

(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 3 月 5 日 (05.03.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/042449 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 31/575 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01) A61P 19/08 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/121847

(22) 国际申请日: 2018 年 12 月 18 日 (18.12.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201811013796.9 2018年8月31日 (31.08.2018) 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: 成文翔 (CHENG, Wenxiang); 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)。王新峦 (WANG, Xinluan); 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)。张鹏 (ZHANG, Peng); 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)。孟祥波 (MENG, Xiangbo); 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: 深圳市科进知识产权代理事务所 (普通合伙) (SHENZHEN KEJIN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE); 中国广东省深圳市南山区粤兴三道二号虚拟大学园产业化基地 A701 室, Guangdong 518055 (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, 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,

(54) Title: USE OF CUCURBITACIN E IN PREPARING DRUG OR BIOMEDICAL MATERIAL FOR TREATING DISEASE ASSOCIATED WITH INSUFFICIENT NEOANGIOGENESIS, AND PRODUCT EMPLOYING SAME

(54) 发明名称: 葫芦素E在制备治疗血管新生不足相关疾病药物或生物医用材料中的用途和应用其的产品

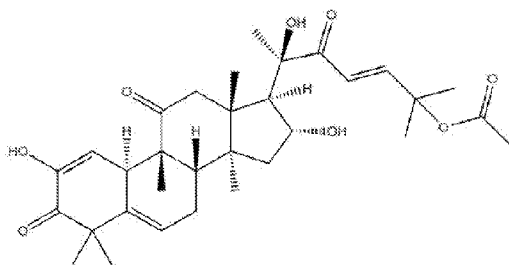


图 1

(57) Abstract: Disclosed is use of cucurbitacin E in preparing a drug or a biomedical material for treating a disease associated with insufficient neoangiogenesis. Also disclosed is a drug or a biomedical material for treating a disease associated with insufficient neoangiogenesis. The drug or the biomedical material can be used to prevent or treat a variety of conditions associated with insufficient neoangiogenesis, having uses in bone tissue repair, and for slow bone fracture healing, trauma, coronary heart disease, myocardial ischemia, insufficient establishment of collateral circulation, occlusive vasculitis, insufficient neoangiogenesis after organ transplantation.

(57) 摘要: 公开了一种葫芦素E在制备治疗血管新生不足相关疾病药物或生物医用材料中的用途, 还公开了用于治疗血管新生不足相关疾病的药物或生物医用材料, 能够用于骨组织修复、骨折愈合缓慢、创伤、冠心病、心肌缺血、侧支循环代偿建立不足、闭塞性脉管炎、器官移植后血管新生不足等诸多血管新生不足疾病防治。

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))。

葫芦素 E 在制备治疗血管新生不足相关疾病药物或生物医用材料中的用途和应用其的产品

相关申请的交叉引用

本申请要求于 2018 年 08 月 31 日提交中国专利局的申请号为 CN201811013796.9、名称为“葫芦素 E 在制备治疗血管新生不足相关疾病药物或生物医用材料中的用途和应用其的产品”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

技术领域

本申请涉及医药技术领域，具体而言，涉及一种葫芦素 E 在制备治疗血管新生不足相关疾病药物或生物医用材料中的用途和应用其的产品。

背景技术

血管新生是指成人在原始血管丛或已存在血管的基础上以发芽方式形成新生血管的过程，具有维持人体正常的生长和平衡的功能，通常血管新生发生在胚胎和胚胎发育后期，生殖周期和伤口愈合期。血管新生在许多疾病的发生、发展及转归和预后中扮演着重要的角色。

骨组织修复、骨折愈合缓慢、创伤、冠心病、心肌缺血、侧支循环代偿建立不足、闭塞性脉管炎等均为临床多发病、常见病，是影响民众健康和生活质量的重要因素。血管新生不足是这些疾病共同的重要病理生理基础，因此开展血管新生不足疾病的防治有着重要的意义。研究显示，血管新生主要涉及基底膜的降解、内皮细胞迁移、增殖和管形成等过程，由于血管形成在疾病中扮演着重要角色，研究新的促血管形成的药物，成为促进血管新生中的研究热点。

有鉴于此，特提出本申请。

发明内容

本申请的目的之一在于提供一种葫芦素 E 在制备治疗血管新生不足相关疾病的药物或生物医用材料中的用途，葫芦素 E 在无细胞毒性的浓度下可促进血管内皮细胞成管，对血管新生有促进作用。

本申请的目的之二在于提供一种用于治疗血管新生不足相关疾病的药物，主要由葫芦素 E 和药学上可接受的载体制成。

本申请的目的之三在于提供一种用于治疗血管新生不足相关疾病的生物医用材料，包括有效量的葫芦素 E。

为了实现本申请的上述目的，特采用以下技术方案：

第一方面，提供了一种葫芦素 E 在制备治疗血管新生不足相关疾病的药物或生物医用

材料中的用途，所述葫芦素 E 处于无细胞毒性浓度下。

优选地，在本申请提供的技术方案的基础上，所述葫芦素 E 的有效浓度不高于 50nM，优选不高于 30nM。

优选地，在本申请提供的技术方案的基础上，所述葫芦素 E 的给药途径包括外用、口服、肠胃外、雾化吸入或植入生物材料。

优选地，在本申请提供的技术方案的基础上，所述血管新生不足相关疾病包括骨组织修复不良、骨折愈合缓慢症、冠心病、心肌缺血、侧支循环代偿建立不足、闭塞性脉管炎或器官移植后血管新生不足中的任一疾病。

