



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103239466 A

(43) 申请公布日 2013.08.14

(21) 申请号 201310168243.1

(22) 申请日 2013.05.06

(71) 申请人 中国科学院武汉病毒研究所

地址 430071 湖北省武汉市洪山区小洪山中区 44 号

(72) 发明人 陈绪林 郭文炎 吴阳 廖庆姣

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001

代理人 王敏锋

(51) Int. Cl.

A61K 31/7048(2006.01)

A61P 31/14(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

一种石榴皮鞣素在制备治疗或预防丙型肝炎病毒感染药物中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种石榴皮鞣素在制备治疗或预防丙型肝炎病毒感染药物中的应用。选用基本无毒性的药物浓度进行抗病毒实验,通过检测石榴皮鞣素对丙型肝炎病毒复制的影响,显示了该化合物具有显著的抗丙型肝炎病毒活性并呈剂量依赖效应。进一步实验证实,石榴皮鞣素可以阻碍 HCV 吸附和侵入到靶细胞,从而抑制 HCV 的进入和再感染。同时,该化合物还能显著降低 HCVNS3 丝氨酸蛋白酶活性。因此,通过单独使用或者与其他抗 HCV 药物联合使用,石榴皮鞣素能够在预防或者治疗丙型肝炎病毒感染过程中发挥重要作用。

1. 一种石榴皮鞣素在制备治疗或预防丙型肝炎病毒感染药物中的应用。
2. 如权利要求 1 所述的应用,其特征在于:所述的抗丙型肝炎药物是以石榴皮鞣素作为药物活性成分,制成片剂、胶囊、颗粒剂、口服液、缓释制剂、控释制剂、纳米制剂、注射剂任何一种药学上可接受的剂型。

## 一种石榴皮鞣素在制备治疗或预防丙型肝炎病毒感染药物中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及属于医药技术领域,更具体涉及一种石榴皮鞣素在制备治疗或预防丙型肝炎病毒(HCV)感染药物中的应用。

### 背景技术

[0002] 丙型肝炎病毒(Hepatitis C Virus, HCV)发现于 1989 年,它是引起输血后非甲非乙型肝炎的主要病原体。目前全球约有 1.7 亿人感染 HCV。HCV 感染呈世界性分布,感染率约有 3%,其中每年新增病例 300 ~ 400 万。我国血清流行病学调查资料显示,一般人群 HCV 阳性率为 3.2%。HCV 的主要传播途径包括输血或血制品的传播、静脉吸毒传播、性接触和母婴传播等。HCV 感染极易导致慢性化,只有 20% 左右的 HCV 感染者可自愈,而大约 80% 的急性感染者会发展成为慢性感染,其中 20% 的慢性感染者会在其后的 5 到 10 年终发展为肝硬化,甚至肝癌。HCV 除了会影响肝脏之外,还会引起其他组织和器官的病变。例如:混合型冷凝球蛋白血症,非何杰金氏淋巴瘤和膜性增生性肾小球肾炎。

[0003] 现阶段抗-HCV 的治疗方法主要局限于聚乙二醇偶联的长效  $\alpha$  干扰素(peg-IFN)和病毒唑(Ribavirin)的结合疗法。该疗法对 HCV 的治愈率只有 40% (1 型 HCV 感染者)~80% (2 型 HCV 感染者),且疗程长,价格昂贵,副作用明显。当然,随着针对 HCV 研究的不断深入,许多以 HCV 蛋白为靶点的药物不断涌现。Telaprevir 与 Boceprevir 同属于直接抗病毒药物中蛋白酶抑制剂 (PI),随着这两个直接抗病毒药物 Telaprevir 以及 Boceprevir 在 2011 年的陆续上市,丙型肝炎的标准治疗方案将有重大的改进。但是目前尚无有效疫苗预防 HCV 感染。因此,HCV 感染仍然是目前危害全球人口健康的一个重要公共卫生问题。

