



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118555958 A

(43) 申请公布日 2024. 08. 27

(21) 申请号 202280075587.5

(22) 申请日 2022.07.04

(30) 优先权数据

2021-186784 2021.11.17 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.05.13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2022/026543 2022.07.04

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/089862 JA 2023.05.25

(71) 申请人 国立感染症研究所所长代表的日本
国

地址 日本东京都

申请人 泽井制药株式会社

(72) 发明人 渡土幸一 佐宗若奈 寺岛徹

(74) 专利代理机构 北京弘权知识产权代理有限公司 11363

专利代理师 许伟群 崔春植

(51) Int.Cl.

A61K 31/4353 (2006.01)

A61K 36/59 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

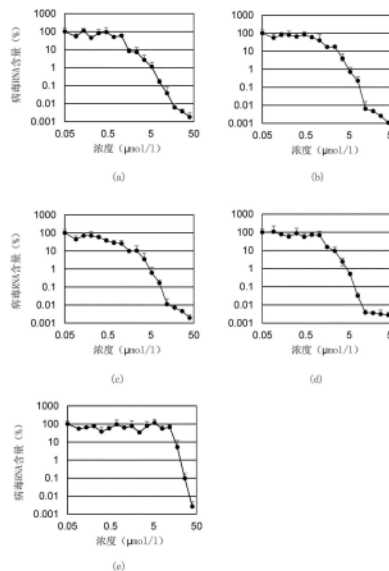
权利要求书1页 说明书7页 附图4页

(54) 发明名称

含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂

(57) 摘要

在一个实施方式中,提供一种含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂,其用于治疗新型冠状病毒感染症。根据本发明的一个实施方式,用于治疗新型冠状病毒感染症的制剂包括千金藤素、异汉防己碱、轮环藤宁及小檗胺。用于治疗新型冠状病毒感染症的制剂用于治疗新型冠状病毒突变株引起的感染症。根据本发明的一个实施方式,提供了一种含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂,其用于治疗新型冠状病毒感染症。



1. 一种含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂,其用于治疗新型冠状病毒感染症,包括千金藤素、异汉防己碱、轮环藤宁及小檗胺。
2. 根据权利要求1所述的含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂,其用于治疗由新型冠状病毒突变株引起的感染症。

含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂

技术领域

[0001] 本发明的一个实施方式涉及含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂,特别地,本发明的一个实施方式涉及用于治疗冠状病毒感染症的含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂。更具体地说,本发明的一个实施方式涉及一种用于治疗新型冠状病毒感染症(COVID-19)的含有从金线吊乌龟提取的生物碱的制剂,该制剂包括千金藤素、异汉防己碱、轮环藤宁及小檗胺。

背景技术

[0002] 新型冠状病毒感染症(COVID-19)是一种新兴感染症,2020年3月11日世界卫生组织(WHO)宣布处于世界性大流行状态。作为预防新型冠状病毒感染症的方法,疫苗已被开发出来,在提交本申请时,疫苗的接种正在全球范围内进行。在提交本申请时,新型冠状病毒感染症的主要治疗方法仅为对症治疗,治疗药物的开发正在进行中。但是,尚没有对于新型冠状病毒感染症的高度有效性得到确认的治疗药物相关报告。

[0003] 与新型冠状病毒感染症相同,2003年报告的严重急性呼吸综合征(SARS:severe acute respiratory syndrome)是一种由冠状病毒引起的严重感染症。此外,2012年,一种由冠状病毒(MERS-CoV)引起的中东呼吸综合征(MERS)被报道,该病毒被命名为中东呼吸综合征冠状病毒(Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus,MERS冠状病毒)。但是,还没有有效地预防严重急性呼吸综合征和中东呼吸综合征的疫苗或高度有效性得到确认的治疗药物相关的报告。

[0004] 另一方面,例如在非专利文献1中记载了作为从金线吊乌龟萃取的生物碱的组成成分之一的千金藤素具有对SARS冠状病毒的抗病毒作用。此外,非专利文献2中记载了千金藤素、粉防己碱在感染细胞的早期阶段对人冠状病毒OC43株具有抗病毒作用。此外,本发明的发明人在非专利文献3中记载了千金藤素(注册商标)制剂(含有千金藤素、异汉防己碱、轮环藤宁及小檗胺在内的含有来自金线吊乌龟的多种生物碱的制剂)对新型冠状病毒(SARS-CoV-2(武汉株))具有抗病毒作用,以及含有多种来自金线吊乌龟的生物碱的千金藤素(注册商标)通过与SARS-CoV-2刺突蛋白(spike protein)的ACE2结合位点结合,抑制SARS-CoV-2与ACE2的结合。此外,在非专利文献4中,对于从墨西哥人中检测出的SARS-CoV-2的刺突蛋白(spike protein)的主要突变体(H49Y、D614G、T573I),记载了作为从金线吊乌龟萃取的生物碱的组成成分之一的千金藤素的结合方式的模拟结果。

