



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108721622 B

(45) 授权公告日 2022.10.25

(21) 申请号 201710245671.8

C12N 15/85 (2006.01)

(22) 申请日 2017.04.14

A01K 67/027 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

审查员 赵陆海

申请公布号 CN 108721622 A

(43) 申请公布日 2018.11.02

(73) 专利权人 中国科学院上海高等研究院

地址 201210 上海市浦东新区海科路99号

(72) 发明人 黄福德 蒋理想 蒙石泉 焦常平

王文安

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

专利代理师 陈静

(51) Int. Cl.

A61K 45/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书15页

A61P 1/16 (2006.01)

序列表3页 附图2页

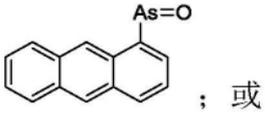
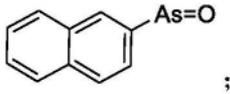
(54) 发明名称

抑制肝纤维化的试剂及应用

(57) 摘要

本发明涉及抑制肝纤维化的试剂及应用。本发明中,通过遗传改造动物,获得了不易于发生肝纤维化的动物。同时,本发明人还筛选获得了一系列对于原代HSC的PI4KA(编码PI4KIII α)的表达或PI4KIII α 的酶活性具有抑制作用的化合物,这些化合物均能较为显著地抑制HSC的PI4KA的mRNA水平或抑制PI4KIII α 的酶活性,进而减低 α -SMA或I型胶原的mRNA水平,从而可以抑制肝纤维化。

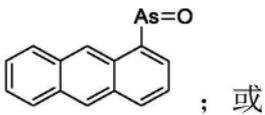
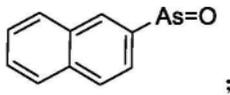
1. PI4KIII α 抑制剂在制备抑制肝纤维化或肝硬化的药物中的用途;所述的PI4KIII α 抑制剂为特异性抑制PI4KIII α 的抑制性核苷酸或特异性抑制PI4KIII α 的小分子化合物或其盐,选自:



SEQ ID NO:4的siRNA。

2. 药物组合物在制备抑制肝纤维化或肝硬化的药盒中的应用;

其中,所述的药物组合物含有PI4KIII α 抑制剂及药学上可接受的载体,所述的PI4KIII α 抑制剂为特异性抑制PI4KIII α 的抑制性核苷酸或特异性抑制PI4KIII α 的小分子化合物或其盐,选自:



SEQ ID NO:4的siRNA。

抑制肝纤维化的试剂及应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,更具体地,本发明涉及抑制肝纤维化的试剂及应用。

背景技术

[0002] 肝纤维化是肝脏损伤时发生的一个可逆的肝脏愈伤修复反应,主要表现为细胞外基质(extracellular matrix,ECM)的积累。当肝脏损伤持续发生,ECM持续积累就会导致肝实质为愈伤组织所替代,最终发展为肝硬化。ECM的积累与肝星状细胞(hepatic stellate cell,HSC)的活化密切相关,而且HSC一直作为肝纤维化防治的主要靶细胞。有研究表明,HSC的活化受PI3K/Akt通路调节。PI3K是一种胞内磷脂酰肌醇激酶,其对细胞的生长、增殖、分化有调控作用。有研究表明PI3K/Akt信号通路能够促进HSC的活化与增殖,从而促进肝硬化。磷脂酰肌醇-4激酶(phosphatidylinositol 4-kinases,PI4KIII α)能催化肌醇磷酸(phosphatidyl inositol,PI)环上D4位磷酸化产生4-磷酸磷脂酰肌醇(4-phosphatidyl-inositide,PI₄P),PI₄P再经PIP5-K激酶催化生成4,5-二磷酸(4,5-phosphatidyl-inosididediphosphate,PIP₂)。而PIP₂是PI3K的直接催化底物,能激活下游多种蛋白的活性,在PI3K/Akt中处于核心地位,因此PI4KIII α 可能影响到PI3K/Akt信号通路。

[0003] 尽管本领域对于PI3K/Akt信号通路有所研究,然而目前仍然缺少有效的肝纤维化或肝硬化的治疗药物。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供抑制肝纤维化的试剂及应用。

[0005] 在本发明的第一方面,提供PI4KIII α 抑制剂在制备抑制肝纤维化或肝硬化(包括:预防、缓解或治疗肝纤维化或肝硬化疾病)的药物中的用途。

[0006] 在本发明的另一方面,提供一种用于抑制肝纤维化或肝硬化(包括:预防、缓解或治疗肝纤维化或肝硬化疾病)的药物组合物,所述的药物组合物含有:特异性抑制PI4KIII α 的抑制性核苷酸,其是靶向于PI4KA序列中SEQ ID NO:1~11任一所示核苷酸序列位置的siRNA或其组合;以及药学上可接受的载体。

[0007] 在本发明的另一方面,提供一种用于抑制肝纤维化或肝硬化(包括:预防、缓解或治疗肝纤维化或肝硬化疾病)的药物组合物,其特征在于,所述的药物组合物含有:特异性抑制PI4KIII α 的小分子化合物;以及药学上可接受的载体。

[0008] 在本发明的另一方面,提供一种制备不易于发生肝纤维化或肝硬化的转基因动物的方法,所述方法包括:通过基因敲除的方法,在动物的基因组中敲除磷脂酰肌醇4-磷酸激酶III(PI4KIII α)的表达。

[0009] 本发明的其它方面由于本文的公开内容,对本领域的技术人员而言是显而易见的。

附图说明

[0010] 图1、正常肝脏 (CTRL)、肝硬化肝脏 (Cirrhosis) 的整体外观与HE染色的石蜡切片。

[0011] A,E分别为CTRL和Cirrhosis小鼠的肝脏整体外观,B,E分别为A、D中矩形部位的放大图像;C、F分别为CTRL和Cirrhosis小鼠的肝脏病理切片HE染色后的结果,其中黑色箭头指示的为炎症小泡。

[0012] 图2、Cirrhosis-PI4KA^{-/+}小鼠的肝脏表面与Cirrhosis小鼠的肝脏表面的比较图。其中,A、B、C分别为肝脏整体外观,D、E、F分别为A、B、C中矩形部位的放大图像。

[0013] 图3、正常肝脏 (CTRL)、肝硬化肝脏 (Cirrhosis)、PI4KA单拷贝敲除小鼠的肝硬化肝脏 (Cirrhosis-PI4KA^{-/+}) HE染色的石蜡切片。

[0014] 图4、正常肝脏 (CTRL)、肝硬化肝脏 (Cirrhosis)、PI4KA单拷贝敲除小鼠的静脉窦周围的炎症小泡数量的统计结果。

具体实施方式

[0015] 本发明人经过深入的研究,发现通过遗传改造动物,可以获得不易于发生肝纤维化的动物。同时,本发明人还筛选获得了一系列对于原代HSC的PI4KA的表达具有抑制作用的化合物,这些化合物均能较为显著地抑制PI4KA的mRNA水平,从而可以抑制肝纤维化。

[0016] PI4KIII α 抑制剂

[0017] 基于本发明人的新发现,所述的PI4KIII α 抑制剂可用于制备预防、改善或治疗肝硬化或肝纤维化的组合物。

[0018] 如本文所用,所述的“PI4KIII α 抑制剂”包括了其“活性或功能抑制剂”,也包括了PI4KIII α 的核酸抑制物、拮抗剂、抑制剂、阻滞剂、阻断剂等,只要它们能够下调PI4KIII α 抑制剂的表达水平、抑制PI4KIII α 抑制剂的活性或功能。它们可以是化合物、化学小分子、生物分子。所述的生物分子可以是核酸水平(包括DNA、RNA)的,也可以是蛋白水平的。

