

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 31/4412 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200480038221.2

[45] 授权公告日 2009年9月2日

[11] 授权公告号 CN 100534432C

[22] 申请日 2004.11.5

[21] 申请号 200480038221.2

[30] 优先权

[32] 2003.11.7 [33] FR [31] 0313134

[86] 国际申请 PCT/FR2004/002858 2004.11.5

[87] 国际公布 WO2005/046672 法 2005.5.26

[85] 进入国家阶段日期 2006.6.20

[73] 专利权人 国家研究中心

地址 法国巴黎

共同专利权人 普瓦捷大学

[72] 发明人 F·贝克 C·诺雷兹

[56] 参考文献

WO0102862A1 2001.1.11

US20020035072A1 2002.3.21

activation of CFTR by genistein in human airway epithelial celllines. Charlotte Andersson et al. BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Vol. 308 No. 3. 2003

审查员 楼杜鹃

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利  
商标事务所

代理人 罗菊华

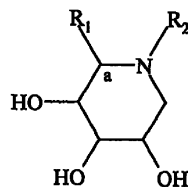
权利要求书2页 说明书19页 附图7页

[54] 发明名称

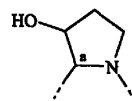
葡糖苷酶抑制剂在粘液粘稠病治疗中的应用

[57] 摘要

本发明涉及选自通式(I)的化合物的葡糖苷酶抑制剂在制备用于治疗粘液粘稠病(mucoviscidosis)的药物中的应用,其中R<sub>1</sub>表示CH<sub>3</sub>或CH<sub>2</sub>OH, R<sub>2</sub>表示H或具有1-5个碳原子的烷基,或R<sub>1</sub>和R<sub>2</sub>与位于(a)位上的碳和式(I)的氮一起形成具有式(II)的基团。

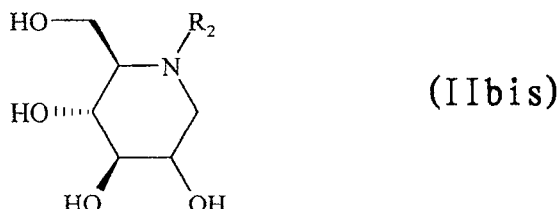


(I)



(II)

1. 葡糖苷酶抑制剂在制备旨在用于治疗囊性纤维化的药物中的应用，其中所述的葡糖苷酶抑制剂选自下列通式 (Iibis) 的化合物：



其中 R<sub>2</sub> 是丁基。

2. 权利要求 1 的应用，其中所述抑制剂是具有下式之一的化合物：



NB-DNJ，即 N-丁基-脱氧野尻霉素    NB-DMJ，即 N-丁基-脱氧甘露糖型野尻霉素。

3. 权利要求 2 的应用，其中所述抑制剂是化合物 NB-DNJ。

4. 权利要求 1-3 之一的应用，其中所述的药物能够通过口服、直肠或鼻部途经给药。

5. 权利要求 4 的应用，其中所述药物能够分一次或多次剂量以 1 mg - 2 g/天的活性组分的比例对成年人给药或以 1 mg - 1 g/天的比例对儿童和婴儿给药。

---

6. 权利要求 4 的应用，其中所述药物能够作为糖浆剂、混悬液、明胶胶囊、片剂、粉剂、颗粒、栓剂、通过吸入的气溶胶或滴剂。

## 葡糖苷酶抑制剂在粘液粘稠病治疗中的应用

本发明的主题为葡糖苷酶抑制剂在制备用于治疗囊性纤维化的药物中的应用。

囊性纤维化(CF)是在欧洲和北美人群中最为广泛的致命性常染色体隐性遗传病。CF基因(基因座7q31)编码称作CFTR(囊性纤维化跨膜传导调节蛋白)的跨膜蛋白(Tsui等1985; Riordan等1989)。CF基因突变导致水和电解质通过各种器官,诸如肺、汗腺、肠和外分泌胰腺的细胞膜的转运异常。尽管CFTR蛋白存在1000种以上的突变,但是最常见的突变(70%的患者)在于508位上的NBF1结构域中的苯丙氨酸缺失(delF508)。CF患者死亡率的主要原因与这种缺失相关并且导致感染或因粘液粘性增加导致的肺动脉瓣关闭不全。这种粘性导致呼吸道阻塞并且增加机会致病菌感染的风险。此外,在消化系统且特别是胰腺系统中还注意到了恶化(患有胰腺机能不全的患者)。CFTR蛋白为1480个氨基酸的糖蛋白,它属于ABC膜转运蛋白超家族。CFTR为位于健康个体内肺上皮细胞顶端原生质膜中的氯通道。CFTR负责水和电解质的跨上皮运输并且在健康个体中使肺气道水化。在CF患者中,该蛋白质在原生质膜中不存在,这是因保留在内质网(ER)中的该蛋白质不正确寻址(addressing)所致。肺气道的水化在这种情况下不再是功能性的。delF508缺失干扰了NBF1结构域折叠并且防止蛋白质的完全成熟,由此,该蛋白质在其生物合成过程中极早地被降解。但是,如果delF508蛋白达到膜,那么它可作为氯离子通道起作用。治疗这种疾病的关键之一由此在于重新使delF508寻址到细胞膜。一旦在膜处,delF508转运活性就可以受到内源性或外源性激动剂刺激。

如下实现CFTR蛋白寻址机制。CFTR蛋白在其新合成后在ER腔中被发现,其中它通过糖基转移酶进行各种糖基化。发现该蛋白质特别带有3个N-连接的葡萄糖和1个N-连接的甘露糖。葡萄糖中的两个被

葡糖苷酶 I 和 II 除去。钙联接蛋白或钙网蛋白，即依赖性钙陪伴分子识别单葡糖基化蛋白并且通过 N-连接的葡萄糖结合后者。这些陪伴分子防止存在于 ER 中的不同 CFTR 蛋白发生聚集并且允许结合其它陪伴分子，诸如 ERp57。由此形成的 CFTR/钙联接蛋白/ERp57 复合物使得 CFTR 折叠。然后葡糖苷酶 II 除去剩余的葡萄糖，由此使 CFTR 从陪伴分子中释放。如果折叠不正确，那么葡糖基-转移酶将葡萄糖添加到 CFTR 上，后者可以再次进行一个或多个循环，直到它折叠良好。如果折叠仍然不正确，那么甘露糖苷酶除去 N-连接的甘露糖，该蛋白质然后通过易位子通道复合物转运入胞质溶胶，在那里它被降解 (*Ellgard & Helenius, 2003*)。对 80% 的 CFTR-WT 和 99% 的  $\Delta$ 1F508-CFTR 观察到了这种现象。一旦在胞质溶胶中，那么该蛋白质就会得到不同的陪伴分子，诸如 Hsp70、Hsp90 或 Hdj-2 辅助。这些陪伴分子使得泛素结合 CFTR。这样标记的 CFTR 被属于 ATP-依赖性的 26S 蛋白酶体复合物识别和降解 (*Gelman 等 2002*)。如果内质网控制机制认为 CFTR 折叠正确，那么该蛋白质可以达到高尔基体。它得到通过甘露糖结合 CFTR 的“cargo”蛋白 ERGIC-53 (属于凝集素族) 辅助。ERGIC 通过因子 COP I 形成的小囊泡发生通过 (*Ellgard & Helenius, 2003*)。看起来如果该蛋白质折叠极差，那么它对高尔基体的内切糖苷酶 H 敏感 (*Cheng 等 1990*) 且然后返回到内质网中，它在那里被降解。另一方面，耐内切糖苷酶 H 的正确折叠的蛋白得到因子 VIP 36 (ERGIC-53 同系物) 辅助并且被输送至顶膜 (*Fiedler & Simons, 1995*)。

