

(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 10 月 1 日 (01.10.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/192233 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 31/365 (2006.01) *A61P 1/16* (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2019/130839
- (22) 国际申请日: 2019 年 12 月 31 日 (31.12.2019)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201910243173.9 2019 年 3 月 28 日 (28.03.2019) 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 518000 (CN)。

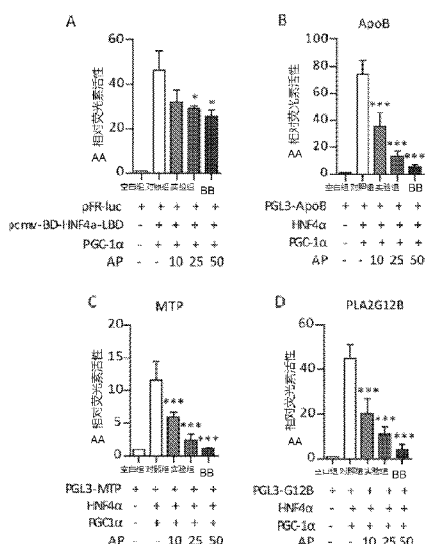
(72) 发明人: 管敏 (GUAN, Min); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518000 (CN)。张敏仪 (ZHANG, Minyi); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518000 (CN)。

(74) 代理人: 深圳中一联合知识产权代理有限公司 (SHENZHEN ZHONGYI UNION INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国广东省深圳市福田区园岭街道深南中路 1014 号报春大厦 9 楼 (5 号信箱), Guangdong 518028 (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,

(54) Title: APPLICATION OF ANDROGRAPHOLIDE IN PREPARATION OF DRUGS FOR DISEASES RELATED TO ABNORMAL LIPID METABOLISM

(54) 发明名称: 穿心莲内酯在制备脂代谢异常相关疾病药物中的应用



AA Relative fluorescein activity
BB Blank group Control group Experimental group

图 1

(57) Abstract: Provided are an use of andrographolide as a regulator for reducing lipid synthesis and/or reducing the formation and secretion of very low density lipoproteins and an application of andrographolide in drugs. Further disclosed is a method for a drug containing an effective dose of andrographolide and acting as a regulator of HNF4α to reduce the expression of genes MTP, APOB and PLA2G12B, and simultaneously reduce the expression of genes SREBP-1, FASN and SCD-1. The andrographolide can reduce the expression of lipid metabolism-related genes and interfere with the interaction of HNF4α/PGC-1α in liver cells, and reduce the expression of downstream target genes. Therefore, the andrographolide can reduce lipid synthesis and the formation and secretion of very low density lipoprotein so as to reduce blood lipids and lower lipid content in the liver, thereby ultimately playing the function of preventing and/or treating diseases related to abnormal lipid metabolism. Moreover, the andrographolide is an effective ingredient of natural drugs, and has good curative effect and low toxic and side effect.

(57) 摘要: 提供一种穿心莲内酯作为降低脂质合成的调节剂和/或降低极低密度脂蛋白形成与分泌的调节剂和药物中的应用。进一步, 含有有效剂量的穿心莲内酯的药物, 作为HNF4α的调节剂、下调基因MTP、APOB和PLA2G12B的表达, 同时下调基因SREBP-1、FASN、SCD-1表达的方法。所述穿心莲内酯能够下调脂代谢相关基因的表达和干扰肝脏细胞内HNF4α/PGC-1α相互作用, 下调其下游靶基因的表达, 因此, 穿心莲内酯能够降低脂质合成和极低密度脂蛋白形成和分泌, 以降低血脂和降低肝脏内脂质含量, 最终起到预防和/或治疗脂代谢异常相关疾病的作用。另外, 由于穿心莲内酯是天然药物的有效成分, 疗效好, 毒副作用小。

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, 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))。

穿心莲内酯在制备脂代谢异常相关疾病药物中的应用

技术领域

本发明属于生物医药技术领域,具体的是涉及一种穿心莲内酯在制备脂代谢异常相关疾病药物中的应用。

5 背景技术

脂代谢异常是指血浆及其他组织器官中脂质及其代谢产物质的异常,常伴有胆固醇或甘油三酯(TG)水平的升高,可分为原发性和继发性两类。脂代谢紊乱是非酒精性脂肪肝(NAFLD)、动脉粥样硬化(AS)、心脑血管疾病和糖尿病等发病关键影响因子。

10 随着社会的发展,人们的饮食呈富余化趋势,因血脂升高导致的动脉粥样硬化、冠心病等心血管脂代谢异常导致的慢性疾病率逐年升高,并呈年轻化趋势。我国成人血脂异常患病率高达18.6%,其中高胆固醇血症占2.9%,高甘油三酯血症占11.9%,低高密度脂蛋白血症占7.4%。临床统计表明,近年来心肌梗死病死亡人数中77%是由于高血脂造成的。其中,动脉粥样硬化和冠心病,15 是全球常见多发病,严重危害人类健康和生存质量。NAFLD是指除酒精外其他因素所致的肝细胞内脂肪过度沉积的病理综合征。近年随着肥胖及相关代谢综合征全球化趋势,NAFLD在我国发病率逐年上升且日趋低龄化,国内报道肥胖儿童和青少年中NAFLD的检出率高达23.3%~59.6%,显著高于国外。如何控制血脂代谢异常、遏止心脑血管病迅猛增长势头,已成为我国公共卫生20 事业面临的严重挑战。

降低血脂对于治疗脂代谢异常疾病具有重要意义,因而,降血脂药物已成为近年来药物研究的热点之一。目前临床应用的降血脂药主要有他汀类、贝特类、烟酸类、胆酸螯合剂类等。其中他汀类药治疗效果最好,能有效地降低血清中的低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和三酰甘油(TG),其副作用是大剂量服用会产生肌毒和升高肝转氨酶。贝特类降甘油三酯效果显著,可能会引起胃肠道不适和肾功能损伤。而缓释烟酸在升高高密度脂蛋白(HDL)方面表现良好,可25

能引起胃肠道不适和肝肾副作用。胆固醇吸收抑制剂依替米贝和胆酸螯合剂考来维仑主要降低LDL-C,但这些药物也有一定的不良反应,如面部或舌咽部水肿,以及脂溶性维生素缺失。

用天然药物改善血脂异常具有一定效果,使用相对安全,适宜长期服用。

5 近年来,关于中药活性成分改善血脂异常有很多报道,也筛选出了一批有效的天然产物,但大多数研究只停留在药效学研究,在治疗机制和药理作用环节方面研究较少。

穿心莲内酯(andrographolide, AP)是穿心莲的主要活性成分,穿心莲为爵床科植物穿心莲(*Andrographis*)的全草或叶。又名春莲秋柳、一见喜、榄核莲、苦胆草、金香草、金耳钩、印度草和苦草。有清热解毒、消炎、消肿止痛作用。10 主治细菌性痢疾、尿路感染、急性扁桃体炎、肠炎、咽喉炎、肺炎和流行性感冒,外用可治疗疮疖肿毒和外伤感染。在亚洲许多国家广泛用于治疗病毒感染、糖尿病、风湿关节炎、咽喉炎和腹泻。随着对穿心莲的研究不断深入,最近有报道穿心莲及其类类似物穿心莲表现出良好的癌症(Satyanarayana et al., 15 Science 2003, 299, 363-370)治疗,并在治疗或预防艾滋病、阿尔茨海默氏病和肝炎取得了进展,虽然目前发现少量有关于穿心莲内酯在调节脂代谢紊乱疾病方面的研究报道,但是至今没有看到关于穿心莲内用于调节脂代谢紊乱疾病药理作用机制的研究报道。

技术问题

20 本发明的目的在于克服现有技术的上述不足,提供一种穿心莲内酯在作为制备脂代谢异常相关疾病药物中的应用,以解决穿心莲内酯目前常仅局限用于抗肿瘤和抗病毒以及现有脂代谢异常相关疾病药物副作用较大的技术问题。

技术解决方案

为了实现上述发明目的,本发明的一方面,提供了穿心莲内酯在如下至少25 一方面的应用:

作为抑制脂质合成的调节剂;

作为降低极低密度脂蛋白形成与分泌的调节剂。

本发明的另一方面,提供了用于抑制脂质合成或降低极低密度脂蛋白形成

与分泌的药物。所述药物包括有效剂量的穿心莲内酯。

本发明的又一方面，提供了一种干扰 HNF4 α 与 PGC-1 α 作用的方法。所述干扰 HNF4 α 与 PGC-1 α 作用的方法包括将有效剂量的穿心莲内酯或本发明用于抑制脂质合成或降低极低密度脂蛋白形成与分泌的药物与具有表达
5 HNF4 α 的细胞细胞接触的步骤。

