(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
2024 年 6 月 20 日 (20.06.2024)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2024/125540 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 31/737 (2006.01) *A61P 11/00* (2006.01)
A61K 36/03 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/138342

(22) 国际申请日: 2023 年 12 月 13 日 (13.12.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202211624541.2 2022年12月16日 (16.12.2022) CN

(71) 申请人: 中国科学院上海药物研究所(**SHANGHAI INSTITUTE OF MATERIA MEDICA, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES**) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区张江祖冲之路 555 号, Shanghai 201203 (CN)。

(72) 发明人: 丁侃(**DING, Kan**); 中国上海市浦东新区张江祖冲之路555号, Shanghai 201203 (CN)。 李佳(**LI, Jia**); 中国上海市浦东新区张江祖冲之路555号, Shanghai 201203 (CN)。 臧奕(**ZANG, Yi**); 中国上海市浦东新区张江祖冲之路555号, Shanghai 201203 (CN)。 李赛娟(**LI, Saijuan**); 中国上海市浦东新区张江祖冲之路555号, Shanghai 201203 (CN)。 朱安明(**ZHU, Anming**); 中国上海市浦东新区张江祖冲之路555号, Shanghai 201203 (CN)。

(74) 代理人: 北京金信知识产权代理有限公司(**KINGSOUND & PARTNERS**); 中国北京市海淀区紫竹院路 116 号嘉豪国际中心 B 座 11层, Beijing 100097 (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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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)。

(54) **Title:** SEAWEED-DERIVED SULPHATED POLYSACCHARIDE, PREPARATION METHOD THEREFOR, AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 海藻硫酸多糖及其制备方法和用途

(57) **Abstract:** The present invention belongs to the technical field of polysaccharides, and particularly relates to a seaweed-derived sulphated polysaccharide, a preparation method therefor, and use thereof. The seaweed-derived sulphated polysaccharide SPW-05-S2 comprises 62%-70% of polysaccharide, 27%-32% of acidophobe, 0.5%-1.5% of acetyl, and 2.0%-4.5% of protein, and has a weight-average molecular weight of 121.77 kDa. The composition of the polysaccharide mainly comprises mannose, glucuronic acid, galactose, xylose, and fucose. In-vivo experiments demonstrate that the polysaccharide can reduce pulmonary fibrosis induced by bleomycin, including recovering the lung tissue morphology, reducing a lung coefficient, and reducing animal lung injury and the expression of a fibrosis phenotype-related protein. Moreover, the seaweed-derived sulphated polysaccharide does not affect cell growth activity in vitro, and can significantly inhibit the expression of the fibrosis-related protein. Therefore, the polysaccharide has a potential effect of relieving lung injury, and is expected to be a candidate carbohydrate drug for treating pulmonary fibrosis.

(57) 摘要: 属于多糖技术领域，具体涉及一种海藻硫酸多糖及其制备方法和用途。所述海藻硫酸多糖SPW-05-S2包含多糖62%～70%、硫酸基27%～32%、乙酰基0.5%～1.5%以及蛋白2.0%～4.5%，其重均分子量为121.77kDa；所述多糖的组成主要有甘露糖，葡萄糖醛酸，半乳糖，木糖和岩藻糖。经体内实验证明，该多糖能够降低博莱霉素诱导的肺纤维化，包括恢复肺组织形态，降低肺系数，减少动物肺损伤和纤维化表型相关蛋白的表达。并且在体外对细胞生长活力没有影响，能显著抑制纤维化相关蛋白的表达。因此，所述多糖具有潜在缓解肺损伤的作用，有望成为一种治疗肺纤维化的候选糖类药物。

WO 2024/125540 A1

[见续页]

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

海藻硫酸多糖及其制备方法和用途

技术领域

本发明属于多糖技术领域，具体涉及一种海藻硫酸多糖、其制备方法及在制备抗肺纤维化药物中的用途。

背景技术

肺纤维化（Pulmonary fibrosis）的特征是肺间质内细胞外基质过度沉积和正常实质结构的破坏，导致肺功能进行性丧失。各种因素促成肺纤维化的发展，如成纤维细胞的异常增殖、肌成纤维细胞的异常表达、肺泡上皮或内皮的损伤、组织的异常修复、伤口愈合途径的失调以及细胞外基质生成过多和累积。肺纤维化病因和发病机制未明，严重影响患者的生存和生活质量，为患者家庭以及社会带来沉重负担，是一种慢性进行性的、致命的肺部疾病。因此，找到一种可有效治疗肺纤维化的药物具有重要的临床意义。

中药海藻，属马尾藻科植物海蒿子 *Sargassum pallidum* (Turn.) C. Ag 或羊栖菜 *Sargassum fusiforme* (Harv.) Setch. 的干燥藻体。前者习称“大叶海藻”，后者习称“小叶海藻”。海蒿子分布于辽宁、山东的黄海和渤海沿岸。羊栖菜分布于辽宁、山东、福建、浙江、广东等地沿海。海藻具有清热解毒、消痰软坚散结，利水消肿之功效，常用于瘿瘤，瘰疬、睾丸肿痛，痰饮水肿。海藻中含有丰富的多糖，占海藻干重的 50%以上。多糖作为中药中的主要活性物质，在其生物活性的发挥中起着重要的作用。现代研究表明，海藻多糖具有多种生物活性，包括抗病毒、抗肿瘤、抗凝血、抗动脉硬化、抗突变、抗氧化和调节免疫活性等，从而引起较多研究者的关注。但中药中具有抗肺纤维化活性的天然多糖鲜有报道。

发明内容

本发明采用一种简单有效的硫酸多糖提取工艺和方法，以海藻（*Sargassum fusiforme*）为原料获得了一种含硫酸基的多糖（文中命名：SPW-05-S2）。体外实验表明 SPW-05-S2 可以改善肺泡上皮细胞纤维化表型；

并通过体内实验证明，该多糖可以在博莱霉素诱导的肺纤维化模型小鼠中减轻肺部损伤并减弱肺纤维化，有望开发成为一种抗肺纤维化的糖类药物。

本发明的目的之一在于提供一种海藻硫酸多糖。

本发明的目的之二在于提供一种所述海藻硫酸多糖的制备方法。

本发明的目的之三在于提供一种包含所述海藻硫酸多糖的药物组合物。

本发明的目的之四在于提供一种所述海藻硫酸多糖或包含所述海藻硫酸多糖的药物组合物在制备预防和/或治疗肺纤维化的药物中的用途。

为了实现本发明的上述目的，特采用以下技术方案：

本发明一方面，提供了一种海藻硫酸多糖（SPW-05-S2），包含重量百分含量为62%~70%（如63%、65%、67%、69%）的多糖，重量百分含量为27%~32%（如28%、29%、30%、31%）的硫酸基，重量百分含量为0.5%~1.5%（如0.7%、0.9%、1.1%、1.3%）的乙酰基，以及重量百分含量为2.0%~4.5%（如2.5%、3%、3.5%、4%）的蛋白（这里的重量百分含量以海藻硫酸多糖重量为基准计算）；

其中，所述多糖主要由甘露糖、葡萄糖醛酸、半乳糖、木糖和岩藻糖组成。

所述多糖的结构单元是以1→4连接的β-葡萄糖醛酸、1→2连接的α-甘露糖为主链，在α-甘露糖的C-6位和C-3位存在分支，分支由半乳糖（1, 3, 6-β-半乳糖、1, 6-β-半乳糖和末端-β-半乳糖）、木糖（1, 4-β-木糖和末端-β-木糖）和岩藻糖（1, 2-α-岩藻糖、1, 3-α-岩藻糖、1, 4-α-岩藻糖、1, 2, 4-α-岩藻糖和末端-α-岩藻糖）残基组成；