[0005] 由此可见,来自金线吊乌龟的生物碱混合物或其构成成份之一的千金藤素有可能成为新型冠状病毒的治疗药物。然而,新型冠状病毒突变株的报告例越来越多,目前还没有研究来自金线吊乌龟的生物碱和构成其的各个成分(千金藤素等)是否对广泛的突变株具有高度的有效性。

[0006] 现有技术文献

[0007] 非专利文献

[0008] 非专利文献1:ZHANG Chuan-hai et.al.,Antiviral activity of

cepharanthine against severe acute respiratory syndrome coronavirus in vitro, Chin Med J(Engl).2005Mar20;118(6):493-6.

[0009] 非专利文献2:Dong Eon Kim et.al.,Natural Bis-Benzylisoquinoline Alkaloids-Tetrandrine,Fangchinoline,and Cepharanthine,Inhibit Human Coronavirus OC43 Infection of MRC-5Human Lung Cells,Biomolecules.2019Nov 4;9(11):696.

[0010] 非专利文献3:Hirofumi Ohashi et.al.,Potential anti-COVID-19agents, Cepharanthine and Nelfinavir,and their usage for combination treatment.iScience.2021Mar 26:102367.

[0011] 非专利文献4:Yudibeth Sixto-Lopez et.al.,Structural insights into SARS-CoV-2spike protein and its natural mutants found in Mexican population, Scientific Reports,25February 2021,11,1-16。

发明内容

[0012] 发明所要解决的问题

[0013] 为解决上述问题,本发明的目的之一为提供一种含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂,该制剂用于治疗新型冠状病毒感染症。或本发明的目的之一在于,在一个实施方式中,提供一种含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂,该制剂可用于治疗由新型冠状病毒突变株引起的感染症。

[0014] 解决问题所采用的措施

[0015] 根据本发明的一个实施方式,提供了一种用于治疗新型冠状病毒感染症的制剂,该制剂包括千金藤素、异汉防己碱、轮环藤宁及小檗胺。

[0016] 用于治疗新型冠状病毒感染症的制剂可以用于治疗新型冠状病毒突变株引起的感染症。

[0017] 发明的效果

[0018] 根据本发明的一个实施方式,提供一种含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂,该制剂用于治疗新型冠状病毒感染症。或者,根据一个实施方式,提供一种含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂,该制剂可广泛用于治疗由新型冠状病毒突变株引起的感染症。

附图说明

[0019] 图1示出根据本发明一个实施例的新型冠状病毒武汉株的感染试验结果,其中,(a)示出含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂的结果,(b)示出千金藤素的结果,(c)示出异汉防己碱的结果,(d)示出轮环藤宁的结果,(e)示出小檗胺的结果。

[0020] 图2示出受到根据本发明一个实施例的含有来自线吊乌龟的生物碱的制剂作用的细胞的存活率,其中,(a)示出含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂的结果,(b)示出千金藤素的结果,(c)示出异汉防己碱的结果,(d)示出轮环藤宁的结果,(e)示出小檗胺的结果。

[0021] 图3示出根据本发明一个实施例的新型冠状病毒突变株(阿尔法突变株)的感染试验结果,其中,(a)示出含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂的结果,(b)示出千金藤素的结果,(c)示出异汉防己碱的结果,(d)示出轮环藤宁的结果,(e)示出小檗胺的结果。

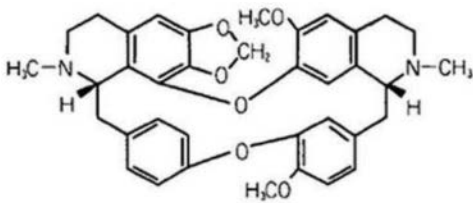
[0022] 图4示出根据本发明一个实施例的新型冠状病毒突变株(武汉株、贝塔突变株、伽玛突变株)的感染试验结果。

具体实施方式

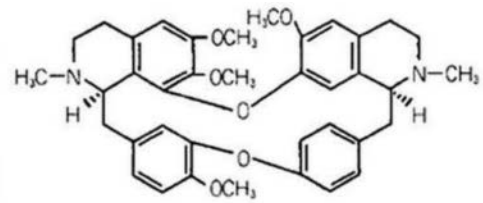
[0023] 以下,将详细说明本发明所涉及的含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂。但是,本发明的含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂不限于以下所示的实施方式和实施例的记载内容的解释。

