

(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
2022 年 3 月 17 日 (17.03.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/052234 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 45/00 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
A61K 31/444 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/124288

(22) 国际申请日: 2020 年 10 月 28 日 (28.10.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202010949418.2 2020 年 9 月 10 日 (10.09.2020) CN

(71) 申请人: 中国科学院深圳先进技术研究院 (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。

(72) 发明人: 钱政江 (QIAN, Zhengjiang); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。李洪超 (LI, Hongchao);

中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。杨海洋 (YANG, Haiyang); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。李翔 (LI, Xiang); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。

(74) 代理人: 北京品源专利代理有限公司 (BEYOND ATTORNEYS AT LAW); 中国北京市海淀区莲花池东路 39 号西金大厦 6 层, Beijing 100036 (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, IT, 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,

(54) Title: METHOD FOR REGULATING MACROPHAGE POLARIZATION STATE

(54) 发明名称: 一种调节巨噬细胞极化状态的方法

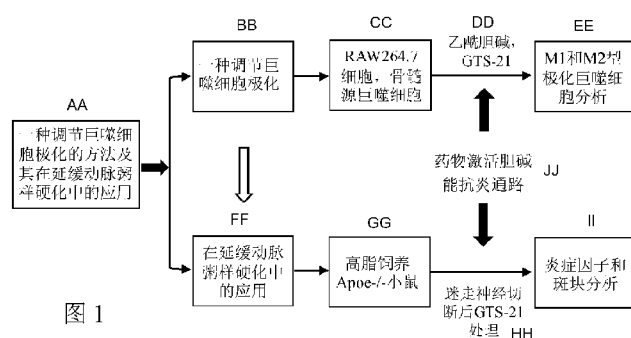


图 1

AA A method for regulating macrophage polarization and an application thereof in delaying atherosclerosis
BB Regulation of macrophage polarization
CC RAW264.7 cells, bone marrow-derived macrophages
DD Acetylcholine, GTS-21
EE Analysis of M1 and M2 type polarized macrophages
FF Application in delaying atherosclerosis
GG High-fat feeding ApoE^{-/-} mice
HH Treatment of GTS-21 after the vagus nerve is blocked
II Analysis of inflammatory factor and plaque
JJ Drug activates cholinergic anti-inflammatory pathway

(57) Abstract: A method for regulating macrophage polarization state, the method comprising a step of using a cholinergic anti-inflammatory pathway agonist and/or a vagus nerve electrical stimulation signal to activate the cholinergic anti-inflammatory pathway of a macrophage. A cholinergic anti-inflammatory pathway agonist is used to stimulate in vitro a macrophage, or an electrical stimulation signal is used to stimulate in vivo the vagus nerve, the cholinergic anti-inflammatory pathway is activated, which inhibits the polarization of M1 type macrophages, promotes the polarization of M2 type macrophages, and achieves a regulatory effect on the polarization type of macrophages, having a great significance in specifically regulating the function of polarized macrophages and the diseases cause thereby.

(57) 摘要: 一种调节巨噬细胞极化状态的方法, 所述方法包括采用胆碱能抗炎通路激动剂和/或迷走神经电刺激信号激活巨噬细胞的胆碱能抗炎通路的步骤。采用胆碱能抗炎通路激动剂对巨噬细胞进行体外刺激, 或采用电刺激信号对迷走神经进行体内刺激, 激活胆碱能抗炎通路, 抑制了 M1 型巨噬细胞的极化, 促进了 M2 型巨噬细胞的极化, 实现了对巨噬细胞极化类型的调节作用, 在特异性调节极化巨噬细胞功能及其引发的疾病方面具有重要意义。

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, 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))。

一种调节巨噬细胞极化状态的方法

技术领域

本申请属于生物医药技术领域，涉及一种调节巨噬细胞极化状态的方法，尤其涉及通过激活胆碱能抗炎通路调节巨噬细胞极化状态的方法及其在延缓动脉粥样硬化炎症发生发展中的应用。

背景技术

巨噬细胞是由骨髓系祖细胞分化为单核细胞后进入血液，迁移至组织中分化形成的。根据激活方式以及功能的差异，巨噬细胞分为经典型（M1 型）和替代型（M2 型）。在细菌毒素 LPS 或 Th1 类细胞因子（TNF α ，IFN γ ）等刺激下，巨噬细胞被激活极化为 M1 型，表达和释放促炎性因子和活性氧，具有杀灭病原体、清除坏死组织和促进炎症反应发生的作用；与之对应，在 Th2 类细胞因子（IL-4，IL-13）等诱导下，巨噬细胞被激活为 M2 型，表达抗炎因子（如 TGF β ，IL-10），具有消退炎症、促进组织生长和修复的作用。此外，通过改变 Krüppel-like factors（KLF4）、STAT6、miR-33 等基因的表达，也能调节巨噬细胞的极化状态。

研究发现，两种不同的极化巨噬细胞在炎症疾病的发生过程中具有重要的调控作用，在不同的微环境响应不同刺激时，可以在功能上相互转变；而阻断 M1 型巨噬细胞的功能，维持 M2 型极化细胞的抗炎修复特性，对抑制炎症的发生发展具有重要作用。因此，寻找一种有效的方法调节巨噬细胞的极化状态，在预防和治疗炎症相关疾病方面意义重大。然而，目前有效的调节巨噬细胞极化的方法较少。

胆碱能抗炎通路（Cholinergic Anti-inflammatory Pathway，CAP）是一种新近发现的神经免疫调节抗炎途径。在炎症条件下，传入迷走神经（afferent vagus）将炎症信号传递至中枢神经系统，再通过传出迷走神经（efferent vagus）释放乙

