

(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 8 月 2 日 (02.08.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/137396 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 31/522 (2006.01) **A61K 45/00** (2006.01)
A61K 31/5575 (2006.01) **A61P 7/00** (2006.01)
A61K 31/7076 (2006.01) **A61P 7/04** (2006.01)
A61K 31/551 (2006.01) **A61P 7/06** (2006.01)

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。

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/112898

(22) 国际申请日: 2017 年 11 月 24 日 (24.11.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201710060730.4 2017年1月25日 (25.01.2017) CN
201710060759.2 2017年1月25日 (25.01.2017) CN

(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))。

(71) 申请人: 苏州大学(SOOCHOW UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国江苏省苏州市工业园区仁爱路
199号, Jiangsu 215123 (CN)。

(72) 发明人: 戴克胜(DAI, Kesheng); 中国江苏省苏州
市工业园区仁爱路199号, Jiangsu 215123 (CN)。

(74) 代理人: 南京经纬专利商标代理有限公司
(NANJING JINGWEI PATENT & TRADEMARK
AGENCY CO., LTD); 中国江苏省南京市鼓楼区中
山路179号12楼B座, Jiangsu 210005 (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,

(54) **Title:** USE OF PROTEIN KINASE A ACTIVATOR AND INHIBITOR IN PREPARATION OF DRUGS FOR TREATING
DISEASES ASSOCIATED WITH CHANGES IN PLATELET COUNTS

(54) 发明名称: 蛋白激酶A激活剂及抑制剂在制备治疗血小板数量变化相关疾病药物中的用途

(57) **Abstract:** A use of a protein kinase A activator and an inhibitor in the preparation of drugs for treating diseases associated with
changes in platelet counts. Investigating the effect of protein kinase A in the regulation of platelet apoptosis by means of experimentation,
research shows that protein kinase A regulates platelet apoptosis by means of regulating the phosphorylation of serine at BAD position
155; the activation of protein kinase A activity may inhibit the occurrence of endogenous platelet apoptosis, and may also increase
circulating platelet counts in experimental animals; in addition, inhibiting PKA activity may induce platelet apoptosis in vitro, while
also reducing circulating platelet counts in the body, indicating that PKA inhibitors may participate in the treatment of thrombocytosis,
and reduce platelet counts in peripheral circulating blood.

(57) **摘要:** 蛋白激酶A激活剂及抑制剂在制备治疗血小板数量变化相关疾病药物中的用途。通过实验探究
了蛋白激酶A在调控血小板凋亡过程中的作用, 研究证明蛋白激酶A通过调控BAD 155位点丝氨酸的磷酸化
调控血小板凋亡, 蛋白激酶A活性的激活可抑制内源性血小板凋亡的发生, 而且还可以提高实验动物体内
循环血小板的数量, 另外抑制PKA活性不仅可以诱导体外血小板凋亡, 而且可以降低体内循环血小板的数
量, 表明PKA抑制剂可以参与血小板增多性疾病的治疗过程, 减少外周循环血中血小板数量。

WO 2018/137396 A1

蛋白激酶 A 激活剂及抑制剂在制备治疗血小板数量变化相关疾病药物中的用途

技术领域

[0001] 本发明属于血小板相关药物领域，具体涉及蛋白激酶 A 激活剂及抑制剂在制备治疗血小板数量变化相关疾病药物中的用途。

背景技术

[0002] 血小板精细调控血液循环相关的血栓和出血平衡。同时，血小板在许多重要的病理生理过程中发挥重要作用，例如：免疫、感染、动脉硬化、肿瘤发生发展和转移等。然而，血小板的寿命很短并且神秘，为什么血小板体内循环仅 8 - 9 天？这个问题困扰人类半个多世纪。此外，危及生命的血小板减少症通常发生在许多高发病率的疾病，如糖尿病，感染，ITP，以及许多药理治疗后。这些病理过程中血小板寿命缩短的原因并不完全理解。自限性，寿命短，尤其是储存时病变，限制了储存血小板治疗血小板减少症的有效期。因此，找到调控血小板寿命和生存的机制具有重要的病理生理意义。

血小板是循环系统中调节血栓形成与病理性出血的关键因素，同时也在机体的免疫反应、感染、动脉粥样硬化形成以及肿瘤转移等病理生理过程中发挥重要作用。对血小板的生命周期的精细调节是维持正常人体内血小板数量的关键，血小板数量增多见于多种疾病，如原发性血小板增多症，真性红细胞增多症，而有些病理过程中外周血血小板数量增多，增加了出血或血栓形成的风险，如慢性粒细胞性白血病、大出血后及慢性炎症、肿瘤等。因此，探讨调控血小板寿命和生存的机制，通过缩短血小板寿命来减少外周血中血小板数量，对治疗血小板增多性疾病具有重要的病理生理学意义。

近年来对血小板凋亡的研究越来越被重视，因为其可以揭示血小板寿命和生存的神秘。越来越多的证据表明，病理和生理条件下细胞凋亡的内在程序导致血小板破坏。类似于真核细胞，BAK 和 BAX 是细胞内两个命中注定的杀手，其在血小板参与的血栓形成和止血过程中不会损耗。然而，众多 Bcl - 2 家族的抗凋亡蛋白质中，目前证明只有 Bcl-xL 与 BAK 参与调控无核血小板的凋亡。突变 Bcl-xL 剂量依赖性降低体内血小板生存，而这个过程可以通过敲除 BAK 和 BAX 被抑制。P53 通过抑制 Bcl-xL 活性被证明可能参与调节血小板凋亡过程。此外，BAD，即抗凋亡蛋白 Bcl-2 同源域 3 (BH3) 蛋白也被发现参与调节血小板生存。敲除 BAD 可以显著延长血小板寿命。这些研究揭示了血小板凋亡蛋白在调节血小板寿命的关键作用。

然而，基本的问题仍然存在，如何在生理或病理条件下诱导或抑制血小板凋亡，目前仍不清楚。

蛋白激酶 A (PKA) 是一种在真核细胞中广泛存在的丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶。PKA 是由两个催化亚基和两个调控亚基组成的异四聚体。环磷酸腺苷结合到调控亚基后，释放激活的催化亚基，进而调控细胞内各种活动，包括细胞代谢、生长、分化、基因表达和细胞凋亡等。血小板中 PKA 高度表达，PKA 在血小板功能的调节中扮演重要角色。但是 PKA 是否对储存或病理刺激诱导的血小板凋亡有较大的影响，仍未可知。

发明内容

[0003] 要解决的技术问题：血小板凋亡限制了它的寿命，许多疾病引起的血小板凋亡能够导致血小板减少症，但是血小板凋亡的启动和调节机制目前还未完全阐明。我们要解决的技术问题是进一步研究蛋白激酶 A 激活剂和抑制剂对促进和抑制血小板凋亡的具体机制，进而公开蛋白激酶 A 激活剂和抑制剂在制备治疗血小板数量变化相关疾病药物中的用途。

[0004] 技术方案：针对上述问题，本发明公开了蛋白激酶 A 激活剂在制备治疗血小板数量减少相关疾病药物中的用途。

优选的，所述的蛋白激酶 A 激活剂为无机物激活剂、有机物激活剂中的一种或几种。

优选的，所述的无机物激活剂为氢化物、氧化物、酸、碱、盐中的一种或几种。

优选的，所述的有机物激活剂为烃类、烃的衍生物、糖类、蛋白质、脂肪、核酸、合成高分子材料中的一种或几种。

优选的，所述的烃类为烯烃、烷烃、炔烃、芳香烃中的一种或几种；所述的烃的衍生物为卤代烃、醇、酚、醛、酸、酯中的一种或几种；所述的糖类为单糖、二糖、低聚糖、多糖中的一种或几种；所述的蛋白质为氨基酸、多肽中的一种或几种；所述的核酸为脱氧核糖核酸、核糖核酸中的一种或几种。

优选的，所述的蛋白激酶 A 激活剂为磷酸二酯酶抑制剂、腺苷酸环化酶激动剂、环磷酸腺苷中的一种或几种。

优选的，所述的蛋白激酶 A 激活剂为药物氨力农、米力农、依诺昔酮、氨茶碱、地诺前列酮、伊洛前列素、西洛他唑、西洛酰胺、双嘧达莫中的一种或几种。

优选的，所述的蛋白激酶 A 激活剂为银杏叶提取物、槲皮素、环磷酸腺苷葡胺、环磷酸腺苷、佛

司可林、8-溴腺苷-3',5'-环单磷酸、8-溴代-环磷腺苷、8-哌啶基腺苷-环磷腺苷、8-氯代-环磷腺苷、腺苷酸 3,5-环单磷酸盐、N6-苯甲酰基-环磷腺苷、(S)-腺苷酸、环 3',5'-(氢硫代磷酸酯)三乙基、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、8-氯苯-环磷腺苷、腺苷酸 3,5-环单磷酸盐、腺苷酸 3,5-环单硫代磷酸酯、8-溴代-环磷腺苷、特异性 5,6-4,5-二氰基咪唑-环磷腺苷、特异性 8-氯苯-环鸟苷酸钠、特异性腺苷酸 3',5'-环单硫代磷酸酯三乙基盐、特异性环磷腺苷、联丁酰基-环磷腺苷、N6-单酰腺苷 3',5'-环单磷酸盐、8-溴代腺苷酸 3',5'-环单磷酸硫酯、8-溴代腺苷酸 3',5'-环单磷酸盐、N6-苯甲酰基-环磷腺苷、赤-9-氨基- β -己基- α -甲基-9H-嘌呤-9-盐酸乙醇-9-腺嘌呤盐酸中的一种或几种。

优选的，所述的血小板数量减少相关疾病包括免疫性血小板减少症、感染所致的血小板减少疾病、继发性血小板减少疾病、药物引起的血小板减少疾病、血小板生成缺欠疾病或非免疫性血小板减少疾病。

优选的，所述的免疫性血小板减少症相包括特发性血小板减少性紫癜。

优选的，所述的感染所致的血小板减少疾病包括细菌感染血小板减少疾病或病毒感染血小板减少疾病。

优选的，所述的继发性血小板减少相关疾病包括糖尿病病人体内的血小板减少疾病、肿瘤病人体内的血小板减少疾病、心脑血管疾病病人体内的血小板减少疾病、药物治疗过程中导致的血小板减少疾病、脾功能亢进疾病、妊娠过程中血小板减少疾病、继发于再生障碍性贫血的血小板减少疾病、继发于脾功能亢进的血小板减少疾病、继发于白血病的血小板减少疾病、继发于系统性红斑狼疮的血小板减少疾病、继发于干燥综合症的血小板减少疾病或继发于电离辐射的血小板减少疾病。

优选的，所述的药物引起的血小板减少疾病中，该药物为抗肿瘤药物、奎宁、奎尼丁、肝素、抗生素、抗惊厥药物中的一种或几种。

优选的，所述的血小板生成缺欠疾病包括先天性血小板生成不良、无巨核细胞性血小板减少、

范可尼综合征、血小板膜糖蛋白 Ib-IX 缺乏或功能异常引起的伯纳德-苏利耶综合征 (Bernard-Soulier 综合征)、灰色血小板综合征、湿疹血小板减少伴免疫缺陷综合征 (Wiskott-Aldrich 综合征)、再生障碍性贫血与骨髓增生异常综合征所引起的血小板减少疾病、获得性血小板生成不良、化疗药物所引起的血小板生成欠缺疾病或放射损伤引起的血小板生成欠缺疾病。

优选的, 所述的血小板数量减少相关疾病包括血小板生成减少导致的疾病、血小板破坏增多导致的疾病或血栓性血小板减少性紫癜。

优选的, 所述的血小板生成减少导致的疾病包括慢性再生障碍性贫血、骨髓增生异常综合征、放疗引起的血小板生成减少疾病或化疗引起的血小板生成减少疾病; 所述的血小板破坏增多导致的疾病包括自身免疫性疾病引起的血小板破坏增多疾病、抗磷脂综合征引起的血小板破坏增多疾病、人类免疫缺陷病毒引起的血小板破坏增多疾病或药物性血小板减少症引起的血小板破坏增多疾病。

优选的, 所述的药物为片剂、胶囊剂、颗粒剂、丸剂、缓释制剂、控释制剂、口服液或贴剂。

优选的, 所述的药物包含药学上有效剂量的蛋白激酶 A 激活剂和药学上可接受的载体。

优选的, 所述的药物通过口服、注射、喷雾吸入或经胃肠道进行给药。

蛋白激酶 A 抑制剂在制备治疗血小板数量增多相关疾病药物中的用途。

优选的, 所述的蛋白激酶 A 抑制剂为无机物抑制剂、有机物抑制剂中的一种或几种。

优选的, 所述的无机物抑制剂为氢化物、氧化物、酸、碱、盐中的一种或几种。

优选的, 所述的有机物抑制剂为烃类、烃的衍生物、糖类、蛋白质、脂肪、核酸、合成高分子材料中的一种或几种。

优选的, 所述的烃类为烯烃、烷烃、炔烃、芳香烃中的一种或几种; 所述的烃的衍生物为卤代烃、醇、酚、醛、酸、酯中的一种或几种; 所述的糖类为单糖、二糖、低聚糖、多糖中的一种或几种; 所述的蛋白质为氨基酸、多肽中的一种或几种; 所述的核酸为脱氧核糖核酸、核糖核酸中的一种或几种。

优选的, 所述的蛋白激酶 A 抑制剂为法舒地尔、氮-[2-(磷酸化溴硝基精氨酸酰氨基) 乙基]-5-

异喹啉磺酰胺、 $C_{94}H_{148}N_{32}O_{31}$ 、 $C_{80}H_{130}N_{28}O_{24}$ 、 $C_{27}H_{21}N_3O_5$ 、 $C_{26}H_{19}N_3O_5$ 、 $C_{20}H_{13}N_3O$ 、 $C_{32}H_{31}N_3O_5$ 、 $C_{22}H_{22}N_4O$ 、 $C_{14}H_{17}N_3O_2S \cdot 2HCl$ 、 $C_{14}H_{17}N_3O_2S$ 、 $C_{11}H_{13}N_3O_2S \cdot HCl$ 、 $C_{12}H_{13}ClN_2O_2SHCl$ 、 $C_{12}H_{15}N_5O_2S_2HCl$ 、 $C_{53}H_{100}N_{20}O_{12}$ 、1-(5-喹啉磺酰基)哌嗪、4-氰基-3-甲基异喹啉、乙酰氨基-4-氰基-3-甲基异喹啉、8-溴代-2-单酰腺苷-3, 5-环单硫代磷酸酯、腺苷酸 3,5-环单硫代磷酸酯、2-0-单丁-环磷腺苷、8-氯代-环磷腺苷、N-[2-(肉桂酰氨基酸)]-5-异琳喹酮、反相-8-己基氨基腺苷酸 3,5-单硫代磷酸酯、反相-8-哌啶基腺苷-环磷腺苷、反相-腺苷酸 3,5-环单硫代磷酸酯、5-碘代结核菌素、8-羟基腺苷酸-3,5-单硫代磷酸酯、钙磷酸蛋白 C、瑞香素、反相-8-氯苯-环磷腺苷、反相-环磷腺苷、反相-8-Br-环磷腺苷、9-腺苷酸环化酶、1-(5-异喹啉磺酰)-2-甲基哌啶、8-羟基腺苷酸-3',5'-单磷酸、8-己基氨基腺苷酸-3',5'-单磷酸、反相-腺苷酸 3',5'-环单磷酸中的一种或几种。