[0019] 所述的PI4KIII α 抑制剂是指任何可降低PI4KIII α 的活性、降低PI4KIII α 的稳定性、下调PI4KIII α 的表达、减少PI4KIII α 有效作用时间的物质,这些物质均可用于本发明,作为对于下调PI4KIII α 有用的物质,从而可用于缓解或治疗肝硬化或肝纤维化。例如,所述的下调剂是:核酸抑制物、蛋白抑制剂、抗体、配体、化合物、核酸酶、核酸结合分子等,只要其能够下调PI4KIII α 的表达、抑制其活性或功能。所述的核酸抑制物包括但不限于:以PI4KIII α 的编码基因或其转录本为抑制或沉默靶标的shRNA,反义核酸、小干扰RNA、微小RNA,或能表达或形成所述shRNA,反义核酸、小干扰RNA、微小RNA的构建物。

[0020] 作为本发明的优选方式,所述的PI4KIII α 抑制剂是siRNA,其核苷酸序列包括SEQ ID NO:5所示的序列;或所述的干扰分子是包括SEQ ID NO:5所示的序列或以SEQ ID NO:5所示的序列为靶标的表达系统。所述的表达系统包括但不限于:表达质粒、宿主细胞或病毒;所述的病毒包括腺病毒、腺相关病毒、慢病毒等。

[0021] 基因下调

[0022] 本发明还提供了一些特异性的小干扰RNA分子(siRNA),其具有SEQ ID NO:1~11任一所示的核苷酸序列。

[0023] 如本文所用,所述的“小干扰RNA (small interfering RNA, siRNA)”是指一种短片段双链RNA分子,能够以同源互补序列的mRNA为靶目标降解特定的mRNA,这个过程就是RNA

干扰(RNA interference)过程。小干扰RNA可以制备成双链核酸的形式,它含有一个正义链和一个反义链,这两条链仅在杂交的条件下形成双链。一个双链RNA复合物可以由相互分离的正义链和反义链来制备。因此,举例来讲,互补的正义链和反义链是化学合成的,其后可通过退火杂交,产生合成的双链RNA复合物。

[0024] 在经过大量研究比较后,本发明提供了一系列对于原代HSC的 α -SMA或I型胶原的表达具有抑制作用的siRNA,具体地,所述的siRNA是列于表2中的靶向于靶向于PI4KA序列中SEQ ID NO:1~11序列位置的siRNA。更为优选的是其中具有“++”或“+++”的siRNA;其中“+++”的siRNA是最为优选的。

[0025] 基因敲除

[0026] 如本发明所用,所述的“敲除”或“删除”指将目标基因从基因组中删除或使其不再编码活性多肽的技术。

[0027] 肝纤维化是肝损伤时发生的可逆的愈伤修复反应,其发展过程受到HSC的调节。正常情况下,HSC呈静止状态;HSC会在肝损伤时激活,激活后会转化为肌纤维母细胞,能大量生成分泌ECM,并促使肝纤维化发生。正常情况下,肝脏修复完成后,HSC会被清除或恢复到静止状态,只有在持续损伤,HSC会持续活化,导致ECM过度积累,引发不可逆的肝脏病变。因此抑制或抑制HSC的活化状态常作为控制肝纤维化的主要策略。HSC活化过程受多条信号通路调控,其中涉及的分子就包括了TGF- β 、MAPK、PAPR、PDGF、PI3K等。

[0028] 本发明中,发现下调PI4KIII α 的表达对肝纤维化的抑制作用。在本发明的具体实施例中,通过每周两次,持续7周的CCl₄腹腔注射构建肝纤维化动物模型,设置:仅注射植物油的野生型对照动物(CTRL),注射CCl₄的野生型动物(Cirrhosis),注射CCl₄的PI4KA(编码PI4KIII α)单拷贝缺失的动物(Cirrhosis-PI4KA^{-/+})。然后通过解剖动物观察其肝脏整体形态,通过病理切片和HE染色显微镜下观察其肝脏细胞的变化,以确定动物肝脏病变情况。结果显示,相比CTRL小鼠,Cirrhosis小鼠的肝脏表面变得粗糙而且有颗粒状突起,在病理切片上,肝细胞排列松散,静脉窦附近出现炎症小泡。相比Cirrhosis小鼠,Cirrhosis-PI4KA^{-/+}小鼠的肝脏表面变得更加光滑,而且在病理切片上,肝细胞结构排布都更加紧密,静脉窦附近的炎症小泡数量也都明显减少。该结果说明,在动物体内,下调PI4KIII α 的表达能够抑制肝纤维化过程。这提示可将PI4KIII α 和PI4KIII α 的抑制剂分别作为治疗肝纤维化的新靶点和潜在的治疗药物。

[0029] 基于本发明人的新发现,本发明提供一种经过遗传改造的、不易于发生肝纤维化的动物,该动物中PI4KA发生单拷贝缺失。

[0030] 可以通过基于转座子插入、基因沉默(RNAi)或同源重组的基因敲除技术等来实施PI4KA基因敲除,从而获得基因组中PI4KA单拷贝缺失的动物。

[0031] 本发明还提供了一种用于进行基因敲除的质粒的用途,用于制备抑制肝纤维化或肝硬化的药物。所述的抑制肝纤维化或肝硬化包括:预防、缓解或治疗肝纤维化或肝硬化疾病。

[0032] 具有抑制作用的化合物

[0033] 在经过大量筛选后,本发明还提供了一系列对于原代HSC的 α -SMA或I型胶原的表达具有抑制作用的化合物,具体地,所述的化合物是列于表1中第1~76号的化合物。更为优选的是其中具有“++”或“+++”的化合物;其中“+++”的化合物是最为优选的。

[0034] 本发明还包括上述化合物的异构体、溶剂合物、前体,或它们的药学上可接受的盐,只要它们也具有抑制PI4KIII α 的功能。所述的“药学上可接受的盐”是指化合物与无机酸、有机酸、碱金属或碱土金属等反应生成的盐。这些盐包括(但不限于):(1)与如下无机酸形成的盐:如盐酸、硫酸、硝酸、磷酸;(2)与如下有机酸形成的盐,如乙酸、草酸、丁二酸、酒石酸、甲磺酸、马来酸、或精氨酸。其它的盐包括与碱金属或碱土金属(如钠、钾、钙或镁)形成的盐,以酯、氨基甲酸酯,或其它常规的“前体药物”的形式。化合物具有一个或多个不对称中心。所以,这些化合物可以作为外消旋的混合物、单独的对映异构体、单独的非对映异构体、非对映异构体混合物、顺式或反式异构体存在。

[0035] 所述的“化合物的前体”指当用适当的方法服用后,该化合物的前体在病人体内进行代谢或化学反应而转变成具有本发明所主张的抑制PI4KIII α 活性的化合物。

[0036] 本领域人员应理解,在得知了本发明化合物的结构以后,可通过多种本领域熟知的方法、利用公知的原料,来获得本发明的化合物,比如化学合成或从生物(如动物或植物)中提取的方法,这些方法均包含在本发明中。

