



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107982278 A

(43)申请公布日 2018.05.04

(21)申请号 201711351091.3

C12Q 1/02(2006.01)

(22)申请日 2017.12.15

C12Q 1/6883(2018.01)

(71)申请人 哈尔滨医科大学

G01N 33/53(2006.01)

地址 150081 黑龙江省哈尔滨市南岗区保健路157号

G01N 33/50(2006.01)

(72)发明人 张志毅 张跃 张娟 孙佳莹
郑一宁 梅铁芳(74)专利代理机构 北京国坤专利代理事务所
(普通合伙) 11491

代理人 赵红霞

(51)Int.Cl.

A61K 33/36(2006.01)

A61K 9/08(2006.01)

A61K 47/02(2006.01)

A61P 19/02(2006.01)

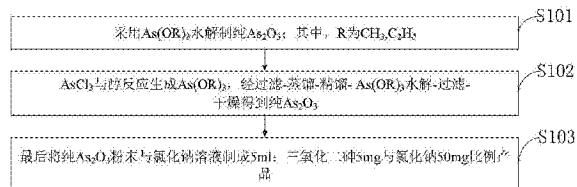
权利要求书1页 说明书11页 附图3页

(54)发明名称

一种用于治疗血管生成介导疾病的药物及应用

(57)摘要

本发明属于医药学技术领域,公开了一种用于治疗血管生成介导疾病的药物及应用,提供一种利用三氧化二砷制备的用于治疗血管生成介导疾病的药物;评估用于治疗血管生成介导疾病的药物疗效的方法包括:评估三氧化二砷对关节病变滑膜细胞TSP-1-TGF- β -CTGF-VEGF血管增殖功能模块的抑制作用;评估三氧化二砷通过抑制TSP-1-TGF- β -CTGF-VEGF血管增殖功能模块进而对病变关节中微血管内皮细胞增殖的抑制作用。本发明的三氧化二砷可通过抑制TSP-1-TGF- β -CTGF-VEGF功能模块,进而抑制血管增殖,发挥治疗血管增殖性疾病的目



1. 一种利用三氧化二砷制备的用于治疗血管生成介导疾病的药物,其特征在于,所述利用三氧化二砷制备的用于治疗血管生成介导疾病的药物组份按质量计由三氧化二砷5mg与氯化钠50mg组成。

2. 一种如权利要求1所述利用三氧化二砷制备的用于治疗血管生成介导疾病的药物的制备方法,其特征在于,所述制备方法包括:

采用As (OR)₃水解制纯As₂O₃;其中,R为CH₃,C₂H₅;

AsCl₃与甲醇或乙醇反应生成As (OR)₃,经过滤-蒸馏-精馏-As (OR)₃水解-过滤-干燥,得到纯As₂O₃;

将As₂O₃粉末与氯化钠溶液制成5ml,其中,三氧化二砷5mg,氯化钠50mg。

3. 如权利要求2所述的制备方法,其特征在于,As (OR)₃水解中,按质量比As (OR)₃:H₂O=1:1.6-3;水解的温度为293±5K;

干燥步骤中,包括:在真空干燥箱中,对过滤后的As₂O₃进行热处理;加热速度为1.5°C/min;在等温条件下加热至恒重;

AsCl₃与甲醇或乙醇反应生成的As (OCH₃)₃或As (OC₂H₅)₃在343K、363K、373K、413K温度条件下干燥时间分别为43min、19min、14min、3min和116min、55min、17min、4min。

4. 一种评估权利要求1所述利用三氧化二砷制备的用于治疗血管生成介导疾病的药物疗效的方法,其特征在于,所述评估用于治疗血管生成介导疾病的药物疗效的方法包括:

评估三氧化二砷对关节病变滑膜细胞TSP-1-TGF-β-CTGF-VEGF血管增殖功能模块的抑制作用;

评估三氧化二砷通过抑制TSP-1-TGF-β-CTGF-VEGF血管增殖功能模块进而对病变关节中微血管内皮细胞增殖的抑制作用。

5. 如权利要求4所述评估用于治疗血管生成介导疾病的药物疗效的方法,其特征在于,所述评估用于治疗血管生成介导疾病的药物疗效的方法具体包括:

建立正常滑膜组织的成纤维样滑膜细胞NH-FLS和RA滑膜组织的成纤维样滑膜细胞RA-FLS与人真皮微血管内皮细胞HDMECs共培养体系;

采用实时荧光定量PCR方法测定共培养体系中FLS TSP-1、TGF-β1、CTGF和VEGF mRNA表达水平;

ELISA方法分析共培养体系上清液中TSP-1、TGF-β1、CTGF和VEGF蛋白表达情况;然后将新鲜上清液加至HDMECs进行Transwell实验和成管实验。

6. 如权利要求5所述评估用于治疗血管生成介导疾病的药物疗效的方法,其特征在于,所述评估用于治疗血管生成介导疾病的药物疗效的方法还包括:

分别刺激或干扰RA-FLS TSP-1、TGF-β1、CTGF表达后,检测RA-FLS及其共培养体系培养上清液中TSP-1、TGF-β1、CTGF、VEGF基因及蛋白表达情况,从而评估血管增殖因子TSP-1、TGF-β1、CTGF、VEGF之间的相互作用关系。

一种用于治疗血管生成介导疾病的药物及应用

技术领域

[0001] 本发明属于医药学技术领域,尤其涉及一种用于治疗血管生成介导疾病的药物及应用。

背景技术

[0002] 血管在人体内形成广泛的网络,为身体的每一个部位提供氧气和营养,异常的血管生长和功能是癌症以及炎症性疾病的标志,导致了疾病的进展。血管增殖相关关节疾病中局部病变依赖于新血管形成以确保持续供给病变细胞及炎性细胞氧气和营养。生理情况下,关节滑膜衬里层仅由1-2层细胞组成。在RA等关节病的病理情况下,TNF- α 和IL-1等炎性细胞因子促使滑膜细胞数量明显增多,通常细胞会达到4-10层。滑膜中的成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocytes,FLS)作为滑膜的主要增殖细胞,可在局部分裂,并与外周血来源的单核细胞以及新生血管进一步促进炎性细胞的浸润,还可以进一步诱导滑膜细胞增殖,且为增殖的滑膜组织提供营养物质,表现出局部肿瘤样的生物学行为,侵袭并破坏关节软骨、软骨下骨、肌腱和韧带,最终造成关节畸形和残疾。将RA滑膜组织切片并用内皮细胞特异性抗体染色,可发现滑膜下层存在丰富的毛细血管网,并可见毛细血管后小静脉,血管新生是RA等关节疾病早期一个组织病理学改变,是该类疾病的重要发病环节,抑制新生血管形成可能成为RA等血管增殖相关关节疾病的一种全新的治疗方法。通过作用于血管生成的不同环节,包括对VEGF等生长因子产生的抑制、促血管生成因子的连接(使用抗体或可溶型受体)、阻断下游信号的转导、阻断基质的降解等都可能成为治疗RA的潜在靶标。

[0003] 当前抗血管生成剂的主要靶标是一种称之为血管内皮生长因子(VEGF)的蛋白,它在血管发生中发挥至关重要的作用。尽管多年来众所周知VEGF抑制剂与细胞毒性药物联合治疗,但VEGF抑制剂存在心脑血管的不良反应及其疗效的局限型限制了VEGF抑制剂的临床应用。此外,临床前和临床分析的数据揭示抗血管生成疗法可产生耐受。

