



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106727625 A

(43)申请公布日 2017. 05. 31

(21)申请号 201611046571.4

(22)申请日 2016.11.23

(71)申请人 苏州大学

地址 215000 江苏省苏州市工业园区仁爱路199号

(72)发明人 朱力 尤涛 唐朝君

(74)专利代理机构 苏州市中南伟业知识产权代理有限公司(普通合伙) 32257

代理人 杨慧林

(51) Int. Cl.

A61K 31/7024(2006.01)

A61P 7/02(2006.01)

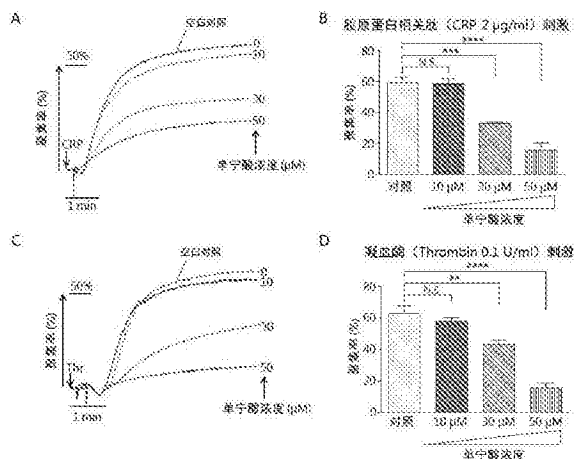
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54)发明名称

单宁酸在抗血栓药物中的应用

(57)摘要

本发明公开了单宁酸在制备抗血栓药物中的应用,尤其是抑制血小板活化/聚集的药物,通过进行体外和动物研究并发现,单宁酸作为一种天然化合物,在低浓度时即可明显抑制血小板磷脂拼接、活化和聚集,发挥显著的抗血小板和抗血栓作用,同时并不增加出血风险;单宁酸可由植物提取或工业合成,制造成本低,作为一种新型抗血小板药物开发,应用前景广阔,具有巨大的市场潜力与社会价值。



1. 单宁酸或其衍生物、水解物、溶剂化物、水合物在制备抗血栓药物中的应用。
2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于:所述抗血栓药物为抗血小板聚集的药物。
3. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于:所述抗血栓药物为抗血小板活化的药物。
4. 根据权利要求1-3中任一项所述的应用,其特征在于:所述药物中还包括药学可接受的载体、辅剂或媒介物。
5. 根据权利要求1-3中任一项所述的应用,其特征在于:所述药物剂型为片剂或注射剂。

单宁酸在抗血栓药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明设计医药领域,特别涉及单宁酸、该水解产物或衍生物的一种或几种组合作为预防和治疗血栓的用途。

背景技术

[0002] 血栓形成即血液成分在人体局部血管内的异常凝集,可以发生在动脉,也可以发生在静脉内。动脉血栓形成是造成90%以上的心肌梗死,80%脑卒中的主要原因,动脉栓塞性心血管疾病一直是发达国家首位的死亡原因;深静脉血栓和肺栓塞统称静脉血栓栓塞病,是发达国家继心梗和脑卒中后的第三位的心血管相关性疾病的死亡原因。动脉血栓和静脉血栓发生的病理生理基础不同,充分理解和掌握这种不同,是临床成功处置血栓性疾病的关键。从广义角度来说,动脉血栓是由于在粥样斑块破裂部位富含血小板血栓形成,阻断血流,造成供血不足所致。对于急性动脉血栓的处置主要是应用抗栓药物减缓已有血栓的继续进展并减少新的血栓形成,此类药物主要针对的靶点是参与血小板活化和聚集的分子。应用溶栓药物降解纤维蛋白,再通血管,也是动脉血栓治疗的重要措施,但此类药物的疗效主要取决于是否在合理的时间窗内应用。

[0003] 人们对于血小板参与血栓形成的机理的认识有了显著的提高,但寻找“理想的抗栓药物”的努力仍在继续。理想的抗栓药物应具备如下特点:首先,该药物应能抑制病理性的血栓形成,同时不影响正常的止血过程,不会造成出血;半衰期长,无需反复连续给药;临床应用方便,口服吸收良好;治疗窗宽,没有临床副作用或免疫原性,只需简单的监测;最后,如果一种药物可以满足所有要求,它的费用还不应太高。

