[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[51] Int. Cl.

A61K 31/7048 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 31/20 (2006.01)

[21] 申请号 200810083838.6

[43] 公开日 2008年8月20日

[11] 公开号 CN 101244075A

[22] 申请日 2008.3.6

[21] 申请号 200810083838.6

[30] 优先权

[32] 2007. 4. 10 [33] CN [31] 200710039336. 9

[71] 申请人 上海医药工业研究院

地址 200040 上海市北京西路 1320 号

[72] 发明人 王曙光 孔德云 周 珮 黄 海

[74] 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司 代理人 薜 琦 朱水平

权利要求书1页 说明书6页

[54] 发明名称

黄芪甲苷在制备抗乙型肝炎病毒药物中的应 用

[57] 摘要

本发明公开了黄芪甲苷的一种新用途,即在制备抗乙肝病毒的药物,包括防治病毒性乙型肝炎的药物中的应用。

- 1、黄芪甲苷在制备抗乙型肝炎病毒药物中的应用。
- 2、如权利要求 1 所述的应用,其特征在于所述的药物为防治病毒性乙型肝炎的药物。

黄芪甲苷在制备抗乙型肝炎病毒药物中的应用

技术领域

本发明涉及黄芪甲苷的新用途,特别是在抗乙型肝炎病毒方面的应用。

背景技术

黄芪甲苷(astragaloside IV)为从中药黄芪中提取出来的三萜皂苷类化合物,其分子式为 $C_{41}H_{68}O_{14}$,分子量 784,化学名为 3-O- β -D-吡喃葡萄糖基黄芪皂醇,结构式如下所示。

黄芪是传统中药,祖国医药认为黄芪有补气升阳、利水消肿、益气固表之功效,而将其归属"补气"之药。现代药理研究表明黄芪具有多种功效,黄芪的提取物具有抗水疱性口炎病毒(VSV),流感病毒、副流感病毒 I 型、柯萨奇病毒、孤儿病毒等功效。黄芪甲苷具有抗柯萨奇 B 病毒以及治疗脑血管疾病的疗效(CN1502336A、CN1843370A)。黄芪药材用于多种抗乙肝的复方中药,混合物黄芪总皂苷具有一定的抗乙肝病毒活性,但单体化合物黄芪甲苷抗乙肝病毒的活性没有被发现。

另一方面,乙肝病毒(HBV)可引起病毒性乙型肝炎、肝硬化及肝癌等疾病,严重影响人类的健康。目前针对 HBV 没有特效药,现在具备疗效的药物如核苷类、干扰素等药物价格昂贵、副作用大。因此开发抗 HBV 疗效好、价格低,副作用较小的天然药物是目前医药行业的一个热点。

发明内容

本发明要解决的技术问题即是提供一个中药的单体化合物——黄芪甲 苷在制备抗乙肝病毒的药物中的应用。

其中,本发明所说的"抗乙肝病毒"包括抑制乙肝病毒表面抗原(如 HBsAg)和/或 e 抗原(如 HBeAg)的表达,和/或抑制乙肝病毒 DNA(如 HBV-DNA)的复制。

本发明人在体外细胞试验时发现黄芪甲苷具有明显地抑制 HBsAg 和HBeAg 的活性,动物体内试验则提示黄芪甲苷对 DHBV 鸭血清中的 DHBVs 抗原和 DHBV-DNA,以及 DHBV 鸭肝脏中的 DHBV-DNA 均有显著的抑制作用。因此,黄芪甲苷可以开发成制备抗乙肝病毒、特别是预防或治疗病毒性乙型肝炎的药物。

具体实施方式

下面用实施例来进一步说明本发明,但本发明并不受其限制。

实施例中所用的黄芪甲苷标准品为成都思科华生物技术有限公司产品, 对照品拉米夫定(3TC)取自上海市食品药品监督管理局。

实施例 1: 体外细胞试验

按照国家卫生部药政局制定的《新药(西药)临床前研究指导原则》(1993)所规定乙肝病毒细胞方法进行体外细胞试验。

1、细胞及细胞培养

本研究采用的实验模型为 HepG2 2.2.15 细胞,该细胞株被转染了 HBV

DNA, 能产生 HBV 病毒颗粒。细胞培养液为 DMEM 培养液, 含 10 %(v/v) 胎牛血清, 0.03 % (g/ml) 谷氨酰胺, 100 IU/ml 青霉素, 100 IU/ml 链霉素, 380 μg/ml G418 (抗生素)。细胞于 37℃, 5% CO₂进行培养。