优选地，在本申请提供的技术方案的基础上，所述骨折包括创伤或病理性骨质疏松引起的骨折；

优选地，所述的冠心病包括缺血性心脏病、冠脉血管栓塞及损伤性疾病。

第二方面，提供了一种用于治疗血管新生不足相关疾病的药物，所述药物主要由葫芦素 E 和药学上可接受的载体制成。

优选地，在本申请提供的技术方案的基础上，所述药物的剂型包括片剂、散剂、颗粒剂、胶囊剂、混悬剂、糖浆剂、口服液、软膏剂、贴剂或注射剂。

第三方面，提供了一种用于治疗血管新生不足相关疾病的生物医用材料，包括有效量的葫芦素 E。

优选地，在本申请提供的技术方案的基础上，所述生物医用材料为生物医用高分子材料，优选为生物医用高分子支架。

优选地，在本申请提供的技术方案的基础上，所述葫芦素 E 以自身形态、微球或纳米粒形式存在。

与已有技术相比，本申请具有如下有益效果：

本申请提供了葫芦素 E 无细胞毒性的浓度下在制备治疗血管新生不足相关疾病的药物或生物医用材料中的用途。实验表明，葫芦素 E 在内皮细胞可耐受的安全浓度下可大大促进血管内皮细胞成管，形成交织良好的三维网络结构。同时用葫芦素 E 制成生物支架后进行骨修复实验也证实葫芦素 E 能促进动物骨缺损处的血管形成以及新骨形成。进一步葫芦素 E 促进血管内皮细胞 hy.EA926 相关的基因表达试验表明血管内皮生长因子受体 VEGFR 的表达变化与葫芦素 E 有剂量依赖性，无细胞毒性浓度下葫芦素 E 可促进 VEGFR 的表达上调，提示基因水平葫芦素 E 可以促进血管新生。葫芦素 E 对血管新生的促进作用可用于治疗血管新生不足相关疾病，为开发用于治疗血管新生不足相关疾病的药物或生物医用材料提供了新的选择。

附图说明

图 1 为葫芦素 E 的分子结构；

图 2 为本申请实施例 1 葫芦素 E 浓度与细胞存活率之间的关系图；

图 3 为本申请实施例 2 葫芦素 E 促进血管内皮细胞成管照片，其中 A 为对照组照片，B 为 10nM 葫芦素 E 组照片，C 为 30nM 葫芦素 E 组照片；

图 4 为本申请实施例 3 制得的葫芦素 E 生物复合材料支架促进骨缺损部位血管形成照片，其中 A 为对照组照片，B 为葫芦素 E 处理组照片；

图 5 为本申请实施例 3 制得的葫芦素 E 生物复合材料支架促进骨缺损部位新骨形成照片，其中 A 为对照组照片，B 为葫芦素 E 处理组照片；

图 6 为葫芦素 E 对 VEGFR 基因 mRNA 表达的影响。

具体实施方式

下面将结合实施例对本申请的实施方案进行详细描述，但是本领域技术人员将会理解，下列实施例仅用于说明本申请，而不应视为限制本申请的范围。实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市售购买获得的常规产品。

根据本申请的一个方面，提供了一种葫芦素 E 在制备治疗血管新生不足相关疾病的药物或生物医用材料中的用途，该用途中，葫芦素 E 处于无细胞毒性浓度下。

目前还没有现有技术中披露过葫芦素 E 对血管新生有促进作用。本研究发现葫芦素 E 在血管内皮细胞可耐受的安全浓度下可大大促进血管内皮细胞成管，即葫芦素 E 处于无细胞毒性浓度下具有促进血管新生的效果。

葫芦素 E (Cucurbitacin E) 也称葫芦苦素 E，为一种四环三萜化合物，主要分布于葫芦科植物中，在十字花科、玄参科等高等植物及一些大型真菌中也有发现。其化学式为 $C_{32}H_{44}O_8$ ，分子结构如图 1 所示。对葫芦素 E 的来源不作限定，可采用市售的现有产品或采用现有方法制备得到。

无细胞毒性浓度是指内皮细胞可耐受的安全浓度，即葫芦素 E 在该浓度下内皮细胞未出现生长抑制。

葫芦素 E 的有效浓度（无细胞毒性浓度）典型但非限制性的不高于 50nM，特别可以不高高于 30nM。

血管新生也称为血管生成(angiogenesis)，是从已有血管发芽生成新血管的过程。

研究表明，葫芦素 E 在人脐带静脉内皮细胞增殖实验、微管形成实验以及生物支架骨修复动物实验中有明显的促进血管新生的作用，可用于制备治疗血管新生不足相关疾病的药物或生物医用材料。

