

(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
2020 年 7 月 2 日 (02.07.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/134022 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 31/4439 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2019/095242
- (22) 国际申请日: 2019 年 7 月 9 日 (09.07.2019)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201811610364.6 2018 年 12 月 27 日 (27.12.2018) CN
- (71) 申请人: 浙江大学(ZHEJIANG UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路 866 号, Zhejiang 310058 (CN)。
- (72) 发明人: 胡富强(HU, Fuqiang); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路 866 号, Zhejiang 310058 (CN)。
温丽娟(WEN, Lijuan); 中国浙江省杭州市西湖

区余杭塘路 866 号, Zhejiang 310058 (CN)。袁弘(YUAN, Hong); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路 866 号, Zhejiang 310058 (CN)。王凯(WANG, Kai); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路 866 号, Zhejiang 310058 (CN)。孟廷廷(MENG, Tingting); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路 866 号, Zhejiang 310058 (CN)。

(74) 代理人: 北京尚诚知识产权代理有限公司(SHANGCHENG & PARTNERS); 中国北京市西城区平安里西大街 28 号光大国际中心 18 层 1801, Beijing 100034 (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,

(54) Title: USE OF AXITINIB AND ANALOGS THEREOF IN PREPARING BLOOD-BRAIN BARRIER PERMEABILITY REGULATOR

(54) 发明名称: 阿西替尼及其类似物在制备血脑屏障渗透性调控剂中的应用

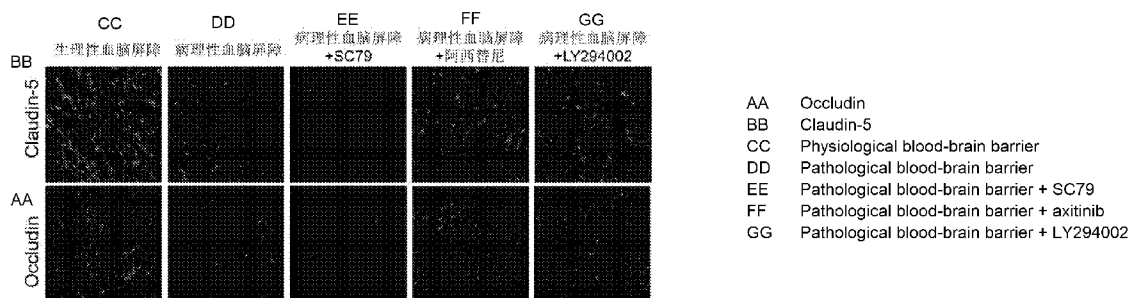


图 12

(57) Abstract: The present invention relates to the use of axitinib and analogs thereof in preparing a blood-brain barrier permeability regulator. The blood-brain barrier permeability regulator can reduce the permeability of the blood-brain barrier, and can promote the recovery of the blood-brain barrier function from a pathologically destroyed state to a state close to that of the physiological barrier. The axitinib and analogs thereof reduce the degree of down-regulation of a pathological blood-brain barrier tight junction protein Claudin-5/Occludin by inhibiting the vascular endothelial cell growth factor-phosphatidylinositol kinase-protein kinase B signaling pathway, thereby reducing the permeability of the blood-brain barrier. The blood-brain barrier permeability regulator can be used in the treatment of related diseases that cause changes in the permeability of the blood-brain barrier.

(57) 摘要: 本发明涉及阿西替尼及其类似物在制备血脑屏障渗透性调控剂中的应用。所述血脑屏障渗透性调控剂能够降低血脑屏障渗透性, 促进血脑屏障功能由病理性破坏状态恢复至接近生理性屏障状态。阿西替尼及其类似物通过抑制血管内皮细胞生长因子-磷脂酰肌醇激酶-蛋白激酶B信号通路, 减少病理性血脑屏障紧密连接蛋白Claudin-5/Occludin下调的程度, 降低血脑屏障渗透性。所述血脑屏障渗透性调控剂能够用于引起血脑屏障渗透性改变的相关疾病的治疗。

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,
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))。

阿西替尼及其类似物在制备血脑屏障渗透性调控剂中的应用

5 技术领域

本发明属于制药领域，涉及阿西替尼及其类似物的新的治疗用途，尤其涉及阿西替尼及其类似物在制备血脑屏障渗透性调控剂中的应用。该血脑屏障渗透性调控剂能够用于治疗引起血脑屏障渗透性改变的相关疾病。

10

背景技术

15

血脑屏障是保护、维持中枢神经系统功能的特殊系统，主要由脑微血管内皮细胞、内皮细胞之间的紧密连接、基膜以及毛细血管周围的胶质细胞足突构成，其中内皮细胞及其紧密连接是血脑屏障的重要形态学基础。大部分的大分子物质和超过 98% 小分子药物都不能渗漏通过血脑屏障，只有少部分分子量小于 500 Da 的营养物质可以被动扩散或者选择性跨过血脑屏障以维持中枢神经系统的生理平衡。

20

血脑屏障完整性缺失是脑部疾病发生、发展过程中的一个显著的病理学特性。脑毛细血管内皮细胞及细胞间表达的紧密连接构成血脑屏障的低渗和高电阻特性。其中，Claudin-5、Occludin 等是构成紧密连接的关键蛋白，在维持血脑屏障完整性特性中扮演重要的角色。血脑屏障结构病理性破坏主要是指其紧密连接结构完整性缺失及屏障功能异常，伴随着紧密连接蛋白下调表达、血脑屏障渗透性增加、中枢神经系统内环境平衡被破坏，是许多中枢神经系统疾病突出的病理

25

性特征，包括脑胶质瘤、帕金森氏病、脑缺血、阿尔兹海默症、多发性硬化等。

阿西替尼（Axitinib）是由美国 Pfizer 公司研发的一种多靶点酪氨酸激酶抑制剂，可阻断血管内皮细胞生长因子受体（VEGFR）的自磷酸化作用、血管内皮生长因子（VEGF）调节内皮细胞的活力、微管形成及下游信号。该药于 2012 年 1 月 27 日获美国 FDA 批准上

30

市，商品名为 Inlyta。该药为片剂，主要用于治疗对药物没有应答的晚期肾癌。阿西替尼的中文化学名称为：N-甲基-2-((2-((1E)-2-(吡啶-2-基)乙烯)-1H-吡唑-6-基)硫)苯甲酰胺；英文化学名称：N-methyl-2-((3-((1E)-2-(pyridine-2-yl)ethenyl)-1H-indazol-6-yl)sulfanyl)benzamide；分子式：C₂₂H₁₈N₄OS；分子量：386.47；CAS 登记号：319460-85-0。

阿西替尼类似物主要是指作用机制与阿西替尼类似，能作用于血管内皮生长因子-磷脂酰肌醇激酶-蛋白激酶 B (VEGF-PI3K-AKT) 信号通路的抑制剂，包括但不限于 VEGF、PI3K、AKT 等 3 个位点的抑制剂，如磷脂酰肌醇激酶 (PI3K) 位点抑制剂 LY294002。

近年来研究发现阿西替尼具有治疗非小细胞肺癌、白血病的作用，此外，还发现了阿西替尼可通过促进白色脂肪细胞褐色化抵抗高脂饲料诱导的肥胖和胰岛素不敏感症状，同时具有治疗脂肪肝的作用。但是，阿西替尼及其类似物具有调控血脑屏障渗透性的作用尚未报道。

发明内容

本发明的目的在于提供阿西替尼及其类似物在制备血脑屏障渗透性调控剂中的应用。

本发明的发明人经过深入的研究发现，阿西替尼及其类似物对血脑屏障渗透性具有调控作用，其能够降低血脑屏障渗透性，促进血脑屏障功能由病理性破坏状态恢复至接近生理性屏障状态，从而实现针对引起血脑屏障渗透性改变的相关疾病的治疗，本发明正是基于上述发现而完成的发明。具体而言，本发明涉及以下发明内容。

1. 阿西替尼及其类似物在制备血脑屏障渗透性调控剂中的应用。

2. 如上述 1 所述的应用，其特征在于，上述血脑屏障渗透性调控剂能够降低血脑屏障渗透性，促进血脑屏障功能由病理性破坏状态恢复至接近生理性屏障状态。

3. 如上述 1 或 2 所述的应用，其特征在于，阿西替尼及其类似物通过减少病理性血脑屏障紧密连接蛋白 Claudin-5/Occludin 下调的

程度，降低血脑屏障渗透性。

4. 如上述 1 或 2 所述的应用，其特征在于，阿西替尼及其类似物通过抑制血管内皮细胞生长因子-磷脂酰肌醇激酶-蛋白激酶 B 信号通路，减少病理性血脑屏障紧密连接蛋白 Claudin-5/Occludin 下调的程度，降低血脑屏障渗透性。

5. 如上述 1 或 2 所述的应用，其特征在于，所述阿西替尼类似物是能够在血管内皮生长因子-磷脂酰肌醇激酶-蛋白激酶 B 信号通路中对血管内皮生长因子、磷脂酰肌醇激酶或蛋白激酶 B 的任意位点发挥抑制作用的抑制剂。

6. 如上述 5 所述的应用，其特征在于，所述阿西替尼类似物是磷脂酰肌醇激酶抑制剂。

7. 如上述 1 或 2 所述的应用，其特征在于，上述血脑屏障渗透性调控剂是用于治疗引起血脑屏障渗透性改变的相关疾病的药物。

发明的效果

本发明涉及的血脑屏障渗透性调控剂，通过阿西替尼及其类似物对血脑屏障渗透性的调控作用，能够降低血脑屏障渗透性，促进血脑屏障功能由病理性破坏状态恢复至接近生理性屏障状态，从而达到对引起血脑屏障渗透性改变的相关疾病的治疗作用，具有显著优越的技术效果。

附图说明

图 1：体外生理性血脑屏障和病理性血脑屏障跨膜电阻值测定。脑微血管内皮细胞 bEnd.3 的 Transwell 模型模拟生理性血脑屏障，脑微血管内皮细胞 bEnd.3 和脑胶质瘤细胞 U87 MG 共孵育的 Transwell 模型模拟病理性血脑屏障，图中所示结果为细胞电阻仪检测的生理性血脑屏障和病理性血脑屏障细胞跨膜电阻值（n=5）。

图 2：体外 FITC-右旋糖酐跨生理性血脑屏障和病理性血脑屏障转运效率。选用分子量为 10 kDa 的 FITC-右旋糖酐评价血脑屏障的渗透性，将 FITC-右旋糖酐的 HBSS 溶液加于 Transwell 小室，作用 4 小时，图中所示结果为荧光分光光度计检测的 Transwell 外室 FITC-

右旋糖酐浓度 (n=3)。

图 3: 体外生理性血脑屏障和病理性血脑屏障紧密连接蛋白 Claudin-5/Occludin 表达。脑微血管内皮细胞 bEnd.3 的 Transwell 模型模拟生理性血脑屏障, 脑微血管内皮细胞 bEnd.3 和脑胶质瘤细胞 U87 MG 共孵育的 Transwell 模型模拟病理性血脑屏障。对 Transwell 小室膜上的 bEnd.3 细胞进行免疫荧光染色, 图 A 所示为共聚焦观察紧密连接蛋白 Claudin-5/Occludin 表达结果, 图 B 是 Image J 对 Claudin-5/Occludin 表达的荧光半定量分析结果 (n=3)。

图 4: 体内 FITC-右旋糖酐于生理性血脑屏障和病理性血脑屏障渗透性评价。模型动物尾静脉注射 FITC-右旋糖酐溶液, 4 小时后, 心脏灌流获取正常脑组织和荷瘤脑组织, 冠状面冰冻切片厚度为 5 微米, CD31 (红色) 特异性标记脑组织血管, 图中所示为激光共聚焦显微镜观察 FITC-右旋糖酐 (绿色) 在血管的渗漏结果。

图 5: 组织水平透射电镜观察生理性血脑屏障和病理性血脑屏障紧密连接结构。心脏灌流取模型动物正常脑组织和荷瘤脑组织, 图中所示为透射电镜观察正常脑组织切片血脑屏障紧密连接结构 (左图) 及荷瘤脑组织切片血脑屏障紧密连接结构 (右图)。

图 6: 体内生理性血脑屏障和病理性血脑屏障紧密连接蛋白 Claudin-5/Occludin 表达。心脏灌流取模型动物正常脑组织和荷瘤脑组织, 冠状面冰冻切片厚度为 5 微米, 对脑组织紧密连接蛋白 Claudin-5/Occludin 进行免疫荧光染色, 激光共聚焦显微镜观察紧密连接蛋白 Claudin-5/Occludin 表达。

图 7: 体外阿西替尼呈剂量依赖性阻断血管内皮生长因子 (VEGF) 与血管内皮生长因子受体 (VEGFR) 结合。脑微血管内皮细胞 bEnd.3 的 Transwell 模型模拟生理性血脑屏障, Transwell 小室中加入外源性血管内皮生长因子 (VEGF) 刺激, 另外用不同浓度阿西替尼 (0、2 $\mu\text{g/mL}$ 、4 $\mu\text{g/mL}$) 协同作用 24 小时后, 对 Transwell 小室膜上的 bEnd.3 细胞进行免疫荧光染色, 图 A 所示为共聚焦观察紧密连接蛋白 Claudin-5 表达结果, 图 B 是 Image J 对 Claudin-5 表达的荧光半定量分析结果 (n=3)。

图 8：体外阿西替尼降低紧密连接蛋白 Claudin-5 下调的程度，降低病理性血脑屏障破坏程度。脑微血管内皮细胞 bEnd.3 和脑胶质瘤细胞 U87 MG 共孵育 Transwell 模型模拟病理性血脑屏障，阿西替尼作用于 Transwell 小室，24 小时后，对 Transwell 小室膜上的 bEnd.3 细胞进行免疫荧光染色，以脑微血管内皮细胞 bEnd.3 的 Transwell 模型模拟的生理性血脑屏障作为阳性对照组，图 A 所示为共聚焦观察紧密连接蛋白 Claudin-5 表达结果，图 B 是 Image J 对 Claudin-5 表达的荧光半定量分析结果 (n=3)。

图 9：体外阿西替尼呈剂量依赖性促进病理性血脑屏障功能恢复至接近生理性屏障状态。脑微血管内皮细胞 bEnd.3 和脑胶质瘤细胞 U87 MG 共孵育 Transwell 模型模拟病理性血脑屏障，不同浓度的阿西替尼 (0、0.05 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、4 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$) 作用于 Transwell 小室，24 小时后，细胞电阻仪检测细胞跨膜电阻值，以脑微血管内皮细胞 bEnd.3 的 Transwell 模型模拟的生理性血脑屏障作为阳性对照 (n=5)。

图 10：体外 U87 MG 脑胶质瘤细胞与 bEnd.3 细胞共孵育，阿西替尼及其类似物调控血脑屏障渗透性，细胞跨膜电阻值测定。脑微血管内皮细胞 bEnd.3 和脑胶质瘤细胞 U87 MG 共孵育 Transwell 模型模拟病理性血脑屏障，Transwell 小室中加入阿西替尼 (10 μM)、阿西替尼类似物磷脂酰肌醇激酶 (PI3K) 抑制剂 LY294002 (10 μM)、蛋白激酶 B (AKT) 激动剂 SC79 (10 μM)，24 小时后，细胞电阻仪检测细胞跨膜电阻值，以脑微血管内皮细胞 bEnd.3 的 Transwell 模型模拟的生理性血脑屏障作为阳性对照 (n=5)。