[0024] 根据本发明一个实施方式的用于治疗新型冠状病毒感染症的制剂包括含有来自金线吊乌龟的生物碱。“来自金线吊乌龟的生物碱”是指从防己科千金藤属植物金线吊乌龟(*Stephania cepharantha* Hayata)中萃取的生物碱。在一个实施方式中,用于治疗新型冠状病毒感染症的制剂所包括的作为主要成分的来自金线吊乌龟的生物碱为用如下化学式表示的千金藤素(Cepharanthine)、异汉防己碱(Isotetrandrine)、轮环藤宁(Cycleanine)及小檗胺(Berbamine)。

[0025] [化1]

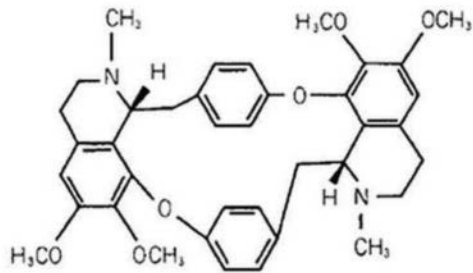


千金藤素

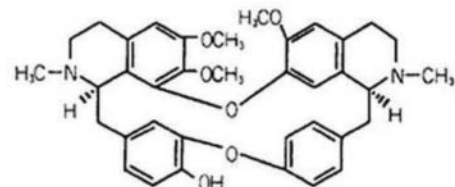


异汉防己碱

[0026]



轮环藤宁



小檗胺

[0027] 在一个实施方式中,制剂中所含的来自金线吊乌龟的生物碱的总量为100质量%时,用于治疗新型冠状病毒感染症的制剂可以包含19.5%~33.5%的千金藤素、25.0%~39.0%的异汉防己碱、6.5%~16.5%的轮环藤宁以及7.0%~16.5%的小檗胺。另外,在一个实施方式中,制剂所含的来自金线吊乌龟的生物碱的总量为100质量%时,用于治疗新型冠状病毒感染症的制剂含有总计85%左右的这四种生物碱。

[0028] 在一个实施方式中,用于治疗新型冠状病毒感染症的制剂除了上述四种生物碱之外,还可以包含选自如下生物碱的一种以上的来自金线吊乌龟的生物碱:高阿罗莫灵(homoaromoline)、头花千金藤醇灵碱(cepharanoline)、阿罗莫灵(aromoline)、黄皮树碱(obamegine)、降轮环藤宁(norcycleanine)、2-诺千金藤素(2-norcepharantine)、2-诺头

花千金藤醇灵碱(2-norcepharanoline)、2-诺小檗胺(2-norberbamine)、司可千金藤素(secocepharanthine)、黄小檗碱(obaberine)、2-诺异汉防己碱(2-norisotetrandrine)、尖刺碱(oxyacanthine)、司提腓巴檗啉(stephibaberine)、及缙唐松草碱(thalrugosine)等双苄基异喹啉类生物碱;衡州乌药碱(coclaurine)、网脉番荔枝碱(reticuline)、劳丹尼定(laudanidine)、原青藤碱(protosinomenine)、及N-甲基乌药碱(N-methylcoclaurine)等苄基异喹啉生物碱;FK-3000、青藤碱(sinomenine)、西法莫宁(cephamonine)、坦纳金(tannagine)、及西法姆啉(cephamuline)等吗啡烷生物碱;拉斯托维啉(lastourvilline)、异紫堇定(isocorydine)、及紫堇定(corydine)等阿朴啡生物碱;光千金藤碱(stepharine)等原阿朴菲生物碱;头花千金藤胺(cepharamine)、阿可那地宁(aknadinine)、阿可那地内酰胺(aknadilactam)等哈苏巴散(hasubasan)生物碱。

[0029] 此外,在一个实施方式中,用于治疗新型冠状病毒感染症的制剂可以包括这些生物碱的衍生物。例如,可以含有这些生物碱的至少一个羟基或亚氨基的氢原子被酰基、烷基或氨基甲酰基取代的酰基衍生物、烷基衍生物或氨基甲酰基衍生物。

[0030] 在一个实施方式中,用于治疗新型冠状病毒感染症的制剂中,每一个制剂中可以含有1mg至10mg上述的来自金线吊乌龟的生物碱。用于治疗新型冠状病毒的制剂可在注射剂、散剂、颗粒剂、片剂及胶囊剂中任意选择。此外,片剂可以是素片(uncoated tablet),也可以是薄膜包衣片。

[0031] 在一个实施方式中,用于治疗新型冠状病毒感染症的制剂除了上述来自金线吊乌龟的生物碱外,还可以根据剂型包括一种以上的药学上可接受的添加剂。例如从赋形剂、崩解剂、润滑剂、电解质、pH调节剂、防腐剂等中,可根据剂型选择。

