

(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
2019 年 2 月 21 日 (21.02.2019)



(10) 国际公布号
WO 2019/033710 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 38/12 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01) **A61P 37/02** (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/073571

(22) 国际申请日: 2018 年 1 月 22 日 (22.01.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201710710198.6 2017年8月18日 (18.08.2017) CN

(71) 申请人: 中国药科大学 (CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省南京市江宁区龙眠大道639号, Jiangsu 211198 (CN)。

(72) 发明人: 谭宁华(TAN, Ninghua); 中国江苏省南京市江宁区龙眠大道639号, Jiangsu 211198 (CN)。王琛(WANG, Chen); 中国江苏省南京市江宁区龙眠大道639号, Jiangsu 211198 (CN)。汪哲(WANG, Zhe); 中国江苏省南京市江宁区龙眠大道639号, Jiangsu 211198 (CN)。李森林(LI, Senlin); 中国江苏省南京市江宁区龙眠大道639号, Jiangsu 211198 (CN)。徐会敏(XU, Huimin); 中国江苏省南京市江宁区龙眠大道639号, Jiangsu 211198 (CN)。宋立华(SONG, Lihua); 中国江苏省南京市江宁区龙眠大道639号, Jiangsu 211198 (CN)。

(74) 代理人: 南京苏高专利商标事务所(普通合伙) (NANJING SUGAO PATENT AND TRADEMARK FIRM (ORDINARY PARTNERSHIP)); 中国江苏省南京市中山东路198号龙台国际大厦1912室, 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, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明:

— 发明人资格(细则4.17(iv))

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(54) Title: USE OF COMPOSITAE-TYPE CYCLIC PEPTIDE COMPOUND AS CGAS-STING SIGNALLING PATHWAY INHIBITOR

(54) 发明名称: 菊科类型环肽化合物作为cGAS-STING信号通路抑制剂的应用

(57) Abstract: Disclosed are the use of a Compositae-type cyclic peptide compound or a pharmacologically acceptable salt thereof as a cGAS-STING signalling pathway inhibitor, and the use of the Compositae-type cyclic peptide compound or a pharmacologically acceptable salt thereof as a cGAS-STING signalling pathway inhibitor in the preparation of a drug for treating a disease where the cGAS-STING signalling pathway is abnormally activated. The Compositae-type cyclic peptide compound is a natural compound with diversified dosage forms and methods of administration and has wide clinical application prospects.

(57) 摘要: 一种菊科类型环肽化合物或其药理学上容许的盐作为cGAS-STING信号通路抑制剂的应用, 以及菊科类型环肽化合物或其药理学上容许的盐作为cGAS-STING信号通路抑制剂在制备治疗cGAS-STING信号通路异常激活的疾病的药物中的应用。所述的菊科类型环肽化合物为天然化合物, 其剂型和用药方式多样化, 具有广泛的临床应用前景。



WO 2019/033710 A1

菊科类型环肽化合物作为 cGAS-STING 信号通路抑制剂的应用

技术领域

本发明属于药物技术，具体地涉及一种菊科类型环肽作为 cGAS-STING 信号通路抑制剂的应用，以及其在制备治疗相关疾病药物中的应用。

背景技术

固有免疫是宿主机体免疫系统的第一道防线。在漫长的生物进化过程中，宿主细胞中的模式识别受体能够识别入侵病原微生物的保守组分病原相关分子模式，如核酸分子、LPS 等，感知到病原微生物的入侵，侵染信号通过下游接头蛋白、激酶和转录因子传递，诱导 I 型干扰素和促炎症细胞因子的表达，最终清除入侵的病原微生物。过去几十年的研究已经详细解析了宿主细胞识别以及清除“非己”RNA 的信号转导机制，而最近几年才开始对识别“非己”DNA 的信号转导机制进行研究，特别是 cGAS-STING 信号通路。

STING (stimulator of interferon genes)，又称为 TMEM173, MITA, ERIS 或 MPYS，作为胞内应答 DNA 入侵的关键节点分子，在胞质 DNA 刺激下，它响应来自胞质 DNA 受体的信号，对于诱导产生干扰素的过程中发挥了关键性的作用。宿主细胞的 DNA 识别受体识别外源或内源的“非己”DNA 后将信号传递给内质网上的节点分子 STING，随后 STING 迅速二聚化并从内质网转移到核外周小体上。在这个过程中，激酶 TBK1 也会被招募并转移到核外周小体上激活，被激活的 TBK1 磷酸化转录因子 IRF3，随后 IRF3 发生二聚化并进入细胞核激活多种靶基因的转录表达，参与多种生物效应，包括抗病毒、炎症反应、免疫应答及肿瘤发生发展等重要的生理病理过程。

正常激活的 cGAS-STING 信号通路有助于机体识别和清除入侵的 DNA 病原微生物，但是异常过度激活的 cGAS-STING 信号通路会造成机体发生炎症及自身免疫性疾病等，如 Aicardi-Goutieres 综合征、系统性红斑狼疮或狼疮样疾病。因此研究调控 cGAS-STING 信号通路以维持固有免疫处于正常稳定的状态至关重要。目前的研究主要集中在 cGAS-STING 信号通路关键分子的翻译后修饰以及寻找新的调控分子，而小分子化合物参与调控 cGAS-STING 信号通路的研究还比较少，但具有十分重要的应用价值，这也成为重点关注的研究方向之一。

现有技术中未见 cGAS-STING 信号通路抑制剂的报道，亦未见菊科类型环肽作用于该通路和制备治疗自身免疫性疾病药物的报道。菊科类型环肽在菊科植物中存在的种类不多，目前仅从菊科紫菀属植物紫菀 (*Aster tataricus* L. f.) 中分离得到 15 个。菊科类型环肽类化合物的提取分离具有一定的特点，主要是因为

