OAc 的 Water: ACN (v: v, 5: 95) 溶液

洗脱梯度：

时间 (min)	流速 (mL/min)	A (%)	B (%)
Initial	0.400	60	40
1.40	0.400	2	98
1.70	0.400	2	98
1.71	0.400	60	40
2.00	0.400	60	40

柱温：40°C

进样器弱洗溶剂：ACN: Water (v: v, 10: 90)

进样器强洗溶剂：含 0.2% TFA 的 ACN: MeOH: IPA: Water (v: v: v: v, 1: 1: 1: 1) 溶液

20 进样器温度：10°C

进样体积：4 μ L（进样体积可适当调整，以便得到良好的质谱行为）

质谱分析条件

质谱仪：AB SCIEX Triple Quad 6500+

扫描模式：负离子多反应离子监测

离子源：涡轮喷雾

雾化气：60 psi

气帘气：40 psi

喷雾电压：-4500 V

电离模式：电喷雾离子化

辅助加热气：60 psi

碰撞气：10

离子源温度：500°C

多反应监测参数表格

化合物名称	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	驻留时间 (msec.)	去簇电压 (eV)	碰撞能量 (eV)
PAO(衍生物)	336.8	152.9	100	-80	-19
甲苯磺丁脲	269.0	169.8	100	-80	-23

1.9 数据采集和处理

化合物和内标的保留时间、色谱图采集和色谱图的积分由软件 Analyst（Applied Biosystems, 版本号 1.6.3, Foster City, CA, USA）进行处理。

5 数据的统计由软件 Watson LIMS(Thermo Fisher Scientific, 版本号 7.4.2, Philadelphia, PA, USA) 和 Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation, 版本号 2013, Redmond, WA, USA) 进行处理。

1.10 计算公式

1.10.1 准确度(%偏差)

10

$$\text{准确度} [\%] = 100 \times \frac{(\text{平均})\text{浓度}_{\text{测得}}}{\text{浓度}_{\text{标示}}}$$
$$\text{偏差} [\%] = \text{准确度} - 100$$
$$\text{偏差} [\%] = \left(100 \times \frac{(\text{平均})\text{浓度}_{\text{测得}}}{\text{浓度}_{\text{标示}}} \right) - 100$$

1.10.2 精密度(%变异系数)

精密度以变异系数来标示，计算公式：

15

$$\text{变异系数} [\%] = 100 \times \frac{\text{标准偏差}}{\text{样品均值}}$$
$$\text{标准偏差} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\text{值}_{\text{测得}} - \text{均值})^2}{n - 1}}$$

1.10.3 干扰

分析物和内标在空白基质中的干扰计算公式如下：

20

$$\text{干扰} [\%] = 100 \times \frac{\text{峰面积}_{\text{双空白}}}{(\text{平均})\text{峰面积}_{\text{LLOQ}}}$$

1.10.4 提取回收率

$$\text{回收率} = 100 \times \frac{(\text{平均})\text{峰面积}_{\text{提取样品}}}{(\text{平均})\text{峰面积}_{\text{回收样品}}}$$

1.10.5 稳定性

稳定性 = 100 × $\frac{\text{(平均) 浓度}_{\text{测定}}}{\text{浓度}_{\text{标示}}}$

2. 分析方法验证

以甲苯磺丁脲为内标，对 SD 大鼠全血中 PAO 浓度测定分析方法进行了完全验证。

表 13. 方法验证时间安排

分析批编号	是否接受	分析批试验内容
1	接受	校正曲线、质控样品、特异性、干扰、稀释可靠性（1/10）、残留、批内准确度和精密度以及批间准确度和精密度
2	拒绝*	校正曲线、质控样品、提取回收率、基质效应、残留以及批间准确度和精密度
3	接受	校正曲线、质控样品、残留以及批间准确度和精密度
4	接受	校正曲线、质控样品、提取回收率、基质效应、残留以及批间准确度和精密度
5	拒绝**	校正曲线、质控样品以及处理后样品的 79 小时稳定性
6	接受	校正曲线、质控样品以及处理后样品的 23 小时稳定性
7	接受	校正曲线、质控样品以及处理后样品的 53 小时稳定性

*LLQC 不满足分析标准

**峰型异常

5 2.1 校正标样算得浓度

校正标样算得的浓度应该在标示值的 ±15.0% 以内，最低校正标样除外，它应该在 ±20.0% 内。校正标样算得浓度结果见表 14。本试验的三个分析批的校正标样均符合上述接受标准。

表 14. SD 大鼠全血中 PAO 校正标样算得浓度

分析批号	1	%偏差*	3	%偏差*	4	%偏差*	均值	标准偏差	%变异系数	%批间偏差	样本数
1.00 ng/mL	0.996	-0.4	1.01	1.0	1.01	1.0	1.01	0.00808	0.8	1.0	3
2.00 ng/mL	**1.45		1.96	-2.0	1.97	-1.5	1.97			-1.5	2
10.0 ng/mL	10.5	5.0	9.91	-0.9	9.75	-2.5	10.1	0.395	3.9	1.0	3
50.0 ng/mL	50.0	0.0	47.7	-4.6	51.0	2.0	49.6	1.69	3.4	-0.8	3
100 ng/mL	86.9	-13.1	108	8.0	105	5.0	100	11.4	11.4	0.0	3
240 ng/mL	265	10.4	237	-1.3	231	-3.8	244	18.1	7.4	1.7	3
440 ng/mL	425	-3.4	437	-0.7	457	3.9	440	16.2	3.7	0.0	3
500 ng/mL	507	1.4	503	0.6	477	-4.6	496	16.3	3.3	-0.8	3

*% 偏差应在±15.0%内，除了 LLOQ，它应在±20.0%内

**%偏差超过±15.0%，不参与线性拟合

10 2.1.1 校正曲线（线性）

以 $1/x^2$ 为加权系数对 SD 大鼠全血中 PAO 浓度进行线性回归, 线性范围为 1.00-500 ng/mL。本试验三个分析批的校正曲线参数见表 15。试验中所有三个分析批的校正曲线决定系数 $R^2 \geq 0.9944$ 。试验结果表明, 线性符合接受标准, 校正曲线适用于定量分析。

表 15. SD 大鼠全血中 PAO 校正曲线回归方程参数

分析批号	斜率 (a)	截距 (b)	决定系数 (R^2)	定量下限 (ng/mL)	定量上限 (ng/mL)
1	0.00588	0.001695	0.9944	1.00	500
3	0.007681	0.0009535	0.9985	1.00	500
4	0.008219	0.001715	0.9985	1.00	500

5 2.1.2 批间、批内准确度和精密度

计算公式见第 1.10.1 部分和 1.10.2 部分。批间、批内准确度和精密度通过三个分析批, 每个质控样品浓度水平六个测定值来评价。批间、批内准确度和精密度结果见表 16。试验结果表明, 批间、批内准确度和精密度符合接受标准, 分析方法可靠。

2.1.3 分析方法灵敏度

10 PAO 的 LLOQ 具有良好的信噪比和灵敏度。在 SD 大鼠全血中的 LLOQ 为 1.00 ng/mL。批内和批间 LLOQ 的平均精密度和准确度均在 $\pm 20.0\%$ 以内, 结果见表 16。

批内和批间 LLOQ 的平均精密度和准确度均在 $\pm 20.0\%$ 以内, 结果见表 16。

表 16. SD 大鼠全血中 PAO 的精密度和准确度

分析批号	定量下限 (1.00 ng/mL)	%偏差	低浓度 (3.00 ng/mL)	%偏差	中浓度 (80.0 ng/mL)	%偏差	高浓度 (400 ng/mL)	%偏差
1	0.873	-12.7	2.82	-6.0	82.6	3.3	394	-1.5
	0.907	-9.3	2.86	-4.7	84.2	5.3	460	15.0
	0.818	-18.2	3.12	4.0	90.6	13.3	445	11.3
	0.845	-15.5	3.14	4.7	83.1	3.9	406	1.5
	0.835	-16.5	2.77	-7.7	84.3	5.4	455	13.8
	#0.792	-20.8	3.42	14.0	90.0	12.5	423	5.8
批内均值	0.845		3.02		85.8		431	
批内标准偏差	0.0407		0.250		3.55		27.1	
批内 %变异系数*	4.8		8.3		4.1		6.3	
批内 %偏差**	-15.5		0.7		7.3		7.8	
样本数	6		6		6		6	
3	1.06	6.0	2.92	-2.7	81.6	2.0	400	0.0
	1.08	8.0	3.29	9.7	82.8	3.5	444	11.0
	1.09	9.0	3.19	6.3	88.6	10.8	433	8.3
	0.921	-7.9	3.07	2.3	83.8	4.8	393	-1.8
	1.04	4.0	3.21	7.0	##92.3	15.4	411	2.8
	0.939	-6.1	3.00	0.0	87.4	9.3	408	2.0
批内均值	1.02		3.11		86.1		415	
批内标准偏差	0.0733		0.140		4.07		19.7	
批内 %变异系数	7.2		4.5		4.7		4.7	
批内 %偏差	2.0		3.7		7.6		3.8	
样本数	6		6		6		6	

表 16. （接上表）SD 大鼠全血中 PAO 的精密度和准确度

分析批号	定量下限 (1.00 ng/mL)	% 偏差	低浓度 (3.00 ng/mL)	% 偏差	中浓度 (80.0 ng/mL)	% 偏差	高浓度 (400 ng/mL)	% 偏差
4	0.997	-0.3	3.00	0.0	83.8	4.8	409	2.3
	0.911	-8.9	2.92	-2.7	84.9	6.1	408	2.0
	0.906	-9.4	3.25	8.3	##95.4	19.3	407	1.8
	0.978	-2.2	3.32	10.7	83.6	4.5	##273	-31.8
	0.922	-7.8	3.24	8.0	82.8	3.5	384	-4.0
	1.03	3.0	3.19	6.3	83.8	4.8	403	0.8
批内均值	0.957		3.15		85.7		381	
批内标准偏差	0.0516		0.157		4.79		53.6	
批内 %变异系数	5.4		5.0		5.6		14.1	
批内 %偏差	-4.3		5.0		7.1		-4.8	
样本数	6		6		6		6	
批间均值	0.941		3.10		85.9		409	
批间标准偏差	0.0922		0.186		3.92		40.4	
批间 %变异系数***	9.8		6.0		4.6		9.9	
批间 %偏差****	-5.9		3.3		7.4		2.3	
样本数	18		18		18		18	

*批内 %变异系数应≤15.0%， LLOQ 应≤ 20.0%
**批内 %偏差应在±15.0%内， LLOQ 应在±20.0%
***批间 %变异系数应≤15.0%， LLOQ 应≤ 20.0%
****批间 %偏差应在±15.0%， LLOQ 应在±20.0%内
%偏差不在±20.0%， 但该数据仍参与批内精密度准确度计算，所有结果符合分析要求
%偏差不在±15.0%， 但该数据仍参与批内精密度准确度计算，所有结果符合分析要求

2.2 定量下限和定量上限（LLOQ 和 ULOQ）

三个分析批 LLOQ 的平均准确度都在±20.0%内，平均精密度都小于 20.0%；ULOQ 的平均准确度都在±15.0%内，平均精密度都小于 15.0%。

2.3 稀释可靠性

稀释试验用来验证稀释样品浓度高于 ULOQ 时的稀释可靠性。

制备浓度 4000 ng/mL 的质控样品，分别用空白 SD 大鼠全血稀释 10 倍，平行六份，进行稀释可靠性验证。

10 平均准确度（%偏差）和精密度（%变异系数）见表 17。本试验结果符合接受标准，稀释浓度高于 ULOQ 样品时，10 倍的稀释可靠性被验证。

表 17. SD 大鼠全血中 PAO 稀释的质控样品的精密度和准确度

分析日期	稀释倍数	浓度 4000 ng/mL	% 偏差
-	10	4150	3.8
		4600	15.0
		4320	8.0
		4250	6.3
		4210	5.3

	5430	35.8
批内均值	4490	
批内标准偏差	485	
批内 %变异系数*	10.8	
批内 %偏差**	12.3	
样本数	6	
*批内 %变异系数应≤15.0%		
**批内 %偏差应在±15.0%内		

2.4 特异性和干扰

分别取六个不同批次的 SD 大鼠空白全血，以 2.10.3 部分计算公式来评价方法的特异性（选择性）。

六个不同来源的空白基质中分析物的特异性结果见表 18，试验中所有六个不同来源的空白基质中分析物干扰组分低于分析物在定量下限质控样品中响应的 20.0%，内标干扰组分低于内标在质控样品中响应的 5.0%。本试验结果符合接受标准，分析方法的特异性被验证。

取上述特异性试验中六个批次的混合空白基质来评价分析物和内标的相互干扰。六个批次的混合空白基质中，内标对分析物的干扰组分低于分析物在定量下限样品中响应的 20.0%，分析物对内标的干扰组分低于内标在定量下限样品中响应的 5.0%。结果表明分析物和内标之间无相互干扰。结果见表 19。

