



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103417531 A

(43) 申请公布日 2013. 12. 04

(21) 申请号 201210146794. 3

(22) 申请日 2012. 05. 14

(71) 申请人 鲁南制药集团股份有限公司  
地址 276005 山东省临沂市红旗路 209 号

(72) 发明人 赵志全 徐真真 李斌

(51) Int. Cl.

A61K 31/365(2006. 01)

A61P 19/04(2006. 01)

A61P 37/02(2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页

(54) 发明名称

牛蒡子苷元在制备治疗系统性红斑狼疮的药物中的用途

(57) 摘要

本发明属于医药领域,具体涉及牛蒡子苷元在制备治疗系统性红斑狼疮的药物中的用途,牛蒡子苷元能有效调节 SLE 样小鼠淋巴细胞功能异常及多种细胞因子分泌失衡,在治疗红斑狼疮方面作用显著,具有开发成治疗系统性红斑狼疮药物的潜力。

1. 牛蒡子苷元在制备治疗系统性红斑狼疮的药物中的用途。
2. 如权利要求 1 所述的用途,其特征在於所述的牛蒡子苷元为口服制剂、注射剂或外用制剂。
3. 如权利要求 2 所述的用途,其特征在於所述的牛蒡子苷元为注射剂。
4. 如权利要求 3 所述的用途,其特征在於所述的牛蒡子苷元注射剂含有牛蒡子苷元和助溶剂。
5. 如权利要求 4 所述的用途,其特征在於所述的助溶剂包含吐温-80、丙二醇、甘油、乙醇、PEG-400 或 PEG-300 中的一种或几种。
6. 如权利要求 3 所述的用途,其特征在於所述的牛蒡子苷元注射剂的 pH 为 2.5-6.5。
7. 如权利要求 6 所述的用途,其特征在於所述的牛蒡子苷元注射剂的 pH 为 3.0-5.0。
8. 如权利要求 6 所述的用途,其特征在於所述的牛蒡子苷元注射剂的 pH 调节剂为 EDTA、乙酸、盐酸、柠檬酸或山梨酸中的一种或几种。
9. 如权利要求 1 所述的用途,其特征在於所述的牛蒡子苷元的人用量为  $0.005\text{mg}/\text{kg} \cdot \text{d} \sim 1\text{mg}/\text{kg} \cdot \text{d}$ 。
10. 如权利要求 9 所述的用途,其特征在於所述的牛蒡子苷元的人用量为  $0.01\text{mg}/\text{kg} \cdot \text{d} \sim 0.2\text{mg}/\text{kg} \cdot \text{d}$ 。

## 牛蒡子苷元在制备治疗系统性红斑狼疮的药物中的用途

### 技术领域

[0001] 本发明属于医药领域,具体涉及牛蒡子苷元在制备治疗系统性红斑狼疮的药物中的用途。

### 背景技术

[0002] 系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus;SLE)是一种弥漫性、全身性自身免疫病,主要累及皮肤粘膜、骨骼肌肉、肾脏及中枢神经系统,同时还可能累及肺、心脏、血液等多个器官和系统,表现出多种临床表现,其病因及发病机理尚不明确,系统性红斑狼疮患者血清中可检测到多种自身抗体和免疫学异常,淋巴细胞功能异常及多种细胞因子分泌失衡在该病的发生发展中起重要作用,有研究证实系统性红斑狼疮病人外周血中CD3+CD4+T细胞下降,CD3+CD8+T上升,IL-10水平上调,其中IL-10作为Th类细胞因子的代表在SLE发病机制中倍受关注。白介素是一大类非均一的调节细胞生长、分化、介导信号传递的多肽类,IL-10在系统性红斑狼疮研究中较受关注。IL-10是一个多效性细胞因子,具有免疫刺激和免疫抑制双重作用,其免疫刺激作用主要是提高B细胞的存活率,促进B细胞的增殖、MHC-II类抗原表达以及抗体的分泌。有研究表明IL-10可以刺激系统性红斑狼疮患者PBMCs产生抗dsDNA抗体。研究表明系统性红斑狼疮患者无论在活动期还是缓解期,其体内IL-10水平始终高于正常人。

