

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 31/167 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710172980.3

[43] 公开日 2008 年 7 月 30 日

[11] 公开号 CN 101229147A

[22] 申请日 2007.12.24

[21] 申请号 200710172980.3

[71] 申请人 复旦大学

地址 200433 上海市邯郸路 220 号

[72] 发明人 张锦生 钱瑾 朱虹光

[74] 专利代理机构 上海正旦专利代理有限公司

代理人 吴桂琴

权利要求书 1 页 说明书 5 页

[54] 发明名称

N-4-羟苯视黄酰胺在制备抗肝纤维化药物中的用途

[57] 摘要

本发明属药物领域，涉及 N-4-羟苯视黄酰胺在制备抗肝纤维化药物中的用途。本发明对 N-4-羟苯视黄酰胺进行了体外细胞实验，结果显示，低剂量的 4-HPR 能诱导肝纤维化过程中产生细胞外基质的主要细胞—肝星状细胞发生凋亡；采用四氯化碳诱导的小鼠肝纤维化模型进行体内实验，分别进行预防或治疗干预，结果表明，4-HPR 具有抗肝纤维化的药理作用，证实 4-HPR 对肝纤维化有明显的干预作用，而且无明显加重肝功能异常的副作用。证实了 N-4-羟苯视黄酰胺新的防治慢性肝病肝纤维化的医疗用途，可进一步制成注射制剂、缓释剂或口服制剂，使用方便，有推广价值。

- 1、N-4-羟苯视黄酰胺在制备抗肝纤维化药物中的用途。
- 2、按权利要求 1 所述的用途，其中所述的用途是预防性或治疗性干预。
- 3、按权利要求 2 所述的用途，其中所述的预防性或治疗性干预呈剂量依赖性。
- 4、一种预防或治疗肝纤维化的药物，其特征是含权利要求 1 所述的 N-4-羟苯视黄酰胺。
- 5 按权利要求 4 所述的预防或治疗肝纤维化的药物，其特征是制成注射制剂、缓释剂或口服制剂。

N-4-羟苯视黄酰胺在制备抗肝纤维化药物中的用途

技术领域

本发明属药物领域，涉及 N-4-羟苯视黄酰胺新的药用用途，具体涉及 N-4-羟苯视黄酰胺在制备抗肝纤维化药物中的用途。

背景技术

N-4-羟苯视黄酰胺 [N-4-(hydroxyphenyl)retinamide]，简称 4-HPR(fenretinide)，为一种人工合成视黄酸衍生物，目前主要作为肿瘤化疗药物，用于多种肿瘤的治疗，包括白血病、乳腺癌、前列腺癌、膀胱癌、皮肤癌、头颈部的肿瘤。而且其对人体毒性较小，无肝脏毒性。

研究表明，N-4-羟苯视黄酰胺（4-HPR）抗肿瘤的机制在于诱导肿瘤细胞发生凋亡，4-HPR 对其它细胞是否有诱导凋亡的作用是个未知数。

肝纤维化是指肝组织学上有广泛的纤维结缔组织增生、沉积；肝星状细胞（HSC）是肝纤维化病变过程中胶原等细胞外基质的主要生成细胞，抑制 HSC 的活化与增殖是目前开发研究肝纤维化治疗药物的主要靶目标，现有技术不断有报道针对肝脏纤维结缔组织增生制备的肝纤维化的中药制剂。有关该领域已将肝纤维化的逆转、抑制 HSC 活化与增殖以及生成、分泌胶原等细胞外基质，提高间质性胶原酶活性作为研究开发肝纤维化治疗药物的重要目标之一。

目前，有关抗肝纤维化的有效的化学药物报道尚未多见。

发明内容

本发明的目的是提供 N-4-羟苯视黄酰胺新的药用用途，具体涉及 N-4-羟苯视黄酰胺在制备抗肝纤维化药物中的用途。

本发明对 N-4-羟苯视黄酰胺（简称 4-HPR(fenretinide)），进行了体外细胞实验，结果显示，很低剂量的 4-HPR 就能诱导肝纤维化过程中产生细胞外基质的主要细胞—肝星状细胞发生凋亡，而对肝细胞，则需要很高的剂量才可诱导凋亡，两者相差十倍。进一步采用 N-4-羟苯视黄酰胺进行动物体内实验，采用四氯化碳诱导的小鼠肝纤维化模型，分别在肝纤维化建模的第 1 周（预防）和第 5 周（治