[0004] 目前,抗血小板药主要分4类:(1)影响花生四烯酸代谢的药物,如阿司匹林;(2)增高环磷酸腺苷(cAMP)水平的药物,如西洛他唑等;(3)初级受体拮抗剂:ADP受体拮抗剂、凝血酶受体拮抗剂,如氯吡格雷等;(4)纤维蛋白原受体拮抗剂,如替罗非班、埃替非班、阿昔单抗等。临床广泛使用的经典抗栓药物如阿司匹林、噻氯吡啶等,可相应地抑制血小板活化过程中,由血栓烷A₂和ADP介导的单一步骤,具有预防血栓形成的作用,但治疗作用有限。然而,血小板通过由许多不同的活化途径组成的复杂网络而活化,因此单一阻断该复杂通路中的某一条,并不能完全阻断血小板聚集。无论血小板活化的最初途径是通过何种方式触发的,血小板聚集的最终共同通路都是活化血小板表面暴露出膜糖蛋白GPIIb/IIIa,并和纤维蛋白原结合。因此,阻断GPIIb/IIIa形成是开发抗血栓药物的一个非常有吸引力的选择。然而,此类抗栓药物具有引起临床出血的危险。最初的血小板粘附,依赖于血小板GPIb/IX/V复合物通过VWF的桥接作用粘附到内皮下基质,特别是在高剪切力条件下。因此可以基于新的防止血栓形成的策略,开发新的安全有效的抗血栓药物,不仅可以保障人类健康、降低社会医疗成本,而且可以产生良好的经济效益。

[0005] 多年来,人们对抗血小板、抗血栓机制的研究及其药物开发进行了不懈的努力,并有效的应用于血栓性心脑血管疾病的预防、干预和治疗,但仍受到疗效差和副作用大的限制,特别是出血并发症。因此,寻找和开发新型安全有效的抗血小板药物仍然是目前的热点

和关键问题。目前临床所用的抗血小板及抗凝药物作用于血小板活化的不同通路及血栓形成的各个阶段,但也带来了一定的出血风险,限制了其广泛应用。血小板的质膜与大多数真核细胞一样,具有磷脂分布不对称的特点。磷脂酰胆碱(PC)和鞘磷脂(sphingomyelin)主要分布在膜外叶,而脑磷脂(PE)和磷脂酰丝氨酸(PS)则分布在膜内叶。质膜的不对称性通常由翻转酶(flippases)和氨基磷脂特异性移位酶(floppases)维持。在特定刺激下,比如血小板活化过程中,这种不对称性会遭到破坏,膜内叶中的磷脂酰丝氨酸暴露在外膜上,募集并激活一系列凝血因子,促进血液凝固和血栓形成。磷脂拼接酶(PS scramblases)的激活被认为是介导磷脂的双向跨膜运动的关键环节。

[0006] 目前,一种名为TMEM16F的蛋白已被证实具有磷脂拼接酶活性并在血小板膜上表达。而在Scott综合症患者(一种先天性出血性疾病)中,TMEM16F突变导致钙离子激活的脂质紊乱及磷脂拼接活性缺陷,患者表现为凝血功能异常。研究人员在TMEM16F基因敲除小鼠模型中发现其血小板磷脂拼接功能异常,促凝活性下降,并可抵抗颈动脉血栓形成。进一步的电生理研究揭示了TMEM16F具有钙离子门控离子通道和磷脂拼接酶双重功能,而后者呈现钙离子依赖性。同时,TMEM16家族的其他成员,包括TMEM16C、16D、16F、16G、16J,也具有钙离子依赖的磷脂拼接酶活性。因此,TMEM16F等介导的磷脂拼接有望成为抗血小板及抗栓治疗的新靶点。