另一方面，尽管已经观察到葡糖苷酶抑制剂澳粟精胺 (castanospermine) 对肺上皮细胞表面上存在的  $\Delta$ 1F508 更新具有作用 (*Wei 等 1996*)，但是从未描述该化合物不仅能够恢复  $\Delta$ 1F508 的膜寻址，而且能够使  $\Delta$ 1F508 作为离子转运蛋白起作用。因此，该文章的作者没有就该化合物在治疗囊性纤维化范围中的可能应用提出假设。

本发明人已经精确地研究了这些葡糖苷酶抑制剂，以便确定它们是否能够确保  $\Delta$ 1F508 的正确和特异性寻址 (addressing)，而又不会

影响其离子转运活性或细胞存活力。

N-丁基-脱氧野尻霉素 (NB-DNJ) 为内质网的葡糖苷酶 I 和 II 抑制剂, 最初它被研发作为用于人的抗病毒分子。这些酶的抑制改变了 HIV 病毒 (人免疫缺陷病毒) 的被膜的糖蛋白的折叠且结果是发现病毒周期被阻断 (Platt 等 2001)。已经对患有获得性免疫缺陷综合征的患者评价了使用 NB-DNJ 的疗法: 这种分子得到充分耐受并且甚至在高浓度 (2 mM) 下对培养物中的组织也没有细胞毒性。此外, 这些临床试验揭示 NB-DNJ 还对葡萄糖基转移酶具有抑制作用。这就是为何在治疗戈谢病中研究也称作 OGT 918 的该分子的原因 (Dwek 等 2000, Cox 等 2000)。这种遗传疾病是因溶酶体酶  $\beta$ -葡糖脑苷脂酶缺乏导致的, 这引起葡糖脑苷脂 (酶底物) 积累。葡糖脑苷脂生物合成中涉及的 NB-DNJ (一种葡萄糖基转移酶抑制剂) 由此阻止了其合成和蓄积 (Dwek 等 2000, Cox 等 2000)。在 2002 年, NB-DNJ 作为治疗戈谢病的药物以名称 Zavesca<sup>®</sup> 获得了市场授权。

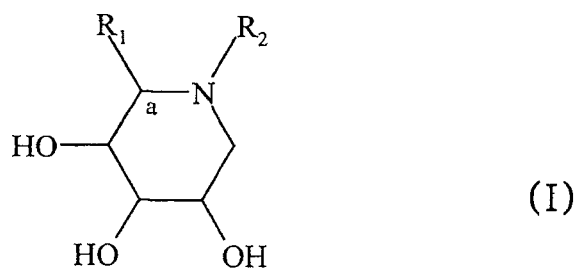
本发明人证明的如下事实产生了本发明, 即 NB-DNJ 和其它一般性的糖苷酶抑制剂能够恢复 delF508 的膜寻址, 而不会改变其它氯离子通道并且使 delF508 作为转运蛋白起作用。

本发明的一个主题在于葡糖苷酶抑制化合物在制备用于治疗囊性纤维化的药物中的应用。

所谓“葡糖苷酶抑制剂”这一表达方式指的是任意葡糖苷酶 I 和/或 II 抑制剂, 这些葡糖苷酶的抑制能够按照尤其是 Platt 等 1994 所述的方法测定。

更具体的说, 本发明的一个主题在于上述葡糖苷酶抑制化合物的应用, 所述的化合物选自能够恢复 delF508 膜寻址而不会改变其它氯离子通道并且允许 delF508 作为离子转运蛋白起作用的那些化合物, 特别是在下述对 delF508 缺失纯合型人肺上皮 CF15 细胞进行的实验的框架内显示上述性质的化合物。

更具体的说, 本发明的一个主题在于选自如下通式 (I) 的化合物的葡糖苷酶抑制化合物的上述应用:

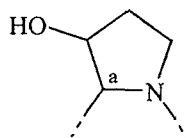


其中

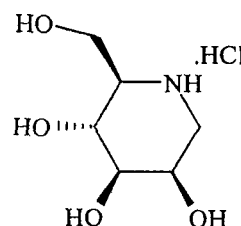
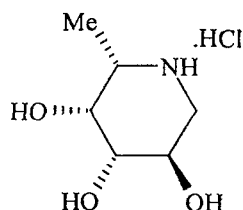
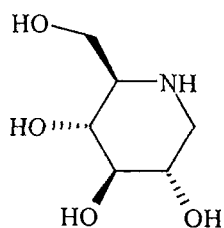
- R<sub>1</sub>表示 CH<sub>3</sub>, 或 CH<sub>2</sub>OH 基团;

- R<sub>2</sub>表示 H 或具有 1-5 个碳原子的烷基;

- 或 R<sub>1</sub> 和 R<sub>2</sub> 与上述通式 (I) 的氮和 (a) 位上的碳一起形成如下式的基团:



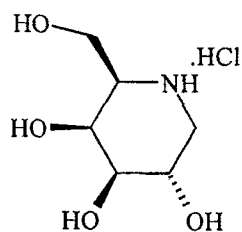
更具体的说, 本发明涉及如下式 (I) 的化合物的上述应用:



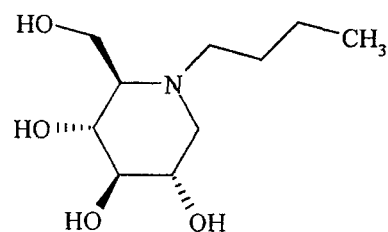
DNJ (脱氧野尻霉素)

DFJ (deoxyfuconojirimycin)

DMJ (脱氧甘露糖型野尻霉素  
(deoxymannojojirimycin))

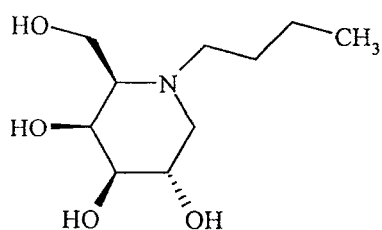


DGJ

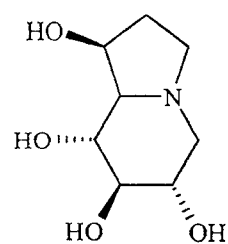


NB-DNJ (N-丁基-脱氧野尻霉素)

(脱氧半乳糖型野尻霉素 (deoxygalactonojojirimycin))



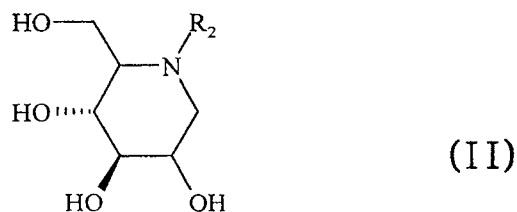
NB-DGJ



溴粟精胺

(N-丁基-脱氧半乳糖型野尻霉素 (deoxygalactonojirimycin))

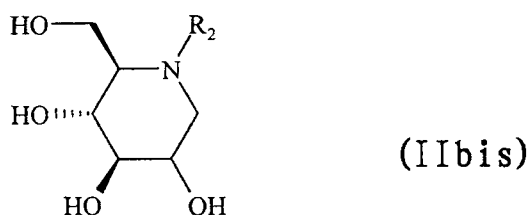
更具体的说, 本发明涉及选自如下通式(II)的化合物的葡糖苷酶抑制剂的上述应用:



(II)

其中  $R_2$  表示 H 或具有 1-5 个碳原子的烷基。

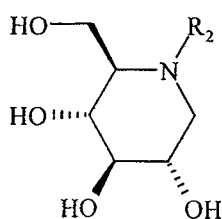
更具体的说, 本发明涉及选自如下通式(IIbis)的化合物的如上所述葡糖苷酶抑制剂的上述应用:



