



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110652510 A

(43)申请公布日 2020.01.07

(21)申请号 201910582562.4

(22)申请日 2019.06.28

(66)本国优先权数据

201810692532.4 2018.06.28 CN

(71)申请人 好医生药业集团有限公司

地址 622651 四川省绵阳市安州工业园区

(72)发明人 耿福能 马秀英

(51)Int.Cl.

A61K 31/439(2006.01)

A61P 13/12(2006.01)

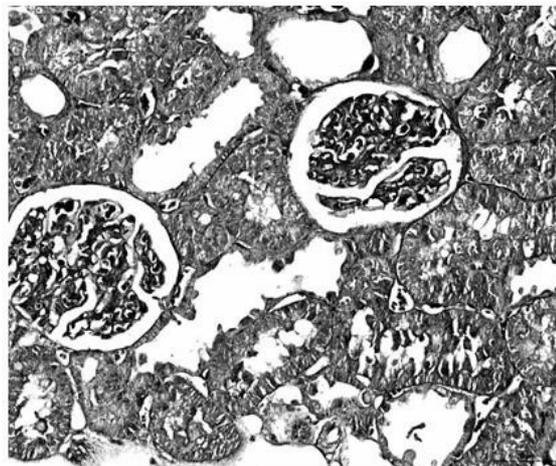
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

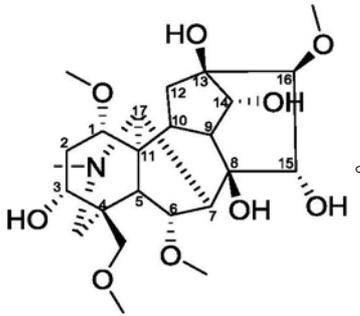
中乌宁在制备防治肾纤维化药物中的应用

(57)摘要

本发明公开了一种防治肾炎、肾纤维化的药物。所述的药物为中乌宁或其可接受的盐、酯或溶剂化物。以该药物为有效成分,可与药物中可以接受的辅料或辅助性成分共制备成具有相应功能的制剂。研究表明,中乌宁对预防和/或治疗肾炎、肾纤维化有显著效果。



1. 中乌宁或其药学上可接受的盐、酯或溶剂化物,在制备预防和/或治疗肾脏疾病药物或保健品中的应用,其中所述的肾脏疾病为肾纤维化或肾炎,所述的中乌宁的结构式如下所示。



2. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述的肾脏纤维化为各种因素引起肾脏组织慢性炎症或成纤维细胞增生而导致的肾脏纤维化。

3. 如权利要求2所述的应用,其特征在于,所述的各种因素为药物、糖尿病、高血压、痛风、病毒、细菌感染或肾移植。

4. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述的肾脏纤维化为肾间质纤维化。

5. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述的肾脏纤维化为肾切除致肾脏纤维化。

6. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述的肾炎为肾间质炎症。

7. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述的预防和/或治疗肾脏纤维化药物是以中乌宁或其药学上可接受的盐、酯或溶剂化物为活性成分,加上药学上常用的辅料或辅助性成分制备而成的制剂。

8. 如权利要求7所述的应用,其特征在于,所述的药学上可以接受的盐为无机盐或有机盐。

9. 如权利要求7所述的应用,其特征在于,所述的制剂的剂型为液体制剂、固体制剂或者半固体制剂。

中乌宁在制备防治肾纤维化药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于药物领域,具体涉及中乌宁在制备治疗肾纤维化药物及保健品中的应用。

背景技术

[0002] 肾脏纤维化是慢性肾功能衰竭的病理特征之一,也是各种慢性、进展性肾脏疾病的最终归宿,其轻重程度决定着肾脏疾病的预后,是各种肾脏疾病发展至终末期肾脏病(即肾功能不全)的共同通路。如何利用药物干预肾间质纤维化的发展是防治慢性肾功能衰竭的关键。目前认为,终末期肾脏病的病理改变是不可逆的,因此,控制肾纤维化的发生发展至关重要。现代医学研究表明:肾纤维化的发病机制复杂,涉及因素多,肾纤维化的不同阶段,在众多相关细胞、因子、活性物质的共同参与和调控下,产生了促纤维化和抗纤维化因子的失衡、肌成纤维细胞生成和消亡的失衡、细胞外基质(ECM)生成和降解的失衡,从而依次发生炎性细胞浸润、肌成纤维细胞激活、上皮细胞向间充质细胞转分化(EMT)、ECM的重塑和过度堆积以及肾脏固有细胞凋亡。

