



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102885829 A

(43) 申请公布日 2013.01.23

(21) 申请号 201210417407.5

(22) 申请日 2012.10.26

(71) 申请人 吴俊华

地址 210009 江苏省南京市鼓楼区汉口路  
22 号

(72) 发明人 施桦 冯怡 吴俊华

(74) 专利代理机构 江苏银创律师事务所 32242

代理人 何震花

(51) Int. Cl.

A61K 31/58 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页

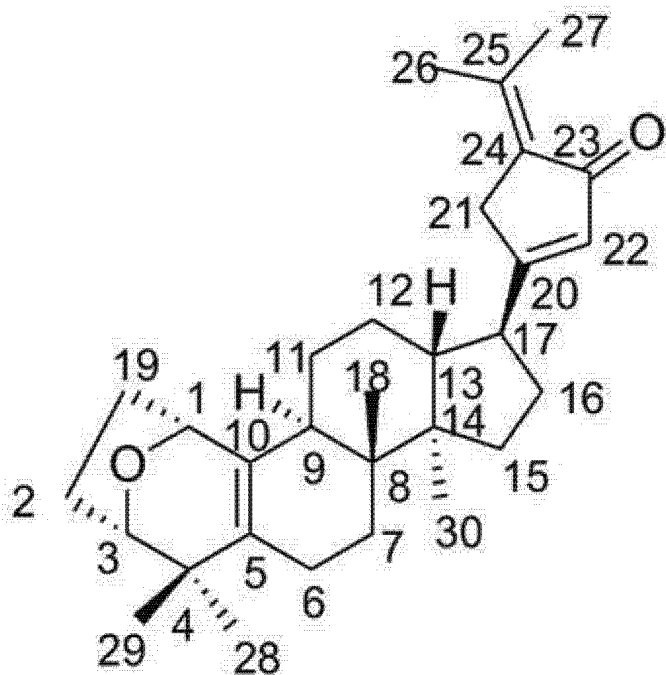
(54) 发明名称

Gypensapogenin B 在抗幽门螺杆菌药物中的应用

(57) 摘要

体外活性实验表明 GypensapogeninB 具有很强的抗幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 活性。GypensapogeninB 可用于急、慢性胃炎、胃、十二指肠溃疡等疾病的治疗及在制备治疗急、慢性胃炎、胃、十二指肠溃疡药物中得到应用。本发明涉及的 GypensapogeninB 在制备治疗抗幽门螺杆菌药物中的用途属于首次公开, 由于骨架类型属于全新的骨架类型, 而且其对于幽门螺杆菌抑制活性强得意想不到, 不存在由其他化合物给出任何启示的可能, 具备突出的实质性特点, 同时用于幽门螺杆菌感染的防治显然具有显著的进步。

1. Gypensapogenin B在抗幽门螺杆菌药物中的应用,所述化合物Gypensapogenin B结构如式(I)所示:



式(I)。

## Gypensapogenin B 在抗幽门螺杆菌药物中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物制药技术领域,尤其涉及Gypensapogenin B在制备抗幽门螺杆菌药物中的应用。

### 背景技术

[0002] 幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 是一种革兰氏阴性螺旋状细菌。研究显示,幽门螺杆菌是急、慢性胃炎以及胃、十二指肠溃疡的主要致病原因,并可能与胃癌和胃粘膜相关性淋巴样组织 (MALT) 恶性淋巴瘤发病有关。最近,世界卫生组织将 Hp 归为 I 类致癌物,它在胃癌发展中起主导作用。目前流行的治疗 Hp 感染的方案是同时服用质子泵抑制剂 (PPI) 加两种抗生素 (克拉霉素,阿莫西林、四环素、甲硝唑等选二种) 的三联疗法。影响三联疗法的最主要因素被认为是 Hp 对抗菌剂的耐药性;另一严重问题是质子泵抑制剂会诱发消化不良,大量抗菌剂则导致消化道内菌群的严重毁灭。因此,寻找高效、安全的抗 Hp 活性一类新药物成为一个重要和迫切的任务。