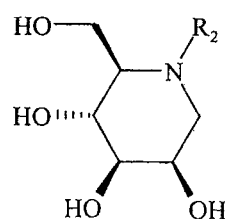
(IIbis)

其中  $R_2$  表示 H 或具有 1-5 个碳原子的烷基。

本发明的主题还在于权利要求 1-4 之一的葡糖苷酶抑制剂的上述应用, 所述的葡糖苷酶抑制剂选自下列通式(II.1)或(II.2)的化合物:



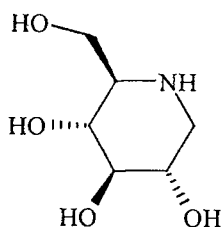
(II.1)



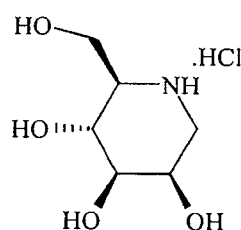
(II.2)

其中  $R_2$  表示 H 或具有 1-5 个碳原子的烷基。

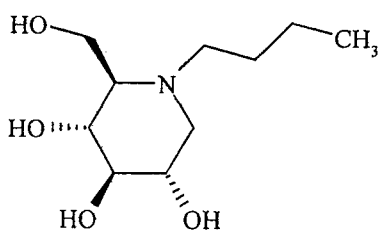
更具体的说, 本发明涉及如下所示  $R_2$  表示 H 或 N-丁基的如上所述通式 (II.1) 或 (II.2) 化合物的上述应用:



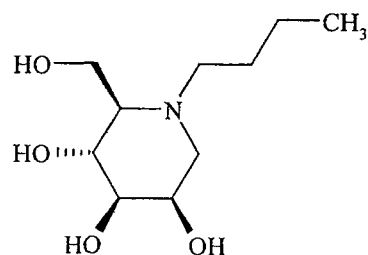
DNJ (脱氧野尻霉素)



DMJ (脱氧甘露糖型野尻霉素)



NB-DNJ (N-丁基-脱氧野尻霉素)



NB-DMJ (N-丁基-脱氧甘露糖型野尻霉素)

优选本发明范围内使用的化合物为 NB-DNJ 和 NB-DMJ。

另外优选本发明范围内使用的化合物为 NB-DNJ。

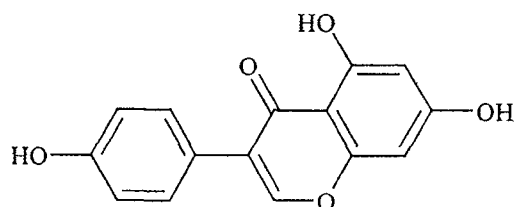
本发明的主题还在于上述定义的葡糖苷酶抑制化合物在制备药物中的上述应用, 所述的药物可以通过口服(糖浆剂、混悬液、明胶胶囊、片剂、粉剂或颗粒)、直肠(栓剂)、鼻部途经(通过吸入的气溶胶或滴

剂)给药,特别是分一次或多次剂量以约 1 mg - 2 g/天的活性组分的比例对成年人给药或以 1 mg - 1 g/天的比例对儿童和婴儿给药。

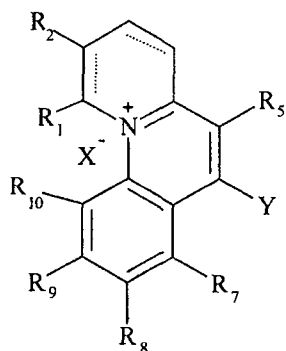
本发明还涉及上述定义的葡糖苷酶抑制化合物与 CFTR 通道活化化合物组合的上述应用。

更具体的说,本发明的主题由此在于上述定义的葡糖苷酶抑制化合物与 CFTR 通道活化化合物组合的上述应用,所述的 CFTR 通道活化化合物选自:

- 下式的染料木黄酮(genistein):



-或如下的式(II)的苯并[c]喹啉鎓类(benzo[c] quinoliziniums)衍生物:



(II)

其中:

-  $R_1$  和  $R_2$  表示氢原子或与  $C_1$  和  $C_2$  一起形成具有 6 个碳原子的芳族环;

-  $R_5$  表示氢原子或具有 1-10 个碳原子的直链或取代烷基,特别是丁基,或通式  $COOR'$  的酯,其中  $R'$  表示具有 1-10 个碳原子的直链

或取代烷基，特别是乙基；

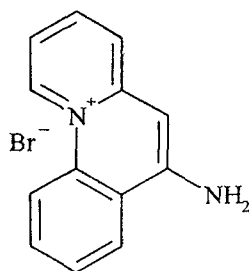
- Y 表示 -OH、-SH、-NH<sub>2</sub> 或 -NHCOCH<sub>3</sub> 基团；

- R<sub>7</sub>、R<sub>8</sub>、R<sub>9</sub> 和 R<sub>10</sub> 表示氢原子或 R<sub>7</sub>、R<sub>8</sub>、R<sub>9</sub> 或 R<sub>10</sub> 中至少一个表示卤原子，特别是氯、溴或氟原子；

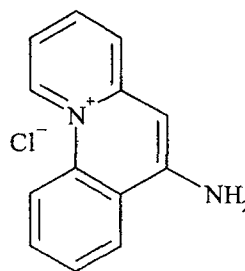
- X 表示阴离子形式的卤原子，特别是溴 Br<sup>-</sup> 或氯 Cl<sup>-</sup> 原子或阴离子形式的原子群。

更具体的说，本发明的主题在于上述定义的葡萄糖苷酶抑制化合物与式 (II) 的苯并 [c] 喹啉鎓类衍生物组合的上述应用，所述的式 (II) 的苯并 [c] 喹啉鎓类衍生物选自下列化合物：

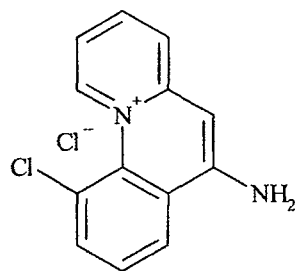
化合物 13 (MPB-01)



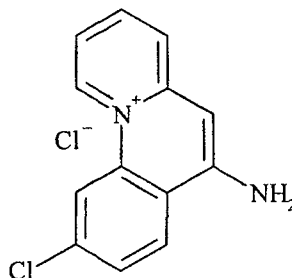
化合物 11 (MPB-26)



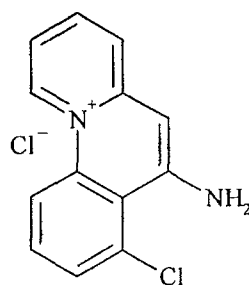
化合物 14 (MPB-02)



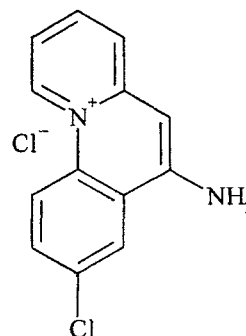
化合物 15 (MPB-03)



