

氘代氧化苯砷化合物及其应用

5 技术领域

本发明属于化学合成领域，具体涉及一种新型氘代氧化苯砷化合物及其制备方法和应用。

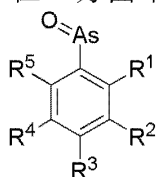
背景技术

10 氧化苯砷（Phenylarsine Oxide, 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。

氘是氢的一种稳定同位素。相比于氢，氘可以形成更强的化学键，使药物分子更加稳定。人体试验已经发现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嗪（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。

20 发明内容

在一方面中，本发明提供了一种式 I 化合物或其药学上可接受的盐，



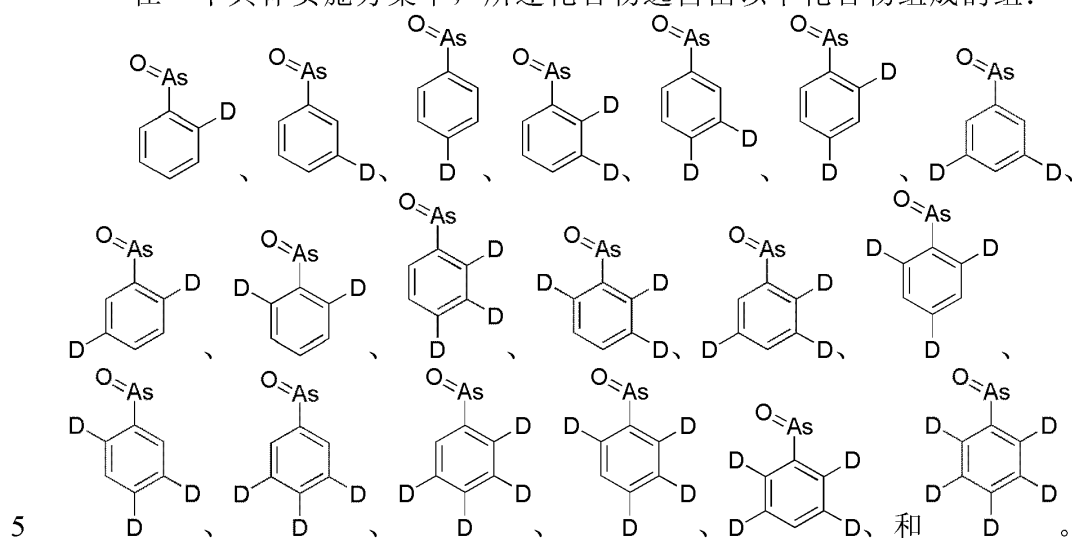
式 (I)

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

在一个实施方案中，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。

在一个具体实施方案中，所述化合物选自由以下化合物组成的组：



另一方面，本发明公开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。

在一个实施方案中，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
10 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。

在一个实施方案中，所述受试者是人或非人哺乳动物。

在一个具体实施方案中，所述肿瘤选自淋巴瘤、宫颈癌、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、
15 胃癌、皮肤癌诸如黑色素瘤、骨癌、骨肉瘤、骨髓瘤、血癌、或卵巢癌。。

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。

20 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 $\text{TNF}\alpha$ 或 IL-6 增加。

在一个具体实施方案中，所述组织器官纤维化选自肺纤维化或肝纤维化。

- 5 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、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。

10 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。

- 15 又一方面，本发明开公开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。本发明开公开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。

- 20 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，诸如与血管内皮生长因子受体络氨酸激酶抑制剂，优选为尼达尼布。

- 25 在一个具体实施方案中，所述第二试剂是用于治疗肿瘤的试剂，所述治疗肿瘤的试剂选自紫杉醇、吉西他滨、环磷酰胺、替莫唑胺中的至少一种。

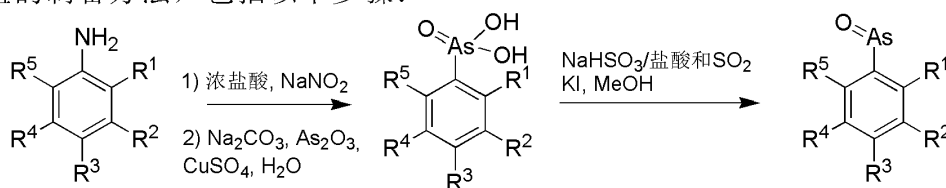
在一个实施方案中，前述化合物或其其药学上可接受的盐在所述第二试剂之前、之后或同时施用。

- 30 又一方面，本发明开公开了一种药物组合物，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。

在一个具体实施方案中，所述治疗肿瘤的药物选自紫杉醇、吉西他滨、环磷酰胺、替莫唑胺中的至少一种。

- 5 又一方面，本发明公开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°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；

- 10 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。

- 15 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。

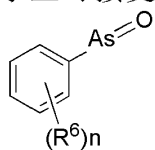
再一方面，本发明公开了氧化苯砷及其衍生物在制备用于预防或治疗组织器官纤维化诸如肺纤维化或肝纤维化的药物中的用途。

- 20 本发明公开了氧化苯砷及其衍生物在制备用于预防或治疗炎症反应的药物中的用途，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。

- 25 本发明公开了氧化苯砷及其衍生物在制备用于预防或治疗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的药物中的用途。

本发明公开了氧化苯砷及其衍生物在制备用于预防或治疗肿瘤的药物中的用途。

在一个实施方案中，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）

- 5 其中， R^6 各自独立的选自（a）H、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 R^7 或 R^8 取代，其中 R^7 和 R^8 各自独立的选自
- 10 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)- R^{10} 、-C(O)OR⁹、6-12 元的芳香基、C1-
- 15 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 R^9 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， R^{10} 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
- 20

（b）两个相邻碳原子上的 R^6 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，

- 25 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 R^6 各自独立的选自 H、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)、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。

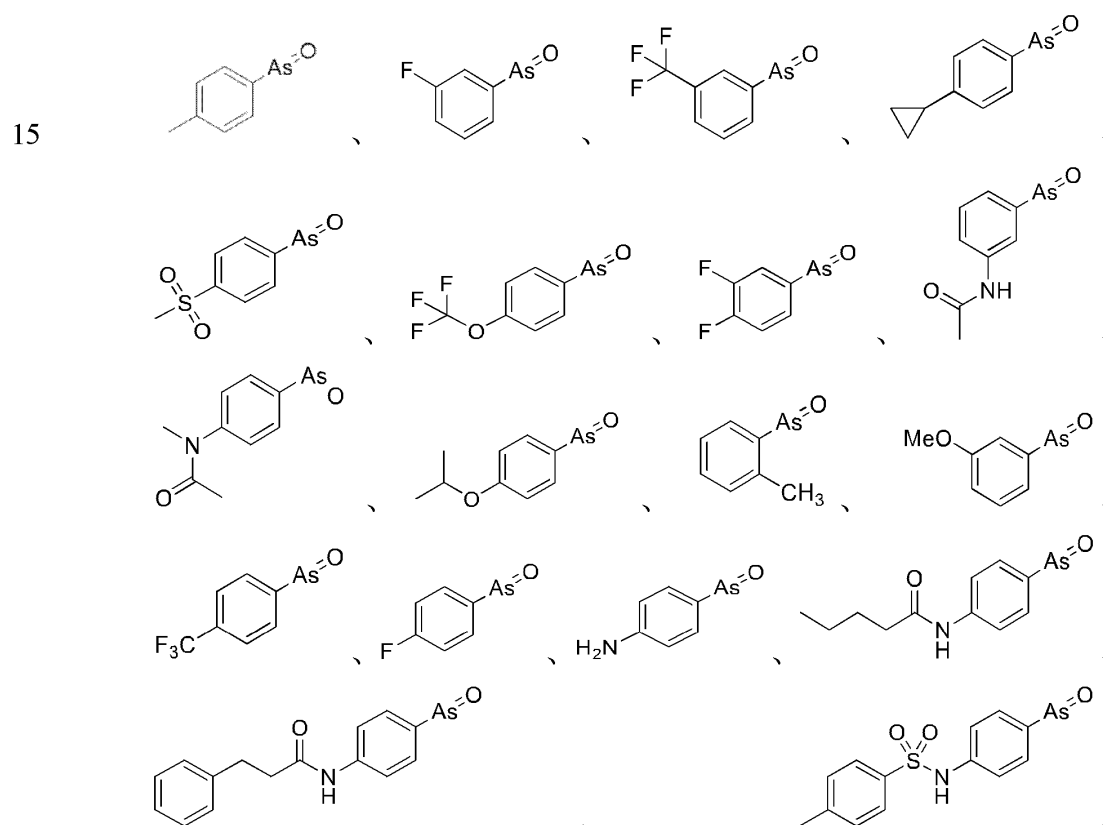
在一个实施方案中, 其中 n 为 0-2 的整数, 所述 R⁶ 各自独立的选自 H、卤素、硝基、氰基、羟基、氨基、C1-6 烷基砷基、C1-6 烷基、C1-6 环烷基、C1-6 烷氧基、C1-6 卤代烷基、-As(O)、-NH-C(O)H 或 -NH-S(O)₂H, 并且可选的被所述 R⁷ 或 R⁸ 取代。

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、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 卤代烷基取代。

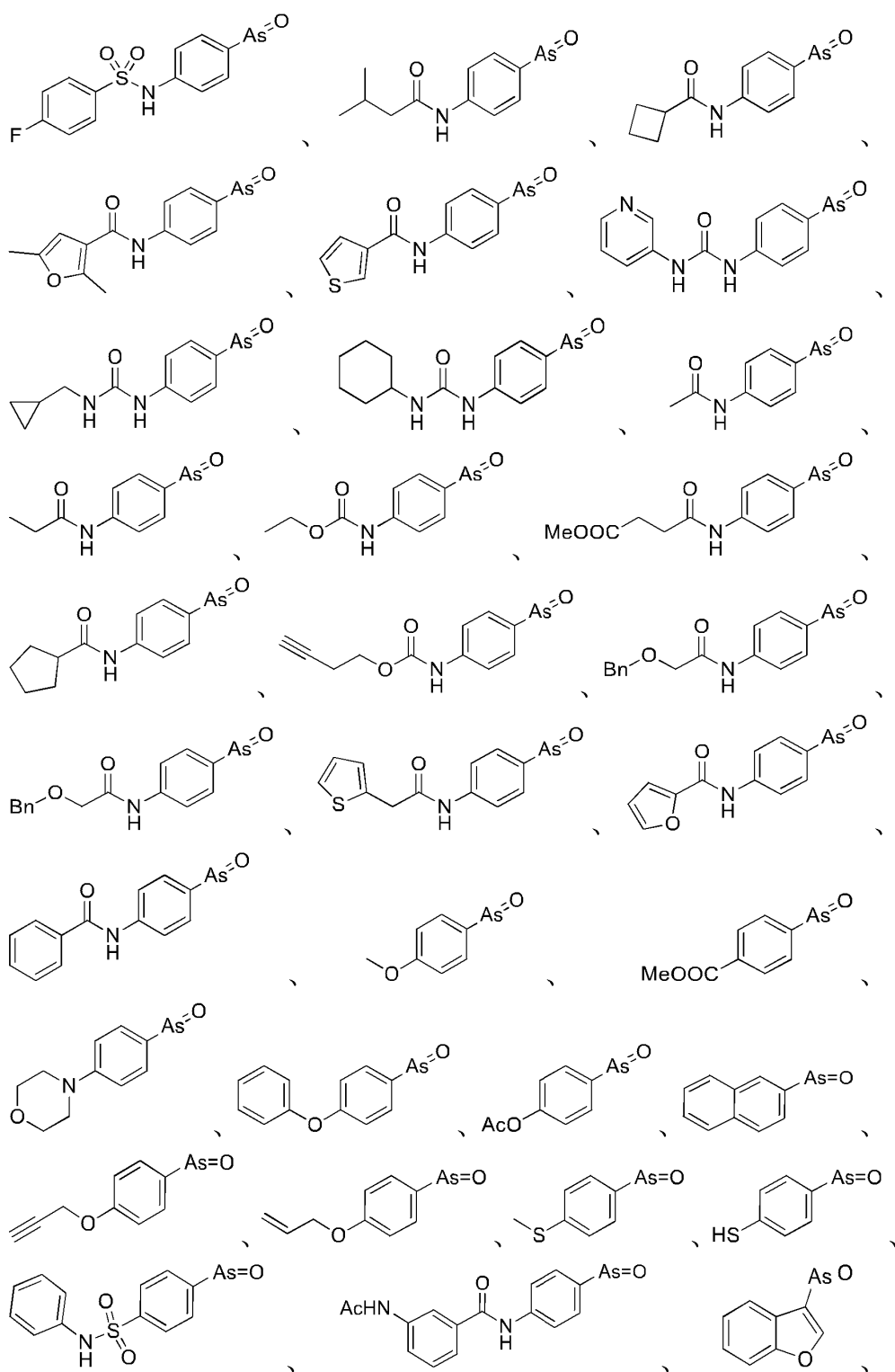
在一个实施方案中, 其中所述 R⁶ 位于 -As(O) 基团的邻位和/或者对位。

在一个实施方案中, 其中 n 是 0。

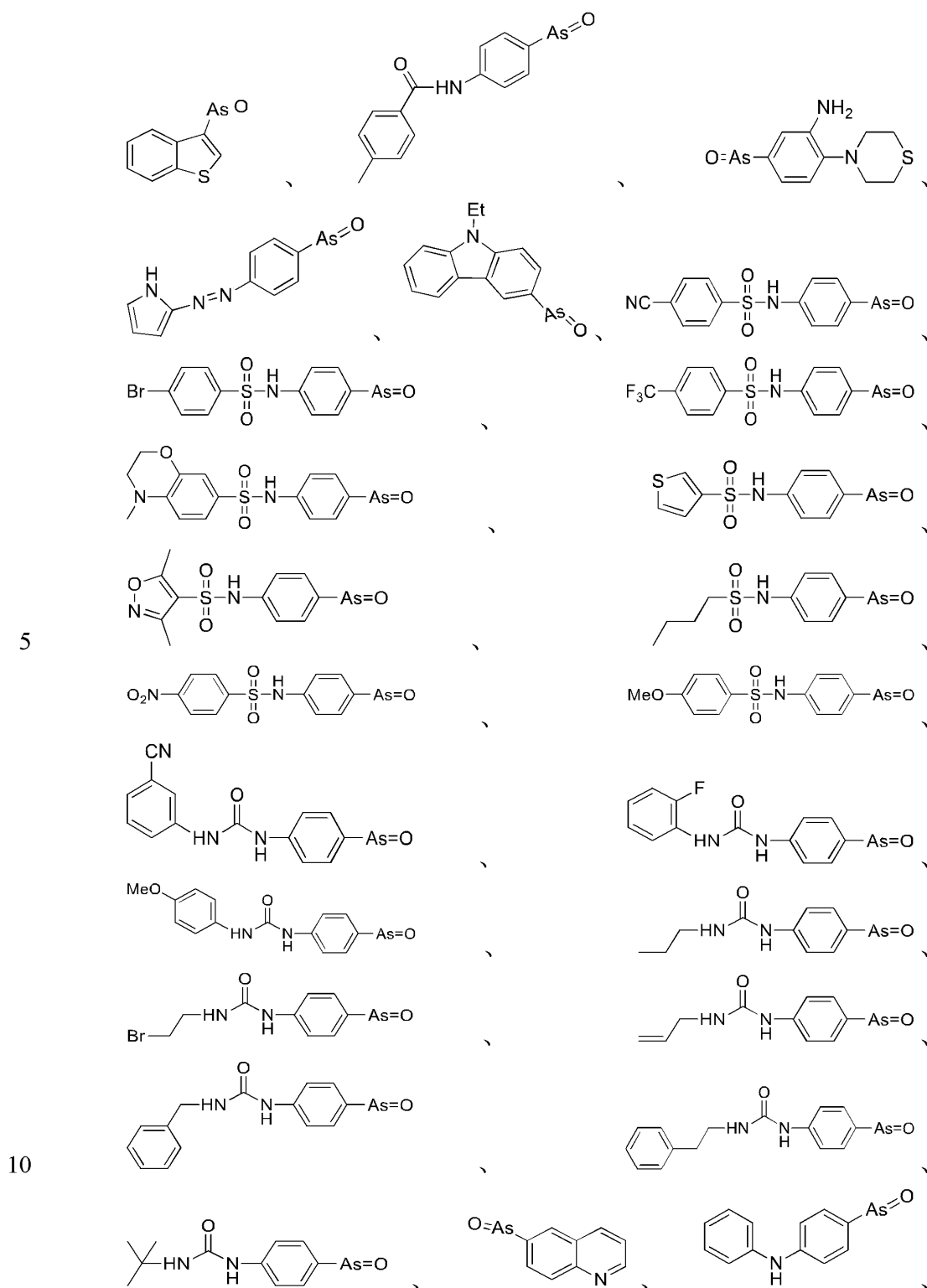
在一个实施方案中, 所述化合物选自由以下化合物组成的组:

