



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113181155 A

(43) 申请公布日 2021.07.30

(21) 申请号 202110435944.1

(22) 申请日 2021.04.22

(71) 申请人 澳门科技大学

地址 中国澳门氹仔伟龙马路

申请人 依诺科技(香港)有限公司

(72) 发明人 朱依淳 王冉

(74) 专利代理机构 珠海智专专利商标代理有限公司 44262

代理人 林永协

(51) Int. Cl.

A61K 31/198 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

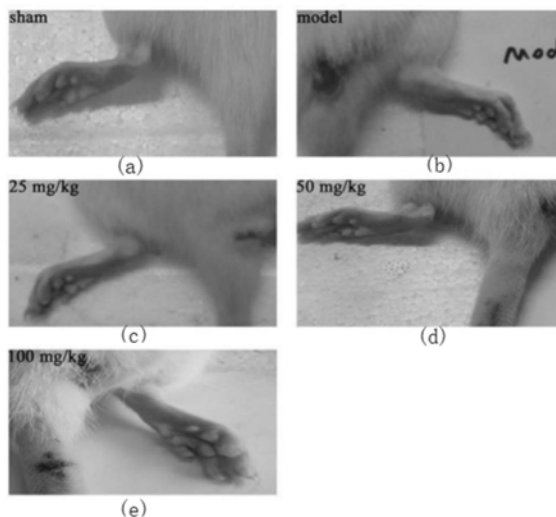
权利要求书1页 说明书4页 附图7页

### (54) 发明名称

内源性硫化氢供体在制备治疗类风湿性关节炎药物中的用途

### (57) 摘要

本发明属于药物新用途领域,涉及内源性硫化氢供体在制备治疗类风湿性关节炎药物中的用途,其中NAV2作为靶点。本发明采用的试验包括SPRC抑制AIA大鼠炎症及NAV2表达试验、检测NAV2在类风湿性关节炎病人外周血中异常表达试验、NAV2通过激活Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路促进MH7A细胞炎症反应试验等,结果表明:SPRC通过抑制NAV2表达缓解类风湿性关节炎,直接激活NAV2可以促进类风湿性关节炎发展,抑制NAV2表达可以对类风湿性关节炎起到显著的治疗效果。



1. 内源性硫化氢供体在制备治疗类风湿性关节炎药物中的用途, 其特征在于以NAV2为作用靶点。

2. 根据权利要求1所述的用途, 其特征在于所述内源性硫化氢供体用于制备抑制NAV2蛋白表达的药物。

3. 根据权利要求1或2所述的用途, 其特征在于所述内源性硫化氢供体为SPRC。

4. 根据权利要求1或2所述的用途, 其特征在于所述内源性硫化氢供体用于制备改善关节肿胀的药物。

5. 根据权利要求1或2所述的用途, 其特征在于所述内源性硫化氢供体用于制备缓解炎症带来的疼痛反应的药物。

6. 根据权利要求1或2所述的用途, 其特征在于所述内源性硫化氢供体用于制备抑制炎症相关蛋白表达的药物, 所述炎症相关蛋白为IL-6、ICAM-1和/或MMP9。

7. 根据权利要求1或2所述的用途, 其特征在于所述内源性硫化氢供体用于制备抑制滑膜成纤维细胞增殖、迁移和/或侵袭的药物。

8. 根据权利要求1或2所述的用途, 其特征在于所述内源性硫化氢供体用于制备减少Wnt/ $\beta$ -catenin通路激活的药物。

## 内源性硫化氢供体在制备治疗类风湿性关节炎药物中的用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及药物新用途领域,具体涉及新型内源性硫化氢供体在制备治疗NAV2作为靶点的类风湿性关节炎药物中的用途。

### 背景技术

[0002] Neuron navigator 2 (NAV2) 首次被鉴定为人神经母细胞瘤细胞(维甲酸诱导的神经母细胞瘤1,RAINB1)中的全反式维甲酸(all-trans retinoic acid,atRA)的应答基因,该基因在atRA暴露后可延伸神经突起。它在结构上与秀丽隐杆线虫unc-53基因相关,是细胞迁移和轴突生长所必需的。NAV2蛋白位于SH-SY5Y细胞的细胞体和生长神经突上,其模式与神经丝和微管蛋白非常相似。在Cos-1细胞中转染NAV2缺失的载体,发现NAV2蛋白(aa 837-1065)的一个区域定位在微管细胞骨架。硫化氢是人体内半胱氨酸等的代谢产物。虽然体内性硫化氢的生理浓度非常低,但是研究表明硫化氢广泛参与多种疾病的发生与发展,尤其对机体炎症有明显的调节作用。

