(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102552280 A
(43)申请公布日 2012.07.11

(21)申请号 201110268166.8

(22)申请日 2011.09.09

(71)申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号
申请人 中国科学院上海生命科学研究院湖州营养与健康产业创新中心

(72)发明人 师晓栋 王滔 邓红雨 宗伟英 都培双 肖辉 肖功胜

(74)专利代理机构 上海精晟知识产权代理有限公司 31253
代理人 何新平

(51)Int.Cl.
A61K 31/56(2006.01)
A61K 31/704(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 4 页

(54)发明名称

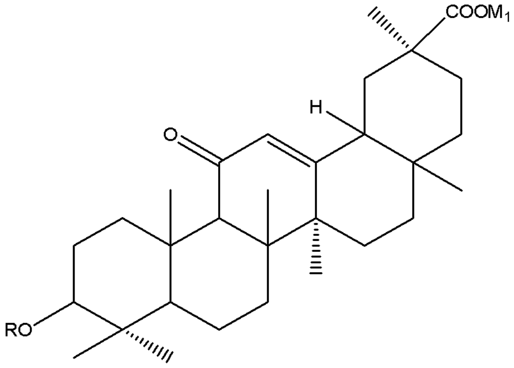
甘草酸或盐及其衍生物的制药用途

(57)摘要

本发明涉及医药学领域,特别是涉及一种甘草酸或盐及其衍生物的医药用途。本发明的甘草酸或盐及其衍生物可用于治疗炎症性组织二次损伤。

CN 102552280 A

1. 结构式 (I) 的化合物或其可药用盐、前药用于制备 HMGB1 表达抑制剂或活性抑制剂：



(I)

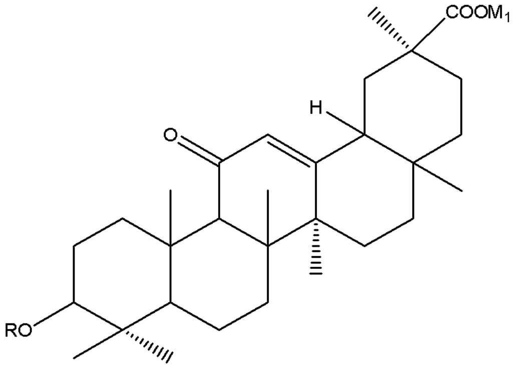
其中，R 为氢、葡萄糖基或 $-COM_2OOCO_3H_{10}C_4-C_5H_{11}O_5COOM_3$；

M_1、M_2 和 M_3 独立地选自 H^+、Na^+、K^+、NH_4^+、Ca^{2+} 或 Zn^{2+}。

2. 权利要求 1 的用途，其中所述化合物为甘草次酸。

3. 权利要求 1 的用途，其中所述化合物为甘草酸铵。

4. 结构式 (I) 的化合物或其可药用盐、前药用于制备预防或者治疗炎症性组织二次损伤的药物：



(I)

其中，R 为氢、葡萄糖基或 $-COM_2OOCO_3H_{10}C_4-C_5H_{11}O_5COOM_3$；

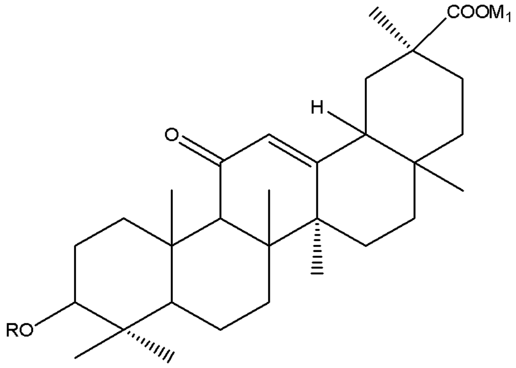
M_1、M_2 和 M_3 独立地选自 H^+、Na^+、K^+、NH_4^+、Ca^{2+} 或 Zn^{2+}。

5. 权利要求 4 的用途，其中所述炎症性组织二次损伤由 HMGB1 调控。

6. 权利要求 4 或 5 的用途，其中所述化合物为甘草次酸。

7. 权利要求 4 或 5 的用途，其中所述化合物为甘草酸铵。

8. 一种药物组合物，包括治疗有效量的结构式 (I) 的化合物或其可药用盐、前药，及可药用载体：



(I)

