

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2019 年 5 月 16 日 (16.05.2019)



(10) 国际公布号
WO 2019/091397 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 31/7034 (2006.01) *A61P 1/16* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2018/114329
- (22) 国际申请日: 2018 年 11 月 7 日 (07.11.2018)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201711085577.7 2017 年 11 月 7 日 (07.11.2017) CN
- (71) 申请人: 南京大学 (NANJING UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国江苏省南京市鼓楼区汉口路
22 号, Jiangsu 210093 (CN)。
- (72) 发明人: 薛斌 (XUE, Bin); 中国江苏省南京市
鼓楼区汉口路 22 号, Jiangsu 210093 (CN)。 李

朝军 (LI, Chaojun); 中国江苏省南京市鼓楼区
汉口路 22 号, Jiangsu 210093 (CN)。 齐雅玲
(QI, Yaling); 中国江苏省南京市鼓楼区汉口
路 22 号, Jiangsu 210093 (CN)。

(74) 代理人: 南京经纬专利商标代理有限公司
(NANJING JINGWEI PATENT & TRADEMARK
AGENCY CO., LTD); 中国江苏省南京市鼓楼区中
山路 179 号 12 楼 B 座, Jiangsu 210005 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS,
JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,

(54) Title: USE OF AZIDO PHLORIZIN IN PREPARATION OF MEDICAMENT FOR TREATING NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER

(54) 发明名称: 叠氮根皮苷素在制备治疗非酒精性脂肪肝药物中的用途

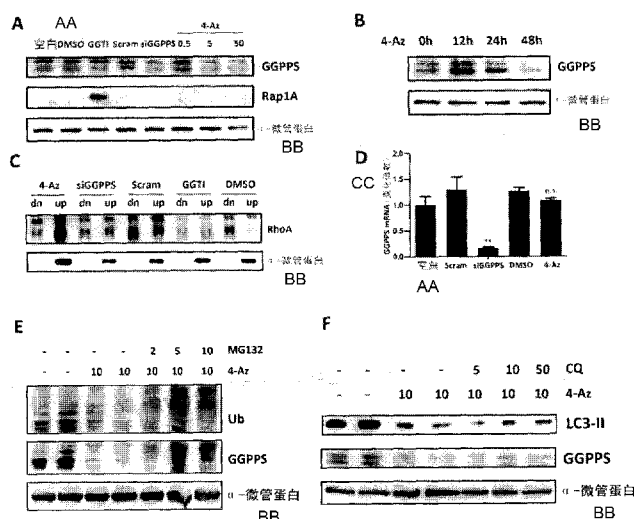


图 1

AA Blank
BB α-microtubulin
CC GGPPS mRNA (variation factor)

(57) Abstract: The present invention discloses a use of azido phlorizin (4-Az) as a key branching enzyme GGPPS inhibitor in a mevalonate pathway, especially in the preparation of a medicament for treating non-alcoholic fatty liver. Through a series of experiments, the present invention has proved that 4-Az can cause ubiquitination-proteasome pathway-dependent degradation of GGPPS protein, has an inhibitory effect on GGPPS protein expression, and can be used as an inhibitor of GGPPS protein expression. More specifically, the azido phlorizin of the present invention can reduce lipid accumulation and fatty degeneration in the liver, and can reduce levels

MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。

of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in the blood, can actively protect liver function, and can be used for the preparation of a medicament for treating non-alcoholic fatty liver.

(57) 摘要: 本发明公开了叠氮化根皮苷(4-Az)作为甲羟戊酸途径中关键分支酶GGPPS抑制剂的用途, 尤其在制备治疗非酒精性脂肪肝药物中的用途。本发明通过系列实验, 证明4-Az可造成GGPPS蛋白质发生泛素化-蛋白酶体通路依赖的降解, 对GGPPS蛋白质表达具有抑制作用, 可以作为GGPPS蛋白质表达的抑制剂。更具体地, 本发明的叠氮根皮苷素能降低肝脏的脂质堆积和脂肪变性, 并可以降低血液中谷丙转氨酶和谷草转氨酶的水平, 具有保护肝功能的活性, 可以用于制备治疗非酒精性脂肪肝的药物。

叠氮根皮苷素在制备治疗非酒精性脂肪肝药物中的用途

技术领域

本发明属于医药领域，具体涉及叠氮化根皮苷素在制备治疗非酒精性脂肪肝药物中的用途。叠氮化根皮苷素可以降低肝脏的脂质积累，对治疗非酒精性脂肪肝有显著作用。

背景技术

非酒精性脂肪肝病是指除酒精以外的其他因素导致的肝细胞内脂肪过度沉积，其发展过程一般包括肝脏的单纯性脂肪变性、脂肪性肝炎、肝纤维化等病变，严重的会产生肝硬化，肝脏衰竭甚至肝癌。该病的患病率在全球范围内持续增加，与肥胖症的增加成平行关系，日趋成为严重的公共卫生问题。

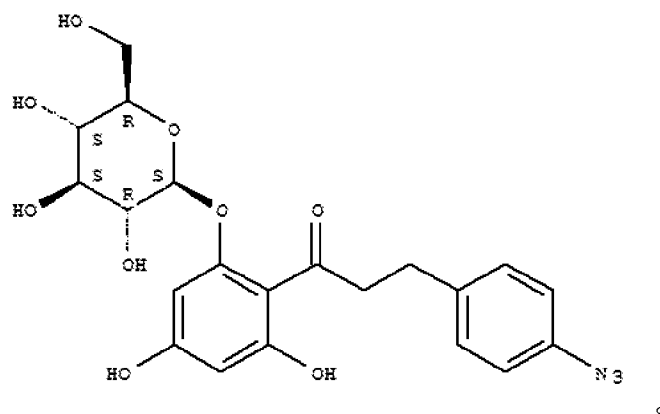
非酒精性脂肪肝病是遗传-环境-代谢-应激等多重因素共同作用的结果，与胰岛素抵抗、高血糖及高血脂等代谢综合征密切相关。目前众多国际指南关于早期非酒精性脂肪肝病的治疗策略主要集中在改变生活方式，以及防治伴随的代谢、心血管并发症。但是发展到后期，必须要采用针对肝脏的药物治疗，阻止肝病进展，减少或预防肝硬化肝癌及其并发症的发生。