[0003] 类风湿性关节炎(RA)是一种常见的全身自身免疫性炎症性疾病,其特征是关节疼痛、肿胀,可严重损害身体功能和生活质量。临床实践中常见的肌肉骨骼疼痛、肿胀和僵硬症状,因此熟悉RA的诊断和处理是至关重要的。风湿性关节炎患者发生严重感染、呼吸道疾病、骨质疏松症、心血管疾病、癌症和死亡的风险高于普通人群。RA严重降低患者生活质量,并显著增加患者死亡率,对公共卫生威胁极大。近年来,早期诊断、积极治疗和扩大治疗选择的抗风湿性关节炎药物,显著改善了RA的治疗和长期预后。

[0004] 迄今为止,RA患者的治疗主要集中在治疗炎症和间接治疗疼痛的基础之上。目前临床上大多采用抗风湿药(DMARDs)等基础药物治疗。这些药物通常需要大约1至3个月才能发挥疗效。部分疗效欠佳的患者还需长期服药,严重影响患者生活品质和工作能力。由此引发的家庭负担和社会经济影响更是不容忽视。因此,国内外风湿病专家试图从各方面着手开发新型治疗方案。患者期盼有更加安全、有效的RA治疗药物早日问世。

[0005] 现有研究表明,硫化氢具有显著抗炎作用,但硫化氢对于RA炎症及疼痛方面的疗效尚不明确。

### 发明内容

[0006] 针对现有技术的不足,本发明的目的是提供内源性硫化氢供体在治疗NAV2作为靶点的类风湿性关节炎中的用途,有助于制备更加安全、有效的RA治疗药物。

[0007] 为实现本发明的目的,本发明提供了内源性硫化氢供体在制备治疗类风湿性关节炎药物中的用途,其中NAV2为作用靶点。

[0008] 进一步的技术方案是,内源性硫化氢供体可显著降低NAV2蛋白表达,进而缓解炎症症状。

[0009] 进一步的技术方案是,内源性硫化氢供体为SPRC,即炔丙基半胱氨酸。

[0010] 进一步的技术方案是,NAV2及内源性硫化氢供体用于治疗类风湿性关节炎包括改

善关节肿胀、缓解炎症带来的疼痛反应。

[0011] 进一步的技术方案是,NAV2及内源性硫化氢供体可显著降低炎症蛋白的表达,缓解炎症症状。

[0012] 进一步的技术方案是,沉默NAV2表达可抑制滑膜成纤维细胞增殖,侵袭,缓解炎症症状,内源性硫化氢供体降低NAV2蛋白表达也能够抑制滑膜成纤维细胞增殖、迁移和侵袭从而缓解炎症症状。

[0013] 进一步的技术方案是,内源性硫化氢供体降低NAV2表达,能够通过减少炎症条件下Wnt/ $\beta$ -catenin通路的激活来治疗类风湿性关节炎。

[0014] 与现有技术相比,本发明能够取得以下有益效果:

[0015] 本发明提供了NAV2及硫化氢在炎症中的新用途,具体涉及NAV2及硫化氢在制备治疗RA药物中的用途。本发明采用硫化氢内源性供体例如SPRC能够用于治疗RA、抑制炎症,并通过AIA佐剂诱导的大鼠关节炎模型试验、人类类风湿性关节炎MH7A细胞RA模型试验等进行验证,试验结果显示,硫化氢内源性供体SPRC能够显著缓解AIA大鼠的炎症症状、改善关节肿胀;NAV2在RA中的高表达能够促进炎症发生发展,NAV2通过激活Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路,可以促进MH7A细胞增殖,侵袭和迁移,表明NAV2是RA的新型治疗靶点,NAV2能够用于制备治疗RA的药物;硫化氢内源性供体SPRC通过抑制大鼠滑膜组织NAV2的表达,减少下游Wnt/ $\beta$ -catenin通路的激活,能够用于制备治疗RA的药物。

## 附图说明

[0016] 图1显示SPRC剂量依赖性的缓解AIA大鼠关节肿胀程度;其中,图1(a)为sham组结果,图1(b)为AIA组(model组),图1(c)为AIA+25mg/kg SPRC,图1(d)为AIA+50mg/kg SPRC,图1(e)为AIA+100mg/kg SPRC。