其中，R 为氢、葡萄糖基或 $-COM_2OOCO_3H_{10}C_4-C_5H_{11}O_5COOM_3$；

M_1、M_2 和 M_3 独立地选自 H^+、Na^+、K^+、NH_4^+、Ca^{2+} 或 Zn^{2+}。

9. 权利要求 8 的药物组合物，其中所述化合物为甘草次酸。

10. 权利要求 8 的药物组合物，其中所述化合物为甘草酸铵。

甘草酸或盐及其衍生物的制药用途

技术领域

[0001] 本发明涉及医药学领域，特别是涉及甘草酸或盐及其衍生物的医药用途。

背景技术

[0002] 药用甘草为豆科植物甘草 Glycyrrhiza uralensis Fisch.、胀果甘草 Glycyrrhizainflate Bat. 或光果甘草 Glycyrrhiza glabra L. 的干燥根和根茎。甘草中含有多种三萜皂苷，其中甘草酸和甘草次酸为其主要有效成分。甘草次酸(Glycyrrhetinic acid，GA)，为白色结晶性粉末，不溶于水，药理作用非常广泛，临床研究证实甘草次酸具有抗炎、抗溃疡及肾上腺皮质激素样作用。甘草酸单铵盐(Monoammoniumglycyrrhizate，MaG)则是甘草中提取的另一活性成分甘草酸所制备的铵盐。

[0003] 1973 年，Goodwin 等在牛胸腺中提取鉴定了一种含量丰富的非组蛋白核蛋白，该蛋白分子量 30kD 左右，富含电荷。因其在聚丙烯酰胺凝胶电泳中迁移率快，故命名为高迁移率族蛋白(HMG)。HMG 蛋白分为三类 :HMGB1(原称 HMG1 或 amphoterin 或 SBP-1)、HMGB2(原称 HMG2)和 HMGB3(原称 HMG4 或 HMG2b)。HMGB1 是含量最丰富的 HMG 蛋白，平均 10～15 个核小体中就含有一个 HMGB1 分子，每个细胞中约含 100 万个，非特异性结合在 DNA 分子的小沟上，参与 DNA 的构成，稳定核小体的结构。

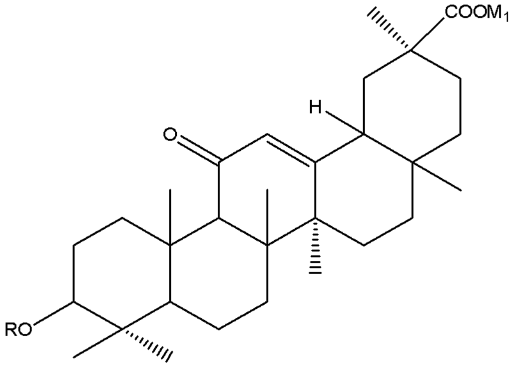
[0004] 大量文献报道，HMG 蛋白与众多疾病发生和发展密切相关。与 TNFα、IL-6 等其它已知的促炎细胞因子相比，HMGB1 具有出现晚、且作用持续时间长的特点，是导致炎症组织二次损伤的关键靶点。

发明内容

[0005] 本发明的目的旨在提供甘草酸或盐及其衍生物，或其可药用盐、前药的一种新的医药用途。

[0006] 本发明的第一方面是提供了结构式(I)的化合物，或其可药用盐、前药，用于制备 HMGB1 表达抑制剂或活性抑制剂的用途 :

[0007]



(I)

[0008] 其中，R 代表氢、葡萄糖基或 $-COM_2OOCO_3H_{10}C_4-C_5H_{11}O_5COOM_3$;

[0009] 其中，M_1、M_2 和 M_3 独立地选自 H^+、Na^+、K^+、NH_4^+、Ca^{2+} 或 Zn^{2+}。

[0010] 在一优选例中，所述化合物为甘草次酸。

[0011] 在另一优选例中，所述化合物为甘草酸铵。

[0012] 本发明的第二方面是提供了结构式（I）化合物，或其可药用盐、前药，用于制备预防或者治疗炎症性组织二次损伤的药物的用途。其中所述炎症性组织二次损伤由 HMGB1 调控。

[0013] 在一优选例中，所述化合物为甘草次酸。

[0014] 在另一优选例中，所述化合物为甘草酸铵。

[0015] 本发明的还提供了一种药物组合物，包括治疗有效量的结构式（I）化合物，或其可药用盐、前药，及可药用载体。

[0016] 本发明各个方面的细节将在随后的章节中得以详尽描述。通过下文以及权利要求的描述，本发明的特点、目的和优势将更为明显。

附图说明

[0017] 图 1

[0018] (A)MHV 致死剂量感染条件下，甘草次酸（GA）注射组和对照组的小鼠的生存曲线；

[0019] (B) 感染第 5 天血清中谷丙转氨酶（ALT）和谷草转氨酶（AST）水平分析；

[0020] (C) 感染第 5 天的肝组织的 H&E 病理切片染色结果（放大倍数 ×100）；

[0021] (D) 肝脏组织在感染第 5 天的 IP10，IL-6，TNF-α 和 IL-1β 基因表达水平分析；

[0022] (E) 感染第 3 和 5 天，各组小鼠血清中的 HMGB1 蛋白水平分析。

[0023] 图 2

[0024] (A)GA($1mg/10^6$ 细胞）或 anti-HMGB1($100\mu g/10^6$ 细胞）抗体处理后 MHV 病毒感染的 BNL.CL2 细胞 HMGB1 释放情况。