所述硫酸基主要取代在1, 2-α-岩藻糖的C-4位、1, 4-α-岩藻糖的C-2位、末端-β-半乳糖的C-4位以及部分末端-β-木糖的C-4位。

所述海藻硫酸多糖的重均分子量的范围为5-1000 kDa，优选为10-500 kDa，更优选为15-400 kDa。

优选地，所述甘露糖、葡萄糖醛酸、半乳糖、木糖和岩藻糖的摩尔比为10~15:1.5~4:22~32:5~9:40~60，优选为12.28:2.60:27.59:7.06:50.47。

在一些实施例中，所述海藻硫酸多糖SPW-05-S2含29.28%的硫酸基、66.4%的多糖、0.91%乙酰基及3.4%的蛋白，其重均分子量为121.77 kDa。

优选地，所述海藻硫酸多糖具有基本上如图1所示的高效凝胶渗透色谱（HPGPC）图。

优选地，所述海藻硫酸多糖具有基本上与图 2 中的主要伸缩振动吸收峰一致的红外图谱。在所述海藻硫酸多糖 SPW-05-S2 的红外图谱中，3308.69 cm^{-1} 为 O-H 伸缩振动吸收峰，2932.46 cm^{-1} 为 C-H 伸缩振动吸收峰，1217.11 cm^{-1} 处的强吸收峰为 O=S=O 的伸缩振动峰，1732.38 cm^{-1} 为羧基 C=O 伸缩振动，表明该多糖含有糖醛酸。

优选地，所述海藻硫酸多糖具有基本上与图 3 中的主要信号值一致的 ^{13}C NMR 谱。在所述海藻硫酸多糖的 ^{13}C NMR 谱中，δ 105.48-δ 104.08 信号归属于 1, 3, 6-β-半乳糖，1, 6-β-半乳糖，末端 β-半乳糖。δ 103.24 -δ 100.51 信号归属于 1, 2, 3-α-甘露糖/1, 2, 6-α-甘露糖、1, 4-β-木糖和末端-β-木糖及 1, 4-β-葡萄糖醛酸。δ 99.69-δ 97.44 归属于 1, 2-α-岩藻糖，1, 4-α-岩藻糖，1, 2, 4-α-岩藻糖和末端-α-岩藻糖。δ 93.44 归属于 1, 3-α-岩藻糖。δ 175.02 信号归属于 1, 4-β-葡萄糖醛酸羧基碳的信号峰。δ 39.47 及 δ 21.83 的信号表明该多糖含有乙酰基。δ 17.97 和 δ 17.12 归属于 α-岩藻糖 C6 的信号峰。

优选地，本发明的海藻硫酸多糖是从浙江产地的海藻（按形状及产地归属为羊栖菜）中提取出的。

本发明另一方面，提供了所述海藻硫酸多糖（SPW-05-S2）的制备方法，包括以下步骤：

a. 硫酸多糖提取：

干燥的海藻，进行沸水提取，将所得提取液浓缩、透析、再浓缩、离心去沉淀，所得上清液醇沉、离心分离，所得沉淀洗涤、干燥，得水提海藻粗硫酸多糖；

优选地，所述步骤 a 包括：干燥的海藻，加入约 15~20 倍重量的水，将温度升至 100 ℃进行沸水提取 3~5 h，共提取 7~9 次，将提取液合并浓缩，透析，再浓缩，离心得上清液，加入约 5 倍~10 倍于上清液体积的乙醇，离心得沉淀，沉淀经无水乙醇与丙酮洗涤 3~6 次，经真空干燥或冷冻干燥得水提海藻粗硫酸多糖；

进一步优选，所述步骤 a 包括：干燥的海藻，加入约 20 倍重量的去离子水，将温度升至 100 ℃进行沸水提取 4 h，共提取 8 次，将提取液合并浓缩，透析，透析内液浓缩，离心，得上清液后，加入约 5 倍于上清液体积的乙醇，离心得沉淀，沉淀经无水乙醇与丙酮交替洗涤 3 次，经烘箱干燥后，复溶，再冷冻干燥得水提海藻粗硫酸多糖；

b. 硫酸多糖纯化：

b1.取步骤 a 制备的水提海藻粗硫酸多糖用水溶解，离心，上清液经阴离子交换柱进行初步分级纯化，依次以水和 0.05~0.8 M 的 NaCl 溶液洗脱，收集约 0.5 M NaCl 溶液的洗脱组分，得硫酸多糖 SPW-05；

优选地，所述步骤 b1 包括：取步骤 a 制备的水提海藻粗硫酸多糖，加入约 10~20 倍重量的水中溶解，离心，上清液经阴离交换柱分离，依次以去离子水、0.05 M、0.1 M、0.2 M、0.3 M、0.5 M、0.6 M 及 0.8 M NaCl 溶液洗脱，硫酸-苯酚检测，根据洗脱曲线收集合并约 0.5 M NaCl 溶液的洗脱液，浓缩，离心，取上清液透析，冷冻干燥，得初步纯化的硫酸多糖 SPW-05；

进一步优选地，所述步骤 b1 包括：取步骤 a 制备的水提海藻粗硫酸多糖，加入约 10 倍重量的水中溶解，离心，上清液经 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离交换柱分离，依次以去离子水、0.05 M、0.1 M、0.2 M、0.3 M、0.5 M、0.6 M 及 0.8 M NaCl 溶液洗脱，硫酸-苯酚检测，根据洗脱曲线收集合并 0.5 M NaCl 溶液的洗脱液，浓缩，离心，取上清液透析，冷冻干燥，得初步纯化的硫酸多糖 SPW-05；

b2.将步骤 b1 制备的硫酸多糖 SPW-05 溶于约 0.01~1 倍重量的 0.2 M NaCl 溶液中，离心，上清液经凝胶色谱柱纯化，以 0.2 M NaCl 溶液洗脱，根据洗脱曲线收集合并硫酸多糖 SPW-05-S2 这一主要组分，得所述硫酸多糖 SPW-05-S2；

优选地，所述步骤 b2 包括：将步骤 b1 制备的硫酸多糖 SPW-05 溶于约 0.01 倍重量的约 0.2 M NaCl 溶液中，离心，上清液经 Sephacryl HR S-300 凝胶色谱柱纯化，以 0.2 M NaCl 溶液洗脱，硫酸-苯酚法检测，根据洗脱曲线收集合并硫酸多糖 SPW-05-S2 这一主要组分，浓缩，透析，冷冻干燥，得所述硫酸多糖 SPW-05-S2。

步骤 a 中，所述乙醇可以为约 70%（v/v）以上的乙醇水溶液，优选为约 85%（v/v）以上的乙醇水溶液，特别为约 95%（v/v）以上的乙醇水溶液。

硫酸多糖的结构鉴定：所述海藻硫酸多糖 SPW-05-S2 通过对其单糖组成、甲基化、红外及核磁等进行综合解析，确定其结构。

本发明再一方面，提供了一种药物组合物，其包含治疗有效量的所述海藻硫酸多糖作为活性成分，该组合物可以进一步包括药剂学上可接受的药物辅料，例如载体、赋形剂、佐剂和/或稀释剂等。

本发明的又一方面，提供了所述海藻硫酸多糖或所述药物组合物在制备用于治疗和/或预防肺纤维化的药物中的用途。

肺纤维化优选为博莱霉素诱导的肺纤维化。

本发明的又一方面，还提供了一种减弱纤维化表型，以及预防和/或治疗肺纤维化的方法，所述方法包括向需要该治疗的对象给药治疗有效量的所述海藻硫酸多糖或所述药物组合物。

本发明的技术方案至少具有以下技术效果：

本发明通过特定提取及分离方法，制备含有特定糖组成，硫酸基含量，分子量及硫酸基取代位置等的均一硫酸多糖组分（分子量在一定范围（呈现正态分布）内的，具有确定的糖残基连接方式和糖组成）。经体内实验证明，该多糖SPW-05-S2能够降低博莱霉素诱导的肺纤维化，包括恢复肺组织形态，降低肺系数，减少动物肺损伤和纤维化表型相关蛋白的表达。并且在体外对细胞生长活力没有影响，能显著抑制纤维化相关蛋白的表达，在预防和/或治疗肺纤维化的候选药物方面具有巨大的应用前景。