图 11：体外 U87 MG 脑胶质瘤细胞与 bEnd.3 细胞共孵育，FITC-右旋糖酐跨膜转运效率。脑微血管内皮细胞 bEnd.3 和脑胶质瘤细胞 U87 MG 共孵育 Transwell 模型模拟病理性血脑屏障，Transwell 小室中加入阿西替尼 (10 μM)、阿西替尼类似物磷脂酰肌醇激酶 (PI3K) 抑制剂 LY294002 (10 μM)、蛋白激酶 B (AKT) 激动剂 SC79 (10 μM)，24 小时后，PBS 清洗 Transwell 小室和外室，将 FITC-右旋糖酐的 HBSS 溶液加于 Transwell 小室，作用 4 小时，图中所示结果即为荧光分光

光度计检测 Transwell 外室的 FITC-右旋糖酐浓度，以脑微血管内皮细胞 bEnd.3 的 Transwell 模型模拟的生理性血脑屏障作为阳性对照 (n=3)。

图 12：体外 U87 MG 脑胶质瘤细胞与 bEnd.3 细胞共孵育，血脑屏障紧密连接蛋白 Claudin-5/Occludin 免疫荧光染色。脑微血管内皮细胞 bEnd.3 和脑胶质瘤细胞 U87 MG 共孵育 Transwell 模型模拟病理性血脑屏障，Transwell 小室中加入阿西替尼 (10 μ M)、阿西替尼类似物磷脂酰肌醇激酶 (PI3K) 抑制剂 LY294002 (10 μ M)、蛋白激酶 B (AKT) 激动剂 SC79 (10 μ M)，24 小时后，对 Transwell 小室膜上的 bEnd.3 细胞进行免疫荧光染色，以脑微血管内皮细胞 bEnd.3 的 Transwell 模型模拟的生理性血脑屏障作为阳性对照，图中所示为共聚焦观察紧密连接蛋白 Claudin-5/Occludin 表达结果。

图 13：Transwell 模型中细胞存活率评价。脑微血管内皮细胞 bEnd.3 和脑胶质瘤细胞 U87 MG 共孵育 Transwell 模型模拟病理性血脑屏障，Transwell 小室中加入阿西替尼 (10 μ M)、阿西替尼类似物磷脂酰肌醇激酶 (PI3K) 抑制剂 LY294002 (10 μ M)，24 小时后，四唑蓝比色法检测 Transwell 小室中 bEnd.3 细胞 (图 A) 及 Transwell 外室中 U87 MG 细胞 (图 B) 的存活率 (n=3)。

图 14：阿西替尼及其类似物细胞毒性评价。以 1×10^4 个/孔的密度，取 200 μ L 生长良好的 bEnd.3 细胞、U87 MG 脑胶质瘤细胞悬液接种于 96 孔板中。细胞贴壁生长后，加入不同浓度 (0~10 μ g/mL) 的阿西替尼、阿西替尼类似物磷脂酰肌醇激酶 (PI3K) 抑制剂 LY294002，以未处理组作为空白对照。四唑蓝比色法检测细胞存活率，其中图 A、图 B 分别是阿西替尼对 bEnd.3 细胞、U87 MG 脑胶质瘤细胞的细胞毒性，图 C、图 D 分别是阿西替尼类似物磷脂酰肌醇激酶 (PI3K) 抑制剂 LY294002 对 bEnd.3 细胞、U87 MG 脑胶质瘤细胞的细胞毒性 (n=3)。

图 15：体外肿瘤细胞培养液与 bEnd.3 细胞共孵育，阿西替尼及其类似物调控血脑屏障渗透性，细胞跨膜电阻值测定。脑微血管内皮细胞 bEnd.3 和脑胶质瘤细胞 U87 MG 共孵育 Transwell 模型模拟病理

性血脑屏障,待病理性血脑屏障模型形成,撤除 Transwell 外室的 U87 MG 脑胶质瘤细胞,但保留肿瘤细胞培养液。Transwell 小室中加入阿西替尼 (10 μ M)、阿西替尼类似物磷脂酰肌醇激酶 (PI3K) 抑制剂 LY294002 (10 μ M), 24 小时后,细胞电阻仪检测细胞跨膜电阻值,以脑微血管内皮细胞 bEnd.3 的 Transwell 模型模拟的生理性血脑屏障作为阳性对照 (n=5)。

图 16: 体外肿瘤细胞培养液与 bEnd.3 细胞共孵育, FITC-右旋糖酐跨膜转运效率。脑微血管内皮细胞 bEnd.3 和脑胶质瘤细胞 U87 MG 共孵育 Transwell 模型模拟病理性血脑屏障,待病理性血脑屏障模型形成,撤除 Transwell 外室的 U87 MG 脑胶质瘤细胞,但保留肿瘤细胞培养液。Transwell 小室中加入阿西替尼 (10 μ M)、阿西替尼类似物磷脂酰肌醇激酶 (PI3K) 抑制剂 LY294002 (10 μ M), 24 小时后, PBS 清洗 Transwell 小室和外室,将 FITC-右旋糖酐的 HBSS 溶液加于 Transwell 小室,作用 4 小时,图中所示结果即为荧光分光光度计检测 Transwell 外室的 FITC-右旋糖酐浓度,以脑微血管内皮细胞 bEnd.3 的 Transwell 模型模拟的生理性血脑屏障作为阳性对照 (n=3)。

图 17: 体外肿瘤细胞培养液与 bEnd.3 细胞共孵育,体外血脑屏障紧密连接蛋白 Claudin-5/Occludin 免疫荧光染色。脑微血管内皮细胞 bEnd.3 和脑胶质瘤细胞 U87 MG 共孵育 Transwell 模型模拟病理性血脑屏障,待病理性血脑屏障模型形成,撤除 Transwell 外室的 U87 MG 脑胶质瘤细胞,但保留肿瘤细胞培养液。Transwell 小室中加入阿西替尼 (10 μ M)、阿西替尼类似物磷脂酰肌醇激酶 (PI3K) 抑制剂 LY294002 (10 μ M), 24 小时后,对 Transwell 小室膜上的 bEnd.3 细胞进行免疫荧光染色,以脑微血管内皮细胞 bEnd.3 的 Transwell 模型模拟的生理性血脑屏障作为阳性对照,共聚焦观察紧密连接蛋白 Claudin-5/Occludin 表达结果。

图 18: 脑胶质瘤模型中,阿西替尼调控病理性血脑屏障渗透性降低。按照 10 mg/kg 阿西替尼给药剂量尾静脉注射于荷瘤动物,24 小时后,按照 5 mg/kg 给药剂量尾静脉注射依文思蓝溶液,4 小时后,心脏灌流取裸鼠完整大脑,图 A 所示为小动物活体成像仪定性观察

脑组织中依文思蓝分布强度结果，图 B 所示为依文思蓝荧光信号半定量结果 (n=3)。

图 19: 脑胶质瘤模型中，阿西替尼调控病理性血脑屏障渗透性降低，依文思蓝入脑渗透含量减少。按照 10 mg/kg 阿西替尼给药剂量尾静脉注射于荷瘤动物，24 小时后，按照 5 mg/kg 给药剂量尾静脉注射依文思蓝溶液，4 小时后，心脏灌流取裸鼠完整大脑，机溶剂 N, N-二甲基甲酰胺萃取脑组织中依文思蓝，图中所示结果为紫外分光光度法定量检测的依文思蓝渗透至脑内量 (n=3)。

图 20: 阿西替尼调控病理性血脑屏障渗透性降低，治疗脑胶质瘤。荷瘤第 4 天开始给药，以 0.2% 注射级吐温 80 溶液稀释阿西替尼，按照 10 mg/kg 阿西替尼给药剂量尾静脉注射于荷瘤动物，连续给药 7 天，生物发光成像技术监测原位脑胶质瘤生长，图 A 定性反映荷瘤第 4 天、第 16 天脑肿瘤大小，图 B 是脑胶质瘤实时（第 4、7、10、13、16 天）生长的定量监测曲线 (n=5)。以生理盐水组为对照。

图 21: 脑胶质瘤模型动物生存曲线。阿西替尼给药治疗结束后，记录生理盐水组、阿西替尼治疗组动物的生存周期 (n=6)。

图 22: 帕金森氏病发生引起血脑屏障病理性破坏，渗透性增加。选择雄性 C57/BL6 (6-8 w) 为模型动物，1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶溶给药刺激构建帕金森氏病模型。按照 5 mg/kg 给药剂量尾静脉注射依文思蓝溶液，4 小时后，心脏灌流取裸鼠完整大脑，图 A 所示为小动物活体成像仪定性观察脑组织中依文思蓝分布强度结果，图 B 所示为依文思蓝荧光信号半定量结果 (n=3)。

图 23: 帕金森氏病发生伴随着血脑屏障渗透性增加，依文思蓝渗透入脑含量增加。选择雄性 C57/BL6 (6-8 w) 为模型动物，1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶溶给药刺激构建帕金森氏病模型。按照 5 mg/kg 给药剂量尾静脉注射依文思蓝溶液，4 小时后，心脏灌流取裸鼠完整大脑，机溶剂 N, N-二甲基甲酰胺萃取脑组织中依文思蓝，图中所示结果为紫外分光光度法定量检测的依文思蓝渗透至脑内量 (n=3)。

图 24: 帕金森氏病模型中，阿西替尼调控病理性血脑屏障渗透

性降低。选择雄性 C57/BL6(6-8 w)为模型动物,1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶溶给药刺激构建帕金森氏病模型。按照 10 mg/kg 阿西替尼给药剂量尾静脉注射于帕金森氏病模型动物,24 小时后,按照 5 mg/kg 给药剂量尾静脉注射依文思蓝溶液,4 小时后,心脏灌流取裸鼠完整大脑,图 A 所示为小动物活体成像仪定性观察脑组织中依文思蓝分布强度结果,图 B 所示为依文思蓝荧光信号半定量结果如 (n=3)。

图 25: 帕金森氏病模型中,阿西替尼调控病理性血脑屏障渗透性降低,依文思蓝入脑含量减少。按照 10 mg/kg 阿西替尼给药剂量尾静脉注射于帕金森氏病模型动物,24 小时后,按照 5 mg/kg 给药剂量尾静脉注射依文思蓝溶液,4 小时后,心脏灌流取裸鼠完整大脑,有机溶剂 N, N-二甲基甲酰胺萃取脑组织中依文思蓝,图中所示结果为紫外分光光度法定量检测的依文思蓝渗透至脑内量 (n=3)。

图 26: 阿西替尼调控病理性血脑屏障渗透性降低,治疗帕金森氏病。选择雄性 C57/BL6 (6-8 w) 为模型动物,1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶溶给药刺激构建帕金森氏病模型。按照 10 mg/kg 阿西替尼给药剂量尾静脉注射于帕金森氏病模型动物,连续给药 7 天。左旋多巴溶于生理盐水,按照 20 mg/kg 给药剂量腹腔注射,连续给药 10 天。治疗结束后,按照 5 mg/kg 给药剂量尾静脉注射依文思蓝溶液,4 小时后,心脏灌流取裸鼠完整大脑,图 A 所示为小动物活体成像仪定性观察脑组织中依文思蓝分布强度结果,图 B 所示为依文思蓝荧光信号半定量结果 (n=3)。

图 27: 阿西替尼调控病理性血脑屏障渗透性降低,治疗帕金森氏病,依文思蓝脑内含量减少。选择雄性 C57/BL6 (6-8 w) 为模型动物,1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶溶给药刺激构建帕金森氏病模型。按照 10 mg/kg 阿西替尼给药剂量尾静脉注射于帕金森氏病模型动物,连续给药 7 天。左旋多巴溶于生理盐水,按照 20 mg/kg 给药剂量腹腔注射,连续给药 10 天。治疗结束后,按照 5 mg/kg 给药剂量尾静脉注射依文思蓝溶液,4 小时后,心脏灌流取裸鼠完整大脑,有机溶剂 N, N-二甲基甲酰胺萃取脑组织中依文思蓝,图中所示结果为紫外分光光度法定量检测的依文思蓝渗透至脑内量 (n=3)。

图 28: 阿西替尼调控血脑屏障渗透性治疗帕金森氏病, 模型动物运动时间记录。选择雄性 C57/BL6 (6-8 w) 为模型动物, 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶溶给药刺激构建帕金森氏病模型。按照 10 mg/kg 阿西替尼给药剂量尾静脉注射于帕金森氏病模型动物, 连续给药 7 天。左旋多巴溶于生理盐水, 按照 20 mg/kg 给药剂量腹腔注射, 连续给药 10 天。治疗结束后, 记录各实验组动物 2 分钟内的运动时间 (走动、双前肢向上抬举、洗脸、理毛等) (n=5)。

图 29: 阿西替尼调控血脑屏障渗透性治疗帕金森氏病, 模型动物脑组织酪氨酸羟化酶表达。选择雄性 C57/BL6 (6-8 w) 为模型动物, 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶溶给药刺激构建帕金森氏病模型。按照 10 mg/kg 阿西替尼给药剂量尾静脉注射于帕金森氏病模型动物, 连续给药 7 天。左旋多巴溶于生理盐水, 按照 20 mg/kg 给药剂量腹腔注射, 连续给药 10 天。治疗结束后, 心脏灌流取裸鼠完整大脑, 4%多聚甲醛溶液固定, 石蜡包埋后对脑组织纹状体部位冠状面切片, 并且进行酪氨酸羟化酶免疫组化染色, 图 A 所示为光学显微镜观察各实验组脑组织酪氨酸羟化酶表达结果, 图 B 是 Image J 对酪氨酸羟化酶表达的半定量分析结果 (n=3)。

具体实施方式

本发明涉及的阿西替尼 (Axitinib) 是一种多靶点酪氨酸激酶抑制剂, 其中文化学名称为 N-甲基-2-((2-((1E)-2-(吡啶-2-基)乙烯)-1H-吲哚-6-基)硫)苯甲酰胺; 英文化学名称为 N-methyl-2-((3-((1E)-2-(pyridine-2-yl)ethenyl)-1H-indazol-6-yl)sulfanyl)benzamide; 分子式为 $C_{22}H_{18}N_4OS$; 分子量为 386.47; CAS 登记号为 319460-85-0。

本发明涉及的阿西替尼类似物是指作用机制与阿西替尼类似, 能作用于血管内皮生长因子-磷脂酰肌醇激酶-蛋白激酶 B (VEGF-PI3K-AKT) 信号通路的抑制剂, 如磷脂酰肌醇激酶 (PI3K) 抑制剂 LY294002 等。

本发明的发明人发现, 阿西替尼及其类似物对血脑屏障渗透性具有调控作用, 其能够降低血脑屏障渗透性, 促进血脑屏障功能由病理

性破坏状态恢复至接近生理性屏障状态，从而实现针对血脑屏障渗透剂及屏障功能改变引起的相关疾病的治疗。

作为血脑屏障功能相关疾病，可以列举脑胶质瘤、帕金森氏病、脑缺血、阿尔兹海默症、多发性硬化等。这些脑部疾病的发生都会引起血脑屏障紧密连接结构完整性缺失及屏障功能异常，伴随着紧密连接蛋白下调表达、血脑屏障渗透性增加、中枢神经系统内环境平衡被破坏。

