(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106957826 B
(45)授权公告日 2020.02.07

(21)申请号 201710148704.7

(22)申请日 2017.03.14

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106957826 A

(43)申请公布日 2017.07.18

(73)专利权人 昆药集团股份有限公司
地址 650106 云南省昆明市高新技术产业开发区科医路166号

(72)发明人 张建文 李莹 黄茜 王萍 任超 李宁 丛茜 杨兆祥

(74)专利代理机构 昆明知道专利事务所(特殊普通合伙企业) 53116
代理人 谢乔良 王远同

(51)Int.Cl.
C12N 7/06(2006.01)

(56)对比文件
CN 106606539 A,2017.05.03,
CN 1897958 A,2007.01.17,
CN 101460066 A,2009.06.17,
CN 106397624 A,2017.02.15,
CN 106397624 A,2017.02.15,

审查员 张丹丹

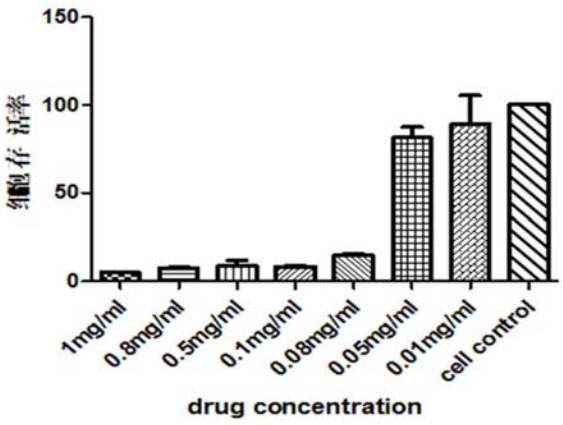
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54)发明名称

一种病毒灭活剂及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种病毒灭活剂及其应用。所述的病毒灭活剂为终浓度0.5~1mg/ml的肉桂提取物。应用为所述的病毒灭活剂在制备灭活副黏液病毒、疱疹病毒、逆转录病毒以及流感病毒药物中的应用。本发明公开了一种肉桂提取物(KPC-rg1)的病毒灭活作用,经研究表明,该种提取物在常温下即可以与病毒外壳的包膜蛋白发生迅速、强力结合,从而使病毒灭活、失去感染和扩增能力,但保有抗原性。



CN 106957826 B

1.一种病毒灭活剂,其特征在于病毒灭活剂的制备方法为:

步骤一:将肉桂树皮粉碎,以3倍量水于4℃浸泡提取1次,提取1小时;滤过,取滤液,药渣备用;滤液加入乙醇至乙醇含量达65%,静置;离心,上清液备用,保留沉淀部分;步骤二:取步骤一中上清液减压浓缩,真空干燥;加水溶解,过滤;滤液以稀盐酸调pH值至5;过滤,取沉淀,干燥;将步骤一、步骤二的沉淀与市售桂皮醛按10:10:0.5的比例混合,得所述病毒灭活剂;

或者,步骤一:将肉桂树皮粉碎,以8倍量水于20℃搅拌3次,每次2小时;滤过,取滤液,药渣备用;滤液加入乙醇至乙醇含量达80%,静置;离心,上清液备用,保留沉淀部分;步骤二:将步骤一中上清液减压浓缩,真空干燥;加水溶解,过滤;滤液以稀盐酸调pH值至2;过滤,取沉淀,干燥;将步骤一、步骤二的沉淀与市售桂皮醛按10:10:0.5的比例混合,得所述病毒灭活剂;

或者,步骤一:将肉桂树皮粉碎,以30倍量水于80℃搅拌提取3次,每次24小时;滤过,取滤液,药渣备用;滤液加入乙醇至乙醇含量达90%,静置;离心,上清液备用,保留沉淀部分;步骤二:将步骤一中上清液减压浓缩,真空干燥;加水溶解,过滤;滤液以稀盐酸调pH值至1;过滤,取沉淀,干燥;将步骤一、步骤二的沉淀与市售桂皮醛按10:10:0.5的比例混合,得所述病毒灭活剂。