该类化合物的极性小、溶解性不好且含量较低,难以得到纯度较高的环肽类成分。近年来,从紫菀属植物中分离环肽类成分已有若干方法公开发表,如徐会敏等报道,用甲醇回流提取菊科紫菀属植物紫菀的根茎后,得甲醇浸膏,加水混悬后,用乙酸乙酯和正丁醇反复萃取,乙酸乙酯部分反复利用正反向硅胶柱层析、Sephadex LH-20 富集得到总环肽部位,再结合 HPLC 对其进行分离纯化,得到一系列环肽。参见 Xu, H. M, et al. Astins K-P, six new chlorinated cyclopentapeptides from *Aster tataricus*, Tereahedron 2013, 69, 7964-7969。专利 CN102174083B 也公开了类似的制备方法。但是这些方法普遍存在提取效率低,过程复杂,样品损失量较大,重复性和可控性差等缺点。

发明内容

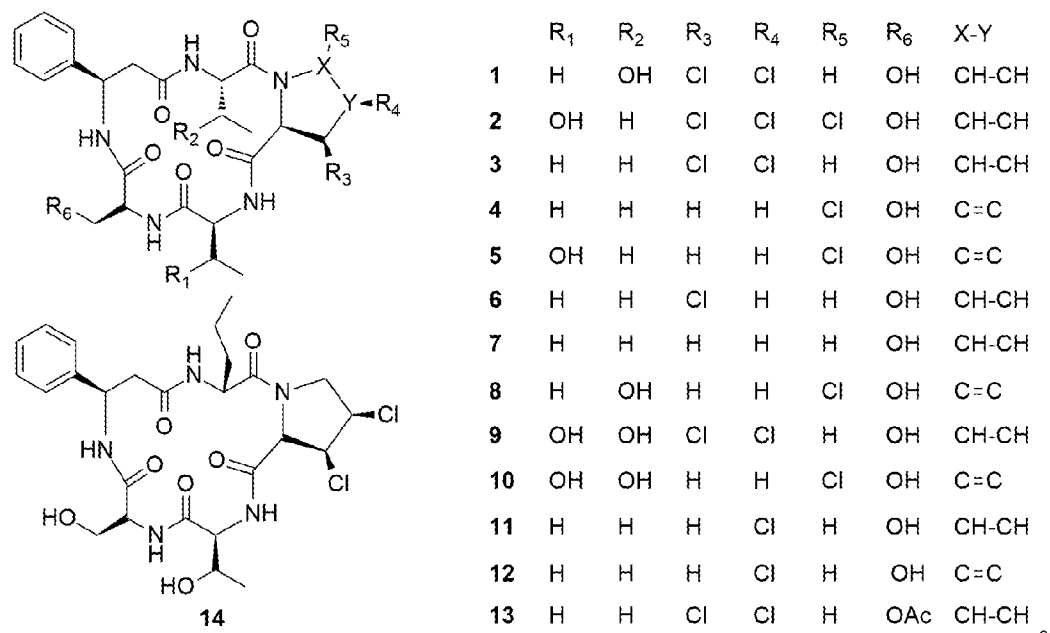
本发明的目的在于提供一类菊科类型环肽化合物作为 cGAS-STING 信号通路抑制剂的应用; 以及其在制备治疗 cGAS-STING 信号通路异常激活的疾病的药物中的应用。

为了实现本发明的上述目的, 本发明提供了如下技术方案:

菊科类型环肽化合物或其药理学上容许的盐作为 cGAS-STING 信号通路抑制剂的应用。

菊科类型环肽化合物或其药理学上容许的盐作为 cGAS-STING 信号通路抑制剂在制备治疗 cGAS-STING 信号通路异常激活的疾病的药物中的应用。

其中, 所述菊科类型环肽化合物优选为下述结构式所示的菊科类型环肽 Astins A-H (1-8) 和 Astins K-P (9-14),



进一步优选的, 所述菊科类型环肽为 Astin C。

所述菊科类型环肽化合物或其药理学上容许的盐能够抑制 ISD 刺激下 cGAS-STING 信号通路下游基因 *IFN β* 、*IFN α 4* 和 *CXCL10* 的表达，从而达到抑制 cGAS-STING 信号通路。

所述的药理学上容许的盐包括与无机酸、有机酸、碱金属、碱土金属或者碱性氨基酸形成的盐。

进一步的，本发明的所述菊科类型环肽或其药理学上容许的盐，可以列举例如与盐酸、硝酸、硫酸、磷酸、氢溴酸等无机酸，或者马来酸、富马酸、酒石酸、乳酸、柠檬酸、乙酸、甲磺酸、对苯甲磺酸、己二酸、棕榈酸、单宁酸等有机酸，锂、钠、钾等碱金属，钙、镁等碱土金属，赖氨酸等碱性氨基酸形成的盐。

本发明所述的治疗 cGAS-STING 信号通路异常激活的自身免疫性疾病的药物，可以由菊科类型环肽化合物或其药理学上容许的盐，与药学上可接受的载体组合后制备而成。制备的药物剂型可以为片剂、胶囊、口服液、针剂、注射用冻干剂或粉针剂等。由于菊科类型环肽可从紫菀中提取分离，而片剂、胶囊、口服液、针剂、注射用冻干剂或粉针剂等药物剂型的制备也是本领域的常规知识。因此，由菊科类型环肽化合物与相应载体制备的各种药物剂型也能够由本领域技术人员实现。

上文中所述的药学上可接受的载体是指药学领域常规的药物载体，例如：稀释剂、赋形剂如水等，填充剂如淀粉、蔗糖等；黏合剂如纤维素衍生物、藻酸盐、明胶和聚乙烯吡咯烷酮；湿润剂如甘油；崩解剂如琼脂、碳酸钙和碳酸氢钠；吸收促进剂如季铵化合物；表面活性剂如十六烷醇；吸附载体如高岭土和皂黏土；润滑剂如滑石粉、硬脂酸钙和硬脂酸镁、以及聚乙二醇等。另外还可以在组合物中加入其它辅剂如香味剂、甜味剂等。