[0004] 近十年来,TNF- α 拮抗剂已成为治疗风湿性疾病最有力的武器之一,目前临床使用的TNF- α 拮抗剂主要有英夫利昔单抗、依那西普及阿达木单抗,它们均可缓解及阻止RA的临床及影像学进展,显著减轻RA患者的症状、改善功能及提高生活质量等。然而,TNF- α 拮抗剂也有它的局限性。TNF- α 拮抗剂可导致潜在的结核感染或是导致潜在的结核复燃,英国风湿病学会的一项分析显示,应用阿达木单抗后结核的发生率约为144/10000(人次/年),英夫利昔单抗约为136/10000(人次/年),依那西普约为39/10000(人次/年),应用TNF抑制剂治疗后还可导致包括抗ds-DNA抗体在内的自身抗体的出现,对于使用TNF拮抗剂的乙肝或丙肝患者,还需密切注意患者的转氨酶、病毒定量的变化。另外,RA患者的异质性导致许多患者对生物制剂治疗方法反应不佳,一些患者因经济、地域等原因几乎难以接触到这种治疗或是先期罹患肿瘤等疾病而被排除于用药之外。因而,仍然需求用于治疗类风湿关节炎等持续性血管增殖性疾病的改进方法或制剂。根据公开内容,这些需求可通过施用三氧化二砷来实现。

[0005] 目前As₂O₃对疾病的治疗多局限于血液系统疾病及如胃癌、食管癌、肝癌等恶性实

体瘤的治疗,其治病机理多着重于:

[0006] 诱导致病细胞凋亡:①激活有丝分裂原激活的蛋白激酶信号通路;②抑制端粒酶活性及端粒酶逆转录酶基因的表达;③降低线粒体跨膜电位;④下调原癌基因的表达:下调致癌基因表达如Bcl-2、Bcl-XL等,或上调抑癌基因表达如Bax,P53、Bcl-xs等,也可调节细胞周期依赖基因的表达,引起细胞代谢异常,使细胞增殖能力减弱而凋亡或分化。

[0007] 诱导肿瘤细胞分化:主要通过降低原癌基因c-myc等表达,以及上调细胞分化抗原CD11b表达,从而促进白血病细胞成熟、分化。

[0008] 抑制肿瘤细胞增殖:As₂O₃以剂量依赖方式使细胞周期阻滞。细胞周期存在G1/S期和G2/M期转移2个限制点,处于G2/M期的细胞易于凋亡。As₂O₃通过抑制细胞周期相关蛋白,如上调CDK6等,下调CDK1和cdc-2的表达,并显著增加P21与cdc-2、CDK4等的结合,导致细胞周期阻滞在G1及G2/M期,最终使细胞不能进入有丝分裂末期而凋亡。

[0009] 直接损伤DNA:As₂O₃能引起CHOK1细胞染色体畸形和姐妹染色体单体交换,以及DNA断裂和微核产生,抑制DNA修复。

[0010] 抑制肿瘤细胞转移:CD44基因编码产物是一种跨膜糖蛋白,是细胞黏附分子之一,常出现在已发生转移的肿瘤中,认为它是一种肿瘤扩散转移的标志物。研究显示As₂O₃可显著降低胃癌细胞黏附分子CD44基因编码蛋白的表达。

[0011] As₂O₃对荷瘤机体免疫功能的影响:免疫功能的降低是导致肿瘤生长、发展的原因之一。机体内具有抗肿瘤、抗病毒、发挥免疫监督功能的免疫细胞。研究表明As₂O₃能提高肝癌小鼠机体免疫功能,抑制肿瘤的生长。As₂O₃的这种作用可能与其使免疫细胞的杀伤力显著增强有关。

[0012] 抗血管生成:当前抗血管生成剂的主要靶标是一种称之为血管内皮生长因子(VEGF)的蛋白,它在血管发生中发挥至关重要的作用。尽管多年来众所周知VEGF抑制剂与细胞毒性药物联合治疗,但VEGF抑制剂存在心脑血管的不良反应及其疗效的局限性限制了VEGF抑制剂的临床应用。此外,临床前和临床分析的数据揭示VEGF抑制剂抗血管生成疗法可产生耐受。

[0013] 总之,尽管大量实验证明As₂O₃抗血液病及实体肿瘤的机理是多途径、多靶点的,但是通过抗血管生成途径发挥治疗作用的研究尚少,且仅局限于下调血管内皮细胞生长因子(VEGF)的单因子表达与功能方面。本专利基础研究就As₂O₃通过抑制TSP-1-TGF-β-CTGF-VEGF血管增殖功能模块进而发挥治疗血管增殖性疾病的作用及分子机制进行了较系统的论证,充分说明As₂O₃抗血管增殖作用还可广泛应用类风湿关节炎等多种血管增殖性疾病的治疗,为As₂O₃应用提供了更广阔的适应症,也为血管增殖性疾病提供了一种新的治疗药物,同时为药物联合应用或多途径、多靶点导向治疗提供了一种新的工具。根据公开内容,这些需求可通过施用三氧化二砷来实现。血管增殖是类风湿关节炎(RA)早期组织病理学改变之一,是血管翳生成的必要条件,但其机制尚不明确;目前分析表明,血小板反应蛋白-1(TSP-1)、转化生长因子-β1(TGF-β1)、结缔组织生长因子(CTGF)、血管内皮生长因子(VEGF)这些血管生成因子在RA患者滑膜组织中表达增加,并可能相互作用,对RA滑膜组织血管增殖产生重要影响。虽然生物制剂抗TNF-α治疗对RA有效,但让人忧心的是这种治疗方法会出现多种不良反应,甚至增加恶性肿瘤的发病几率;三氧化二砷(As₂O₃)已被用来治疗肿瘤等血管增殖性疾病,引起了全世界的广泛关注;然而,As₂O₃对RA患者滑膜血管新生的作用及分子机

制尚不清楚。

[0014] 三氧化二砷治病中,通过抑制TSP-1-TGF- β -CTGF-VEGF功能模块发挥抗血管增殖作用的具体结合蛋白或作用靶点尚不明确,有待深入研究;其难度在于,人体是一个复杂的系统,存在着成千上万的蛋白分子,因此,寻找到三氧化二砷的具体作用靶蛋白分子,需要时间及精力的进一步大量投入;三氧化二砷与其他治疗药物联用的疗效、不良反应、最佳剂量尚不明确,有待进一步研究。

[0015] 综上所述,现有技术存在的问题是:TNF- α 拮抗剂也有它的局限性。TNF- α 拮抗剂可导致潜在的结核感染或是导致潜在的结核复燃。

发明内容

[0016] 针对现有技术存在的问题,本发明提供了一种用于治疗血管生成介导疾病的药物及应用。本发明为三氧化二砷临床应用,提供更加坚实的基础。

[0017] 本发明是这样实现的,一种利用三氧化二砷制备的用于治疗血管生成介导疾病的药物;所述利用三氧化二砷制备的用于治疗血管生成介导疾病的药物组份按质量计由三氧化二砷5mg与氯化钠50mg组成。

[0018] 本发明的另一目的在于提供一种用于治疗血管生成介导疾病的药物的制备方法。

[0019] 所述制备方法包括:

[0020] 采用As (OR)₃水解制纯As₂O₃;其中,R为CH₃,C₂H₅;

[0021] AsCl₃与甲醇或乙醇反应生成As (OR)₃,经过滤-蒸馏-精馏-As (OR)₃水解-过滤-干燥,得到纯As₂O₃;