[0017] 图2显示SPRC处理后AIA大鼠的相关炎症蛋白表达;其中图2(a)为Western Blot图,图2(b)为MMP9相对表达量,图2(c)为ICAM-1相对表达量,图2(d)为IL-6相对表达量,图2(e)为Nrf2相对表达量,图2(f)为CSE相对表达量;图中,GAPDH作为参照,\*、\*\*和\*\*\*分别表示与AIA rats组比较, $p<0.05$ 、 $p<0.01$ 和 $p<0.001$ 。

[0018] 图3显示SPRC处理可显著降低AIA大鼠滑膜组织NAV2蛋白的表达;以Western Blot检测蛋白表达水平,GAPDH作为参照。

[0019] 图4显示NAV2在类风湿性关节炎病人外周血中异常高表达;其中图4(a)为Western Blot图,图4(b)为NAV2的相对表达量;图中,\*\*\*表示与健康组或OA组比较, $p<0.001$ 。

[0020] 图5显示NAV2在类风湿性关节炎病人滑膜成纤维细胞中异常高表达;其中图5(a)为Western Blot图,图5(b)为免疫荧光方法检测蛋白表达水平的图片。

[0021] 图6显示NAV2可以促进MH7A细胞炎症发展;以Western Blot检测NAV2以及相关炎症蛋白的表达水平,GAPDH作为参照。

[0022] 图7显示NAV2可以激活Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路;以Western Blot检测蛋白表达水平。

[0023] 图8显示NAV2可以促进MH7A细胞增殖、侵袭和迁移;以划痕实验、Transwell小室实验、CCK-8增殖实验检测;图8(a)为实验结果图片,图8(b)为细胞增殖,图8(c)为愈合率,图8(d)为细胞计数;图中,\*\*\*是与TNF- $\alpha$ 组比较, $p<0.001$ 。

[0024] 以下结合附图以及具体实施方式对本发明作进一步详细的说明。

## 具体实施方式

### [0025] 实施例1

[0026] 将180g至200g的SD大鼠分为6组：(1) sham, (2) AIA, (3) AIA+1mg/kg MTX, (4) AIA+100mg/kg SPRC, (5) AIA+50mg/kg SPRC, (6) AIA+25mg/kg SPRC。每组15只。其中,第(1)组sham为假手术组;第(2)组AIA即模型(model)组,是通过尾根部皮下注射完全弗氏佐剂4mg/ml建立AIA佐剂诱导的大鼠关节炎模型,AIA病理学表现与人类类风湿性关节炎相似;第(3)组是造模后,腹腔注射对应剂量的甲氨蝶呤MTX;第(4)组至第(6)组是造模后,口服灌胃给予对应剂量的SPRC。连续给药28天后,检测相关指标。

[0027] 结果显示,如图1所示,SPRC剂量依赖性地减轻了AIA大鼠的关节严重程度,改善关节肿胀,并且能够缓解炎症带来的疼痛。如图2所示,Western Blot显示SPRC治疗剂量依赖性地降低了炎症关节中MMP-9、ICAM-1和IL-6的表达,此外,SPRC治疗后可显著增加炎症关节中CSE和Nrf2的表达。如图3所示,SPRC显著降低NAV2蛋白表达。

[0028] 本实施例证明了SPRC能够抑制AIA大鼠的关节炎症。

### [0029] 实施例2

[0030] 在签署知情自愿同意书的前提下,在上海中医药大学龙华医院风湿科采集RA患者、骨关节炎(OA)患者及健康(Healthy)志愿者的血液。所有来自志愿者的流行病学调查和分类均按照美国风湿病学会的标准进行,志愿者情况如下表1所示,其中N为人数,NA表示没有评估。

[0031] 表1 RA、OA和健康志愿者数据表

| 参数             | RA (N=20)  | OA (N=9)   | Healthy (N=6) |
|----------------|------------|------------|---------------|
| 年龄(岁(平均数(范围))) | 61 (37~79) | 56 (58~75) | 46 (18~65)    |
| 性别(人数(女/男))    | 18/2       | 7/2        | 3/3           |
| 类风湿因子>20IU/mL  | 16/20      | NA         | NA            |

[0033] 首先对临床血样进行分离和提取白细胞,然后进行后续实验。Western Blot结果显示,如图4所示,与OA患者或健康样本相比较,RA患者血液中NAV2表达显著增加。