本发明化合物可以以组合物的形式通过口服、鼻吸入、直肠或肠胃外给药的方式施用于需要这种治疗的患者。用于口服时，可将其制成常规的固体制剂如片剂、粉剂、粒剂、胶囊等，制成液体制剂如水或油悬浮剂或其他液体制剂如糖浆、酏剂等；用于肠胃外给药时，可将其制成注射用的溶液、水或油性悬浮剂等。本发明药物组合物的各种剂型可以按照药学领域的常规生产方法制备。例如使活性成分与一种或多种载体混合，然后将其制成所需的剂型。

所述药物中，优选含有重量比为 0.1%~99.5% 的活性成分菊科类型环肽或其药理学上容许的盐，最优选含有重量比为 0.5%~95% 的活性成分。

本发明所述药物的施用量可根据用药途径、患者的年龄、体重、所治疗的疾病的类型和严重程度等变化，其日剂量可以是 0.01~10 mg/kg 体重，优选 0.1~5 mg/kg 体重，可以一次或多次施用。

本发明是通过在 MEF 细胞中检测 Astins A-H (1-8) 和 Astins K-P (9-14)

对 DNA 类似物 ISD 刺激激活的 cGAS-STING 信号通路下游基因表达的影响,以及在 HSV-1 诱导的小鼠血清中 IFN β 蛋白表达的影响;发现菊科类型环肽能在体内外抑制 cGAS-STING 信号通路,是该通路的第一个抑制剂,可用于制备治疗相关疾病的药物。所述 cGAS-STING 信号通路异常激活的疾病包括自身免疫性、炎症性疾病和癌症等,如 Aicardi-Goutieres 综合症、系统性红斑狼疮等。

本发明中所述的 Astins A-H (1-8) 和 Astins K-P (9-14) 的制备方法可参照 Xu, H. M, et al. Astins K-P, six new chlorinated cyclopentapeptides from *Aster tataricus*, Tereahedron 2013, 69, 7964-7969, 以及专利 CN102174083B 中公开的类似的制备方法。但是上述方法普遍存在提取效率低,过程复杂,样品损失量较大,重复性和可控性差等缺点,本申请中对制备方法做了改进,改进后的制备方法概括地说就是,甲醇浸膏直接经硅胶柱层析,无需萃取,既简化了分离过程,又减少了样品损失;通过正反相硅胶柱层析可以简便的除去部分色素及其它低极性成分;利用 Sephadex LH-20 凝胶色谱,可分开一部分与环肽分子量相差很大的小分子成分,同时快速富集环肽;利用高效液相色谱(HPLC)纯化及重结晶技术,即可成功分离得到环肽。另外,本方法仅利用实验室或工业上常规的层析材料,包括正反相硅胶、Sephadex LH-20 等。总之,本发明提取分离方法可控性和重现性好,样品损失少,成本较低,操作方便,可分离得到微量环肽,溶剂可以反复回收利用,适用于工业生产。具体制备见实施例部分。

有益效果:本发明首次揭示了菊科类型环肽化合物是一种 cGAS-STING 信号通路抑制剂,能够有效抑制 DNA 类似物 ISD 刺激下 cGAS-STING 信号通路下游基因 IFN β 、IFN $\alpha 4$ 和 CXCL10 的表达;由此可应用于制备治疗 cGAS-STING 信号通路异常激活的疾病的药物,由于本发明所述的菊科类型环肽化合物为天然化合物,其剂型和用药方式多样化,具有广泛的临床应用前景。

附图说明

图 1 为本发明的菊科类型环肽化合物的制备方法流程图;

图 2a 为本发明的菊科类型环肽化合物 Astins A-H (1-8) 和 Astins K-P (9-14) 在 MEF 细胞中对 DNA 类似物 ISD 刺激激活的 IFN β mRNA 表达的抑制作用;

图 2b 为 Astin C (3) 在 MEF 细胞中对 DNA 类似物 ISD 刺激激活的 cGAS-STING 信号通路下游基因 IFN β , IFN $\alpha 4$ 和 CXCL10 的表达的影响;

图 3 为本发明的菊科类型环肽化合物 Astin C (3) 对 HSV-1 诱导的小鼠血清中 IFN β 蛋白表达的影响。

具体实施方式

下面结合具体实施例来进一步说明本发明的实质性内容。

本实施例中使用的设备、材料、试剂除有特殊说明以外,均可以通过市场购

买获取。

实施例 1

菊科类型环肽化合物 Astins A-H (1-8) 和 Astins K-P (9-14) 的制备: (制备方法流程见图 1 所示)

