

(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
2018 年 6 月 7 日 (07.06.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/099148 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 38/12 (2006.01) *A61P 11/00* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2017/099249
- (22) 国际申请日: 2017 年 8 月 28 日 (28.08.2017)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201611079521.6 2016 年 11 月 30 日 (30.11.2016) CN
201710014483.4 2017 年 1 月 9 日 (09.01.2017) CN
- (71) 申请人: 南京大学 (NANJING UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国江苏省南京市汉口路 22 号,
Jiangsu 210093 (CN)。
- (72) 发明人: 王亚平 (WANG, Yaping); 中国江苏省南京市汉口路 22 号, Jiangsu 210093 (CN)。徐力致 (XU, Lizhi); 中国江苏省南京市汉口路 22 号, Jiangsu 210093 (CN)。王洁 (WANG, Jie); 中国江苏省南京市汉口路 22 号, Jiangsu 210093 (CN)。赵庆亚 (ZHAO, Qingya); 中国江苏省南京市汉口路 22 号, Jiangsu 210093 (CN)。
- (74) 代理人: 天津市北洋有限责任专利代理事务所 (BEI&OCEAN); 中国天津市南开区鞍山西道时代公寓 A 座 603 室, Tianjin 300193 (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,

(54) Title: USE OF MICROCYSTINS IN PREPARATION OF DRUGS FOR PREVENTING OR TREATING ORGAN AND TISSUE FIBROSIS DISEASES

(54) 发明名称: 微囊藻毒素在制备用于预防或治疗器官组织纤维化疾病的药物中的用途

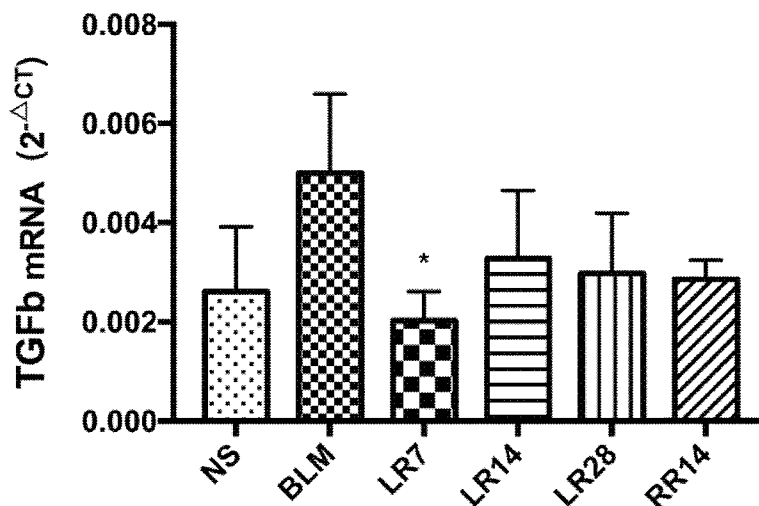


图7

(57) Abstract: Use of microcystins having a monocyclic heptapeptide structure in preparation of drugs for preventing or treating organ and tissue fibrosis diseases. Preferably, the microcystins are microcystins-LR with amino acids at positions 2 and 4 of a monocyclic heptapeptide structure thereof being leucine and arginine respectively, or are microcystins-RR with amino acids at positions 2 and 4 thereof being both arginine. Also provided is a method for inhibiting myofibroblast differentiation and collagen synthesis. The method is implemented by inhibiting a TGF-β/Smad signal pathway by using one or more microcystins.

(57) 摘要: 单环七肽结构微囊藻毒素在制备用于预防或治疗器官组织纤维化疾病的药物中的用途。优选地, 所述微囊藻毒素是其单环七肽结构的第二和第四位氨基酸分别为亮氨酸和精氨酸的微囊藻毒素-LR, 或者是其第二和第四位氨基酸均为精氨酸的微囊藻毒素-RR。还涉及一种抑制肌成纤维细胞分化和胶原蛋白合成的方法, 该方法通过使用一种或多种微囊藻毒素阻抑TGF-β/Smad信号通路而实现。



WO 2018/099148 A1



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))。

微囊藻毒素在制备用于预防或治疗器官组织纤维化疾病的药物中的用途

技术领域

本发明属于医药技术领域。具体地说,本发明涉及微囊藻毒素(Microcystins, MCs)在制备用于预防或治疗人类器官组织纤维化疾病的药物中的用途。

背景技术

纤维化(Fibrosis)是机体组织器官对损伤所产生的一种病理性反应,以细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)(主要是胶原蛋白)异常沉积为特征。不同组织器官的纤维化发生具有相似的分子病理机制:涉及机体内、外因素引起组织细胞损伤,活性氧(Reactive oxygen species, ROS)增加,受损组织炎症细胞浸润,转化生长因子- β (Transforming growth factor- β , TGF- β)释放, TGF- β /Smad信号通路激活,肌成纤维细胞(Myofibroblast)形成⁽¹⁻³⁾。纤维化一般渐进发展,最终导致组织器官功能衰竭,临床预后较差⁽⁴⁾。

肺纤维化(Pulmonary fibrosis, PF)是由多种原因引起的严重肺间质慢性疾病。可分为继发性肺纤维化(Secondary pulmonary fibrosis, SPF)和特发性肺纤维化(Idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)。前者病因明确,如工业、矿石粉尘接触引发的尘肺、矽肺、石棉肺,及患者自身免疫性疾病基础上的肺纤维化等;后者病因不明。IPF是呼吸系统衰老相关常见疾病之一,也是临床高死亡率的疑难病症之一^(5, 6)。随着社会老龄化的快速发展,人群IPF的发病率呈上升趋势。IPF组织病理学和分子病理学具有一般间质性肺炎、肺纤维化的特征,表现为进行性劳力性呼吸困难,限制性通气障碍和氧弥散功能受限,最终发生呼吸衰竭而死亡,初诊后平均生存时间仅约3年。在已报导的肺纤维化模型动物研究中,博来霉素(Bleomycin, BLM)诱导的大鼠或小鼠肺纤维化模型是研究肺纤维化常规采用的动物模型^(7, 8)。

微囊藻毒素(Microcystins, MCs)是环境水体蓝藻水华污染产生的一类常见毒素。一般认为其具有抑制丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶1和2A(Serine/threonine protein phosphatases 1 and 2A, PP1和PP2A)的活性而主要产生肝肾毒性⁽⁹⁾,

10)。对于其抗纤维化的生物活性及开发临床药物的功能，迄今未见相关研究报道。MCs主结构是一类单环七肽化合物，由于组成氨基酸的差异，自然界存在多种异构体，主要变异发生于其第二和第四位的氨基酸。本发明首先选择这种单环七肽结构的第二和第四位氨基酸分别为亮氨酸(Leucine, L)和精氨酸(Arginine, R)的微囊藻毒素(MC-LR)开发、制备肺纤维化的治疗和干预药物。在观察到疗效的基础上，本发明又选择了这种单环七肽结构的第二和第四位氨基酸均为精氨酸(Arginine, R)的微囊藻毒素(MC-RR)开发、制备肺纤维化的治疗和干预药物。MC-RR的毒性明显小于MC-LR,小鼠染毒和体外培养细胞的毒理学实验(LD 50)显示，MC-RR的毒性不足MC-LR毒性的1/5⁽¹⁰⁾(图1)，但MC-RR同样具有治疗和干预肺纤维化的良好效果。

本发明在构建博来霉素(Bleomycin, BLM)诱导肺纤维化动物模型的基础上，通过日常饮水给予MC-RR或MC-LR干预治疗，并采用组织病理学观察及组织细胞纤维化发生关键分子、信号通路分析来确定干预治疗的效果。结果：MC-RR和MC-LR干预可以缓解和改善由BLM引发的肺组织纤维化病理状态；明显降低模型大鼠肺组织中胶原蛋白I(Collagen 1)和 α -SMA(α -smooth muscle actin)的含量；在MC-RR或MC-LR干预大鼠肺组织细胞，纤维化发生关键分子TGF- β 及其信号通路蛋白表达受到明显抑制，主要为TGF- β 、smad2/smads3 mRNA和蛋白质表达明显下调，而纤维化抑制分子smad7的mRNA及蛋白质表达上调。TGF- β /Smad信号通路的激活可以促进上皮间质转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)及肌成纤维细胞形成⁽¹¹⁻¹⁴⁾；同时，在干预大鼠肺组织中，结构性胶原蛋白形成的关键酶P4HA3表达受到抑制。P4HA3是TGF- β 调控的下游促纤维化因子⁽¹⁵⁾。另一方面，组织纤维化病理发生过程中常伴有其他细胞因子的释放，并对纤维化的发展具有促进作用。VEGF(Vascular endothelial growth factor)是已知功能效应最强的血管生长因子之一。组织细胞VEGF含量的增高可促进血管通透性，导致巨噬细胞迁移、聚集和活化，引起TGF- β 释放增多。纤维化组织亦常见ET-1(Endothelin 1)的表达上调⁽¹⁶⁾。ET-1具有促进成纤维细胞增殖，诱导成纤维细胞向肌成纤维细胞分化,抑制胶原蛋白降解的作用⁽¹⁷⁾。在给予MC-RR或MC-LR干预的模型大鼠肺组织中,VEGF和ET-1的转录表达均显著降低。