优选的，所述的血小板数量增多相关疾病包括原发性血小板增多疾病或继发性血小板增多疾病。

优选的，所述的原发性血小板增多疾病包括原发性血小板增多症、慢性粒细胞白血病、骨髓纤维化和真性红细胞增多症、骨髓增生异常综合症或骨髓增殖性肿瘤。

优选的，所述的继发性血小板增多疾病包括切脾后血小板增多、细菌或病毒引起的感染、肿瘤或免疫系统疾病。

优选的，所述的药物为片剂、胶囊剂、颗粒剂、丸剂、缓释制剂、控释制剂、口服液或贴剂。

优选的，所述的药物包含药学上有效剂量的蛋白激酶 A 抑制剂和药学上可接受的载体。

优选的，所述的药物通过口服、喷雾吸入、注射或经胃肠道进行给药。

蛋白激酶 A 抑制剂在制备促血小板凋亡药物中的用途。

有益效果：本发明研究发现，PKA 位于启动或抑制病理生理条件诱导血小板凋亡的早期调控阶段。PKA 通过磷酸化 Bad 促凋亡蛋白的 155 位点的丝氨酸残基增强与 14-3-3 的结合，从而促进抗凋亡蛋白 Bcl-xL 释放来抑制血小板凋亡。因此，我们研究结果证实，体内外的各种病

理生理学因素皆可以诱导血小板凋亡，而 PKA 处于凋亡调控的上游，通过提高 PKA 活性可以显著地保护储存或病理刺激诱导的血小板凋亡，本发明的技术方案具体可应用于治疗特发性血小板减少性紫癜、糖尿病和细菌感染等血小板数量减少相关疾病，临床应用前景非常广阔，并且本发明的蛋白激酶 A 激活剂可广泛地应用血小板的储存中。

本发明首次通过实验探究了 PKA 在调控血小板凋亡过程中的作用，发现在 ITP，感染和糖尿病病人的血小板中 PKA 活性下降，而且 PKA 通过调控 BAD 155 位点丝氨酸的磷酸化进而调控血小板凋亡。抑制 PKA 活性不仅可以诱导体外血小板凋亡，而且可以降低体内循环血小板的数量，表明 PKA 抑制剂可以参与血小板增多性疾病的治疗过程，减少外周循环血中血小板数量，具有开发成新型治疗血小板增多性疾病药物的潜力，极具科研和经济价值。

附图说明

图 1 为 ITP 患者、糖尿病患者和败血症患者的血小板中磷酸化 GPIIb/IIIa、GPIIb/IIIa 总蛋白以及 PKA 活性测试结果；

图 2 为细菌感染后血小板检测 GPIIb/IIIa 磷酸化蛋白、GPIIb/IIIa 总蛋白和 PKA 活性测试结果；

图 3 为蛋白激酶 A 抑制导致血小板凋亡线粒体跨膜电位去极化的血小板所占的百分比测试结果；

图 4 为蛋白激酶 A 抑制导致血小板凋亡 western blot 检测 caspase-3、gelsolin 蛋白表达和血小板中 caspase-3 活性测定结果；

图 5 为洗涤血小板与不同浓度的 H89 孵育后，蛋白激酶 A 抑制导致血小板凋亡 PS 外翻测试结果；

图 6 为蛋白激酶 A 抑制导致血小板凋亡 FSC-FL1 收集的血小板散点图；

图 7 为不同浓度梯度的蛋白激酶 A 抑制剂 H89 于 22 °C 作用于洗涤血小板 160 分钟后的扫描

电镜结果;

图 8 为 PKA 通过调节 Bad 155 位点丝氨酸磷酸化调控血小板凋亡相关实验结果图;

图 9 为雄性 ICR 小鼠注射 PKA 激动剂 8-Br-cAMP (2.5 mg/mL)后 0- 8 天计数小鼠体内的血小板和网织血小板测定结果;

图 10 为条件性基因敲除小鼠构建过程及相关测试结果;

图 11 为 PKA 敲除小鼠血小板清除比率增加相关结果;

图 12 为线粒体跨膜电位去极化血小板和 PS 阳性血小板所占的百分比相关结果;

图 13 为洗涤血小板与蛋白激酶 A 激活剂药物米力农(8 μ M)、阴性对照、凝血酶孵育后血小板 $\Delta\psi_m$ 结果;

图 14 为洗涤血小板与蛋白激酶 A 激活剂药物氨茶碱(0.48mM)、阴性对照、凝血酶孵育后血小板 $\Delta\psi_m$ 结果;

图 15 为洗涤血小板与蛋白激酶 A 激活剂药物灭菌前列腺素 E₂ 溶液 (10ng/ml)、阴性对照、凝血酶孵育后血小板 $\Delta\psi_m$ 结果;

图 16 为洗涤血小板与蛋白激酶 A 激活剂药物环磷腺苷注射液 (24 μ g/mL)、阴性对照、凝血酶孵育后血小板 $\Delta\psi_m$ 结果;

图 17 为小鼠尾静脉注射蛋白激酶 A 激活剂药物米力农 (1mg/kg) (或 NS) 后不同时间血小板计数结果;

图 18 为小鼠尾静脉注射蛋白激酶 A 激活剂药物 PGE2 (20ng/ml) (或 NS) 后不同时间血小板计数结果;

图 19 为小鼠尾静脉注射蛋白激酶 A 激活剂药物 cAMP (12 μ g/ml) (或 NS) 后不同时间血小板计数结果;

图 20 为小鼠尾静脉注射蛋白激酶 A 激活剂药物氨茶碱 (0.24mmol/L) (或 NS) 后不同时间血小板计数结果。

图 21 为 PKA 抑制引起体内急性血小板减少相关实验结果；

图 22 为洗涤血小板与不同 Fasudil（法舒地尔）或者阴性对照孵育后血小板 $\Delta\psi_m$ 及 PS 外翻测试结果；

图 23 为老鼠采血后对照组和试验组分别注射 DMSO 和 Fasudil（法舒地尔）（ $1.6\mu\text{mol/L}$ ）后在不同时间采血计数测试结果。

具体实施方式

1、试剂与材料：

抗 GpIIb/IIIa 的单克隆抗体 SZ21 由江苏省血液研究所所长阮长耿教授提供，二甲基亚砜（DMSO）、抗 Actin 一抗购自美国 Sigma 公司，EDTA-K2 抗凝管购自美国 BD 公司，异硫氰酸荧光素（Fluorescein Isothiocyanate, FITC）-Annexin V 购自北京嘉美生物科技有限公司，FITC-羊抗鼠抗体购自美国 Bioworld Technology 公司，（Horse Radish Peroxidase, HRP）-羊抗鼠、HRP-羊抗兔、兔和鼠 IgG、抗 BAX、抗 BAK、抗 Bcl-xL、抗 Bcl-2、抗 Caspase-3、抗 BAD 155 磷酸化抗体购自美国 Santa Cruz 生物科技公司，抗 PKA C α 抗体购自美国 CST 公司，N-[2-((p-Bromocinnamyl) amino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H89)、佛司可林（Forsklin）、抗 GAPDH、抗 P53 抗体、JC-1、ECL、PMSF 购自中国碧云天生物科技有限公司，E64 购自美国 Roche 生物科技股份有限公司，A23187 购自美国 Calbiochem 公司。RNA 寡核苷酸由吉玛公司设计合成。脂质体 Lipofectamine™ 2000 和 培养基 Opti-Mem I 购自美国 Invitrogen 生物公司。

2、实验用小鼠：

PKA 基因敲除小鼠（B6;129X1-Prkac^{tm1Gsm}/Mmnc）以 C57BL/6J 为背景，购自美国 MMRRC UNC。全部动物实验均经苏州大学附属第一医院伦理委员会批准。

3、洗涤血小板：

健康成人志愿者自肘正中静脉采血，献血者均知情同意并签署协议书。实验方案经苏州大学附属第一医院伦理委员会批准，符合赫尔辛基宣言。

制备洗涤血小板时，取健康自愿者静脉血与 ACD (2.5 % 柠檬酸钠，2.0 % 葡萄糖，1.5 % 柠檬酸) 按 1: 7 抗凝，1300 rpm 离心 20 min 得到富血小板血浆 (PRP)，将 PRP 以 1500 g 离心 2 min，弃上清。用 CGS 缓冲液 (0.123 M 氯化钠，0.033 M 葡萄糖，0.013 M 柠檬酸钠，pH 6.5) 悬浮并离心、洗涤沉淀的血小板，再用修改的 Tyrode's 缓冲液 (2.5 mM 两性离子缓冲液 Hepes，150 mM 氯化钠，2.5 mM 氯化钾，1 mM 氯化钙，1 mM 氯化镁，12 mM 碳酸氢钠，5.5 mM 葡萄糖，pH 7.4) 重悬血小板，得到洗涤血小板悬液，用计数仪对血小板进行计数，调整血小板悬液至浓度为 3×10^8 /mL，室温静置 60 min。

4、电镜：

洗涤血小板以 2.5%戊二醛于 4℃固定过夜。送扫描电镜样品室制样。扫描电镜（日本日立公司，S-4700）对血小板进行形貌分析。各选择 5 个不同视野进行观察并拍照。

5、全身照射及骨髓移植：

雄性 WT 小鼠（6 周龄）接受 Co^{60} 来源的 9.5 Gy 剂量的全身照射。收集来自 PKA 基因杂合子孕鼠（怀孕 15 天左右）胎儿肝细胞，并按照 1 胎鼠肝细胞对应一只辐照雄鼠比例给予注射（接受照射后 6h 内完成），放入 IVC 专用动物房，给予酸化水、 Co^{60} 辐照饲料及垫料，每日观察生存情况；4 周后存活小鼠测定全血细胞计数，若恢复正常即可用于下一步实验。移植是否成功通过 Western Blotting 检测受体小鼠血小板中 PKA 蛋白的表达来确定。

6、线粒体膜电位 ($\Delta\psi\text{m}$) 检测

洗涤血小板 (3×10^8 /mL) 与不同浓度 H89 (12.5 μM ，25 μM ，37.5 μM 和 50 μM)或者阴性对照 (DMSO) 室温 10 min，之后血小板 $\Delta\psi\text{m}$ 使用亲脂性阳离子染料 JC-1 测定。终浓度为 2 $\mu\text{g/ml}$ 的 JC-1 加入处理后的血小板中，37 °C 避光孵育 20 min，流式细胞仪检测。红色荧光表示线粒体膜电位依赖性的 JC-1 聚合物，绿色荧光表示线粒体膜电位去极化之后未结合膜电位

的 JC-1 单体。JC-1 单体 (λ_{ex} 514 nm, λ_{em} 529 nm) 以及聚合物 (λ_{ex} 585 nm, λ_{em} 590 nm) 通过计算流式红色荧光 (JC-1 聚合物) 或者绿色荧光 (JC-1 单体) 比例来测定。

7、PS 外翻

洗涤血小板与不同浓度的 H89 (12.5 μM , 25 μM , 37.5 μM 和 50 μM) 或者阴性对照 (DMSO) 于室温孵育 10 min。之后将 Annexin V 缓冲液、H89 处理后的血小板、Annexin V-FITC 按照 50: 10: 1 的比例室温下避光孵育 15 min, 流式细胞仪检测。

8、血小板皱缩实验

洗涤血小板与不同浓度的 H89 (12.5 μM , 25 μM , 37.5 μM 和 50 μM) 或者阴性对照 (DMSO) 于室温孵育 10 min。然后将血小板与 SZ21 抗体室温共孵育 30 min。离心, 用含有 FITC 标记的羊抗鼠抗体重悬血小板, 室温避光孵育 30 min。流式细胞仪收集血小板, FSC-FL1 收集的血小板散点图用于分析血小板。血小板的皱缩通过分析 FSC 的变化, 评价 GPIIb/IIIa 阳性细胞的 FSC 降低程度来评价皱缩程度。A23187 作为阳性对照。DMSO 作为阴性对照。

9、Western Blotting:

洗涤血小板与不同浓度的 H89 (25 μM , 50 μM , 100 μM) 或者阴性对照 (DMSO) 于室温孵育 10 min。加入 2X 细胞裂解液 (含 2 mM PMSF、2 mM NaF、2 mM Na_3VO_4 以及蛋白酶抑制剂) 终止反应, 冰上裂解, 制样。样本以免疫印迹法检测相应蛋白的表达。

10、RNA 干扰实验

靶目标 PRKACA 的双链 siRNA 寡核苷酸 (正义: 5-GCUCCCUUCAUACCAAAGUTT-3, 反义: 5-ACUUUGGUAUGAAGGGAGCTT-3) 和 阴性对照 siRNA (正义: 5-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3, 反义: 5-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3) 由吉玛公司设计并合成。

Hela 细胞转染时, 转染前一天, 将 2×10^5 个 hela 细胞接种于培养板中, 每孔中加入约 500 μL 无抗生素的培养基, 使转染时的细胞密度能够达到 30~50%; 取 1 μL /孔 Lipofectamine 2000

(使用前轻轻摇匀), 用 50 μ L Opti-MEM I 低血清培养基稀释。轻轻混和后在室温孵育 5 min; 取 2 μ L FAM-siRNA, 用 50 μ L Opti-MEM I 低血清培养基稀释, 轻轻混和均匀; 稀释的 Lipofectamine 2000 经过 5 min 的孵育后, 与稀释 FAM-siRNA 轻轻混和, 室温静置 20 min; 将 FAM-siRNA-转染试剂混和液加入含有细胞及培养液 (约含 400 μ L) 的孔中, 轻轻摇晃孔板, 使混和。

血小板转染实验时, 无菌准备洗涤血小板 6×10^8 /mL, 静置后。将 100 μ L siRNA 寡核苷酸加入 100 μ L 无血清 M199 培养基悬浮的血小板中。

在 37 $^{\circ}$ C 的 CO₂ 培养箱中培养, 6 小时后可将培养基换为含血清的完全培养基培养 48 h; 转染 6 小时后即可通过流式细胞仪检测转染效率。培养结束时, 收集并裂解 hela 细胞和血小板。样品通过蛋白质印迹方法检测 PKA C α 的表达程度, Actin 用于内参检测。

11、统计学分析:

全部数据均来源于至少 3 次相互独立的实验, 数据以均数 $\pm$ 标准误表示, 应用 Prism Version 5.0 对数据进行统计学分析, 对数据进行非配对 T 检验, $p < 0.05$ 作为差异性显著界值。

12、实验结果:

(1) 败血症、糖尿病或 ITP 病人血浆孵育过或细菌感染的血小板均会出现 PKA 活性下降现象

血小板减少症经常发生在一些高发病率疾病中, 如糖尿病, ITP、败血症或细菌感染等等。我们研究了 PKA 在这些出现血小板减少症疾病中的作用。离心收集 ITP 患者、糖尿病患者和败血症患者的血小板, 并以相应年龄、性别的健康人群血小板作对照, 将血小板用 MTB 重悬后, 调整浓度为 3×10^8 /mL, 血小板裂解后的总蛋白用于检测磷酸化 GPIIb β 、GPIIb β 总蛋白以及 PKA 活性, 与对照组相比 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。将 MTB 稀释的洗涤血小板 1×10^7 /mL 与相应的细菌 (用 MTB 缓冲液 1:20 稀释) 37 $^{\circ}$ C 共培养 90 分钟, 同时设无细菌培养组做阴性对照, 检测 GPIIb β 磷酸化蛋白、GPIIb β 总蛋白和 PKA 活性, 结果来自不同血小板捐献者四次独

立实验，结果见图 1 和图 2，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

我们可以发现，我们发现健康人的血小板与糖尿病或 ITP 患者血浆孵育后，会诱导正常血小板凋亡，同时，PKA 活性明显减少。最新的证据表明，脓毒症患者中分离的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌可以体外诱导血小板凋亡(Kraemer 等，2012)。我们研究发现，大肠杆菌和葡萄球菌不仅可以诱导血小板凋亡，而且可以明显减少 PKA 活性。总之，这些结果表明，ITP、败血症及糖尿病病人或细菌感染可以诱发血小板凋亡，同时 PKA 活性发生下降。