取紫菀 (*Aster tataricus* L.) 干燥根及根茎 10 Kg, 经干燥、粉碎及甲醇浸泡过夜后, 用甲醇热回流提取, 共提取三次, 第一次 4 小时, 第二次 4 小时, 第三次 3 小时, 合并提取液, 经减压浓缩得甲醇浸膏 4.6 Kg。该浸膏经硅胶柱层析, 用氯仿/甲醇 (100:0, 9:1, 8:2, 7:3, 1:1, 0:100) 梯度洗脱, 利用环肽 TLC 检测方法合并含环肽各馏分, 得总环肽部位 (212.6 g); 以下的每一过程都须结合环肽 TLC 检测方法来指导分离纯化。总环肽部位经硅胶柱层析, 用 100:1-8:2 的氯仿/甲醇梯度洗脱, 根据环肽点的不同合并为五个组分 Fr.1-Fr.5。对 Fr.1 (64 g) 经硅胶柱层析, 12:1-1:1 的石油醚/丙酮梯度洗脱, 分离得到三个组分 Fr.1-1-Fr.1-3; Fr.1-2 (10 g) 经 Sephadex LH-20 凝胶柱层析, 1:1 的氯仿/甲醇为洗脱剂, 所富集的含有环肽的部分再经硅胶柱层析, 10:1-3:1 的氯仿/乙酸乙酯梯度洗脱, 得到三个组分 Fr.1-2-1-Fr.1-2-3; Fr.1-2-1 (34 mg) 组分经 ODS HPLC 半制备柱纯化, 20 %乙腈和 5%三氟乙酸为流动相, 得到 Astin L (10) (5 mg); Fr.1-2-2 (231 mg) 再经硅胶柱层析, 1:3 的氯仿/乙酸乙酯为洗脱剂, 得到 Astin K (9) (20 mg)。对 Fr.2 (15 g) 经硅胶柱层析, 2:1-1:2 的石油醚/丙酮梯度洗脱, 得到五个组分 Fr.2-1-Fr.2-5; 其中 Fr.2-2 (2.8 g) 再经硅胶柱层析, 7:1 的氯仿/甲醇等度洗脱, 得到四个组分 Fr.2-2-1-Fr.2-2-4; Fr.2-2-1 (786 mg) 经 Sephadex LH-20 层析, 1:1 的氯仿/甲醇为洗脱剂, 得环肽组分经 ODS HPLC 半制备柱纯化, 35%乙腈和 5%三氟乙酸为流动相, 得到 Astin F (6) (10 mg), Astin H (8) (15 mg) 和 Astin M (11) (7 mg); Fr.2-3 (1.1 g) 经 Sephadex LH-20 层析, 1:1 的氯仿/甲醇为洗脱剂, 得环肽组分再经硅胶柱层析, 20:1-5:1 的氯仿/甲醇梯度洗脱, 得到四个组分 Fr.2-3-1-Fr.2-3-4, 其中 Fr.2-3-4 (41 mg) 经 ODS HPLC 半制备柱纯化得到 Astin N (12) (5 mg); Fr.2-4 (789 mg) 经硅胶柱层析, 20:1-5:1 氯仿/甲醇梯度洗脱, 得到 Astin D (4) (200 mg); Fr.2-5 (971 mg) 经 Sephadex LH-20 层析, 1:1 的氯仿/甲醇为洗脱剂, 得两组分 Fr.2-5-1-Fr.2-5-2; 其中 Fr.2-5-1 (128 mg) 经硅胶柱层析, 25:1 的乙酸乙酯/甲醇等度洗脱, 得到 Astin A (1) (12.7 mg); Fr.2-5-2 (78 mg) 经反复硅胶柱层析, 用氯仿/丙酮洗脱分离得到 Astin O (13) (3 mg)。对 Fr.3 (30 g) 经硅胶柱层析, 1:1-1:2 的石油醚/丙酮梯度洗脱, 得到三个组分 Fr.3-1-Fr.3-3; 其中 Fr.3-1 (8 g) 再经硅胶柱层析, 3:1-5:1 的氯仿/乙酸乙酯为洗脱剂进行梯度洗脱, 合并得到五个组分 Fr.3-1-1-Fr.3-1-5。其中 Fr.3-1-2 (3 g) 经 Sephadex LH-20 层析, 1:1 的氯仿/甲醇为洗脱剂, 合并环肽部分, 该

部分经甲醇重结晶得到化合物 Astin C (3) (1.4 g); Fr.3-2 (12 g) 经 RP-18 柱层析, 10%-80%的甲醇/水梯度洗脱, 得到三个组分 Fr.3-2-1–Fr.3-2-3; Fr.3-2-2 (4.1 g) 经 Sephadex LH-20 层析, 1:1 的氯仿/甲醇为洗脱剂, 得到富集环肽的部分; 该部分再经硅胶层析, 20:1-5:1 的氯仿/甲醇为洗脱剂梯度洗脱, 得到四个组分 Fr.3-2-2-1–Fr.3-2-2-4; Fr.3-2-2-2 (821 mg) 经 ODS HPLC 半制备柱纯化, 45%乙腈和 5%三氟乙酸为洗脱剂, 得到 Astin P (14) (12 mg) 和 Astin E (5) (200 mg); Fr.3-2-2-3 (44 mg) 经 ODS HPLC 半制备柱纯化, 15%乙腈和 5%三氟乙酸为洗脱剂, 得到 Astin G (7) (12 mg)。Fr.3-2-2-4 (1.3 g) 经硅胶柱层析, 1:3-1:9 的氯仿/乙酸乙酯梯度洗脱, 将环肽部分富集, 该部分经 Sephadex LH-20 层析纯化后, 再经硅胶柱层析, 15:1-5:1 氯仿/甲醇梯度洗脱, 得到化合物 Astin B (2) (786 mg)。

实施例 2

实施例 1 制备所得菊科类型环肽化合物 Astins A-H(1-8)和 Astins K-P(9-14)在 MEF 细胞中检测对 DNA 类似物 ISD 刺激激活的 cGAS-STING 信号通路下游基因表达的影响。实验原理、方法和结果如下:

实验原理: 在固有免疫信号转导通路中, cGAS-STING 信号通路能够识别入侵机体的外源 DNA 病原微生物。外源 DNA 刺激能够诱导下游 I 型干扰素基因和干扰素刺激基因的表达。因此, 在外源 DNA (DNA 类似物 ISD) 刺激下, 通过检测通路下游基因 *IFN β* , *IFN α 4* 和 *CXCL10* 的表达可以反映 cGAS-STING 信号通路的激活情况, 从而评价化合物对 cGAS-STING 信号通路激活的影响。