乙酰胆碱 (Acetylcholine, ACh) 作用于巨噬细胞, 进而降低细胞炎症因子的释放, 可以有效抑制炎症反应的发展。CAP 对全身和局部炎症均具有明显的抑制作用, 为调节细胞因子功能和缓解炎症相关疾病提供了有效途径。研究表明, 通过刺激迷走神经激活 CAP, 能够抑制急性炎症、脓毒症、慢性类风湿性关节炎等疾病的发生发展, 从而改善疾病症状。目前, 刺激迷走神经的方法已被美国 FDA 认证通过, 被应用于癫痫、类风湿性关节炎等疾病的预防和治疗。

动脉粥样硬化是一种慢性炎症性疾病, 主要病因是脂质代谢异常并积累于血管内皮上, 引发炎症, 加剧斑块和血栓的形成, 导致血管堵塞。炎症反应始终贯穿于动脉粥样硬化的发生、发展和演变的各个阶段, 可能是动脉粥样硬化多种诱发因素致病机制的核心环节。在动脉粥样硬化发生初期, 炎症反应诱导 M1 型极化巨噬细胞聚集, 发挥清理累积的脂质及坏死细胞的功能, 同时释放促炎症因子加快炎症发展以及斑块形成; 而伴随炎症的加剧, M2 型极化巨噬细胞被激活并释放抗炎因子, 促进斑块分解并发挥抗炎修复功能。在对动脉粥样硬化动物模型的研究中发现, 激活 M1 型极化巨噬细胞或者抑制 M2 型极化巨噬细胞, 均可以加速动脉粥样硬化斑块的形成; 相反, 激活 M2 型极化巨噬细胞则可以显著抑制动脉粥样硬化的发生发展。对临床动脉粥样硬化病人组织切片分析发现, M1 型极化巨噬细胞富集于脂质累积的重度炎症斑块区域, 而 M2 型极化巨噬细胞则分布于炎症程度较低的区域。

目前, 临床上针对动脉粥样硬化的抗炎治疗策略包括使用传统抗炎药物 (如他汀类、阿司匹林等)、抑制炎症相关因子 TNF- α 、白介素类活性 (如白介素 IL-1 β 的单克隆抗体 canakinumab) 或抑制细胞内炎症信号通路相关分子, 如抑制 p38 MAPK 级联激酶、NADPH 氧化酶等炎症信号分子活性。然而, 临床药物多存在副作用大、炎症抑制特异性弱的缺点。

因此，调节巨噬细胞极化，靶向炎症的发生发展，对抑制动脉粥样硬化的形成具有关键作用。现有技术针对调节巨噬细胞极化的方法较少，而通过调节巨噬细胞极化影响抑制炎症发生发展还有待于改进和发展，需研发更加特异、效果更好的靶向调节方法，进而调节炎症相关疾病的发生发展。

发明内容

本申请提供了一种调节巨噬细胞极化状态的方法，通过药物刺激或者电刺激迷走神经激活胆碱能抗炎通路，影响不同极化类型的巨噬细胞的功能，从而抑制炎症的发生发展，并抑制动脉粥样硬化斑块的形成。

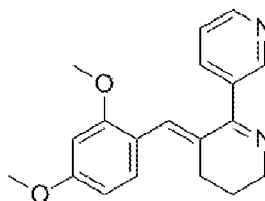
第一方面，本申请提供了一种调节巨噬细胞极化状态的方法，所述方法包括采用胆碱能抗炎通路激动剂和/或迷走神经电刺激信号激活巨噬细胞的胆碱能抗炎通路的步骤。

本申请中，采用胆碱能抗炎通路激动剂对巨噬细胞进行体外刺激，或采用电刺激信号对迷走神经进行体内刺激，均实现了对胆碱能抗炎通路的激活效果，抑制了 M1 型巨噬细胞的极化，促进了 M2 型巨噬细胞的极化。

优选地，所述胆碱能抗炎通路激动剂包括乙酰胆碱和/或胆碱受体激动药。

优选地，所述胆碱受体激动药包括 GTS-21 (DMBX-A)，是一种选择性的 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体激动剂。