[0037] 药物组合物

[0038] 本发明还提供了一种药物组合物,它含有有效量的所述siRNA或化合物,以及药学上可接受的载体。本发明的药物组合物可用于通过抑制PI4KA的表达或活性,预防、缓解或治疗肝纤维化或肝硬化。

[0039] 如本文所用,“药学上可接受的”的成分是适用于人和哺乳动物而无不良副作用(如毒性、刺激和变态反应)的,即具有合理的效益/风险比的物质。术语“药学上可接受的载体”指用于治疗剂给药的载体,包括各种赋形剂和稀释剂。

[0040] 如本文所用,术语“药物组合物”包括(但不限于):药物、饮食补充剂、保健品组合物,只要它们含有本发明的所述siRNA或化合物,作为预防、改善或治疗哺乳动物和人肝纤维化或肝硬化的活性成分。

[0041] 本发明中,术语“含有”表示各种成分可一起应用于本发明的混合物或组合物中。因此,术语“主要由...组成”和“由...组成”包含在术语“含有”中。

[0042] 本发明的药物组合物中药学上可接受的载体,包括(但并不限于):橄榄油、盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油及其组合。通常药物制剂应与给药方式相匹配。所述的药物组合物宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量。

[0043] 本发明所述的药物组合物的剂型可以是多种多样的,只要是能够使活性成分有效地到达哺乳动物或人体内的剂型都是可以的。比如可选自:片剂、胶囊、粉末、颗粒、糖浆、溶液、悬浮液、或气雾剂。

[0044] 在需要的情况下,本发明的药物组合物还可以与其它一种或多种对于糖尿病或代谢综合征有效的物质联合应用。

[0045] 应当理解,本发明不限于这里描述的具体方法,包括采用的试验方案,分析测试方法和试剂等,这些都是可以变化的。

[0046] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不用来限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件如J. 萨姆布鲁克等编著,分子克隆实验指南,第三版,科学出版社,2002中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0047] 材料与方法

[0048] 一、材料

[0049] 1、实验动物

[0050] SPF级小鼠,体重30g左右,由中国南方模式动物中心提供,普通饲料喂养,自由饮食。

[0051] 2、主要试剂和仪器

[0052] 水合氯醛、多聚甲醛(PFA)、磷酸缓冲液(PBS)、乙醇、二甲苯、石蜡、石蜡包埋机、石蜡切片机、包埋盒、展片槽。

[0053] 二、方法

[0054] 1、单拷贝缺失的小鼠($PI4K^{-/+}$)的制备

[0055] 通过以下方法,制备单拷贝缺失的小鼠($PI4K^{-/+}$):

[0056] $PI4KIII\alpha$ 杂合突变($Pi4ka^{Gt(RR0073)Byg/+}$):利用转座子pGT2Lxf插入在PI4KA中(编码PI4KIII α 基因,插入其中会导致该拷贝基因在转录时出现障碍,产生的mRNA仅能翻译PI4KIII α 氨基端的前1~265个氨基酸与报告基因编码的蛋白所组成的融合蛋白)。

[0057] 把 $Pi4ka^{Gt(RR0073)Byg/+}$ 突变杂合子(MMRRC,Cat.#016351-UCD)与C57BL/6野生型小鼠交配,获得野生型(CTRL)、PI4KIII α 突变杂合子($PI4KA^{-/+}$)。

[0058] 2、利用CCl₄辅以乙醇方法构建肝纤维化小鼠

[0059] 取六只30g左右的小鼠作为一组,每组按0.2mL/只腹腔注射20%CCl₄菜籽油溶液7周,每周给药2次,共计14次,同时前两周以10%乙醇溶液作为饮用水;第3~4周改为以20%乙醇溶液作为饮用水,从第5周开始以30%乙醇溶液作为饮用水,直到肝纤维化小鼠构建完成,共诱导7周。试验组小鼠给药时,对照组注射等量生理盐水,给予普通颗粒饲料喂养,正常饮水。

[0060] 野生型小鼠和PI4KA单拷贝缺失小鼠用上述方法构建,分别得到野生型肝纤维化小鼠(Cirrhosis)和PI4KA单拷贝缺失的肝纤维化小鼠(Cirrhosis- $PI4K^{-/+}$)。

[0061] 3、小鼠的解剖和灌流

[0062] 使用0.02ml/g 4%水合氯醛麻醉小鼠,将小鼠躺卧固定到支架上,从小鼠腹腔开始剪开,剪到横膈膜处,小心把横膈膜剪开不要剪破血管,之后将心脏袒露出来,必要可以将肋骨剪开,从心脏左心室扎入针头,同时剪开右心耳,然后注射入20-30mL的PBS置换出小鼠体内的全部血液,观察到小鼠肝脏变白,没有血丝后,再注射20mL 4%PFA的PBS稀释溶液进行固定,取下完整肝脏,在4%PFA溶液中再固定48小时。

[0063] 4、肝脏整体形态的观察

[0064] 完成小鼠解剖和灌流后,取完整肝脏,平置排列在黑色平板上,控制好光线,相机置于正上方进行拍摄观察。

[0065] 5、肝脏的病理切片

[0066] 从小鼠最大肝叶切下50mm X 50mm X 50mm体积大小的肝组织块,放入包埋盒。之后用流水冲洗一个小时,将肝组织的固定液充分洗脱。

[0067] 然后进行脱水包埋过程,将装有肝脏组织块的包埋盒放入60%乙醇I,60%乙醇II,75%乙醇I,75%乙醇II,85%乙醇I,85%乙醇II,95%乙醇I,95%乙醇II,无水乙醇I,无水乙醇II分别浸泡30min,之后放入二甲苯I,二甲苯II分别浸泡5min,最后放入石蜡I中

60min,石蜡Ⅱ中90min。然后打开包埋盒,夹出肝脏组织块用包埋机进行包埋。

[0068] 切片前将蜡块放到-20℃暂时保存,切片时拿出,用石蜡切片切片机进行切片,切出0.4μm的切片。

[0069] 将切好的蜡片,放至装有38℃的水的展片槽中进行展片。展片完成后用干净的玻片进行捞片。最后将玻片放在60℃的烤片器上烤片一个小时。烤片完成后,可常温保存切片,用于之后的实验。

[0070] 6、HE染色

[0071] 将脱蜡入水的组织用Harri苏木素染液室温染色6min,盐酸乙醇溶液5s,伊红染色1min,中性树脂封片。

[0072] 7、大鼠原代肝星状细胞(HSC)分离及培养

[0073] 雄性成年SD大鼠,体重约400g,无菌条件下经戊巴比妥钠麻醉后,门脉插管,以D-Hank's灌注冲洗,同时将肝脏游离;取出肝脏置于无菌培养皿中切碎,去除筋膜等结构,并转入含0.5g/LIV型胶原酶和0.1g/L蛋白酶E的D-Hank's液中,37℃水浴,振荡消化。细胞悬液经过200目细胞筛,离心,DMEM冲洗2-3遍后,180g/L Nycodenz梯度离心,取中间云雾状细胞层,进行细胞计数,以含20%胎牛血清的DMEM培养液调整细胞浓度为以 1×10^5 个/孔的密度接种于无包被的6孔塑料培养板上,置于37℃、体积分数5%CO₂ 95%潮湿空气的CO₂培养箱中培养。24h后培养液更换为含10%胎牛血清的DMEM培养液,之后根据细胞生长情况,每2-3d换液1次。