根据下文中所记载的实施例可以明确，阿西替尼及其类似物能够通过其对血脑屏障渗透性的调控作用发挥对脑胶质瘤和帕金森氏病的治疗作用。

进一步的研究发现，阿西替尼及其类似物在体外能够阻断血管内皮生长因子受体（VEGFR），抑制血管内皮细胞生长因子（VEGF）与血管内皮细胞生长因子受体（VEGFR）结合，抑制 VEGF 下游磷脂酰肌醇激酶-蛋白激酶 B（PI3K-AKT）蛋白信号通路、减少 Claudin-5/Occludin 蛋白下调表达，降低血脑屏障渗透性，使血脑屏障功能由病理性破坏状态恢复至接近生理性屏障状态，该作用具有剂量依赖性。研究还发现，阿西替尼及其类似物在体内能够促进血脑屏障功能由病理性破坏状态恢复至接近生理性屏障状态，显著抑制脑胶质瘤生长，显著缓解帕金森氏病的运动障碍，有效治疗脑胶质瘤和帕金森氏病。研究还发现，阿西替尼及其类似物在调控血脑屏障功能由病理性破坏状态恢复至接近生理性屏障状态的药物浓度条件下，对脑胶质瘤细胞及脑内皮细胞无明显细胞毒性，说明阿西替尼及其类似物对脑胶质瘤及帕金森氏病的治疗作用是通过调控病理性血脑屏障渗透性降低、促进血脑屏障功能由病理性破坏状态恢复至接近生理性屏障状态实现的。

在下文中，结合实施例和附图对本发明进行详细说明。需要说明的是，以下的实施例仅为例示，下述实施例对本发明的保护范围并无限定作用。

实施例

实施例一 脑胶质瘤生长引起血脑屏障病理性破坏，渗透性增加

1. 生理性血脑屏障细胞模型构建

以脑微血管内皮细胞 bEnd.3 作为血脑屏障模型细胞，以 1×10^5 个/孔的细胞密度，取 0.5 mL 生长良好的 bEnd.3 细胞悬液接种于孔径 0.4 μm 的 12 孔 Transwell 板小室中，外室补加 1.5 mL 新鲜培养液。

5 隔天更换新鲜培养液，在 37°C ，5%二氧化碳条件下持续孵育 15 天。当细胞跨膜电阻值大于 150 欧姆·平方厘米 ($\Omega \cdot \text{cm}^2$) 时，得到评价用生理性血脑屏障细胞模型。

2. 病理性血脑屏障细胞模型构建

10 以 U87 MG 脑胶质瘤细胞作为脑肿瘤模型细胞，以 2×10^5 个/孔的细胞密度，取 1.5 mL 生长良好的 U87 MG 细胞悬液接种于 12 孔板中，在 37°C ，5%二氧化碳条件下孵育至细胞贴壁。然后将实施例一中方法 1 构建的生理性血脑屏障即生长有 bEnd.3 细胞的 Transwell 小室转移至长有 U87 MG 细胞的 12 孔板中，继续共培养 24 小时，得到病理性血脑屏障细胞模型。

15 3. 脑胶质瘤生长引起模型细胞紧密连接蛋白下调，血脑屏障渗透性增加

以实施例一中方法 1 和方法 2 分别构建的生理性血脑屏障和病理性血脑屏障为模型，将生长有 bEnd.3 细胞的 Transwell 小室转移至另一 12 孔板中，PBS 清洗 3 次，在小室中加入 0.5 mL HBSS 营养液，
20 外室补加 1.5 mL HBSS 营养液，细胞于 37°C 平衡 15 分钟，跨膜电阻仪检测细胞跨膜电阻值，结果如图 1 所示。以实施例一中方法 1 和方法 2 分别构建的生理性血脑屏障和病理性血脑屏障为模型，将生长有 bEnd.3 细胞的 Transwell 小室转移至另一 12 孔板中，PBS 清洗 3 次，
25 在小室中加入含有 FITC 标记荧光标记的分子量为 10 *kDa* 右旋糖酐 HBSS 溶液，外室补加 1.5 mL HBSS 营养液，细胞于 37°C 避光孵育 4 小时后，荧光分光光度计检测经 Transwell 小室转移至外室的 FITC-右旋糖酐的浓度，结果如图 2 所示。以实施例一中方法 1 和方法 2 分别构建的生理性血脑屏障和病理性血脑屏障为模型，将生长有 bEnd.3 细胞的 Transwell 小室取出，用 PBS 清洗 3 次，4%甲醛固定，10%的
30 牛血清白蛋白封闭 30 分钟后，加入 Claudin-5/Occludin 一抗并于 4°C

孵育过夜，最后用荧光标记的二抗孵育 1 小时，DAPI 复染细胞核。激光共聚焦显微镜观察紧密连接蛋白 Claudin-5/Occludin 的表达，Image J 半定量分析 Claudin-5/Occludin 表达水平，结果如图 3 所示。

根据图 1~3 所示的结果可知，病理性血脑屏障细胞模型中，肿瘤细胞 U87 MG 和 bEnd.3 细胞共孵育之后，细胞跨膜电阻值降低，紧密连接蛋白 Claudin-5/Occludin 蛋白表达较正常的血脑屏障模型明显下调，血脑屏障渗透性增加，FITC-右旋糖酐跨膜转运增加。

4. 脑胶质瘤生长引起模型动物紧密连接蛋白下调，血脑屏障渗透性增加

选择雄性 BABL/c 裸鼠（ 20 ± 2 g）为模型动物，借助脑立体定位仪，将表达虫荧光素酶的 U87-luci 胶质瘤细胞以 5×10^5 个细胞/5 微升浓度接种于裸鼠纹状体（接种坐标于前凶前侧 0.8 毫米，右侧 2 毫米，深度为 3 毫米）区域，构建原位脑胶质瘤模型。待脑胶质瘤生长到适宜体积，尾静脉注射 FITC-右旋糖酐溶液，4 小时后，心脏灌流取裸鼠完整大脑，将组织冷冻切片，并于激光共聚焦显微镜观察 FITC-右旋糖酐在脑血管的渗透性，CD31 特异性荧光标记脑血管，结果如图 4 所示。

根据图 4 所示的结果可知，脑肿瘤的生长会严重破坏脑血管结构，血脑屏障渗透性增加，对比正常脑组织，脑胶质瘤模型中，FITC-右旋糖酐从血管渗出量显著增加。

心脏灌流取正常裸鼠和原位脑胶质瘤荷瘤裸鼠完整大脑，组织透射电镜观察血脑屏障紧密连接蛋白结构变化，结果如图 5 所示。对脑组织紧密连接蛋白 Claudin-5/Occludin 进行免疫荧光染色，激光共聚焦观察紧密连接蛋白表达水平，结果如图 6 所示。

根据图 5 和图 6 所示的结果可知，脑胶质瘤的生长明显破坏血脑屏障紧密连接结构，正常脑组织的紧密连接蛋白表达完整且连续，脑肿瘤组织的紧密连接蛋白表达离散且不连续。此外，脑胶质瘤生长显著下调紧密连接蛋白 Claudin-5/Occludin 表达，血脑屏障渗透性增加。

实施例二 阿西替尼作用于血管内皮生长因子受体（VEGFR），呈剂量依赖性阻断血管内皮细胞生长因子（VEGF）与受体结合

以实施例一中方法 1 构建的生理性血脑屏障为模型,在 Transwell 小室中加入外源性血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 和不同浓度阿西替尼, 药物作用 24 小时后, 将生长有 bEnd.3 细胞的 Transwell 小室取出, 用 PBS 清洗 3 次, 4%甲醛固定, 10%的牛血清白蛋白封闭 30 分钟后, 加入 Claudin-5 一抗并于 4℃孵育过夜, 最后用荧光标记的二抗孵育 1 小时, DAPI 复染细胞核。激光共聚焦显微镜观察紧密连接蛋白 Claudin-5 表达情况, 结果如图 7 所示。

根据图 7 所示的结果可知, 阿西替尼作用于血管内皮细胞生长因子受体 (VEGFR), 可以阻断血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 与血管内皮细胞生长因子受体 (VEGFR) 结合, 减少 Claudin-5 下调的程度, 该作用呈剂量依赖性。

实施例三 阿西替尼阻断血管内皮细胞生长因子受体作用位点, 减少紧密连接蛋白下调, 显著降低血脑屏障病理性破坏程度

以实施例一中方法 2 构建的病理性血脑屏障为模型, 在 Transwell 小室中加入阿西替尼, 药物作用 24 小时后, 将生长有 bEnd.3 细胞的 Transwell 小室转移至另一 12 孔板中, PBS 清洗 3 次, 4%甲醛固定, 10%的牛血清白蛋白封闭 30 分钟后, 加入 Claudin-5 一抗并于 4℃孵育过夜, 最后用荧光标记的二抗孵育 1 小时, DAPI 复染细胞核。激光共聚焦显微镜观察紧密连接蛋白 Claudin-5 表达情况, 结果如图 8 所示。

根据图 8 所示的结果可知, 阿西替尼可以阻断血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 与血管内皮细胞生长因子受体 (VEGFR) 结合, 减少血脑屏障紧密连接蛋白 Claudin-5 下调表达, 显著降低血脑屏障病理性破坏程度。

以实施例一中方法 2 构建的病理性血脑屏障为模型, 在 Transwell 小室中加入不同浓度阿西替尼刺激, 作用 24 小时后, 测定细胞跨膜电阻值, 结果如图 9 所示。

根据图 9 所示的结果可知, 阿西替尼调控血脑屏障功能由病理性破坏状态恢复至接近生理性屏障状态的作用呈剂量依赖性, 当阿西替尼浓度为 0.5~20 $\mu\text{g/mL}$ (1.29-51.75 μM) 时, 可有效降低血脑屏障渗

透性,促进血脑屏障功能由病理性破坏状态恢复至接近生理性屏障状态。

实施例四 阿西替尼及其类似物抑制血管内皮细胞生长因子-磷脂酰肌醇激酶-蛋白激酶 B (VEGF-PI3K-AKT) 信号通路,减少病理性血脑屏障紧密连接蛋白下调的程度,降低血脑屏障渗透性

以实施例一中方法1和方法2分别构建的生理性血脑屏障和病理性血脑屏障为模型,在实施例一中方法2构建的病理性血脑屏障模型的 Transwell 小室中加入阿西替尼 (10 μ M)、阿西替尼类似物磷脂酰肌醇激酶 (PI3K) 抑制剂 LY294002 (10 μ M)、蛋白激酶 B (AKT) 激动剂 SC79 (10 μ M), 药物作用 24 小时后,将生长有 bEnd.3 细胞的 Transwell 小室转移至另一 12 孔板中, PBS 清洗 3 次,在小室中加入 0.5 mL HBSS 营养液,外室补加 1.5 mL HBSS 营养液,细胞于 37 $^{\circ}$ C 平衡 15 分钟,跨膜电阻仪检测细胞跨膜电阻值,结果如图 10 所示。

以实施例一中方法1和方法2分别构建的生理性血脑屏障和病理性血脑屏障为模型,在实施例一中方法2构建的病理性血脑屏障模型的 Transwell 小室中加入阿西替尼 (10 μ M)、阿西替尼类似物磷脂酰肌醇激酶 (PI3K) 抑制剂 LY294002 (10 μ M)、蛋白激酶 B (AKT) 激动剂 SC79 (10 μ M), 药物作用 24 小时后,将生长有 bEnd.3 细胞的 Transwell 小室转移至另一 12 孔板中, PBS 清洗 3 次,在小室中加入含有 FITC 标记荧光标记的分子量为 10 *kDa* 右旋糖酐 HBSS 溶液,外室补加 1.5 mL HBSS 营养液,细胞于 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 4 小时后,荧光分光光度计检测经 Transwell 小室转移至外室的 FITC-右旋糖酐的浓度,结果如图 11 所示。

以实施例一中方法1和方法2分别构建的生理性血脑屏障和病理性血脑屏障为模型,在实施例一中方法2构建的病理性血脑屏障模型的 Transwell 小室中加入阿西替尼 (10 μ M)、阿西替尼类似物磷脂酰肌醇激酶 (PI3K) 抑制剂 LY294002 (10 μ M)、蛋白激酶 B (AKT) 激动剂 SC79 (10 μ M), 药物作用 24 小时后,将生长有 bEnd.3 细胞的 Transwell 小室取出,用 PBS 清洗 3 次,4%甲醛固定,10%的牛血清白蛋白封闭 30 分钟后,加入 Claudin-5/Occludin 一抗并于 4 $^{\circ}$ C 孵育

过夜，最后用荧光标记的二抗孵育 1 小时，DAPI 复染细胞核。激光共聚焦显微镜观察紧密连接蛋白 Claudin-5/Occludin 表达情况，结果如图 12 所示。

根据图 10、图 11 和图 12 所示的结果可知，阿西替尼作用于血管内皮生长因子受体（VEGFR），可以阻断血管内皮细胞生长因子（VEGF）与血管内皮细胞生长因子受体（VEGFR）结合，抑制血管内皮细胞生长因子-磷脂酰肌醇激酶-蛋白激酶 B（VEGF-PI3K-AKT）信号通路，减少病理性血脑屏障紧密连接蛋白 Claudin-5/Occludin 下调的程度，降低血脑屏障渗透性，促进血脑屏障功能由病理性破坏状态恢复至接近生理性屏障状态。

另外，根据图 10、图 11 和图 12 所示的结果可知，阿西替尼类似物磷脂酰肌醇激酶（PI3K）抑制剂 LY294002，作用于磷脂酰肌醇激酶（PI3K）位点，可以抑制血管内皮细胞生长因子-磷脂酰肌醇激酶-蛋白激酶 B（VEGF-PI3K-AKT）信号通路，减少血脑屏障紧密连接蛋白 Claudin-5/Occludin 下调的程度，降低血脑屏障渗透性，促进血脑屏障功能由病理性破坏状态恢复至接近生理性屏障状态。

实施例五 阿西替尼及其类似物调控病理性血脑屏障渗透性降低，治疗浓度下不产生抗脑胶质瘤药效

以实施例一中方法 1 和方法 2 分别构建的生理性血脑屏障和病理性血脑屏障为模型，在实施例一中方法 2 构建的病理性血脑屏障模型的 Transwell 小室中加入阿西替尼（10 μ M）、阿西替尼类似物磷脂酰肌醇激酶（PI3K）抑制剂 LY294002（10 μ M）。药物作用 24 小时后，将生长有 bEnd.3 细胞的 Transwell 小室转移至另一 12 孔板中，加入 5 mg/mL 的噻唑蓝 50 μ L；另外，向生长有 U87 MG 细胞的 Transwell 外室加入 5 mg/mL 的噻唑蓝 150 μ L，继续孵育 4 小时。弃去培养基，将每孔中的紫色甲臞溶于 2000 μ L 二甲基亚砷，置于恒温振荡箱中振荡 15 分钟，以 200 μ L/孔转移至 96 孔板。用酶标仪测量 570 nm 处吸光度值。根据以下公式计算细胞存活率：

$$\text{细胞存活率}(\%) = (\text{实验组的吸光度} / \text{对照组的吸光度值}) \times 100\%$$

bEnd.3 细胞和 U87 MG 细胞存活率结果如图 13 所示。

另外，以 bEnd.3 细胞、U87 MG 脑胶质瘤细胞作为模型细胞，采用四唑蓝比色法评价阿西替尼、阿西替尼类似物磷脂酰肌醇激酶（PI3K）抑制剂 LY294002 的细胞毒性。以 1×10^4 个/孔的密度，取 200 μL 生长良好的 bEnd.3 细胞、U87 MG 脑胶质瘤细胞悬液接种于 96 孔板中。在 37 $^{\circ}\text{C}$ ，5% 二氧化碳条件下孵育至贴壁。然后向其中加入不同浓度（0~10 $\mu\text{g/mL}$ ）的阿西替尼、阿西替尼类似物磷脂酰肌醇激酶（PI3K）抑制剂 LY294002，以未处理组作为空白对照，每组重复 3 次。继续孵育 48 小时，然后向每孔加入 5 mg/mL 的噻唑蓝 20 μL ，继续孵育 4 小时，弃去培养基，向每孔中加入 200 μL 二甲基亚砜，将 96 孔板置于恒温振荡箱中振荡 15 分钟，用酶标仪测量 570 nm 处吸光度值。bEnd.3 细胞和 U87 MG 细胞存活率结果如图 14 所示。