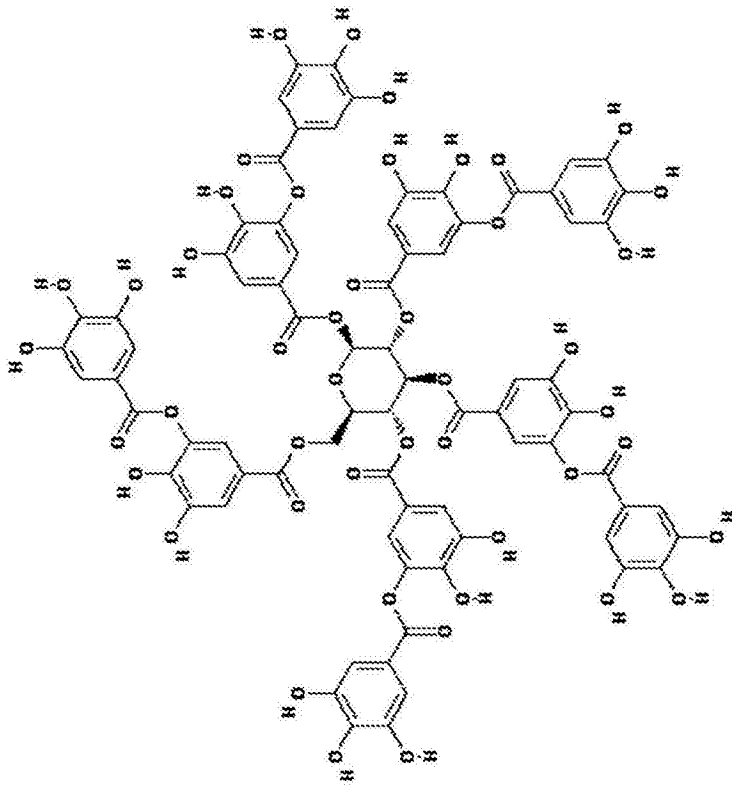
[0007] 作为一种小电导钙激活非选择性阴离子通道,TMEM16F并不能被常规的钙离子激活的非选择性阳离子通道(CAN)和钙离子激活的氯离子通道(CaCC)阻断剂所抑制,包括5-硝基-2-(3-苯丙胺)苯甲酸(NPPB)、氟芬那酸(FFA)、尼氟酸(NFA)、N-苯基萘酸(NPC)和SKF96365。而已知可有效阻断TMEM16F的物质则有钌红(Ru-Red)、2-氨基乙基联苯基硼酸酯(2APB)、镉离子、钆离子和单宁酸。

[0008] 单宁酸作为唯一的天然低毒物质,是一种历史悠久的药物,曾被用于解毒、收敛、抑菌及工业生产;单宁酸广泛存在于咖啡、红酒、绿茶等饮料中,过量食用可能引起消化道刺激和缺铁性贫血。最新研究发现,单宁酸具有天然抗氧化活性,并能抑制平滑肌增生、迁移、收缩,发挥抗动脉粥样硬化、抑制肿瘤生长等效应。大量的临床观察也证实了饮用富含单宁酸的咖啡、红酒和绿茶能够显著降低心血管疾病风险。然而,单宁酸在血小板和血栓性疾病中的作用国内外尚无报道。

发明内容

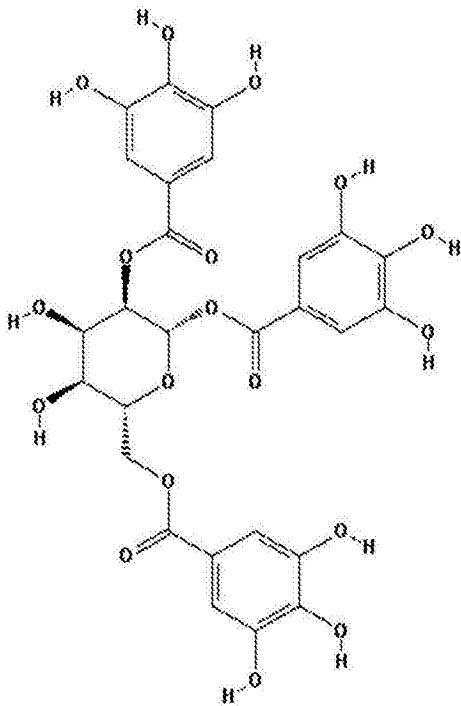
[0009] 为解决上述技术问题,本发明的目的是提供一种单宁酸或其衍生物、水解物、溶剂化物、水合物在制备抗血栓药物中的应用,该药物疗效显著、成本低。化学式如下:式(I)为五倍子丹宁(或单宁酸,鞣质,TANNIC ACID,Tanninum;),式(II)为Gallotannin 23(或1,3,6-三-O-没食子酰葡萄糖,1-酰-3,6-六羟基联苯二甲酰基葡萄糖,1,2,6-Trigalloyl glucose),是单宁酸水解化合物,式(III)为五倍子丹宁(红色)(或Gallotannin(red-colored)),是单宁酸聚合物。

[0010]