[0074] 8、PI4KIIIa抑制剂对HSC激活的影响的筛选

[0075] 原代HSC并以 5×10^4 个/孔的密度接种于12孔板,每孔1ml,每组3个复孔;分别以50nmol/L浓度的候选物质(表1)或应用针对PI4KA(编码PI4KIIIa)的siRNA(表2)处理培养第4天的原代HSC,并设置空白对照组,作用72h后收集细胞,提取各组细胞RNA进行分析细胞的汇合度应为40~80%。

[0076] 9、RNA抽提及Real-time PCR分析

[0077] 按Trizol Reagent说明书提取细胞总RNA,紫外分光计检测纯度和定量。cDNA的合成采用20ul逆转录体系,逆转录PCR根据GenBank资料设计引物,用制备的标准品作模板,确定最佳反应体系和反应条件。进行SYBR Green-1荧光定量PCR扩增,一磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作为内参,PCR体系为20ul,包含cDNA2ul,上下游引物(10umol/L)各1ul,SYBR Premix Ex Taq酶10ul,用DEPC水补至20ul。

[0078] 在ABI 7500Real-time PCR仪设置反应程序条件为:预变性95℃30s,1个循环,PCR扩增反应95℃5s,40个循环,60℃34s,40个循环,95℃15s,1个循环。各样品目的基因和内参基因分别进行扩增反应。

[0079] 各样品目的基因和内参基因的扩增曲线及参数扩增反应结束后有机器直接生成。

[0080] GAPDH引物:

[0081] 上游:5' -GAG GAC CAG GTT GTC TCC TG-3' (SEQ ID NO:12);

[0082] 下游:5' -GGA TGG ATT GTG AGG GAG A-3' (SEQ ID NO:13);

[0083] α-SMA引物:

[0084] 上游:5' -GGT GAA ACT CTG GAG ATC CT-3' (SEQ ID NO:14);

[0085] 下游:5' -AAT GGC ATC TGT GTC AAC C-3' (SEQ ID NO:15)。

[0086] 10、统计学处理

[0087] 应用SPSS11.0软件包进行统计学分析,所有数据进行正态性及方差齐性检验,计量资料以 $X \pm SD$ 表示,两组间比较采用t检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

[0088] 实施例1、肝纤维化小鼠的构建

[0089] 为验证PI4KIII α 下调对于肝纤维化的抑制作用,本发明人利用CCl₄的方法构建了小鼠肝纤维化模型。该模型利用CCl₄及乙醇对肝细胞的损伤作用,来强迫小鼠肝脏组织发生肝纤维化病变。在肝损伤持续修复过程中,肝脏的纤维化程度也会持续加强,从而造成肝脏过度纤维化,最终发展成肝硬化。患有肝纤维化的小鼠,其肝细胞受到损害,肝功能出现障碍。通过肝脏的组织切片后观察肝脏的损伤来判断小鼠肝纤维化模型的建立情况。

[0090] 建模完成后,解剖取出对照组野生型小鼠(CTRL)和肝纤维化小鼠(Cirrhosis)的肝脏进行比较,发现CTRL小鼠肝脏表面光滑平整,而Cirrhosis小鼠的肝脏表面粗糙、呈现出颗粒状。

[0091] 分别对两组小鼠进行组织病理切片后,观察发现,CTRL小鼠肝细胞排布紧密规律,静脉窦周围细胞平整饱满,很少出现空泡化炎症;而Cirrhosis小鼠,肝细胞排布松散,并且静脉窦附近会出现一些空泡化的炎症小泡,如图1,而且炎症小泡的数量也明显增加($P < 0.0001$),如图4。

[0092] 上述研究结果表明,利用CCl₄辅以乙醇溶液作为饮用水的方法能够有效地构建小鼠肝纤维化模型。

[0093] 实施例2、下调PI4KIII α 对小鼠肝纤维化的有影响

[0094] 为找到适合于抑制肝纤维化的生物药,本发明人经过大量的筛选,发现下调PI4KIII α 对小鼠肝纤维化有作用。

[0095] 如前述,本发明人构建了Cirrhosis小鼠和Cirrhosis-PI4KA^{-/+},结果发现,Cirrhosis-PI4KA^{-/+}小鼠肝脏的纤维化情况相比于Cirrhosis小鼠发生显著的缓解。

[0096] 从肝脏整体上看,Cirrhosis-PI4KA^{-/+}小鼠的肝脏表面相比于Cirrhosis小鼠的肝脏表面更加光滑,如图2。

[0097] 从病理切片上看,Cirrhosis-PI4KA^{-/+}小鼠的肝脏细胞的排布相比于Cirrhosis小鼠更加规律紧密,如图3。

[0098] 观察静脉窦附近炎症小泡,发现静脉窦附近炎症小泡也明显减少($P = 0.0085$, $P = 0.0006$),如图4。

[0099] 从整体抑制情况来看,PI4KA的单拷贝缺失对于小鼠的肝脏纤维化的发展过程起到了显著的抑制作用。因此,PI4KA的单拷贝缺失能实现对肝纤维化的抑制。

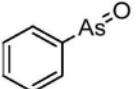
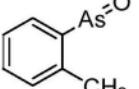
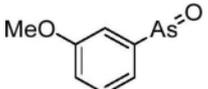
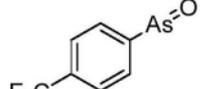
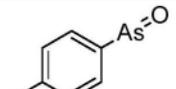
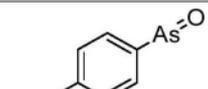
[0100] 实施例3、筛选对原代HSC有抑制作用的化合物或siRNA

[0101] 根据用药后,处理组的 α -SMA的mRNA水平相对与空白对照组的下调程度来确定一些潜在的候选物抑制HSC活化的作用强度。

[0102] 筛选条件:抑制PI4KA的mRNA水平下调程度在 $>70\%$ 、 $30-70\%$ 、 $<30\%$,抑制HSC活化的作用强度分别为+++、++、+。

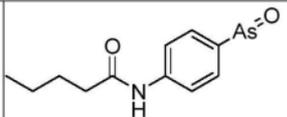
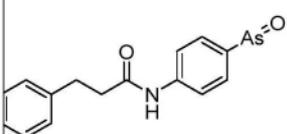
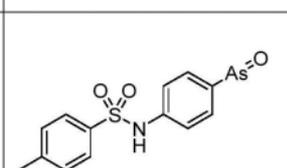
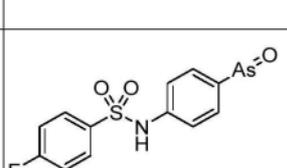
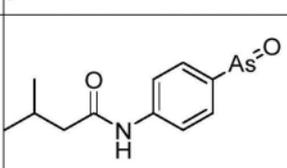
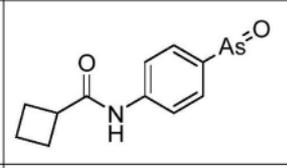
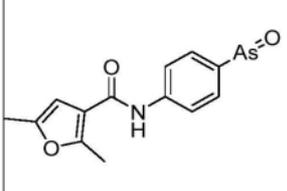
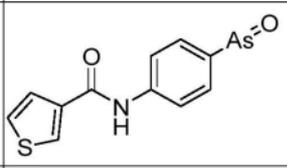
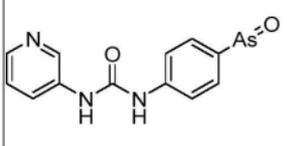
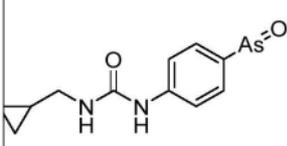
[0103] 针对大量的候选化合物进行筛选后,对原代HSC的PI4KA的表达具有抑制作用的一些化合物列于表1中,这些化合物均能较为显著地抑制PI4KA的mRNA水平,从而可以抑制肝纤维化。