[0003] 系统性红斑狼疮目前尚无根治办法,很多患者需要长期甚至终身治疗。西医治系统性红斑狼疮多采用激素的疗法,激素治系统性红斑狼疮具有卓著的疗效,但激素具有相当大的副作用,长期大量的使用激素不利于患者的身心健康,不仅如此,激素的减停极有可能导致病情加重。中医治系统性红斑狼疮多采用中药调剂的办法,中药调剂治系统性红斑狼疮虽具有卓著疗效,但疗效仅停留在缓解症状侧面上,很难从根本上对系统性红斑狼疮进行治疗,中医治系统性红斑狼疮是一个长期的过程,一般坚持治疗半年后才看到疗效。因此,目前系统性红斑狼疮的治疗方法都存在一定局限性。因此,寻找一种新的有效药物来治疗系统性红斑狼疮患者有非常重要的意义。

[0004] 牛蒡子为菊科植物牛蒡的干燥成熟果实,是常用中药,具有疏散风热、宣肺透疹、解毒利咽的功能,用于风热感冒、咳嗽痰多、麻疹、风疹、咽喉肿痛、痒腮丹毒、痈肿疮毒。该中药含有木脂素类化合物,主要是牛蒡苷(arctiin)和牛蒡子苷元(arctigenin)等。现已有证据证明牛蒡子苷元比牛蒡苷具有更强的生物活性,比如显著的抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗PAF受体及钙拮抗活性,但是现有技术尚没有报道牛蒡子苷元在制备治疗系统性红斑狼疮的药物中的用途。

### 发明内容

[0005] 为克服现有技术缺陷,本发明提供了牛蒡子苷元的一种新的医药用途,即牛蒡子苷元用于制备治疗系统性红斑狼疮的药物中的用途。

[0006] 具体地说,本发明所述的牛蒡子苷元为口服制剂、注射剂、外用制剂。

[0007] 更具体地说,本发明提供了一种牛蒡子苷元注射剂,适用于多种给药途径,包括皮内、皮下、肌内、腹腔、局部或静脉内给药,进一步优选为皮下给药。

[0008] 更具体地说,本发明所述的牛蒡子苷元的用量为 0.05mg/kg~10mg/kg,换算为人的用量为 0.005mg/kg~1mg/kg;优选为 0.1mg/kg~2mg/kg,换算为人的用量为 0.01mg/kg~0.2mg/kg。

[0009] 本发明所提供的含牛蒡子苷元的注射剂,由牛蒡子苷元和助溶剂组成,其中所述的助溶剂选自吐温-80、丙二醇、甘油、乙醇、PEG-400 或 PEG-300 中的一种或几种。

[0010] 本发明提供的牛蒡子苷元的注射剂的 pH 为 2.5-6.5。优选地,本发明提供的牛蒡子苷元的注射剂的 pH 为 3.0-5.0。

[0011] 本发明提供的调节牛蒡子苷元注射剂 pH 的物质为 EDTA、乙酸、盐酸、柠檬酸或山梨酸中的一种或几种。

[0012] 本发明提供的牛蒡子苷元对系统性红斑狼疮具有显著的治疗作用。本发明的实施例 8 (牛蒡子苷元注射剂对系统性红斑狼疮 MRL/lpr 小鼠的影响) 的试验结果表明,本发明能使 SLE 样小鼠下降的 CD3+CD4+T 细胞上升,使上升的 CD3+CD8+T 下降,纠正 T 细胞亚群的失衡状态;本发明能显著降低 SLE 样小鼠血清 IL-10 和抗 ds-DNA 抗体水平的升高;本发明能显著降低 SLE 样小鼠尿液中白蛋白的含量,能有效抑制 SLE 样小鼠肾脏损伤,其中牛蒡子苷元低、中剂量组效果尤为显著,优于阳性药,这表明,本发明的药物对于 SLE 样小鼠具有显著的治疗效果。

