

(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
2017 年 9 月 8 日 (08.09.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/148338 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 31/7048 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2017/074842
- (22) 国际申请日: 2017 年 2 月 24 日 (24.02.2017)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201610114703.6 2016 年 3 月 1 日 (01.03.2016) CN
- (71) 申请人: 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院 (YUE YANG HOSPITAL OF INTEGRATED TRADITIONAL CHINESE AND WESTERN MEDICINE, SHANGHAI UNIVERSITY OF TRADITIONAL CHINESE MEDICINE) [CN/CN]; 中国上海市虹口区甘河路 110 号, Shanghai 200433 (CN)。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祖冲之路 555 号, Shanghai 201203 (CN)。
- (72) 发明人: 张腾 (ZHANG, Teng); 中国上海市虹口区甘河路 110 号, Shanghai 200433 (CN)。朱维良 (ZHU, Weiliang); 中国上海市虹口区甘河路 110 号, Shanghai 200433 (CN)。陈瑜 (CHEN, Yu); 中国上海市虹口区甘河路 110 号, Shanghai 200433 (CN)。

宁冰冰 (NING, Bingbing); 中国上海市虹口区甘河路 110 号, Shanghai 200433 (CN)。张勇 (ZHANG, Yong); 中国上海市虹口区甘河路 110 号, Shanghai 200433 (CN)。贾成林 (JIA, Chenglin); 中国上海市虹口区甘河路 110 号, Shanghai 200433 (CN)。熊敏琪 (XIONG, Minqi); 中国上海市虹口区甘河路 110 号, Shanghai 200433 (CN)。崔金刚 (CUI, Jingang); 中国上海市虹口区甘河路 110 号, Shanghai 200433 (CN)。王培伟 (WANG, Peiwei); 中国上海市虹口区甘河路 110 号, Shanghai 200433 (CN)。李波 (LI, Bo); 中国上海市虹口区甘河路 110 号, Shanghai 200433 (CN)。徐志建 (XU, Zhijian); 中国上海市虹口区甘河路 110 号, Shanghai 200433 (CN)。吴丹丹 (WU, Dandan); 中国上海市虹口区甘河路 110 号, Shanghai 200433 (CN)。李黎 (LI, Li); 中国上海市虹口区甘河路 110 号, Shanghai 200433 (CN)。

(74) 代理人: 上海卓阳知识产权代理事务所 (普通合伙) (SHANGHAI ZHUOYANG INTELLECTUAL PROPERTY AGENT FIRM); 中国上海市静安区恒丰路 638 号苏河 1 号 2318 室, Shanghai 200070 (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,

[见续页]

(54) Title: USE OF LUTEOLIN-7-DIGLUCURONIDE IN PREPARATION OF DRUG FOR PREVENTING CARDIAC DAMAGE OR FIBROSIS

(54) 发明名称: 木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷在制备抗心肌损伤或纤维化的药物中的应用

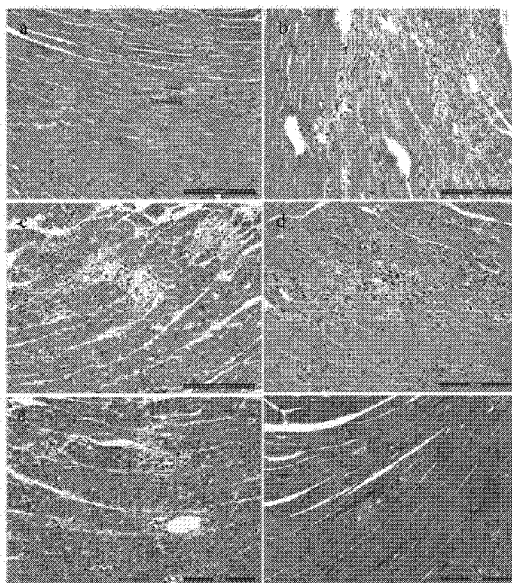


图 1

(57) Abstract: Use of luteolin-7-diglucuronide in preparation of a drug for preventing cardiac damage or fibrosis

(57) 摘要: 木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷在制备抗心肌损伤或纤维化形成药物中的应用。



WO 2017/148338 A1



IS, 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。

(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)。

(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

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷在制备抗心肌损伤或纤维化的药物中的应用

技术领域

本发明涉及医药技术领域，具体地说，是木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷在制备抗心肌损伤或纤维化的药物中的应用。此外，木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷抗纤维化形成机制的效应提示了其干预其他系统纤维化如肝、肺、肾等多系统纤维化病理形成的应用。

背景技术

心脏病（heart disease）是心脏疾病的总称，包括风湿性心脏病、先天性心脏病、高血压性心脏病、冠心病、心肌炎等各种心脏病。

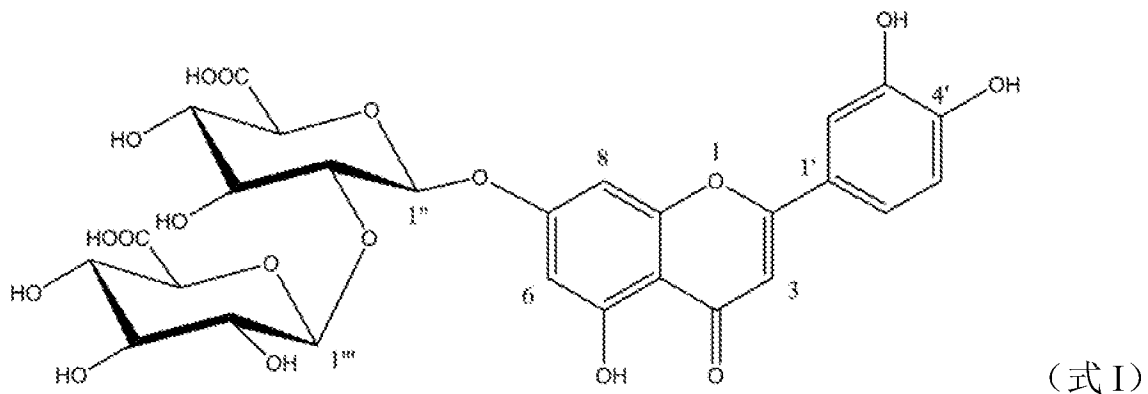
在心血管系统，当心肌因缺血、炎症、衰老等原因受损时，局部心肌细胞凋亡、心肌组织结构中胶原纤维过量积聚、胶原浓度和胶原容积分数显著增加，各型胶原比例失调以及排列紊乱，导致心肌纤维化（cardiac fibrosis, CF）发生。它是各种心血管疾病发展到一定阶段的共同病理改变，是心肌重构的主要表现之一。纤维化的心肌僵硬增加、顺应性减少、收缩力下降、同步性降低，使得心脏功能逐步减退。临床研究表明纤维化是不良心脏预后的独立预测因子。因此有效干预心肌损伤纤维化至今仍是研究热点。

异丙肾上腺素为 β 受体激动剂，临床上用于支气管哮喘、心脏骤停、房室传导阻滞、休克等的治疗。其重大不良反应涉及心肌损伤、心律失常、猝死等。在实验研究中，根据其心脏毒性，多用于心肌损伤动物模型的建立，广泛用于心肌损伤的机制及药理研究。

纤维化是各种原因引起的多种器官损伤导致器官功能障碍甚至衰竭的重要机制，是介导肝、肾、肺等多个器官的形态及功能不可逆性改变的重要病理过程。转化生长因子 $\beta 1$ （transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$ ）是促进多系统纤维化形成的重要细胞因子。TGF- $\beta 1$ 被认为是抗器官纤维化的治疗靶点。活化的TGF- $\beta 1$ 主要是通过与其受体结合而发挥作用，进而通过细胞内SMAD家族蛋白介导其促纤维化效应，SMAD依赖性TGF- $\beta 1$ 信号传导通路是TGF- $\beta 1$ 促纤维化效应的经典信号通路。Col1a1, Col1a2, Col3a1, Col12a1, CTGF, elastin, Fibrillin1等基因在多系统纤维化过程中表达上调，是纤维化形成的共同标志，反映出纤维化进程中细胞外基质的异常过度形成。针对纤维化形成机制的有效药物干预对多器官纤维化的治疗具有重要价值。

木犀草素-7-O-[β -葡萄糖醛酸基（glucuronosy）(1 $\rightarrow$ 2) β -葡萄糖醛酸]可从多种植物体

提取获得，该化合物英文简写为 Luteolin-7-diglucuronide，中文化学名称可简写为木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷，化学结构式如式 I 所示：



中国专利文献 201410166181.5 公开了木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷在制备治疗视网膜退行性病变药物中的应用，对有效量的木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷抗光感受器细胞死亡、防治视网膜退行性病变发生的作用进行了研究。然而，关于本发明的木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷在制备抗心肌损伤及纤维化的药物中的应用，目前还未见报道。