[0003] 目前临床上对于肾纤维化的治疗主要包括:原发病的治疗(如梗阻性肾病等)、相关危险因素消除和干预(如感染、药物等)及针对发病机制的治疗(如非甾体类抗炎药物、降压药物)。尽管上述治疗方法能够对肾脏纤维化起到一定的治疗作用,但并不能完全阻止慢性肾病向慢性肾功能不全发展,为此寻找一种能对抗肾炎和肾脏纤维化,治疗肾纤维化的药物十分必要。

[0004] 目前,尚无任何文献及专利表明中乌宁具有抗肾脏纤维化的作用,我们采用抗肾脏纤维化活性追踪的方式,从附子和乌头中分离发现中乌宁(mesaconine; Cas No.:6792-09-2;分子式:C₂₄H₃₉N₉)具有显著的抗肾脏纤维化作用,中乌宁的原料来源丰富,化学结构清楚,可以进行合成,克服了中药复方物质复杂难以阐明的问题,有望通过符合现代医药学规律的研发使之成为一种创新性药物。

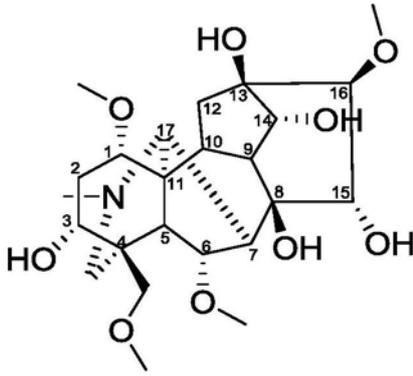
[0005] 本发明的目的是通过药理实验对中乌宁肾纤维化作用进行研究,结果表明,本发明所述的中乌宁能显著减轻肾脏炎症及肾脏纤维化程度,具有明显改善肾脏病理损害的作用,可用于制备预防和/或治疗肾脏纤维化的保健品及药物。本发明涉及的中乌宁在制备预防和/或治疗肾纤维化药物中的用途属于首次公开。

发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题是为了克服现有技术中缺乏有效预防或治疗肾脏纤维化的药物,而提供了一种中乌宁在肾纤维化中的应用。中乌宁能够很好地预防和/或治疗肾脏纤维化。

[0007] 本发明提供了一种中乌宁或其药学上可接受的盐、酯或溶剂化物,在制备预防和/或治疗肾脏纤维化药物或保健品中的应用,其中所述的中乌宁的结构式如下所示。

[0008]



[0009] 本发明中,所述的肾脏纤维化包括肾间质纤维化和肾小球硬化。

[0010] 更进一步的,所述的肾脏纤维化为肾切除致肾脏纤维化。

[0011] 本发明中,所述的预防和/或治疗肾脏纤维化药物是以中乌宁或其药学上可接受的盐、酯或溶剂化物为活性成分,加上药学上常用的辅料或辅助性成分制备而成的制剂。

[0012] 其中,所述的药学上可以接受的盐为无机盐或有机盐;所述的无机盐为硫酸盐、硝酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、或磷酸盐;所述的有机盐为乙酸盐、丙酸盐、马来酸盐、草酸盐、苹果酸盐、乙醇酸盐、丙酮酸盐、丙二酸盐、琥珀酸盐、柠檬酸盐、苯甲酸盐、富马酸盐、酒石酸盐、肉桂酸盐、扁桃酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、对甲苯磺酸盐或水杨酸盐;所述的制剂的剂型为液体制剂、固体制剂或者半固体制剂。

[0013] 其中,中乌宁的每日给药剂量为0.0001-80mg/Kg。进一步的,中乌宁的每日给药剂量为0.0005-80mg/Kg。更进一步的,中乌宁的每日给药剂量为0.001-50mg/Kg。