2.一种权利要求1所述病毒灭活剂的应用,其特征在于所述病毒灭活剂在制备灭活副黏液病毒、疱疹病毒、逆转录病毒或流感病毒药物中的应用。

一种病毒灭活剂及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于医药技术领域，具体涉及一种病毒灭活剂及其应用。

背景技术

[0002] 目前国内外应用的主要疫苗包括弱毒疫苗和灭活疫苗。由于灭活疫苗的生产工艺简单、安全、使用方便、易于保存、能刺激动物产生高滴度抗体和显著的疫苗保护效果等优点，因此开发优质高效的灭活疫苗是防控各种病毒感染疾病的最有效手段。灭活疫苗，顾名思义就是要将具有感染性的活的病原体用适当的物理或化学方法灭活，使其丧失致病性，但仍保留其免疫原性，用其制造的疫苗。

[0003] 传统的病毒灭活剂甲醛，是一种有强烈刺激性的致癌物质。其既可作用于病毒含氨基的核苷酸碱基，又可作用于病毒壳蛋白。甲醛作用于病毒壳蛋白时，易使蛋白质发生交联或病毒颗粒聚集，从而使病原体蛋白的中和免疫原性遭到严重破坏。且用甲醛灭活时间长，一般需要在 37 ～39℃处理 24h 以上或更长时间 ；残留的游离甲醛，若随疫苗注入机体后，会产生刺激性反应。因此，在保证灭活绝对安全的前提下，提高灭活速度、缩短灭活时间，降低有效抗原的损失，一直是新型病毒灭活剂的开发目标。

[0004] 肉桂是我国常用中药材，始载于《神农本草经》，列为上品，历代重要本草均有记载。肉桂及其所含的成分具有多方面的药理作用，常见报道的包括抗菌、抗氧化、降血糖、抗醛糖还原酶、抗炎、抗补体、抗肿瘤活性，以及对消化系统、心血管系统、免疫系统、中枢神经、内分泌系统的调节作用。肉桂用于预防和治疗病毒感染的报道极少。

发明内容

[0005] 本发明的第一目的在于提供一种病毒灭活剂；第二目的在于提供所述的病毒灭活剂的应用。

[0006] 本发明的第一目的是这样实现的，所述的病毒灭活剂为终浓度0.5~1mg/ml的肉桂提取物。

[0007] 本发明的第二目的是这样实现的，所述的病毒灭活剂在制备灭活副黏液病毒、疱疹病毒、逆转录病毒以及流感病毒药物中的应用。

[0008] 本发明公开了一种肉桂提取物(KPC-rg1)的病毒灭活作用，经研究表明，该种提取物在常温下即可以与病毒外壳的包膜蛋白发生迅速、强力结合，从而使病毒灭活、失去感染和扩增能力，但保有抗原性。

[0009] 本发明所述的肉桂包括：肉桂、大叶清化桂、锡兰肉桂、华南桂、钝叶桂、阴香、天竺桂、银叶桂、香桂、柴桂、川桂；优选的，所述肉桂包括：肉桂、大叶清化桂和锡兰肉桂；更优选的，所述肉桂包括：肉桂和大叶清化桂。