发明内容

本发明的第一个目的是针对现有技术中的不足，提供木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷在制备抗心肌损伤药物中的应用。

本发明的第二个目的是，提供木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷在制备抑制心肌纤维化形成药物中的应用。

本发明的第三个目的是，提供木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷在制备抑制多器官纤维化形成的药物中的应用。

为实现上述第一个目的，本发明采取的技术方案是：

木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷在制备抗心肌损伤药物中的应用。

所述的木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷抑制异丙肾上腺素诱导的心肌损伤。

所述的木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷抑制异丙肾上腺素诱导的心肌细胞坏死，肉芽组织形成，炎细胞浸润、心肌纤维化形成。

为实现上述第二个目的，本发明采取的技术方案是：

木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷在制备抑制心肌纤维化形成的药物中的应用。

所述的木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷抑制异丙肾上腺素诱导的心肌纤维化形成。

所述的木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷抑制异丙肾上腺素诱导的细胞外基质包括胶原基因表达。

为实现上述第三个目的，本发明采取的技术方案是：

木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷在制备抑制多器官纤维化形成的药物中的应用。

所述的木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷抑制 TGF- β /SMAD 及细胞外基质包括胶原基因表达。

所述的木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷以药学上可接受的盐形式存在。

所述的木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷可以以前药形式存在。

所述的前药形式包括酯化、乙酰化等药学上可接受的形式。

所述木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷可以单独使用或者以药物组合物的形式使用，所述药物组合物包含木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷、其药学上可接受的盐或它的前药，以及药学上的载体，赋形剂，稀释剂，辅剂和媒介物的至少一种。

本发明优点在于：

本发明采用异丙肾上腺素诱导小鼠心肌损伤的动物模型，对木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷干预心肌损伤的药理作用及分子机制进行了研究，研究表明木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷对异丙肾上腺素诱导的心肌损伤具有显著的抑制作用，主要表现为抑制心肌细胞坏死，肉芽组织形成，炎细胞浸润、纤维化形成等病理表型。运用荧光实时定量 PCR，在分子水平揭示并进一步证实了木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷抗心肌纤维化形成的作用，特别是体现在木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷对细胞外基质包括胶原基因表达具有显著的抑制作用。因此本发明为木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷抗心肌损伤及心肌纤维化的效应提供了直接的实验证据。此外，木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷下调 TGF- β /SMAD 及细胞外基质基因表达的效应提示了其干预其他系统纤维化如肝、肺、肾等多系统纤维化病理形成的应用。

附图说明

附图 1 为木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷腹腔注射对异丙肾上腺素诱导的心肌损伤的保护作用：异丙肾上腺素模型组给与异丙肾上腺素（溶于灭菌的缓冲磷酸盐溶液（PBS）），按照 10mg/kg 体重的剂量进行腹腔内注射，每次注射体积为 100 μ L，每日一次，共 5 次。木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷按照以下剂量腹腔内注射：5mg/kg 体重、10mg/kg 体重、

20mg/kg 体重、40mg/kg 体重。30 分钟后，小鼠接受异丙肾上腺素注射，持续 5 天。正常对照组分别接受 100 μ L PBS 作为溶剂对照。最后一次注射 24h 后处死小鼠，采集心脏，进行石蜡包埋、切片及苏木素/伊红染色，光镜下观察心脏的病理形态改变。与正常对照组(a)相比较，异丙肾上腺素模型组(b)小鼠左心室呈现广泛的坏死，伴炎细胞浸润，肉芽组织形成；而低剂量（5mg/kg, 10mg/kg）木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷给药的小鼠左心室表现为中度的组织坏死（c-d）；接受中剂量（20mg/kg）木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷给药的小鼠左心室表现为轻度组织坏死（e）；接受高剂量（40mg/kg）木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷给药的小鼠左心室未见明显组织坏死（f）。

附图 2 为木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷腹腔注射抑制异丙肾上腺素诱导的心肌纤维化形成：A. 小鼠左心室切片进行 Masson 三色胶原染色，结果表明与正常对照组相比，异丙肾上腺素给药组 Masson 三色阳性的区域显著增加（* $p < 0.01$ ），与异丙肾上腺素组相比，木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷治疗组显著减少 Masson 三色阳性的区域（# $p < 0.01$ ）。B. 小鼠左心室 Masson 三色胶原染色代表性图片：正常对照组（VC），异丙肾上腺素组（ISO）及木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷 40mg/kg 治疗组（LC1）。

附图 3 为木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷在分子水平抑制异丙肾上腺素诱导的心肌纤维化形成：免疫组织化学检测表明纤维化形成相关的重要分子标志物如 α -SMA, Col1, TGF- β 1, p-SMAD2 及 Timp1 在异丙肾上腺素组小鼠左心室心肌受损部位表达增强（a,c,e,g,i），未见这些分子标志物在木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷组小鼠左心室心肌组织的表达（b,d,f,h,j）。

附图 4 为木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷抑制异丙肾上腺素诱导的参与心肌纤维化形成细胞外基质及炎症相关基因的表达：采用荧光实时定量 PCR 对参与心肌纤维化形成的细胞外基质基因的表达进行分析，结果表明异丙肾上腺素模型组小鼠心脏 Col1a1, Col1a2, Col3a1, Col12a1, CTGF, elastin, Fibrillin1 及 Ccl4, Ccl12 的表达，与正常对照组相比较显著上调，木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷治疗组与异丙肾上腺素模型组相比，这些基因的表达呈显著的下调。

附图 5 为木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷对异丙肾上腺素诱导 10 天的心肌损伤的保护作用：异丙肾上腺素模型组给与异丙肾上腺素（溶于灭菌的缓冲磷酸盐溶液（PBS）），按照 10mg/kg 体重的剂量进行腹腔内注射，每次注射体积为 100 μ L，每日一次，共 10 次。造模第 5 天开始，木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷按照 40mg/kg 剂量腹腔内注射，30 分钟后，

小鼠接受异丙肾上腺素注射，持续 6 天。正常对照组分别接受 100 μ L PBS 作为溶剂对照。最后一次注射 24h 后处死小鼠，采集心脏，进行石蜡包埋、切片及苏木素/伊红染色，光镜下观察心脏的病理形态改变。与正常对照组(a)相比较，异丙肾上腺素模型组(b)小鼠左心室呈现广泛的坏死，伴炎细胞浸润，肉芽组织形成；而 40mg/kg 木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷给药的小鼠左心室见轻度组织坏死 (c)。

附图 6 为木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷抑制异丙肾上腺素诱导 10 天的心肌纤维化形成：A. 小鼠左心室切片进行 Masson 三色胶原染色，结果表明与正常对照组相比，异丙肾上腺素给药组 Masson 三色阳性的区域显著增加 ($*p<0.01$)，与异丙肾上腺素组相比，木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷治疗组显著减少 Masson 三色阳性的区域 ($#p<0.01$)。B. 小鼠左心室 Masson 三色胶原染色代表性图片：正常对照组 (VC)，异丙肾上腺素组 (ISO) 及木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷 40mg/kg 治疗组 (LC1)。

附图 7 为木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷抑制异丙肾上腺素诱导 10 天的心肌纤维化形成：A. 小鼠左心室切片进行天狼星红胶原染色，结果表明与正常对照组相比，异丙肾上腺素给药组天狼星红阳性的区域显著增加 ($*p<0.01$)，与异丙肾上腺素组相比，木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷治疗组显著减少天狼星红阳性的区域 ($#p<0.01$)。B. 小鼠左心室天狼星红胶原染色代表性图片：正常对照组 (VC)，异丙肾上腺素组 (ISO) 及木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷 40mg/kg 治疗组 (LC1)。

附图 8 为木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷灌胃对异丙肾上腺素诱导的心肌损伤的保护作用：异丙肾上腺素模型组给与异丙肾上腺素（溶于灭菌的缓冲磷酸盐溶液 (PBS)），按照 10mg/kg 体重的剂量进行腹腔内注射，每次注射体积为 100 μ L，每日一次，共 5 次。木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷按照 120mg/kg 体重及 240mg/kg 体重灌胃。30 分钟后，小鼠接受异丙肾上腺素注射，持续 5 天。正常与模型对照组分别接受 200 μ L PBS 作为溶剂对照。最后一次注射 24h 后处死小鼠，采集心脏，进行石蜡包埋、切片及苏木素/伊红染色，光镜下观察心脏的病理形态改变。与正常对照组(a)相比较，异丙肾上腺素模型组(b)小鼠左心室呈现广泛的坏死，伴炎细胞浸润，肉芽组织形成；而接受 LC1 120mg/kg 体重(c)及 240mg/kg 体重(d)灌胃的小鼠心肌组织损伤程度显著减轻。