实验方法: (1) 细胞培养: MEF 细胞使用含有 10%胎牛血清 (Gibco) 及含 50 U/mL 盘尼西林和 50 μ g/mL 链霉素的 DMEM (Invotrogen) 培养。培养条件为 37 °C、5%的 CO₂, 每两天传代一次; (2) 脂质体法转染与化合物处理: 将 MEF 细胞铺于 12 孔细胞培养板中, 用 10 μ M 相应的化合物和等量的 DMSO 预处理细胞 6 小时后, 用 Lipo2000 (Invotrogen) 转染 5 μ g ISD 刺激细胞, 6 小时后弃去培养液, 用 PBS 将细胞离心收集于 EP 管中; (3) RNA 抽提: 用 500 μ L TRIzol 将 (2) 中细胞裂解, 然后加入 100 μ L CHCl₃ 萃取裂解液中的 RNA, 4 °C 12000 g 离心 15 min, 转移 200 μ L 最上层清液到新的 EP 管中, 加入等体积的异丙醇将 RNA 沉淀出来, 静置 10 min 后, 4 °C 12000 g 离心 10 min, 去掉上清, 加入 1 mL 含 75%乙醇的 DEPC 水清洗沉淀, 4 °C 7500 g 离心 5 min, 去掉上清, 并在室温干燥沉淀 5 min, 然后用适量的 DEPC 水溶解 RNA 进行后续实验; (4) 实时荧光定量 PCR 检测下游基因表达: 以 (2) 中抽提得到细胞总 RNA 为模板, 以 oligo dT 为引物, 通过逆转录得到 cDNA。使用 Power SYBR GREEN PCR MASTER MIX (ABI) 试剂进行实时荧光定量 PCR, 以 GAPDH 作为内参基因。

实验结果见图2。其中,图2a为本发明的菊科类型环肽化合物 Astins A-H(1-8)和 Astins K-P(9-14)在 MEF 细胞中对 DNA 类似物 ISD 刺激激活的 *IFN β* mRNA 表达的抑制作用;图2b为 Astin C(3)在 MEF 细胞中对 DNA 类似物 ISD 刺激激活的 cGAS-STING 信号通路下游基因 *IFN β* , *IFN $\alpha 4$* 和 *CXCL10* 的表达的影响。

实验结果显示,菊科类型环肽化合物能够抑制 DNA 类似物 ISD 刺激下 cGAS-STING 信号通路下游基因 *IFN β* , *IFN $\alpha 4$* 和 *CXCL10* 的表达,其中 Astin C 活性最好,说明菊科类型环肽能抑制 cGAS-STING 信号通路活性,是目前发现的第一个该通路的抑制剂。

实施例 3

实施例 1 制备所得菊科类型环肽化合物 Astin C(3)对 HSV-1 诱导的小鼠血清中 *IFN β* 蛋白表达的影响。

实验原理:机体内 *IFN β* 蛋白的表达是固有免疫抗感染反应的标志事件,*IFN β* 表达后能够激活干扰素受体 (*IFNR*) 信号转导通路诱导干扰素刺激基因等细胞因子和炎症因子的表达,然后通过招募 NK 细胞或进一步激活适应性免疫反应等分子机制,最终清除入侵的病原微生物。因此,在 DNA 病毒 HSV-1 感染小鼠后,通过检测小鼠血清中 *IFN- β* 的表达量可以反映机体固有抗感染免疫反应的激活情况,从而评价化合物对机体固有抗感染免疫反应活性的影响。

实验方法:(1)构建 HSV-1 感染小鼠模型:取 6-8 周龄的野生型小鼠,通过尾静脉注射的方式将 100 μ L 滴度为 1×10^7 的 HSV-1 注射入小鼠体内,6 h 后收集获得血清进行后续实验;(2)化合物处理小鼠方式:通过尾静脉注射的方式向野生型小鼠注射一定浓度的化合物,每隔一天注射一次,注射 3 次;(3)眼眶取血法收集小鼠血液获得血清:用毛细管刺破小鼠眼眶毛细血管,通过毛细管引流收集 200 μ L 外周血到 EP 管中,室温静置过夜,然后 3000 rpm 离心 10 min,取上清;(4)ELISA 检测血清中 *IFN β* 蛋白含量:根据 Verikine 试剂盒 (PBL Assay Science) 的实验操作手册上的方法步骤检测小鼠血清中的 *IFN β* 蛋白的含量。

实验结果见图 3。

实验结果表明,菊科类型环肽化合物 Astin C(3)能够明显降低 HSV-1 诱导的小鼠血清中 *IFN β* 蛋白含量,说明菊科类型环肽能在体内抑制 cGAS-STING 信号通路活性。

实施例 4

实施例 1 所得化合物 Astins A-H(1-8)和 Astins K-P(9-14),加入 4%的硫酸乙醇溶液,PH=4,过滤,干燥,制成硫酸盐化合物 1-14。

实施例 5

实施例 1 所得化合物 Astins A-H(1-8)和 Astins K-P(9-14),加入 4%的盐

酸溶液，PH = 4，过滤，干燥，制成盐酸盐化合物 1-14。

实施例 6

实施例 1 所得化合物 Astins A-H (1-8) 和 Astins K-P (9-14)，加入 4% 的酒石酸溶液，PH = 4，过滤，干燥，制成酒石酸盐化合物 1-14。

实施例 7

实施例 1 所得化合物 Astins A-H (1-8) 和 Astins K-P (9-14)，加入 4% 的柠檬酸溶液，PH = 4，过滤，干燥，制成柠檬酸盐化合物 1-14。

实施例 8

片剂：实施例 1 所得化合物 Astins A-H (1-8) 和 Astins K-P (9-14) 或实施例 4-7 所得的盐 10 mg，乳糖 180 mg，淀粉 55 mg，硬脂酸镁 5 mg。

制备方法：将化合物或其盐、乳糖和淀粉混和，用水均匀湿润，把湿润后的混合物过筛并干燥，再过筛，加入硬脂酸镁，然后将混合物压片，每片重 250 mg，化合物含量为 10 mg。

实施例 9

安瓿剂：实施例 1 所得化合物 Astins A-H (1-8) 和 Astins K-P (9-14) 或实施例 4-7 所得的盐 2 mg，氯化钠 10 mg。

制备方法：将化合物或其盐和氯化钠溶解于适量的注射用水中，过滤所得溶液，在无菌条件下装入安瓿瓶中。

实施例 10

注射用冻干剂：实施例 1 所得化合物 Astins A-H (1-8) 和 Astins K-P (9-14) 或实施例 4-7 所得的盐 10 mg，碳酸氢钠 2 mg，甘露醇 252 mg。