甲羟戊酸途径（mevalonate pathway, MVA pathway）是细胞代谢通路中的一个重要途径。在甲羟戊酸途径中，首先乙酰辅酶 A 通过 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 合成酶的作用下生成 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A，然后在 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶的作用下生成甲羟戊酸。途径的产物可以看作是活化的异戊二烯单位，是类固醇、类萜等生物分子的合成前体。这其中的代谢中间产物如法尼基焦磷酸盐（farnesyl diphosphate, FPP）及香叶基香叶基焦磷酸盐（geranylgeranyl diphosphate, GGPP），也是合成胆固醇、萜类和萜类化合物的重要底物，在多种生理过程中都占据重要地位。甲羟戊酸途径中的关键分支酶香叶基香叶基焦磷酸合成酶（Geranylgeranyl Diphosphate Synthase, GGPPS）能够催化法尼基焦磷酸生成香叶基香叶基焦磷酸，介导蛋白质异戊二烯化的平衡，通过对体内蛋白质异戊二烯化的调控影响肝脏糖脂代谢，参与非酒精性脂肪肝以及 2 型糖尿病的发生与发展。研究表明，GGPPS 通过调控 MAPK/PI3K/AKT 信号通路的相对活化，参与高胰岛素状态下胰岛素抵抗的形成；GGPPS 调控的蛋白质异戊二烯化修饰促进了脂肪酸诱导的肌肉胰岛素抵抗的发生；GGPPS 通过调控

体内 FPP/GGPP 的比例参与调控肝脏的脂质代谢。在非酒精性脂肪肝疾病中, GGPPS 可通过调控体内 FPP/GGPP 的比例参与调控肥胖诱发的肝脏脂肪的变性, 故此敲除 GGPPS 基因能够有效的缓解非酒精性脂肪肝的形成, 因此提出以 GGPPS 为靶点来筛选非酒精性脂肪肝有效治疗药物。

经 GGPPS 竞争性结合抑制剂 DGBP (Digeranyl Bisphosphonate) 处理的高脂诱导非酒精性脂肪肝小鼠, 其肝脏脂质积累得到有效抑制。由于 DGBP 具有较大的毒副作用, 使得其针对非酒精性脂肪肝病的病情控制较为局限。

叠氮化根皮苷是一种苹果、苹果树皮及叶中存在的酚类物质类似物。根皮苷是从苹果、苹果树皮及叶等中提取而得, 它是苹果树体内的酚类物质。叠氮化根皮苷素 (4-Azidophlorizin, 4-Az) 是根皮苷素的一种衍生物, 具有如下化学结构式:



式 I

叠氮化根皮苷素曾被报道作为肾脏表达的钠-葡萄糖协同转运蛋白 2 (sodium-dependent glucose transporters 2, SGLT-2) 抑制剂, 可以抑制肾脏对葡萄糖的重吸收, 但是尚未有研究显示 4-Az 是否具有促进 GGPPS 蛋白质发生降解的作用。叠氮化根皮苷素可以直接靶向结合 GGPPS, 通过泛素化-蛋白酶体途径引发 GGPPS 降解, 从而阻断三磷酸鸟苷酶家族 (GTPase) 参与的多种信号通路的传递, 达到抑制肝脏脂质累积的作用, 但是迄今尚未见将叠氮化根皮苷素用于治疗非酒精性脂肪肝病的报道。

发明内容

有鉴于此, 本发明的目的在于提供叠氮化根皮苷素在医药领域的一种用途, 具体涉及其在制备治疗非酒精性脂肪肝的药物中的用途。

为达上述目的，发明人通过高脂诱导建立非酒精性脂肪肝小鼠模型，并观察叠氮化根皮苷素对非酒精性脂肪肝小鼠体重、肝脏组织脂质代谢与累积、以及肝脏功能的影响。

本发明所述的药物可包含二甲基亚砜、叠氮化根皮苷素及药学上可接受的载剂，所述药物施用方式可为腹腔注射，所述药物施用剂量可为 1-10mg/kg。所述药物施用方式还可为皮下、皮内、动脉内、静脉内、肌内、关节内、滑液内、胸骨内、鞘内、病灶内、颅内注射或输注，口服、局部、直肠、经鼻、经颊、阴道、舌下、皮内、粘膜、气管、尿道给药，通过吸入气雾、植入蓄积及针刺方式给药。

本发明的实施例考察了非酒精性脂肪肝小鼠注射叠氮化根皮苷素后，其体重和肝脏重量的变化以及肝脏脂质堆积的情况。结果显示本发明具有以下有益效果：

(1) 本发明的叠氮化根皮苷素可以有效地降低肝脏的脂质堆积和脂肪变性，并可以降低血液中谷丙转氨酶和谷草转氨酶的水平，具有保护肝功能的活性，因此可以用于制备治疗非酒精性脂肪肝的药物，在非酒精性脂肪肝治疗领域具有潜在、良好的应用前景。

(2) 本发明不仅对于非酒精性脂肪肝的新药研发提供了高水平靶向药物，同时还为由蛋白质异戊二烯化失衡引起的代谢类疾病的个体化诊断及精准医疗提供了新思路。

为进一步证实叠氮化根皮苷素治疗非酒精性脂肪肝的作用和有益效果，发明人在细胞水平上比较了叠氮化根皮苷素和根皮苷素对肝细胞内脂质代谢的作用。结果显示叠氮化根皮苷素对肝细胞内脂质代谢的作用远远显著于根皮苷素。

附图说明：

图 1 显示不同条件下的 GGPPS 表达水平。其中，A 图和 B 图均为 TSC2-null 细胞在 4-Az 处理下 GGPPS 表达量下降；C 图为 4-Az 造成 RhoA 蛋白异戊二烯化的逆转；图 D 为 4-Az 不引起 GGPPS 转录水平的变化；E 图为蛋白酶体抑制剂 MG132 能够逆转 4-Az 造成的 GGPPS 表达下降；F 图为自噬体-溶酶体抑制剂 CQ 不能逆转 4-Az 造成的 GGPPS 表达下降。

图 2 显示 4-Az 对 GGPPS 的抑制降解作用。其中，图 A 显示 4-Az 促进 GGPPS 泛素化累积，从而发生降解。图 B 到图 E 是微量热泳筛选系统，显示 4-Az 与 GGPPS 重组蛋白结合。

图 3 为经不同浓度叠氮化根皮苷素分别连续给药 14 天后，非酒精性脂肪肝小鼠体重及主要脂质代谢组织重量的变化图。其中，A 图表示小鼠在 14 天内的体重变化（隔天给药并监测记录）；B 图表示第 14 天最后一次给药后，小鼠的肝脏重量与体重的比值；C 图表示第 14 天最后一次给药后，小鼠的附睾脂肪重量与体重的比值。

图 4 为经不同浓度叠氮化根皮苷素分别连续给药 14 天后，非酒精性脂肪肝小鼠肝脏内的脂质含量的变化图。其中，A 图为第 14 天最后一次给药后，小鼠的肝脏 CT 扫描图；B 图为第 14 天最后一次给药后，40keV 管电压扫描得到的小鼠肝脏组织密度；C 图为第 14 天最后一次给药后，小鼠肝脏脂质含量。