表 18. 六个不同来源的 SD 大鼠空白全血的特异性评价

样品名	PAO (分析物)				甲苯磺丁脲 (内标)			
	空白基质中峰面积	LLOQ 样品中峰面积	%干扰*	<20.0% 是/否	空白基质中峰面积	LLOQ 样品中峰面积	%干扰**	<5.0% 是/否
Rat EDTA-K ₂ blood source 1	0	4900	0.0	是	0	882000	0.0	是
Rat EDTA-K ₂ blood source 2	0	4950	0.0	是	0	901000	0.0	是
Rat EDTA-K ₂ blood source 3	0	5520	0.0	是	0	877000	0.0	是
Rat EDTA-K ₂ blood source 4	0	5470	0.0	是	0	882000	0.0	是
Rat EDTA-K ₂ blood source 5	0	4970	0.0	是	0	894000	0.0	是
Rat EDTA-K ₂ blood source 6	0	4360	0.0	是	0	908000	0.0	是
	均值	5030			均值	891000		

*空白基质中分析物 %干扰组分应低于分析物在 LLOQ 样品中响应的 20.0%
**空白基质中内标 %干扰组分应低于内标在 LLOQ 样品中响应的 5.0%
Rat EDTA-K₂ blood source 1-6: 六个不同来源不含 PAO 和甲苯磺丁脲的 SD 大鼠空白全血

表 19. 分析物和内标在 SD 大鼠空白全血的干扰评价

样品名	PAO (分析物)				样品名	甲苯磺丁脲 (内标)			
	空白基质中峰面积	LLOQ 样品中峰面积	%干扰*	<20.0% 是/否		空白基质中峰面积	LLOQ 样品中峰面积	%干扰**	<5.0% 是/否
Interference QC0-1	0	6790	0.0	是	Interference ULOQ-1	0	899000	0.0	是

Interference QC0-2	0	0.0	是	Interference ULOQ-2	0	0.0	是
Interference QC0-3	0	0.0	是	Interference ULOQ-3	0	0.0	是
Interference QC0-4	0	0.0	是	Interference ULOQ-4	0	0.0	是
Interference QC0-5	0	0.0	是	Interference ULOQ-5	0	0.0	是
Interference QC0-6	0	0.0	是	Interference ULOQ-6	0	0.0	是

%% 分析物干扰组分应低于分析物在 LLOQ 样品中响应的 20.0%
**% 内标干扰组分应低于内标在 LLOQ 样品中响应的 5.0%
Interference QC0: 只加内标甲苯磺丁脲未加 PAO 的质控样品
Interference ULOQ: 只加 ULOQ 浓度的 PAO 未加内标甲苯磺丁脲的质控样品

2.5 基质效应

分别取六个不同来源的 SD 大鼠 EDTA-K2 空白全血评价基质效应。

六个不同来源的 SD 大鼠空白全血，按照样品处理方法制备低浓度质控样品和高浓度质控样品，用作评价方法的基质效应和批间差异。各批次高浓度和低浓度质控样品总的%变异

5 系数为 7.2%，可见不同批次间的生物基质不存在明显基质效应。结果见表 20。

表 20. 六个不同来源的 SD 大鼠空白全血的基质效应评价

浓度	基质来源	峰面积		基质因子 (MF)		内标归一化的 MF	每个浓度的 % 变异系数* (内标归一化的 MF)	总的 % 变异系数* (内标归一化的 MF)	
		PAO (分析物)	甲苯磺丁脲 (内标)	PAO (分析物)	甲苯磺丁脲 (内标)				
Low:	Reference (平均值)	9860	1020000	-	-	-	4.8	7.2	
2.00 ng/ mL	Rat EDTA-K ₂ blood source 1	20700	1060000	2.10	1.04	2.02			
	Rat EDTA-K ₂ blood source 2	18200	999000	1.85	0.979	1.89			
	Rat EDTA-K ₂ blood source 3	17900	996000	1.82	0.976	1.86			
	Rat EDTA-K ₂ blood source 4	18000	1040000	1.83	1.02	1.79			
	Rat EDTA-K ₂ blood source 5	18000	1040000	1.83	1.02	1.79			
	Rat EDTA-K ₂ blood source 6	19000	1010000	1.93	0.990	1.95			
High:	Reference (平均值)	2600000	997000	-	-	-			
500 ng/ mL	Rat EDTA-K ₂ blood source 1	4820000	1030000	1.85	1.03	1.80	5.3		
	Rat EDTA-K ₂ blood source 2	4340000	1020000	1.67	1.02	1.64			
	Rat EDTA-K ₂ blood source 3	4630000	979000	1.78	0.982	1.81			
	Rat EDTA-K ₂ blood source 4	3990000	966000	1.53	0.969	1.58			
	Rat EDTA-K ₂ blood source 5	4200000	966000	1.62	0.969	1.67			
	Rat EDTA-K ₂ blood source 6	4360000	986000	1.68	0.989	1.70			

%% 变异系数应≤15.0%
Rat EDTA-K₂ blood source 1-6: 六个不同来源的 SD 大鼠空白全血

2.6 生物样品处理过程的回收率

通过从生物样品中提取 3 个浓度水平的 PAO (3.00、80.0 和 400 ng/mL, 每个浓度水平 3 份)所得的分析物峰面积分别除以用空白基质提取后的上清液配置的相同浓度的 PAO 对照溶液所得的分析物峰面积来计算生物样品中分析物提取回收率, 计算公式见 1.10.4 部分。

分析物 PAO 在现有生物样品处理方法下在待测基质中回收率总的%变异系数为 5.2%。

5 结果表明, 低、中、高浓度的回收率无明显差异, 结果见表 21。

表 21. PAO 在 SD 大鼠全血中处理过程的回收率

样品名	对照峰面积	样品名	提取峰面积	回收率 (%)	%变异系数*	所有浓度回收率总的%变异系数*	
Recovery LQC 1	16200	Extraction LQC 1	11200	67.1	5.8	5.2	
Recovery LQC 2	17100	Extraction LQC 2	12000	71.9			
Recovery LQC 3	16900	Extraction LQC 3	12600	75.4			
均值	16700	均值	11900				
标准偏差	473	标准偏差	702				
%变异系数	2.8	%变异系数	5.9				
Recovery MQC 1	404000	Extraction MQC 1	298000	71.0	2.7		
Recovery MQC 2	428000	Extraction MQC 2	303000	72.1			
Recovery MQC 3	429000	Extraction MQC 3	314000	74.8			
均值	420000	均值	305000				
标准偏差	14200	标准偏差	8190				
%变异系数	3.4	%变异系数	2.7				
Recovery HQC 1	1920000	Extraction HQC 1	1540000	78.2	0.6		
Recovery HQC 2	2020000	Extraction HQC 2	1530000	77.7			
Recovery HQC 3	1980000	Extraction HQC 3	1550000	78.7			
均值	1970000	均值	1540000				
标准偏差	50300	标准偏差	10000				
%变异系数	2.6	%变异系数	0.6				

%% 变异系数应≤ 15.0%

Recovery QC: 在空白基质提取后加入 PAO 工作液

Extraction QC: 在提取前在空白基质中加入 PAO 工作液。

2.7 残留

系统残留通过在 ULOQ 样品后立即进空白样品来验证。PAO 在残留样品中的峰面积均在 LLOQ 中的平均峰面积的 20.0%以内; 内标在残留样品中的峰面积均在 LLOQ 中的平均峰面积的 5.0%以内。 结果见表 22, 该分析方法的残留符合标准。

10

表 22. SD 大鼠全血中 PAO 和甲苯磺丁脲的残留评价

分析批号	样品名	PAO (分析物)		甲苯磺丁脲 (内标)	
		峰面积	%残留*	峰面积	%残留**
1	C8	6790	-	899000	-
	Double Blank (after C1)	0	0.0	0	0.0
3	C8	8600	-	986000	-
	Double Blank (after C1)	0	0.0	0	0.0
4	C8	10000	-	1000000	-
	Double Blank (after C1)	0	0.0	0	0.0

*% 分析物残留应低于分析物在 LLOQ 样品中峰面积的 20.0%

***% 内标残留应低于内标在 LLOQ 样品中峰面积的 5.0%

2.8 系统适用性

在考察方法验证样品前通过三个 LLOQ 浓度的样品来确认分析物的色谱行为和质谱响应。

3. 稳定性

5 所有稳定性试验，采用低和高浓度水平，每个浓度水平 3 份样品来评价。接受标准为测得浓度与标示浓度相比，其%偏差应在±15.0%以内。

计算公式见 1.10.5 部分。

3.1 PAO 在处理过的样品中（自动进样器）的重复进样稳定性

10 处理过的 PAO 校正曲线和质控样品置于 96 孔板中在 10°C 自动进样器中放置 23 和 53 小时后用现有 LC-MS/MS 方法对校正曲线和质控样品再次进样分析，用分析物平均浓度和标示浓度相比来评价处理过的质控样品在自动进样器中的重复进样稳定性。结果见表 23，处理过的样品放置在 10°C 进样器中至少 53 小时稳定。

表 23. PAO 在处理后 SD 大鼠全血中的重复进样稳定性

样品名	标示浓度 (ng/mL 在 全血中)	测定浓度 (ng/mL 在全血中)				标准偏 差	%变异系 数*	%与标示浓度的 偏差**
		重复 1	重复 2	重复 3	平均 值			
低浓度								
在 10°C 放置 23 小时	3.00	3.19	2.96	2.90	3.02	0.153	5.1	0.7
在 10°C 放置 53 小时	3.00	2.84	2.84	2.91	2.86	0.0404	1.4	-4.7
高浓度								
在 10°C 放置 23 小时	400	367	362	367	365	2.89	0.8	-8.8
在 10°C 放置 53 小时	400	370	377	380	376	5.13	1.4	-6.0

***% 变异系数应≤15.0%
***% 与标示浓度的偏差应在±15.0%内

4. 结论

15 对 PAO 在 SD 大鼠全血中的 LC-MS/MS 定量测定方法成功地进行了验证。方法的线性范围为 1.00-500 ng/mL。高于 ULOQ 的样品可用空白 SD 大鼠全血最高稀释 10 倍。对该分析方法校正曲线、批内及批间精密度和准确度、灵敏度、特异性、基质效应、提取回收率、稀释可靠性和残留进行了验证。并对处理后样品的稳定性进行了考察。

- 20 1) PAO在SD大鼠全血中定量测定的LC-MS/MS方法的验证结果符合所有分析接受标准。结果显示验证的LC-MS/MS方法可用于PAO在SD大鼠全血基质中的浓度测定。
- 2) PAO在SD大鼠全血中的LLOQ可达到1.00 ng/mL，批内和批间LLOQ的精密度和准确

度均符合接受标准。

- 3) PAO在SD大鼠全血中PAO的校正曲线有良好的线性($R^2 \geq 0.9944$)和准确度。线性范围1.00-500 ng/mL。
- 4) 四个不同浓度水平样品 ($n=6$) 的批内和批间分析结果均符合接受标准, 分析方法具有良好的批内、批间精密度和准确度。
- 5) PAO在所考察的六个不同来源的空白基质中无任何潜在的内源性干扰, 分析方法的特异性被验证。且分析物和内标之间也无定量干扰。
- 6) PAO在所考察的六个不同来源的空白基质中未见明显基质效应。
- 7) PAO在所考察的基质中用现有分析方法在各浓度的提取回收率总的%变异系数为5.2%。
- 8) 在现有的LC-MS/MS分析方法条件下, PAO在SD大鼠全血中的残留小于20%的LLOQ; 内标残留小于5%的LLOQ。
- 9) 稳定性试验结果如下: PAO在SD大鼠全血处理过的样品中, 放置在10°C自动进样器中至少53小时稳定。

总之, 当前验证的 LC-MS/MS 分析方法适用于 SD 大鼠全血中 PAO 浓度测定。

二、苯肿酸对 EDTA-K2 全血中 PAO 浓度测定的液相色谱-质谱 (LC-MS/MS) 方法的影响

本实例显示血液中的苯肿酸不能二巯基丙磺酸钠衍生或者被衍生后所产生的衍生产物比同样量的 PAO 被衍生化的产物的量小 4 个数量级, 请看图 38 和图 39。

实施例17. 单次灌胃给药后PAO在SD大鼠的组织分布特征

本实验中 30 只 SD 大鼠分成 5 组 (3/性别/组)。各组分别单次灌胃 0.9 mg/kg PAO, 溶媒为 MIGLYOL® 812N。第 1 至第 5 组大鼠分别于给药后 2、4、10、24 和 36 小时吸入二氧化碳安乐死, 采集全血以及各种组织, 制备得组织匀浆样品, 以验证过的 LC/MS/MS 方法进行分析。

实验结果显示, SD 大鼠单次给予 0.9mg/kg PAO 后, PAO 在组织中分布迅速, 在给药 2 小时内即分布到大部分组织中 (图 40)。

在雌雄大鼠各组织中, 给药后 2 到 24 小时达到 PAO 的浓度高峰, 并在给药 36 小时后出现浓度的明显下降。

表 24. 单次给药 2h 后雄性大鼠各脏器中 PAO 浓度 (ng/g)

动物编号	肝脏	肾脏	肺	心脏	骨骼肌	脾脏
R1	13.3	33.2	12.8	12.5	48	57
R2	15.1	37.4	31.5	12.1	10.9	75

R3	18.6	86.5	58.5	18.9	5.55	100
均值	15.7	52.4	34.3	14.5	21.5	77.3
标准误	1.6	17.1	13.3	2.2	13.4	12.5
变异系数 (%)	17.2	56.5	67.1	26.3	107	27.9