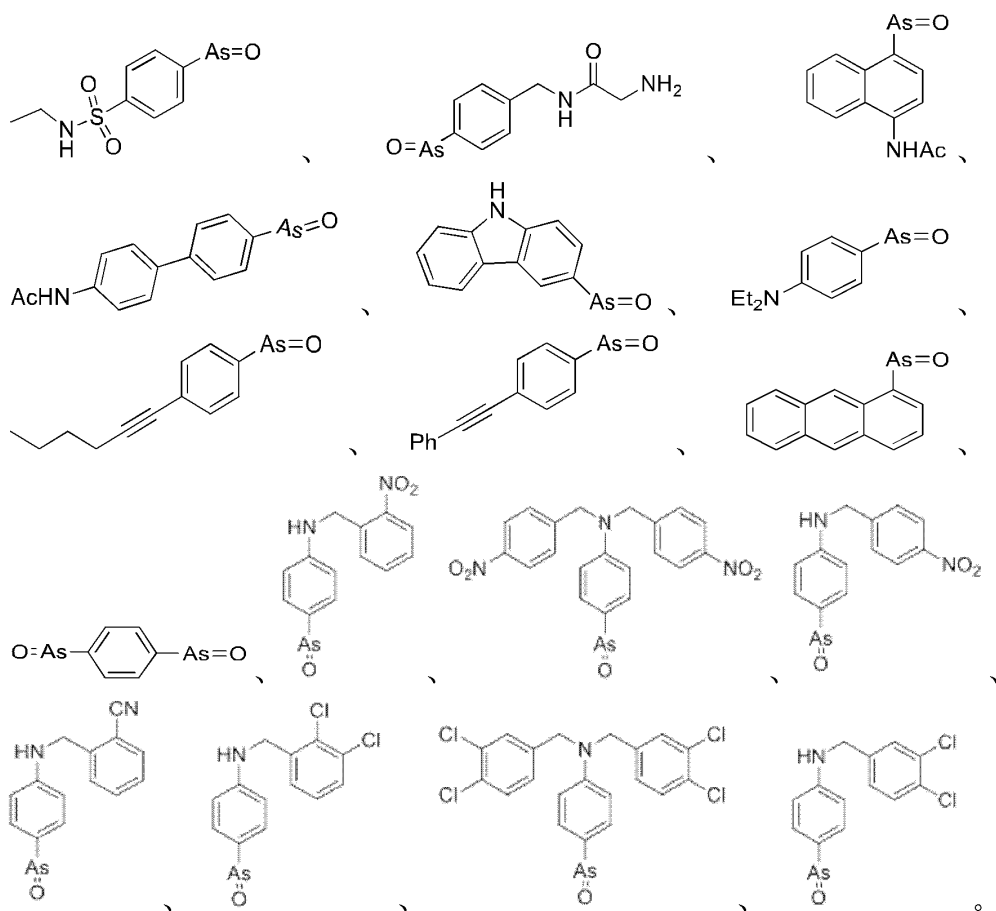


5



10





5

在一个实施方案中，所述客体是人或者哺乳动物。

在一个实施方案中，所述肿瘤选自淋巴瘤、宫颈癌、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、或卵巢癌。

10

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，其中所述化合物在所述第二试剂之前、之后或同时施用。

15

在一个实施方案中，其中所述治疗肿瘤的试剂选自紫杉醇、吉西他滨、环磷酰胺、替莫唑胺中的至少一种。

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，所述疾病选自组织或器官纤维化、炎症反应、恶病质、肿瘤。

5 在一个实施方案中，组织器官纤维化选自肺纤维化或肝纤维化。

在一个实施方案中，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。

在一个实施方案中，所述肿瘤选自淋巴瘤、宫颈癌、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、或卵巢癌。

10

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 或 d5PAO，药代动力学的药时曲线图。

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

图 3 示出 α -synuclein 过表达质粒的载体图谱。

图 4 示出 α -synuclein ELISA 检测的标准配制图。

图 5 示出 d5PAO 和 PAO 抑制 SH-sy5y 细胞凋亡，其中图 5A 示出 MTT 检测一定浓度 d5PAO 和 PAO 对 SH-sy5y 细胞活力的作用， $n=5$ ， $\text{mean}\pm\text{SEM}$ ，One-way ANOVA，*** $p<0.0001$ vs. ctrl，### $p<0.0001$ vs. ctrl；图 5B 示出免疫荧光处理前在培养液中加入碘化丙啶（PI）共孵育 15 分钟后进行 Ki67 免疫荧光染色。

20

图 6 示出 d5PAO 和 PAO 提高稳转 APP (SW) HEK293 细胞活力并促进 A β 释放，其中图 6A 示出 MTT 检测一定浓度 d5PAO 和 PAO 对稳转 APP (SW) HEK293 细胞活力的作用， $n=5$ ， $\text{mean}\pm\text{SEM}$ ，One-way ANOVA，** $p<0.001$ ，*** $p<0.0001$ vs. ctrl；图 6B 示出 ELISA 试剂盒检测上清中 A β 含量，并通过标准曲线计算各组 A β 值；图 6C 示出将数据归一化处理，以 ctrl 为 1，计算各组 A β 含量变化的倍数值， $n=3$ ， $\text{mean}\pm\text{SEM}$ ，One-way ANOVA，

25

30 * $p<0.03$ ，** $p<0.001$ ，*** $p<0.0001$ vs. ctrl。

图 7 示出 PAO 氘代化合物结构式及其促进 A β 释放作用比较, 图 7A 示出 ELISA 试剂盒检测上清中 A β 含量, 并通过标准曲线计算各组 A β 值; 图 7B 示出将数据归一化处理, 以 ctrl 为 1, 计算各组 A β 含量变化的倍数, n=3, mean $\pm$ SEM, One-way ANOVA, *p<0.03, **p<0.001, ***p<0.0001 vs. ctrl. 与 50 nM d5PAO 处理组比较 ##p<0.001, ###p<0.0001。

图 8 示出 d5PAO 和 PAO 减小 α -synuclein 过表达对 SH-sy5y 细胞的损伤作用并促进 α -synuclein 释放, 其中图 8A 示出 MTT 检测一定浓度 d5PAO 和 PAO 对瞬转 α -synuclein 细胞的细胞活力作用, n=5, mean $\pm$ SEM, One-way ANOVA, *p<0.03, **p<0.001, ***p<0.0001 vs. ctrl; 图 B 示出 ELISA 试剂盒检测上清中 α -synuclein 含量, 并通过标准曲线计算各组 α -synuclein 值, n=3, mean $\pm$ SEM, One-way ANOVA, *p<0.03 vs. ctrl; 图 8C 示出将数据归一化处理, 以 α -syn OE 组为 1, 计算各组 α -synuclein 含量变化的倍数, n=3, mean $\pm$ SEM, One-way ANOVA, *p<0.03 vs. ctrl。

图 9 示出 d5PAO 和 PAO 在 CBE 构建的 SH-SY5Y 细胞模型中发挥保护作用。其中图 9A 示出 CBE 处理 SH-SY5Y 细胞 48 小时, 进行 MTT 实验检测细胞活力; 图 9B 示出 100 μ M CBE 处理 SH-SY5Y 细胞 24 小时, 饥饿 (不含 FBS 的高糖 DMEM) 和 100 μ M CBE 处理共同处理 24 小时, 再给予不同浓度 PAO 处理 24 小时, 通过 MTT 实验检测细胞活力; 图 9C 示出 100 μ M CBE 处理 SH-SY5Y 细胞 24 小时, 饥饿 (不含 FBS 的高糖 DMEM) 和 100 μ M CBE 处理共同处理 24 小时, 再给予不同浓度 d5PAO 和 PAO 处理 24 小时, 通过 MTT 实验检测细胞活力。n=5, 数据以 mean $\pm$ SEM 表示, 与对照组比较 ###p<0.0001, 与 100 μ M CBE 处理组比较 **p<0.001, ***p<0.0001 vs. 100 μ M CBE。

图 10 示出 PAO 抑制 CBE 诱导的溶酶体和 GlcCer 贮积, 促进 GlcCer 外排。其中图 10A 示出 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; 图 10B 示出统计分析各组 Lyso-tracker 荧光强度; 标尺: 50 μ m; n=5; One-way ANOVA 分析, 与对照组比较 ##p<0.001, 与 100 μ M CBE 处理组比较 **p<0.001, ***p<0.0001; 图 10C 示出各组细胞裂解液中 GlcCer 浓度经 LC/MS 测定值统计分析; 图 10D 示出各组细胞培养基上清中 GlcCer 浓

度经 LC/MS 测定值统计分析。

图 11 示出敲减 *PI4Ka* 促进溶酶体贮积减少。其中图 11A 示出 Western blot 检测不同 shRNA 干扰慢病毒载体 (sh-ctrl, sh1-*PI4Ka*, sh2-*PI4Ka*, sh3-*PI4Ka*) 处理 SH-SY5Y 细胞 48 小时 *PI4KIII α* 蛋白水平; 图 11B 对 Western blot 检测结果统计分析; 图 11C 示出免疫荧光方法检测 shRNA 干扰慢病毒载体处理后 Lyso-tracker 荧光强度, 并统计分析 (图 11D)。标尺: 50 μm ; n=5; 数据以 mean $\pm$ SEM 表示, One-way ANOVA 分析, ***p<0.0001。

图 12 示出 pGMLV-SC5 RNAi 载体图谱。

图 13 示出 MRC-5 细胞处理 24 小时后明场图。MRC-5 细胞使用含有 5 ng/mL TGF- β 1, 并根据分组同时加入含有不同浓度 PAO 或 d5PAO 的 MEM 培养基 (无 FBS) 培养 24 小时。标尺: 50 μm 。

图 14 示出 d5PAO 和 PAO 抑制 α -SMA 和 Calponin1 在 MRC-5 模型细胞中的表达。其中图 14A 示出蛋白质免疫印迹法检测 α -SMA 和 Calponin1 的表达水平。图 14B 示出各组 α -SMA 表达量统计分析结果。图 14C 示出各组 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 mean $\pm$ 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 15 示出 d5PAO 和 PAO 抑制 α -SMA 和 Calponin1 在 MRC-5 模型细胞中的表达。其中图 15A 示出各组 α -SMA 免疫荧光图, 红色: α -SMA, 蓝色: DAPI (核)。标尺: 50 μm 。15B 示出各组 Calponin1 免疫荧光图, 红色: Calponin1, 蓝色: DAPI (核)。标尺: 50 μm 。图 15 C,D 示出 α -SMA, Calponin1 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 mean $\pm$ 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<0.0001。

图 16 示出 d5PAO 和 PAO 调控 Calponin1 在 MSC 中的表达, 其中图 16A 示出各组 Calponin1 免疫荧光图, 红色: Calponin1, 蓝色: DAPI (细胞核)。标尺: 50 μm ; 图 16B 示出 Calponin1 免疫荧光强度统计结果分析。n=4 使用单因素分析 (One-way ANOVA) 处理, 数据用 mean $\pm$ SEM 表示。

图 17 示出 d5PAO 和 PAO 抑制 MRC-5 细胞纤维过程中 COL1 的分泌。

图 17A 示出 ELISA 检测各组上清中 COL1 浓度, $n=6$, 数据用 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示。图 17B 示出以 ctrl 组平均值为 1, 对各组上清中 COL1 浓度进行统计分析, 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 $\#p<0.0001$ 。

5 图 18 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。图 18A 示出检测 PI4KIII α 蛋白; 图 18B 示出对数据使用 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 $***p<0.0001$ 。

10 图 19 示出敲减 PI4K α 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 5 ng/mL TGF- β 1 处理 24 小时, 进行免疫荧光染色观察。其中图 19A 示出各组 α -SMA 免疫荧光染色, 红色: α -SMA, 蓝色: DAPI (核), 绿色: 绿色荧光蛋白 GFP。标尺: 50 μm 。图 19B 示出各组 Calponin1 免疫荧光染色, 红色: Calponin1, 蓝色: DAPI (细胞核), 绿色: 绿色荧光蛋白 GFP。标尺: 50 μm 。 α -SMA (图 19C) 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, $##p<0.001$, $###p<0.0001$ 。

20 图 20 示出 d5PAO 和 PAO 抑制 IL-6 和 TNF- α 在 BV2 细胞炎症模型中的分泌。其中图 20A 示出 ELISA 检测 BV2 细胞上清中 TNF- α 浓度, 并据标准曲线计算 TNF- α 含量 (pg/mL); 图 20B 示出以 ctrl 组浓度平均值为 1, 计算各组 TNF- α 相对浓度变化图 20C 示出 ELISA 检测 BV2 细胞上清中 IL-6 浓度, 并据标准曲线计算 IL-6 含量 (pg/mL); 图 20D 示出以 ctrl 组浓度平均值为 1, 计算各组 IL-6 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 $\mu\text{g/mL}$ LPS 处理组比较 $*p<0.03$, $**p<0.001$, $***p<0.0001$, 与 ctrl 组比较 $\#p<0.03$, $##p<0.001$ 。

图 21 示出 PAO 对乳腺癌的抑制作用。

图 22 示出 PAO 对淋巴癌的抑制作用。

30 图 23 示出 d5PAO 对黑色素瘤的抑制作用。

图 24 示出 d5PAO 在用药第 28 天对黑色素瘤的抑制作用。

图 25 示出高剂量 PAO 和 d5PAO 灌胃对小鼠体重和存活率的影响比较。

图 26 示出 PAO 对乳腺癌小鼠模型体重的影响。

图 27 示出 PAO 对胰腺癌模型体重的影响。

5 图 28 示出 PAO 对淋巴瘤模型动物体重的影响。

图 29 示出 d5PAO 联合用药对黑色素瘤小鼠体重的影响。

图 30 示出 PAO 和 d5PAO 对 HCoV 229E (流感冠状病毒)的抑制作用。

图 31 示出 PAO 和 d5PAO 的抗焦虑作用, d5PAO 比 PAO 的抗焦虑作用更显著。

10 图 32 示出 PAO 和 d5PAO 有抗抑郁作用, d5PAO 比 PAO 的抗抑郁作用更显著和更稳定。

图 33 示出 d5PAO 和 PAO 抑制 U18666A 导致的胆固醇贮积。标尺: 50 μm 。

15 图 34 示出 PAO 促进 LC3B 和 p62 表达, Baf-A1 阻断 PAO 在细胞模型中的保护作用, 其中图 34A 示出蛋白质免疫印迹实验检测 LC3B 和 p62 蛋白; 图 34B, C 示出使用 Image J 软件统计分析 LC3B 和 p62 蛋白信号强度统计分析; 图 34D 示出免疫荧光检测 LC3B 和 p62, 红色: p62, 绿色: LC3B, 标尺: 50 μm ; 图 34E 示出 MTT 检测各组细胞活力, 并统计分析。n=5, 数据以 mean $\pm$ SEM 表示, One-way ANOVA 分析, 与对照组比较 ###p<0.0001, 20 与 100 μM CBE 处理组比较**p<0.001。

图 35 示出敲减 *PI4Ka* 激活 ALP, 其中图 35A, B 示出 Western blot 检测不同 shRNA 干扰慢病毒载体 (sh-ctrl, h1-PI4Ka, sh2-PI4Ka, sh3-PI4Ka) 处理 SH-SY5Y 细胞 48 小时后 LC3B 蛋白水平, 并统计分析; 图 35C, D 示出 shRNA 干扰慢病毒载体转染的同时给予 CBE 处理, 共孵育 48 小时, 检测 25 LC3B 蛋白水平, 并统计分析。n=3; 数据以 mean $\pm$ SEM 表示, One-way ANOVA 分析, 与 sh-ctrl 比较*p<0.03。