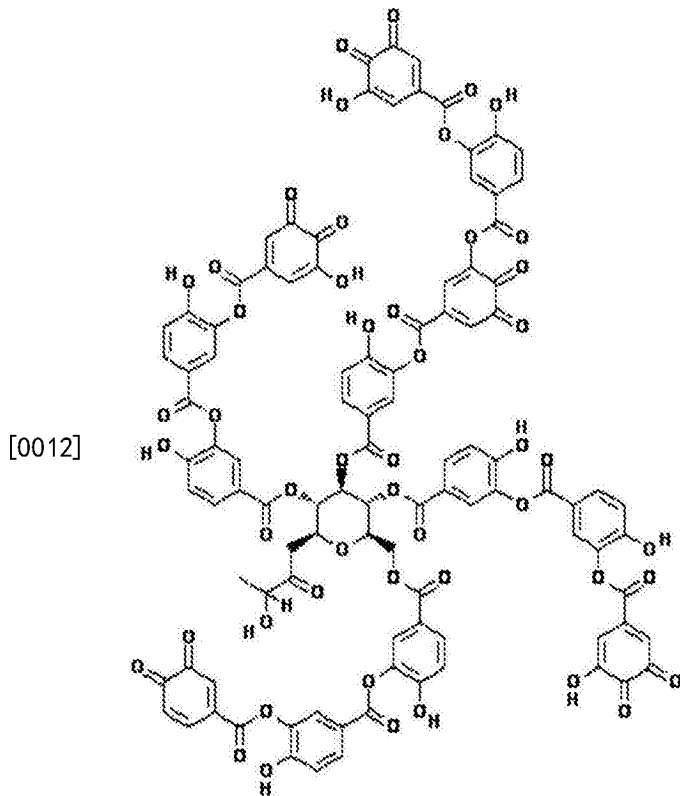


(I)

[0011]



(II)



(III)

[0013] 进一步的,所述抗血栓药物为抗血小板聚集的药物。

[0014] 进一步的,所述抗血栓药物为抗血小板活化的药物。

[0015] 进一步的,所述药物中还包括药学可接受的载体、辅剂或媒介物。

[0016] 进一步的,所述药物剂型为片剂或注射剂。

[0017] 借由上述方案,本发明至少具有以下优点:

[0018] 本发明提供了单宁酸、单宁酸水解产物、单宁酸衍生物在制备抑制血小板活化和/或聚集的药物中的应用,有效抑制TMEM16、抑制钙离子通道和质膜外翻的活性。单宁酸作为一种天然化合物,在低浓度时即可明显抑制血小板磷脂拼接、活化和聚集,发挥显著的抗血小板和抗血栓作用,同时并不增加出血风险;单宁酸可由植物提取或工业合成,制造成本低,生产技术成熟,理化性质稳定,储存条件简易,并兼有抗动脉粥样硬化、静脉血栓、心肌梗塞或脑卒中的作用,作为一种新型抗血小板药物开发,应用前景广阔,具有巨大的市场潜力与社会价值。

[0019] 上述说明仅是本发明技术方案的概述,为了能够更清楚了解本发明的技术手段,并可依照说明书的内容予以实施,以下以本发明的较佳实施例并配合附图详细说明如后。

附图说明

[0020] 图1中的A、B图示了与空白对照组相比,单宁酸显著抑制胶原蛋白相关肽(CRP, 2 μ g/ml)刺激的血小板聚集;C、D图示了与空白对照组相比,单宁酸显著抑制凝血酶(thrombin, 0.1U/ml)刺激的血小板聚集;

[0021] 图2中的A、B图示了与空白对照组相比,单宁酸对CRP (2 μ g/ml) 刺激的血小板选择

素(P-selectin)表达有显著抑制作用;C、D图示了与空白对照组相比,单宁酸对thrombin (0.1U/ml) 刺激的P-selectin表达有显著抑制作用;

[0022] 图3中的A、B图示了与空白对照组相比,单宁酸对CRP (2 μ g/ml) 刺激的纤维蛋白原结合有显著抑制作用;C、D图示了与空白对照组相比,单宁酸对thrombin (0.1U/ml) 刺激的纤维蛋白原(Fibrinogen)结合有显著抑制作用。

[0023] 图4中的A图示了与空白对照组相比,激光损伤小鼠提睾肌小动脉后,血栓大小随时间变化的曲线;B图示了检测时间内,两组血栓总体面积的对比;C图示了检测时间内,两组最大血栓面积的对比;D图示了两组峰值血栓的图像。

具体实施方式

[0024] 下面结合附图和实施例,对本发明的具体实施方式作进一步详细描述。以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。

[0025] 实施例一

[0026] 单宁酸对离体血小板聚集的抑制作用,具体如下:

[0027] (1) 制取洗涤血小板

[0028] 20%柠檬酸-葡萄糖溶液(ACD, pH4.4) (配方:柠檬酸三钠65mM,柠檬酸70mM,葡萄糖100mM) 抗凝取健康志愿者静脉血,900r/min离心20min制取富含血小板的血浆(PRP),PRP过已用台氏液(Tyrode's buffer)洗涤平衡过的琼脂糖凝胶sepharose2BTM柱子,从柱下端接取实验用洗涤血小板。血小板记数,用Tyrode's buffer调节血小板浓度至 $250 \times 10^6 \text{ml}^{-1}$ 。

[0029] (2) CRP刺激的血小板聚集的测定

[0030] 血小板聚集仪(CHRONO-LOG)于实验前30min开机预热。取4只血小板聚集仪(CHRONO-LOG)专用比色杯(CHRONO-LOG,型号P/N312),分别加入250 μ L上述制取的洗涤血小板,洗涤血小板中分别加入1 μ L浓度为10、30和50 μ M的单宁酸溶液(生理盐水作为溶剂)以及1 μ L生理盐水(0 μ M,空白对照组),孵育15分钟,与胶原蛋白相关肽(collagen related peptide,CRP,2 μ g/ml)刺激下用血小板聚集仪测量血小板聚积率,结果见附图1中的A、B,与空白对照组(生理盐水组)比较,单宁酸溶液在浓度分别为30 μ M和50 μ M时显著抑制CRP (2 μ g/ml) 刺激的血小板聚集。

[0031] (3) 凝血酶(thrombin)刺激的血小板聚集的测定

[0032] 血小板聚集仪(CHRONO-LOG)于实验前30min开机预热。取4只血小板聚集仪(CHRONO-LOG)专用比色杯(CHRONO-LOG,型号P/N312),分别加入250 μ L以上制取的洗涤血小板,洗涤血小板中分别加入1 μ L浓度为10、30和50 μ M的单宁酸溶液(生理盐水作为溶剂)以及1 μ L生理盐水(0 μ M,空白对照组),孵育15分钟,于凝血酶(thrombin,0.1U/ml)刺激下用血小板聚集仪测量血小板聚积率,结果见附图1中的C、D,与空白对照组(生理盐水组)比较,单宁酸溶液在浓度分别为30 μ M和50 μ M时显著抑制thrombin (0.1U/ml) 刺激的血小板聚集。

[0033] 从附图1中可以看出,与空白对照组比较,**P值<0.01,***P值<0.001,****P值<0.001,具有显著统计学差异。

[0034] 实施例二

[0035] 单宁酸对离体血小板活化的抑制作用,具体如下:

[0036] (1) 制取洗涤血小板

[0037] 20%ACD (pH4.4) (配方:柠檬酸三钠65mM,柠檬酸70mM,葡萄糖100mM)抗凝取健康志愿者静脉血,900r/min离心20min制取富含血小板的血浆 (PRP),PRP过已用Tyrode's buffer洗涤平衡过的sepharose2BTM凝胶柱子,从柱下端接取实验用洗涤血小板,血小板记数,用Tyrode's buffer调节血小板浓度至 $250 \times 10^6 \text{ml}^{-1}$ 。

[0038] (2) 测P-selectin表达实验

[0039] 4支上样管中分别加入上述制取的洗涤血小板100 μL ,洗涤血小板中分别加入1 μL 浓度为10、30和50 μM 的单宁酸溶液 (生理盐水作为溶剂) 以及1 μL 生理盐水 (空白对照组),在加入荧光PE-P-selectin抗体标记血小板的条件下,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育10分钟,再用凝血酶 (thrombin,0.1U/mL) 或胶原相关肽 (Collagen-Related Peptide,CRP,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 刺激并37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育10分钟;随后在流式细胞仪下观察P-selectin表达。结果见附图2中的A、B,与空白对照组 (生理盐水) 相比,单宁酸溶液在浓度为10 μM 、30 μM 和50 μM 时对CRP (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 刺激的P-selectin表达有显著的抑制作用;附图2的C、D中,与空白对照组 (生理盐水) 相比,单宁酸溶液在浓度为10 μM 、30 μM 和50 μM 时对thrombin (0.1U/ml) 刺激的P-selectin表达有显著的抑制作用。

