(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 114450003 B
(45)授权公告日 2024.06.21

(21)申请号 202080067722.2
(22)申请日 2020.09.27
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114450003 A
(43)申请公布日 2022.05.06
(66)本国优先权数据
PCT/CN2019/108548 2019.09.27 CN
202011009274.9 2020.09.23 CN
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.03.25
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2020/118044 2020.09.27
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/057955 ZH 2021.04.01
(73)专利权人 江苏挪贝肽医药科技有限公司
地址 226400 江苏省南通市如东县珠江路888号
(72)发明人 黄福德 王文安 焦常平 黄长德 黄体德
(74)专利代理机构 北京市君合律师事务所 11517
专利代理师 赵昊 顾云峰
(51)Int.Cl.
A61K 31/285(2006.01)
A61K 31/7052(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 25/18(2006.01)
A61P 25/22(2006.01)
A61P 25/24(2006.01)
(56)对比文件
CN 109966281 A,2019.07.05
WO 2016173562 A1,2016.11.03
审查员 陈典

权利要求书1页 说明书35页 附图5页

(54)发明名称

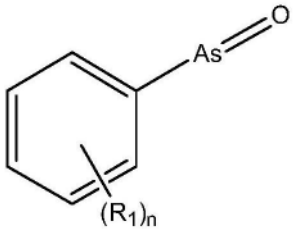
一种治疗心境障碍的方法

(57)摘要

提供了PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物的抑制剂以及用该抑制剂预防或治疗心境障碍的方法。

CN 114450003 B

1.PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物抑制剂在制备用于预防或治疗心境障碍的药物中的用途,所述预防或治疗包括诊断客体具有心境障碍,随后向需要其的客体施用有效量的所述药物,其中所述心境障碍是焦虑症或抑郁症,并且所述PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物抑制剂具有式(I)所示的结构或者其药学上可接受的盐:

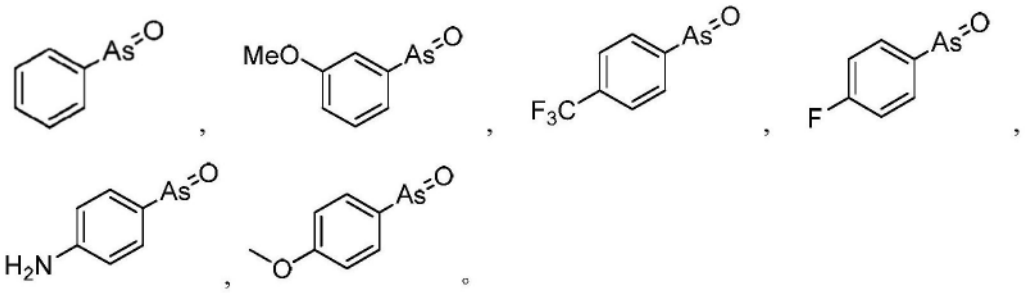


式(I)

其中所述R_1各自独立的选自H、氘、卤素、氨基、C_{1-6}烷氧基或C_{1-6}卤代烷基,其中n为1。

2.根据权利要求1所述的用途,其中所述R_1位于-As(O)基团的邻位和/或者对位。

3.根据权利要求1所述的用途,其中所述PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物抑制剂选自由以下化合物组成的组:



4.根据权利要求1所述的用途,其中所述客体是人或者哺乳动物。

5.根据权利要求1所述的用途,其中所述心境障碍是由神经退行性疾病、中风或恶性肿瘤引起的焦虑症或抑郁症。

6.根据权利要求1所述的用途,其中所述心境障碍是神经退行性疾病引起的焦虑症或抑郁症。

7.根据权利要求1所述的用途,其中所述预防或治疗进一步包括向需要其的客体施用第二试剂。

8.根据权利要求7所述的用途,其中所述第二试剂是用于治疗心境障碍的试剂。

9.根据权利要求7所述的用途,其中所述第二试剂是用于治疗神经退行性疾病、中风或恶性肿瘤的试剂。

10.根据权利要求7所述的用途,其中所述PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物抑制剂在所述第二试剂之前、之后或同时施用。

一种治疗心境障碍的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及预防或治疗心境障碍的方法,所述方法包括向需要其的客体施用有效量的PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物抑制剂。

背景技术

[0002] 心境障碍是以焦虑、抑郁或躁郁为代表的精神失常,近年来有增加的倾向,成为很大的社会问题。焦虑和抑郁是最常见的精神障碍,并且是其它神经精神疾病、中风、肿瘤等的并发症。超过70%的痴呆患者具有抑郁和/或焦虑症状(Selbaek,G.,K.Engedal and S.Bergh,The prevalence and course of neuropsychiatric symptoms in nursing home patients with dementia:a systematic review.J Am Med Dir Assoc,2013.14(3):p.161-9)。

[0003] 目前,临床上抗焦虑抑郁的药物整体上疗效不理想,特别是对重度焦虑抑郁、神经退行性疾病和中风后抑郁、以及恶性肿瘤患者的焦虑抑郁的疗效果差或基本无效,而且还有起效慢、副作用广泛又严重的缺点。

[0004] 在本申请之前,通常认为磷酸肌醇(PI)水平和磷酸肌醇-3激酶(PI3K)的酶活性降低与抑郁症相关。PI3K缺乏增加了小鼠的焦虑水平,而几类传统抗抑郁药增加了与焦虑和抑郁相关的脑区磷酸肌醇的再合成(参见,例如:Di Paolo,G.and P.De Camilli,Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics.Nature,2006.443(7112):p.651-7;Saito,T.,et al.,Polymorphism screening of PIK4CA:possible candidate gene for chromosome 22q11-linked psychiatric disorders.Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet,2003.116B(1):p.77-83;Balla,A.and T.Balla,Phosphatidylinositol 4-kinases:old enzymes with emerging functions.Trends Cell Biol,2006.16(7):p.351-61)。

[0005] 令人惊讶的是,本申请的发明人发现:在多种疾病模型小鼠中,通过遗传方法降低PI4KIIIα或用于锚定PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物的Efr3a的表达,或者应用PI4KIIIα抑制剂能减轻小鼠的焦虑或抑郁程度。所以本申请提供了一个潜在抗心境障碍的靶点(即,PI4KIIIα蛋白复合体)以及一系列治疗心境障碍的潜在药物。

发明内容

[0006] 在一个方面,本申请提供了一种用于预防或治疗心境障碍的方法,包括向需要其的客体施用有效量的PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物抑制剂。

[0007] 在一些实施方案中,所述PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物抑制剂是小分子化合物、抗体、RNAi分子或者反义核酸。

[0008] 在一些实施方案中,所述PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物抑制剂是EFR3特异性抑制剂。

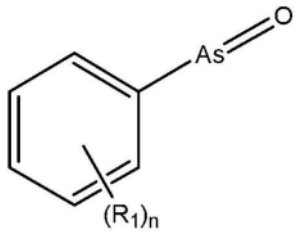
[0009] 在一些实施方案中,所述EFR3特异性抑制剂是EFR3a特异性抑制剂或EFR3b特异性

抑制剂。

[0010] 在一些实施方案中,所述PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物抑制剂是PI4KIIIα特异性抑制剂。

[0011] 在一些实施方案中,所述PI4KIIIα特异性抑制剂是小分子化合物。

[0012] 在一些实施方案中,所述小分子化合物具有式(I)所示的结构或者其药学上可接受的盐,

[0013] 

式(I)

[0014] 其中,R_1各自独立的选自(a)H、氘、卤素、硝基、氰基、羟基、氨基、氨基甲酰基、C_{1-6}烷基、C_{2-6}炔基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}亚烷基-NH_2、C_{1-6}亚烷基-NH-C(O)H、-As(O)、-N=NH、N-(C_{1-6}烷基)氨基、N,N-(C_{1-6}烷基)$_2$氨基、-NH-C(O)H、-NH-S(O)$_2$H、-C(O)OH、-OC(O)H、-SH、-S(O)$_2$H、-S(O)$_2$-NH或杂环基,并且可选的被R_2或R_3取代,其中R_2和R_3各自独立的选自氨基、C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、C_{1-6}卤代烷基、N-(C_{1-6}烷基)氨基、N-(6-12元芳香基)氨基、N,N-(C_{1-6}烷基)$_2$氨基、C_{3-6}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_5、-C(O)OR_4、6-12元的芳香基、C_{1-6}烷基、C_{2-6}炔基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、C_{1-6}卤代烷基、3-6元的杂环基、C_{3-6}环烷基或Bn-O-取代,并且R_4是C_{1-6}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、C_{1-6}烷基、C_{2-6}炔基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、C_{1-6}卤代烷基、3-6元的杂环基、C_{3-6}环烷基或Bn-O-取代,R5选自H、C_{1-6}烷基、C_{2-6}炔基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基或C_{1-6}卤代烷基,或

[0015] (b)两个相邻碳原子上的R_1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、C_{1-6}烷基、C_{2-6}炔基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、C_{1-6}卤代烷基、3-6元的杂环基、C_{3-6}环烷基或Bn-O-取代,

[0016] 其中,n为0-5的整数。

[0017] 在一些实施方案中,所述R_1各自独立的选自H、氘、卤素、硝基、氰基、羟基、氨基、氨基甲酰基、C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、C_{1-6}卤代烷基、-As(O)、N-(C_{1-6}烷基)氨基、N,N-(C_{1-6}烷基)$_2$氨基或-C(O)OR_6,其中n为0-2的整数,并且R_6是C_{1-6}的烷基。

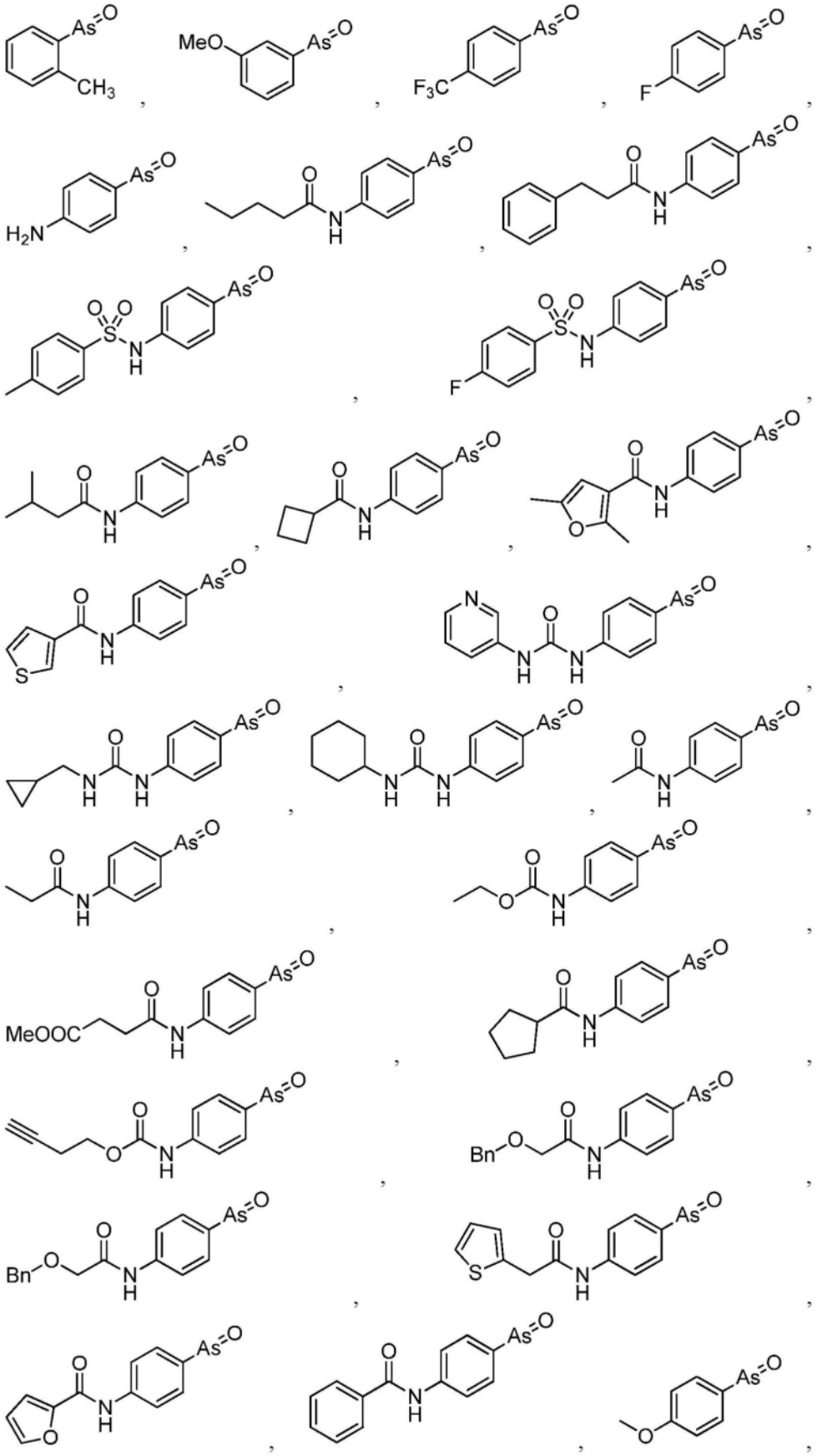
[0018] 在一些实施方案中,所述R_1各自独立的选自H、氘、卤素、硝基、氰基、羟基、氨基、C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、C_{1-6}卤代烷基或-As(O),其中n为0-2的整数。

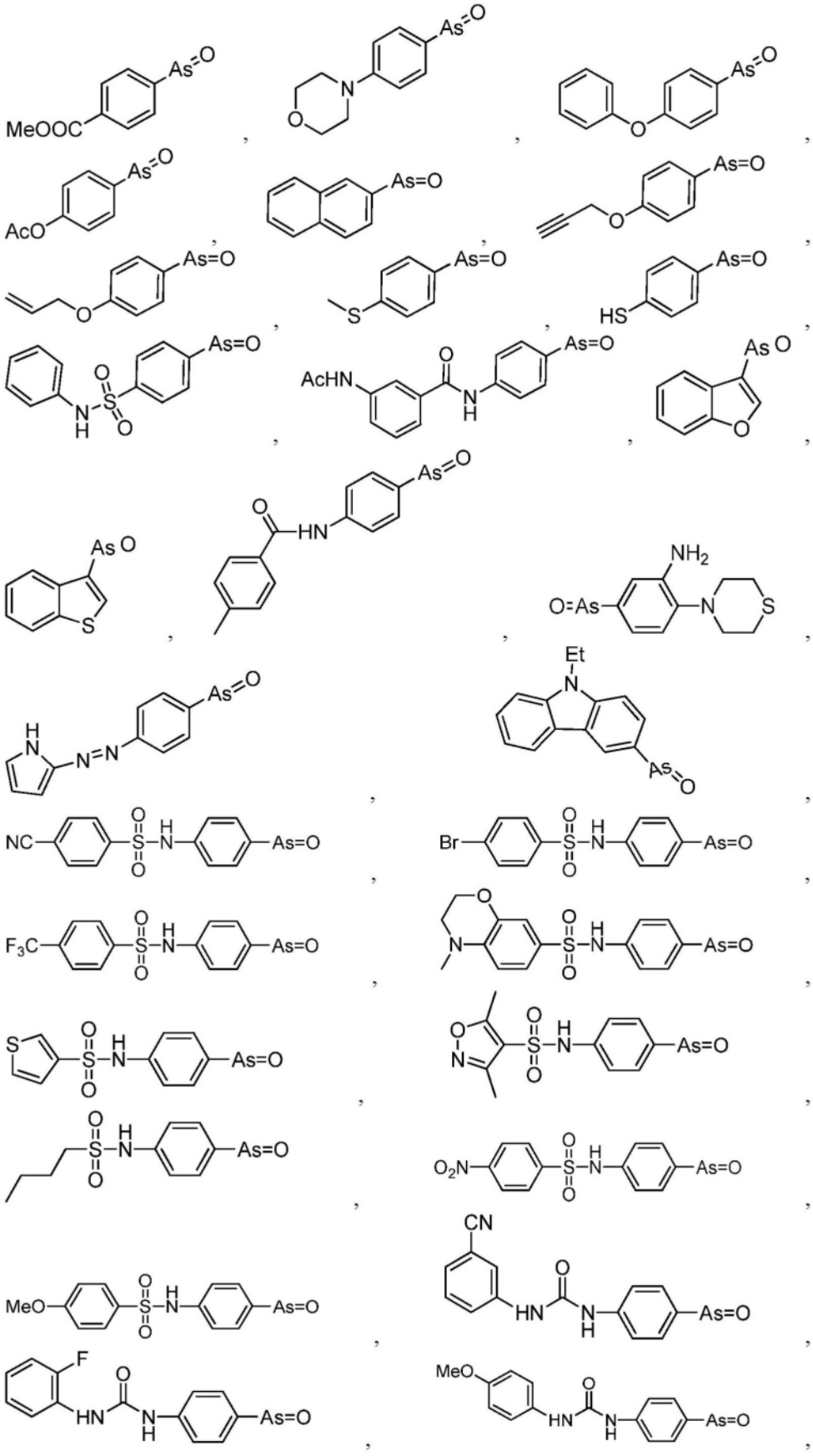
[0019] 在一些实施方案中,所述R_1各自独立的选自H、氘、卤素、氨基、C_{1-6}烷氧基或C_{1-6}卤代烷基,其中n为1。