[0025] (B)ELISA 检测 MHV 病毒感染的 BNL.CL2 细胞上清中前体炎症因子（IP10、TNFα）的表达情况。

[0026] (C) 测定 MHV 病毒感染 BNL.CL2 后不同处理组处理 48 小时 IP10 基因表达情况。

[0027] (D)GA($1mg/10^6$ 细胞）或 anti-HMGB1($100\mu g/10^6$ 细胞）抗体处理后 MHV 感染的 BNL.CL2 细胞病毒滴度实验。

[0028] (E) 采用上述 48 小时的培养上清，UV 灭活病毒后分别与适量的 GA($0.3mg/10^6$ 细胞）和 HMGB1($15\mu g/10^6$ 细胞）抗体处理后刺激 RAW264.7 细胞，不同时间点各组 IP10 基因的相对表达情况。

[0029] *表示 $P < 0.05$；**表示 $P < 0.01$.

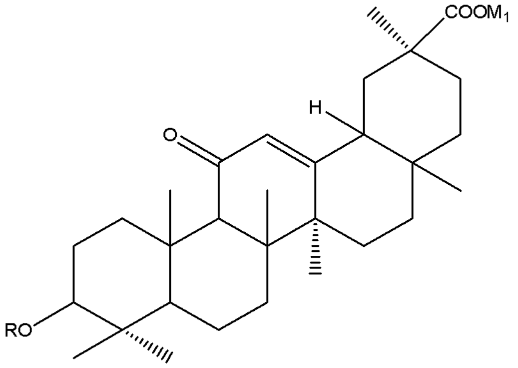
[0030] 图 3 甘草酸单铵盐（MaG）处理后 PBMC 细胞产生 TNFα 能力降低

具体实施方式

[0031] 本发明的问世部分是基于这样一个意外发现：甘草酸或盐及其衍生物，或其可药用盐、前药，在体外及动物体内均可显著抑制炎症因子 HMGB1 的表达。因此，甘草酸或盐及其衍生物，或其可药用盐、前药可用于制备 HMGB1 表达抑制剂。

[0032] 进而，本发明提供了一种结构式（I）的化合物，或其可药用盐、前药，用于制备 HMGB1 表达抑制剂或活性抑制剂的用途：

[0033]



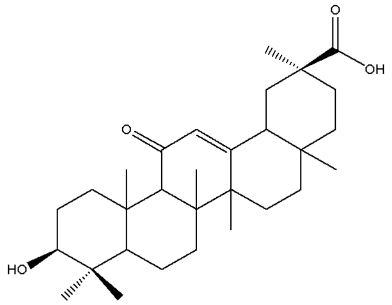
（I）

[0034] 其中，R 代表氢、葡萄糖基或 $-COM_2OOCO_3H_{10}C_4-C_5H_{11}O_5COOM_3$；

[0035] M_1、M_2 和 M_3 独立地选自 H^+、Na^+、K^+、NH_4^+、Ca^{2+} 或 Zn^{2+}。

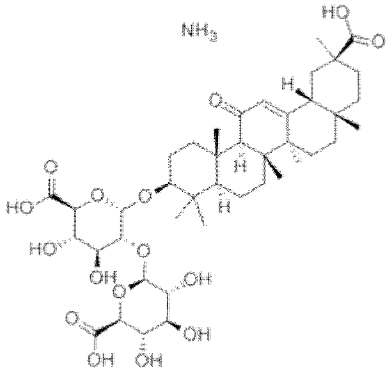
[0036] 特别是，所述化合物优选为甘草次酸或甘草酸单铵盐。其中，本发明的甘草次酸的分子式为：$C_{30}H_{46}O_4$，分子量为：470.68，结构式如下：

[0037]



[0038] 本发明的甘草酸单铵分子式为：$C_{42}H_{65}NO_{16}$，分子量为：839.9626，结构式如下：

[0039]



[0040] 本发明的结构式（I）化合物可通过商业途径获得或者使用本领域常规的合成原料和方法制备或提纯。

[0041] 本发明还包括结构式（I）化合物的相应的所有药学上可以接受的盐、前药。这些盐可以由化合物中带正电荷的部分（例如，铵基）与具有相反电性的带负电荷（例如，三氟醋酸）形成；或者由化合物中带负电荷的部分（例如，羧基）与正电荷（例如，钠，钾，钙，镁离子等）形成。所述的“结构式（I）化合物的前药”通常指一种物质，当用适当的方法施用后，可在受试者体内进行代谢或化学反应而转变成结构式（I）的至少一种化合物或其盐。

[0042] 本发明还提供了一种药物组合物，包括治疗有效量的结构式（I）化合物，或其可药用盐、前药及可药用载体。治疗有效量（即：可对人和/或动物产生功能或活性的且可被