同时，还提供了一种下调基因 MTP、APOB 和 PLA2G12B 表达的方法。所述方法包括将有效剂量的穿心莲内酯或本发明用于降低极低密度脂蛋白形成与分泌的药物与具有表达 MTP、APOB 和 PLA2G12B 的细胞接触的步骤。

以及，还提供了一种下调基因 SREBP-1、FASN、SCD-1 表达的方法。所述
10 述方法包括将有效剂量的穿心莲内酯或本发明用于抑制脂质合成的药物与具有表达 SREBP-1、FASN、SCD-1 的细胞接触的步骤。

与现有技术相比，本发明穿心莲内酯的应用具有以下有益效果：

经实验证明，所述穿心莲内酯能够下调包括基因 FASN、SCD-1、SREBP-1 表达等作用，同时干扰 HNF4 α 与 PGC-1 α 相互作用，下调其 MTP、APOB 和
15 PLA2G12B 的表达，从而降低脂质合成和/或降低极低密度脂蛋白形成与分泌，因此，将所述穿心莲内酯作为降低脂质合成和/或降低极低密度脂蛋白形成与分泌调节剂，能够有效下调 SREBP1c、FASN、SCD1 表达实现降低脂质合成，还能抑制极低密度脂蛋白形成和分泌，具体的如干扰 HNF4 α 与 PGC-1 α 相互作用和下调包括基因下调 MTP、APOB 和 PLA2G12B 表达。

20 有益效果

本发明用于抑制脂质合成或降低极低密度脂蛋白形成与分泌的药物由于含有有效剂量的穿心莲内酯，因此，所述药物能够下调脂代谢相关基因的表达，从而降低脂质合成和极低密度脂蛋白形成和分泌，以降低血脂和降低肝脏内脂质含量，最终起到预防和/或治疗脂代谢异常相关疾病的作用。另外，由于穿

心莲内酯是天然药物的有效成分，疗效好，毒副作用小。

附图说明

下面将结合附图及实施例对本发明作进一步说明，附图中：

图 1 为实施例 1 中 AP 对 HNF4 α -LBD 活性及 VLDL 分泌相关基因启动子
5 转录活性的影响图；其中，图 1-A 为 AP 对 HNF4 α -LBD 活性的影响图，图 1-B
为 AP 对 APOB 启动子转录活性的影响图，图 2-C 为 AP 对 MTP 启动子转录
活性的影响图，图 2-D 为 AP 对 PLA2G12B 启动子转录活性的影响图，且 $n=4$ ，
与空白对照组比较， $*P < 0.05$ ， $***P < 0.001$ ；

图 2 为实施例 2 中对照组和给药组中 AP 为 $10\mu\text{ mol/L}$ 对 Huh-7 细胞脂代
10 谢关键基因 mRNA 表达影响图；其中，图 2-A 至图 2-C 为 AP 对参与 VLDL
装配和分泌相关基因 mRNA 表达影响图；图 2-D 至图 2-G 为 AP 对参与调控
脂肪酸和甘油三酯生物合成相关基因 mRNA 表达的影响图；且 $n=4$ ，与对照
组比较， $*P < 0.05$ ， $**P < 0.01$ ， $***P < 0.001$ ；

图 3 为实施例 3 中不同浓度穿心莲内酯对小鼠原代肝细胞脂滴水平的影响
15 图；其中，图 3-A 为 AP 小鼠原代肝细胞脂滴荧光染色图；图 3-B 为对照组和
实验组中胞内脂滴荧光区域统计柱状图；图 3-C 为对照组和实验组中胞内甘油
三酯水平图；且 $n=4$ ，与空白对照组比较， $*P < 0.05$ ， $**P < 0.01$ ， $***P < 0.001$ ；

图 4 为实施例 4 中对照组和给药组中 AP 为 100mg/kg/天 短期加药对小鼠
肝脏中脂代谢相关基因表达的影响影响图；其中，图 4-A 至图 4-C 为 AP 对参
20 与 VLDL 装配和分泌相关基因 mRNA 表达影响图；图 4-D 至图 4-F 为 AP 对
参与调控脂肪酸和甘油三酯生物合成相关基因 mRNA 表达的影响图；且 $n=6$ ，
与对照组比较， $*P < 0.05$ ， $**P < 0.01$ ；

图 5 为实施例 5 中普通组、高脂组和高脂加药组中 AP 对高脂小鼠血脂的

影响图；其中，图 5-A 至 5-D 为 CD 小鼠、HFD 小鼠及 HFD+AP 小鼠血清中甘油三酯(TG)、胆固醇(TC)、高密度脂蛋白(HDL-C)、低密度脂蛋白(LDL-C)的水平，图 5-E 为 CD 小鼠、HFD 小鼠及 HFD+AP 小鼠血清甘油三酯(TG)水平变化，图 5-F 为 CD 小鼠、HFD 小鼠及 HFD+AP 小鼠 VLDL 分泌率的检测。

- 5 G: CD 小鼠、HFD 小鼠及 HFD+AP 小鼠血清中 ApoB 水平，图 5-H 为 CD 小鼠、HFD 小鼠及 HFD+AP 小鼠肝脏蛋白 western blot 结果。且 $n=8$ ，与空白对照组比较， $*P < 0.05$ ， $**P < 0.01$ ， $***P < 0.001$ 。 $\#P < 0.05$ ， $\##P < 0.01$ ， $\###P < 0.001$ ；

- 10 图 6 为实施例 5 中普通组、高脂组和高脂加药组中 AP 对高脂小鼠肝脏组织的影响图；其中，图 6-A 为 CD 小鼠、HFD 小鼠及 HFD+AP 小鼠肝脏中甘油三酯(TG)的水平，图 6-B 至 6-C 为 CD 小鼠、HFD 小鼠及 HFD+AP 小鼠血清中 ALT、AST 水平，图 6-D 为 CD 小鼠、HFD 小鼠及 HFD+AP 小鼠肝脏及油红、HE 染色；且 $*P < 0.05$ ， $**P < 0.01$ ， $***P < 0.001$ 。 $\#P < 0.05$ ， $\##P < 0.01$ ， $\###P < 0.001$ 。

15 本发明的实施方式

为了使本发明要解决的技术问题、技术方案及有益效果更加清楚明白，以下结合实施例与附表，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。

本文中涉及的相关专用名称的解释：

- 20 穿心莲内酯 (andrographolide, AP)：是从植物穿心莲中提取得到的活性成分，药性和毒性试验结果显示，在急性毒性实验中，小鼠灌服穿心莲内酯的 LD50 在 40g/kg 以上，小鼠每日最大耐受量为 110.25g/kg。亚急性毒性实验中，对大鼠或家兔灌服穿心莲内酯 1g/kg，每日 1 次，连续 7 日，未见明显的毒性。穿琥宁注射液 84mg/kg 腹腔注射每日 1 次，连续 10 天，无
- 25 明显毒性作用。

肝细胞核因子 4 α (HNF4 α): 是核激素受体超家族的一种保守性的配体依赖性转录因子, 主要表达于肝脏、肾脏、肠道。

分泌型的磷脂酶 A2G12B (PLA2G12B): 是分泌型磷脂酶家族的成员之一, 主要在小鼠肝脏和小肠中表达。

5 PGC-1 α : 辅助激活因子-1 α (PPAR γ coactivator-1 α)

FASN: 脂肪酸合成酶 (Fatty acid synthase)

SCD-1: 硬脂酰辅酶 A1

ACAC α : 乙酰辅酶 A 羧化酶 α

MTP: 微粒体甘油三酯转运蛋白(microsomal triglyceride transfer protein)

10 极低密度脂蛋白 (VLDL): 是由肝脏利用乳糜颗粒残粒、胆汁酸、脂肪酸、糖和蛋白质的中间代谢物与肝脏内合成的载脂蛋白组成的一种脂蛋白, 在肝细胞中组装合成并携带脂类, 是将肝脏脂质分泌输出到外周组织的主要途径。

15 脂质代谢异常: 是先天性或获得性因素造成的血液及其他组织器官中脂质及其代谢产物质和量的异常, 其具体病症主要包括高脂蛋白血症等。

本发明的发明人基于大量研究发现, 穿心莲内酯具有下调脂代谢相关基因的表达, 以降低血脂和肝脂的等相关作用, 基于此, 本发明实施例提供了穿心莲内酯在下文相关方面的应用。