[0013] 因此,将牛蒡子苷元开发成治疗红斑狼疮的创新药物并用于临床系统性红斑狼疮的治疗具有很好的前景。

[0014] 总之,本发明提供的牛蒡子苷元注射剂同现有技术相比,具有如下突出的优势:

[0015] 1. 牛蒡子苷元起效快,疗效稳定,纠正了系统性红斑狼疮患者免疫功能的异常;

[0016] 2. 牛蒡子苷元本身毒性低,用量小,适于系统性红斑狼疮患者长期使用;

[0017] 3. 牛蒡子苷元成本低且容易生产,降低了系统性红斑狼疮患者的经济负担,具有价格优势。

## 具体实施方式

[0018] 以下通过具体实施例进一步描述本发明,本发明不仅仅限于以下实施例。

[0019] 实施例 1 牛蒡子苷元注射剂

[0020] 处方:

[0021] 牛蒡子苷元 4g

[0022] PEG-400 200ml

[0023] 0.9% 氯化钠溶液 加至 1000ml

[0024] 制备工艺:

[0025] 将处方量的 PEG-400 加入牛蒡子苷元,搅拌溶解,加入处方量的 0.9% 氯化钠溶液至 1000ml,搅拌均匀,调 pH 到 3,加入 0.5% 针用活性炭,搅拌,脱炭,即得。

[0026] 实施例 2 牛蒡子苷元注射剂

[0027] 处方:

[0028] 牛蒡子苷元 5g

[0029] PEG-300 300ml

[0030] 0.9% 氯化钠溶液 加至 1000ml

[0031] 制备工艺：

[0032] 将处方量的 PEG-300 加入牛蒡子苷元，搅拌溶解，加入 0.9% 氯化钠溶液至 1000ml，搅拌均匀，调 pH 到 4，加入 0.5% 针用活性炭，搅拌，脱炭，即得。实施例 3 牛蒡子苷元注射剂

[0033] 处方：

[0034] 牛蒡子苷元 4g

[0035] PEG-400 100ml

[0036] 注射用水 加至 1000ml

[0037] 制备工艺：

[0038] 将处方量的 PEG-400 加入牛蒡子苷元，搅拌溶解，加入注射用水至 1000ml，搅拌均匀，柠檬酸调 pH 到 5，加入 0.5% 针用活性炭，搅拌，脱炭，即得。

[0039] 实施例 4 牛蒡子苷元注射剂

[0040] 处方：

[0041] 牛蒡子苷元 2g

[0042] PEG-400 250ml

[0043] 注射用水 加至 1000ml

[0044] 制备工艺：

[0045] 将处方量的 PEG-400 加入牛蒡子苷元，搅拌溶解，加入注射用水至 1000ml，搅拌均匀，柠檬酸调 pH 到 2.5，加入 0.5% 针用活性炭，搅拌，脱炭，即得。

[0046] 实施例 5 牛蒡子苷元注射剂

[0047] 处方：

[0048] 牛蒡子苷元 1g

[0049] 吐温 -80 300ml

[0050] 注射用水 加至 1000ml

[0051] 制备工艺：

[0052] 将处方量的吐温 -80 加入牛蒡子苷元，搅拌溶解，加入注射用水至 1000ml，搅拌均匀，柠檬酸调 pH 到 3，加入 0.5% 针用活性炭，搅拌，脱炭，即得。

[0053] 实施例 6 牛蒡子苷元注射剂

[0054] 处方：

[0055] 牛蒡子苷元 2g

[0056] PEG-400 200ml

[0057] 注射用水 加至 1000ml

[0058] 制备工艺：

[0059] 将处方量的 PEG-400 加入牛蒡子苷元，搅拌溶解，加入注射用水至 1000ml，搅拌均匀，柠檬酸调 pH 到 3.5，加入 0.5% 针用活性炭，搅拌，脱炭，即得。