在上文中已经详细地描述了本发明，但是上述实施方式本质上仅是例示性，且并不欲限制本发明。此外，本文并不受前述现有技术或发明内容或以下实施例中所描述的任何理论的限制。

附图说明

图1为海藻硫酸多糖SPW-05-S2的特征高效凝胶渗透色谱图；

图2为海藻硫酸多糖SPW-05-S2的特征红外光谱图；

图3为海藻硫酸多糖SPW-05-S2的特征 ^{13}C NMR图谱；

图4为海藻硫酸多糖SPW-05-S2的特征 ^{1}H-QA(定量) NMR图谱；

图5为制备实施例1中制得的海藻硫酸多糖SPW-05-S2对博莱霉素诱导小鼠肺纤维化模型中小鼠肺组织形态（A）与肺系数柱状图（B）（**代表 $P < 0.01$）；

图6为制备实施例1中制得的海藻硫酸多糖SPW-05-S2对博莱霉素诱导小鼠肺纤维化模型中小鼠肺组织苏木素-伊红染色（A）和Masson染色（B）代表图；

图7为制备实施例1中制得的海藻硫酸多糖SPW-05-S2对博莱霉素诱导小鼠肺纤维化模型中小鼠肺组织Fibronectin，Collagen I和α-smooth muscle actin蛋白免疫印迹图；

图8为使用CCK-8细胞增殖及毒性检测实验检测制备实施例1中制得的

海藻硫酸多糖 SPW-05-S2 对肺泡上皮细胞 A549 细胞活力影响的柱状图（+代表加入，—代表不加入）；

图 9 为制备实施例 1 中制得的海藻硫酸多糖 SPW-05-S2 对 TGF-β 诱导的肺泡上皮细胞 A549 细胞中 E-cadherin、α-SMA、Collagen I 和 Fibronectin 的蛋白水平表达量的免疫印迹图（+代表加入，—代表不加入）。

具体实施方式

在本文中，所有以数值范围或百分比范围形式界定的特征或条件仅是为了简洁及方便。据此，数值范围或百分比范围的描述应视为已涵盖且具体公开所有可能的次级范围及范围内的个别数值，特别是整数数值。举例而言，“1至 8”的范围描述应视为已经具体公开如 1 至 7、2 至 8、2 至 6、3 至 6、4 至 8、3 至 8 等等所有次级范围，特别是由所有整数数值所界定的次级范围，且应视为已经具体公开范围内如 1、2、3、4、5、6、7、8 等个别数值。除非另有指明，否则前述解释方法适用于本发明全文的所有内容，不论范围广泛与否。

若数量或其他数值或参数是以范围、较佳范围或一系列上限与下限表示，则其应理解成是本文已特定公开了由任一对该范围的上限或较佳值与该范围的下限或较佳值构成的所有范围，不论这些范围是否有分别公开。此外，本文中若提到数值的范围时，除非另有说明，否则该范围应包括其端点以及范围内的所有整数与分数。

在本文中，在可实现发明目的的前提下，数值应理解成具有该数值有效位数的精确度。举例来说，数字 40.0 则应理解成涵盖从 39.50 至 40.49 的范围。

下面结合实施例对本发明作进一步的说明，需要说明的是，提供以下实施例仅出于说明目的并不构成对本发明要求保护范围的限制。

实施例所用的实验方法如无特殊说明，均为常规方法。

实施例所用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

材料：

海藻藻体购自亳州中药饮片公司，产地为中国浙江。

设备：

高效凝胶渗透色谱采用 Shodex SUGAR KS-804 (8.0 mm × 300 mm，美国

Agilent 公司)和 Shodex SUGAR KS-802 (8.0 mm × 300 mm，美国 Agilent 公司)串联柱，以用不同分子量的 T-系列标准葡聚糖 (Dextran) 制作标准曲线；

高效液相色谱 (HPLC) 采用 Agilent 1260 Seri 高效液相系统测定(美国 Agilent 公司)；

红外分析采用 Perkin-Elmer 599B 型红外分光光度计测定 (美国 Perkin-Elmer 公司)；

核磁共振分析采用 Brucker AM-500 型核磁共振仪测定 (德国 Brucker 公司)。

制备实施例 1：海藻硫酸多糖 SPW-05-S2 的制备

a. 海藻硫酸多糖提取：

干燥的 2 kg 海藻藻体，加入 20 L × 2 的去离子水，在 100 ℃下沸水提取 4 h 每次，共提取 8 次，将提取液合并浓缩，用流动水透析 3 天。将透析内液加热浓缩至 2.5 L，离心弃去沉淀，将上清液在搅拌下加入 5 倍体积(12.5 L)的 95 % v/v 乙醇，静置醇沉过夜，离心分离，所得沉淀用无水乙醇与丙酮交替洗涤 3 次，离心取沉淀于 50 ℃下真空干燥，再复溶于 1500 mL 去离子水中，进行冷冻干燥得水提海藻粗硫酸多糖 204 g（收率 10.2%）。

b. 硫酸多糖纯化：

取上述制备的水提海藻粗硫酸多糖 6 g，100 mL 的去离子水溶解，4000 r/min 离心 10 min 除去不溶物，上清液经 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换柱进行分离，依次以去离子水、0.05 M、0.1 M、0.2 M、0.3 M、0.5 M、0.6 M 及 0.8 M NaCl 溶液梯度洗脱，硫酸-苯酚检测，并绘制洗脱曲线，根据洗脱曲线收集合并 0.5 M NaCl 洗脱液，浓缩，离心，取上清液透析，冷冻干燥，得初步纯化的硫酸多糖 SPW-05 约 508 mg（得率 8.46%）。取 200 mg SPW-05 溶于 4 mL 的 0.2 M NaCl 溶液中，4000 r/min 离心 10 min，上清液经 Sephacryl HR S-300 凝胶色谱柱，以 0.2 M NaCl 溶液洗脱并控制流速 5 mL/15 min。硫酸-苯酚法检测并绘制洗脱曲线，根据洗脱曲线收集合并硫酸多糖 SPW-05-S2 组分，浓缩，透析，冷冻干燥，得海藻硫酸多糖 SPW-05-S2 约 166 mg（得率 32.7%）。

c. 海藻硫酸多糖 SPW-05-S2 结构鉴定及解析：

（1）经高效凝胶渗透色谱 (high performance gel permeation chromatography，HPGPC) 测定硫酸多糖 SPW-05-S2 相对分子质量为 121.77

kDa，其纯度达 95%（如图 1，图中的小尖峰为溶剂峰）。

硫酸多糖 SPW-05-S2 的完全水解样品经 PMP 衍生法测其单糖组成，确定硫酸多糖 SPW-05-S2 主要含有甘露糖，葡萄糖醛酸，半乳糖，木糖和岩藻糖，其摩尔比为 12.28:2.60:27.59:7.06:50.47。甲基化分析。综合对原糖、脱硫后多糖及其还原的脱硫多糖进行甲基化，通过 GC-MS 进行分析，确定硫酸多糖 SPW-05-S2 的糖残基连接方式及其硫酸基的取代位置，确定葡萄糖醛酸的连接方式为 1, 4-葡萄糖醛酸。通过部分酸水解后的次级多糖的糖组成和糖残基连接方式等确定硫酸多糖 SPW-05-S2 的主链为 1, 4-葡萄糖醛酸和 1, 2-甘露糖。此外，通过元素分析，发现硫酸多糖 SPW-05-S2 的含硫量为 9.76，进一步确定其硫酸基含量为 29.28%。以葡萄糖为标准品，通过苯酚硫酸法，进行糖含量测定，提示硫酸多糖 SPW-05-S2 的糖含量为 66.4%（两次糖含量测定取平均值）。此外，BCA 试剂盒检测出其还含有 3.4%的蛋白。