人和/或动物所接受的量)的本发明的化合物与药学上可以接受的载体(用于治疗给药的载体,它们本身并不是必要的活性成分,且施用后没有过分的毒性)可以组成药物制剂,这些药物制剂可以制备成口服制剂、注射剂、片剂、粉制剂、胶囊剂、分散片、缓释制剂等。

[0043] 治疗有效量的本发明的组合物的用量介于0.001-500mg/kg体重/天之间,任何介于上述范围之内的用量皆为本发明的有效量。优选的,本发明的组合物的用量介于0.005-300mg/kg体重/天之间;更优选的,本发明的组合物的用量介于0.01-100mg/kg体重/天之间。所述的"治疗有效量"可用于相关疾病的单一用药或联合用药治疗。本领域的专业人员能够理解,在实际给药时的用量可高于或低于上述剂量范围。针对某一对象(如哺乳动物-人)的"治疗有效量"和具体治疗方案可受诸多因素的影响,包括所用化合物或其前药的药效活性、给药对象的年龄、体重、一般情况、性别、饮食、给药时间、疾病易感性、疾病进程以及收治医师的判断等。所述的"治疗"指得是给予机体(患有炎症、具有炎症的症状、或者具有炎症的前兆)一种或几种本发明的结构式(I)化合物,以治疗、减轻、减缓、改变、治愈、影响、改善其炎症、炎症的症状或炎症的前兆。

[0044] 研究证实,组织受到病毒感染、外伤或内源性损伤后,受感染和损伤的细胞死亡,导致内源性佐剂物质(DAMPs)的初步分泌,其中包括HMGB1(高迁移率族蛋白1)等促炎症反应分子,该类炎症分子能够激活巨噬细胞、DC细胞、中性粒细胞等炎症细胞,分泌TNFα、IL-6等细胞因子,触发炎症,该反应将导致炎症细胞的进一步激活和募集,进而分泌大量HMGB1等促炎因子,继续激活和募集更多的炎症细胞并分泌大量的细胞因子,这一过程循环往复,最终引发瀑布级联反应,产生大量的TNFα、IL-6等细胞因子,引起受损伤部位周围甚至全身组织细胞的炎症反应,导致这些组织细胞被进一步杀伤,从而引发来源于免疫细胞和免疫分子的组织二次损伤。

[0045] 可以理解,本发明的可抑制HMGB1表达和活性的结构式(I)化合物,或其可药用盐、前药,可用于制备预防或者治疗上述炎症组织二次损伤的药物。本领域的专业人员能够理解,所述的炎症组织二次损伤或许会在今后被证明具有其他的、未必与HMGB1的表达或活性密切相关的发病机理,但这并不影响本发明的结构式(I)化合物,或其可药用盐、前药,用于制备预防或者治疗上述炎症组织二次损伤的药物。

[0046] 本发明的结构式(I)化合物或其可药用盐、前药可以单独使用或以药物组合物的形式使用。药物组合物包括作为活性成分的本发明的结构式(I)化合物,或其可药用盐、前药,及可药用载体。较佳地,本发明的药物组合物含有0.1-99.9%重量百分比的作为活性成分的本发明的结构式(I)化合物,或其可药用盐、前药。"可药用载体"不会破坏本发明的结构式(I)化合物,或其可药用盐、前药的药学活性,同时其有效用量,即能发挥药物载体作用时的用量对人体无毒。

[0047] 所述可药用载体包括但不限于:软磷脂、硬脂酸铝、氧化铝、离子交换材料、自乳化药物传递系统、吐温或其他表面活化剂、血清蛋白、缓冲物质如磷酸盐、氨基乙酸、山梨酸、水、盐、电解质如硫酸盐精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、硅酸镁、饱和脂肪酸部分甘油酯混合物等。

[0048] 其他常用的药物辅料如粘合剂(如微晶纤维素)、填充剂(如淀粉、葡萄糖、无水乳糖和乳糖珠粒)、崩解剂(如交联PVP、交联羧甲基淀粉钠、交联羧甲基纤维素钠、低取代羟丙基纤维素)、润滑剂(如硬脂酸镁)以及吸收促进剂、吸附载体、香味剂、甜味剂、赋形剂、

稀释剂、润湿剂等。

[0049] 本发明的结构式(I)化合物,或其可药用盐、前药以及药物组合物可按本领域常规方法制备并可以通过肠道或非肠道或局部途径给药。口服制剂包括片剂、颗粒剂、悬浮液、胶囊、溶液等,非肠道给药制剂包括注射液。局部给药制剂包括霜剂、贴剂、软膏剂、喷雾剂等。