血管新生不足是指在机体修复或愈合过程中血管生成不足，不能满足机体修复或愈合

需要。血管新生不足会导致局部血液循环不良、甚至组织坏死。

血管新生不足相关疾病是指以血管新生不足为病理、生理基础的疾病。典型但非限制性的例如包括骨组织修复不良、骨折愈合缓慢症、冠心病、心肌缺血、侧支循环代偿建立不足或闭塞性脉管炎等疾病；还可包括例如对血管新生有依赖性的疾病，例如器官移植后血管新生不足等。

促进血管形成则有助于某些疾病的治愈和转归，例如骨折、骨坏死，闭塞性脉管炎以及机体各个部位由于局部缺血后侧支循环的建立。在器官移植包括脏器移植以及干细胞移植，良好的血管新生有利于脏器以及干细胞生存的微环境，影响移植后疾病的转归。

骨组织修复、骨折愈合缓慢、创伤、冠心病、心肌缺血、侧支循环代偿建立不足、闭塞性脉管炎等均为临床多发病、常见病，是影响民众健康和生活质量的重要因素，血管新生不足是这些疾病共同的重要病理和生理基础，因此开展血管新生不足疾病的防治和治疗有着重要的意义。

这里所述的骨组织修复是指疾病、创伤或药物导致骨缺损后的缺损部位的骨以及相关血管的修复。这里所述的骨折愈合包括创伤或病理性骨质疏松等引起的骨折。这里所述的冠心病包括缺血性心脏病、冠脉等血管栓塞及损伤性疾病。这里所述的心肌缺血指心脏由于某些原因导致的心肌血液供需失衡后的血液灌注减少，心肌能量代谢失调。这里所述的侧支循环代偿建立不足是是机体某一局部的主要血管的血流受阻后，不能形成旁路，使血液迂回地通过这些旁路，从而无法有效的建立侧支循环使局部组织遭受供血不足。这里所述的闭塞性脉管炎是指慢性周围血管狭窄或闭塞的疾病，其中、小动脉及其伴行的静脉和浅静脉发生狭窄或闭塞，受累血管呈现血管壁全层的非化脓性炎症，管腔内有血栓形成，管腔呈现进行性狭窄以至完全闭塞，引起肢体缺血，导致溃疡及其坏疽。

器官移植后血管新生不足是指包括脏器移植以及干细胞移植后新生血管不能满足更好的生长或愈合效果。

对葫芦素 E 制成的药物形式不作限定，可以是药物组合物的形式，也可以是药物制剂的形式。

对葫芦素 E 制成的生物医用材料的种类和材质不作限定，该生物医用材料主要以葫芦素 E 作为活性物质，与其他惰性材料如高分子材料、陶瓷或金属、合金等制成生物复合材料。

需要注意的是，治疗血管新生不足相关疾病的药物或生物医用材料的治疗对象包括但不限于人，也可以是其他动物，例如狗、兔、猫、猪、鸵鸟、牛、马、鼠，猴等哺乳类动物。

本申请公开了葫芦素 E 在制备促进血管新生药物中的应用，实验表明，葫芦素 E 在内

皮细胞可耐受的安全浓度下可大大促进血管内皮细胞成管，形成交织良好的三维网络结构。用葫芦素 E 制成生物支架后进行骨修复实验也证实葫芦素 E 能促进动物骨缺损处的血管形成以及新骨形成。进一步葫芦素 E 促进血管内皮细胞 hy.EA926 相关的基因表达试验表明血管内皮生长因子 VEGFR 的表达变化与葫芦素 E 有剂量依赖性，低剂量葫芦素 E 可促进 VEGFR 的表达上调，提示基因水平葫芦素 E 可以促进血管新生。葫芦素 E 对血管新生的促进作用可用于治疗血管新生不足相关疾病，为开发用于治疗血管新生不足相关疾病的药物或生物医用材料提供了新的选择。

在一种优选的实施方式中，为实施治疗和/或预防血管新生不足相关疾病的方法，葫芦素 E 可通过外用、口服、肠胃外、雾化吸入以及植入生物材料给药。

外用主要指涂抹、外敷等方式，肠胃外包括皮下、皮内、静脉内、肌肉内、关节内、动脉内、滑膜腔内、胸骨内、鞘内、病灶内及颅内注射或输入。

根据本申请的第二个方面，提供了一种用于治疗血管新生不足相关疾病的药物，药物主要由葫芦素 E 和药学上可接受的载体制成。

药学上可接受的载体是指药学领域常规的药物载体。

根据本申请可以将治疗有效量的葫芦素 E 和药学上允许的任意辅料制成药物制剂，也可以添加其他与葫芦素 E 没有拮抗作用的促血管新生药物。其制剂可以是药学上的任意一种剂型，包括但不限于片剂、散剂、颗粒剂、胶囊剂、混悬剂、糖浆剂、口服液、软膏剂、贴剂或注射剂等。