表 25. 单次给药 24h 后雄性大鼠各脏器中 PAO 浓度 (ng/g)

动物编号	肝脏	肾脏	肺	心脏	骨骼肌	脾脏
R19	21.6	188	103	44.2	45.9	305
R20	18	199	114	45.8	54	260
R21	23	170	103	52	44.8	229
均值	20.9	186	107	47.3	48.2	265
标准误	1.5	8.5	3.7	2.4	2.9	22.1
变异系数 (%)	12.3	7.85	5.93	8.71	10.4	14.4

实施例18. PAO抑制ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化斑块的形成-动脉粥样硬化的新治疗方案

5 本实验测试了 PI4KIIIa 抑制剂 PAO 高脂饮食诱导的动脉粥样硬化模型 ApoE^{-/-}小鼠的体重以及动脉内斑块形成的影响。ApoE^{-/-}小鼠是常用的动脉粥样硬化模型小鼠，其动脉粥样硬化病变的发展与人类疾病的病理学研究中观察到的相似。PAO 抑制了高脂饮食诱导的 ApoE^{-/-}小鼠的体重增加，以及主动脉内粥样斑块的数量和面积。这些结果说明 PAO 可降低粥样斑块的形成，从而成为潜在的抗动脉粥样硬化的有效治疗方案。

10 **1. 实验方法**

1.1 实验动物

 ApoE^{-/-}小鼠(购自苏州赛业生物)，SPF 级，8 周龄，体质量(20±2)g，饲养于上海交通大学医学院附属新华医院实验动物中心，动物按照 12 小时光照，12 小时黑暗周期，22℃ 恒温饲养。Model 组:8 周龄雄性 ApoE^{-/-}小鼠 7 只，高脂饮食喂养戴茨(Dyets ASHF3 高脂(40%kcal%)高胆固醇(1.25%)鼠粮)。PAO 组:8 周龄雄性 ApoE^{-/-}小鼠 7 只高脂饮食喂养戴茨(Dyets ASHF3 高脂(40%kcal%)高胆固醇(1.25%)鼠粮)同时给予 0.15mg/kg PAO 灌胃，每日一次。

15 两组小鼠共计喂养 20 周。

1.1.1 小鼠动脉油红 O 染色

油红 O 染色相关溶液的配制:

- 20 (1) 油红 O 储存液的配制:油红 O 试剂 5g(Sigma 公司,货号 SLBG0158V)，用异丙醇定容到 1000ml。在水浴锅中轻轻晃动使得油红 O 溶解，冷却到室温以后使用滤纸过滤。
- (2) 油红 O 工作液的配制:将油红 O 储存液与蒸馏水按 6:4 的比例混合均匀，去除残渣后使用。
- (3) 60%异丙醇溶液的配制:使用蒸馏水配制，现用现配。

小鼠主动脉剥离与取材:

(1) 小鼠心脏灌流固定:

1. 小鼠麻醉后立即将其用针头固定在泡沫板上,用镊子夹住胸部皮肤,用剪刀 剪开胸腔的皮肤和肋骨,充分暴露心脏。
- 5 2. 将注射针头插入小鼠左心室,将小鼠右心房剪破使血液流出。灌注 0.9%氯化钠溶液,持续灌注 10 分钟左右,使得肝脏和舌变白。
3. 待小鼠四肢、肝脏和舌头变白之后,换用 4%多聚甲醛灌流固定,4%多聚甲醛 灌注 20 分钟。
4. 灌流结束后,将针头取出,小鼠置于冰上等待后续操作。

- 10 (2) 小鼠主动脉剥离:体视显微镜下,用钝性剪切开小鼠腹腔和胸腔,游离出主动脉弓。剪除膈肌和肾脏,清除裸露在主动脉表面的脂肪。用镊子提起近心端主动脉,用将主动脉沿脊柱分离直至髂动脉分支处。将显微弹簧剪插入主动脉管腔内,沿着主动脉弓内弯曲侧纵向剪至髂动脉分叉,并将左右髂动脉一并纵向剪开,然后再从主动脉弓外弯曲侧依次将主动脉弓、无名动脉、左颈总动脉、左锁骨下动脉剖开,最后剪断左右髂动脉,剥离出完整的整根主动脉。
- 15

- (3) 油红 O 染色:将剥离下来的主动脉用 0.9%的生理盐水漂洗,随后转移到预先加有 4%多聚甲醛的 5ml 离心管中,室温下固定 12 小时。固定结束后,使用生理盐水漂洗 3 次,置于培养皿中。体视显微镜下小心剥离动脉周围结缔组织和脂肪。随后将主动脉浸没于油红 O 工作液中,室温下染色 30 分钟。染色结束后使用 60%异丙醇溶液漂洗 30 秒脱色,随后置于生理盐水中漂洗 3 次。
- 20 (4) 拍照及主动脉斑块面积测量:染色结束后,将主动脉充分展开于黑色背景塑料板上,随后拍照。使用 Image pro plus6.0 软件分别对整根动脉表面积以及动脉粥样硬化病灶面积进行计算。

1.2 统计分析

- 使用 SPSS23.0 对数据进行分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示,小鼠体重和动脉粥样斑块所占面积使用 t 检验进行分析,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。
- 25

2. 实验结果

- Model 组:8 周龄雄性 ApoE^{-/-}小鼠,高脂饮食喂养戴茨(Dyets ASHF3 高脂(40%kcal%)高胆固醇(1.25%)鼠粮)。PAO 组:8 周龄雄性 ApoE^{-/-}同时给予 0.15mg/kgPAO 灌胃,每日一次。两组小鼠共计喂养 20 周。喂养结束后,麻醉下进行经心灌流固定,随后在体视显微镜下,游离出小鼠全长主动脉,随后剪断,置于 4%多聚甲醛溶液中固定 12 小时,在生理盐水中漂洗后剥离动脉周围结缔组织,随后进行油红 O 染色。结果显示,在模型组动物的主动脉内有
- 30

大量的动脉粥样斑块生成。而 PAO 组动脉粥样硬化斑块数目明显少于 Model 组，且斑块所占整根动脉的面积也小于 Model 组(图 41)， $P < 0.05$ ，差异有统计学意义(图 42)。

实施例19. PAO在卵清蛋白OVA诱导的BALB/c小鼠哮喘模型中的药效评价

1. 实验方法和材料

1.1 实验动物处理

从上海吉辉试验动物饲养有限公司或其它符合资质的供应商购入共计 40 只（5 只备用。备用动物仅用于筛选合适体重范围的动物进行随机分组，不做造模或给药处理，将在试验结束时统一进行安乐死）。雌性 BALB/c 小鼠。动物均无特定病原，到达澎立生物动物房时约为 5 - 6 周。设计应用于动物的实验操作方案将由澎立生物 IACUC（实验动物管理和使用委员会）进行审批。

根据动物体重，通过 BioBook 随机分配功能将动物随机分配到各个处理组中，将 35 只动物随机分成 4 组: G1 组，即正常组，5 只 BALB/c 小鼠；G2 组，即模型组，10 只 BALB/c 小鼠；G3 组，即模型处理+PAO 0.1mpk 组；G4 组，即模型处理+PAO 0.3mpk 组。

配置致敏溶液：把 2 mg 的卵清蛋白溶解在 5 mL 磷酸盐缓冲液中。终浓度为 0.4 mg/mL。将 5 mL 卵清蛋白溶液和 5 mL 氢氧化铝（40 mg/mL）混合制备成 1:1 的溶液，37 °C，放置在水平振荡器上摇晃 30 分钟混匀。配置攻击溶液：在 50 mL 磷酸盐缓冲液中溶解 0.5 g 卵清蛋白。终浓度为 10 mg/mL。

在第 1 天和第 14 天，对 G2 - G4 组的小鼠腹腔注射致敏溶液进行致敏（0.1 mL/鼠）；G1 组小鼠腹腔注射 0.1 mL 磷酸盐缓冲液。在第 28 - 31 天，用攻击溶液对 G2 - G4 组小鼠进行攻击（1% OVA 攻击溶液，BUXCO aerosolizing dosing system, 30 分钟）。G1 组动物用磷酸盐缓冲液进行攻击 30 分钟。

1.2 气道反应性监测-Penh Value

在第 32 天，给药 4 个小时后，使用全身体积描记系统(whole body plethysmography WBP, Buxco BFL0100 WBP)对动物进行气道高反应性的检测。所有动物均用雾化吸入 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 mg/mL 倍增浓度的乙酰甲胆碱，测定相应浓度下的增强呼气间歇值。

在第 32 天，WBP 检测后，使用 25 - 50 mg/kg 舒泰和 5 - 10 mg/kg 甲苯噻嗪对动物麻醉后进行气管插管，用 0.4 mL 的 PBS（包含 1%FBS）对肺进行第一次灌洗。另取 0.4 mL 的 PBS（包含 1%FBS）对肺进行第二次、第三次灌洗。将三次灌洗的灌洗液（bronchoalveolar lavage fluid, BALF）置于冰上。4 °C，300 g 条件下离心 BALF 5 分钟，将不含细胞的 BALF 上清收集起来，保存在-80°C备用。

总白细胞计数：100 μL 台盼蓝溶液中加入 100 μL 含有细胞的 BALF 溶液，再将 10 μL 的混合物加入细胞计数板中。在显微镜下计算四个大方格内的细胞总数。总细胞数(cells/mL) = 绝对计数 * 100 μL / 总 BALF 体积(mL)。

5 分类细胞计数：用酒精擦拭细胞载玻片。将 100 μL 含有细胞的 BALF 加入离心涂片机上，离心后，让载玻片上的细胞自然干燥，然后在甲醇中固定 1 分钟。使用 Wright-Giemsa 染色液染色，从而区分出嗜酸细胞，中性白细胞，巨噬细胞和淋巴细胞。在 4 倍视野的显微镜下找到细胞，放大 20 倍。在显微镜下，随机选取细胞分布均匀的区域，计数分化细胞的数量，直到计数包含 200 个细胞。细胞数 = 绝对计数 / 200 * 总细胞数(cells/mL)。

10 脱颈椎安乐死动物后，收集右肺组织，液氮速冻后于 -80°C 冻存。收集左肺组织，10% 的中性甲醛溶液中固定，使用石蜡包埋在一个蜡块中，沿最大切片纵切一张切片，进行 H&E 染色，由病理专家进行气道直径、粘膜厚度和炎性浸润评分。

1.3 体重

整个实验周期，每周两次称量并记录动物的体重。

1.4 统计分析

15 实验数据表示成均值 $\pm$ 标准误 (mean $\pm$ S.E.M)。采用 SPSS 或 Graphpad Prism 分析数据。所采用的具体分析方法会在图例和表下注释里说明。P < 0.05 认为具有统计学差异。

2. 实验结果

2.1 实验动物体重分析

20 分别对实验第 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 29 和 32 天各组小鼠的体重进行统计分析。实验结果显示，各组小鼠体重随实验时长增加逐渐增长。实验第 32 天，与 G2 模型组比较，G1 正常组、G3 模型+PAO 0.1mpk 组和 G4 模型+PAO 0.3mpk 组小鼠体重均没有出现明显差异；G2 模型组小鼠体重与 G1 正常组比较有下降趋势，G3 模型+PAO 0.1mpk 组和 G4 模型+PAO 0.3mpk 组没有明显下降趋势（图 43）。

2.2 PAO 改善模型组小鼠呼吸功能

25 在实验第 32 天，给药 4 个小时后，使用全身体积描记系统 (whole body plethysmography WBP, Buxco BFL0100 WBP) 对动物进行气道高反应性的检测。所有动物均用雾化吸入 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 mg/mL 倍增浓度的乙酰甲胆碱，测定相应浓度下的增强呼气间歇值。与 G1 正常组比较，G2 模型组 Penh Value 和 AUC 统计值显著升高，提示模型组小鼠增强呼气间歇值明显升高，呼吸功能下降；与 G2 模型组比较，G3 模型+PAO 0.1mpk 组和 G4 模型+PAO 0.3mpk 组 Penh Value 和曲线下面积 AUC 统计值有下降趋势（图 44），提示一定浓度
30 PAO 能够改善模型组小鼠的呼吸功能。

2.3 PAO 减少小鼠肺部灌洗液中多种类型白细胞数量

在实验第 32 天，使用 PBS 对小鼠肺部进行 3 次灌洗，对灌洗液中的总白细胞数和白细胞分类细胞分别进行计数分析。实验结果表明：与 G1 正常组比较，G2 模型组总白细胞数显著增多；与 G2 模型组比较，G3 模型+PAO 0.1mpk 组和 G4 模型+PAO 0.3mpk 组总白细胞数显著减少（图 45），提示 PAO 0.1mpk 和 0.3mpk 处理能够显著抑制造模导致的灌洗液中白细胞总数上升。对灌洗液中不同类型白细胞进行分类统计分析，结果显示：与 G1 正常组比较，G2 模型组嗜酸性粒细胞（EOS）、巨噬细胞（Mac）、中性粒细胞（Neu）和淋巴细胞（Lym）数量均显著增多；与 G2 模型组比较，G3 模型+PAO 0.1mpk 组和 G4 模型+PAO 0.3mpk 组嗜酸性粒细胞数显著减少，G4 模型+PAO 0.3mpk 组中性粒细胞数显著减少，G3 模型+PAO 0.1mpk 组和 G4 模型+PAO 0.3mpk 组淋巴细胞数有下降趋势（图 46）。