以实施例一中方法 1 和方法 2 分别构建的生理性血脑屏障和病理性血脑屏障为模型。待病理性血脑屏障模型形成，撤除 Transwell 外室的 U87 MG 脑胶质瘤细胞，但保留肿瘤细胞培养液。在 Transwell 小室中加入阿西替尼（10 μM ）、阿西替尼类似物磷脂酰肌醇激酶（PI3K）抑制剂 LY294002（10 μM ），药物作用 24 小时后，将生长有 bEnd.3 细胞的 Transwell 小室转移至另一 12 孔板中，PBS 清洗 3 次，在小室中加入 0.5 mL HBSS 营养液，外室补加 1.5 mL HBSS 营养液，细胞于 37 $^{\circ}\text{C}$ 平衡 15 分钟，跨膜电阻仪检测细胞跨膜电阻值，结果如图 15 所示。

以实施例一中方法 1 和方法 2 分别构建的生理性血脑屏障和病理性血脑屏障为模型。待病理性血脑屏障模型形成，撤除 Transwell 外室的 U87 MG 脑胶质瘤细胞，但保留肿瘤细胞培养液。在 Transwell 小室中加入阿西替尼（10 μM ）、阿西替尼类似物磷脂酰肌醇激酶（PI3K）抑制剂 LY294002（10 μM ），药物作用 24 小时后，将生长有 bEnd.3 细胞的 Transwell 小室转移至另一 12 孔板中，PBS 清洗 3 次，在小室中加入含有 FITC 标记荧光标记的分子量为 10 kDa 右旋糖酐 HBSS 溶液，外室补加 1.5 mL HBSS 营养液，细胞于 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 4 小时后，荧光分光光度计检测经 Transwell 小室转移至外室的

FITC-右旋糖酐的浓度，结果如图 16 所示。

以实施例一中方法 1 和方法 2 分别构建的生理性血脑屏障和病理性血脑屏障为模型。待病理性血脑屏障模型形成，撤除 Transwell 外室的 U87 MG 脑胶质瘤细胞，但保留肿瘤细胞培养液。在 Transwell 小室中加入阿西替尼（10 μ M）、阿西替尼类似物磷脂酰肌醇激酶（PI3K）抑制剂 LY294002（10 μ M），药物作用 24 小时后，将生长有 bEnd.3 细胞的 Transwell 小室取出，用 PBS 清洗 3 次，4%甲醛固定，10%的牛血清白蛋白封闭 30 分钟后，加入 Claudin-5/Occludin 一抗并于 4℃孵育过夜，最后用荧光标记的二抗孵育 1 小时，DAPI 复染细胞核。激光共聚焦显微镜观察紧密连接蛋白 Claudin-5/Occludin 表达情况，结果如图 17 所示。

根据图 13、图 14 所示的结果可知，阿西替尼（10 μ M）、阿西替尼类似物磷脂酰肌醇激酶（PI3K）抑制剂 LY294002（10 μ M）在治疗剂量下对 bEnd.3 细胞和 U87 MG 细胞不产生明显的细胞毒性，细胞存活率均大于 80%。另外，根据图 15、图 16 和图 17 所示的结果可知，在维持血脑屏障功能破坏的病理性条件下，阿西替尼及其类似物作用后，病理性血脑屏障紧密连接蛋白 Claudin-5/Occludin 下调的程度降低，血脑屏障渗透性减少，屏障功能由病理性破坏状态恢复至接近生理性屏障状态。上述结果说明阿西替尼及其类似物在治疗剂量下只起调控病理性血脑屏障渗透性的作用，对 U87 MG 脑胶质瘤细胞不产生抗肿瘤药效。

实施例六 阿西替尼促进脑胶质瘤模型动物血脑屏障功能由病理性破坏状态恢复至接近生理性屏障状态

选择雄性 BABL/c 裸鼠（20 $\pm$ 2 g）为模型动物，借助脑立体定位仪，将表达虫荧光素酶的 U87-luci 脑胶质瘤细胞以 5×10^5 个细胞/5 微升浓度接种于裸鼠纹状体（接种坐标于前囟前侧 0.8 毫米，右侧 2 毫米，深度为 3 毫米）区域，构建原位脑胶质瘤模型。以 0.2%注射级吐温 80 溶液稀释阿西替尼，按照 10 mg/kg 阿西替尼给药剂量尾静脉注射，24 小时后，按照 5 mg/kg 给药剂量尾静脉注射依文思蓝溶液，4 小时后，心脏灌流取裸鼠完整大脑，小动物活体成像仪定性观察脑

组织中依文思蓝分布强度，结果如图 18 所示。有机溶剂 N，N-二甲基甲酰胺萃取脑组织中依文思蓝，紫外分光光度法定量检测依文思蓝渗透至脑内量，结果如图 19 所示。

根据图 18、图 19 所示的结果可知，较荷瘤对照组，阿西替尼作用后，依文思蓝渗透入脑含量减少，显示血脑屏障渗透性显著降低，表明阿西替尼可降低血脑屏障渗透性，促进脑胶质瘤模型动物血脑屏障功能由病理性破坏状态恢复至接近生理性屏障状态。

实施例七 阿西替尼调控脑胶质瘤模型动物血脑屏障渗透性，治疗脑胶质瘤

选择雄性 BABL/c 裸鼠 (20 ± 2 g) 为模型动物，借助脑立体定位仪，将表达虫荧光素酶的 U87-luci 脑胶质瘤细胞以 5×10^5 个细胞/5 微升浓度接种于裸鼠纹状体（接种坐标于前囟前侧 0.8 毫米，右侧 2 毫米，深度为 3 毫米）区域，构建原位脑胶质瘤模型。荷瘤第 4 天开始给药，以 0.2% 注射级吐温 80 溶液稀释阿西替尼，按照 10 mg/kg 阿西替尼给药剂量尾静脉注射，连续给药 7 天，生物发光成像技术实时监测原位脑胶质瘤生长，结果如图 20 所示。阿西替尼治疗后，脑胶质瘤模型动物的生存周期结果记录如图 21 所示。

根据图 20 所示的结果可知，较生理盐水对照组，阿西替尼给药治疗后，原位脑胶质瘤生长明显被抑制。根据图 21 所示的结果可知，阿西替尼治疗后，动物的生存周期显著延长。

实施例八 帕金森氏病引起血脑屏障病理性破坏，渗透性增加

选择雄性 C57/BL6 (6-8 w) 为模型动物，1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶溶于生理盐水，按照 20 mg/kg 的 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶给药剂量腹腔注射，连续给药 7 天，构建帕金森氏病模型。按照 5 mg/kg 给药剂量尾静脉注射依文思蓝溶液，4 小时后，心脏灌流取裸鼠完整大脑，小动物活体成像仪定性观察脑组织中依文思蓝分布强度，结果如图 22 所示。有机溶剂 N，N-二甲基甲酰胺萃取脑组织中依文思蓝，紫外分光光度法定量检测依文思蓝渗透至脑内量，结果如图 23 所示。

根据图 22、图 23 所示的结果可知，帕金森氏病会显著增加血脑屏障渗透性，对比正常脑组织，帕金森氏病模型中，依文思蓝渗透入脑含量显著增加。

5 实施例九 阿西替尼促进帕金森氏病模型动物血脑屏障功能由病理性破坏状态恢复至接近生理性屏障状态

选择雄性 C57/BL6 (6-8 w) 为模型动物，1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶溶于生理盐水，按照 20 mg/kg 的 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶给药剂量腹腔注射，连续给药 7 天，构建帕金森氏病模型。以 0.2%注射级吐温 80 溶液稀释阿西替尼，按照 10 mg/kg 阿西替尼给药剂量尾静脉注射，24 小时后，按照 5 mg/kg 给药剂量尾静脉注射依文思蓝溶液，4 小时后，心脏灌流取裸鼠完整大脑，小动物活体成像仪定性观察脑组织中依文思蓝分布强度，结果如图 24 所示。有机溶剂 N, N-二甲基甲酰胺萃取脑组织中依文思蓝，紫外分光光度法定量检测依文思蓝渗透至脑内量，结果如图 25 所示。

根据图 24、图 25 所示的结果可知，较帕金森氏病对照组，阿西替尼作用后，依文思蓝渗透入脑含量减少，显示血脑屏障渗透性显著降低，表明阿西替尼可降低血脑屏障渗透性，促进血脑屏障功能由病理性破坏状态恢复至接近生理性屏障状态。

20 实施例十 阿西替尼调控帕金森氏病模型动物血脑屏障渗透性，治疗帕金森氏病

1. 帕金森氏病模型动物的构建

选择雄性 C57/BL6 (6-8 w) 为模型动物，1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶溶于生理盐水，按照 20 mg/kg 的 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶给药剂量腹腔注射，连续给药 7 天，构建帕金森氏病模型。

2. 阿西替尼治疗帕金森氏病

2-1 阿西替尼治疗后，依文思蓝脑内渗透性显著下降

以 0.2%注射级吐温 80 溶液稀释阿西替尼，按照 10 mg/kg 阿西替尼给药剂量尾静脉注射，连续给药 7 天。左旋多巴溶于生理盐水，按照 20 mg/kg 给药剂量腹腔注射，连续给药 10 天。治疗结束后，按照

5 mg/kg 给药剂量尾静脉注射依文思蓝溶液，4 小时后，心脏灌流取裸鼠完整大脑，小动物活体成像仪定性观察脑组织中依文思蓝分布强度，结果如图 26 所示。有机溶剂 N，N-二甲基甲酰胺萃取脑组织中依文思蓝，紫外分光光度法定量检测依文思蓝渗透至脑内量，结果如图 27 所示。

根据图 26、图 27 所示的结果可知，较帕金森氏病对照组，阿西替尼和左旋多巴给药治疗后，依文思蓝渗透入脑含量均有不同程度减少，但阿西替尼给药组的依文思蓝渗透入脑含量明显低于左旋多巴给药组，表明阿西替尼可降低血脑屏障渗透性，促进帕金森氏病的血脑屏障功能由病理性破坏状态恢复至接近生理性屏障状态，且效果优于左旋多巴。

2-2 阿西替尼治疗后，帕金森氏病运动性障碍明显被改善

阿西替尼和左旋多巴治疗结束后，记录各实验组动物 2 分钟内的运动时间（走动、双前肢向上抬举、洗脸、理毛等），结果如图 28 所示。

根据图 28 所示的结果可知，较帕金森氏病对照组，阿西替尼和左旋多巴给药治疗后，均可显著缓解帕金森氏病模型动物的运动障碍，二者效果无差异。

2-3 阿西替尼治疗后，酪氨酸羟化酶表达水平显著提高

治疗结束后，心脏灌流取裸鼠完整大脑，4%多聚甲醛溶液固定，石蜡包埋后对脑组织纹状体部位冠状面切片，厚度为 3 微米。抗坏血酸缓冲液修复组织表面抗原，将切片与酪氨酸羟化酶一抗（1:1000 稀释）于 4℃孵育 24 小时，然后将切片与生物素标记的二抗（1:200 稀释）于 37℃孵育 45 分钟，随后用链亲和素-辣根过氧化物酶 37℃孵育 30 分钟，DAB 工作液显色。光学显微镜观察切片组织酪氨酸羟化酶表达，结果如图 29 所示。

根据图 29 所示的结果可知，帕金森氏病会引起脑组织纹状体酪氨酸羟化酶表达显著下调，阿西替尼和左旋多巴给药治疗后，均可显著上调帕金森氏症模型动物的纹状体酪氨酸羟化酶表达，且阿西替尼治疗组效果优于左旋多巴治疗组。

工业实用性

根据本发明，能够提供一种血脑屏障渗透性调控剂，该血脑屏障渗透性调控剂通过阿西替尼及其类似物对血脑屏障渗透性的调控作用，能够降低血脑屏障渗透性，促进血脑屏障功能由病理性破坏状态恢复至接近生理性屏障状态，从而达到对引起血脑屏障渗透性改变的相关疾病的治疗作用。因此，本发明在医药领域中具有很大的实用性。

权 利 要 求 书

1. 阿西替尼及其类似物在制备血脑屏障渗透性调控剂中的应用。

5

2. 如权利要求 1 所述的应用，其特征在于：

所述血脑屏障渗透性调控剂能够降低血脑屏障渗透性，促进血脑屏障功能由病理性破坏状态恢复至接近生理性屏障状态。

10

3. 如权利要求 1 或 2 所述的应用，其特征在于：

阿西替尼及其类似物通过减少病理性血脑屏障紧密连接蛋白 Claudin-5/Occludin 下调的程度，降低血脑屏障渗透性。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的应用，其特征在于：

15

阿西替尼及其类似物通过抑制血管内皮细胞生长因子-磷脂酰肌醇激酶-蛋白激酶 B 信号通路，减少血脑屏障紧密连接蛋白 Claudin-5/Occludin 下调的程度，降低血脑屏障渗透性。

5. 如权利要求 1 或 2 所述的应用，其特征在于：

20

所述阿西替尼类似物是在血管内皮生长因子-磷脂酰肌醇激酶-蛋白激酶 B 信号通路中能够对血管内皮生长因子、磷脂酰肌醇激酶或蛋白激酶 B 的任意位点发挥抑制作用的抑制剂。