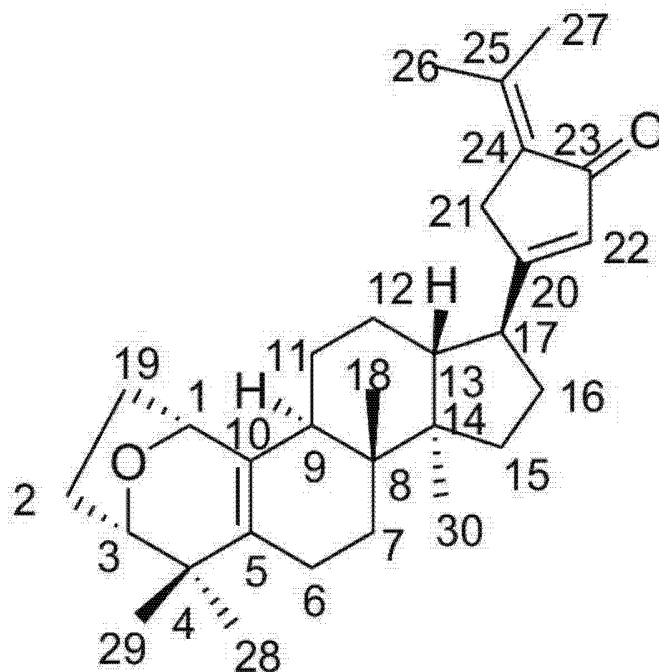
[0003] 本发明涉及的化合物 Gypensapogenin B 是一个 2012 年发表 (Li, N. et al., 2012. Triterpenes possessing an unprecedented skeleton isolated from hydrolyzate of total saponins from *Gynostemma pentaphyllum*. *European Journal of Medicinal Chemistry* 50, 173 - 178.) 的新骨架化合物,该化合物拥有全新的骨架类型,目前的用途仅仅涉及人肿瘤细胞株的细胞毒活性 (Li, N. et al., 2012. Triterpenes possessing an unprecedented skeleton isolated from hydrolyzate of total saponins from *Gynostemma pentaphyllum*. *European Journal of Medicinal Chemistry* 50, 173 - 178.), 对于本发明涉及的 Gypensapogenin B 在制备治疗抗幽门螺杆菌药物中的用途属于首次公开,由于骨架类型属于全新的骨架类型,而且其对于幽门螺杆菌抑制活性强得意想不到,不存在由其他化合物给出任何启示的可能,具备突出的实质性特点,同时用于幽门螺杆菌感染的防治显然具有显著的进步。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是研究 Gypensapogenin B 在抗幽门螺杆菌药物中的应用。

[0005] 所述化合物 Gypensapogenin B 结构如式 (I) 所示:

[0006]



[0007] 式(I)

[0008] Gypensapogenin B的体外实验表明,Gypensapogenin B具有很强的抗幽门螺旋杆菌活性,纸片法显示其抑菌圈直径为21 mm (ATCC43504)。用琼脂稀释法显示它能完全抑制5个随机的临床菌株(Hp001、Hp003、Hp004、Hp018和Hp036)和1个标准菌株(ATCC43504)的生长,最小抑菌浓度(MIC)均为1.0  $\mu$ g/ml。用氨苄西林作阳性对照,其对6株测试菌完全抑制的最小浓度(MIC)为2.0  $\mu$ g/ml。

[0009] 本研究结果显示,Gypensapogenin B的抑制幽门螺旋杆菌活性的能力比氨苄西林强,说明对于与幽门螺旋杆菌密切相关的急、慢性胃炎、胃、十二指肠溃疡等疾病来讲,Gypensapogenin B是一个极具开发潜力的化合物。它可直接用于相应疾病的治疗以及相关药物的制备。

[0010] 本发明涉及的Gypensapogenin B在制备治疗抗幽门螺杆菌药物中的用途属于首次公开,由于骨架类型属于全新的骨架类型,而且其对于幽门螺杆菌抑制活性强得意想不到,不存在由其他化合物给出任何启示的可能,具备突出的实质性特点,同时用于幽门螺杆菌感染的防治显然具有显著的进步。

### 具体实施方式

[0011] 本发明所涉及化合物Gypensapogenin B的制备方法参见文献(Li, N. et al., 2012. Triterpenes possessing an unprecedented skeleton isolated from hydrolyzate of total saponins from *Gynostemma pentaphyllum*. *European Journal of Medicinal Chemistry* 50, 173-178. 和 Wei, J.X. et al., 1982. Two new dammaran sapogenins from leaves of *Panax notoginseng*. *Planta Medica*, 45(3): 167-171.)。

[0012] 以下通过实施例对本发明作进一步详细的说明,但本发明的保护范围不受具体实施例的任何限制,而是由权利要求加以限定。

[0013] 实施例 1:本发明所涉及化合物 Gypensapogenin B 片剂的制备:

[0014] 取 20 克化合物 Gypensapogenin B,加入制备片剂的常规辅料 180 克,混匀,常规压片机制成 1000 片。

[0015] 实施例 2:本发明所涉及化合物 Gypensapogenin B 胶囊剂的制备:

[0016] 取 20 克化合物 Gypensapogenin B,加入制备胶囊剂的常规辅料如淀粉 180 克,混匀,装胶囊制成 1000 片。

[0017] 下面通过药效学实验来进一步说明其药物活性。

[0018] Gypensapogenin B 的药理实验

[0019] 1) 供试菌株

[0020] 幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 标准菌株 ATCC 43504 购于美国菌种保存中心 (American Type Culture Collection, ATCC)。15 株 Hp 临床菌株采自江苏省人民医院消化科、江苏省中医院检验科和南京市儿童医院胃镜室接受胃镜检查的患者;在连续胃镜检查中对消化性溃疡、十二指肠球炎或疣状胃炎的患者,先经快速尿素酶实验确定为 Hp 阳性者,再取胃窦黏膜 1-2 块,切碎后接种于含 8% 马血清、三甲氧苄氨嘧啶 (trimethoprim, TMP) 1.25 g/L、多粘菌素 (polymyxin) B2500 U/L、万古霉素 (vancomycin) 10 mg/L 的 Columbia 选择性琼脂培养基中,于 37 ° C 在微氧环境下 (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> 和 85% N<sub>2</sub>) 培养 72 小时。收集细菌,经涂片革兰氏染色,氧化酶、触酶和尿素酶鉴定为阳性后,传代纯培养,所得菌株作为实验菌株。