（2）红外图谱（如图 2），3308.69 cm^{-1} 为 O-H 伸缩振动吸收峰，2932.46 cm^{-1} 为 C-H 伸缩振动吸收峰，1217.11 cm^{-1} 处的强吸收峰为 O=S=O 的伸缩振动峰，1732.38 cm^{-1} 为羧基 C=O 伸缩振动，表明该多糖含有硫酸基和糖醛酸。

（3）NMR 分析：

取硫酸多糖 SPW-05-S2 35 mg，加 D_2O 0.5 mL 溶解，加 2.5 μL 丙酮为内标 (δ H = 2.29 ppm，δ C = 31.5 ppm)，于 Bruker AVANCE III 500 M 核磁共振仪上，25℃分别测定一维和二维核磁共振谱，并参考核磁图谱对硫酸多糖 SPW-05-S2 进行结构确证，SPW-05-S2 的 ^{13}C NMR 结果如图 3。

在硫酸多糖 SPW-05-S2 的 ^{13}C NMR 谱中，异头碳区域内，δ 105.48-δ 104.08 信号归属于 1, 3, 6-β-半乳糖，1, 6-β-半乳糖，末端 β-半乳糖。δ 103.24 -δ 100.51 信号归属于 1, 2, 3-α-甘露糖/1, 2, 6-α-甘露糖、1, 4-β-木糖和末端 β-木糖及 1, 4-β-葡萄糖醛酸。δ 99.69-δ 97.44 归属于 1, 2-α-岩藻糖、1, 4-α-岩藻糖、1, 2, 4-α-岩藻糖和末端-α-岩藻糖。δ 93.44 归属于 1, 3-α-岩藻糖。δ 175.02 信号归属于 1, 4-β-葡萄糖醛酸羧基碳的信号峰。δ 39.47 及 δ 21.83 的信号表明该多糖含有乙酰基。δ 17.97 和 δ 17.12 归属于 α-岩藻糖 C6 的信号峰。

^{1}H-QA(定量) NMR 图谱中（图 4，未加丙酮），位于 δ 5.0-5.7 的信号是硫酸多糖 SPW-05-S2 中异头氢的信号，位于 δ 3.25-4.65 的信号是糖环上的氢的信号，位于 δ 2.28 附近的信号是典型的乙酰基上甲基氢的信号，位于

δ 1.30 附近的信号是岩藻糖 H6 的信号。根据 δ 2.28 附近的信号和 δ 1.30 附近的信号的积分面积比可知乙酰基与岩藻糖的摩尔比为 0.028:1。由于岩藻糖占总糖的摩尔分数是 50.47%。可以换算出乙酰基与总糖的摩尔比是 0.014:1。

综合以上结果表明，海藻硫酸多糖 SPW-05-S2 可能以 1, 4-β-葡萄糖醛酸及 1, 2-α-甘露糖为主链结构，而在 α-甘露糖的 C-6 位和 C-3 位存在分支，分支由半乳糖残基（1, 3, 6-β-半乳糖、1, 6-β-半乳糖和末端-β-半乳糖）、木糖（1, 4-β-木糖和末端-β-木糖）和岩藻糖（1, 2-α-岩藻糖、1, 3-α-岩藻糖、1, 4-α-岩藻糖、1, 2, 4-α-岩藻糖和末端-α-岩藻糖）残基组成。通过对比脱硫前后的糖残基连接方式确定其硫酸基主要取代在 1, 2-α-岩藻糖的 C-4 位和 1, 4-α-岩藻糖的 C-2 位，以及末端-β-半乳糖的 C-4 位和部分末端-β-木糖的 C-4 位。

测试实施例 2：海藻硫酸多糖 SPW-05-S2 抗肺纤维化的活性

（1）博莱霉素诱导的肺纤维化模型检测海藻多糖组分 SPW-05-S2 对小鼠肺组织形态和肺组织系数的影响

此次动物实验遵行实验动物管理和使用指南，获得中国科学院上海药物研究所动物伦理委员会批准。从上海斯莱克实验动物中心有限公司购得 8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠 36 只。动物随机分为三组，对照组 6 只，模型组 6 只，实验组 24 只。自由饮食饮水，室温 22±1℃，室内相对湿度 65±5 %，12 h 循环光照。模型组和实验组，气管给药博莱霉素（购自 CSNpharm 公司）溶液 1.8mg/kg（使用 0.9%生理盐水配置）。6 只小鼠气管给药等体积 0.9%生理盐水为正常对照组。一周后实验组随机分组给药，每组 6 只，分为四组 A、B、C、D 组。A 组给药 25 mg/kg SPW-05-S2 多糖，B 组给药 50 mg/kg SPW-05-S2 多糖，C 组给药 100 mg/kg SPW-05-S2 多糖，D 组给药 100 mg/kg 吡非尼酮（购自 MCE 公司）为阳性药对照，每天灌胃给药，持续两周，对照组和模型组给予等体积生理盐水。给药两周后对小鼠体重进行记录后牺牲小鼠，观察各组小鼠肺组织形态，并对肺组织进行称重。结果如图 5 中 A 和 B 所示，使用 SPW-05-S2 多糖干预后的肺纤维化小鼠，肺组织表面恢复光滑红润，色泽光亮，但质地不及对照组小鼠肺组织柔软，富有弹性。模型组小鼠肺系数（肺组织重量/小鼠体重）增高，SPW-05-S2 低（25 mg/kg）、中（50 mg/kg）、高（100 mg/kg）剂量组肺系数降低，与模型组相比具有显著差异。

（2）苏木素-伊红染色和 Masson 染色观察 SPW-05-S2 对减轻肺纤维化的作用

给药两周后小鼠牺牲，取左侧肺大叶使用 4%多聚甲醛固定 48 小时后，进行苏木素-伊红染色和 Masson 染色。如图 6 中 A 和 B 所示，苏木素-伊红染色结果表明，SPW-05-S2 低、中、高剂量组小鼠肺组织病变程度显著减轻，仅可观察到少部分间质血管扩张、充血及轻度肺泡炎，但肺泡壁纤维化程度大大减少。肺泡间隔基本恢复正常，未见弥漫性的炎性浸润。Masson 染色结果表明，SPW-05-S2 低、中、高剂量组小鼠肺组织中肺泡完整性变好，纤维组织团块明显减少，抑制胶原沉积现象较为明显。这说明多糖 SPW-05-S2 可以有效缓解肺部纤维化病灶，降低纤维增生且减缓肺纤维化进程。

（3）蛋白免疫印迹实验检测 SPW-05-S2 对小鼠肺中纤维化表型相关蛋白水平的影响

给药两周后小鼠牺牲，部分肺组织用组织提取试剂盒（购自生工生物工程有限公司）提取蛋白，加入 5×上样缓冲液后将蛋白于金属加热器中 95℃变性 10 min，冷却后储存于-80 ℃。免疫印迹检测 Fibronectin、Collagen I 和 α-smooth muscle actin 蛋白表达。结果如图 7 所示，海藻多糖 SPW-05-S2 能够抑制纤维化表型相关蛋白（Fibronectin、Collagen I 和 α-smooth muscle actin）的表达。