(2) 抑制 PKA 活性诱导血小板发生内途径依赖的细胞凋亡

分别以不同浓度的 H89 (0、12.5、25、37.5 和 50 μM) 于 22 $^{\circ}\text{C}$ 作用于洗涤血小板 160 分钟，流式细胞仪检测血小板的线粒体跨膜电位去极化和 PS 暴露。实验结果重复四次。结果如图 3 至图 7 所示。将洗涤血小板用不同浓度梯度的 H89 在 22 $^{\circ}\text{C}$ 预处理 30 分钟，同时设立 DMSO 和 A23187 处理的阴性对照组和阳性对照组血小板，western blot 检测 caspase-3、gelsolin 蛋白表达和血小板中 caspase-3 活性。将 FITC 标记的抗 CD41 抗体与预处理的血小板以 1:10 的比例混匀，常温下避光孵育 10 分钟，分析血小板大小散点图 CD41 阳性数量下降表示血小板数量减少。不同浓度梯度的 H89 于 22 $^{\circ}\text{C}$ 作用于洗涤血小板 160 分钟，同时设立 DMSO 阴性对照组血小板。血小板经 1%戊二醛固定 30 分钟后，扫描电镜成像观察结果，实验结果来自三次独立实验，标尺=1 μm 。结果用均数 $\pm$ 标准差表示，与对照组相比* $P < 0.05$ ，结果重复三次以上。

接下来我们探讨了 PKA 在调控血小板凋亡中的作用。将血小板与 PKA 抑制剂 H89 共孵育，流式细胞仪检测血小板内 JC-1 染料标记变化，发现 H89 剂量依赖性诱导血小板发现线粒体膜电位 ($\Delta\Psi\text{m}$) 去极化。而且，H89 也可以时间依赖的诱导血小板发生 $\Delta\Psi\text{m}$ 去极化。 $\Delta\Psi\text{m}$ 去极化位于 caspase-3 信号通路上游，而 caspase-3 是半胱天冬酶家族刽子手之一，可导致细胞的解体和崩溃。我们研究发现，H89 剂量依赖性的方式诱导 caspase-3 的活化和 caspase-3 底物 gelsolin 的酶切。磷脂酰丝氨酸 (PS) 外翻是内途径依赖细胞凋亡的另一个明显标记分

子, 我们研究发现, H89 可以剂量依赖性诱导血小板表面 PS 外翻。

在凋亡过程中, 线粒体功能障碍引发生物能量学破坏, 最终引起质膜完整性破坏并导致形态学改变。实验结果显示 H89 可诱导 GPIIb/IIIa 阳性的血小板, 出现向前散射 (FSC) 减少现象, 表明抑制 PKA 活性后血小板形态上发生收缩。此外, H89 剂量依赖的诱导的血小板出现典型的凋亡形态学改变, 包括细胞膜囊泡, 伪足, 皱缩, 脱颗粒现象等。总之, 这些结果表明, PKA 抑制可以诱导血小板发生的内途径依赖的细胞凋亡。

(3) PKA 通过调节 BAD 155 位点磷酸化调控血小板凋亡

接下来我们进一步探索了 PKA 抑制诱导血小板凋亡的机制。常温下, 3×10^8 /mL 的洗涤血小板与不同浓度梯度的 H89 或 DMSO 内参共孵育 160 分钟, 用等体积裂解液冰上裂解 30 分钟, 产物经 SDS-PAGE 电泳分离得到不同大小的蛋白片段, 脱脂奶粉封闭一小时后加入一抗孵育, 最终 ECL 发光显示目的蛋白条带(图 8a)。洗涤血小板分别用 37.5 uM 的 H89、10 uM 的 forskin 以及 DMSO 内参常温下预处理 160 分钟, 分别提取血小板的胞浆蛋白和线粒体蛋白, western blot 检测目的蛋白, Image J 软件分析目的蛋白的量, 统计四次实验以均数 $\pm$ 标准差显示结果(图 8b)。预处理的血小板裂解后, 17,000 g 4°C 离心 10 分钟, 将得到的上清与相应抗体孵育沉淀过夜, 与 protein A/G + 琼脂糖珠 4°C 孵育 2 小时后, 将珠子洗脱后用于蛋白杂交(图 8c), 统计分析四次实验以均数 $\pm$ 标准差显示结果, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

结果发现, PKA 抑制剂量依赖减少血小板 GPIIb β 166 位点丝氨酸的磷酸化程度, 进而证明降低 PKA 活性。然而, 我们研究发现, 凋亡血小板中凋亡执行蛋白 BAK、BAX 和抗凋亡蛋白 Bcl-2、Bcl-xL 的表达量, 均未出现明显的变化。有报道显示, 在 S49 淋巴瘤细胞中, PKA 通过调控增加 Bim 的表达, 使肿瘤细胞避免发生凋亡现象。而我们研究发现, 在 PKA 参与调控的血小板凋亡过程中, Bim 蛋白水平未出现明显变化, 排除了 Bim 的调控作用。

有报道证明, PKA 抑制可以促进 P53 的表达, 而且糖尿病患者血小板中磷酸化的 P53 可以直接诱导抗凋亡蛋白 Bcl-xL 的失活, 进而促使血小板发生凋亡。然而, 在 PKA 参与的血小板

凋亡中, P53 或磷酸化的 P53 均未检测出变化。

在有核细胞中, PKA 通过调节 BAD 155 位点丝氨酸的磷酸化, 并调控 14-3-3 蛋白与抗凋亡蛋白 Bcl-xL 的绑定, 进而调控细胞凋亡。在 BAD 155 位点去磷酸化的条件下, BAD 与 Bcl-xL 形成二聚体, 释放凋亡执行者 BAK 和 BAX, 进而导致线粒体膜渗透性增强, 发生细胞凋亡。我们发现 BAD 155 位点丝氨酸在 PKA 抑制诱导的血小板中出现磷酸化程度减少的现象。而且, H89 减少、佛司可林增强 BAD 155 位点丝氨酸的磷酸化, 进而影响线粒体膜上 Bcl-xL 蛋白的减少和增加。最重要的是, 免疫共沉淀结果显示 H89 或佛司可林刺激下, Bcl-xL 与 BAD 明显减少或增强, 提示 H89 或佛司可林通过调控 BAD 与 Bcl-xL 的相互作用调控抗凋亡蛋白 Bcl-xL 的活性。因此, 这些数据表明 PKA 通过调控 BAD 155 位点丝氨酸磷酸化调控血小板的凋亡。

(4) PKA 激活剂提高循环血小板数量

另一方面, PKA 活化可以促进 BAD 155 丝氨酸位点磷酸化水平, 进而阻止细胞凋亡的发生。因此, PKA 活化剂可能阻止衰老的血小板凋亡, 并且延长了血小板的寿命。为了验证这一假设, 我们将雄性 ICR 小鼠每 24 小时经尾静脉注射 PKA 激动剂 8-Br-cAMP (2.5 mg/mL), 同时设立 PBS 组做为阴性对照, 8 天后计数小鼠体内的血小板和网织血小板, 实验组和对照组分别设立 5-6 只小鼠 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (图 9)。

结果发现, 血小板计数逐天增加, 在第 8 天达到峰值。相应的网织血小板逐天减少, 表明血小板的增加不是血小板产生增多的结果(图 9)。而且, JC-1 标记血小板没有明显的变化。这些数据表明, PKA 活性增加保护血小板不发生凋亡现象, 并且可以延长体内血小板的寿命。

(6) PKA 敲除小鼠血小板清除比率增加

首先是条件性基因敲除小鼠构建 (图 10a)。Western blot 检测血小板中 PKA、Bad、GPIIb β 、磷酸化 Bad Ser-155 和磷酸化 GPIIb β Ser-166 的表达, 每实验组至少设 5 只小鼠 (图 10b)。

Sysmex XP-100 血液分析仪计数血小板, 结果统计分析了 7 只 WT 小鼠、7 只 PKA $^{+/-}$ 小鼠

和 5 PKA^{-/-} 小鼠 (图 10c)。全血用噻唑橙 (0.5 μ g/mL) 和抗 CD41 (20 μ g/mL) 抗体标记后, 在室温下孵育 15 min, 流式细胞仪检测网织血小板的数量。数据来自于 7 只 WT 小鼠、7 只 PKA^{+/-} 小鼠和 5 PKA^{-/-} 小鼠 (图 10d)。抗血小板抗体 R300 (0.15 μ g/kg) 经腹腔注射入 WT 和 PKA^{+/-} 小鼠体内, 眼眶采血收集全血, Sysmex XP-100 血液分析仪计数血小板数量, 结果分别统计分析了 6 只 WT 和 6 只 PKA^{+/-} 小鼠 (图 10e)。洗涤血小板与 JC-1 (2 μ g/mL) 避光孵育 10 分钟, 流式细胞仪检测线粒体跨膜电位去极化水平 (图 11f)。FITC 标记的抗 CD41 抗体与血小板以 1:10 的比例混合, 轻轻混匀后室温孵育 10 分钟 (图 11g)。分析血小板大小散点图, CD41 阳性细胞数量下降代表血小板数量减少。1%戊二醛固定洗涤血小板 30 分钟后, 扫描电镜成像观察结果, 标尺=2 μ m (图 11h)。*P<0.05, **P<0.01, 实验结果来自三次独立实验, 该图代表了每个基因型的至少五只小鼠。

大多数 PKA C α 基因敲除小鼠在围产期就会死亡, 因此我们建立了 PKA C α 基因敲除小鼠胎儿的肝脏细胞移植给辐照过野生小鼠的骨髓移植方法。移植的胎鼠胎肝基因型通过 PCR 检测鉴定。小鼠移植 4 个月后得到稳定的移植结果, 移植后带有 PKA 缺陷的血小板通过蛋白质印迹验证。在红细胞, 白细胞计数和血红蛋白浓度上, 移植的 PKA^{-/-}, PKA^{+/-}, 和 WT 老鼠没有显著的差异。而 PKA^{+/-}与 WT 老鼠相比, 血小板的数量明显减少。PKA^{+/-}与 WT 的网状血小板比较没有差异, 这表明血小板数量的减少并不是由于血小板产生减少, 而是由于血小板清除的加速。而且, 我们发现注射抗血小板抗体 R300, 可诱导血小板发生凋亡, 同时可迅速诱导 PKA^{+/-}比 WT 更快的血小板清除。有趣的是, PKA^{-/-}小鼠血小板明显减少, 且 PKA^{-/-}小鼠的血小板呈现典型的凋亡变化。

为了避免骨髓移植对 PKA C α 基因敲除小鼠存在可能的干扰, 我们构造 PKA C α 条件敲除小鼠, 这个小鼠与 PF4 Cre 老鼠共繁殖可得到血小板内 PKA 条件敲除的小鼠。条件敲除的 C-PKA^{-/-}, C-PKA^{+/-}, 和 C-PKA^{+/+}老鼠在红细胞, 白细胞计数、血红蛋白浓度变化上没有显著的差异。而且 PKA^{+/-}和 RIP3^{-/-}老鼠相比, 没有任何自发出血或血栓倾向。杂合子和纯合子小

鼠 PKA 活性呈现剂量依赖性变化。在循环血小板数量上，不同类型的老鼠无明显异常。然而，PKA 敲除小鼠的 PS 外翻明显升高。在体内追踪生物素标记的血小板发现，PKA 敲除可以剂量依赖性的降低血小板寿命。为了确认血小板寿命的缩短来自血小板内在因素，我们将 PKA 敲除小鼠的血小板移植到野生型小鼠体内。PKA^{-/-}，PKA^{+/-}小鼠血小板明显表现出比 WT 小鼠血小板缩短的寿命。

(7) PKA 敲除小鼠体内出现 BAD 磷酸化减少现象

然后我们探讨了 PKA 敲除小鼠血小板凋亡的机制。和我们之前在人类血小板体外实验的结果一致，杂合子和纯合子小鼠中 P53 的表达剂量梯度性升高，而 PKA 催化亚基表达和 PKA 活性明显减少。而且，PKA 敲除小鼠血小板 BAD 155 位点丝氨酸磷酸化降低。然而，PKA C α 敲除血小板与野生型血小板相比，BAK，BAD，BAX，Bcl-xL 无明显变化。总之，这些小鼠结果验证了我们在人类血小板的发现，证明 PKA 的抑制导致 BAD 155 位点丝氨酸磷酸化介导的血小板凋亡发生。

(8) 提高 PKA 活性保护血小板不发生病理条件诱发的细胞凋亡和清除

洗涤血小板分别用 5 μ M forskin 和 DMSO 22 °C 预处理 5 分钟，然后与 ITP 患者血清室温下共培养 12 小时，同时设立健康成年人血清作对照，流式细胞仪检测线粒体跨膜电位去极化血小板(图 12d)和 PS 阳性血小板(图 12e)所占的百分比。ICR 小鼠静脉注射单剂量 8-Br-cAMP (0.0625、1.25、2.5mg/kg) 以及内参，再经腹腔注射 Fc 抑制剂去除 Fc 段介导的血小板清除，10 分钟后，抗血小板抗体 R300 (0.2 μ g/kg) 经腹腔注射进入小鼠体内，于不同时间点眼眶静脉采集小鼠全血，Sysmex XP-100 血液分析仪计数血小板数量，每组设 6 只小鼠，结果用均数 $\pm$ 标准差表示 (图 12f)。洗涤血小板分别用 5 μ M forskin 和 DMSO 22 °C 预处理 5 分钟，然后与金黄色葡萄球菌悬液室温下共培养 90min，同时设阴性无金黄色葡萄球菌液体处理的阴性对照组血小板，流式细胞仪检测线粒体跨膜电位去极化血小板(图 12g)和 PS 阳性血小板(图 12h) 所占的百分比。实验重复三次以上，结果以均数 $\pm$ 标准差表示。洗涤血小板分别用

5 μ M forskin 和 DMSO 22 °C 预处理 5 分钟, 然后与糖尿病患者的血清室温下共培养 12 小时, 同时设立健康成年人血清作对照, 流式细胞仪检测线粒体跨膜电位去极化血小板(图 12d)和 PS 阳性血小板(图 12e)所占的百分比。

血小板凋亡似乎是储存血小板发生功能紊乱并被快速清除的主要原因。为了探明 PKA 在血小板储存损伤的作用, 在血小板储存时加入 PKA 激活剂或抑制剂。正如所料, PKA 抑制剂最先引发血小板凋亡。有趣的是, PKA 激活剂 Forskolin 明显推迟血小板凋亡的发生。众所周知, 线粒体膜电位去极化调控的内在程序性凋亡是一个不可逆转的过程。这些数据不仅进一步验证 PKA 调节血小板凋亡的作用, 而且也表明 PKA 位于线粒体去极化调节细胞凋亡的上游。

除了细胞凋亡, 还有其他储存损伤变化, 导致储存血小板在体内的清除。因此, 我们研究了是否 PKA 激活保护血小板凋亡的同时, 可防止储存血小板被清除。结果发现, Forskolin 明显可保护储存血小板, 抑制其被体内清除, 另一方面, H89 加速了清除的速度。这些数据表明, PKA 调控的细胞凋亡在血小板储存损伤中发挥关键作用, 并提示了一种有效延长血库储存血小板的新方法。

ITP、特别是难治性 ITP 患者体内的自身抗体会诱导血小板凋亡, 引发血小板破坏。与先前的报道相一致, 我们研究发现 ITP 患者抗血小板血清明显诱导血小板发生凋亡。然而, Forskolin 预孵育后的血小板显著降低了血清诱导的血小板凋亡的发生。为了明确 PKA 活化剂在血小板体内清除中的作用, 我们用抗血小板单克隆混合抗体 R300 建立了一个 ITP 小鼠模型。R300 体外与血小板共孵育会诱导血小板凋亡。Fc 受体封闭剂注射入小鼠体内可以封闭 Fc-依赖的血小板破坏。PKA 激活剂可以剂量依赖性抑制抗血小板抗体诱导的血小板清除现象。这些结果, 不仅证实 PKA 在保护抗体诱导血小板凋亡和清除中的作用, 而且提示了治疗 ITP 的新策略。