图 36 示出乙酰甲胆碱引起的增强呼气间歇值 Penh 相对基线的百分比。

图 37 示出肺泡灌洗液 (BALF) 中的嗜酸性粒细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和淋巴细胞的总数计数。T.Test, 单尾, * <0.5, ** <0.1 与模型组的总细胞含量比。
30

图 38 示出肺泡灌洗液 (BALF) 中的嗜酸性粒细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和淋巴细胞的分别计数。T.Test, 单尾, * < 0.5, ** < 0.1 与模型组的 BALF 比较。

图 39 示出血浆胶原蛋白 I 型的含量, 正常组 (ctrl)。

- 5 图 40 示出 PAO 和 dPAO 与阳性对照药尼达尼布中下调肺纤维化小鼠血浆透明质酸的作用比较, 正常组 (ctrl)。

具体实施方式

- 10 以下根据实施例, 并且结合附图, 详细描述本发明。从下文的详细描述中, 本发明的上述方面和本发明的其他方面将是明显的。本发明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。

- 15 根据本发明的另一方面, 本发明涉及氙代氧化苯砷优选是全苯环取代氙代同位素。

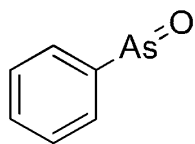
- 本文所述的化合物可以是不对称的 (例如具有一个或多个立体中心)。除非另外指明, 所有的立体异构体, 例如对映体和非对映体, 都旨在包含在内。在本文所述的化合物中还可以存在烯烃、碳-碳双键等多种几何异构体, 20 并且在本文中已经考虑了所有的这些稳定异构体。本文描述了化合物的顺式和反式几何异构体并且其可以以异构体的混合物或单独的异构体形式分离。

- 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 25 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-异𫏖唑以及 1H-和 2H-吡唑。互变异构形式通过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 30 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。

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：



细胞内蛋白错误折叠相关疾病

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，
10 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聚病，这一类包涵体主要由一种因折叠错误而聚集的核心蛋白，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）、包涵体肌炎症（IBM）、额
15 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
20 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，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
25 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, 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

5 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)、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

25 (北方癫痫、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、

30

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、Chédiak-Higashi 病。

5 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），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。

20 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。

本文中公开的氙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，本文所述的氙代氧化苯砷通过口服、皮下、肌内或静脉施用。在一些实施方案中，本文所述的氙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。

5 本文中提供的氘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。

10 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，所述氘代氧化苯砷在所述第二试剂之前、之后或同时施用。

15 本申请的还涉及用于预防或治疗细胞内蛋白错误折叠相关疾病的方法，包括向需要其的客体施用有效量的氘代氧化苯砷。

本申请的还涉及用于预防或治疗溶酶体贮积病的方法，包括向需要其的受试者施用有效量的氘代氧化苯砷。

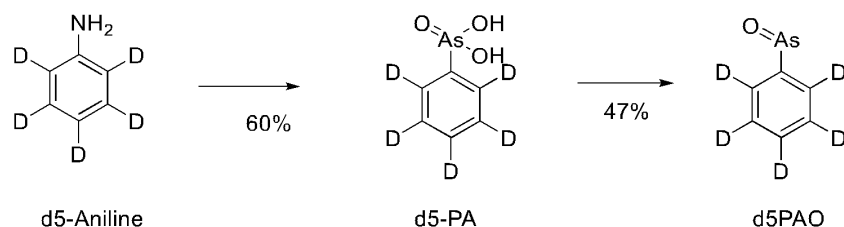
20 实施例 1. 化合物的合成及其物理特性

1. d5PAO（五氘代氧化苯砷）的合成及其物理特性

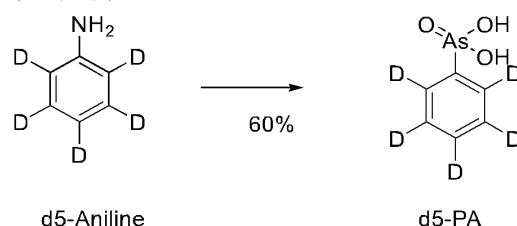
1.1 d5PAO 合成

d5PAO 的合成线路如下：

25



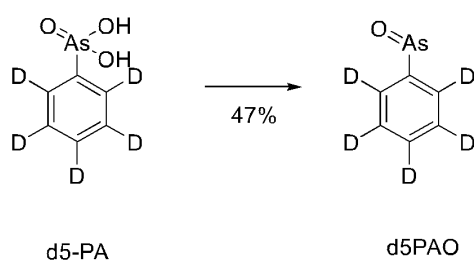
第一步：d5-PA 的合成方法：



往一个三口瓶中加入 91.35 mL 水，18.27 g 的五氘代苯胺 (d5-Aniline)，
 5 搅拌、降温至 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，
 10 后降温至 5~15°C。分批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
 15 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 ES+ (m/z): 208.0 [(M+H)⁺]

第二步：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，
 20 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)⁺].

5 1.2 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 μ m 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

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。

20 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、25 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 μ m (Waters)。

30 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:

5	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
10	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

15 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:

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

20 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

25 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 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

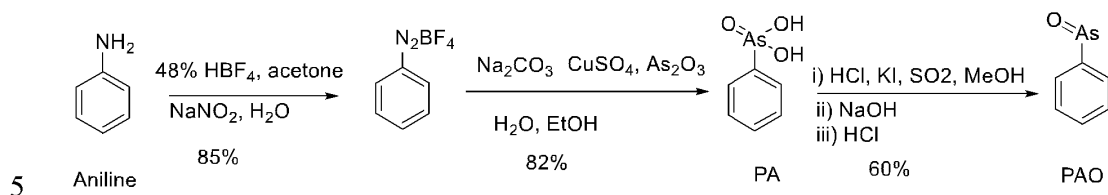
药物	pH	峰面积	对应溶解度 (mg/mL)
d5PAO	6	884.20	5.36

d5PAO	4	889.51	5.39
d5PAO	2	986.70	5.98

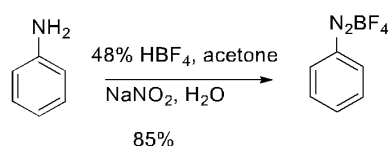
2. PAO 的合成及其物理特性

2.1 PAO 的合成

合成路线:

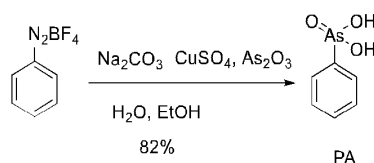


第一步:



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。

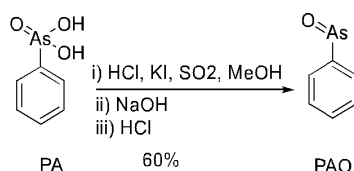
15 第二步:



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 mol, 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)⁺]。

10 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

PAO 的分子式为 $\text{C}_6\text{H}_5\text{AsO}$, 分子量为 168.03.

20 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 μ m 滤膜 (上海青阳生物科技有限公司)。

25 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

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。

- 5 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。

- 10 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

- 15 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。

- 20 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
25	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

- 30 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、
5 0.015 mg/mL 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
的线性关系。

10 2.2.6 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 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
15 pH 缓冲液中溶解度分别为 1.15 mg/mL、3.38 mg/mL、4.52 mg/mL。

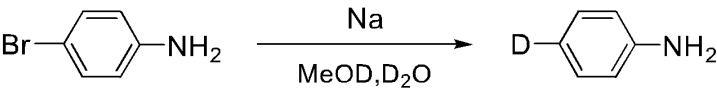
表 2. PAO 的溶解度

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

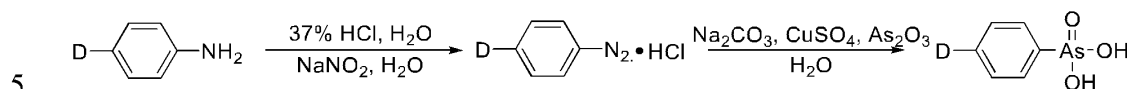
3.1 d1PAO 的制备

20

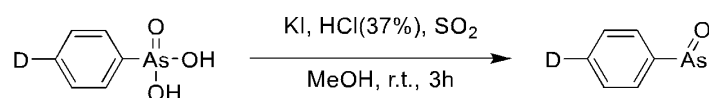


氮气条件下，将对溴苯胺（3.44g）溶于氘代甲醇（5 mL）中，回流 30
分钟，旋干，重复 3 次，旋干抽干待用。将 3 克金属钠分批加入到氘代甲醇
（10 mL）中，待其反应完毕，缓慢加入重水（30 mL），制得 10%的氘氧化
25 钠的重水溶液。氮气条件下，将第一步的产品溶于氘代甲醇（5 mL），加入

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。



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, 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, 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砷酸 900 mg, 产率为 44 %。¹H NMR (δ, DMSO-d₆): 7.60 (d, 2H), 7.53 (d, 2H)。



d1PAO

25

往 25 mL 三颈瓶中依次加入对氘苯砷酸 (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.),

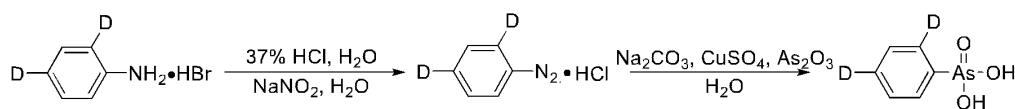
甲醇（5.8 mL），室温搅拌 5–10 分钟，持续通入二氧化硫气体，反应 3 小时，TLC 监测反应完全。反应液抽滤，并用甲醇（1.5 mL × 2）洗涤。液体于冰水浴中滴加入质量分数为 15% 的 NaOH 溶液，调节 pH 至 14，此时体系呈橙色浊液。用乙酸乙酯（50 mL × 2）萃取，合并有机相，并用无水 Na₂SO₄ 干燥，过滤，低温（20–28°C）旋干，得到粗产物。向粗产物中加入约 4 mL 的乙醚打浆约 30 分钟后过滤，抽干，得到类白色固体的 d1PAO 约 430 mg。

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%。

10 3.2 d2PAO 的制备

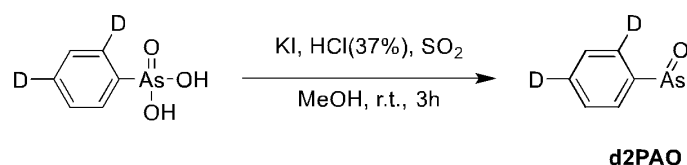


将浓盐酸（5 mL）滴加到邻溴苯胺（3.44 g）的乙醚溶液中，有固体产生，砂芯漏斗抽滤，乙醚洗涤，抽干得到苯胺的盐酸盐。氮气条件下，在封管中将固体溶于重水（7 mL），加热到 120°C，反应 24 小时，重水旋干，置换氮气，重新加入重水（7 mL），反应 48 小时，冷却至室温，使用 30% 的氢氧化钠调节 pH = 7，乙醚萃取，无水硫酸钠干燥，旋干可得到 2-溴-4,6-二氘-苯胺。氮气条件下，将 22 毫升的甲醇加入到 2-溴-4,6-二氘-苯胺和 10% Pd/C（300 mg）的混合物中，将氮气置换为氢气，反应 3 小时，点板监测到 2-溴-4,6-二氘-苯胺消失，硅藻土过滤，少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



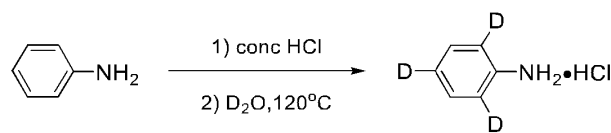
往 25 mL 带有磁力搅拌子的圆底瓶中加入由上步得到的 2,4-二氘-苯胺的氢溴酸盐并加水 5 mL，降温至 0–5 °C，并于该温度下，缓慢加入 37% 的盐酸水溶液（1.1 mL），加入水 5 mL 稀释，继续搅拌，反应 30 分钟。再向该反应液中缓慢加入 NaNO₂ 水溶液（724.5 mg, 10.5 mmol, 3 mL H₂O），控制反应温度在 0–5°C，30–40 分钟内滴加完，溶液呈棕黄色，继续低温下搅拌反应 2 小时。往 50 mL 圆底反应瓶中加入 Na₂CO₃（4.0 g, 38.0 mmol, 3.8

eq.) , As_2O_3 (1.0 g, 5.0 mmol, 0.5 eq.) , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (150 mg, 0.6 mmol, 0.06 eq.) , H_2O (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 $\times$ 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, 2 mL 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-苯肿酸固体 1.15 g, 产率为 56.4 %。 ^1H NMR (δ , DMSO- d_6): 7.72 (d, 1H), 7.56-7.59 (m, 2H)。



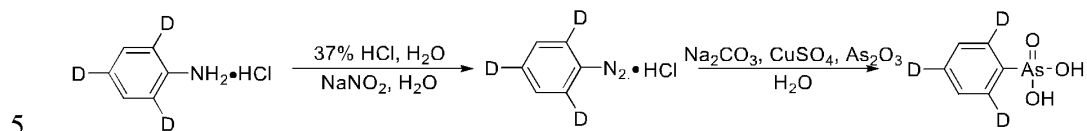
往 25 mL 三颈瓶中依次加入 2, 4-二氘-苯肿酸 (1.1 g, 5.4 mmol, 1.0 eq.) , KI (20.6 mg, 0.124 mmol, 0.023 eq.) , 37% HCl (2.1 mL, 25.0 mmol, 4.6 eq.) , MeOH (7.3 mL) , 室温搅拌 5–10 分钟, 持续通入二氧化硫气体, 反应 3 小时, TLC 监测反应完全。冰水浴下, 滴加入质量分数为 15% 的 NaOH 溶液, 调节 pH 至 7, 此时体系出现大量不溶物。用乙酸乙酯 (50 mL $\times$ 2) 萃取, 合并有机相, 并用无水 Na_2SO_4 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 400 mg。 ^1H NMR (δ , DMSO- d_6): 7.58 (d, 1H), 7.36-7.39 (m, 2H). MS ES+ (m/z) : 170.7 [(M+H)+]. 产率约 48%。

3.3 d3PAO 的制备

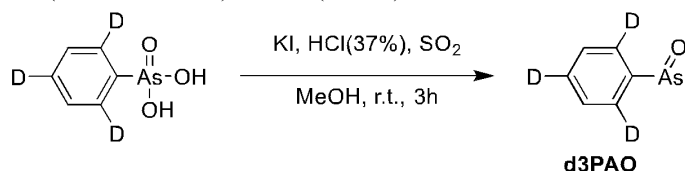


将浓盐酸 (5 mL) 滴加到苯胺溶液 (2.65 g 苯胺, 7 mL 重水) 中, 有固

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 h，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)。



25 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 h, 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 2. d5PAO 和 PAO 药代动力学研究

d5PAO (d5-PAO) 由实施例 1 所述的方法制备得到, PAO (PAO) 由公司自行制备。在受试成年雄性大鼠中单次静脉注射 PAO, d5PAO (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 °C 环境中震荡孵育 15 分钟, 4 °C 离心 5 分钟 (×3220 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 °C 环境中离心 15 分钟 (×3220 g);
- 5) 50 μL 上清液转入到 96-孔板中 4 °C 离心 5 分钟 (×3220 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：

5 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 和 d5PAO (0.2 mg/Kg)，两者的药代动力学指标无显著差异 (参见表 3、表 4 和图 1 和图 2)。0.1 mg/Kg 灌胃剂量组生物利用度为 15.7%。