制备方法：将碳酸氢钠、甘露醇，加注射用水溶解，加活性炭吸附 30 分钟除热原，过滤除去活性炭，在滤液中加入化合物或其盐，超声处理使溶解，用 1 N 盐酸调节 PH 为 5.0-7.0，微孔滤膜滤过，加注射用水，分装，冷冻干燥，上塞，轧盖，即得。

实施例 11

胶囊剂：实施例 1 所得化合物 Astins A-H (1-8) 和 Astins K-P (9-14) 或实施例 4-7 所得的盐 10mg，乳糖 187 mg，硬脂酸镁 3mg。

制备方法：将化合物或其盐与助溶剂混和，过筛，均匀混合，把得到的混合物装入硬明胶胶囊，每个胶囊重 200 mg，活性成分含量为 10 mg。

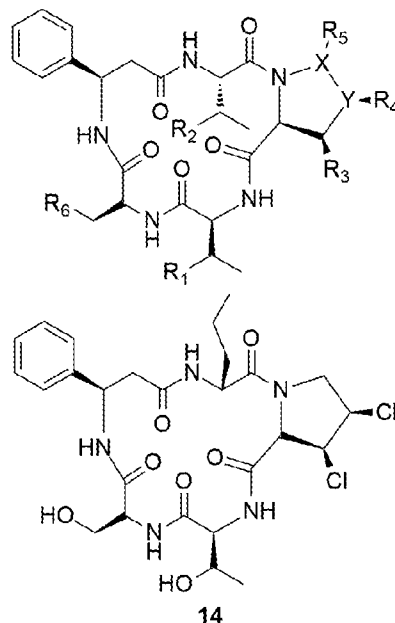
权 利 要 求 书

1、菊科类型环肽化合物或其药理学上容许的盐作为 cGAS-STING 信号通路抑制剂的的应用。

2、菊科类型环肽化合物或其药理学上容许的盐作为 cGAS-STING 信号通路抑制剂在制备治疗 cGAS-STING 信号通路异常激活的疾病的药物中的应用。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的应用，其特征在于，所述菊科类型环肽化合物为骨架含有 β -苯丙氨酸，并以正常氨基酸肽键直接相连形成的单环均五肽化合物，含有一个 L- β -苯丙氨酸、一个 L-丝氨酸衍生物、一个 L-脯氨酸衍生物和两个其他氨基酸衍生物。

4、根据权利要求 3 所述的应用，其特征在于，所述菊科类型环肽化合物为下述结构式所示的菊科类型环肽 Astins A-H (1-8) 和 Astins K-P (9-14)，



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	X-Y
1	H	OH	Cl	Cl	H	OH	CH-CH
2	OH	H	Cl	Cl	Cl	OH	CH-CH
3	H	H	Cl	Cl	H	OH	CH-CH
4	H	H	H	H	Cl	OH	C=C
5	OH	H	H	H	Cl	OH	C=C
6	H	H	Cl	H	H	OH	CH-CH
7	H	H	H	H	H	OH	CH-CH
8	H	OH	H	H	Cl	OH	C=C
9	OH	OH	Cl	Cl	H	OH	CH-CH
10	OH	OH	H	H	Cl	OH	C=C
11	H	H	H	Cl	H	OH	CH-CH
12	H	H	H	Cl	H	OH	C=C
13	H	H	Cl	Cl	H	OAc	CH-CH

5、根据权利要求 4 所述的应用，其特征在于，所述菊科类型环肽为 Astin C。

6、根据权利要求 1 或 2 所述的应用，其特征在于，所述菊科类型环肽提取自紫菀属植物紫菀的根及根茎。

7、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述菊科类型环肽化合物或其药理学上容许的盐能够抑制 DNA 类似物 ISD 刺激下 cGAS-STING 信号通路下游基因 *IFN β* 、*IFN α 4* 和 *CXCL10* 的表达。

8、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述的药理学上容许的盐包括与无机酸、有机酸、碱金属、碱土金属或者碱性氨基酸形成的盐。