然后我们发现, PKA 激活有效防止脓毒症患者体内的金黄色葡萄球菌分离株和糖尿病病人血

浆与血小板孵化后诱发的细胞凋亡。总之这些数据表明，PKA 是血小板凋亡的早期监管调控蛋白，而且最重要的是，此研究结果对不同的病理生理刺激诱发的血小板减少症的治疗，和控制体内血小板的寿命具有重要的意义。

(9) 同类型药物抑制血小板凋亡实验及结果

线粒体膜电位检测：

洗涤血小板(3×10^8 /mL)与不同 PKA 激动剂(氨茶碱 0.48mM,灭菌前列腺素 E₂ 溶液 10ng/ml, 米力农 8 μ M, 环磷腺苷注射液 24 μ g/mL) 或者阴性对照 (生理盐水) 室温 10 min, 之后除阴性对照外每组加入凝血酶 0.1U/ml, 37 °C 孵育 30min。血小板 $\Delta\psi_m$ 使用亲脂性阳离子染料 JC-1 测定。终浓度为 2 μ g/ml 的 JC-1 加入处理后的血小板中, 37 °C 避光孵育 5 min, 流式细胞仪检测。红色荧光表示线粒体膜电位依赖性的 JC-1 聚合物, 绿色荧光表示线粒体膜电位去极化之后未结合膜电位的 JC-1 单体。JC-1 单体 (λ_{ex} 514 nm, λ_{em} 529 nm) 以及聚合物 (λ_{ex} 585 nm, λ_{em} 590 nm) 通过计算流式红色荧光 (JC-1 聚合物) 或者绿色荧光 (JC-1 单体) 比例来测定 (图 13 至图 16)。

PS 外翻：

洗涤血小板(3×10^8 /mL)与不同 PKA 激动剂(氨茶碱 0.48mM,灭菌前列腺素 E₂ 溶液 10ng/ml, 米力农 8 μ M, 环磷腺苷注射液 24 μ g/ml) 或者阴性对照 (生理盐水) 室温 10 min, 之后除阴性对照外每组加入凝血酶 0.1U/ml, 37 °C 孵育 30min。之后将 Annexin V 缓冲液、处理后的血小板、Annexin V-FITC 按照 50: 10: 1 的比例室温下避光孵育 15 min, 流式细胞仪检测 (图 13 至图 16)。

米力农能够抑制血小板体内清除

ICR 小鼠 12 只, 每组各 6 只。实验组米力农 1mg/kg 6 只, 对照组生理盐水 (NS) 6 只。小鼠尾静脉注射米力农 1mg/kg 10min (或 NS) 后, 小鼠腹腔注射 0.1mg/kg R300 抗体。然后分别在各时间点采血计数。从结果上, 我们可以看出, 1mg/kg 米力农明显提升小鼠外周血血小

板计数（图 17）。

PGE2 能够抑制血小板体内清除

首先给予老鼠采血，作为基准值，然后对照组和试验组分别注射 0.9%NS 和 PGE2 (20ng/ml)，10min 后注射 R300(0.1μg/g)，然后在 30min, 2h, 4h, 6h, 24h 时间点采血计数。在 30min 时，NS 组和 PGE2 组的血小板计数 $P < 0.05$ ，有统计学差异（图 18）。

cAMP 能够抑制血小板体内清除

首先给予老鼠采血，作为基准值，然后对照组和试验组分别注射 0.9%NS 和 cAMP (12μg/ml)，10min 后注射 R300(0.1μg/g)，然后在 30min, 2h, 4h, 6h, 24h 时间点采血计数。在 30min 时，NS 组和 cAMP 组的血小板计数 $P < 0.05$ ，有统计学差异（图 19）。

氨茶碱能够抑制血小板体内清除

首先给予老鼠采血，作为基准值，然后对照组和试验组分别注射 0.9%NS 和 Aminophylline(氨茶碱)(0.24mmol/L)，10min 后注射 R300(0.1μg/g)，然后在 30min, 2h, 4h, 6h, 24h 时间点采血计数（图 20）。

(10) PKA 抑制引起体内急性血小板减少

接下来我们进一步探讨了 PKA 在体内血小板寿命中的作用。雄性 ICR 小鼠经尾静脉注射单剂量的 Rp-cAMPS (50 mg/kg)，检测不同时间点小鼠体内血小板和网织血小板的数量。雄性 ICR 小鼠腹腔注射单剂量的抗血小板抗体 R300, 0.15 mg/kg，清除血小板能够引起严重的血小板减少症，网织血小板数量增加将新合成的血小板释放到外周循环中，大约 3 天后，体内血小板数量恢复正常。雄性 ICR 小鼠腹腔注射单剂量的抗血小板抗体 R300, 0.15 mg/kg，两天和 7 天后尾静脉注射 Rp-cAMPS (50 mg/kg)，分别计数 Rp-cAMPS 注射前和注射 8 小时后的血小板和网织血小板。雄性 ICR 小鼠每 24 小时经尾静脉注射 PKA 激动剂 8-Br-cAMP (2.5 mg/mL)，同时设立 PBS 组做为阴性对照，8 天后计数小鼠体内的血小板和网织血小板，实验组和对照

组分别设立 5-6 只小鼠 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (图 21)。

将 PKA 抑制剂反相-环磷腺苷 (Rp-cAM7PS) (非试剂对照) 通过尾静脉注射到 ICR 小鼠体内。结果发现, 2 小时检测, 血小板计数下降了正常血小板计数的 30%。8 小时检测, 血小板计数下降至最低值。而且, Rp-cAMPS 注射后的血小板出现 $\Delta\Psi_m$ 去极化现象, 表明血小板发生凋亡。

衰老或储存血小板会出现细胞凋亡, 而且 PKA 活性相应的下降。与这些结果一致, 我们发现, Rp-cAMPS 注射小鼠诱发体内血小板计数减少的同时, 促进了网织血小板数量的增加, 提示年轻血小板对 Rp-cAMPS 诱发的细胞凋亡有抵抗作用, 同时也提示, 在体内 PKA 抑制剂更容易诱导衰老的血小板发生凋亡。为了验证这个可能性, 我们将抗血小板单克隆混合抗体 R300, 腹腔内注射方式打入小鼠体内, 促进小鼠体内血小板清除, 人为同步血小板产生速率。正如预期结果一样, 注射后 6 小时小鼠体内检测不到循环的血小板, 血小板数量在 7 天内恢复正常。在此期间, 网织血小板的比例变化显著。注射 Rp-cAMPS 会破坏 R300 抗体注射过 7 天后小鼠体内 70% 的循环血小板, 然而只有 30% 的血小板在第二天被破坏。这些结果证实, 衰老的血小板更容易受到 PKA 抑制剂刺激, 进而诱发血小板凋亡和清除。而且, 降低血小板的 PKA 活性会缩短循环血小板寿命。

(11) 法舒地尔能够促进血小板的凋亡

线粒体膜电位检测:

洗涤血小板 (3×10^8 /mL) 与不同 Fasudil (法舒地尔) 或者阴性对照 (生理盐水) 室温 10 min, 之后除阴性对照外每组加入凝血酶 0.1U/ml, 37 °C 孵育 30min。血小板 $\Delta\Psi_m$ 使用亲脂性阳离子染料 JC-1 测定。终浓度为 2 $\mu\text{g/ml}$ 的 JC-1 加入处理后的血小板中, 37 °C 避光孵育 5 min, 流式细胞仪检测。红色荧光表示线粒体膜电位依赖性的 JC-1 聚合物, 绿色荧光表示线粒体膜电位去极化之后未结合膜电位的 JC-1 单体。JC-1 单体 (λ_{ex} 514 nm, λ_{em} 529 nm) 以及聚合物 (λ_{ex} 585 nm, λ_{em} 590 nm) 通过计算流式红色荧光 (JC-1 聚合物) 或者绿色荧光 (JC-1

单体)比例来测定(图22)。

PS 外翻:

洗涤血小板(3×10^8 /mL)与不同 Fasudil(法舒地尔)或者阴性对照(生理盐水)室温 10 min, 之后除阴性对照外每组加入凝血酶 0.1U/ml, 37 °C 孵育 30min。之后将 Annexin V 缓冲液、处理后的血小板、Annexin V-FITC 按照 50: 10: 1 的比例室温下避光孵育 15 min, 流式细胞仪检测(图22)。

首先给予老鼠采血,作为基准值,然后对照组和试验组分别注射 DMSO 和 Fasudil(法舒地尔)($1.6\mu\text{mol/L}$),然后在 30min, 2h, 4h, 6h, 24h 时间点采血计数(图23)。

总之,这些结果表明 PKA 通过调控凋亡决定血小板的寿命和生存,PKA 抑制剂可以参与血小板增多性疾病的治疗过程,减少外周循环血中血小板数量,我们的研究为血小板增多症的临床治疗提供了新的思路,抑制 PKA 活性有可能成为临床治疗血小板增多症的新手段,PKA 抑制剂具有开发成新型治疗血小板增多性疾病药物的潜力,极具科研和经济价值。

权利要求书

1. 蛋白激酶 A 激活剂在制备治疗血小板数量减少相关疾病药物中的用途。
2. 根据权利要求 1 所述的蛋白激酶 A 激活剂在制备治疗血小板数量减少相关疾病药物中的用途，其特征在于，所述的蛋白激酶 A 激活剂为无机物激活剂、有机物激活剂中的一种或几种。
3. 根据权利要求 2 所述的蛋白激酶 A 激活剂在制备治疗血小板数量减少相关疾病药物中的用途，其特征在于，所述的无机物激活剂为氢化物、氧化物、酸、碱、盐中的一种或几种。
4. 根据权利要求 2 所述的蛋白激酶 A 激活剂在制备治疗血小板数量减少相关疾病药物中的用途，其特征在于，所述的有机物激活剂为烃类、烃的衍生物、糖类、蛋白质、脂肪、核酸、合成高分子材料中的一种或几种。
5. 根据权利要求 4 所述的蛋白激酶 A 激活剂在制备治疗血小板数量减少相关疾病药物中的用途，其特征在于，所述的烃类为烯烃、烷烃、炔烃、芳香烃中的一种或几种；所述的烃的衍生物为卤代烃、醇、酚、醛、酸、酯中的一种或几种；所述的糖类为单糖、二糖、低聚糖、多糖中的一种或几种；所述的蛋白质为氨基酸、多肽中的一种或几种；所述的核酸为脱氧核糖核酸、核糖核酸中的一种或几种。
6. 根据权利要求 1 所述的蛋白激酶 A 激活剂在制备治疗血小板数量减少相关疾病药物中的用途，其特征在于，所述的蛋白激酶 A 激活剂为磷酸二酯酶抑制剂、腺苷酸环化酶激动剂、环磷腺苷中的一种或几种。
7. 根据权利要求 1 所述的蛋白激酶 A 激活剂在制备治疗血小板数量减少相关疾病药物中的用途，其特征在于，所述的蛋白激酶 A 激活剂为药物氨力农、米力农、依诺昔酮、氨茶碱、地诺前列酮、伊洛前列素、西洛他唑、西洛酰胺、双嘧达莫中的一种或几种。
8. 根据权利要求 1 所述的蛋白激酶 A 激活剂在制备治疗血小板数量减少相关疾病药物中的用途，其特征在于，所述的蛋白激酶 A 激活剂为银杏叶提取物、槲皮素、环磷腺苷葡胺、环磷腺苷、佛司可林、8-溴腺苷-3', 5'-环单磷酸、8-溴代-环磷腺苷、8-哌啶基腺苷-环磷腺苷、8-氯代-环磷腺苷、腺苷酸 3,5-环单磷酸盐、N6-苯甲酰基-环磷腺苷、(S)-腺苷酸、环 3', 5'-(氢硫代磷酸酯) 三乙基、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、8-氯苯-环磷腺苷、腺苷酸 3,5-环单磷酸盐、腺苷酸 3,5-环单硫代磷酸酯、8-溴代-环磷腺苷、特异性 5,6-4,5-二氨基咪

唑-环磷铂苷、特异性 8-氯苯-环鸟苷酸钠、特异性腺苷酸 3', 5'-环单硫代磷酸酯三乙基盐、特异性环磷腺苷、联丁酰基-环磷腺苷、N6-单酰腺苷 3', 5'-环单磷酸盐、8-溴代腺苷酸 3', 5'-环单磷酸硫酸酯、8-溴代腺苷酸 3', 5'-环单磷酸盐、N6-苯甲酰基-环磷腺苷、赤-9-氨基- β -己基- α -甲基-9H-嘌呤-9-盐酸乙醇-9-腺嘌呤盐酸中的一种或几种。

9. 根据权利要求 1 至 8 任一所述的蛋白激酶 A 激活剂在制备治疗血小板数量减少相关疾病药物中的用途，其特征在于，所述的血小板数量减少相关疾病包括免疫性血小板减少症、感染所致血小板减少疾病、继发性血小板减少疾病、药物引起的血小板减少疾病、血小板生成缺乏疾病或非免疫性血小板减少疾病。

10. 根据权利要求 9 所述的蛋白激酶 A 激活剂在制备治疗血小板数量减少相关疾病药物中的用途，其特征在于，所述的免疫性血小板减少症包括特发性血小板减少性紫癜。

11. 根据权利要求 9 所述的蛋白激酶 A 激活剂在制备治疗血小板数量减少相关疾病药物中的用途，其特征在于，所述的感染所致血小板减少疾病包括细菌感染血小板减少疾病或病毒感染血小板减少疾病。

12. 根据权利要求 9 所述的蛋白激酶 A 激活剂在制备治疗血小板数量减少相关疾病药物中的用途，其特征在于，所述的继发性血小板减少相关疾病包括糖尿病病人体内的血小板减少疾病、肿瘤病人体内的血小板减少疾病、心脑血管疾病病人体内的血小板减少疾病、药物治疗过程中导致的血小板减少疾病、脾功能亢进疾病、妊娠过程中血小板减少疾病、继发于再生障碍性贫血的血小板减少疾病、继发于脾功能亢进的血小板减少疾病、继发于白血病的血小板减少疾病、继发于系统性红斑狼疮的血小板减少疾病、继发于干燥综合症的血小板减少疾病或继发于电离辐射的血小板减少疾病。

13. 根据权利要求 9 所述的蛋白激酶 A 激活剂在制备治疗血小板数量减少相关疾病药物中的用途，其特征在于，所述的药物引起的血小板减少疾病中，该药物为抗肿瘤药物、奎宁、奎尼丁、肝素、抗生素、抗惊厥药物中的一种或几种。

14. 根据权利要求 9 所述的蛋白激酶 A 激活剂在制备治疗血小板数量减少相关疾病药物中的用途，其特征在于，所述的血小板生成缺陷疾病包括先天性血小板生成不良、无巨核细胞性血小板减少、范可尼综合征、血小板膜糖蛋白 Ib-IX 缺乏或功能异常引起的伯纳德-苏利耶综合征、灰色血小板综合征、湿疹血小板减少伴免疫缺陷综合征、再生障碍性贫血与骨髓增生异常综合征所引起的血小板减少疾病、获得性血小板生成不良、化疗药物所引起的血小板生成欠缺疾病或放射损伤引起的血小板生成欠缺疾病。

15. 根据权利要求 1 至 8 任一所述的蛋白激酶 A 激活剂在制备治疗血小板数量减少相关疾病药物中的用途，其特征在于，所述的血小板数量减少相关疾病包括血小板生成减少导致的疾病、血小板破坏增多导致的疾病或血栓性血小板减少性紫癜。

16. 根据权利要求 15 所述的蛋白激酶 A 激活剂在制备治疗血小板数量减少相关疾病药物中的用途，其特征在于，所述的血小板生成减少导致的疾病包括慢性再生障碍性贫血、骨髓增生异常综合征、放疗引起的血小板生成减少疾病或化疗引起的血小板生成减少疾病；所述的血小板破坏增多导致的疾病包括自身免疫性疾病引起的血小板破坏增多疾病、抗磷脂综合征引起的血小板破坏增多疾病、人类免疫缺陷病毒引起的血小板破坏增多疾病或药物性血小板减少症引起的血小板破坏增多疾病。