[0022] 将As₂O₃粉末与氯化钠溶液制成5ml,其中,三氧化二砷5mg,氯化钠50mg。

[0023] 进一步,As (OR)₃水解中,按质量比As (OR)₃:H₂O=1:1.6-3;水解的温度为293±5K;

[0024] 干燥步骤中,包括:在真空干燥箱中,对过滤后的As₂O₃进行热处理;加热速度为1.5 °C/min;在等温条件下加热至恒重;

[0025] AsCl₃与甲醇或乙醇反应生成的As (OCH₃)₃或As (OC₂H₅)₃在343K、363K、373K、413K温度条件下干燥时间分别为43min、19min、14min、3min和116min、55min、17min、4min。

[0026] As (OR)₃的产率实际上不随As (OR)₃中烃基的改变而改变,而恒为98-99%;当As (OR)₃:H₂O=1:1.6-3时,达到As₂O₃最高产率99%;当比值<1:1.6时,产率急剧下降,水量增加;当升高温度时,As₂O₃产率减少不很大;通过As (OR)₃水解而获得的As₂O₃粉末,含6-8%水分和痕量醇。为了除去这些水分和痕量醇,在真空干燥箱中,对As₂O₃进行热处理。制得的特纯As₂O₃为高分散的粉末,质点的平均直径为13.13和10.64μ(相应于R为CH₃,C₂H₅)。制得的纯As₂O₃粉末的伦琴相分析指出,它们皆为立方晶体。

[0027] 本发明的另一目的在于提供一种评估用于治疗血管生成介导疾病的药物疗效的方法包括:

[0028] 评估三氧化二砷对关节病变滑膜细胞TSP-1-TGF- β -CTGF-VEGF血管增殖功能模块的抑制作用;

[0029] 评估三氧化二砷通过抑制TSP-1-TGF- β -CTGF-VEGF血管增殖功能模块进而对病变关节中微血管内皮细胞增殖的抑制作用。

[0030] 进一步,所述评估用于治疗血管生成介导疾病的药物疗效的方法具体包括:

[0031] 建立正常滑膜组织的成纤维样滑膜细胞NH-FLS和RA滑膜组织的成纤维样滑膜细胞RA-FLS与真皮微血管内皮细胞HDMECs共培养体系；

[0032] 采用实时荧光定量PCR方法测定共培养体系中FLS TSP-1、TGF- β 1、CTGF和VEGF mRNA表达水平；

[0033] ELISA方法分析共培养体系上清液中TSP-1、TGF- β 1、CTGF和VEGF蛋白表达情况；然后将新鲜上清液加至HDMECs进行Transwell实验和成管实验。

[0034] 进一步，所述评估用于治疗血管生成介导疾病的药物疗效的方法还包括：

[0035] 分别刺激或干扰RA-FLS TSP-1、TGF- β 1、CTGF表达后，检测RA-FLS及其共培养体系培养上清液中TSP-1、TGF- β 1、CTGF、VEGF基因及蛋白表达情况，从而评估血管增殖因子TSP-1、TGF- β 1、CTGF、VEGF之间的相互作用关系。

[0036] 本发明的优点及积极效果为：

[0037] 本发明的一个方面提供了用于治疗血管增殖介导的关节疾病的方法，其包括向哺乳动物施用在治疗上足够量的三氧化二砷(As₂O₃)，施用此化合物可使哺乳动物的关节疾病的病变在临幊上有显著改善。在本发明中，疾病症状临幊上有显著改善包括以下的一项或多项改善：a) 减轻或抑制疼痛；b) 减轻或抑制肿胀；c) 减轻或抑制发红；d) 降低或抑制受影响组织的温度；以及e) 减少或抑制畸形及功能性丧失。

[0038] 本发明可以进行下述推断但并不依赖于该推断，即血管在人体内形成广泛的网络，为身体的每一个部位提供氧气和营养，异常的血管生长和功能是癌症以及炎症性疾病的标志，导致了疾病的进展。在过去的十年中，对血管生成相关分子机制的理解以爆炸性的速度增加，部分抗血管生成药物已获得癌症和眼疾的治疗批准。血管生成过程包括血管生成因子的释放、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的降解、内皮细胞迁移、增殖，管腔结构的形成等多步骤复杂过程。在类风湿关节炎等病理环境下，滑膜细胞可分泌大量细胞因子，其中部分可影响血管内皮细胞。TSP-1、TGF- β 、CTGF、VEGF作为重要的血管增殖因子，在RA患者滑膜组织中均高表达，且存在相关性。TGF- β 1可促进RA-FLS中TSP-1表达，TSP-1可通过TGF- β 1通路上调关节炎中发挥重要作用的血管纤溶酶原激活物产物。关节炎动物模型给予TSP-1衍生物拮抗TSP-1，则可明显缓解关节炎症，并降低滑膜组织CTGF表达。CTGF通过上调miR-210表达，促进人滑膜成纤维细胞VEGF的表达与血管生成，阻断CTGF可明显抑制VEGF表达。CTGF单克隆抗体阻断CTGF，可以改善C1A模型鼠病情的进展。应用TGF- β 1型受体阻断剂阻断TGF- β ，在C1A模型中也展现出良好的治疗前景。综上所述，TSP-1、TGF- β 1、CTGF、VEGF在多系统间存在复杂的相互作用，已构成功能模块，共同调控血管增殖。但在类风湿关节炎中，上述四种蛋白分子之间的相互作用关系及其对新生血管形成的影响。因为病理状态下，关节滑膜细胞可表达和分泌上述血管生成因子，上述因子又可影响血管内皮细胞，对类风湿关节炎血管增殖产生重要影响。三氧化二砷可通过抑制TSP-1-TGF- β 1-CTGF-VEGF功能模块，进而抑制血管增殖，发挥治疗血管增殖性疾病的目地。

[0039] 本发明涉及三氧化二砷的新用途，特别是在血管生成介导的类风湿关节炎等血管增殖性疾病治疗中的新用途。本发明考察了三氧化二砷对人关节病变滑膜细胞TSP-1-TGF- β -CTGF-VEGF血管增殖功能模块的抑制作用，还进一步考察了三氧化二砷通过抑制上述功能模块进而对病变关节中微血管内皮细胞增殖的抑制功能，表明三氧化二砷有望成为血管生成介导的疾病治疗的有效药物。

[0040] 本发明为血管增殖性疾病的治疗提供了一种新的治疗方法,并为联合用药提供了一种新的药物。其直接技术不仅在于有效缓解患者痛苦,还在于其明显的经济效益。本实验三氧化二砷在动物实验小鼠中有效剂量为1mg/kg/day,相当于成人体5mg/day,三氧化二砷价格便宜,商品价格接近70元/5mg/只,以类风湿关节炎为例,最便宜的TNF- α 拮抗剂为230元/日,如果应用三氧化二砷治疗,则价格为最便宜的TNF- α 抑制剂的近30%,为患者减少经济负担近70%。如果应用于其他血管增殖性疾病如肿瘤的治疗,则更加明显。此外,本专利药物三氧化二砷还可与TNF- α 抑制剂联合用药,增强疗效,减少联用药物的不良反应,可谓“协同作战”。三氧化二砷治疗肿瘤外病变同时,治疗肿瘤本身,可谓“一石二鸟”。此外,患者病情改善,学习、工作、生活能力增强,生活质量提高,也间接带来了巨大的经济社会效益。

附图说明

[0041] 图1是本发明实施例提供的As₂O₃对RA-FLS TSP-1-TGF- β 1-CTGF-VEGF功能模块表达及其促血管增殖功能的影响图。

[0042] 图2是本发明实施例提供的As₂O₃可能通过抑制TSP-1-TGF- β 1-CTGF-VEGF功能模块来发挥抗RA滑膜组织血管增殖作用,从而达到治疗RA的目的图。