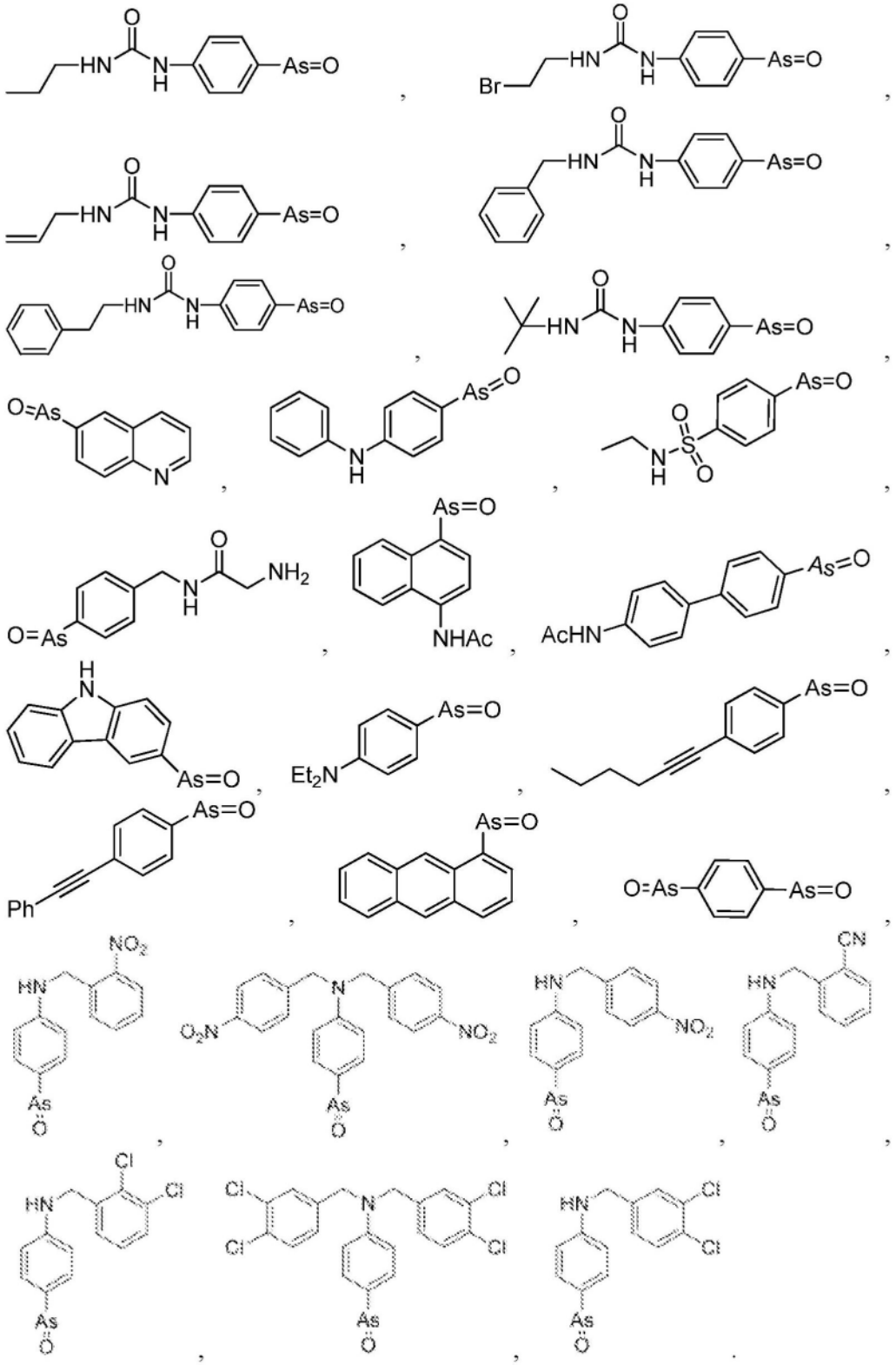
[0020] 在一些实施方案中,所述R_1位于-As(O)基团的邻位和/或者对位。

[0021] 在一些实施方案中,n是0。

[0022] 在一些实施方案中,所述小分子化合物选自由以下化合物组成的组:

[0023] 

[0024] 

[0025] 

[0026] 在一些实施方案中,所述抗体是单克隆抗体或者多克隆抗体。

[0027] 在一些实施方案中,所述抗体是嵌合抗体、人源化抗体或者全人源抗体。

[0028] 在一些实施方案中,所述RNAi分子是小干扰RNA(siRNA)、短发夹RNA(shRNA)或微小RNA(miRNA)的。

[0029] 在一些实施方案中,所述RNAi分子的长度为18-100碱基。

[0030] 在一些实施方案中,所述RNAi分子被修饰以增强其稳定性。

[0031] 在一些实施方案中,所述客体是人或者哺乳动物。

[0032] 在一些实施方案中,所述心境障碍是情绪高昂、情绪低落或者情绪在高昂和低落之间循环。

[0033] 在一些实施方案中,所述心境障碍是焦虑症、抑郁症、精神分裂症或躁狂症。

[0034] 在一些实施方案中,所述心境障碍是由神经退行性疾病、中风或恶性肿瘤引起的心境障碍。

[0035] 在一些实施方案中,所述心境障碍是神经退行性疾病引起的焦虑症或抑郁症。

[0036] 在一些实施方案中,所述PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物抑制剂通过口服、皮下、肌内或静脉施用。

[0037] 在一些实施方案中,其进一步包括在向客体施用有效量的PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物抑制剂之前,诊断所述客体具有心境障碍。

[0038] 在一些实施方案中,其进一步包括向需要其的客体施用第二试剂。

[0039] 在一些实施方案中,所述第二试剂是用于治疗心境障碍的试剂。

[0040] 在一些实施方案中,所述第二试剂是用于治疗神经退行性疾病、中风或恶性肿瘤的试剂。

[0041] 在一些实施方案中,所述PI4KIIIαα/FAM126/TTC7复合物抑制剂在所述第二试剂之前、之后或同时施用。

[0042] 在另一方面,本申请提供了本申请所述的PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物抑制剂在制备用于预防或治疗心境障碍的药物中的用途。

[0043] 在又一方面,本申请提供了本申请所述的PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物抑制剂用于预防或治疗心境障碍的用途,包括向需要其的客体施用有效量的PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物抑制剂。

附图说明

[0044] 图1示出了各组大鼠在CUMS造模及给药阶段的体重变化。

[0045] 图2示出了PI4KIIIα的mRNA表达水平与抑郁程度呈线性正相关。

[0046] 图3示出了PI4KIIIα抑制剂PAO能够预防或减轻APP/PS1小鼠的焦虑行为(WT是指野生型小鼠,“APP/PS1 0”是指未用PAO治疗的APP/PS1小鼠,“APP/PS1 0.3”是指用PAO治疗的小鼠,剂量0.3mg/kg体重。“*”代表P＜0.05)

[0047] 图4示出了PAO和Aricept对APP/PS1小鼠在水迷宫试验中的影响效果。

[0048] 图5示出了PAO和Aricept对APP/PS1小鼠在新奇抑制摄食实验中的影响效果。

[0049] 图6示出了减少Efr3a的mRNA表达对APP/PS1小鼠在黑白箱实验中的影响效果。

[0050] 图7示出了PAO衍生物PI04、PI05和PI06对ICR小鼠在被迫游泳实验中影响。黑色和灰色柱分别是各组小鼠第一和第二次游泳实验后4分钟内不动的时间总和。

[0051] 图8示出了PAO对小鼠神经元损伤导致的抑郁的预防或减轻效果。

[0052] 图9示出了PAO及其衍生物对野生型小鼠的焦虑行为的抑制效果。

[0053] 图10示出了果蝇中Hyccin(FAM126)、RBO、TTC7和P4KIIIα的相互作用。图10A:rbo-egfp转基因以及野生型(wt)成年果蝇头匀浆的抗GFP抗体的免疫共沉淀物的考马斯亮蓝染

色。RBO-GFP的表达受rbo基因驱动子所驱动;图10B:免疫共沉淀-免疫印迹法(WB)显示成年野生型果蝇内源性Hyccin、RBO和PI4KIIIα(PI4K)相互共免疫沉淀;图10C:免疫印迹法(WB)显示野生型和hyccin$^{-/-}$,rbo$^{-/-}$,ttc7$^{*/*}$突变果蝇胚胎细胞膜和胞浆中RBO和Hyccin的表达水平。RBO只表达在细胞膜上,且未出现在以上三个纯合突变体的胚胎中。Hyccin主要出现在胞浆中,其在rbo$^{-/-}$和ttc7$^{*/*}$突变体的胞浆中水平无明显改变,说明Hyccin的表达独立于RBO和TTC7的表达;图10D:免疫印迹法(WB)显示在rbo$^{-/+}$和hyccin$^{-/+}$成年杂合突变果蝇中Hyccin的表达量,进一步显示Hyccin的表达独立于RBO;图10E:WB显示在相同基因背景的野生型(wt)、rbo$^{-/+}$以及hyccin$^{-/+}$杂合突变成年果蝇,以及对照(ctrl)和4种pi4kIIIα无义突变杂合体(pi4k$^{FQ88/+}$、pi4k$^{FY24/+}$、pi4k$^{GJ86/+}$以及pi4k$^{GS27/+}$)成年果蝇中PI4KIIIα和RBO的总水平。其中4个pi4kIIIα无义突变体是通过对照果蝇(ctrl)进行基因突变剂处理和筛选所得到的。

具体实施方式

[0054] 本发明的如下描述仅旨在说明本发明的各个实施方案。所描述的具体实施例不应被理解为是对本发明的范围的限制。在不偏离本发明的精神和实质的情况下,本领域技术人员可进行各种等同替代、改变或变化,而且应了解本文也包括这些等同实施方案。本文引用的所有文献,包括出版物、专利和专利申请等以全文引用方式并入本文。

[0055] 在本申请的一个方面,提供了一种用于预防或治疗心境障碍的方法,包括向需要其的客体施用有效量的PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物抑制剂。

[0056] PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物抑制剂

[0057] 本申请所用的术语“PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物”是指由PI4KIIIα、FAM126和TTC7三种蛋白组成的复合物,其定位于细胞质膜上并参与体内脂质磷酸化。EFR3a或EFR3b是将PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物锚定于细胞质膜的重要分子。

[0058] 本申请所用的术语“PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物抑制剂”是指能够降低、减少、消除PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物活性的任何物质。在一些实施方案中,PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物抑制剂是抑制PI4KIIIα或FAM126或TTC7或EFR3基因的转录或翻译的抑制剂。在另一些实施方案中,PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物抑制剂是抑制PI4KIIIα磷酸化脂质能力的抑制剂。在另一些实施方案中,PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物抑制剂是抑制PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物形成的抑制剂。在另一些实施方案中,PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物抑制剂是抑制PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物锚定于细胞质膜的抑制剂。

[0059] 在一些实施方案中,所述PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物抑制剂能够将PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物的活性降低至少5%、10%、20%、40%、50%、80%、90%、95%或更多。

[0060] 在本申请中,当“活性”与增加或降低一同使用的时候,是指检测到的功能活性,其可以表现为含量变化、或者含量不变但是功能活性变化。在一些实施方式中,所述活性与脂质磷酸化相关。在一些实施方式中,所述活性与心境障碍相关。

[0061] 在一些实施方案中,所述PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物抑制剂是小分子化合物、抗体、RNAi分子或者反义核酸。

[0062] 在一些实施方案中,所述PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物抑制剂是小分子化合物。

[0063] 本申请所用的术语“小分子化合物”是指一种分子量小于3000、2500、2000、1500、

1000或500道尔顿的有机化合物,该有机化合物可以是天然的或者是化学合成的。

[0064] 在一些实施方案中,所述PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物抑制剂是抗体。

[0065] 本申请所用的术语“抗体”包含可结合某特定抗原的任意免疫球蛋白、单克隆抗体、多克隆抗体、多价抗体、双价抗体、单价抗体或抗体。本申请中的“抗体”一词旨在广泛地涵盖常规的四链抗体以及不具有四条链的较不常规的抗体(例如,天然缺乏轻链的抗体)。

[0066] 一个常规的完整抗体是异四聚体,其包含两条重(H)链和两条轻(L)链。哺乳动物的重链可分为α、δ、ε、γ和μ,每条重链由一可变区(V_H)和第一、第二、第三恒定区(分别为C_{H1}、C_{H2}、C_{H3})组成;哺乳动物的轻链可分为λ或κ,每条轻链由一可变区(V_L)和一恒定区组成。常规抗体呈“Y”型,“Y”型结构的颈部由两条重链的第二和第三恒定区组成,其通过二硫键结合。“Y”型结构的每条臂包含其中一条重链的可变区和第一恒定区,其与一条轻链的可变区和恒定区结合。轻链和重链的可变区决定抗原的结合。每条链的可变区均含有三个高变区,称互补决定区(CDR)(轻链的CDR包含LCDR1、LCDR2、LCDR3,重链的CDR包含HCDR1、HCDR2、HCDR3)。本申请中公开的抗体和抗原结合片段的CDR边界可通过Kabat,IMGT,Chothia或Al-Lazikani命名法命名或识别(Al-Lazikani,B.,Chothia,C.,Lesk,A.M.,J.Mol.Biol.,273(4),927(1997);Chothia,C.等,J Mol Biol.Dec 5;186(3):651-63(1985);Chothia,C和Lesk,A.M.,J.Mol.Biol.,196,901(1987);Chothia,C.等,Nature.Dec 21-28;342(6252):877-83(1989);Kabat E.A.等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,马里兰州Bethesda(1991);Marie-Paule Lefranc et al,Developmental and Comparative Immunology,27:55-77(2003);Marie-Paule Lefranc et al,Immunome Research,1(3),(2005);Marie-Paule Lefranc,Molecular Biology of B cells(second edition),chapter 26,481-514,(2015))。其中,三个CDR由被称为框架区(FR)的侧面连续部分间隔开,框架区比CDR更加高度保守并形成一个支架支撑超变环。重链和轻链的恒定区与抗原结合无关,但具有多种效应功能。

[0067] 抗体依据重链恒定区的氨基酸序列可以分成几类。根据是否含有α、δ、ε、γ和μ重链,抗体可分别分为五个主要的分类或异构体:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM。几个主要的抗体分类还可分为亚类,如IgG1(γ1重链)、IgG2(γ2重链)、IgG3(γ3重链)、IgG4(γ4重链)、IgA1(α1重链)或IgA2(α2重链)等。

[0068] 在一些实施方案中,所述抗体是全长抗体或抗原结合片段。

[0069] 本申请中使用的术语“抗原结合片段”指由含有一个或多个CDR的抗体部分但不具有完整抗体结构的抗体片段所形成的一种抗体片段。抗原结合片段的例子包括,但不限于,Fab片段、Fab′片段、$F(ab')_2$片段、Fv片段、单链抗体分子(scFv)、scFv二聚体、骆驼化单域抗体(camelized single domain antibody)和纳米抗体。抗原结合片段可以与母体抗体结合相同的抗原。

[0070] 抗体的“Fab”片段是指由一条轻链(包括可变区和恒定区)和一条重链的可变区和第一恒定区经二硫键结合起来的那部分抗体。

[0071] “Fab′”片段是指包含了部分铰链区的Fab片段。

[0072] “F(ab′)2”片段是指Fab′的二聚体。

[0073] 抗体的“Fv”片段由一条轻链的可变区和一条重链的可变区组成。

[0074] “单链抗体分子”或“scFv”是指由轻链可变区与重链可变区直接相连或通过一个肽链连接而成的工程抗体。详细介绍可以参见例如Huston JS等,Proc Natl Acad Sci USA、85:5879(1988)。

[0075] “scFv二聚体”是指由两个scFv形成的聚合体。

[0076] “骆驼化单域抗体(Camelized single domain antibody)”(又称为“重链抗体”或“HCAb(Heavy-chain-only antibodies,HCAb)”)是指含有两个重链可变区而不含有轻链的抗体(Riechmann L和Muyldermans S.,J Immunol Methods.Dec 10;231(1-2):25-38(1999);Muyldermans S.,J Biotechnol.Jun;74(4):277-302(2001);WO94/04678;WO94/25591;U.S.Patent No.6,005,079)。重链抗体最初从驼科(骆驼、单峰驼和美洲驼)衍生得到。虽然缺失轻链,但是骆驼化抗体具有抗原结合的全部功能(参见Hamers-Casterman C.等人,Nature.363(6428):446-8(1993);Nguyen VK.等,“Heavy-chain antibodies in Camelidae;a case of evolutionary innovation,”Immunogenetics.54(1):39-47(2002);Nguyen VK.等人,Immunology.109(1):93-101(2003)),其全部内容通过引用并入本申请。

[0077] “纳米抗体”是由一个来自重链抗体的重链可变区和两个恒定区CH2和CH3组成。

[0078] 在一些实施方案中,所述抗体是单克隆抗体或者多克隆抗体。

[0079] 在一些实施方案中,所述抗体是鼠源抗体、兔源抗体、嵌合抗体、人源化抗体或者全人源抗体。

[0080] 本申请中使用的术语“全人源”当用于抗体或抗原结合片段时,是指所述抗体或抗原结合片段的氨基酸序列对应于由人或人免疫细胞生产的、或从例如利用人源抗体库的转基因非人动物等非人来源衍生的抗体的氨基酸序列,或者其他编码人源抗体的序列。

[0081] 本申请中使用的术语“人源化”当用于抗体或抗原结合片段时,是指包括来源于非人动物的CDR、来源于人的FR区,以及来源于人的恒定区(当适用时)的抗体或抗原结合片段。由于人源化的抗体或抗原结合片段具有更低的免疫原性,其在某些实施方式中可用作人的治疗剂。在某些实施方式中,所述非人动物是哺乳动物(例如,小鼠、大鼠、兔、山羊、绵羊、豚鼠或仓鼠)。在某些实施方式中,所述人源化抗体或抗原结合片段除了CDR序列是非人源的以外,基本上全部由人源序列组成。

[0082] 本申请中使用的术语“嵌合”当用于抗体或抗原结合片段时,是指具有来源于一种物种的重链和/或轻链的一部分,而所述重链和/或轻链其余部分来源于不同物种的抗体或抗原结合片段。在一些实施方式中,嵌合抗体可以包括来源于人的恒定区和来源于非人动物(例如小鼠或兔)的可变区。

[0083] 在一些实施方式中,本申请所述抗体是单特异性抗体、双特异性抗体或多特异抗体。

[0084] 在一些实施方式中,本申请所述抗体可以进一步地被标记。

[0085] 在一些实施方式中,本申请所述抗体是PI4KIIIα或FAM126或TTC7或EFR3的特异性抗体。在一些实施方式中,本申请所述抗体是PI4KIIIα或EFR3的特异性抗体。

[0086] 在一些实施方式中,本申请所述抗体能够抑制PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物的形成、抑制PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物锚定于细胞质膜、或者抑制PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物的磷酸化活性。

[0087] 在一些实施方案中,所述PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物抑制剂是RNAi分子。

[0088] 本申请所用的术语“RNAi分子”是指RNA或其类似物,其具有与靶RNA充分的序列互补性,以指导RNA干扰。在一些实施方式中,还包括可用于生成RNA的DNA。RNA干扰(RNAi)是指序列特异或选择的过程,通过该过程下调了靶分子(例如,靶基因、蛋白或RNA)。

[0089] 在一些实施方案中,所述RNAi分子是小干扰RNA(siRNA)、短发夹RNA(shRNA)或微小RNA(miRNA)。

[0090] 本申请所用的术语“小干扰RNA(siRNA)”是指一种RNA分子,优选双链分子,具有约10～50个核苷酸的长度,优选约15～25个核苷酸的长度,更优选约17、18、19、20、21、22、23、24或25个核苷酸的长度,所述链任选地具有包括例如1、2或3个突出的核苷酸(或核苷酸类似物)的突出末端,其能够指导或介导RNA的降解。天然产生的siRNA通过细胞的RNAi机制(例如,Dicer或其同系物)由更长(例如＞25个核苷酸)的dsRNA分子产生,并通过形成RISC复合物降解mRNA。

[0091] 本申请所用的术语“短发夹RNA(shRNA)”是指具有茎环结构的RNA分子,其包括互补序列的第一区域和第二区域,互补的程度以及区域的方向足以使碱基对出现在区域之间,第一区域和第二区域被环区域连接,环由环区域中的核苷酸(或核苷酸类似物)之间缺少碱基配对而产生。