一方面, 本发明实施例提供了穿心莲内酯在如下至少一方面的应用:

20 (1) 作为抑制脂质合成的调节剂;

(2) 作为降低极低密度脂蛋白形成与分泌的调节剂。

经发明人构建的相关实验得知, 所述穿心莲内酯作为活性成分, 能够有效下调脂代谢相关基因的表达, 从而抑制或降低脂质合成过程, 抑制或降低极低

密度脂蛋白形成和分泌过程，最终达到降低肝脂和血脂的作用，从而改善脂代谢异常相关疾病。

如在一实施例中，所述穿心莲内酯具有下调包括基因 SREBP-1、FASN、SCD-1 表达的作用。因此，所述穿心莲内酯可以被用于下调包括基因 SREBP-1、FASN、SCD-1 表达的调节剂，以及进一步可以用于制备下调包括基因 SREBP-1、FASN、SCD-1 表达的相关药物，以有效下调脂质合成如抑制肝脏脂质合成过程中的相关基因表达，从而实现抑制脂质合成如抑制肝脏脂质合成，达到降低相关细胞如肝脏细胞脂质形成以达到降脂如降肝脂作用，从而改善脂代谢异常相关疾病的临床效果。

研究发现，HNF4 α 是调节肝脏脂代谢的重要转录因子。是细胞核受体超家族的成员之一，HNF4 α 在肝脏中高表达，接下来依次是肾、小肠、结肠和胰腺细胞。其作用模式是：HNF4 α 蛋白含有锌指结构，以同源二聚体的形式结合在 DNA 上，其识别位点是同向重复的 AGGTCA 元件，通过招募转录辅激活因子和其他辅助蛋白，上调靶基因的表达。在肝脏组织中，HNF4 α 仅定位于细胞核中，调控大量基因的组成型表达，这些基因编码的蛋白包括各种酶、转运蛋白、其他核受体以及大部分肝脏特异性表达的基因。而发明人在研究发现，所述穿心莲内酯具有调节 HNF4 α 与 PGC-1 α 相互作用，从而下调其下游靶相关基因表达，其中，下调其下游靶相关基因包括 MTP、APOB 和 PLA2G12B。因此，在一实施例中，所述穿心莲内酯可以作为 HNF4 α 调节剂的应用，以及进一步可以用于制备调节 HNF4 α 与 PGC-1 α 相互作用的相关药物，从而有效调节 HNF4 α 与 PGC-1 α 相互作用，以下调其下游相关靶基因的表达，从而降低极低密度脂蛋白形成和分泌，最终降低如肝脂作用和降低血脂的作用，从而改善脂代谢异常相关疾病的临床效果。

由于所述穿心莲内酯具有下调 HNF4 α /PGC-1 α 下游相关靶基因包括 MTP、APOB 和 PLA2G12B 等的表达的作用。因此，在具体实施例中，所述穿心莲内酯作为下调包括基因 MTP、APOB 和 PLA2G12B 表达的调节剂的应用，以及进一步可以用于制备调节 HNF4 α 与 PGC-1 α 相互作用的相关药物，从而实
5 现降低极低密度脂蛋白形成和分泌，最终降低如肝脂作用和降低血脂的作用，从而改善脂代谢异常相关疾病的临床效果。

基于上文所述穿心莲内酯能够有效下调脂代谢相关基因的表达，从而降低脂质合成以及抑制极低密度脂蛋白形成和分泌过程等作用，所述穿心莲内酯可以被用于制备预防和/或治疗脂代谢异常相关疾病药物，进一步是作为制备抑
10 制脂质合成的药物或降低极低密度脂蛋白形成与分泌的药物。具体如上文所述的，所述穿心莲内酯可以被用于制备下调包括基因 SREBP-1、FASN、SCD-1 表达的药物、被用于制备调节 HNF4 α 与 PGC-1 α 相互作用的药物、被用于制备下调包括基因 MTP、APOB 和 PLA2G12B 表达的药物。那么相应的本发明实施例还提供了一种预防和/或治疗脂代谢异常相关疾病的药物，进一步提供
15 了一种用于抑制脂质合成或降低极低密度脂蛋白形成与分泌的药物，具体提供了一种下调包括基因 SREBP-1、FASN、SCD-1 表达的药物、调节 HNF4 α 与 PGC-1 α 相互作用的药物、下调包括基因 MTP、APOB 和 PLA2G12B 表达的药物。所述药物包括有效剂量的活性成分穿心莲内酯。另外，所述药物还可以包括能够有效预防和/或治疗脂代谢异常相关疾病的其他活性成分，此处所述的
20 “有效”是单独预防和/或治疗脂代谢异常相关疾病有临床效果的成分，也可以是与穿心莲内酯进行复合后能够提高穿心莲内酯预防和/或治疗脂代谢异常相关疾病有临床效果的成分。所述“有效剂量”是指能够预防和/或治疗脂代谢异常相关疾病的有效量，是指足以对个体显示益处或临床意义的穿心莲内酯

的量。本领域技术人员将会理解，给药的实际量或剂量以及给药时程将取决于被预防或治疗的疾病的性质和严重性、被预防或治疗的受试者的年龄和一般状况以及给药方式等。如在一实施例中，所述穿心莲内酯在所述药物中的有效剂量为 50-100 mg/kg，如经动物实验，穿心莲内酯的有效剂量为 50-100mg/kg，具体的可以是实验小鼠口服有效剂量为 50-100mg/kg。其中，所述脂代谢异常相关疾病包括高脂血症、非酒精性脂肪肝疾病（包单纯性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎）、动脉粥样硬化、心脑血管疾病和糖尿病中的至少一种。

另外，所述药物还可以进一步包括药学上可接受的穿心莲内酯的载体（辅料）成分。所述药学上可接受的穿心莲内酯的载体成分可以根据所述药物给药方式制备的相应剂型的相应载体。只要是能够负载所述穿心莲内酯，并有利于其稳定和被吸收的符合医药要求的载体均在本发明公开的范围。因此，依据所述载体的选择，所述药物的剂型可以是口服剂型、注射剂型中的至少一种。

因此，所述药物由于含有上文的穿心莲内酯，由此，所述药物能够有效下调脂代谢相关基因的表达，具体可以下调包括基因 SREBP-1、FASN、SCD-1 表达；同时调节 HNF4 α 与 PGC-1 α 相互作用，从而下调其下游靶相关基因包括 MTP、APOB 和 PLA2G12B 表达，从而抑制脂质合成和抑制极低密度脂蛋白形成和分泌过程，最终降低如肝脂作用和降低血脂的作用，从而改善脂代谢异常相关疾病的临床效果。另外，由于穿心莲内酯是天然药物的有效成分，疗效好，毒副作用小，安全。

又一方面，基于上文所述穿心莲内酯的应用和含有所述穿心莲内酯的药物，一实施例中，本发明实施例提供了一种干扰 HNF4 α 与 PGC-1 α 作用的方法。所述方法包括将有效剂量的所述穿心莲内酯或上文所述药物与具有表达 HNF4 α 的细胞接触的步骤。通过所述方法能够有效干扰所述细胞中 HNF4 α 与

PGC-1 α 的接触，以下调其下游相关靶基因的表达，从而降低极低密度脂蛋白形成和分泌，最终降低肝脂作用和降低血脂的作用，从而改善脂代谢异常相关疾病的临床效果。

5 另一实施例中，本发明实施例还提供了一种下调基因 MTP、APOB 和 PLA2G12B 表达的方法。所述方法包括将有效剂量的穿心莲内酯或上文所述药物与具有表达 MTP、APOB 和 PLA2G12B 的细胞接触的步骤。通过所述方法能够有效降低极低密度脂蛋白形成和分泌，最终降低肝脂作用和降低血脂的作用，从而改善脂代谢异常相关疾病的临床效果。

10 再一实施例中，本发明实施例还提供了一种下调 SREBP-1、FASN、SCD-1 表达的方法。所述方法包括将有效剂量的穿心莲内酯或上文所述药物与具有表达 SREBP-1、FASN、SCD-1 的细胞接触的步骤。通过所述方法能够有效下调脂质合成如下调肝脏脂质合成的相关基因表达，从而实现抑制或降低脂质合成如抑制肝脏脂质合成，达到降低相关细胞如肝脏细胞脂质形成以达到降脂如降肝脂作用，从而改善脂代谢异常相关疾病的临床效果。