（4）CCK-8 实验检测海藻多糖 SPW-05-S2 对肺泡上皮细胞 A549 生长活力的影响

对数生长期的 A549 细胞（5×10^3 个/孔）种入 96 孔板中，设三复孔，于培养箱中培养 24 h；吸去细胞上清液，加入终浓度分别为 0.1、0.5 及 1 mg/mL 的海藻多糖 SPW-05-S2 溶液培养 1 小时后，在加入 TGF-β (10ng/mL) 干预处理，继续培养 48 h 后，每孔加入 10 μL CCK-8 增强型溶液（购自大连美仑公司），继续培养 1 h 后用酶标仪在 450 nm 下检测吸光度。细胞生长活力按照以下公式进行计算：细胞活力=（实验组 OD 值－空白组 OD 值）/（对照组 OD 值－空白组 OD 值）×100%。结果如图 8 所示，说明 SPW-05-S2 对细胞生长活力没有影响（+代表加入，—代表不加入）。

（5）蛋白免疫印迹实验检测海藻多糖 SPW-05-S2 对肺泡上皮细胞 A549 细胞中纤维化表型相关蛋白水平表达的影响

人肺泡上皮细胞 A549 培养于含 10 %胎牛血清（购自美国 Gibco 公司）、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的以体积比 1:1 混合的 RPMI1640 培养基中。取对数生长期的 A549 细胞，以 1.2×10^6 个/孔的密度种于 6 孔板中，培养 24 h 后，用 0.1、0.5 及 1 mg/mL 的海藻多糖 SPW-05-S2 和阳性药 1mg/mL 吡非尼酮处理 1 h 后，以 0、10ng/ml 的浓度加入 TGF-β 重组蛋白（购自 Abclonal 公司）刺激。培养 24 小时后，弃上清，用预冷的 PBS 漂洗细胞，RIPA 细胞裂解液（购自 Absin 公司）冰上裂解细胞 20 min，离心收集上清液。加入 5×上样缓冲液后将蛋白于金属加热器中变性 10 min，冷却后储存于-80 ℃。免疫印迹检测 E-cadherin、α-smooth muscle actin、Collagen I 和 Fibronectin 的蛋白表达情况。结果如图 9 所示，海藻多糖 SPW-05-S2 可以显著地抑制 α-smooth muscle actin、Collagen I 和 Fibronectin 蛋白的表达，显著地增加 E-cadherin 蛋白的表达。

综上，通过测试实施例结果可知，海藻硫酸多糖 SPW-05-S2 能够降低博莱霉素诱导的肺纤维化，包括恢复肺组织形态，降低肺系数，减少动物肺损伤和纤维化表型相关蛋白的表达。并且在体外不影响肺泡上皮细胞 A549 的细胞生长活力，SPW-05-S2 能明显抑制纤维化相关蛋白 α-SMA、Collagen I 和 Fibronectin 的表达，显著地增加 E-cadherin 蛋白的表达。因此该多糖组分 SPW-05-S2 可成为预防和/或治疗肺纤维化的潜在的糖类药物。

以上各实施例仅用以举例说明本发明的技术方案，而非对其限制。尽管参照前述各实施例对本发明进行了详细的说明，本领域的普通技术人员应当理解：在没有脱离本发明权利要求所限定的精神和实质的范围内，可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改，或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换；而这些修改或者替换仍然在本发明权利要求所限定的范围内。

权利要求

1、一种海藻硫酸多糖，其特征在于，以重量百分含量计，所述海藻硫酸多糖包含多糖 62%~70%、硫酸基 27%~32%、乙酰基 0.5%~1.5%以及蛋白 2.0%~4.5%；

所述多糖主要由甘露糖、葡萄糖醛酸、半乳糖、木糖和岩藻糖组成。

2、根据权利要求 1 所述的海藻硫酸多糖，其特征在于，所述多糖的结构单元是以 1→4 连接的 β-葡萄糖醛酸、1→2 连接的 α-甘露糖为主链，在 α-甘露糖的 C-6 位和 C-3 位存在分支，分支由 1, 3, 6-β-半乳糖、1, 6-β-半乳糖、末端-β-半乳糖、1, 4-β-木糖、末端-β-木糖、1, 2-α-岩藻糖、1, 3-α-岩藻糖、1, 4-α-岩藻糖、1, 2, 4-α-岩藻糖和末端-α-岩藻糖残基组成；

所述硫酸基主要取代在 1, 2-α-岩藻糖的 C-4 位、1, 4-α-岩藻糖的 C-2 位、末端-β-半乳糖的 C-4 位以及部分末端-β-木糖的 C-4 位。

3、根据权利要求 1 所述的海藻硫酸多糖，其特征在于，所述海藻硫酸多糖的重均分子量的范围为 5-1000 kDa，优选为 10-500 kDa，更优选为 15-400 kDa。

4、根据权利要求 1 所述的海藻硫酸多糖，其特征在于，所述甘露糖、葡萄糖醛酸、半乳糖、木糖和岩藻糖的摩尔比为 10~15:1.5~4:22~32:5~9:40~60，优选为 12.28:2.60:27.59:7.06:50.47。

5、如权利要求 1-4 任一项所述的海藻硫酸多糖的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

a. 硫酸多糖提取：

干燥的海藻用沸水提取，将所得提取液浓缩、透析、再浓缩、离心去沉淀，所得上清液醇沉、离心分离，所得沉淀洗涤、干燥，得水提海藻粗硫酸多糖；

b. 硫酸多糖纯化：

b1.取步骤 a 制备的水提海藻粗硫酸多糖用水溶解，离心，上清液经阴离子交换柱进行初步分级纯化，依次以水和 0.05~0.8 M 的 NaCl 溶液洗脱，收集 0.5 M NaCl 溶液的洗脱组分，得硫酸多糖 SPW-05；

b2.将步骤 b1 制备的硫酸多糖 SPW-05 溶于 0.01~1 倍重量的 0.2 M NaCl 溶液中，离心，上清液经凝胶色谱柱纯化，以 0.2 M NaCl 溶液洗脱，收集合并硫酸多糖组分。

6、根据权利要求 5 所述的制备方法，其特征在于，

所述步骤 a 包括：在干燥的海藻中加入 15~20 倍重量的水，浸泡过夜后，沸水提取 3~5 小时，每天 3 次，提取至苯酚硫酸法检测至无明显颜色变化；将提取液合并，浓缩，透析，再浓缩，离心得上清液，加入 5 倍~10 倍于上清液体积的乙醇，离心得沉淀，沉淀经无水乙醇与丙酮洗涤 3~6 次，经干燥得水提海藻粗硫酸多糖；

所述步骤 b 包括：b1.取步骤 a 制备的水提海藻粗硫酸多糖，加入 10~20 倍重量的水中溶解，离心；上清液经阴离子交换柱分离，依次以水、0.05 M、0.1 M、0.2 M、0.3 M、0.5 M、0.6 M 及 0.8 M NaCl 溶液洗脱，硫酸-苯酚检测，根据洗脱曲线收集合并 0.5 M NaCl 溶液的洗脱液，浓缩，离心，取上清液透析，冷冻干燥，得硫酸多糖 SPW-05；

b2.将步骤 b1 制备的硫酸多糖 SPW-05 溶于 0.01~1 倍重量的 0.2 M NaCl 溶液中，离心，上清液经凝胶色谱柱纯化，以 0.2 M NaCl 溶液洗脱，硫酸-苯酚检测，根据洗脱曲线收集合并硫酸多糖这一组分，浓缩，透析，冷冻干燥，得所述硫酸多糖。

7、根据权利要求 6 所述的制备方法，其特征在于，步骤 a 中，所述乙醇为 70%（v/v）以上的乙醇水溶液，优选为 85%（v/v）以上的乙醇水溶液，特别为 95%（v/v）以上的乙醇水溶液。