[0010] 所述肉桂的植物部位为树皮。

[0011] 本发明所述的灭活剂灭活病毒的方法是将待灭活的病毒液用本发明所述的病毒灭活剂进行4~37℃的灭活。

附图说明

[0012] 图1为本发明病毒灭活剂肉桂提取物(KPC-rg1)对vero细胞增殖的抑制作用示意图；

[0013] 图2为HSV-1及KPC-rg1预处理的HSV-1病毒感染细胞后对细胞形态的影响示意图；

[0014] 图3为KPC-rg1处理后,HSV-1病毒滴度变化示意图；

[0015] 图4为H1N1攻毒后小鼠体重的变化情况示意图；

[0016] 图5为小鼠血清中针对H1N1病毒的血凝抑制效价示意图；

[0017] 图6为感染后第3天和实验终点(28天)各组小鼠肺部H1N1病毒M基因RNA拷贝数示意图。

具体实施方式

[0018] 下面结合实施例和附图对本发明作进一步的说明,但不以任何方式对本发明加以限制,基于本发明教导所作的任何变换或替换,均属于本发明的保护范围。

[0019] 本发明所述的病毒灭活剂为终浓度0.5~1mg/ml的肉桂提取物。

[0020] 所述的病毒灭活剂还包括肉桂提取物重量百分比1~5%的桂皮醛；

[0021] 所述的肉桂提取物是在PH值为1~5的条件下制备得到的肉桂水提液。

[0022] 所述的肉桂提取物是以肉桂为原料经前处理、提取、后处理步骤制备得到,具体包括以下步骤：

[0023] A、前处理:将原料肉桂粉碎过筛的的物料a备用；

[0024] B、提取:物料a中加入物料a重量3~30倍的水,于温度4~80℃下提取1~3次,每次1~24h,合并提取液得到提取液b；

[0025] C、后处理:将提取液b浓缩至相对密度为1.01~1.05得到浓缩液c,浓缩液c中加入酸性磷酸盐缓冲液中,以盐酸调节pH值至1~5,静置8~24h,取沉淀部分即为所述的肉桂提取物;加入沉淀部分重量百分比1~5%的桂皮醛混合均匀即为目标物病毒灭活剂。

[0026] 所述的肉桂提取物是以肉桂为原料经前处理、提取、后处理步骤制备得到,具体包括以下步骤：

[0027] A、前处理:将原料肉桂粉碎过筛的的物料a备用；

[0028] B、提取:物料a中加入物料a重量3~12倍的水,于温度4~40℃下提取1~3次,每次1~8h,合并提取液得到提取液b；

[0029] C、后处理:将提取液b浓缩至相对密度为1.01~1.05得到浓缩液c,浓缩液c中加入pH值3~6的酸性磷酸盐缓冲液中,以盐酸调节pH值至2~4,静置8~24h,取沉淀部分即为所述的肉桂提取物;加入沉淀部分重量百分比1~5%的桂皮醛混合均匀即为目标物病毒灭活剂。

[0030] 所述的肉桂提取物是以肉桂为原料经前处理、提取、后处理步骤制备得到,具体包括以下步骤：

[0031] A、前处理:将原料肉桂粉碎过筛的的物料a备用；

[0032] B、提取:物料a中加入物料a重量10倍的水,于温度20℃下提取3次,每次2h,合并提取液得到提取液b；

[0033] C、后处理:将提取液b浓缩至相对密度为1.01~1.05得到浓缩液c,浓缩液c中加入pH值6的酸性磷酸盐缓冲液中,以盐酸调节pH值至3,静置12h,取沉淀部分即为所述的肉桂

提取物;加入沉淀部分重量百分比1~5%的桂皮醛混合均匀即为目标物病毒灭活剂。

[0034] 本发明所述的病毒灭活剂的应用为所述的病毒灭活剂在制备灭活副黏液病毒、疱疹病毒、逆转录病毒以及流感病毒药物中的应用。

[0035] 所述的病毒灭活剂在制备灭活副黏液病毒、疱疹病毒、逆转录病毒以及流感病毒疫苗中的应用。

[0036] 所述的灭活副黏液病毒、疱疹病毒、逆转录病毒以及流感病毒疫苗的制备方法包括以下步骤:

[0037] A、制备抗原液;

[0038] B、在抗原液中加入浓度为0.5~1mg/ml的肉桂提取物充分混匀后,将混合液放置于温度为20~30℃的条件下震荡孵育5~10min得到目标物灭活疫苗;其中肉桂提取物和抗原液的配比比例为1 :2.5(其中肉桂提取物以质量单位计,病毒以血凝单位计)。

[0039] 所述的制备抗原液是将病毒按体积百分数1%~3%的接种量接种在宿主细胞中,当宿主细胞生长到40%~90%时,将培养液更换为维持液,维持观察48~72h后收集病毒得到抗原液。