图 5 为经不同浓度叠氮化根皮苷素分别连续给药 14 天后，非酒精性脂肪肝小鼠的肝脏石蜡切片及 HE 染色后光镜图。其中，A 图为第 14 天最后一次给药后，小鼠的肝脏 HE 染色后光镜图；B 图为 A 图为第 14 天最后一次给药后，小鼠的肝脏甘油三酯含量。

图 6 为经不同浓度叠氮化根皮苷素分别连续给药 14 天后，非酒精性脂肪肝小鼠血液中谷丙转氨酶和谷草转氨酶的含量变化图。其中，A 图为第 14 天最后一次给药后，小鼠血液中谷丙转氨酶的含量；B 图为第 14 天最后一次给药后，小鼠血液中谷草转氨酶的含量。

图 3 至图 6 中的“n.s.”表示无显著性差异；“*”表示 vehicle 组和 4-Az 1mg/kg 组间存在显著性差异， $p < 0.05$ ；“**”表示 vehicle 组和 4-Az 1mg/kg 组间存在显著性差异， $p < 0.001$ ；“#”表示 4-Az 1mg/kg 组和 4-Az 10mg/kg 组间存在显著性差异， $p < 0.05$ ；“##”表示 4-Az 1mg/kg 组和 4-Az 10mg/kg 组间存在显著性差异， $p < 0.001$ 。

具体实施方式

下面结合附图和实施例对本发明作进一步详细的说明。以下实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明范围。实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，例如《分子克隆实验指南》（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

叠氮化根皮苷素对 GGPPS 蛋白质表达的抑制作用

一般材料和方法

材料：pET28a 重组质粒及表达载体由公司构建，目的基因插在 NcoI 与 BamI

酶切位点之间，克隆入 GGPPS-EGFP-His 基因，以利于外源蛋白 GGPPS 的绿色荧光激发。大肠杆菌 BL21 为公司购买并保存。TSC2-null 细胞由美国实验室惠赠。质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒和 PCR 产物纯化试剂盒购自 Axygen 公司。CaCl₂、LB 培养液、甘油、诱导剂 IPTG、镍（Ni）柱平衡缓冲液、洗杂缓冲液及洗脱缓冲液所用试剂 Tris、NaCl、咪唑，购于美国 sigma 试剂公司及中国索莱宝试剂公司。甲醇，乙醇，丙醇，异丙醇，氯仿，多聚甲醛，二甲苯，甲醛，氨水等普通有机试剂，购自南京化学试剂公司。DMSO, HEPES, TEMED, TWEEN-20, NP40，双氧水等购自上海生工公司。四型胶原酶，胰酶购自 Gibco 公司。蛋白酶抑制剂 cocktail, BSA, SDS, GGPP, FPP, STA-21 等购自 Sigma 公司。GGPPS, Ub 抗体购自 Santa Cruz 公司。PVDF 膜购自 Roche 公司。Ni-IDA Resin、GST-Resin、层析柱、Ni 柱亲和填料、购自江苏溥博生物科技有限公司。超速离心机购自 Beckman 公司。低温离心机购自 Kubota 公司。Western Blot 系统购自天能公司。

方法 1、TSC2-null 细胞的培养

TSC2-null 在含有 10% 小牛血清的 DMEM 培养液中生长，90% 的高糖 DMEM+10%FBS 培养基培养，0.25% 胰酶，PBS，DMSO。放置在 5%CO₂，95% 空气，37 度的培养箱中培养。注意培养基中 PH 值的变化情况，定期进行换液，待细胞密度达到 70%-80% 时重复传代操作或者冻存。

方法 2、siRNA 细胞转染

培养 TSC2-null 细胞（60mm 培养皿）至细胞融合率 60% 以上时进行转染。根据 Invitrogen 公司 LipofectamineTM 2000 转染操作说明书，在无菌管内将 10ul siRNA 与 500ulOPTI 培养基中轻轻混匀。将 10ul LipofectamineTM 2000 稀释于 500ulOPTI 培养基中，室温静置 5min，随后轻轻混合上述两种溶液，使得脂质体 lipo 包裹住质粒，在室温孵育 20min。随后进行质粒转染。转染 48h 后即可收集细胞进行采样。

方法 3、细胞蛋白的提取

细胞培养至所需时间时，弃去培养液，用预 PBS（pH7.4）洗涤单层细胞 2 次，然后加入适量含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液裂解细胞，裂解产物于 100℃加热 10 分钟，13000rpm 离心去除细胞碎片，取上清，保存于 -20℃或 -70℃。

方法 4、RNA 抽提及 Real time PCR

单层贴壁细胞培养预定时间后，弃去培养液。用 PBS 洗涤单层细胞（35mm 培养皿），加入 1mL Trizol Reagent，立即用移液器吹打使其彻底混匀。细胞脱壁后，将裂解液移入离心管中，室温静置 5 分钟。加 0.2mL 氯仿，充分混匀后室温静置 15 分钟，离心 4℃，12000g×10 分钟。小心吸取上清，加入等体积异丙醇，混匀后室温静置 10 分钟，离心 4℃，12000g×10 分钟。弃上清，沉淀用 75% 乙醇洗涤 2 次，室温自然干燥。用无 RNA 酶水溶解，-80℃冰箱冻存。设计引物，以逆转录产物为模板，用上、下游引物 PCR 扩增目的片段。根据 CT 值计算 mRNA 的相对量。以 18S 作为内参定量，计算其它时间点相对于诱导前的表达量。

蛋白免疫印迹实验

制备电泳凝胶，进行 SDS-PAGE。电泳时间一般 4~5 h，首先进行 80V 预电泳，待样品跑至分离胶改电压为 120V。电泳至溴酚兰刚跑出即可终止电泳，进行转膜。按滤纸—凝胶—PVDF 膜—滤纸顺序叠放，凝胶靠近负极，膜朝向正极，除尽各层之间气泡。用相应的抗体进行免疫印迹反应，第一抗体稀释度和反应条件如下： α -Tubulin（1:1000）、GGPPS（1:200）、Rap1A（1:200）、RhoA（1:200）4℃过夜孵育 12-16 小时，PBS 每次 10min 洗膜 3 次，HRP 标记的荧光二抗室温孵育 2 小时，PBS 每次 5min 洗膜 6 次。洗涤干净后进行化学发光，曝光显影留存。