15 其中，上述的细胞如具有表达 HNF4 α 的细胞、具有表达 SREBP-1、FASN、SCD-1 的细胞和具有表达具有表达 MTP、APOB 和 PLA2G12B 的细胞可以但不仅仅为肝细胞、肝癌细胞，还可以是其他组织部分的相关细胞，如肾脏、肠道等中相关细胞。

20 其次，上文各实施例中的所述穿心莲内酯可以按照现有常规方法从甘草原药材中提取，当然也可以设计新的提取方法从甘草原药材中提取。

现结合具体实例，对穿心莲内酯用于抑制脂代谢相关基因表达的应用进行进一步详细说明。

实施例 1. 检测穿心莲内酯 (AP) 对 VLDL 合成和分泌关键基因启动子

活性的影响的实验：

(1) 实验方法如下：

A. 检测穿心莲内酯(AP)对 VLDL 合成和分泌关键基因启动子活性的影响：

5 实验组：将 293T 细胞以 2.0×10^4 /孔的密度接种在 96 板上，每组 3 个复孔。对于启动子活性检测实验，待细胞贴壁后，使用 Lipofectamine3000 转染试剂将内参质粒 pRL-TK、报告质粒 pGL3-PLA2G12B (25 ng) (或 pGL3-MTP(25 ng) 和 pGL3-APOB (25 ng)) 和表达载体 pcDNA4-HNF4a (25 ng)、pcDNA4-PGC1a (10 ng) 共转染转入细胞培养 6 小时后，给药 AP (10、25、
10 50 μ M) 处理 24 小时；

对照组：参照实验组处理，其中，不添加 AP；

空白组：293T 细胞。

B. 对于穿心莲内酯(AP)干扰 HNF4a 配体结合域 (LBD) 与共激活因子 PGC1a 相互作用的实验：

15 实验组：将内参质粒 pRL-TK、报告质粒 pFR-Luc (25ng) 和表达载体 pCMV-BD-HNF4a-LBD (25ng) 和 pcDNA4-PGC1a (5ng) 共转染转入细胞培养 24 小时后，给药 AP (10、25、50 μ M) 处理 24 小时。

对照组：参照实验组处理，其中，不添加 AP；

空白组：293T 细胞。

20 (2) Luciferase 荧光检测：待 (1) 和 (2) 中实验组、对照组和空白组培养完毕后，吸去各组中的培养液，PBS 清洗细胞 2 次，加入 50 μ l 双蒸水稀释的 1 $\times$ passive lysis buffer，于震荡仪上震荡裂解细胞 30 分钟；每个孔吸出 25 μ l 细胞裂解液，加入 25 μ l 萤光素酶底物，利用多孔板化学发光检测仪检测裂解

液荧光强度，加 25 μ l 的 1 $\times$ Stop&Glo 底物，检测内参 phRL-TK 萤光素酶荧光强度。计算各孔中萤光素酶荧光强度与 phRL-TK 萤光素酶荧光强度的比值，并进行数据处理。

(3) 实验结果：本实施例测得结果如图 1 所示，AP 通过干扰 HNF4 α 的配体结合域与 PGC-1 α 的相互作用，抑制了 HNF4 α /PGC-1 α 对 APOB、MTP 和 PLA2G12B 基因启动子活性的上调作用。由此可见，AP 通过下调 HNF4 α 参与的 VLDL 相关基因转录调控，从而参与 VLDL 合成和分泌的调节，而且随着 AP 的有效剂量浓度增加下调 HNF4 α 参与的 VLDL 相关基因转录调控作用增强。

实施例 2. 穿心莲内酯(AP)对 Huh-7 细胞脂代谢关键基因的影响实验：

(1) 实验方法如下：

检测穿心莲内酯(AP)在细胞水平对脂代谢关键基因的影响：将 Huh-7 细胞按照 3×10^5 /孔的密度接种在 6 孔板中，用 10%FBS 的高糖 DMEM 培养。24 小时后，按对照组 (DMSO) 和给药组 (AP 10 μ M) 处理细胞。给药处理 24h 后弃去培养基，用冷的 PBS 清洗 2 次，加入 Trizol 裂解细胞，提取细胞内总 RNA，反转录制备 cDNA。体系如下表 1 所示：

表 1. 反转录体系及 RT-qPCR 体系如下：

试剂	使用量
Total RNA	2 μ g
Oligo-dT	1 μ l
dNTP(10mM)	2 μ l
Ribolock RNase Inhibitor	1 μ l
RevertAid Reverse Transcriptase	1 μ l

5×Reaction Buffer	4μl
RNase Free H ₂ O	~ 20μl

反转录PCR程序：

反应：42°C (60min)，终止反应：70°C (5min)。将反转录产物稀释20倍后，进行Real time PCR检测。

Real time PCR反应体系如下表2所示：

5

表2. Real time PCR反应体系

试剂	使用量	终浓度
SYBR (2×)	10μl	1×
Forward and Reverse Primer(1.2μM)	5μl	0.3μM
cDNA 模板	5μl	
Total	20μl	

Real time PCR反应程序：

预变性 94°C 30s

PCR反应40cycles 95°C 5s

60°C 15s

72°C 10s

溶解曲线 50°C 30s

50°C~95°C 0.5°C/s

10

Real time PCR 引物序列如下表 3 所示：

表 3. Real time PCR 引物序列

Specifies	Gene	序列(5'to3')	序号
Humans	APOB	正向引物：5' -CGGGCTCGTTACCACATGAAG -3'	SEQIDNO: 1

		反向引物 : 5' -GCGTAGAGACCCATCACATGATA- 3'	SEQIDNO: 2
	MTP	正向引物 : 5' -AGCTCACGTACTCCACTGAAG -3'	SEQIDNO: 3
		反向引物 : 5' -CCTCCATAGTAAGGCCACATCC- 3'	SEQIDNO: 4
	PLA2G12B	正向引物 : 5' -TGGGCATTCCAGCAATGACAA-3'	SEQIDNO: 5
		反向引物 : 5' -GATCGAGTGGAGACACCATCG- 3'	SEQIDNO: 6
	SREBP-1c	正向引物 : 5' -CGGAACCATCTTGGCAACAGT -3'	SEQIDNO: 7
		反向引物 : 5' -CGCTTCTCAATGGCGTTGT- 3'	SEQIDNO: 8
	FASN	正向引物 : 5' -AAGGACCTGTCTAGGTTTGATGC-3'	SEQIDNO: 9
		反向引物 : 5' -TGGCTTCATAGGTGACTTCCA- 3'	SEQIDNO: 10
	SCD-1	正向引物 : 5' -TCTAGCTCCTATACCACCACCA-3'	SEQIDNO: 11
		反向引物 : 5' -TCGTCTCCAATTATCTCCTCC- 3'	SEQIDNO: 12
	ACAC α	正向引物 : 5' -ATGTCTGGCTTGACCTAGTA -3'	SEQIDNO: 13
		反向引物 : 5' -CCCCAAAGCGAGTAACAAATTCT- 3'	SEQIDNO: 14
	G6Pc	正向引物 : 5' -GTGTCCGTGATCGCAGACC -3'	SEQIDNO: 15
		反向引物 : 5' -GACGAGGTTGAGCCAGTCTC- 3'	SEQIDNO: 16
5	PEPCK1	正向引物 : 5' -CAAGACGGTTATCGTCACCCA -3'	SEQIDNO: 17
		反向引物 : 5' -GAACCTGGCATTGAACGCTT- 3'	SEQIDNO: 18
	β -Actin	正向引物 : 5' -CATGTACGTTGCTATCCAGGC -3'	SEQIDNO: 19
		反向引物 : 5' -CTCCTTAATGTCACGCACGAT- 3'	SEQIDNO: 20

(2) 实验结果：本实施例测得结果如图 2 所示。由图 2 可知，与对照组比较，浓度为 10 μ M 的 AP 可以明显抑制 VLDL 合成与分泌关键基因 PLA2G12B、MTP 和 APOB 以及脂合成关键基因 SREBP-1c、FASN、SCD-1 和 ACAC α 表达。由此可见，AP 通过抑制脂质的从头合成和 VLDL 分泌相关

5 基因的表达从而调控胞内脂质合成和分泌。

实施例 3. 穿心莲内酯 (AP) 对小鼠原代肝细胞脂滴分泌的影响, 提高原代肝细胞内甘油三酯积累水平实验

(1) 实验方法如下:

实验组: 小鼠原代肝细胞的提取: 小鼠肝脏经过冲洗、消化、重悬和 percoll 5 分层后得到原代肝细胞。用冷的 PBS 清洗三遍后, 10%FBS (DMEM-L) 重悬, 台盼蓝计数, 看细胞活率。按 1.5×10^5 /孔铺 24 孔板, 3.5×10^5 /孔铺 12 孔板。铺板 3 小时后, 有爬片的孔板换液; 铺板 12 小时后, 加 OA (储存浓度: 10mM) 至培养基中, 终浓度为 $100 \mu\text{M}$; 加 OA 培养 12 小时后, 加药处理, AP (10 , 25 , $50 \mu\text{M}$)。培养 24 小时后收细胞进行一步处理。

10 对照组: 参照实验组处理, 其中, 不添加 AP;

(2) 检测方法:

胞内甘油三酯浓度测定: 待 (1) 和 (2) 中实验组和对照组培养完毕后, 裂解细胞, 提取后按试剂盒说明检测胞内甘油三酯和蛋白浓度。

胞内脂滴荧光实验: 对实验组加药 24 小时后和对照组 24 形式后收样, PBS 15 清洗两遍, 4%PVF 固定 15 分钟; PBS 清洗 3 遍, 用 BODIPY493/503 染色 10 分钟, 用 DAPI 染核 3 分钟; PBS 清洗 3 遍后, 把细胞爬片倒扣在滴有防淬灭剂的载玻片上; 最后, 在 Olympus 正置荧光显微镜(BX51)下观察并拍摄照片。

(3) 实验结果: 本实施例测得结果如图 3 所示。由图 3-C 可知, 随着 AP 药物浓度增加, 胞内甘油三酯浓度显著增加, 并呈剂量依赖性, 说明 AP 能够 20 抑制小鼠原代肝细胞胞内甘油三酯的输出; 由图 3-A 和图 3-B 所示的胞内脂滴荧光染色分析结果同样表明, AP 抑制小鼠原代肝细胞胞内脂滴向胞外分泌, 造成胞内脂滴积累增加。由此可见, AP 可通过调控 VLDL 合成和分泌相关基因影响胞内脂质的输出。

实施例4. 检测穿心莲内酯 (AP) 对于普通小鼠短期加药后, 对肝脏中与脂代谢相关基因的影响

(1) 实验方法如下:

C57BL/6J小鼠随机分组 ($n \geq 6$), 穿心莲内酯 (AP) 剂量为100mg/kg/day, 连续5天灌胃给药。处死后取肝脏, 提取肝脏总RNA, 反转录制备cDNA。反转录体系和程序以及qPCR的体系和程序按实例2。

Real time PCR 引物序列如下表 4 所示:

表4. Real time PCR引物序列

Species	Gene	序列(5'to3')	序号
Mus musculus	PLA2G12B	正向引物: 5' - CCAGCAATGACCAAGTGTTG -3'	SEQIDNO: 21
		反向引物: 5' -GAGAATCACAGGCTGCTTCC- 3'	SEQIDNO: 22
	MTP	正向引物: 5' - CAAGCTCACGTACTCCACTGAAG- 3'	SEQIDNO: 23
		反向引物: 5' - TCATCATCACCATCAGGATTCCT -3'	SEQIDNO: 24
	APOB	正向引物: 5' - GCCCATTGTGGACAAGTTGATC -3'	SEQIDNO: 25
		反向引物: 5' -CCAGGACTTGGAGGTCTTGGA - 3'	SEQIDNO: 26
	SREBP-1c	正向引物: 5' -GCAGCCACCATCTAGCCTG - 3'	SEQIDNO: 27
		反向引物: 5' -CAGCAGTGAGTCTGCCTTGAT - 3'	SEQIDNO: 28
	FASN	正向引物: 5' - GGCATCATTGGGCACTCCTT -3'	SEQIDNO: 29
		反向引物: 5' - GCTGCAAGCACAGCCTCTCT -3'	SEQIDNO: 30
	SCD1	正向引物: 5' - TTCTTGCGATACACTCTGGTGC -3'	SEQIDNO: 31
		反向引物: 5' -CGGGATTGAATGTTCTTGTCGT- 3'	SEQIDNO: 32
	ACAC α	正向引物: 5' - GATGAACCATCTCCGTTGGC- 3'	SEQIDNO: 33
		反向引物: 5' -GACCCAATTATGAATCGGGAGTG- 3'	SEQIDNO: 34
	β -Actin	正向引物: 5' -GGCTGTATTCCCCTCCATCG -3'	SEQIDNO: 35

		反向引物：5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3	SEQIDNO: 36
--	--	----------------------------------	-------------

(2) 实验结果：本实施例测得结果如图 4 所示。AP 加药组可以抑制小鼠肝脏细胞脂合成关键基因 SREBP-1c、FASN、SCD-1。同时对 VLDL 合成与分泌关键基因 PLA2G12B、MTP 和 APOB 表达也具有抑制作用。由此可见，穿心莲内酯 (AP) 可以通过调控肝脏的脂质合成和 VLDL 分泌从而调节胞内脂质合成和分泌。

实施例 5. 检测穿心莲内酯 (AP) 对于高脂饲料诱导的非酒精性脂肪肝小鼠模型的影响实验

(1) 实验方法如下：

将 6 周龄雄性 C57BL/6 小鼠分为 3 组，普通组 (CD)、高脂组 (HFD) 和高脂穿心莲内酯加药组 (HFD+AP)。普通组给予普通喂食，高脂组和高脂药组给予高脂饲料。18 周后高脂加药组给予高脂饮食的同时每天灌胃剂量为 50mg/kg 的 AP，对照组给予空白对照溶剂，6 周后将小鼠处死，收集血液和肝脏等样本进行检测。

(2) 实验结果：本实施例测得结果如图 5 和 6 所示。由图 5-A 和图 5-D 所示可知，血生化分析显示，与 HFD 组相比，AP 加药组能有效降低高脂饮食导致的血浆中高甘油三酯、高胆固醇和高低密度脂蛋白。由图 6-A 和 6-D 所示，通过对肝脏甘油三酯含量、组织切片染色和肝功能检测分析，发现 AP 能够明显降低高脂饮食诱导的肝脏甘油三酯含量上升，改善肝脏脂肪变性程度。同时，如图 6-B 和图 6-C 所示，AP 能够明显降低高脂饮食诱导的谷草转氨酶 (AST) 和谷丙转氨酶 (ALT) 的活性上升，改善肝功能。如图 5-E 和图 5-F 所示，对肝脏 VLDL 分泌分析表明，AP 能降低由高脂饮食诱导肝脏 VLDL 分泌率增加。如图 5-G 和图 5-H 所示，对肝脏中 VLDL 合成与分泌的相关基因表达量检测结果表明，AP 能够显著下调小鼠肝脏中 APOB、MTP 和 PLA2G12B 基因的表达。由此可见，AP 通过下调 APOB、MTP 和 PLA2G12B 基因表达来抑制 VLDL 合成和分泌，降低肝脏中脂质输出，从而降低血脂。

结合上述细胞水平研究实验结果可知，AP 可以通过调控脂合成和 VLDL 分泌相关基因降低肝脏细胞内脂质合成和分泌，从而降低肝脂和血脂，改善动脉粥样化，对非酒精性脂肪肝炎具有疗效。

5 以上所述的实施例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。

权利要求书

1. 穿心莲内酯在如下至少一方面的应用：

作为抑制脂质合成的调节剂；

作为降低极低密度脂蛋白形成与分泌的调节剂。

5 2. 根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于：所述穿心莲内酯作为下调包括基因 SREBP-1、FASN、SCD-1 表达的调节剂的应用。

3. 根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于：所述穿心莲内酯作为 HNF4 α 调节剂的应用。

10 4. 根据权利要求 3 所述的应用，其特征在于：所述穿心莲内酯作为下调包括基因 MTP、APOB 和 PLA2G12B 表达的调节剂的应用。

5. 一种用于抑制脂质合成或降低极低密度脂蛋白形成与分泌的药物，其特征在于：包括有效剂量的穿心莲内酯。

6. 根据权利要求 5 所述的药物，其特征在于：所述药物为口服剂型、注射剂型中的至少一种。

15 7. 一种干扰 HNF4 α 与 PGC-1 α 作用的方法，其特征在于：包括将有效剂量的穿心莲内酯或权利要求 5-6 任一所述的药物与具有表达 HNF4 α 的细胞接触的步骤。

8. 一种下调基因 MTP、APOB 和 PLA2G12B 表达的方法，其特征在于：包括将有效剂量的穿心莲内酯或权利要求 5-6 任一所述的药物与具有表达
20 MTP、APOB 和 PLA2G12B 的细胞接触的步骤。