表 3. 雄性 SD 大鼠单次静脉注射同剂 (0.1 mg/Kg) PAO 和 d5PAO 药代动力学指标

	PAO (IV, 0.1mg/Kg)	d5PAO (IV, 0.1mg/Kg)
PK Parameters	Mean±SD	Mean±SD
No. points used for T _{1/2}	3.00	3.00
C ₀ (ng/mL)	1344.67±210.97	1487.67±141.76
T _{1/2} (h)	11.4±0.03	12.43±0.65
Vd _{ss} (L/kg)	0.16±0.02	0.155±0.02
Cl(mL/分钟/kg)	0.41±0.03	0.38±0.02
T _{last} (h)	48.0	48.000
AUC _{0-last} (ng.h/mL)	4010±252.82	4337±280.63
AUC _{0-inf} (ng.h/mL)	4061.67±258.10	4404.33±275.54
MRT _{0-last} (h)	5.84±0.44	5.87±0.049
MRT _{0-inf} (h)	6.58±0.45	6.79±0.65
AUC _{Extra} (%)	1.267±0.05	1.54±0.27
AUMC _{Extra} (%)	12.47±0.67	14.87±1.46

10

表 4. 雄性 SD 大鼠单次口服灌胃 (0.2 mg/Kg) PAO 和 d5PAO 药代动力学指标

	PAO (PO, 0.2mg/Kg)	d5PAO (PO, 0.2mg/Kg)
PK Parameters	Mean±SD	Mean±SD
No. points used for T _{1/2}	3.00	3.00
C _{max} (ng/mL)	156±12.53	161±10.4
T _{max} (h)	8.00±0.00	7.33±1.15
T _{1/2} (h)	6.87±0.94	7.19 ±0.78
T _{last} (h)	48.00	48.00
AUC _{0-last} (ng.h/mL)	2313.67±419.51	244.5.00±474.53
AUC _{0-inf} (ng.h/mL)	2341±425.87	2478.67±483.09
MRT _{0-last} (h)	12.53±0.61	12.63±0.78
MRT _{0-inf} (h)	13.03±0.75	13.27±0.9
AUC _{Extra} (%)	1.16±0.47	1.35±0.44
AUMC _{Extra} (%)	5.09±1.99	5.92±1.8
Bioavailability (%) ^a	28.82	28.14

实施例 3. d5PAO 与 PAO 对细胞活力的影响和药理学作用比较

细胞培养和给药处理：SH-SY5Y 的完全培养体系为 15% FBS (Gibco 公司) 加入高糖 DMEM (Gibco 公司)。使用 Fugene HD 转染试剂 (Promega, Beijing Biotech Co., Ltd. Catalog No.E2311) 转染质粒。质粒购自 Obio Technology (Shanghai Corp., Ltd)，载体图谱如图 3 所示。 α -synuclein 过表达质粒的序列如下：

ATGGATGTATTTCATGAAAGGACTTTCAAAGGCCAAGGAGGGAGTTGTGGCTGCTGCTGAGAAAAC
CAAACAGGGTGTGGCAGAAGCAGCAGGAAAGACAAAAGAGGGTGTCTCTATGTAGGCTCCAAAACCA
AGGAGGGAGTGGTGCATGGTGTGGCAACAGTGGCTGAGAAGACCAAAGAGCAAGTGACAAATGTTGG
AGGAGCAGTGGTGACGGGTGTGACAGCAGTAGCCAGAAAGACAGTGGAGGGAGCAGGGAGCATTGCA
GCAGCCACTGGCTTTGTCAAAAAGGACCAGTTGGGCAAGAATGAAGAAGGAGCCCCACAGGAAGGAAT
TCTGGAAGATATGCCTGTGGATCCTGACAATGAGGCTTATGAAATGCCTTCTGAGGAAGGGTATCAAGA
CTACGAACCTGAAGCCTAA (SEQ ID NO:1)

稳转 APP (SW) HEK293 细胞系是转染瑞典双突变 APP695 cDNA 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 h。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 h 后更换为完全培养体系并给药处理。

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。

ELISA 检测

a) α -synuclein ELISA 检测 α -synuclein 单克隆抗体 (Mouse monoclonal) 购自 Sigma-Aldrich (上海, Catalog No.S5566)； α -synuclein ELISA Kit 试剂盒购自 Thermo Fisher Scientific (Catalog No. KHB0061)。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 (标曲配制参见图4) 到各孔 (chromogen blanks empty 除外)，轻震荡混匀，盖膜 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜；用 1 $\times$ Wash buffer 100 μ L 充分洗孔 4 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 1 $\times$ 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；加 100 μ L Stop Solution 到每孔。轻震荡混匀，溶液变黄，使用 NovoStar 酶标仪 (BMG company, Germany) 吸收波长 450 nm 读数。

b) A β ELISA 检测

Amyloid beta 42 Human ELISA Kit 试剂盒购自 Thermo Fisher Scientific (Catalog No. KHB3544)。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 h；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 h；弃上清，用 1× Wash buffer 清洗各孔 3 次，每次 2 分钟且尽量无液体残留；加 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 450 nm）读数。

10 碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 染色

在免疫荧光染色处理前 15 分钟加入 PI (Cell Signaling Technology, Catalog No.4087) 并放置细胞培养箱共孵育 15 分钟，进行免疫荧光处理。PI/RNase 染色溶液的最长激发光和发射光波长分别为 535 nm 和 617 nm。

免疫荧光染色

15 将药物等处理后的细胞吸去上清后，使用预冷的 PBS 清洗三次，用 4%PFA 处理，室温静置 30 分钟，使用 PB-S 清洗三次，10 分钟每次。将 Triton-X 溶于 PBS 配备为 0.1%Triton-X 溶液，处理 15 分钟。10%驴血清封闭 1 小时；一抗：Mouse anti-Ki67 (Cell Signaling Technology, Catalog No.9129)；二抗：anti-Mouse Alex 488。

20 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。

实验结果：

d5PAO 与 PAO 对 SH-sy5y 细胞活力的影响

25 SH-sy5y 细胞系的完全培养体系为地高糖 DMEM 培养液中加入 15%FBS。细胞毒性实验中，SH-sy5y 细胞培养 48h 后分别给予不同浓度 d5PAO 和 PAO 处理 24h，加入终浓度为 0.5 mg/mL 的噻唑蓝 (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。结果显示，d5PAO 在 6.25 nM、25 nM、50 nM、100 nM 和 200 nM 浓度显著促进 SH-sy5y 细胞增殖，PAO 在 200 nM 处理 24 h 后出现毒性，细胞出

现显著死亡。为了进一步检测不同浓度 d5PAO 和 PAOSH-sy5y 细胞的毒性作用，我们通过 PI 染色和对 Ki67 免疫荧光染色考察 d5PAO 和 PAO 对 SH-sy5y 细胞凋亡/死亡和增殖的影响。PI（碘化丙啶）是一种能够插入到 DNA 和 RNA 碱基和染色剂之间的荧光染料，其不能通过活细胞膜，但却能穿过破损的细胞膜从而对已经凋亡/死亡细胞的核染色，而 Ki67 是细胞增殖中不可缺少的蛋白，其功能与丝分裂密切相关，因此 Ki67 常被用于标记增殖周期中的细胞，且一般在临床应用中认为 Ki67 阳性率高的细胞肿瘤生长速度快。在不同浓度 d5PAO 和 PAO 处理 24h 后进行 PI 染色和 Ki67 染色。结果显示，50 nM 和 100 nM d5PAO、PAO 均未使 Ki67 阳性率显著增高，而 PI 阳性细胞较对照组（ctrl）减少，说明 d5PAO 和 PAO 减少细胞凋亡或死亡，而没有明显促进细胞增殖（图 5）。

实施例 4. d5PAO 和 PAO 对稳转 APP（SW）HEK293 细胞活力和 A β 释放的作用

稳转 APP（SW）HEK293 细胞系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 h。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 h 后分别加入不同浓度的 d5PAO 和 PAO 处理 24 h，加入终浓度为 0.5 mg/mL 的噻唑蓝（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。

检测 d5PAO 和 PAO 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 d5PAO 和 PAO 处理 4 小时，通过 ELISA 检测细胞培养液上清中 A β 水平。

实验结果：

25 nM、50 nM、100 nM 和 200 nM d5PAO 处理稳转 APP（SW）HEK293 细胞 24 h 使其较对照组细胞活力显著增加。前期研究显示，PAO 能够促进 β -淀粉样蛋白（amyloid β -protein, A β ）等蛋白的释放，通过 ELISA 试剂盒检测稳转 APP（SW）HEK293 细胞上清中 A β ，结果显示：

25 nM、50nM 和 100 nM d5PAO、PAO 显著促进胞外 A β 含量（图 6）。

实施例 5. 其他氘代化合物对稳转 APP (SW) HEK293 细胞 A β 释放的作用比较

5 选择的三个 PAO 氘代化合物是 d1PAO, d2PAO, d3PAO。APP (SW) HEK293 细胞培养方法给给药方法与实施例 4 相同。各处理组分组为：对照组 (ctrl)、d5PAO 50 nM 处理组、d5PAO 100 nM 处理组、PAO 50 nM 处理组、PAO 75 nM 处理组、d1PAO 25 nM 处理组、d1PAO 50 nM 处理组、
10 d1PAO 75 nM 处理组、d2PAO 25 nM 处理组、d2PAO 50 nM 处理组、
d2PAO 75 nM 处理组、d3PAO 25 nM 处理组、d3PI03 50 nM 处理组、
d3PAO 75 nM 处理组。结果显示：与对照组比较，50 nM 和 75 nM d5PAO；50 nM 和 75 nM PAO；25 nM、50 nM 和 75 nM d1PAO；25 nM、50 nM 和 75 nM d2PAO、25 nM、50 nM 和 75 nM d3PAO 处理组均显著促进胞外 A β 含量。除对照组外，其他处理组与 d5PAO 50 nM 处理组比较，
15 50 nM 和 75 nM PAO 处理组，25 nM、50nM 和 75nM d1PAO 处理组，25nM、和 75nM d2PAO 处理组，以及 25nM 和 75nM d3PAO 处理组细胞培养上清中的 A β 含量均有显著性差异（图 7A 和图 7B）。

实施例 6. d5PAO 和 PAO 对 α -synuclein 分泌的作用

20 SH-SY5Y 细胞系使用 Eugene HD 转染试剂转染 α -synuclein 过表达 (α -synuclein overexpression, α -syn OE) 质粒，饥饿处理 24 小时后更换为完全培养体系，同时化合物 d5PAO 或 PAO 处理 24h，通过 MTT 检测 d5PAO 和 PAO 对转染 α -synuclein 质粒的 SH-sy5y 细胞活力的影响。结果显示，过表达 α -synuclein 使 SH-sy5y 细胞活力显著下降，25 nM、50 nM、75 nM、100
25 nM 和 200 nM d5PAO，以及 50 nM、75 nM 和 100 nM PAO 使过表达 α -synuclein 的 SH-sy5y 细胞活力较 α -synuclein 过表达组显著升高。通过 ELISA 试剂盒检测细胞上清中 α -synuclein，结果显示：50 nM d5PAO 使上清中 α -synuclein 含量显著升高，而 PAO 与 d5PAO 有类似促进 α -synuclein 升高的趋势（图 8）。

30

实施例 7. d5PAO 和 PAO 对戈谢病的治疗作用

1. d5PAO 和 PAO 抑制 CBE 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡或死亡

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。使用 CBE 处理 SH-SY5Y 细胞 48 小时, 导致 SH-SY5Y 细胞出现浓度依赖性的细胞活力下降 (图 9A)。我们选择 100 μ M CBE 进行后续实验。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 d5PAO 或 PAO 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, 100 μ M CBE 与 25 nM, 50 nM 以及 100 nM d5PAO 和 25 nM, 50 nM 以及 100 nM PAO 共同处理组细胞活力显著升高 (图 9B, C), 提示 d5PAO 或 PAO 对 CBE 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡或死亡有保护作用。

2. PAO 降低溶酶体贮积并促进葡萄糖神经酰胺 (Glucosylceramide, GlcCer) 外排

GD 是一类常见的溶酶体贮积病, 我们通过溶酶体标志物 DND99 (Lyso-tracker red DND99) 研究 d5PAO 和 PAO 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 10A, B), 提示 CBE 处理导致 SH-SY5Y 细胞中溶酶体贮积。与 100 μ M CBE 处理组比较, 100 μ M CBE 与 50 nM 和 100 nM PAO 共同处理组使 Lyso-tracker 的荧光强度显著降低 (图 10A, B)。GD 的根本缺陷在于缺乏葡萄糖脑苷脂酶的活性, 而该酶主要介导把葡萄糖脑苷脂分解成葡萄糖和 GlcCer 过程, 因此 GD 患者或 CBE 处理的细胞中均出现 GlcCer 等底物的贮积。为了进一步探究 PAO 是否对 SH-SY5Y 细胞模型中的 GlcCer 贮积有所影响, 我们通过 LC-MS 实验胞内和细胞培养基上清中不同侧链的 GlcCer 含量。检测结果表明, 细胞内 100 μ M CBE 处理组多种不同侧链 GlcCer 浓度远高于对照组 (ctrl), 100 μ M CBE 和 50 nM PAO 共同处理组 GlcCer 浓度与 100 μ M CBE 处理组比较降低 (图 10C)。100 μ M CBE 单独处理使细胞培养基上清中 GlcCer 减少, 100 μ M CBE 和 50 nM PAO 共同处理使 GlcCer 浓度回升 (图 10D)。

3. 敲减 PI4Ka 促进溶酶体贮积减少

前期研究显示, PAO 在低浓度 ($<5\ \mu\text{M}$) 时主要作用于磷脂酰肌醇 4 激酶 PI4KIII α , 为了进一步探究 PAO 作用靶点 PI4KIII α 在纤维化过程中的作用, 我们设计了针对编码 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 SH-SY5Y 细胞 48 小时后, 干扰序列 sh1, sh2, sh3 均使处理组 PI4KIII α 表达水平显著降低 (图 11A, B)。shRNA 干扰慢病毒载体处理 48 小时后通过免疫荧光观察 Lyso-tracker 的荧光强度。与 sh-ctrl 比较, sh-ctrl 和 100 μM CBE 共同处理组 Lyso-tracker 免疫荧光强度显著升高。与 sh-ctrl 和 100 μM CBE 共同处理组比较, sh1-PI4Ka 和 100 μM CBE 共同处理组 Lyso-tracker 免疫荧光强度的下降有显著意义 (图 11C)。以上结果说明敲减 PI4Ka 促进溶酶体贮积减少。

实施例 8. d5PAO 和 PAO 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, 且临床缺乏有效治疗药物。

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- $\beta 1$ (transforming growth factor-1, TGF- $\beta 1$) 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 (extracellular matrix, ECM) 的异常沉积和肺泡结构的破坏, 最终导致 PF 的形成。TGF- $\beta 1$ 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- $\beta 1$ 处理 MRC-5 细胞促使其发生纤维化。d5PAO 和 PAO 分别是氧化苯砷和其改构物。前期研究显示, PAO 具有抑制 PF 的潜能。

实验方法:

MRC-5 细胞培养和处理

MRC-5 细胞购买于中国科学院分子细胞科学卓越创新中心。根据细胞培

养指导说明用含有 10%胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的 MEM (Gibco 公司) 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 5ng/mL TGF-β1 (Proteintech Group, HZ-1011), 并根据分组同时加入含有不同浓度 PAO 或 d5PAO 的 MEM 培养基 (Gibco 公司), 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-β1 组, 5 ng/mL TGF-β1 和 50nM d5PAO 共同处理组 (5 ng/mL TGF-β1+50 nM d5PAO 组), 5 ng/mL TGF-β1 和 25 nM d5PAO 共同处理组 (5 ng/mL TGF-β1+25 nM d5PAO 组), 5 ng/mL TGF-β1 和 50 nM PAO 共同处理组 (5 ng/mL TGF-β1+50 nM PAO 组), 5 ng/mL TGF-β1 和 25 nM PAO 共同处理组 (5 ng/mL TGF-β1+25 nM PAO 组)。