原核蛋白的表达与纯化

将含有目的基因的重组质粒的 BL-21 菌株大规模培养，表达的目的蛋白上带有 His 标签，上样速度 2mL/min，同时收集穿透样品，用于后续的制样跑胶，以确定是否目的蛋白都挂柱；上样结束后，用 Ni 柱洗杂缓冲液 buffer W 清洗未与 Ni 柱结合的杂蛋白，用 Ni 柱洗脱缓冲液 buffer B，3mL/min，洗脱与 Ni 柱结合的目的蛋白，观察 280nm 吸收峰的变化，适时在出样口处收集洗脱蛋白，将收集的洗脱目的蛋白注入透析卡内，并将透析卡放入含有 10%甘油的 PBS 缓冲液中，4℃放置 12h，随后配制 1L 的 PBS（不含甘油），透析卡放入其中，4℃放置 12h。制备出的原核纯化蛋白 GGPPS-EGFP-His 部分避光放置于 4℃以备后续试验，部分冻存于-80℃长期保存。

微量热泳动实验鉴定结合

微量热泳动 (Microscale Thermophoresis, MST) 是一项基于物理原理近年来应用于生物分析的荧光显色定量技术。可通过测量分子在微温度梯度下的运动变化, 监测分子水合壳、电性或大小的变化。使用该技术, 可快速监测从离子或片段结合到大型复合物 (脂质体和核糖酸) 在内的多种生物分子之间的相互作用。

将制备出的原核纯化蛋白 GGPPS-EGFP-His 作为大分子配体, 以 GGPPS 的小分子底物 FPP 作为 GGPPS 结合筛选模型的阳性检测物质。同时以 4-Az 作为待检测化合物。试验前, 使用离心方式进行搅拌 (5 分钟, 13000 转/分, 4°C)。使用 Tween 20 (0.01 % - 0.1 %) 作为清除原始聚合的清洁剂。测定 GGPPS 融合荧光蛋白在 20% LED POWER 下的荧光值, 使其控制在 200~1000 范围内。其中荧光结合蛋白的浓度不变, 无标记结合配体以稀释缓冲液 1:1 梯度稀释成 16 个浓度的滴定液。将荧光结合蛋白与无标记结合配体按照 1:1 比例孵育, 并上样至进行微量热泳动的毛细管中。

实施例 1、4-Az 对内源性高表达的 GGPPS 蛋白水平的影响。

将 TSC2-null 细胞培养至 50% 密度, 此时换液, 给不同处理组分别以空白对照 (Blank)、药物溶剂阴性对照 (DMSO)、GGPP 转移酶抑制剂 (GGTI)、GGPPS 小干扰 RNA (siGGPPS), 以及 4-Az 药物的浓度梯度 (0.5uM、5uM、50uM)。48h 处理后收取细胞并检测蛋白水平, 可发现随着浓度的梯度增高, 药物对 GGPPS 的表达量造成了下调的影响。分别在 0 小时、12 小时、24 小时、48 小时收取 TSC2-null 的蛋白, 检测 GGPPS 表达水平, 发现药物处理后, GGPPS 的蛋白水平呈现时间依赖性下降。上述结果显示 4-Az 能够显著的降低内源性 GGPPS 蛋白水平。

实施例 2、4-Az 对内源性高表达的 GGPPS 转录水平的影响。

为了进一步验证 4-Az 对于 GGPPS 表达水平的影响是通过转录水平、翻译水平或者翻译后水平进行调控的, 我们收取不同处理组别的 RNA, 进行 RNA 抽提, 反转录 cDNA 后进行 Real time PCR 检测 GGPPS 的 mRNA 表达。结果显示, siGGPPS 处理组 GGPPS 的 mRNA 水平显著下降, 而药物处理组 4-Az 并未造成对 GGPPS mRNA 的影响。

实施例 3、4-Az 促进 GGPPS 发生泛素化降解

4-Az 给药后分别给予泛素化-蛋白酶体抑制剂 MG132 及溶酶体-自噬体融合抑制

剂 CQ 处理,检测在分别破坏两条降解通路时,仅 MG132 的处理阻止了 GGPPS 的表达下降。且随 MG132 浓度的上升呈现 GGPPS 表达的上升。因此我们得出结论,泛素化-蛋白酶体抑制剂 MG132 能够逆转 4-Az 造成的 GGPPS 表达下降。将共转染 GGPPS 和 Ub 质粒的 293T 分为四个组别:阴性对照组(DMSO)、药物处理组(4-Az,10uM)、蛋白酶体抑制组(DMSO+MG132)、蛋白酶体与药物合用组(4-Az+MG132)。MG132 通过阻止被泛素化小分子标记的目标蛋白进入蛋白酶体,从而阻止降解的发生。当 4-Az 与 MG132 同时处理细胞时,4-Az 促进 GGPPS 发生泛素化,且在尚未进入蛋白酶体时被 MG132 阻拦,泛素化累积的 GGPPS 增多。因此,我们可以得出结论,4-Az 能够促进 GGPPS 蛋白发生泛素化。

实施例 4、4-Az 能够直接结合 GGPPS 的作用方式

将纯化获得的 GGPPS-EGFP-His 荧光表达融合蛋白浓度保持恒定,每次滴定时所使用的滴定剂即 GGPPS 阳性对照底物 FPP 浓度均有变化。未结合 GGPPS 的热泳动运动与已同 GGPPS 结合的底物 FPP 的运动不同,所示时间为 $t=30$ 秒时,在不同 FPP 浓度下,GGPPS 经标准化处理后的荧光信号,以形成于 K_d 拟合的结合曲线。将滴定剂替换成所需鉴定的天然活性小分子,与对照组 EGFP 相比,荧光检测显示 4-Az 与 GGPPS 直接结合。由此可见 4-Az 通过与 GGPPS 直接结合从而促进 GGPPS 发生泛素化方式促进 GGPPS 降解。

叠氮化根皮苷素对非酒精性脂肪肝的治疗作用

一般材料和方法

1.材料

4 周龄小鼠(C57BL/6J)购于南京大学模式动物研究所。小鼠饲料购于江苏省协同生物工程有限责任公司。高脂饲料购于 Research Diets, New Brunswick, NJ。叠氮化根皮苷素购于上海陶素生化有限公司。肝脏组织甘油三酯检测试剂盒购于普莱特生物工程有限公司。谷丙转氨酶和谷草转氨酶检测试剂盒购于凯基生物科技发展有限公司。

2.试剂的配制

叠氮化根皮苷素制剂的配制:将叠氮化根皮苷素粉末溶于二甲基亚砷(Dimethyl Sulphoxide, DMSO),按照 1mg/kg 和 10mg/kg 两个剂量组别,分别溶成 0.15g/L