附图 9 为木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷灌胃对异丙肾上腺素诱导的心肌纤维化的抑制作用：异丙肾上腺素模型组给与异丙肾上腺素（溶于灭菌的缓冲磷酸盐溶液 (PBS)），按照 10mg/kg 体重的剂量进行腹腔内注射，每次注射体积为 100 μ L，每日一次，共 5 次。

木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷按照 120mg/kg 体重及 240mg/kg 体重灌胃。30 分钟后,小鼠接受异丙肾上腺素注射,持续 5 天。正常与模型对照组分别接受 200 μ L PBS 作为溶剂对照。最后一次注射 24h 后处死小鼠,采集心脏,进行石蜡包埋、小鼠左心室切片,进行 Masson 三色胶原染色。A. Masson 三色胶原染色定量结果表明与正常对照组相比,异丙肾上腺素给药组 Masson 三色阳性的区域显著增加 ($*p<0.01$),与异丙肾上腺素组相比,木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷灌胃治疗组显著减少 Masson 三色阳性的区域 ($#p<0.01$)。B. 小鼠左心室 Masson 三色胶原染色代表性图片: 正常对照组 (VC), 异丙肾上腺素组 (ISO), 木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷 120mg/kg 治疗组 (LC1L) 及木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷 240mg/kg 治疗组 (LC1H)。

附图 10 为木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷灌胃显著抑制 ISO 所诱导的心肌细胞肥大: 异丙肾上腺素模型组给与异丙肾上腺素(溶于灭菌的缓冲磷酸盐溶液(PBS)), 按照 10mg/kg 体重的剂量进行腹腔内注射, 每次注射体积为 100 μ L, 每日一次, 共 5 次。木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷按照 120mg/kg 体重及 240mg/kg 体重灌胃。30 分钟后, 小鼠接受异丙肾上腺素注射, 持续 5 天。正常与模型对照组分别接受 200 μ L PBS 作为溶剂对照。最后一次注射 24h 后处死小鼠, 采集心脏, 进行石蜡包埋、小鼠左心室切片, 进行苏木素/伊红染色, 光镜下观察心脏的病理形态改变, 并采用 Leica QWIN V3 分析软件对心肌细胞横截面积进行测算。正常组 (VC) 心肌细胞面积为 $(215.74\pm 1.61)\mu\text{m}^2$, 与正常组 (VC) 相比, 模型组 (ISO) 心肌细胞面积显著增加 $(329.52\pm 11.70\mu\text{m}^2, *P<0.05)$; 与模型组 (ISO) 相比, 木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷 120mg/kg 治疗组 (LC1L) $(249.88\pm 10.26\mu\text{m}^2, #P<0.05)$, 及木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷 240mg/kg 治疗组 (LC1H) $(231.69\pm 31.18\mu\text{m}^2, #P<0.05)$ 均显著减少。木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷 120mg/kg 治疗组 (LC1L) 与木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷 240mg/kg 治疗组 (LC1H) 两组相比未见显著差异。

具体实施方式

下面结合具体实施方式, 进一步阐述本发明。应理解, 这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。此外应理解, 在阅读了本发明记载的内容之后, 本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改, 这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

需要说明的是, 本发明所使用的术语“前药”, 代表一个化合物在体内转化为式 (I)

所示的化合物。这样的转化受前体药物在血液中水解或在血液或组织中经酶转化为母体结构的影响。本发明前体药物类化合物可以是酯，在现有的发明中酯可以作为前体药物的有苯酯类，脂肪族(C1-24) 酯类，酰氧基甲基酯类，碳酸酯，氨基甲酸酯类和氨基酸酯类。例如本发明的化合物包含羟基，即可以将其酰化得到前体药物形式的化合物。其他的前体药物形式包括磷酸酯，如这些磷酸酯类化合物是经母体上的羟基磷酸化得到的。关于前体药物完整的讨论可以参考以下文献：T.Higuchi and V.Stella,Pro-drugs as Novel Delivery Systems,Vol.14of the A.C.S.SymposiumSeries,Edward B.Roche,ed.,Bioreversible Carriers in Drug Design,American Pharmaceutical Association and Pergamon Press,1987,J.Rautio et al,Prodrugs:Design and Clinical Applications,Nature Review Drug Discovery,2008,7,255-270,and S.J.Hecker et al,Prodrugs of Phosphates and Phosphonates,Journal of Medicinal Chemistry,2008,51,2328-2345。

本发明所使用的“药学上可接受的盐”是指化合物的有机盐和无机盐。药学上可接受的盐在所属领域是为我们所熟知的，如文献：S.M.Berge et al.,J.Pharmaceutical Sciences,66:1-19,1977 所记载的。药学上可接受的无毒的酸形成的盐包括，但并不限于，与氨基基团反应形成的无机酸盐有盐酸盐，氢溴酸盐，磷酸盐，硫酸盐，高氯酸盐，和有机酸盐如乙酸盐，草酸盐，马来酸盐，酒石酸盐，柠檬酸盐，琥珀酸盐，丙二酸盐，或通过书籍文献上所记载的其他方法如离子交换法来得到这些盐。其他药学上可接受的盐包括己二酸盐，藻酸盐，抗坏血酸盐，天冬氨酸盐，苯磺酸盐，苯甲酸盐，重硫酸盐，硼酸盐，丁酸盐，樟脑酸盐，樟脑磺酸盐，环戊基丙酸盐，二葡萄糖酸盐，十二烷基硫酸盐，乙磺酸盐，甲酸盐，反丁烯二酸盐，葡庚糖酸盐，甘油磷酸盐，葡萄糖酸盐，半硫酸盐，庚酸盐，己酸盐，氢碘酸盐，2- 羟基- 乙磺酸盐，乳糖醛酸盐，乳酸盐，月桂酸盐，月桂基硫酸盐，苹果酸盐，丙二酸盐，甲磺酸盐，2- 萘磺酸盐，烟酸盐，硝酸盐，油酸盐，棕榈酸盐，扑酸盐，果胶酸盐，过硫酸盐，3- 苯基丙酸盐，苦味酸盐，特戊酸盐，丙酸盐，硬脂酸盐，硫氰酸盐，对甲苯磺酸盐，十一酸盐，戊酸盐，等等。通过适当的碱得到的盐包括碱金属，碱土金属，铵和 N+(C1-4 烷基)4 的盐。药学上可接受的盐进一步包括适当的、无毒的铵，季铵盐和抗平衡离子形成的铵阳离子，如卤化物，氢氧化物，羧化物，硫酸化物，磷酸化物，硝酸化物，C1-8 磺酸化物 and 芳香磺酸化物。

实施例 1

在本实施方案中，我们通过病理形态学及分子生物学的研究手段，探讨并明确了木

犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷对异丙肾上腺素诱导的小鼠心肌损伤模型的干预效应。研究结果表明木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷可有效地抑制异丙肾上腺素诱导的小鼠心肌细胞坏死变性,炎细胞浸润,肉芽组织形成及纤维化形成并显著抑制心肌纤维化形成过程中关键分子及基因的表达。这一研究首次揭示了木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷对心肌损伤的治疗干预作用及相关机制,提示木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷相关的药物对于心肌损伤及损伤后纤维化形成具有重要的治疗干预价值。

一、方法

1.小鼠心肌损伤动物模型及干预

6-8 周龄,体重 20-25g 的雄性清洁级 C57BL/6J 小鼠购自中国科学研究院,常规摄食及饮水喂养。采用异丙肾上腺素 (Sigma,USA) 腹腔内注射建立心肌缺血模型。异丙肾上腺素溶解于无菌的磷酸盐缓冲液(PBS),每次给药剂量为 10mg/kg,给药体积为 100 μ L,每日于 9:00am 给药一次,腹腔内注射。异丙肾上腺素给药为 5-10 次;木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷(中国科学院上海药物研究所提供,纯度>98%)溶解于无菌的磷酸盐缓冲液(PBS),木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷于异丙肾上腺素给药前 30 分钟给药,分腹腔注射和灌胃两个途径(均每日一次)。木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷腹腔注射给药剂量分别为:5mg/kg 体重,10mg/kg 体重,20mg/kg 体重及 40mg/kg 体重,每次给药体积为 100 μ L。木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷灌胃剂量为 120mg/kg 体重及 240mg/kg 体重,每次给药体积为 200 μ L。正常组及模型对照组均同步给予等体积的无菌磷酸盐缓冲液 PBS 腹腔注射或灌胃。