[0034] 本实施例表明NAV2在类风湿性关节炎病人外周血中异常高表达。

### [0035] 实施例3

[0036] 收集6例类风湿性关节炎(RA)患者行膝关节置换术后摘取的滑膜组织,与此同时收集了6例骨关节炎(OA)滑膜损伤需行滑膜切除手术患者的滑膜组织。进行原代成纤维样滑膜细胞(FLS)的提取和培养,并进行后续实验。如图5所示,Western Blot和细胞免疫荧光结果显示相对于OA滑膜成纤维细胞,NAV2在RA滑膜成纤维细胞中表达显著增加。

[0037] 本实施例证明了NAV2在类风湿性关节炎病人滑膜成纤维细胞中异常高表达。

### [0038] 实施例4

[0039] 炎症条件下MH7A细胞Wnt/ $\beta$ -catenin通路的激活会导致炎症以及增殖、侵袭和迁移的增强。MH7A细胞RA模型试验：(1) TNF- $\alpha$ +si NAV2组：对MH7A细胞转染si NAV2小干扰RNA以沉默NAV2的表达,转染48h后,以20mg/kg TNF- $\alpha$ 刺激建立炎症模型,12h后进行检测；(2) TNF- $\alpha$ +siScr组：对MH7A细胞转染si Scr小干扰RNA以沉默Scr的表达,其余步骤与

TNF- $\alpha$ +si NAV2组相同；(3) TNF- $\alpha$ 组：直接以TNF- $\alpha$ 刺激建立炎症模型；(4) Control组，即空白组。Western Blot结果显示，NAV2可促进炎症反应(如图6所示)，激活Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路(如图7所示)，促进MH7A细胞增殖、侵袭和迁移(如图8所示)。

[0040] 本实施例证明了NAV2通过激活Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路促进MH7A细胞炎症反应。

[0041] 综合上述实施例的试验结果，表明硫化氢内源性供体SPRC能够显著缓解AIA大鼠的炎症症状，改善关节肿胀，硫化氢内源性供体SPRC能够用于制备治疗RA的药物。进一步研究发现，NAV2在RA中的高表达能够促进炎症发生发展，NAV2通过激活Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路，可以促进MH7A细胞增殖、侵袭和迁移，表明NAV2是RA的新型治疗靶点，NAV2能够用于制备治疗RA的药物。SPRC的治疗效果是通过抑制NAV2的表达实现，SPRC能够抑制下游Wnt/ $\beta$ -catenin通路的激活。

[0042] 最后需要强调的是，以上所述仅为本发明的优选实施例，并不用于限制本发明。凡在本发明的精神和原则之内，所做的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