8、一种药物组合物，其包含权利要求 1-4 任一项所述的海藻硫酸多糖以及任选的药学上可接受的辅料。

9、权利要求 1-4 任一项所述的海藻硫酸多糖或权利要求 8 所述的药物组合物在制备用于预防和/或治疗肺纤维化的药物中的用途。

10、根据权利要求 9 所述的用途，其特征在于，所述肺纤维化为博莱霉素诱导的肺纤维化。

附图

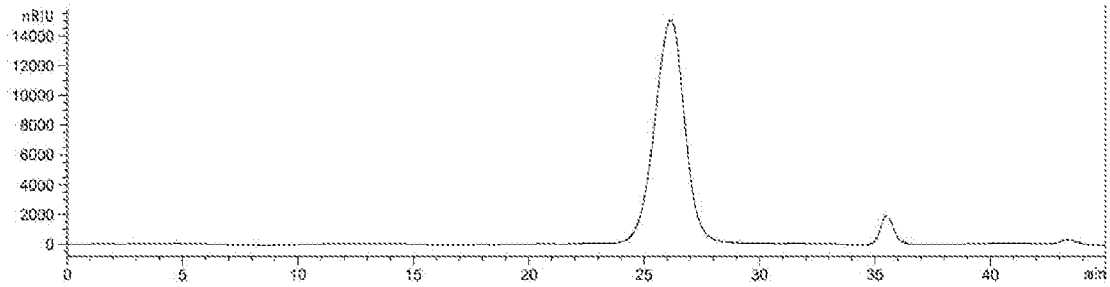

nRIU
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
min

图 1

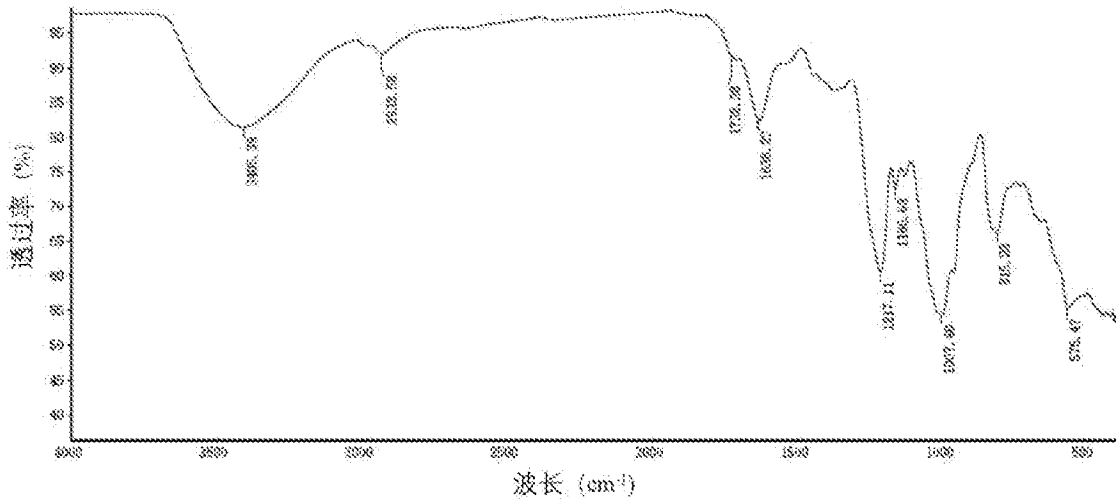

透过率 (%)
波长 (cm⁻¹)

图 2

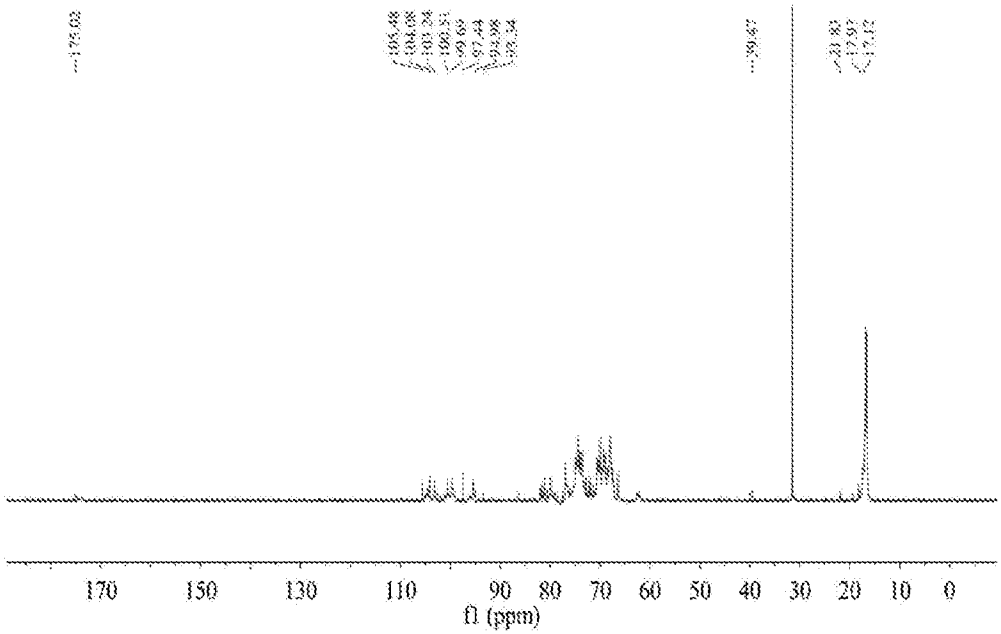

175.02
165.48
164.08
160.26
160.13
157.63
157.44
153.98
153.74
39.47
20.82
17.93
17.32
170
150
130
110
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
f1 (ppm)

图 3

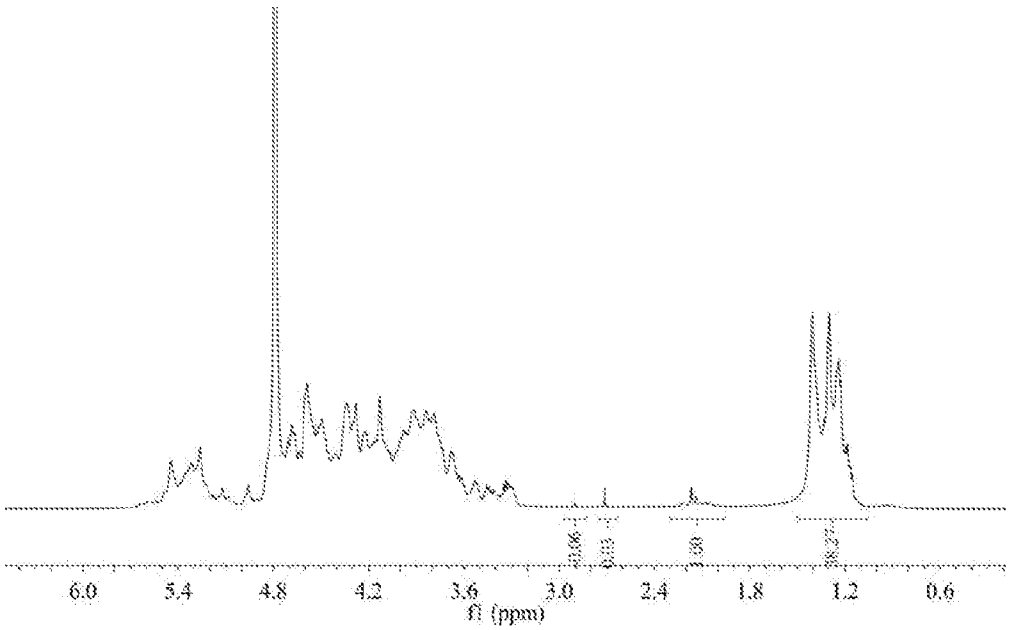

6.0
5.4
4.8
4.2
3.6
3.0
2.4
1.8
1.2
0.6
f1 (ppm)