[0050] 本发明的结构式(I)化合物,或其可药用盐、前药以及药物组合物的给药途径可以为口服、舌下、经皮、经肌肉或皮下、皮肤粘膜、静脉、尿道、阴道等。

[0051] 以下结合具体实施例对本发明作进一步说明,但并不意味着本发明仅限于此。

[0052] 实施例 1 甘草次酸纯结晶粉末及溶液的制备

[0053] 甘草酸单钾盐 50g(含量约 60%),加 500ml 浓硫酸 : 乙醇 : 水 (25 : 100 : 375) 加热回流水解 10h,抽滤。冷却静置至充分析出晶体,抽滤得甘草次酸粗品,反复水洗至中性,干燥后加氯仿热溶,趁热过滤,得氯仿溶液,放冷,过三氯化铝柱层析,以氯仿洗脱,收集洗脱液,回收氯仿,所得固体物以乙醇重结晶两次,得甘草次酸纯结晶 10.8g,纯度≥ 96%。

[0054] 取上述粉末 20mg 用 1ml 乙醇溶解后,加入到 10ml PBS 缓冲溶液中,按照 1 : 10000 的比例加入 DMSO 1μl,加热到 55℃并持续搅拌混匀,15 ~ 20 分钟后即可得到甘草次酸的使用溶液 (2mg/ml)。

[0055] 实施例 2 甘草次酸对肝炎病毒感染小鼠血清中 HMGB1 蛋白的活性抑制

[0056] 实验步骤如下 :

[0057] (1) 利用 17Cl1 细胞扩增病毒 MHV-A59 至病毒滴度达≥ 2×10^{6}PFU/ml

[0058] (2) 对 6 周龄的 C57BL/6 小鼠随机分组,每个时间点的小鼠平行样本不少于 3 只。

[0059] (3) 在病毒感染生存曲线测定实验中,每组小鼠 10 只,I.P. 注射剂量为 8×10^{5}PFU/ 只 ;在低剂量感染实验中,I.P. 注射剂量为 1×10^{4}PFU/ 只。2 小时后用按实施例 1 制备甘草次酸溶液 I.P. 注射小鼠(剂量 20mg/kg,隔天注射,总共 3 次)。

[0060] (4) 生存曲线试验中每天记录小鼠死亡率。在甘草次酸抑制试验中,第 3 天眼球静脉取血,收集血清。在感染后第 5 天解剖小鼠,摘除眼球收集血清,提取肝组织置于 10%福尔马林中准备做 H&E 染色病理分析 ;剪取 0.1g 左右的肝组织并冻存以用作 RNA 提取所用。

[0061] (5) 血清中的 HMGB1 测定采用美国 CHONDREX 公司的小鼠 ELISA 试剂盒检测,ALT/AST 生化检测试剂盒采用北京中生北控公司的产品。

[0062] (6) 小鼠感染后第 5 天肝组织总 RNA 提取后,利用随机引物反转录生成 cDNA,稀释 10 倍后作为模板对前炎症因子 IP-10、IL-6、TNFα 和 IL-1β 进行定量 PCR 分析基因表达情况。

[0063] 结果表明(图 1),甘草次酸能够明显降低 MHV 感染引起的小鼠死亡率,对肝脏组织损伤、肝脏中炎症因子产生和血清中 HMGB1 水平都起到了明显抑制作用。

[0064] 实施例 3 甘草次酸对小鼠肝细胞中 HMGB1 蛋白的表达抑制

[0065] 实验步骤如下 :

[0066] (1) 以感染系数 MOI = 0.5 用 MHV-A59 感染小鼠胚胎肝细胞 BNL.CL2 细胞,吸附 1 小时后加入甘草次酸溶液 (1mg/10^{6}cells) 和抗 HMGB1 抗体 (100μg/10^{6}cells),37℃孵育 15 分钟后加入 DMEM 培养基,37℃条件下 5% CO_2 培养箱中培养。

[0067] (2) 第 24、36 和 48 小时收集细胞培养上清,ELISA 检测 CL2 细胞分泌产生 HMGB1

和 IP10 以及 TNFα 的浓度水平并做比较分析。

[0068] (3) 第 48 小时收集细胞总 RNA,并作 IP10 的 RT 定量 PCR 分析基因表达水平。

[0069] (4) 同样的处理方法,取各处理组 48 小时培养的上清,系列稀释后做病毒滴度测定。

[0070] (5) 采用上述 48 小时的培养上清,UV 灭活病毒后分别与适量的甘草次酸和 HMGB1 抗体处理 1 小时后,刺激小鼠巨噬细胞 RAW264.7,不同时间点测定各处理组的 IP10 基因的相对表达情况。

[0071] 结果表明(图 2),甘草次酸能明显抑制肝脏细胞和巨噬细胞 HMGB1 的产生和对炎症因子的诱导能力。

[0072] 实施例 4 甘草酸单铵 (MaG) 体外抑制 TNFα 表达实验研究

[0073] 实验步骤如下:

[0074] (1) 从健康人新鲜血液中分离外周血单核细胞 (PBMC);

[0075] (2) 以感染系数 MOI = 50 的 HSV-1 病毒感染 PBMC 细胞,吸附 1 小时后加入 MaG 溶液 (100uM),37℃孵育 30 分钟后,加入 1640 完全培养基,37℃条件下 5% CO2 培养箱中培养;