[0004] 单宁主要来源于植物体,是植物体内复杂酚类次生代谢产物,故又称为植物多酚。除茶叶、咖啡来源的小分子假单宁 (Pseudo tannins) 外,多数单宁分子量在 500 ~ 3000 之间。除了褐藻多酚 (间苯三酚的低聚物),其他单宁基本上可以分为两类:缩合单宁和水解单宁。其中,水解单宁主要是聚鞣酸酯类多酚,即鞣酸及其衍生物与多元醇以酯键连接而成,可以分为鞣单宁和鞣花单宁两类。本发明涉及的石榴皮鞣素就属于鞣花单宁。目前,没有石榴皮鞣素在抗丙型肝炎病毒方面的应用。

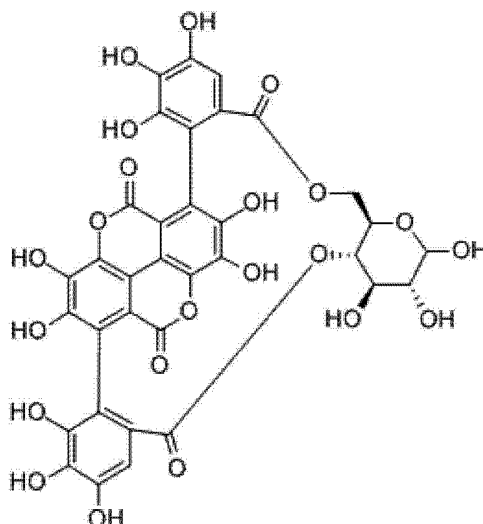
### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供了一种石榴皮鞣素在制备治疗或预防丙型肝炎病毒感染药物中的应用,从而为临床上丙型肝炎的治疗提供一类安全高效且毒副作用小的化合物。通过单独使用或者与其他抗 HCV 药物联合使用,石榴皮鞣素能够在预防或者治疗丙型肝炎病毒感染过程中发挥重要作用。

[0006] 为了实现上述的目的,本发明采用的技术方案是:

[0007] 一种石榴皮鞣素 (Punicalin) 在制备治疗或预防丙型肝炎病毒感染药物中的应用,该化合物具有如下结构式:

[0008]



[0009] 其中 :O 代表氧原子, H 为氢原子。

[0010] 一种石榴皮鞣素在制备治疗或预防丙型肝炎病毒感染药物中的应用,其步骤是:

[0011] A. 石榴皮鞣素在 Huh7. 5. 1 细胞上毒性实验:

[0012] Huh7. 5. 1 细胞按  $8 \times 10^3$  个细胞 / 孔接种于 96 孔细胞培养板中,细胞贴壁后,分别用不同梯度浓度的药物进行处理,每组重复三个孔,置于  $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  培养箱中培养 48 ~ 72 小时后,以 3-(4,5- 二甲基噻唑 -2)-2,5- 二苯基四氮唑溴盐(噻唑蓝, MTT) 法检测细胞的存活率。

[0013] 本实验结果如图 2 所示,石榴皮鞣素浓度为  $50 \mu\text{M}$  (微摩尔) 时,细胞存活率依然达到 80% 以上,浓度为  $25 \mu\text{M}$  及其以下时,细胞存活率接近 100%。这表明,石榴皮鞣素细胞毒性比较小,在  $25 \mu\text{M}$  及其以下浓度时,对细胞几乎没有毒性。

[0014] B. 石榴皮鞣素抗丙型肝炎病毒活性的评价:

[0015] (1)质粒 PJFH1-Luc-5AGFP 的构建:在 PJFH1 上进行质粒改造,选取 NS5A 编码区 C 端一个酶切位点 XhoI (nt7523 ~ nt7528, aa419 ~ aa420) 插入 EGFP 基因。为使 hRLuc 基因插入到 JFH1 基因组的 5' NTR 与 core 基因之间,在 5' NTR 后添加了 51nt 的 HCV core 基因编码序列  $\Delta\text{C}$ ,使重组病毒的 5' 端 IRES 功能完整;紧接着通过一个口蹄疫病毒 2A 蛋白自切割短肽 (foot-and-mouth disease virus2A, FMDV2A) 融合在 hRLuc 基因的 C 端,使其与 HCV Core 蛋白分离。(2)病毒 JFH1 和 JFH1-Luc-5AGFP 的制备:以 XbaI 线性化后的质粒 pJFH1、PJFH1-Luc-5AGFP 为模板,体外转录得到病毒基因组 RNA,然后电转 Huh-7. 5. 1 细胞。9 ~ 10 天后,将出现明显细胞病变,于是收集培养基上清,分装后  $-80^\circ\text{C}$  冻存。为了得到大量的病毒储存液,以 0.02 的感染复数用病毒感染 Huh7. 5. 1 细胞,待出现明显细胞病变后,收集感染性上清,储存待用。(3)将 Huh7. 5. 1 细胞按  $8 \times 10^3$  个 / 孔接种于 96 孔细胞培养板中, $37^\circ\text{C}$  细胞培养箱中培养 14 ~ 18h 后,待细胞长成单层后备用。用 DMEM 培养基将石榴皮鞣素 2 倍稀释成 8 个浓度梯度,每组 2 个重复。将不同剂量药物加入到培养皿中 12h 后,按 0.2 的感染复数加入 JFH1-Luc-5AGFP 病毒,感染后 72h 后进行荧光素酶检测,然后通过检测荧光素酶活性来研究药物抗病毒活性。

[0016] 本实验结果如图 2 所示,石榴皮鞣素剂量依赖地抑制了 HCV 在细胞内的增殖。当药物浓度为  $25 \mu\text{M}$  时,细胞接近 100% 存活,而药物对病毒复制的抑制率达到了 98%。这表明,

石榴皮鞣素对 HCV 的抑制是真实的,而不是由于对细胞的毒性而导致病毒复制受到抑制。

[0017] C. 石榴皮鞣素抑制丙型肝炎病毒吸附 (attachment) 和侵入 (penetration) 的研究:

[0018] (1) Huh7. 5. 1 细胞按  $8 \times 10^3$  个细胞 / 孔接种于 96 孔细胞培养板中。(2) 细胞贴壁后, 96 孔培养板置于  $4^{\circ}\text{C}$  预冷 0.5 ~ 1h。(3) 吸附 (attachment) 实验中, 用预冷至  $4^{\circ}\text{C}$  的 DMEM 培养基将石榴皮鞣素以 2 倍梯度稀释成 8 个浓度梯度, 同时按 0.2 的感染复数加入 JFH1-LUC-5AGFP 病毒至预先  $4^{\circ}\text{C}$  孵育的 96 孔培养板, 继续置于  $4^{\circ}\text{C}$  环境 3h, 之后吸去 96 孔板中培养基, 用  $4^{\circ}\text{C}$  预冷的 PBS 洗一遍, 加入新鲜 DMEM 培养基并置于  $37^{\circ}\text{C}$  培养箱培养 72h。(4) 侵入 (penetration) 实验中, 先直接以 0.2 的感染复数加入 JFH1-LUC-5AGFP 病毒至预先  $4^{\circ}\text{C}$  孵育的 96 孔培养板, 然后置于  $4^{\circ}\text{C}$  环境 3h, 之后吸去 96 孔板中培养基, 用  $4^{\circ}\text{C}$  预冷的 PBS 洗一遍, 然后加入不同浓度石榴皮鞣素 (用 DMEM 培养基以 2 倍梯度稀释成 8 个浓度梯度), 于  $37^{\circ}\text{C}$  细胞培养箱培养 72h。(5) 裂解细胞, 通过检测荧光素酶活性来研究石榴皮鞣素对 HCV 吸附和侵入的作用。

[0019] 实验结果如图 3 所示, 石榴皮鞣素既剂量依赖地抑制 HCV 吸附到靶细胞表面, 也剂量依赖地抑制吸附之后病毒侵入靶细胞这一过程。25  $\mu\text{M}$  石榴皮鞣素对 HCV 吸附和侵入的抑制率, 分别达到 68% 和 53%。

[0020] D. 石榴皮鞣素体外抑制 HCV NS3 丝氨酸蛋白酶活性的作用研究:

[0021] (1) 配置好反应缓冲液: 50mM Hepes+0.1M NaCl+20% 甘油 +5mM DDT+10uM KK4A。(2) 取洁净的 96 孔板, 每孔加入 75uL 反应缓冲液, 5uL 纯化的 NS3 蛋白溶液, 混匀。(3) 96 孔板每孔加入 10uL 用反应缓冲液稀释的不同浓度石榴皮鞣素, 混匀后置于室温 10 分钟。(4) 96 孔板每孔加入 10uL 10 $\times$ NS3 蛋白酶 FRET 底物,  $37^{\circ}\text{C}$  反应 1 小时。(5) 用 Perkin Elmer 公司 Envision2102 多标记读板机, 以激发光 355 纳米, 发射光 495 纳米检测荧光信号。对酶活性的抑制率计算方法为:

[0022] 抑制率 (%) =  $[(c - a) - (b - a)] / (c - a) \times 100$ , 其中 a=DMSO+ 底物, b= 蛋白酶 + 抑制剂 + 底物, c=DMSO+ 蛋白酶 + 底物。

[0023] 本实验结果如图 4 所示。在体外化学反应水平上, 石榴皮鞣素剂量依赖地抑制了 HCVNS3 丝氨酸蛋白酶活性。石榴皮鞣素浓度为 10  $\mu\text{M}$  时, 对 NS3 蛋白酶活性抑制率达到 64%; 当浓度增大到 100  $\mu\text{M}$  时, 石榴皮鞣素 100% 抑制了 NS3 的蛋白酶活性。

[0024] 本发明与现有技术相比, 具有以下优点和效果:

[0025] 1. 作为一种鞣花单宁, 石榴皮鞣素不仅在石榴中存在, 也在榄仁等植物中大量存在, 是一种来源广泛的天然产物, 毒副作用较小。

[0026] 2. 石榴皮鞣素在 HCV 感染性培养系统上 EC50 为 3.44uM (微摩尔), CC50>50uM, 故选择指数相对比较高 (CC50/EC50>14), 能显著抑制丙型肝炎病毒的进入和复制。

[0027] 3. 石榴皮鞣素能抑制 HCV 生活周期的多个阶段, 是具有显著抗 HCV 活性的多靶标化合物。

#### 附图说明

[0028] 图 1 为一种石榴皮鞣素的化学结构式。

[0029] 图 2 为石榴皮鞣素在 Huh7. 5. 1 上的细胞毒性和抗病毒活性检测示意图。

[0030] 图3为石榴皮鞣素在Huh7.5.1上针对HCV进入的两个阶段——吸附和侵入的抑制活性检测示意图。

[0031] 图4为石榴皮鞣素体外抑制HCV NS3 丝氨酸蛋白酶活性示意图。

## 具体实施方式

[0032] 为了更好地理解本发明的内容,下面结合具体实施方式对本发明内容作进一步说明,但本发明的保护内容不局限于以下实施例。

[0033] 实施例1:石榴皮鞣素抗丙型肝炎病毒活性的评价

[0034] 1. 实验材料

[0035] 1.1 细胞、质粒、病毒和药物

[0036] Huh7.5.1 细胞由 Dr.F.V.Chisari 惠赠;含有 HCV2a 型 JFH1 病毒株基因组全序列的质粒 pJFH1 由 Dr.Takaji Wakita 教授惠赠。带有报告基因的病毒 JFH1-5AGFP 由申请人本实验室制备(参考步骤B—石榴皮鞣素抗丙型肝炎病毒活性的评价 || 或者参考 Wu Y,Liao Q,Yang R,et al.A novel luciferase and GFP dual reporter virus for rapid and convenient evaluation of hepatitis C virus replication[J].Virus Research, 2011, 155(2):406-414. );石榴皮鞣素购自上海楷洋生物技术有限公司。