根据剂型的不同，选择合适的药物载体，包括但不限于填充剂、粘合剂、崩解剂、润滑剂、增溶剂、助悬剂、润湿剂、色素、香精、溶剂、表面活性剂、矫味剂、缓冲剂、等渗调节剂、抗氧剂、抑菌剂和止痛剂中的一种或几种。

制成不同的剂型有利于根据实际需要进行临床应用，提高药物活性成分葫芦素 E 的利用率。

根据本申请的第三个方面，提供了一种用于治疗血管新生不足相关疾病的生物医用材料，包括有效量的葫芦素 E。

生物医用材料包括但不限于生物医用高分子材料。

所述的生物医用材料包含有效量的葫芦素 E。

优选地，典型的生物医用高分子材料为生物高分子材料的支架。

制备生物高分子材料的支架时，可以是葫芦素 E 与现有技术中的支架材料混合制备而成，也可以先将葫芦素 E 制备成微球或纳米粒后再与现有技术中的支架材料混合制备成生物复合材料。即生物复合材料中，药物活性物质葫芦素 E 可以自身形态直接存在，也可以微球或纳米粒的形态存在。

优选地，本申请通过 3D 打印技术制备了含葫芦素 E 的生物高分子材料的支架。

优选地，生物高分子材料的支架中药物有效成分葫芦素 E 的重量百分比为 0.001-0.1%，例如为 0.001%、0.005%、0.01%、0.015%、0.02%、0.05%、0.06%、0.08%或 0.1%。

由葫芦素 E 制成的药物和/或生物医用材料可应用于治疗血管新生不足相关疾病，特别是用于骨组织修复、骨折愈合缓慢、创伤、冠心病、心肌缺血、侧支循环代偿建立不足、闭塞性脉管炎等诸多血管新生不足疾病的防治。

为了有助于更清楚的理解本申请的内容，现结合具体的实施例和附图详细介绍。如未明确指出，以下实施例中涉及的实验操作方法为常用的医学操作方法，涉及的试剂、仪器为常规的市售试剂或者仪器。

以下实施例中所用各试剂均直接购于市场，例如：葫芦素 E 购自法国 EXTRASYNTHESE 公司；CCK-8 试剂购自同仁化学；基质胶购自康宁公司；PLGA (poly lactic-co-glycolic acid, 聚乳酸-羟基乙酸共聚物) 购自山东省医疗器械研究所，PLGA 的分子量为 10 万，其中乳酸与乙醇酸的摩尔比为 70:30。上述各物质不限于购于以上所述厂家，所用其他原料或试剂也均购于市场，购买厂家不限。以下实施例所用快速成型机由清华大学机械工程系研制，型号为 CLRF-2000-II。

实施例 1 葫芦素 E 对血管内皮细胞毒性检测

1、原理：药物毒性实验采用 CCK-8 方法。CCK-8 方法是一种在活细胞中运用比色法确定细胞增殖数量的测定方法。原理为 WST-8[化学名：2-(2-甲氧基-4-硝基苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二磺酸苯)-2H-四唑单钠盐]，在电子载体 1-甲氧基-5-甲基吩噻嗪鎓硫酸二甲酯 (1-Methoxy PMS) 的作用下被细胞中的脱氢酶还原为具有高度水溶性的黄色甲瓚产物，生成的甲瓚物的数量与活细胞的数量成正比。因此可利用这一特性直接进行细胞增殖和毒性分析。

2、方法：将血管内皮细胞 ea.hy926 细胞悬液按照 3000 细胞/孔接种于 96 孔板中，过夜培养贴壁后，分别加入含有不同浓度葫芦素 E (1,3,10,30,100,300nM) 的培养基作用 72 小时，然后每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂，孵育 2 小时，酶标仪上 490nm 处读出每个孔中的光吸收值。根据数值得出药物的半数致死浓度为 65.45nM (如图 2 所示)。根据此结果确定 50nM 以下为内皮细胞可耐受的安全浓度。

实施例 2 葫芦素 E 促进血管内皮细胞 EA.hy926 成管实验

1、原理：基质胶是从 EHS (Engelbreth-Holm-Swarm) 小鼠肉瘤中抽提得到的可溶性的基底膜抽提物。在室温下，基质胶聚合为一种具有生物活性的基质材料，作用与哺乳动物细胞基底膜类似，对于细胞的粘附和分化有效应作用，血管内皮细胞可在 Matrigel 上融合成微管，利用血管内皮细胞的这种特性来研究药物对血管形成的影响。

2、方法：将基质胶铺到 24 孔板上，于 37℃，5% CO₂ 培养箱放置 30 分钟待其凝固。每孔加入相同体积的细胞和含不同浓度葫芦素 E 的培养基共 500μL，混匀。于 37℃，5% CO₂ 培养箱中培养 16-18h 后在显微镜下观察微管形成情况，计算微管形成数量并进行统计学分析。