作为提出本发明基础的上述实验结果明确显示，针对博来霉素(Bleomycin, BLM)诱导肺纤维化的病理学改变，MC-RR及MC-LR具有有效的干预和治疗作用。

其重要机制是通过下调 TGF- β 的表达, 阻抑 TGF- β /Smad 信号通路, 抑制肌成纤维细胞分化和胶原蛋白的合成, 最终缓解和阻滞细胞外基质(ECM)的异常沉积。

本发明发现了微囊藻毒素可用于开发、制备预防和治疗器官组织纤维化疾病的新型药物。另外, 本发明也提供了一种用微囊藻毒素抑制肌成纤维细胞分化和胶原蛋白合成的方法, 可用于科研、医疗等领域。很显然, 本发明的上述两个方面具有共同的技术特征, 即一种或多种能阻抑TGF- β /Smad信号通路微囊藻毒素。

发明内容

本发明公开了单环七肽化合物微囊藻毒素(Microcystins, MCs)的医药用途, 尤其是微囊藻毒素-RR 和 LR(MC-RR 和 MC-LR)在开发、制备用于预防或治疗器官组织纤维化疾病的药物中的用途。

优选地, 所述器官是肺。

优选地, 本发明的药物在博来霉素(Bleomycin, BLM)诱导产生的肺纤维化大鼠肺组织中, 阻抑肌成纤维细胞形成(降低 α -SMA 水平)、抑制胶原蛋白I(Collagen 1)表达。

优选地, 本发明的药物在 BLM 诱导肺纤维化大鼠肺组织细胞中, 抑制组织纤维化发生关键分子 TGF- β 的 mRNA 和蛋白质表达。

优选地, 本发明的药物抑制 Smad2 和 Smad3 的表达。所述 Smad2 和 Smad3 是在 BLM 诱导肺纤维化大鼠肺组织细胞中构成纤维化发生关键信号通路(TGF- β /Smad 信号通路), 是促进纤维化形成的分子。

优选地, 本发明的药物上调 Smad7 的表达。所述 Smad7 是在 BLM 诱导肺纤维化大鼠肺组织细胞中针对纤维化发生关键信号通路(TGF- β /Smad 信号通路)的负调控因子, 是阻抑纤维化形成的分子。

优选地，本发明的药物在 **BLM** 诱导肺纤维化大鼠肺组织细胞中抑制肺纤维化发生关键酶促分子 **P4HA3** 表达。

本发明还公开了一种抑制肌成纤维细胞分化和胶原蛋白合成的方法，该方法通过使用一种或多种微囊藻毒素阻抑 **TGF- β /Smad** 信号通路而实现。优选地，在该方法中，微囊藻毒素是含单环七肽结构，其第二和第四位氨基酸分别为亮氨酸和精氨酸的微囊藻毒素-**LR**，或者是含单环七肽结构，其第二和第四位氨基酸均为精氨酸的微囊藻毒素-**RR**。

本发明在构建博来霉素(**Bleomycin, BLM**)诱导大鼠肺纤维化这一经典动物模型的基础上，分别采用 **MC-RR**、**MC-LR** 干预治疗。依据组织病理学及针对纤维化发生关键信号通路分子的分析结果，创新提出 **MC-RR** 和 **MC-LR** 可以缓解和治疗由 **BLM** 引发的肺纤维化病理状态，有效阻止肺纤维化进程。基于此，本发明提供了微囊藻毒素干预、治疗纤维化的分子靶标和作用机制。

自然界微囊藻毒素(**MCs**)在单环七肽基本结构的基础上由于氨基酸组成差异存在多种变异体，不同变异体之间的毒性差异很大。本发明基于的实验采用了毒性较小的 **MC-RR** 和毒性较大的 **MC-LR** 干预、治疗模型鼠的肺纤维化，两者均表现出良好的干预和治疗效果。证明 **MCs** 的抗纤维化作用与其单环七肽分子结构及由此产生的生物学效应有关，而与 **MCs** 毒性强弱无关联。

基于上述研究，本发明公开了微囊藻毒素单环七肽结构具有缓解和阻滞肺纤维化病理发生的生物学作用，可用于开发、制备器官组织纤维化疾病的治疗和干预药物。

附图说明

图1 显示微囊藻毒素(**Microcystins**)的化学结构，其中 **A** 是微囊藻毒素(**MCs**)的一般结构；**B** 是 **MC-LR** 的结构；**C** 是 **MC-RR** 的结构；**D** 显示实时动态细胞分析技术(**Real time cellular analysis, RTCA**)检测 **MC-LR** 和 **MC-RR** 对培养肝细胞株(**L02**)的毒性作用的结果，表明 **MC-LR** 的细胞毒性明显高于 **MC-RR** (**NC**为对照组)。

图2 显示 BLM 诱导肺纤维化模型大鼠及 MCs 干预各组大鼠体重变化情况, 其中 NS 是生理盐水对照组; BLM 是 5 μ g/kg 博来霉素(BLM)气道滴注构建肺纤维化大鼠模型组; LR7、LR14 和 LR28 分别是于 BLM 气道滴注后第 7 天、第14 天和第 28 天开始 MC-LR 干预组; RR14 是 BLM 气道滴注后第 14 天开始MC-RR 干预组。

图3 显示各组大鼠的肝、肾和肺指数,其中 A 是肺指数。“*”: 与 NS 组比较, $P<0.05$; “#”: 与 BLM 组比较, $P<0.05$ 。B 是肝指数; C 是肾指数。

图4 显示各组大鼠的肝、肾功能分析结果, 其中 A、B 反映肝脏功能的血清谷草转氨酶(AST)和谷丙转氨酶(ALT)水平; C、D 反映肾脏功能的血清肌酐(CRE)和尿素氮的含量(BUN)。

图5 显示 BLM 诱导大鼠肺纤维化模型的建立, 其中 A 显示生理盐水(NS)对照组大鼠肺组织切片 Masson 染色; B 显示 BLM 气道内滴注构建的肺纤维化大鼠肺组织切片 Masson 染色; C 显示 NS 组与 BLM 建模组大鼠肺组织纤维化评估比较, 建模组大鼠肺组织呈现纤维化病变; D 显示 NS 组与 BLM 建模组大鼠肺组织中胶原蛋白I表达的比较, 结果建模组胶原蛋白I的 mRNA 转录明显增高; E 显示 NS 组与 BLM 建模组大鼠肺组织 α -SMA 蛋白比较, 建模组肺组织 α -SMA 蛋白表达明显增高。* $P<0.05$ 。

图6 显示 MC-RR 或 MC-LR 的干预对 BLM 诱导大鼠肺纤维化的影响。其中, A-D 为大鼠肺组织切片 Masson 染色: A 显示 BLM 建模第 7 天开始 MC-LR 干预(LR7)缓解大鼠肺纤维化作用, B 显示 BLM 建模第 14 天开始 MC-LR 干预(LR14)缓解大鼠肺纤维化作用, C 显示 BLM 建模第 28 天开始干预(LR28)对大鼠肺纤维化的影响, D 显示 BLM 建模第 14 天开始 MC-RR 干预(RR14)缓解大鼠肺纤维化作用; E 显示 MC-RR 和 MC-LR 各干预组缓解和治疗 BLM 诱导大鼠肺纤维化的评估比较,结果显示: LR7 和 RR14 缓解效果最为明显; F 显示 MC-RR 和 MC-LR 各干预组肺组织胶原蛋白I表达,提示 LR7 和 RR14 组胶原蛋白I转录表达下调幅度最大; G 显示 MC-RR 和 MC-LR 各干预组肺组织 α -SMA 蛋白表达均受到抑制, 其中 RR14 和 RR28 下调幅度最大。“*”: 与 BLM 组比较, $P<0.05$ 。

图7 显示 MC-RR 或 MC-LR 干预可抑制 BLM 诱导的大鼠肺组织细胞 TGF- β 表达, 其中 “*”: 与 BLM 组比较, $P < 0.05$ 。

图8 显示 MC-RR 和 MC-LR 干预对 BLM 诱导的大鼠肺组织细胞 TGF- β /Smad 信号通路的影响, 其中 A 显示各组肺组织细胞 TGF- β /Smad 通路蛋白 Western Blot 分析结果; B 显示各组肺组织细胞 Smad3 基因 mRNA 转录表达的分析结果; C 显示各组肺组织细胞 Smad7 基因 mRNA 转录表达的分析结果。