和 1.5g/L 浓度。

安慰剂溶液为叠氮化根皮苷素制剂的溶剂 DMSO。

3.方法

肝脏组织甘油三脂的测量：取小鼠肝组织右叶 50 mg 左右，并记录准确重量。PBS 水洗置于 1 ml 裂解液中，机械匀浆。将裂解好的组织匀浆分成两部分。其中一部分 500 ul 置于 70℃金属浴中，加热 10min，并离心 2,000x rpm，5 min。取 1-10 ul 用于组织 TG 试剂盒检测。另外 500 ul 用于 BCA 法检测蛋白浓度。

石蜡切片制备：取肝组织右叶适量，用 4%的多聚甲醛固定 24-48 h，逐级乙醇脱水，二甲苯透明，浸蜡，石蜡包埋，切片，厚度为 5 μm。

石蜡切片的 HE 染色：将切片分别浸于二甲苯中 10 min 和 5 min 脱蜡，之后于梯度乙醇中附水。苏木精染色 4 min 后单蒸水稍洗。用 0.25% $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 泛蓝 30 s 后单蒸水洗。用梯度浓度乙醇脱水至 95%乙醇脱水后，0.5%伊红液染色 2-3 s，之后 100%乙醇中脱水，并在二甲苯中浸泡 2 min。最后用中性树胶封片。

谷丙转氨酶和谷草转氨酶水平检测：小鼠麻醉后，通过眼窝静脉取血，并置于室温 30 min，待血清析出，离心。取 10ul 血清用于谷丙转氨酶和谷草转氨酶试剂盒检测。

实施例 1、建立非酒精性脂肪肝小鼠模型

利用食源性诱导建立非酒精性脂肪肝模型鼠。高脂饲料（含有 60%的脂肪）喂养上述“一般材料与方法”中的 4 周龄小鼠 8 周，8 周后成功诱导其产生脂肪肝。

实施例 2、叠氮化根皮苷素对非酒精性脂肪肝小鼠体重及主要脂质代谢组织的影响

选取实施例 1 中的非酒精性脂肪肝小鼠共 18 只，随机分配为 3 组，每组 6 只，设置为“4-Az 1”组、“4-Az 10”组和对照组。向上述三组小鼠分别进行腹腔注射等体积的 1mg/kg 剂量叠氮化根皮苷素制剂、10mg/kg 剂量叠氮化根皮苷素制剂及二甲基亚砷（作为安慰剂），隔天注射一次，连续 14 天，并同时监测小鼠体重的改变。

如图 1 中的 A 图和 B 图所示，经注射叠氮化根皮苷素制剂的小鼠的体重、肝脏重量及附睾脂肪与对照组的小鼠相比，均显著降低，表明叠氮化根皮苷素能够显著降低非酒精性脂肪肝小鼠的体重。

实施例 3、叠氮化根皮苷素对非酒精性脂肪肝小鼠肝脏脂质积累的影响

如实施例 2 连续给药 14 天后，处死并解剖各组小鼠，检测相关生理指标。对各组小鼠的肝脏组织进行 CT 扫描、同时按“一般材料与方法”中所述的步骤对各组小鼠的肝脏组织进行甘油三脂水平检测及石蜡切片 HE 染色。

如图 2 中的 A-C 图所示，经注射叠氮化根皮苷素制剂的小鼠与对照组小鼠相比，其肝脏组织密度明显提高，同时脂质含量显著降低。如图 3 所示，A 图显示经叠氮化根皮苷素制剂给药的非酒精性脂肪肝小鼠，其肝脏的大泡型脂肪变性较对照组有明显的缓解，同时 B 图显示其甘油三脂含量显著降低，说明叠氮化根皮苷素能够降低高脂诱导产生的肝脏脂质变性。

实施例 4、叠氮化根皮苷素对小鼠血液中谷丙转氨酶和谷草转氨酶水平的影响

如实施例 2 连续给药 14 天后，检测小鼠血液中谷丙转氨酶和谷草转氨酶水平。

如图 4 所示，A 图和 B 图结果显示经注射叠氮化根皮苷素制剂的小鼠与对照组小鼠相比，其血液中的谷丙转氨酶和谷草转氨酶均显著降低水平，说明叠氮化根皮苷素缓解了高脂饲养造成的肝毒性，具有保护肝脏功能的活性。

实施例 5、叠氮化根皮苷素与根皮苷素在细胞水平上对肝细胞内脂质代谢的差异

1. 肝细胞脂肪变性模型的构建

此模型为细胞模型，以脂质变性的肝细胞模拟非酒精性脂肪肝的细胞环境。分离 8 周龄小鼠的原代肝细胞，铺至培养皿大约至 80%。分别给予游离脂肪酸以及游离脂肪酸的溶剂牛血清白蛋白（bovine serum albumin, BSA）作为阴性对照刺激细胞。将肝细胞培养在游离脂肪酸（单不饱和脂肪酸:饱和脂肪酸=2:1）的混合液中。肝细胞随着游离脂肪酸浓度的升高和时间的加长，油红染色和甘油三酯的检测结果显示脂质积累的情况加深。

2. 叠氮化根皮苷素（4-Az）显著降低肝细胞脂质变性模型中的甘油三酯（TG）含量

在肝细胞脂质变性模型基础上内部设置三个组别分别为 DMSO 组、4-Az 药物处理组（10 μ M，20 μ M，50 μ M）以及根皮苷素药物处理组（100 μ M）。细胞学甘油三酯试剂盒检测结果显示，BSA 组里，药物处理浓度达到最高 50 μ M 时，细胞的 TG 含量下降，游离脂肪酸处理后的组别，甘油三酯较阴性对照 BSA 组别有 4 倍的显著升高，在此基础上给药后可发现在最低浓度 10 μ M 4-Az 的处理下，甘

油三酯的含量已经显示显著下降，TG 降低率 65%。而在 100 μ M 根皮苷素的处理下，甘油三酯的含量还未显著下降，TG 降低率仅为 83%，如表 1 所示。结果说明，叠氮化根皮苷素对肝细胞内脂质代谢的作用远远显著于根皮苷素。

表 1

试验物质	浓度	TG 降低率
根皮苷素 (phloridzin)	100 μ M	83 $\pm$ 12
叠氮化根皮苷 素 (4-Az)	10 μ M	65 $\pm$ 10

以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制，尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明，本领域的普通技术人员应当理解，可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换，而脱离本发明技术方案的宗旨和范围，其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

权 利 要 求 书

1. 叠氮化根皮甘素作为 GGPPS 抑制剂的用途。
2. 叠氮化根皮甘素在制备治疗与 GGPPS 抑制相关疾病的药物中的用途。
3. 根据权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述疾病为非酒精性脂肪肝。
4. 根据权利要求 2 或 3 所述的用途，其特征在于，所述药物包含二甲基亚砜、叠氮化根皮苷素及药学上可接受的载剂。
5. 根据权利要求 2 所述的用途，其特征在于，所述药物施用方式包括腹腔注射、皮下、皮内、动脉内、静脉内、肌内、关节内、滑液内、胸骨内、鞘内、病灶内、颅内注射或输注，口服、局部、直肠、经鼻、经颊、阴道、舌下、皮内、粘膜、气管、尿道给药，通过吸入气雾、植入蓄积及针刺方式给药。
6. 根据权利要求 3 所述的用途，其特征在于，所述药物的施用剂量为 1-10mg/kg。