[0092] 本申请所用的术语“微小RNA(microRNA或miRNA)”是一种短的、天然存在的非编码的单链RNA分子,长度约为16-26个核苷酸(nt)(例如约16-29nt,19-22nt,20-25nt,或21-23nt),通常在体内参与调控基因表达。在真核细胞中,miRNA基因通过DNA转录酶II(DNA transcriptase II)转录为“初产物”(pri-miRNA),pri-miRNA很快被一种核糖核酸酶III(Drosha)加工为miRNA“前体”(pre-miRNA),pre-miRNA从细胞核转运到细胞质中,然后经另一种核糖核酸酶III(Dicer)识别剪切为成熟的miRNA。成熟的miRNA分子与一种或多种mRNA部分互补,并且调控蛋白的表达。已知的miRNA的序列可以通过公开的数据库获得,例如miRBase数据库(www.mirbase.org),其中提供了包括miRNA序列信息、功能注释、以及预测的基因靶标等信息。在本发明中,miRNA还包括由人工合成的质粒在细胞中表达的具有类似天然miRNA的结构和功能的RNA分子,能像天然miRNA分子一样靶向对应的mRNA,阻碍其翻译成蛋白质。

[0093] 在一些实施方案中,所述RNAi分子能够降低PI4KIIIα的表达,例如,敲减PI4KA基因。

[0094] 在一些实施方案中,所述RNAi分子具有SEQ ID NO:1[5'-TGCTCATTAGCAGTAAAGA-3']。

[0095] 在一些实施方案中,所述RNAi分子的长度为18-100碱基。

[0096] 在一些实施方案中,所述RNAi分子被修饰以增强其稳定性。

[0097] 在一些实施方案中,所述PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物抑制剂是反义核酸。

[0098] 本申请所用的术语“反义核酸”包括与靶序列完全互补的核苷酸以及具有一个或多个核苷酸错配的那些核苷酸,只要该反义核酸能与所述靶序列特异性杂交即可。例如,本申请的反义核酸包括在至少15个连续核苷酸的长度上具有至少70％或更高,优选80％或更高,更优选90％或更高,甚至更优选95％或更高同源性的多核苷酸。由于形成杂交体,靶基因转录和/或靶mRNA翻译减少或被阻断。描述了涉及反义技术的标准方法(参见,例如

Melani等,Cancer Res.(1991)51:2897-2901)。

[0099] 在一些实施方案中,所述PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物抑制剂是EFR3特异性抑制剂。

[0100] 本申请所用的术语“EFR3特异性抑制剂”是指能够特异性降低、减少、消除EFR3(即,源自酵母的甲酰基-CoA还原酶)基因的转录或翻译,和/或EFR3蛋白的活性的任何抑制剂。在一些实施方案中,所述EFR3特异性抑制剂能够将EFR3的活性降低至少5%、10%、20%、40%、50%、80%、90%、95%或更多。在一些实施方案中,EFR3的活性是指将PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物锚定至细胞质膜的活性。

[0101] 在一些实施方案中,EFR3特异性抑制剂能够在复杂混合物中优选识别EFR3蛋白,所述抑制剂与EFR3蛋白的结合常数为其与其他非特异性结合蛋白的结合常数的至少2倍。在某些实施方案中,EFR3特异性抑制剂与EFR3蛋白的平衡解离常数小于或等于10^{-5}或10^{-6}M。在某些实施方案中,EFR3特异性抑制剂与EFR3蛋白的平衡解离常数小于或等于10^{-6}或10^{-7}M。在某些实施方案中,EFR3特异性抑制剂与EFR3蛋白的平衡解离常数小于或等于10^{-7}M或10^{-8}M。在一些实施方案中,所述EFR3特异性抑制剂是EFR3a特异性抑制剂或EFR3b特异性抑制剂。

[0102] 在一些实施方案中,所述PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物抑制剂是PI4KIIIα特异性抑制剂。

[0103] 本申请所用的术语“PI4KIIIα特异性抑制剂”是指能够特异性降低、减少、消除PI4KIIIα基因的转录或翻译,和/或PI4KIIIα蛋白活性的各类物质。在一些实施方案中,所述PI4KIIIα特异性抑制剂能够将PI4KIIIα的活性降低至少5%、10%、20%、40%、50%、80%、90%、95%或更多。在一些实施方案中,PI4KIIIα的活性是指将PI4KIIIα将脂质(例如,磷酸肌醇(PI))磷酸化(例如,转化为4-磷酸磷脂酰肌醇(PI4P))的活性。

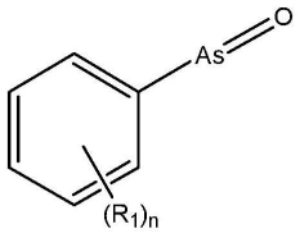
[0104] 在一些实施方案中,PI4KIIIα特异性抑制剂能够在复杂混合物中优选识别PI4KIIIα蛋白,所述抑制剂与PI4KIIIα蛋白的结合常数为其与其他非特异性结合蛋白的结合常数的至少2倍。在某些实施方案中,PI4KIIIα特异性抑制剂与PI4KIIIα蛋白的平衡解离常数小于或等于10^{-5}或10^{-6}M。在某些实施方案中,PI4KIIIα特异性抑制剂与PI4KIIIα蛋白的平衡解离常数小于或等于10^{-6}或10^{-7}M。在某些实施方案中,PI4KIIIα特异性抑制剂与PI4KIIIα蛋白的平衡解离常数小于或等于10^{-7}M或10^{-8}M。

[0105] 在一些实施方案中,相比于对PI4KII(例如,PI4KIIα或PI4KIIβ),PI4KIIIα特异性抑制剂对PI4KIIIα的抑制强至少1倍、2倍、4倍、5倍、10倍、20倍、30倍、50倍、100倍、200倍、500倍或10000倍。在一些实施方案中,相比于对PI4KIIIβ,PI4KIIIα特异性抑制剂对PI4KIIIα的抑制强至少1倍、2倍、4倍、5倍、10倍、20倍、30倍、50倍、100倍、200倍、500倍或10000倍。在一些实施方案中,PI4KIIIα特异性抑制剂基本上不抑制PI4KII(例如,PI4KIIα或PI4KIIβ),例如,其IC_{50}大于或等于10μM、20μM、30μM、40μM、50μM、60μM、80μM、100μM、150μM、200μM或500μM。

[0106] 在一些实施方案中,PI4KIIIα特异性抑制剂对PI4KIIIα的IC_{50}小于或等于100μM、80μM、50μM、30μM、20μM、10μM、5μM、3μM、2μM、1μM、0.5μM、0.2μM、0.1μM、0.05μM、0.02μM、0.01μM、0.005μM、0.002μM或0.001μM。

[0107] 在一些实施方案中,所述PI4KIIIα特异性抑制剂是小分子化合物。

[0108] 在一些实施方案中,本申请所述的小分子化合物具有式(I)所示的结构或者其药学上可接受的盐,

[0109] 

式(I)

[0110] 其中,R_1各自独立的选自(a)H、氘、卤素、硝基、氰基、羟基、氨基、氨基甲酰基、C_{1-6}烷基、C_{2-6}炔基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}亚烷基-NH_2、C_{1-6}亚烷基-NH-C(O)H、-As(O)、-N=NH、N-(C_{1-6}烷基)氨基、N,N-(C_{1-6}烷基)$_2$氨基、-NH-C(O)H、-NH-S(O)$_2$H、-C(O)OH、-OC(O)H、-SH、-S(O)$_2$H、-S(O)$_2$-NH或杂环基,并且可选的被R_2或R_3取代,其中R_2和R_3各自独立的选自氨基、C_1-$_6$烷基、C_{1-6}烷氧基、C_{1-6}卤代烷基、N-(C_{1-6}烷基)氨基、N-(6-12元芳香基)氨基、N,N-(C_{1-6}烷基)$_2$氨基、C_{3-6}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_5、-C(O)OR_4、6-12元的芳香基、C_{1-6}烷基、C_{2-6}炔基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、C_{1-6}卤代烷基、3-6元的杂环基、C_{3-6}环烷基或Bn-O-取代,并且R_4是C_1-6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、C_{1-6}烷基、C_{2-6}炔基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、C_{1-6}卤代烷基、3-6元的杂环基、C_{3-6}环烷基或Bn-O-取代,R5选自H、C_{1-6}烷基、C_{2-6}炔基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基或C_{1-6}卤代烷基,或

[0111] (b)两个相邻碳原子上的R_1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、C_{1-6}烷基、C_{2-6}炔基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、C_{1-6}卤代烷基、3-6元的杂环基、C_{3-6}环烷基或Bn-O-取代,

[0112] 在一些实施方案中,所述n为0、1、2或者3。在一些实施方案中,所述n为0、1或者2。在一些实施方案中,所述n为0或者1。

[0113] 在一些实施方案中,所述R_1各自独立的选自H、氘、卤素、硝基、氰基、羟基、氨基、氨基甲酰基、C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、C_{1-6}卤代烷基、-As(O)、N-(C_{1-6}烷基)氨基、N,N-(C_{1-6}烷基)$_2$氨基或-C(O)OR_6,其中n为0-2的整数,并且R_6是C_{1-6}的烷基。

[0114] 在一些实施方案中,所述R_1各自独立的选自H、氘、卤素、硝基、氰基、羟基、氨基、C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、C_{1-6}卤代烷基或-As(O),其中n为0-2的整数。

[0115] 在一些实施方案中,所述R_1各自独立的选自H、氘、卤素、氨基、C_{1-6}烷氧基或C_{1-6}卤代烷基,其中n为1。

[0116] 在一些实施方案中,所述R_1位于-As(O)基团的邻位或者对位。在一些实施方案中,所述R_1是H。

[0117] 本申请中所用的术语“取代”,当指化学基团时,指所述化学基团的一个或多个氢原子被去除并且被取代基取代。

[0118] 本申请中所用的术语“取代基”具有本领域公知的通常含义,指共价连接至或者在适合的情况下稠合至母体基团的化学部分。

[0119] 本申请中使用的术语“C_n-C_m”表示碳原子数的范围,其中n和m是整数并且碳原子数的范围包括端点(即n和m)和其间的各整数点。例如,C_1-C_6表示1至6个碳原子的范围,包括1个碳原子、2个碳原子、3个碳原子、4个碳原子、5个碳原子和6个碳原子。

[0120] 本申请中使用的术语“烷基”,无论是作为其他术语的一部分还是单独使用,指饱和的烃基基团,其可以是直链的或支链的。术语“C_n-C_m烷基”指具有n至m个碳原子的烷基。在某些实施方案中,烷基基团含有1至12、1至8、1至6、1至4、1至3或1至2个碳原子。烷基基团的示例包括但不限于化学基团如甲基、乙基、n-丙基、异丙基、n-丁基、叔丁基、异丁基、仲丁基、2-甲基-1-丁基、n-戊基、3-戊基、n-己基、1,2,2-三甲基丙基等。

[0121] 本申请中使用的术语“烯基”,无论是作为其他术语的一部分还是单独使用,指不饱和的烃基基团,其可以是直链的或支链的,具有至少一个碳-碳双键。在某些实施方案中,烯基基团含有2至12、2至10、2至8、2至6、2至5、2至4或2至3个碳原子。在某些实施方案中,烯基基团还能有1至6、1至5、1至4、1至3、1至2或1个碳碳双键。烯基基团的示例包括但不限于化学基团如乙烯基、n-丙烯基、异丙烯基、n-丁烯基、仲丁烯基等。

[0122] 本申请中使用的术语“炔基”,无论是作为其他术语的一部分还是单独使用,指不饱和的炔基基团,其可以是直链的或支链的,具有至少一个碳-碳三键。在某些实施方案中,炔基基团含有2至12、2至10、2至8、2至6、2至5、2至4或2至3个碳原子。在某些实施方案中,炔基基团还能有1至6、1至5、1至4、1至3、1至2或1个碳碳三键。炔基基团的示例包括但不限于化学基团如乙炔基、丙炔基、丁炔基等。

[0123] 本申请中使用的术语“环烷基”指至少由3个原子组成的环系烷基。术语“n-m元环烷基”指具有n至m个形成环的成员的环烷基。此外,该环还可以具有一个或多个双键,但不具有完全共轭的系统。在某些实施方案中,环烷基具有3至8、3至6或4至6个形成环的碳原子。环烷基的示例包括但不限于环丙烷、环丁烷、环戊基等。

[0124] 本申请中使用的术语“杂环基”指在环系中的至少一个原子是杂原子而其余环原子是碳原子的环基。术语“n-m元杂环基”指具有n至m个形成环的成员的杂环基。本申请中使用的术语“杂环基”包括杂芳基和杂环烷基。此外,该环还可以具有一个或多个双键。在某些实施方案中,杂环基是饱和的杂环烷基。杂原子的示例包括但不限于氧、硫、氮、磷等。

[0125] 本申请中使用的术语“杂环烷基”指在环系中的至少一个原子是杂原子而其余环原子是碳原子的环烷基。术语“n-m元杂环烷基”指具有n至m个形成环的成员的杂环烷基。此外,该环还可以具有一个或多个双键,但不具有完全共轭的系统。在某些实施方案中,杂环烷基是饱和的杂环烷基。杂原子的示例包括但不限于氧、硫、氮、磷等。在某些实施方案中,杂环烷基具有3至8、3至6或4至6个形成环的碳原子。杂环烷基的示例包括但不限于氮杂环丁烷、氮丙啶、吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基、硫代吗啉、高哌嗪等。

[0126] 本申请中使用的术语“芳基”或“芳香基”,无论是作为其他术语的一部分还是单独使用,指在形成环的碳原子之间具有交替的双键和单键的单-或多-碳环环系基团。术语“C_n-C_m芳基”指具有n至m个形成环的碳原子的芳基。在某些实施方案中,芳基环系在一个或多个环中具有6至12、6至10或6至8个碳原子。在某些实施方案中,芳基环系具有稠合在一起的2个或多个环。芳基基团的示例包括但不限于化学基团如苯基、萘基、四氢萘基、茚满基、茚基等。

[0127] 本申请中使用的术语“杂芳基”指其中在芳环中的至少一个环原子是杂原子并且

其余的环原子是碳原子的芳基基团。术语“n-m元杂芳基”指具有n至m个形成环的成员的杂芳基。杂原子的示例包括但不限于氧、硫、氮、磷等。在某些实施方案中,杂芳基可以具有5至10、5至8或5至6个形成环的成员。在某些实施方案中,杂芳基是5元或6元杂芳基。杂芳基的示例包括但不限于呋喃基、噻吩基、吡啶基、喹啉基、吡咯基、N-低级烷基吡咯基、吡啶基-N-氧化物、嘧啶基、吡嗪基、咪唑基、吲哚基等。

[0128] 本申请中使用的术语“烷氧基”,无论是作为其他术语的一部分还是单独使用,指式“-O-烷基”所示的基团。术语“C_n-C_m烷氧基”指烷氧基的烷基部分具有n至m个碳原子。在某些实施方案中,烷基部分具有1至6、1至4或1至3个碳原子。烷氧基基团的示例包括但不限于化学基团如甲氧基、乙氧基、丙氧基(例如n-丙氧基和异丙氧基)、t-丁氧基等。

[0129] 本申请中使用的术语“卤代烷基”,无论是作为其他术语的一部分还是单独使用,指式“-烷基-X”所示的基团,其中X为卤素,选自氟、氯、溴和碘的原子。术语“C_n-C_m卤代烷基”指卤代烷基的烷基部分具有n至m个碳原子。在某些实施方案中,烷基部分具有1至6、1至4或1至3个碳原子。卤代烷基基团的示例包括但不限于化学基团如卤代甲基、卤代乙基、卤代丙基(例如n-卤代丙基和异卤代丙基)、t-卤代丁基等。

[0130] 本申请中使用的术语“n元”,其中n是整数,其通常与环系一起使用以描述环系中形成环的原子数。例如,哌啶基为6元杂环烷基环的一个示例,吡唑基为5元杂芳基环的一个示例,吡啶基为6元杂芳基环的一个示例而1,2,3,4-四氢-萘为10元芳基的一个示例。

[0131] 本申请中使用的术语“卤素”指选自氟、氯、溴和碘的原子。

[0132] 本申请中使用的术语“氰基”指式“-CN”所示的基团。

[0133] 本申请中使用的术语“羟基”指式“-OH”所示的基团。

[0134] 本申请中使用的术语“硝基”指式“-NO_2”所示的基团。

[0135] 本申请中使用的术语“氨基”指式“-NH_2”所示的基团。

[0136] 本申请中使用的术语“氨基甲酰基”指式“-$HNCONH_2$”所示的基团。

[0137] 本申请中使用的术语“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。

[0138] 本申请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。可以以光学活化或外消旋的形式分离含有不对称取代的碳原子的本申请的化合物。如何从不具有光学活性的初始原料制备光学活化形式的方法是本领域公知的,如通过拆分外消旋混合物或通过立体选择性合成。在本申请所述的化合物中还可以存在烯烃、碳-碳双键等多种几何异构体,并且在本申请中已经考虑了所有的这些稳定异构体。本申请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。

[0139] 在某些实施方案中,本申请所述的化合物具有(R)构型。在某些实施方案中,本申请所述的化合物具有(S)构型。

[0140] 可以通过本领域公知的多种方法中的任一对化合物的外消旋混合物进行拆分。示例性的方法包括使用手性拆分酸的分级结晶,手性拆分酸是一种具有光学活性的成盐有机酸。用于分级重结晶方法的适宜的拆分试剂是例如具有光学活性的酸(如,酒石酸、二乙酰酒石酸、二苯甲酰酒石酸、扁桃酸、苹果酸、乳酸的D和L形式)或各种具有光学活性的樟脑磺酸。适于分级结晶方法的其他拆分试剂包括N-甲基苄胺、2-苯甘氨醇、去甲麻黄碱、麻黄碱、

N-甲基麻黄碱、环已基乙胺、1,2-二氨基环已烷等的立体异构纯形式。

[0141] 还可以通过在装有光学活性拆分试剂(例如二硝基苯甲酰基苯基甘氨酸)的柱上通过洗脱进行外消旋混合物的拆分。可以由本领域技术人员确定适宜的洗脱溶剂组合物。

[0142] 本申请的化合物还包括互变异构形式。互变异构形式是由同时伴有质子的迁移的单键与相邻双键的对换导致的。互变异构形式包括具有相同化学式和总电荷的异构质子化状态的质子的互变异构体。质子互变异构体的示例包括酮-烯醇对、酰胺-亚胺酸对、内酰胺-内酰亚胺对、烯胺-亚胺对和环状的形式,其中质子能够占据杂环系统的两个或多个位置,例如1H-和3H-咪唑、1H-,2H-和4H-1,2,4-三唑、1H-和2H-异吲哚以及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。