微管形成情况照片如图 3 所示，其中 A 为对照组（未给予葫芦素 E），B 为 10nM 葫芦素 E 组，C 为 30nM 葫芦素 E 组。血管内皮细胞在基质胶中生长 16-18h 后，细胞由原来的多角形变成长梭形，在基质胶中延伸生长，单个细胞卷成管状并相互连接，形成三维网状结构。图中可以看出，与对照组相比，给予葫芦素 E 之后，内皮成管过程大大被促进，形成交织良好的三维网络结构，说明葫芦素 E 可以促进内皮细胞微管形成。

实施例 3 葫芦素 E 生物复合材料支架的制备

（1）PLGA+TCP+葫芦素 E 溶剂的配制

称取 5.0g PLGA 和 1.25g TCP 置于 100ml 烧杯中，加入 50ml 1,4-二氧六环，搅拌使其溶解。在打印之前，称取 20mg 葫芦素 E 置于 1.5ml 离心管中，加入 500ul 1,4-二氧六环使其溶解，在加入到 PLGA/TCP 溶液中，备用。

（2）3D 打印

① 建立支架模型：设计支架的长宽高为 20mm×20mm×20mm 的立方体，生成 STereo Lithography (STL)。将 STL 文件导入 Aurora 软件中进行分层切割，设计单层厚度 0.12mm，生成 command-line interface (CLI) 文件。

② 设置打印参数：将步骤 1 设置好的 CLI 文件，导入 cark 软件中，打印过程参数设定为：打印速度 20mm/s，浆料填充速度 1.00mm/s，支架层厚 120μm，平均孔径大小 500μm。

③ 测量溶浆的粘度：使用粘度计测量 PLGA/TCP/CuE 溶液的粘度，将其粘度控制在 600cp-700cp 范围内。

④ 打印过程：3D 打印机的温度预冷至-30℃后，将浆料倒入料仓，使用软管将料仓与打印机连接，打印过程在设定的参数下运行，整个打印过程在-30℃条件下进行，以保证浆料中药物分子的活性。

冷冻干燥：打印结束后，将制备的支架置于冷冻干燥机中，在真空条件下冷冻干燥 72 小时，去除材料中的有机溶剂。

实施例 4 葫芦素 E 生物复合材料支架促进兔骨缺损处血管形成

将注入造影剂的动物标本应用小动物用微 CT (SkyScan 1176) 扫描，置胫骨或脊柱标本于机床中心，调节电脑参数，分辨率 (Resolution) 中级 (18um)，滤光器 (Filter) Al 1 mm，电压 (Voltage) 60kV，电流 (Current) 400 μA，平均校正 (Frame Averaging) 2 次。应用 NRecon 软件重建股骨远端标本二维图，选择二维重建区域，预览 (Preview) 二制图，统

一设置灰度范围 (Minimum or Maximum for CS to Image Conversion): 0.00-0.10, 选择全标本重建区域 (Reconstruct ROI), 重建血管形成。用 CTAn 软件选取骨缺损位置 (Analysis ROI), 设置背景 (Thresholding) 为 40-255, 选择 3D 模型程序进行重建。

葫芦素 E 生物复合材料支架促进骨缺损部位血管形成照片如图 4 所示, 其中 A 为对照组 (未含有葫芦素 E 的支架) 照片, B 为葫芦素 E 处理组照片。图中可以看出, 使用葫芦素 E 生物复合材料支架能明显促进兔骨缺损处血管形成。

实施例 5 葫芦素 E 生物复合材料支架促进兔骨缺损处新骨形成

应用小动物用微 CT (SkyScan 1176), 置胫骨或脊柱标本于机床中心, 调节电脑参数, 分辨率 (Resolution) 中级 (18um), 滤光器 (Filter) Al 1 mm, 电压 (Voltage) 60kV, 电流 (Current) 400 μ A, 平均校正 (Frame Averaging) 2 次。应用 NRecon 软件重建股骨远端标本二维图, 选择二维重建区域, 预览 (Preview) 二制图, 统一设置灰度范围 (Minimum or Maximum for CS to Image Conversion): 0.00-0.10, 选择全标本重建区域 (Reconstruct ROI), 添加重建并开始运行。应用 CTAn 软件选取骨缺损位置 (Analysis ROI), 设置背景 (Thresholding) 为 63-255, 选择 3D 分析进行分析可检测缺损位置新生骨的骨体积分数 (Percent bone volume, BV/TV)。根据大鼠标样建立密度与灰度标准曲线, 可获得缺损位置新生骨的骨密度。选择 3D 建模可以生成新生骨 3D 重建模型。

葫芦素 E 生物复合材料支架促进骨缺损部位新骨形成照片如图 5 所示, 其中 A 为对照组 (未含有葫芦素 E 的支架) 照片, B 为葫芦素 E 处理组照片。图中可以看出, 使用葫芦素 E 生物复合材料支架能明显促进兔骨缺损处新骨形成。