图9 显示 MC-RR 和 MC-LR 抑制促纤维化分子 P4HA3 的转录表达, 其中 “*”: 与 BLM 组比较, $P < 0.05$ 。

图10 显示 MC-RR 和 MC-LR 抑制纤维化相关细胞因子 VEGF 和 ET1 的表达, 其中 “*” 与 BLM 组比较, $P < 0.05$ 。

具体实施方式

博来霉素(Bleomycin, BLM)诱导大鼠(或小鼠)的肺纤维化是国际、国内各实验室在研究肺纤维化发生机制、干预靶点及治疗药物时常用动物模型。该模型构建稳定, 病理组织学改变与人类肺纤维化相近。我们采用的大鼠 BLM 暴露方式为普遍采用的经口气管插管, 气道内滴注给药; 对照采用等体积生理盐水大鼠气道内滴注。

实验动物: SPF 级 Sprague Dawley(SD)大鼠, 雄性, 体重 200g-250g(常州卡文斯实验动物有限公司提供), 动物合格证号: SCXK(苏)2011-0003。饲养条件: 通气良好的 20°C 恒温环境, 每 12 小时光照与黑暗交替, 饮水和鼠粮自由摄取。

博来霉素(BLM, 日本化药株式会社)诱导大鼠肺纤维化模型的构建: SD 雄性大鼠, 约 8 周龄。腹腔注射 10% 水合氯醛(0.4ml/kg)实施全身麻醉, 大鼠固定, 经口行气管插管, 气道内滴注 BLM(剂量为 5mg/kg)。观察大鼠呼吸稳定后, 放回干燥洁净的鼠笼。大鼠苏醒后, 正常饲养。同时设立等体积生理盐水滴注的对照组。

SD 大鼠共 36 只, 随机分为 6 组(每组 6 只): ①生理盐水对照组(NS); ②BLM 诱导肺纤维化模型组(BLM); ③BLM 建模+ MC-LR 第 7 天开始干预组

(LR7); ④BLM 建模+ MC-LR 第 14 天开始干预组(LR14); ⑤BLM 建模+ MC-LR第 28 天开始干预组(LR28); ⑥BLM 建模+ MC-RR 第 14 天开始干预组(RR14)。NS 组、BLM 组采用自然饮用灭菌超纯水; LR7 组于 BLM 滴注后第 7 天开始饮用的灭菌超纯水加入 MC-LR(终浓度:20 μ g/L), 持续饮用; LR14 组于 BLM滴注后第 14 天开始饮水含 MC-LR(终浓度:20 μ g/L), 持续饮用; LR28 组于 BLM 滴注后第 28 天开始饮水含 MC-LR(终浓度:20 μ g/L), 持续饮用; RR14组于 BLM 滴注后第 14 天开始饮水含 MC-RR(终浓度:20 μ g/L), 持续饮用。全部实验大鼠于实施BLM 气道滴注后的第 56 天(8 周)实施腹腔注射 10%水合氯醛(0.4ml/kg)全身麻醉, 腹主动脉取血(留取全血及分离血清样本)后处死; 留取肺、肝、肾等组织样本。肺组织样本按肺叶分部留取。各器官样本每个留取部位的组织均分为 4%中性甲醛固定样本和液氮冻存样本。中性甲醛固定样本用于组织病理学分析, 液氮冻存样本主要用于蛋白质和核酸分析。检测数据的统计学分析应用SPSS11.5 统计软件处理, 采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结果

针对 BLM 诱导产生的肺纤维化模型大鼠, 及 MC-RR 或 MC-LR 干预和治疗肺纤维化大鼠的观察、分析, 结果显示:

(1) MC-RR 或 MC-LR 使用剂量和给药方式对模型大鼠未产生明显的毒性效应: ①与模型(BLM 组)大鼠在实验过程中的体重变化比较, BLM + MC-RR, 或 BLM + MC-LR 大鼠体重增长良好(图 2); 大鼠的肝、肾指数(鼠的肝或肾重量/大鼠体重)在各组间无显著差异; BLM 诱导肺纤维化大鼠的肺指数与 NS对照组比较显著增高, 而 MC-RR 及 MC-LR 的干预处理组肺指数低于 BLM 组大鼠(图 3); ②MC-RR 或 MC-LR 干预组大鼠与对照组和 BLM 建模组大鼠比较, 肝肾功能无明显异常(图 4)。

(2) 大鼠气管内(单次)滴注 BLM(5mg/kg)可稳定诱导大鼠肺组织纤维化病变: ①Masson 染色是观察病理切片组织纤维化状态的常规技术。结果显示, BLM建模组大鼠肺组织呈现明显的纤维化状态; ②BLM 组大鼠肺组织胶原蛋白I 的表达(mRNA 转录)明显高于生理盐水对照组大鼠; ③BLM 组大鼠肺组织 α -

SMA(α -smooth muscle actin)蛋白的表达明显增高,反映了BLM组大鼠肺组织中肌成纤维细胞增殖(图5)。

(3) MC-RR 或 MC-LR 的干预可明显减轻 BLM 诱导大鼠产生的肺纤维化程度:①Masson 染色显示, BLM 建模第 14 天开始的 MC-RR 干预(RR14), BLM 建模第 7 天(LR7)、第 14 天开始的 MC-LR(LR14)干预的大鼠肺纤维化程度明显降低, BLM 建模第 28 天(LR28)开始 MC-LR 干预大鼠的肺纤维化也有降低趋势;②与 BLM 建模组大鼠比较, MC-RR 和 MC-LR 各干预组肺组织细胞 Collagen 1 表达均有下降, 其中 LR7 和 RR14 组的下降最为明显;③与 BLM 建模组大鼠比较, MC-RR 和 MC-LR 各干预组肺组织细胞 α -SMA 表达均有下调, 其中 RR14 和 LR28 下调幅度最大(图 6)。

(4) MC-RR 或 MC-LR 的干预可明显抑制 BLM 诱导的大鼠肺组织细胞 TGF- β 表达: TGF- β 是目前已知最强的促进组织纤维化的蛋白因子, 也是纤维化形成机制及抗纤维化研究的重要分子靶标。TGF- β 可以促进上皮间质转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)及肌成纤维细胞形成^(11, 12)。气管内滴注 BLM 引起大鼠肺组织细胞 TGF- β 的释放显著增高。而 BLM 气道内滴注后, MC-RR 或 MC-LR 的干预均明显抑制 TGF- β 的转录和翻译表达, 其中 LR7 干预组和 RR14 干预组抑制 TGF- β 表达的幅度最大(图 7, 图 8A)。

(5) MC-RR 或 MC-LR 的干预可明显阻抑 BLM 诱导的大鼠肺组织细胞 TGF- β /Smad 信号通路活性: 组织细胞释放的 TGF- β 通过与细胞膜表面的 TGF- β 受体结合, 激活 TGF- β /Smad 信号通路。引起 Smad2/3 表达增高(蛋白磷酸化水平增高), 并与 Smad4 形成复合体, 转入细胞核, 改变核基因的表达, 启动 EMT 及肌成纤维细胞分化, 导致组织纤维化形成^(13, 14)。在气管内滴注 BLM 构建肺纤维化模型的大鼠肺组织细胞, Smad2/3 表达(包括蛋白磷酸化水平)明显增高, 显示 TGF- β /Smad 信号通路的激活。而针对 BLM 建模大鼠给予 MC-RR 或 MC-LR 饮水干预均明显降低组织细胞中 Smad2/3 表达(包括蛋白磷酸化水平的降低)。正常细胞内 TGF- β /Smad 信号通路还存在 Smad7 的抑制调控。在 MC-RR 或 MC-LR 干预大鼠, 同时观察到 Smad7 的表达显著增高。充分体现了 MC-RR 或 MC-LR 对诱导性肺纤维化形成的阻抑作用(图 8)。

(6) MC-RR 或 MC-LR 的干预可明显抑制 TGF- β 介导的下游促进纤维化分子

P4HA3(an α -subunit of collagen prolyl hydroxylase)的表达: P4HA3 是近年鉴定的TGF- β 诱导下游上调表达的促纤维化因子,在临床肺纤维化患者肺组织,及BLM诱导肺纤维化模型大鼠肺组织中 P4HA3 表达明显增高⁽¹⁵⁾。而对 BLM 建模大鼠给予 MC-RR 或 MC-LR 干预可抑制 P4HA3 的表达,其中在 RR14、LR7 组抑制效果明显(图 9)。