[0143] 本申请的化合物还可以包括中间体或最终化合物中出现原子的所有同位素。同位素包括具有相同原子序数但不同质量数的那些原子。例如,氢的同位素包括氕、氘和氚。

[0144] 在某些实施方案中,本申请的小分子化合物可以通过有机合成获得。可以使用任意公知的有机合成技术制备并且可以根据多种可能的合成途径合成本申请的化合物,包括其盐、酯、水合物或溶剂化物。

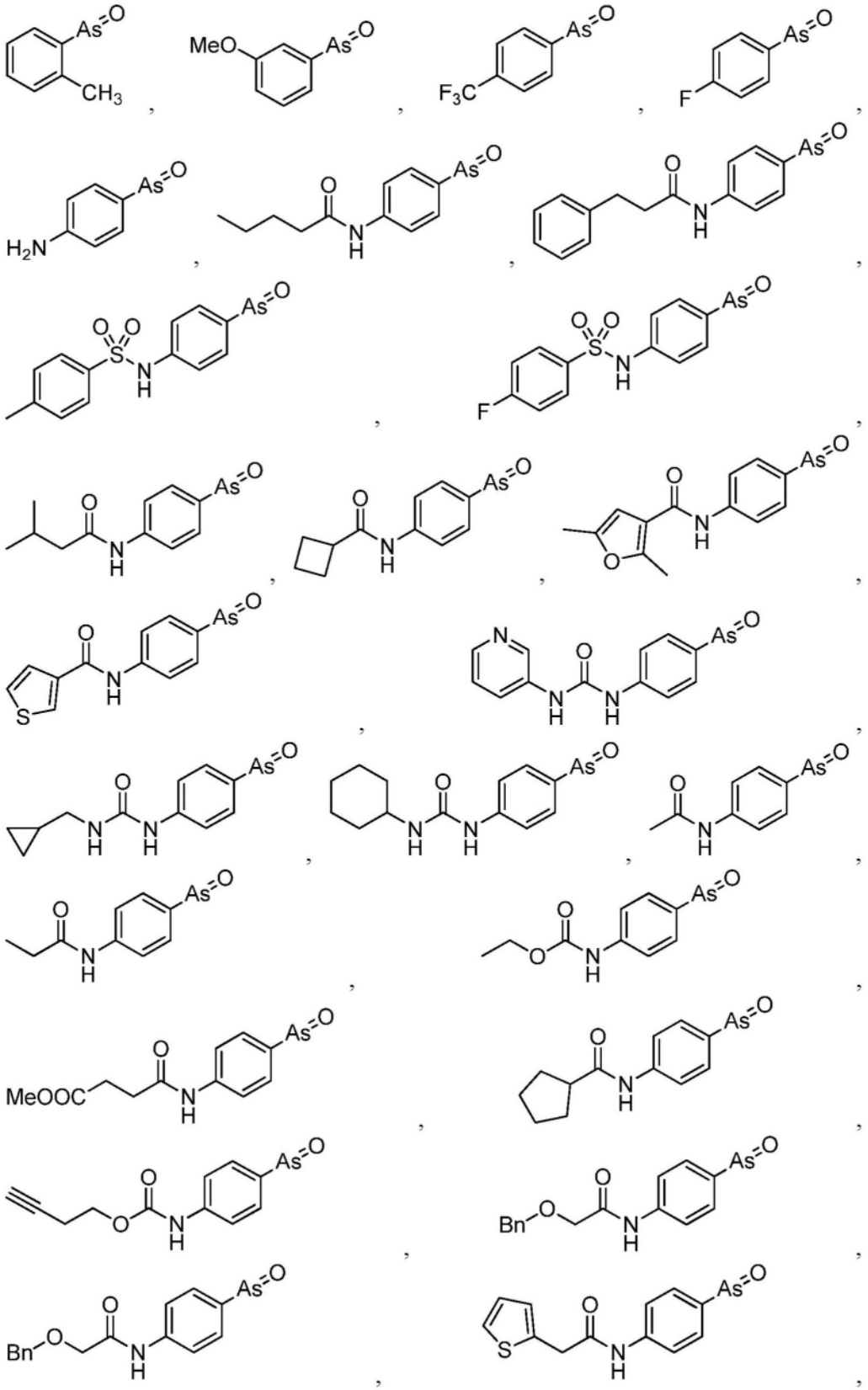
[0145] 可以在适宜的溶剂中进行制备本申请化合物的反应,有机合成领域的技术人员能够容易地对溶剂进行选择。适宜的溶剂能够在反应进行的温度下(例如可以是从溶剂的冷冻温度至溶剂的沸腾温度的温度范围)基本上不与初始原料(反应物)、中间体或产物反应。可以在一种溶剂或一种以上溶剂的混合物中进行给定的反应。根据特定反应步骤,本领域技术人员能够针对特定反应步骤选择适宜的溶剂。

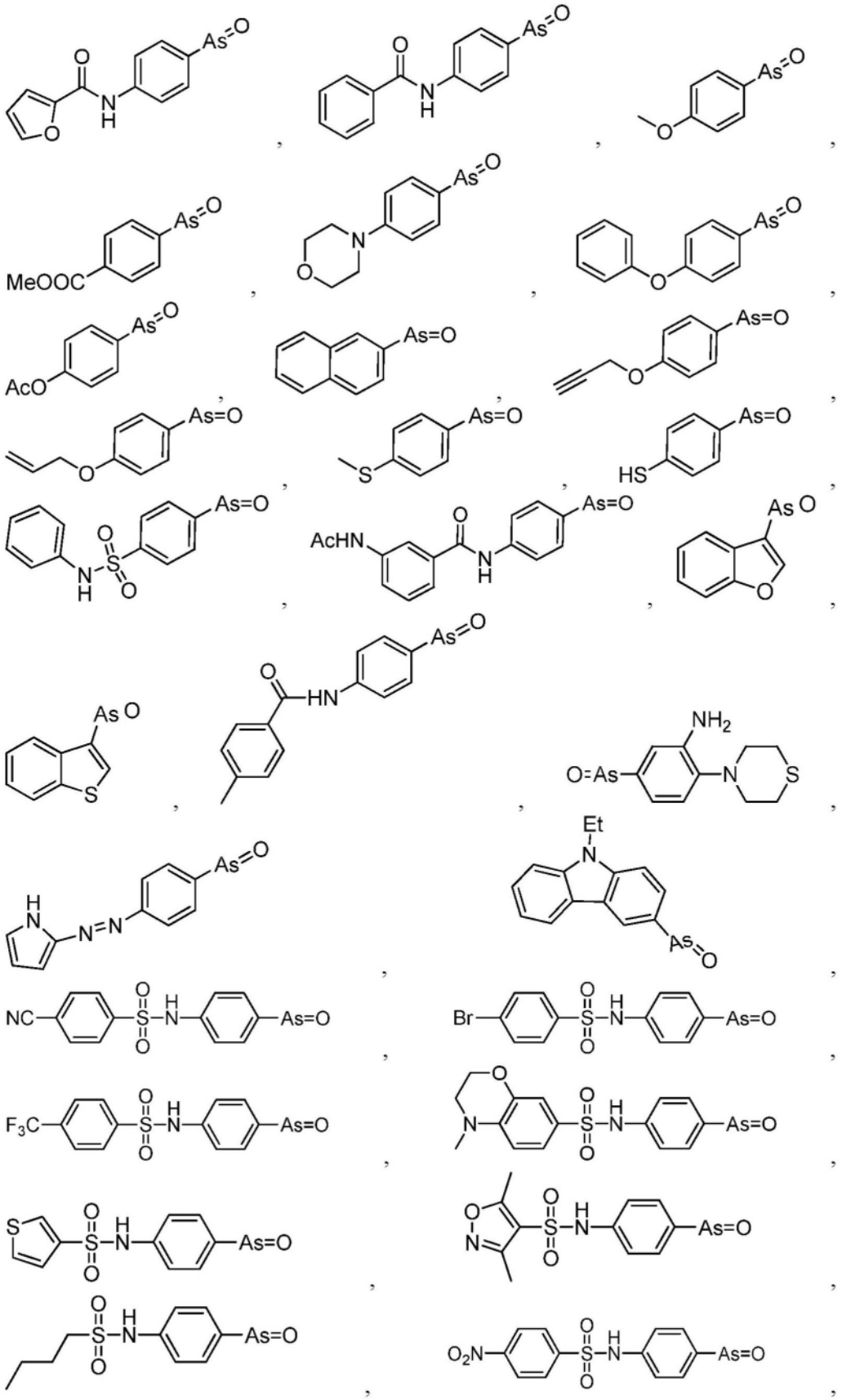
[0146] 本申请化合物的制备可能涉及各种化学基团的保护和去保护。本领域技术人员能够容易地确定是否需要保护和去保护以及选择适宜的保护基团。保护基团化学可以参见,例如T.W.Greene and P.G.M.Wuts,Protective Groups in Organic Synthesis,3rd Ed.,Wiley&Sons,Inc.,New York(1999),其全部内容通过引用并入本申请。

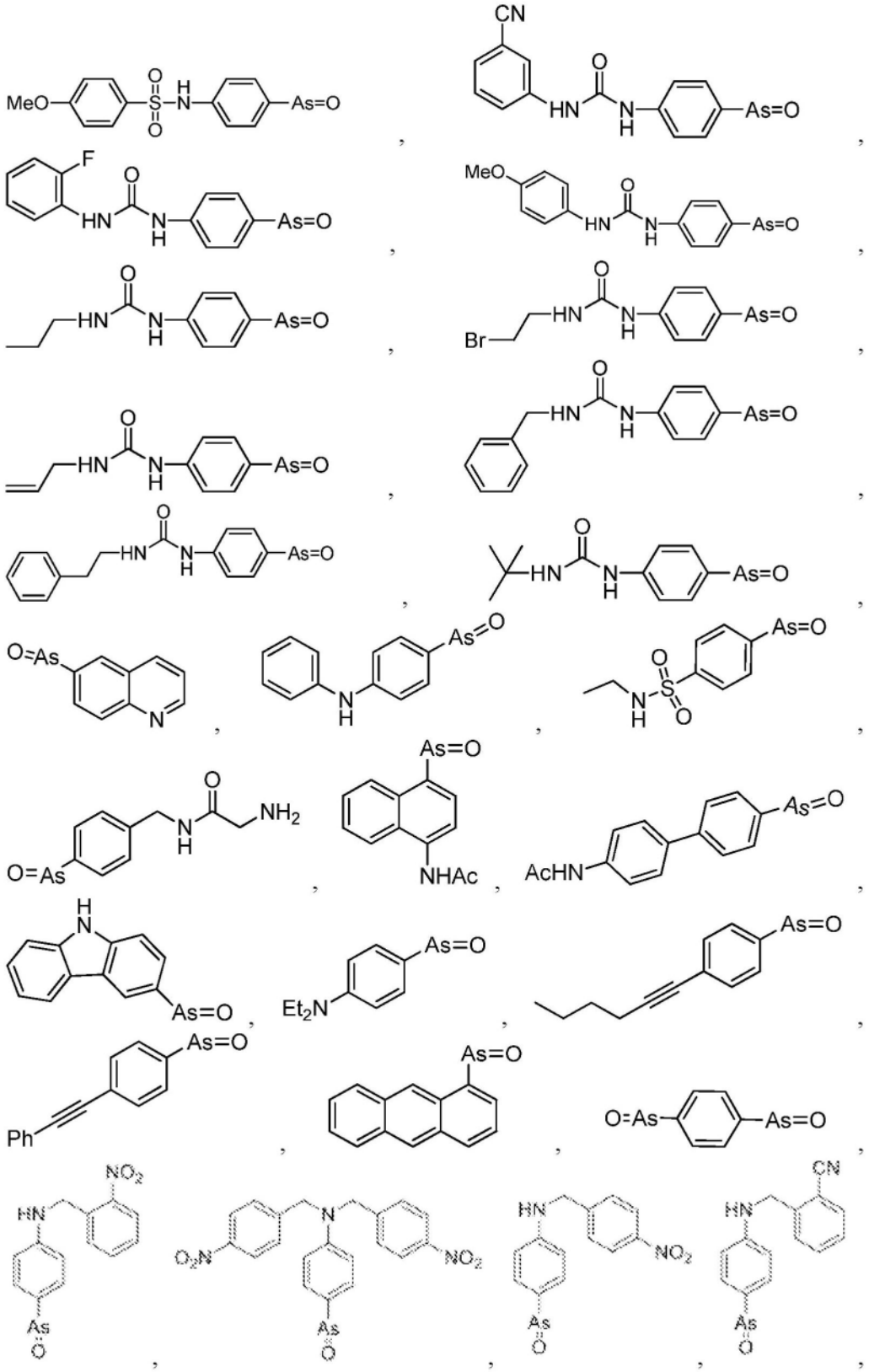
[0147] 可以根据本领域公知的任意适宜方法对反应进行监测。例如,可以利用光谱法,如核磁共振光谱(例如^{1}H或^{13}C)、红外光谱、分光光度法(例如UV-可见)、质谱,或者利用色谱法,如高效液相色谱(HPLC)、液相色谱-质谱(LCMS)或薄层层析(TLC)对产物的形成进行监测。本领域技术人员可以利用多种方法对化合物进行纯化,包括高效液相色谱(HPLC)(例如参见“Preparative LC-MS Purification:Improved Compound Specific Method Optimization”Karl F.Blom,Brian Glass,Richard Sparks,Andrew P.Combs J.Combi.Chem 2004,6(6),874-883,其全部内容通过引用并入本申请)和正相硅胶柱层析。

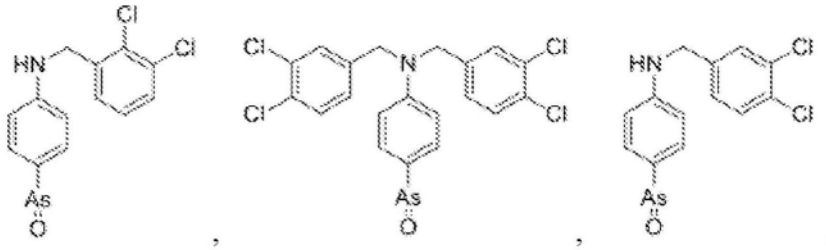
[0148] 在某些实施方案中,本申请的小分子化合物可以通过商业途径购买获得。

[0149] 在一些实施方案中,所述小分子化合物是:

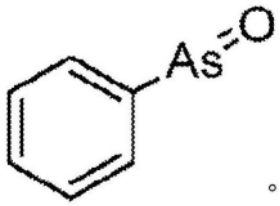
[0150] 

[0151] 

[0152] 

[0153] 

[0154] 本申请中使用的术语“PAO”是指一种以氧化砷基团与苯环为基本结构的小分子化合物,其具体化学结构如下:

[0155] 

[0156] 心境障碍

[0157] 本申请所用的术语“心境障碍(mood disorder)”是指,由于在一定期间内持续的情绪(感情)的不正常而感到痛苦、对日常生活造成某种障碍的状态。

[0158] 在一些实施方案中,所述心境障碍是情绪高昂、情绪低落或者情绪在高昂和低落之间循环。

[0159] 本申请所用的术语“情绪高昂”是指躁狂发作的主要原发症状。典型表现为患者自我感觉良好,故而表现得兴高采烈、得意洋洋、无忧无虑等。这种高涨的心境非常具有感染力,常能博得周围人的哄堂大笑。有些躁狂发作的病人可能以易激惹为主要表现,动辄便大发脾气,甚至可出现破坏和攻击行为。

[0160] 本申请所用的术语“情绪低落”是指产生包括但不限于悲伤和沮丧感的精神状态,其能够引起破坏性行为。患者自觉情绪低沉、苦恼忧伤,情绪的基调是低沉、灰暗的。抑郁发作的情感低落有两个重要特征:其一,“显著而持久”,是指这种低落的情绪通常为本人和(或)他人明显地感觉到,程度可以从闷闷不乐到伤心欲绝不等,持续时间至少2周;其二,是这种情感低落“与其现实处境不相称”,是一种歪曲和放大了的“低落”,而难以用客观的现实境遇来解释。

[0161] 本申请所用的术语“情绪在高昂和低落之间循环”是指精神状态在情绪高昂和情绪低落之间交替转换。

[0162] 在一些实施方案中,所述心境障碍是焦虑症、抑郁症、精神分裂症或躁狂症。

[0163] 本申请所用的术语“焦虑症”包括有或无旷野恐怖的恐慌症、无恐慌症病史的旷野恐怖症、特定恐惧症、社交恐惧症、强迫行为障碍、创伤后紧张症、急性紧张症、广泛性焦虑症、归因于一般医学病症的焦虑症、物质诱发的焦虑症及未另外列出的焦虑症。如本文中所用,术语“焦虑症”包括那些焦虑症的诊断和统计手册(例如,Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders)(DSM-IV)(1994,American Psychiatric Association,Washington,D.C.))中所述的相关病症。本领域技术人员应认识到,神经及精神病症且特别是焦虑症存在替代性命名系统、疾病分类系统及分类系统,且这些系统随着医药科学发展而演变。因此,术语“焦虑症”意欲包括其它诊断来源中所述的类似病症。

[0164] 本申请所用的术语“抑郁症”包括例如单发型或复发型严重抑郁症及心境恶劣性

情感病症、抑郁性神经病及官能性抑郁症。本申请的抑郁症包括:忧郁型抑郁症,包括厌食症、体重减轻、失眠及早醒,和精神运动性阻滞;非典型性抑郁症(或反应性抑郁症),包括食欲增加、睡眠过度、精神运动性焦躁或烦躁、焦虑症及恐惧症;季节性情感病症。如本文中所用,术语"抑郁症"包括DSM-IV中所述的相关病症。

[0165] 本申请所用的术语"精神分裂症",是一种特征在于严重的慢性精神损害的精神类疾病。其症状在成人期的早期出现,随后是一段时期的社交障碍。精神分裂症表现为幻听和幻视、偏执、妄想(阳性症状)、情感迟滞、抑郁、快感缺乏、言语贫乏、记忆力和注意力缺陷以及社交退缩(阴性症状)等等。

[0166] 本申请所用的术语"躁狂症"是一种以情感高涨或易激惹为主要临床相,伴随精力旺盛、言语增多、活动增多,严重时伴有幻觉、妄想、紧张症状等精神病性症状。躁狂发作时间需持续一周以上,一般呈发作性病程,每次发作后进入精神状态正常的间歇缓解期,大多数病人有反复发作倾向。

[0167] 在一些实施方案中,所述心境障碍是由神经退行性疾病、中风或恶性肿瘤引起的心境障碍。

[0168] 在一些实施方案中,所述心境障碍是神经退行性疾病引起的焦虑症或抑郁症,例如,老年痴呆引起的焦虑症或抑郁症。

[0169] 药物施用和医药用途

[0170] 本申请中使用的术语"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(如美国食品药品管理局、中国食品药品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。