GTS-21 具有如下结构：



本申请中，乙酰胆碱或 GTS-21 作为胆碱能抗炎通路激动剂，刺激并激活胆碱能抗炎通路，抑制了 M1 型促炎性巨噬细胞的功能，并促进了 M2 型抑炎性巨

噬细胞的功能，在特异性调节极化巨噬细胞功能及其引发的疾病方面具有重要应用。

优选地，所述乙酰胆碱的浓度为 10~200 μM ，例如可以是 10 μM 、50 μM 、100 μM 或 200 μM 。

优选地，所述 GTS-21 的浓度为 5~50 μM ，例如可以是 5 μM 、10 μM 、20 μM 或 50 μM 。

优选地，所述迷走神经电刺激信号的施加电压为 3~6 V，例如可以是 3 V、4 V、5 V 或 6 V，优选为 5 V。

优选地，所述迷走神经电刺激信号的施加时间为 1~5 ms，例如可以是 1 ms、2 ms、3 ms、4 ms 或 5 ms，优选为 2 ms。

优选地，所述迷走神经电刺激信号的施加频率为 1~5 Hz，例如可以是 1 Hz、2 Hz、3 Hz、4 Hz 或 5 Hz，优选为 2 Hz。

本申请中，电刺激信号刺激迷走神经，激活胆碱能抗炎通路，抑制了 M1 型促炎性巨噬细胞的功能，并促进了 M2 型抑炎性巨噬细胞的功能。

优选地，所述巨噬细胞包括 RAW264.7 和/或骨髓来源巨噬细胞。

第二方面，本申请提供了一种调节巨噬细胞极化状态的装置，所述装置包括胆碱能抗炎通路激动剂施加单元和/或迷走神经电刺激信号施加单元。

优选地，所述胆碱能抗炎通路激动剂施加单元用于向巨噬细胞施加乙酰胆碱和/或 GTS-21。

优选地，所述乙酰胆碱的浓度为 10~200 μM ，例如可以是 10 μM 、50 μM 、100 μM 或 200 μM 。

优选地，所述 GTS-21 的浓度为 5~50 μM ，例如可以是 5 μM 、10 μM 、20 μM 或 50 μM 。

优选地，所述施加的时间为 5~20 min，例如可以是 5 min、10 min、15 min 或 20 min。

优选地，所述迷走神经电刺激信号施加单元用于向迷走神经施加电刺激信号。

优选地，所述电刺激信号的施加电压为 3~6 V，例如可以是 3 V、4 V、5 V 或 6 V，优选为 5 V。

优选地，所述电刺激信号的施加时间为 1~5 ms，例如可以是 1 ms、2 ms、3 ms、4 ms 或 5 ms，优选为 2 ms。

优选地，所述电刺激信号的施加频率为 1~5 Hz，例如可以是 1 Hz、2 Hz、3 Hz、4 Hz 或 5 Hz，优选为 2 Hz。

第三方面，本申请提供了一种调节巨噬细胞极化状态的药物组合物，所述药物组合物包括胆碱能抗炎通路激动剂。

优选地，所述胆碱能抗炎通路激动剂包括乙酰胆碱和/或胆碱受体激动药。

优选地，所述胆碱受体激动药包括 GTS-21。

所述药物组合物还包括药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂中的任意一种或至少两种的组合。

本申请中，激活胆碱能抗炎通路的药物组合物具有特性作用性，可通过静脉注射导入生物体内，通过血液循环运输到特定部位，达到预防和治疗心血管慢性疾病、胃肠道炎症性疾病、神经系统疾病或恶性肿瘤的目的。

第四方面，本申请提供了第二方面所述的装置和/或第三方面所述的药物组合物在制备炎症相关疾病治疗药物中的应用。

优选地，所述疾病包括心血管疾病和/或神经系统疾病。

优选地，所述疾病包括动脉粥样硬化。

另一方面，本申请还提供了一种治疗炎症相关疾病的方法，包括：

向患者施用胆碱能抗炎通路激动剂和/或施加迷走神经电刺激信号，以激活患者的巨噬细胞的胆碱能抗炎通路。

与现有技术相比，本申请具有如下有益效果：

(1) 本申请利用乙酰胆碱或 GTS-21 激活胆碱能抗炎通路，抑制 M1 型促炎性巨噬细胞的功能，促进 M2 型抑炎性巨噬细胞的功能，实现了特异性调节极化巨噬细胞功能及其引发的疾病的效果；

(2) 本申请利用电刺激迷走神经激活胆碱能抗炎通路，在预防和治疗炎症性相关疾病方面具有重要意义。

附图说明

图 1 为技术方案路线图；

图 2 为乙酰胆碱和 GTS-21 抑制 M1 型巨噬细胞释放促炎性因子；

图 3 为乙酰胆碱和 GTS-21 促进 M2 型巨噬细胞极化；

图 4 为切断迷走神经后，GTS-21 激活的胆碱能抗炎通路延缓动脉粥样硬化的炎症和斑块形成。

具体实施方式

为进一步阐述本申请所采取的技术手段及其效果，以下结合实施例和附图对本申请作进一步地说明。可以理解的是，此处所描述的具体实施方式仅仅用于解释本申请，而非对本申请的限定。

实施例中未注明具体技术或条件者，按照本领域内的文献所描述的技术或条件，或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可通过正规渠道商购获得的常规产品。

本申请从调节极化巨噬细胞功能、特异性干预炎症反应的角度出发，运用

原代细胞培养、组织病理观察等技术手段，提出一种调节巨噬细胞极化功能、延缓炎症发生发展的方法，主要从以下方面列举实施例：1) 体外细胞实验证实激活胆碱能抗炎通路对巨噬细胞极化的调节作用；2) 利用动脉粥样硬化小鼠模型验证胆碱能抗炎通路激活对动脉粥样硬化炎症状态和主动脉斑块的抑制作用，技术方案路线图如图 1 所示。

实施例 1 骨髓来源的巨噬细胞的分离和培养

将小鼠脱颈处死，依次浸泡于两个 75%酒精烧杯中；用剪刀剪断大腿，分离股骨和胫骨，剔除皮肉后置于 10 mL RPMI1640 培养基（含 10%FBS）中；剪断股骨和胫骨的关节面，暴露骨髓腔，用 10 mL 注射器（1 mL 针头）冲洗骨髓腔，1 mL 移液枪吹散细胞；

细胞经细胞筛过滤后，收集细胞悬浮液至 50 mL 离心管中；1000 g 离心 8 min，弃上清，用含有 10 ng/mL 巨噬细胞集落刺激因子（MCSF）的 1640 培养基重悬细胞，接种于 6 孔板中进行培养；三天后添加含有 10 ng/mL MCSF 的培养基，再培养 3 天后获得的成熟骨髓来源的巨噬细胞（BMDM）。

实施例 2 乙酰胆碱和胆碱能受体激动剂对 M1 型巨噬细胞的影响

将 RAW264.7 或 BMDM 分别接种于 6 孔板中，待细胞密度达 70%左右时，加入不同浓度的乙酰胆碱（0、10、50、100、200 μ M）或胆碱能受体激动剂 GTS-21（0、5、10、20、50 μ M）处理 10 min；

使用脂多糖 LPS 或 IFN γ 刺激诱导 M1 巨噬细胞，24 h 后收集细胞，分析促炎性因子 TNF α 、IL-1 β 、IL-6 的表达。

结果如图 2 所示，在 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中，分别用不同浓度乙酰胆碱（Ach）和 GTS-21 进行处理 24 小时，然后分析促炎性因子 TNF α 、IL-1 β 和 IL-6 的相对表达，结果显示，LPS 诱导产生的促炎性因子能够被乙酰胆碱和

GTS-21 抑制，并呈现浓度依赖性。与此类似，在 IFN γ 诱导的原代骨源性巨噬细胞中，乙酰胆碱（Ach）和 GTS-21 能够浓度依赖性的抑制促炎性因子 TNF α 、IL-1 β 和 IL-6 的增加。