[0014] 所述的肾脏纤维化包括肾间质纤维化和肾小球硬化,是各种原因引起的肾脏损害最后阶段的主要病理基础,肾纤维化发生机制较为复杂,与多种因素有关,其中主要与细胞外基质细胞产生细胞的增殖和活化,血管活性物质、细胞因子以及细胞外基质转换失衡有关,肾间质纤维化几乎是所有原发或继发肾脏疾病进展到终末期肾衰竭的共同途径。可以理解为本领域常识中,各种因素(如药物、糖尿病、高血压、痛风、病毒/细菌感染、肾移植等因素)能够引起肾脏组织慢性炎症和成纤维细胞增生而导致的肾脏纤维化均属于本申请所述的范畴。

[0015] 所述的“预防”是指在可能的肾脏纤维化因素的存在下,使用后防止或降低肾脏纤维化的产生。所述的“预防”是指减轻肾脏纤维化的程度,或者延缓心肌纤维化的进程,或者治愈肾脏纤维化使之正常化。

[0016] 本发明中,术语“药学上可接受的”是指对接受治疗的受试者的一般健康情况没有长期的有害影响。

[0017] 本发明中,术语“药学上可接受的盐”是指保留了中乌宁中游离碱的生物效力,并且在生物学或其它方面上没有不良作用的盐。药学上可接受的盐是指把母体化合物中的碱基基团转换成盐的形式,如碱基基团(如胺基)的无机或有机酸盐类,一般将母体化合物与常规种类的酸在一个溶剂系统中反应进行制备,无机酸一般包括硫酸、硝酸、盐酸、氢溴酸、或磷酸等;由有机酸一般包括乙酸、丙酸、马来酸、草酸、苹果酸、乙醇酸、丙酮酸、丙二酸、琥珀酸、柠檬酸、苯甲酸、富马酸、酒石酸、肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸或水杨酸等。本发明中,术语“药学上可接受的溶剂化物”是指通过溶剂化作用形成的中乌宁与溶剂分子的组合,可包括化学计量或非化学计量的溶剂,并且溶剂中的溶剂分子可能以有序

或非有序排列的形式存在。

[0018] 本发明中,术语“药学上可接受的酯”是指中乌宁在药学上可接受的酯,一般在体外或体内生物条件下,酯键可从化合物上裂解或以其他方式发生反应以提供中乌宁。所述的酯可无活性,或者比中乌宁本身活性低,使得直到将中乌宁从所述的上酯裂解后才能发挥其活性。成酯的中乌宁后一般可改善母体化合物(即中乌宁)在组织相容性或药物代谢动力学等方面的性质。

[0019] 本发明中,所述的“预防和/或治疗肾脏纤维化的药物”可包括中乌宁或其药学上可接受的盐、酯或溶剂化物,以及药学上可接受的辅料,其可根据本领域常规方法制备,一般通过将中乌宁或其药学上可接受的盐、酯或溶剂化物,与一种或多种药学上常规的赋形剂(可为固体赋形剂或液体赋形剂)和/或辅剂混合,制成适用于人或动物使用的剂型,例如普通制剂(如胶囊剂、片剂、颗粒剂或注射剂等)、缓释制剂、控释制剂、靶向制剂及各种微粒给药系统。中乌宁在所述的所述的“肾脏纤维化的药物”中的重量含量可为5-99%。

[0020] 所述的“预防和/或治疗肾脏纤维化的药物”可用任何公知的给药方法给药,给药途径可为肠道或非肠道,如口服、静脉注射、肌肉注射、皮下注射、鼻腔、口腔粘膜、肺和呼吸道、皮肤、阴道、直肠、眼等。给药剂型可以是固体剂型、半固体剂型或液体剂型。液体剂型可以是溶液剂(包括真溶液和胶体溶液)、乳剂(包括o/w型、w/o型和复乳)、混悬剂、注射剂(包括水针剂、粉针剂和输液)、滴眼剂、滴鼻剂、洗剂和搽剂等;固体剂型可以是片剂(包括普通片、分散片、咀嚼片、泡腾片、口腔崩解片、肠溶片、含片)、胶囊剂(包括硬胶囊、软胶囊、肠溶胶囊)、颗粒剂、散剂、微丸、滴丸、气(粉)雾剂、喷雾剂栓剂、膜剂、贴片、等;半固体剂型可以是软膏剂、凝胶剂、糊剂等。