[0043] 图3是本发明实施例提供的用于治疗血管生成介导疾病的药物的制备方法流程图。

具体实施方式

[0044] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0045] 本发明通过分析RA患者滑膜组织的成纤维样滑膜细胞中血管生成因子包括TSP-1、TGF- β 1、CTGF和VEGF组成的调控网络,明确RA患者滑膜中血管增殖的发病机制。分析As₂O₃对RA患者滑膜血管新生的作用及分子机制,探索RA治疗的新方法。

[0046] 本发明实施例提供一种利用三氧化二砷制备的用于治疗血管生成介导疾病的药物;所述利用三氧化二砷制备的用于治疗血管生成介导疾病的药物组份按质量计由三氧化二砷5mg与氯化钠50mg组成。

[0047] 如图3所示,本发明实施例提供的用于治疗血管生成介导疾病的药物的制备方法,所述制备方法包括:

[0048] S101:采用As (OR)₃水解制纯As₂O₃;其中,R为CH₃,C₂H₅;

[0049] S102:AsCl₃与醇反应生成As (OR)₃,经过滤-蒸馏-精馏-As (OR)₃水解-过滤-干燥得到纯As₂O₃;

[0050] S103:最后将纯As₂O₃粉末与氯化钠溶液制成5ml:三氧化二砷5mg与氯化钠50mg比例产品。

[0051] As (OR)₃的产率实际上不随As (OR)₃中烃基的改变而改变,而恒为98-99%;当As (OR)₃:H₂O=1:1.6-3时,达到As₂O₃最高产率99%;当比值<1:1.6时,产率急剧下降,水量增加;当升高温度时,As₂O₃产率减少不很大;水解的适宜温度为293±5K。通过As (OR)₃水解而

获得的As₂O₃粉末,含6-8%水分和痕量醇。为了除去这些水分和痕量醇,在真空干燥箱中,对As₂O₃进行热处理。加热速度为1.5℃/min。在等温条件下加热至恒重。As(OCH₃)₃和As(OC₂H₅)₃在343K、363K、373K、413K温度条件下所需的干燥时间分别为43、19、14、3min和116、55、17、4min。制得的特纯As₂O₃为高分散的粉末,质点的平均直径为13.13和10.64μ(相应于R为CH₃,C₂H₅)。制得的纯As₂O₃粉末的伦琴相分析指出,它们皆为立方晶体。

[0052] 本发明实施例提供一种评估用于治疗血管生成介导疾病的药物疗效的方法包括:

[0053] 评估三氧化二砷对关节病变滑膜细胞TSP-1-TGF-β-CTGF-VEGF血管增殖功能模块的抑制作用;

[0054] 评估三氧化二砷通过抑制TSP-1-TGF-β-CTGF-VEGF血管增殖功能模块进而对病变关节中微血管内皮细胞增殖的抑制作用。

[0055] 所述评估用于治疗血管生成介导疾病的药物疗效的方法具体包括:

[0056] 建立正常滑膜组织的成纤维样滑膜细胞NH-FLS和RA滑膜组织的成纤维样滑膜细胞RA-FLS与真皮微血管内皮细胞HDMECs共培养体系;

[0057] 采用实时荧光定量PCR方法测定共培养体系中FLS TSP-1、TGF-β1、CTGF和VEGF mRNA表达水平;

[0058] ELISA方法分析共培养体系上清液中TSP-1、TGF-β1、CTGF和VEGF蛋白表达情况;然后将新鲜上清液加至HDMECs进行Transwell实验和成管实验。

[0059] 所述评估用于治疗血管生成介导疾病的药物疗效的方法还包括:

[0060] 分别刺激或干扰RA-FLS TSP-1、TGF-β1、CTGF表达后,检测RA-FLS及其共培养体系培养上清液中TSP-1、TGF-β1、CTGF、VEGF基因及蛋白表达情况,从而评估血管增殖因子TSP-1、TGF-β1、CTGF、VEGF之间的相互作用关系。

[0061] 下面结合附图及具体实施例对本发明的应用原理作进一步描述。

[0062] 方法

[0063] 正常人滑膜组织的成纤维样滑膜细胞(NH-FLS)和RA患者滑膜组织的成纤维样滑膜细胞(RA-FLS)与人真皮微血管内皮细胞(HDMECs)分别建立共培养体系。As₂O₃与TNF-α共同处理共培养体系。采用实时定量荧光PCR方法测定共培养体系中FLS TSP-1、TGF-β1、CTGF和VEGF mRNA表达水平,ELISA方法分析共培养体系上清液中TSP-1、TGF-β1、CTGF和VEGF蛋白表达情况,然后将新鲜上清液加至HDMECs进行Transwell实验和成管实验。本发明也检测了分别刺激或干扰RA-FLS TSP-1、TGF-β1、CTGF表达后,RA-FLS及其培养上清液中TSP-1、TGF-β1、CTGF、VEGF基因及蛋白表达情况,从而评估血管增殖因子TSP-1、TGF-β1、CTGF、VEGF之间的相互作用关系。体内实验,向DBA/1J小鼠注射牛11型胶原蛋白建立胶原诱导性关节炎(CIA)模型,给予As₂O₃或甲氨蝶呤治疗2周,通过关节评分和关节组织病理学来评估关节炎严重程度,通过免疫组化方法分析CIA模型鼠关节滑膜组织中TSP-1、TGF-β1、CTGF和VEGF表达情况以及血管新生情况。

[0064] 结果

[0065] 共培养体系中RA-FLS表达TSP-1、TGF-β1、CTGF和VEGF mRNA水平较NH-FLS明显升高,RA-FLS和HDMECs共培养体系上清液中TSP-1、TGF-β1、CTGF和VEGF表达较NH-FLS与HDMECs共培养体系上清液中上述蛋白的含量明显增加,这导致了HDMECs迁移和小管生成的增多,说明RA-FLS分泌的上述血管增殖因子具有生物学活性,可促进血管生成。分别刺激或

干扰RA-FLS TSP-1、TGF- β 1、CTGF表达后, TSP-1、TGF- β 1、CTGF和VEGF无论是在蛋白水平还是在基因水平均发生复杂改变, 交互交织形成网络, 构建功能模块共同调节RA滑膜血管新生。TNF- α 可明显促进RA-FLS和HDMECs共培养体系中TSP-1、TGF- β 1、CTGF和VEGF表达及其相关血管生成。无论是否进行TNF- α 诱导, As₂O₃均可显著抑制RA-FLS和HDMECs共培养体系中TSP-1、TGF- β 1、CTGF和VEGF的表达。体内实验中, CIA模型鼠关节滑膜组织中TSP-1、TGF- β 1、CTGF和VEGF的表达以及微血管密度(MVD)明显升高, 给予As₂O₃治疗后, TSP-1、TGF- β 1、CTGF和VEGF的表达以及MVD显著下降, 抑制了CIA模型鼠滑膜组织中血管生成, 从而减轻关节炎严重程度。

[0066] 结论

[0067] RA-FLS中TSP-1、TGF- β 1、CTGF和VEGF表达呈系统性升高, 并构成功能模块, 共同调控血管增殖, 在RA发病中发挥重要作用。As₂O₃通过阻断TSP-1-TGF- β 1-CTGF-VEGF (TTCV) 功能模块, 显著抑制RA-FLS和HDMECs共培养体系和CIA滑膜组织血管生成, 蕴含着治疗RA的巨大潜力。