[0060] 实施例 7 牛蒡子苷元注射剂

[0061] 处方：

[0062] 牛蒡子苷元 4g

[0063] PEG-400 250ml

[0064] 注射用水 加至 1000ml

[0065] 制备工艺：

[0066] 将处方量的 PEG-400 加入牛蒡子苷元，搅拌溶解，加入注射用水至 1000ml，搅拌均匀，柠檬酸调 pH 到 3，加入 0.5% 针用活性炭，搅拌，脱炭，即得。

[0067] 实施例 8 牛蒡子苷元注射剂对系统性红斑狼疮 MRL/lpr 小鼠的影响

[0068] 1. 实验材料

[0069] 1.1 实验动物及分组

[0070] 8 周龄系统性红斑狼疮 (SLE) MRL/lpr 小鼠 50 只，雌性，由上海斯莱克实验动物有限公司提供，适应性饲养一周后，按体重随机分为 5 组，每组 10 只。ICR 小鼠 10 只，雌性，作为正常对照组小鼠。

[0071] 正常对照组：皮下注射溶剂；

[0072] SLE 模型组：皮下注射溶剂；

[0073] 泼尼松组：皮下注射 5mg/kg；

[0074] 牛蒡子苷元低剂量组：皮下注射本发明实施例 1 制备的药物 0.5mg/kg；

[0075] 牛蒡子苷元中剂量组：皮下注射本发明实施例 1 制备的药物 1mg/kg；

[0076] 牛蒡子苷元高剂量组：皮下注射本发明实施例 1 制备的药物 4mg/kg。

[0077] 所有试验组每天给药 1 次，连续给药 3 周，于给药结束时取血备用，摘取脾脏。1.2 试剂

[0078] (1) IL-10、抗 ds-DNA 抗体试剂盒购自上海柯丰生物试剂有限公司

[0079] (2) PBS：称取下列试剂 8.5g NaCl, 0.2g KCl, 2.85g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0.27g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ，用 1L 双蒸水定容，以上试剂均为市售分析纯

[0080] (3) 红细胞裂解液：先配制 0.83%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ，再配制 tris 溶液（称取 tris 20.594g 溶于 500-700ml 蒸馏水中，再用 1M HCl 调 pH 7.65 至 1L），把 0.83%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  与 tris 溶液按 9:1 比例混合后即得。

[0081] (4) 抗小鼠荧光标记单克隆抗体 CD3 (FITC)，为 Beckman Coulter 公司产品

[0082] (5) 抗小鼠荧光标记单克隆抗体 CD4 (PE)、CD8a (PE)，Caltag laboratories 产品

[0083] 2. 实验方法

[0084] 2.1 T 淋巴细胞亚群分析

[0085] 脾细胞单细胞悬液的制备：把小鼠的脾脏放入盛有冷 PBS 液的培养皿中清洗，在玻璃匀浆器中加入 3ml PBS 研磨，再用 200 目不锈钢网过滤，把脾匀浆液离心以转速 1500rpm/min 离心 7 分钟，弃上清液，并加入红细胞裂解液 2.5ml，混匀，静置 2 分钟后再加入 PBS 液 2ml 终止裂解反应，再以 1500rpm/min 离心 7 分钟，弃去上清液，用 PBS 洗三次后加入 PBS，在荧光显微镜下计算细胞数。以上的操作均需在冰上。

[0086] 用以上脾细胞单细胞悬液，计细胞数后，把细胞浓度调整为  $5 \times 10^6$  cells/ml。每一组取其中一只小鼠脾细胞样本做亚群分析，把已调整浓度的小鼠脾细胞样本加入流式细胞分析专用管，每只小鼠脾细胞样本制备两管，每管加入样本 100  $\mu$ l。

[0087] 在含有样品专用管的第一管加 5  $\mu$ l CD3 (FITC) 和 3  $\mu$ l CD4 (PE)，第二管加 5  $\mu$ l

CD3 (FITC)和 3  $\mu$  l CD8 (PE)。室温闭光孵育 20min,各管加入 500  $\mu$  l 鞘液,振荡混匀。准备上机分析。

[0088] 2.2 血清 IL-10、抗 ds-DNA 抗体含量测定

[0089] 按试剂盒操作说明操作即可。

[0090] 2.3 尿微量白蛋白的测定:

[0091] 实验试剂:10% (v/v) 的冰醋酸溶液 (PH2.8);0.303mol/L 甘氨酸-冰醋酸缓冲液 (PH3.0):称取 22.72g 甘氨酸,用 10% 冰醋酸溶液稀释成 1000ml,加  $\text{NaN}_3$ 100mg,室温密封可稳定 1 年;溴酚蓝 (1.924mmol/L) 贮存液:精确称取 257.36mgBPB,用无水乙醇溶至 200ml,4 $^{\circ}$ C 冰箱可稳定 1 年;溴酚蓝 (0.231mmol/L) 显色剂:取 60mlBPB 贮存液,加入 2.5mlTriton X-100,用甘氨酸-冰醋酸缓冲液稀释至 500ml,室温密封可保存 1 年。

[0092] 标本的采集和检测:于第 20 天将小鼠分别放于代谢笼中饲养,收集隔夜 12 小时尿,准确记录尿量。叠氮钠处理后,离心 (2000r/min)10min,量取储存的小鼠尿液 2ml,各加显色剂 1ml,混匀 (防止产生气泡),用紫外分光光度计于 600nm 下测定吸光度 A。吸光度 A 反映尿微量白蛋白的含量大小,A 值越小,尿微量白蛋白含量越低。

[0093] 实验数据按照以下方法进行统计学处理:采用 SPSS10.0 统计软件,计算数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,多组资料比较采用方差分析,组内比较采用 t 检验。以  $p < 0.05$  为有统计学意义。

[0094] 3. 实验结果

[0095] 3.1 本发明对 SLE 小鼠 T 淋巴细胞亚群的影响

[0096] CD3+CD4+ 淋巴细胞是辅助性 T 细胞 (Th),CD3+CD8+ 淋巴细胞主要起抑制性调节作用,SLE 小鼠模型组 CD3+CD4+ 淋巴细胞水平比正常对照组的下降,SLE 小鼠模型组 CD3+CD8+ 淋巴细胞水平比正常对照组的上升,本发明能使 SLE 小鼠下降的 CD3+CD4+T 细胞上升,使上升的 CD3+CD8+T 下降,其中牛蒡子苷元中剂量组效果较好,这表明,本发明的药物能够纠正 SLE 小鼠 T 细胞亚群的失衡状态。试验结果见表 1。

[0097] 表 1 本发明对 SLE 小鼠 T 淋巴细胞亚群的影响

| 组别          | CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> (%) | CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (%) |
|-------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 正常对照组       | 14.80                                 | 4.00                                  |
| SLE 模型组     | 12.00                                 | 6.80                                  |
| [0098] 泼尼松组 | 12.50                                 | 6.60                                  |
| 牛蒡子苷元低剂量组   | 13.90                                 | 4.90                                  |
| 牛蒡子苷元中剂量组   | 14.20                                 | 4.20                                  |
| 牛蒡子苷元高剂量组   | 13.30                                 | 5.40                                  |

[0099] 3.2 本发明对血清 IL-10、抗 ds-DNA 抗体含量的影响

[0100] 与正常对照组比较,SLE 模型小鼠的 IL-10 和抗 ds-DNA 抗体水平明显升高,与 SLE 模型组相比,本发明能显著降低 SLE 小鼠血清 IL-10 和抗 ds-DNA 抗体水平,其中牛蒡子苷元低、中剂量组效果尤为显著,优于阳性药,其中牛蒡子苷元中剂量组与正常对照组无显著性差异。这表明,本发明的药物对于 SLE 小鼠治疗效果显著。试验结果见表 2。