2.4 PAO 改善造模导致的呼吸道病理改变

小鼠在安乐死处理后，收集右肺组织，液氮速冻后于-80℃冻存。收集左肺组织，10%的中性甲醛溶液中固定，使用石蜡包埋在一个蜡块中，沿最大切片纵切一张切片，进行 H&E 染色，由病理专家进行气道直径、粘膜厚度和炎症浸润评分。

结果显示：与 G1 正常组比较，G2 模型组粘膜厚度评分、炎症浸润评分和病理评分均显著升高；与 G2 模型组比较，G4 模型+PAO 0.3mpk 组粘膜厚度评分和 G4 模型+PAO 0.3mpk 组病理评分明显下降，G3 模型+PAO 0.1mpk 组和 G4 模型+PAO 0.3mpk 组炎症评分有下降趋势（图 47）。

实施例20. PAO和d5PAO对非酒精性脂肪性肝炎的治疗作用研究

1. 实验方法

1.1 HepG2 细胞培养和处理

人肝癌细胞 HepG2 细胞使用含 15%胎牛血清（fetal bovine serum, FBS）的 DMEM 培养温 37℃，5%CO₂，饱和湿度的培养箱中培养，培养 24 小时使其贴壁。次日，加入 0.5mM 油酸(Oleic acid, OA)，根据实验需要继续培养 24 小时。造模处理 24 小时后，根据实验分组给予不同浓度 PAO、d5PAO 或 f3PAO 处理 24 小时。

1.2 油红 O 染色

1.2.1 染色液的配制

a) 油红 O 染色液的配制

油红 O 储备液的配方：100%异丙醇 100 mL+0.5 g 油红 O 干粉，充分溶解，过滤，4 度避光保存。

油红 O 工作液的配方：实验前，将储备液与蒸馏水按 3:2 稀释，过滤（滤纸或极性滤膜配 1mL 注射器），酒红色且无沉淀。现配现用原则，避免工作液出现沉淀。

b) 60%异丙醇的配制

60%异丙醇的配方：100%异丙醇 60 mL+蒸馏水 40 mL，4 度保存。

5 1.2.2 染色

a) 缓慢吸去细胞培养液，PBS 洗涤 1 次；

b) 加入 4%多聚甲醛固定液(P0099)或 10%甲醛溶液固定 10 分钟，PBS 漂洗 2 次；

c) 加入适量染色洗涤液覆盖细胞 20 秒；

d) 吸除染色洗涤液，加入适量油红 O 染色工作液，染色 10-20 分钟；

10 e) 去除油红 O 染色工作液，加入适量染色洗涤液，静置 30 秒，然后去除染色洗涤液，用 PBS 洗涤 20 秒；

f) 加入适量 PBS，均匀覆盖细胞即可，显微镜下观察和拍照。

2. 结果分析

通过油红 O 染色和检测细胞中甘油三酯的浓度考察 PAO、d5PAO 以及 f3PAO 化合物在
15 经油酸处理的 HepG2 细胞模型中的作用。实验结果显示，PAO、d5PAO 和 f3PAO 能够减少
0.5mM 油酸处理导致的脂滴在 HepG2 细胞中的蓄积（图 48A）。0.5mM 油酸处理导致细胞
中甘油三酯含量较对照显著增多，50nM d5PAO 和 50nM f3PAO 显著减少 0.5mM 油酸处理所
导致的甘油三酯蓄积（图 48B）。

HepG2 细胞加入 0.5mM 油酸培养 24 小时后，根据实验分组给予不同浓度 PAO, d5PAO,
20 或 f3PAO 处理 24 小时。（A）油红 O 染色处理并拍照分析，标尺：50μM；（B）检测甘油三
酯并分析，One-way ANOVA, *p<0.03,**p<0.01,与 0.5mM 油酸处理组比较（图 48）。

本实验揭示 PAO、d5PAO 和 f3PAO 能阻止油酸所导致的脂滴和甘油三酯在肝细胞内的
蓄积，其中，当 d5PAO 和 f3PAO 的浓度为 50nM 时，阻止效果显著，从而缓解对肝细胞的
损伤。

25 **实施例21. PAO和F3PAO对动脉狭窄的作用研究**

1. 实验方法

1.1 体外用 Ang2 诱导大鼠血管平滑肌细胞（A7R5）的增殖和迁移：

采用血管紧张素 2（1μg/ml，Ang2）建立大鼠胸主动脉平滑肌细胞（A7R5）的增殖和迁
移模型，分为①对照组；②模型组；③加药组（低中高浓度），将细胞用胰酶消化后种板，
30 等细胞密度达到 70%时用无血清饥饿 24 小时，后加入 Ang2 造模并予以 PAO、F3PAO 各浓

度梯度干预 12-24 小时，后利用 CCK8 看细胞整体活力，qPCR，western，细胞免疫荧光细胞观察平滑肌细胞增殖指标（PCNA），迁移指标（MMP9，collagen-1）变化情况。

1.2 CCK8 法检测细胞活力：

将 A7R5 细胞以 5×10^3 的密度均匀的种至 96 孔板中（康宁），待细胞完全贴壁并融合至 70%~80% 时用无血清 DMEM 培养基饥饿 24 小时后，加入 1ug/ml 的 Ang2 孵育 48 小时左右诱导细胞增殖，之后每孔加入 10 μ l CCK8 试剂(碧云天)和 90 μ L DMEM 培养基，37℃孵育 2 小时后应用酶标仪于 450nm 波长处检测吸光度(OD)值，评价细胞增殖和细胞活力情况。每组设置 5 个复孔。

1.3 荧光定量 PCR 检测 PCNA 及 MMP9 基因表达：

用 RNA 提取试剂盒（B0004DP，苏州英泽生物医药有限公司）提取细胞总 RNA。应用分光光度（赛默飞）计进行 RNA 浓度及纯度鉴定。采用反转录试剂盒（上海翌圣）对 1000 ng 总 RNA 进行反转录反应获取 cDNA。采用 SYBR Green 试剂盒（上海翌圣）对 cDNA 进行荧光定量 PCR 扩增 PCNA 及 MMP9 基因，GAPDH 基因为内参照。从 NCBI 网站上下载上述基因 cDNA 序列，PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成。引物序列如下：PCNA：正向 TGGACTTAGACGTTGAGCAACTTGG，反向 GCACAGGAGATCACCACAGCATC；MMP9：GATCCCCAGAGCGTTACTCG，GTTGTGGAACTCACACGCC；Col 1A：正向 TAAGGGTCCCCAATGGTGAGA，反向 GGGTCCCTCGACTCCTACAT；GAPDH：正向 CCAGGCGCCCAATACG，反向 CCACATCGCTCAGACACCAT。

1.4 细胞提取物免疫印记（Western Blotting）检测 PCNA，MMP9 以及 Col 1A 蛋白表达：

吸取培养基，用 PBS 清洗 2 遍培养皿。根据培养细胞的总量加入适量含有蛋白酶抑制剂的 RIPA lysis（碧云天），冰上裂解 30 分钟。期间涡旋震荡数次以保证蛋白裂解充分。然后将裂解物在 4℃、12000g 离心 15 分钟，上清即为获得的细胞总蛋白。采用 BCA 试剂盒（碧云天）对蛋白进行定量。应用 SDS-PAGE 胶试剂盒（雅酶）胶对 30 μ g 蛋白进行电泳。一抗采用 Col 1A 抗体（Abcam），PCNA(Abcam)，MMP9(Abcam)抗体；二抗使用 HRP 标记的抗体（碧云天），GAPDH 为内参。应用 Image-Pro Plus6.0 软件对条带进行灰度分析。

1.5 A7R5 细胞迁移能力测试（划痕实验）：

将 A7R5 细胞接种于画好平行线的 6 孔板内，当细胞密度约为 80%时，饥饿(无血清培养基培养) 24 小时 后，用 200 μ L 的灭菌枪头沿之前画好的平行线制造划痕。用 PBS 溶液清洗 3 次，吸弃脱落细胞，后对细胞进行 Ang2 造模和药物干预，每组分别设 3 个复孔。分别在倒置显微镜下观察 0 小时、48 小时划痕区细胞的迁移情况，采用 ImageJ 软件对每个

镜下视野迁移后的划痕宽度和划痕面积，迁移率以迁移后划痕面积占初始划痕面积的百分比进行计算。

1.6. 统计学处理：

采用 SPSS22.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较采用独立样本 t 检验；超过 3 组用 one-way ANOVA 进行统计分析，组间使用 Bonferroni 检验分析，计数资料以率(%)表示，组间比较采用 χ^2 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。#表示与 control 比较，#p < 0.05, ##p < 0.001, ###p < 0.0001。*表示与 model 比较，*p < 0.05, **p < 0.001, ***p < 0.0001。

2. 实验结果

2.1 F3PAO 抑制 Ang2 刺激血管平滑肌细胞的增殖 (CCK8 检测)

结果表明 (图 49)，在 1 μ g/ml Ang2 的干预下，血管平滑肌细胞的增殖能力较之于对照组有明显升高，从对照组的 92% $\pm$ 0.9% 上升到模型组的 150% $\pm$ 3.5% 左右 (###p < 0.0001)，说明 Ang2 干预刺激了血管平滑肌细胞的增殖和迁移。在 Ang2 干预的条件下分别加入不同浓度的 F3PAO，发现血管平滑肌细胞的增殖和迁移能力也随之下降，当 F3PAO 的浓度达到 50nM 的时候，与模型组相比有统计学意义 (50nM, **p < 0.001, > 100nM, ***p < 0.0001)。低于 50 nM 的 F3PAO 对抑制细胞活力则没有明显改变。实验说明 F3PAO 可以有效抑制 Ang2 刺激的血管平滑肌细胞的增殖。n=3，使用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 处理，各组间使用 T-test 分析，数据用 mean $\pm$ SEM 表示。

2.2 F3PAO 抑制 Ang2 诱导的 A7R5 细胞 PCNA, MMP9 基因的表达量 (定量 PCR, Q-PCR)

PCNA, MMP9 是典型的增殖和迁移标志蛋白。Q-PCR 揭示 Ang2 干预后可显著提高 MMP9 基因的表达量 (从 100% 上升至 173% $\pm$ 10.2%，P < 0.0001)，而这个表达增强效应可被 F3PAO (50、100nM) 抑制，F3PAO 的抑制效应呈剂量依赖性：F3PAO 浓度越高，抑制效应越明显 MMP9 表达量分别为 93% $\pm$ 7.6%，P < 0.05；80% $\pm$ 6.1%，P < 0.001) (图 50A)。

Ang2 干预后亦可显著提高 PCNA 的表达量 (从 100% 上升至 156% $\pm$ 8.2%)，而这个表达增强效应可以被 F3PAO (50、100nM) 抑制，F3PAO 的抑制效应亦呈剂量依赖性：F3PAO 浓度越高，抑制效应越明显 (PCNA 表达量分别为 115% $\pm$ 4.7%，P < 0.0001, 91% $\pm$ 10.7%, P < 0.0001) (图 50B)。n=3，使用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 处理，各组间使用 T-test 分析，数据用 mean $\pm$ SEM 表示。

2.3 F3PAO 抑制 Ang2 诱导的 A7R5 细胞内 PCNA 和 MMP9 蛋白的表达量 (WB)

Ang2 干预后可显著提高 PCNA 基因的表达量 (从 100% 上升至 161% $\pm$ 10.2%，P < 0.0001)，而这个表达增强效应可以被 F3PAO (50、100nM) 抑制。F3PAO 的抑制效应呈剂量依赖性：

F3PAO 浓度越高,抑制效应越明显, MMP9 的表达量分别为 $118\% \pm 3.0\%$, $P < 0.05$; $89\% \pm 8.3\%$, $P < 0.001$) (图 51A, C)

Ang2 干预后亦可显著提高 MMP9 蛋白表达量 (从 100% 上升至 $245\% \pm 15.2\%$, $P < 0.0001$), 而这个表达增强效应可以被 F3PAO (50、100nM) 抑制, F3PAO 的抑制效应亦呈剂量依赖性: F3PAO 浓度越高, 抑制效应越明显 (MMP9 表达量分别为 $174\% \pm 14.4\%$, $P < 0.05$, $158\% \pm 15.3\%$, $P < 0.05$) (图 51B, C)。n=3, 使用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 处理, 各组间使用 T-test 分析。数据用 mean $\pm$ SEM 表示。