[0068] 下面结合具体实施例对本发明的应用原理作进一步描述。

[0069] 实验方法

[0070] 1) 建立FLS与HDMECs共培养体系及给药

[0071] RA-FLS和NH-FLS分别加入10%FBS DMEM制成 4×10^5 个细胞/ml细胞悬液。加入或者不加入肿瘤坏死因子- α , 同时加入不同浓度As₂O₃ (0, 0.5 μ mol/L, 1.0 μ mol/L, 2.0 μ mol/L), 共培养48h后, 收集上清液离心去除细胞杂质。部分无细胞的上清液取出后立即用于接下来的Transwell实验和成管实验, 剩余上清液于-20℃冻存用于后续ELISA实验。收集共培养体系下层小室中FLS细胞, 并提取RNA用于进一步基因检测。

[0072] 2) 刺激实验

[0073] RA-FLS 85%满时应用胰蛋白酶-EDTA消化, 加入10%FBS DMEM制成 5×10^5 个细胞/ml细胞悬液, 加入6孔培养板, 过夜使细胞贴壁。次日换液为1%FBS DMEM, 加入重组人CTGF、TSP-1或TGF- β 1使其浓度分别达到500ng/ml、1000ng/ml或5ng/ml。刺激48h后收集FLS的RNA和含有蛋白的上清液分别进行real-time PCR (RT-PCR) 和western blot检测, 评估CTGF、TSP-1、TGF- β 1刺激结果。

[0074] 3) 干扰实验

[0075] 通过向RA-FLS中转染TSP-1、TGF- β 1、CTGF的特异小干扰RNA (siRNA) 来进行TSP-1、TGF- β 1、CTGF干扰实验。

[0076] 4) RNA提取及实时定量PCR检测

[0077] 滑膜细胞RNA抽提, RNA的逆转录, Real-time PCR扩增

[0078] 5) ELISA检测

[0079] ELISA方法检测细胞上清液中CTGF、TGF- β 1、TSP-1、VEGF浓度

[0080] 6) Transwell实验

[0081] 在24孔培养板中加入上清液600 μ L/孔, 将上层小室放入下层上清液中。胰蛋白酶-EDTA消化HDMECs, 并将HDMECs用无血清DMEM制成细胞悬液。取200 μ L HDMECs细胞悬液加入上层小室中并孵育。取出小室, 用棉签擦去膜上层表面未迁移过去的细胞, 甲醇固定, 结晶紫染色, 显微镜100 \times 放大倍数下观察拍照, 计数穿膜细胞数, 从而进行量化。

[0082] 7) Matrigel成管实验

[0083] 预先冷却加样枪头和96孔培养板,Matrigel胶冰上溶化后,在96孔培养板上每孔加入50μL,5%CO₂、37℃湿润环境中放置30min使其凝固。取出96孔培养板,每孔加入50μL前述新鲜上清液。用无血清DMEM制成HDMECs细胞。96孔培养板上每孔加100μL HDMECs细胞悬液。孵育6h后应用相差显微镜对内皮细胞成管观察。

[0084] 8) 动物实验

[0085] 本发明采用动物模型测试三氧化二砷抗血管增殖的有效性。

[0086] 胶原诱导性关节炎是类风湿关节炎的实验模型,该实验模型已经广泛用于许多种类风湿治疗药物的临床前测试。该模型的特点是对于强烈的、易测的多关节炎症,带有滑膜血管增殖以及明显骨破坏。此分析用来确定腹腔给药(1P)三氧化二砷的效果以及剂量反应,每天施用以用来抑制小鼠胶原诱导性关节炎发展过程中产生的炎症(足肿)、软骨损伤和骨再吸收。

[0087] 9) C1A小鼠模型造模过程简要叙述如下:

[0088] 牛11型胶原蛋白(C11)溶于0.05M乙酸至2mg/ml,加入等体积含有4mg/ml热杀死结核分枝杆菌H37Ra的完全弗氏佐剂(CFA)混合,充分研磨至混合物完全乳化,以乳化物滴入水中不松散为度(冰浴中操作),在每只DBA/1J小鼠尾根部皮内注射含有100μg C11的100μL乳化液进行首次免疫。首次免疫后第21天小鼠进行加强免疫,即注射与等体积不完全弗氏佐剂(IFA)乳化后的C11100μg。有6只小鼠作为正常对照组未诱导关节炎。

[0089] 首次免疫后21天,小鼠被分为以下6组(每组6只):I组:正常对照组;II组:C1A模型对照组;III组:As₂O₃1.0mg/kg/day治疗组;IV组:As₂O₃2.0mg/kg/day治疗组;V组:As₂O₃5.0mg/kg/day治疗组;VI组:MTX1.5mg/kg/week治疗组。从首次免疫后第26天至39天C1A小鼠腹腔内给药As₂O₃及MTX。正常组和模型组小鼠给予等体积磷酸盐缓冲盐水(PBS)。治疗期间每日监测小鼠的毛色、体重、进食情况。第40天,宰杀所有小鼠进行后续实验。

[0090] 从首次免疫后第19天开始每日对关节炎临床症状进行评估,每3日对关节进行评分直至实验结束。为了量化关节炎严重程度,本发明引用了已有报道的评分系统。依据病变严重程度通过视觉观察肢体来评定,由两名独立的观察者完成评分,每个肢体按照炎症程度分0-4分,评分标准如下:

[0091] 0分=无红斑及肿胀;

[0092] 1分=红斑及轻度肿胀,局限于跗骨或踝关节,踝关节有一定的发红和肿胀,或在个别足趾出现发红和肿胀;

[0093] 2分=红斑及轻度肿胀,从踝关节延伸到跗骨,踝关节出现中度红斑及肿胀;

[0094] 3分=红斑及中度肿胀,从踝关节延伸到跖关节;

[0095] 4分=红斑及严重肿胀,包围了踝关节、足及足趾,或者关节强直。

[0096] 将每只小鼠的四个肢体分别评定,评分之和为关节评分,每只动物最高分为16分,评分大于4分可诊断为关节炎。小鼠宰杀后,HE染色进行组织学评估,免疫组化染色评估微血管密度等重要指标。

[0097] 组织学分析

[0098] HE染色

[0099] 充分脱钙后,脱水,石蜡包埋膝关节制成蜡块,切片厚度为5μm,进行苏木精-伊红

(hematoxylin-eosin staining,HE)染色。

[0100] HE染色染色步骤如下：

[0101] 1) 二甲苯脱蜡,梯度酒精水化。

[0102] 2) 放入苏木精水溶液中染色。

[0103] 3) 酸水及氨水中分色,各数秒钟。

[0104] 4) 流水冲洗1h后入蒸馏水片刻。

[0105] 5) 入70%和90%酒精中脱水各10min。

[0106] 6) 入酒精伊红染色液染色2-3min。

[0107] 7) 脱水透明:染色后的切片经纯酒精脱水,再经二甲苯使切片透明。

[0108] 8) 将切片滴上树胶,盖上盖玻片,标记,保存。

[0109] 关节炎组织学评估

[0110] 定量评估关节炎的严重程度,由两个观察员以盲评的方式根据细胞浸润、软骨破坏和骨侵蚀参数,参照已有标准进行评分^[147]。

[0111] 评分标准如下:

[0112] 0=正常关节结构;

[0113] 1=轻度改变,轻度滑膜炎、血管翳及散在的软骨灶性侵蚀;