图 4

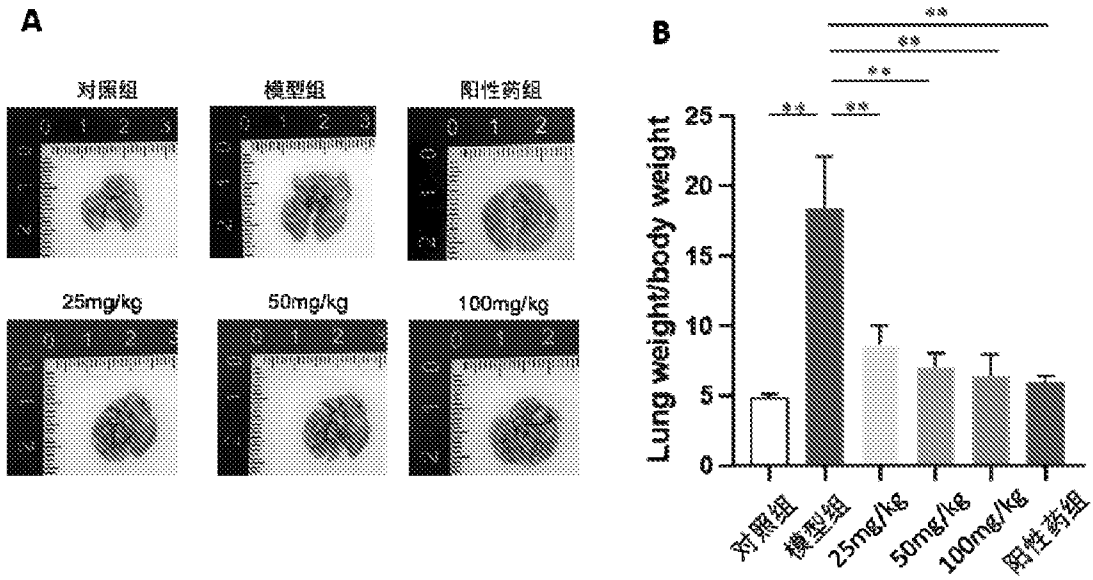

A
对照组
模型组
阳性药组
25mg/kg
50mg/kg
100mg/kg
B
Lung weight/body weight
0
5
10
15
20
25
**
**
**
**
对照组
模型组
25mg/kg
50mg/kg
100mg/kg
阳性药组

图 5

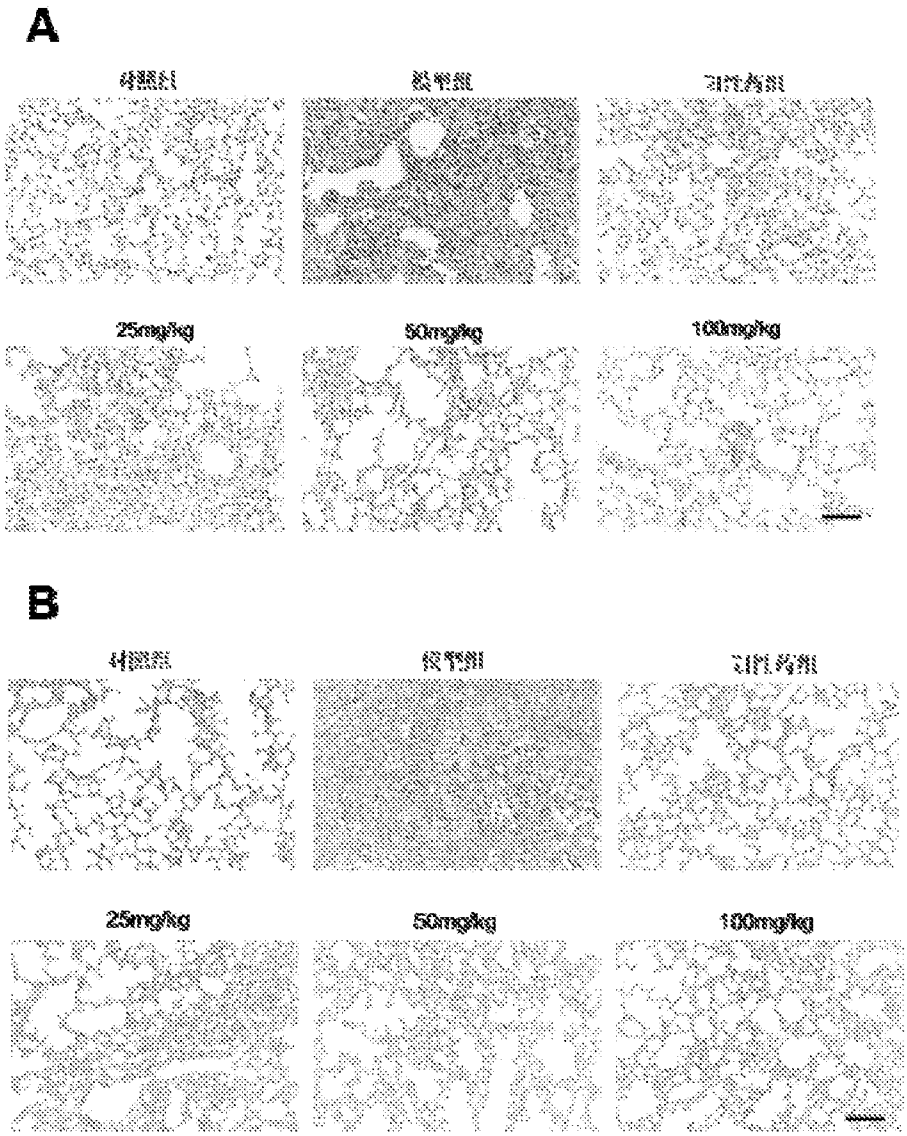

A
25mg/kg
50mg/kg
100mg/kg
B
25mg/kg
50mg/kg
100mg/kg

图 6

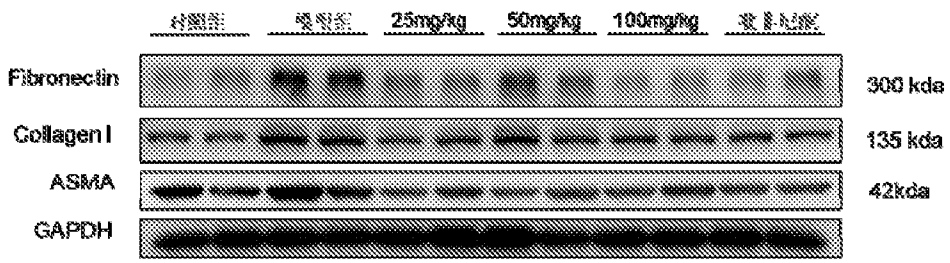

25mg/kg
50mg/kg
100mg/kg
Fibronectin
Collagen I
ASMA
GAPDH
300 kda
135 kda
42kda

图 7

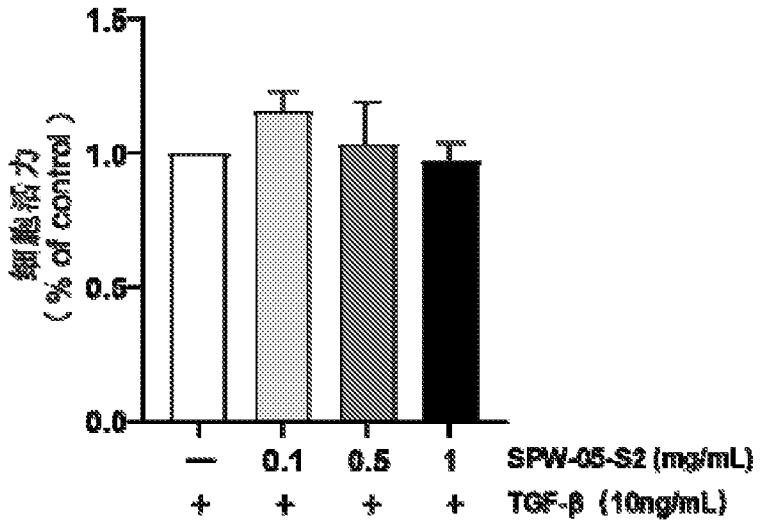

1.5
1.0
0.5
0.0
细胞活力
(% of control)
—
0.1
0.5
1
SPW-05-S2 (mg/mL)
+
+
+
+
TGF-β (10ng/mL)