[0032] 在一个实施方式中,作为用于治疗新型冠状病毒感染症的制剂可以使用千金藤素(注册商标)(Cepharanthin(注册商标),化研生药株式会社)。例如,由化研生药株式会社发售的千金藤素(Cepharanthin(注册商标)注射10g可用作注射剂。此外,例如,由化研生药株式会社发售的千金藤素(Cepharanthin(注册商标)粉末1%可用作散剂。此外,例如,由化研生药株式会社发售的千金藤素(Cepharanthin(注册商标)片1mg可用作片剂。

[0033] 在一个实施方式中,当用于治疗新型冠状病毒感染症的制剂是注射剂时,对于成人,可以通过静脉注射以一次1mg至10mg、每天一次至每周两次给药。此外,在一个实施方式中,当用于治疗新型冠状病毒感染症的制剂是散剂或片剂时,对于成人,可以一天分两次至三次将1.5mg至6mg在餐后口服给药。

[0034] 本实施方式所涉及的用于治疗新型冠状病毒感染症的制剂可用于治疗由新型冠状病毒突变株引起的感染症。根据非专利文献1~4的记载,可以推断,千金藤素通过与SARS-CoV-2刺突蛋白(spike protein)的ACE2结合位点结合,来抑制SARS-CoV-2与ACE2结合,从而发挥抗病毒作用。另一方面,刺突蛋白(spike protein)容易发生变异,众所周知刺突蛋白(spike protein)的变异会影响疫苗的有效性。本实施方式所涉及的用于治疗新型冠状病毒感染症的制剂是从金线吊乌龟萃取的多种生物碱的混合物,对新型冠状病毒及其突变株具有抗病毒作用。

[0035] [用于治疗新型冠状病毒感染症的制剂的制造方法]

[0036] 可以通过公知的方法从金线吊乌龟萃取本发明所涉及的来自金线吊乌龟的生物碱。例如,可以使用:将来自金线吊乌龟的萃取液浓缩而成的精华(extract),将该精华的酸

性溶液成为碱性时所产生的沉淀,进一步由此分离的含有生物碱的组分(fraction),或通过公知的方法来分离提纯而得到的晶体,通过公知的方法制备的生物碱的衍生物等。例如,用甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯或苯等溶剂萃取金线吊乌龟(可以使用根茎、茎、种子、叶等,但不限于这些部分),浓缩萃取液。将得到的浓缩物溶解于稀盐酸、稀硫酸、柠檬酸水溶液或草酸水溶液等酸性水溶液中,使溶液呈碱性,获取所产生的沉淀,由此可分离生物碱组分。所得组分还可以通过各种色谱、及重结晶等公知的手段进行提纯。

[0037] 根据公知的制造方法,用所得的来自金线吊乌龟的生物碱制造选自注射剂、散剂、颗粒剂、片剂或胶囊剂中的任意制剂。

[0038] 实施例

[0039] 以下,对上述实施方式所涉及的含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂,示出实施例并进一步说明。另外,本发明所涉及的含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂不限于以下实施例。

[0040] [实施例1]

[0041] 作为实施例1,对于本发明所涉及的含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂、以及作为含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂中所含的四种主要的生物碱的千金藤素、异汉防己碱、轮环藤宁及小檗胺,评价了对新型冠状病毒SARS-CoV-2(武汉株)的抗病毒作用。将千金藤素(注册商标)(Cepharanthin(注册商标),化研生药株式会社)使用为含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂。另外,从含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂分离提纯了千金藤素、异汉防己碱、轮环藤宁及小檗胺。

[0042] <细胞培养>

[0043] 对VeroE6/TMPRSS2细胞,在37°C、5%CO₂气氛下,使用添加有10%胎牛血清(FBS,细胞培养生物科学(Cell Culture Bioscience)公司)、100单位(units)/ml青霉素、100μg/ml链霉素、10mM HEPES(pH7.4)及1mg/ml G418二硫酸盐(Nacalai Tesque株式会社)的Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM,生物科技(Life Technologies)公司)进行了培养。在感染试验中,变更为2%FBS,未添加G418二硫酸盐。

[0044] <感染试验>

[0045] 使用从患者分离的新型冠状病毒SARS-CoV-2Wk-521株(武汉株),以感染复数(MOI)为0.003,对VeroE6/TMPRSS2细胞进行感染1小时。此时,在培养基中添加了含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂、千金藤素、异汉防己碱、轮环藤宁或小檗胺。清洗了细胞以清除未与细胞结合的病毒。培养细胞24小时,利用MagMax Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation kit(赛默飞世尔科技(Thermo Fisher Scientific)公司)提取了培养上清液中所含的来自新型冠状病毒武汉株的RNA。采用实时RT-PCR法对提取的RNA进行了定量。RNA定量结果如图1(a)至图1(e)所示。