[0171] 本申请中所用的术语"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。

[0172] 在一些实施方案中,本申请所述的客体是人或者哺乳动物。在一些实施方案中,本申请所述的客体是人或者非人灵长类动物。

[0173] 本申请中公开的PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物抑制剂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,本申请所述的PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物抑制剂通过口服、皮下、肌内或静脉施用。在一些实施方案中,本申请所述的PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物抑制剂通过口服施用。

[0174] 本申请中使用的术语"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,本申请中使用的术语“治疗有效量”是指,可以缓解或者消除客体的心境障碍(例如,焦虑症或抑郁症)的药物的量。

[0175] 本申请中提供的PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物抑制剂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。

[0176] 在一些实施方案中,进一步包括在向客体施用有效量的PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物抑制剂之前,诊断所述客体具有心境障碍。可以使用精神科临床医生常规的诊断方法和标准诊断客户是否具有心境障碍。

[0177] 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。

[0178] 在一些实施方案中,所述第二试剂是用于治疗心境障碍的试剂,包括但不限于,三环类抗抑郁药、选择性5-羟色胺再摄取抑制药(SSRI)、或5-羟色胺/去甲肾上腺素再摄取抑制药(SNRI)。

[0179] 在一些实施方案中,所述第二试剂是用于治疗神经退行性疾病、中风或恶性肿瘤的试剂。在一些实施方案中,治疗神经退行性疾病的试剂包括但不限于左旋多巴(levodopa)、卡比多巴(carbidopa)、司来吉兰(selegiline)、雷沙吉兰(rasagiline)、恩他卡朋(entacapone)、托卡朋(tolcapone)、金刚烷胺(amantadine)、美金刚(memantine)、利鲁唑(riluzole)、溴隐亭(bromocriptine)、培高利特(pergolide)、阿扑吗啡(apomorphine)、罗匹尼罗(ropinitrol)、普拉克索(Pramipexole)、阿托品、东莨菪碱、苯海索(trihexyphenidyl)、苯扎托品(benzatropine)、丙环定(procyclidine)、他克林(tacrine)、盐酸多奈哌齐(donepezil hydrochloride)、氢溴酸加兰他敏(galanthamine)、石杉碱甲(huperzine A)和利凡斯的明(Rivastigmine)。在一些实施方案中,治疗中风的试剂包括但不限于潘生丁、低分子右旋糖酐、尿激酶、肝素和阿司匹林。在一些实施方案中,治疗恶性肿瘤的试剂包括但不限于环磷酰胺、塞替派、卡莫司汀、顺铂、卡铂、甲氨蝶呤、培美曲塞、卡培他滨、阿糖胞苷、吉西他滨、紫杉醇、多西他赛和长春花碱。

[0180] 在一些实施方案中,所述PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物抑制剂在所述第二试剂之前、之后或同时施用。

[0181] 本申请的还涉及本申请所述的PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物抑制剂在制备用于预防或治疗心境障碍的药物中的用途以及本申请所述的PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物抑制剂用于预防或治疗心境障碍的用途。

[0182] 药物筛选

[0183] 本申请的还提供了一种筛选PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物抑制剂的方法,包括将备选药物与PI4KIIIα、FAM126、TTC7或EFR3a的蛋白或者核酸或者PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物接触,并检测备药物是否能够抑制PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物的形成或者活性。

[0184] 本申请的还提供了一种筛选用于预防或治疗心境障碍的药物的方法,包括将备选药物与PI4KIIIα、FAM126、TTC7或EFR3a的蛋白或者核酸或者PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物接触,并检测备选药物是否能够抑制PI4KIIIα/FAM126/TTC7复合物的形成或者活性。

[0185] 实施例

[0186] 实施例1:口服给予PAO在大鼠慢性轻度不可预见性应激刺激模型中的抗抑郁药效

[0187] 1.1试验原理

[0188] 慢性轻度不可预见性应激刺激(Chronic unpredictable mild stress,CUMS)模型是Willner等受Katz描述的慢性不可预见性应激刺激的启发于1987年提出、并经过适当改动的大鼠抑郁症模型,是目前文献中广泛使用的模型。该模型更现实地模拟了人们日常生活中遭遇的“困难”。在此模型中,应激因子的多变性和不可预测性是模型制造成功的关键。十余种应激因子的顺序在试验全程中随机抽取,使动物不能预料刺激的发生。该模型具有高度的有效性,基本符合抑郁模型的要求,可用于研究其它模型无力解决的问题。在经过长期温和应激刺激之后蔗糖水饮用量的减少反映了内源性抑郁症的中心症状即快感缺乏,同时模拟了其它重症抑郁障碍的症状表现,如运动能力及社会交往能力下降、探索行为能力下降、侵犯攻击能力缺陷、性行为能力下降等。慢性应激介导的行为异常可保持几个月,抗抑郁药的长期应用可纠正这些异常行为,而其它类型的精神类药物则无效。

[0189] 1.2试验目的

[0190] 本试验的目的是观察待PAO口服给药对慢性轻度不可预见性应激刺激模型大鼠的糖水偏爱程度的影响,以判断PAO是否具有良好的抗抑郁作用。

[0191] 1.3试验材料

[0192] 1.3.1受试样品

[0193] 名称:PAO

[0194] 配制方法:称取所需量的PAO,用二甲基亚砜(DMSO)配制成浓度为30mg/ml母溶液,然后用水稀释。

[0195] 灌胃口服给药:给药剂量范围0.1-3.0mg/kg,给药溶液的体积为每100g体重给0.5ml。

[0196] 1.3.2阳性对照品

[0197] 名称:盐酸文拉法辛缓释胶囊(怡诺思)

[0198] 规格:150mg/粒

[0199] 配制方法:取文拉法辛胶囊2粒(150mg/粒),碾碎,使用0.5%CMC-Na超声后混悬,并用0.5%CMC-Na定容至终体积100ml。

[0200] 1.3.3试验动物

[0201] 种属:Wistar大鼠

[0202] 使用动物数量和性别:60只,雄性

[0203] 体重:200~220g(分组前体重)

[0204] 来源:上海斯莱克实验动物有限公司

[0205] 1.4实验方法

[0206] 1.4.1动物分组

[0207] 试验前环境适应5天,选择健康的体重为220~250g的SD大鼠作为试验动物,并如下表1所示进行分组。

[0208] 表1.动物分组

[0209]

组别	给药剂量(mg/kg)	动物数

空白对照(饮用水)	0	10
CUMS模型组(饮用水)	0	10
阳性药文拉法辛	15	10
PAO灌胃高剂量	3.0	10
PAO灌胃中剂量	1.5	10
PAO灌胃低剂量	0.75	10

[0210] 1.4.2动物造模及给药方法

[0211] 1.4.2.1基础糖水偏爱检测

[0212] 适应性饲养大鼠1周,随后进行基础糖水偏爱试验。在开始的24小时内所有动物均给予1%的蔗糖水:两个瓶子里均盛有1%的蔗糖水,同时放在笼子的左右角。在接下来的24小时中,同时给予1%的蔗糖水和普通饮用水:一个瓶子内为1%的蔗糖水,另一个瓶子内为普通饮用水,仍同时放在笼子的左右角。接着禁食禁水23小时,随后进行糖水偏爱试验:同时给予1%的蔗糖水和普通饮用水,通过称饮水瓶重量来测量动物在1小时内蔗糖水和普通饮用水的饮用量。据动物体重、液体消耗量和糖水消耗量将动物如表1所示进行均匀分组,随后进行慢性轻度不可预见性应激刺激(“CUMS”)。

[0213] 1.4.2.2 CUMS抑郁造模

[0214] 对除空白对照组之外的其它组进行CUMS抑郁造模。每周十余种应激刺激因子交替给予大鼠,使大鼠不可预见每次应激因子刺激持续的时间和接下来将给予的刺激。实验的刺激因素如下:2次7小时的闪光刺激;1次17小时的不洁垫料环境(将150ml的水倒在垫料上);1次3小时和1次5小时的间歇性噪音刺激;1次夜间光照(光照持续36小时);1次7小时和1次22小时鼠笼倾斜;1次17小时的群养(5只鼠一笼),1次17小时的陌生气味环境饲养;1次7小时陌生异物环境;3次分别持续19、22和24小时的禁食,每次禁食后给予2小时有限的饲料供应;4次分别持续17、19、20和21小时的禁水,每次禁水后放置空瓶1小时(表2)。

[0215] 表2.CUMS刺激时间安排

[0216]

	时 间	刺激时间安排（刺激种类时间不变，时间表随试验调整）
周 一	9:00	单笼饲养，给药
	11:00	供给食物夹尾
	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），给药
	16:00	拿走水、食物和异物，持续光照（开关打开）
周 三	9:00	3 小时白噪音，给药
	12:00	供给食物和水，冰粒（200 ml）/笼
周 四	9:00	换笼子，7 小时左右白噪音，给药后称体重，禁食、水
		配置糖水，准备每笼一瓶水和糖水，水瓶称重
	16:00	倾斜鼠笼，打开闪光灯
周 五	9:00	关闭闪光灯，供给 1 小时水和糖水（1-5 号鼠），水瓶称重
	10:30	供给 1 小时水和糖水（6-10 号鼠），水瓶称重
	11:30	供给食物，6 小时白噪音
		给药，清洗水瓶，送动物房消毒
	16:00	停止白噪音，持续夜间光照（开关打开）
周 六	10:00	供给水，给药，倾斜鼠笼
	16:00	拿除水，停止倾斜鼠笼，打开闪光灯
周 日	9:00	关闭闪光灯，供给水，给药，拿除食物，45-50℃热水（150ml/笼）
	16:00	五只一笼群养

[0217] 1.4.2.3给药方法

[0218] 在CUMS刺激造模的前2周,不进行大鼠的PAO给药。在CUMS造模2周后的首个周一起口服给予大鼠PAO或文拉法辛,同时空白组及模型组大鼠也开始给予饮用水,按照表1中的剂量给药,每天给药1次,连续给药至CUMS程序结束。给药期间继续CUMS刺激。

[0219] 1.4.3抑郁行为指标——糖水偏爱程度检测

[0220] 每周在禁食禁水后测定液体消耗量(均于周五测定),记录每只动物的体重(周四记录)、液体摄入总量、摄水量和糖水摄入量。计算每鼠糖水偏爱百分比(计算公式如下:[偏爱＝(糖水摄入量/液体总摄入量)×100％])和每克体重的糖水消耗量。此实验周期为9周。

[0221] 1.4.4统计方法

[0222] 使用SPSS软件进行统计分析,数据以平均值±标准误差($\bar{x} \pm$ s.e.m.)表示,其它各组动物与空白组动物的体重差异通过双因素方差分析(Two way ANOVA)进行统计检验;给药1周和2周后其它各组与模型组的糖水偏爱值差异及其它各组与空白对照组的糖水偏爱值差异均使用Unpaired t test检验显著性,P＜0.05标记为*,P＜0.01标记为**。

[0223] 1.5试验结果

[0224] 1.5.1 CUMS造模及给药后体重的变化

[0225] 初始分组时,各组动物体重相似,无显著性差异。随着CUMS的进行,除未处理的空白组外,其它组动物因为均进行了CUMS抑郁造模,体重增重均显著变缓(表3,图1)。自刺激第一周开始,经CUMS刺激的其它各组动物的体重在每周的测量中均低于空白对照组(表3,

图1),说明本试验使用CUMS进行抑郁造模是非常有效的,很好地模拟了抑郁症发病过程中的体重降低。

[0226] 表3.各组大鼠在CUMS造模及给药阶段的体重情况

[0227]

时间	空白对照	模型对照	文拉法辛	PI 高剂量	PI 中剂量	PI 低剂量
分组时	251.8	245.2	251.1	253	250.9	251.4
CUMS 1 周	251.7	232.2	234	233	234.9	235.2
CUMS 2 周	282.6	247.1	252.3	247.6	254.4	254.4
CUMS 3 周	299.7	245.8	251.5	248.1	252.3	255.5
CUMS 4 周	316.9	256.5	264.3	261.3	260	266
CUMS 5 周	333.7	258	268.1	263.3	262.3	269.6
CUMS 6 周	348.4	262.7	269.3	264.2	269.1	272.5
CUMS 7 周	333.2	268.4	273.3	266.8	273.3	279
CUMS 8 周	352.8	262.7	276	272.9	278.5	283.9

[0228]

[0229] 1.5.2 PAO多次给药的抗抑郁药效

[0230] 初始分组时,各组动物糖水偏爱程度相似。给药6周后,3和0.75mg/kg剂量的PAO和文拉法辛均有提高大鼠糖水偏爱值的趋势,与模型组大鼠具有显著性差异(P＜0.05或P＜0.01),并且其糖水偏爱值与空白对照组大鼠相近(P＞0.05)(表4)。本试验结果表明,在大鼠CUMS抑郁模型中,PAO口服给药可起到显著的抗抑郁效果,其起效时间略晚于经口灌胃给予文拉法辛。

[0231] 表4.PAO对CUMS大鼠糖水偏爱的影响(每组n＝10, $\bar{x}\pm$ s.e.m.)

[0232]

时间	空白对照	模型对照	文拉法辛	PAO 高剂量	PAO 中剂量	PAO 低剂量
CUMS 5 周	0.90±0.10	0.85±0.22	0.90±0.08	0.81±0.21	0.72±0.30	0.87±0.15
CUMS 6 周	0.87±0.25	0.83±0.22	0.94±0.04*	0.84±0.17	0.78±0.20	0.88±0.14
CUMS 7 周	0.89±0.05*	0.79±0.1	0.92±0.07**	0.90±0.06*	0.86±0.08	0.91±0.11*
CUMS 8 周	0.90.±0.07*	0.72±0.23	0.90±0.07*	0.86±0.10	0.81±0.14	0.92±0.06*

** P＜0.01, * P＜0.05 与模型组比较

[0233] 1.6结论

[0234] 每天口服给予1次3和0.75mg/kg剂量的PAO或者阳性药文拉法辛6周后显示出增加CUMS抑郁模型大鼠的糖水偏爱程度,并将糖水偏爱值增加至与正常大鼠相似的程度,体现

了抗抑郁药效作用。口服1.5mg/kg剂量的PAO也有增加糖水偏爱程度的趋势。

[0235] 实施例2:PAO的抗焦虑抑郁药效的进一步验证和机理研究

[0236] 2.1小鼠的品系、育种和繁殖

[0237] 本发明使用的小鼠品系有C57/6B和ICR野生型小鼠、Efr3a$^{-/+}$小鼠(Efr3a的第二个外显子被无条件敲除并导致之后的遗传密码移位)、Pi4kaGt(RRO073)$^{Byg/+}$(简称Pi4k$^{-/+}$)小鼠和APP/PS1小鼠。

[0238] Pi4kaGt(RRO073)$^{Byg/+}$小鼠是由美国突变小鼠资源与研究中心(Mutant Mouse Resource and Research Center)的Pi4kaGt(RRO073)$^{Byg/+}$]小鼠(MMRRC,Cat.#016351-UCD)与C57/6B小鼠回交5代以上后的小鼠,该小鼠的PI4KA(编码PI4KIIIα)基因上插入了一个转座子并引入polyA,能使PI4KA的转录被提前终止。APP/PS1小鼠是双转基因小鼠,基因型是B6.Cg-Tg(APPswe,PSEN1dE9)85Dbo/Mmjax(MMRRC ID 034832-JAX),其是一种阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)的模型小鼠。

[0239] 在本申请中,各种小鼠都用标准大小的鼠笼饲养,每笼5只,偶尔一笼有4只或6只。无特别规定时,小鼠自由进食和喝水。

[0240] 2.2激素诱导小鼠焦虑抑郁模型的建立

[0241] ICR小鼠口服皮质酮(Corticosterone,GC,即11β,21-二羟基孕烯-3,20-二酮),一月后可得小鼠抑郁模型。用羟丙基-β-环糊精(hydroxypropyl-β-cyclodextrin,β-CD)助溶,配制成GC浓度为35μg/ml的水溶液,其中β-CD的浓度为0.45%。

[0242] 取60只雄性C57B/6的WT小鼠分成六组,每组各10只,在小鼠3月龄时,在四组小鼠的饮用水被上述GC溶液替换,另两组继续给予普通饮用水,并每周记录小鼠的体重变化和饮水量。继续一月后,分别从喂食GC溶液和水的小鼠中各随机抽选两组给予PAO溶液灌胃。PAO采用每天定时灌胃给药方式,以0.2和0.4mg/kg体重的剂量进行给药,总体积300μl,给药一个月后,即小鼠5月龄时进行小鼠的行为学实验分析。

[0243] 2.3 PAO或其衍生物的配置

[0244] PAO母液配置:取PAO≤30mg放入1.0ml的纯DMSO溶剂中,超声或振荡至PAO完全溶解。然后用水稀释至所需要的浓度,DMSO的浓度最终浓度为0.1%。

[0245] 在某些实施例中,PAO或其衍生物溶解于中链甘油三酸酯中,母液浓度是1.0mg/g,灌胃时,用中链甘油三酸酯稀释到特定浓度。

[0246] 2.4小鼠行为实验方法

[0247] 2.4.1强迫游泳(Forced Swimming Test,FST)

[0248] 强迫游泳实验(通过将实验动物置于一个局限的环境中(如水中),动物在该环境中拼命挣扎试图逃跑而又无法逃脱,从而提供了一个无可回避的压迫环境,一段时间后,动物即表现出典型的"不动状态",一种被称之为"行为绝望状态"的抑郁模型。实验在一个内径15cm,高度30cm的透明塑料圆柱体中进行,注水高度15cm,可适当调整高度,以小鼠尾巴不能触底,小鼠不能跳出水罐的高度为宜。实验时水温应保持在22℃-25℃之间,强迫游泳图像采集系统应置于FST装置前侧,距离水罐一定距离并能清楚记录小鼠在水里的四肢运动状态为宜。每次需计时6min,分析小鼠在第2min至第6min时间内的不动时间,实验后及时取出小鼠擦干,若实验过程中小鼠发生溺水现象应及时将其取出并停止对该鼠进行FST实验。实验进行过程中,应当营造并保持绝对的无音环境。小鼠在一定时间内的不动状态持续

越长,则表明小鼠的抑郁程度更深。

[0249] 2.4.2黑白箱实验(the light/dark box test,LDB)