6. 如权利要求 5 所述的应用，其特征在于：

25

所述阿西替尼类似物是磷脂酰肌醇激酶抑制剂。

7. 如权利要求 1 或 2 所述的应用，其特征在于：

所述血脑屏障渗透性调控剂是用于治疗引起血脑屏障渗透性改变的相关疾病的药物。

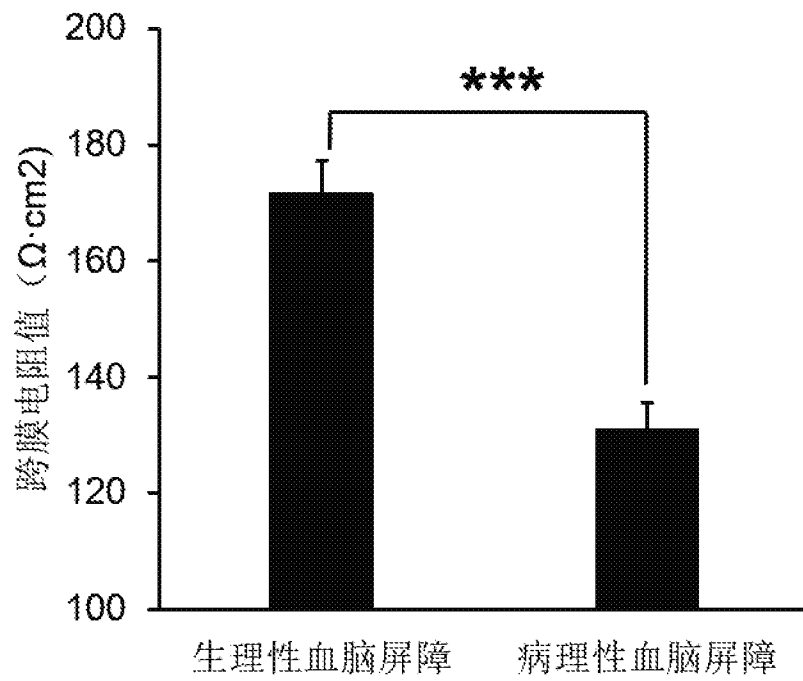


图 1

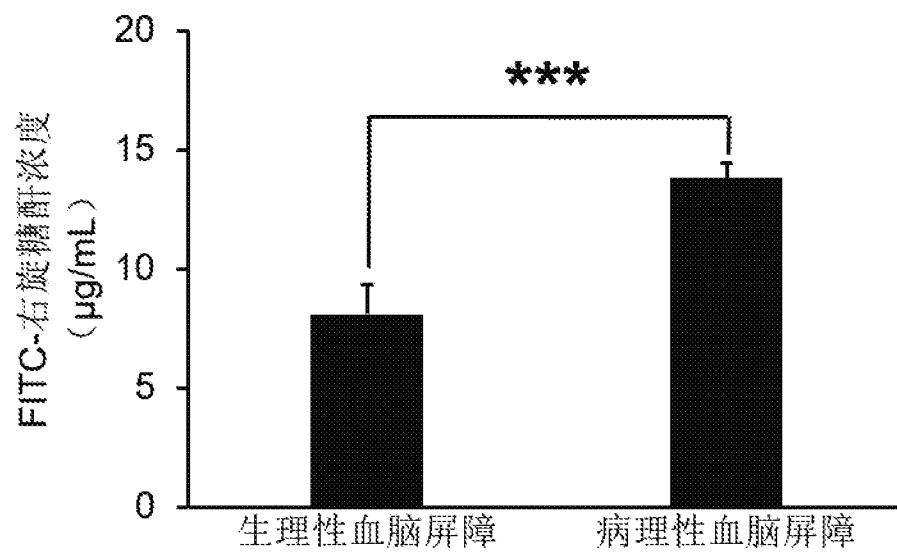


图 2

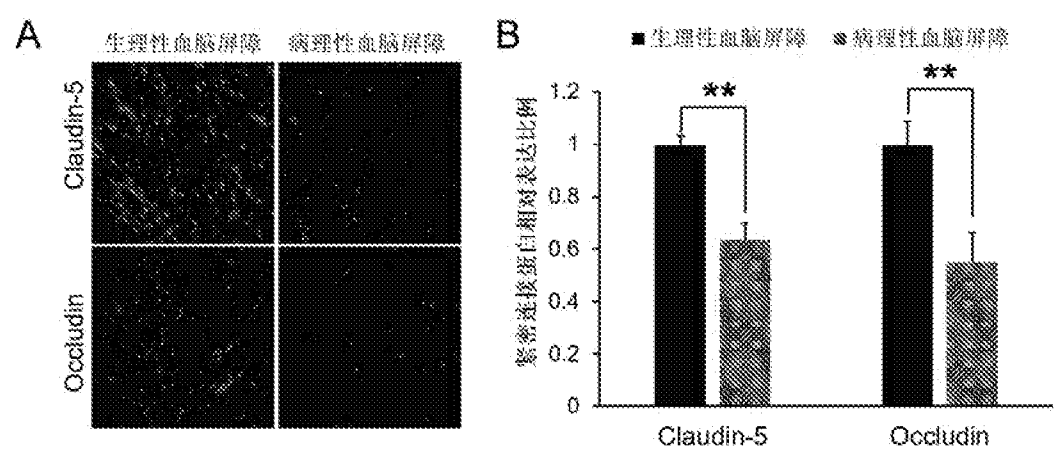


图 3

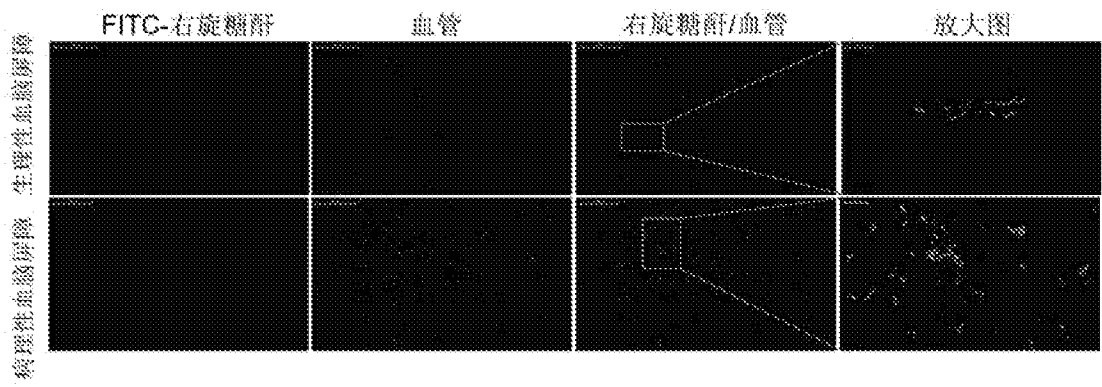


图 4

生理性血脑屏障

病理性血脑屏障

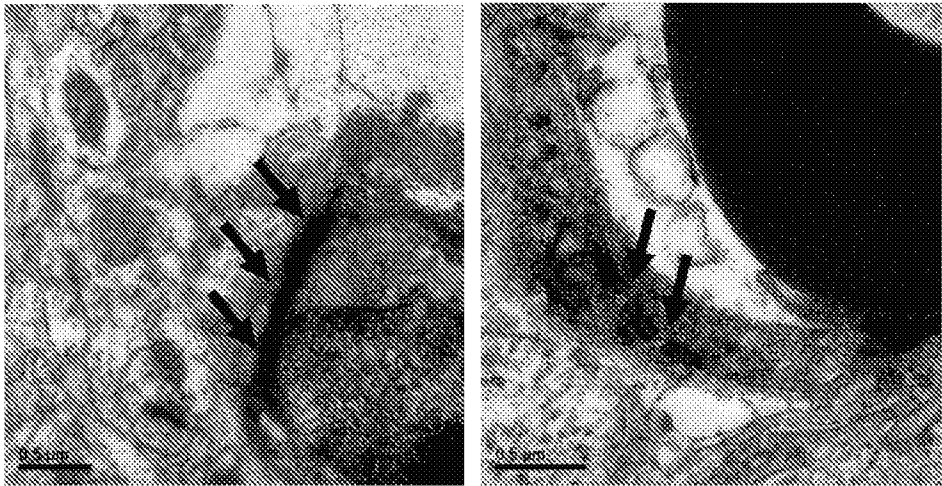


图 5

Claudin-5

Occludin

生理性血脑屏障
病理性血脑屏障

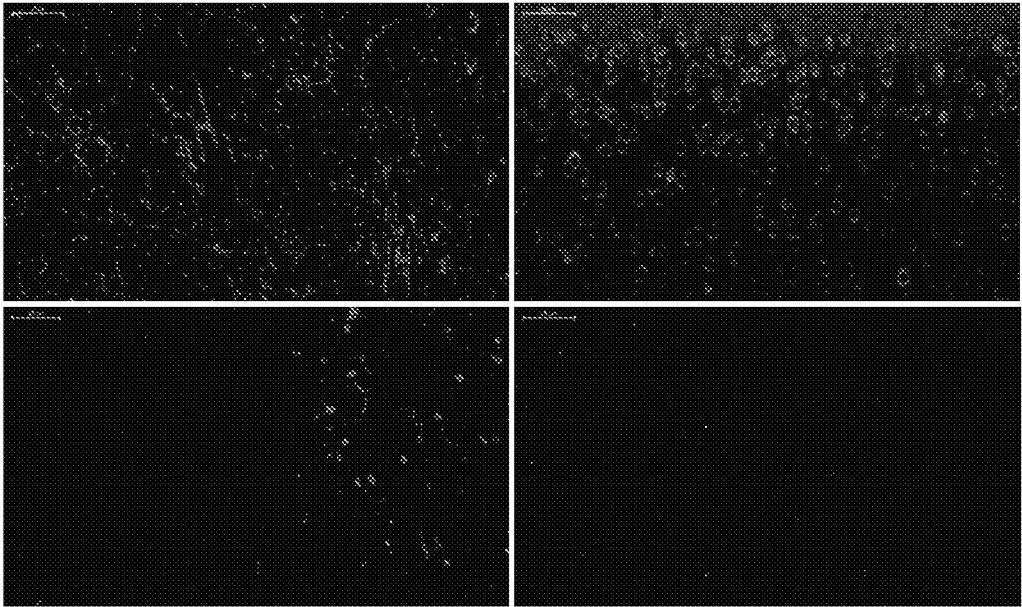


图 6

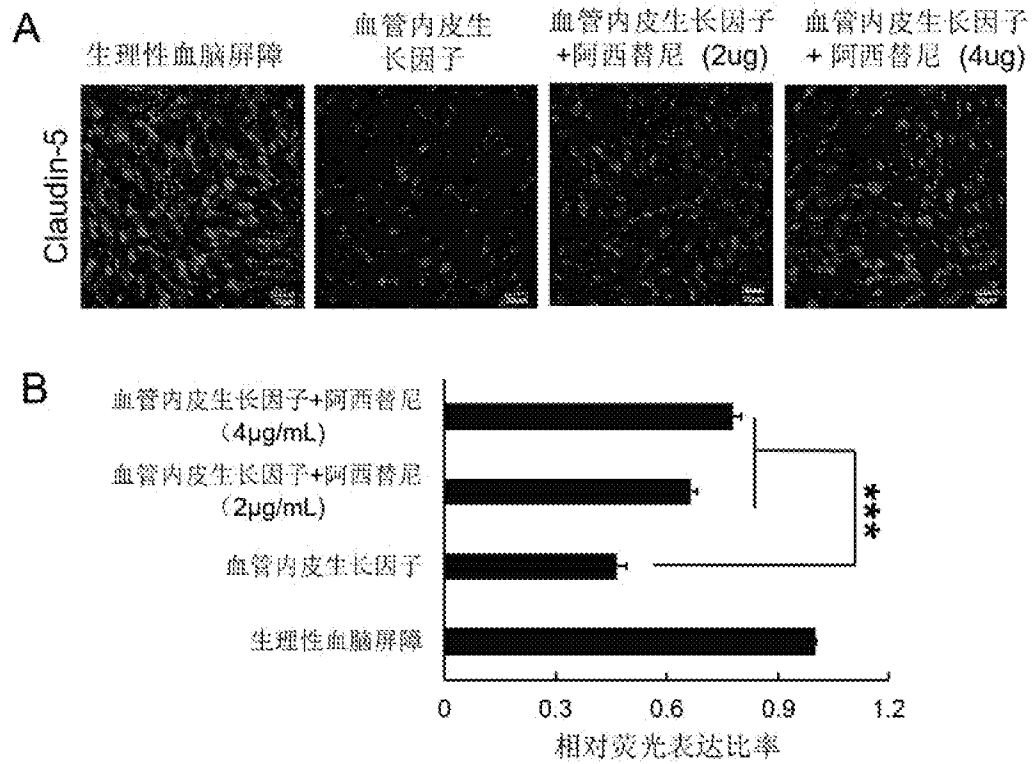


图 7

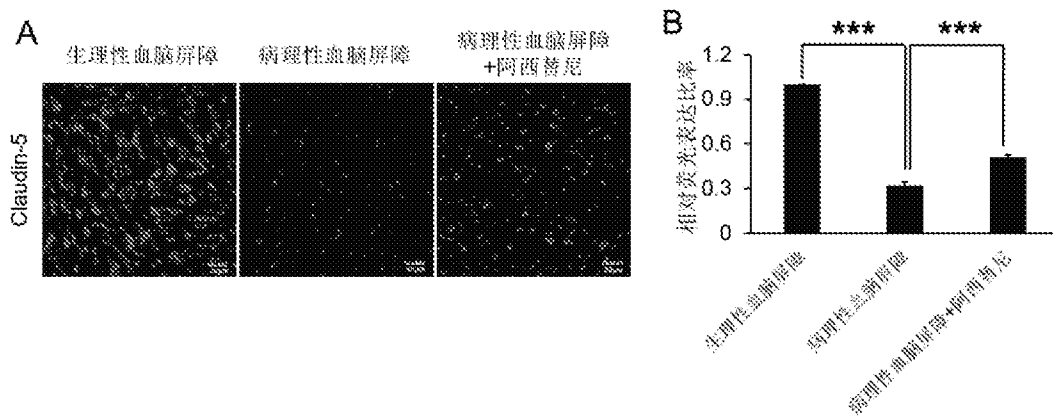


图 8

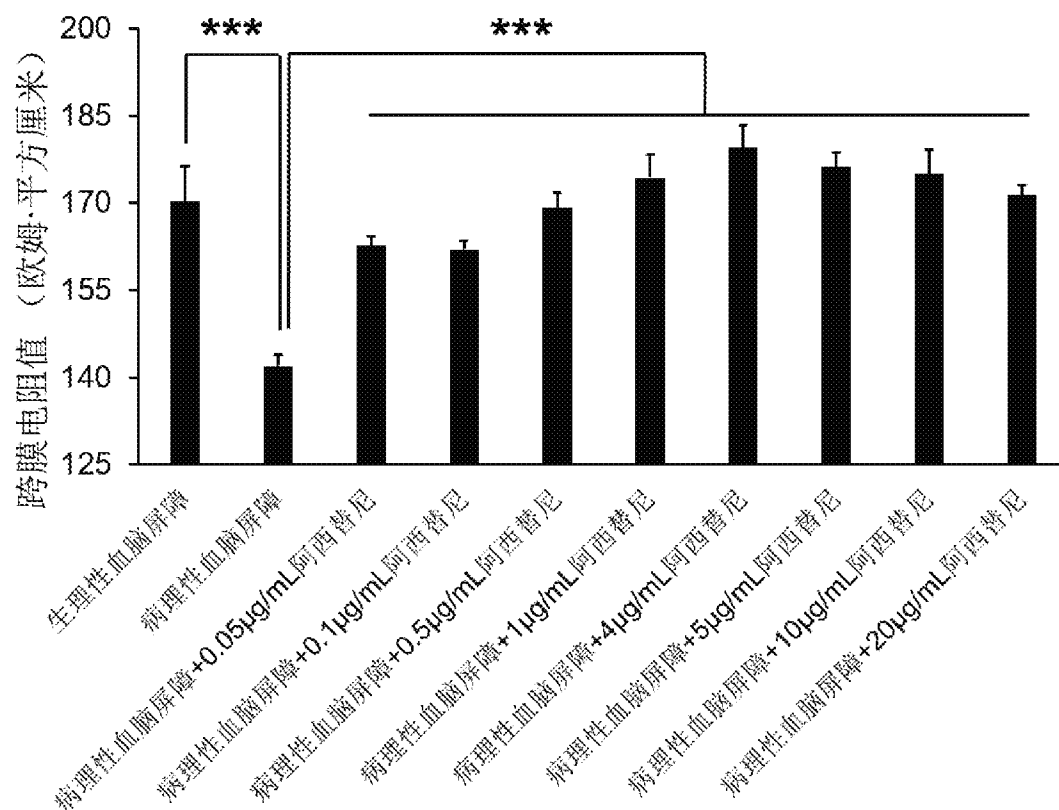


图 9

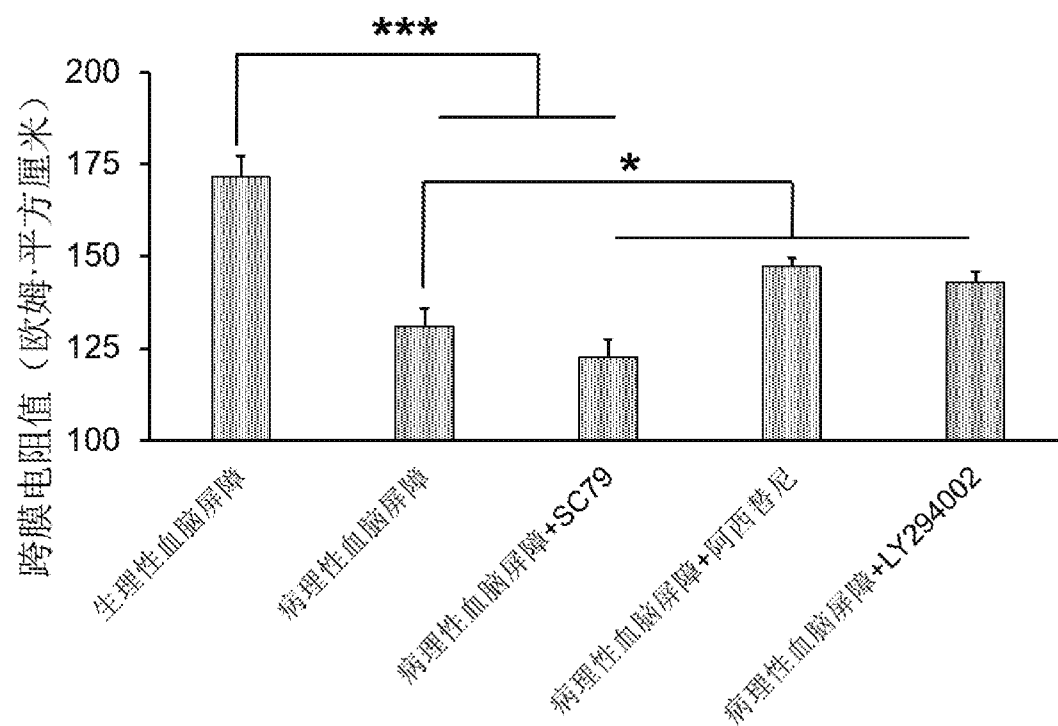


图 10

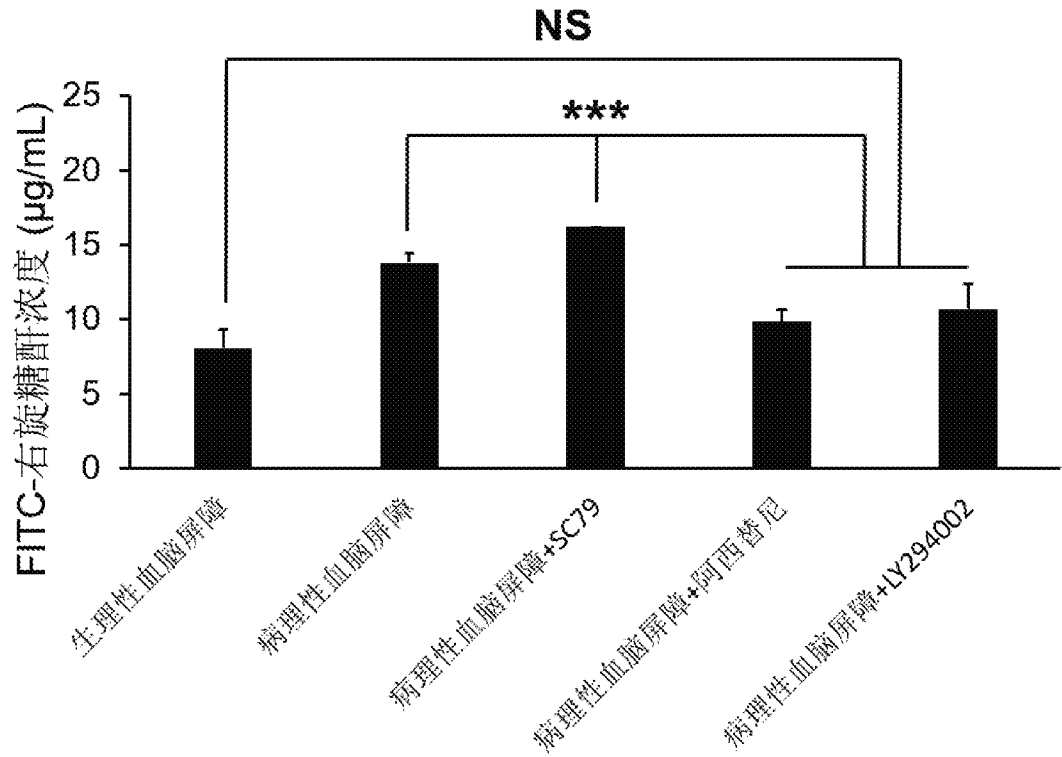


图 11

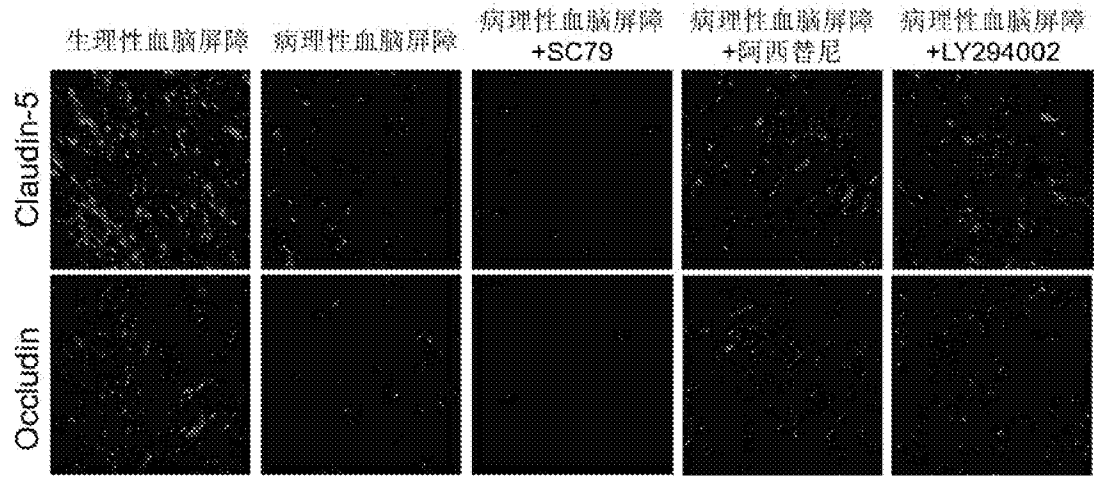


图 12

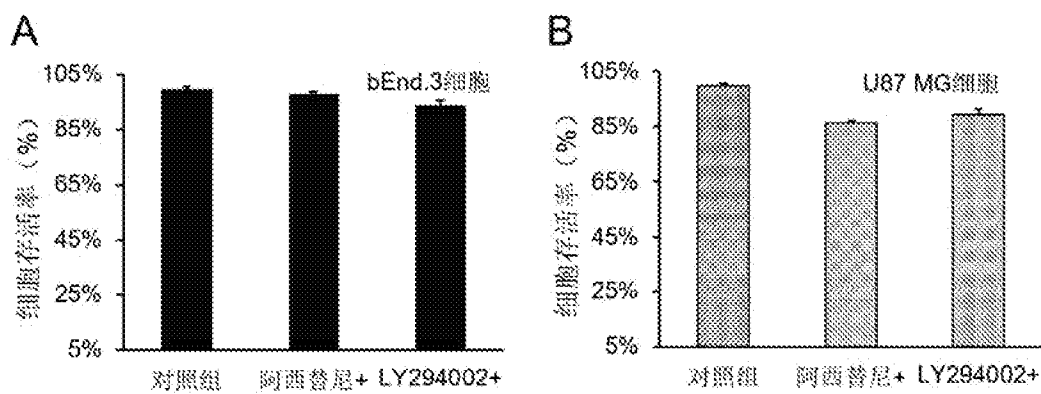


图 13

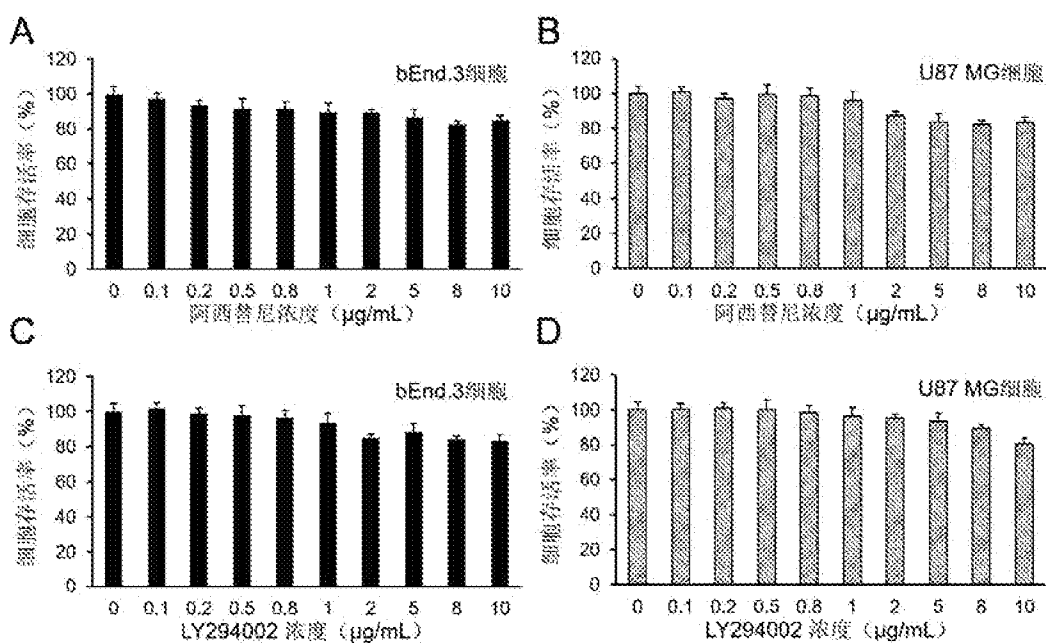


图 14

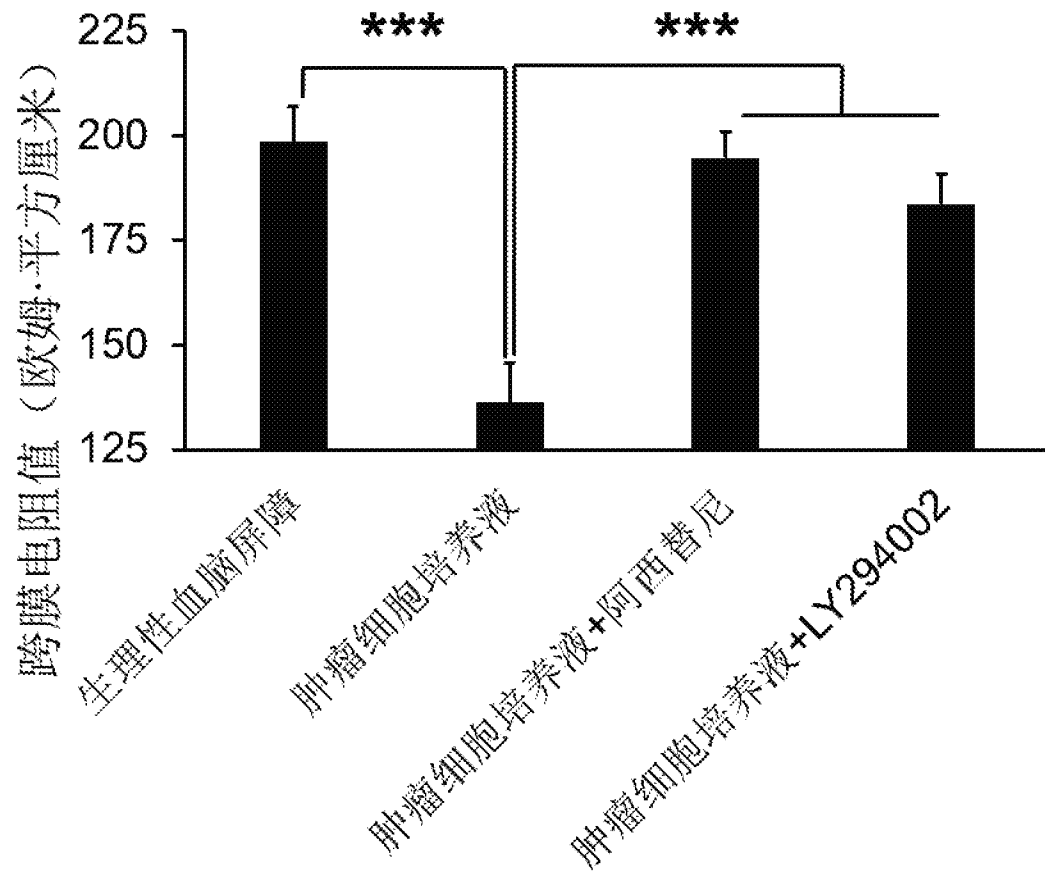


图 15

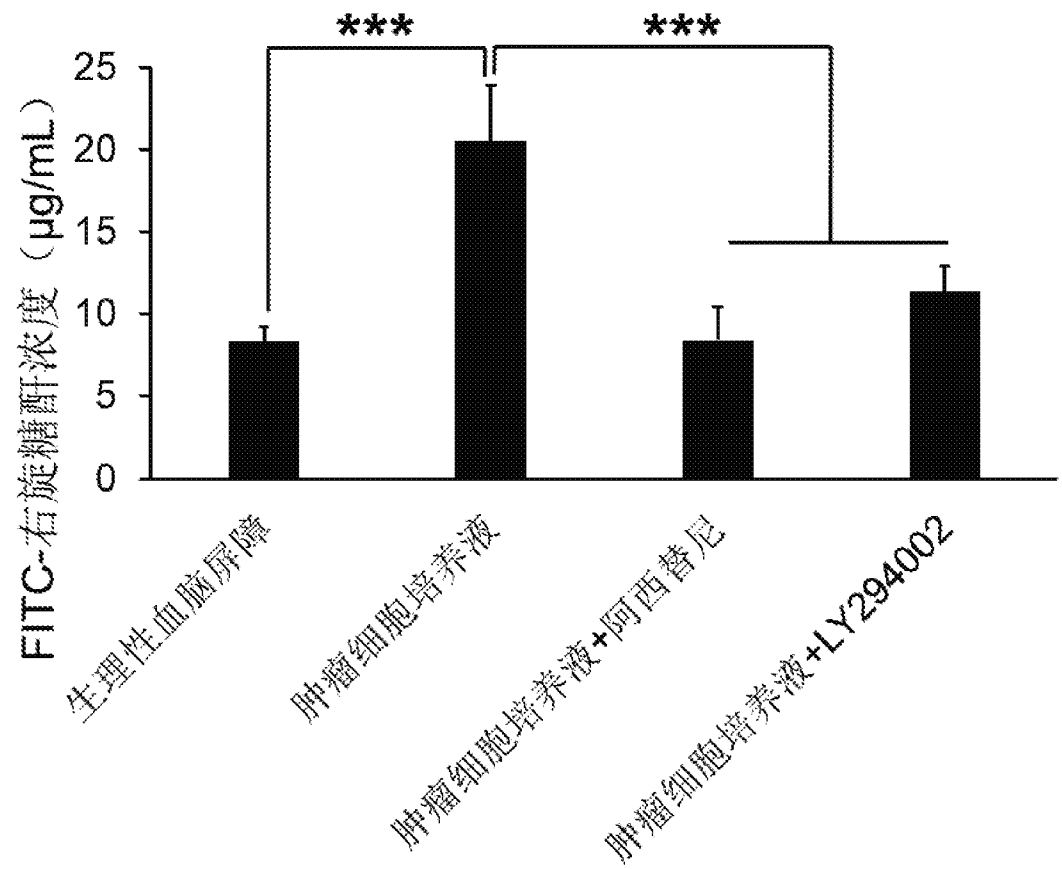


图 16

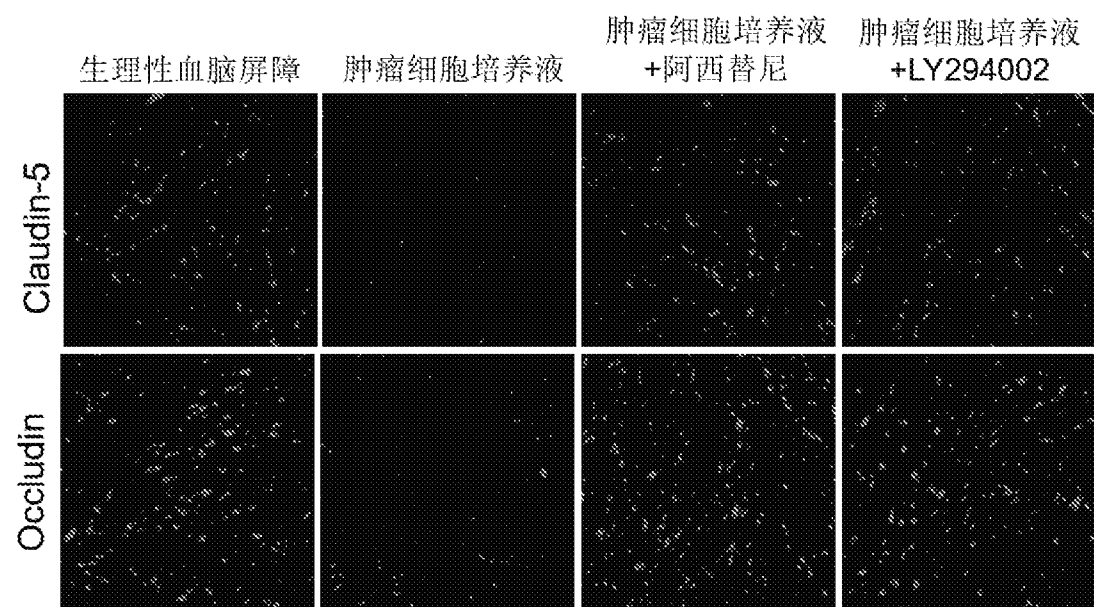


图 17

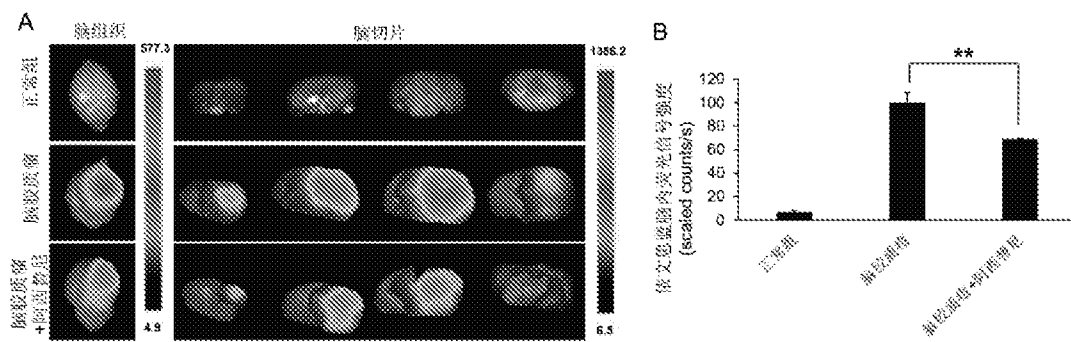


图 18