9. 一种下调 SREBP-1、FASN、SCD-1 表达的方法，其特征在于：包括将有效剂量的穿心莲内酯或权利要求 5-6 任一所述的药物与具有表达 SREBP-1、FASN、SCD-1 的细胞接触的步骤。

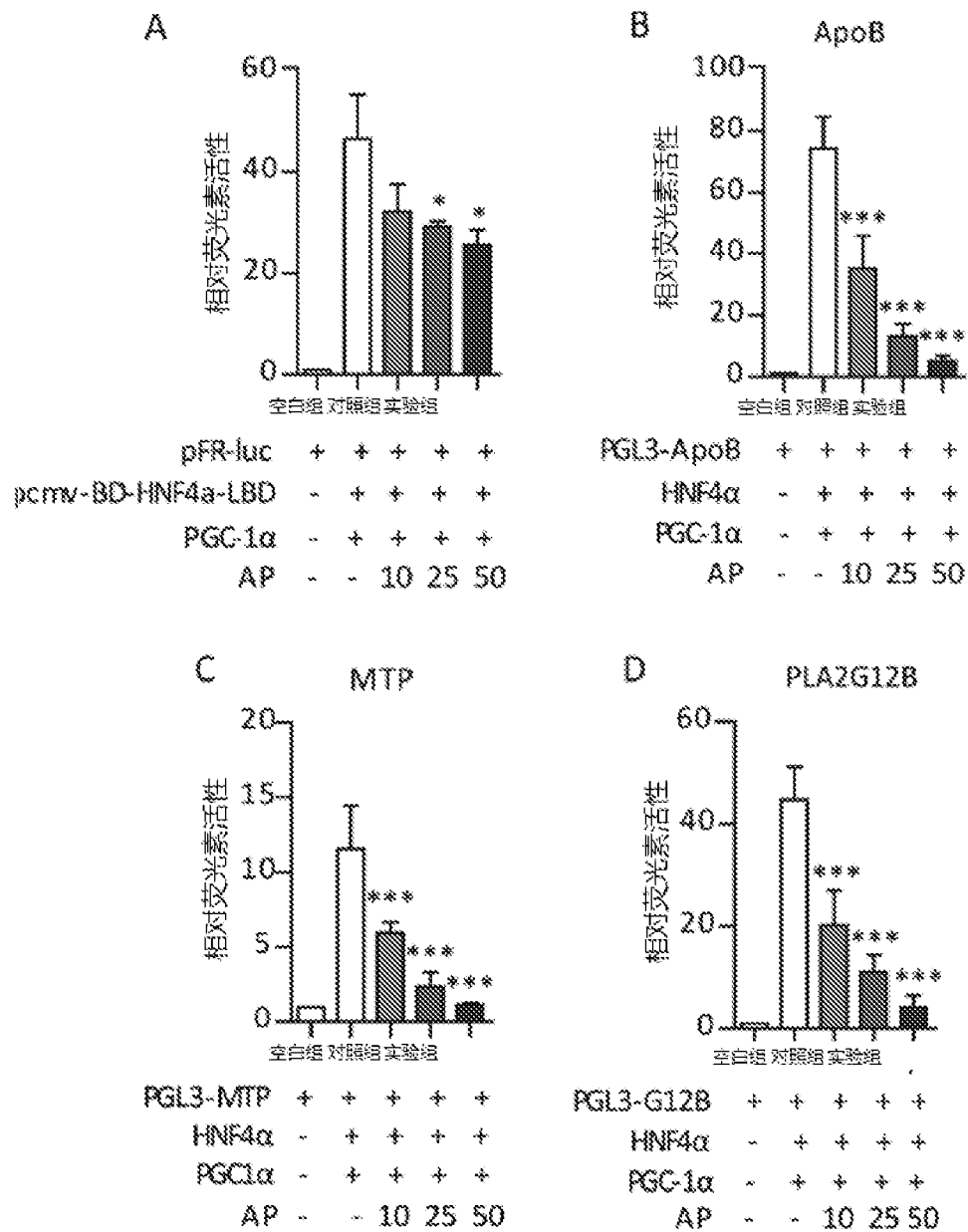


图 1

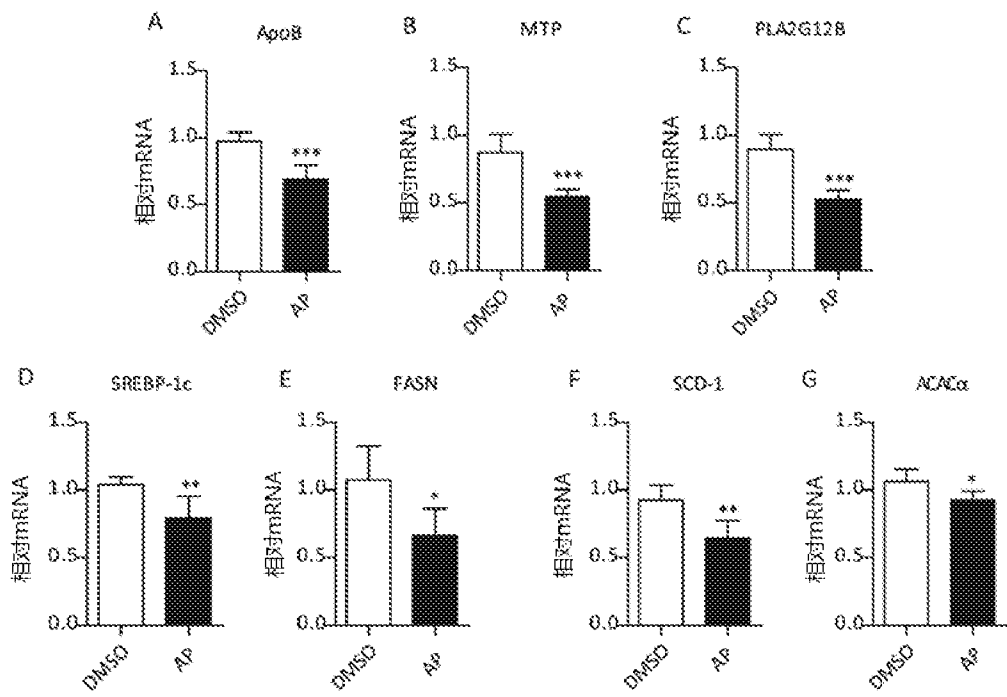


图 2

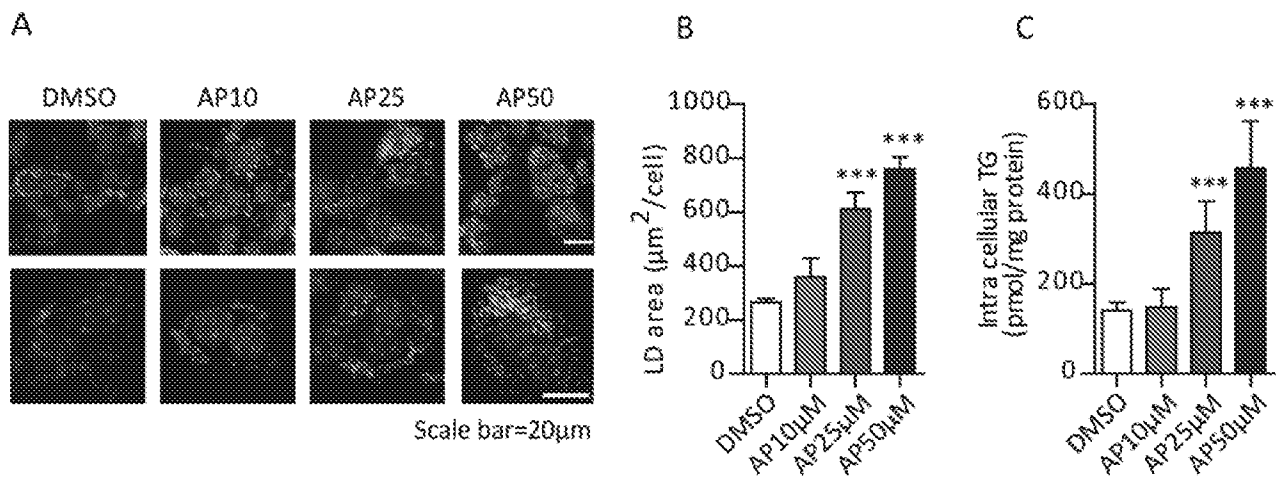


图 3

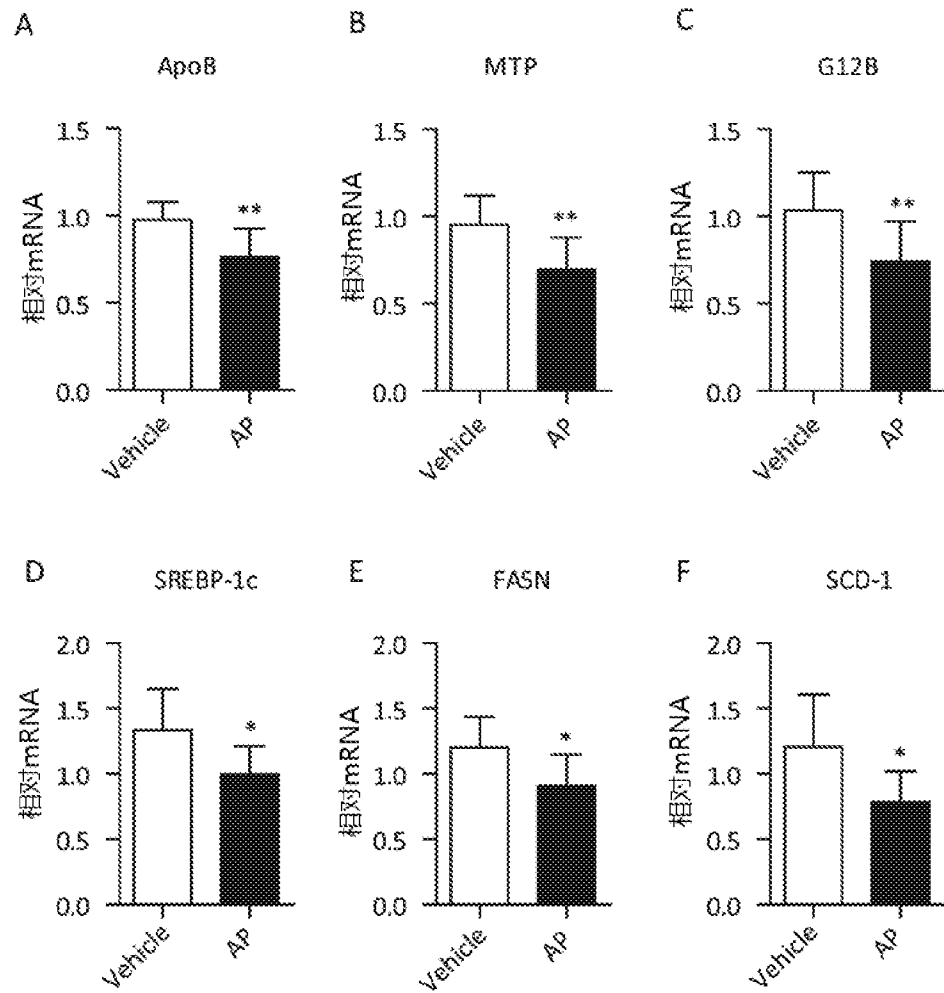


图 4

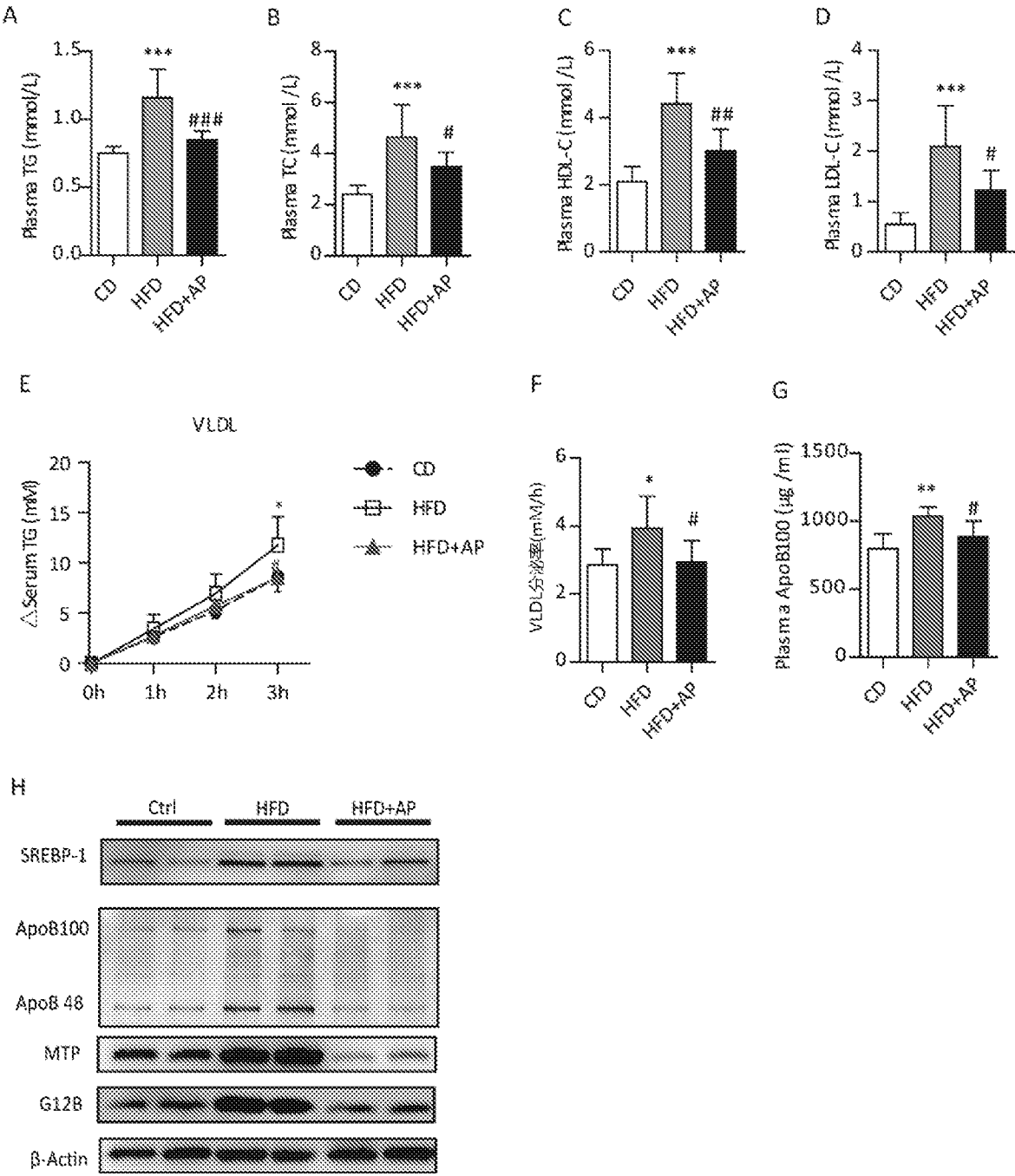


图 5

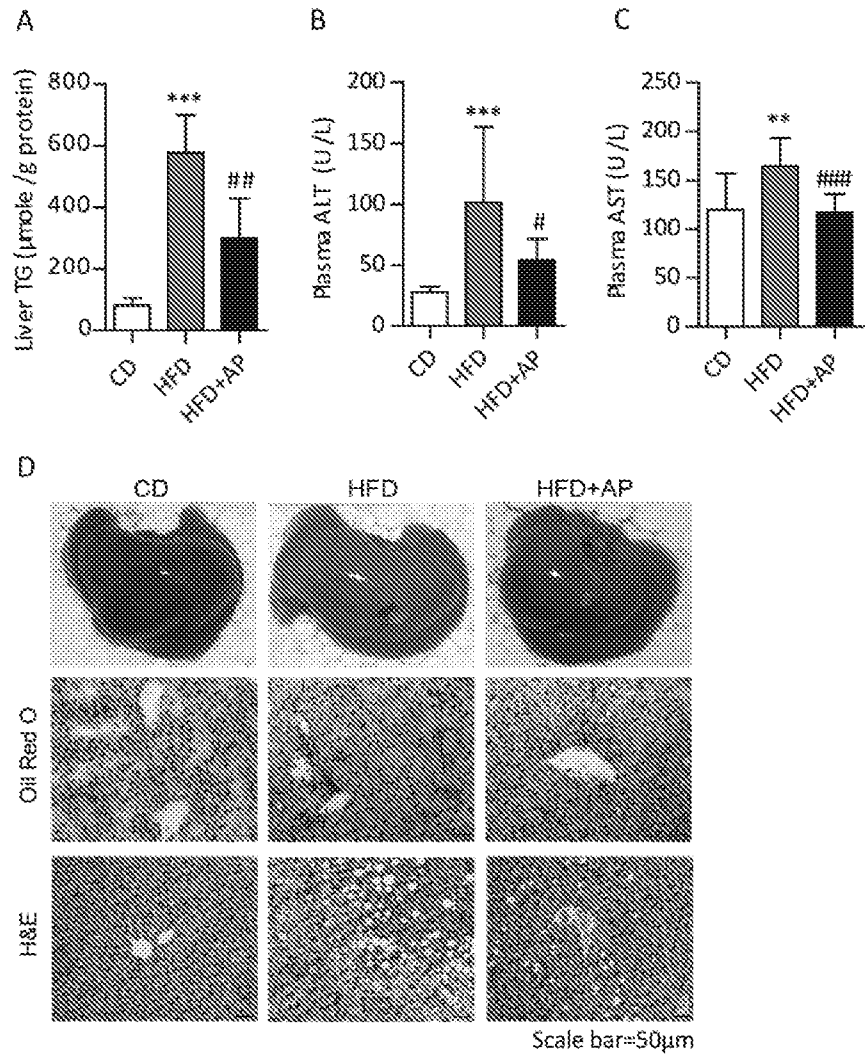


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/130839

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/365(2006.01)i; A61P 3/06(2006.01)i; A61P 1/16(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)

A61K31/-;A61P3/-;A61P1/-

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)

CNTXT, CNABS, CNKI, DWPI, VEN, STNEXT, ISI WEB OF SCIENCE: 穿心莲内酯, 脂质合成, 脂代谢, 动脉粥样硬化, 非酒精性脂肪肝, 脂质, 脂肪, 胆固醇, 甘油三酯, 低密度脂蛋白, SREBP, FASN, SCD, MTP, APOB, PLA2G12B, HNF4α, PGC, andrographolide, NAFLD, AS, TG, fat, lipid, LDC, atherosclerosis, cholesterol7

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 102247356 A (SHANGHAI UNIVERSITY OF TRADITIONAL CHINESE MEDICINE) 23 November 2011 (2011-11-23) description, paragraphs 0008, 0011, 0043, 0059	1-9
X	谢治深 等 (XIE, Zhishen et al.). "SREBPs天然小分子抑制剂的药理学研究进展 (Progress in pharmacological research of natural small-molecule inhibitor of SREBPs)" <i>中国药房 (China Pharmacy)</i> , Vol. 29, No. 10, 31 December 2018 (2018-12-31), pp. 1435-1440	1-9
X	陈玉 等 (CHEN, Yu et al.). "穿心莲内酯对 HepG2 细胞 SREBP 表达及脂质代谢的影响 (Effects of andrographolide on expression of SREBPs and lipid metabolism in HepG2 cells)" <i>南京中医药大学学报 (Journal of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine)</i> , Vol. 31, No. 5, 30 September 2015 (2015-09-30), pp. 494-497	1-9

☒ 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

06 March 2020

Date of mailing of the international search report

31 March 2020

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

Authorized officer

Facsimile No. (86-10)62019451

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/130839