(7) MC-RR 或 MC-LR 的干预可明显阻抑具有促进纤维化形成作用的细胞因子 VEGF 和 ET1 的释放:组织纤维化病理发生过程中常伴有其他细胞因子的释放,并对纤维化的发展具有促进作用。VEGF(Vascular endothelial growth factor)是已知功能效应最强的血管生长因子之一。组织细胞 VEGF 含量的增高可促进血管通透性,导致巨噬细胞迁移、聚集和活化,引起 TGF- β 释放增多。纤维化组织亦常见 ET-1 的表达上调⁽¹⁶⁾。有研究提示,ET-1 具有促进成纤维细胞增殖,诱导成纤维细胞向肌成纤维细胞分化,抑制胶原蛋白降解的作用⁽¹⁷⁾。在给予MC-RR 或 MC-LR 饮水干预肺纤维化模型大鼠肺组织中,VEGF 和 ET-1 的转录表达均显著降低(图 10)。

作为提出本发明基础的上述实验结果明确显示,针对博来霉素诱导肺纤维化的病理学改变,MC-RR 及 MC-LR 具有有效的干预和治疗作用。其重要机制是通过下调 TGF- β 的表达,阻抑 TGF- β /Smad 信号通路,抑制肌成纤维细胞分化和胶原蛋白的合成,最终缓解和阻滞细胞外基质(ECM)的异常沉积。

因此,本发明的微囊藻毒素在开发、制备预防和治疗器官组织纤维化疾病的药物中有新的重要用途。

参考文献

1. Wallace K, Burt AD, Wright MC. Liver fibrosis. *Biochem J*, 2008, 411(1):1.
2. LeBleu VS, Taduri G, O'Connell J, Teng Y, Cooke VG, Woda C, Sugimoto H, Kalluri R. Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat Med*, 2013, 19(8):1047-53.
3. Meng XM, Tang PM, Li J, Lan HY. TGF- β /Smad signaling in renal fibrosis. *Front Physiol*, 2015, 6:82.
4. Hutchinson J, Fogarty A, Hubbard R, McKeever T. Global incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review. *Eur Respir J*, 2015,

46(3):795.

5. Baumgartner KB, Samet JM, Coultas DB, Stidley CA, Hunt WC, Colby TV, Waldron JA. Occupational and environmental risk factors for idiopathic pulmonary fibrosis: a multicenter case-control study. *Am J Epidemiol*, 2000, 152(4):307.
6. King TJ, Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet*, 2011, 378(9807):1949.
7. Tager AM, LaCamera P, Shea BS, Campanella GS, Selman M, Zhao Z, Polosukhin V, Wain J, Karimi-Shah B A, Kim ND, Hart WK, Pardo A, Blackwell TS, Xu Y, Chun J, Luster AD. The lysophosphatidic acid receptor LPA1 links pulmonary fibrosis to lung injury by mediating fibroblast recruitment and vascular leak. *Nat Med*, 2008, 14:45.
8. Zhang H, Liu XF, Chen S, Wu JH, Ye X, Xu LZ, Chen HM, Zhang DP, Tan RX, Wang YP, Tectorigenin inhibits the in vitro proliferation and enhances miR-338* expression of pulmonary fibroblasts in rats with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Ethnopharmacol*, 2010, 131(1):165.
9. van Apeldoorn ME 1 , van Egmond HP, Speijers GJ, Bakker GJ. Toxins of cyanobacteria. *Mol Nutr Food Res*, 2007, 51(1):7-60.
10. Wolf HU, Frank C. Toxicity assessment of cyanobacterial toxin mixtures, *Environ. Toxicol*, 2002, 17, 395–399.
11. Allison SJ. Fibrosis: the source of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat. Rev. Nephrol*, 2013, 9:494.
12. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest*, 2003, 112:1776.
13. Lan HY. Diverse roles of TGF- β /Smads in renal fibrosis and inflammation. *Int J Biol Sci*, 2011, 7(7):1056.
14. Yan X, Liu Z, Chen Y. Regulation of TGF-beta signaling by Smad7. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2009, 41(4):263.
15. Luo Y, Xu W, Chen H, Warburton D, Dong R, Qian B, Selman M, Gauldie J, Kolb M, Shi W. A novel profibrotic mechanism mediated by TGF β -stimulated collagen prolyl hydroxylase expression in fibrotic lung mesenchymal cells. *J Pathol*, 2015, 236(3):384.
16. Wernig G, Chen SY, Cui L, Van Neste C, Tsai JM, Kambham N, Vogel H,

Natkunam Y, Gilliland DG, Nolan G, Weissman IL. Unifying mechanism for different fibrotic diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(18):4757.

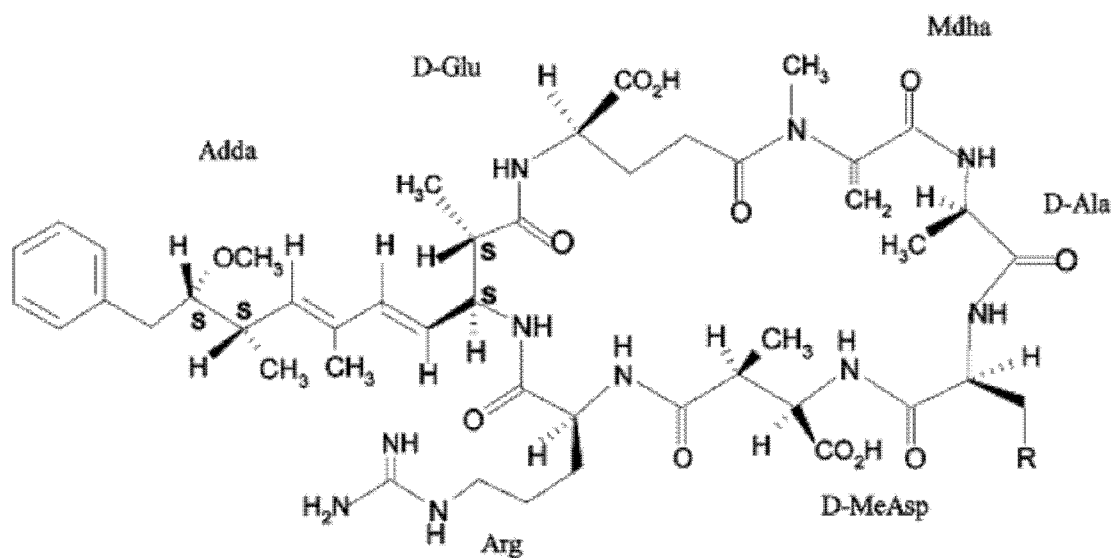
17. Anguiano L, Riera M, Pascual J, Soler MJ. Endothelin Blockade in Diabetic Kidney Disease. *J Clin Med*, 2015, 4(6):1171.

权利要求

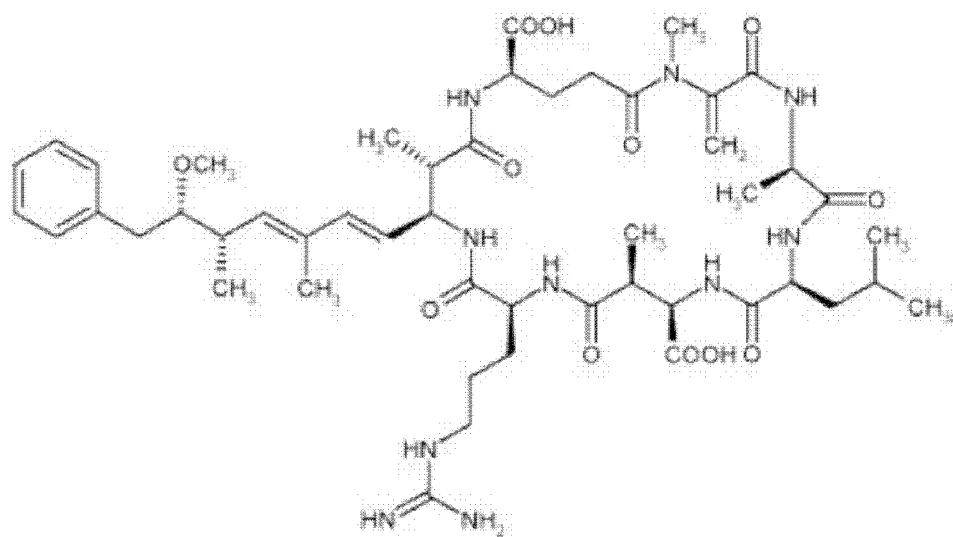
1. 微囊藻毒素在制备用于预防或治疗器官组织纤维化疾病的药物中的用途。
2. 权利要求1的用途，其中所述微囊藻毒素是含单环七肽结构，其第二和第四位氨基酸分别为亮氨酸和精氨酸的微囊藻毒素-LR。
3. 权利要求1的用途，其中所述微囊藻毒素是含单环七肽结构，其第二和第四位氨基酸均为精氨酸的微囊藻毒素-RR。
4. 权利要求1的用途，其中所述器官是肺。
5. 权利要求1的用途，其中所述药物抑制肌成纤维细胞形成。
6. 权利要求1的用途，其中所述药物降低 α -SMA水平。
7. 权利要求1的用途，其中所述药物抑制胶原蛋白I表达。
8. 权利要求1的用途，其中所述药物抑制TGF- β 的 mRNA和蛋白质表达。
9. 权利要求1的用途，其中所述药物抑制Smad2和Smad3表达。
10. 权利要求1的用途，其中所述药物上调Smad7的表达。
11. 权利要求1的用途，其中所述药物抑制P4HA3的表达。
12. 一种抑制肌成纤维细胞分化和胶原蛋白合成的方法，该方法通过使用一种或多种微囊藻毒素抑制TGF- β /Smad信号通路而实现。
13. 权利要求12的方法，其中所述微囊藻毒素是含单环七肽结构，其第二和第四位氨基酸分别为亮氨酸和精氨酸的微囊藻毒素-LR。
14. 权利要求12的方法，其中所述微囊藻毒素是含单环七肽结构，其第二和第四