[0040] 所述的培养液是所述的培养液是根据病毒宿主细胞不同对应选择(病毒宿主细胞不同,培养基也不同);所述的维持液是含2%胎牛血清的培养液。

[0041] 下面以具体实施案例对本发明做进一步说明:

[0042] 实施例1 病毒灭活剂的制备

[0043] 步骤一:将肉桂树皮粉碎,以3倍量水4 ℃浸泡提取1次,提取1小时。步骤二:滤过,取滤液,药渣备用。步骤三:滤液加入乙醇至乙醇含量达65%,静置。步骤四、离心,上清液备用并保存沉淀。步骤五:取步骤四中的上清液,减压浓缩,真空干燥。步骤六:加水溶解,过滤。步骤七:滤液以稀盐酸调PH值至5。步骤八:过滤,取沉淀,干燥。将步骤四和步骤八及市售桂皮醛按10:10:0.5的比例混合既得所述病毒灭活剂。

[0044] 实施例2 病毒灭活剂的制备

[0045] 步骤一:将肉桂树皮粉碎,以8倍量水常温(20 ℃)搅拌3次,每次两小时。步骤二:滤过,取滤液,药渣备用。步骤三:滤液加入乙醇至乙醇含量达80%,静置。步骤四、离心,上清液备用,保留沉淀部分。步骤五:将步骤四中的上清液,减压浓缩,真空干燥。步骤六:加水溶解,过滤。步骤七:滤液以稀盐酸调PH值至2。步骤八:过滤,取沉淀,干燥。将步骤四和步骤八及市售桂皮醛按10:10:0.5的比例混合既得所述病毒灭活剂。

[0046] 实施例3 肉桂树皮总多糖、总多酚的制备

[0047] 肉桂树皮总多糖的制备:步骤一:将肉桂树皮粉碎,以30倍量水80 ℃搅拌提取3次,每次24小时。步骤二:滤过,取滤液,药渣备用。步骤三:滤液加入乙醇至乙醇含量达90%,静置。步骤四、离心,上清液备用,保留沉淀部分。步骤五:将步骤四中的上清液,减压浓缩,真空干燥。步骤六:加水溶解,过滤。步骤七:滤液以稀盐酸调PH值至1。步骤八:过滤,取沉淀,干燥。将步骤四和步骤八及市售桂皮醛按10:10:0.5的比例混合既得所述病毒灭活剂。

[0048] 实施例6

[0049] KPC-rg1对vero细胞增殖的抑制作用

[0050] vero细胞铺板96孔板,在37℃,5% CO_2培养箱过夜长满单层后,加入不同浓度的肉桂提取物(kpc-rg1),分别设置实验组、细胞对照组、空白对照组,48h后用CCK8试剂盒检测

每个浓度下的OD值，根据公式计算细胞存活率。结果显示，当kpc-rg1的浓度小于0.05mg/ml时，对vero细胞无细胞毒作用。具体数据见图1。

[0051] 实施例7

[0052] KPC-rg1对HSV-1病毒活性的抑制

[0053] 将40ug/ml的KPC-rg1和Mol=0.1的HSV-1病毒液在4度共同孵育24小时，再加入到vero细胞铺板的96孔板中，同时设病毒对照和细胞对照（ 不加病毒，只加培养基），培养24小时后于显微镜下观察细胞形态，并计算病毒悬液的TCID50值。结果显示，KPC-rg1对HSV-1病毒的灭活作用显著，并对vero细胞起到了很好的保护作用。具体实验结果见图2、图3。

[0054] 实施例8

[0055] KPC-rg1对RSV病毒及HIV-1病毒的体外抗病毒活性测试

[0056] 样品配制：KPC-rg1用无菌水溶至8 mg/ml并于80℃水浴中加热15分钟溶解。溶液于2000 RPM离心2分钟后取上清储存于4 ℃作为KPC-rg1母液。在EC50测定实验中，KPC-rg1和参照化合物被3倍倍比稀释测试8个浓度点，每个浓度测试双复孔。最高测试浓度为1000μg/ml。细胞培养基中的DMSO最终浓度为0.5%。并按下表的方法进行抗病毒活性测试：