2.小鼠心脏组织形态学

给药结束后 24 小时处死小鼠,采集心脏,固定于 4%多聚甲醛后进行组织包埋及切片处理。组织形态学分析主要采用 4 μ M 厚度的石蜡切片进行苏木素-伊红染色,光镜(Leica, Germany)下观察心脏的组织形态学改变。胶原纤维染色采用 Masson 三色染色后光镜下进行观察。苏木素-伊红染色后对心脏病理改变进行评分,评分标准如下。1 分:无心肌坏死,肉芽组织形成及炎细胞浸润等心肌损伤的改变;2 分:偶见散在、独立的心肌坏死病灶;3 分:心内膜下层见 30%或 30%以下心肌损伤;4 分:心内膜下层 30%-50%广泛的心肌损伤;5 分:50%以上的心内膜下层心肌损伤。

3.小鼠心脏免疫组织化学检测

各组石蜡切片(厚度 4 μ M)或冰冻切片(厚度 10 μ M)进一步进行免疫组织化学研

究,一抗包括 α -smooth muscle actin (α -SMA) (Sigma,USA),collagen 1 (Col1)(Sigma,USA), tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (Timp1) (Protein Tech, China), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) (Santa Cruz, China), p-SMAD2 (Protein Tech, China)。二抗均购自 Solarbio (China),包括山羊抗小鼠 IgG 用来检测 α -SMA 的表达,山羊抗兔 IgG 用来检测 TGF- β 1、Timp1 及 p-SMAD2 的水平。免疫反应性最终采用 3,3-二氨基联丙胺 (DAB, Sigma, USA) 显色并于光镜 (Leica, Germany) 下观察记录。

4. 荧光实时定量 PCR 分析

组织总 RNA 抽提纯化 (Qiagen, USA) 后进行逆转录合成 cDNA (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo, USA)。cDNA 进一步采用 ABI Power SYBR Green PCR Master Mix 进行荧光实时定量 PCR 的分析 (7900 HT Sequence Detection System, ABI, USA)。

5. 统计学分析

实验结果重复至少三次,数据表达为 $\text{mean} \pm \text{S.E.M}$, 数据分析采用 student's t-test。 $p < 0.05$ 定义为统计学显著差异。

二、结果:

1. 木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷抑制异丙肾上腺素诱导的小鼠心肌损伤:

异丙肾上腺素 (isoproterenol, ISO) 为一种 β 受体激动剂,可诱导梗死样心肌细胞死亡。ISO 诱导的心肌损伤动物模型可模拟人心肌梗死过程中心脏形态及代谢的改变,在抗心肌损伤的药物疗效及机制研究中广泛采用。本研究中采用 C57/BL6J 小鼠建立 ISO 诱导的心肌损伤模型。ISO 按照 10mg/kg 剂量腹腔内注射,每日一次,给药 5 或 10 天。如图 1 所示,木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷腹腔注射抑制 (LC1) 剂量依赖性地减轻 ISO 诱导的心肌细胞退行性改变、炎细胞浸润、肉芽肿形成等心肌损伤改变。如图 5 所示,LC1 腹腔注射可显著逆转 ISO 诱导的心肌损伤。木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷灌胃给药亦体现出显著的抗 ISO 诱导心肌损伤的效应 (图 8 及表 1)。

表 1 心肌损伤程度评分

组别	N	-	-/+	+	++	+++	++++
ISO	13		3		2	2	6
LC1L*	8	2	2	1	3		
LC1H*	8	4	1	2	1		

LC1L: LC1 120mg/kg 体重灌胃; LC1H: LC1 240mg/kg 体重灌胃

* 与 ISO 组相比, $P < 0.05$ 。

2. 木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷抑制异丙肾上腺素诱导的心肌纤维化形成:

心肌纤维化定义为显著增加的胶原体积。因此, 进一步采用 Masson's 三色染色对心肌组织切片中的胶原纤维进行了评估并定量。如图 2A 所示, 少量的 Masson's 三色阳性的胶原纤维见于溶剂对照组的心肌空隙间, ISO 组 Masson's 三色染色的胶原纤维含量显著增加, 而 LC1 高剂量治疗组 Masson's 三色染色的胶原纤维含量显著降低。代表性 Masson's 三色染色图片见图 2B: 溶剂对照心肌组织未见纤维化样结缔组织(a), 大量 Masson's 三色染色阳性的纤维化样结缔组织可见于 ISO 组的小鼠左心室, 特别是损伤部位(b), 而这一现象未见于 LC1 干预的小鼠左心室(c)。此外, 如图 6、7 所示, LC1 显著逆转 ISO 诱导的心肌纤维化。这些结果表明 LC1 对 ISO 诱导的心肌纤维化形成具有显著的抑制效应。木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷抑制异丙肾上腺素诱导的心肌纤维化形成的效应亦体现在接受灌胃给药的小鼠中 (图 9)。

3. 木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷抑制 ISO 诱导的心肌细胞肥大:

ISO 不仅引起心肌细胞坏死损伤, 同时引起存活的心肌细胞肥大样改变, 病理学分析表明与正常组相比, ISO 组心肌细胞面积显著增加; 与 ISO 组相比, LC1 灌胃治疗显著降低心肌细胞面积, LC1 两个剂量之间未见显著性差异 (图 10)。

4. 木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷抑制纤维化形成分子标志物的表达:

为进一步明确 LC1 抗心肌纤维化的效应, 本研究进一步分析了纤维化相关的关键分子标志物在各组的表达。如图 3 所示, 在 ISO 诱导的心肌损伤模型中, α -SMA 在心肌损伤部位的表达显著上调(a), 而这一现象未见于 LC1 干预的小鼠心肌(b), 提示 LC1 干预可显著抑制损伤过程中肌成纤维细胞的激活, 从而抑制纤维化形成。在 ISO 诱导的心肌损伤模型组中, Col1 在损伤部位的表达显著升高(c), 而 LC1 组则未观察到 Col1 的表达(d), Col1 是细胞外基质的主要成分, 提示 LC1 干预可显著抑制损伤过程中细胞外基质的生成。此外, 其他纤维化形成的关键分子标志物如反映介导纤维化形成的 TGF β 信号通路活性的 TGF- β 1, p-SMAD2 在 ISO 诱导的心肌损伤部位免疫反应性显著增强(e,g), 而其信号未见于 LC1 干预的小鼠心肌(f,h), 这一结果表明 LC1 可通过抑制纤维化形成的关键信号通路 TGF- β 1 的活性而干预 ISO 诱导的心肌纤维化。进一步的分析表明, ISO 诱导的纤维化形成过程中抑制胶原纤维降解的重要分子 Timp1 的表达在心肌损伤部位显著上

调(i), 而这一异常亦可被 LC1 所抑制(j), 表明 LC1 对纤维化形成及纤维降解等重要分子环节均具有显著的干预效应。

5. 木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷抗纤维化作用的分子依据:

为进一步在分子水平揭示 LC1 抗心肌损伤的分子效应及机制, 本研究采用荧光实时定量 PCR 对参与心肌纤维化形成的细胞外基质基因的表达进行分析, 结果表明炎症反应基因及纤维化基因表达上调参与 ISO 诱导的心肌损伤, 而 LC1 对这些重要的损伤相关的基因表达具有显著的抑制效应 (图 4), 这亦是其抗心肌损伤中重要分子效应及机制。

以上所述仅是本发明的优选实施方式, 应当指出, 对于本技术领域的普通技术人员, 在不脱离本发明方法的前提下, 还可以做出若干改进和补充, 这些改进和补充也应视为本发明的保护范围。

权利要求

1. 木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷在制备抗心肌损伤药物中的应用。
2. 根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述的木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷抑制异丙肾上腺素诱导的心肌损伤。
3. 根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述的木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷抑制异丙肾上腺素诱导的心肌细胞坏死，肉芽组织形成，炎细胞浸润、心肌纤维化形成。
4. 木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷在制备抑制心肌纤维化形成的药物中的应用。
5. 根据权利要求 4 所述的应用，其特征在于，所述的木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷抑制异丙肾上腺素诱导的心肌纤维化形成。
6. 根据权利要求 4 所述的应用，其特征在于，所述的木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷抑制异丙肾上腺素诱导的细胞外基质包括胶原基因表达。
7. 木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷在制备抑制多器官纤维化形成的药物中的应用。
8. 根据权利要求 7 所述的应用，其特征在于，所述的木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷抑制 TGF- β /SMAD 及细胞外基质包括胶原基因表达。
9. 根据权利要求 1-8 任一所述应用，其特征在于，所述木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷以药学上可接受的盐形式存在。
10. 根据权利要求 1-8 任一所述应用，其特征在于，所述木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷以前药形式存在。
11. 根据权利要求 10 所述应用，其特征在于，所述木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷前药形式包括酯化、乙酰化等药学上可接受的形式。
12. 根据权利要求 1-8 所述的应用，其特征在于，所述木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷可以单独使用或者以药物组合物的形式使用，所述药物组合物包含木犀草素-7-二葡萄糖醛酸苷、其药学上可接受的盐或它的前药，以及药学上的载体，赋形剂，稀释剂，辅剂和媒介物的至少一种。