17. 根据权利要求 1 至 8 任一所述的蛋白激酶 A 激活剂在制备治疗血小板数量减少相关疾病药物中的用途，其特征在于，所述的药物为片剂、胶囊剂、颗粒剂、丸剂、缓释制剂、控释制剂、口服液或贴剂。

18. 根据权利要求 1 至 8 任一所述的蛋白激酶 A 激活剂在制备治疗血小板数量减少相关疾病药物中的用途，其特征在于，所述的药物包含药学上有效剂量的蛋白激酶 A 激活剂和药学上可接受的载体。

19. 根据权利要求 1 至 8 任一所述的蛋白激酶 A 激活剂在制备治疗血小板数量减少相关疾病药物中的用途，其特征在于，所述的药物通过口服、注射、喷雾吸入或经胃肠道进行给药。

20. 蛋白激酶 A 抑制剂在制备治疗血小板数量增多相关疾病药物中的用途。

21. 根据权利要求 20 所述的蛋白激酶 A 抑制剂在制备治疗血小板数量增多相关疾病药物中的用途，其特征在于，所述的蛋白激酶 A 抑制剂为无机物抑制剂、有机物抑制剂中的一种或几种。

22. 根据权利要求 21 所述的蛋白激酶 A 抑制剂在制备治疗血小板数量增多相关疾病药物中的用途，其特征在于，所述的无机物抑制剂为氢化物、氧化物、酸、碱、盐中的一种或几种。

23. 根据权利要求 21 所述的蛋白激酶 A 抑制剂在制备治疗血小板数量增多相关疾病药物中的用途，其特征在于，所述的有机物抑制剂为烃类、烃的衍生物、糖类、蛋白质、脂肪、核酸、合成高分子材料中的一种或几种。

24. 根据权利要求 23 所述的蛋白激酶 A 抑制剂在制备治疗血小板数量增多相关疾病药物中的用途，其特征在于，所述的烃类为烯烃、烷烃、炔烃、芳香烃中的一种或几种；所述的烃的衍生物为卤代烃、醇、酚、醛、酸、酯中的一种或几种；所述的糖类为单糖、二糖、低聚糖、多糖中的一种或几种；所述的蛋白质为氨基酸、多肽中的一种或几种；所述的核酸为脱氧核糖核酸、核糖核酸中的一种或几种。

25. 根据权利要求 20 所述的蛋白激酶 A 抑制剂在制备治疗血小板数量增多相关疾病药物中的用途，其特征在于，所述的蛋白激酶 A 抑制剂为法舒地尔、氮-[2-(磷酸化溴硝基精氨酸酰氨基)乙基]-5-异喹啉磺酰胺、 $C_{94}H_{148}N_{32}O_{31}$ 、 $C_{80}H_{130}N_{28}O_{24}$ 、 $C_{27}H_{21}N_3O_5$ 、 $C_{26}H_{19}N_3O_5$ 、 $C_{20}H_{13}N_3O$ 、 $C_{32}H_{31}N_3O_5$ 、 $C_{22}H_{22}N_4O$ 、 $C_{14}H_{17}N_3O_2S \cdot 2HCl$ 、 $C_{14}H_{17}N_3O_2S$ 、 $C_{11}H_{13}N_3O_2S \cdot HCl$ 、 $C_{12}H_{13}ClN_2O_2SHCl$ 、 $C_{12}H_{15}N_5O_2S_2HCl$ 、 $C_{53}H_{100}N_{20}O_{12}$ 、1-(5-喹啉磺酰基)哌嗪、4-氰基-3-甲基异喹啉、乙酰氨基-4-氰基-3-甲基异喹啉、8-溴代-2-单酰腺苷-3,5-环单硫代磷酸酯、腺苷酸 3,5-环单硫代磷酸酯、2-0-单丁-环磷腺苷、8-氯代-环磷腺苷、N-[2-(肉桂酰氨基酸)]-5-异喹啉酮、反相-8-己基氨基腺苷酸 3,5-单硫代磷酸酯、反相-8-哌啶基腺苷-环磷腺苷、反相-腺苷酸 3,5-环单硫代磷酸酯、5-碘代结核菌素、8-羟基腺苷酸-3,5-单硫代磷酸酯、钙磷酸蛋白 C、瑞香素、反相-8-氯苯-环磷腺苷、反相-环磷腺苷、反相-8-Br-环磷腺苷、9-腺苷酸环化酶、1-(5-异喹啉磺酰)-2-甲基哌啶、8-羟基腺苷酸-3',5'-单磷酸、8-己基氨基腺苷酸-3',5'-单磷酸、反相-腺苷酸 3',5'-环单磷酸中的一种或几种。

26. 根据权利要求 20 所述的蛋白激酶 A 抑制剂在制备治疗血小板数量增多相关疾病药物中的

用途，其特征在于，所述的血小板数量增多相关疾病包括原发性血小板增多疾病或继发性血小板增多疾病。

27. 根据权利要求 26 所述的蛋白激酶 A 抑制剂在制备治疗血小板数量增多相关疾病药物中的用途，其特征在于，所述的原发性血小板增多疾病包括原发性血小板增多症、慢性粒细胞白血病、骨髓纤维化和真性红细胞增多症、骨髓增生异常综合症或骨髓增殖性肿瘤。

28. 根据权利要求 26 所述的蛋白激酶 A 抑制剂在制备治疗血小板数量增多相关疾病药物中的用途，其特征在于，所述的继发性血小板增多疾病包括切脾后血小板增多、细菌或病毒引起的感染、肿瘤或免疫系统疾病。

29. 根据权利要求 20 至 25 任一所述的蛋白激酶 A 抑制剂在制备治疗血小板数量增多相关疾病药物中的用途，其特征在于，所述的药物为片剂、胶囊剂、颗粒剂、丸剂、缓释制剂、控释制剂、口服液或贴剂。

30. 根据权利要求 20 至 25 任一所述的蛋白激酶 A 抑制剂在制备治疗血小板数量增多相关疾病药物中的用途，其特征在于，所述的药物包含药学上有效剂量的蛋白激酶 A 抑制剂和药学上可接受的载体。

31. 根据权利要求 20 至 25 任一所述的蛋白激酶 A 抑制剂在制备治疗血小板数量增多相关疾病药物中的用途，其特征在于，所述的药物通过口服、喷雾吸入、注射或经胃肠道进行给药。