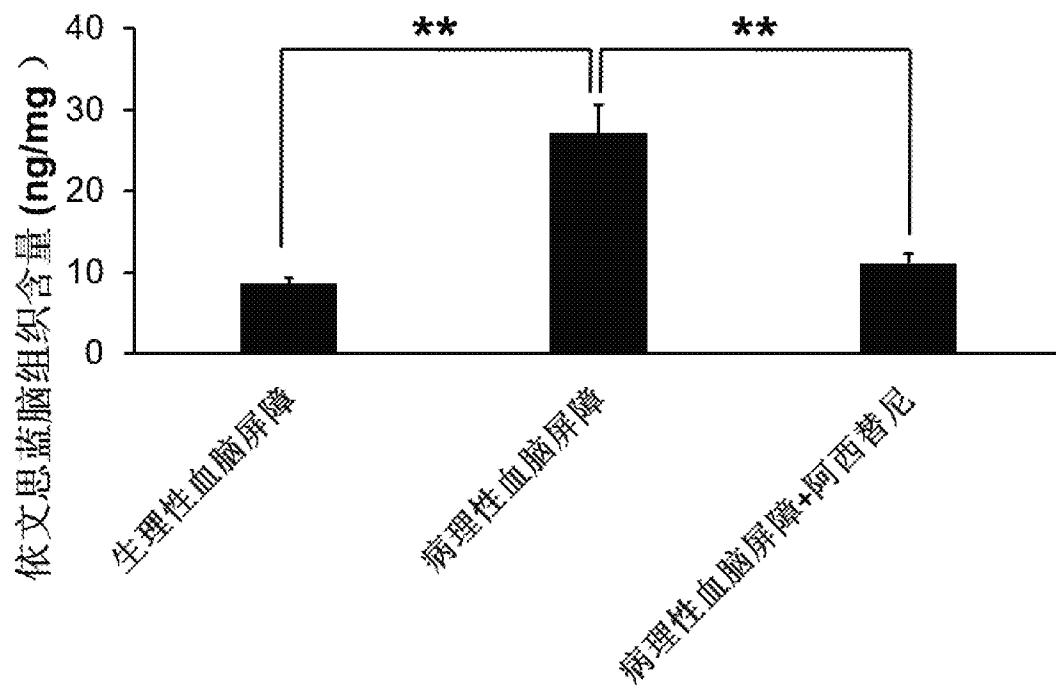


图 19

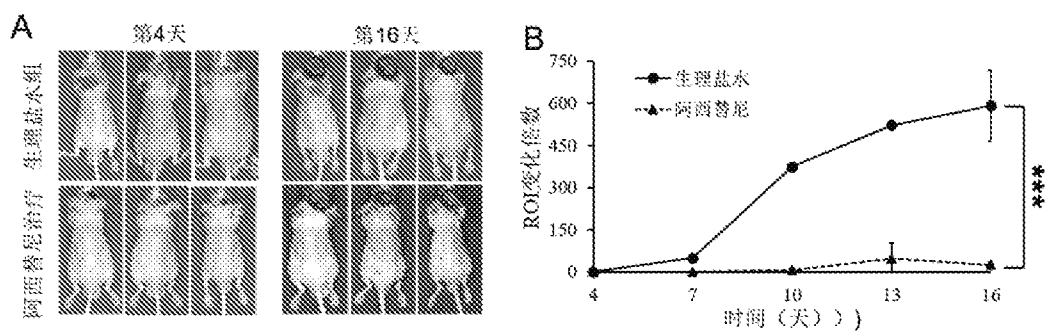


图 20

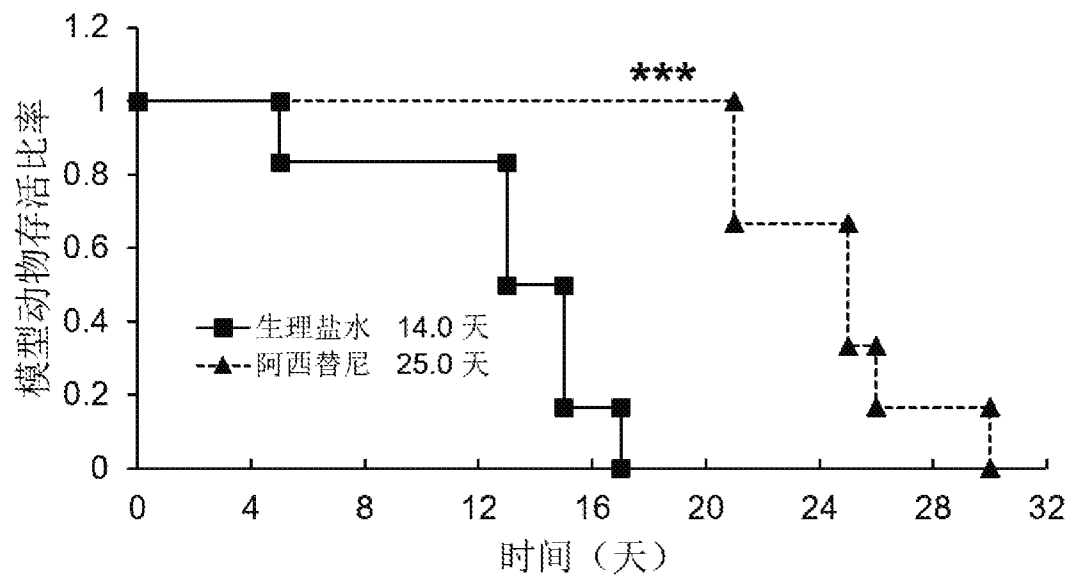


图 21

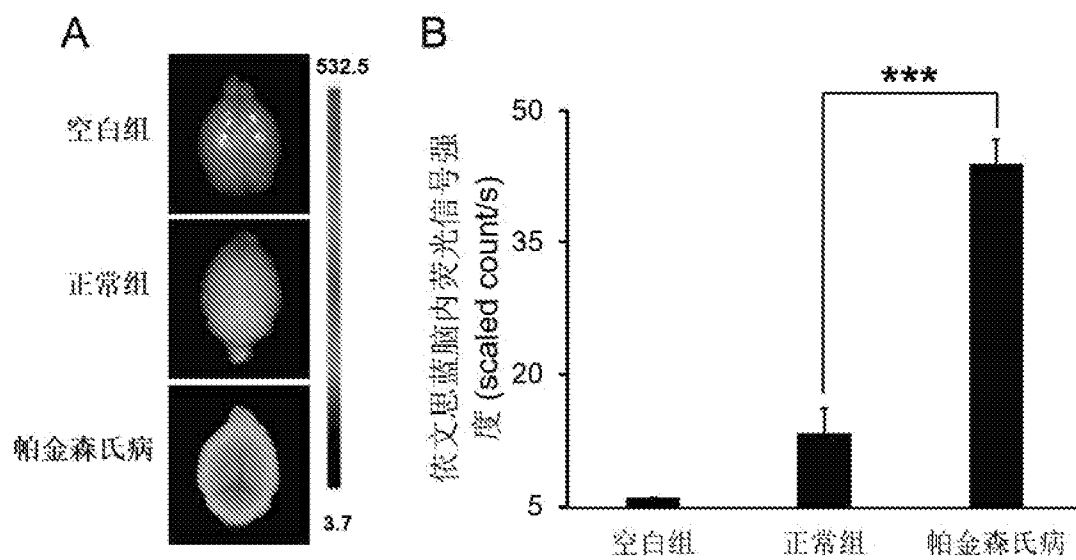


图 22

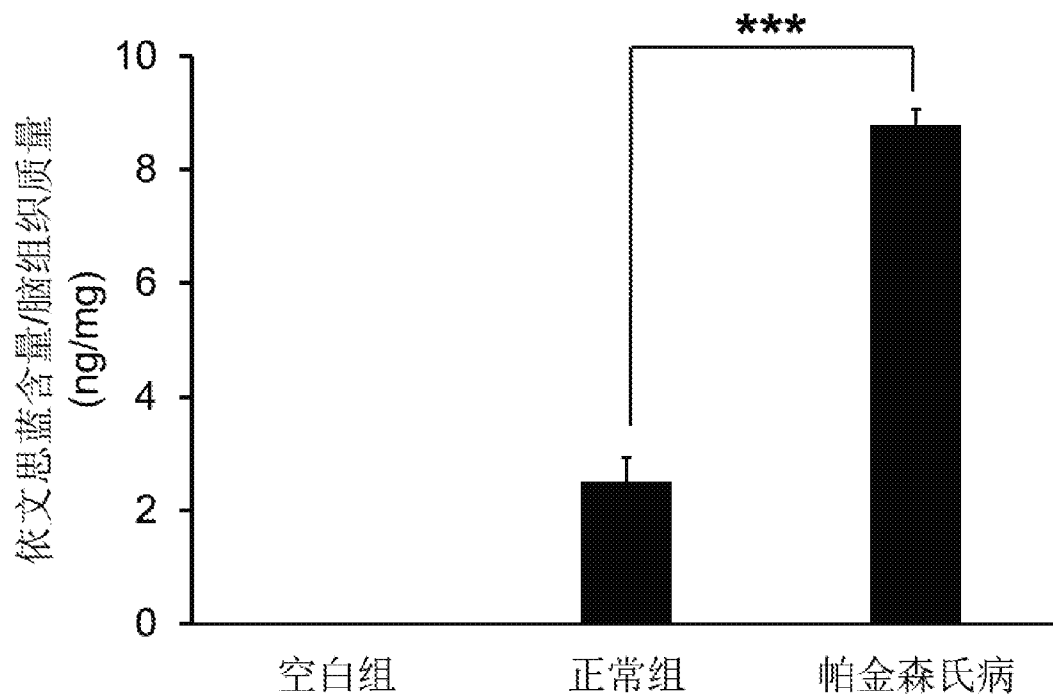


图 23

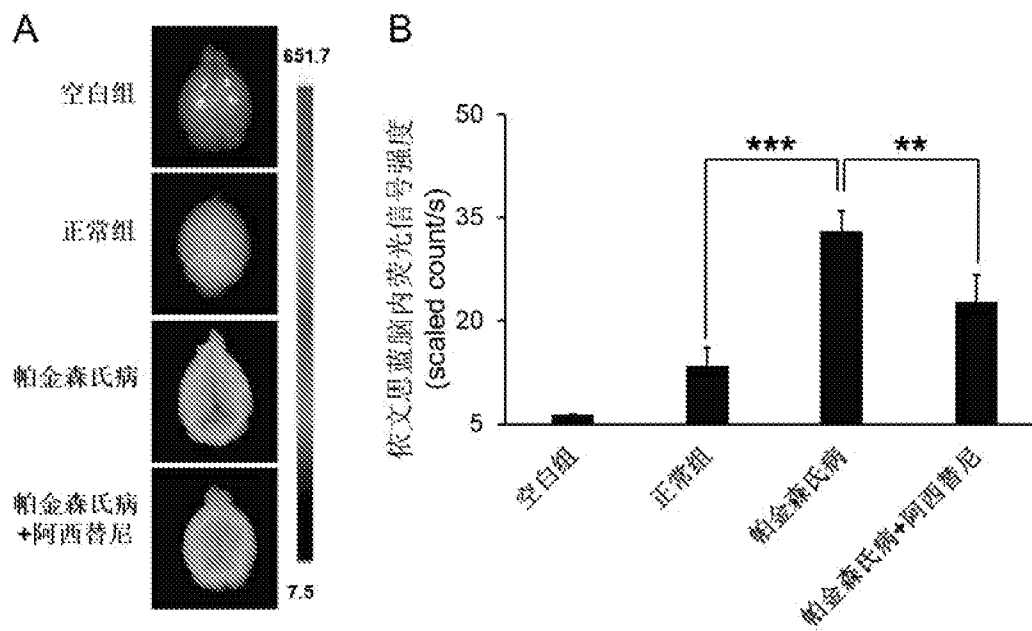


图 24

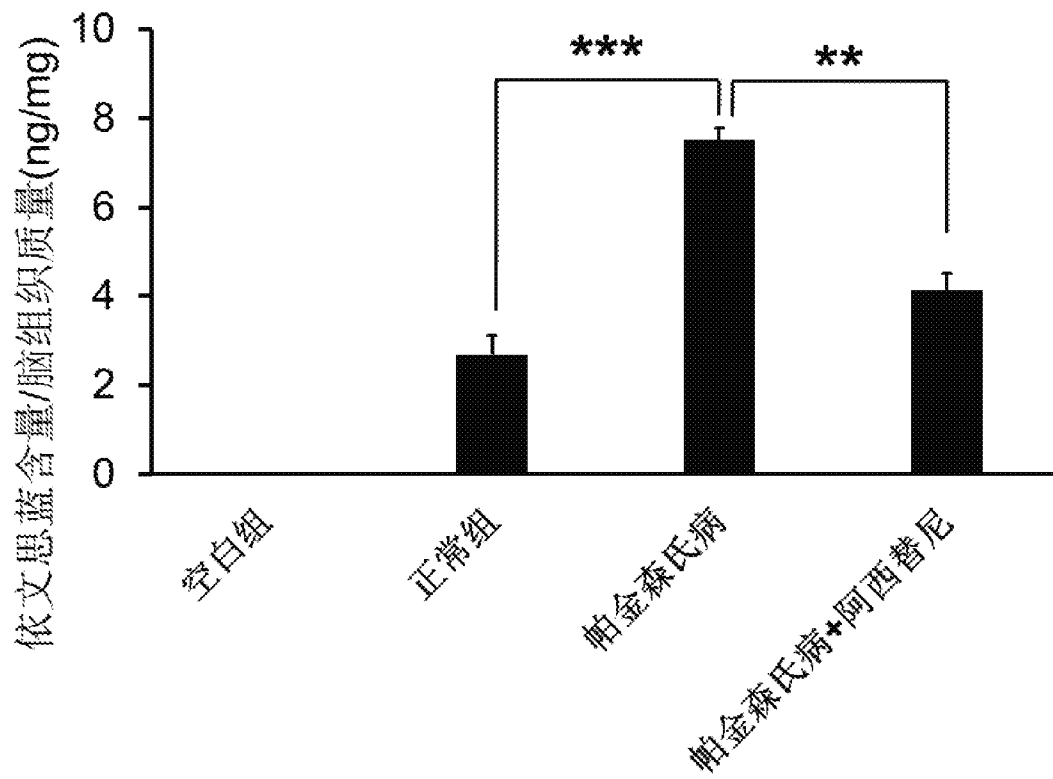


图 25

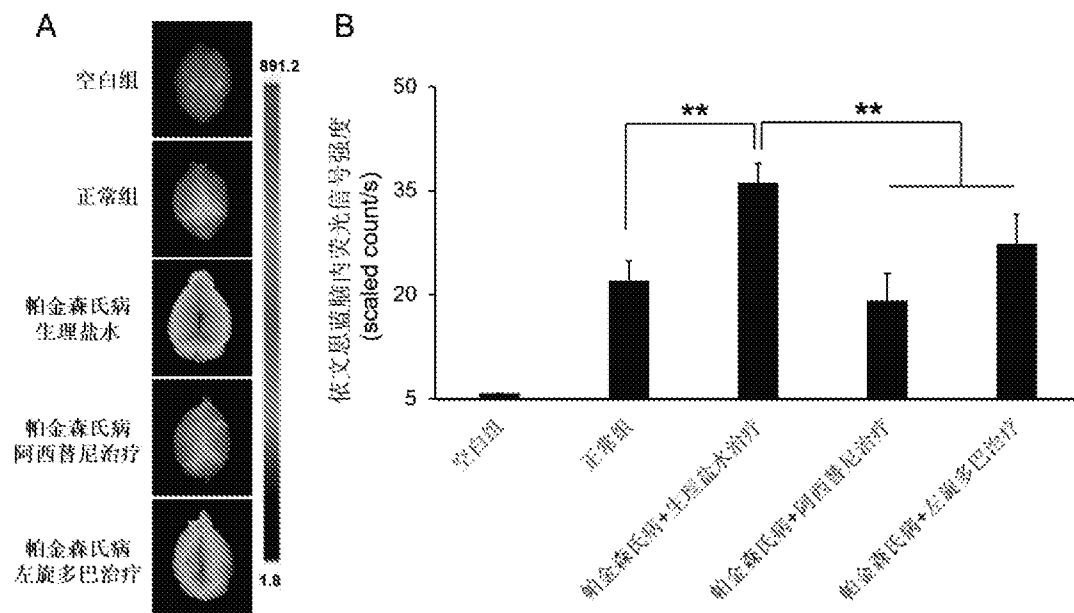


图 26

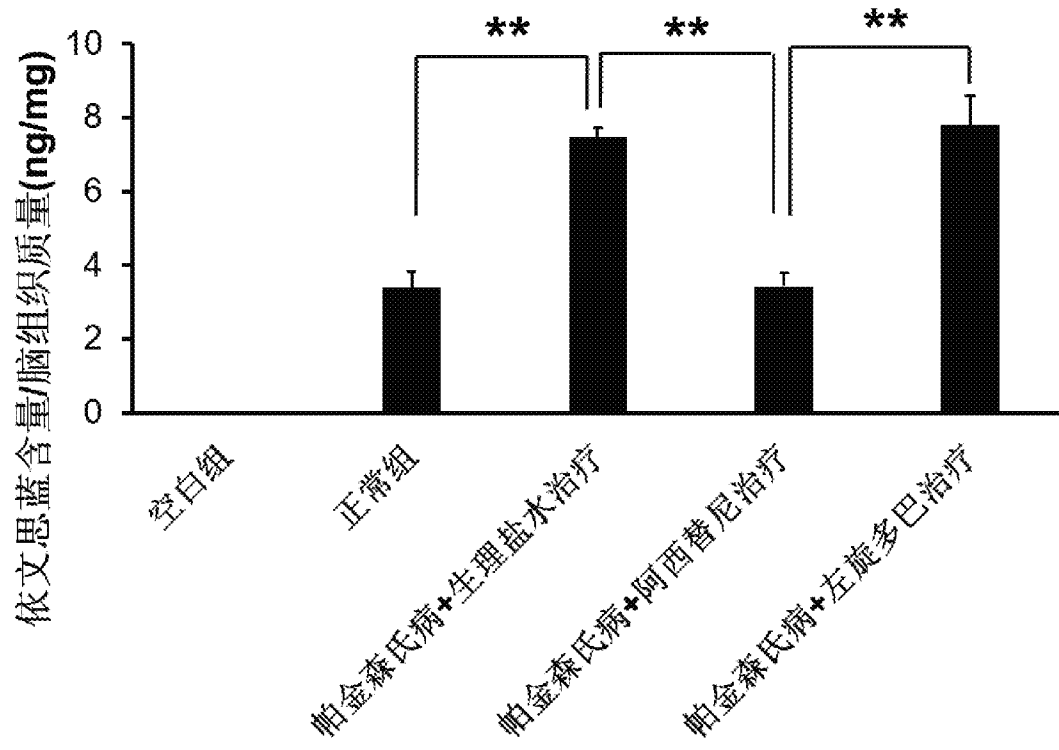


图 27

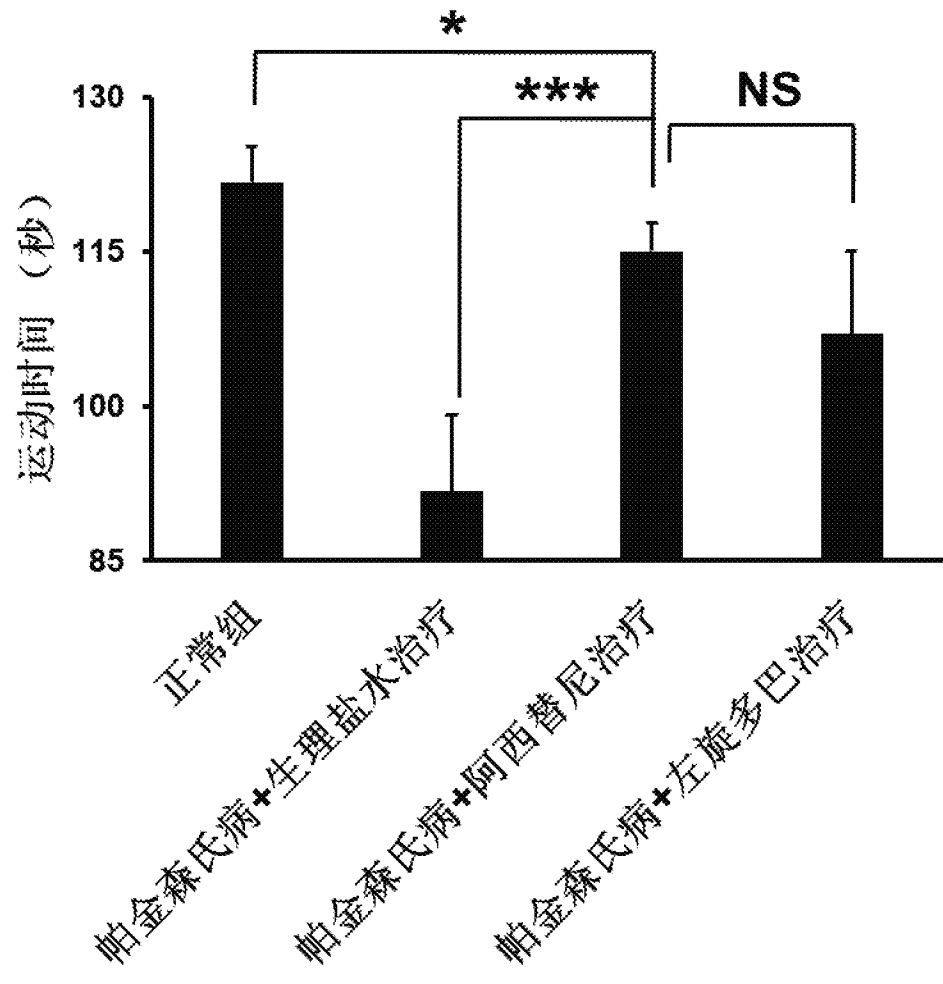


图 28

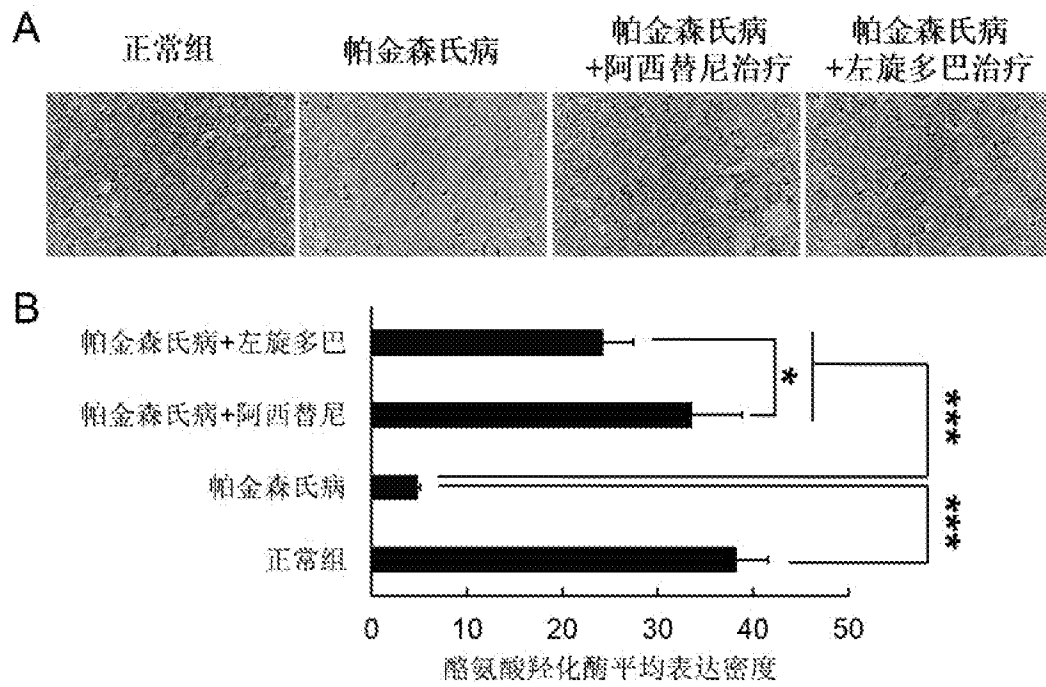


图 29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/095242

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/4439(2006.01)i; A61P 25/28(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)

CNABS, VEN (DWPI+SIPOABS), CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, 中国药物专利数据库, CHINESE PHARMACEUTICAL PATENT DATABASE, CNKI, 百度搜索, BAIDU SCHOLAR SEARCH, ISI-WEB OF SCIENCE: 阿西替尼, 血脑屏障, 渗透, 磷脂酰肌醇激酶, 脑胶质瘤, 帕金森氏病, 脑缺血, 阿尔茨海默症, 多发性硬化, axitinib, blood brain barrier, bbb, permeability, phosphatidylinositol, glioblastoma, parkinson, ischemia, alzheimer, multiple sclerosis, claudin-5, occludin