[0057] 表1 抗病毒实验方法列表

[0058]

病毒(株)	细胞/接种密度（每孔）	化合物处理时间（天）/终点法	参考化合物	检测试剂
RSV (ALong) /1 $TCID_{90}$	Hep-2 / 1,500 cells（384 孔）	5/CPE	BMS-433771	CCK8
HIV-1 (IIIB) / 2.4 $TCID_{50}$	MT-4 / 10,000 cells（96 孔）	5/CPE	AZT	CellTiter-Glo

[0059] RSV Along病毒致细胞病变实验：细胞以一定密度(表1)接种到微孔板并于37℃，5% CO2培养箱中培养过夜。第二天，不同浓度的化合物和病毒(表1)的预混液加入细胞板中于37℃，5% CO2培养3-5天至病毒对照孔中的细胞病变完全。细胞活性随后使用CCK8细胞活力检测试剂盒按照检测试剂的说明进行检测。化合物不同浓度下的抗病毒活性由对病毒引起的细胞病变效应的抑制作用来决定。所有数据经空白感染对照校准。EC50由GraphPad Prism软件进行分析计算。

[0060] HIV-1病毒致细胞病变实验：测试化合物和参照化合物倍比稀释后与病毒(表1)混合，随后化合物和病毒的混合液与MT-4细胞加入微孔板并于33℃或37℃，5% CO2培养箱中培养2-6天至病毒对照孔中的细胞病变完全。细胞活性随后使用CCK8或CellTiter Glo细胞活力检测试剂盒按照检测试剂的说明进行检测。化合物在不同浓度下的抗病毒活性由对病毒引起的细胞病变效应的抑制作用来决定。EC50由GraphPad Prism软件进行分析计算。

[0061] 结果显示，本实验所有抗病毒活性实验的参照化合物的抗病毒活性与预期符合，证明本实验结果可靠。KPC-rg1的抗病毒活性与阳性对照药类似，对两种病毒均有较好活性抑制作用，结果见表2。

[0062] 表2. 肉桂提取物抗病毒活性列表

[0063]

病毒（株）	样品名称	EC_{50}（μg/ml）
RSV (Along)	KPC-rg1	40.66
	BMS-433771	24.39
HIV-1 (IIIB)	KPC-rg1	9.24
	AZT	2.96

[0064] 实施例9

[0065] 验证KPC-rg1的抗流感病毒作用以及由于KPC-rg1诱导的“原位固化免疫效应”而产生的动物保护作用

[0066] 实验材料与动物分组

[0067] 测试样品:KPC-rg1

[0068] 实验病毒株:H1N1 (A/Puerto Rico/8/1934)。病毒通过狗肾细胞进行繁殖。病毒株在-70℃储存前测得其HA滴定度(HAU)为256;实验用病毒为250HAU。

[0069] 实验动物与分组:28-30天年龄的小鼠。

[0070] A)PBS对照组:6只小鼠。

[0071] B)病毒组(PR8攻毒组):8只小鼠(250 HAU/只)。

[0072] C)KPC-rg1给药组,共8只小鼠。

[0073] 实验方法

[0074] 指定剂量的KPC-rg1(100ug /只)与病毒(250 HAU/只)室温下用适量的PBS预先混合培养5-10 min。28-30天年龄的小鼠接种预先混合好的KPC-rg1/病毒溶液或者病毒溶液。KPC-rg1/病毒在PBS中的总体积为50 ul/只小鼠。接种前麻醉。PBS做为空白对照。观察小鼠28天存活水平。并于实验终点(28天)眼球采血收集小鼠血清,进行红细胞凝集抑制实验(HI)检测小鼠血清中针对H1N1病毒的血凝抑制效价(HI titer)。血凝抑制结果≧20为阳性有效HI效价。n=3。同时于感染后第3天和实验终点(28天)获取鼠肺,提取肺总RNA,RT-PCR检测各组小鼠肺部H1N1病毒M基因RNA拷贝数。