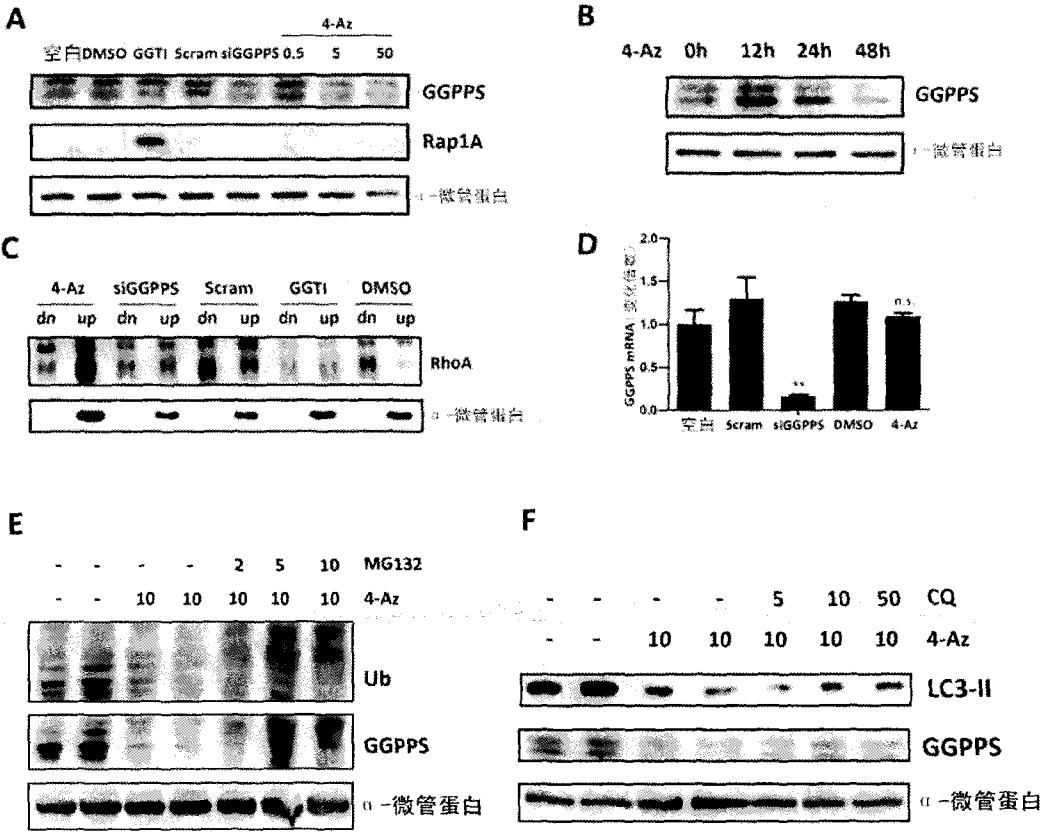


图 1

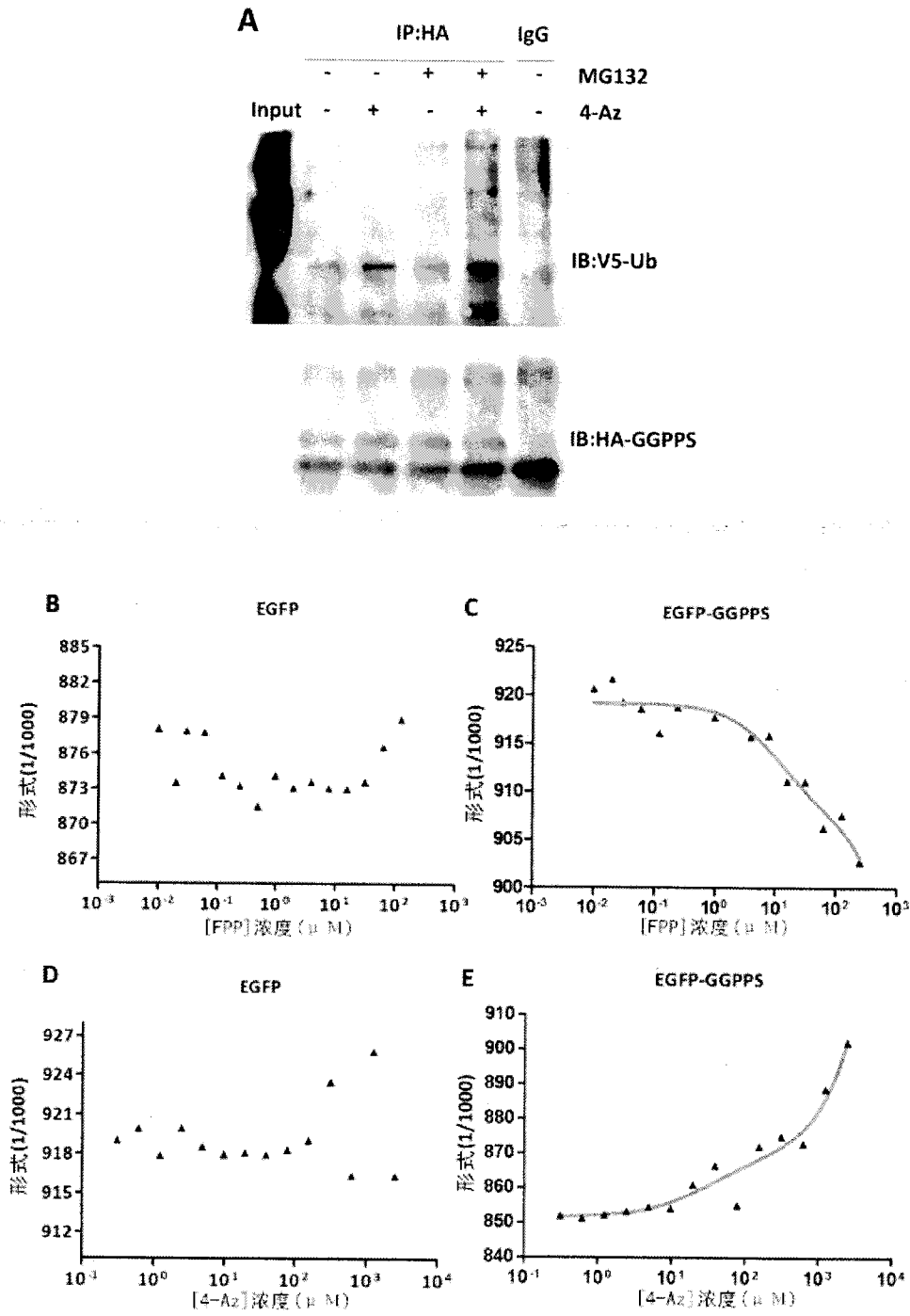


图 2

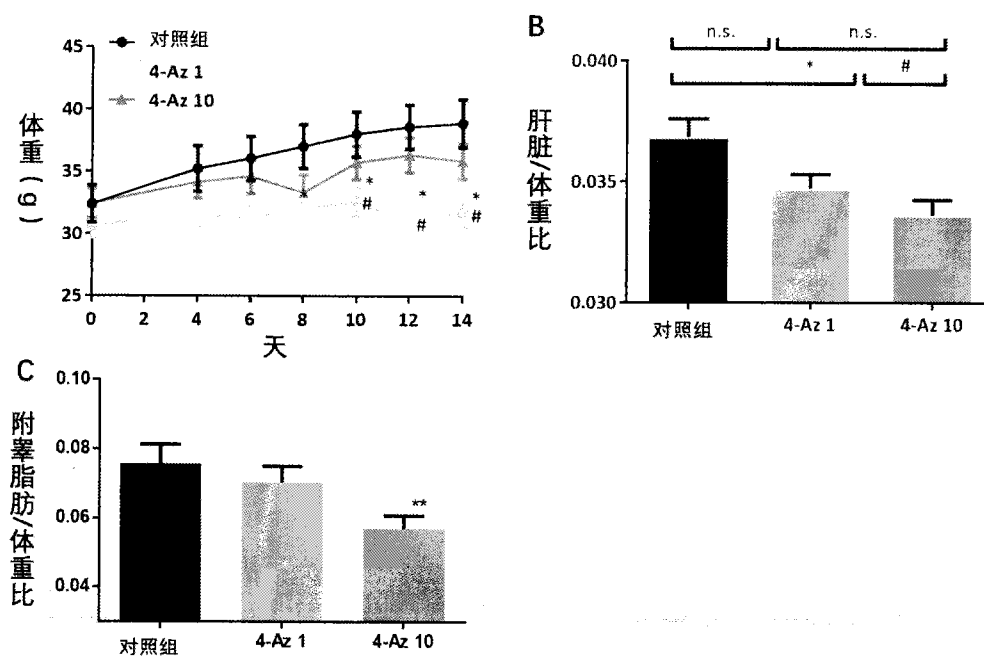


图 3

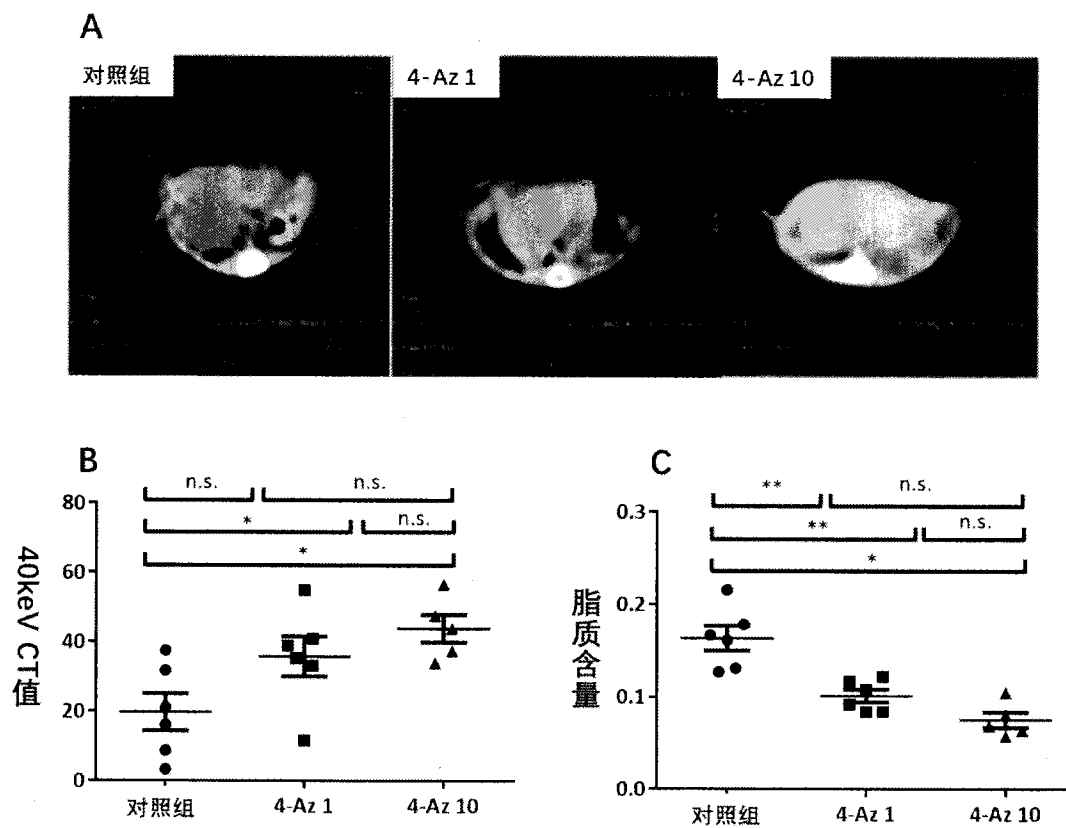


图 4

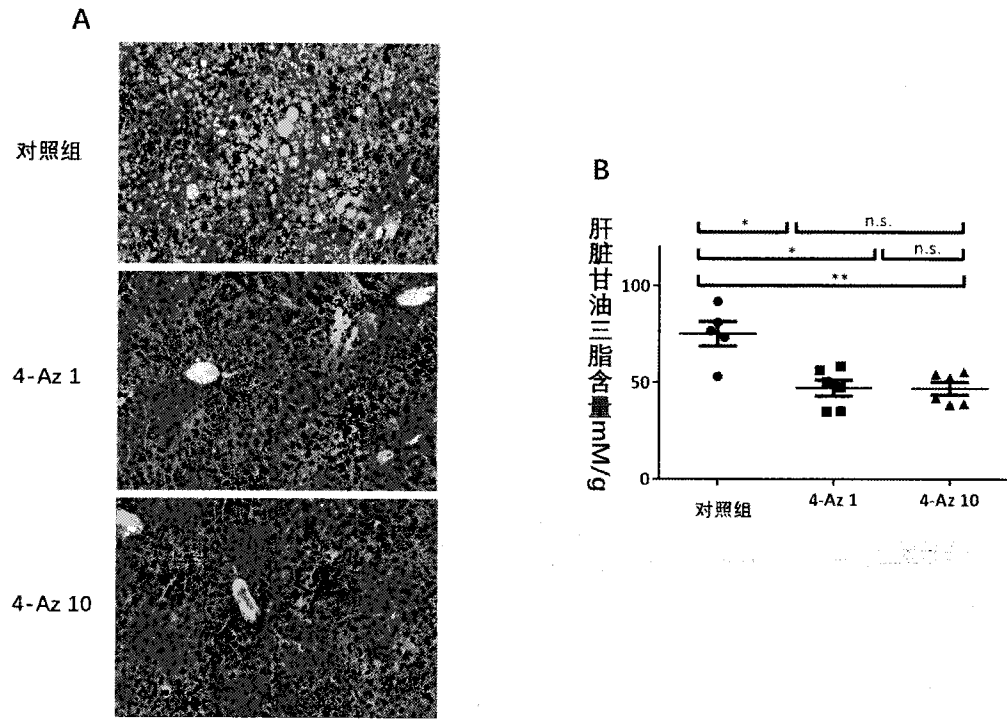


图 5

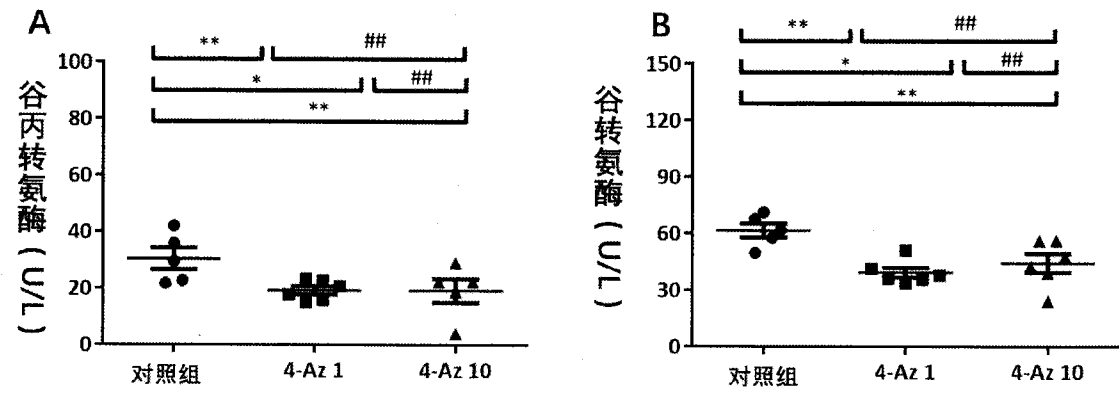


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/114329

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/7034(2006.01)i; A61P 1/16(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DWPI, SIPOABS, CNABS, CPRSABS, CNTXT, TWTXT, USTXT, WOTXT, EPTXT, CNKI, 中国药学文摘库 (CN), CHINA PHARMACEUTICAL ABSTRACTS (CN), CAPLUS: 叠氮化根皮苷, 根皮苷, 非酒精性脂肪肝, 香叶基香叶基焦磷酸合成酶, azidophlorizin, phloridzin, phlorizin, non-alcoholic fatty liver, ggpps, geranylgeranyl diphosphate synthas, RN: 79541-46-1

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 108721308 A (NANJING UNIVERSITY) 02 November 2018 (2018-11-02) claims 1-6	1-6
Y	CN 101683351 A (WANG, YUNZHI) 31 March 2010 (2010-03-31) claims 1-9, and description, experimental example 8	1-6
Y	HOSANG, M. et al. "Photoaffinity Labeling and Identification of (a Component of) the Small-Intestinal Na ⁺ , D-Glucose Transporter Using 4-Azidophlorizin." <i>Febs Letters</i> , Vol. 130, No. (2), 31 August 1981 (1981-08-31), pages 244-248, particularly page 245, right-hand column	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