[0076] (3) 分别于第 5 天、第 7 天收集细胞培养上清,ELISA 检测 PBMC 细胞分泌产生 TNFα 的浓度水平并做比较分析。

[0077] 结果表明(图 3):甘草酸单铵能抑制 HSV-1 刺激 PBMC 细胞产生炎症因子 TNFα 的能力。

[0078] 实施例 5 片剂的制备

[0079] 片剂组成:

[0080]

甘草次酸	0.5g

[0081]

乳糖	69g
淀粉	25g
淀粉(冲浆 15%)	5g
硬脂酸镁	0.5g
共	100g

[0082] 将甘草次酸、HPMCLVIOO、乳糖、淀粉混匀,加入以淀粉浆制成软材,制粒,60℃通风干燥 40 分钟,过 75%乙醇制软材,24 目筛制粒,50℃干燥 3 小时,18 目筛整粒,加入硬脂酸镁混匀压片,制成 1000 片,每片 0.1g。用于患者,口服,一日 3 次,每次 2 片。

[0083] 实施例 6 胶囊剂的制备

[0084] 胶囊组成:

[0085]

甘草次酸	0.5g
淀粉	94g
淀粉（冲浆 15%）	5g
硬脂酸镁	0.5g
共	100g

[0086] 将甘草次酸、淀粉混匀，加入淀粉浆制成软材，制粒，60℃通风干燥，过 24 目筛整粒，加入硬脂酸镁混匀，装胶囊，共 1000 粒，每粒 0.1g。用于患者，口服。

[0087] 实施例 7 注射剂的制备

[0088] 注射液组成：

[0089]

甘草次酸	0.5g
聚氧乙烯（40）蓖麻油	15g
乙醇	10ml
加注射用水至	100ml

[0090] 甘草次酸0.5g溶于乙醇中，与聚氧乙烯(40)蓖麻油混匀，加注射用水至100mL，制成乳液，加入 0.1%生物活性炭滤过，分装，灌封，100℃流通蒸汽灭菌，30min 即得。

[0091] 本发明所涉及的多个方面已做如上阐述。然而，应理解的是，在不偏离本发明精神之前提下，本领域专业人员可对其进行等同改变和修饰，所述改变和修饰同样落入本申请所附权利要求的覆盖范围。

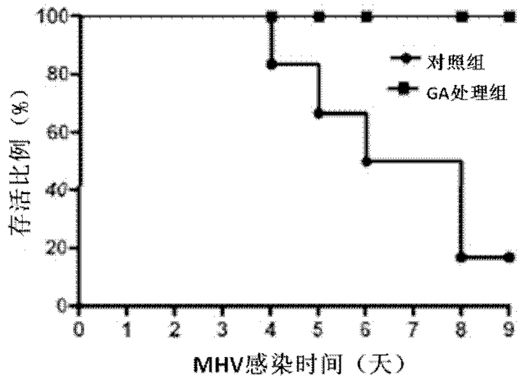

100
80
60
40
20
0
存活比例（%）
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
MHV感染时间（天）
对照组
GA处理组

图 1A

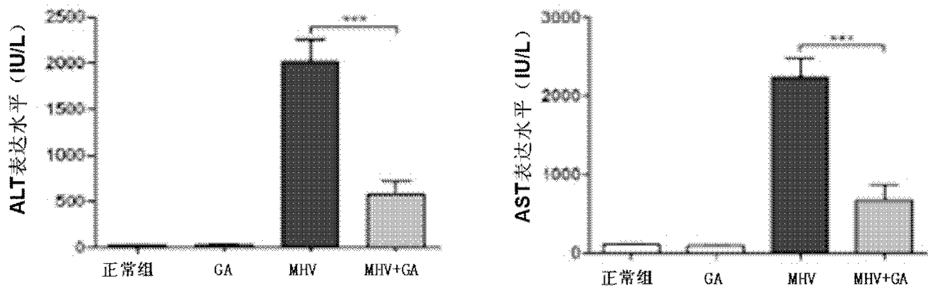

ALT表达水平（IU/L）
2500
2000
1500
1000
500
0
正常组
GA
MHV
MHV+GA
***
AST表达水平（IU/L）
3000
2000
1000
0
正常组
GA
MHV
MHV+GA
***