[0040] 从附图2中可以看出,与空白对照组比较,**P值 <0.01 ,***P值 <0.001 ,****P值 <0.001 ,具有显著统计学差异。

[0041] (3) 测Pac-1结合实验

[0042] 4支上样管中分别加入上述制取的洗涤血小板100 μL ,洗涤血小板中分别加入1 μL 浓度为10、30和50 μM 的单宁酸溶液 (生理盐水作为溶剂) 以及1 μL 生理盐水 (空白对照组),在加入荧光PE-P-selectin抗体标记血小板的条件下,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育10分钟,再用凝血酶 (thrombin,0.1U/mL) 或胶原相关肽 (Collagen-Related Peptide,CRP,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 刺激并37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育10分钟;随后在流式细胞仪下观察Pac-1结合。结果见图3的A、B,与空白对照组 (生理盐水) 相比,单宁酸溶液在浓度为10 μM 、30 μM 和50 μM 时对CRP (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 刺激的纤维蛋白原 (Fibrinogen) 结合有显著的抑制作用;图3的C、D中,与空白对照组 (生理盐水) 相比,单宁酸溶液在浓度为10 μM 、30 μM 和50 μM 时对thrombin (0.1U/ml) 刺激的Fibrinogen结合有显著的抑制作用。

[0043] 从附图3中可以看出,与空白对照组比较,**P <0.01 ,***P <0.001 ,****P <0.001 。

[0044] 实施例三

[0045] 单宁酸对激光诱导小鼠提睾肌动脉血栓的影响,具体如下:

[0046] 给野生型小鼠腹腔注射单宁酸 (7.5mg/kg) 以及等体积生理盐水 (空白对照组),半小时后麻醉,静脉注射DIOC6染料,以激光脉冲损伤游离的提睾肌动脉,在intravital显微镜下观察记录血栓形成情况。结果见图4,A显示血栓大小随时间变化的曲线,D为形成的最大血栓的显微放大图,结果均表明与空白对照组相比,单宁酸在剂量为7.5mg/kg (腹腔注射) 时对激光诱导小鼠提睾肌动脉血栓有明显的抑制作用。图4的B、C表现为单宁酸给药组血栓的总体积、峰值体积均小于空白对照组,从附图4的B、C中可以看出,*P值 <0.05 ,具有显著统计学差异。

[0047] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,并不用于限制本发明,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明技术原理的前提下,还可以做出若干改进和变型,这些改进和变型也应视为本发明的保护范围。