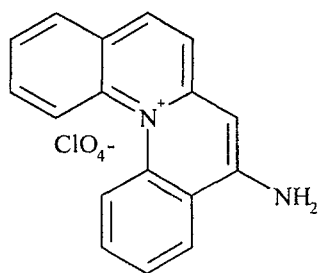
化合物 16



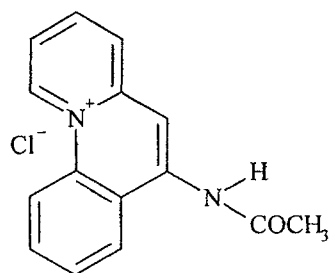
化合物 17



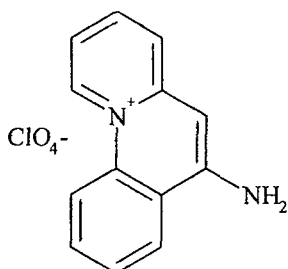
化合物 22



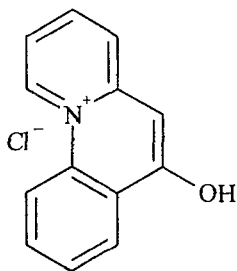
化合物 23



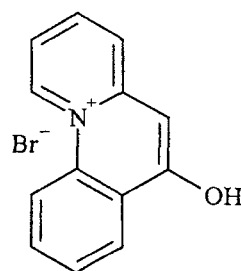
化合物 24



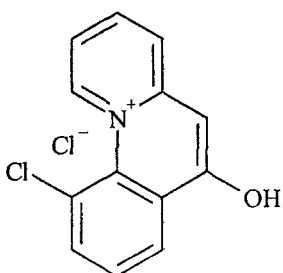
化合物 12 (MPB-05)



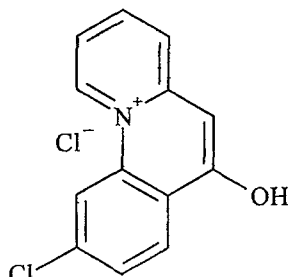
化合物 18 (MPB-06)



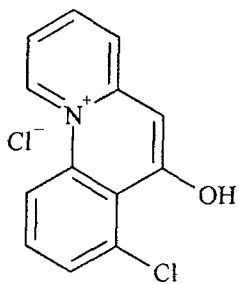
化合物 19 (MPB-07)



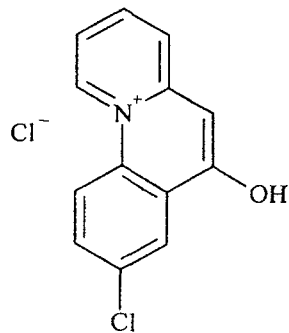
化合物 20 (MPB-08)



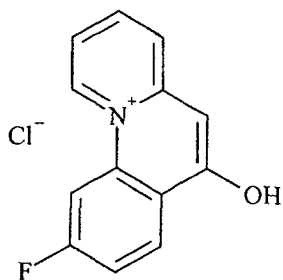
化合物 21 (MPB-27)



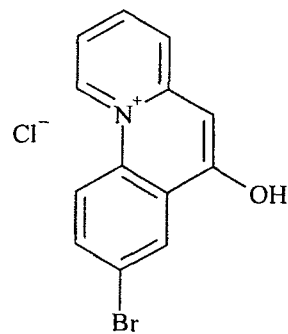
化合物 25 (MPB-30)



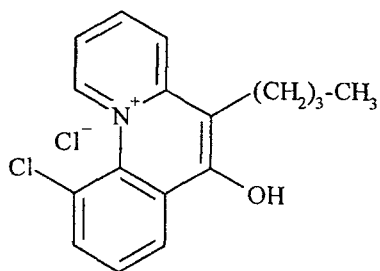
化合物 26 (MPB-29)



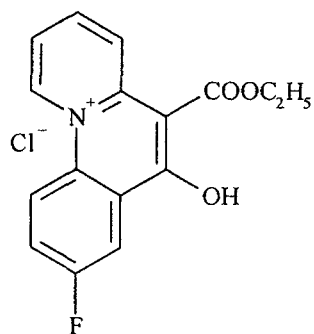
化合物 27 (MPB-32)



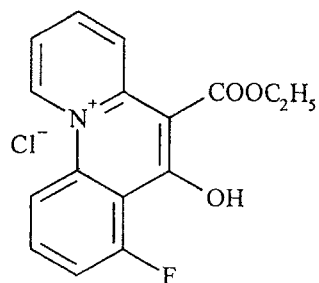
化合物 MPB-91



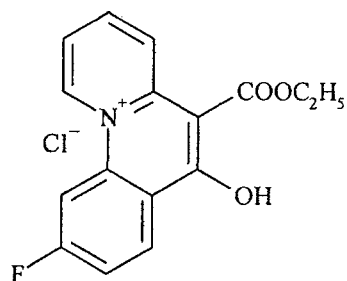
化合物 MPB 73



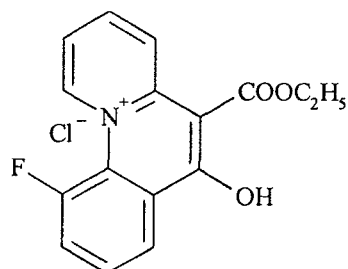
化合物 MPB 75



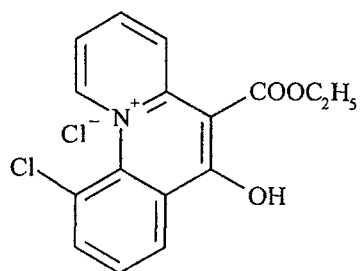
化合物 MPB 86



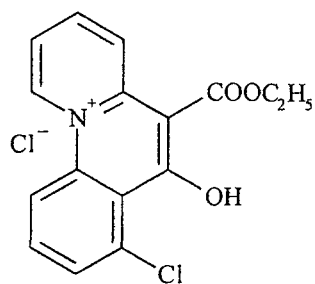
化合物 MPB 77



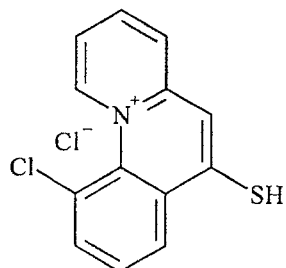
化合物 MPB 87



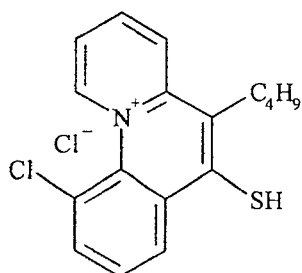
化合物 MPB 88



化合物 MPB 102



化合物 MPB 103



本发明的主题还在于包括至少一种葡糖苷酶抑制化合物，特别是如上所述的式(I)或(II)的化合物和至少一种如上所述的 CFTR 通道活化化合物的产品，它们作为组合产品同时或分开或在一定时间内分散用于囊性纤维化治疗中。

本发明进一步通过下列详细描述来举例说明，后面用实验证明 MB-DNJ 对  $\Delta F508$  的正确和特异性寻址的作用，然而，MB-DNJ 对其离子转移活性或细胞存活力没有影响。

## I) 材料和方法

### M1. 细胞培养物

**CHO-WT 细胞:** CHO (中国仓鼠卵巢) 细胞为用野生型 CFTR 基因 (CFTR-WT) 转染的成纤维细胞。这些细胞由此超表达 CFTR 蛋白。

培养基: MEM $\alpha$  培养基 (GIBCO) + 7% 胎牛血清 + 0.5% 青霉素/链霉素 + 100  $\mu$ M 甲氨蝶呤 (Amethopterin, Sigma)

**CF15 细胞:** CF15 细胞为表达  $\Delta F508$ -CFTR 基因的来源于鼻的人上皮细胞。

培养基: DMEM 培养基 + HAM F12 + 10% FCS + 0.6% 青霉素/链霉素 + 生长因子 (胰岛素 5  $\mu$ g/ml、转铁蛋白 5  $\mu$ g/ml、肾上腺素 5.5  $\mu$ M、腺嘌呤 0.18 mM、EGF 10 ng/ml、T3 2 nM、氢化可的松 1.1  $\mu$ M)

