



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112704072 A

(43) 申请公布日 2021.04.27

(21) 申请号 202011570007.9

(22) 申请日 2020.12.26

(71) 申请人 通化康元生物科技有限公司

地址 134000 吉林省通化市通化开发区经
开环路2266号

(72) 发明人 林万君 郑玲玲

(74) 专利代理机构 长春众邦菁华知识产权代理
有限公司 22214

代理人 于晓庆

(51) Int. Cl.

A01N 37/46 (2006.01)

A01P 1/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

(54) 发明名称

林蛙抗菌肽在制备抗新型冠状病毒SARS-CoV-2药物中的应用

(57) 摘要

林蛙抗菌肽在制备抗新型冠状病毒SARS-CoV-2药物中的应用,涉及抗新型冠状病毒SARS-CoV-2药物领域。本发明通过试验验证了林蛙抗菌肽具有抗新型冠状病毒SARS-CoV-2的作用,送检样本中1[#]林蛙抗菌肽20倍稀释液和2[#]林蛙抗菌肽30倍稀释液对新型冠状病毒SARS-CoV-2的灭活率达到99.0%以上,具有很强的抗新型冠状病毒SARS-CoV-2活性。本发明为预防和防治新型冠状病毒SARS-CoV-2提供了新的途径,扩展了抗新型冠状病毒SARS-CoV-2药物的范围,提高了抗新型冠状病毒SARS-CoV-2的效果,为全球的公共卫生安全事业提供了有利支撑。

1. 林蛙抗菌肽在制备抗新型冠状病毒SARS-CoV-2药物中的应用。
2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述林蛙抗菌肽是一种pI值为8.0~10.5的碱性多肽,分子量为4KDa。
3. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述抗新型冠状病毒SARS-CoV-2药物为消毒剂。

林蛙抗菌肽在制备抗新型冠状病毒SARS-CoV-2药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及抗新型冠状病毒SARS-CoV-2药物技术领域,具体涉及林蛙抗菌肽在制备抗新型冠状病毒SARS-CoV-2药物中的应用。

背景技术

[0002] 随着抗生素副作用的日益增加,研发功能相似且不易产生耐药性的其他活性物质已经迫在眉睫。目前,抗菌肽有可能成为继青霉素等传统抗生素之后又一类重要的新型抗菌药物。抗菌肽是一类具有天然广谱抗菌活性的多肽类物质,具有耐热、无毒、无药残、不易产生耐药菌株等特点。同时,抗菌肽还具有多种生物学活性,如抗细菌、抗真菌、抗病毒、抗寄生虫及抗肿瘤细胞等。抗菌肽作用机理独特,既能起到体内抗细菌感染、促进癌细胞凋亡的作用,还可作为抗病毒化疗剂和医疗器械的抗菌材料。抗菌肽可以和任何药物配伍使用,口服和注射的效果相同,不存在用药注意事项,可以按照最方便的方法给药;抗菌肽还有起效时间快的特点,10分钟内被吸收完毕,且能够达到100%被吸收。抗菌肽来自于动植物自身免疫系统,是纯正的绿色产品,目前已经成功应用在各行各业。

[0003] 东北林蛙(*Rana dybowskii*)是我国特有的重要药食两用两栖动物,其药用历史悠久,早在明代李时珍《本草纲目》中便有记载。已有研究表明,东北林蛙皮分泌物由多种组分组成,其皮肤分泌物抗菌肽粗提物具有广谱的抗菌活性。根据相关资料记载,一只东北林蛙个体可以同时表皮分泌多达12种成熟抗菌肽。已经证实的,林蛙皮抗菌肽具有广谱的抗菌作用,已经在饲料、化妆品、卫生用品中广泛应用。

[0004] 目前,新型冠状病毒即严重急性呼吸综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2)正在全球肆虐,由此引发的新冠肺炎疫情对全人类的公共卫生安全构成严峻挑战和重大威胁。新型冠状病毒(SARS-CoV-2)具有很强的传播性和致病性,人体吸入后极易导致呼吸道感染,继而引发病毒性肺炎。

[0005] 目前,还未见关于林蛙抗菌肽在抗新型冠状病毒SARS-CoV-2方面的报道。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种林蛙抗菌肽在制备抗新型冠状病毒SARS-CoV-2药物中的应用。