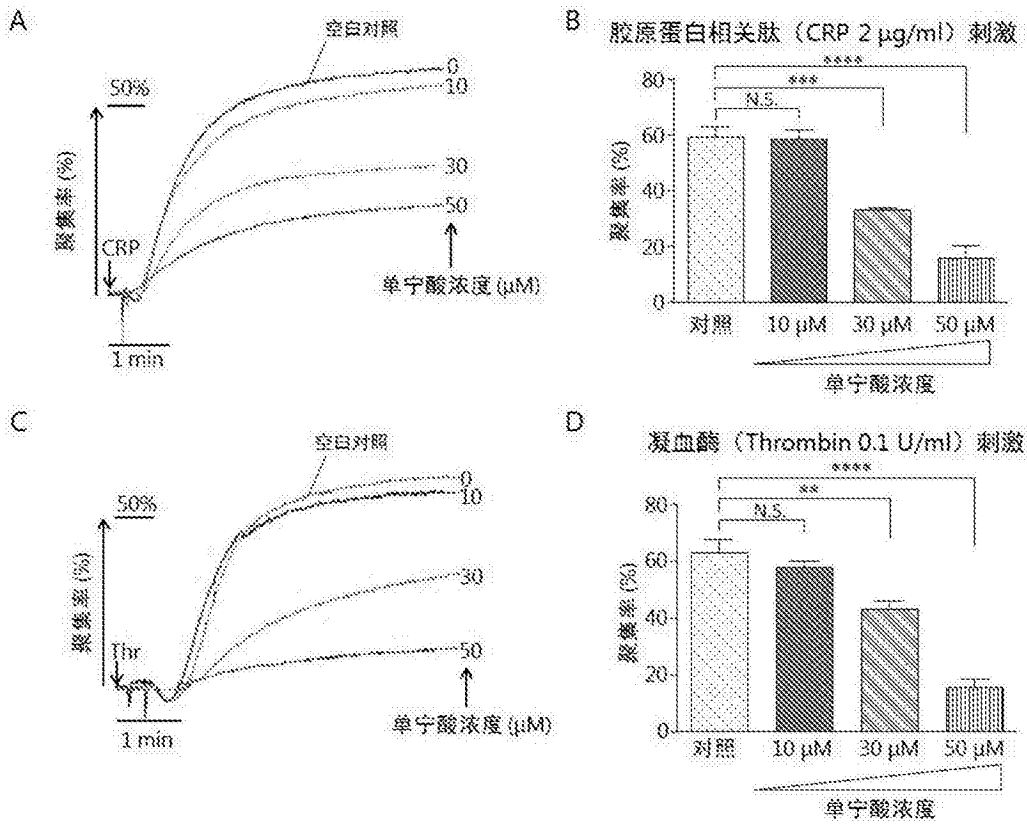


图1

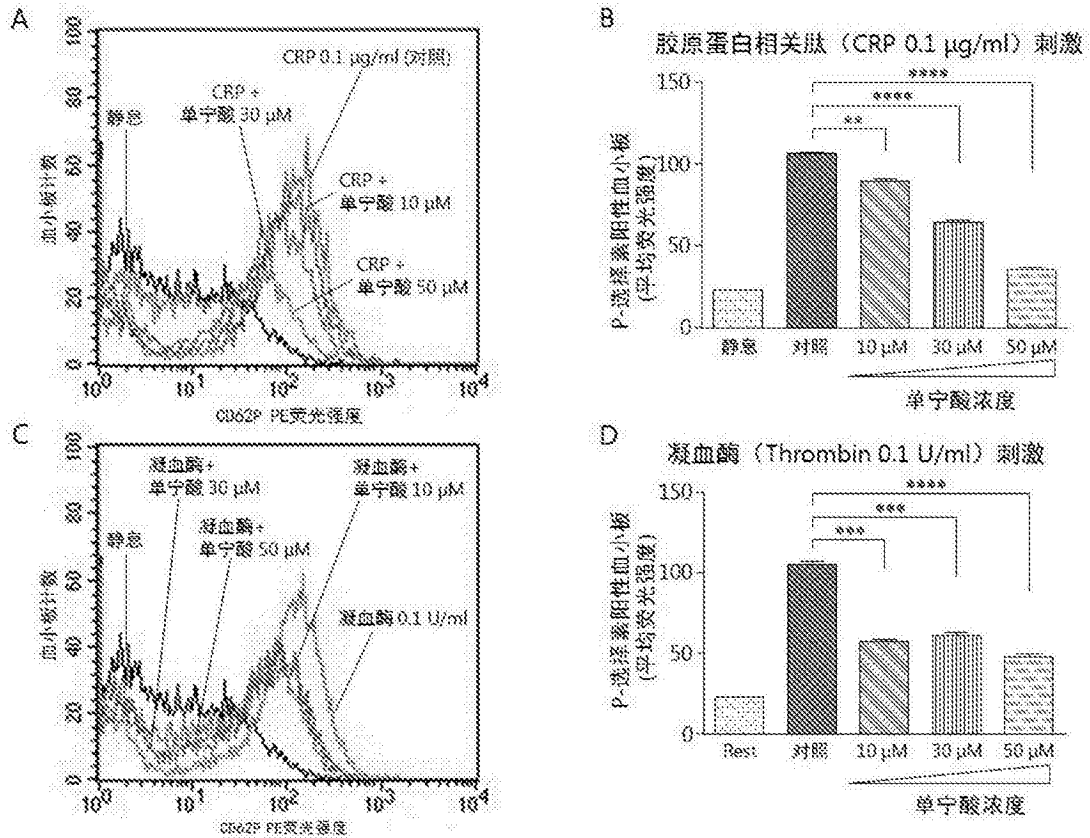


图2