图 1B

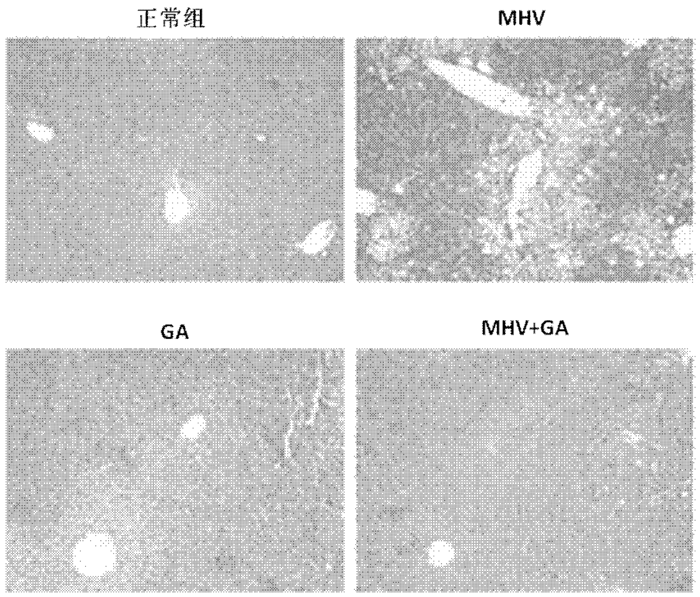

正常组
MHV
GA
MHV+GA

图 1C

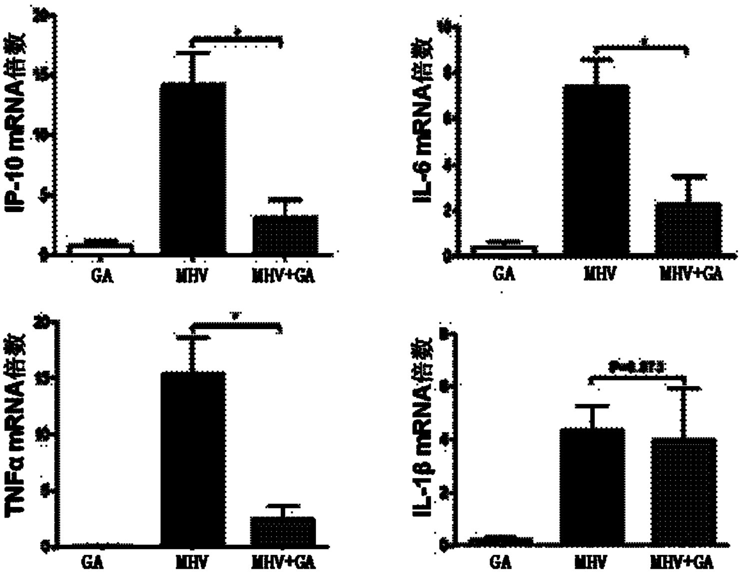

IP-10 mRNA倍数
IL-6 mRNA倍数
TNFα mRNA倍数
IL-1β mRNA倍数
GA
MHV
MHV+GA

图 1D

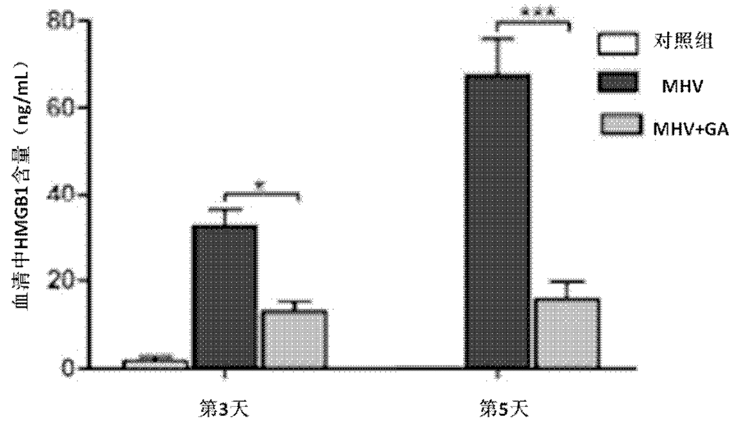

80
60
40
20
0
血清中HMGB1含量（ng/mL）
对照组
MHV
MHV+GA
*
***
第3天
第5天

图 1E

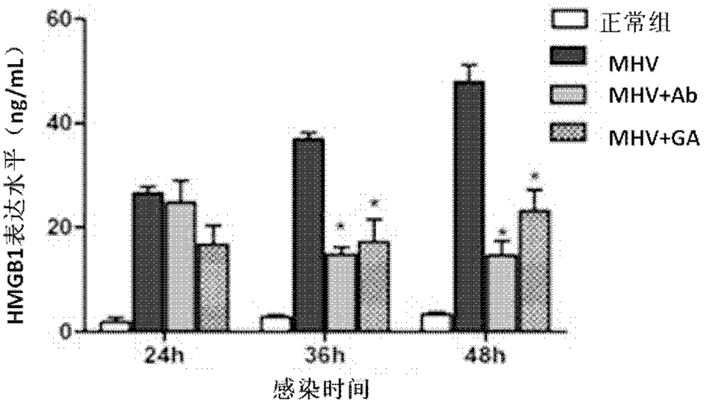