[0104] 表1、候选物及其对原代HSC的抑制作用

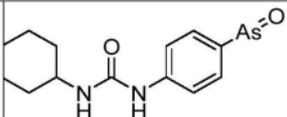
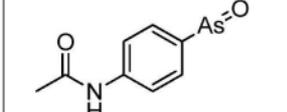
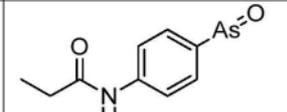
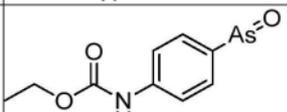
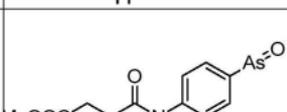
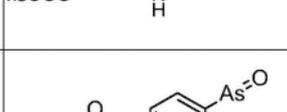
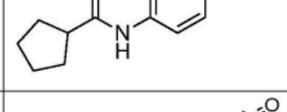
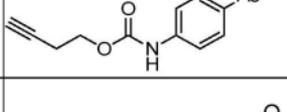
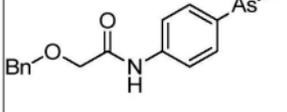
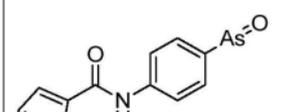
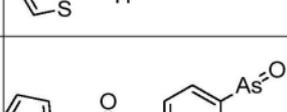
No.	化学式结构/序列	名称	分子量	活性
1		苯基氧化砷(oxo(phenyl)arsane)	168.0	+++
2		邻甲苯基氧化砷(oxo(o-tolyl)arsane)	182.1	++
3		3-甲氧基苯基氧化砷 ((3-methoxyphenyl)(oxo)arsane)	198.15	+
4		4-三氟甲基苯基氧化砷 (oxo(4-(trifluoromethyl)phenyl)arsane)	236.0	++
5		4-氟苯基氧化砷 ((4-fluorophenyl)(oxo)arsane)	186.0	++
6		4-氧化砷基苯胺(4-(oxoarsanyl)aniline)	183.0	++

[0105]

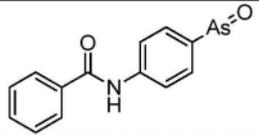
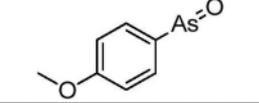
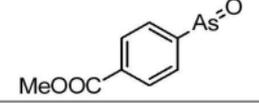
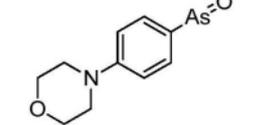
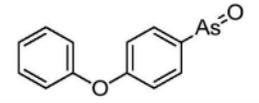
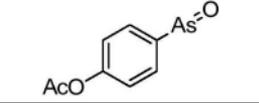
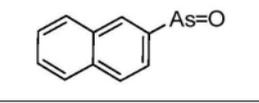
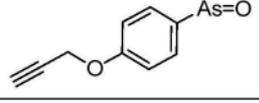
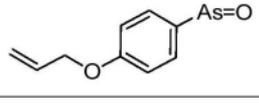
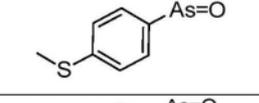
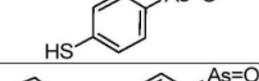
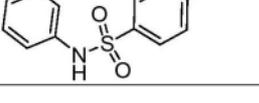
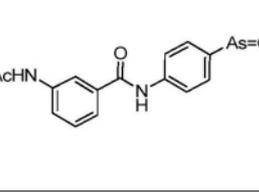
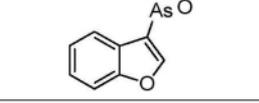
[0106]

7		N-(4-氧化砷基苯基)戊酰胺 (N-(4-(oxoarsanyl)phenyl)pentanamide)	267.2	+
8		N-(4-氧化砷基苯基)-3-苯基丁酰胺 (N-(4-(oxoarsanyl)phenyl)-3-phenylpropanamide)	315.2	+
9		4-甲基-N-(4-氧化砷基苯基)苯磺酰胺 (4-methyl-N-(4-(oxoarsanyl)phenyl)benzenesulfonamide)	337.2	+
10		4-氟-N-(4-氧化砷基苯基)苯磺酰胺 (4-fluoro-N-(4-(oxoarsanyl)phenyl)benzenesulfonamide)	341.2	+
11		3-甲基-N-(4-氧化砷基苯基)丁酰胺 (3-methyl-N-(4-(oxoarsanyl)phenyl)butanamide)	267.2	+
12		N-(4-氧化砷基苯基)环丁基甲酰胺 (N-(4-(oxoarsanyl)phenyl)cyclobutanecarboxamide)	265.1	+
13		2,5-二甲基-N-(4-氧化砷基苯基)呋喃-3-甲酰胺 (2,5-dimethyl-N-(4-(oxoarsanyl)phenyl)furan-3-carboxamide)	305.2	+
14		N-(4-氧化砷基苯基)噻吩-3-甲酰胺 (N-(4-(oxoarsanyl)phenyl)thiophene-3-carboxamide)	293.2	+
15		1-(4-氧化砷基苯基)-3-(3-吡啶基)脲 (1-(4-(oxoarsanyl)phenyl)-3-(pyridin-3-yl)urea)	303.2	+
16		1-(环丙基甲基)-3-(4-氧化砷基苯基)脲 (1-(cyclopropylmethyl)-3-(4-(oxoarsanyl)phenyl)urea)	280.2	+

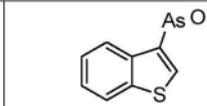
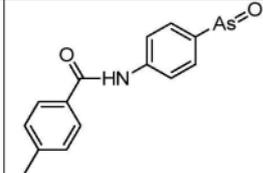
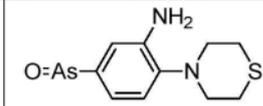
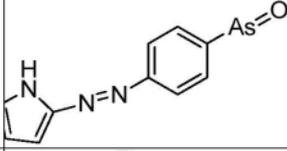
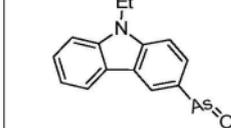
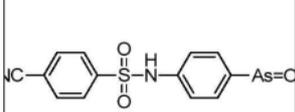
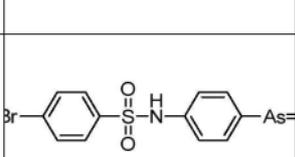
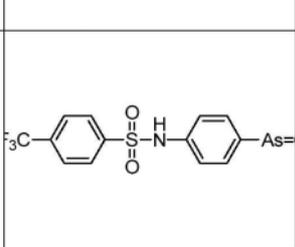
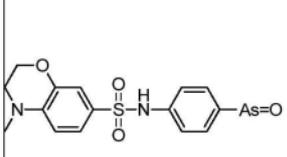
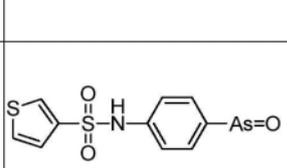
[0107]