[0037] 1.2 试剂

[0038] DMEM 培养基购自 GIBCO 公司;MTT 检测试剂购自 biomol 公司;限制性内切酶购自 NEB 公司。

[0039] 1.3 实验仪器

[0040] 蔡司高级倒置显微镜 Axio observer A1(Carl Zeiss);PerkinElmer 多功能检测仪。

[0041] 2. 实验方法与结果

[0042] 2.1 药物细胞毒性检测

[0043] 37℃,5%CO<sub>2</sub> 加湿培养箱中培养。使用含有 10% FBS、100U/mL 的青霉素和链霉素的 DMEM 培养基。细胞至 90% 汇合度后传代,传代比例 1/4 - 1/6。Huh7.5.1 细胞按 8×10<sup>3</sup> 个细胞/孔接种于 96 孔细胞培养板中,细胞贴壁后备用。用培养基将石榴皮鞣素从 50 μM 开始,2 倍梯度依次稀释成 8 个浓度,每浓度 3 个复孔。培养 72h 后于每孔中加入 5mg/ml MTT20 μl,置细胞培养箱中继续培养;培养 4h 后,弃培养液上清,每孔加入 100 μl/孔三联溶解液(溶解液由 SDS10g,异丁醇 5ml,10M HCl0.1ml,用双蒸水溶解配成 100ml),37℃培养箱中溶解过夜后多功能检测仪检测 570nm 波长处吸光值,校正波长为 630nm,并计算药物浓度细胞存活率。结果如图 2(存活率曲线图)所示,石榴皮鞣素浓度为 50 μM(微摩尔)时,细胞存活率依然达到 80% 以上,浓度为 25 μM 及其以下时,细胞存活率接近 100%。这表明,石榴皮鞣素细胞毒性比较小,在 25 μM 及其以下浓度时,对细胞几乎没有毒性。

[0044] 2.2 质粒 pJFH1-5AGFP 的构建和病毒 JFH1-5AGFP 的制备;

[0045] 在 pJFH1 上进行质粒改造,选取 NS5A 编码区 C 端一个酶切位点 XhoI (nt7523 ~ nt7528,aa419 ~ aa420)插入 EGFP 基因(扩增自 PEGFP-N1 质粒)。质粒构建成功后,测序鉴定。以 XbaI 线性化后的质粒 pJFH1-5AGFP 为模板,体外转录得到病毒基因组 RNA,然后电转 Huh-7.5.1 细胞。9 ~ 10 天后,将出现明显细胞病变,于是收集培养基上清,分装后 -80℃冻

存。为了得到大量的病毒储存液,以 0.02 的感染复数用病毒感染 Huh7. 5. 1 细胞,待出现明显细胞病变后,收集感染性上清,储存待用。

[0046] 2.3 通过检测荧光素酶活性来验证石榴皮鞣素抗病毒株 JFH1-Luc-5AGFP 活性。

[0047] 荧光素酶(Luciferase)报告基因系统是以荧光素(luciferin)为底物来检测荧光素酶活性的一种报告系统。荧光素酶可以催化荧光素氧化成氧化荧光素,在荧光素氧化的过程中,会发出生物荧光(bioluminescence)。然后通过荧光测定仪也称化学发光仪(luminometer)或液闪测定仪测定荧光素氧化过程中释放的生物荧光。荧光素和荧光素酶这一生物发光体系,可以极其灵敏、高效地检测基因的表达。申请人实验室制备的 JFH1-Luc-5AGFP 病毒株中带有 Luciferase 报告基因,因此可以很灵敏的定量药物对病毒基因表达的影响。将 Huh7. 5. 1 细胞按  $8\times 10^3$  细胞 / 孔接种于 96 孔细胞培养板中,37℃ 细胞培养箱中培养 14 ~ 18h 后,待细胞长成单层后备用。用培养基将石榴皮鞣素从最高浓度 1250ug/mL 以 2 倍梯度稀释成 10 个浓度,每组 3 个重复。将不同剂量药物加入到培养板中 2h 后,按 0.2 的感染复数加入 JFH1-Luc-5AGFP 病毒,感染后 72h 进行荧光素酶检测,待测细胞用 PBS 洗 2 遍,然后用 Renilla 荧光素酶检测试剂盒说明书的方法加入裂解液使细胞充分裂解,然后将裂解样品加入稀释好的底物中,在荧光素酶检测仪上进行检测。结果以相对荧光单位数值(relative light units, RLU)显示。实验数据表示为三次独立实验的平均值,误差以标准差表示。