**Calu-3 细胞:** Calu-3 细胞为表达野生型 CFTR 基因的来源于肺的人上皮细胞。

培养基: 含有 glutamax + 7% 胎牛血清 + 1% 青霉素/链霉素的 DMEM 培养基/F12

### M2. 免疫标记

免疫标记使得借助于抗-CFTR 初级抗体 (Ab)，然后借助于用 Cy3 荧光团标记的抗初级抗体的二次抗体使 CFTR 蛋白的细胞寻址显现成为可能。预先将细胞接种在合适的培养基中的片层上。用 TBS (NaCl: 157 mM, Tris 碱: 20  $\mu$ M, pH 7.4) 进行 3 次洗涤，每次 5 分钟。然后

通过在 20 分钟内添加 TBS-低聚甲醛 (3%) 固定细胞。在用 3 TBS 洗涤 3 次 (5 分钟) 后, 将细胞与 0.1% TBS-triton 一起保温 (10 分钟), 使得细胞膜上形成孔, 然后再次用 TBS 进行 3 次洗涤, 此后将细胞与 0.5% TBS-BSA - 0.05% 皂苷共同保温 1 小时。然后将细胞与 CFTR 抗-C 末端初级抗体 (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 一起保温 1 小时。用 TBS-BSA-皂苷进行 3 次洗涤, 每次 5 分钟, 此后与 GAM-cy3 二次抗体 (1/400) 一起保温 1 小时。在两次用 TBS 洗涤 5-分钟后, 通过与 Topro3 (1/1000) 一起保温 5 分钟标记核。最后, 在用 TBS 进行最后 3 次 5-分钟的洗涤后可以将所述片层固定在载玻片上。用聚焦显微镜 (Bio-Rad), 借助于在合适波长处使用激光激发观察载玻片。为了区分 Cy3 与 Topro3 标记, Topro3 的荧光颜色已经改变成蓝色 (核的颜色)。

### M3. 放射性示踪物流出

使用放射性碘化物流出技术对细胞中氯离子转运进行测定 (Becq 等 1999; Dormer 等 2001)。将示踪物 ( $^{125}\text{I}$ ) 掺入胞内介质中。然后在加入不同的药物活性剂后计数离开细胞的放射性示踪物的量。将碘化物用作氯离子转运的示踪物。已经证实可以将两种放射性示踪物  $^{125}\text{I}$  和  $^{36}\text{Cl}$  看作用于测定氯离子通道活性的等效物 (Venglarick 等 1990)。 $^{125}\text{I}$  还具有比  $^{36}\text{Cl}$  短的寿命的优点 (各自的半衰期: 30 天和 300,000 年)。将细胞在 24-孔板内的合适的培养基中培养。用流出培养基 (NaCl: 136.6 mM, KCl: 5.4 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 0.3 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ : 0.3 mM,  $\text{NaHCO}_3$ : 4.2 mM,  $\text{CaCl}_2$ : 1.3 mM,  $\text{MgCl}_2$ : 0.5 mM,  $\text{MgSO}_4$ : 0.4 mM, HEPES: 10 mM, D-葡萄糖: 5.6 mM) 进行 2 次冲洗, 以便消除按照反常方式释放放射性的死亡细胞。然后将细胞和 500  $\mu\text{l}$  装载物 (1  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  的  $^{125}\text{I}\text{Na}$ ) 一起保温, 就 CHO-WT 而言为 30 分钟, 或就 CF15 和 Calu-3 而言为 1 小时。碘化物在细胞膜的两侧处于平衡状态。由机器人 (MultiPROBE, Packard) 操纵下列步骤: 用流出培养基冲洗上清以便消除胞外放射性。每分钟将上清收集到溶血管内并且用等体积 (500  $\mu\text{l}$ ) 培养基取代。对前 3 分钟内所取的样品不经添加药物, 它们能够获得稳定的基线, 表征  $\text{I}^-$  离子被动排出。在测试分子的存在下获得随后 7 份样品。在实验

结束时, 通过添加 500  $\mu\text{l}$  NaOH (0.1 N) / 0.1% SDS (30 分钟) 裂解细胞, 由此, 可以测定保留在细胞内部的放射性。使用  $\gamma$  计数器 (Cobra II, Packard) 以每分钟的计数 (cpm) 对溶血管内存在的放射性进行计数。将以 cpm 计的结果按照下列公式表示为放射性碘化物的排出速度形式 (R):  $R (\text{分钟}^{-1}) = [\ln(^{125}\text{I } t_1) - \ln(^{125}\text{I } t_2)] / (t_1 - t_2)$ , 其中  $^{125}\text{I } t_1$ :  $t_1$  时的 cpm;  $^{125}\text{I } t_2$ :  $t_2$  时的 cpm。将该碘化物流量表示为曲线形式。为了对因给予测试分子导致的碘化物排出, 计算能够清除基线流量的下列相对流量: 相对速度 ( $\text{分钟}^{-1}$ ) =  $R_{\text{峰值}} - R_{\text{基线值}}$ 。最终, 将这些结果标准化, 以便能够将不同药物的作用彼此进行比较。将结果表示为平均值  $\pm$  SEM 的形式。使用斯氏统计学检验以便比较药物与对照品的作用 (将相当于  $P < 0.01$  的值看作统计学上显著的)。

#### M4. 细胞毒性试验

MTT 毒性试验为基于线粒体脱氢酶将 MTT (黄色四氮唑盐) 代谢成甲臃 (紫色) 的能力的比色试验。然后通过分光光度法测定与转化的染料成比例的吸光度。将细胞在有待测活性剂存在的 96-孔平板中保温 2 小时。进行 3 种对照: 100% 活细胞: 不使用活性剂的细胞; 0% 活细胞: 保持接触空气的细胞; 空白: 不含细胞的培养基。用不含酚红的 RPMI 培养基冲洗细胞, 使得培养基的颜色不会干扰吸光度测定。然后将它们与 100  $\mu\text{l}$  补充了 MTT (0.5 mg/ml) 的 RPMI 溶液一起保温 4 小时。然后除去培养基, 添加 100  $\mu\text{l}$  的 DMSO 使得能够增溶转化的染料 (甲臃)。在 570 nm (紫色); 630 nm (背景噪声) 处通过分光光度法测定吸光度。为了消除背景噪声, 进行下列计算:  $OD_{\text{real}} = OD_{570\text{nm}} - OD_{630\text{nm}}$ 。然后将结果相对于对照组 (100% 和 0% 活细胞) 标准化并且以平均值  $\pm$  SEM 的形式表示。

## II) 结果

### R1. NB-DNJ 对 CF15 细胞中 *de1F508* 寻址的作用

在实验室中通过合并药理学、细胞成像、生物化学和电生理学试验手段在 *de1F508* 缺失纯合型人上皮 CF15 细胞上对 *de1F508*-CFTR 蛋

白的寻址进行研究。存在能够干扰 CFTR 寻址中涉及的某些因素的不同分子。作为葡糖苷酶 I 和 II 抑制剂并且被测试的 N-丁基-脱氧野尻霉素 (NB-DNJ) 就是这种情况。

对每次实验而言, 添加混合物(毛喉素 (Forskolin) 10  $\mu\text{M}$ 、染料木黄酮 30  $\mu\text{M}$ ) 在 CFTR 在膜上时使 CFTR 活化。因此, 如果 de1F508 寻址已经得到恢复, 那么可以观察到碘化物流出。将以直方图形式表示的结果已相对于参比处理(用 250  $\mu\text{M}$  MPB-91 将细胞处理 2 小时以上) 标准化, 将参比处理视为存在 100% CFTR 活性。我们证实在 37°C 下用葡糖苷酶抑制剂 N-丁基脱氧野尻霉素 (NB-DNJ) (如下所示的结构) 将 CF15 细胞处理 2 小时恢复了 de1F508 蛋白的寻址并且使得后者起离子转运蛋白的作用(附图 1)。