17		1-环己基-3-(4-氧化砷基苯基)脲 (1-cyclohexyl-3-(4-(oxoarsanyl)phenyl)urea)	308.2	+
18		N-(4-氧化砷基苯基)乙酰胺 (N-(4-arsorylphenyl)acetamide)	225.0	+
19		N-(4-氧化砷基苯基)丙酰胺 (N-(4-arsorylphenyl)propionamide)	239.0	+
20		(4-氧化砷基苯基)氨基甲酸乙酯 (ethyl(4-arsorylphenyl)carbamate)	255.0	+
21		4-((4-氧化砷基苯基)氨基)-4-氧化丁酸甲酯 (methyl 4-((4-arsorylphenyl)amino)-4-oxobutanoate)	297.0	+
22		N-(4-氧化砷基苯基)环戊酰胺 (N-(4-arsorylphenyl)cyclopentanecarboxamide)	279.0	+
23		(4-氧化砷基苯基)氨基甲酸-3-丁炔-1-酯 (but-3-yn-1-yl (4-arsorylphenyl)carbamate)	279.0	+
24		N-(4-氧化砷基苯基)-2-苄氧基乙酰胺 (N-(4-arsorylphenyl)-2-(benzyloxy)acetamide)	331.0	+
25		N-(4-氧化砷基苯基)噻吩-2-甲酰胺 (N-(4-arsorylphenyl)thiophene-2-carboxamide)	292.9	+
26		N-(4-氧化砷基苯基)-2-(噻吩-2-基)乙酰胺 (N-(4-arsorylphenyl)-2-(thiophen-2-yl)acetamide)	307.0	+
27		N-(4-氧化砷基苯基)呋喃-2-甲酰胺 (N-(4-arsorylphenyl)furan-2-carboxamide)	277.0	+

[0108]

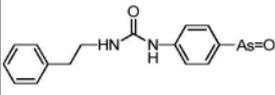
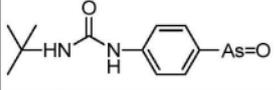
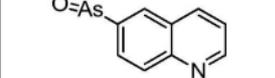
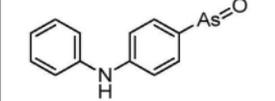
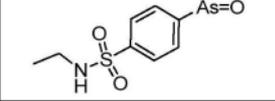
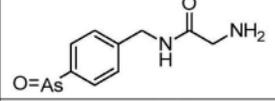
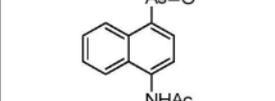
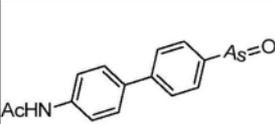
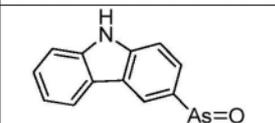
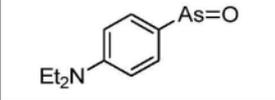
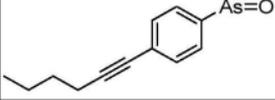
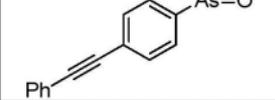
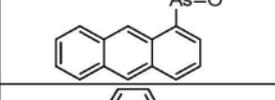
28		N-(4-氧化砷基苯基)苯甲酰胺 (N-(4-arsorylphenyl)benzamide)	287.0	++
29		4-甲氧基苯基氧化砷 ((4-methoxyphenyl)(oxo)arsine)	198.0	++
30		4-氧化砷基苯甲酸甲酯 (methyl 4-arsorylbenzoate)	226.0	+
31		4-(4-氧化砷基苯基)吗啉 (4-(4-arsorylphenyl)morpholine)	253.0	+
32		4-苯氧基苯基氧化砷 (oxo(4-phenoxyphenyl)arsine)	260.0	+
33		4-氧化砷基苯基乙酸酯 (4-arsorylphenyl acetate)	226.0	++
34		萘-2-基氧化砷 (naphthalen-2-yl(oxo)arsine)	218.0	++
35		4-(2-丙炔-1-氧基)苯基氧化砷 (oxo(4-(prop-2-yn-1-yloxy)phenyl)arsine)	222.0	+
36		4-(2-丙烷-1-氧基)苯基氧化砷 (oxo(4-(prop-2-en-1-yloxy)phenyl)arsine)	224.0	+
37		4-甲硫基苯基氧化砷 ((4-(methylthio)phenyl)(oxo)arsine)	213.9	+
38		4-氧化砷基苯硫酚(4-arsorylbenzenethiol)	199.9	+
39		4-氧化砷基-N-苯基苯磺酰胺 (4-arsoryl-N-phenylbenzenesulfonamide)	323.0	+
40		3-乙酰胺基-N-(4-氧化砷基苯基)苯甲酰胺 (3-acetamido-N-(4-arsorylphenyl)benzamide)	344.0	+
41		苯并呋喃-3-基氧化砷 (benzofuran-3-yl(oxo)arsine)	208.0	+

[0109]

42		苯并[b]噻吩-3-基氧化砷 (benzo[b]thiophen-3-yl(oxo)arsine)	224.0	+
43		N-(4-氧化砷基苯基)-4-甲基苯甲酰胺 (N-(4-arsorylphenyl)-4-methylbenzamide)	301.0	+
44		5-氧化砷基-2-硫代吗啉基苯胺 (5-arsoryl-2-thiomorpholinoaniline)	284.0	+
45		2-(4-氧化砷基苯基偶氮基)-1H-吡咯 (2-((4-arsorylphenyl)diazenyl)-1H-pyrrole)	261.0	+
46		3-氧化砷基-9-乙基-9H-咔唑 (3-arsoryl-9-ethyl-9H-carbazole)	285.0	+
47		N-(4-氧化砷基苯基)-4-腈基苯磺酰胺 (N-(4-arsorylphenyl)-4-cyanobenzenesulfonamide)	335.9	+
48		N-(4-氧化砷基苯基)-4-溴代苯磺酰胺 (N-(4-arsorylphenyl)-4-bromobenzenesulfonamide)	400.9	+
49		N-(4-氧化砷基苯基)-4-(三氟代甲基)苯磺酰胺 (N-(4-arsorylphenyl)-4-(trifluoromethyl)benzenesulfonamide)	300.9	+
50		N-(4-氧化砷基苯基)-4-甲基-3,4-二氢化苯并[b]-2H-1,4-恶嗪-7-磺酰胺 (N-(4-arsorylphenyl)-4-methyl-3,4-dihydro-2H-benzo[b][1,4]oxazine-7-sulfonamide)	394	+
51		N-(4-氧化砷基苯基)噻吩-3-磺酰胺 (N-(4-arsorylphenyl)thiophene-3-sulfonamide)	328.9	+

[0110]