位氨基酸均为精氨酸的微囊藻毒素-RR。

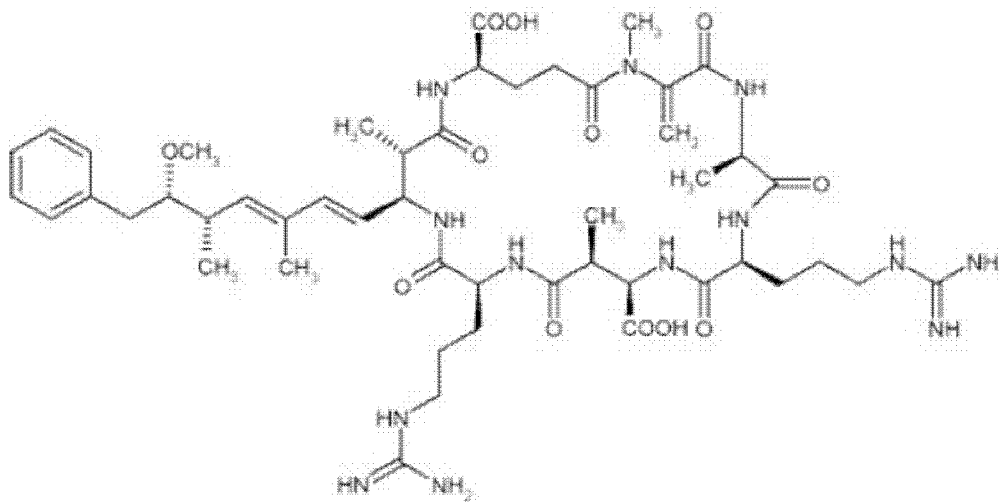
A

Microcystin LR $R = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$ Microcystin RR $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH}_2)=\text{NH}$