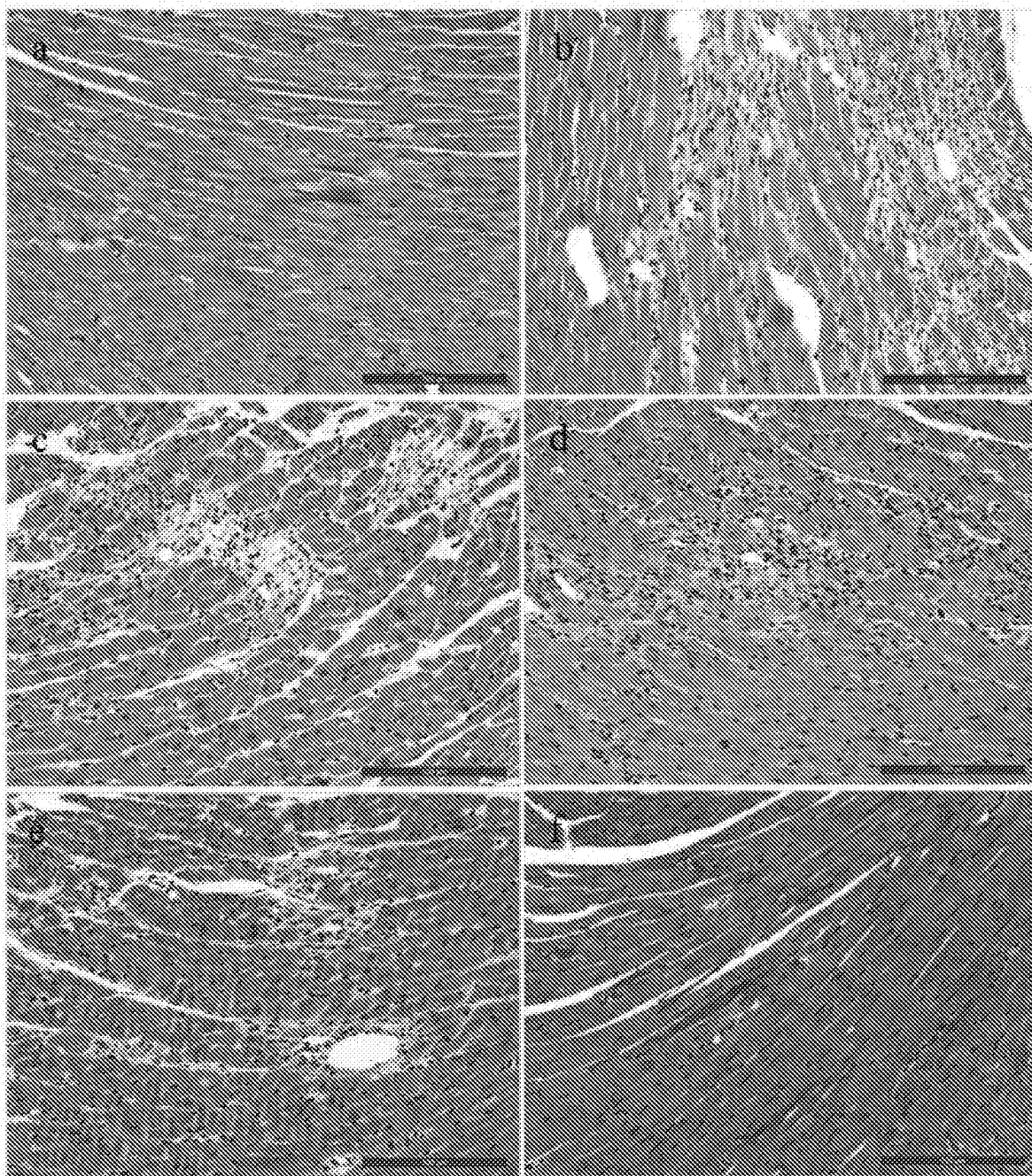


图 1

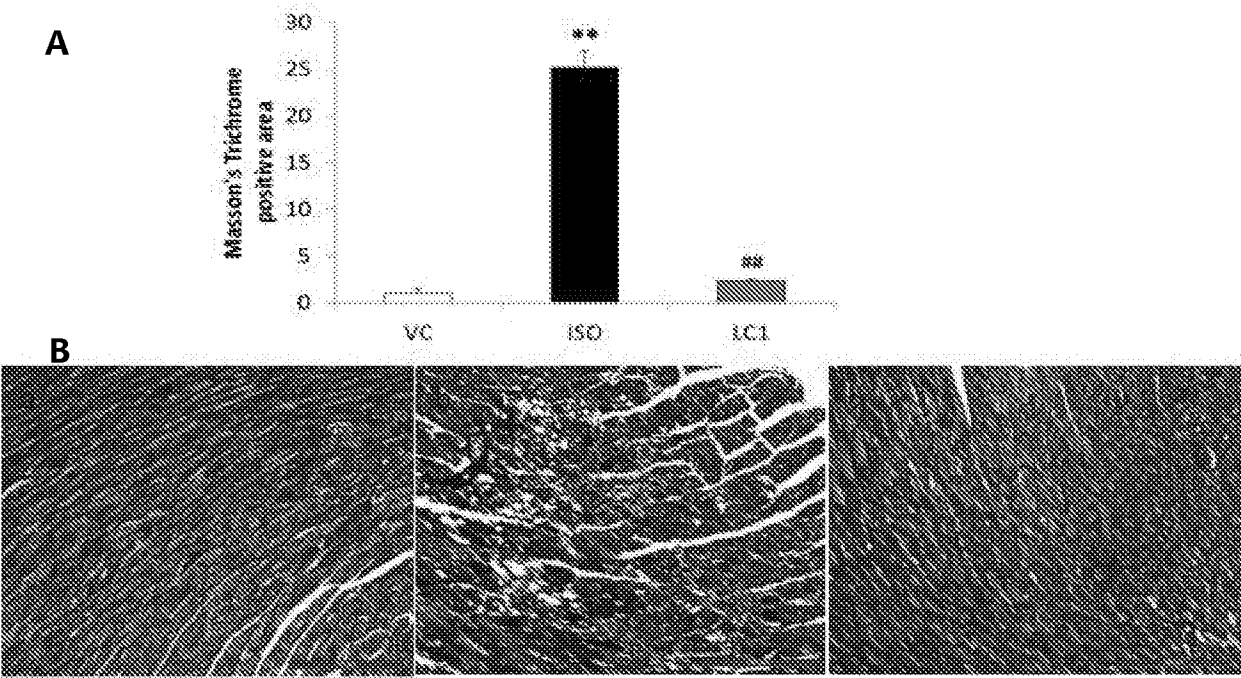


图 2

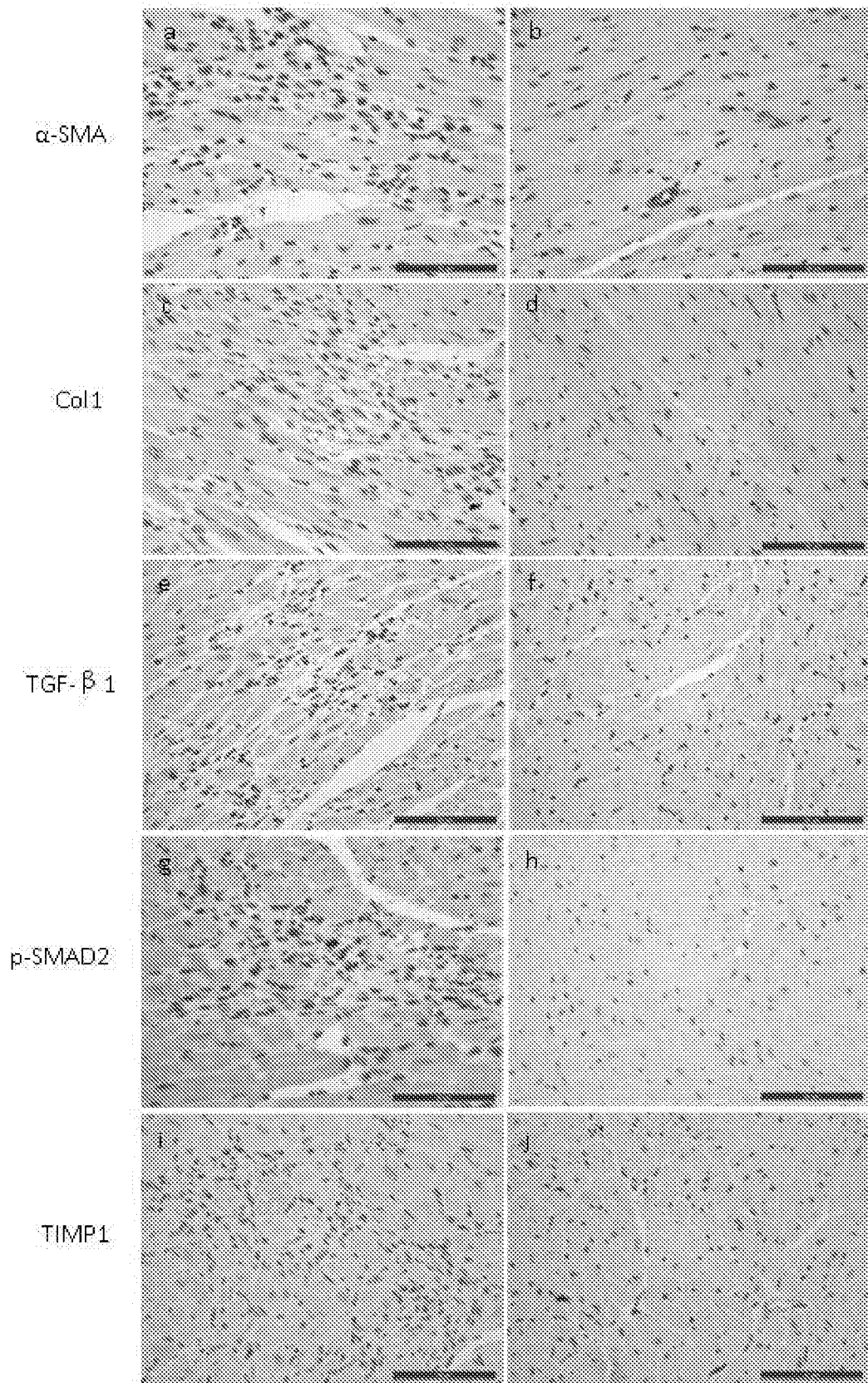


图 3

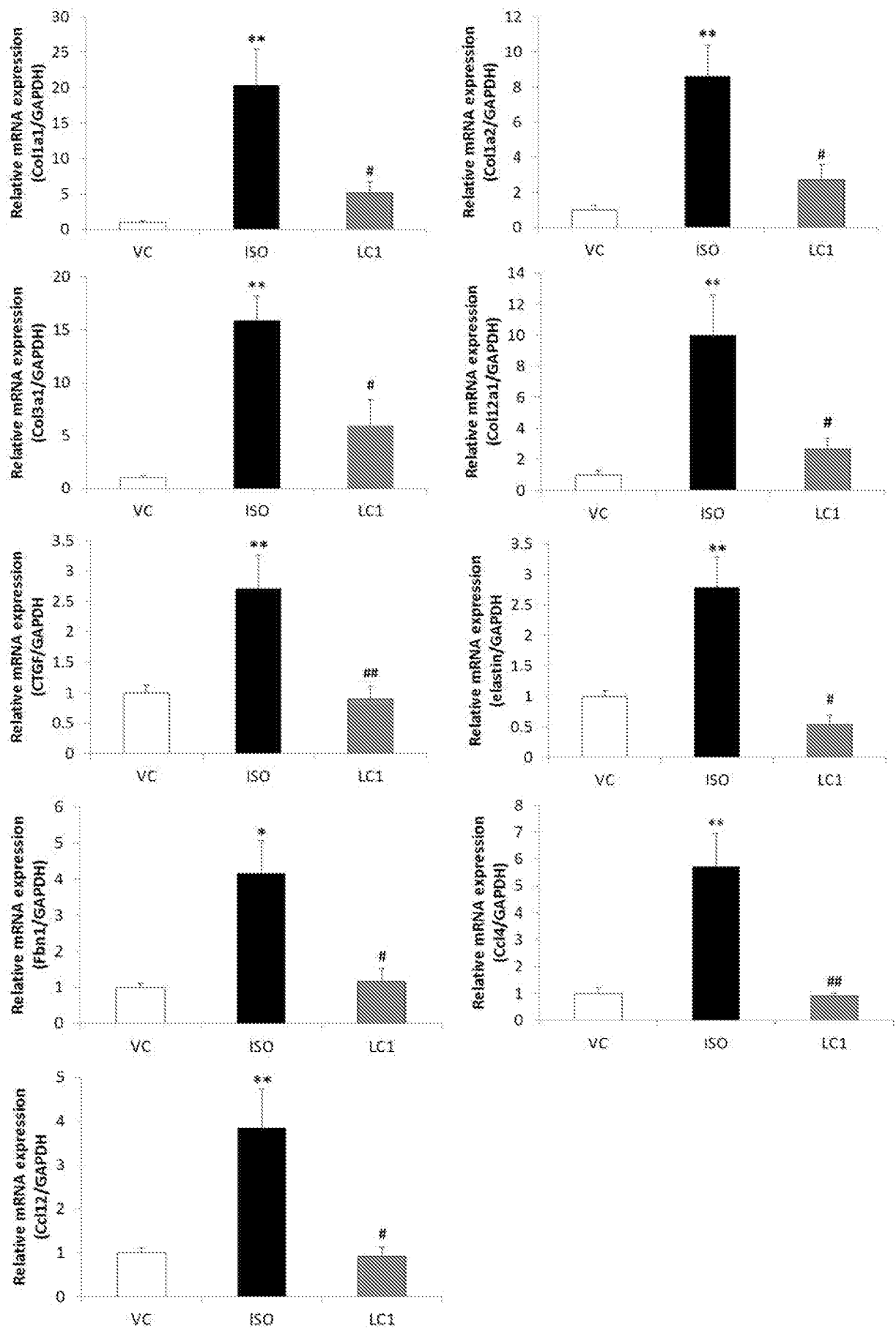


图 4

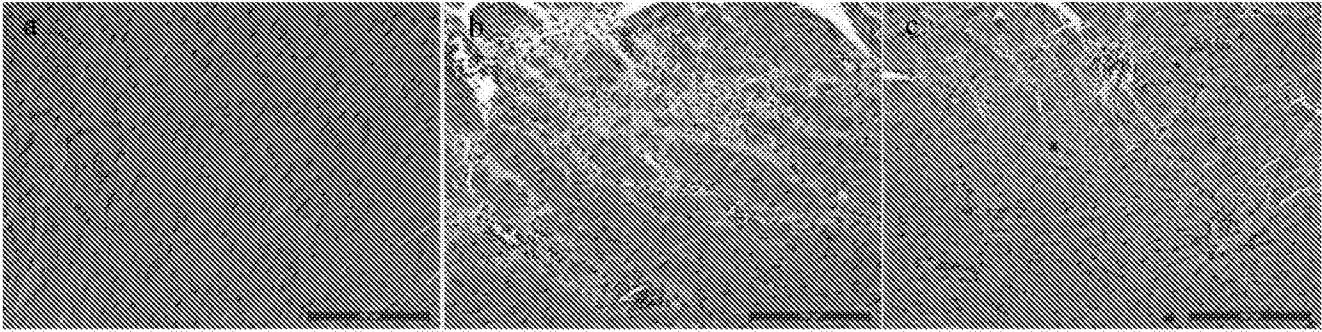


图 5

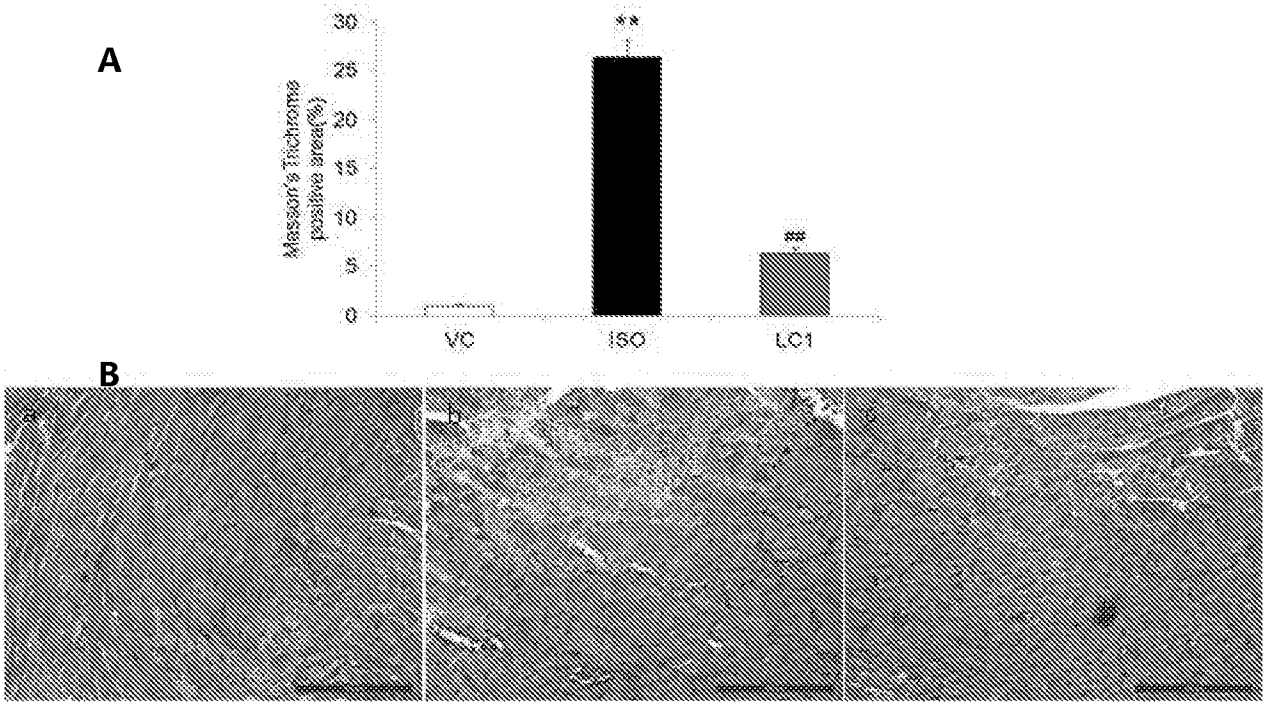


图 6

6/9

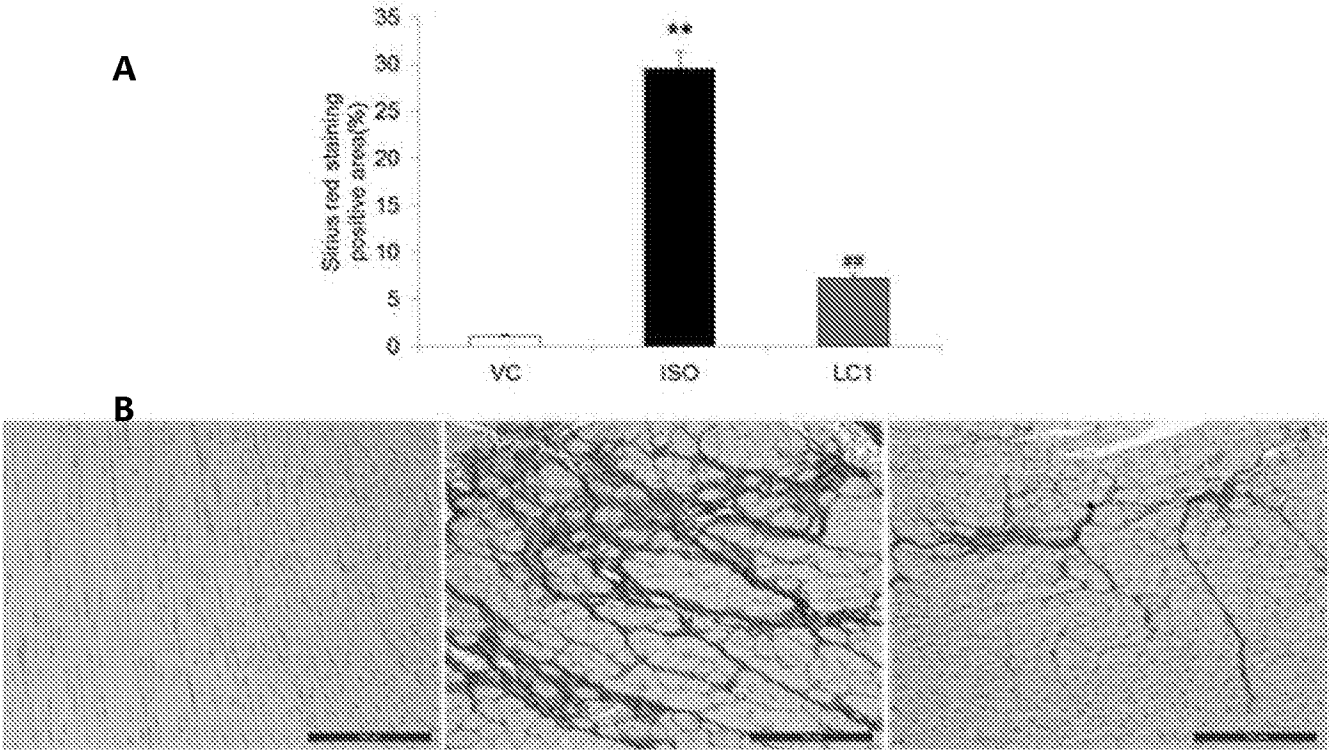


图 7

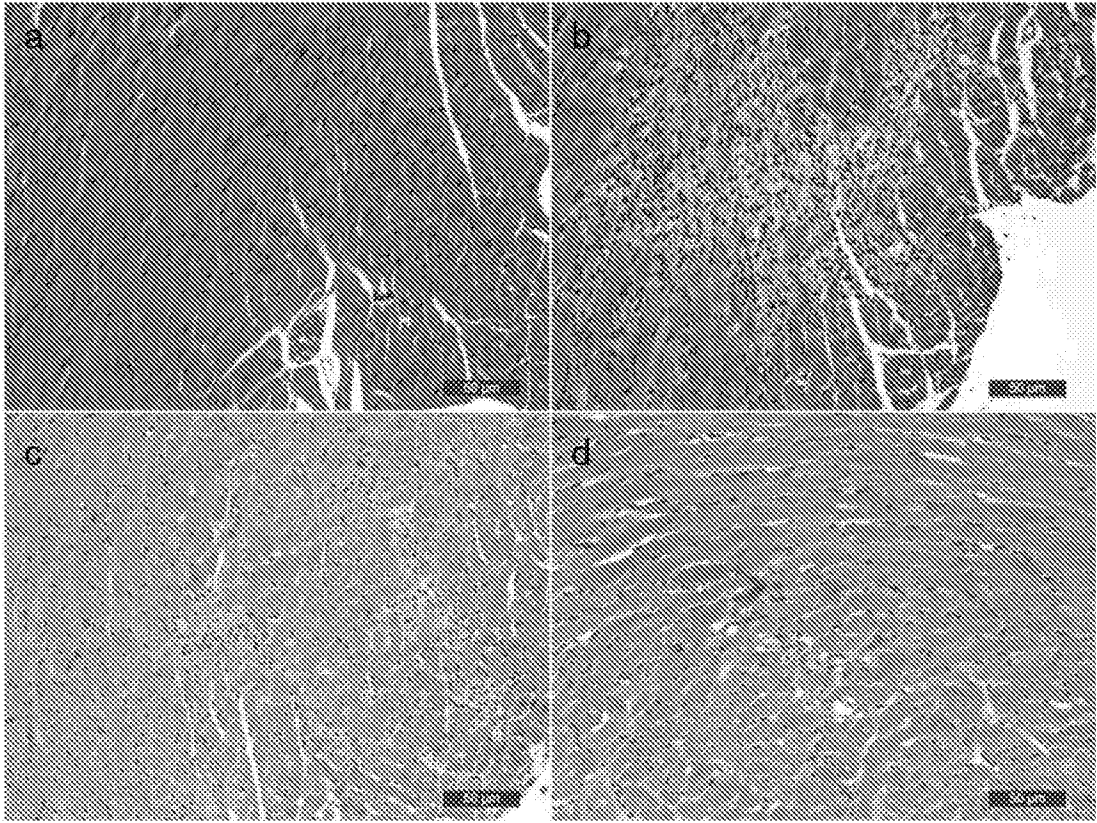


图 8

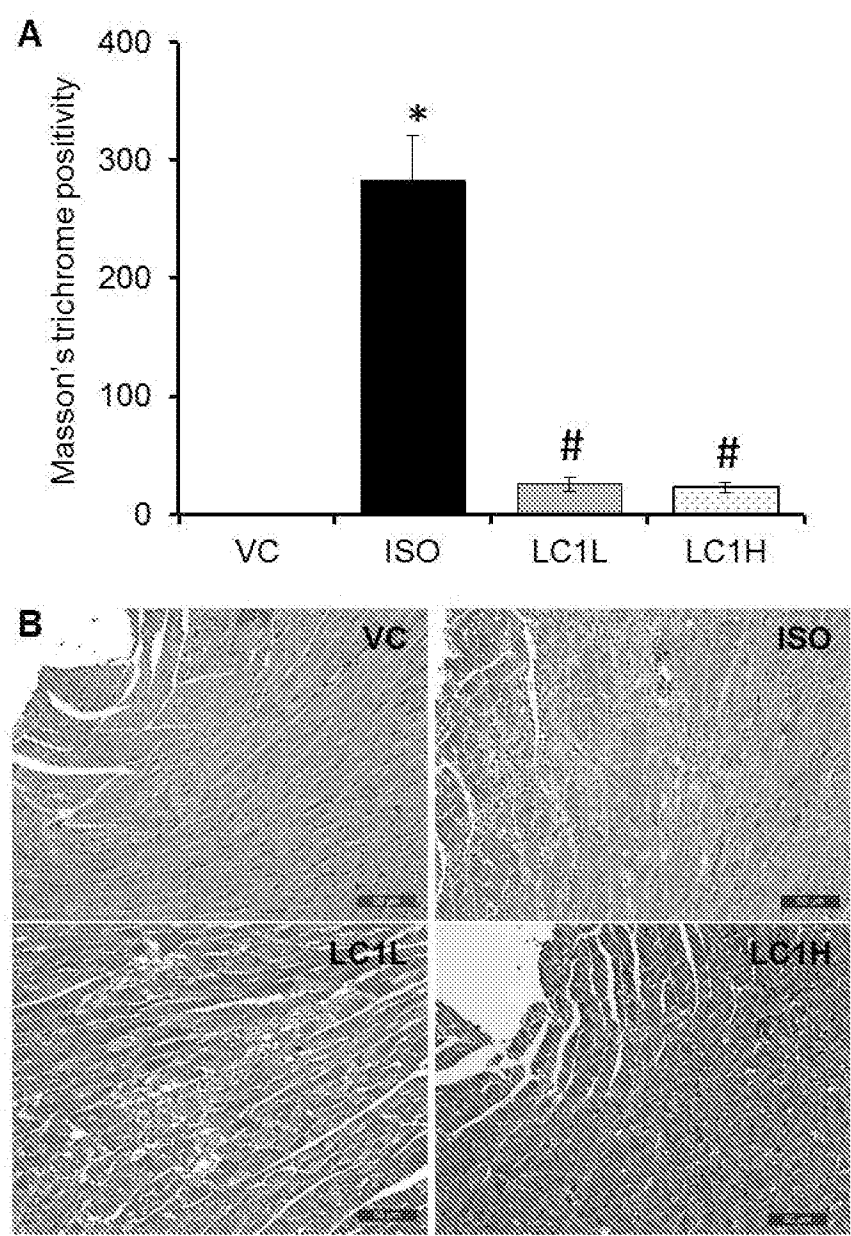


图 9

9/9

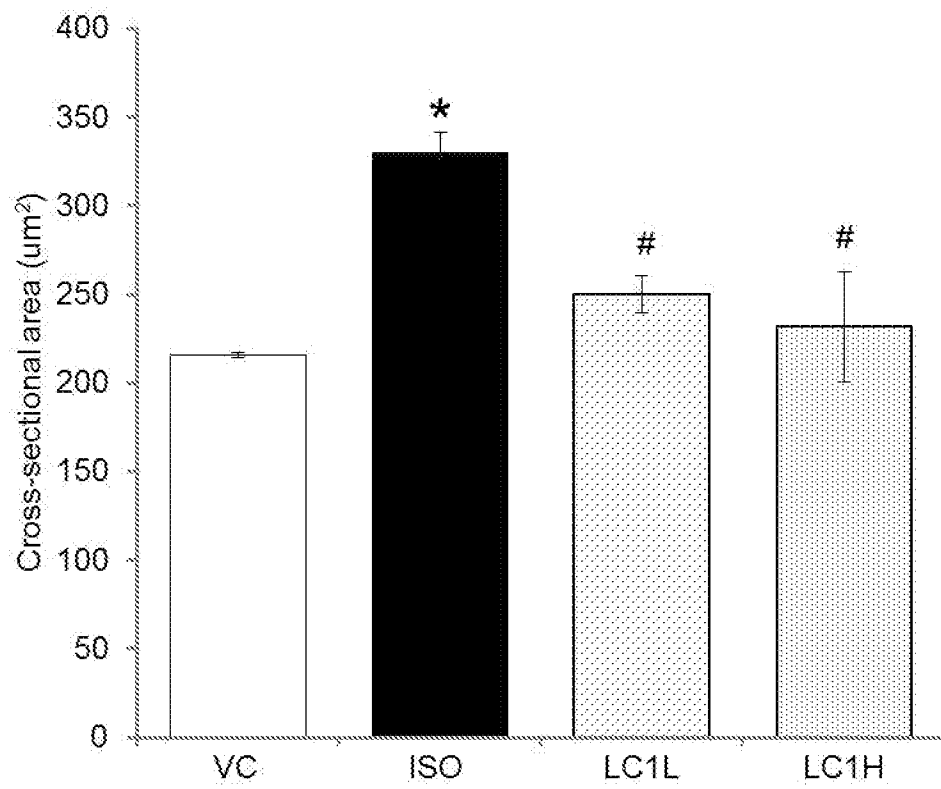


图 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/074842

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/7048 (2006.01) i; A61P 9/00 (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)

Databases: DWPI, CNPAT, CNKI, CA

Keywords: luteolin?, myocardial damage, diglucuronide?, fibrosis

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 20140125552 A (KYUNGPOOK NAT UNIV IND ACAD), 29 October 2014 (29.10.2014), claim 1	1-12