52		N-(4-氧化砷基苯基)-3,5-二甲基异恶唑-4-磺酰胺 (N-(4-arsorylphenyl)-3,5-dimethylisoxazole-4-sulfonamide)	342.0	+
53		N-(4-氧化砷基苯基)-正丁基-1-磺酰胺 (N-(4-arsorylphenyl)butane-1-sulfonamide)	303.0	+
54		N-(4-氧化砷基苯基)-4-硝基苯磺酰胺 (N-(4-arsorylphenyl)-4-nitrobenzenesulfonamide)	367.9	+
55		N-(4-氧化砷基苯基)-4-甲氧基苯磺酰胺 (N-(4-arsorylphenyl)-4-methoxybenzenesulfonamide)	353.0	+
56		1-(4-氧化砷基苯基)-3-(3-腈基苯基)脲 (1-(4-arsorylphenyl)-3-(3-cyanophenyl)urea)	327.0	+
57		1-(4-氧化砷基苯基)-3-(2-氟代苯基)脲 (1-(4-arsorylphenyl)-3-(2-fluorophenyl)urea)	320.0	+
58		1-(4-氧化砷基苯基)-3-(4-甲氧基苯基)脲 (1-(4-arsorylphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)urea)	332.0	+
59		1-(4-氧化砷基苯基)-3-丙基脲 (1-(4-arsorylphenyl)-3-propylurea)	368.0	+
60		1-(4-氧化砷基苯基)-3-(2-溴代乙基)脲 (1-(4-arsorylphenyl)-3-(2-bromoethyl)urea)	331.9	+
61		1-烯丙基-3-(4-氧化砷基苯基)脲 (1-allyl-3-(4-arsorylphenyl)urea)	266.0	+
62		1-(4-氧化砷基苯基)-3-苯基脲 (1-(4-arsorylphenyl)-3-benzylurea)	316.0	+

63		1-(4-氧化砷基苯基)-3-苯乙基脲 (1-(4-arsorylphenyl)-3-phenethylurea)	330.0	+
64		1-(4-氧化砷基苯基)-3-叔丁基脲 (1-(4-arsorylphenyl)-3-(tert-butyl)urea)	282.0	+
65		6-氧化砷基喹啉(6-arsorylquinoline)	219.0	+
66		4-氧化砷基二苯胺 (4-arsoryl-N-phenylaniline)	259.0	+
67		4-氧化砷基-N-乙基苯磺酰胺 (4-arsoryl-N-ethylbenzenesulfonamide)	275.0	+
68		2-氨基-N-(4-氧化砷基苄基)乙酰胺 (2-amino-N-(4-arsorylbenzyl)acetamide)	254.0	+
69		N-(4-氧化砷基萘-1-基)乙酰胺 (N-(4-arsorylnaphthalen-1-yl)acetamide)	275.0	+
70		N-(4'-氧化砷基-[1,1']联二苯-4-基)乙酰胺 (N-(4'-arsoryl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)acetamide)	301.0	+
71		3-氧化砷基-9H-咔唑 (3-arsoryl-9H-carbazole)	257.0	+
72		4-氧化砷基-N,N-二乙基苯胺 (4-arsoryl-N,N-diethylaniline)	239.0	+
73		(4-(1-己炔-1-基)苯基)氧化砷 (4-(1-hex-1-yn-1-yl)phenyl)(oxo)arsine)	248.0	+
74		(4-苯乙炔基苯基)氧化砷 (oxo(4-(phenylethynyl)phenyl)arsine)	268.0	+
75		蒽-1-基氧化砷(anthracen-1-yl(oxo)arsine)	268.0	++
76		1,4-二(氧化砷基)苯(1,4-diarsorylbenzene)	257.9	++

[0112] 本发明人还合成了大量的siRNA,以确定抑制效果理想的siRNA。经过分析比较,对原代HSC的PI4KA的表达具有抑制作用的siRNA列于表2中。

[0113] 表2、候选物及其对原代HSC的抑制作用

SEQ ID NO:	针对人源 PI4KA mRNA 的序列 (5'→3')	活性
1	AAGGACCACGGCTATAGGCAT	+
2	AAGCTAAGCCTCGGTTACAGA	+
3	AAGGTGTTTCGAAGGCGTTCCT	+
4	AACATCCAAGACGAGCACCTG	+++
[0114] 5	AACCTTTGCATCAAGCTATCT	+
6	AAGCGATGTGGAGTTAGTGAA	++
7	AACCTGGACATAACTGTCGGC	+
8	AAGGCGACGAGAGAAAGAAGG	+
9	AAGAAGCTAAGCCTCGGTTAC	+
10	TGCTCATTAGCAGTAAAGA	++
11	AAGGCTGGATCAACACATACC	+

[0115] 表2中的siRNA均能较为显著地抑制PI4KA的mRNA水平,从而可以抑制肝纤维化。其中,以SEQ ID NO:4的siRNA最佳,SEQ ID NO:4的siRNA次之。

[0116] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 中国科学院上海高等研究院
- [0003] <120> 抑制肝纤维化的试剂及应用
- [0004] <130> 172499
- [0005] <160> 15
- [0006] <170> PatentIn version 3.3
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 21
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 智人
- [0011] <400> 1
- [0012] aaggaccacg gctataggca t 21
- [0013] <210> 2
- [0014] <211> 21
- [0015] <212> DNA
- [0016] <213> 智人
- [0017] <400> 2
- [0018] aagctaagcc tcggttacag a 21
- [0019] <210> 3
- [0020] <211> 21
- [0021] <212> DNA
- [0022] <213> 智人
- [0023] <400> 3
- [0024] aaggtgttcg aagcgttcc t 21
- [0025] <210> 4
- [0026] <211> 21
- [0027] <212> DNA
- [0028] <213> 智人
- [0029] <400> 4
- [0030] aacatccaag acgagcacct g 21
- [0031] <210> 5
- [0032] <211> 21
- [0033] <212> DNA
- [0034] <213> 智人
- [0035] <400> 5
- [0036] aacctttgca tcaagctatc t 21
- [0037] <210> 6
- [0038] <211> 21

- [0039] <212> DNA
[0040] <213> 智人
[0041] <400> 6
[0042] aagcgatgtg gagttagtga a 21
[0043] <210> 7
[0044] <211> 21
[0045] <212> DNA
[0046] <213> 智人
[0047] <400> 7
[0048] aacctggaca taactgtcgg c 21
[0049] <210> 8
[0050] <211> 21
[0051] <212> DNA
[0052] <213> 智人
[0053] <400> 8
[0054] aaggcgacga gagaaagaag g 21
[0055] <210> 9
[0056] <211> 21
[0057] <212> DNA
[0058] <213> 智人
[0059] <400> 9
[0060] aagaagctaa gcctcggtta c 21
[0061] <210> 10
[0062] <211> 19
[0063] <212> DNA
[0064] <213> 智人
[0065] <400> 10
[0066] tgctcattag cagtaaaga 19
[0067] <210> 11
[0068] <211> 21
[0069] <212> DNA
[0070] <213> 智人
[0071] <400> 11
[0072] aaggctggat caacacatac c 21
[0073] <210> 12
[0074] <211> 20
[0075] <212> DNA
[0076] <213> 引物
[0077] <400> 12

[0078] gaggaccagg ttgtctcctg 20
[0079] <210> 13
[0080] <211> 19
[0081] <212> DNA
[0082] <213> 引物
[0083] <400> 13
[0084] ggatggattg tgagggaga 19
[0085] <210> 14
[0086] <211> 20
[0087] <212> DNA
[0088] <213> 引物
[0089] <400> 14
[0090] ggtgaaactc tggagatcct 20
[0091] <210> 15
[0092] <211> 19
[0093] <212> DNA
[0094] <213> 引物
[0095] <400> 15
[0096] aatggcatct gtgtcaacc 19