2、药物的细胞毒性检测

HepG2 2.2.15 细胞在 96 孔细胞培养板中培养 48 小时后,加入不同浓度黄芪甲苷培养液(800, 400, 200, 100, 40 μg/ml)及作为对照的拉米夫定培养液,继续培养 9 天(每 3 天换液一次),用 MTT 法检测细胞存活率,确定药物对 HepG2 2.2.15 细胞的毒性浓度。

3、药物对 HBsAg 和 HBeAg 的抑制率检测

HepG2 2.2.15 细胞在 96 孔细胞培养板中培养 48 小时后,加入不同浓度 黄芪甲苷培养液及作为阳性药物对照的拉米夫定培养液(无毒浓度下),继 续培养 9 天(每 3 天换液一次),收集上清液,用上海实业科华生物技术公司的 HBsAg 和 HBeAg 诊断试剂盒(ELISA)检测 HBsAg 和 HBeAg(按试剂盒说明书进行操作)。

抑制率(%)=(未用药的抗原值-用药的抗原值)/未用药的抗原值×100% 字验结果

<u> </u>			
样品	细胞毒性	HBsAg抑制率	HBeAg抑制率
		(%)	(%)
	未见毒性	17.7	20.5
黄芪甲苷100μg/mL	未见毒性	23.6	22.9
	未见毒性	31.8	23.3
拉米夫定(3TC)100μg/mL	未见毒性	20.1	19.7
拉米夫定(3TC)200μg/mL	未见毒性	34.9	23.1

以上实验和结果表明:黄芪甲苷对 HepG2 2.2.15 细胞分泌的 HBsAg 和 HBeAg 具有明显的抑制作用,黄芪甲苷具有抑制乙肝病毒的作用。

实施例 2 黄芪甲苷体内抗乙肝病毒药效试验

- 1、抑制鸭血清 DHBVs 抗原试验
- 1.1 试验材料:
- 1.1.1 毒株: 鸭乙肝病毒 (DHBV), 新鲜分离的阳性麻鸭血清。
- 1.1.2 动物:北京雏鸭,1日龄,上海稳德福食品公司昆山周市联营厂提供。
- 1.1.3 血清 DHBVs 抗原的检测方法见参考文献[闻玉梅、张维、楼惠珍等. PLC/PRF/5 肝癌细胞系产生乙型肝炎表面抗原的研究. 复旦学报(医学版)(上海第一医学院学报), 1982, 9(1):1-6]。
- 1.1.4 受试药物 (黄芪甲苷) 用 0.5% CMC 溶液配制成三个不同剂量的供试液: 黄芪甲苷 120mg/kg (大剂量组), 40mg/kg (中剂量组) 和 10 mg/kg (小剂量组) 供试液。
- 1.2 试验方法(参见赵艳玲,蔡光明,张新金等. 赋肝能抗病毒作用实验研究. 中国药学杂志, 2001, 5: 305-308 及黄正明,杨新波,曹文斌等. 水芹提取物抗鸭乙型肝炎病毒机理的研究. 科学通报, 1997, 17: 1863-1867): 1日龄北京雏鸭取血检测,阴性鸭静脉感染病毒后 7-10 天取血检测,去除阴性鸭,将阳性鸭按三个剂量给药(120mg/kg, 40mg/kg, 10mg/kg),另设病毒对照组(给生理盐水)和阳性药物对照组(恩替卡韦 Entecarvir,上海中美施贵宝制药有限公司,批号: 0703681,剂量: 0.01mg/kg)。口服给药一日一次。给药后第 10 天和停药后 3 天取鸭血分离血清。将各组鸭感染前、后、治疗期间和停药后血清标本测定血清 DHBVs 抗原用 geneQuant 定量,计算不同剂量组抗原的变化,应用 Total lab(Version 1.1)软件计算抑制率(%)。第 13 天杀剖鸭,采血,检测各项指标。