实施例 3 乙酰胆碱和胆碱能受体激动剂对 M2 型巨噬细胞的影响

将 RAW264.7 或 BMDM 分别接种于 6 孔板中，待细胞密度达 70%左右时，加入乙酰胆碱或胆碱能受体激动剂 GTS-21 处理 10 min；

使用 IL-4 刺激诱导 M2 巨噬细胞，24 h 后收集细胞，分析抗炎性因子精氨酸酶 1（Arg1）、TGF- β 、IL-10 的表达。

结果如图 3 所示，在 IL4 诱导的 M2 型巨噬细胞 RAW264.7 和原代骨髓源巨噬细胞中，乙酰胆碱（Ach）和 GTS-21 能够明显促进 M2 型巨噬细胞的分化，促进相关标志基因如 Arg1、TGF 以及 IL-10 的表达。

实施例 4 GTS-21 或电刺激对 Apoe^{-/-}小鼠动脉粥样硬化的影响

以高脂饲料（含 21%脂肪，0.15%胆固醇）喂养 Apoe^{-/-}小鼠 10 周，构建动脉粥样硬化模型小鼠；10 周后，对小鼠颈部下行的、位于颈动脉鞘内的单侧迷走神经进行切断手术；

向小鼠腹腔注射 4 mg/kg GTS-21，每 3 天一次，处理高脂饲料 Apoe^{-/-}小鼠；

实验结束后，眼球取血分析血清炎症因子的表达，并分离主动脉进行血管斑块分析。

本实施例同时设置空白对照组，注射等量的生理盐水。

结果如图 4 所示，迷走神经切断明显促进了血清炎症因子 TNF α 和 IL-6 的产生，并促进动脉斑块的形成；而切断迷走神经后 GTS-21 处理能够明显抑制血清炎症因子 TNF α 和 IL-6 的产生，并减缓动脉粥样硬化斑块的形成。

采用电刺激信号（5 V、2 ms、2 Hz）刺激动脉粥样硬化模型小鼠的迷走神

经,发现血清促炎症因子 TNF α 、IL-1 β 和 IL-6 的表达得到抑制,而抗炎因子 TGF 和 IL-10 的表达提高,说明电刺激迷走神经同样实现了对巨噬细胞极化状态的调节,即抑制了 M1 型巨噬细胞的极化,促进了 M2 型巨噬细胞的分化,减缓了动脉粥样硬化斑块的形成。

综上所述,本申请通过药物刺激或者电刺激迷走神经激活胆碱能抗炎通路,影响不同极化类型的巨噬细胞的功能,从而抑制炎症的发生发展,在炎症性疾病的预防和治疗方面具有重要意义。

申请人声明,本申请通过上述实施例来说明本申请的详细方法,但本申请并不局限于上述详细方法,即不意味着本申请必须依赖上述详细方法才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了,对本申请的任何改进,对本申请产品各原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等,均落在本申请的保护范围和公开范围之内。

权 利 要 求 书

1、一种调节巨噬细胞极化状态的方法，其包括采用胆碱能抗炎通路激动剂和/或迷走神经电刺激信号激活巨噬细胞的胆碱能抗炎通路的步骤。

2、根据权利要求1所述的方法，其中，所述胆碱能抗炎通路激动剂包括乙酰胆碱和/或胆碱受体激动药。

3、根据权利要求2所述的方法，其中，所述胆碱受体激动药包括 GTS-21。

4、根据权利要求2所述的方法，其中，所述乙酰胆碱的浓度为 10~200 μM 。

5、根据权利要求3所述的方法，其中，所述 GTS-21 的浓度为 5~50 μM 。

6、根据权利要求1-5 中任一项所述的方法，其中，所述迷走神经电刺激信号的施加电压为 3~6 V；

优选地，所述迷走神经电刺激信号的施加时间为 1~5 ms；

优选地，所述迷走神经电刺激信号的施加频率为 1~5 Hz。

7、根据权利要求1-6 任一项所述的方法，其中，所述巨噬细胞包括 RAW264.7 和/或骨髓来源巨噬细胞。

8、一种调节巨噬细胞极化状态的装置，其包括胆碱能抗炎通路激动剂施加单元和/或迷走神经电刺激信号施加单元。

9、根据权利要求8所述的装置，其中，所述胆碱能抗炎通路激动剂施加单元用于向巨噬细胞施加乙酰胆碱和/或 GTS-21；

优选地，所述乙酰胆碱的浓度为 10~200 μM ；

优选地，所述 GTS-21 的浓度为 5~50 μM ；

优选地，所述施加的时间为 5~20 min。

10、根据权利要求8所述的装置，其中，所述迷走神经电刺激信号施加单元用于向迷走神经施加电刺激信号；

优选地，所述电刺激信号的施加电压为 3~6 V；

优选地，所述电刺激信号的施加时间为 1~5 ms；

优选地，所述电刺激信号的施加频率为 1~5 Hz。

11、一种调节巨噬细胞极化状态的药物组合物，其包括胆碱能抗炎通路激动剂；

优选地，所述胆碱能抗炎通路激动剂包括乙酰胆碱和/或胆碱受体激动药；

优选地，所述胆碱受体激动药包括 GTS-21。

12、根据权利要求 11 所述的药物组合物，其中，所述药物组合物还包括药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂中的任意一种或至少两种的组合。