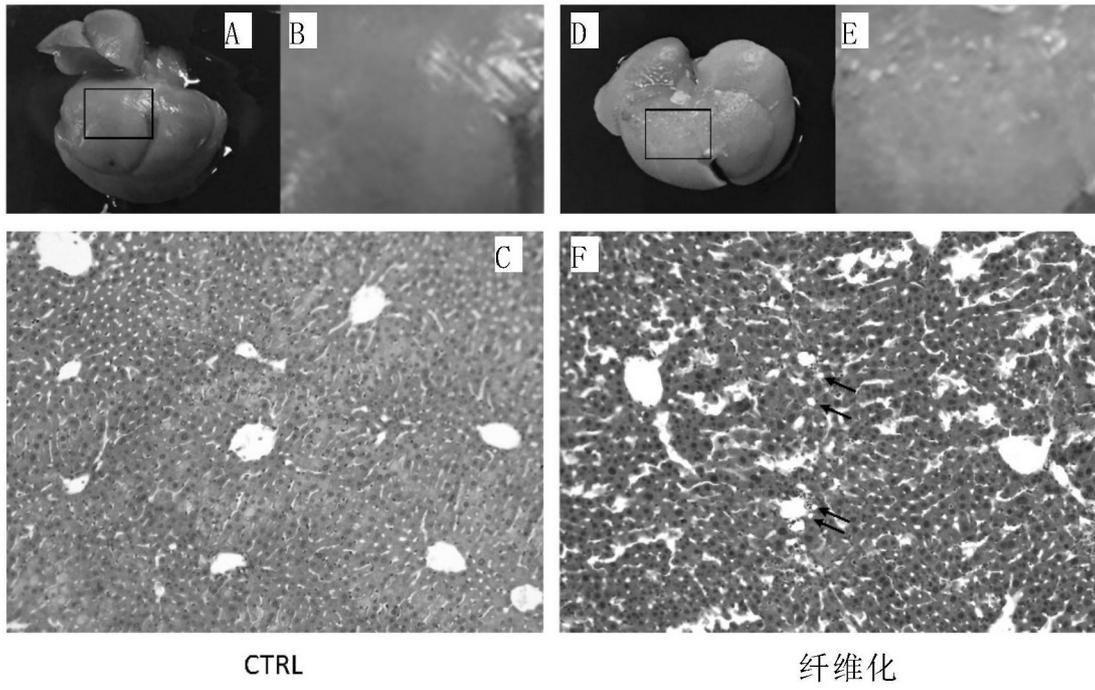


图1

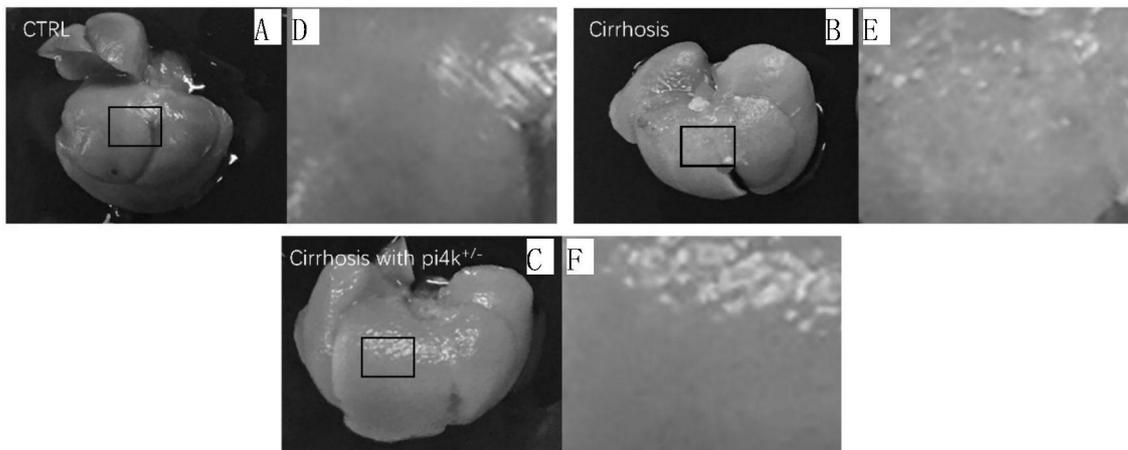


图2

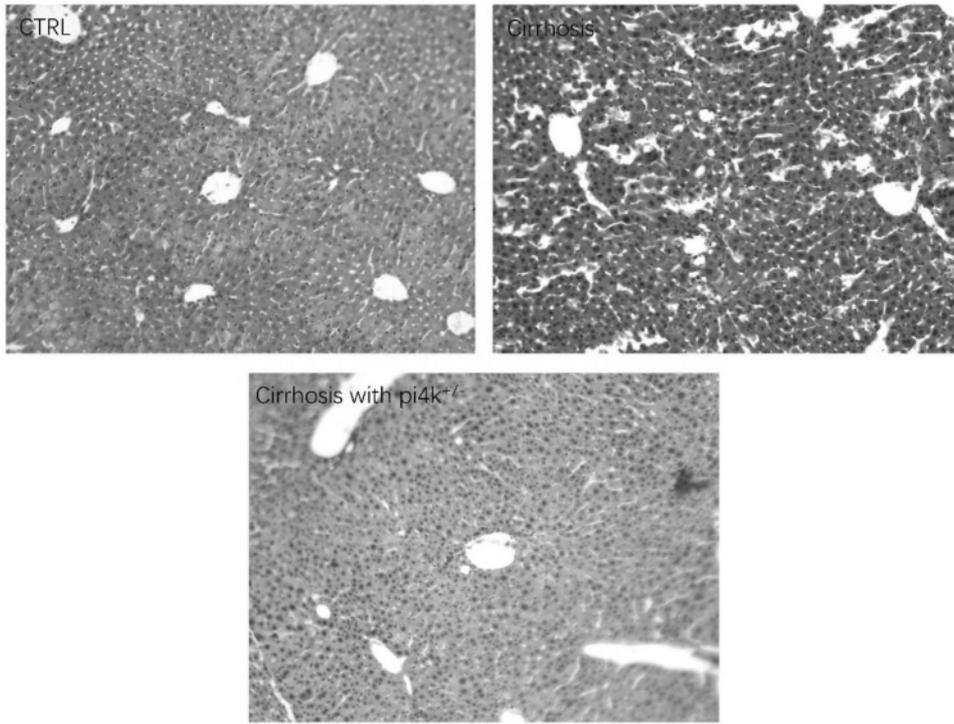


图3

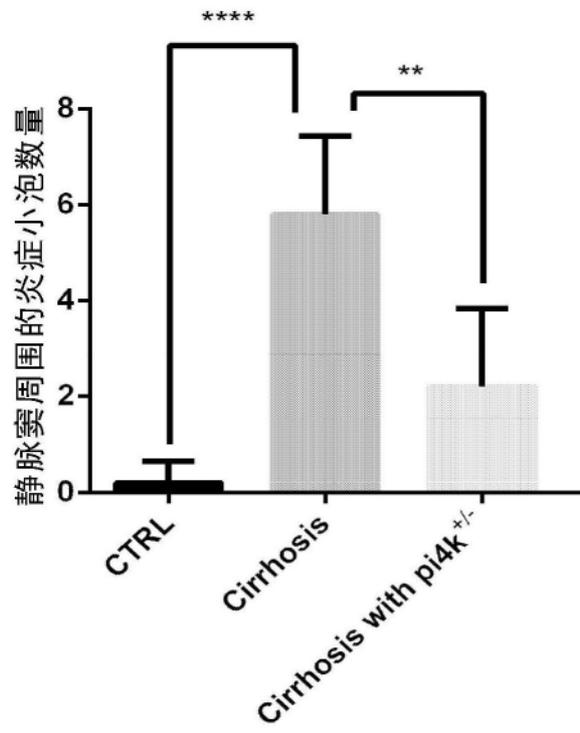


图4