[0048] 本实验结果如图 2(抑制率曲线图)所示,与不加药物,只感染病毒的对照孔相比,石榴皮鞣素剂量依赖地抑制了 HCV 在细胞内的增殖。当药物浓度为 25  $\mu$  M 时,细胞接近 100% 存活,而药物对病毒复制的抑制率达到了 98%。这表明,石榴皮鞣素对 HCV 的抑制是真实的,而不是由于对细胞的毒性而导致病毒复制受到抑制。

[0049]

药物浓度 ( $\mu$ M)	50	25	12. 5	6. 25	3. 12	1. 56	0. 78	0. 39
平均细胞存活率	83. 15	103. 94	103. 94	104. 31	101. 92	101. 56	99. 10	100. 20
平均病毒抑制率	99. 83	98. 44	93. 27	72. 76	50. 24	18. 65	7. 36	2. 71

[0050] 2.4 病毒吸附和侵入检测(Attachment&Penetration assay)

[0051] Hu7. 5. 1 细胞 4° C 预冷 1 小时。用培养基将石榴皮鞣素从 25  $\mu$  M 开始,2 倍梯度依次稀释成 8 个浓度并且预冷至 4° C 备用。然后,在病毒吸附实验中,将上述含不同浓度药物的培养基加入 96 孔板各孔中,同时感染 HCV(JFH1) 50  $\mu$  L/ 孔,继续 4° C 放置 3 小时,让病毒尽可能充分吸附到靶细胞上,之后用预冷 PBS 洗去没有吸附的病毒;在病毒侵入实验中,先不加药物,让 HCV 直接和细胞 4° C 孵育 3 小时,预冷 PBS 洗去没有吸附的病毒后,快速加入上述的含不同浓度药物的培养基并立刻转移到 37° C 继续培养 1 小时,然后去除含药培养基,用 PBS 洗去残余药物。最后,经过不同处理的细胞都更换成新鲜培养基,37℃ 再培养大约 48 小时。之后通过报告基因荧光素酶的检测,来计算药物对 HCV 吸附和侵入的影响。

[0052] 实验结果如图 3 所示,以不加药物只感染病毒的培养孔为对照(抑制率视为 0%),石榴皮鞣素既剂量依赖地抑制 HCV 吸附到靶细胞表面,也剂量依赖地抑制吸附之后病毒侵

入靶细胞这一过程。25  $\mu\text{M}$  石榴皮鞣素对 HCV 吸附和侵入的抑制率, 分别达到 68% 和 53%。

[0053]

药物浓度 ( $\mu\text{M}$ )	25.00	12.50	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.20
吸附平均抑制率	68.63	60.36	43.70	35.85	28.29	27.17	21.57	9.52
侵入平均抑制率	53.04	41.08	34.91	30.86	23.43	14.66	6.27	3.28

[0054] 2.5HCV NS3 丝氨酸蛋白酶活性检测

[0055] (1) 配置好反应缓冲液: 50mM Hepes+0.1M NaCl+20% 甘油 +5mM DDT+10uM KK4A。

(2) 取洁净的 96 孔板, 每孔加入 75uL 反应缓冲液, 5uL 纯化的 NS3 蛋白溶液, 混匀。(3) 96 孔板每孔加入 10uL 用反应缓冲液稀释的不同浓度石榴皮鞣素 (100  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 0.1  $\mu\text{M}$  和 0.01  $\mu\text{M}$ ), 混匀后置于室温 10 分钟。(4) 96 孔板每孔加入 10uL 10 $\times$ NS3 蛋白酶 FRET 底物, 37 $^{\circ}\text{C}$  反应 1 小时。(5) 用 Perkin Elmer 公司 Envision2102 多标记读板机, 以激发光 355 纳米, 发射光 495 纳米检测荧光信号。对酶活性的抑制率计算方法为:

[0056] 抑制率(%) =  $[(c - a) - (b - a)] / (c - a) \times 100$ , 其中 a=DMSO+ 底物, b= 蛋白酶 + 抑制剂 + 底物, c=DMSO+ 蛋白酶 + 底物