13、权利要求 8-10 任一项所述的装置和/或权利要求 11 或 12 所述的药物组合物在制备炎症相关疾病治疗药物中的应用。

14、根据权利要求 13 所述的应用，其中，所述疾病包括心血管疾病、脓血症、风湿性关节炎、神经系统疾病或肿瘤中的任意一种或至少两种的组合。

15、根据权利要求 13 所述的应用，其中，所述疾病包括动脉粥样硬化。

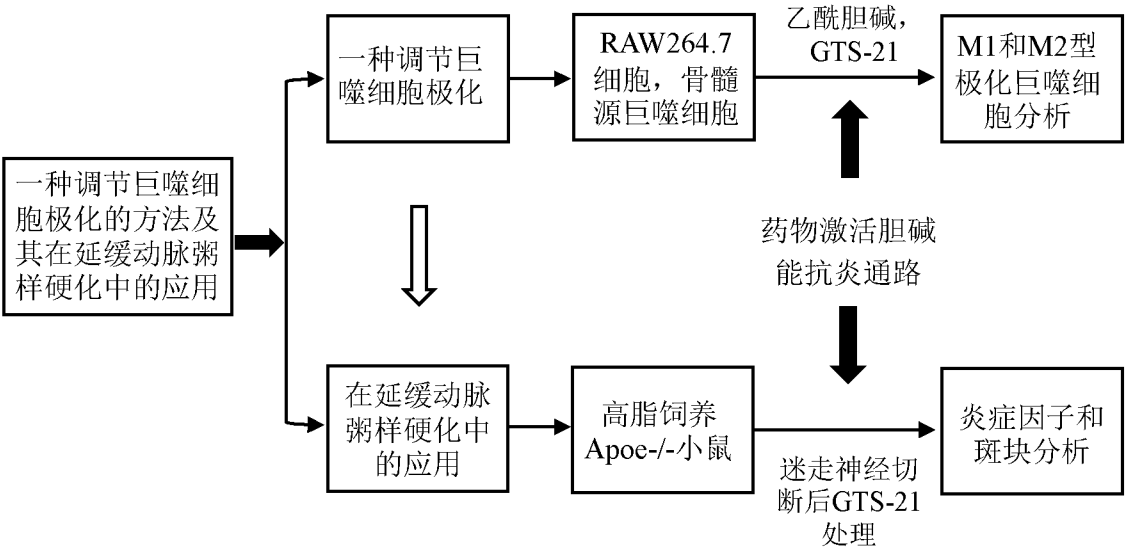


图 1

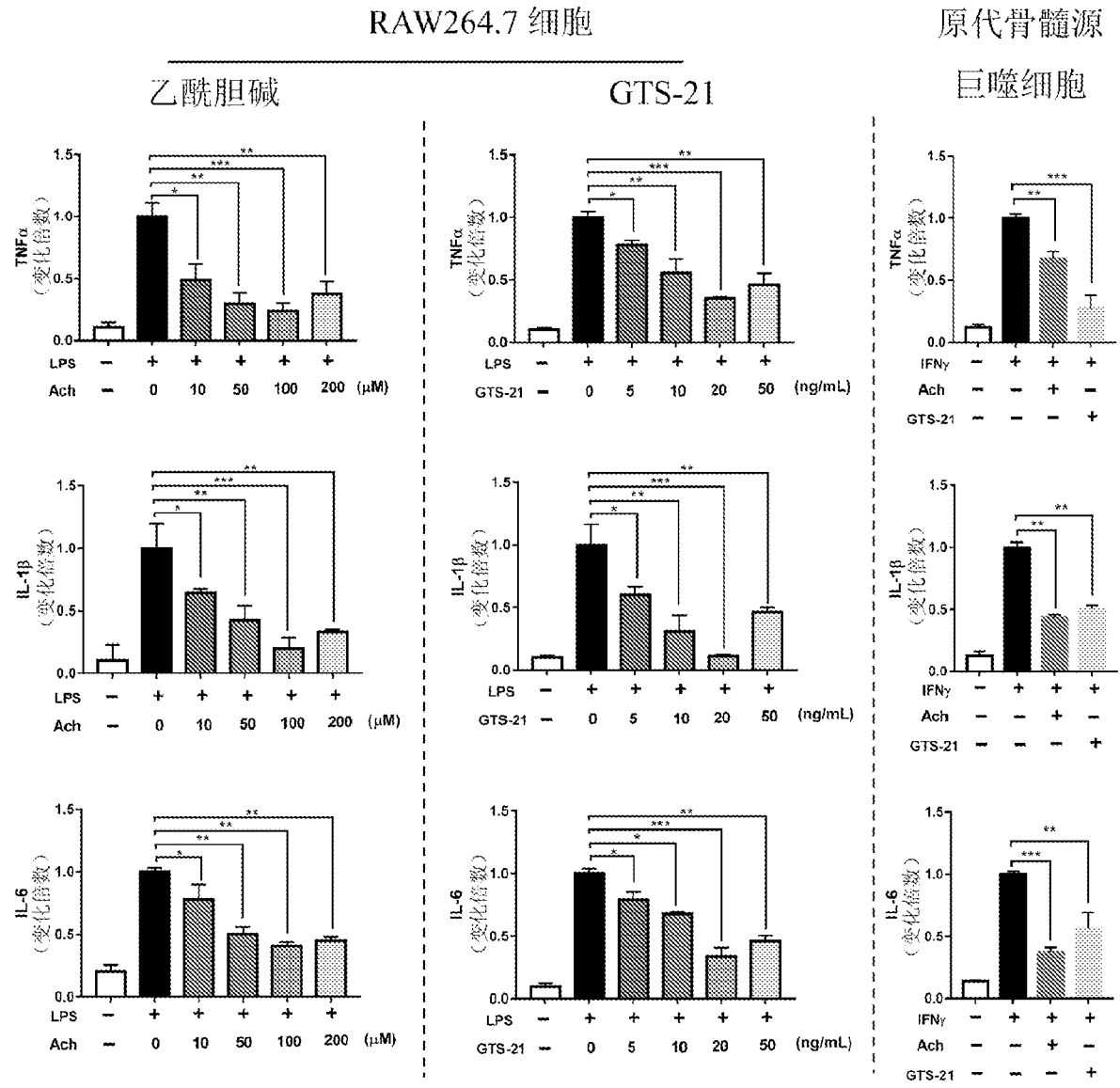
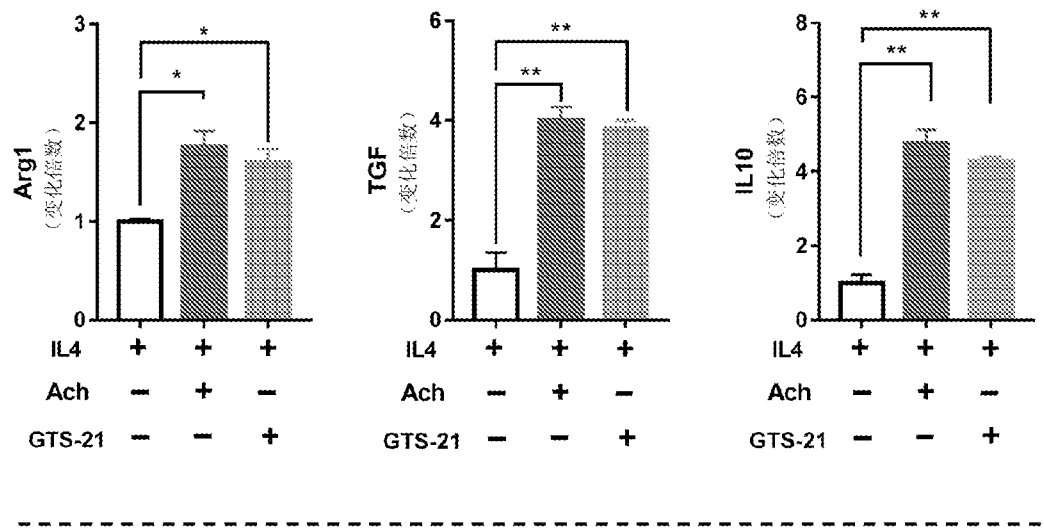