实施例 6 葫芦素 E 促进内皮细胞 hy.EA926 相关的基因表达试验

将 hy.EA926 细胞种在 6 孔板中, 孵育过夜后, 加 30nM 葫芦素 E 分别于时间点 6, 12, 24, 48 小时按 AxyGen 的 RNA 提取试剂盒说明书提取 RNA, 逆转录总 mRNA 为 cDNA, 设计 VEGFR2 的引物。

引物序列为: 上游: 5' -CTCTCTCTGCCTACCTCACCTG-3'; 下游: 5' -CGGCTCTTTCGCTTACTGTTC-3'。使用 SYBR-Green Mix kit (Takara) 应用 Roche LC96 荧光定量 PCR 仪来检测 VEGFR2 基因水平的变化。葫芦素 E 对 VEGFR2 基因 mRNA 表达调控的影响如图 6 所示, 图中显示药物可以促进血管内皮生长因子受体 VEGFR2 的表达, 并具有时间依赖性, 该结果提示在葫芦素 E 可调控血管新生相关的基因表达从而促进血管新生。

葫芦素 E 经实验结果表明, 无毒性的低剂量葫芦素 E 对人脐静脉细胞有显著的成血管效果, 进一步动物体内实验证明其促进损伤部位的血管新生以及具有骨修复的作用, 这是由于低剂量葫芦素 E 可促进 VEGFR2 的表达上调。

尽管已用具体实施例来说明和描述了本申请，然而应意识到，在不背离本申请的精神和范围的情况下可以作出许多其它的更改和修改。因此，这意味着在所附权利要求中包括属于本申请范围内的所有这些变化和修改。

权利要求书

- 1、葫芦素 E 在制备治疗血管新生不足相关疾病的药物或生物医用材料中的用途，所述葫芦素 E 处于无细胞毒性浓度下。
- 2、按照权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述葫芦素 E 的有效浓度不高于 50nM，优选不高于 30nM。
- 3、按照权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述葫芦素 E 的给药途径包括外用、口服、肠胃外、雾化吸入或植入生物材料。
- 4、按照权利要求 1-3 任一项所述的用途，其特征在于，所述血管新生不足相关疾病包括骨组织修复不良、骨折愈合缓慢症、冠心病、心肌缺血、侧支循环代偿建立不足、闭塞性脉管炎或器官移植后血管新生不足中的任一疾病。
- 5、按照权利要求 4 所述的用途，其特征在于，所述骨折包括创伤或病理性骨质疏松引起的骨折；
优选地，所述的冠心病包括缺血性心脏病、冠脉血管栓塞及损伤性疾病。
- 6、一种用于治疗血管新生不足相关疾病的药物，其特征在于，所述药物主要由葫芦素 E 和药学上可接受的载体制成。
- 7、按照权利要求 6 所述的用于治疗血管新生不足相关疾病的药物，其特征在于，所述药物的剂型包括片剂、散剂、颗粒剂、胶囊剂、混悬剂、糖浆剂、口服液、软膏剂、贴剂或注射剂。
- 8、一种用于治疗血管新生不足相关疾病的生物医用材料，其特征在于，包括有效量的葫芦素 E。
- 9、按照权利要求 8 所述的用于治疗血管新生不足相关疾病的生物医用材料，其特征在于，所述生物医用材料为生物医用高分子材料，优选为生物医用高分子支架。
- 10、按照权利要求 8 或 9 所述的用于治疗血管新生不足相关疾病的生物医用材料，其特征在于，所述葫芦素 E 以自身形态、微球或纳米粒形式存在。