在不处理细胞的情况下, de1F508 蛋白为非膜的并且不存在所述混合物(毛喉素 10  $\mu\text{M}$ 、染料木黄酮 30  $\mu\text{M}$ ) 刺激的碘化物流出。测定 NB-DNJ 的  $\text{EC}_{50}$  (产生 50% 的最大有效性的分子浓度) 为 123 微摩尔(附图 2)。通过细胞成像, 我们确定用 NB-DNJ 处理后 de1F508 蛋白位于质膜部分内。

### R2. NB-DNJ 对 Calu-3 细胞中 CFTR 活性的作用

为了证实 NB-DNJ 对 de1F508 寻址的作用是特异性的和不会改变其它氯离子通道, 将 NB-DNJ 作为潜在激活物对 Calu-3 细胞测试。在 Calu-3 细胞上碘化物流出中获得了附图 3 中所示的结果。我们的对照品为毛喉素 (5  $\mu\text{M}$ , n=8) 和 MPB-91 (250  $\mu\text{M}$ , n=8)。NB-DNJ (n=8) 既不是这些细胞的野生型 CFTR 的激活物, 也不是其它阴离子转运的激活物, 因为在使用或不使用 NB-DNJ (基线) 的作用之间没有显著差异。

### R3. NB-DNJ 对 Calu-3 细胞中 CFTR 寻址的作用

为了证实 NB-DNJ 对 de1F508 寻址的作用的特异性, 将 NB-DNJ 作为 Calu-3 细胞上野生型 CFTR 寻址的调节剂测试。在用 NB-DNJ (500  $\mu\text{M}$ ) 处理 2 小时的 Calu-3 细胞上碘化物流出中获得了附图 4 中所示的结

果。在附图 4 中，基线相当于未处理且未用 MPB-91 刺激的细胞。没有刺激碘化物流出。第二个对照组相当于未经处理，但使用 250  $\mu\text{M}$  MPB-91 刺激的细胞。在这种情况下，CFTR 被活化并且测定了碘化物流出。第三个对照组相当于用 MPB-91 在 37°C 下处理 2 小时，然后用 250  $\mu\text{M}$  MPB-91 刺激的细胞。在该实验条件下的 CFTR 活性与两种其它实验情况相比没有显著性差异。最后，当在 37°C 下用 500  $\mu\text{M}$  NB-DNJ 将 Calu-3 细胞处理 2 小时并且用 250  $\mu\text{M}$  MPB-91 刺激时，CFTR 的活性水平未受影响。这些结果证实 NB-DNJ 不会影响野生型 CFTR 寻址途径或其它氯离子通道，也不会改变人非-CF 肺上皮细胞中的 CFTR 活性。

#### R4. 不同抑制剂的寻址途径的细胞毒性

为了测试 NB-DNJ 的细胞毒性，将 CHO-WT 细胞与不同浓度的抑制剂一起保温 2 小时，此后使用 MTT 进行细胞存活力试验。附图 5 表示了结果的概括。结果证实细胞对所有浓度的 NB-DNJ 均能保持存活。该分子由此表现出无细胞毒性。

#### R5. NB-DNJ 类似物对 CF15 细胞中 *de1F508* 寻址的作用

我们比较了 N-丁基-脱氧野尻霉素家族 (NB-DNJ 或 nB-DNJ) 的不同化合物的作用。这些产品如附图 6 中所示。对每一实验而言，添加混合物 (毛喉素 10  $\mu\text{M}$ 、染料木黄酮 30  $\mu\text{M}$ ) 在 CFTR 位于膜上时使得 CFTR 活化。附图 7 中所示的结果表明在 37°C 下用 100  $\mu\text{M}$  of DNJ、nB-DMJ 或 DMJ 将 CF15 细胞处理 2 小时恢复了 *de1F508* 蛋白的寻址并且使得后者作为离子转运蛋白起作用 (附图 7)。相反，化合物 DGJ、nB-DGJ、DFJ 和 nB-DFJ 对 *de1F508* 的寻址没有显著作用 (附图 7)。对每一化合物 (DNJ、DMJ 和 nB-DMJ) 而言，经测定  $\text{EC}_{50}$  (产生 50% 的最大有效性的分子浓度) 分别为 >250  $\mu\text{M}$ ，134  $\mu\text{M}$  和 113  $\mu\text{M}$ 。

### III) 结论

流出试验揭示出导致 *de1F508* 在内质网中蓄积的 NB-DNJ 允许了该

蛋白的重新膜寻址并且由此代表了将 delF508 在人肺上皮细胞中重新寻址的重要药理学手段。NB-DNJ 使得 delF508 特异性膜寻址,而不会影响该蛋白的离子转运活性,并且对其它氯离子通道没有影响,对细胞存活力也没有影响。

### 文献目录

BECQ 等 (1999) 《生物化学杂志》 (Journal of Biological Chemistry) 274, 27415-27425。

CHENG 等 (1990) 《细胞》 (Cell) 63, 827-834。

COX 等 (2000) 《柳叶刀》 (The Lancet) 355, 1481-1485。

DORMER 等 (2001)《细胞科学杂志》(Journal of Cell Science)114, 4073-4081。

DWEK 等 (2000) 专利 WO 00/62779。

ELLGAARD & HELENIUS (2003). 《分子细胞生物学》 (Molecular Cell Biology), 4, 181-191。

FIEDLER & SIMONS K. (1995) 《细胞科学杂志》 (Journal of Cell Science)109, 271-276。

GELMAN 等 (2002) 《生物化学杂志》 (Journal of Biological Chemistry)277, 11709-11714。

PLATT 等 (1994) 《生物化学杂志》 (Journal of Biological Chemistry)269, 27108-27114。

PLATT 等 (2001) 《遗传与代谢疾病杂志》 (J. Inherit. Metab. Dis.)24, 275-290。

RIORDAN 等 (1989) 《科学》 (Science) 245, 1066-1073。

TSUI 等 (1985) 《科学》 (Science)230, 1054-1057。

WEI 等 (1996) 《细胞生理学杂志》 (Journal of Cellular Physiology), 168, 373-384。

### 附图说明

#### 附图 1: NB-DNJ 对 de1F508 寻址的作用

用 NB-DNJ (500  $\mu\text{M}$ ) 将 CF15 细胞预处理 2 小时。将 MPB-91 (250  $\mu\text{M}$ ) 的作用看作在本试验中代表 100 %。在用 fsk 10  $\mu\text{M}$  + Gst 30  $\mu\text{M}$  刺激后的碘化物流出中测定 CFTR 活性(对每种条件而言,  $n=8$ )。Ns: 非显著性差异。\*\*\*: 显著性差异  $P<0.001$

#### 附图 2: 表示 NB-DNJ 对 de1F508 寻址的作用的示意图

用不同浓度的 NB-DNJ 将 CF15 细胞预处理 2 小时。在用 fsk 10  $\mu\text{M}$  + Gst 30  $\mu\text{M}$  刺激后的碘化物流出中测定 CFTR 活性(对每种浓度而言,  $n=4$ )。

#### 附图 3: NB-DNJ 对 Calu-3 细胞的阴离子转运的作用

在用毛喉素(fsk) 5  $\mu\text{M}$ 、MPB-91 250  $\mu\text{M}$ 、NB-DNJ 500  $\mu\text{M}$  刺激后的碘化物流出中测定 CFTR 活性(对每种条件而言,  $n=8$ )。应注意 fsk 和化合物 MPB-91 活化了该细胞中的碘化物流出, 但 NB-DNJ 没有导致这种活化, NB-DNJ 没有作用。Ns: 无显著性差异。\*\*\*: 显著性差异  $P<0.001$