[0046] <细胞存活率>

[0047] 对于VeroE6/TMPRSS2细胞,对于向培养基中添加含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂、千金藤素、异汉防己碱、轮环藤宁或小檗胺而培养24小时的细胞,用4%多聚甲醛进行固定,用DAPI染色了核。随后,使用ImageXpress Micro Confocal(分子器件(Molecular Device)公司)测定了存活细胞的数量。细胞生存率测定结果如图2(a)至图2(e)所示。

[0048] 图1(a)示出了含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂的结果,图1(b)示出了千金藤

素的结果,图1(c)示出了异汉防己碱的结果,图1(d)示出了轮环藤宁的结果,图1(e)示出了小檗胺的结果。图1(a)至图1(e)的结果表明,当含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂、千金藤素、异汉防己碱、轮环藤宁及小檗胺的添加浓度升高时,新型冠状病毒武汉株病毒RNA含量降低,从而清楚地表明含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂及这些生物碱对新型冠状病毒武汉株具有抗病毒作用。

[0049] 图2(a)示出了含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂的结果,图2(b)示出了千金藤素的结果,图2(c)示出了异汉防己碱的结果,图2(d)示出了轮环藤宁的结果,图2(e)示出了小檗胺的结果。图2(a)至图2(e)的结果表明,当含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂、千金藤素、异汉防己碱、轮环藤宁及小檗胺的添加浓度增加时,存活的细胞数降低,清楚地表明含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂和这些生物碱对细胞表现出伤害作用。

[0050] 此外,将图1(a)至图1(e)的结果与图2(a)至图2(e)的结果进行比较,则在伤害作用较低的生物碱浓度下,病毒RNA量下降,清楚地表明含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂、千金藤素、异汉防己碱、轮环藤宁和小檗胺显示对新型冠状病毒武汉株的抗病毒作用。此外,清楚地表明,千金藤素、异汉防己碱及轮环藤宁对新型冠状病毒武汉株的抗病毒作用与含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂相当。另一方面,清楚地表明,与其他生物碱相比,小檗胺对新型冠状病毒武汉株的抗病毒作用较弱。

[0051] [实施例2]

[0052] 作为实施例2,通过与实施例1相同的方法,对于本发明所涉及的含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂以及千金藤素、异汉防己碱、轮环藤宁及小檗胺,评价了对新型冠状病毒突变株(阿尔法突变株)的抗病毒作用。RNA定量结果如图3(a)至图3(e)所示。

[0053] 图3(a)示出了含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂的结果,图3(b)示出了千金藤素的结果,图3(c)示出了异汉防己碱的结果,图3(d)示出了轮环藤宁的结果,图3(e)示出了小檗胺的结果。图3(a)至图3(e)的结果表明,当含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂、千金藤素、异汉防己碱、轮环藤宁及小檗胺的添加浓度的增加时,新型冠状病毒突变株(阿尔法突变株)的病毒RNA含量下降,因此,清楚地表明含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂和这些生物碱对新型冠状病毒突变株(阿尔法突变株)具有抗病毒作用。此外,清楚地表明,千金藤素、异汉防己碱及轮环藤宁对新型冠状病毒突变株(阿尔法突变株)的抗病毒作用与含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂相当。另一方面,清楚地表明,与其他生物碱相比,小檗胺对新型冠状病毒突变株(阿尔法突变株)的抗病毒作用较弱。

[0054] [实施例3]

[0055] 作为实施例3,通过与实施例1相同的方法,评价了本发明所涉及的含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂对新型冠状病毒突变株(伽玛突变株)的抗病毒作用。

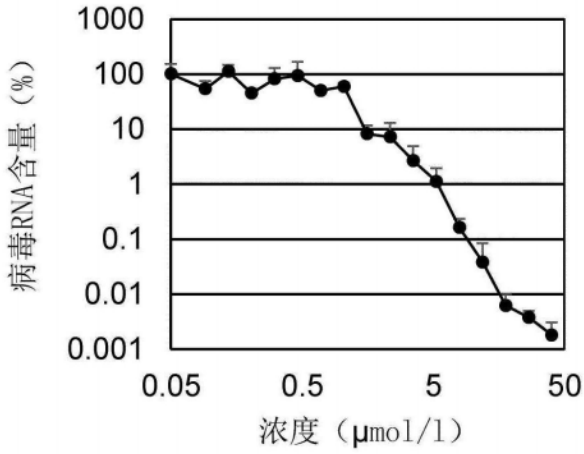
[0056] [实施例4]

[0057] 作为实施例4,通过与实施例1相同的方法,评价了本发明所涉及的含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂对新型冠状病毒突变株(贝塔突变株)的抗病毒作用。