[0075] 实验结果

[0076] 小鼠28天存活情况

[0077] 表3 各组小鼠28天存活水平

[0078]

实验分组	动物数 day1	动物数 day28
PBS 对照组	8	8
病毒组	8	3
KPC-rg1/病毒组	8	8

[0079] 攻毒组小鼠在攻毒后第三天出现死亡,攻毒后一周内死亡过半,存活率为37.5%(8只小鼠共计死亡5只)。KPC-rg1组在攻毒后未出现死亡,存活率百分之百。体重和生存结果揭示药物对小鼠有显著保护性效果。

[0080] 小鼠体重变化情况见图4

[0081] 对照PBS组小鼠体重稳定增长，而涉及病毒攻击的攻毒组、KPC-rg1组小鼠体重均在攻毒后下降，一周后体重逐渐恢复并上升。

[0082] 小鼠血凝抑制效价(抗体水平)见图5

[0083] 感染后28天，攻毒组、KPC-rg1组小鼠血清中均可检测出128的血凝抑制效价，表明病毒对小鼠的攻击使小鼠免疫系统产生了相应抗体和保护性。

[0084] 小鼠肺部病毒载量检测见图6

[0085] 攻毒后3天检测病毒感染肺部情况，各组小鼠肺部病毒载量均达到10的7次方每50mg肺，表明病毒在小鼠肺部感染增殖情况。实验终点28天时，攻毒组小鼠肺部病毒载量已检测不到，表明病毒已被小鼠免疫系统清除。上述结果揭示了病毒从感染再到清除的肺部感染进程。

[0086] 综合上述结果，病毒在攻毒后对各组小鼠肺部均发生了感染，导致攻毒组小鼠在感染后一周内死亡过半。而KPC-rg1组小鼠未出现死亡现象，表明药物对H1N1流感病毒攻击小鼠有显著保护效果。感染后28天存活下来的攻毒组和药物组小鼠均有显著的抗体产生，病毒也已被机体免疫系统清除。

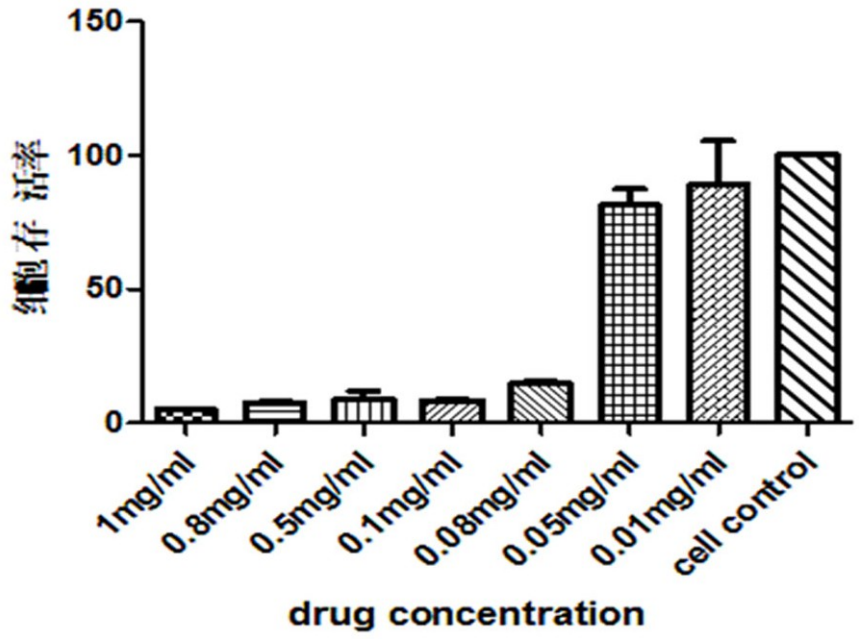
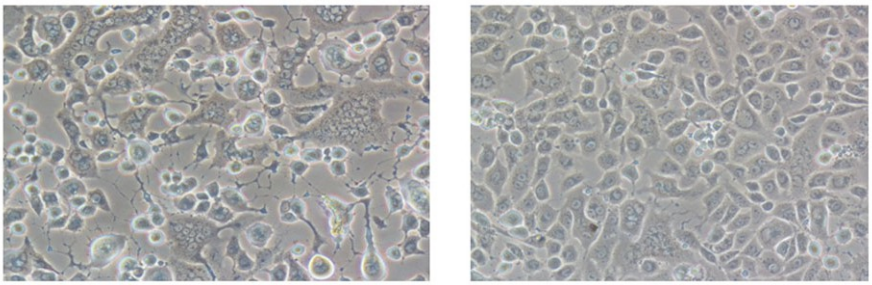