疗)用 4-HPR 进行干预。测得肝组织内胶原蛋白含量(肝组织切片天狼猩红染色结合图象分析技术半定量)的变化,肝组织羟脯氨酸含量的变化及血清谷丙转氨酶(ALT)、血清白蛋白(ALB)和球蛋白(GLO)的变化,结果表明,4-HPR 具有抗肝纤维化的药理作用,证实 4-HPR 对肝纤维化有明显的干预作用,而且无明显加重肝功能异常的副作用。

所述的 4-HPR 购自美国国立癌症研究院(NCI)肿瘤预防研究所。

本发明经实验证实了 N-4-羟苯视黄酰胺新的防治慢性肝病肝纤维化的医疗用途,所述的 N-4-羟苯视黄酰胺可制成注射制剂、缓释剂或口服制剂,使用方便。有推广价值。

具体实施方式

实施例 1

一、体内实验:清洁级 BALB/c 雄性小鼠(中国科学院上海实验动物部),体重 18-20g,随机分为以下几组:正常对照组(n=10)、正常小鼠 37.5mg/kgBW 用药组(n=11)、正常小鼠 112.5 mg/kgBW 用药组(n=11)、肝纤维化模型组(n=12)、肝纤维化模型+溶剂干预组(n=12)、预防性干预作用又分:低剂量(12.5 mg/kgBW)组(n=14)、中剂量(37.5 mg/kgBW)组(n=15)、高剂量(112.5 mg/kgBW)组(n=11);治疗性干预作用又分:低剂量(12.5 mg/kgBW)组(n=14)、中剂量(37.5 mg/kgBW)组(n=15)、高剂量(112.5 mg/kgBW)组(n=13)。正常对照组用生理盐水代替四氯化碳及 4-HPR;肝纤维化模型组用 25%四氯化碳橄榄油溶液以 5 ml/kgBW 的剂量进行腹腔注射,每周二次,共 10 周;溶剂采用含 1.65mg/ml 牛血清白蛋白的生理盐水制备 5%乙醇溶液,预防性干预均从实验第 1 周开始用药,均腹腔注射,每周 4 次,共 10 周;治疗性干预从实验第 5 周开始用药,方法同上,至实验结束的第 10 周为止。实验结束后,小鼠在乙醚麻醉下眼球后血管采血,用于肝功能指标:血清 ALT、ALB、及 GLO 的生化测定。继而处死,准确称取 0.5 g 肝组织两份,液氮速冻后-70℃保存,用于羟脯氨酸(hydroxyproline, Hyp)含量测定;部分肝组织置于 10%中性福尔马林固定后,常规酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋,切成 5 μ m 连续切片,用于 HE 和天狼猩红染色,后者染色结果在 Axiophot-2 数码图象分析仪(Zeiss)上,用随机分析软件 KS400 进行相对定量。

二、实验结果

1. 肝组织内胶原蛋白的变化:

天狼猩红可特异地与组织内胶原蛋白反应而染成猩红色，在偏振光下，还可大致区分 I 型和 III 型胶原，因此肝脏组织切片经天狼猩红染色后进行图象分析可以对组织内胶原含量进行半定量。各组小鼠肝组织内胶原蛋白含量变化如表 1 所示。正常小鼠单用不同剂量 4-HPR 后，肝内胶原蛋白含量与正常小鼠无差别，说明 4-HPR 不会增加正常肝脏胶原蛋白含量。四氯化碳诱导肝纤维化的小鼠肝脏胶原蛋白明显增加，说明肝纤维化模型建立成功。

统计处理结果是：纯粹使用溶剂与模型组相比，无统计学显著性意义，说明溶剂对肝纤维化无干预作用；而无论是预防性还是治疗性干预，4-HPR 均能明显降低肝纤维化小鼠肝脏内胶原的含量：中剂量时平均降低 66%，且呈现剂量依赖性。