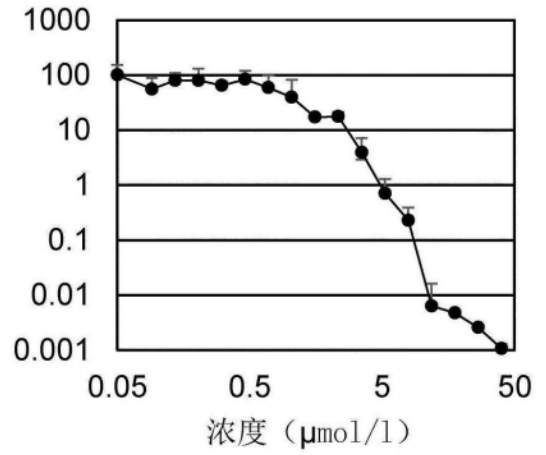
[0058] 实施例3以及实施例4的评价结果如图4所示。图4的结果表明,当含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂的添加浓度的增加时,新型冠状病毒突变株(伽马突变株)和新型冠状病毒突变株(贝塔突变株)的病毒RNA量下降,清楚地表明了含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂对新型冠状病毒突变株(伽马突变株)和新型冠状病毒突变株(贝塔突变株)具有抗

病毒作用。

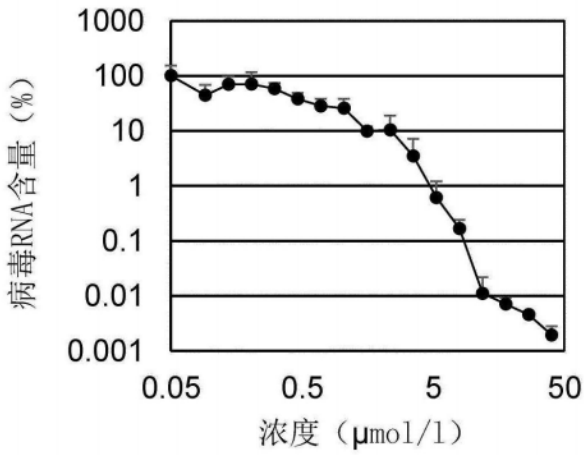
[0059] 上述实施例的结果清楚地表明,本发明所涉及的含有来自金线吊乌龟的生物碱的制剂不仅对新型冠状病毒武汉株,而且对新型冠状病毒突变株(阿尔法突变株、贝塔突变株及伽马突变株)也具有抗病毒作用。



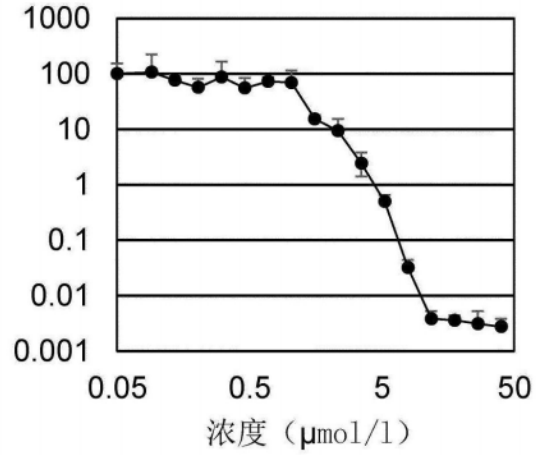
(a)



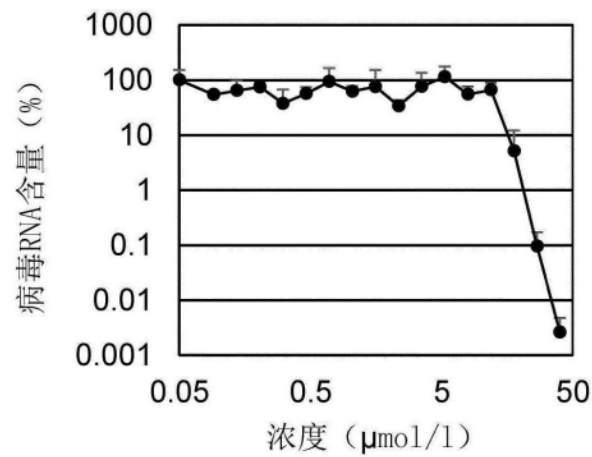
(b)



(c)

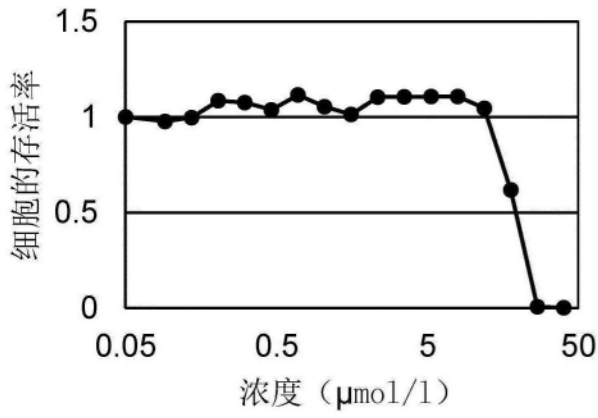


(d)