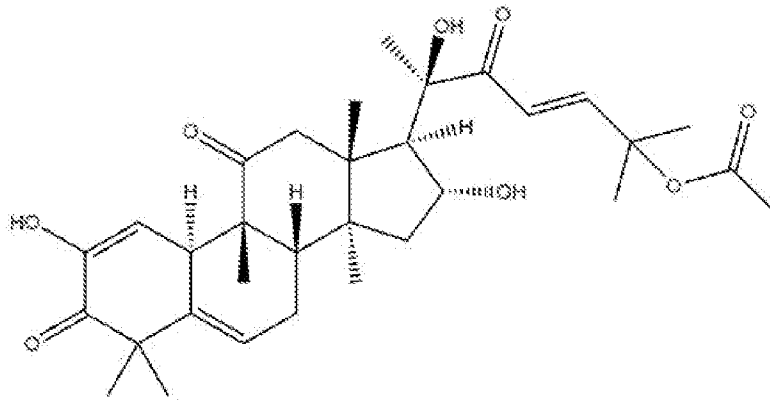


图 1

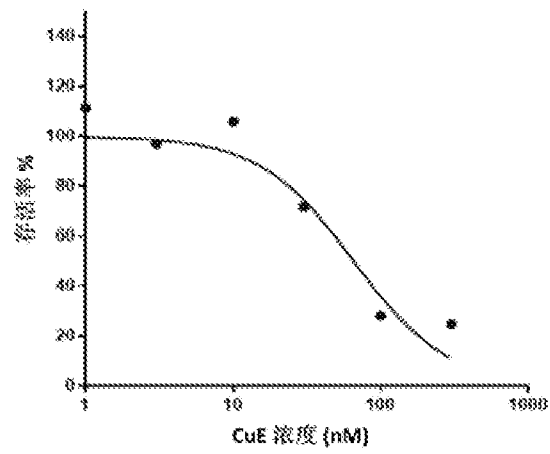


图 2

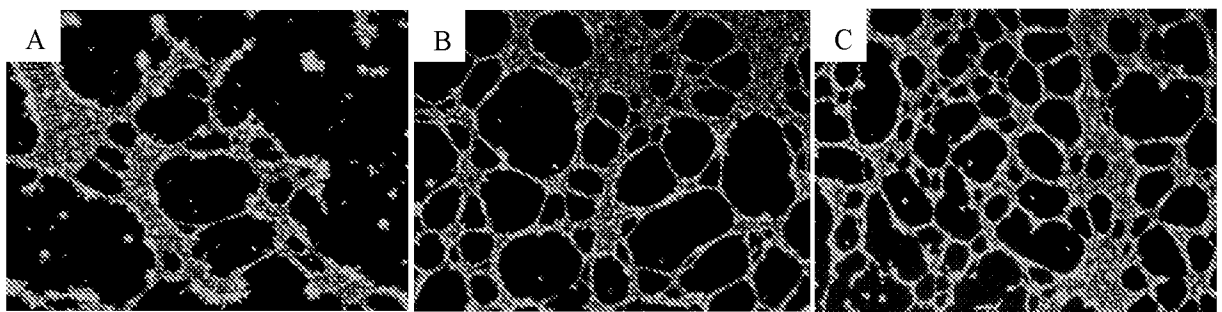


图 3

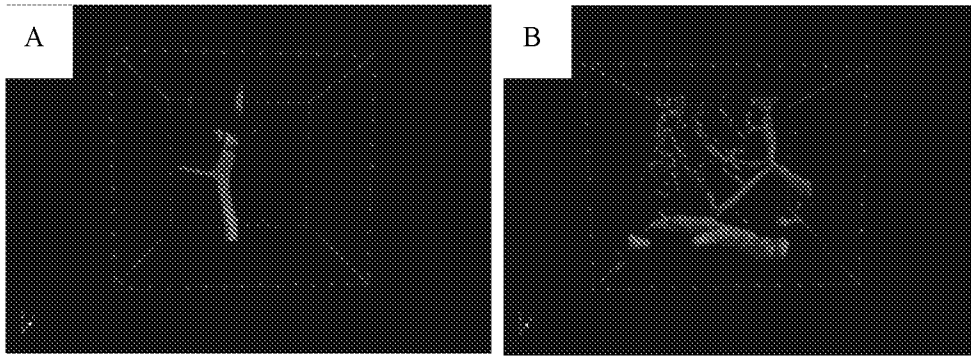


图 4

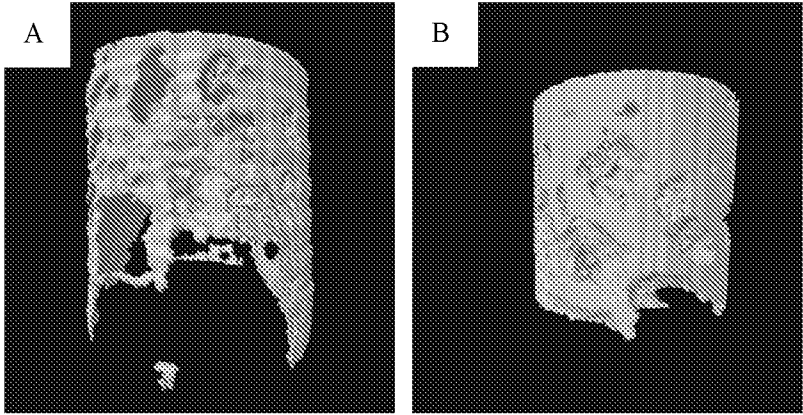


图 5

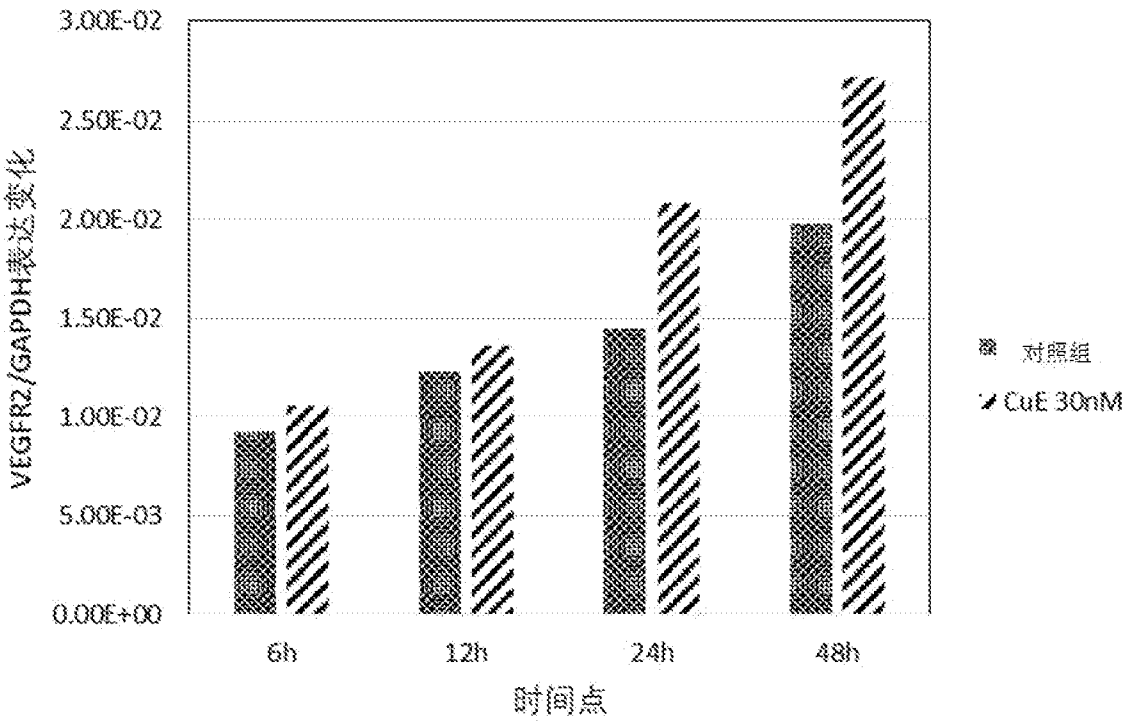


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/121847

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/575(2006.01)i; A61P 9/10(2006.01)i; A61P 9/00(2006.01)i; A61P 19/08(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)

CNABS, DWPI, EPODOC, SIPOABS, MOABS, TWMED, HKABS, TWABS, VEN, CNTXT, CJFD, CNKI, CA, MEDLINE, 中国药物专利数据库, China Medicine Patent Database, 中国药学文摘, Chinese Pharmaceutical Abstracts (CPA), E药全库, ECOO, 百度学术搜索, BAIDU SCHOLAR, 读秀学术, DUXIU ACADEMIC: (葫芦素, 血管新生不足, 血管新生, 血管, 细胞毒性, 毒性浓度, 浓度, 心肌缺血, 冠心病, 侧枝循环, 侧支循环, 骨折, 骨质疏松, 骨, 脉管炎, cucurbitacin, blood vessel formation, blood vessel, vein, cytotoxicity, myocardial ischemia, coronary heart disease, collateral circulation, fracture, bone, angitis, angitis)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 20170019639 A (YANG, D. G.) 22 February 2017 (2017-02-22) abstract, claims 1-7, and description, paragraphs [0037]-[0047]	1-10
X	CN 105168432 A (JINAN XINGYI MEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 23 December 2015 (2015-12-23) embodiments 1-4, and experiment 10	1-10
X	CN 105168396 A (JINAN XINGYI MEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 23 December 2015 (2015-12-23) embodiments 1-10, and experiment 1	1-10



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

04 April 2019

Date of mailing of the international search report