[0101] 表 2 本发明对 SLE 小鼠血清 IL-10、抗 ds-DNA 抗体含量的影响

[0102]

| 组别        | IL-10<br>(pg/ml) | 抗 ds-DNA 抗体<br>(OD) |
|-----------|------------------|---------------------|
| 正常对照组     | 237±80.1         | 0.071±0.017         |
| SLE 模型组   | 748±105.4        | 1.86±0.24           |
| 泼尼松组      | 476±100.8**      | 0.71±0.37*          |
| 牛蒡子苷元低剂量组 | 385±94.5**       | 0.63±0.39**         |
| 牛蒡子苷元中剂量组 | 296±79.6#        | 0.34±0.81#          |
| 牛蒡子苷元高剂量组 | 499±113.1***     | 0.79±0.83***        |

[0103] \* 与正常对照组相比,  $p < 0.05$ ; \*\* 与正常对照组相比,  $p < 0.01$ ;

[0104] # 与 SLE 模型组相比,  $p < 0.05$ ; ## 与 SLE 模型组相比,  $p < 0.01$ 。

[0105] 3.3 本发明对 SLE 小鼠尿微量白蛋白含量的影响

[0106] 微量白蛋白尿反映肾脏异常渗漏蛋白质, 正常对照组尿液中仅出现极少量白蛋白, SLE 模型组白蛋白含量明显升高, 反映 SLE 小鼠肾脏有损伤; 与模型组相比, 本发明能显著降低 SLE 小鼠尿液中白蛋白的含量, 牛蒡子苷元低、中剂量组效果尤为显著, 优于阳性药, 并且牛蒡子苷元低、中剂量组与正常对照组无显著性差异。这进一步表明, 本发明的药物对于 SLE 小鼠肾脏损伤具有突出的治疗效果。试验结果见表 3。

[0107] 表 3 本发明对 SLE 小鼠尿微量白蛋白含量的影响( $\bar{x} \pm s$ )

[0108]

| 组别        | 吸光度 A (OD)    |
|-----------|---------------|
| 正常对照组     | 0.087±0.016   |
| SLE 模型组   | 0.785±0.214** |
| 泼尼松组      | 0.416±0.113** |
| 牛蒡子苷元低剂量组 | 0.189±0.081## |
| 牛蒡子苷元中剂量组 | 0.177±0.049## |
| 牛蒡子苷元高剂量组 | 0.481±0.205** |

[0109] \* 与正常对照组相比,  $p < 0.05$ ; \*\* 与正常对照组相比,  $p < 0.01$ ;

[0110] # 与 SLE 模型组相比,  $p < 0.05$ ; ## 与 SLE 模型组相比,  $p < 0.01$ 。

[0111] 在 T 淋巴细胞亚群分析试验中, 与 SLE 模型组相比, 本发明能使 SLE 样小鼠下降的 CD3+CD4+T 细胞上升, 使上升的 CD3+CD8+T 下降, 纠正 T 细胞亚群的失衡状态; 在血清 IL-10、抗 ds-DNA 抗体含量测定试验中, 与 SLE 模型组相比, 本发明能显著降低 SLE 小鼠血清 IL-10 和抗 ds-DNA 抗体水平的升高, 其中牛蒡子苷元中剂量组与正常对照组无显著性差异, 说明本发明的药物对于 SLE 小鼠治疗效果显著; 在尿微量白蛋白的测定试验中, SLE 模型组白蛋白含量明显升高, 反映 SLE 小鼠肾脏有损伤, 本发明能显著降低 SLE 小鼠尿液中白蛋白的含量, 牛蒡子苷元低、中剂量组效果尤为显著, 优于阳性药, 并且牛蒡子苷元低、中剂量组与正常对照组无显著性差异, 表明本发明的药物对于 SLE 小鼠肾脏损伤具有突出的治疗效果。

[0112] 将实施例 2-7 制备的牛蒡子苷元注射剂替代实施例 8 中使用的实施例 1 的牛蒡子苷元注射剂, 重复实施例 8, 结果发现实施例 2-7 制备的牛蒡子苷元注射剂对系统性红斑狼疮 (SLE) MRL/lpr 小鼠仍有显著的治疗作用。

[0113] 以上通过具体实施方式进一步描述了本发明, 任何等同替换对于本领域的技术人员来说都是显而易见的且包含在本发明之中。