表 1.是各组小鼠肝脏胶原蛋白及羟脯氨酸含量。

表 1

	天狼猩红染色阳性面积 (%)	羟脯氨酸含量 (μ g/mg 蛋白)
正常对照组 (n=10) 正常小鼠	0.53 \pm 0.13	0.095 \pm 0.035
37.5mg/kgBW 用药组 (n=11) 正常小鼠	0.68 \pm 0.13	0.118 \pm 0.035
112.5 mg/kgBW 用药组(n=11) 肝纤维化模型组 (n=12)	0.56 \pm 0.13	0.125 \pm 0.031
溶剂干预组 (n=12)	6.33 \pm 1.73*	0.408 \pm 0.059*
4-HPR 预防性干预:	6.15 \pm 1.09*	0.404 \pm 0.093*
低剂量组 (n=14)	3.18 \pm 0.72*▲	0.363 \pm 0.061*▲
中剂量组 (n=15)	2.05 \pm 0.81*▲	0.248 \pm 0.058*▲
高剂量组 (n=11)	2.12 \pm 0.71*▲	0.275 \pm 0.057*▲
4-HPR 治疗性干预:		
低剂量组 (n=14)	3.24 \pm 0.93*▲	0.306 \pm 0.057*▲
中剂量组 (n=15)	2.20 \pm 0.95*▲	0.244 \pm 0.062*▲
高剂量组 (n=13)	1.90 \pm 0.82*▲	0.247 \pm 0.066*▲

*与正常对照组比较, $p < 0.05$; ▲与肝纤维化模型组比较, $p < 0.05$

2. 肝组织羟脯氨酸含量的变化

羟脯氨酸是胶原蛋白特有的氨基酸，与胶原分子内交联有关，故羟脯氨酸含量可以间接反映胶原蛋白的含量。用生化方法测得的各组小鼠肝脏内羟脯氨酸的含量见表1。正常小鼠单用不同剂量4-HPR后，肝内羟脯氨酸含量与正常小鼠无差别，说明4-HPR不会增加正常肝脏胶原蛋白含量。四氯化碳诱导肝纤维化的小鼠肝脏羟脯氨酸含量明显增加，说明肝脏内胶原含量明显增多，肝纤维化模型建立成功。纯粹使用溶剂与模型组相比，羟脯氨酸含量无统计学显著性意义，说明溶剂对肝纤维化无干预作用。而无论是预防性还是治疗性干预，4-HPR均能明显降低肝纤维化小鼠肝脏内羟脯氨酸的含量：中剂量时平均降低39.7%，且呈现剂量依赖性。从另一个方面证实4-HPR的确可以明显减轻肝纤维化。

3. 血清ALT、ALB、及GLO的变化

各组小鼠血清ALT、ALB和GLO的测定结果如表2所示。和正常小鼠比，肝纤维化组小鼠血清ALT有升高，但统计学无显著性意义，使用4-HPR的各组血清ALT与对照组比统计学上也无显著性意义。说明长期使用4-HPR对肝细胞无明显损伤。但使用高剂量4-HPR后，与模型组相比血清白蛋白水平有所下降，大量使用该药时可能会影响肝脏中白蛋白代谢。

表2.是各组小鼠血清肝功能测定结果。

表2.

	ALB(g/L)	GLO(g/L)	A/G	ALT(μ /ml)
正常对照组(n=10)	31.45 \pm 1.70	25.71 \pm 1.59	1.23 \pm 0.08	93.31 \pm 36.75
肝纤维化模型组(n=12)	33.63 \pm 1.60	22.71 \pm 1.71	1.49 \pm 0.09*	175.98 \pm 68.07
溶剂干预组(n=12)	29.87 \pm 4.29	23.88 \pm 2.91	1.25 \pm 0.08	121.78 \pm 33.18
预防性 HPR 干预低剂量组 12.(n=14)	29.53 \pm 2.36	25.33 \pm 2.88	1.17 \pm 0.10	103.54 \pm 44.70
预防性 HPR 干预中剂量组(n=15)	27.98 \pm 2.94	24.53 \pm 2.78	1.15 \pm 0.11	107.61 \pm 33.60
预防性 HPR 干预高剂量组(n=11)	26.35 \pm 1.57*	24.10 \pm 2.28	1.10 \pm 0.10	110.47 \pm 38.83
治疗性 HPR 干预低剂量组(n=14)	30.32 \pm 2.13	24.51 \pm 2.31	1.24 \pm 0.10	138.74 \pm 50.44
治疗性 HPR 干预中剂量组(n=14)	27.21 \pm 3.26	26.47 \pm 3.21	1.04 \pm 0.12	113.54 \pm 49.97
治疗性 HPR 干预高剂量组(n=13)	25.85 \pm 2.50*	25.88 \pm 2.18	1.00 \pm 0.10	117.95 \pm 40.56

*与正常对照组相比， $p < 0.05$

本发明经动物实验，结果证实：N-4-羟苯视黄酰胺（4-HPR）对四氯化碳所致的肝纤维化有明显的干预作用。同时无明显加重肝功能异常的副作用。