9、根据权利要求 2 所述的应用，其特征在于，所述 cGAS-STING 信号通路异常激活的疾病包括自身免疫性、炎症性疾病和癌症。

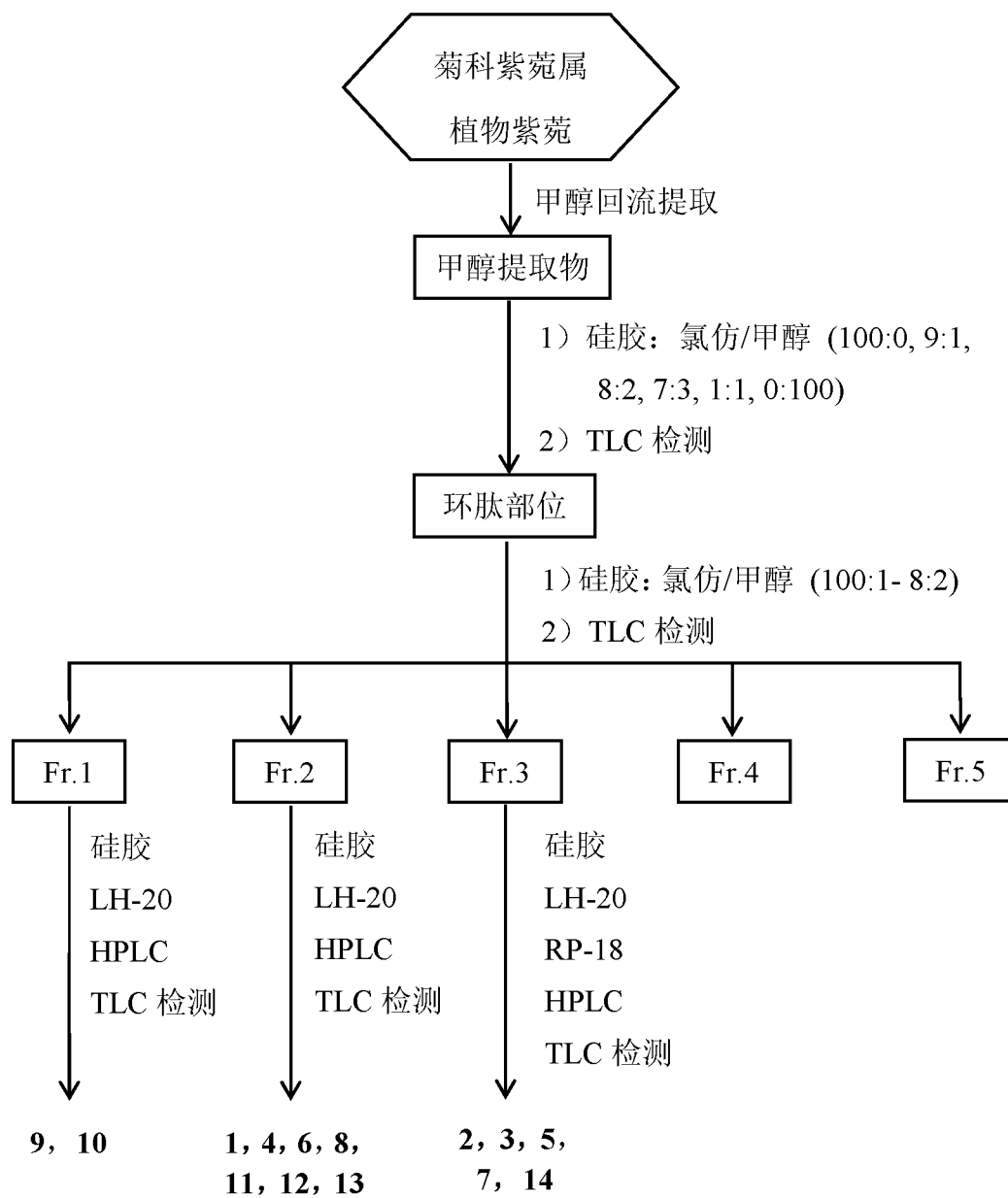


图 1

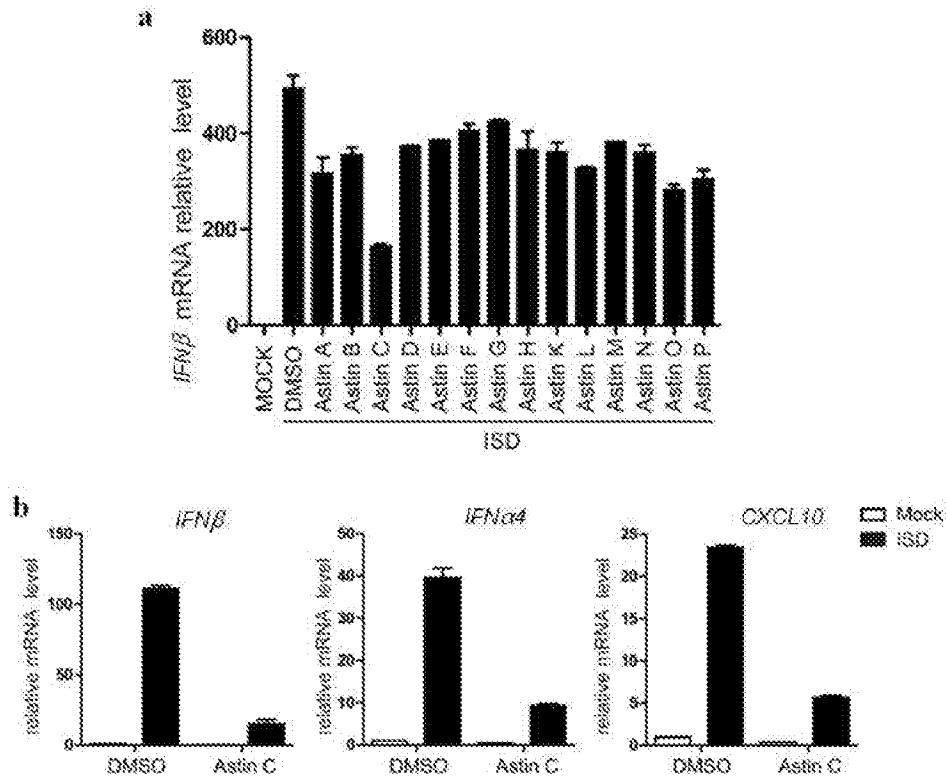


图 2

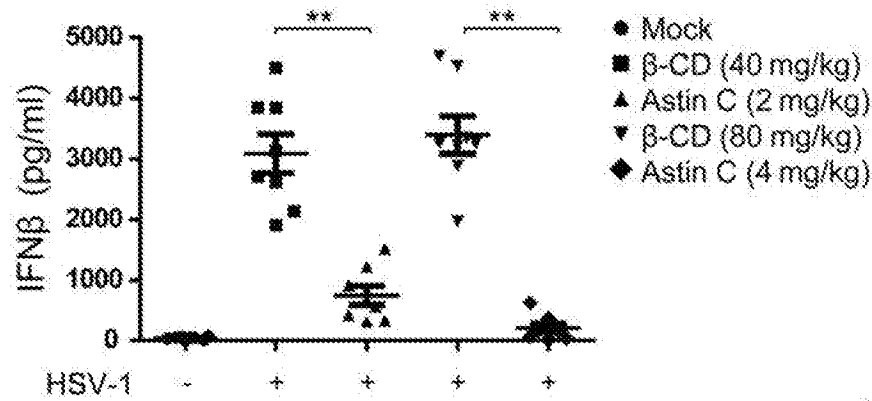


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/073571

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/12 (2006.01) i; A61P 29/00 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i; A61P 37/02 (2006.01) i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K; A61P;

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DWPI; CNABS; SIPOABS; CNTXT; CNKI; Google; ISI web of knowledge; 申请人/发明人, 菊科环肽, 五环肽, 紫菀, 癌症, 肿瘤, 免疫性, 炎症, Astin, Astin C, Tataricin, immunosuppress#, cyclopeptide?, pentapeptide?, cancer, cGAS-STING, IFN β , IFN α 4, CXCL10, immune disease, inflammatory disease