07 January 2019

Date of mailing of the international search report

11 February 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

State Intellectual Property Office of the P. R. China
 No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
 100088
 China

Authorized officer

Facsimile No. (86-10)62019451

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/114329

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **1,3,4,6**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] These claims relate to a method for treating a disease, which is a subject matter which requires no search under PCT Rule 39.1(iv); however, the search is provided with regard to corresponding pharmaceutical applications.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/114329

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	108721308	A	02 November 2018	None			
CN	101683351	A	31 March 2010	CN	101683351	B	07 September 2011
				CN	101683411	A	31 March 2010
				CN	101683411	B	19 September 2012

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/114329

A. 主题的分类

A61K 31/7034(2006.01)i; A61P 1/16(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61K, A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

DWPI, SIPOABS, CNABS, CPRSABS, CNTXT, TWTXT, USTXT, WOTXT, EPTXT, CNKI, 中国药学文摘库(CN), CAPLUS: 叠氮化根皮苷, 根皮苷, 非酒精性脂肪肝, 香叶基香叶基焦磷酸合成酶, azidophlorizin, phloridzin, phlorizin, non-alcoholic fatty liver, ggpps, geranylgeranyl diphosphate synthas, RN:79541-46-1

C. 相关文件

类 型*

引用文件, 必要时, 指明相关段落

相关的权利要求

PX

CN 108721308 A (南京大学) 2018年 11月 2日 (2018 - 11 - 02)
权利要求1-6

1-6

Y

CN 101683351 A (汪鋈植) 2010年 3月 31日 (2010 - 03 - 31)
权利要求1-9, 说明书试验例8

1-6

Y

Markus HOSANG, E. 等. "PHOTOAFFINITY LABELING AND IDENTIFICATION OF (A COMPONENT OF) THE SMALL-INTESTINAL Na⁺, D-GLUCOSE TRANSPORTER USING 4-AZIDOPHLO-RIZIN."

FEBS LETTERS, 第130卷, 第2期, 1981年 8月 31日 (1981 - 08 - 31),
第244-248页, 特别是第245页右栏

1-6

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2019年 1月 7日

国际检索报告邮寄日期

2019年 2月 11日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

黄轶洁

电话号码 86-010-62411202

第II栏

某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 1, 3, 4, 6
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 这些权利要求涉及治疗疾病的方法，属于不要求检索的主题(PCT细则39.1(iv))，但还是针对相应的制药应用进行了检索。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/114329

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	108721308	A	2018年 11月 2日	无	
CN	101683351	A	2010年 3月 31日	CN	101683351 B 2011年 9月 7日
				CN	101683411 A 2010年 3月 31日
				CN	101683411 B 2012年 9月 19日