大鼠骨髓间充质干细胞原代培养和处理

将 6 周龄 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 (上海斯莱克实验动物有限公司) 使用水合氯醛麻醉, 75%乙醇消毒后在超净台中分离并取出胫骨和股骨, 用消毒后的剪刀去除两端, 露出骨髓腔。用 5mL 含 10%FBS 的 MEM 培养基冲洗骨髓腔, 将含有骨髓的冲洗液加入培养皿中; 通过 70μm 的细胞筛过滤, 并在 2000rpm 转速下离心 3 分钟, 去除上清, 用 10%FBS 的 MEM 培养基重悬细胞, 种板后在恒温 37°C, 5%CO₂, 饱和湿度的培养箱中培养, 6 小时后通过换液去除未贴壁的细胞。当细胞长至 80%密度时, 使用 2.5%胰酶消化 1 分钟, 并以 1: 2 的比例传代, 用于免疫荧光实验的间充质干细胞将以 3000-5000 个细胞每孔种于 24 孔板的盖玻片上, 通过观察细胞密度至 70%时, 根据分组加入含有不同浓度 PAO 或 d5PAO 的 MEM 培养基 (无 FBS) 并于恒温 37°C, 5%CO₂, 饱和湿度的培养箱中培养 24 小时。分组如下: 对照 (ctrl) 组、50 nM d5PAO 处理组、25 nM d5PAO 处理组、50 nM PAO 处理组、25 nM PAO 处理组。

免疫荧光染色

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℃孵育一抗过夜（一抗使用 10%GS 封闭液进行稀释， α -Smooth Muscle Actin（兔抗 α -Smooth Muscle Actin, Cell Signaling Technology #19245）。

稀释比例 1: 200, Calponin1 稀释比例 1: 100）。次日，使用 PBS 清洗 3 次，
5 每次 10 分钟；孵育二抗 Alexa Flour 555 山羊抗兔 IgG（Molecular Probes）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-苯基吡啶（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。

10 蛋白质免疫印迹（Wesern blot）实验

1) 将细胞培养皿放置冰上，吸弃上清，使用预冷的 PBS 清洗细胞 3 次；

2) 加入 120 μ L/孔细胞裂解液，冰上水平放置 30 分钟；

3) 使用细胞刮刮取裂解液，收集至 1.5mL EP 管；

15 4) 15000g 离心 15 分钟，收取上清至新的 EP 管中，并取 5 μ L 样品用于检测蛋白含量（BCA 法），其余裂解液则加入 1/4 体积的 loading buffer；

5) 沸水煮 5 分钟；

6) 配置 10%SDS 分离胶，并配置积层胶；

20 7) 通过 SDS-PAGE 凝胶电泳分离不同分子量的蛋白质；

8) 配置湿转 buffer，使用 0.45 μ m PVDF 膜进行转膜实验；

9) 5%脱脂牛奶室温封闭 1 小时；

10) 清洗后孵育一抗，4℃孵育过夜；

11) 次日使用 TBST 液清洗 3 次，孵育二抗，室温放置 2 小时；

25 12) 使用 ECL 显影液显色，并使用 GE。

酶联免疫吸附反应：Human Collagen Type I ELISA Kit

共 8 个样品，包括：对照组(ctrl), 5ng/mL TGF- β 1 组，5 ng/mL TGF- β 1 和 50 nM d5PAO 共同处理组（5 ng/mL TGF- β 1+50 nM d5PAO 组），5 ng/mL TGF- β 1 和 25 nM d5PAO 共同处理组（5 ng/mL TGF- β 1+25 nM d5PAO 组），

30 5 ng/mL TGF- β 1 和 50 nM PAO 共同处理组（5 ng/mL TGF- β 1+50 nM PAO

组), 5 ng/mL TGF- β 1 和 25 nM PAO 共同处理组 (5 ng/mL TGF- β 1+25 nM PAO 组)。

Human Collagen Type I ELISA Kit 采购自 Novus Biologicals (货号: NBP2-30102), 按照使用说明进行以下实验步骤:

- 5 1) 使用 Standard Diluent 配置标准曲线样品: 4000 pg/mL、2000 pg/mL、1000 pg/mL、500 pg/mL、250 pg/mL、125 pg/mL、62.5 pg/mL、0 pg/mL;
- 2) 向各孔中分别加入 100 μ L 待测样品 (3 个复孔) 或标准曲线样品, 使用封口膜封住孔板, 37°C 孵育 2 小时;
- 3) 吸去上清, 不需要清洗;
- 10 4) 向各孔中加入 100 μ L Detection Reagent A 液, 使用封口膜封住孔板, 37°C 孵育 1 小时;
- 5) 弃去上清, 每孔中加入 350 μ L 1 $\times$ Wash solution, 振荡器中清洗 2 分钟, 在无法纸上倒扣孔板并通过扣击清除上清, 连续清洗 3 次;
- 6) 向各孔中加入 100 μ L Detection Reagent B 液, 使用封口膜封住孔板,
- 15 37°C 孵育 30 分钟;
- 7) 弃去上清, 每孔中加入 350 μ L 1 $\times$ Wash solution, 振荡器中清洗 2 分钟, 在无法纸上倒扣孔板并通过扣击清除上清, 连续清洗 5 次;
- 8) 清洗后每孔中加入 90 μ L TMB 底物, 孔板中液体将逐渐变为蓝色, 使用封口膜封住孔板, 室温静置 10 分钟;
- 20 9) 每孔中加入 50 μ L Stop solution, 孔板中液体将变为黄色;
- 10) 使用 450 nm 吸收波长的酶标仪 (读取数据并分析)。

shRNA 慢病毒载体构建和处理

针对 *PI4Ka* 干扰的 shRNA 慢病毒载体由吉满生物科技(上海)有限公司设计并生产。载体信息: pGMLV-SC5 RNAi 载体 (图 12)。

25

设计靶点如下:

	TargetSeq
sh-ctrl	TTCTCCGAACGTGTCACGT
sh1	GCTGATCTCTACTACACTTCC
sh2	GGTTATCACCGGAAATCAATA

sh3	GCAACATTATGCTGGACAAGA
-----	-----------------------

MRC-5 细胞含有 10%胎牛血清（fetal bovine serum, FBS）的 MEM 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，根据分组分别加入 1 μL/孔慢病毒载体，24 小时后根据分组加入 5 ng/mL TGF-β1 共孵育 24 小时，收集蛋白进行蛋白质免疫印迹实验或免疫荧光染色。

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±标准误（mean±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。

实验结果：

用含有 5 ng/mL TGF-β1 的 MEM（不含 FBS）培养基处理 MRC-5 细胞 24 小时，并根据分组给予不同浓度的 d5PAO 或 PAO 处理。与对照组比较，TGF-β1 单独或与一定浓度的 d5PAO 或 PAO 共同处理没有造成明显的细胞死亡或凋亡（图 13）。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 d5PAO 和 PAO 对肺纤维化是否有调控作用，我们分别对 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-β1 处理组 α-SMA 表达量显著增多，提示 5 ng/mL TGF-β1 处理 MRC-5 细胞 24 小时导致细胞纤维化，25 nM、50 nM 和 100 nM d5PAO 以及 50 nM 和 100 nM PAO 显著抑制 5 ng/mL TGF-β1 诱导的 α-SMA 过度表达，并呈现一定剂量依赖关系（图 14A，B）。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-β1 处理组 Calponin1 表达量与 ctrl 组比较显著增多，一定浓度的 d5PAO 或 PAO 与 5 ng/mL TGF-β1 共同处理组中的 Calponin1 表达量与 5 ng/mL TGF-β1 单独处理组比较显著减少（图 14A，C）。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-β1 处理组 α-SMA 表达量较对照组显著升高（图 15A，C）。5 ng/mL TGF-β1 和 25 nM d5PAO，5 ng/mL TGF-β1 和 50 nM d5PAO，5 ng/mL TGF-β1 和 25 nM PAO 以及 5 ng/mL TGF-β1 和 50 nM PAO 共同处理组 α-SMA 表达量与对照组没有明显差异，而 5ng/mL TGF-β1 和 25 nM d5PAO，5 ng/mL TGF-β1 和

50 nM d5PAO, 5 ng/mL TGF- β 1 和 25 nM PAO 以及 5 ng/mL TGF- β 1 和 50 nM PAO 共同处理组 α -SMA 表达量均与 5 ng/mL TGF- β 1 处理组比较显著降低 (图 15A, C)。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 15B, D)。以上结果说明 d5PAO 和 PAO 能够显著抑制 TGF- β 1 诱导的 MRC-5 细胞纤维化过程。

d5PAO 和 PAO 抑制 Calponin1 在骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, bMSC) 中表达

肺纤维化缺乏有效的治疗药物和治疗手段, 而干细胞因其特有的生物学特性及潜在的生物医学应用价值近年来成为治疗肺纤维化的热门研究领域。间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSC) 由于具有低免疫原性、多样化潜能以及免疫调节抗炎能力, 和来源广泛、易于分离培养和较少伦理争议等优点, 成为创伤组织修复、器官功能重建和细胞治疗的理想工程细胞。因此我们分离培养了大鼠骨骼来源的 MSC, 并检测 d5PAO 和 PAO 是否调控 Calponin1 在 MSC 中的表达。分离的 MSC 使用含有 10%FBS 的 MEM 培养基培养, 在免疫荧光实验中以 3000-5000 个细胞每孔种于 24 孔板的盖玻片上, 通过观察细胞密度至 70%时, 根据分组加入含有不同浓度 PAO 或 d5PAO 的 MEM 培养基 (无 FBS) 并于恒温 37°C, 5%CO₂, 饱和湿度的培养箱中培养 24 小时。免疫荧光结果显示, 25nM、50nM d5PAO 和 PAO 处理 MSC 24 小时有抑制 Calponin1 在 MSC 中表达的趋势 (图 16)。

d5PAO 和 PAO 抑制 TGF- β 1 处理的 MRC-5 细胞分泌 I 型胶原蛋白 (Collagen Type I , COL1)

COL1 是细胞外基质的重要组成成分之一。研究显示, TGF- β 1 促进 MRC-5 细胞纤维化过程中 COL1 分泌显著增多。为了进一步探究 d5PAO 和 PAO 在抑制肺纤维化过程中对 COL1 的分泌是否有调控作用, 我们通过 ELISA 实验检测细胞上清中 COL1 水平。用含有 5ng/mL TGF- β 1 的 MEM (不含 FBS) 培养基处理 MRC-5 细胞 24 小时, 并根据分组给予不同浓度的 d5PAO 或 PAO 处理 24 小时, 收集上清进行 ELISA 实验。实验结果显示: 与 ctrl 组比较, 5 ng/mL TGF- β 1 处理组细胞上清中的 COL1 浓度显著升高, 5 ng/mL TGF- β 1 和 25 nM d5PAO, 5 ng/mL TGF- β 1 和 50 nM d5PAO, 5 ng/mL TGF- β 1 和 100 nM d5PAO, 5 ng/mL TGF- β 1 和 25 nM PAO, 5 ng/mL TGF- β 1 和 50 nM PAO

以及 5 ng/mL TGF- β 1 和 100 nM PAO 共同处理组与 5 ng/mL TGF- β 1 单独处理组比较细胞上清中 COL1 水平显著下降（图 17A, B），说明 d5PAO 和 PAO 能够抑制 MRC-5 细胞模型中的 COL1 分泌。

敲减 PI4K α 抑制 MRC-5 细胞纤维化

5 前期研究显示，PAO 在低浓度（ $<5 \mu\text{M}$ ）时主要作用于磷脂酰肌醇 4 激酶 PI4KIII α ，为了进一步探究 PAO 作用靶点 PI4KIII α 在纤维化过程中的作用，我们设计了针对编码 PI4KIII α 蛋白的基因序列 *PI4K α* 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 *PI4K α* 的 shRNA 干扰慢病毒载体在转染 MRC-5 细胞 48 小时
10 后，干扰序列 sh1、sh2、sh3 均使处理组 PI4KIII α 表达水平显著降低（图 18A, 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
15 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 表达水平也有下降趋势（图 19A, C）。Calponin1 的观察结果与 α -SMA 保持一致（图 19B, D），均说明敲减 PI4K α 抑制 MRC-5 细胞纤维化。

实施例 9. d5PAO 和 PAO 抗炎症作用比较

20 d5PAO 和 PAO 抑制小鼠小胶质细胞 BV2 细胞炎症因子释放

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 d5PAO 和 PAO 对肿瘤坏死因子 α （tumor necrosis factor α , TNF- α ）和白细胞介素-6（Interleukin-6, IL-6）等炎症因子分泌的影响，并在实
25 验中使用常用抗炎药吲哚美辛（Indomethacin）作为阳性药对照。

细胞培养及处理

BV2 细胞的培养基使用高糖 DMEM 加入 10%FBS，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 $\mu\text{g/mL}$ LPS（脂多糖，购自
30

Sigma, 货号: L2880) 的高糖 DMEM 培养基 (无 FBS), 并根据分组给予不同浓度 d5PAO 或 PAO 共孵育 24 小时。收取上清离心后供后续实验使用。分组如下: 对照 (ctrl) 组, 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 组, 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 和 50 nM d5PAO 共同处理组 (1 $\mu\text{g/mL}$ LPS + 50 nM d5PAO 组), 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 和 25 nM d5PAO 共同处理组 (1 $\mu\text{g/mL}$ LPS + 25 nM d5PAO 组), 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 和 12.5 nM d5PAO 共同处理组 (1 $\mu\text{g/mL}$ LPS + 12.5 nM d5PAO 组), 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 和 50 nM PAO 共同处理组 (1 $\mu\text{g/mL}$ LPS + 50 nM PAO 组), 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 和 25 nM PAO 共同处理组 (1 $\mu\text{g/mL}$ LPS + 25 nM PAO 组), 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 和 12.5 nM PAO 共同处理组 (1 $\mu\text{g/mL}$ LPS + 12.5 nM PAO 组), 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 和 100 μM 吡啶美辛共同处理组。

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 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 μL 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 μL 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 μL 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 μL 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 μL 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 450 nm 波长吸光度值。

5 Mouse IL-6 ELISA 实验

Mouse IL-6 ELISA Kit 采购自 Proteintech group, 货号: KE10007。按照产品说明进行以下实验:

于检测孔板对应孔中加入各浓度标曲或样本 100 μ L 并预留空白对照比色孔, 盖膜放置于湿盒中, 37°C 孵育 2 h; 每孔 350 μ L Wash Solution 清洗操作 4 次, 每次 1-2 分钟且尽量保证无液体残留; 加 100 μ L Diluent Antibody Solution (Detection Antibody Solution) 于各孔, 盖膜放置于湿盒中, 37°C 孵育 1h; 重复清洗操作 4 次, 每次 1-2 分钟且尽量保证无液体残留; 加 100 μ L HRP-Conjugate Antibody 于各孔, 盖膜放置于湿盒中, 37°C 孵育 40 分钟; 重复清洗操作 4 次且尽量确保无液体残留; 加 100 μ L TMB Substrate Solution 于各孔, 盖膜 37°C 避光孵育 15 分钟。溶液变蓝; 加 100 μ L Stop Solution 到每孔, 轻震荡混匀, 溶液变黄, 尽快用 NOVOstar 转液式酶标仪 (吸收波长 450 nm) 读数。

统计

数据处理和统计采用 GraphPad Prism5 软件, 数据用平均值 $\pm$ 标准误差 (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。

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, 然后去除培养基更换为含有 1 μ g/mL LPS 的高糖 DMEM 培养基 (无 FBS), 并根据给予不同浓度 d5PAO 或 PAO 共孵育 24 小时, 收取上清使用 ELISA (酶联免疫吸附实验) 方法检测培养基中 IL-6 和 TNF- α 的浓度。实验结果显示, 1 μ g/mL LPS 处理组 BV2 细胞上清中的 IL-6 和 TNF- α 浓度与对照 (ctrl) 组比较显著升高, 说明 1 μ g/mL LPS 处理 BV2 细胞促进其释放炎症因子 (图 20 A-D)。与 1 μ g/mL LPS 处理组比较, 阳性药 30 吲哚美辛在 100 μ M 浓度时显著抑制 TNF- α 的分泌 (图 20 A-B)。与阳性药

结果类似，1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 和 12.5 nM 、 25 nM、 50 nM d5PAO 共同处理组以及和 12.5 nM 、 25 nM 、 50 nM PAO 共同处理组上清中 TNF- α 浓度与 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 单独处理组比较显著降低，说明 d5PAO 和 PAO 能够抑制 LPS 诱导的 TNF- α 释放。IL-6 的 ELISA 检测结果显示，一定浓度的 d5PAO 和 PAO 处理有抑制 LPS 诱导的 BV2 细胞分泌 IL-6 的趋势（图 20 C-D）。以上实验说明一定浓度 d5PAO 和 PAO 有抑制 LPS 诱导的 BV2 细胞释放炎症因子的作用。