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WEN, Lijuan et al. "VEGF-mediated Tight Junctions Pathological Fenestration Enhances Doxorubicin-loaded Glycolipid-like Nanoparticles Traversing BBB for Glioblastoma-targeting Therapy" <i>Drug Delivery</i> , Vol. 1, No. (24), 28 November 2017 (2017-11-28), 1843-1855	1-4
X	MAIRE, G.A. "Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT Pathway Inhibition by Doxazosin Promotes Glioblastoma Cells Death, Upregulation of p53 and Triggers Low Neurotoxicity" <i>PLOS One</i> , Vol. 4, No. (11), 28 April 2016 (2016-04-28), 1-18	1-7



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

29 September 2019

Date of mailing of the international search report

16 October 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration
 No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
 100088
 China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/095242

A. 主题的分类

A61K 31/4439(2006.01)i; A61P 25/28(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))

CNABS, VEN(DWPI+SIP0ABS), CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, 中国药物专利数据库, CNKI, 百度学术搜索, ISI-WEB OF SCIENCE:阿西替尼, 血脑屏障, 渗透, 磷脂酰肌醇激酶, 脑胶质瘤, 帕金森氏病, 脑缺血, 阿尔茨海默症, 多发性硬化, axitinib, blood brain barrier, bbb, permeability, phosphatidylinositol, glioblastoma, parkison, ischemia, alzheimer, multiple sclerosis, claudin-5, occludin

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
X	Wen, LJ et al. "VEGF-mediated tight junctions pathological fenestration enhances doxorubicin-loaded glycolipid-like nanoparticles traversing BBB for glioblastoma-targeting therapy" Drug Delivery, 第1卷, 第24期, 2017年 11月 28日 (2017 - 11 - 28), 1843-1855	1-4
X	Gaelzer, MM et al. "Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT Pathway Inhibition by Doxazosin Promotes Glioblastoma Cells Death, Upregulation of p53 and Triggers Low Neurotoxicity" PLOS ONE, 第4卷, 第11期, 2016年 4月 28日 (2016 - 04 - 28), 1-18	1-7

☐ 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 9月 29日

国际检索报告邮寄日期

2019年 10月 16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

葛嘉

电话号码 62089166