图 2

RAW264.7 细胞



原代骨髓源巨噬细胞

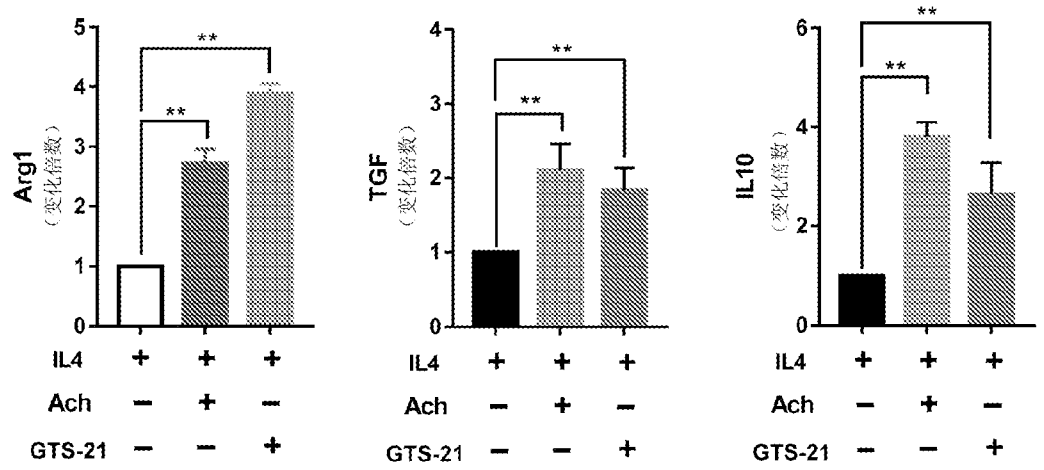


图 3

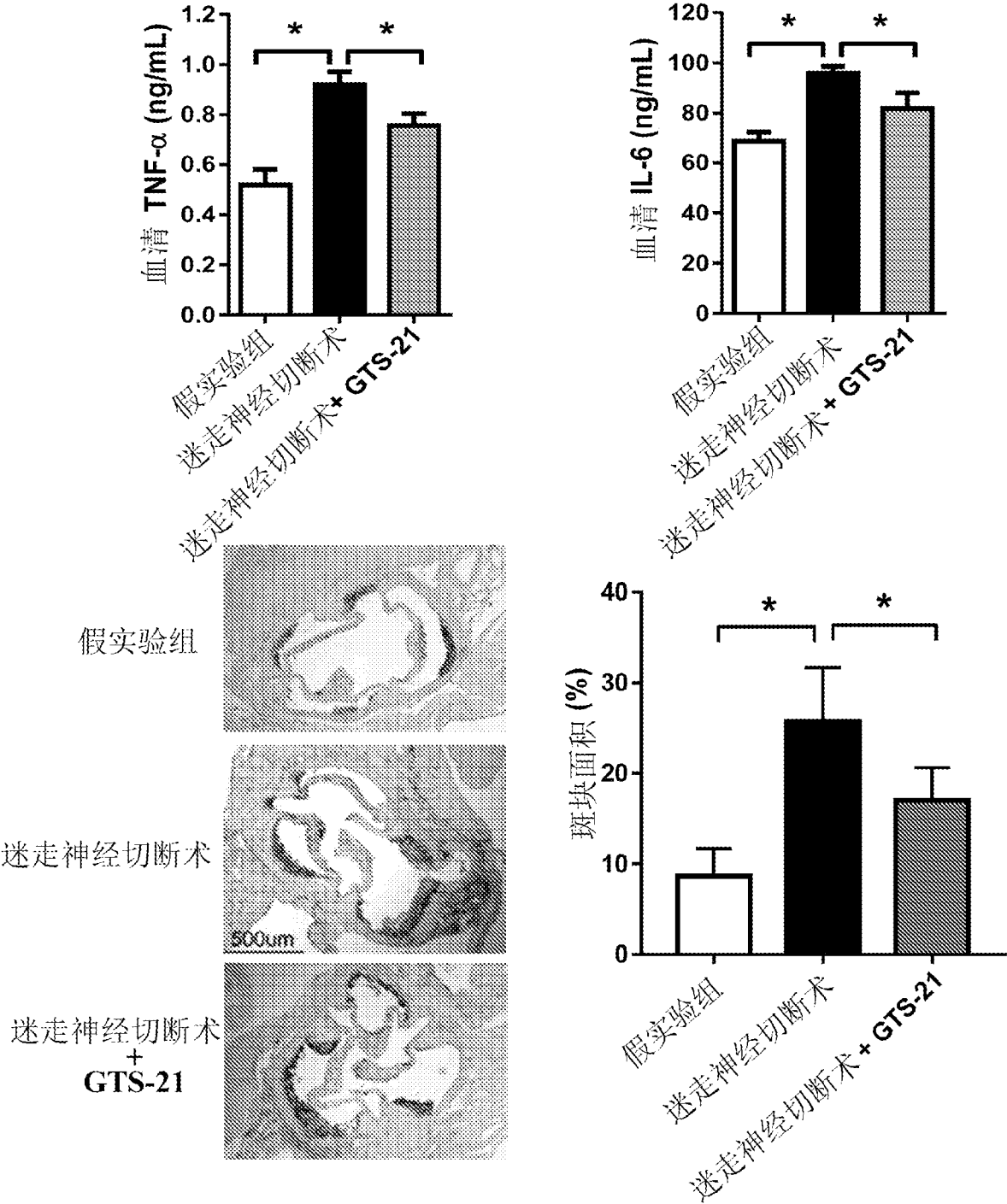


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/124288

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 45/00(2006.01)i; A61K 31/444(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; A61P 9/10(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)

DWPI;CNABS;CNTXT;USTXT;WOTXT;PUBMED;ISI WEB OF SCIENCE;CNKI:巨噬细胞、胆碱能、迷走神经、刺激、激动剂、电刺激、GTS-21、乙酰胆碱、动脉粥样硬化、炎症、inflammatory、macrophage、choline+、electri+、stimulat+、atherosclerosis

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2004204355 A1 (RADFORD, K.J. et al.) 14 October 2004 (2004-10-14) claims 1, 13, description, paragraphs 132-135, 219, 229, embodiments 1-3	1-15
X	US 2019117979 A1 (THE FEINSTEIN INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH) 25 April 2019 (2019-04-25) embodiments 2-3	1, 6-8, 10
X	US 2005125044 A1 (TRACEY, K.J.) 09 June 2005 (2005-06-09) embodiments 1-5	1-15
X	US 2009143831 A1 (HUSTON, J.M. et al.) 04 June 2009 (2009-06-04) claims 1-19	1, 6-8, 10
X	US 2018000899 A1 (ARIAD PHARMACEUTICALS, INC.) 04 January 2018 (2018-01-04) claims 1-20	1-5, 7-9, 11-13
A	丛琳 等 (CONG, Lin et al.). "电刺激在动脉粥样硬化中的作用 (Effect of Electrical Stimulation on Atherosclerosis)" <i>医学综述 (Medical Recapitulate)</i> , Vol. 26, No. 13, 31 July 2020 (2020-07-31), pp. 2497-2501	1-15



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

27 May 2021

Date of mailing of the international search report

09 June 2021

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/124288

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	陈基快 等 (CHEN, Jikuai et al.). "治疗炎性疾病的新靶点- $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体 (Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor: A Novel Therapeutic Target for Inflammatory Diseases)" 第二军医大学学报 (<i>Academic Journal of Second Military Medical University</i>), Vol. 33, No. 8, 31 August 2012 (2012-08-31), pp. 897-899	1-15
A	DEUTSCH, S.I. et al. "Therapeutic Implications of a Selective $\alpha 7$ Nicotinic Receptor Abnormality in Schizophrenia" <i>THE ISRAEL JOURNAL OF PSYCHIATRY AND RELATED SCIENCES</i> , Vol. 42, No. 1, 31 December 2005 (2005-12-31), pp. 33-44	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/124288