2.4 PAO/F3PAO/GSK-A1 抑制 Ang2 刺激诱导的细胞 Collagen-1 蛋白表达量 (WB)

图 52A 中, WB 结果显示 Ang2 可显著提高血管平滑肌中 Collagen-1 蛋白的表达量 (从 100% 上升至 $220\% \pm 22.4\%$, $P < 0.001$), 而这个表达增强效应可以被 PAO/F3PAO (50nM) 抑制。Collagen-1 的表达量分别为 $136\% \pm 8.7\%$, $P < 0.05$, $104\% \pm 5.8\%$, $P < 0.001$ 。图 52 B 中 WB 结果显示 Ang2 可显著提高血管平滑肌中 Collagen-1 蛋白的表达量 (从 100% 上升至 $223\% \pm 15.0\%$, $P < 0.001$), 而这个表达增强效应可以被 GSK-A1 (25nM, 50nM) 抑制。Collagen-1 的表达量分别为 $160\% \pm 9.0\%$, $P < 0.05$, $120\% \pm 7.2\%$, $P < 0.001$ 。n=3, 使用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 处理, 各组间使用 T-test 分析, 数据用 mean $\pm$ SEM 表示, (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$)。考虑 GSK-A1 为 $Pi4kIIIa$ 的抑制剂, 从此 WB 的结果提示 $Pi4kIIIa$ 很有可能和血管平滑肌细胞胶原沉积或血管硬化有关, 提示抑制 $Pi4kIIIa$ 可能改善血管硬化。

2.5 F3PAO 抑制 Ang2 诱导的血管平滑肌细胞迁移能力的增强 (划痕实验)

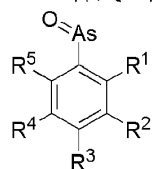
划痕实验表明, Ang2 干预后可显著提高细胞的迁移能力, 从对照组的 100% 到 $184\% \pm 7.4\%$ ($P < 0.0001$), 而 F3PAO (50nM 和 100 nM) 可有效抑制迁移能力的增长 ($155\% \pm 6.4\%$, $P < 0.05$, $147\% \pm 4.1\%$, $P < 0.0001$) (图 53)。n=3, 各组间使用 T-test 分析, 数据用 mean $\pm$ SEM 表示。(迁移率%=(初始划痕面积-24h 后划痕面积)/初始划痕面积 $\times 100\%$ 。)

以上结果显示, F3PAO 可以抑制 Ang2 诱导的体外培养的血管平滑肌细胞的增殖和迁移。同时发现 PAO/F3PAO/GSK-A1 都可在蛋白水平抑制 Ang2 刺激诱导血管平滑肌细胞胶原的表达的增加, 这些结果表明 F3PAO 可能有抑制各种原因导致血管内皮损伤后血管狭窄的作用。而 PAO/F3PAO/GSK-A1 在血管平滑肌上有抑制胶原的作用, 可能成为抑制高血压病以及 PCI 术后晚期血管硬化上的新型药物。

本领域的技术人员应当明了, 尽管为了举例说明的目的, 本文描述了本公开的具体实施方式, 但可以对其进行各种修改而不偏离本公开的精神和范围。因此, 本公开的具体实施方式和实施例不应当视为限制本公开的范围。本公开仅受所附权利要求的限制。本文中引用的所有文献均完整地并入本文作为参考。

权 利 要 求 书

1. 一种式 I 化合物或其药学上可接受的盐，

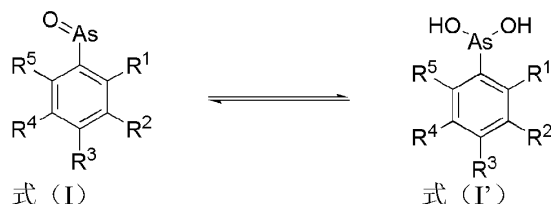


式 (I)

5 其中， R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 独立地选自氢、氘、氟、氯、溴、碘、甲基、氨基、硝基、一氘代甲基、二氘代甲基、三氘代甲基、一氟代甲基、二氟代甲基或三氟代甲基，且 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 中至少一个为卤素或氘。

2. 如权利要求 1 所述的化合物或其药学上可接受的盐，其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 独立地选自氢或氘或卤素，且 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 中至少一个为卤素，至少两个为卤素，优选地至少二个、三个、四个或五个为氟。

3. 如权利要求 1 所述的化合物或其药学上可接受的盐，其中式 I 化合物在溶于溶剂、特别是含水溶剂中时任选形成式 I' 的化合物，其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 具有与前述相同的含义。

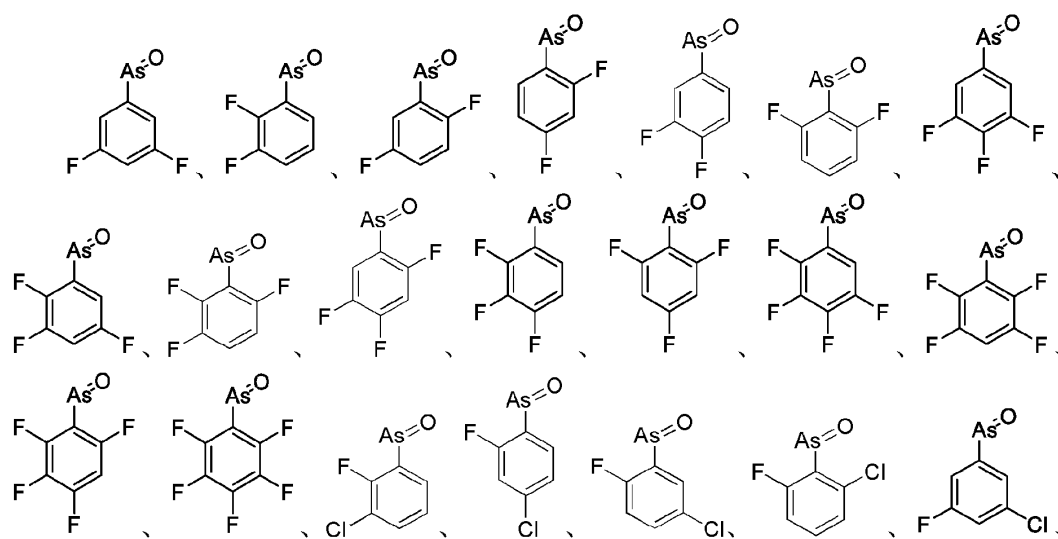


15

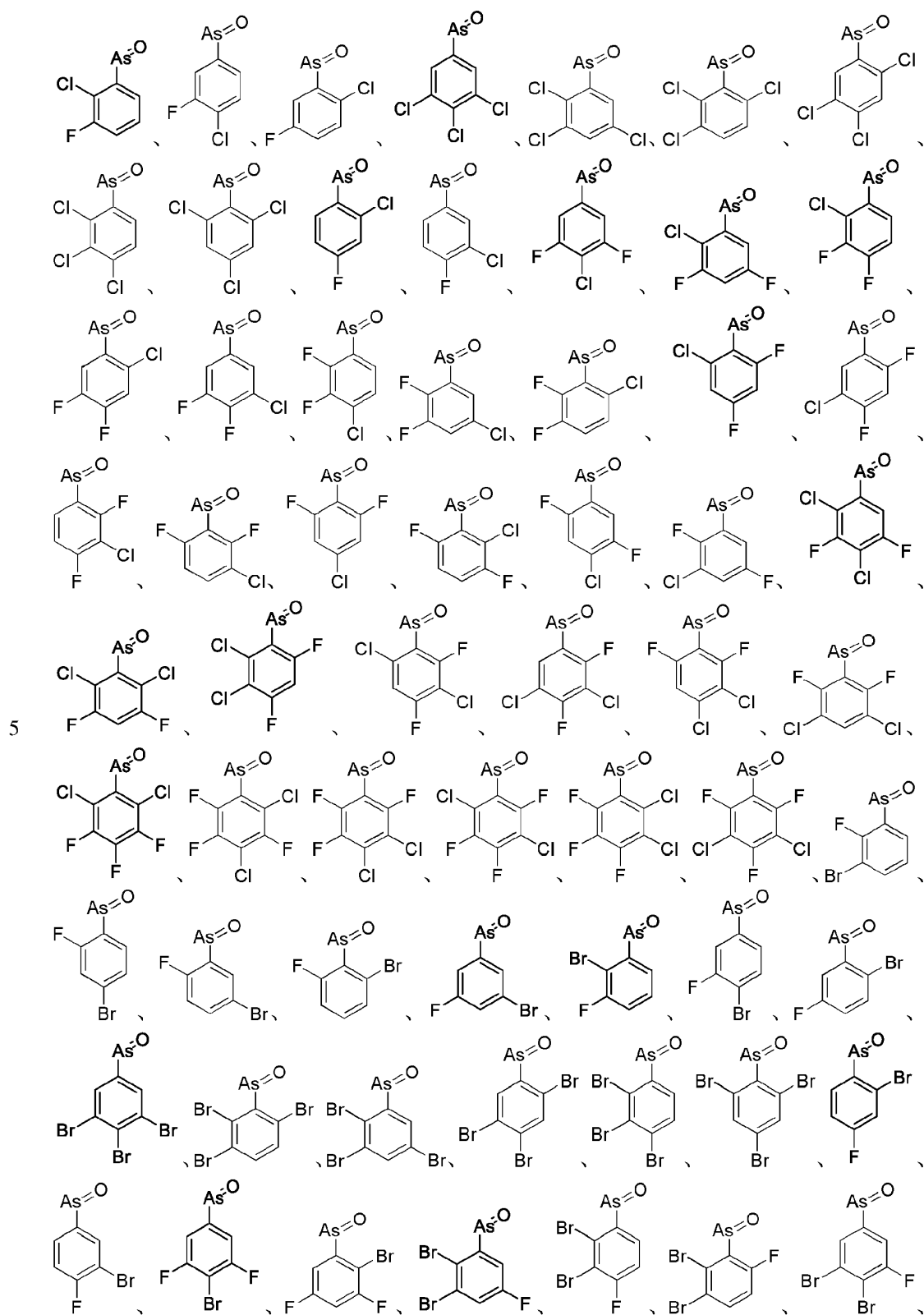
式 (I)

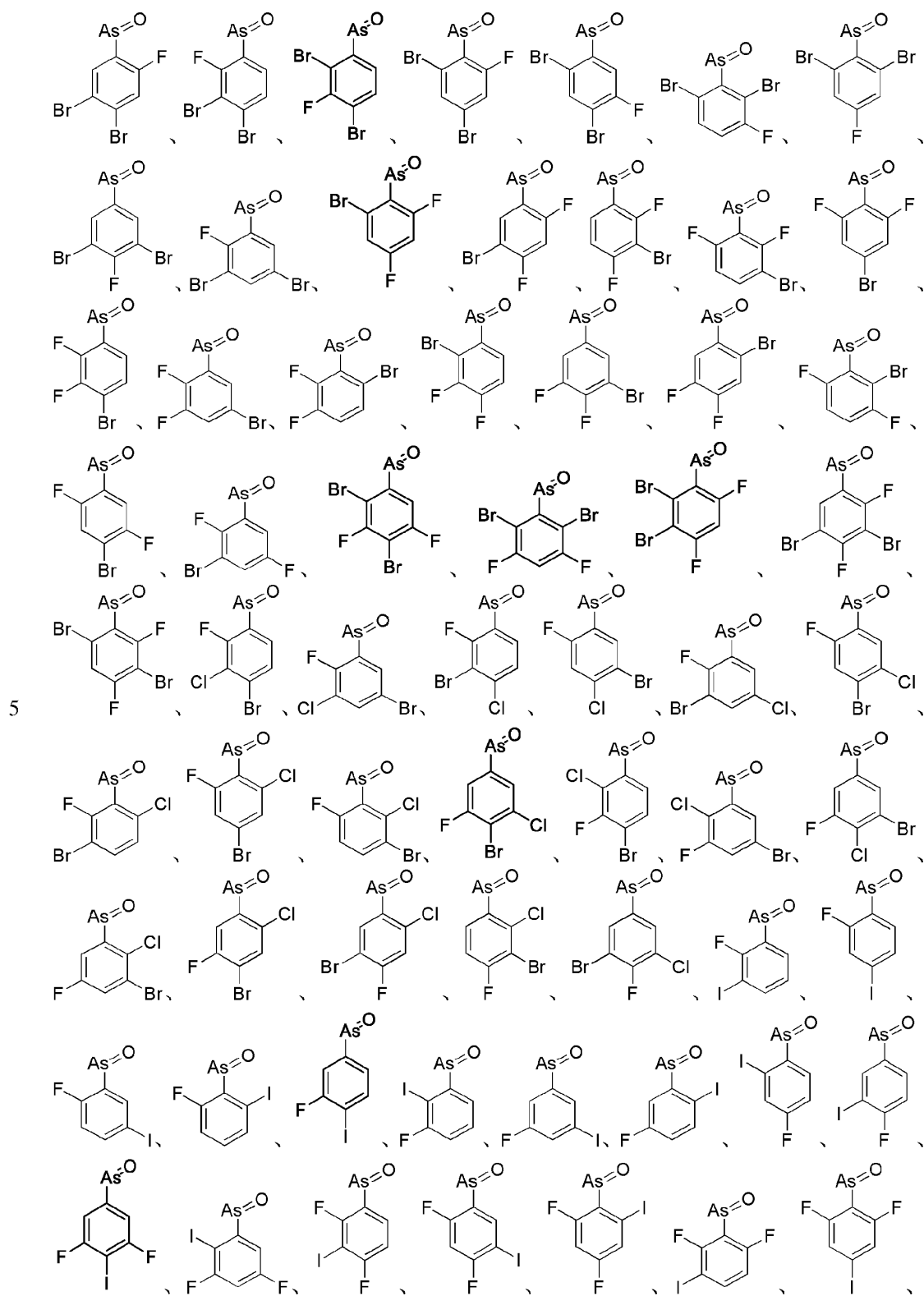
式 (I')