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	叶宝华 等 (YE, Baohua et al.). "穿心莲内酯对大鼠非酒精性脂肪肝的防治作用 (Protective and therapeutic effects of andrographolide on nonalcoholic steatohepatitis)" 安徽医药 (<i>Anhui Medical and Pharmaceutical Journal</i>), Vol. 12, No. 7, 31 July 2008 (2008-07-31), pp. 582-584	1-9
X	黄雪君 等 (HUANG, Xuejun et al.). "穿心莲内酯对高脂血症新西兰兔抗氧化及胆固醇代谢的影响 (Effect of andrographolide on antioxidant and cholesterol metabolism in hyperlipidemic rabbit)" 临床医学工程 (<i>Clinical Medical & Engineering</i>), Vol. 21, No. 1, 31 January 2004 (2004-01-31), pp. 14-15	1-9
X	DING L et al., "Andrographolide prevents high- fat diet- induced obesity in C57BL/6 mice by suppressing the SREBP pathway," 《 <i>J Pharmacol Exp Ther</i> 》, Vol. vol. 351, No. 2, 30 November 2014 (2014-11-30), pp. 474-483	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/130839

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.: **1-4, 7-9**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] The subject matter of claims 1-4 relates to andrographolide acting as a regulating agent which inhibits lipid synthesis or as a regulating agent which reduces very low-density lipoprotein formation and secretion. The subject matter of claims 7-9 relates to methods for interfering in an effect between HNF4 α and PGC-1 α , downregulating MTP, APOB and PLA2G12B gene expression, and downregulating SREBP-1, FASN and SCD-1 expression. According to the content stated in the description, the described subject matter relates to reducing lipid synthesis and/or reducing very low-density lipoprotein formation and secretion, which ultimately prevents and/or treats diseases related to abnormal lipid metabolism. Therefore, the subject matter of the above claims relates to a disease treatment method, and belongs to a case which does not require a search as stipulated in PCT Rule 39.1(iv). The present search report is formed on the basis that the subject matter is amended as follows: an application of andrographolide in preparing a drug which prevents and/or treats diseases related to abnormal lipid metabolism.
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/CN2019/130839

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	102247356	A	23 November 2011	CN	102247356	B	18 September 2013