[0057] 本实验结果如图 4 所示。在体外化学反应水平上, 石榴皮鞣素剂量依赖地抑制了 HCV NS3 丝氨酸蛋白酶活性。石榴皮鞣素浓度为 10  $\mu\text{M}$  时, 对 NS3 蛋白酶活性抑制率达到 64%; 当浓度增大到 100  $\mu\text{M}$  时, 石榴皮鞣素 100% 抑制了 NS3 的蛋白酶活性。

[0058]

药物浓度 ( $\mu\text{M}$ )	0.01	0.1	1	10	100
酶活性平均抑制率	2.99	17.60	39.98	64.14	100



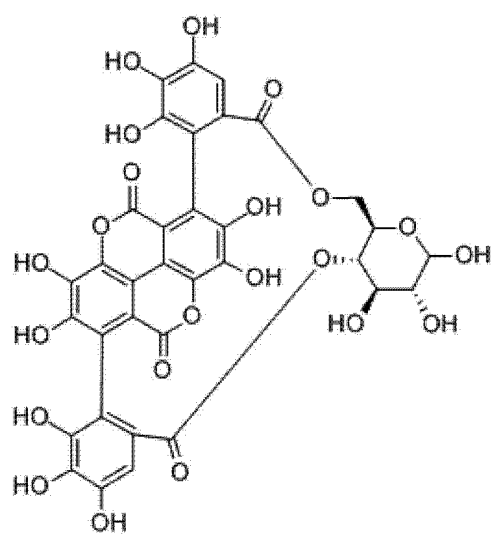


图 1

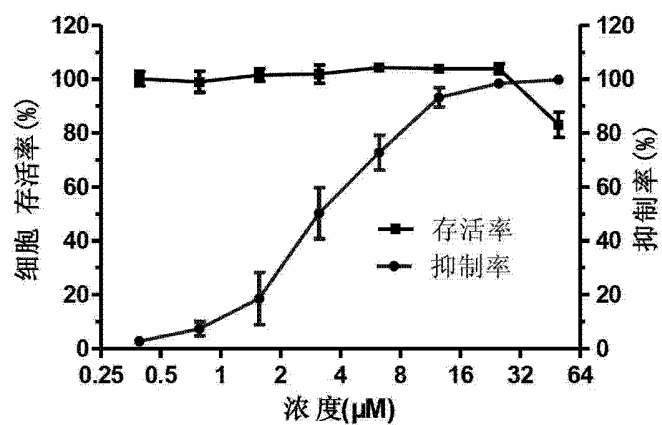


图 2

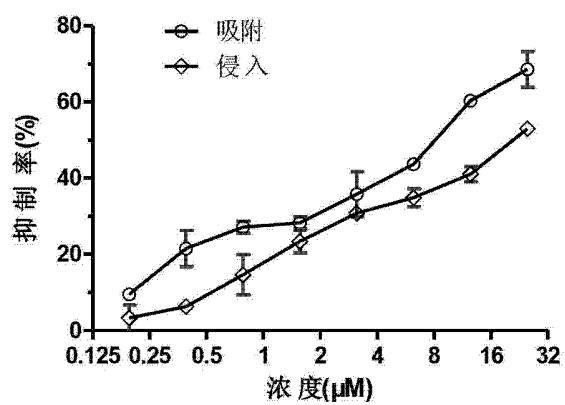


图 3

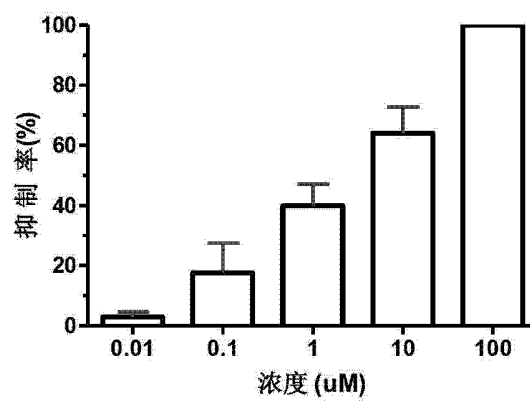


图 4