图 1



Control

HSV-1 infected 24 h.p.i

KPC-rg1 Treated

HSV-1 infected 24 h.p.i

图 2

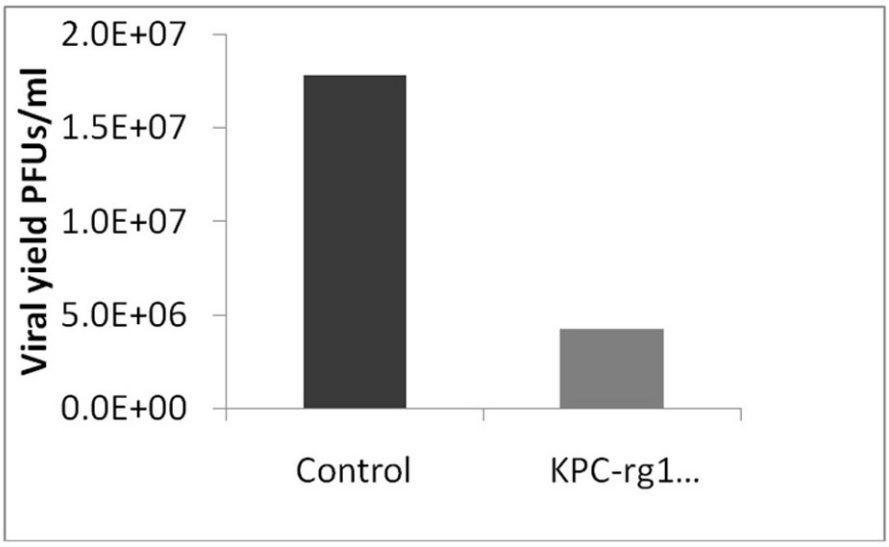

2.0E+07
1.5E+07
1.0E+07
5.0E+06
0.0E+00
Viral yield PFUs/ml
Control
KPC-rg1...

图 3

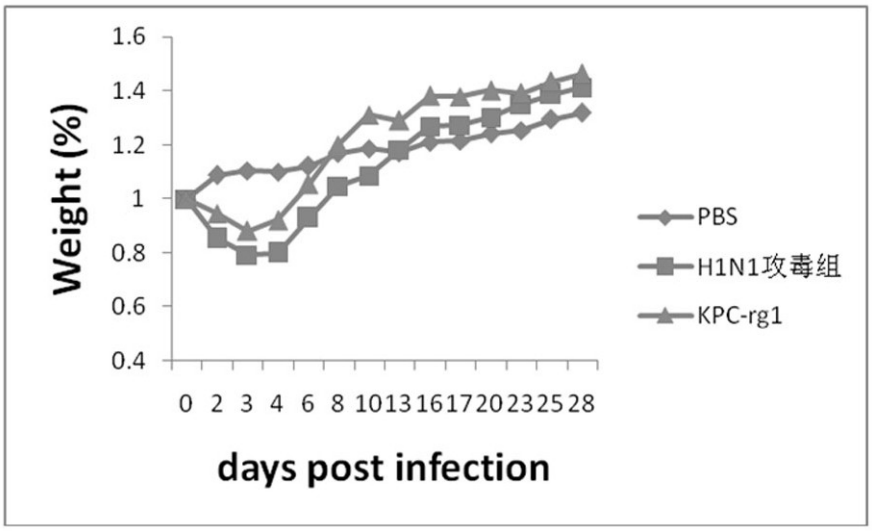

1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
Weight (%)
0 2 3 4 6 8 10 13 16 17 20 23 25 28
days post infection
PBS
H1N1攻毒组
KPC-rg1