抑制率 (%) = $\frac{(病毒对照组DHBVs 抗原值—药物使用组DHBVs 抗原值)}{病毒对照组DHBVs 抗原值} \times 100%$

1.3 结果,如表 2 所示。

表 2 黄芪甲苷对鸭血清 DHBVs 抗原的抑制

	_						
组号	动物	10 天			13 天		
	数目	x ±SD	P值	抑制率	$\bar{x} \pm SD$	P值	抑制率
病毒对照	10	52747.17±			61844.00±		
组	12	14444.009			15620.956		
	10	18980.83±	0.000	C4.007	19116.17±	0.000	CO 10/
大剂量组	12	16270.746	0.000	64.0%	14356.761	0.000	69.1%
나 카 티 사	10	26595.83±	0.000	40.606	13459.67±	0.000	70.20/
中剂量组	12	17793.629	0.002	49.6%	11780.167	0.000	78.2%
	10	30733.00±	0.011	41 707	12740.83±	0.000	70.40/
小剂量组	12	12039.227	0.011	41.7%	5843.657	0.000	79.4%
阳性药物	10	1003.17±	0.000	00.10/	6391.33±	0.000	00.70/
对照组	12	1563.838	0.000	98.1%	2692.988	0.000	89.7%

- 2、黄芪甲苷对 DHBV 鸭血清中 DNA 的抑制率(%)
- 2.1 试验材料中 HBV-DNA 检测,采用地高辛试剂盒。余同上述试验材料 1.1。
- 2.2 试验方法: 阳性药物对照组采用拉米夫定 200mg/kg。将各组鸭感染前、后、治疗期间和停药后血清标本测定血清 DHBV-DNA,计算不同剂量组 DHBV-DNA的变化,计算抑制率(%)。第 13 天杀剖鸭,采血,检测各项指标。应用 Total lab (version 1.1)软件计算抑制率(%),余同上述试验方法 1.2。

2.3 结果, 如表 3 所示。

表 3 黄芪甲苷对 DHBV 鸭血清中 DNA 的抑制				
天数	120mg/kg	40mg/kg	14mg/kg	拉米夫定
				200mg/kg

5	52.0%	32.0%	18.0%	67.5%
10	47.0%	26.0%	15.0%	78.5%
13	39.0%	23.0%	10.0%	31.26%

实验结果显示黄芪甲苷对 DHBV 鸭血清中 DNA 有显著的抑制作用。

- 3、黄芪甲苷对肝脏 DHBV-DNA 的抑制作用
- 3.1 试验材料中 DHBV-肝脏 DNA 检测,采用地高辛试剂盒。余同上述试验材料 1.1。
- 3.2 试验方法: 1 日龄北京雏鸭取血检测,阴性鸭静脉感染病毒后 8 天取血检测,去除阴性鸭,将阳性鸭按三个剂量给药(120 mg/kg,40 mg/kg,10 mg/kg),另设病毒对照组(给生理盐水)和阳性药物对照组(拉米夫定 3TC 200 mg/kg)。口服给药一日一次。给药后共 10 天,停药后 3 天(第 13 天)杀剖鸭,取肝,均浆后提肝脏 DNA,做 southern 杂交,检测肝脏 DHBV-DNA。应用 Total lab(version 1.1) 软件计算抑制率(%)。

3.3 结果,如表 4 所示。

表 4 黄芪甲苷对 DHBV 鸭肝脏中 DHBV-DNA 的抑制

黄芪甲苷量	120mg/kg	40mg/kg	10mg/kg	3TC(200mg/kg)
抑制率	27.3%	18.4%	8.0%	40.06%

实验结果显示黄芪甲苷对鸭肝脏 DHBV-DNA 有显著的抑制作用。综上所述,各项实验结果表明黄芪甲苷具有显著抗乙肝病毒活性。