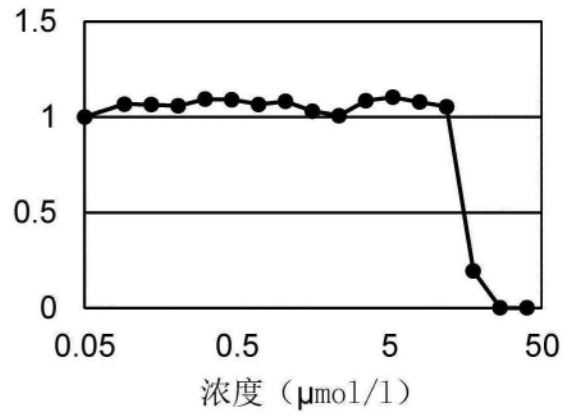


(e)

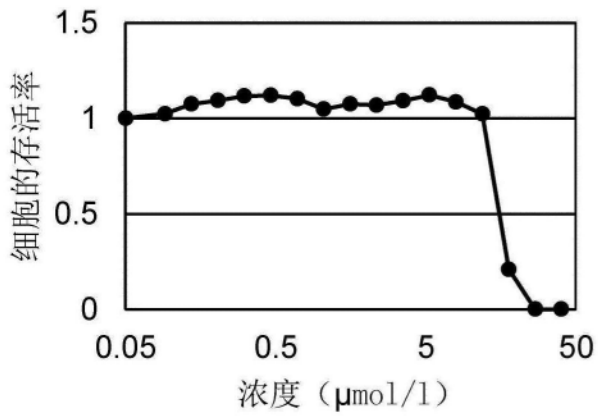
图1



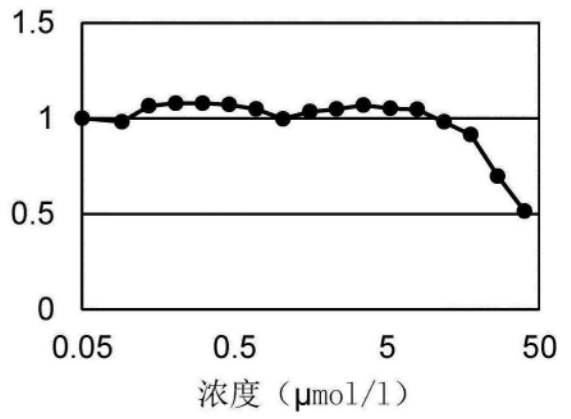
(a)



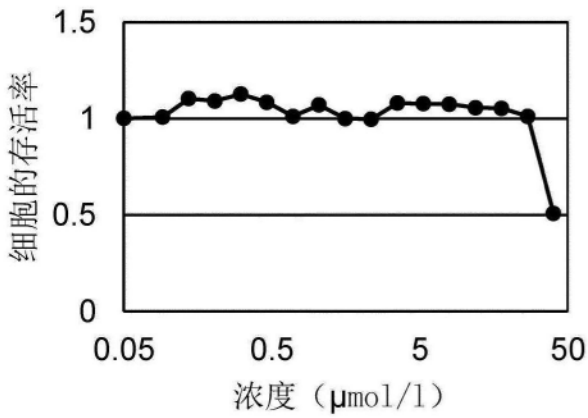
(b)



(c)



(d)



(e)