图 4

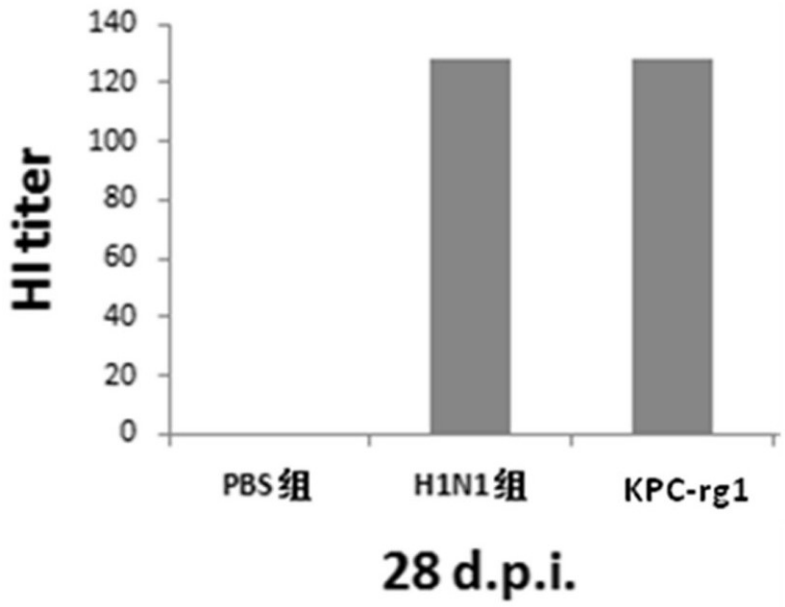

HI titer
140
120
100
80
60
40
20
0
PBS组
H1N1组
KPC-rg1
28 d.p.i.

图 5

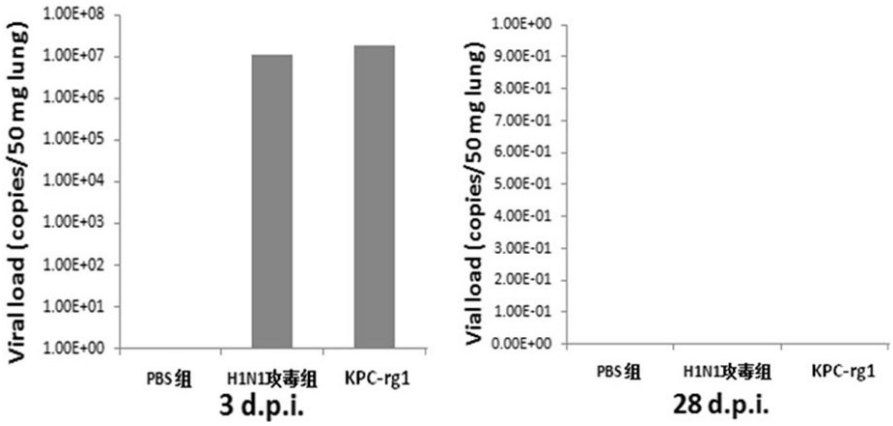

Viral load (copies/50 mg lung)
1.00E+08
1.00E+07
1.00E+06
1.00E+05
1.00E+04
1.00E+03
1.00E+02
1.00E+01
1.00E+00
PBS组
H1N1攻毒组
KPC-rg1
3 d.p.i.
Vial load (copies/50 mg lung)
1.00E+00
9.00E-01
8.00E-01
7.00E-01
6.00E-01
5.00E-01
4.00E-01
3.00E-01
2.00E-01
1.00E-01
0.00E+00
PBS组
H1N1攻毒组
KPC-rg1
28 d.p.i.

图 6