24 April 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

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

Authorized officer

Facsimile No. (86-10)62019451

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/121847

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR	20170019639	A	22 February 2017	None	
CN	105168432	A	23 December 2015	None	
CN	105168396	A	23 December 2015	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/121847

A. 主题的分类

A61K 31/575(2006.01)i; A61P 9/10(2006.01)i; A61P 9/00(2006.01)i; A61P 19/08(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))

CNABS, DWPI, EPDOC, SIPOABS, MOABS, TWMED, HKABS, TWABS, VEN, CNTXT, CJFD, CNKI, CA, MEDLINE, 中国药物专利数据库, 中国药学文摘, E药全库, 百度学术搜索, 读秀学术(葫芦素, 血管新生不足, 血管新生, 血管, 细胞毒性, 毒性浓度, 浓度, 心肌缺血, 冠心病, 侧枝循环, 侧支循环, 骨折, 骨质疏松, 骨, 脉管炎, cucurbitacin, blood vessel formation, blood vessel, vein, cytotoxicity, myocardial ischemia, coronary heart disease, collateral circulation, fracture, bone, angiitis, angitis)

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 20170019639 A (DONG-GWON YANG) 2017年 2月 22日 (2017 - 02 - 22) 摘要和权利要求1-7以及说明书第[0037]-[0047]段	1-10
X	CN 105168432 A (济南星懿医药技术有限公司) 2015年 12月 23日 (2015 - 12 - 23) 实施例1-4和实验例1	1-10
X	CN 105168396 A (济南星懿医药技术有限公司) 2015年 12月 23日 (2015 - 12 - 23) 实施例1-6和实验例1	1-10

☐ 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

2019年 4月 4日

国际检索报告邮寄日期

2019年 4月 24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

受权官员

张贵峰

电话号码 86-010-62411102

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/121847

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	20170019639	A	2017年 2月 22日	无	
CN	105168432	A	2015年 12月 23日	无	
CN	105168396	A	2015年 12月 23日	无	