图 8

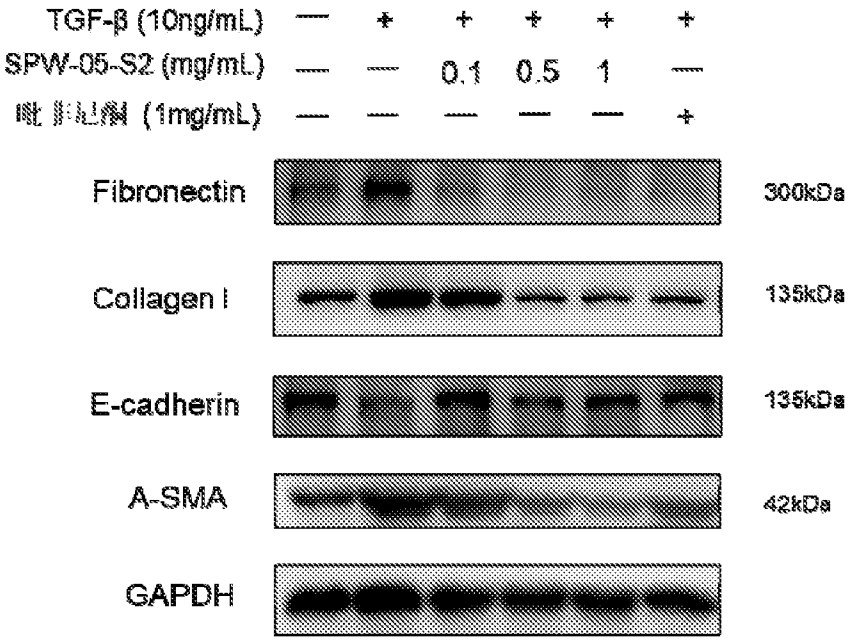

TGF-β (10ng/mL) — + + + + +
SPW-05-S2 (mg/mL) — — 0.1 0.5 1 —
吡非尼酮 (1mg/mL) — — — — — +
Fibronectin
300kDa
Collagen I
135kDa
E-cadherin
135kDa
A-SMA
42kDa
GAPDH

图 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/138342

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/737(2006.01)i; A61K36/03(2006.01)i; A61P11/00(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, CNTXT, DWPI, VEN, ENTXTC, ENTXT, CNKI, PUBMED, ISI_Web of Science, Science Direct, STNext: 中国科学院上海药物研究所, Sargassum fusiforme, 羊栖菜, 多糖, 硫酸, 岩藻糖, 肺纤维化, Fibrosis, Sulfat+, fucose, protein, Mannose, glucuronic acid, galactose, xylose

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 115844928 A (SHANGHAI INSTITUTE OF MATERIA MEDICA, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 28 March 2023 (2023-03-28) description, abstract, and claims 1-10	1-10
X	CN 113332309 A (INSTITUTE OF OCEANOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 03 September 2021 (2021-09-03) description, abstract, claims 1-6, description, paragraphs 12-13	1, 3-4, 8-10
A	吴华勇等 (WU, Huayong et al.). "羊栖菜多糖对TGF-β1诱导的大鼠肺成纤维细胞的影响 (Effects of Sargassum Fusiforme Polysaccharide on Transforming Growth Factor β1-induced Rat Lung Fibroblasts)" *医学研究杂志 (Journal of Medical Research),* Vol. 46, No. 4, 30 April 2017 (2017-04-30), pages 74-77	1-10
A	CONG, Qifei et al. "Structural characterization and effect on anti-angiogenic activity of a fucoidan from Sargassum fusiforme" *Carbohydrate Polymers,* Vol. 136, 09 October 2015 (2015-10-09), pages 899-907	1-10

☑ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"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	Date of mailing of the international search report
17 January 2024	**23 January 2024**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088**	Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LIU, Xue et al. "A fucoidan from Sargassum fusiforme with novel structure and its regulatory effects on intestinal microbiota in high-fat diet-fed mice" *Food Chemistry,* Vol. 358, 20 April 2021 (2021-04-20), 129908 (pages 1-11)	1-10
A	CHEN, Liujun et al. "Sargassum Fusiforme Polysaccharide SFP-F2 Activates the NF-κB Signaling Pathway via CD14/IKK and P38 Axes in RAW264.7 Cells" *Mar. Drugs,* Vol. 16, 01 August 2018 (2018-08-01), 264 (pages 1-15)	1-10
A	王晶 等 (WANG, Jin et al.). "褐藻多糖硫酸酯的结构与生物活性研究 (A Study on the Structure and Activity of Fucoidan)" *海洋科学集刊 (Studia Marina Sinica),* No. 52, 31 December 2017 (2017-12-31), pages 68-89	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2023/138342

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 115844928 A	28 March 2023	None	
CN 113332309 A	03 September 2021	None	

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/138342

A. 主题的分类

A61K31/737(2006.01)i；A61K36/03(2006.01)i；A61P11/00(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, CNTXT, DWPI, VEN, ENTXTC, ENTXT, CNKI, PUBMED, ISI_Web of Science, Science Direct, STNe-xt: 中国科学院上海药物研究所，Sargassum fusiforme，羊栖菜，多糖，硫酸，岩藻糖，肺纤维化，Fibrosis，Sulfat+，fucose，protein，Mannose，glucuronic acid，galactose，xylose

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
PX	CN 115844928 A (中国科学院上海药物研究所) 2023年3月28日 (2023 - 03 - 28) 说明书摘要，权利要求1-10	1-10
X	CN 113332309 A (中国科学院海洋研究所) 2021年9月3日 (2021 - 09 - 03) 说明书摘要，权利要求1-6，说明书第12-13段	1,3-4,8-10
A	吴华勇等. "羊栖菜多糖对TGF-β1诱导的大鼠肺成纤维细胞的影响" 《医学研究杂志》, 第46卷，第4期，2017年4月30日 (2017 - 04 - 30)， 第74-77页	1-10
A	CONG, Q.等. "Structural characterization and effect on anti-angiogenic activity of a fucoidan from Sargassum fusiforme" Carbohydrate Polymers, 第136卷，2015年10月9日 (2015 - 10 - 09)， 第899-907页	1-10
A	LIU, X.等. "A fucoidan from Sargassum fusiforme with novel structure and its regulatory effects on intestinal microbiota in high-fat diet-fed mice" Food Chemistry, 第358卷，2021年4月20日 (2021 - 04 - 20)， 129908（第1-11页）	1-10

☑ 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

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“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	国际检索报告邮寄日期
2024年1月17日	2024年1月23日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	受权官员 崔传明 电话号码 (+86) 010-53961869

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
A	CHEN, L.等. "Sargassum Fusiforme Polysaccharide SFP-F2 Activates the NF-κB Signaling Pathway via CD14/IKK and P38 Axes in RAW264.7 Cells" Mar. Drugs, 第16卷，2018年8月1日 (2018 - 08 - 01)，264（第1-15页）	1-10
A	王晶等. "褐藻多糖硫酸酯的结构与生物活性研究" 海洋科学集刊, 第52期，2017年12月31日 (2017 - 12 - 31)，第68-89页	1-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2023/138342

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN 115844928 A	2023年3月28日	无	
CN 113332309 A	2021年9月3日	无	