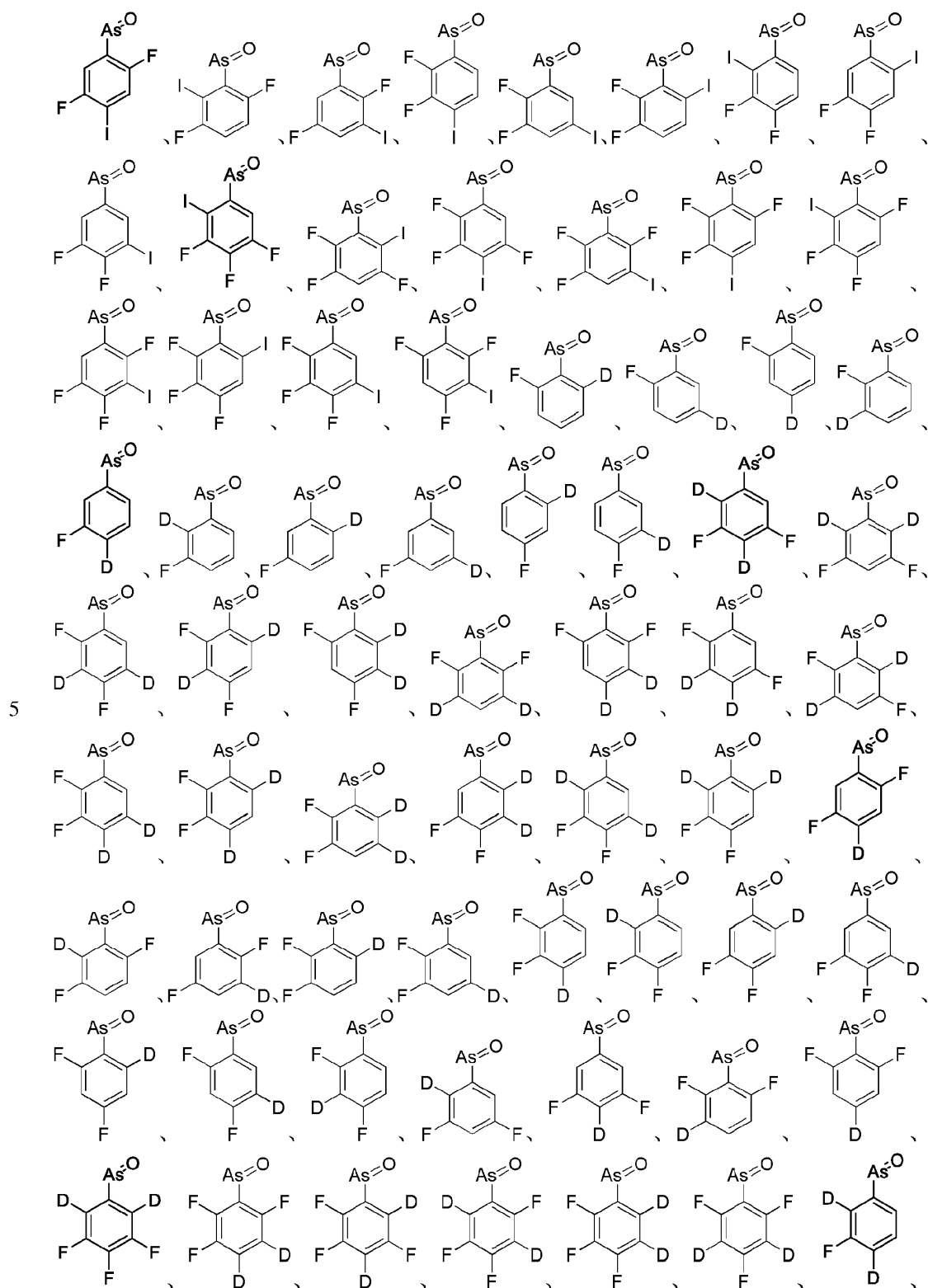
4. 如权利要求 2 或 3 所述的化合物或其药学上可接受的盐，其中所述化合物选自由以下化合物组成的组：

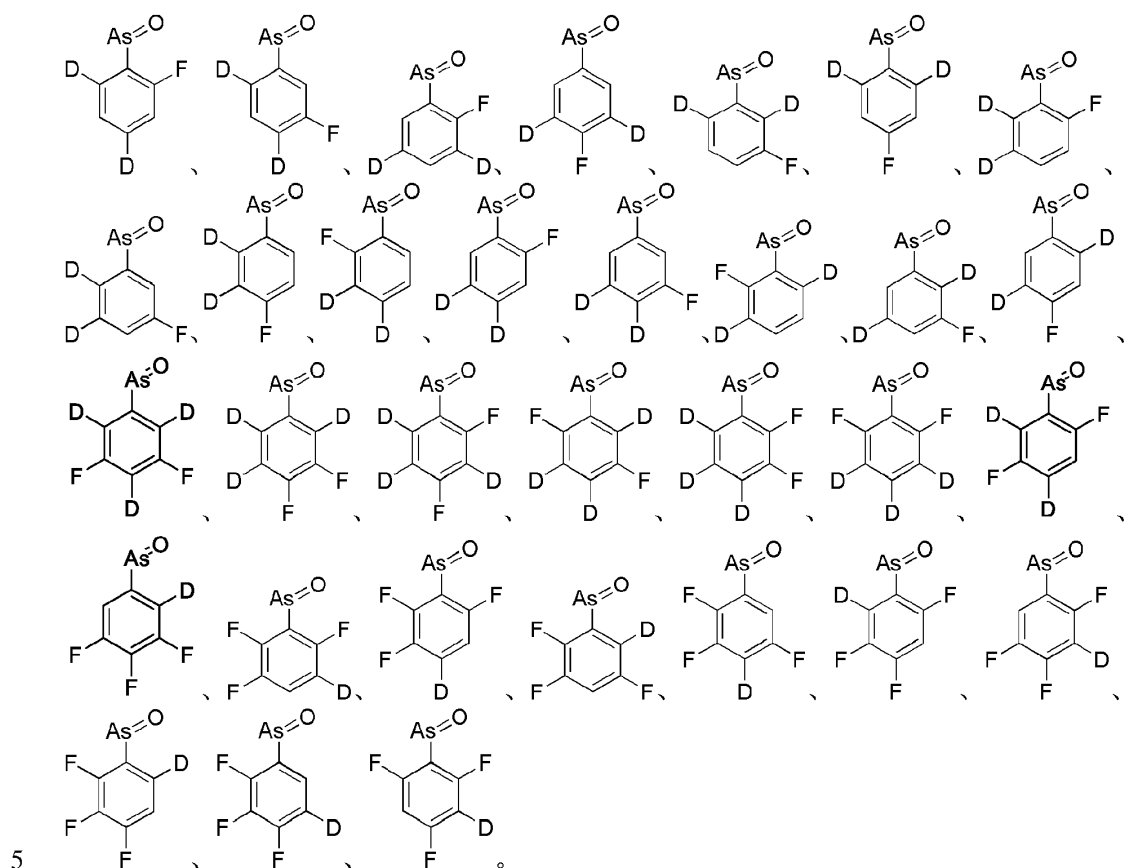


20









5.如权利要求1至4中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备预防或治疗受试者疾病或病理反应的药物中的用途。

6.如权利要求5所述的用途，其中所述疾病选自肿瘤、恶病质诸如恶性肿瘤或治疗肿瘤的化疗药物引起的恶病质、阿尔兹海默症、细胞内蛋白错误折叠相关疾病、溶酶体贮积病、炎症反应、组织器官纤维化、病毒感染的疾病、神经症、微生物感染诸如耐药微生物感染、放射性射线照射导致的细胞组织损伤、动脉粥样硬化、糖尿病、哮喘中的至少一种。

7.如权利要求5所述的用途，其中所述受试者是人或非人哺乳动物。

8.如权利要求6所述的用途，其中所述肿瘤选自淋巴瘤诸如急性非B或非T细胞淋巴瘤、宫颈癌、子宫内膜癌、肝癌、乳腺癌诸如三阴性乳腺癌、肺癌诸如非小细胞肺癌或小细胞肺癌、结直肠癌、胃癌、皮肤癌诸如黑色素瘤、骨癌、骨肉瘤、骨髓瘤、血癌诸如急性或慢性白血病、卵巢癌、前列腺肿瘤、脑瘤诸如脑星型胶质细胞瘤、神经母细胞瘤、甲状腺癌、恶性胚胎横纹肌瘤。

9.如权利要求6所述的用途，其中所述细胞内蛋白错误折叠相关疾病为帕金森氏病、路易体痴呆症、多系统萎缩症、包涵体肌炎、额颞痴呆、亨廷顿疾病、多聚谷氨酰胺病、肌萎缩性侧索硬化症、或朊病毒疾病。

10.如权利要求6所述的用途，其中所述溶酶体贮积病为鞘脂类代谢障碍诸如戈谢病、C型尼曼氏病、黏多糖病、糖原贮存病、糖蛋白贮积病、脂类储存疾病、翻译后修饰缺陷症、内在膜蛋白缺失失调症、神经元蜡样质脂褐质沉积病、或溶酶体相关细胞器紊乱症。

11.如权利要求6所述的用途，其中所述炎症反应为局部组织或者全身血液中炎症因子诸如 TNF α 或 IL-6 增加。

12.如权利要求6所述的用途，其中所述组织器官纤维化选自心纤维化、肾纤维化、肺纤维化、肝纤维化、伤口愈合时的纤维化或瘢痕形成或动脉放置支架后的纤维化所致的再狭窄。

13.如权利要求6所述的用途，其中所述病毒包括冠状病毒和非冠状病毒，优选所述冠状病毒选自鸡传染性支气管炎病毒、猪流行性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒、猪血凝性脑脊髓炎病毒，猪 δ 冠状病毒、犬呼吸道型冠状病毒、小鼠肝炎病毒、猫冠状病毒、人冠状病毒、人乳头瘤病毒、严重急性呼吸综合征病毒、中东呼吸综合征病毒、或新型冠状病毒；所述的非冠状病毒选自丙肝病毒或艾滋病毒。

14.如权利要求6所述的用途，其中所述神经症选自神经衰弱、焦虑症、抑郁症或躁狂症。

15. 如权利要求6所述的用途，其中微生物感染选自细菌或真菌感染，优选为耐药细菌感染或耐药真菌感染，更优选地其中所述微生物选自鲍氏不动杆菌、阴沟肠杆菌、大肠杆菌、产酸克雷伯氏杆菌、肺炎杆菌、摩氏摩根氏菌、绿脓杆菌、粘质沙雷氏菌、金黄葡萄球菌、粪肠球菌、尿肠球菌、肺炎链球菌、白色念珠菌、近平滑白念珠菌、烟曲霉、淋球菌、破伤风梭菌、痤疮丙酸杆菌、新型隐球菌、幽门螺杆菌、脆弱拟杆菌、艰难梭菌、阴道加德纳菌、阴道阿托波氏菌、厌氧消化链球菌、阴道毛滴虫以及上述菌的耐药菌中的至少一种；或者，
20 优选地，所述微生物感染选自体表或粘膜处感染的微生物，诸如痤疮、青春痘、外伤、烧伤或烫伤等处的微生物感染。

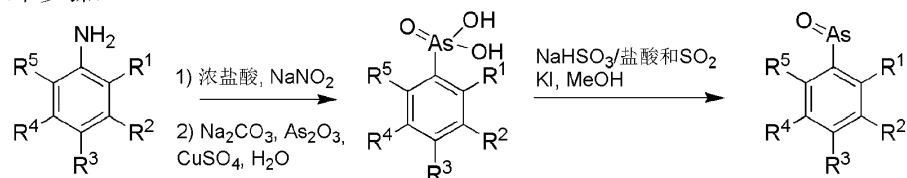
16. 如权利要求6-15中任一项所述的用途，其进一步包括向需要其的受试者施用第二试剂。

17.如权利要求16所述的用途，其中所述权利要求1至4中任一项所述的化合物或其药
25 学上可接受的盐在所述第二试剂之前、之后或同时施用。

18.一种药物组合物，包含权利要求1至4中任一项所述的化合物或其药理学上可接受的盐，和药理学上可接受的载体。

19. 如权利要求18所述的药物组合物，其中所述药物组合物进一步包括第二试剂诸如治疗肿瘤的药物，所述治疗肿瘤的药物优选为干扰有丝分裂的抗肿瘤药诸如紫杉醇或白蛋白紫杉醇、直接影响DNA结构和功能药物诸如卡铂或顺铂、或 Kras 抑制剂。
30

20.一种如权利要求 1 至 4 中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐的制备方法,包括以下步骤:



1) 在 0°C~10°C 下在与式 (I) 对应结构的苯胺或其盐的水溶液中依次加入浓盐酸、亚硝酸钠水溶液, 保持温度在 5°C 以下;

2) 将碳酸钠、三氧化二砷、硫酸铜的水溶液加热至 90~100°C 后降温, 在该水溶液中加入上述第 1) 步制备好的溶液, 搅拌、过滤, 滤液中加入酸调节 pH 值, 分离所析出的固体;