[0114] 2=中度改变,软骨大面积缺损,血管翳侵蚀,滑膜增生和炎性细胞浸润;

[0115] 3=重度滑膜炎,软骨和骨侵蚀,关节结构破坏。

[0116] 免疫组化分析

[0117] 取C1A小鼠膝关节蜡块进行免疫组化染色,具体步骤如下:

[0118] 1) 二甲苯对膝关节切片进行脱蜡。

[0119] 2) 梯度酒精水化。

[0120] 3) 常温下,3%H₂O₂阻断内源性过氧化物酶的活性。

[0121] 4) 在柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)中孵育使抗原暴露。

[0122] 5) 10%山羊血清37℃封闭1小时。

[0123] 6) 分别用抗TSP-1、TGF-β1、CTGF、VEGF、vWF抗体在室温下孵育120min。

[0124] 7) 辣根酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白聚合物室温孵育60min。

[0125] 8) DAB底物液1mL与DAB浓缩液1滴(约50μL)充分混合,加至玻片标本上显色。

[0126] 9) 观察到棕黄色染色后(7-10min),停止显色,洗片,苏木素复染,盐水酒精分化,氨水返蓝,梯度酒精水化。

[0127] 10) 封片。

[0128] 棕黄色染色为阳性染色位置。兔抗鼠vWF被用来识别血管内皮。免疫染色后,在显微镜下对各个切片上关节滑膜组织进行观察评估,显微镜200×放大倍数下观察取3个随机视野,由两个不同的观察员计数阳性细胞数与总细胞数,得到各自均值,得出阳性细胞数与总细胞数的比值。在上述相同区域进行vWF染色阳性的微血管计数。

[0129] 下面结合实验结果对本发明作进一步描述。

[0130] 一、RA-FLS中TSP-1、TGF-β1、CTGF、VEGF过表达并具有促血管增殖活性。体外实验,正常人关节滑膜成纤维细胞(NH-FLS)与类风湿关节炎患者关节滑膜成纤维细胞(RA-FLS)分别与人微血管内皮细胞(HDMECs)共培养,A.与NH-FLS共培养体系相比,RA-FLS共培养体

系上清液中TSP-1-TGF- β 1-CTGF-VEGF功能模块成员蛋白表达明显升高；B，与共培养的NH-FLS相比，共培养的RA-FLS中TSP-1-TGF- β 1-CTGF-VEGF功能模块成员mRNA表达明显升高；C. 与NH-FLS共培养体系相比，RA-FLS共培养体系上清液因TSP-1-TGF- β 1-CTGF-VEGF功能模块过表达而导致内皮细胞血管生成能力明显增强。

[0131] 二、As₂O₃可抑制RA-FLS中TSP-1-TGF- β 1-CTGF-VEGF功能模块过表达从而抑制血管增殖。

[0132] 细胞及功能实验

[0133] 为了模仿RA滑膜组织的微环境，本发明通过Transwell装置建立了RA-FLS与HDMECs共培养体系，同时加入TNF- α 来模仿RA滑膜炎症环境。药物处理：向RA-FLS与HDMECs共培养体系中加入或者不加入肿瘤坏死因子- α (TNF- α ；100ng/ml)，同时加入不同浓度As₂O₃ (0, 0.5 μ mol/L, 1.0 μ mol/L, 2.0 μ mol/L)。ELISA法检测共培养上清液中TSP-1、TGF- β 1、CTGF和VEGF蛋白表达情况。RT-PCR检测共培养的RA-FLS中TSP-1、TGF- β 1、CTGF和VEGF mRNA表达情况。收集上述加药后新鲜共培养上清液分别进行长达6h的Transwell实验和Matrigel成管实验，进一步检测共培养上清液对HDMECs血管生成能力的影响。

[0134] 结果如图1显示，TNF- α 可诱导上清液中TSP-1、TGF- β 1、CTGF和VEGF蛋白表达，而As₂O₃在1.0 μ mol/L或大于1.0 μ mol/L的浓度时可显著抑制TSP-1、TGF- β 1、CTGF和VEGF的分泌，并呈浓度依赖性，且与是否给予TNF- α 无关。RT-PCR检测共培养的RA-FLS中TSP-1、TGF- β 1、CTGF、VEGF mRNA表达情况与上清液中蛋白表达变化趋势一致。因为共培养上清中TSP-1-TGF- β 1-CTGF-VEGF功能模块受到抑制，本发明进行Transwell实验和成管实验进一步检测在共培养上清液影响下，As₂O₃对HDMECs血管生成能力的作用。

[0135] 三、As₂O₃抑制胶原诱导性关节炎的进展。

[0136] 本发明从首次免疫后25天到39天进行了As₂O₃治疗，并从19天开始应用已建立的关节评分系统对关节炎严重程度进行了评估。小鼠As₂O₃给药剂量为1.0, 2.0, 5.0mg/kg/d。本分析中，本发明没有观察到应用As₂O₃后任何明显的毒性或致死作用。C11免疫后，小鼠的关节炎进展迅速，并表现出明显的临床症状。MTX 1.5mg/kg/week组作为治疗阳性对照，表现出较强的抑制关节炎进展的作用。虽然As₂O₃1.0mg/kg/day治疗对CIA小鼠抑制作用很弱，2.0mg/kg/day和5.0mg/kg/day As₂O₃可从25天到39天持续显著减少关节炎指数，模型对照组和As₂O₃5.0mg/kg/day治疗组在给药后的第1、7、14天典型的小鼠爪部照片。As₂O₃治疗组关节症状及评分较CIA模型对照组显著改善，尤其As₂O₃2.0mg/kg/day治疗组和As₂O₃5.0mg/kg/day治疗组。

[0137] 四、As₂O₃改善CIA小鼠关节滑膜的组织学变化。

[0138] 为了证实As₂O₃的保护作用，本发明进一步通过膝关节组织学切片HE染色评估CIA小鼠As₂O₃给药后关节炎的严重程度。结果显示，与改善关节症状的趋势相一致，As₂O₃及MTX治疗组的炎症、软骨和骨破坏均明显减少。As₂O₃治疗组，小鼠关节破坏程度呈剂量依赖性减弱，且特别适用于As₂O₃2.0mg/kg/day和5.0mg/kg/day治疗组。事实上，As₂O₃5.0mg/kg/day治疗组与MTX 1.5mg/kg/week治疗组在滑膜组织学上的改变相似。