实施例 10. d5PAO 和 PAO 在抗肿瘤作用中的比较

1. PAO 和 d5PAO 对肿瘤细胞模型的药效实验

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 PAO 和 d5PAO 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 微升，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（%）= $(1 - (\text{RLU compound} - \text{RLU blank}))$

/(RLU DMSO – RLU blank)) ×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：

5 如下表 5 所示：d5PAO 和 PAO 对所测试的肿瘤细胞都有抑制作用，且两者的抑制作用 IC₅₀ 相近，d5PAO 的 IC₅₀ 稍低；两者对 U2-OS 和 A-375 细胞的抑制作用最强，IC₅₀ 都小于 50 nM；对 HeLa、SK-HEP-1、Daudi、EL4、HL-60、Jurkat, Clone E6-1、NAMALWA 细胞都抑制作用较强，IC₅₀ 在 50-100nM；对 A-431 细胞的抑制作用最弱，IC₅₀ 约为 300nM，对其余细胞的
10 IC₅₀ 在 100-200nM。与 PAO（原形化合物）和 d5PAO（5 个氘代化合物）相比，一个氘代化合物 d1 PAO，对大部分的肿瘤细胞的有效抑制浓度大于 200 nM，说明它对肿瘤细胞的抑制作用不如 PAO 和 d5PAO。

表 5. d5PAO 和 PAO 对肿瘤细胞（培养 72 小时）的抑制作用列表

细胞系		PAO	d5PAO	d1PAO	紫杉醇
		IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	AbsIC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)
HeLa	宫颈癌	87.01	87.78	>200	10.66
SK-HEP-1	肝癌	85.73	83.09		4.69
MCF7	乳腺癌	137.09	151.95	>200	23.36
MDA-MB-231	乳腺癌	105.55	106.42	>200	>10000
A549	肺癌	216.39	225.21	>200	3.95
NCI-H1299	肺癌	116.97	120.85	>200	17.69
HT-29	结肠癌	175.72	168.06	>200	4.19
A-431	皮肤癌	344.36	312.71	>200	3.08
NCIN87 [N87]	胃癌	161.28	153.93	>200	7.76
HCC827	肺癌	180.53	179.63	>200	5.88
EL4	T 淋巴细胞癌	60.22	52.68		55.00
Daudi	血癌	63.42	59.30	97.66	4.71
U-2 OS	骨肉瘤	49.51	48.49	71.17	16.77
Jurkat, Clone E6-1	血癌	93.01	91.06	175.35	3.83
K-562	骨髓癌	51.92	52.10		6.53
HL-60	血癌	49.94	51.14	>200	2.82
SK-OV-3	卵巢癌	207.68	199.59	>200	9.90
U-937	淋巴瘤	85.09	85.79	149.63	3.97
NAMALWA	血癌	61.09	60.73	68.66	3.66
KG-1	骨髓癌	151.10	151.32	176.84	76.80
A-375	黑色素癌	33.23	34.96	50.76	3.98
BxPC-3	胰腺癌	>200	>200	-	-
ZR-75-1	乳腺导管癌	28.54	50-100		

4T1	乳腺癌	47.54	50-100		
B6F10	褐色素瘤	20.88	<50		
A20	B 淋巴细胞癌	64.42	<50		
Raji-Luc	淋巴瘤母细胞瘤	110	>100		
SU-DHL-1	淋巴结大细胞淋巴瘤	100-200	100-200		
LOVO	结肠癌	>200	100-200		
HepG2	肝癌	105	100-200		
NCI-H358	非小细胞肺癌	75.4	~100		
OVCAR-3	卵巢癌		50-100		
SNU-5	胃癌		100-200		
LLC1	肺癌	162.3			

2. PAO 和 d5PAO 对小鼠肿瘤模型的药效实验

实验动物饲养在北京百奥赛图基因生物技术有限公司动物中心的 SPF 级屏障设施环境。屏障系统温度在 20-26°C 和湿度控在 40-70 %。照明每 12 小时交替。SPF 级生长繁殖饲料购自北京科澳协力饲料有限公司。饮用水为酸化水 (pH 2.5~3.0)，经过高压灭菌处理。动物可以自由摄取无菌食物和饮水。

2.1 PAO 对乳腺癌的抑制作用

实验方法：

PDX 模型的接种与分组

待接种的 PDX 肿瘤生长至 800-1000mm³ 左右后，无菌条件下取出瘤块放置在 RPMI 1640 培养基中，剔除钙化点、分泌物等非肿瘤组织，并切成大小均一的小块 (3×3×3 mm)，准备进行乳腺癌 (BP1395) PDX 模型的皮下接种。用碘伏对小鼠右侧肋部皮肤进行消毒处理，用剪刀将皮肤剪开 3-5mm 左右的切口，使用接种针将切好的瘤块接种于小鼠右侧肋部皮下。当平均肿瘤体积达到约 100 mm³ 时，挑选个体肿瘤体积适中的小鼠入组，将动物按肿瘤体积随机分配到 4 个实验组中，每组 8 只，分组当天开始给药。所有组给受试品为口服给药 (P.O.)，分组当天开始给药，受试品 PAO 每天给药 1 次，共给药 20 次。紫杉醇每周静脉 (i.v.) 给药 1 次，共给药 4 次。实验结束或实施人道终点时，使用过量 CO₂ 将动物执行安乐死。

肿瘤体积：分组后每周使用游标卡尺对肿瘤体积进行 2 次测量，安乐死

前测量肿瘤体积，测量肿瘤的长径和短径，其体积计算公式为：肿瘤体积 = $0.5 \times \text{长径} \times \text{短径}^2$ 。

体重检测：接种、分组（即首次给药前）、给药期间每周 2 次、安乐死前称取动物体重。

5 药物评价指标：

肿瘤体积抑制率（ TGI_{TV} ）

$$TGI(\%) = [1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)] \times 100\%$$

（ T_i ：治疗组在给药第 i 天的肿瘤体积均值， T_0 ：治疗组在给药第 0 天的肿瘤体积均值； V_i ：溶剂对照组在给药第 i 天的肿瘤体积均值， V_0 ：溶剂

10 对照组在给药第 0 天的肿瘤体积均值）

瘤重抑制率（ TGI_{TW} ）：

实验结束，对存活动物实施安乐死后剥离肿瘤组织，称量肿瘤重量，计算各组的肿瘤重量，^{差异}以进一步计算瘤重抑制率 TGI_{TW} ，计算公式如下：

$$\text{瘤重抑制率 } TGI_{TW}\% = (W_{\text{溶剂对照组}} - W_{\text{治疗组}}) / W_{\text{溶剂对照组}} \times 100\% , W \text{ 指肿瘤}$$

15 重量。

数据采集和统计学分析：

基于原始数据进行分析处理，结果分析用平均数和标准误表示（ $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ ）。同时对肿瘤体积进行统计学分析， $P < 0.05$ 认为有显著性差异。结果分析时同时考虑统计学意义和生物学意义。

20 实验结果：

在实验过程中，所有动物在给药期间活动和进食状态良好，不荷瘤小鼠体重有一定程度的上升，荷瘤鼠体重略有下降，表明动物对各受试品耐受良好。在分组给药第 21 天，溶剂对照组 G1 平均肿瘤体积为 $436 \pm 40 \text{ mm}^3$ 。给药组 G2 组（PAO，2 mg/Kg）、G3 组（紫杉醇，7 mg/Kg）、G4 组（紫杉醇 7mg/Kg+ PAO，2 mg/Kg）的平均肿瘤体积分别为 $519 \pm 96 \text{ mm}^3$ 、 $290 \pm 63 \text{ mm}^3$ 、 $162 \pm 26 \text{ mm}^3$ ，肿瘤体积生长抑制率 TGI_{TV} 分别为 -25.7%、44.8%、84.1%（ $P=0.01$ ）。结果表明 PAO 和紫杉醇联用可以有效抑制肿瘤体积增长（图 21）。

30 2.2 PAO对淋巴癌的抑制作用

实验方法:

小鼠淋巴瘤 SU-DHL-1 细胞购自 ATCC, 细胞培养在 37°C、5% CO₂ 的培养箱中, 培养基成分为含有 10% 灭活胎牛血清的 Dulbecco's Modified Eagle's 培养基。

5 肿瘤细胞的接种与分组:

将 PBS 重悬的 SU-DHL-1 淋巴瘤细胞以 1×10^7 个/0.1 mL 浓度, 0.1 mL/只体积接种于 B-NDG 人源化小鼠的右侧皮下。当平均肿瘤体积达到大约 100 mm³ 时, 挑选个体肿瘤体积合适的 36 只小鼠入组, 将动物按肿瘤体积随机分配到 6 个实验组中, 每组 6 只。分组当天开始给药。受试品 PAO 每天给药 1 次, 共给药 17 次。环磷酰胺每周皮下注射 (i.v.) 给药 1 次, 共给药 4 次。实验结束或实施人道终点时, 使用过量 CO₂ 将动物执行安乐死。

实验结果:

在实验过程中, 所有动物在给药期间活动和进食状态良好, 不荷瘤小鼠体重有一定程度的上升, 荷瘤鼠体重略有下降, 表明动物对各受试品耐受良好。在分组给药第 17 天, 溶剂对照组 G1 平均肿瘤体积为 3899 ± 272 mm³。给药组 G2 组 (环磷酰胺, 50 mg/Kg)、G3, G4, G5 组 (PAO, 0.3 mg/Kg、0.6 mg/Kg、1.2 mg/Kg)、G6 组 (环磷酰胺 50 mg/Kg + PAO 0.6 mg/Kg) 的平均肿瘤体积分别为 367 ± 79 mm³、 3427 ± 128 mm³、 3784 ± 114 mm³、 3735 ± 205 mm³、 497 ± 106 mm³, 肿瘤体积生长抑制率 TGI_{TV} 分别为 -93% (** P<0.001)、17.2%、3%、4.3%、89.9% (P<0.001**)。实验结果在肿瘤重量上也得到证实。环磷酰胺能够有效抑制淋巴瘤肿瘤体积的增长, PAO 和环磷酰胺联用未能进一步提高抑制作用 (图 22)。

2.3 d5PAO 对黑色素瘤的抑制作用

25 实验方法:

将 A2058 细胞以 1×10^7 个/0.1 mL 浓度, 0.1 mL/只体积接种于 B-NDG 小鼠的右侧皮下。当平均肿瘤体积达到大约 100 mm³ 时, 挑选个体肿瘤体积合适的 48 只小鼠入组, 将动物按肿瘤体积随机分配到 6 个实验组中, 每组 8 只, 分别为 G3 组 (生理盐水/溶媒)、G4 组 (d5PAO, 0.5 mg/Kg)、G5 组 (d5PAO, 1.5 mg/Kg)、G6 (替莫唑胺, 30 mg/Kg + d5PAO, 0.5 mg/Kg)、

G7(替莫唑胺 30 mg/Kg+d5PAO, 1.5 mg/Kg)和 G8(替莫唑胺, 30 mg/Kg)。同时根据小鼠体重挑选 16 只不荷瘤小鼠平均分为 2 个实验组, 每组 8 只, 分别为 G1 组(生理盐水/溶媒)和 G2 组(d5PAO, 1.5mg/Kg)。所有组给药途径均为灌胃给药, 分组当天开始给药, 受试品 d5PAO 每天给药 1 次, 共给药 23 次。受试品替莫唑胺每周给药 4 次, 共给药 12 次。给药和观察期间每周测量 2 次小鼠体重和肿瘤体积, 并记录测量值(图 23)。实验结束时, 动物安乐死, 剥取肿瘤称重、拍照, 计算肿瘤生长抑制率(TGI%)。

实验结果:

在实验过程中, 所有动物在给药期间活动和进食状态良好, 不荷瘤小鼠体重有一定程度的上升, 荷瘤鼠体重略有下降, 表明动物对各受试品耐受良好。在分组给药第 25 天, 溶剂对照组 G3 平均肿瘤体积为 $2806 \pm 240 \text{ mm}^3$ 。给药组 G4 组(d5PAO 0.5mg/Kg)、G5 组(d5PAO 1.5mg/Kg)、G6 组(替莫唑胺 30mg/Kg+d5PAO 0.5mg/Kg)、G7 组(替莫唑胺 30mg/Kg+d5PAO 1.5mg/Kg)和 G8 组(替莫唑胺 30mg/Kg)的平均肿瘤体积分别为 $2907 \pm 295 \text{ mm}^3$ 、 $2180 \pm 312 \text{ mm}^3$ 、 $1064 \pm 164 \text{ mm}^3$ 、 $1213 \pm 155 \text{ mm}^3$ 、 $1480 \pm 136 \text{ mm}^3$, 肿瘤体积生长抑制率 TGI_{TV} 分别为-3.7%、23.2%、64.5%、58.9%和 49.1%。实验结果在肿瘤重量上也得到证实。在受试终点动物体内获取的肿瘤组织重量分别为: G3 组溶媒/生理盐水, 3.413 ± 0.253 克; G4 组 d5PAO 0.5mg/kg, 3.557 ± 0.379 克; G5 组 d5PAO 1.5mg/kg, 2.744 ± 0.459 克; G6 组替莫唑胺 30mg/kg+d5PAO 0.5mg/kg, 1.413 ± 0.233 克; G7 组替莫唑胺 30mg/kg + d5PAO 1.5mg/kg, 1.442 ± 0.251 克; G8 组替莫唑胺 30mg/kg, 1.884 ± 0.217 克(图 24)。

与对照组 G3 相比, 替莫唑胺在 30mg/Kg 剂量下单用时及与 d5PAO 在 0.5mg/Kg 和 1.5mg/Kg 剂量下联合用药时均对 A2058 皮下移植瘤生长有极显著抑制作用($P < 0.001$)。与替莫唑胺单独使用相比, 联用可进一步提升抑制作用。

实施例 11. d5PAO 和 PAO 在抗肿瘤恶病质(Cachexia)中的作用比较

癌症(Cancer)是人类第二大死因, 全球近六分之一的死亡由癌症造成。癌症治疗主要通过化疗、放射治疗、手术、免疫治疗、基因治疗、激素治疗

等手段实现。其中化疗是当前最有效的手段之一。但化学治疗的主要问题是其引起副作用：药物在杀死癌细胞的同时，也会杀死体内快速生长的细胞，包括血液、口腔、消化系统和毛囊中的细胞，从而引起消化系统反应、脱发、骨髓抑制以及其它系统的功能衰退。

- 5 恶病质（Cachexia）亦称恶液质，表现为极度消瘦，体重减轻，脂肪丢失、骨骼肌以及心肌的溶解减少，进而导致渐进性的功能障碍，最后导致全身衰竭等综合征。恶液质多由严重慢性消耗性疾病引起，包括肿瘤、AIDS、严重创伤、手术后、吸收不良及严重的败血症等。其中以肿瘤伴发的恶病质最为常见，也称为肿瘤恶病质。31-87%恶性肿瘤患者都伴有恶病质，约20%
10 肿瘤病人的直接死因是恶病质引起的营养不良，而非疾病本身。恶病质尤其和胰腺癌、胃癌、肺癌、肝癌有较高的相关性。恶病质直接影响癌症治疗效果，增加并发症发生率，并使生活质量下降，生存期缩短，治疗时间延长和医疗费用增加。

- 恶液质的形成原因尚未完全解析，但最近研究逐渐揭示，各类从肿瘤细胞或肿瘤细胞包围环境里的细胞释放的致病因子。减缓或阻止肿瘤恶病质的发生可提高病人生活质量，延长生存时间，是抗癌治疗方案中的主要组成部分。动物实验模型研究表明阻止肿瘤发展过程中体重的降低可以延长生存率。治疗肿瘤病人恶病质的主要手段是通过药物逆转体重降低以及肌肉量的流失。到目前为止，大部分一线首选抗恶病质药物在预防和治疗肿瘤恶病质的
15 效果都非常有限。
20