60
40
20
0
HMGB1表达水平（ng/mL）
正常组
MHV
MHV+Ab
MHV+GA
24h
36h
48h
感染时间

图 2A

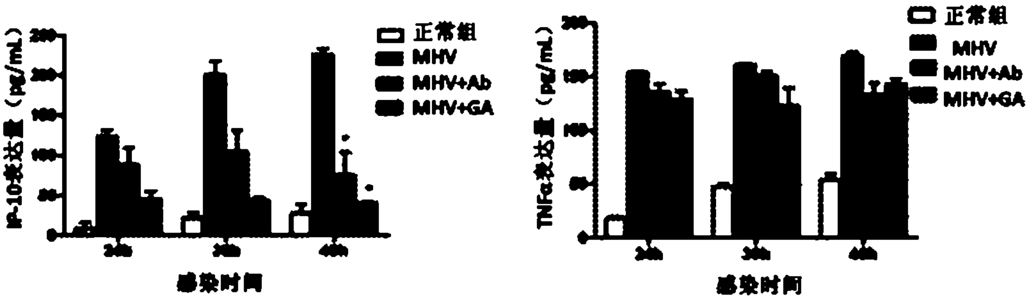


图 2B

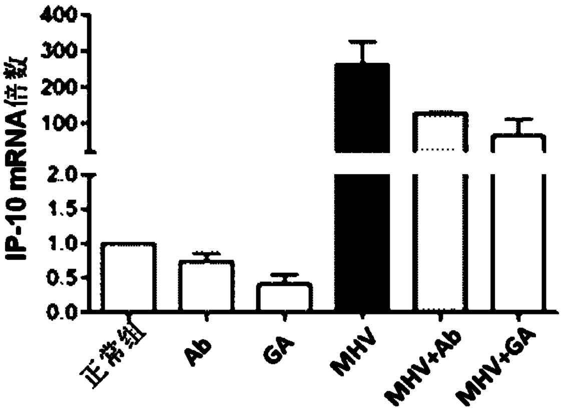


图 2C

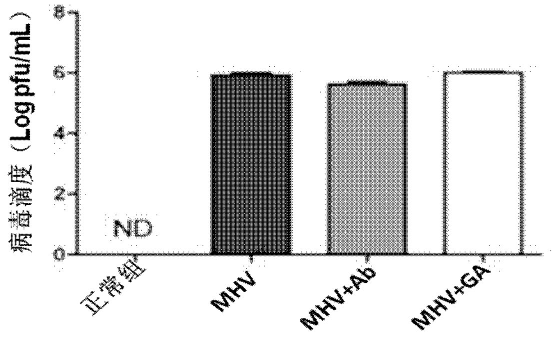


图 2D

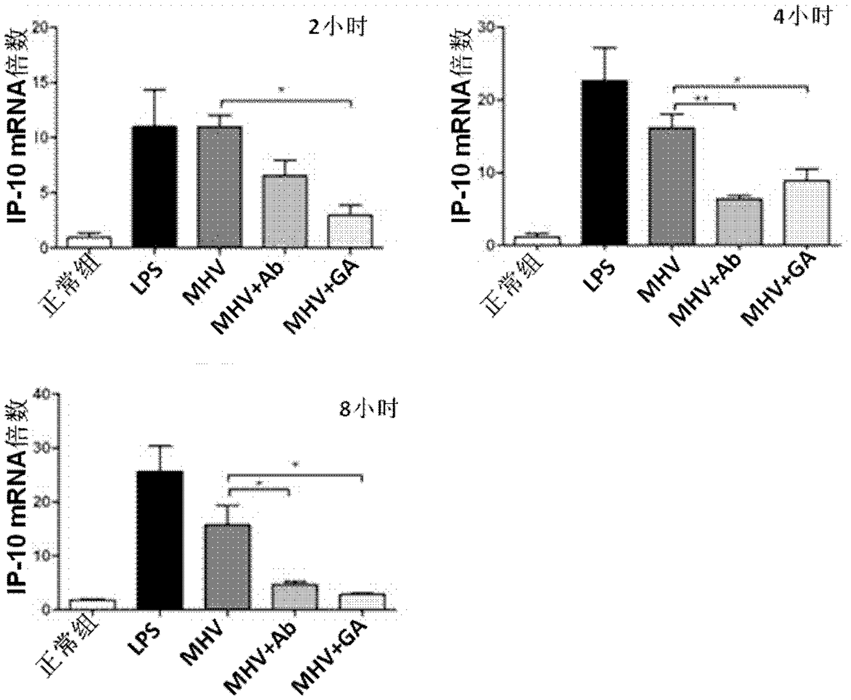


图 2E

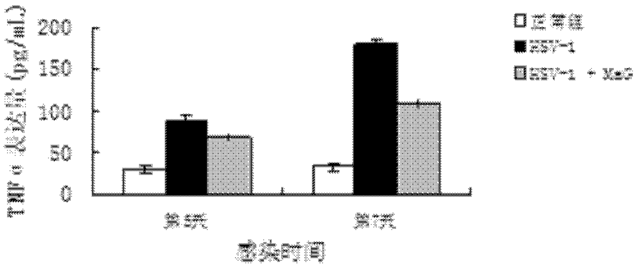


图 3