[0139] 五、As₂O₃抑制模型鼠关节滑膜组织系统性上调的TSP-1-TGF- β 1-CTGF-VEGF (TTCV) 功能模块及血管增殖。

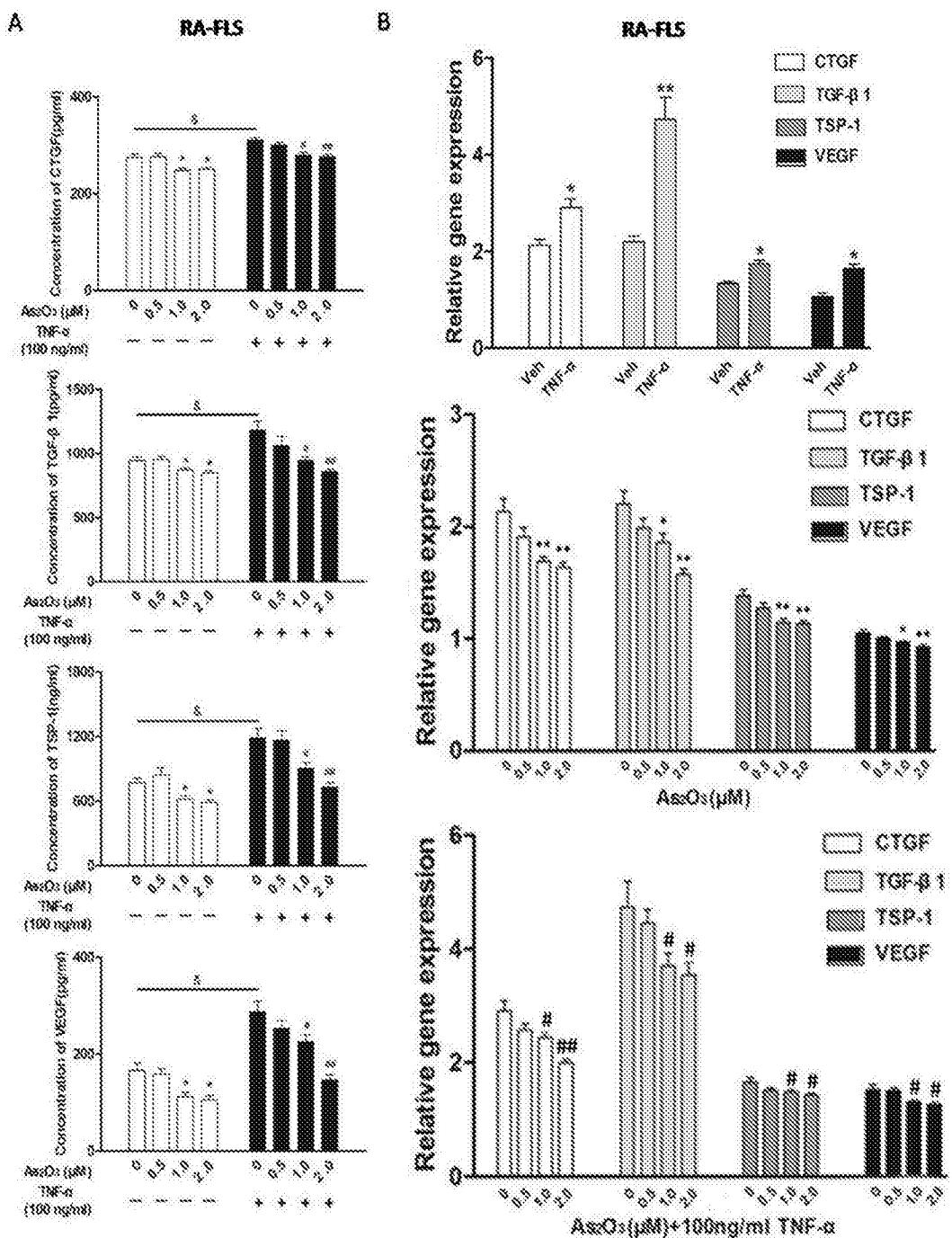
[0140] 通过免疫组化染色来分析As₂O₃给药后TSP-1、TGF- β 1、CTGF、VEGF在关节滑膜组织

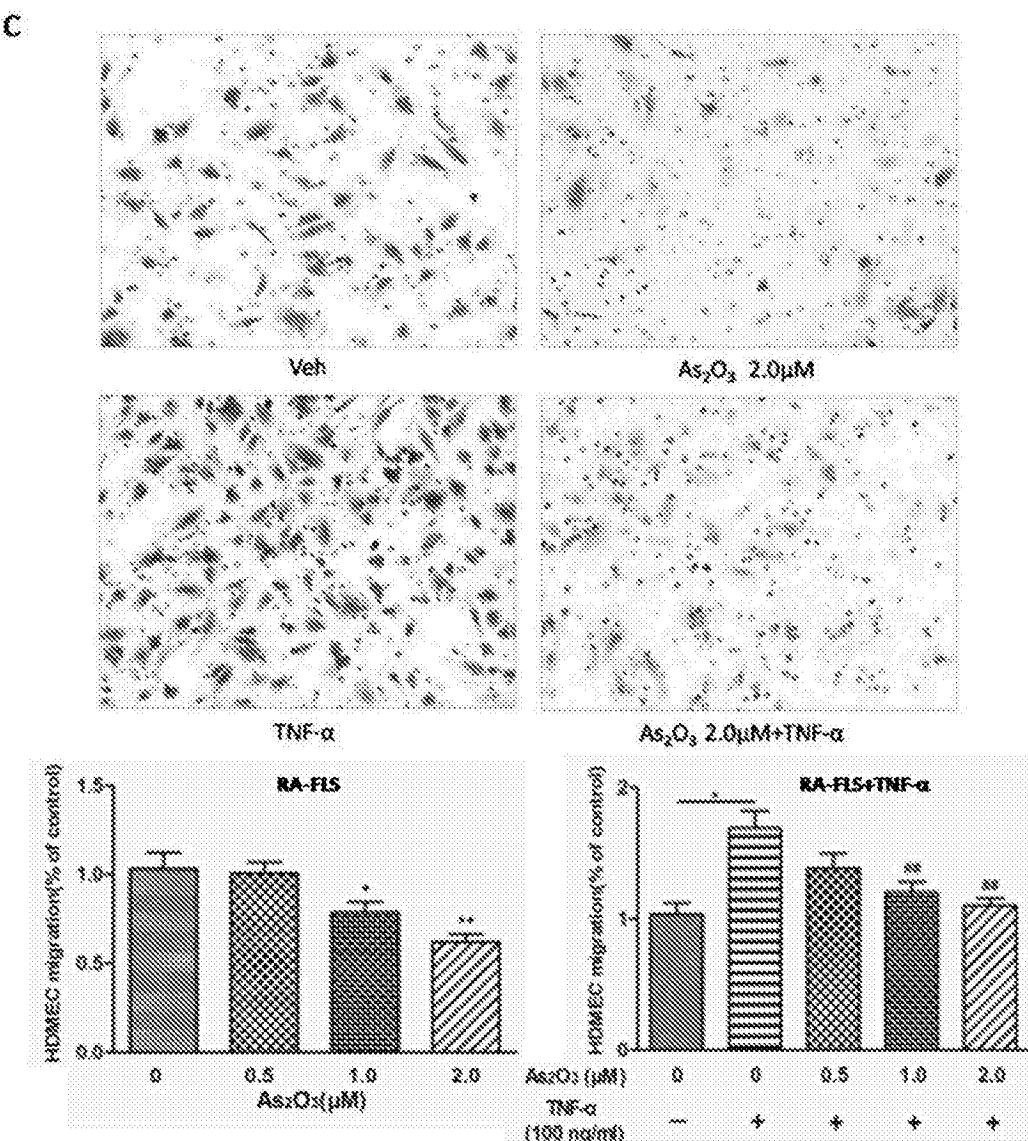
中的表达情况,以及滑膜组织中微血管生成情况。结果显示,C1A小鼠关节滑膜组织中TSP-1、TGF- β 1、CTGF、VEGF的染色强度在As₂O₃治疗组显著降低。而且,在As₂O₃5mg/kg/d治疗组以及MTX 1.5mg/kg/week治疗组几乎未检测到TSP-1、TGF- β 1、CTGF和VEGF染色。

[0141] 最后,通过免疫组化标记vWF来测量微血管密度(MVD),从而评估As₂O₃给药后C1A小鼠滑膜组织血管生成情况,As₂O₃相关的抗血管生成作用也使用此方法来证实。结果显示,MVD在As₂O₃治疗组明显减少,并呈剂量依赖性,尤其见于As₂O₃2mg/kg/day和5mg/kg/day治疗组。这些结果说明,As₂O₃可能通过抑制TSP-1-TGF- β 1-CTGF-VEGF功能模块来发挥抗RA滑膜组织血管增殖作用,从而达到治疗RA的目的。