图2

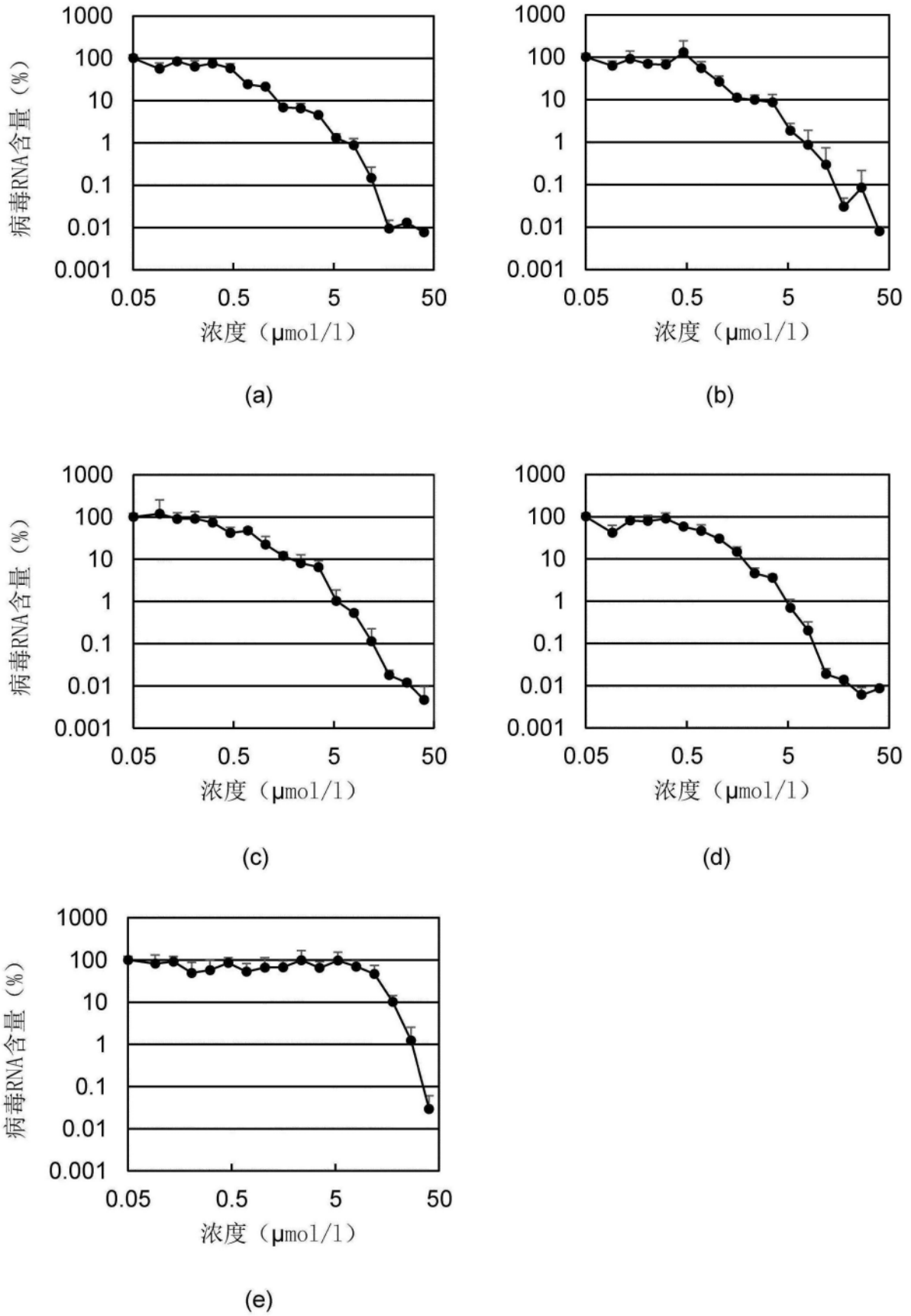


图3

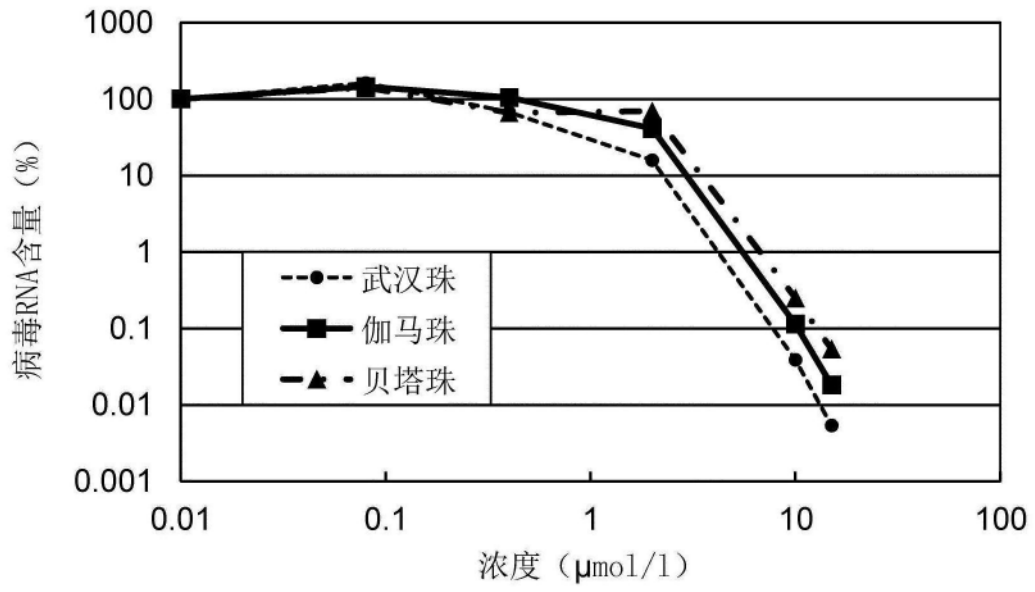


图4