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **1-7**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Claims 1-7 relate to a method for regulating macrophages, and pertain to methods for treating diseases under PCT Rule 39.1 (iv). However, a search has been carried out on the basis of the uses thereof in a drug preparation.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/124288

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2004204355	A1	14 October 2004	PT	1949901	E	23 May 2014
				IL	168787	A	30 November 2010
				CN	102657651	A	12 September 2012
				EP	1581223	B1	14 November 2007
				DK	1949901	T3	19 May 2014
				EP	1581223	B2	25 May 2016
				ES	2293086	T3	16 March 2008
				AT	378048	T	15 November 2007
				AU	2003298939	C1	30 June 2004
				EP	1949901	A2	30 July 2008
				JP	5925178	B2	25 May 2016
				SI	1949901	T1	30 June 2014
				EP	2062595	A1	27 May 2009
				EP	1949901	A3	15 October 2008
				JP	2006514946	A	18 May 2006
				CA	2507502	C	29 November 2011
				WO	2004052365	A2	24 June 2004
				AU	2003298939	A1	30 June 2004
				WO	2004052365	A3	23 September 2004
				CA	2507502	A1	24 June 2004
				JP	2011105745	A	02 June 2011
				DE	60317564	T2	23 October 2008
				IL	206855	A	30 November 2015
				CN	1735414	A	15 February 2006
				EP	1581223	A2	05 October 2005
				JP	2014055178	A	27 March 2014
				EP	1949901	B1	12 February 2014
				AU	2003298939	B2	15 March 2007
				US	7273872	B2	25 September 2007
				DE	60317564	D1	27 December 2007
				JP	4750421	B2	17 August 2011
				JP	2016084355	A	19 May 2016
				ES	2462545	T3	23 May 2014
				SI	EP1949901	T1	30 June 2014
US	2019117979	A1	25 April 2019	US	8914114	B2	16 December 2014
				US	2015100100	A1	09 April 2015
				US	2017266448	A1	21 September 2017
				US	9987492	B2	05 June 2018
				US	10166395	B2	01 January 2019
				US	10561846	B2	18 February 2020
				US	2005125044	A1	09 June 2005
				US	2009248097	A1	01 October 2009
US	2005125044	A1	09 June 2005	US	8914114	B2	16 December 2014
				US	2015100100	A1	09 April 2015
				US	2017266448	A1	21 September 2017
				US	2019117979	A1	25 April 2019
				US	9987492	B2	05 June 2018
				US	10166395	B2	01 January 2019
				US	10561846	B2	18 February 2020
				US	2009248097	A1	01 October 2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/124288