B



C



D

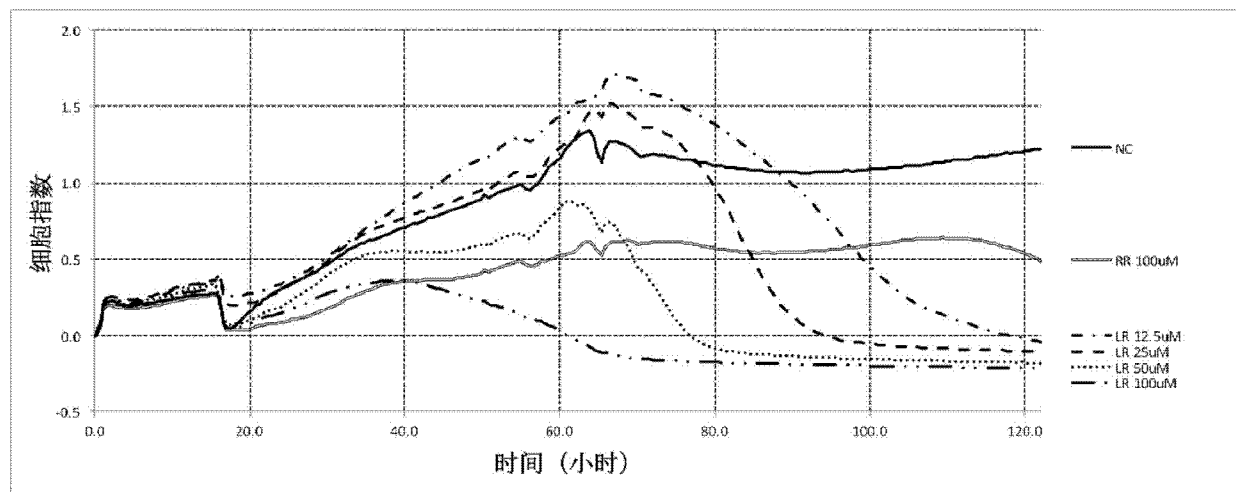


图1

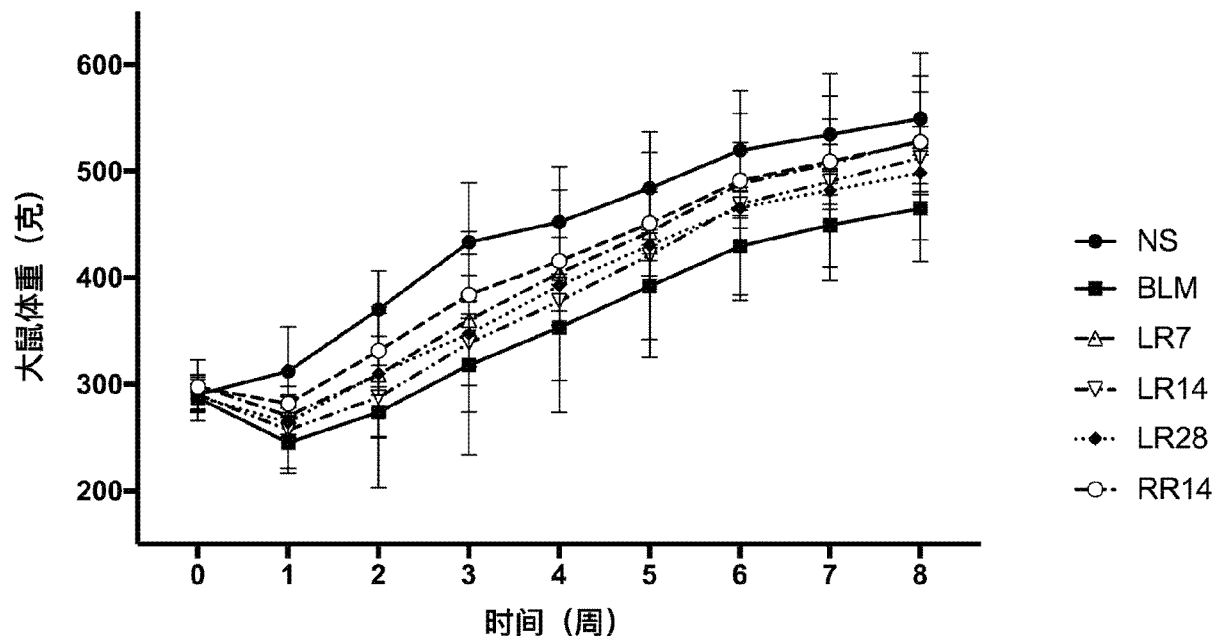


图2

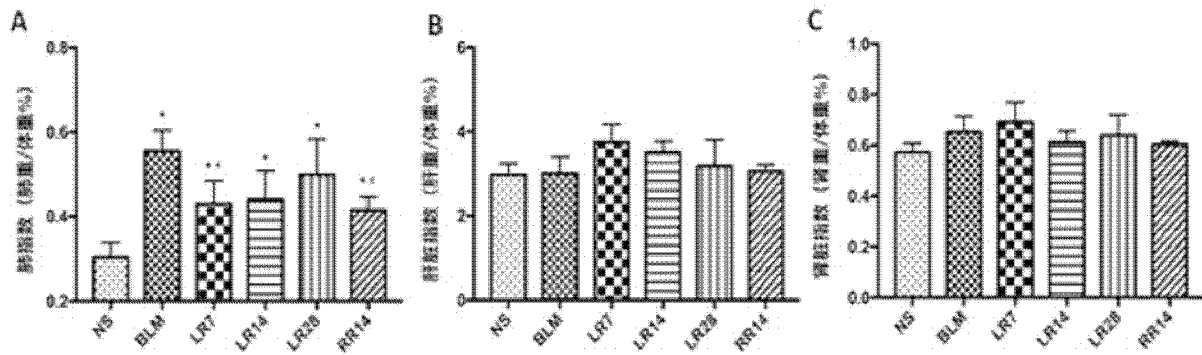


图3

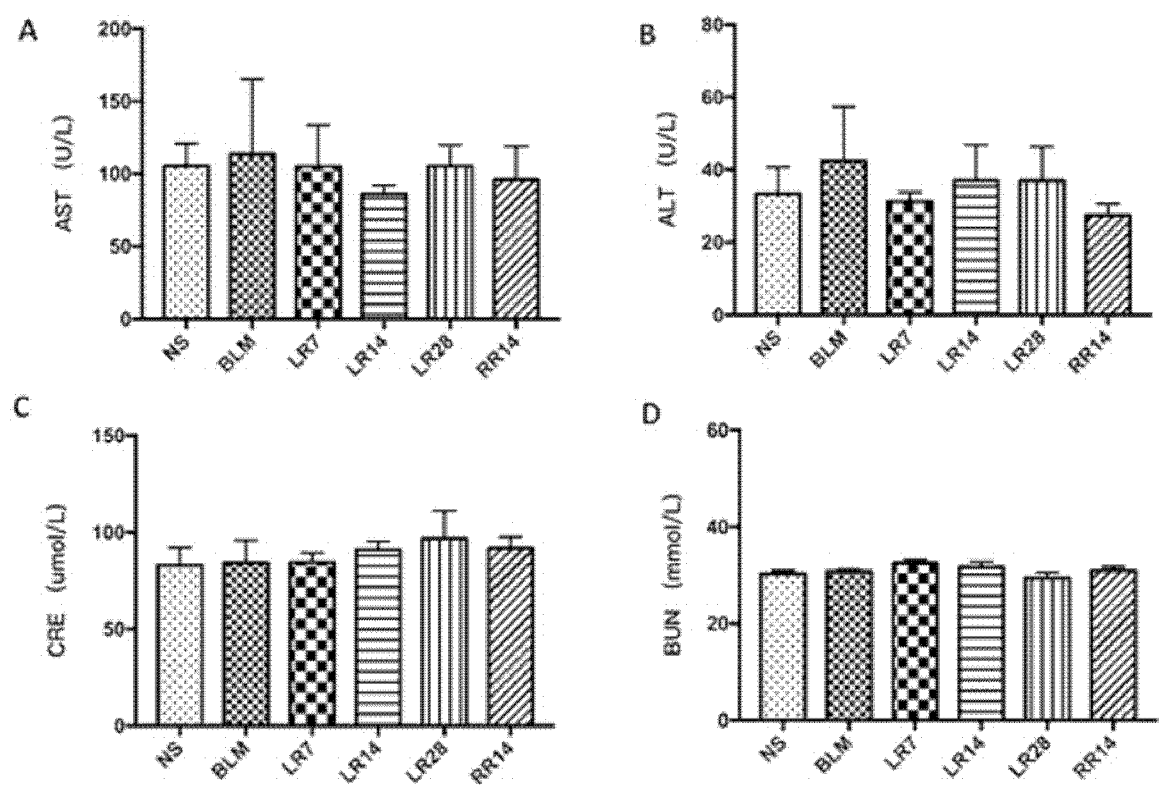


图4

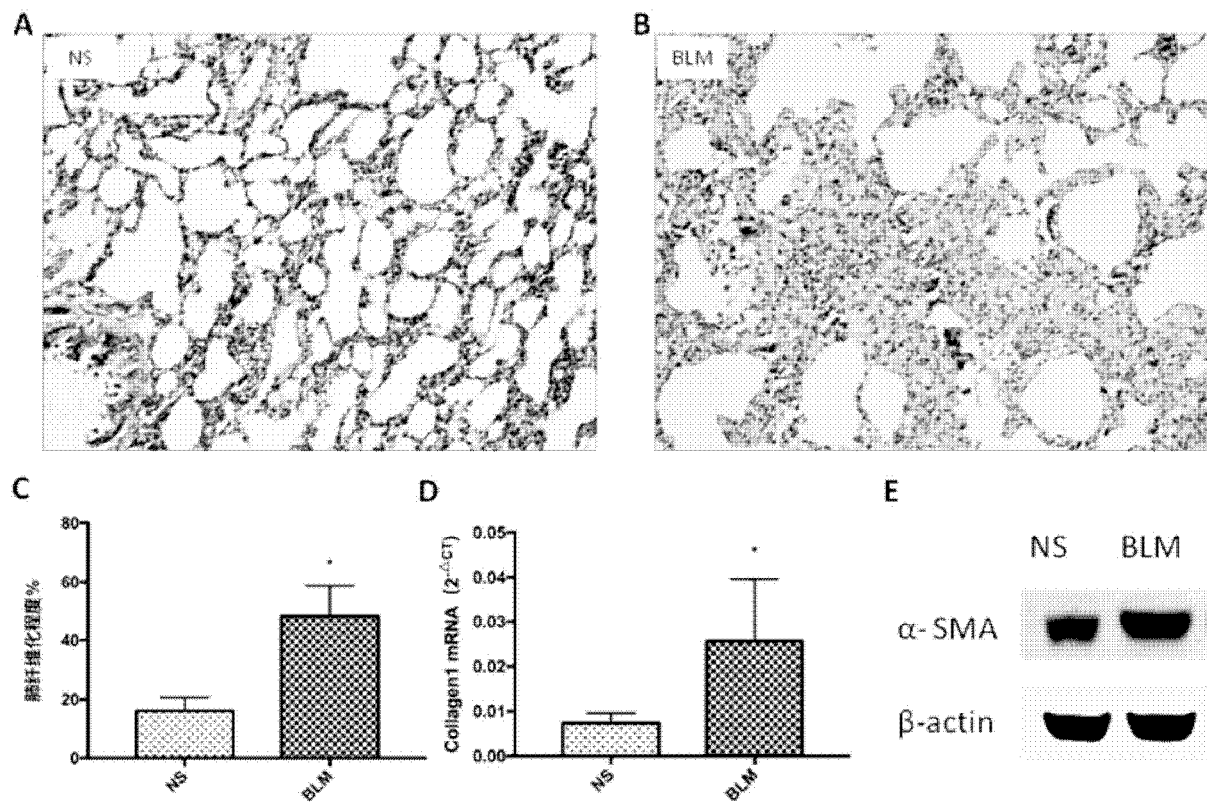


图5

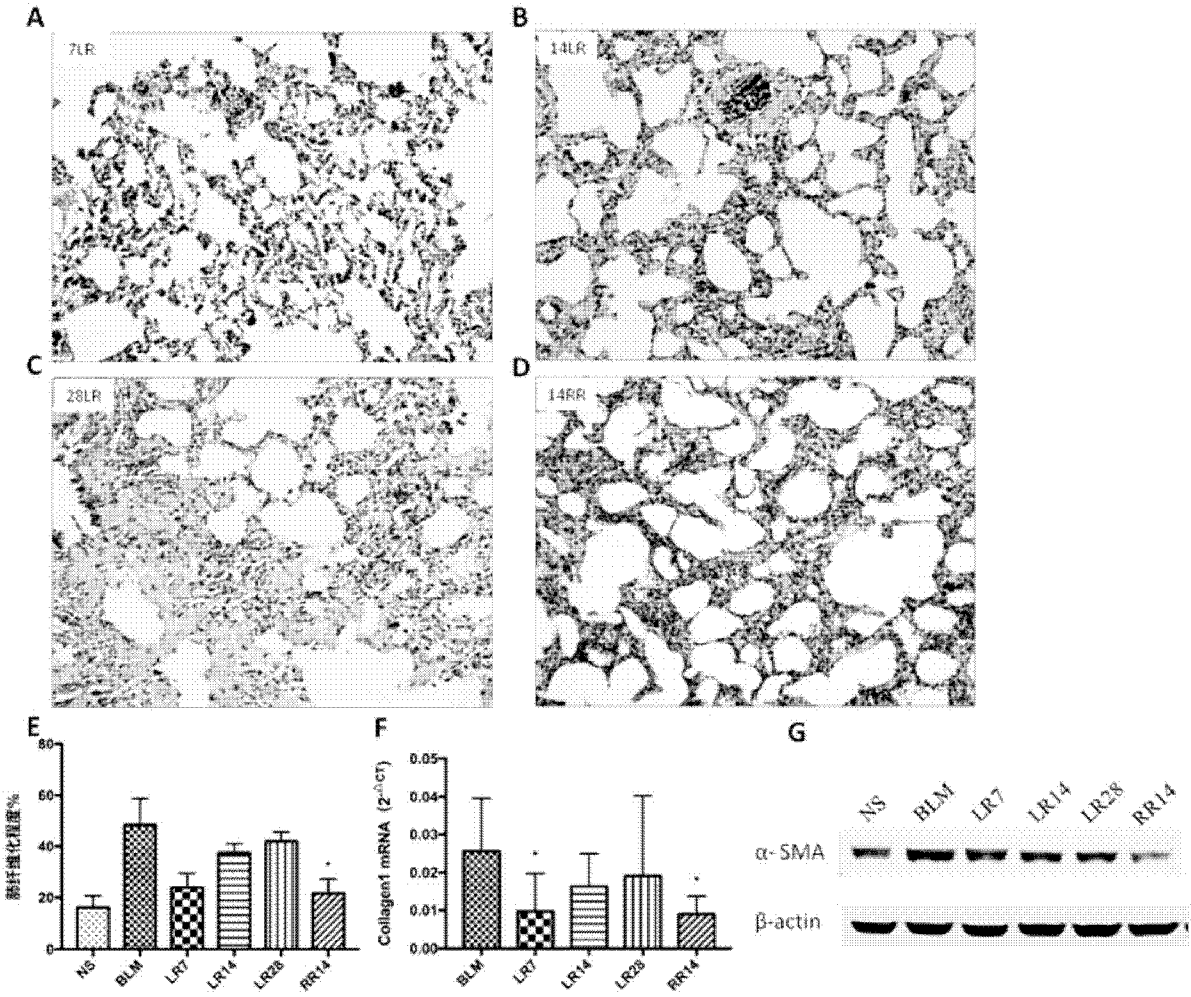


图6

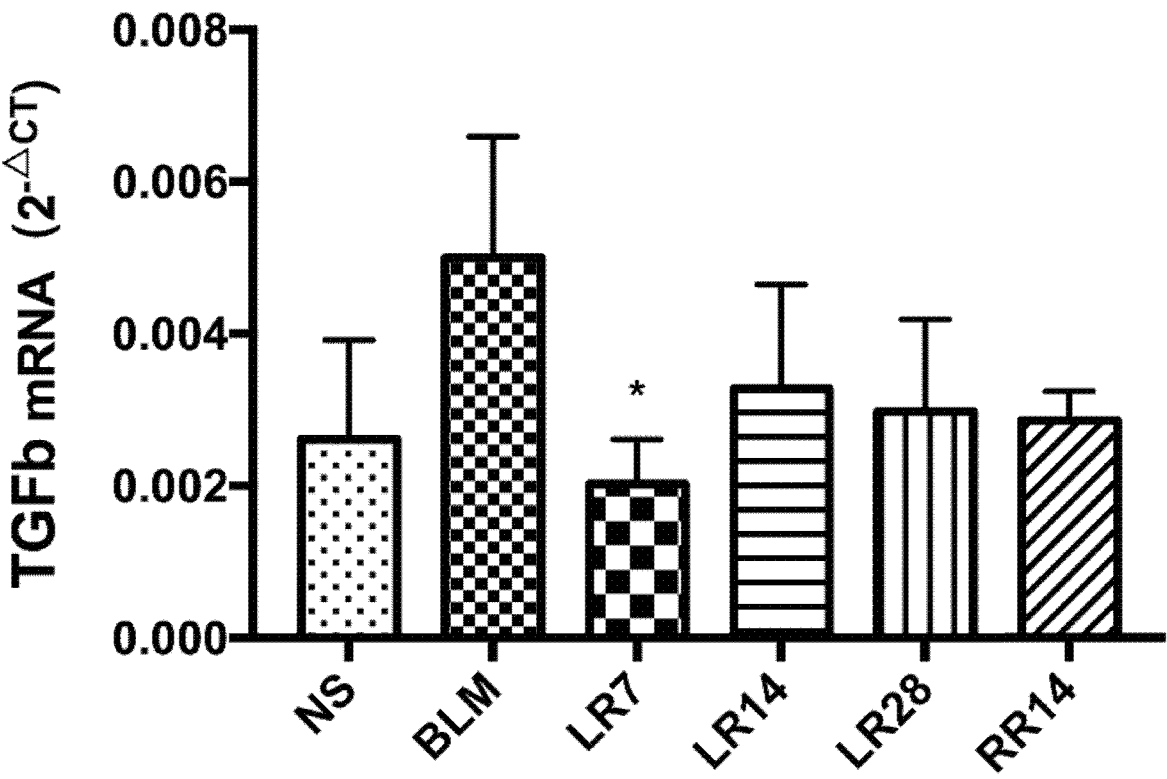


图7

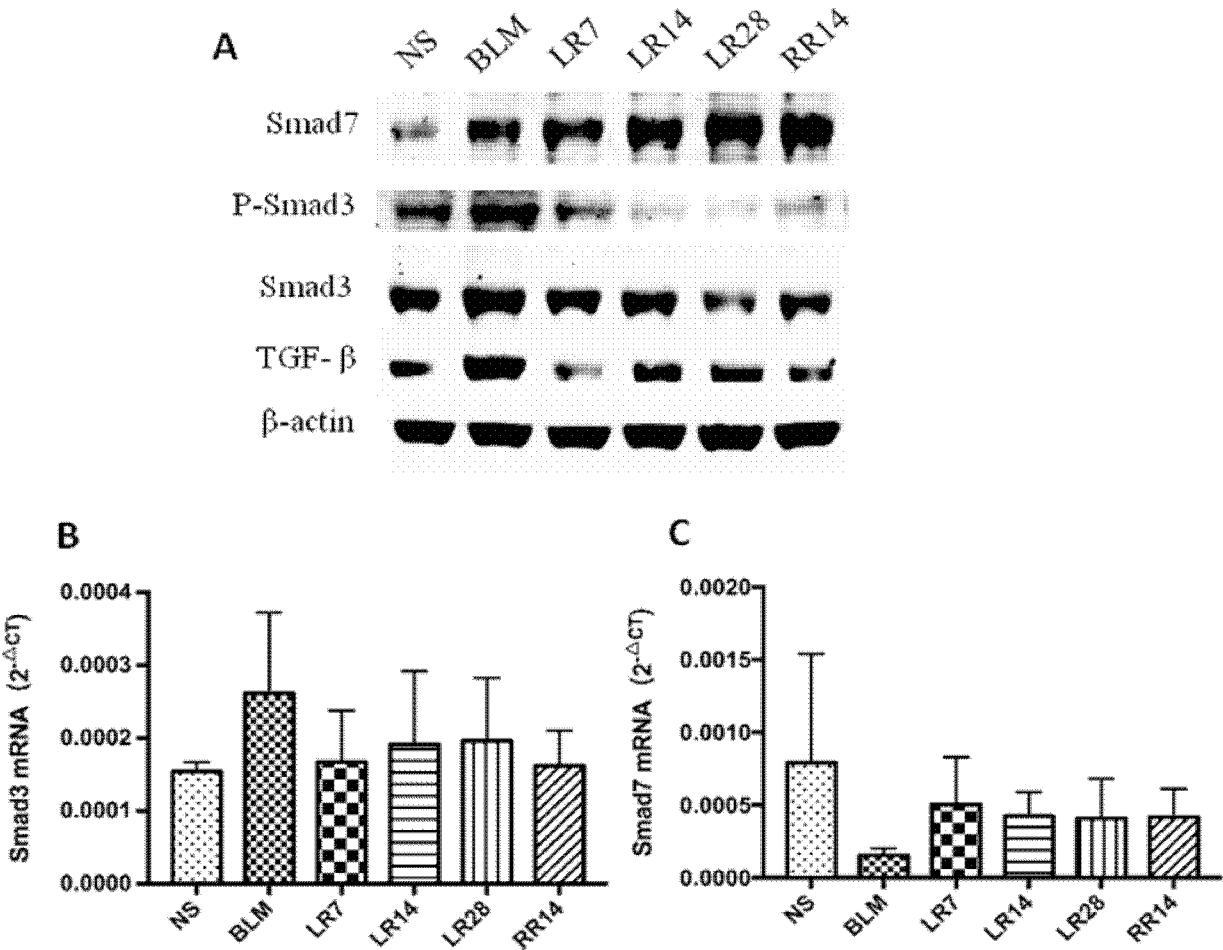


图8

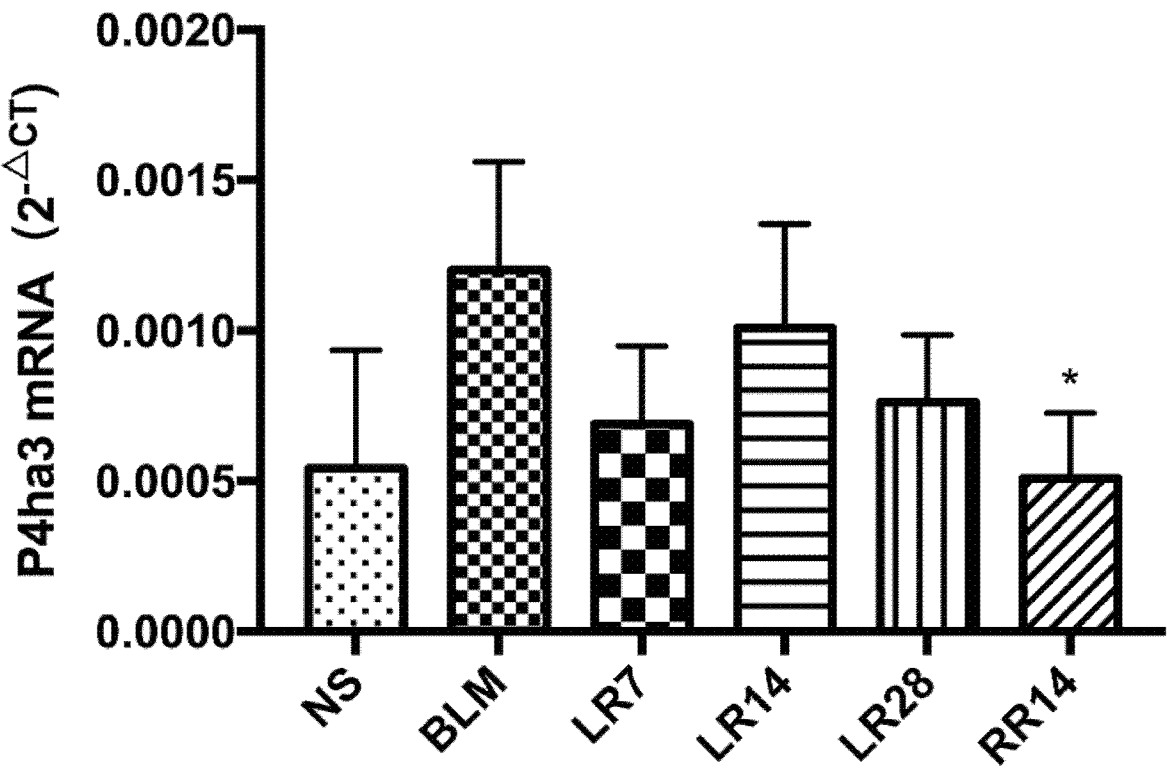


图9

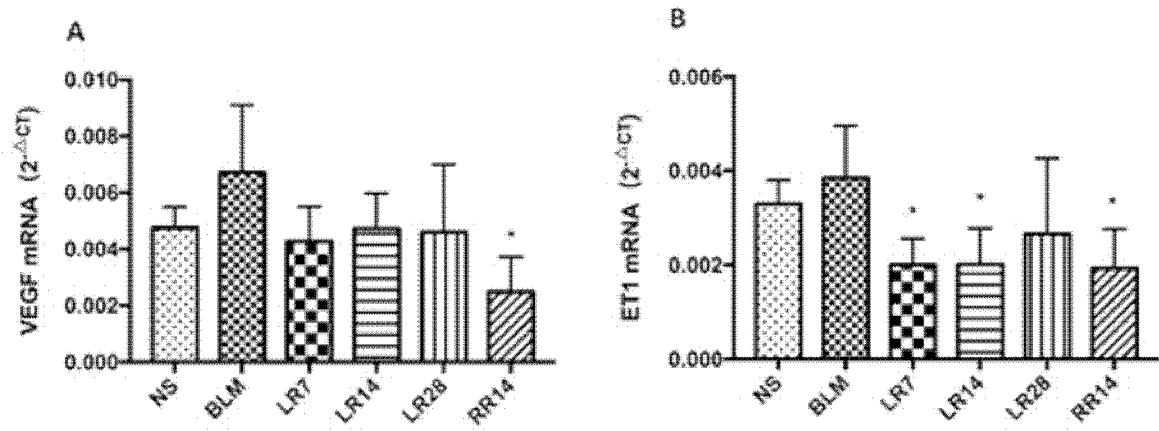


图10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/099249

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/12 (2006.01) i; A61P 11/00 (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)

DWPI, CNKI, CNABS, CNTXT, PubMed, GOOGLE Scholar, ISI Web of Knowledge, STN: 南京大学, 王亚平, 徐力致, 王洁, 赵庆亚, 微囊藻毒素, 亮氨酸, 精氨酸, 微囊藻毒素-LR, 微囊藻毒素-RR, 博来霉素, 肺纤维化, Microcystins, Microcystin LR, MCs, Arg, microcystin-LR, pulmonary fibrosis?, TGF- β , Angiogenesis, Bleocin, 11056-06-7, 101043-37-2

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 106620647 A (NANJING UNIVERSITY), 10 May 2017 (10.05.2017), claims 1-4	1-2, 4-13
A	丁笑生, “微囊藻毒素及其肾毒性的研究进展”, “安徽农业科学”, 31 December 2008 (31.12.2008), 36(31), pages 13506-13507, (DING, Xiaosheng, “Research Progress on Microcystin and Its Kidney Toxicity”, “Journal of Anhui Agricultural Sciences”)	1-14
A	李效宇等, “微囊藻毒素与人类健康关系研究进展”, “中国公共卫生”, 31 August 2008 (31.08.2008), 24(08), pages 1016-1017, (“Chinese Journal of Public Health”), non-official translation (LI, Xiaoyu et al., “Research Progress on Relationship between Microcystin and Human Health”)	1-14
A	US 2014271923 A1 (REID, C.B.), 18 September 2014 (18.09.2014), claims 1-7	1-14
A	CN 102524180 A (ANHUI UNIVERSITY), 04 July 2012 (04.07.2012), claims 1-5	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“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