[0021] 2) 菌株培养

[0022] 我们采用微需氧袋(购自上海医科大学)进行 HP 的菌株培养,它可通过化学反应产生 Hp 所需要的微需氧环境。

[0023] 3) 生物活性测定

[0024] 采用纸片法 (Microbiological paper method) 测定化合物对幽门螺杆菌的抑制作用,用琼脂稀释法来测定供试样品的最低抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC)。

[0025] I. 纸片法实验

[0026] (A) 准备培养基 将配制好的 Columbia 培养基经高压蒸汽灭菌后,冷却至 50-60 ° C,加 8% 马血清或绵羊血,混匀倾注于已经灭菌的培养皿中,每皿 7-10 ml,培养基厚度为 1.5 mm (无菌操作)。

[0027] (B) 转接实验菌(涂菌) 用微量取样器取稀释好的 10<sup>8</sup> CFU/ml (10D<sub>660</sub>=10<sup>8</sup> CFU/ml) Hp 的菌悬液 0.1 ml 均匀地涂抹在适宜的培养皿表面。倒置于 37 ° C 烘干箱中 15 min 后取出,目的使琼脂表面干燥,备用。

[0028] (C) 贴样品纸片 用微量取样器取 6 μl 待测样品 (质量浓度 2 mg/ml) 注入已经灭菌的圆滤纸片上。用无菌镊子镊取含样品的纸片和对照空白纸片,按无菌操作分别纸片紧贴于含菌琼脂表面,每隔一定距离贴一张纸片。每种菌做 3 皿,所得结果求其平均值。

[0029] (D) 培养 将各平皿置于微需氧袋中,封口,打开气体发生器,再置于 37 ° C 培养箱中培养 72h。

[0030] (E) 测抑菌圈直径 取出平板后,分别测量各纸片周围抑菌圈直径的大小。参照对照组的实验结果,可得出待测样品敏感实验的结果。重复三次。

[0031] II. 琼脂稀释法测定 MIC

[0032] (A) 药物平板的制备 首先将测试的化合物用二甲基亚砜(DMSO)溶液配制成 0.5 mg/ml 的母液,再用无菌水稀释,最终配成 10.0,8.0,6.0,4.5,4.0,3.5,3.0,2.5,2.0,1.5,1.0,0.5 和 0.25  $\mu\text{g/ml}$  的浓度系列, DMSO 在介质中的浓度小于 1%。将 1 ml 配制好的测试化合物溶液与保温于 50° C 的 9 ml 哥伦比亚培养基另加 1 ml 保温于 50 ° C 的马血清充分混匀,浇制入培养皿中冷却即成。

[0033] (B) 转接实验菌(涂菌) 用微量取样器吸取稀释好的  $1 \times 10^8$  CFU/ml Hp 的菌悬液 0.1 ml 均匀地涂抹在培养皿表面,倒置于 37°C 烘干箱中 15 min 后取出,目的使琼脂表面干燥,备用。

[0034] (C) 确定 MIC 将待测培养皿在微需氧袋(含 :85%  $\text{N}_2$ , 10%  $\text{CO}_2$  和 5%  $\text{O}_2$ ) 中,保温 37°C 培养 72 小时,观察 Hp 生长情况,与空白组相对照,以完全没有菌生长的样品最低浓度为最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC) 值。阳性对照为氨苄西林(Ampicillin)。

[0035] 3、Gypensapogenin B 的药理实验结果

[0036] 体外实验表明, Gypensapogenin B 具有很强的抗幽门螺旋杆菌活性,纸片法显示其抑菌圈直径为 21 mm (ATCC43504)。用琼脂稀释法显示它能完全抑制 5 个随机的临床菌株(Hp001、Hp003、Hp004、Hp018 和 Hp036) 和 1 个标准菌株(ATCC43504) 的生长,最小抑菌浓度(MIC) 均为 1.0  $\mu\text{g/ml}$ 。用氨苄西林作阳性对照,其对 6 株测试菌完全抑制的最小浓度(MIC) 为 2.0  $\mu\text{g/ml}$ 。

[0037] 结论 :Gypensapogenin B 抑制幽门螺旋杆菌活性的能力比氨苄西林强,说明对于与幽门螺旋杆菌密切相关的急、慢性胃炎、胃、十二指肠溃疡等疾病来讲, Gypensapogenin B 是一个极具开发潜力的化合物。它可直接用于相应疾病的治疗以及相关药物的制备。