3) 将上述析出的固体、碘化钾以及亚硫酸氢钠或盐酸和二氧化硫在甲醇中搅拌至反应完全, 进行后处理得到所述化合物。

21. PI4KIII α 特异性抑制剂在制备用于预防或治疗心脏纤维化的药物中的用途。

22.PI4KIII α 特异性抑制剂在制备在肿瘤患者中用于预防或治疗放射性射线照射导致的细胞组织损伤的药物中的用途。

23. PI4KIII α 特异性抑制剂氧化苯砷及其衍生物在制备用于预防或治疗动脉粥样硬化或动脉粥样硬化所引起的疾病的药物中的用途, 其中所述动脉粥样硬化所引起的疾病优先为冠心病、心梗或脑梗。

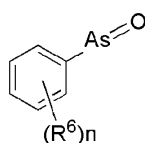
24. PI4KIII α 特异性抑制剂在制备在肿瘤患者中用于预防或治疗糖尿病的药物中的用途。

25. PI4KIII α 特异性抑制剂在制备用于预防或治疗微生物感染的药物中的用途, 其中所述微生物感染选自细菌或真菌感染, 优选为耐药细菌感染或耐药真菌感染, 更优选地其中所述微生物选自鲍氏不动杆菌、阴沟肠杆菌、大肠杆菌、产酸克雷伯氏杆菌、肺炎杆菌、摩根氏菌、绿脓杆菌、粘质沙雷氏菌、金黄葡萄球菌、粪肠球菌、尿肠球菌、肺炎链球菌、白色念珠菌、近平滑白念珠菌、烟曲霉、淋球菌、破伤风梭菌、痤疮丙酸杆菌、新型隐球菌、幽门螺杆菌、脆弱拟杆菌、艰难梭菌、阴道加德纳菌、阴道阿托波氏菌、厌氧消化链球菌、阴道毛滴虫以及上述菌的耐药菌中的至少一种; 或者, 优选地, 所述微生物感染选自体表或粘膜处感染的微生物, 诸如痤疮、青春痘、外伤、烧伤或烫伤等处的微生物感染。

26. PI4KIII α 特异性抑制剂在制备在用于预防或治疗哮喘的药物中的用途。

27. PI4KIII α 特异性抑制剂在制备在用于预防或治疗非酒精性脂肪性肝炎的药物中的用途。

28.根据权利要求 21 至 27 中任一项所述的用途，其中所述氧化苯砷及其衍生物是抗体、小分子化合物、RNAi 分子或者反义核酸，优选所述抗体是单克隆抗体或者多克隆抗体，更优选所述抗体是嵌合抗体、人源化抗体或者全人源抗体；优选所述 RNAi 分子是小干扰 RNA (siRNA)、短发夹 RNA (shRNA) 或微小 RNA (miRNA)，更优选所述 RNAi 分子的长度为 18-100 碱基和/或 RNAi 分子被修饰以增强其稳定性；优选所述小分子化合物是氧化苯砷或其衍生物、G1 及其类似物、A1 及其类似物 (J Med Chem 2014 Vol. 57 Issue 5 Pages 2091-106 和 J Biol Chem 2014 Vol. 289 Issue 9 Pages 6120-32)、或司美匹韦及其类似物 (Int J Radiation Oncol Biol Phys, Vol. 96, No. 4, pp. 867e876, 2016)、TG-1478(Tyrphostin AG-1478, NSC-693255)，更优选所述氧化苯砷及其衍生物具有式 (II) 所示的结构或者其药学上可接受的盐：



式 (II)

其中，R⁶各自独立的选自 (a) H、氘、甲基、一氘代甲基、二氘代甲基、三氘代甲基、卤素、硝基、氰基、羟基、氨基、氨基甲酰基、C1-6 烷基砷基、C1-6 烷基、C1-6 环烷基、C2-6 炔基、C2-6 烯基、C1-6 烷氧基、C1-6 卤代烷基、C1-6 亚烷基-NH₂、C1-6 亚烷基-NH-C(O)H、-As(O)、-N=NH、N-(C1-6 烷基)氨基、N,N-(C1-6 烷基)₂氨基、-NH-C(O)H、-NH-S(O)₂H、-C(O)OH、-OC(O)H、-SH、-S(O)₂H、-S(O)₂-NH₂ 或杂环基，并且可选的被 R⁷ 或 R⁸ 取代，其中 R⁷ 和 R⁸ 各自独立的选自氨基、C1-6 烷基、C1-6 烷氧基、C1-6 卤代烷基、N-(C1-6 烷基)氨基、N-(6-12 元芳香基)氨基、N,N-(C1-6 烷基)₂氨基、C3-6 环烷基、6-12 元的芳香基或 3-12 元的杂环基，并且可选的被一个或多个卤素、硝基、氰基、羟基、氨基、氨基甲酰基、-NH-C(O)-R¹⁰、-C(O)OR⁹、6-12 元的芳香基、C1-6 烷基、C2-6 炔基、C2-6 烯基、C1-6 烷氧基、C1-6 卤代烷基、3-6 元的杂环基、C3-6 环烷基或 Bn-O-取代，并且 R⁹ 是 C1-6 的烷基，并且可选的被一个或多个卤素、硝基、氰基、羟基、氨基、氨基甲酰基、6-12 元的芳香基、C1-6 烷基、C2-6 炔基、C2-6 烯基、C1-6 烷氧基、C1-6 卤代烷基、3-6 元的杂环基、C3-6 环烷基或 Bn-O-取代，R¹⁰ 选自 H、C1-6 烷基、C2-6 炔基、C2-6 烯基、C1-6 烷氧基或 C1-6 卤代烷基，和/或

(b) 两个相邻碳原子上的 R⁶ 形成 5-12 元的环烷基、芳香基或杂环基，并且可选的被一个或多个卤素、硝基、氰基、羟基、氨基、氨基甲酰基、6-12 元的芳香基、C1-6 烷基、C2-6 炔基、C2-6 烯基、C1-6 烷氧基、C1-6 卤代烷基、3-6 元的杂环基、C3-6 环烷基或 Bn-O-取代，

其中，n 为 0-5 的整数。

29. 根据权利要求 28 所述的用途，其中 n 为 0-2 的整数，所述 R⁶ 各自独立的选自 H、
氘、甲基、一氘代甲基、二氘代甲基、三氘代甲基、卤素、硝基、氰基、羟基、氨基、氨基
甲酰基、C1-6 烷基砷基、C1-6 烷基、C1-6 环烷基、C1-6 烷氧基、C1-6 卤代烷基、-As(O)、
5 N-(C1-6 烷基)氨基、N,N-(C1-6 烷基)₂ 氨基、-NH-C(O)H 或 -NH-S(O)₂H，并且可选的被所述
R⁷ 或 R⁸ 取代。

30. 根据权利要求 28 所述的用途，其中 n 为 0-2 的整数，所述 R¹ 各自独立的选自 H、
氘、甲基、一氘代甲基、二氘代甲基、三氘代甲基、卤素、硝基、氰基、羟基、氨基、C1-
6 烷基砷基、C1-6 烷基、C1-6 环烷基、C1-6 烷氧基、C1-6 卤代烷基、-As(O)、-NH-C(O)
10 H 或 -NH-S(O)₂H，并且可选的被所述 R⁷ 或 R⁸ 取代。

31. 根据权利要求 28 所述的用途，其中 n 为 1 或 2，所述 R⁶ 各自独立的选自 H、氘、
甲基、一氘代甲基、二氘代甲基、三氘代甲基、卤素、氨基、C1-6 烷基砷基、C1-6 环烷基、
C1-6 烷氧基、C1-6 卤代烷基、-NH-C(O)R⁷ 或 -NH-S(O)₂R⁸，其中 R⁷ 为 C1-6 烷基，可选的
被一个 6-12 元芳香基取代，R⁸ 为 6-12 元芳香基，可选的被一个卤素、C1-6 烷氧基或 C1-6
15 卤代烷基取代。

32. 根据权利要求 31 所述的用途，其中所述 R⁶ 位于 -As(O) 基团的邻位和/或者对位。

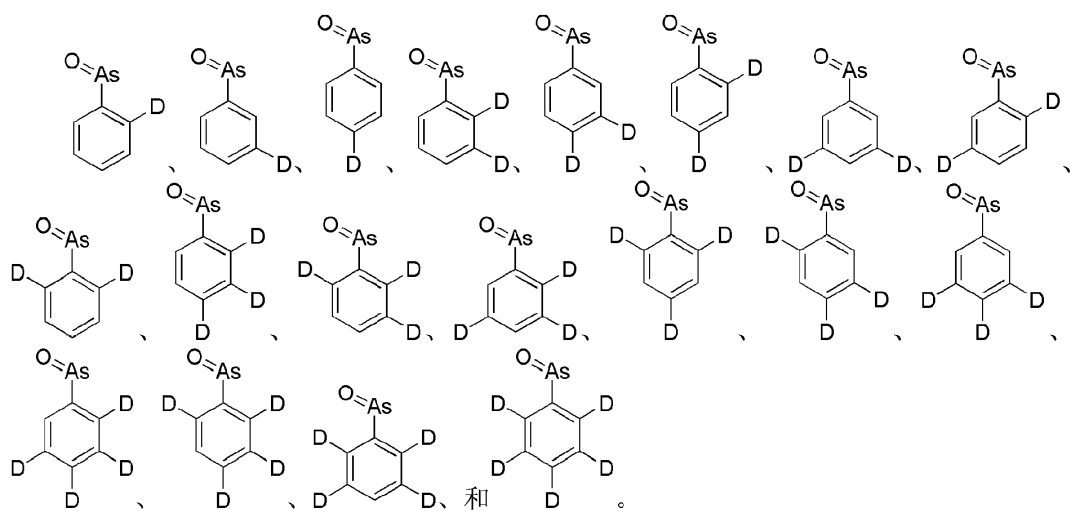
33. 根据权利要求 28 所述的用途，其中 n 是 0。

34. 根据权利要求 28 所述的用途，

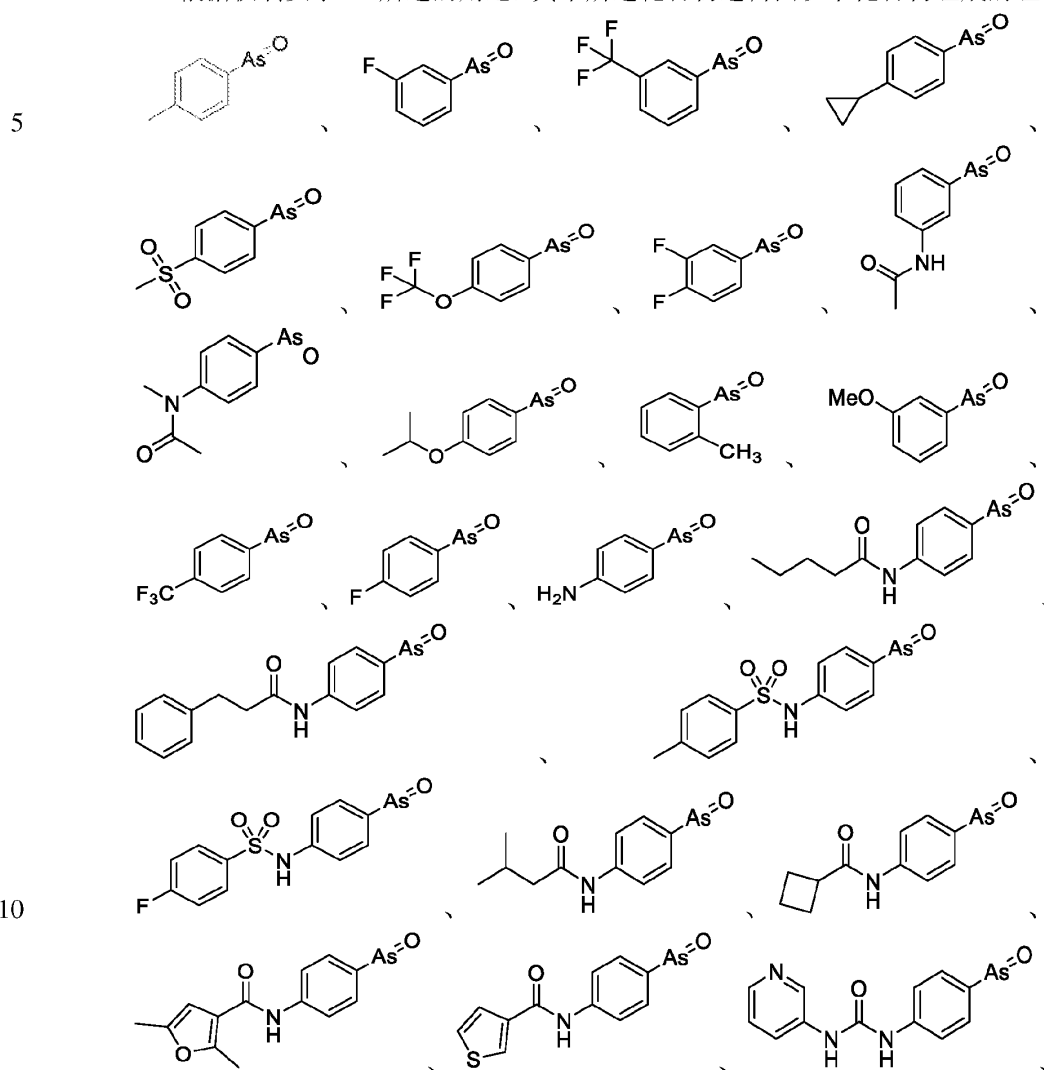
其中，R¹、R²、R³、R⁴、R⁵ 独立地选自氢、氘、卤素、甲基、一氘代甲基、二氘代甲
20 基或三氘代甲基，且 R¹、R²、R³、R⁴、R⁵ 中至少一个为氘或氘代的；