1. PAO和d5PAO对健康小鼠体重的影响

- 取 22 只 2 月龄和 20 只 6 月龄的雄性 C57B/6 小鼠，每个小鼠饲养笼有 5-6 只小鼠，其中 12 只 2 月龄的小鼠和 10 只 6 月龄的小鼠，每日用 MCT 溶媒溶解的 d5PAO，剂量是 2.1mg/kg，其余的 10 只 2 月龄的小鼠和 10 只 6
25 月龄的小鼠，每日用 MCT 溶媒溶解的 PAO，剂量是 2.0 mg/kg。从给药的第一天起，每 4 天的第一天在给药前称量和记录每只小鼠的体重，在接下来的 4 天内，以此体重为依据，给予灌胃相应的剂量的 PAO 或 d5PAO。每 4 天记录小鼠的存活的数量。

- 30 结果如图 25 所示，对于 2 月龄的 d5PAO 和 PAO 小鼠（2M-d5PAO 和

2M-PAO)，灌胃给药的前 24 天，两组小鼠的平均体重完全一样，且逐步增加，24 天后两组小鼠的体重都有所下降，但 2M-PAO 组的体重下降比 2M-d5PAO 组明显快，且组给药后第 44-48 天有一只小鼠死亡，2M-d5PAO 组无死亡。对于 6 月龄的 d5PAO 和 PAO 小鼠（6M-d5PAO 和 6M-PAO），在灌胃给药的 48 天，两组小鼠的平均体重整体上都有缓慢、波动性地下降，但是给药后的第 32 天起，6M-PAO 的体重下降比 6M-d5PAO 组的明显加快，且两组小鼠都有动物死亡，6M-PAO 组有 5 只（50%），6M-d5PAO 组有两只（20%）。所以灌胃给药 d5PAO 所产生的毒性反应比 6M-PAO 明显低。

2. PAO 对肿瘤模型动物体重的影响

10 2.1 PAO 乳腺癌小鼠模型体重的影响

紫杉醇注射可使动物体重下降。用药第 21 天，从 $101.4\% \pm 1.6\%$ （溶媒组，相对于 Day0 平均体重），下降到 $94.3\% \pm 2.6\%$ （紫杉醇组 7 mg/Kg，相对于 Day0 平均体重， $P=0.036^*$ ）。而 PAO 的加入可以阻止由紫杉醇引起的体重下降（ $105.3\% \pm 2.4\%$ ， $P=0.187$ ）。值得注意的是，PAO 本身也能使荷瘤动物的体重增加（ $106.1\% \pm 2.5\%$ ， $P=0.128$ ）（图 26）。

2.2 PAO 对胰腺癌模型体重的影响

胰腺癌模型的建立方式与上同。用药第 28 天，吉西他滨（1.5mg/Kg）和紫杉醇（7mg/kg）组的平均体重（ $104.3\% \pm 4.0\%$ ，相对于 Day 0 的平均体重），与溶媒组相比（ $99.0\% \pm 2.2\%$ ，相对于 Day 0 平均体重）无显著差异。而 PAO 的加入可以使体重增加至 $116.7\% \pm 3.9\%$ （ $P=0.002$ VS 溶媒组和吉西他滨+紫杉醇组，图 27）。

2.3 PAO 对淋巴瘤模型动物体重的影响

淋巴瘤模型的建立方式与上同。虽然 PAO 的加入未能进一步抑制肿瘤的生长，但可以缓解环磷酰胺注射引起的体重下降。用药第 17 天，动物体重从 $117.4\% \pm 1.4\%$ （G1 溶媒组，相对于 Day0 平均体重），下降到 $104.7\% \pm 1.6\%$ （G2，环磷酰胺组 50 mg/Kg，相对于 Day 0 平均体重， $P<0.01^*$ ）。PAO（0.6 mg-0.9 mg/Kg）与环磷酰胺联用缓解了环磷酰胺引起的体重下降（G6 $111.1\% \pm 1.9\%$ ， $P=0.032$ vs. 溶媒组， $P=0.05$ vs. 环磷酰胺组）（图 28）。

2.4 d5PAO 对黑色素瘤模型动物体重的影响

和健康小鼠相比，荷瘤动物的体重均有所下降。与溶媒组荷瘤动物相比，

替莫唑胺在 30 mg/Kg 剂量单用时的体重有所下降（88%±1.5%，相对于 Day0），而高剂量 d5PAO（1.5 mg/Kg）与替莫唑胺的联合使用缓解了体重下降（95%±2%，P=0.01 vs. 替莫唑胺; P=0.038 vs. 溶媒组）。d5PAO 单独使用对荷瘤动物的体重没有显著影响（图 29）。

5

实施例 12. PAO 和 d5PAO 对 HCoV 229E (流感冠状病毒) 的抑制作用 受试化合物与对照化合物

对照化合物 Remdesivir 将由药明康德提供。化合物使用 DMSO 溶液配置为 20 mM 储存液。受试样品和对照化合物测试 8 个浓度，2 倍或者 3 倍梯度稀释，双复孔。

细胞株、病毒株以及试剂

MRC5 细胞和 HCoV 229E 株购自 ATCC。细胞使用添加了 10 %胎牛血清（Hyclone），1 %双抗（Hyclone），1 % L-谷氨酰胺（Gibco）和 1 %非必需氨基酸（Gibco）的 EMEM（Sigma）培养液培养。添加了 5%胎牛血清（Hyclone），1 %双抗（Hyclone），1 % L-谷氨酰胺（Gibco）和 1 %非必需氨基酸（Gibco）的 EMEM（Sigma）培养液为实验培养液。本项目所用主要试剂为细胞活力检测试剂盒 CellTiter-Glo（Promega）。

试验方法

MRC5 细胞以每孔 20,000 个细胞的密度接种到 96 孔测试板中并于 5% CO₂、37°C培养箱中培养过夜。第二天，加入倍比稀释后的化合物（8 个浓度点、2 倍或者 3 倍梯度稀释，双复孔），随后病毒以每孔 200 TCID₅₀ 加入细胞。设置细胞对照（细胞，无化合物处理或病毒感染），病毒对照（细胞感染病毒，无化合物处理）和培养液对照（只有培养液）。培养液中 DMSO 的终浓度为 0.5 %。细胞于培养箱中培养 3 天。细胞毒性实验与抗病毒实验同时进行测试，实验条件一致，但无病毒感染。使用细胞活力检测试剂盒 CellTiter Glo（Promega）检测细胞活力。化合物的抗病毒活性和细胞毒性分别由不同浓度下的化合物对病毒引起的细胞病变效应的抑制率（%）和 MRC5 细胞的活率（%）表示。计算公式如下：

抑制率（%）=（测试孔读值-病毒对照平均值）/（细胞对照平均值-病毒对照平均值）× 100

细胞活率 (%) = (测试孔读值-培养液对照平均值) / (细胞对照平均值-培养液对照平均值) × 100

使用 GraphPad Prism (version 5) 对化合物的抑制率和细胞活率进行非线性拟合分析, 计算化合物的半数有效浓度 (EC₅₀) 和半数细胞毒性浓度 (CC₅₀) 值。拟合公式为: log(inhibitor) vs. response -- Variable slope。

结果

PAO 和 d5PAO 药物的剂量反应拟合曲线见图 30。对照化合物 Remdesivir 显示出预期的抗病毒活性和细胞毒性。

测试结果显示受试化合物 PAO 和 P100 对 HCoV 229E 具有抗病毒活性, 其 EC₅₀ 值分别为 55.35 nM 和 47.21 nM。受试化合物 PAO 和 P100 对 MRC5 细胞有明显的毒性, 其 CC₅₀ 值分别为 256.8 nM 和 317.5 nM。

实施例 13. 低剂量的 d5PAO 与 PAO 抗焦虑抑郁作用比较

试验动物

30 只雄性 2 月龄 ICR 小鼠, 在清洁级鼠房按正常昼夜节律等条件饲养 8 周后, 随机均分为 3 组: 载体、PAO 和 d5PAO 组, 5 只小鼠一个鼠笼, 每组两个笼, 每组都给予慢性不可预知的多种刺激 (chronic unpredictable multiple stimulation, CUMS)。

CUMS 抑郁造模

CUMS 抑郁造模: 每周每天多种刺激交替给予小鼠, 使小鼠不可预见每次刺激持续的时间和接下来将给予的刺激的模式和时间长短。第一周的刺激和时间安排见 (表 6)。表中每一天的刺激模式和时间组成一个模块, 共 7 个。第二周起, 每周一的刺激从 7 个模块中随机抽取, 周二从余下的 6 个随机抽取, 周三从余下的 5 个随机抽取, 以此类推。如果某一天有测试安排, 则对前两天和试验当天的刺激做合适的调整。

表 6. CUMS 刺激时间安排

时 间		刺激时间安排
周 一	9:00	夹尾
	12:00	停止夹尾, 放樟木块, 倾斜鼠笼
周 二	10:00	去除樟木块, 放置异物 (玻璃杯或者塑料杯)

	16:00	拿走食物和异物，持续光照（开关打开）
周 三	9:00	3 小时白噪音
	12:00	冰粒（200 ml）/笼
周 四	9:00	换笼子，7 小时左右白噪音
	16:00	供给食物、倾斜鼠笼，打开闪光灯
周 五	9:00	关闭闪光灯，夹尾 3 小时
	12:00	供给食物，6 小时白噪音
	16:00	停止白噪音，持续夜间光照（开关打开）
周 六	10:00	倾斜鼠笼
	16:00	拿除水，停止倾斜鼠笼，打开闪光灯
周 日	9:00	供水，45-50℃热水（150ml/笼）

给药方法

在完成第一周的 CUMS 刺激后，PAO 和 d5PAO 组的小鼠分别每日灌胃 PAO 和 d5PAO 化合物溶液，剂量都是 0.05 mg/Kg/day，而载体组小鼠每日灌胃与体重相应体积的 MCT（MIGLYOL 812N，供应商 IOI Oleo GmbH），MCT 是用来制备 PAO 和 d5PAO 化合物的溶液的载体。PAO 和 d5PAO 的 MCT 溶液的浓度都是 0.005 mg/mL。

新奇抑制摄食试验（NSF）

新奇抑制摄食试验（Novelty suppressed feeding test, NSF）中有一个只有顶面开放的用不透明有机玻璃制作的长×宽×高为 25 cm×25 cm×20 cm 的盒子，其中央放置有一个小平台，平台上有一颗鼠饲料。试验时，把一只小鼠从盒子任一个角放入盒子，头面向盒子的角，让小鼠在五干扰下自由活动 5 分钟，记录 5 分钟内第一次摄食的潜伏期。如果满 5 分钟时，小鼠未摄食，取出小鼠并把该小鼠的第一次摄食的潜伏期计为 300 秒。第一次摄食的潜伏期的长度（秒）就是小鼠焦虑程度的指数。

抑郁行为指标：糖水偏爱程度检测

在糖水偏好试验中，一个干净的鼠笼的供水处放置有两个预先称好重量的同样水瓶，一只装有水，另一只装有浓度为 1%蔗糖的水溶液。试验时，把一只小鼠的放入该干净鼠笼的远离水瓶的一端，头朝向水瓶的反方向。小鼠在无干扰下，在 1 小时内可自由地选择喝糖水或水，满 1 小时后，取出小鼠，

小心取出两个水瓶，称重，用于计算小鼠所饮用的糖水和水的重量，分别计为 $W_{\text{水}}$ 和 $W_{\text{糖水}}$ 。小鼠糖水的偏好度 = $W_{\text{糖水}} / (W_{\text{水}} + W_{\text{糖水}}) \times 100\%$ 。

统计方法

使用 SPSS 软件进行统计分析，数据以平均值 $\pm$ 标准误差 ($\bar{x} \pm \text{s.e.m.}$) 表示。因为 PAO 有抗抑郁作用是已知的，给药后 PAO 和 d5PAO 组与载体组的糖水偏爱度的差异使用 One-tail unpaired *t* test 检验显著性， $P < 0.05$ 标记为*， $P < 0.01$ 标记为**。

结果

三组小鼠经历 3 周的 CUMS 和分别给予载体 (MCT)、PAO 和 d5PAO 制剂灌胃 15 天后，进行新奇抑制食物摄取 (NSF) 试验。结果发现 10 只载体组小鼠中的只有 2 只有摄食，但其余 8 只在限定的 5 分钟内没有摄食，潜伏期均计为 300 秒，该组平均焦虑指数为 282 ± 12 (秒)；PAO 和 d5PAO 组的该组平均焦虑指数分别为 227 ± 29 (秒) 和 181 ± 36 (秒)，显著比载体组的焦虑程度要低，提示低剂量 (0.05 mg/Kg/day) 的 PAO 和 d5PAO 也有明显的抗焦虑作用，且 d5PAO 比 d5PAO 的抗焦虑作用更显著 (图 31)。

三组小鼠完成 NSF 试验 48 小时后，进行糖水偏好试验，检测三组小鼠的抑郁程度，如图 27 所示，载体、PAO 和 d5PAO 三组小鼠对糖水的偏好程度分别为 $66 \pm 3.8\%$ ， $75 \pm 4.3\%$ 和 $78 \pm 2.4\%$ ；PAO 和 d5PAO 组对糖水的偏好明显比载体组高，提示低剂量 (0.05 mg/Kg/day) 的 PAO 和 d5PAO 也有明显的抗抑郁作用，且 d5PAO 比 PAO 的抗抑郁作用更显著 (图 32)。第一次糖水偏好试验完成后，继续给予三组小鼠 CUMS，总共 38 天，再进行糖水偏好试验，结果显示载体、PAO 和 d5PAO 三组小鼠对糖水的偏好程度分别为 $71 \pm 3.5\%$ ， $77 \pm 2.0\%$ 和 $82 \pm 2.9\%$ ；PAO 和 d5PAO 组对糖水的偏好比载体组高，但 PAO 组与载体组的差异未达到显著性，提示低剂量 (0.05 mg/Kg/天) 的 PAO 和 d5PAO，仍然有抗抑郁作用，且 d5PAO 比 d5PAO 的抗抑郁作用更显著和更稳定 (图 32)。

实施例 14. d5PAO 和 PAO 对 NPC 的治疗作用研究

U18666A，是一种细胞内胆固醇转运 (cholesterol transport) 抑制剂，常被用于构建 C 型尼曼氏病 (NPC) 的细胞模型。

1 细胞培养与化合物处理

SH-SY5Y 细胞使用高糖 DMEM 加 15%FBS 的完全培养基放置 37°C, 5%CO₂ 培养箱培养。当细胞 70%融合时, 加入含 10 μM U18666A (购自爱必信(上海)生物科技有限公司, 货号: abs819512) 同时根据分组加入不同深度

5 d5PAO 和 PAO, 培养 24 小时。

2 Filipin 染色

1) 将 24 孔板中的培养基弃去, 加入 1 mL PBS 缓冲液静置 1 分钟, 弃去 24 孔板中的液体, 重复此步骤 2 次;

2) 每孔加入 1 mL 4%多聚甲醛, 室温下固定 30 分钟;

10 3) 将 24 孔板中的 4%多聚甲醛弃去, 加入 1 mL PBS 缓冲液, 轻轻晃动 24 孔板 1 分钟, 弃去 24 孔板中的液体, 重复此步骤 2 次;

4) 每孔加入 1 mL 1.5 mg/mL 甘氨酸溶液, 室温下孵育 10 分钟;

5) 将 24 孔板中的液体弃去, 加入终浓度为 50 μg/mL Filipin 染色液 (购自 Sigma-Aldrich, 货号: SAE0087) 1 mL, 室温下孵育 1 小时, 避免光照;

15 6) 将 24 孔板中的液体弃去, 加入 1 mL PBS 缓冲液, 轻轻晃动 24 孔板 1 分钟, 弃去 24 孔板中的液体, 重复此步骤 2 次;

7) 取载玻片, 在载玻片中央滴加 5 微升封片剂 (含 DAPI), 将细胞爬片取出晾干, 将有细胞的一面向下, 盖在载玻片上, 使之与封片剂充分接触, 室温避光孵育 30 分钟。