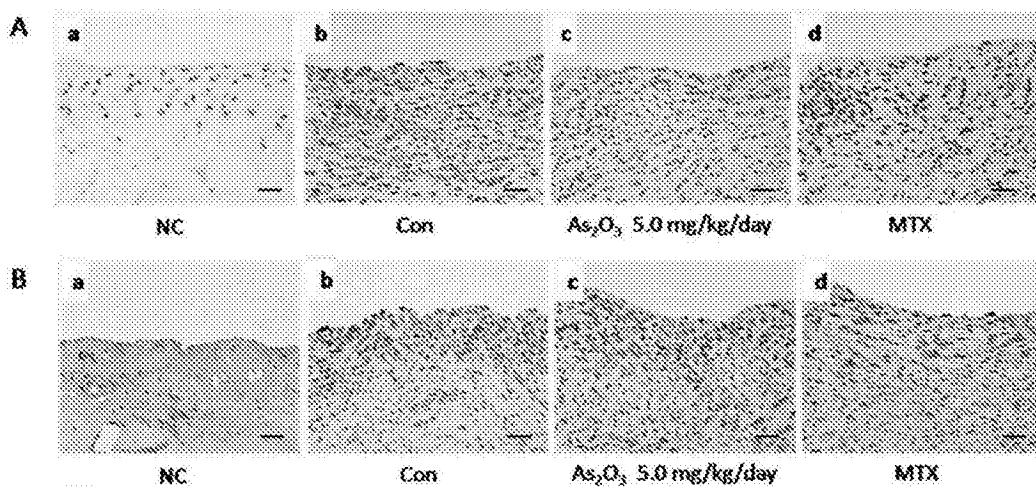
[0142] 此结论可如图2简要概括。活体实验,A-D分别提示,与正常小鼠关节滑膜组织相比,类风湿关节炎C1A模型鼠关节滑膜组织中TSP-1-TGF- β 1-CTGF-VEGF功能模块四个成员均过表达,给予三氧化二砷治疗后,TSP-1-TGF- β 1-CTGF-VEGF功能模块明显下调,且其疗效与MTX相近。

[0143] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。





冬 1



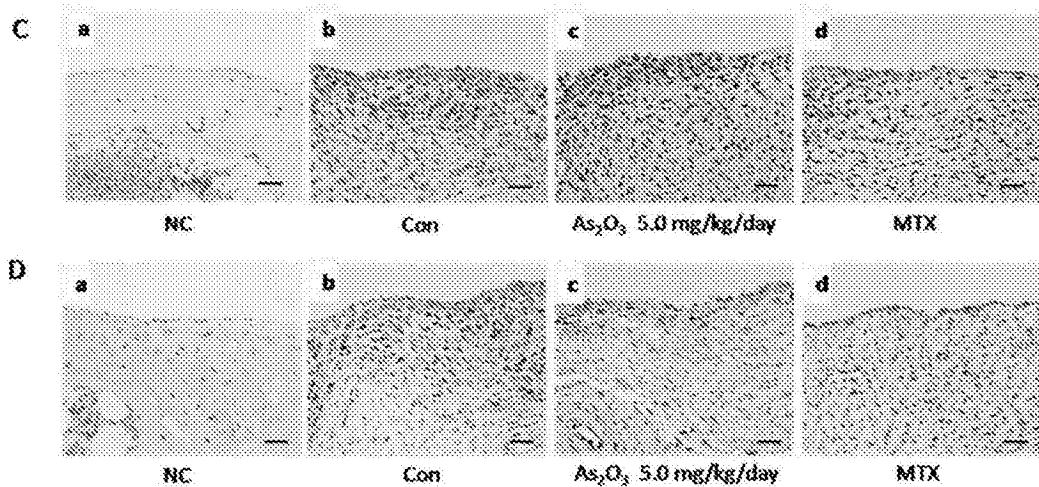


图2

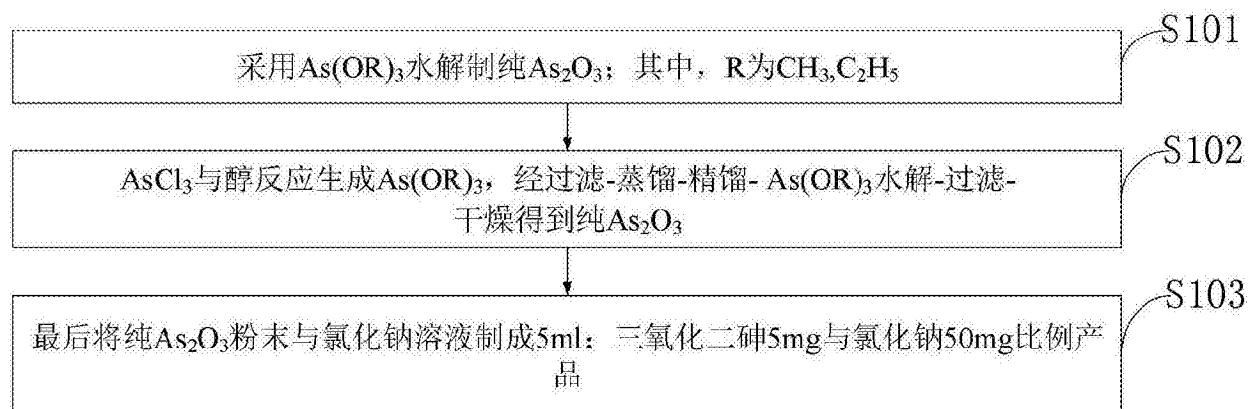


图3

专利名称(译)	一种用于治疗血管生成介导疾病的药物及应用		
公开(公告)号	CN107982278A	公开(公告)日	2018-05-04
申请号	CN201711351091.3	申请日	2017-12-15
[标]申请(专利权)人(译)	哈尔滨医科大学		
申请(专利权)人(译)	哈尔滨医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	哈尔滨医科大学		
[标]发明人	张志毅 张跃 张娟 孙佳莹 郑一宁 梅轶芳		
发明人	张志毅 张跃 张娟 孙佳莹 郑一宁 梅轶芳		
IPC分类号	A61K33/36 A61K9/08 A61K47/02 A61P19/02 C12Q1/02 C12Q1/6883 G01N33/53 G01N33/50		
CPC分类号	A61K33/36 A61K9/08 A61K47/02 C12N2503/02 C12Q1/6883 C12Q2600/158 G01N33/5038 G01N33/5044 G01N33/5088 G01N33/53 G01N2500/10		
代理人(译)	赵红霞		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明属于医药学技术领域，公开了一种用于治疗血管生成介导疾病的药物及应用，提供一种利用三氧化二砷制备的用于治疗血管生成介导疾病的药物；评估用于治疗血管生成介导疾病的药物疗效的方法包括：评估三氧化二砷对关节病变滑膜细胞TSP-1-TGF- β -CTGF-VEGF血管增殖功能模块的抑制作用；评估三氧化二砷通过抑制TSP-1-TGF- β -CTGF-VEGF血管增殖功能模块进而对病变关节中微血管内皮细胞增殖的抑制作用。本发明的三氧化二砷可通过抑制TSP-1-TGF- β -CTGF-VEGF功能模块，进而抑制血管增殖，发挥治疗血管增殖性疾病的目。