[0007] 本发明为解决技术问题所采用的技术方案如下:

[0008] 本发明的林蛙抗菌肽在制备抗新型冠状病毒SARS-CoV-2药物中的应用。

[0009] 作为优选的实施方式,所述林蛙抗菌肽是一种pI值为8.0~10.5的碱性多肽,分子量为4KDa。

[0010] 作为优选的实施方式,所述抗新型冠状病毒SARS-CoV-2药物为消毒剂。

[0011] 本发明的有益效果是:

[0012] 本发明通过检测试验验证了林蛙抗菌肽具有抗新型冠状病毒SARS-CoV-2的作用,送检样本中1[#]林蛙抗菌肽20倍稀释液和2[#]林蛙抗菌肽30倍稀释液对新型冠状病毒SARS-

CoV-2的灭活率达到99.0%以上,具有很强的抗新型冠状病毒SARS-CoV-2活性。因此,林蛙抗菌肽可以广泛应用在制备抗新型冠状病毒SARS-CoV-2药物中,为预防和防治新型冠状病毒SARS-CoV-2提供了新的途径,扩展了抗新型冠状病毒SARS-CoV-2药物的范围,提高了抗新型冠状病毒SARS-CoV-2的效果,为全球的公共卫生安全事业提供了有利支撑。

具体实施方式

[0013] 本发明的林蛙抗菌肽在制备抗新型冠状病毒SARS-CoV-2药物中的应用。

[0014] 优选的,所采用的林蛙抗菌肽具有如下特征:

[0015] (1) 热稳性:60℃条件下保持6小时不失活,95℃条件下保持10min还有活力;

[0016] (2) pH值稳定性:在pH2~6范围内活力稳定,最适pH值3.5,活力最为稳定;

[0017] (3) 等电点:采用吸光度法测定林蛙抗菌肽pI值,结果证实,林蛙抗菌肽是一种pI值为8.0~10.5的碱性多肽;

[0018] (4) 分子量:采用凝胶过滤层析法、聚丙烯酰胺垂直板电泳法或激光解吸电离飞行时间质谱法进行测定,测得分子量为4KDa。

[0019] 优选的,所说的抗新型冠状病毒SARS-CoV-2药物为消毒剂。

[0020] 更优选的,所说的抗新型冠状病毒SARS-CoV-2消毒剂为体外消毒剂。所说的体外消毒剂可以为液体,采用喷洒、涂抹或喷雾等形式进行使用,还可以制成现有其他载体的形式进行使用,例如消毒湿巾、消毒液、消毒喷雾等,实现对新型冠状病毒SARS-CoV-2的消杀作用。

[0021] 下面将结合本发明实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0022] 实施例1林蛙抗菌肽的制备

[0023] 按照公开号为CN103073628A的中国专利,发明名称为:一种利用超声波从林蛙体中提取抗菌肽的生产制备方法中所公开的说明书中的实施例2制备林蛙抗菌肽。选取其中两份林蛙抗菌肽原液作为1[#]林蛙抗菌肽原液样品和2[#]林蛙抗菌肽原液样品,委托中国科学院武汉病毒研究所进行检测。其中,1[#]林蛙抗菌肽原液样品和2[#]林蛙抗菌肽原液样品的区别仅在于储藏时间不同,1[#]林蛙抗菌肽原液样品的储藏时间大于2[#]林蛙抗菌肽原液样品的储藏时间,并且1[#]林蛙抗菌肽原液样品的储藏时间超过2[#]林蛙抗菌肽原液样品的储藏时间22个月左右。

[0024] 试验例1林蛙抗菌肽抗新型冠状病毒活性测定

[0025] 委托中国科学院武汉病毒研究所进行检测,并出具检测报告。报告编号:WIV-CMRB-2020-005;项目名称:林蛙抗菌肽抗新型冠状病毒活性测定;委托单位:通化康元生物科技有限公司。

[0026] 检测报告具体内容如下:

[0027] 1、试验名称:林蛙抗菌肽溶液对SARS-CoV-2(新型冠状病毒)的抗病毒作用。

[0028] 2、试验目的:通过经典的TCID₅₀实验,评价林蛙抗菌肽溶液对SARS-CoV-2的抗病毒活性,评价其抗病毒效果。

- [0029] 3、实验时间
- [0030] 3.1实验时间:2020.6.24-2020.8.15。
- [0031] 3.2总结报告撰写:2020.8.15-2020.8.18。
- [0032] 4、受试材料
- [0033] 1[#]林蛙抗菌肽原液,通化康元生物科技有限公司提供。
- [0034] 2[#]林蛙抗菌肽原液,通化康元生物科技有限公司提供。
- [0035] 5、试剂与耗材
- [0036] 5.1主要试剂
- [0037] 试剂:DMEM(Thermo Fisher),FBS(Gibco)。
- [0038] Vero-E6细胞(ATCC CRL-1586)。
- [0039] 病毒RNA提取:传统TRIzol法(按照Invitrogen说明书)提取。
- [0040] 病毒核酸检测(荧光定量PCR):中国科学院武汉病毒研究所课题组涉及引物,针对RdRP基因。
- [0041] 5.2主要仪器
- [0042] 高通量核酸自动纯化仪:QIAcube HT 9001793(Qiagen)。
- [0043] 荧光定量PCR仪:CFX96 Touch Real-Time Detection System(Bio-rad)。
- [0044] 6、试验设计
- [0045] 6.1原始病毒滴度测定
- [0046] SARS-CoV-2(WIV04,GenBank:MN996528.1)扩增、滴度测定:P6代SARS-CoV-2病毒接种Vero-E6细胞,于37℃、5%CO₂培养箱中培养48h,收取培养的病毒上清,离心后分装,-80℃冰箱冻存。在Vero-E6细胞中采用经典噬斑法测定病毒滴度,原始病毒滴度为 2×10^5 PFU/ml。
- [0047] 6.2样品细胞毒性分析
- [0048] 取两种林蛙抗菌肽原液100μl,加入到900μl 2%DMEM中,得到 10^{-1} 稀释度的溶液,重复上述操作多次,分别获得 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} 各稀释度的林蛙抗菌肽溶液,取原液及各稀释度的林蛙抗菌肽溶液各100μl加入提前一天铺好Vero-E6的24孔板中,37℃孵育一小时后,弃掉林蛙抗菌肽溶液,用PBS洗两次后,换成2%DMEM的培养基,置于37℃培养24h后观察细胞存活及细胞毒性情况。
- [0049] 6.3样品抗病毒效果预实验
- [0050] 取1[#]和2[#]林蛙抗菌肽10倍稀释液50μl与等体积的病毒(10^5 pfu)充分混合,静置15min,同时设置加50μl PBS溶液的等体积的病毒(10^5 pfu)作为对照;将实验组与对照组各加900μl 2%DMEM培养基,充分混合后,取100μl样品与24孔板中的细胞37℃孵育一小时,随后,弃掉溶液,用PBS洗两次,加入500μl 2%DMEM,37℃培养24h,取细胞上清用荧光定量PCR法测定病毒RNA拷贝数。
- [0051] 6.4样品抗病毒效果(TCID₅₀)实验
- [0052] 样品准备:取50μl的1[#]和2[#]林蛙抗菌肽20倍和30倍稀释液,每组溶液加入一个1.5ml EP管中;
- [0053] 病毒暴露:取50μl病毒液(10^5 pfu)加入林蛙抗菌肽溶液,吹打待液体完全混匀;
- [0054] 处理与时间:分别室温静置2min和10min;同时设置不加抗菌肽的对照;

[0055] 混合液稀释:在相应处理后,取900 μ l 2%DMEM加入上述各组实验组中,使得林蛙抗菌肽的稀释比为1:10;

[0056] 病毒稀释:取100 μ l上述处理好的混合液记为 10^{-1} (其余样品分装冻存),加入900 μ l培养基中,即为 10^{-2} 稀释组,进一步的重复上述操作,得到 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 稀释度;

[0057] TCID₅₀实验:观察细胞汇合度,只在高汇合度时进行试验。用细胞培养基将上述的各组稀释溶液100 μ l加入96孔板(每组稀释度六个样品孔)中,37 $^{\circ}$ C孵育1h,用PBS洗涤两次后弃掉,即可加入200 μ l的2%DMEM培养基,置于37 $^{\circ}$ C培养4d即可观察细胞病变形成,并记录相应稀释度的细胞病变孔数。