[0250] 黑白箱实验利用动物嗜暗特性(趋黑箱)和探索特性(趋白箱)进行动物焦虑行为评估的一种实验。LDB由大小一致的九宫格的白箱(27×27cm)和大小一致的六宫格黑箱(18×27cm)组成,整体(45×27×27cm)呈矩形箱,无盖,白箱和黑箱中间由开小窗(7.5×7.5cm)的板隔开。在箱子正上方放置图像采集系统记录设定时间内小鼠在黑白箱内的穿梭的距离和轨迹,进出黑白箱的次数和分别在黑箱或白箱内逗留的时间。若小鼠进出黑白箱次数越频繁,在各个箱内的穿梭距离越长或在黑箱中逗留的时间越久则小鼠的焦虑程度越深。实验开始前应用锡箔纸包住鼠笼,但须有用于空气交换的开口,遮光半小时后再开始实验,目的是为了让小鼠提前适应暗环境,消除小鼠的实验恐慌和焦虑状态,然后逐一依次将老鼠放置于白箱或黑箱的中心位置,面对着小窗,记录小鼠在5分30秒内的穿梭黑白箱的次数,在黑白箱中的穿梭距离和在各个箱的停留时间,待图像采集完之后进行行为学分析,每次实验做完一只小鼠后都应用70%乙醇彻底擦拭黑白箱中小鼠能接触的位置,待酒精气味完全散发干以后再开始下一只小鼠实验,从而避免前一只小鼠的气味对后一只小鼠行为造成不必要的误导和干扰。整个实验进行过程中,应当营造并保持绝对的无音环境。

[0251] 2.4.3高架十字迷宫实验(the elevated plus maze,EPM)

[0252] 高架十字迷宫是评价啮齿类动物焦虑反应的实验方法之一,相较于伤害性刺激所致小鼠焦虑行为检测(如,电刺激、噪声刺激、饮食剥夺和暴露在捕食者气味等),该实验具有操作简单,伤害性小等优点,并能直观反应小鼠的条件应答。EPM由两条开放臂和两条闭合臂组成,呈十字形交叉,交叉部分为中央区,距地面约75cm。原理是由于面对新事物(开臂)小鼠会产生好奇心去探索,而它们又有嗜暗的天性(闭臂),两者之间发生探究与回避的冲突行为,产生焦虑心理。实验时,将单只老鼠面朝向闭合臂放置于中央区,记录小鼠在5分30秒内的进出开放臂和闭合臂的次数以及在各个臂所停留的时间。小鼠进入开放臂和闭合臂的次数越频繁或在闭合臂停留的时间越长,则小鼠的焦虑程度更深。每次做完一只小鼠都应用70%乙醇彻底擦拭高架十字迷宫中小鼠能接触到的位置,待酒精气味散发完以后再开始下一只实验,以避免前一只小鼠的气味对后一只小鼠行为造成不必要的误导和干扰。整个实验进行过程中,应当营造并保持绝对的无音环境。

[0253] 2.4.4新奇抑制摄食实验(novelty-suppressed feeding test,NSF)

[0254] 新奇抑制摄食实验是检测啮齿类动物禁食后饥饿状态下在新奇的环境中产生摄食和对新环境恐惧的矛盾冲突。实验场地是30×30cm正方形、高20cm的白色不透明有机玻璃盒,在盒底中心放置一粒正常小鼠食物。小鼠禁食24小时后,将单只小鼠头部朝玻璃盒角方向随机放入玻璃盒的一角。观察小鼠在玻璃盒中的活动,直到小鼠开始啃吃食物,取出小鼠,并记录小鼠从被放入玻璃盒到开始啃吃食物的时间(摄食潜伏期)。除非另有设计或规定,如果5min小鼠都没啃吃食物,也取出小鼠,该小鼠的摄食时间记录为5min。摄食潜伏期越长,提示焦虑程度越深。

[0255] 2.4.5慢性轻度不可预见性应激刺激模型(chronic unpredictable moderate stress,CUMS)

[0256] 实验持续8-10周,每天从多种应激刺激因子中随机选取两种给予小鼠。应激刺激因素有:夹尾15分钟、强光刺激4小时、噪音10分钟、鼠笼45°倾斜24小时、倒挂10分钟、限制

活动空间4小时、不清洁垫料环境24小时(向垫料中倒入150ml的水)、夜间光照(光照持续36小时)、陌生异物环境7小时;禁食24小时(禁食时取走垫料);持续禁水24小时(禁水时取走垫料)。但是,每周持续禁水只有一次,且禁水与不清洁垫料环境不交叉,持续禁水后称每只小鼠体重,接着测量糖水偏好度。测量糖水偏好度时,单只小鼠放入一个新鼠笼,其中放置两只瓶子,一只含纯水,另一只含1%糖水,预先分别称量两只瓶的重量。小鼠喝水15分钟后,两只瓶子的位置互换,再让小鼠喝水45分钟。取出两只水瓶,并分别称量两只瓶的重量。实验结束后,马上给予小鼠供应充分的水和食物。

[0257] 2.4.6水迷宫实验(Morris water maze)

[0258] 水迷宫实验(Morris Water Maze,MWM)装置是由水迷宫、水迷宫图像采集系统和软件分析系统三部分组成。水迷宫主要由盛水的水池(直径=1.2m)和一个可调节高度并且可以移动位置的圆形透明平台(直径=5cm)所组成。水池里的含有钛白粉,每次实验开始前应搅拌混匀以至小鼠不能直观地发现池里的平台,实验时水温维持在20℃左右。小鼠在水池中的行为由置于水迷宫上方的摄像头采集,传输到与之相连的计算机中,进行线上(on-line)或线下(off-line)分析和存储。

[0259] 水迷宫实验主要依次有适应训练、获得性训练、探查训练三个阶段,有时还有反向获得性训练阶段。简要步骤如下:

[0260] 适应训练:获得性学习开始前一天,调节水温到适宜温度,混匀水池,水池的第三象限放有露出水面0.5cm的平台。将小鼠面朝水池壁放入到水池中,任其自由游泳1min,将小鼠取出,擦干。如果小鼠在1min内能爬山平台,则让小鼠在平台上停留0.5min。

[0261] 获得性训练:一般持续7天,但也可长可短。将水池分为4个象限,平台置于象限一的中间,将小鼠面朝池壁分别从四个象限随机放入水中,在水池的四壁分别粘贴三角形,正方形,四角星和圆形四个不同的标志物以方便小鼠的记忆和学习。记录小鼠找到水下平台的时间。如果时间达到60秒,则引导小鼠上平台,让其在平台上滞留30秒,后取出擦干;如果时间未到60秒就找到了平台,记录时间,并让其在找到平台后滞留30秒再取出并擦干。若小鼠有学习记忆能力,则每天找到平台所花的时间将越来越短。

[0262] 探查训练:最后一次获得性训练之后的第二天,将象限一中的平台撤走,开始60秒的探查训练。分别将小鼠由三,四象限(距离象限一最远)一端放入水中,记录小鼠在象限一(之前放平台的象限)所花的时间占总时间的百分比,以此作为空间记忆的检测指标。实验终止后应及时取出小鼠并擦干。一般在获得性训练中能在各个象限中所花时间最少找到平台又或者在探查训练中象限一所占时间百分比越大的小鼠学习记忆能力越强。实验进行过程中,应当营造并保持绝对的无音环境。

[0263] 反向获得性训练:探索阶段结束后,将平台置于原来位置的对侧象限,每只动物每天4个象限,共训练4次,每次训练60秒。动物找到隐藏平台后使其在平台上停留30秒,若未找到平台,则引导其登上平台停留30秒。动物训练间隔15-20分钟。

[0264] 2.5小鼠大脑PIK4IIIα的mRNA水平的定量PCR分析方法

[0265] 2.5.1主要仪器设备与试剂

[0266] 表5.主要仪器设备与试剂

[0267]

名称	品牌	型号/货号
RNAiso Plus	TAKARA	9109
PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser	TAKARA	RR047A
TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)	TAKARA	RR820A
高速冷冻离心机	Thermo	Heraeus Fresco17
PCR 仪	Biorad	C1000™ Thermal Cycler
qPCR 仪	Biorad	CFX96

[0268] 2.5.2引物信息

[0269] 表6.引物信息

[0270]

名称	序列
Mouse-β-actin-F	GTACCACCATGTACCCAGGC
Mouse-β-actin-R	AACGCAGCTCAGTAACAGTCC
Mouse-Pi4ka-F	CCTAGCCTAGCACCTGAAGC
Mouse-Pi4ka-R	CGTGTGCATCAACGGTCCA

[0271] 2.5.3实验步骤

[0272] RAN抽提:每个脑组织样本(半脑),各加RNAiso Plus 1000μl,组织裂解仪研磨(10转/秒×10秒/循环×10循环),室温静置5min,12000g 4℃离心10min;取上清900μl加入到新鲜1.5ml EP管中,各加200μl三氯甲烷,充分混匀,室温静置5min;12000g 4℃离心15min,将上清400μl移至新1.5ml EP管中,各加800μl异丙醇,室温静置10min;12000g 4℃离心10min,弃上清;75%的乙醇1ml/管,轻轻混匀,7500g 4℃离心5min,弃上清;沉淀室温晾干,各加50μl H_2O溶解。

[0273] 逆转录:使用去DNA的逆转录试剂盒,20μl体系。取1μg RNA于200μl PCR管中,加5×gDNA eraser buffer 2μl/管,gDNA eraser 1μl/管,H_2O补至10μl。42℃2min消化DNA。向该反应液加PrimeScript RT Enzyme MIX I1μl/管,RT primer mix 1μl/管,5×primeScript buffer2(for real time)4μl/管,RNase free H_2O 4μl。37℃ 15min,85℃ 5sec,4℃的程序进行逆转录。得到的cDNA立即使用或-20℃保存备用。

[0274] 实时定量PCR:用RNase free H_2O将cDNA稀释10倍。反应体系为TB Green Premix Ex Taq II 12.5μl,双向引物(10μM)各1μl,cDNA模板2μl,RNase free H_2O 8.5μl,总体积25μl。反应程序采用两步法:95℃预变性30sec;PCR反应95℃ 5sec,60℃ 30sec,共40各循环;最后运行溶解曲线程序。每个样本3个技术重复。

[0275] 2.5.4数据分析:采用ΔCT法对目标基因进行相对定量。

[0276] 2.6数据分析和统计

[0277] SPSS软件用来进行数据的比较分析。文章中的数据统计都以平均值±标准误的方式呈现。数据有显著差异的标准是p值＜0.05。

[0278] 2.7实验结果

[0279] 2.7.1小鼠大脑PI4KIIIα的mRNA水平与抑郁程度正相关

[0280] 取35只雄性2月龄的ICR小鼠,进行第一次强迫游泳实验,经历无可回避的压迫。在之后的第七天,这些小鼠经历第二次强迫游泳实验,并记录每只小鼠在第二次强迫游泳总共6min中的最后4min内处于“不动状态”的时间。然后,快速取出每只小鼠的大脑,提取脑组

织中的总RNA,进行逆转录获得cDNA。对每只小鼠的PI4KIIIα和内参beta-actin的cDNA进行定量PCR,采用ΔCT法进行相对定量,分析计算每只小鼠脑组织中PI4KIIIα的RNA相对内参RNA的量。剔除“不动状态”的时间小于10s或大于160s的数据后,以余下的每只小鼠的“不动状态”时间和PI4KIIIα的RNA的相对量分别为X和Y轴值制作点阵图(图2)。结果显示小鼠大脑PI4KIIIα的mRNA水平与抑郁程度线性正相关。该实验结果提示PI4KIIIα在抑郁严重程度调节或介导中起作用。

[0281] 2.7.2 PI4KIIIα抑制剂减轻APP/PS1小鼠的焦虑和抑郁行为

[0282] 获取6月龄的雄性APP/PS1小鼠和同窝野生型雄性小鼠各9只,每周一至周五的每天给两组小鼠灌胃PAO溶液一次(剂量:0.3mg/kg体重),周六和周日停药。另取同月龄的雄性APP/PS1小鼠9只同时给予不含PAO的溶液灌胃。两月后,三组小鼠因其它试验目的经历了8天的水迷宫训练(training)及之后一天的记忆测试试验。待小鼠月龄达到10月时,每只小鼠被转入一个长宽高均为15cn的无盖的不透明有机玻璃盒中,盒底放置一个改装的家用灭蚊拍。当小鼠处于灭蚊拍中央时给予1秒电击。之后再放回饲养鼠笼(home cage)。7天后,给予高架十字迷宫实验,记录每只小鼠在开放臂所处的时间,计算在开放臂所处的时间占总的在高架十字迷宫所处的时间的百分比。如图3结果显示,没用PAO治疗的APP/PS1小鼠在开放臂所处时间的百分比明显比野生型的小,而用PAO治疗的APP/PS1在开放臂所处时间的百分比明显与野生型的无明显差异。如图3所示PAO能预防或减轻APP/PS1小鼠的焦虑症状。

[0283] 为了探索药物对APP/PS1焦虑行为的治疗作用与对APP/PS1小鼠学习记忆障碍的治疗作用之间是否存在必然的相互依赖性,我们测试了PAO和安理申(Aricept,盐酸多奈哌齐)对APP/PS1焦虑和学习记忆障碍的治疗作用。获取APP/PS1与C57B/6交配的子代的4月龄同窝雄性APP/PS1小鼠32只,随机平分为两组,周一至周六每天通过灌胃分别给予PAO(剂量为0.1mg/kg体重,这组小鼠称为APP/PS1PAO小鼠),Aricept(剂量为1.0mg/kg体重,这组小鼠称为APP/PS1Aricept小鼠)。另外取4月龄同窝雄性WT小鼠16只和APP/PS1小鼠20只,同样灌胃0.1%DMSO水溶液。5周后,进行水迷宫试验。如图4所示,未用药治疗的APP/PS1小鼠在水迷宫中表现最差,WT小鼠表现最好。PAO治疗的小鼠在获得性训练和反向获得性训练中的表现都明显比未用药治疗的APP/PS1小鼠要好,表明PAO明显改善了APP/PS1小鼠学习记忆能力。Aricept治疗的小鼠在获得性训练中的表现与未治疗的APP/PS1小鼠无明显差异,但在反向获得性训练中的表现与用PAO治疗的小鼠的表现一样,也明显比未治疗的小鼠要好,表明Aricept明显改善了APP/PS1的学习记忆能力,但治疗效果不如PAO的好。

[0284] 各组小鼠在水迷宫试验结束1周后,进入新奇抑制摄食实验。如图5所示,未治疗的APP/PS1小鼠摄食潜伏期明显比WT小鼠长,而PAO治疗的APP/PS1小鼠的摄食潜伏期与WT小鼠的无明显差别,表明PAO能明显减低APP/PS1小鼠的焦虑水平;但是Aricept治疗的APP/PS1小鼠的焦虑水平与未治疗的APP/PS1小鼠无明显差异,甚至更高;表明尽管Aricept能明显改善APP/PS1小鼠的学习记忆能力,却不能减轻APP/PS1小鼠的焦虑水平。所以,能否改善学习记忆与能否改善焦虑程度无必然联系。

[0285] 2.7.3在野生型小鼠中下调PI4KIIIα可预防或减轻抑郁及焦虑表现

[0286] 获取$Pi4k^{-/+}$与C57/6B交配后子代中的2月龄野生型(WT)和$Pi4k^{-/+}$小鼠(分别15只),转移至行为实验室适应1周。第二周起开始进行CUMS实验,WT小鼠从CUMS的第3周开始体重滞涨,甚至下降;而$Pi4k^{-/+}$小鼠能持续增长。从CUMS的第6周起,$Pi4k^{-/+}$小鼠与WT比较有

显著性差异(表7)。糖水偏好方面,应激刺激前及CUMS的前2周,两组小鼠对糖水都有明显偏好,且无明显差异。从CUMS的第3周起,两组小鼠对糖水的偏好度便逐周下降,但WT组比$Pi4k^{-/+}$组下降更快,且在CUMS的第7周时,WT组的糖水偏好度显著比$Pi4k^{-/+}$组的低(表8)。该实验结果显示下调PI4KIIIα表达可以预防或减轻抑郁症状。

[0287] CUMS实验结束后的当天,给小鼠供应充分的水和食物,第2天早上9点开始禁食、供水、取出垫料,第三天进行新奇抑制摄食实验。结果显示WT组平均摄食潜伏期明显比$Pi4k^{-/+}$组的长(WT:212±45s,$Pi4k^{-/+}$:154±27s,T-Test,P<0.05)。该实验结果显示下调PI4KIIIα表达可以预防或减轻焦虑症状。

[0288] 表7.WT与$Pi4K^{-/+}$小鼠在CUMS期间的体重情况(n=15,mean±s.e.m.)

[0289]

时间	WT	$Pi4K^{-/+}$
刺激前	24.5±1.2	24.3±1.6
CUMS 1 周	25.1±1.1	24.8±1.4
CUMS 2 周	25.2±1.5	25.2±1.7
CUMS 3 周	25.4±1.7	25.8±1.5
CUMS 4 周	25.6±3.0	26.3±1.3
CUMS 5 周	25.2±2.2	26.8±1.6
CUMS 6 周	25.0±1.7	27.2±2.1*
CUMS 7 周	24.4±2.2	27.5±1.6*
CUMS 8 周	24.1±1.3	27.5±1.5*
CUMS 9 周	23.5±2.0	27.7±1.0**

[0290] “*”表示与对应的WT小鼠比较有显著性差异,p<0.05

[0291] 表8.Pi4k缺失对CUMS小鼠糖水偏爱的影响(n=15,mean±s.e.m.)

[0292]

时间	WT	$Pi4K^{-/+}$
刺激前	0.84±0.15	0.85±0.2
CUMS 1 周	0.83±0.15	0.84±0.21
CUMS 2 周	0.81±0.12	0.84±0.17
CUMS 3 周	0.78±0.15	0.83±0.16
CUMS 4 周	0.75±0.1	0.84±0.11
CUMS 5 周	0.72±0.15	0.82±0.17
CUMS 6 周	0.71±0.15	0.80±0.15
CUMS 7 周	0.64±0.12	0.81±0.13*
CUMS 8 周	0.60±0.11	0.80±0.14*
CUMS 9 周	0.53±0.1	0.77±0.10**

[0293] “*”、“**”表示与对应的WT小鼠比较有显著性差异,p<0.05、p<0.01

[0294] 2.7.4下调PI4KIIIα可预防或减轻神经退行性疾病模型小鼠的抑郁及焦虑表现。

[0295] 为了测试下调PI4KIIIα表达是否可以预防或减轻其它疾病,特别是神经系统疾病伴发的焦虑抑郁,我们获取$Pi4k^{-/+}$与C57/6B基因背景的APP/PS1交配后子代中的4月龄的“APP/PS1”和“APP/PS1;$Pi4k^{-/+}$”小鼠各15只进行CUMS试验,每周测定两组小鼠对糖水的偏好度。如表9结果显示APP/PS1;$Pi4k^{-/+}$小鼠对糖水偏好度的下降明显比APP/PS1小鼠要慢,表明下调PI4KIIIα表达可以预防或减轻APP/PS1小鼠的抑郁症状。

[0296] 表9下调PI4KIIIα对经历CUMS的APP/PS1小鼠的糖水偏爱的影响(n=15,mean±s.e.m.)