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/130839

A. 主题的分类

A61K 31/365(2006.01)i; A61P 3/06(2006.01)i; A61P 1/16(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)

A61K31/-;A61P3/-;A61P1/-

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))

CNTXT, CNABS, CNKI, DWPI, VEN, STNEXT, ISI WEB OF SCIENCE:穿心莲内酯, 脂质合成, 脂代谢, 动脉粥样硬化, 非酒精性脂肪肝, 脂质, 脂肪, 胆固醇, 甘油三酯, 低密度脂蛋白, SREBP, FASN, SCD, MTP, AP0B, PLA2G12B, HNF4 α , PGC, andrographolide, NAFLD, AS, TG, fat, lipid, LDC, atherosclerosis, cholesterol17

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	CN 102247356 A (上海中医药大学) 2011年 11月 23日 (2011 - 11 - 23) 说明书第0008, 0011, 0043, 0059段	1-9
X	谢治深等, . "SREBPs天然小分子抑制剂的药理学研究进展, " 《中国药房》, , 第29卷, 第10期, 2018年 12月 31日 (2018 - 12 - 31), 第1435-1440页	1-9
X	陈玉等, . "穿心莲内酯对 H e p G 2 细胞 S R E B P 表达及脂质代谢的影响, " 《南京中医药大学学报》, , 第31卷, 第5期, 2015年 9月 30日 (2015 - 09 - 30), 第494-497页	1-9
X	叶宝华等, . "穿心莲内酯对大鼠非酒精性脂肪肝的防治作用, " 《安徽医药》, , 第12卷, 第7期, 2008年 7月 31日 (2008 - 07 - 31), 第582-584页	1-9
X	黄雪君等, . "穿心莲内酯对高脂血症新西兰兔抗氧化及胆固醇代谢的影响, " 《临床医学工程》, , 第21卷, 第1期, 2004年 1月 31日 (2004 - 01 - 31), 第14-15页	1-9

☒ 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

2020年 3月 6日

国际检索报告邮寄日期

2020年 3月 31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

陈红霞

电话号码 86-(10)-53962092

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	DING L等, . "Andrographolide prevents high- fat diet- induced obesity in C57BL/6 mice by suppressing the SREBP pathway, " 《J Pharmacol Exp Ther》, , 第351卷, 第2期, 2014年 11月 30日 (2014 - 11 - 30), 第474-483页	1-9

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： 1-4， 7-9
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1-4的主题涉及穿心莲内酯抑制脂质合成的调节剂或作为降低极低密度脂蛋白形成与分泌的调节剂；权利要求7-9的主题涉及干扰HNF4 α 与PGC-1 α 作用, 下调基因MTP、APOB和PLA2 G12B表达以及下调SREBP-1、FASN、SCD-1表达的方法。根据说明书记载的内容，上述主题涉及降低脂质合成和/或降低极低密度脂蛋白形成与分泌，最终起到预防和/或治疗脂代谢异常相关疾病。因此，上述权利要求的主题涉及疾病的治疗方法，属于 PCT 实施细则第39.1(iv)规定的无须检索的情况。本检索报告基于权利要求的主题做如下修改而完成：穿心莲内酯在制备预防和/或治疗脂代谢异常相关疾病的药物中的应用。
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。

国际申请号

PCT/CN2019/130839

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	102247356	A	2011年 11月 23日	CN	102247356	B	2013年 9月 18日	