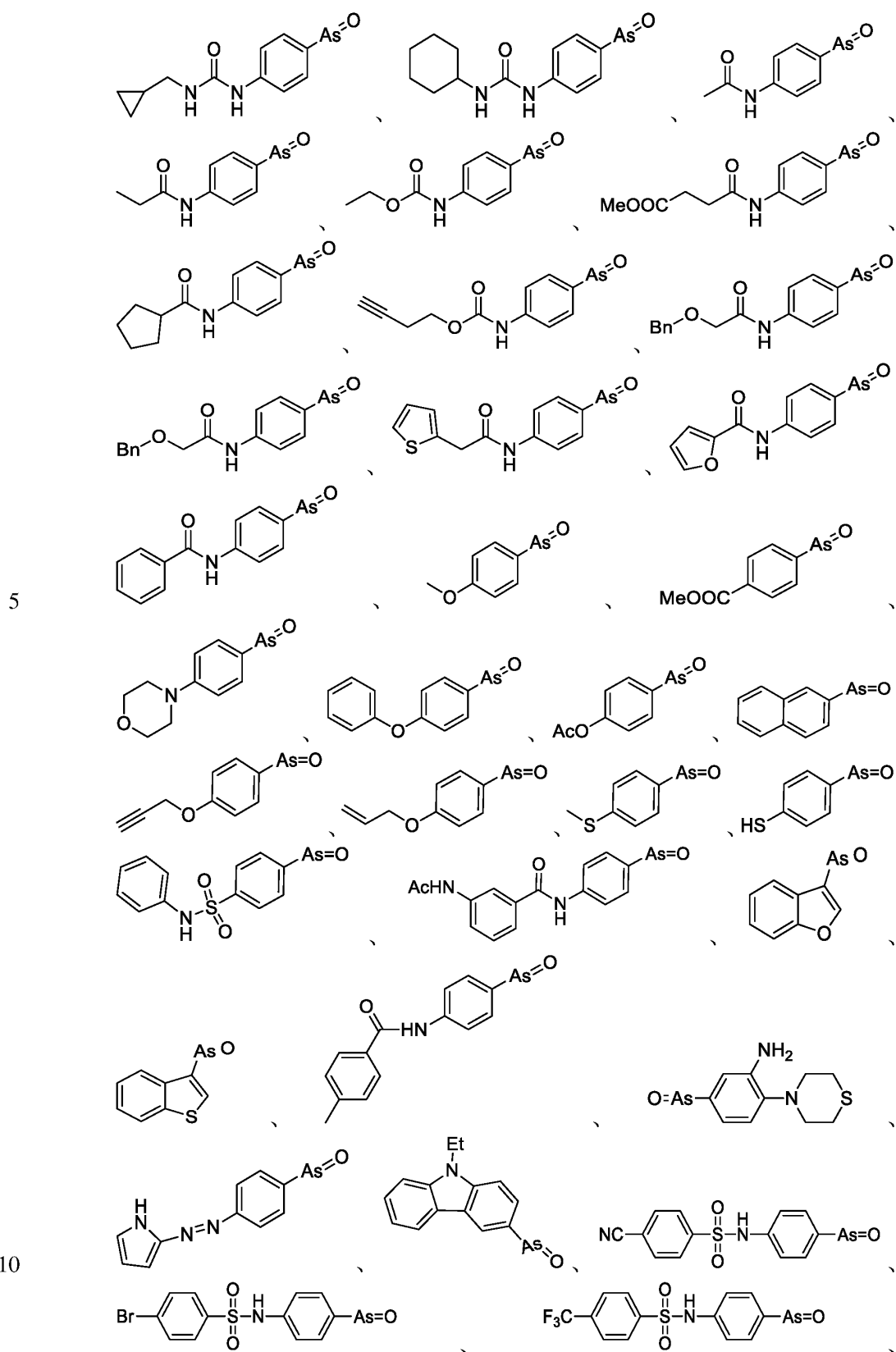
优选地，R¹、R²、R³、R⁴、R⁵ 独立地选自氢或氘，且 R¹、R²、R³、R⁴、R⁵ 中至少一个
为氘，至少两个为氘，优选地至少三个、四个或五个为氘；

更优选地，所述化合物选自由以下化合物组成的组：

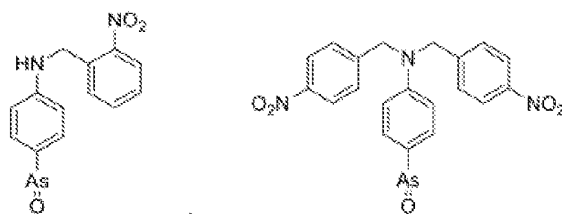
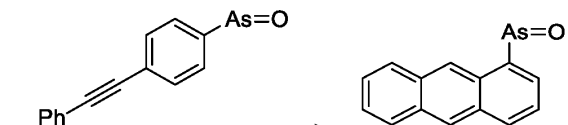
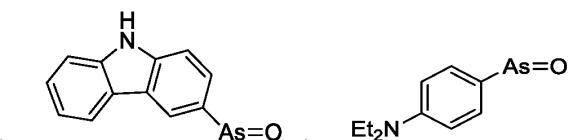
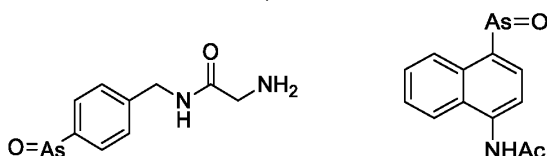
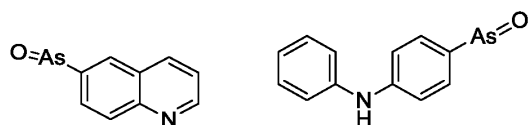
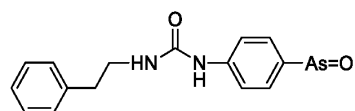
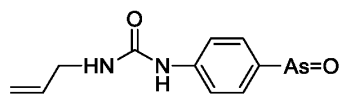
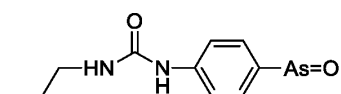
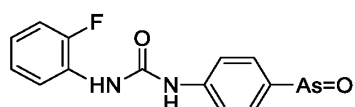
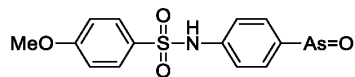
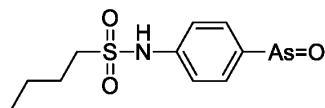
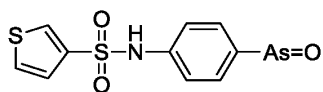
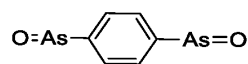
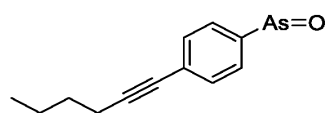
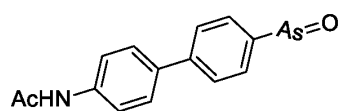
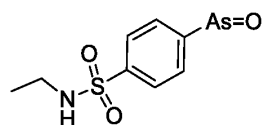
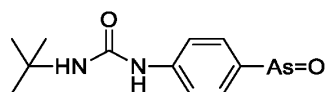
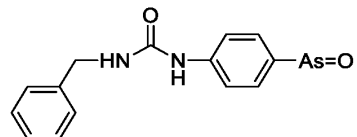
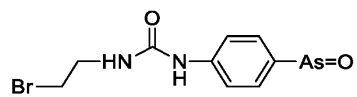
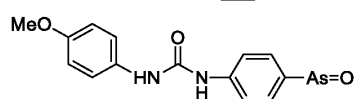
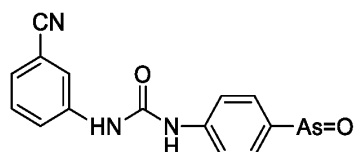
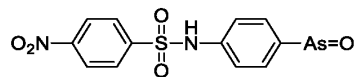
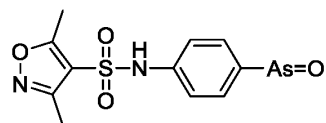
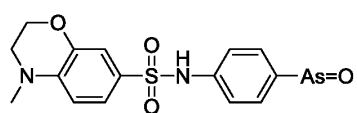


35. 根据权利要求 28 所述的用途, 其中所述化合物选自由以下化合物组成的组:

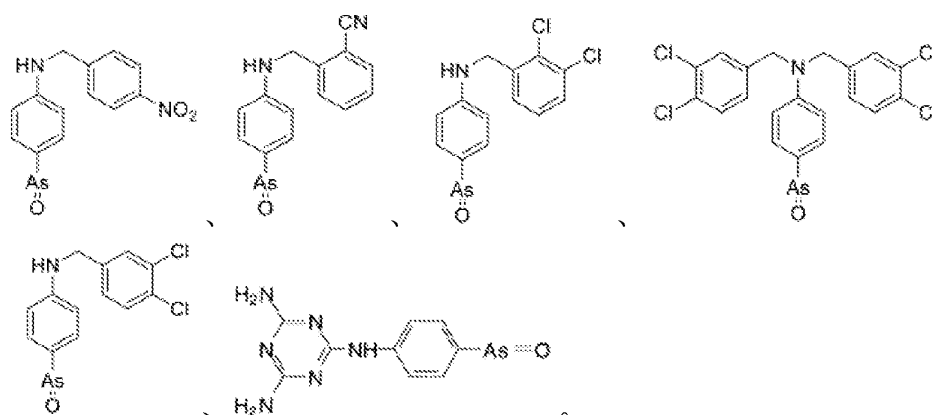




5



10



36. 根据权利要求 21 至 27 中任一项所述的用途, 其中所述客体是人或者非人哺乳动物。

5 37. 根据权利要求 24 所述的用途, 其中所述肿瘤选自淋巴瘤诸如急性非 B 或非 T 细胞淋巴瘤、宫颈癌、子宫内膜癌、肝癌、乳腺癌诸如三阴性乳腺癌、肺癌诸如非小细胞肺癌或小细胞肺癌、结直肠癌、胃癌、皮肤癌诸如黑色素瘤、骨癌、骨肉瘤、骨髓瘤、血癌诸如急性或慢性白血病、卵巢癌、前列腺肿瘤、脑瘤诸如脑星型胶质细胞瘤、神经母细胞瘤、甲状腺癌、恶性胚胎横纹肌瘤。

10 38. 根据权利要求 24 所述的用途, 其进一步包括向需要其的客体施用第二试剂, 优选所述第二试剂是用于治疗肿瘤的试剂。

39. 根据权利要求 38 所述的用途, 其中所述化合物在所述第二试剂之前、之后或同时施用。

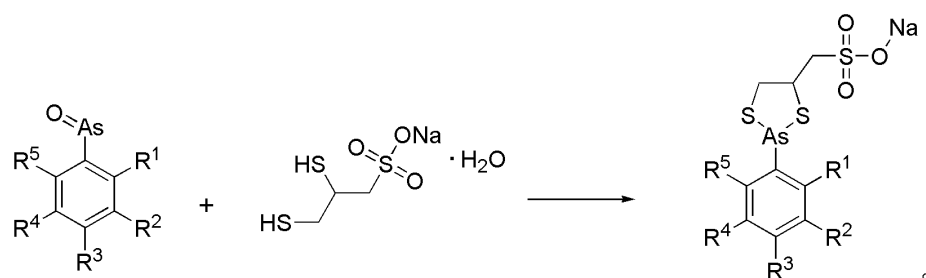
15 40. 一种测定血液中 PAO 或其衍生物浓度的分析方法, 所述衍生物包括式 I 或式 II 化合物, 其包括如下步骤:

第一步: 分别将 PAO 或其衍生物、对照标准品和 2,3-二巯基丙磺酸钠在单独容器中溶解, 制备三种储备液;

第二步: 将待测的包含 PAO 或其衍生物的血液、2,3-二巯基丙磺酸钠的储备液混合, 将溶液调至酸性, 在 25-80°C 下孵育适当时间;

20 第三步: 在第二步所得溶液中加入对照标准品的储备液, 振摇一段时间并离心, 取上清液检测 PAO 或其衍生物的衍生化的产物。

41. 根据权利要求 40 所述的分析方法, 其中在第二步中孵育 10-80 分钟, 所述酸性是指 pH 小于 6, 加入适量的酸例如甲酸、磷酸氢钾、醋酸或盐酸将溶液调整至酸性, 且在第二步中发生的反应如下:



42. 根据权利要求 40 所述的分析方法，其中在第一步中，将 PAO 或其衍生物和对照标准品溶于 DMSO 中，并将对照标准品的 DMSO 溶液用乙腈稀释，将 2,3-二巯基丙磺酸钠溶于纯水中。

- 5 43. 根据权利要求 40 所述的分析方法，其中所述对照标准品为甲苯磺丁脲，在第三步中利用液相色谱-质谱方法检测 PAO 或其衍生物的衍生化的产物。