[0297]

时间	APP/PS1	APP/PS1；$Pi4K^{-/+}$
刺激前	0.78±0.15	0.83±0.17
CUMS 1 周	0.75±0.15	0.81±0.12
CUMS 2 周	0.73±0.18	0.82±0.16
CUMS 3 周	0.70±0.09	0.79±0.17
CUMS 4 周	0.65±0.11	0.77±0.11
CUMS 5 周	0.61±0.10	0.81±0.19*
CUMS 6 周	0.55±0.11	0.78±0.12*
CUMS 7 周	0.51±0.10	0.75±0.13**

[0298] “*”、“**”表示与对应的APP/PS1小鼠比较有显著性差异,$p<0.05$、$p<0.01$

[0299] 同样,CUMS实验结束后的当天,给小鼠供应充分的水和食物,第2天早上9点开始禁食、供水、取出垫料,第三天进行新奇抑制摄食实验。结果显示APP/PS1;$Pi4k^{-/+}$小鼠平均摄食潜伏期明显比APP/PS1组的短(APP/PS1:242s,$Pi4k^{-/+}$:183s,T-Test,$P<0.05$)。该实验结果显示下调PI4KIIIα表达可以预防或减轻APP/PS1小鼠的焦虑症状。

[0300] 2.7.5下调Efr3a可预防或减轻神经退行性疾病模型小鼠的抑郁及焦虑表现。

[0301] 获取APP/PS1与$Efr3a^{-/+}$交配的子代的同窝WT,$Efr3a^{-/+}$,APP/PS1,APP/PS1;$Efr3a^{-/+}$小鼠分别为15、4、14和9只。待小鼠达到8月龄时,进行黑白箱实验。如图6显示,与野生型小鼠(WT)比较,8月龄的APP/PS1小鼠在白色箱中穿越宫格的数量(行走距离)显著增加,而同龄的APP/PS1;$Efr3^{-/+}$小鼠与WT小鼠无明显差异,但比APP/PS1小鼠明显减少。提示APP/PS1小鼠的焦虑程度明显比WT小鼠高,敲除一个拷贝的Efr3a基因能明显预防或减轻APP/PS1小鼠的焦虑程度。

[0302] 实施例3:PAO及其衍生物对小鼠焦虑抑郁的抑制作用

[0303] 本实验测试了PI4KIIIa抑制剂PAO及其衍生物对无明显其它疾病状或神经损伤的野生型小鼠的焦虑抑郁的抑制作用。

[0304] 3.1 PAO衍生物抑制野生型小鼠的抑郁行为

[0305] 我们还测试了PAO衍生物对ICR小鼠在被迫游泳实验中的影响。比如:在PAO苯环的对位上的-H被-F、$-CF_3$和-I取代后分别生成的衍生物PIO4、PIO5和PIO6。这三种PAO衍生物首先都用中链甘油三酸酯-MIGLYOL 812N(IOI Oleo GmbH)配置为浓度为1.0mg/g的母液。每天给小鼠进行灌胃给药前用同样的油分3步梯度稀释为0.033mg/ml的溶液后,均按0.3mg/kg体重的剂量灌胃给药。对照组(veichle)仅给予中链甘油三酸酯。

[0306] 取80只2月龄的ICR小鼠,随机平分为4组,在被迫游泳实验室适应1周后,进行第一次6分钟的被迫游泳,记录后4分钟的总的不动时间(immobile time),剔除各组总的不动时间小于10秒和大于160秒的小鼠后,veichle(空白油)、PIO4、PIO5和PIO6组分别留下16、14、17和15只小鼠。然后,每组每天按0.3mg/kg体重的剂量灌胃给药一次,连续6天。第7天,进行第二次的6分钟被迫游泳实验,每只小鼠在进行被迫游泳实验前60分钟按同样剂量给药一次。记录每只小鼠在后4分钟的不动时间。如图7所示,给空白油的小鼠在第一和第二次被迫游泳实验中的不动时间无明显差别,而PIO4、PIO5和PIO6组的小鼠在第二次被迫游泳实验中的不动时间都比它们在第一次被迫游泳实验中的不动时间明显减少,表明PAO衍生物PIO4、PIO5和PIO6都能减轻焦虑抑郁的行为表现。

[0307] 3.2 PAO预防或减轻神经元损伤导致的焦虑抑郁

[0308] 小分子化合物1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahy-dropyridine,MPTP)被单胺氧化酶B(MAO-B)脱氢生成MPP+离子,这种离子抑制线粒体复合酶I,产生细胞毒性,甚至使该细胞死亡。MPP^+离子比较特异地被黑质(Substantial nigra)中的多巴胺神经元大量摄取,MMP^+阻断线粒体呼吸链的复合体I,导致多巴胺神经元神经退行性改变。

[0309] 取50只4月龄C57B6雄性小鼠,随机分为空白组(Blank)10只,神经损伤后安慰剂组(PD-ctrl)20只,神经损伤后PAO治疗组(PD-PAO)20只。MPTP首先用DMSO溶解,然后用生理盐水稀释,丙磺舒用5%的碳酸氢钠水溶液溶解。首先,给安慰剂组和治疗组的每只小鼠每天腹腔注射一次MPTP(供应商:CSN Pharm),25mg/kg,连续5天,停药两天,然后又按第一周的方法连续5天注射。第三周,每只小鼠每天腹腔先注射一次丙磺舒(250mg/kg),随后注射一次MPTP(25mg/kg),连续5天。空白组前三周仅注射相应的溶剂。第四周,空白组和安慰剂组每天灌胃0.1%的DMSO溶液,而治疗组每天灌胃PAO,0.3mg/kg(PAO溶于0.1%DMSO水溶液),连续7天。

[0310] 第四周的第6天所有动物被禁食,但供水。第7天进行糖水偏好实验。结果如图8A显示,空白组小鼠对糖水有明显偏好,安慰组的小鼠对糖水的偏好有明显减低(One way ANOVA,$p<0.05$),而治疗组对糖水的仍然偏好,与空白组无明显差异。糖水偏好实验后,各组小鼠停止注射和灌胃。第六周的第6天所有动物被禁食,但供水;第7天又进行糖水偏好实验,结果如图8B所示,三组动物的对糖水都有明显偏好,之间无明显差异。

[0311] 上述实验期间,安慰剂组共死亡12只小鼠,治疗组死亡6只小鼠,空白组无死亡。

[0312] 3.3 PAO及其衍生物抑制野生型小鼠的焦虑行为

[0313] 取42只3月龄ICR雄性小鼠随机分为2组,第一组22只为安慰剂组(vehicle),每日灌胃安慰剂(0.1%DMSO水溶液),第二组为PAO处理组,每日灌胃PAO的0.1%DMSO水溶液,剂量是0.3mg/kg体重,连续12天。第12天进行新奇抑制摄食实验(NSF),NSF实验前24小时,所有动物被禁止摄食,但供水。结果如图9A所示,安慰剂组小鼠在进入新环境中后,平均需要201.6±21.5秒($n=22$)开始进食,而PAO处理组平均只需要159.6±20.3秒($n=20$),比安慰剂组明显缩短(T Test,$p<0.05$)。所以,PAO能抑制野生型小鼠在新环境中的焦虑行为。

[0314] 另取47只3月龄的ICR小鼠随机分为3组,第一组16只为安慰剂组(vehicle),每日灌胃安慰剂(0.1%DMSO水溶液),第二组15只和第三组16只,分别为PI05和PI06处理组,每日分别灌胃PI05和PI06的0.1%DMSO水溶液,剂量是0.3mg/kg体重,连续7天。第7天进行新奇抑制摄食实验(NSF),NSF实验前24小时,所有动物被禁止摄食,但供水。结果如图9B所示,安慰剂组小鼠在进入新环境中后,平均需要216.6±21.2秒($n=16$)开始进食,而PI05和PI06处理组分别平均需要194.6±21.7秒($n=15$)和154.2±21.2秒($n=16$),PI06处理组进食的潜伏期比安慰剂组明显缩短(one way ANOVA,$p<0.05$),PI05处理组有缩短的趋势。

[0315] 所以,PAO及其衍生物能抑制野生型小鼠在新环境中的焦虑行为。

[0316] 实施例4.抑制PI4KIIIα、TTC7、Hyccin和RBO对PI4KIIIα复合体表达的影响

[0317] 实验材料和方法

[0318] 果蝇品系和遗传学

[0319] 用标准的果蝇培养基,12/12小时的光照/黑暗循环、25℃环境培养羽化后的果蝇成虫。

[0320] 使用的果蝇品系有:rbo^2/Cyo-GFP(rbo^2是rbo基因敲除突变,Cyo-GFP是表达绿色荧光蛋白GFP的平衡染色体,$rbo^{-/+}$)、rbo^2/rbo^2;rbo-egfp/rbo-egfp(rbo^2突变的纯合和rbo-egfp转基因纯合的突变体,该果蝇品系简称为rbo-gfp)(rbo-egfp转基因是由包含完整rbo的基因组DNA片段构建而成的重组DNA,在rbo的终止密码子前插入了编码绿色荧光蛋白(GFP)的DNA序列,因此,rbo-egfp转基因表达RBO-GFP融合蛋白)、P[lacW]l(2)$k14710^{k15603}$/Cyo-GFP(由转座子P[lacW]插入形成的ttc7基因突变体,也称为$ttc7^{-/+}$)、104577/Cyo-GFP(104577是hyccin基因及其附近的DNA片段缺失后形成的染色体突变,也称为$hyccin^{-/+}$)、$pi4k^{GS27/+}$、$pi4k^{FY24/+}$、$pi4k^{FQ88/+}$、$pi4k^{GJ86/+}$(分别是编码PI4KIIIα蛋白的基因的4种无义突变的杂合子,都有表达绿色荧光蛋白的平衡染色体FM7,Gr-GFP,都是美国普林斯顿大学的Schupbach实验室构建的)。

[0321] 蛋白质免疫印迹和免疫共沉淀实验

[0322] 分别收集各基因型500个(用于免疫共沉淀)和100个(用于蛋白质免疫印迹)果蝇头部并统一处理。果蝇头置于冰上,用预冷的含有1%NP40和蛋白酶抑制剂的Tris缓冲液裂解,制成匀浆。免疫共沉淀实验根据Pierce® Co-Immunoprecipitation(Co-IP)kit(Thermo Scientific)试剂盒说明书进行操作。免疫共沉淀的实验产物使用SDS-PAGE胶进行分离,并用考马斯亮蓝进行染色。使用的一抗包括:抗GFP(Casico),抗RBO和PI4KIIIα(Zhang等人,JNeurosci.,2017,第4928-4941页),抗Hyccin(由Abmart(Shanghai)使用FAM126片段RLPPIKNPRQ作为抗原生产),抗neuroglin(DSHB,clone BP104),抗β-actin和抗Tubulin(Cell Signaling)。

[0323] 从组织裂解液中分离PM片段

[0324] 果蝇脑组织置于冰上,用预冷的含有1%NP40和蛋白酶抑制剂的Tris缓冲液处理,然后收集裂解液在4℃下15000g离心1小时,上清转移至新的EP管中,并使用与上述同样的Tris裂解液重悬沉淀,上清和沉淀重悬物均进行SDS-PAGE胶和蛋白质免疫印迹分析。

[0325] 统计分析

[0326] 使用软件GraphPad Prism进行数据分析。所有数据均以平均值±SEM表示,且$p<0.05$(*$p<0.05$,**$p<0.01$和***$p<0.001$)时有统计学意义。

[0327] 结果

[0328] PI4KIIIα、TTC7、Hyccin和RBO在细胞膜上相互作用形成蛋白复合体-PI4KIIIα复合体,都是PI4KIIIα复合体不可或缺的部分。

[0329] SDS-PAGE胶的考马斯亮蓝染色显示(图10A):在表达RBO-GFP融合蛋白(rbo-gfp)的果蝇头匀浆中,抗GFP抗体能免疫共沉淀出PI4KIIIα、TTC7、Hyccin和RBO-GFP蛋白,而在不表达RBO-GFP融合蛋白的果蝇头匀浆中则不能。蛋白质谱分析能从与RBO-GFP融合蛋白共免疫沉淀的蛋白中鉴定出PI4KIIIα、TTC7和Hyccin蛋白(表10)。与此一致的是,蛋白质谱分析抗RBO抗体能从野生型的果蝇头匀浆中免疫共沉淀出PI4KIIIα、TTC7、Hyccin和RBO蛋白(表11);且SDS-PAGE胶的蛋白印迹能证实PI4KIIIα、Hyccin和RBO蛋白相互免疫共沉淀(图10B)。

[0330] SDS-PAGE胶的蛋白印迹显示(图10C):RBO蛋白只表达在细胞膜上,而Hyccin蛋白在细胞膜和细胞浆中都有,但主要定位在细胞浆中;分别敲除hyccin、rbo和ttc7基因都能导致RBO缺失,分别敲除rbo和ttc7基因也导致细胞膜的Hyccin蛋白缺失或显著减少,但不

明显改变致细胞浆的Hyccin蛋白表达量。这表明细胞膜上的PI4KIIIα、TTC7、Hyccin和RBO蛋白的表达相互依赖,都是PI4KIIIα复合体不可或缺的部分。但是,细胞浆中Hyccin表达不依赖TTC7和RBO。

[0331] SDS-PAGE胶的蛋白印迹显示(图10D):敲除一个拷贝的hyccin能显著减少Hyccin的表达总量,但敲除一个拷贝的rbo基本不改变Hyccin的表达总量。

[0332] SDS-PAGE胶的蛋白印迹显示(图10E):敲除一个拷贝的PI4KIIIα也能显著减少RBO的表达量,进一步表明PI4KIIIα复合体各组分的相互依赖性。

[0333] 表10.rbo-gfp与wt果蝇均浆中与GFP抗体共免疫沉淀的特异性RBO-GFP相互作用蛋白的质谱分析

[0334]

	PepCount	CoverPercent	MW(kd)
RBO-GFP	98	52.3%	122
PI4KIII	186	35.5%	244
TTC7	77	43.1%	95
Hyccin	33	32.7%	70

[0335] 表11.野生型果蝇均浆中与RBO抗体(而非对照蛋白)共免疫沉淀的RBO相互作用蛋白的质谱分析

[0336]

	PepCount	CoverPercent	MW(kd)
RBO	93	44.8%	95
PI4KA	215	37.8%	244
TTC7	55	30.6%	95
Hyccin	20	25.4%	70

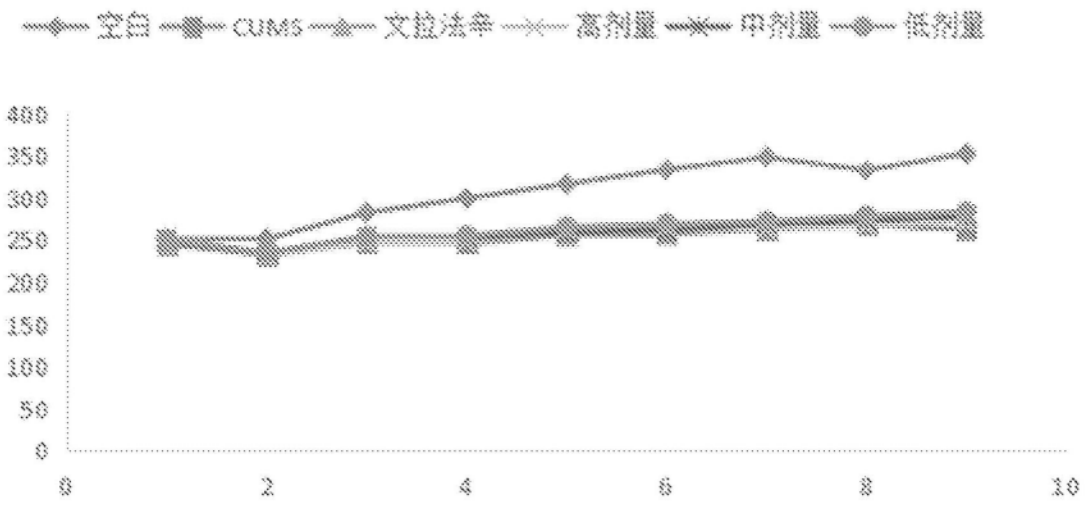

空白
CUMS
文拉法辛
高剂量
中剂量
低剂量
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0
2
4
6
8
10

图1

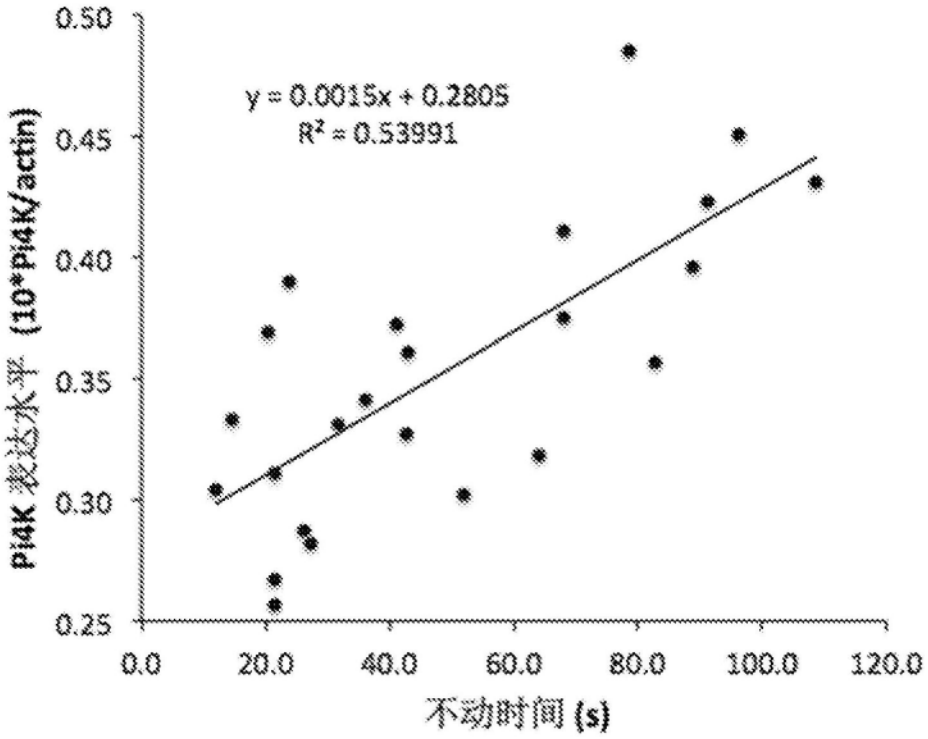

y = 0.0015x + 0.2805
R² = 0.53991
Pi4K 表达水平 (10*Pi4K/actin)
0.50
0.45
0.40
0.35
0.30
0.25
0.0
20.0
40.0
60.0
80.0
100.0
120.0
不动时间 (s)