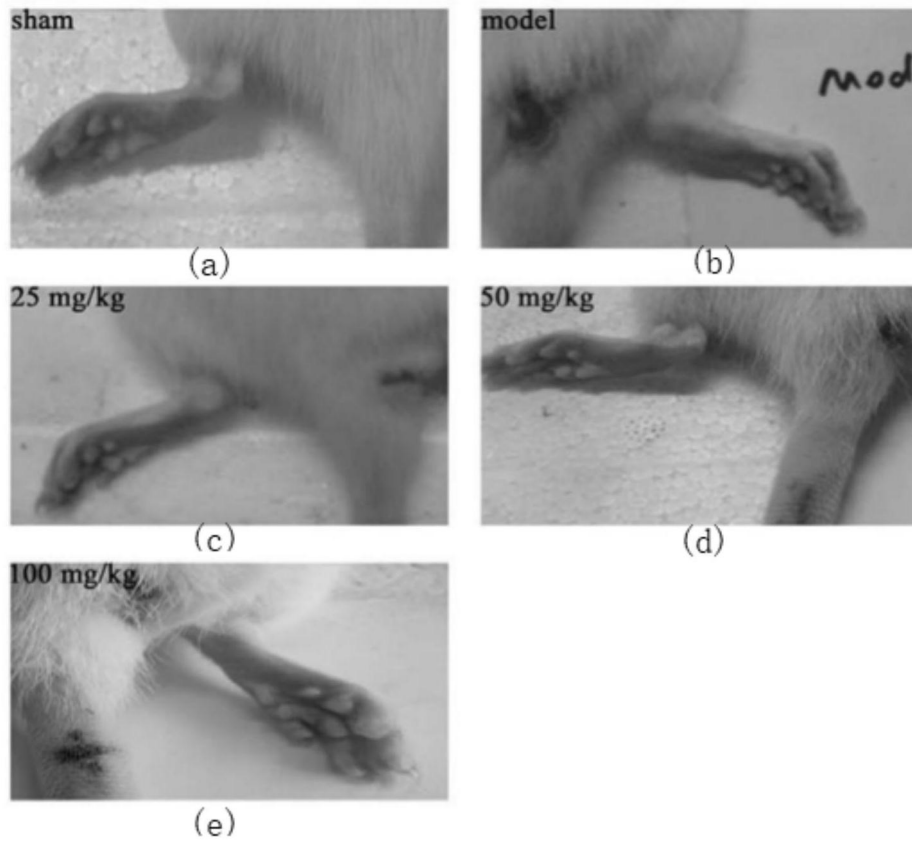


图1

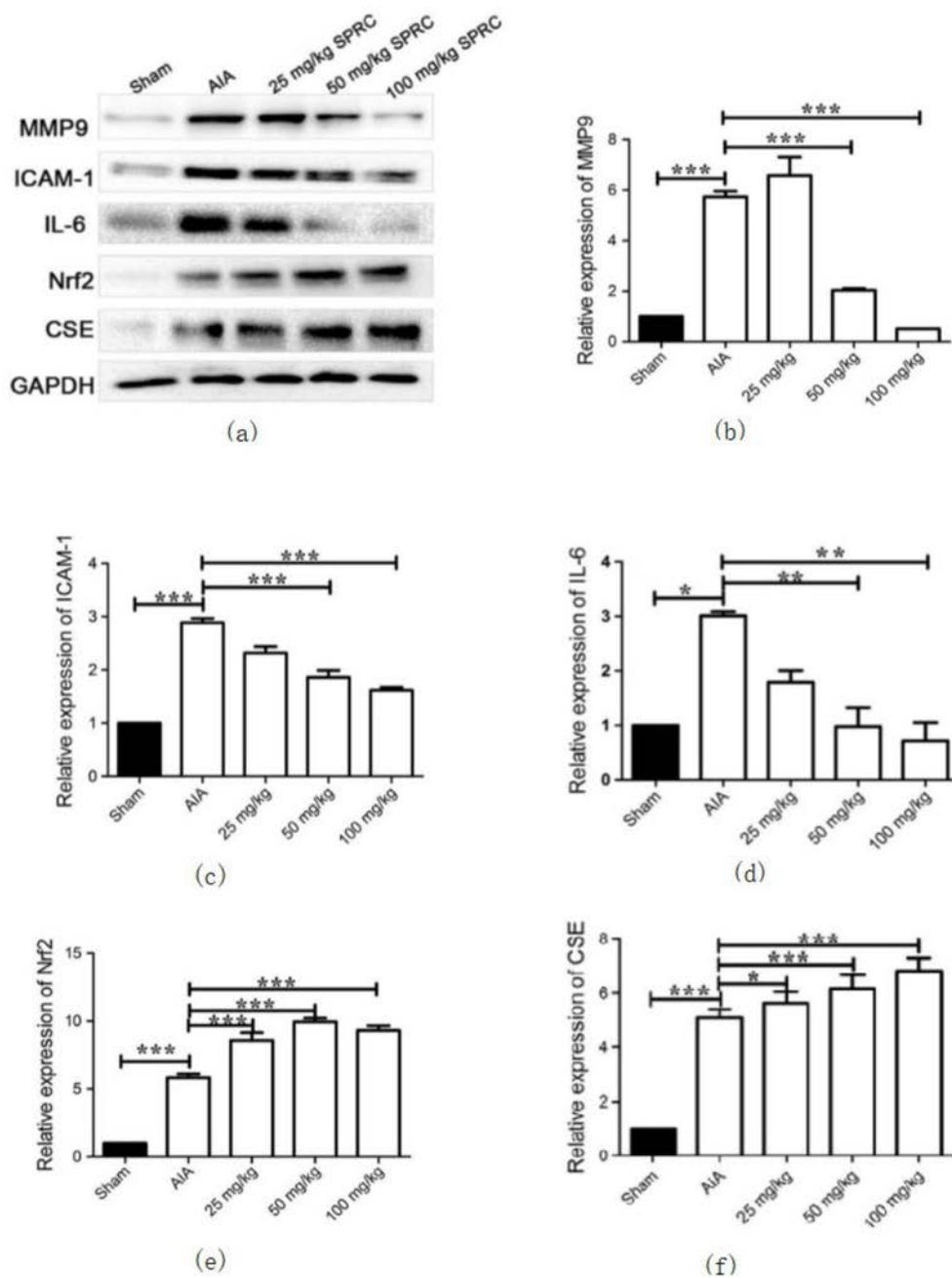


图2

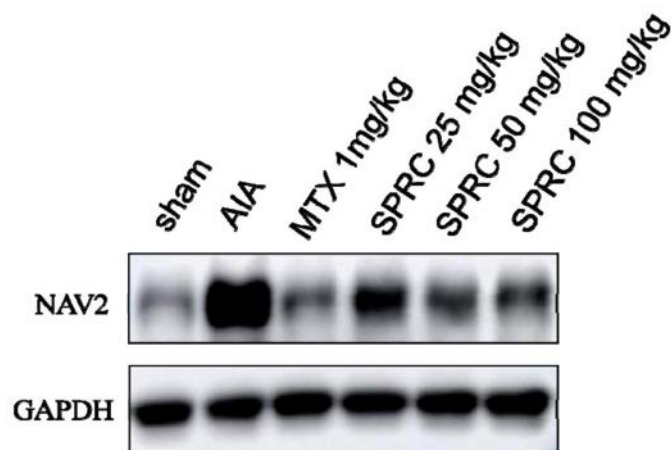