32. 蛋白激酶 A 抑制剂在制备促血小板凋亡药物中的用途。

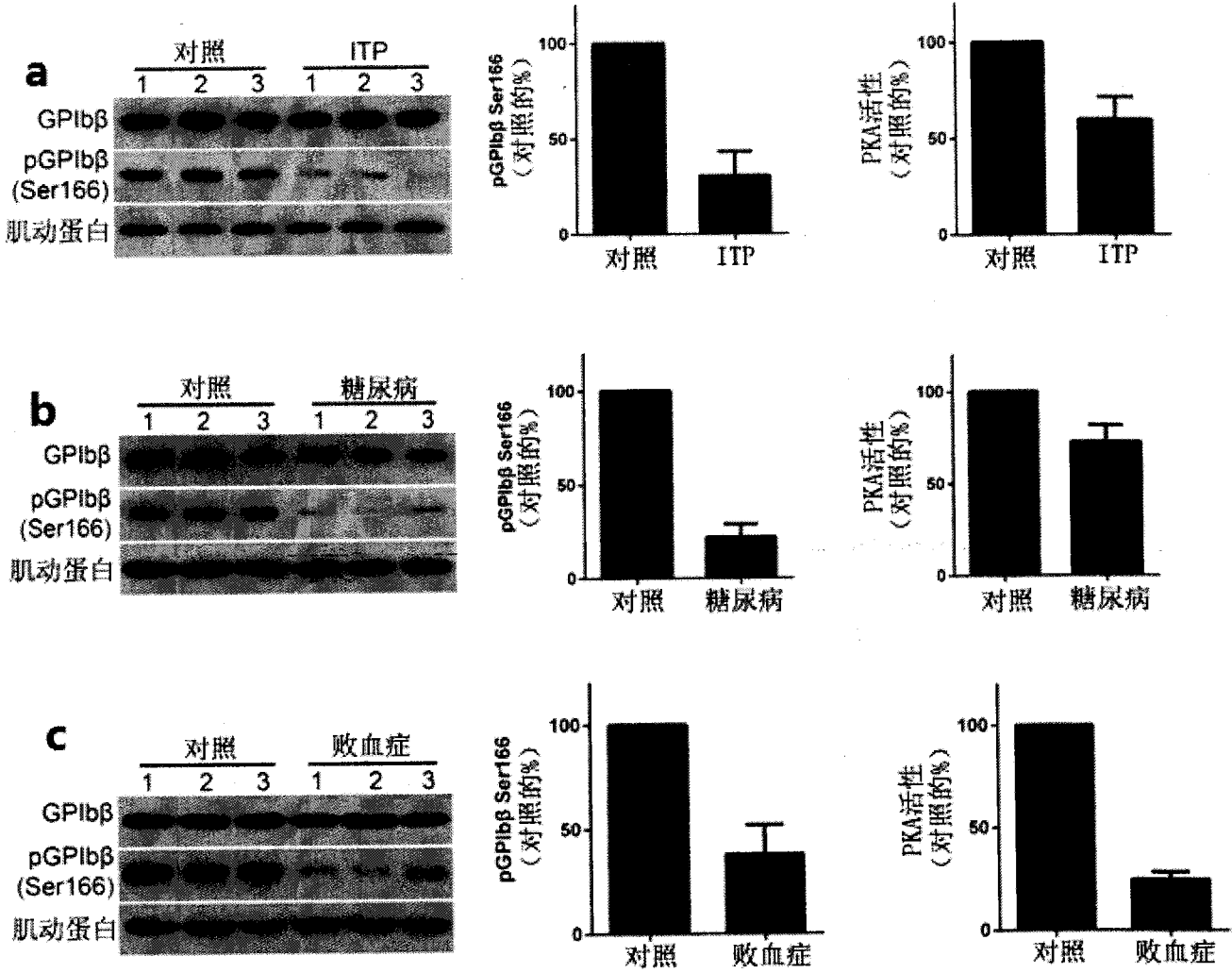


图 1

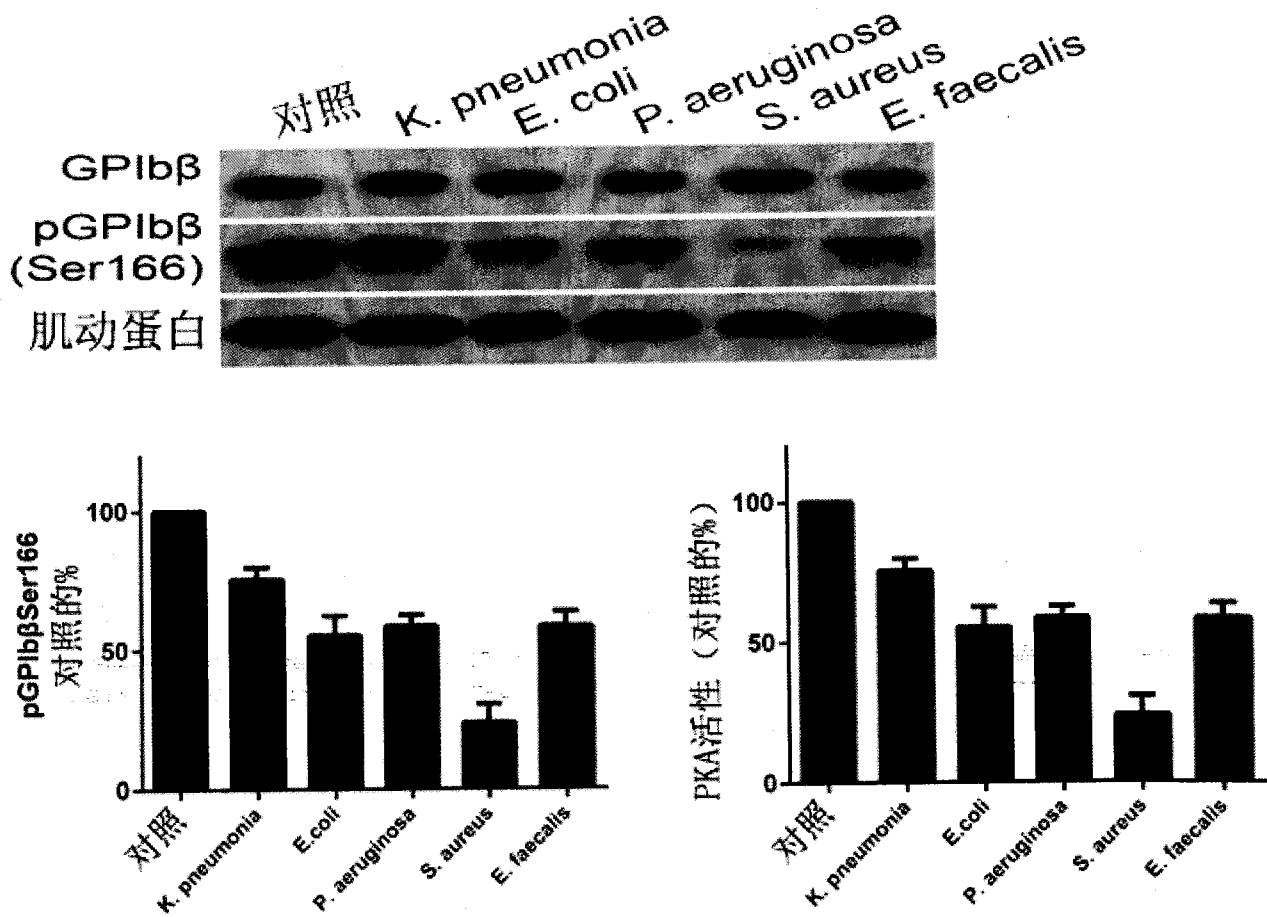


图 2

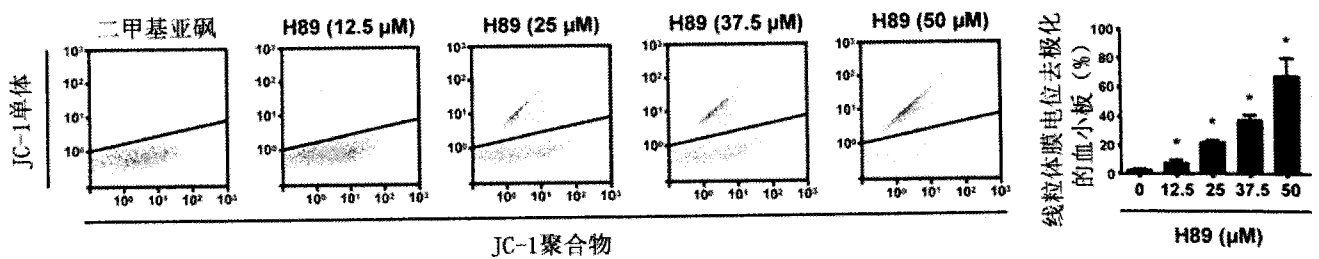


图 3

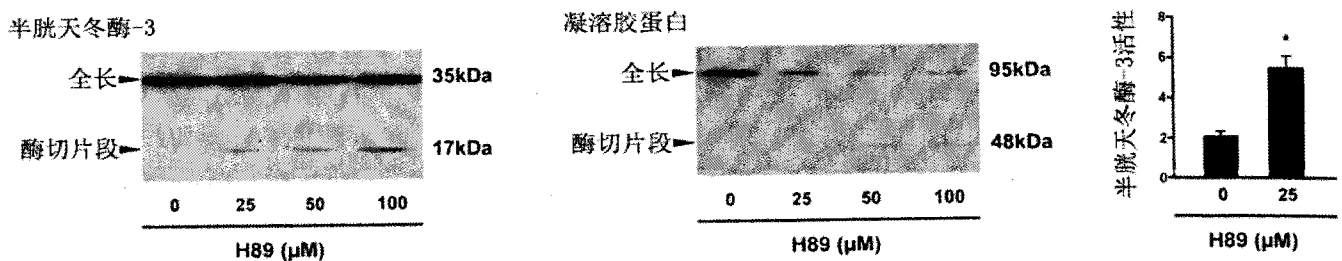


图 4

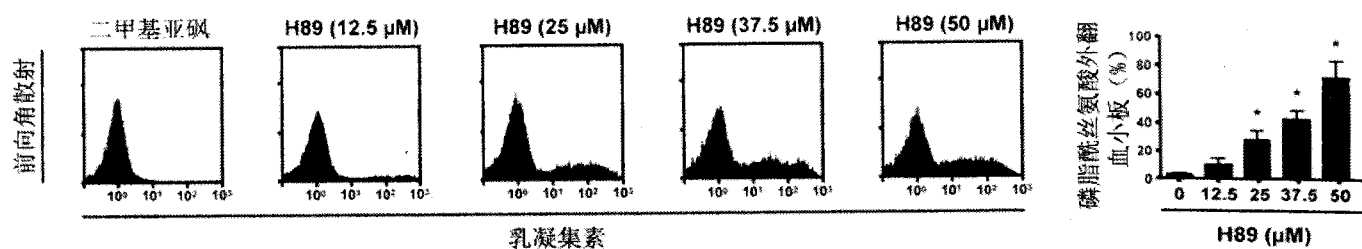


图 5

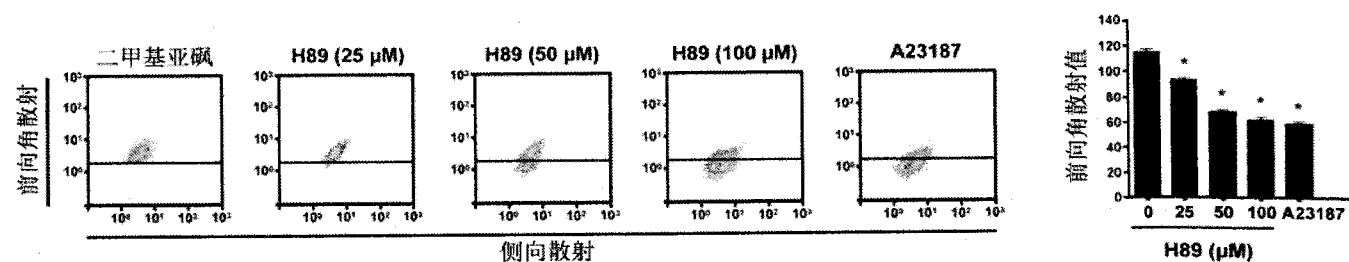


图 6

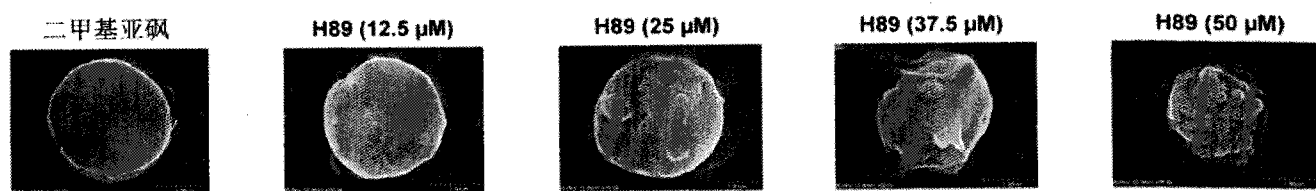


图 7

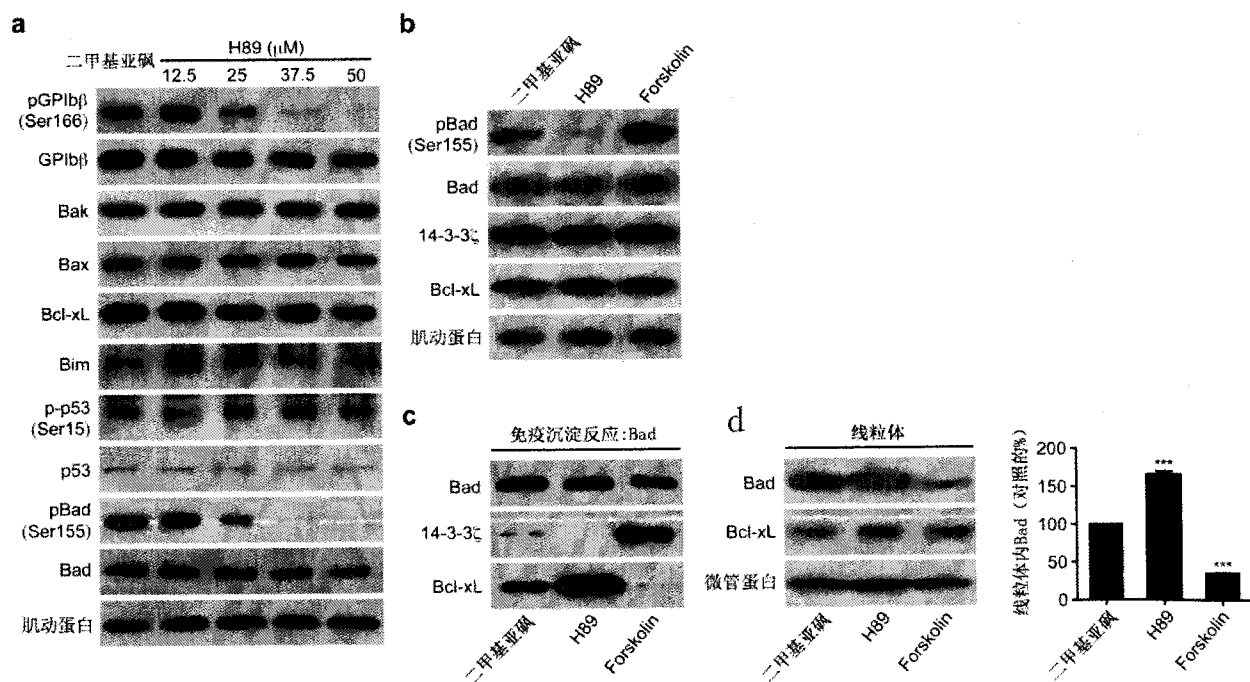


图 8

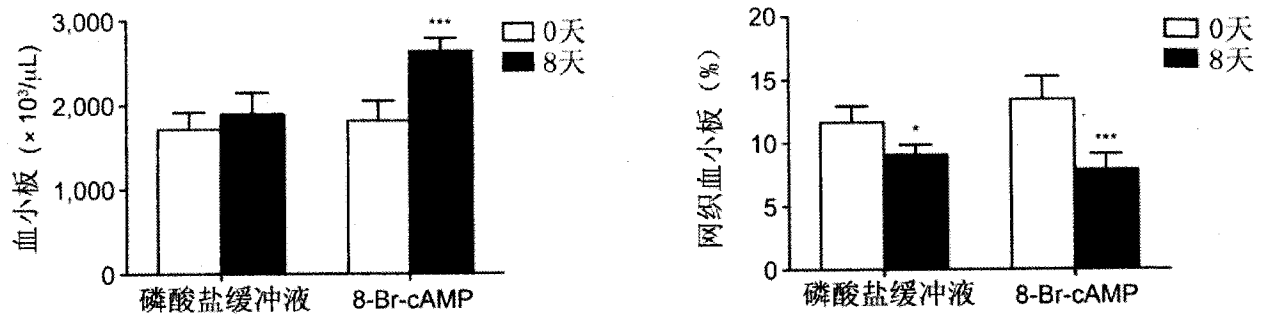


图 9

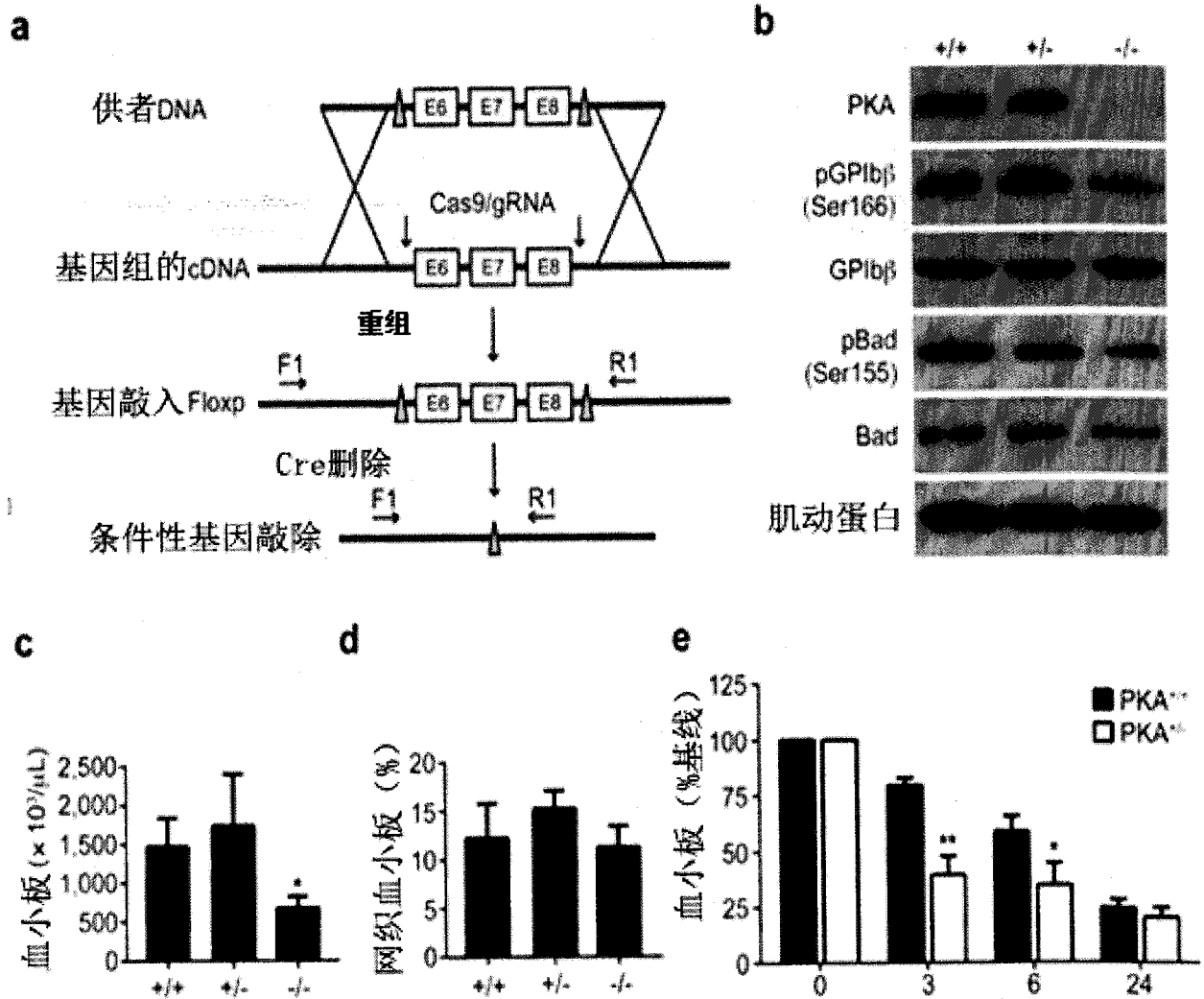


图 10

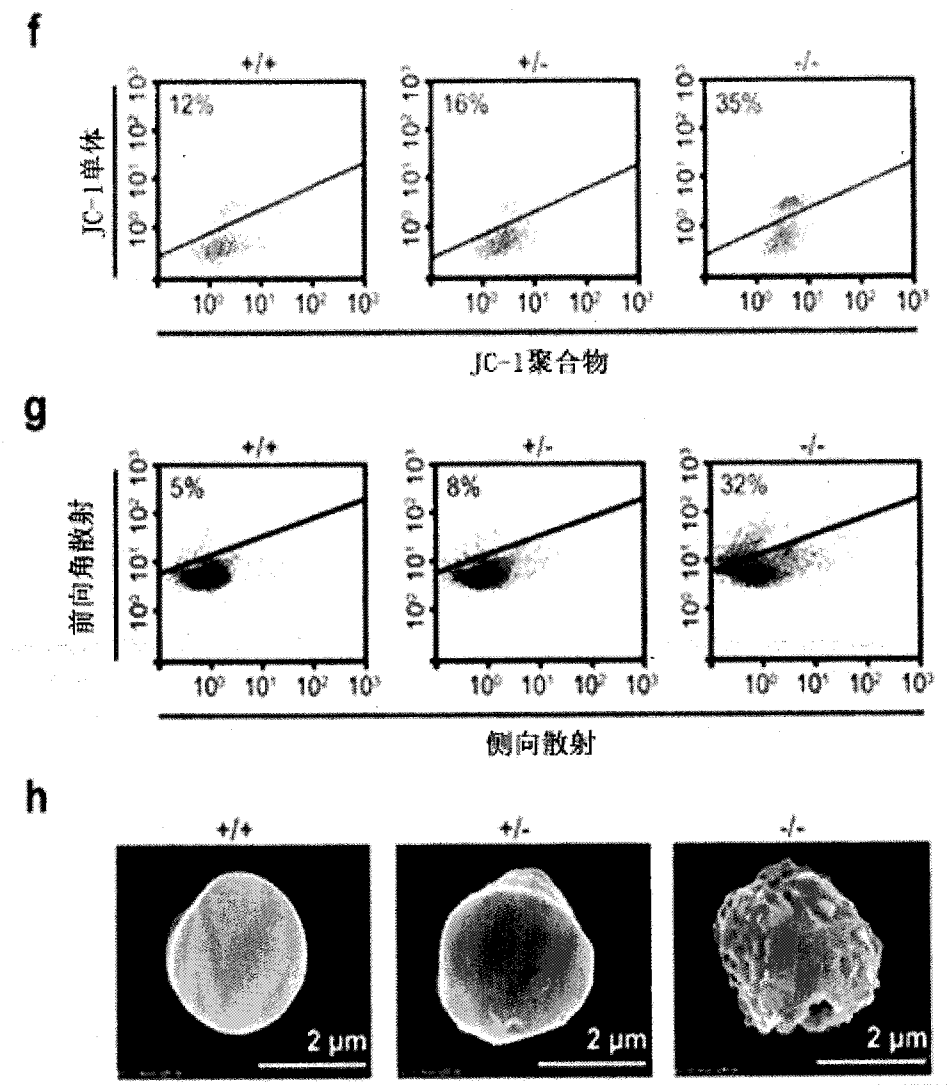


图 11

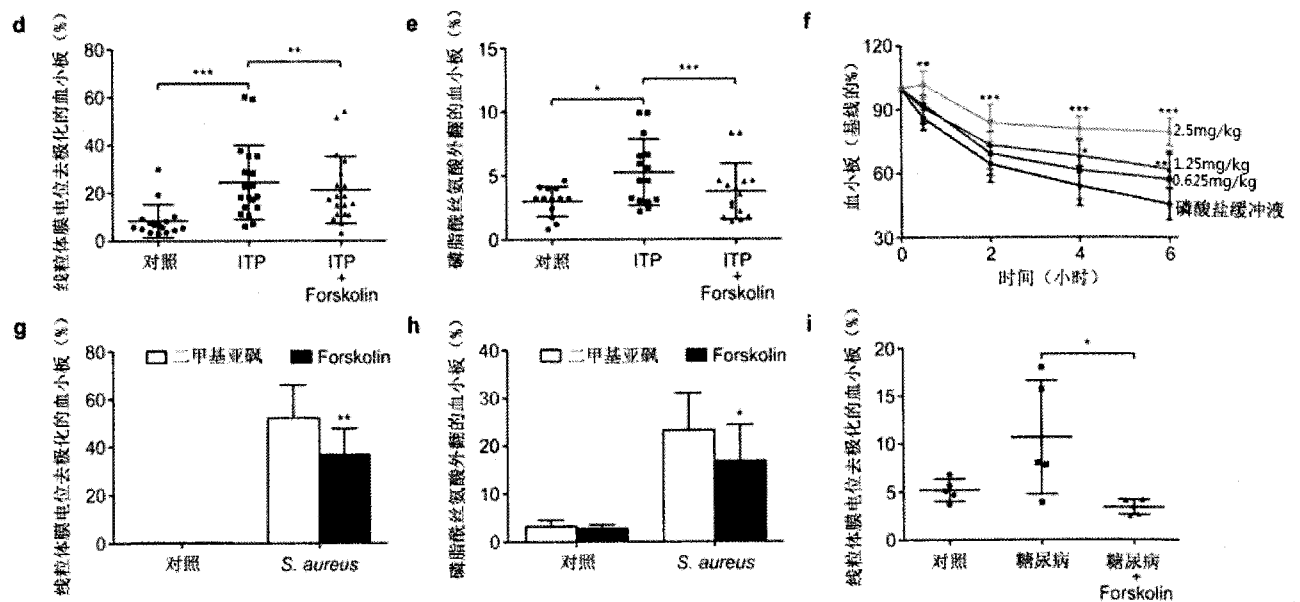


图 12

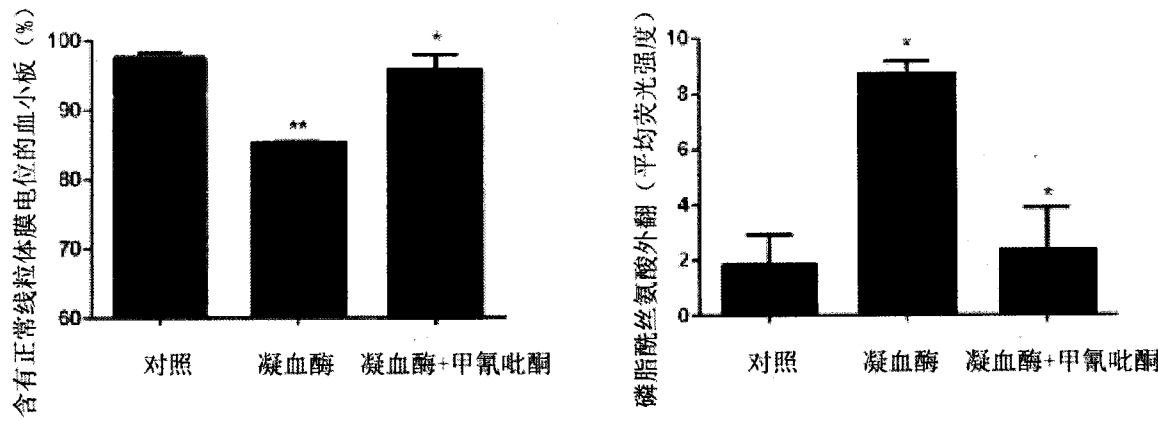


图 13

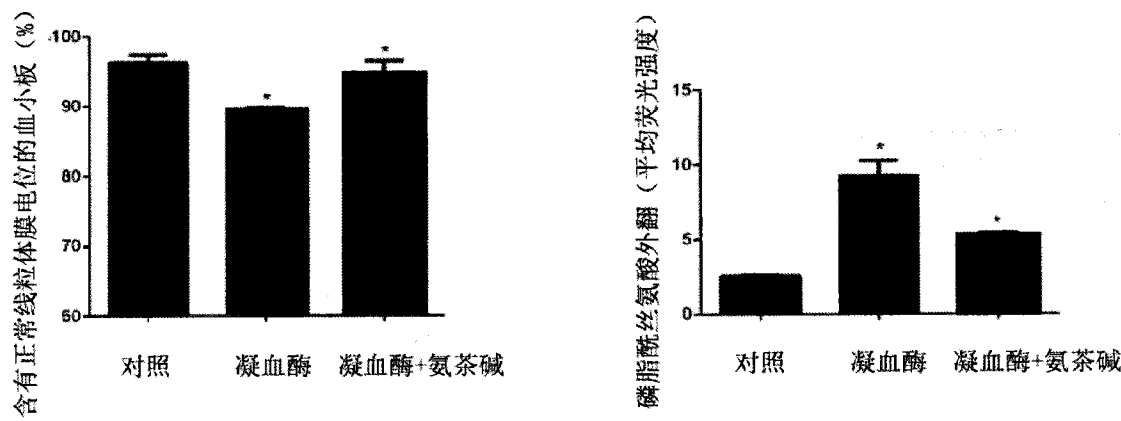


图 14

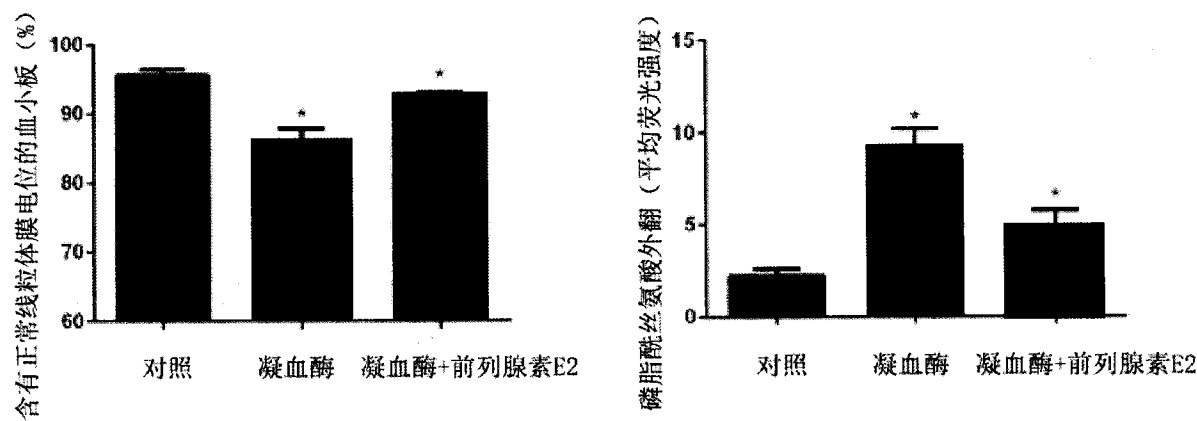


图 15

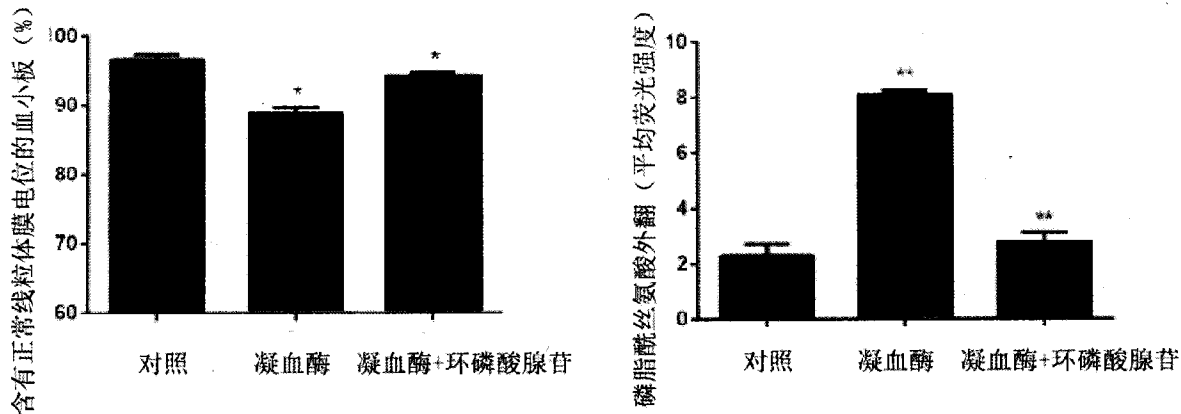


图 16

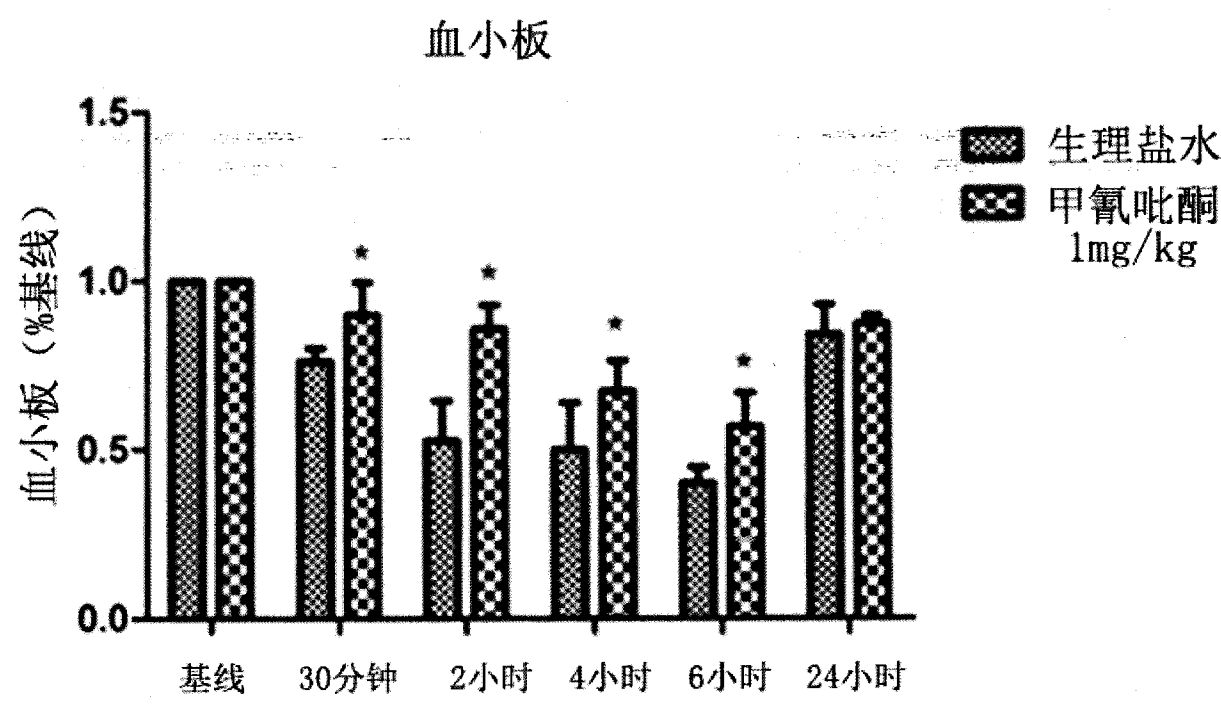


图 17

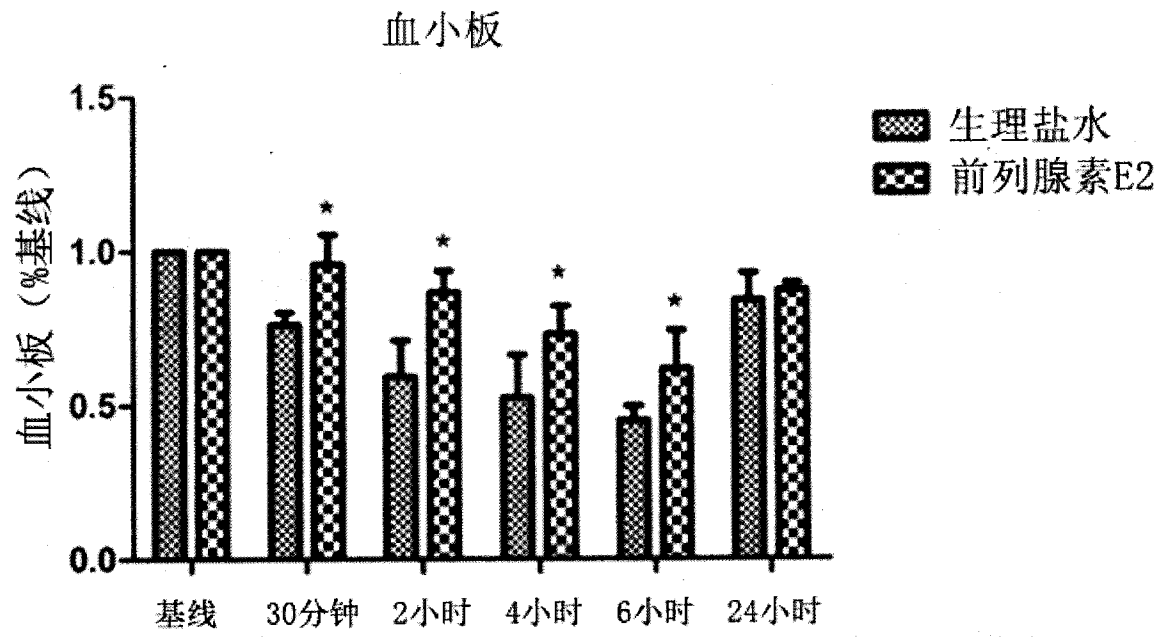


图 18

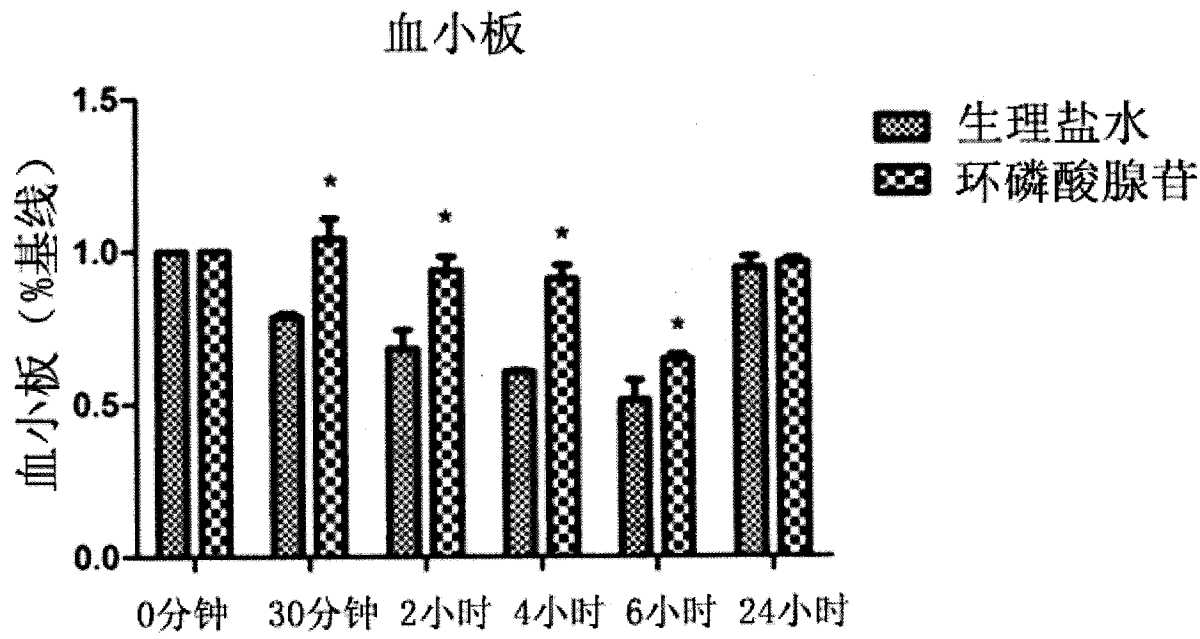


图 19

血小板

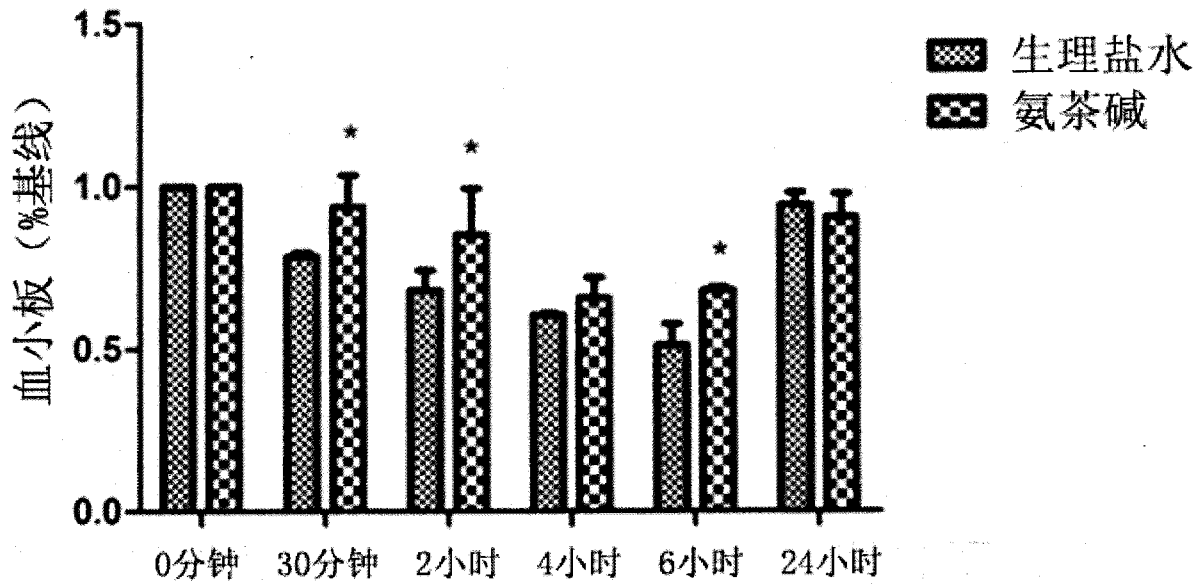


图 20

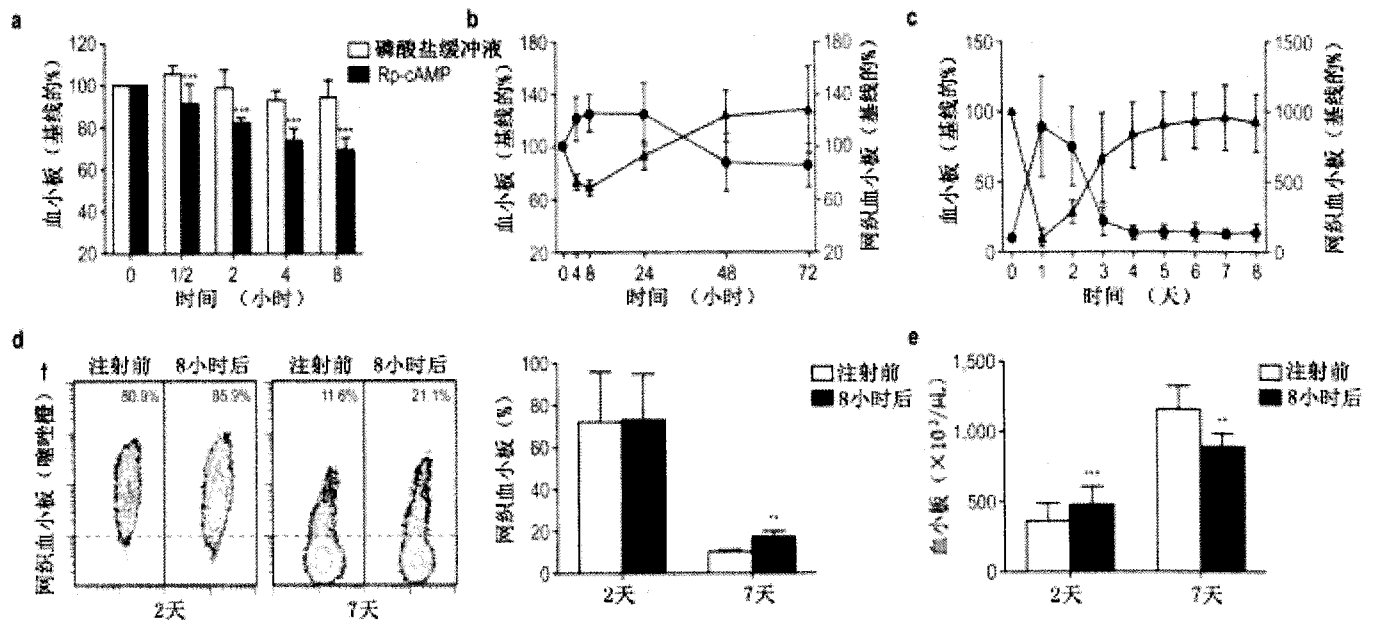


图 21

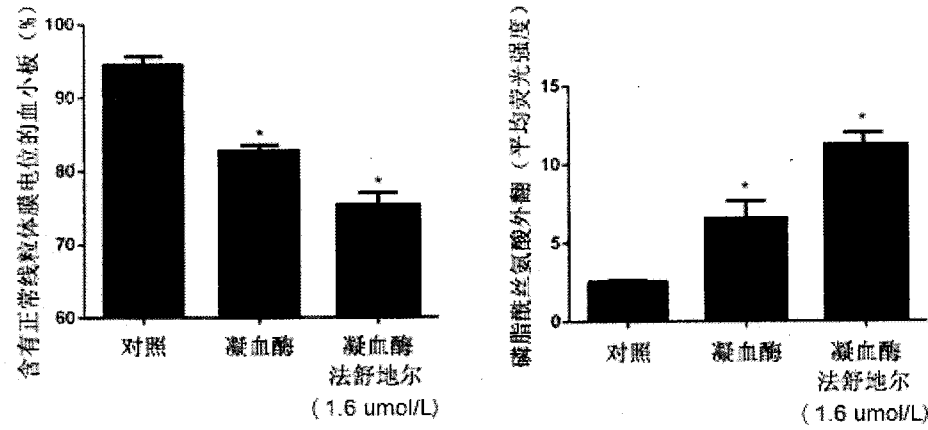


图 22

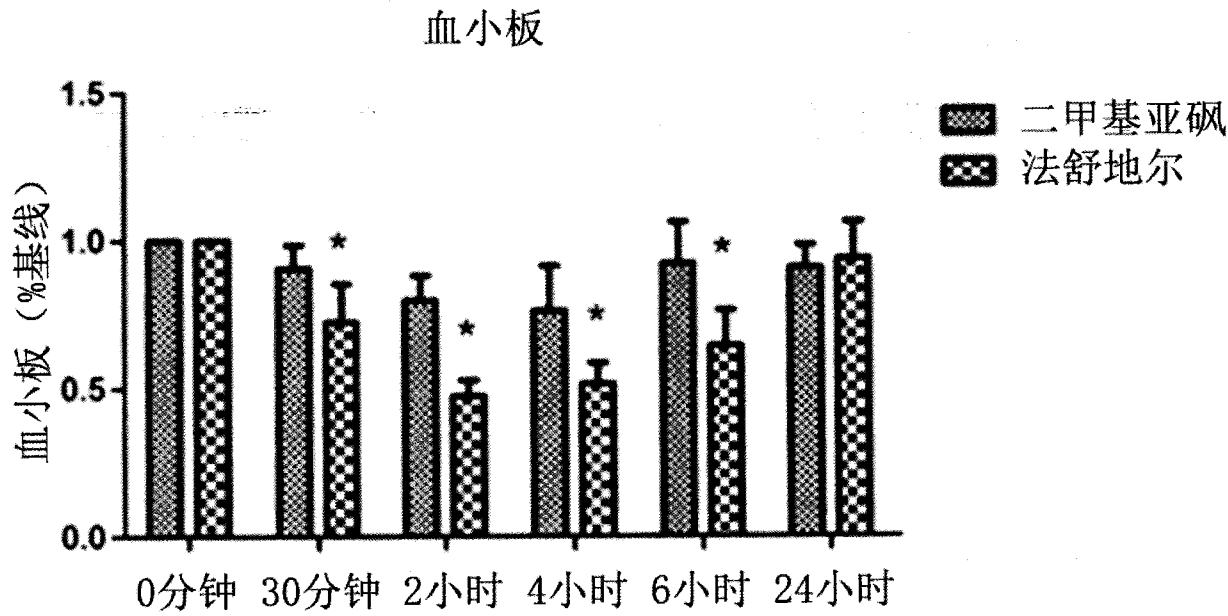


图 23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/112898

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/522 (2006.01) i; A61K 31/5575 (2006.01) i; A61K 31/7076 (2006.01) i; A61K 31/551 (2006.01) i; A61K 45/00 (2006.01) i; A61P 7/00 (2006.01) i; A61P 7/04 (2006.01) i; A61P 7/06 (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)

Data Bases: DWPI, CNPAT, Chinese patent full text search system, EMBASE, CNKI, CAPLUS

Search Terms: 蛋白激酶 A, 激动剂, 抑制剂, 血小板, 凋亡, 氨茶碱, 法舒地尔, 环磷腺苷, 地诺前列酮, 米力农, protein kinase A, inhibitor, agonist, blood platelet, apoptosis, aminophylline, Fasudil, Adenosine Cyclophosphate, pka, PGE2, CAMP, Milrinone

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	赵丽丽等. “蛋白激酶 A 活性抑制诱导的血小板凋亡及其机制研究”, 中华医学会血液学分会第十三届全国血栓与止血学术会议暨“血栓栓塞性疾病(血栓与止血)基础与临床研究进展”论文摘要汇编及学习班讲义, 11 August 2011 (11.08.2011), entire document, non-official translation (ZHAO, Lili et al., “Platelet Apoptosis Induced by Inhibition of Protein Kinase A Activity and Mechanism Study”, The 13th National Thrombosis and Haemostasis Congress of Chinese Medical Association, Hematology Society & Abstract Proceeding of Theses and Lecture Notes of Seminars on “Thrombosis Disease (Thrombosis and Haemostasis) Foundation and Clinical Research Progress”)	1, 17, 20, 26-29, 32
X	CN 103610684 A (SOOCHOW UNIVERSITY), 05 March 2014 (05.03.2014), claims 1-9	4, 5, 9-16, 18-19, 23, 24, 30-31