图2

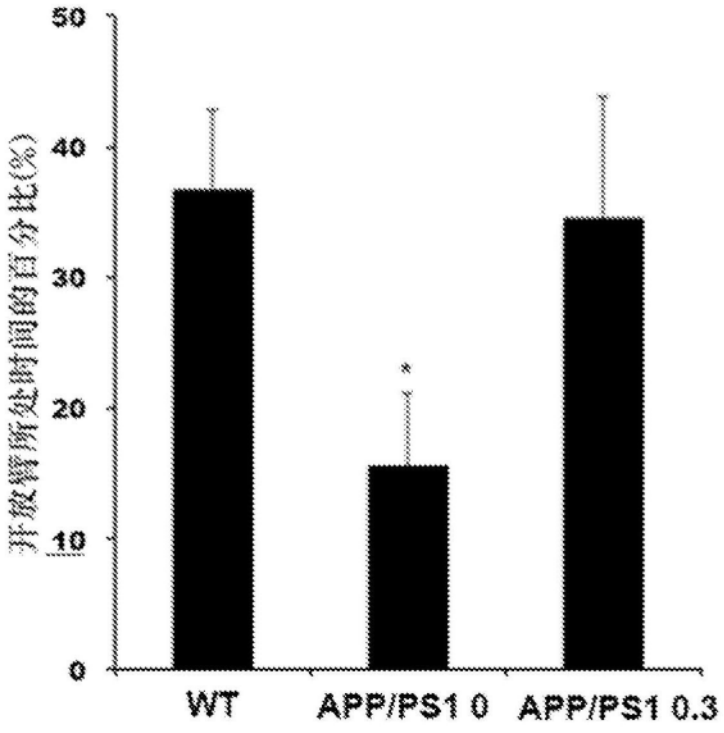

50
40
30
20
10
0
开放臂所处时间的百分比(%)
*
WT
APP/PS1 0
APP/PS1 0.3

图3

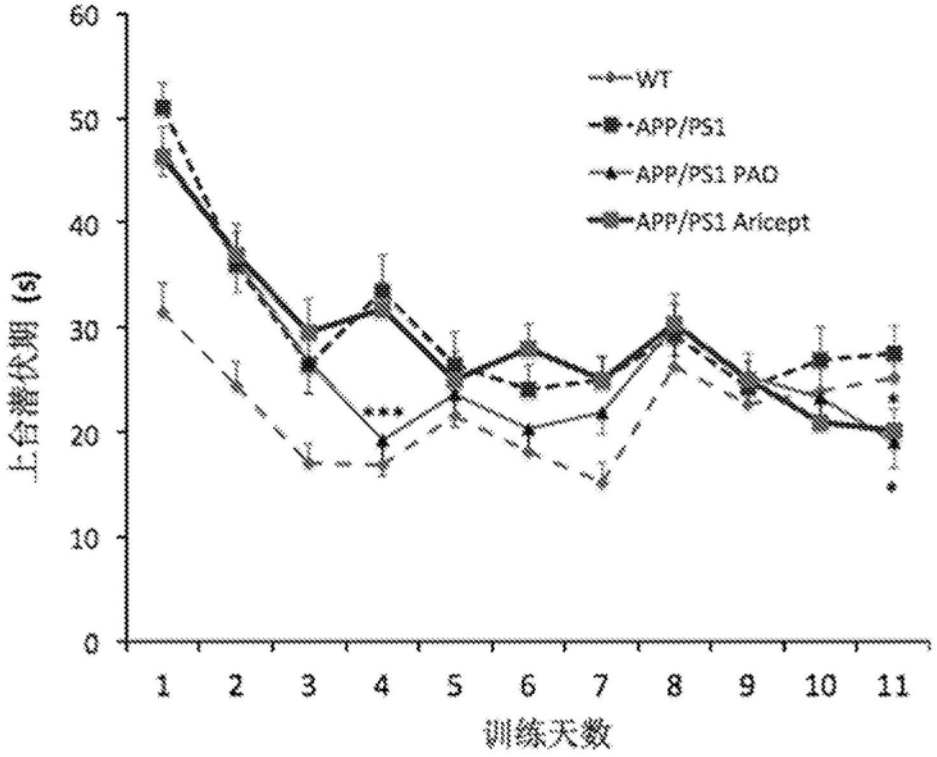

60
50
40
30
20
10
0
上台潜伏期 (s)
WT
APP/PS1
APP/PS1 PAO
APP/PS1 Aricept
***
*
*
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
训练天数

图4

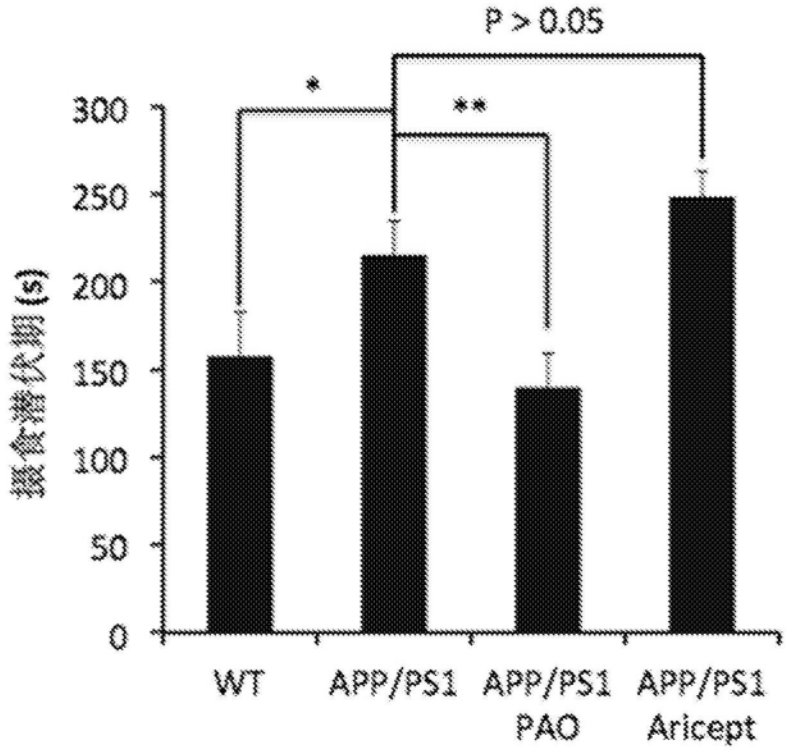

P > 0.05
*
**
300
250
200
150
100
50
0
摄食潜伏期(s)
WT
APP/PS1
APP/PS1 PAO
APP/PS1 Aricept

图5

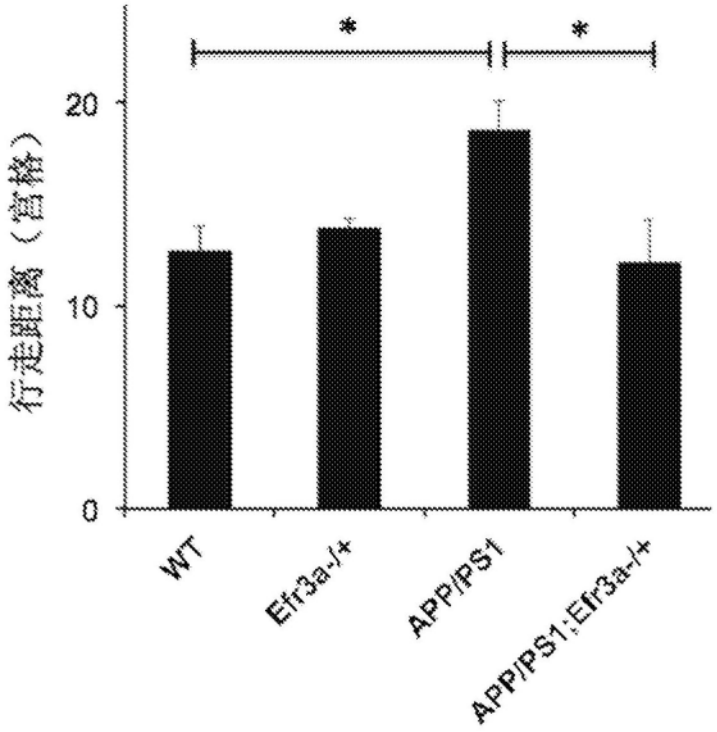

*
*
20
10
0
行走距离（宫格）
WT
Efr3a-/+
APP/PS1
APP/PS1;Efr3a-/+

图6

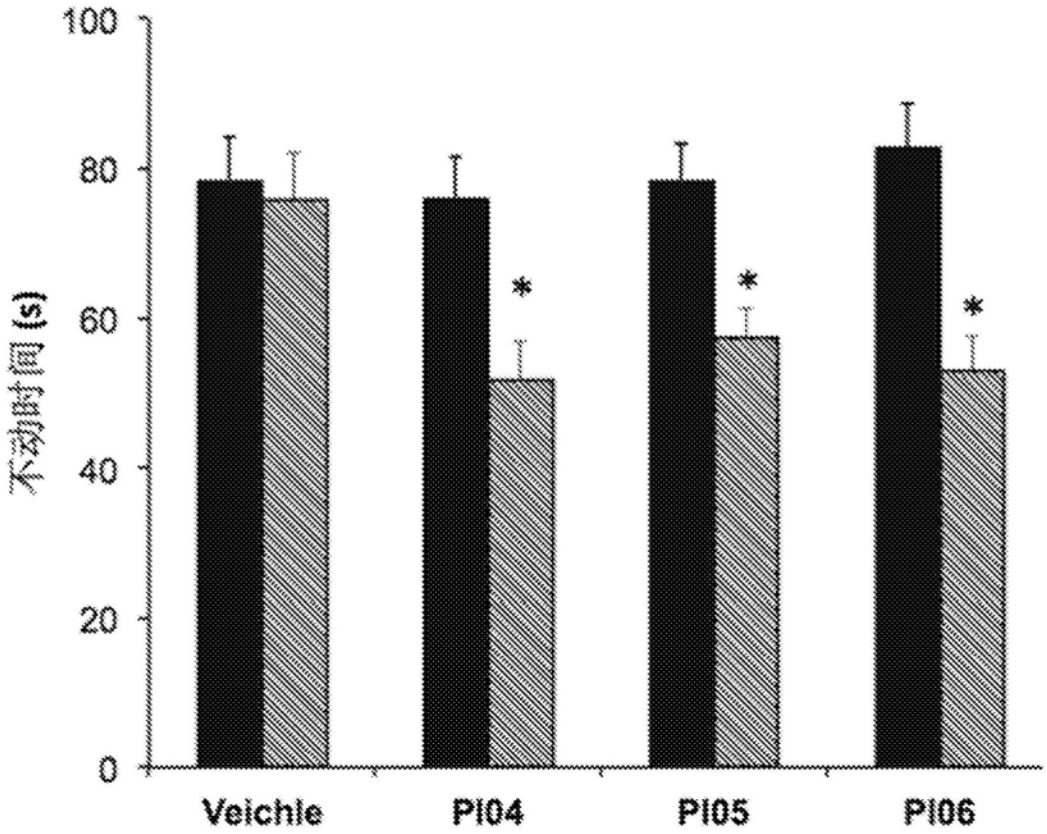

100
80
60
40
20
0
不动时间 (s)
*
*
*
Veichle
PI04
PI05
PI06

图7

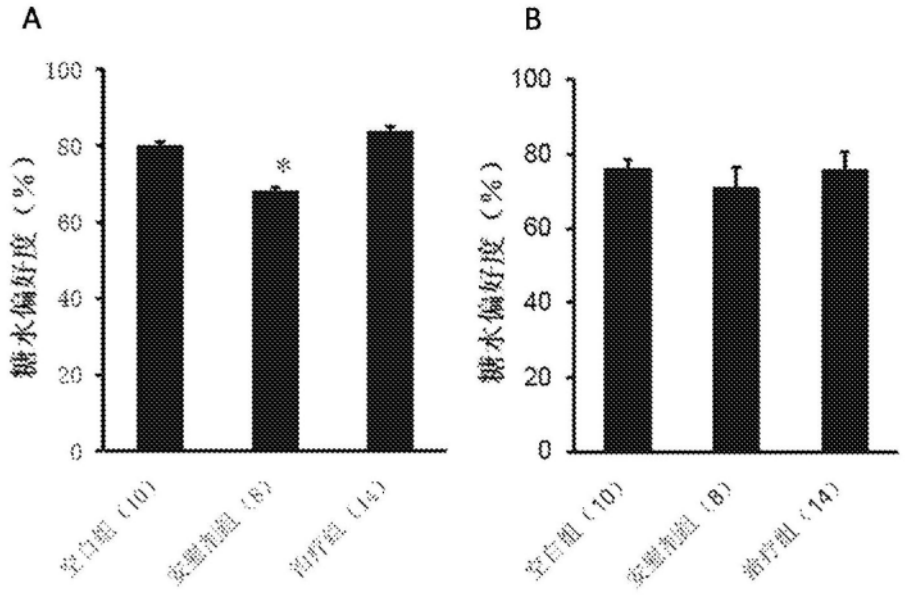

A
B
100
80
60
40
20
0
糖水偏好度（%）
*
空白组（10）
实验组（8）
治疗组（14）

图8

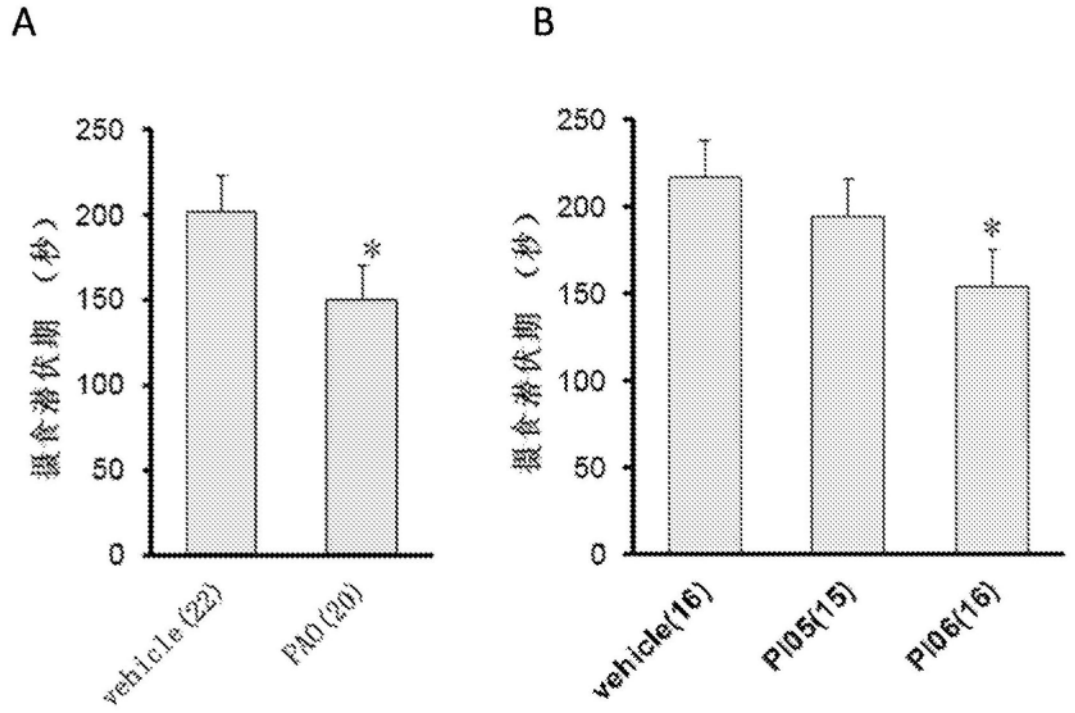

A
B
250
200
150
100
50
0
摄食潜伏期（秒）
*
vehicle (22)
PAO (20)
vehicle(16)
PI05(15)
PI06(16)

图9

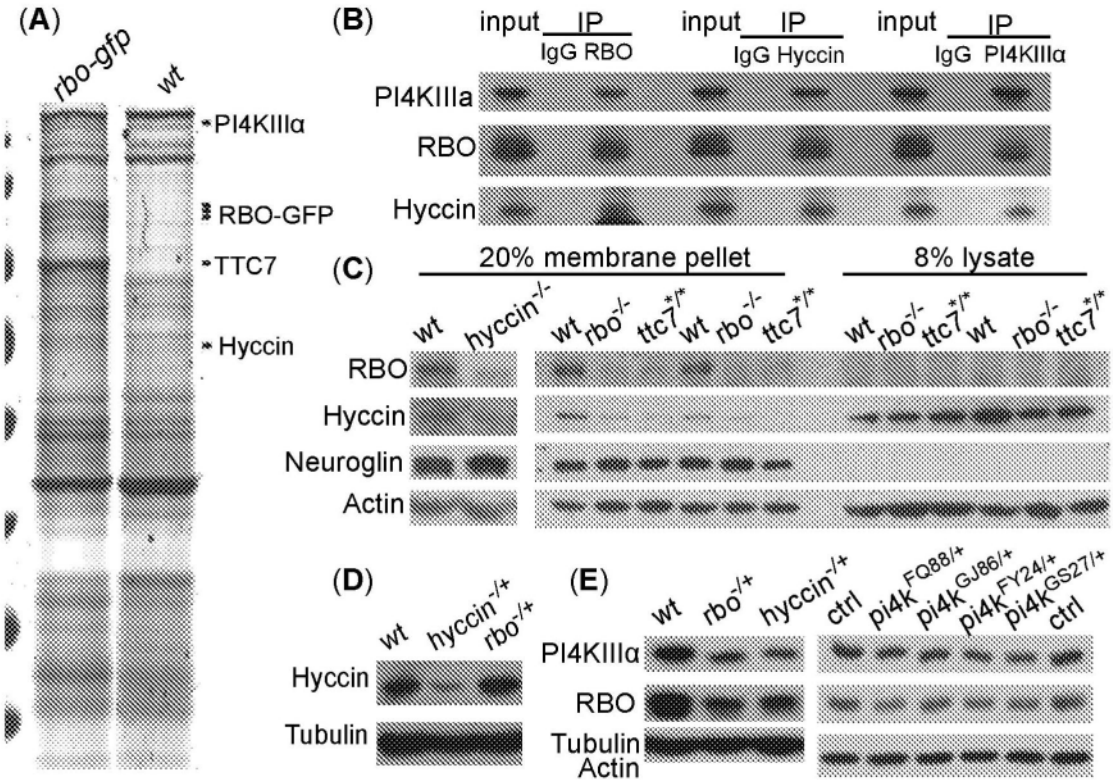

(A)
rbo-gfp
wt
PI4KIIIα
RBO-GFP
TTC7
Hyccin
(B)
input IP
IgG RBO
input IP
IgG Hyccin
input IP
IgG PI4KIIIα
PI4KIIIa
RBO
Hyccin
(C)
20% membrane pellet
8% lysate
wt
hyccin-/-
rbo-/-
ttc7*/*
RBO
Hyccin
Neuroglin
Actin
(D)
wt
hyccin-/+
rbo-/+
Hyccin
Tubulin
(E)
ctrl
pi4KFQ88/+
pi4KGJ86/+
pi4KFY24/+
pi4KGS27/+
PI4KIIIα
RBO
Tubulin
Actin

图10