图3

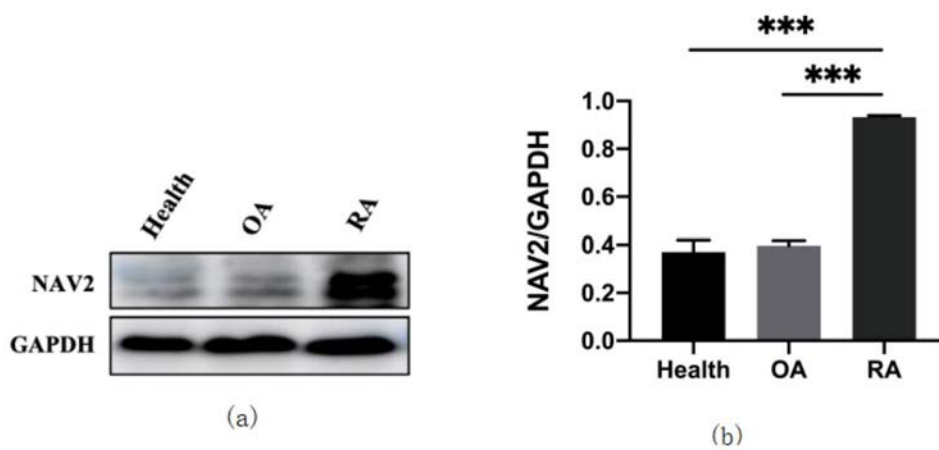


图4

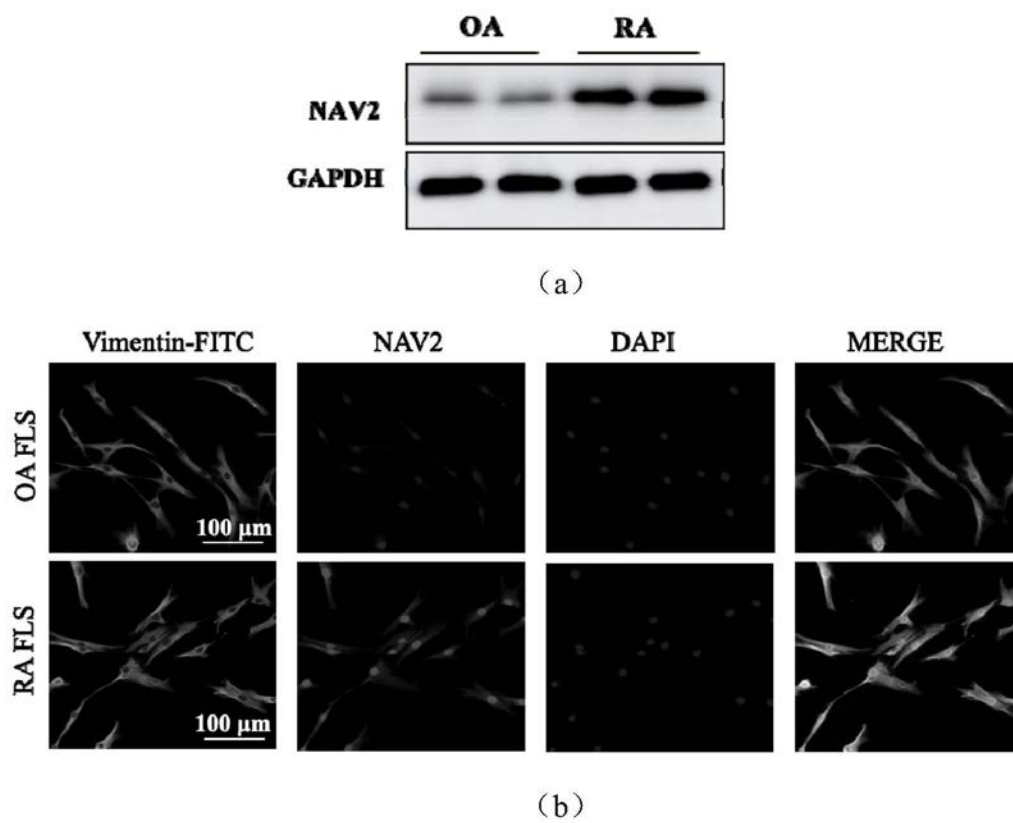


图5

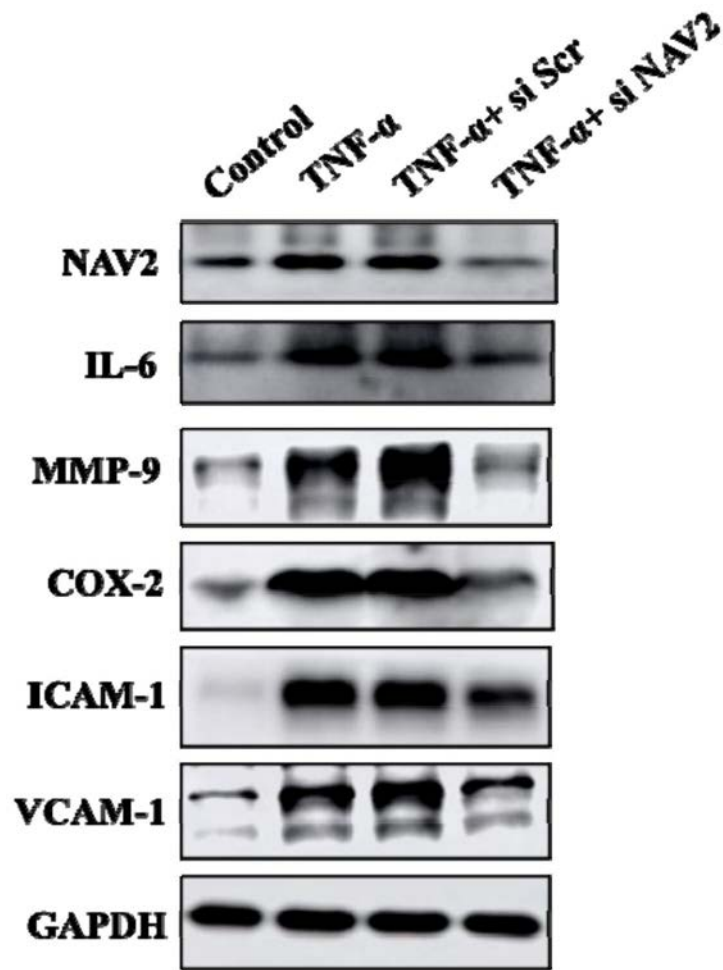