X	李红等, “瑞香素及其衍生物对 2 型糖尿病大鼠血液流变学影响的实验研究”, 吉林医学, 31(22), 31 August 2010 (31.08.2010), ISSN: 1004-0412, page 3616, the last paragraph, (LI, Hong et al., “Effect to Hemorheology Induced by Daphnetin and Its Derivative on Type 2 Diabetic Rats”, Jilin Medical Journal)	25
X	CN 101747413 A (BEIJING UNIVERSITY OF AERONAUTICS AND ASTRONAUTICS), 23 June 2010 (23.06.2010), claims 1-10	4, 5

☒ 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 January 2018	Date of mailing of the international search report 08 February 2018
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 ZHANG, Ting Telephone No. (86-10) 62411123

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CN2017/112898

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0376189 A2 (YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT COMPANY LIMITED), 04 July 1990 (04.07.1990), the abstract	1-32
A	赵丽丽等, “蛋白激酶 A 活性抑制诱导的血小板凋亡及其机制研究”, 中华医学会血液学分会第十三届全国血栓与止血学术会议暨 “血栓栓塞性疾病(血栓与止血)基础与临床研究进展”论文摘要汇编及学习班讲义, 11 August 2011 (11.08.2011), entire document, non-official translation (ZHAO, Lili et al., “Platelet Apoptosis Induced by Inhibition of Protein Kinase A Activity and Mechanism Study”, The 13th National Thrombosis and Haemostasis Congress of Chinese Medical Association, Hematology Society & Abstract Proceeding of Theses and Lecture Notes of Seminars on “Thrombosis Disease (Thrombosis and Haemostasis) Foundation and Clinical Research Progress”)	6-8
PX	CN 107047538 A (SOOCHOW UNIVERSITY), 18 August 2017 (18.08.2017), claims 1-10	claims 1-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/112898

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.: 2-3, 21-22
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:
[1] Claims 2, 3, 21 and 22 include several concepts the scopes of which are too large, wherein a large number of possible compounds are also involved. Therefore, no meaningful search can be made on said claims.
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).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

[1] The same or corresponding technical feature between claims 1, 20 and 32 is protein kinase A being related to the number or apoptosis of platelets, whereas the prior art already discloses the feature; see the section of the relevant document in the table. Therefore, the feature does not belong to a special technical feature underlying the contribution to the prior art. Therefore, said claims lack unity of invention therebetween.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International application No.
PCT/CN2017/112898

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

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/112898

A. 主题的分类