20 8) 激光共聚焦显微镜观察。

实验结果

10 μM U18666A 处理 SH-SY5Y 细胞, 同时根据分组加入不同浓度 d5PAO 和 PAO, 共孵育 24 小时, 进行 Filipin 染色后观察。免疫荧光染色结果表明, 10 μM U18666A 单独处理组 Filipin 染色荧光强度比对照组(ctrl)增强, 提示 10 μM U18666A 处理导致与 Filipin 结合的胆固醇量上升, 即导致胆固醇贮积。10 μM U18666A 与 35 nM, 70 nM d5PAO 以及 35 nM PAO, 70 nM PAO 共同处理组 Filipin 染色荧光强度与 10 μM U18666A 单独处理组比较出现下降 (图 33)。以上结果说明一定浓度 d5PAO 和 PAO 能够抑制 U18666A 导致的胆固醇贮积。

30

实施例 15. PAO 和敲减 *PI4Ka* 激活自噬溶酶体通路 (Autophagy-lysosome pathway, ALP)

前期研究显示, GD 等溶酶体贮积病发展过程中 ALP 被阻断。SH-SY5Y 细胞经 CBE 处理 48 小时后根据分组分别加入不同浓度 PAO 或 mTOR 抑制剂雷帕霉素 (Rapamycin, RAPA) 作为阳性对照, 共孵育 24 小时, 进行蛋白质免疫印迹实验或免疫荧光实验, 通过观察 ALP 常见标志物研究 PAO 等化合物对自噬溶酶体通路的影响。对 ALP 常见的标志物 LC3B 和 p62 进行检测, 蛋白质免疫印迹实验显示: 在 CBE 构建的 SH-SY5Y 细胞模型中, PAO 剂量依赖性地促进 LC3B 蛋白表达, 抑制 p62 蛋白水平, 说明 PAO 激活 ALP 通路并使自噬流活化 (图 34A-C), 与阳性对照 500 nM RAPA 结果相近 (图 34A-C)。免疫荧光结果与蛋白免疫印迹实验结果相一致 (图 34D)。此外, H^+ -ATPase 抑制剂 Bafilomycin A1 (Baf-A1) 是一种常用的 ALP 抑制剂, 通过利用 Baf-A1 阻断 ALP 信号可以进一步验证 PAO 等化合物对 CBE 构建的 SH-SY5Y 细胞的保护作用是否与 ALP 有关。SH-SY5Y 细胞经 CBE 处理 48 小时后根据分组分别加入不同浓度 PAO 或 50nM Baf-A1 共孵育 24 小时, 通过 MTT 实验检测细胞活力。实验结果表明, 与对照组 (ctrl) 比较, 100 μ M CBE 显著抑制 SH-SY5Y 细胞活力。与 100 μ M CBE 处理组比较, 100 μ M CBE 与 25 nM, 50 nM 以及 75 nM PAO 共同处理组细胞活力显著升高, 50nM Baf-A1 处理则使 PAO 在相应组别中的保护作用下降, 使 50 nM Baf-A1 和 100 μ M CBE 分别与 25 nM, 50n M 以及 75 nM 1PAO 共同处理组的细胞活力与 100 μ M CBE 处理组没有明显差异 (图 34E), 说明 Baf-A1 通过抑制 ALP 信号阻断 PAO 对 CBE 处理的 SH-SY5Y 细胞的保护作用。以上结果证实 PAO 激活 ALP 使自噬流活化, 并通过 ALP 发挥对 GD 细胞模型的保护作用。对进行 shRNA 干扰慢病毒载体处理的 SH-SY5Y 细胞检测 ALP 通路标志物 LC3B 进行检测, 结果显示: 与 sh-ctrl 组比较, 敲减 *PI4Ka* 后 LC3B 蛋白水平显著升高 (图 35), 在 CBE 处理的 SH-SY5Y 细胞中敲减 *PI4Ka* 同样促进 LC3B 蛋白表达, 说明与 *PI4Ka* 抑制剂 PAO 结果相同, 敲减 *PI4Ka* 同样激活了 ALP 通路。

实施例 16. PAO 和 d5PAO 抗化学因子引起的肺炎症反应和肺纤维化

肺部及上呼吸道是机体最频繁遭受各种病因包括病原体、化学因子包括药物、异物、组织的物理性损伤、过敏反应和自身免疫异常等所引起的炎症反应的组织器官，所引起的炎症反应包括局部组织或者全身血液中的白细胞增多，诸如中性粒细胞、巨噬细胞和淋巴细胞，以及多种炎症因子或细胞因子增加等。病原体包括微生物和寄生虫。微生物包括细菌、病毒、衣原体、支原体、螺旋体和真菌等。肺部炎症有时还会导致肺部组织纤维化，损害肺部结构和功能，特别是损害通气和氧气的弥散。

博来霉素是明确的能引起肺炎和肺纤维化的药物或者化学，其在动物肺部引起的间质性肺炎和肺纤维化，是研究特发性肺纤维化（Idiopathic pulmonary fibrosis, IPF）的常用模型。IPF 是一种致命疾病，其特征是进行性和不可逆性肺纤维化，目前无特异性治疗方法，现有的治疗方法的疗效部显著。大多数患者在症状发作后 3 - 8 年内死于进行性呼吸衰竭。尽管 IPF 发病机理的基本机制知之甚少，但标志性病理特征，包括：炎症反应、成纤维细胞过度增殖以及细胞外基质异常沉积。

PAO 和 d5PAO 对博来霉素诱导的小鼠肺炎反应和肺纤维化的疗效是 PAO 和到 d5 PAO 在炎症反应和组织纤维化的药物应用的一个实施例。

实验方法：

博来霉素诱导

1、博来霉素配制

博来霉素溶解于生理盐水中，终浓度根据给药剂量调整。

2、诱导方法

在第 1 天，动物将吸入 2 - 5%异氟烷进行麻醉。基于体重，动物将通过气管内的给药途径给予博来霉素（2 mg/kg，具体给药体积将依据动物体重进行计算并被记录）。

3、给药

接受博来霉素诱导当天视为试验第 1 天。在第 3 天对动物进行筛选和分组。所有动物将在试验第 8 天开始给药，每天一次直至试验结束，具体的给药方案请见表 7 所示。

表 7. 分组及给药方案

组别	测试物	动物	给药途径	浓度 mg/mL	给药浓度		给药方案
					mg/kg	mL/kg	
1	正常组 ^a	6	口服	/	-	10	D8-D21, q.d
2	模型组 ^a	10	口服	/	-	10	D8-D21, q.d
3	尼达尼布	10	口服	5	50	10	D8-D21, q.d
4	受试物 PAO 组	10	口服	0.03	0.3	10	D8-D21, q.d
5	受试物 d5PAO 组	10	口服	0.03	0.3	10	D8-D21, q.d

a: MCT

4、样品收集及分析

在第 21 天，所有动物给药后接受气道反应性的测定后，所有动物通过吸入 2-5%异氟烷麻醉后通过眼眶采集最少 0.5 mL 全血，使用 EDTA-2K 抗凝，以 10000 rpm, 10 分钟，4 度条件下离心血浆，-80 度保存。动物完成血样收集后，使用舒泰（腹腔注射，25 - 50 mg/kg，含 1 mg/mL 甲苯噻嗪）对动物麻醉后进行气管插管，用 0.5 mL 的 PBS（包含 1%FBS）对肺进行第一次灌洗。另取 0.5 mL 的 PBS（包含 1%FBS）对肺进行第二次灌洗。混悬取 100 μ L 计数 BALF 中的细胞总数。4°C 下 300g 离心 BALF 5 分钟，收集的不含细胞团的肺泡灌洗液（BALF）上清液，使用电化学发光免疫技术（默沙东 MSD 的小鼠十因子检测试剂盒，V-PLEX Proinflammatory Panel 1 Mouse Ki, t 货号 15048D-X）检测小鼠 BALF 中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IFN- γ 等炎症和细胞因子的浓度。将离心后获得的细胞团重悬用以涂片制备，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。在光学显微镜下计数。

灌洗后，通过脱颈椎安乐死动物。收集肺组织，右肺冷冻保存，匀浆后提取总蛋白，使用商品化的 ELISA 试剂盒检测 I 型胶原、透明质酸、 α -SMA 的含量，均为复孔上样。

收集左肺，中性甲醛固定后，每只动物的左肺切三段，使用石蜡包埋在一个蜡块中，做石蜡包埋和 5 微米厚度的超薄切片的制备，分别进行 Masson's 染色后，进行组织病理学评估。

血浆透明质酸和胶原蛋白水平的 ELISA 测试方法

按照透明质酸 ELISA 试剂盒（Mouse Quantikine ELISA Kit, Biotechnne,

货号：DHYAL0) 和胶原蛋白 I 型 ELISA 试剂盒 (Mouse Typel I Collagen Detection ELISA Kit, Chondrex, 货号：6012) 的产品说明进行检测各组小鼠血浆中透明质酸和胶原蛋白 I 型。

检测指标

5 1、体重

整个试验周期，造模当天称重一次、分组当天称重一次、以及分组后每周三次称量并记录动物的体重。

2、肺功能检测

10 使用无约束全身体积描记法(whole-body plethysmograph,WBP)系统对试验小鼠进行气道高反应性测定肺功能。首先，小鼠雾化吸入 PBS 溶液，随后将连续雾化吸入浓度为 1.5625、3.125、6.25、12.5、25 和 50 mg/mL 的乙酰甲胆碱 (Mch)，测定相应浓度下的增强呼气间歇值 (Penh)，每个浓度下刺激 90 秒，绘制 Penh 相对基线的变化率-Mch 浓度曲线，并计算曲线下面积。

3、病理评价

15 每只动物的左肺切三段，使用石蜡包埋在一个蜡块中，做石蜡包埋和 5 微米厚度的超薄切片的制备，每个蜡块各自制备一张切片，Masson 染色，用于纤维化评价，评分标准参考表 8。

表 8. 纤维化评分标准

评分	标准
1	正常
3	最小的纤维化增厚
5	中度纤维化增厚
7	纤维化伴随肺组织损伤（粗束）
8	纤维面积大，呈现“蜂窝状”

20 I 型胶原含量检测、透明质酸、α-SMA 和 TNF-α、IL-1β、IL-6 等十因子检测

收集的右肺组织将被匀浆，按照商品化检测试剂盒指示操作，检测 I 型胶原含量，透明质酸含量和 α-SMA 含量；用 MSD 盒子来测 BALF 中的细胞因子的表达

收集的不含细胞团的 BALF 上清液，使用 MSD 盒子来测 BALF 中的细胞因子（TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等十因子的含量）的表达用于检测，复孔上样。

试验观察

每天两次笼边观察动物的健康状态，记录在动物房的日志中。

- 5 在称重的同时，由项目组成员另行观察动物状态，任何外观或行为异常表现将被详细记录于澎立生物试验观察表中。例如：如果给药后动物体重显著下降（超过 15%）或出现其它副作用（如：昏睡、不活动、精神萎顿等），此类事件应立即通报客户并与客户讨论是否更改剂量或给药方案。

统计分析：

- 10 试验数据表示成均值 $\pm$ 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。

实验结果：

- 15 使用 WBP 系统对试验小鼠进行气道高反应性测定。首先，小鼠雾化吸入 PBS 溶液，随后将连续雾化吸入浓度为 1.5625、3.125、6.25、12.5、25 和 50 mg/mL 的乙酰甲胆碱（Mch），测定相应浓度下的增强呼气间歇值（Penh），每个浓度下刺激 90 秒，计算每只小鼠在 PBS 和不同 Mch 浓度下的 Penh 相对基线的百分比，结果显示在表 9 中，并绘制 Penh 相对基线的变化率-Mch 浓度曲线（图 36），并计算曲线下面积（表 10）。这些结果提示 PAO 和 d5PAO 能很好的改善肺纤维化对肺功能的损伤，且 d5PAO 的作用比 PAO 强。

利用电化学发光免疫技术检测了各组动物的 BALF 中，TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等 10 个炎症和细胞因子，如表 11 所示，PAO 和 d5PAO 对 IFN- γ 、IL-1 β 、IL-2、IL-5、IL-6 和 TNF- α 的上调都有抑制作用，尤其对 IL-6 对的上调有很强的抑制作用。

- 25 对每组小鼠 BALF 的细胞进行涂片，Wright-Giemsa 染色液染色区分出嗜酸细胞、中性白细胞、巨噬细胞和淋巴细胞、光学显微镜下计数。各组的 4 种细胞的总数计数结果在表 9，各组的 4 种细胞的分别计数结果在图 38。显示 PAO 和 d5PAO 对肺纤维化导致的炎症细胞的总数以及对 4 种炎症细胞的升高有不同程度的抑制作用，尤其对中心粒细胞的升高抑制作用显著。

- 30 肺纤维化还常常伴有血液中透明质酸和胶原蛋白的升高，因此，用

ELISA 方法测试了血浆透明质酸和胶原蛋白水平。部分结果显示在图 39 和图 40 中，提示 PAO 和 d5PAO 对肺纤维化导致的血浆透明质酸和胶原蛋白的升高有抑制作用，其中对透明质酸升高的作用明显优于阳性对照药尼达尼布。

5

表 9. 乙酰甲胆碱产生的增强呼气间歇值 Penh 相对基线的百分比

	小鼠分组	乙酰甲胆碱(mg/mL)						
		PBS	1.563	3.125	6.25	12.5	25	50
%	正常组 (6)	120±10	132±13	150±14	177±14	190±16	289±45	358±29
baseline	模型组(10)	140±7	166±13	173±15	214±24	213±15	357±38	643±77###
Penh	尼达尼布组 (10)	109±8	121±12	142±16	219±37	254±39	352±50	490±115
Mean	PAO 组(10)	127±8	150±18	189±26	203±30	264±46	285±49	431±126**
± SEM	d5PAO 组(10)	127±19	152±28	179±29	208±37	233±41	312±48	383±95***

Two-way ANOVA, ###<0.001 与正常组比; **<0.01 和 ***<0.001 与模型组比。

表 10. Penh 相对基线的变化率-Mch 浓度曲线下的面积 (AUC)

Group	AUC of penh value	inhibition rate
正常组(6)	13166	--
模型组(10)	18522	--
尼达尼布 (10)	16732	9.67%
PAO 组 (10)	14921	19.45%
d5PAO(10)	14549	21.45%

10

表 11. 各组动物的肺泡灌洗液 (BALF) 中的炎症和细胞因子的含量 (pg/mL)

Factors	正常组 (6)	模型组 (10)	阳性药组 (10)	PAO (10)	d5PAO (9)
IFN-γ	0.07±0.01	0.08±0.00	0.13±0.05	0.07±0.00	0.07±0.01
IL-10	1.87±0.09	2.4±0.23	2.17±0.16	2.19±0.16	2.37±0.24
IL-12p70	31.39±2.27	23.31±1.03	25.09±1.12	23.30±2.52	24.32±2.41

IL-1 β	0.36$\pm$0.02	0.77$\pm$0.14	1.24 $\pm$ 0.34	0.71 $\pm$ 0.12	0.73 $\pm$ 0.15
IL-2	0.30 $\pm$ 0.02	0.31 $\pm$ 0.02	0.31 $\pm$ 0.04	0.30 $\pm$ 0.02	0.29 $\pm$ 0.04
IL-4	0.28 $\pm$ 0.02	0.22 $\pm$ 0.01	0.24 $\pm$ 0.01	0.23 $\pm$ 0.02	0.23 $\pm$ 0.02
IL-5	0.52$\pm$0.07	1.64$\pm$0.61	5.67 $\pm$ 3.38	1.57 $\pm$ 0.27	1.20 $\pm$ 0.27
IL-6	9.69$\pm$0.81	290.24$\pm$251.49	371.98$\pm$216.68	34.59$\pm$6.64	82.83$\pm$49.05
KC/GRO	3.13$\pm$.62	7.97$\pm$0.99	9.01 $\pm$ 1.89	7.15 $\pm$ 1.00	11.45 $\pm$ 3.41
TNF- α	0.61$\pm$0.06	5.51$\pm$0.81	3.83 $\pm$ 0.61	5.16 $\pm$ 0.79	4.82 $\pm$ 0.92

本领域的技术人员应当明了，尽管为了举例说明的目的，本文描述了本发明的具体实施方式，但可以对其进行各种修改而不偏离本发明的精神和范围。因此，本发明的具体实施方式和实施例不应当视为限制本发明的范围。

- 5 本发明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。