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“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
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“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
“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)	“&” document member of the same patent family
“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	

Date of the actual completion of the international search 11 October 2017	Date of mailing of the international search report 26 October 2017
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer TU, Haihua Telephone No. (86-10) 62413749

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/099249

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.: 12-14
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] Claims 12-14 relate to a method for inhibiting differentiation of myofibroblasts and collagen synthesis. The method comprises a treatment relating to diseases of the human or animal body, not complying with PCT Rule 39.1(iv). This search report is carried out on the basis of assuming that the subject matter of claims 12-14 is "the use of one or more kinds of microcystins in the preparation of drugs for inhibiting differentiation of myofibroblasts and collagen synthesis".
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

International application No.
PCT/CN2017/099249

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GUZMAN, R.E. et al., "Hepatic Oxidative Stress Following Prolonged Sublethal Microcystin LR Exposure", "Toxicologic Pathology", 31 December 1999 (31.12.1999), 27(5), pages 582-588	1-14

International application No.
PCT/CN2017/099249

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2009)

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/099249

A. 主题的分类 A61K 38/12(2006.01)i; A61P 11/00(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)) DWPI, CNKI, CNABS, CNTXT, PubMed, GOOGLE Scholar, ISI Web of Knowledge, STN 南京大学, 王亚平, 徐力致, 王洁, 赵庆亚, 微囊藻毒素, 亮氨酸, 精氨酸, 微囊藻毒素-LR, 微囊藻毒素-RR, 博来霉素, 肺纤维化, Microcystins, Microcystin LR, MCs, Arg, microcystin-LR, pulmonary fibrosis?, TGF- β , Angiogenesis, Bleocin, 11056-06-7, 101043-37-2		
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 106620647 A (南京大学) 2017年 5月 10日 (2017 - 05 - 10) 权利要求1-4	1-2、4-13
A	丁笑生, . "微囊藻毒素及其肾毒性的研究进展," 《安徽农业科学》, 第36卷, 第31期, 2008年 12月 31日 (2008 - 12 - 31), 第13506-13507页	1-14
A	李效宇等, . "微囊藻毒素与人类健康关系研究进展," 《中国公共卫生》, 第24卷, 第08期, 2008年 8月 31日 (2008 - 08 - 31), 第1016-1017页	1-14
A	US 2014271923 A1 (CHRISTOPHER BRAIN REID) 2014年 9月 18日 (2014 - 09 - 18) 权利要求1-7	1-14
A	CN 102524180 A (安徽大学) 2012年 7月 4日 (2012 - 07 - 04) 权利要求1-5	1-14
☒ 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		国际检索报告邮寄日期
2017年 10月 11日		2017年 10月 26日
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员
中华人民共和国国家知识产权局(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		涂海华 电话号码 (86-10)62413749

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	GUZMAN, Roberto E等, . "Hepatic Oxidative Stress Following Prolonged Sublethal Microcystin LR Exposure, " 《Toxicologic Pathology》, , 第27卷, 第5期, 1999年 12月 31日 (1999 - 12 - 31), 第582-588页	1-14

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： 12-14
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12-14涉及一种抑制肌成纤维细胞分化和胶原蛋白合成的方法，所述方法包含了涉及人体或动物的疾病的治疗，不符合PCT实施细则39.1(iv)的规定。本检索报告是假设权利要求12-14主题为“一种或多种微囊藻毒素在制备抑制肌成纤维细胞分化和胶原蛋白合成药物中的应用”的基础上作出的。
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/CN2017/099249

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	106620647	A	2017年 5月 10日	无	
US	2014271923	A1	2014年 9月 18日	US 2016354370	A1 2016年 12月 8日
CN	102524180	A	2012年 7月 4日	无	