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2009143831	A1	04 June 2009	None			
US	2018000899	A1	04 January 2018	US	2012225114	A1	06 September 2012
				US	2006257359	A1	16 November 2006
				US	2015150945	A1	04 June 2015

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/124288

A. 主题的分类

A61K 45/00(2006.01)i; A61K 31/444(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; A61P 9/10(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))

DWPI;CNABS;CNTXT;USTXT;WOTXT;PUBMED;ISI WEB OF SCIENCE;CNKI:巨噬细胞、胆碱能、迷走神经、刺激、激动剂、电刺激、GTS-21、乙酰胆碱、动脉粥样硬化、炎症、inflammatory、macrophage、choline+、electri+、stimulat+、atherosclerosis

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	US 2004204355 A1 (TRACEY, K. J. 等) 2004年 10月 14日 (2004 - 10 - 14) 权利要求1、13, 说明书第132-135、219、229段、实施例1-3	1-15
X	US 2019117979 A1 (THE FEINSTEIN INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH) 2019年 4月 25日 (2019 - 04 - 25) 实施例2-3	1、6-8、10
X	US 2005125044 A1 (TRACEY, K. J.) 2005年 6月 9日 (2005 - 06 - 09) 实施例1-5	1-15
X	US 2009143831 A1 (HUSTON, J. M. 等) 2009年 6月 4日 (2009 - 06 - 04) 权利要求1-19	1、6-8、10
X	US 2018000899 A1 (APELLIS PHARMACEUTICALS, INC.) 2018年 1月 4日 (2018 - 01 - 04) 权利要求1-20	1-5, 7-9, 11-13
A	丛琳 等. “电刺激在动脉粥样硬化中的作用” 医学综述, 第26卷, 第13期, 2020年 7月 31日 (2020 - 07 - 31), 第2497-2501页	1-15

☒ 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

2021年 5月 27日

国际检索报告邮寄日期

2021年 6月 9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

授权官员

李恩

电话号码 86-(10)-53961874

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	陈基快 等. "治疗炎症性疾病的新靶点- $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体" 第二军医大学学报, 第33卷, 第8期, 2012年 8月 31日 (2012 - 08 - 31), 第897-899页	1-15
A	DEUTSCH, S.I. 等. "Therapeutic Implications of a Selective $\alpha 7$ Nicotinic Receptor Abnormality in Schizophrenia" THE ISRAEL JOURNAL OF PSYCHIATRY AND RELATED SCIENCES, 第42卷, 第1期, 2005年 12月 31日 (2005 - 12 - 31), 第33-44页	1-15

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 1-7
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求1-7涉及一种调节巨噬细胞的方法，属于PCT Rule 39.1 (iv) 规定的疾病的治疗方法，但仍然基于其制药用途进行了检索。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/124288

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)
US	2004204355	A1	2004年 10月 14日	PT	1949901	E	2014年 5月 23日
				IL	168787	A	2010年 11月 30日
				CN	102657651	A	2012年 9月 12日
				EP	1581223	B1	2007年 11月 14日
				DK	1949901	T3	2014年 5月 19日
				EP	1581223	B2	2016年 5月 25日
				ES	2293086	T3	2008年 3月 16日
				AT	378048	T	2007年 11月 15日
				AU	2003298939	C1	2004年 6月 30日
				EP	1949901	A2	2008年 7月 30日
				JP	5925178	B2	2016年 5月 25日
				SI	1949901	T1	2014年 6月 30日
				EP	2062595	A1	2009年 5月 27日
				EP	1949901	A3	2008年 10月 15日
				JP	2006514946	A	2006年 5月 18日
				CA	2507502	C	2011年 11月 29日
				WO	2004052365	A2	2004年 6月 24日
				AU	2003298939	A1	2004年 6月 30日
				WO	2004052365	A3	2004年 9月 23日
				CA	2507502	A1	2004年 6月 24日
				JP	2011105745	A	2011年 6月 2日
				DE	60317564	T2	2008年 10月 23日
				IL	206855	A	2015年 11月 30日
				CN	1735414	A	2006年 2月 15日
				EP	1581223	A2	2005年 10月 5日
				JP	2014055178	A	2014年 3月 27日
				EP	1949901	B1	2014年 2月 12日
				AU	2003298939	B2	2007年 3月 15日
				US	7273872	B2	2007年 9月 25日
				DE	60317564	D1	2007年 12月 27日
				JP	4750421	B2	2011年 8月 17日
				JP	2016084355	A	2016年 5月 19日
				ES	2462545	T3	2014年 5月 23日
				SI	EP1949901	T1	2014年 6月 30日
US	2019117979	A1	2019年 4月 25日	US	8914114	B2	2014年 12月 16日
				US	2015100100	A1	2015年 4月 9日
				US	2017266448	A1	2017年 9月 21日
				US	9987492	B2	2018年 6月 5日
				US	10166395	B2	2019年 1月 1日
				US	10561846	B2	2020年 2月 18日
				US	2005125044	A1	2005年 6月 9日
				US	2009248097	A1	2009年 10月 1日
US	2005125044	A1	2005年 6月 9日	US	8914114	B2	2014年 12月 16日
				US	2015100100	A1	2015年 4月 9日
				US	2017266448	A1	2017年 9月 21日
				US	2019117979	A1	2019年 4月 25日
				US	9987492	B2	2018年 6月 5日
				US	10166395	B2	2019年 1月 1日
				US	10561846	B2	2020年 2月 18日
				US	2009248097	A1	2009年 10月 1日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/124288

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)
US	2009143831	A1	2009年 6月 4日	无	
US	2018000899	A1	2018年 1月 4日	US	2012225114 A1 2012年 9月 6日
				US	2006257359 A1 2006年 11月 16日
				US	2015150945 A1 2015年 6月 4日