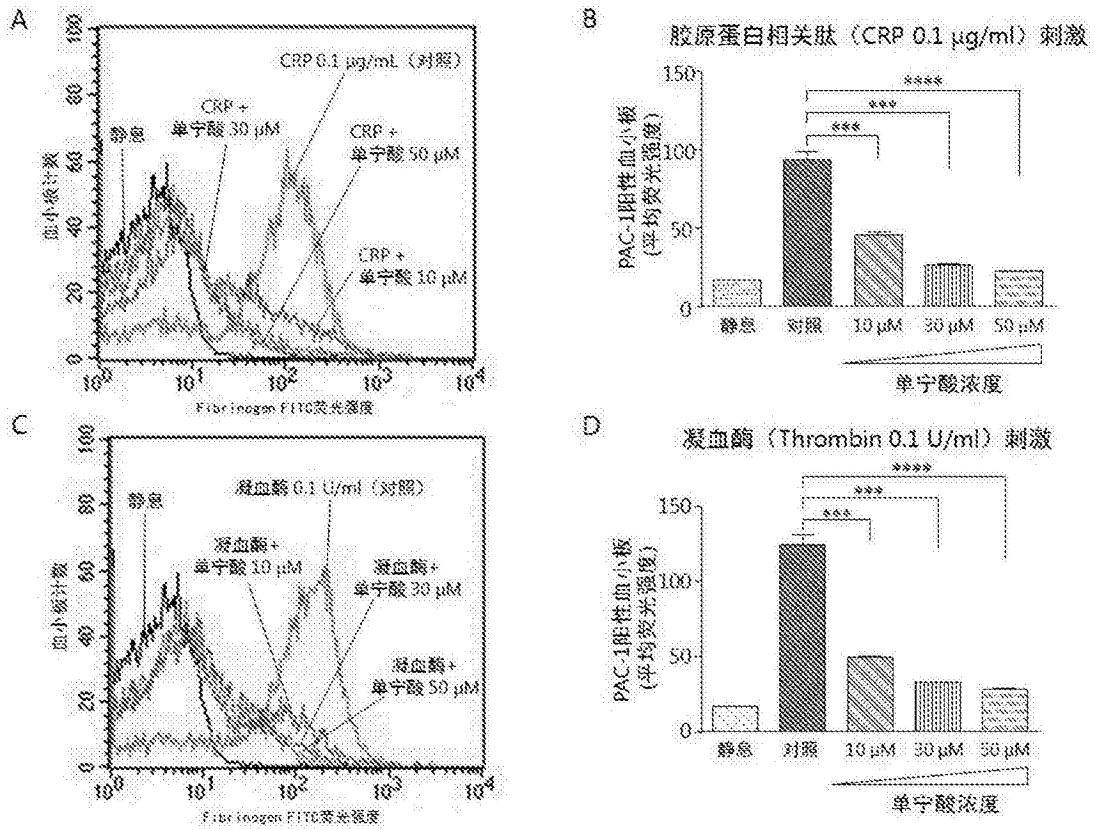


图3

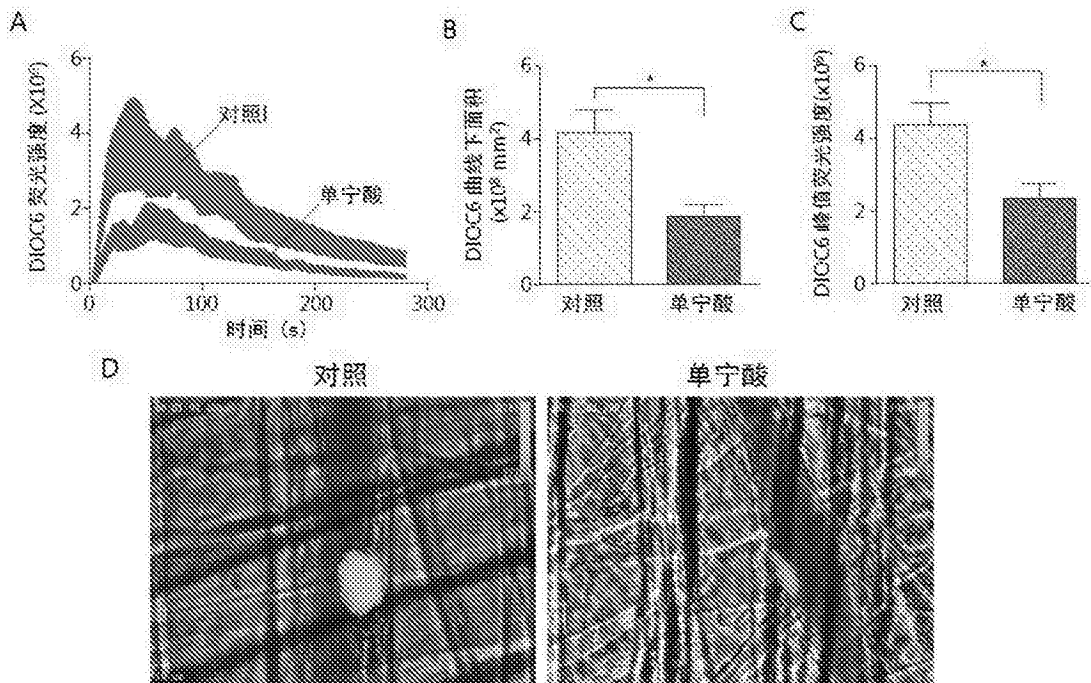


图4