#### 附图 4: 使用 NB-DNJ 处理 Calu-3 细胞的作用

在 37°下将 Calu-3 细胞与 500  $\mu\text{M}$  NB-DNJ、与 MPB-91 250  $\mu\text{M}$  一起预保温 2 小时。未处理的细胞: 未处理。基线表示细胞既未处理, 也未刺激。在用 MPB-91 250  $\mu\text{M}$  刺激后在碘化物流出中测定 CFTR 活性(对每种条件而言,  $n=8$ )。应注意用 NB-DNJ 处理不具有任何作用, 因为对流出刺激水平对三种条件而言是相同的。Ns: 无显著性差异。

#### 附图 5: NB-DNJ 对 CHO 细胞的细胞毒性作用

应注意在 5 和 50  $\mu\text{M}$  下未测定到细胞毒性。看起来在 500  $\mu\text{M}$  下具有低毒性。将细胞处理 2 小时。Ns: 无显著性差异。\*\*\*: 显著性差异  $P<0.001$

---

附图 6: N-丁基-脱氧野尻霉素 (NB-DNJ 或 nB-DNJ) 和不同 NB-DNJ 家族化合物的结构

附图 7: NB-DNJ 和 NB-DNJ 类似物对 CF15 细胞中 de1F508 寻址的作用

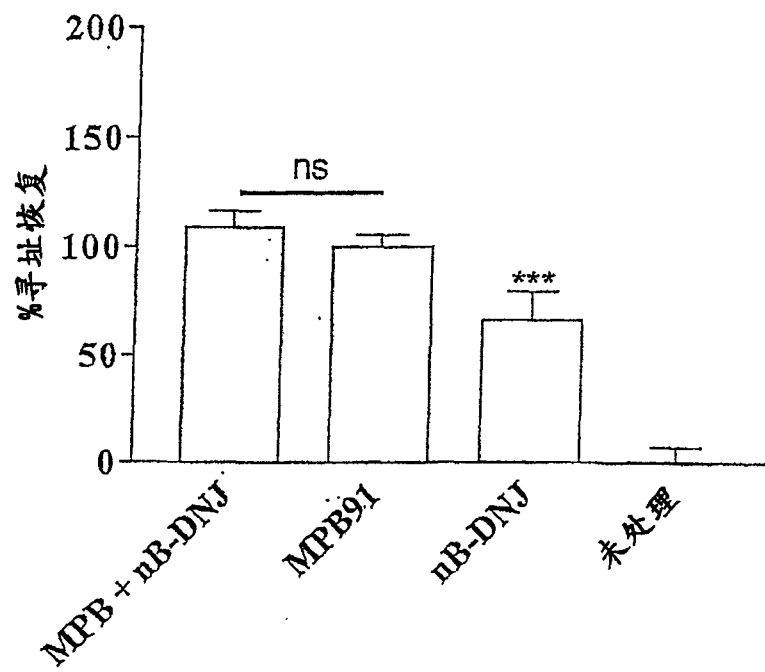


图1

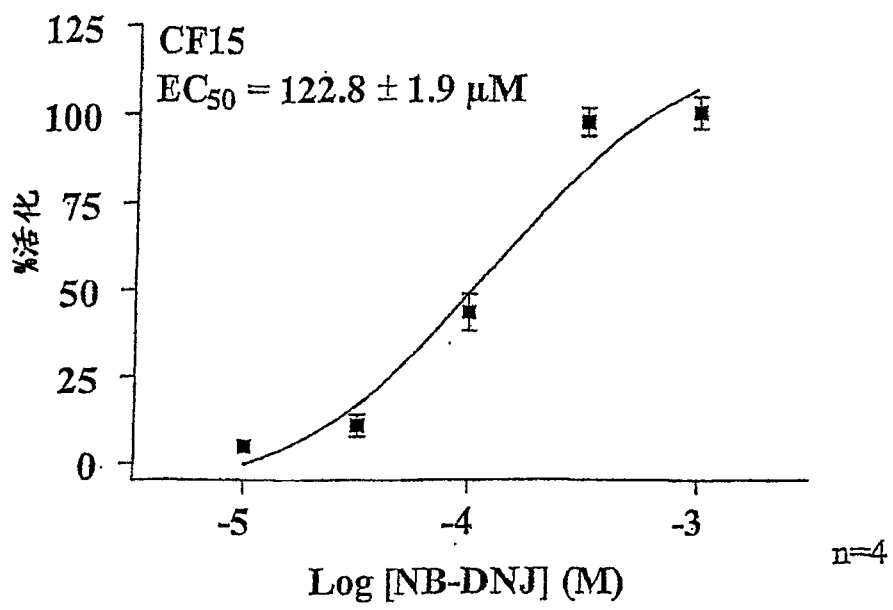


图 2

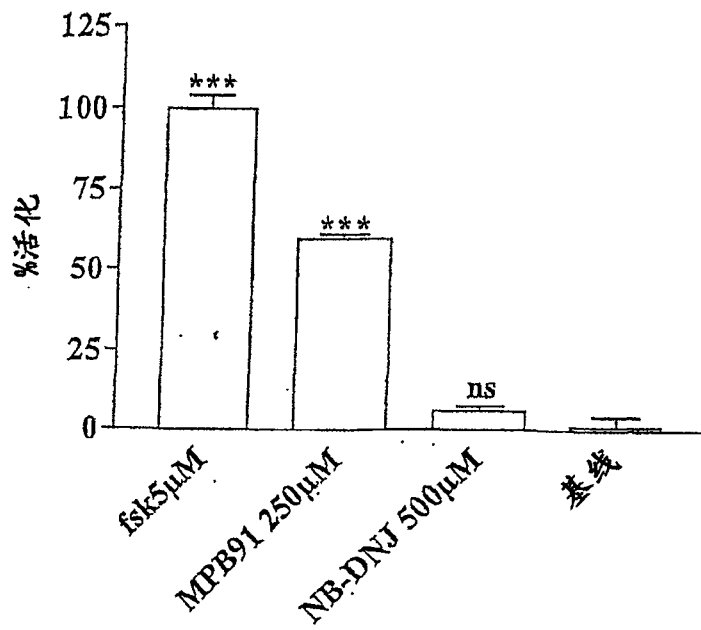


图 3

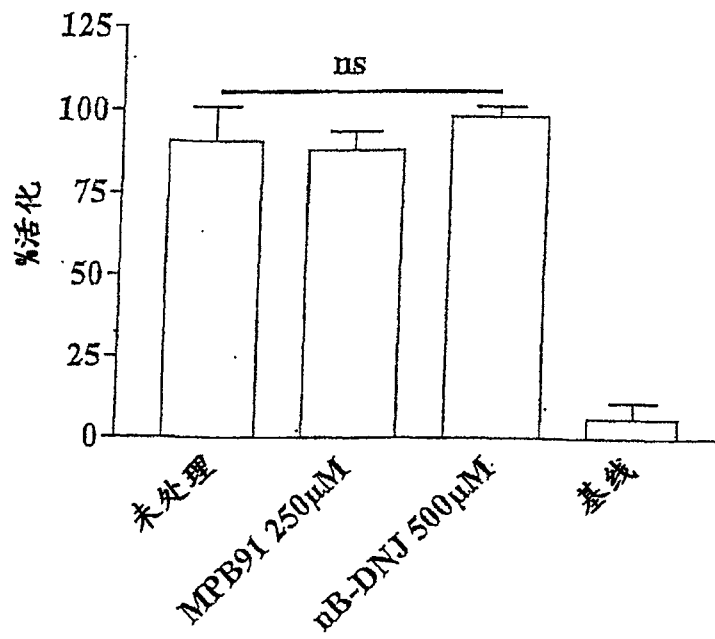


图 4

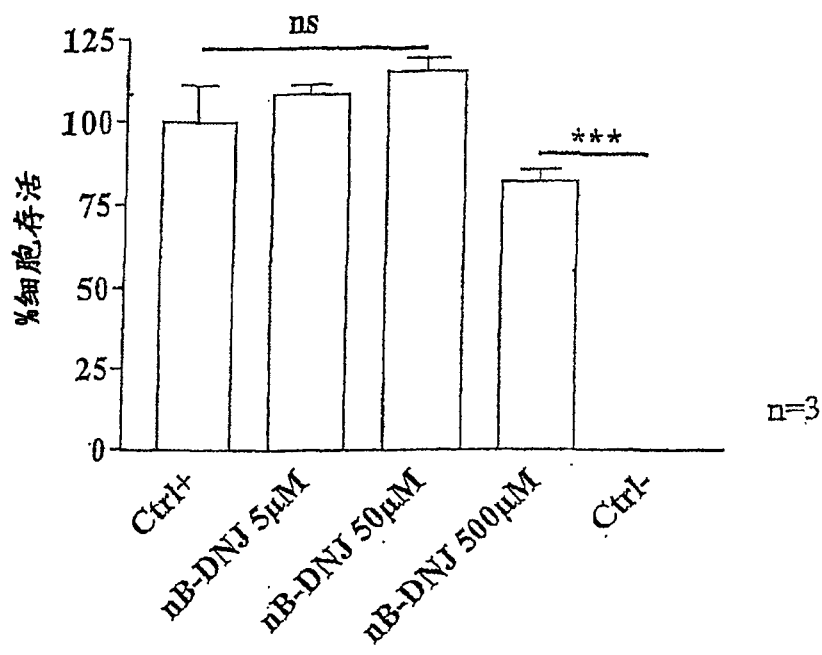


图5

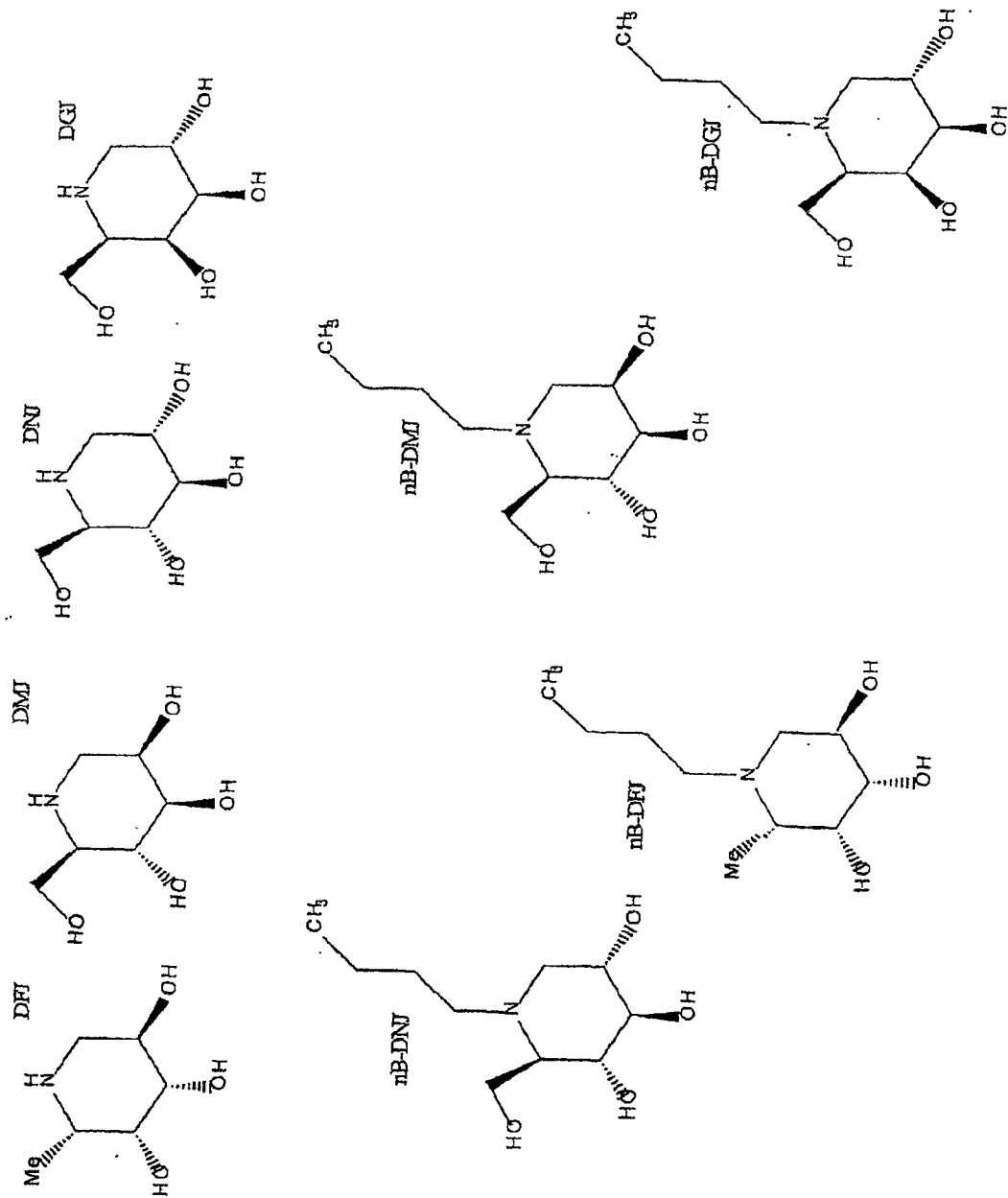


图 6

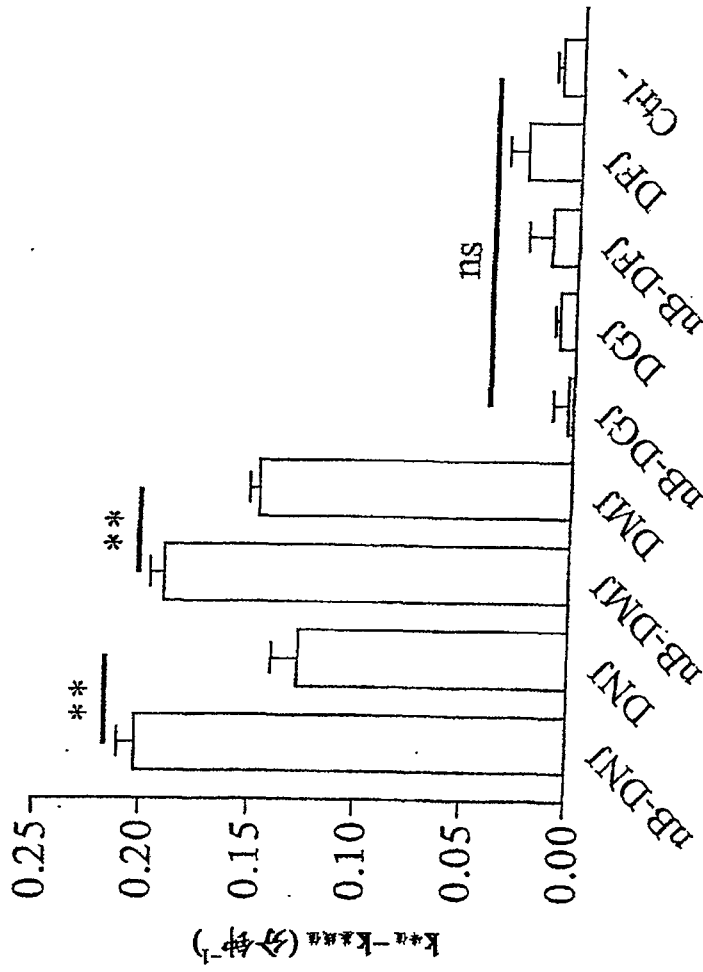


图7