X	US 2014194372 A1 (HIROYUKI, M. et al.), 10 July 2014 (10.07.2014), the whole document	1-12
A	CN 103933058 A (YUEYANG HOSPITAL OF INTEGRATED TRADITIONAL CHINESE AND WESTERN MEDICINE, SHANGHAI UNIVERSITY OF TRADITIONAL CHINESE MEDICINE, SHANGHAI INSTITUTE OF MATERIA MEDICA, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES), 23 July 2014 (23.07.2014), the whole document	1-12
PX	CN 105769896 A (YUEYANG HOSPITAL OF INTEGRATED TRADITIONAL CHINESE AND WESTERN MEDICINE, SHANGHAI UNIVERSITY OF TRADITIONAL CHINESE MEDICINE, SHANGHAI INSTITUTE OF MATERIA MEDICA, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES), 20 July 2016 (20.07.2016), the whole document	1-12

☐ 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 April 2017 (11.04.2017)	Date of mailing of the international search report 31 May 2017 (31.05.2017)
Name and mailing address of the ISA/CN: 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 ZHANG, Zhicong Telephone No.: (86-10) 62411129

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2017/074842

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
KR 20140125552 A	29 October 2014	KR 101497935 B1	03 March 2015
US 2014194372 A1	10 July 2014	CA 2841724 A1	24 January 2013
		US 9326990 B2	03 May 2016
		WO 2013012049 A1	24 January 2013
		JP 2013067605 A	18 April 2013
CN 103933058 A	23 July 2014	CN 103933058 B	03 February 2016
CN 105769896 A	20 July 2016	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/074842

A. 主题的分类

A61K 31/7048(2006.01)i; A61P 9/00(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))

数据库: DWPI, CNPAT, CNKI, CA 关键词: 木犀草素, 二葡萄糖醛酸苷, 纤维化, 心肌损伤, luteolin?, myocardial damage, diglucuronide?, fibrosis

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	KR 20140125552 A (KYUNGPOOK NAT UNIV IND ACAD) 2014年 10月 29日 (2014 - 10 - 29) 权利要求1	1-12
X	US 2014194372 A1 (MORITA HIROYUKI等) 2014年 7月 10日 (2014 - 07 - 10) 全文	1-12
A	CN 103933058 A (上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院 中国科学院上海药物研究所) 2014年 7月 23日 (2014 - 07 - 23) 全文	1-12
PX	CN 105769896 A (上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院 中国科学院上海药物研究所) 2016年 7月 20日 (2016 - 07 - 20) 全文	1-12

☐ 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

2017年 4月 11日

国际检索报告邮寄日期

2017年 5月 31日

ISA/CN的名称和邮寄地址

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

受权官员

张志聪

电话号码 (86-10)62411129

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2017/074842

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)
KR	20140125552	A	2014年 10月 29日	KR	101497935	B1	2015年 3月 3日
US	2014194372	A1	2014年 7月 10日	CA	2841724	A1	2013年 1月 24日
				US	9326990	B2	2016年 5月 3日
				WO	2013012049	A1	2013年 1月 24日
				JP	2013067605	A	2013年 4月 18日
CN	103933058	A	2014年 7月 23日	CN	103933058	B	2016年 2月 3日
CN	105769896	A	2016年 7月 20日	无			

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)