A61K 31/522(2006.01)i; A61K 31/5575(2006.01)i; A61K 31/7076(2006.01)i; A61K 31/551(2006.01)i; A61K 45/00(2006.01)i; A61P 7/00(2006.01)i; A61P 7/04(2006.01)i; A61P 7/06(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, Chinese patent full text search system, EMBASE, CNKI, CAPLUS; 检索词: 蛋白激酶A, 激动剂, 抑制剂, 血小板, 凋亡, 氨茶碱, 法舒地尔, 环磷腺苷, 地诺前列酮, 米力农, protein kinase A, inhibitor, agonist, blood platelet, apoptosis, aminophylline, Fasudil, Adenosine Cyclophosphate, pka, PGE2, CAMP, Milrinone

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	赵丽丽等. “蛋白激酶A活性抑制诱导的血小板凋亡及其机制研究” 中华医学会血液学分会第十三届全国血栓与止血学术会议暨“血栓栓塞性疾病 (血栓与止血) 基础与临床研究进展” 论文摘要汇编及学习班讲义, 2011年 8月 11日 (2011 - 08 - 11), 全文	1, 17, 20, 26-29, 32
X	CN 103610684 A (苏州大学) 2014年 3月 5日 (2014 - 03 - 05) 权利要求1-9	4, 5, 9-16, 18- 19, 23, 24, 30-31
X	李红等. “瑞香素及其衍生物对2 型糖尿病大鼠血液流变学影响的实验研究” 吉林医学, 第31卷, 第22期, 2010年 8月 31日 (2010 - 08 - 31), ISSN: 1004-0412, 第3616页最后一段	25
X	CN 101747413 A (北京航空航天大学) 2010年 6月 23日 (2010 - 06 - 23) 权利要求1-10	4, 5

☒ 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

2018年 1月 11日

国际检索报告邮寄日期

2018年 2月 8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

张婷

电话号码 (86-10) 62411123

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	EP 0376189 A2 (YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT COMPANY LIMITED) 1990年 7月 4日 (1990 - 07 - 04) 摘要	1-32
A	赵丽丽等. “蛋白激酶A活性抑制诱导的血小板凋亡及其机制研究” 中华医学会血液学分会第十三届全国血栓与止血学术会议暨“血栓栓塞性疾病 (血栓与止血)基础与临床研究进展”论文摘要汇编及学习班讲义, 2011年 8月 11日 (2011 - 08 - 11), 全文	6-8
PX	CN 107047538 A (苏州大学) 2017年 8月 18日 (2017 - 08 - 18) 权利要求1-10	权利要求1-32

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：
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
2. ☒ 权利要求： 2-3, 21-22
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：
[1] 权利要求2-3, 21-22包含了范围过大的几个概念，其中又涉及大量可能的化合物，因此，不可能对它们作出有意义的检索。
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。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

- [1] 权利要求1, 20, 32之间的相同或者相应的技术特征是蛋白激酶A与血小板的数量或者凋亡之间存在关联，而现有技术已经公开了该特征，见表格的相关文献部分，因此，该特征不属于对现有技术做出贡献的特定技术特征，因此，这些权利要求之间缺乏单一性。

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. ☒ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。
3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求：
4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

对异议的意见

- ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
- ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
- ☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/112898

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	103610684	A	2014年 3月 5日	无			
CN	101747413	A	2010年 6月 23日	无			
EP	0376189	A2	1990年 7月 4日	US	5215888	A	1993年 6月 1日
CN	107047538	A	2017年 8月 18日	无			