图6

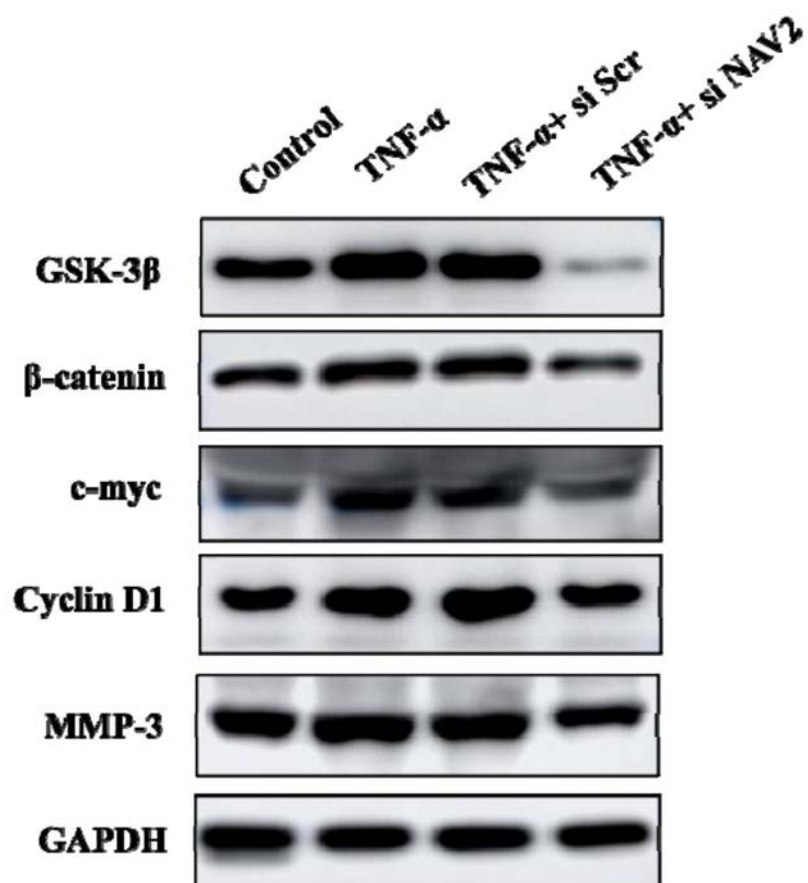
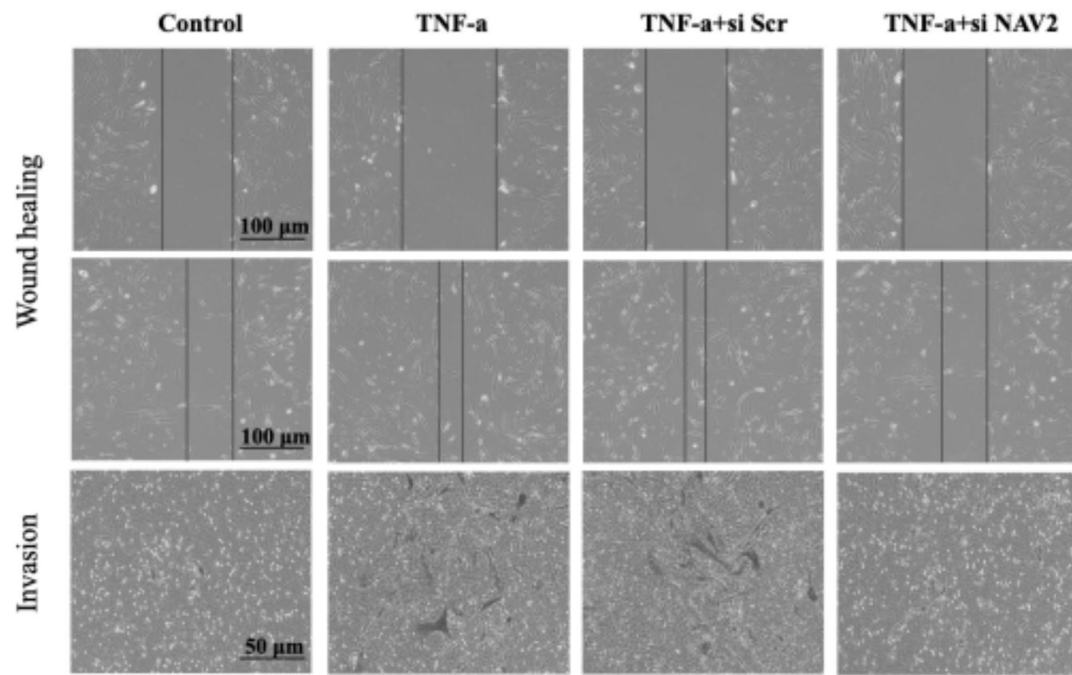
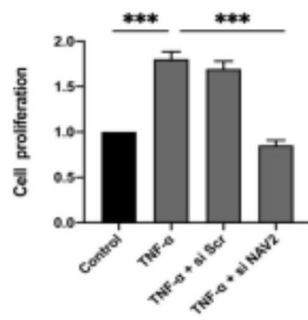


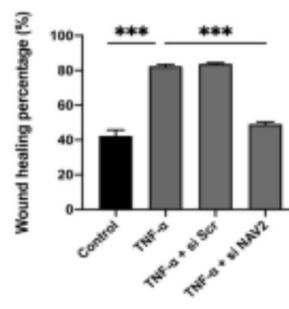
图7



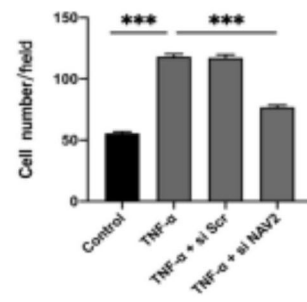
(a)



(b)



(c)



(d)

图8