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 107335049 A (CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY) 10 November 2017 (10.11.2017), entire document	1-9
X	XU, H.M et al. Astins K-P, Six New Chlorinated Cyclopentapeptides from Aster Tataricus. TETRAHEDRON. 08 July 2013 (08.07.2013), no. 69, the abstract, figure 1, and page 7966, section 4. 2	2-6, 9
X	CN 102174083 A (KUNMING BOTANY INSTITUTE; CHINESE ACADEMY OF SCIENCES et al.) 07 September 2011 (07.09.2011), claims 6-9, and embodiment 3	2-6, 9

☐ 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 16 April 2018	Date of mailing of the international search report 08 May 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 JIN, Chunpeng Telephone No. (86-10) 53961947

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/073571

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MORITA, H et al. Structures and Conformation of Antitumour Cyclic Pentapepti-des, Astins A, B and C, from Aster tataricus. TETRAHEDRON. 31 December 1995 (31.12.1995), 51(4), the abstract	2-6, 9
X	房慧勇等. 紫菀的化学成分及其药理活性研究进展. 医学研究与教育. 31 October 2012 (31.10.2012), 29(5), sections 2.2 and 2.5. (FANG, Huiyong et al. Advances on chemical components and pharmacological actions of Aster tataricus. Medical Research and Education.)	2-6, 9
X	许文彦等. 一些重要天然活性环肽化学和生物活性研究进展. 药学报. 31 December 2012 (31.12.2012), 47(3), the abstract, and section 3.2. (XU, Wenyan et al. Progress in the study of some important natural bioactive cyclopeptides. Acta Pharmaceutica Sinica.)	2-6, 9
A	田苗等. 紫菀属植物的化学成分研究进展. 广州化工. 30 September 2013 (30.09.2013), 41(18), pp. 40-43. (TIAN, Miao et al. Study on the Chemical Ingredients from the Aster L. Plant. Guangzhou Chemical Industry.)	1-9
A	丁亮等. 新型胞质 DNA 感受通路: cGAS-STING 的研究进展. 生物化学与生物物理进展. 31 December 2014 (31.12.2014), 41(9), pp. 830-838. (DING, Liang et al. cGAS-STING: The Novel Mechanism of Cytosolic DNA Sensing Pathways. Progress in Biochemistry and Biophysics.)	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/073571

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.: 1, 3-8 (refer to claim 1)
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The application of Claims 1, 3-8 (referring to claim 1) as a signaling pathway inhibitor involves the treatment of the subject's corresponding disease, which is the treatment method for the disease according to PCT rule 39.1(iv). This report is made on the basis of the use of composite cyclopeptide compounds or pharmacologically permissible salts thereof for the preparation of inhibitors.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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. ☐ 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 SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2018/073571

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 107335049 A	10 November 2017	None	
CN 102174083 A	07 September 2011	CN 102174083 B	06 March 2013

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/073571

A. 主题的分类

A61K 38/12(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 37/02(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61K; A61P;

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

DWPI; CNABS; SIPOABS; CNTXT; CNKI; Google; ISI web of knowledge; 申请人/发明人, 菊科环肽, 五环肽, 紫菀, 癌症, 肿瘤, 免疫性, 炎症, Astin, Astin C, Tataricin, immunosuppress#, cyclopeptide?, pentapeptide?, cancer, cGAS-STING, IFN β , IFN α 4, CXCL10, immune disease, inflammatory disease

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 107335049 A (中国药科大学) 2017年 11月 10日 (2017 - 11 - 10) 全文	1-9
X	XU, H.M等. "Astins K-P, six new chlorinated cyclopentapeptides from Aster tataricus." TETRAHEDRON., 第69卷, 2013年 7月 8日 (2013 - 07 - 08), 摘要, 图1, 第7966页第4.2节	2-6, 9
X	CN 102174083 A (中国科学院昆明植物研究所 等) 2011年 9月 7日 (2011 - 09 - 07) 权利要求6-9, 实施例3	2-6, 9
X	MORITA, H 等. "Structures and conformation of antitumour cyclic pentapeptides, Astins A, B and C, from Aster tataricus." TETRAHEDRON., 第51卷, 第4期, 1995年 12月 31日 (1995 - 12 - 31), 摘要	2-6, 9
X	房慧勇 等. "紫菀的化学成分及其药理活性研究进展" 医学研究与教育, 第29卷, 第5期, 2012年 10月 31日 (2012 - 10 - 31), 第2.2节, 2.5节	2-6, 9

☒ 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 4月 16日

国际检索报告邮寄日期

2018年 5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

受权官员

靳春鹏

传真号 (86-10)62019451

电话号码 86- (010) -53961947

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	许文彦 等. “一些重要天然活性环肽化学和生物活性研究进展” 药学学报, 第47卷, 第3期, 2012年 12月 31日 (2012 - 12 - 31), 摘要, 第3.2节	2-6, 9
A	田苗 等. “紫菀属植物的化学成分研究进展” 广州化工, 第41卷, 第18期, 2013年 9月 30日 (2013 - 09 - 30), 第40-43页	1-9
A	丁亮 等. “新型胞质DNA感受通路: cGAS-STING的研究进展” 生物化学与生物物理进展, 第41卷, 第9期, 2014年 12月 31日 (2014 - 12 - 31), 第830-838页	1-9

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： 1, 3-8(引用涉及权利要求1)
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求1, 3-8(引用涉及权利要求1)作为信号通路抑制剂的应用，涉及了用于治疗受试者的相应疾病，属于PCT细则39.1(iv)规定的疾病的治疗方法，本报告基于将菊科类型环肽化合物或其药理学上容许的盐用于制备抑制剂的用途作出。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/073571

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	107335049	A	2017年 11月 10日	无			
CN	102174083	A	2011年 9月 7日	CN	102174083	B	2013年 3月 6日