[0058] 7、数据处理及统计分析

[0059] 数据处理与分析利用Excel计算,TCID₅₀使用Reed-Muench法计算。

[0060] 8、实验结果

[0061] 8.1样品细胞毒性分析

[0062] 表1样品细胞毒性分析

样品号	样品稀释倍数				
	原液	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
1 [#]	-	+	+	+	+
2 [#]	-	+	+	+	+

[0065] 注:-表示细胞死亡,+表示细胞存活。

[0066] 2种林蛙抗菌肽原液都具有一定的细胞毒性作用,而最低稀释度 10^{-1} 即可以保证细胞存活。

[0067] 8.2样品抗病毒效果预实验(荧光定量PCR法)

[0068] 表2 2种林蛙抗菌肽抗病毒效果预实验

实验组	Ct 值*	SARS-CoV-2 RNA 拷贝数/ml	病毒灭活率 (%)
[PBS+病毒] 15min	23.12	40748	-
[1#抗菌肽+病毒] 15min 重复 1	31.52	108	99.7
[1#抗菌肽+病毒] 15min 重复 2	30.89	169	99.6
[1#抗菌肽+病毒] 15min 重复 3	32.52	53	99.9
平均值			99.7
[PBS+病毒] 15min	21.13	166058	-
[2#抗菌肽+病毒] 15min 重复 1	32.56	52	99.9
[2#抗菌肽+病毒] 15min 重复 2	31.89	83	99.8
[2#抗菌肽+病毒] 15min 重复 3	31.56	105	99.7
平均值			99.9

[0070] *阴性对照Ct值未检测到。

[0071] 1#和2#林蛙抗菌肽10倍稀释液与病毒感染液 (10^5 pfu) 孵育15min, 与对照组相比, 能有效抑制上清中SARS-CoV-2病毒的感染, 其抑制率分别为99.7%和99.9%。

[0072] 8.3样品抗病毒效果 (TCID₅₀) 评价

[0073] 表3 1#样品抗病毒效果实验

处理	病毒稀释度 (CPE 孔数/平行孔数)					TCID ₅₀ /ml	病毒灭活率 (%)
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		活率 (%)
[1#抗菌肽+病毒] 2min	6/6	4/6	3/6	2/6	0/6	1.00×10^4	99.0
[1#抗菌肽+病毒] 10min	6/6	4/6	2/6	1/6	0/6	4.22×10^3	99.6

[0076] 注: 加入病毒的初始量为 1×10^5 pfu/ml。

[0077] 表4 2#样品抗病毒效果实验

处理	病毒稀释度 (CPE 孔数/平行孔数)					TCID ₅₀ /ml	病毒灭活率 (%)
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		
[0078] [2 [#] 抗菌肽+病毒] 2min	6/6	4/6	2/6	2/6	0/6	5.62 × 10 ⁴	99.4
[2 [#] 抗菌肽+病毒] 10min	6/6	3/6	2/6	1/6	0/6	2.85 × 10 ³	99.7

[0079] 注:加入病毒的初始量为 1×10^5 pfu/ml。

[0080] 1[#]林蛙抗菌肽20倍稀释液与等体积SARS-CoV-2 (新型冠状病毒) 作用2分钟和10分钟,病毒灭活率分别达到99.0%和99.6%,具有很强的抗病毒活性。

[0081] 2[#]林蛙抗菌肽30倍稀释液与等体积SARS-CoV-2 (新型冠状病毒) 作用2分钟和10分钟,病毒灭活率分别达到99.4%和99.7%,具有很强的抗病毒活性。

[0082] 9、结论

[0083] 送检样本中1[#]林蛙抗菌肽20倍稀释液和2[#]林蛙抗菌肽30倍稀释液对SARS-CoV-2 (新型冠状病毒) 的灭活率达到99.0%以上,具有很强的抗新型冠状病毒的活性。

[0084] 本发明公开了一种林蛙抗菌肽在制备抗新型冠状病毒SARS-CoV-2药物中的应用,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明的产品已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的产品进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。