[0021] 所述的“预防和/或治疗肾脏纤维化的药物”为片剂时,可以使用本领域常规的各种赋形剂,包括稀释剂、崩解剂、黏合剂、润湿剂、润滑剂、助流剂。稀释剂可以是淀粉、糊精、蔗糖、葡萄糖、碳酸钙、乳糖、甘露醇、山梨醇、木糖醇、微晶纤维素、硫酸钙、磷酸氢钙等;湿润剂可以是水、乙醇、异丙醇等;崩解剂可以是预胶化淀粉、低取代羟丙基纤维素、交联聚乙烯吡咯烷酮、交联羧甲基纤维素钠、羧甲基淀粉钠、微晶纤维素、碳酸氢钠与枸橼酸、聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯、十二烷基磺酸钠等;粘合剂可以是淀粉浆、糊精、羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、乙基纤维素、丙烯酸树脂、卡波姆、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇糖浆、蜂蜜、葡萄糖溶液、微晶纤维素、阿拉伯胶浆、明胶浆等;润滑剂和助流剂可以是滑石粉、二氧化硅、硬脂酸盐、酒石酸、液体石蜡、聚乙二醇等。上述片剂还可进一步制成包衣片,如糖包衣片、薄膜包衣片、肠溶包衣片,或双层片和多层片。

[0022] 所述的“预防和/或治疗肾脏纤维化的药物”为胶囊剂时,可以将有效成分(中乌宁)与稀释剂、助流剂混合,将混合物直接置于硬胶囊或软胶囊中。也可将有效成分先与稀释剂、黏合剂、崩解剂制成颗粒或微丸,再置于硬胶囊或软胶囊中。上述片剂的各种稀释剂、黏合剂、润湿剂、崩解剂和助流剂品种也可用于制备所述的胶囊剂中。

[0023] 所述的“预防和/或治疗肾脏纤维化的药物”为注射剂时,为将本发明化合物制成注射剂,可以用水、乙醇、异丙醇、丙二醇或它们的混合物作溶剂并加入适量本领域常用的增溶剂、助溶剂、pH调节剂或渗透压调节剂。增溶剂或助溶剂可以是泊洛沙姆、卵磷脂、羟丙基- β -环糊精等;pH调节剂可以是磷酸盐、醋酸盐、盐酸、氢氧化钠等;渗透压调节剂可以是氯化钠、甘露醇、葡萄糖、磷酸盐、醋酸盐等。如制备冻干粉针剂,还可加入甘露醇、葡萄糖、

乳糖等作为支撑剂。

[0024] 所述的“预防和/或治疗肾脏纤维化的药物”的给药剂量依照所要预防和/或治疗疾病的性质和严重程度,患者或动物的个体情况,给药途径和剂型等可以有变化。一般来讲,中乌宁的每天的临床剂量范围可为0.0001-100mg/Kg体重,优选为0.0005-80mg/Kg体重,更优选为0.001-50mg/Kg体重。上述剂量可以一个剂量单位或分成几个剂量单位给药,这取决于医生的临床经验以及包括运用其它治疗手段的给药方案。

[0025] 所述的“预防和/或治疗肾脏纤维化的药物或保健品”可单独服用或与其他治疗药物或对症药物合并使用。当本发明的化合物与其它治疗药物存在协同作用时,应根据实际情况调整使用剂量。

[0026] 本发明所述的应用中,所述的产品包括但不限于药品和保健品。在不违背本领域常识的基础上,上述各优选条件,可任意组合,即得本发明各较佳实例。

[0027] 本发明所用原料中乌宁为自行合成(合成工艺已报专利),所用试剂市售均可得。

附图说明

[0028] 图1大鼠模型组($\times 400$)肾脏组织(Masson染色)图片。

[0029] 图2大鼠中乌宁高剂量组($\times 400$)肾脏组织(Masson染色)图片。

具体实施方式

[0030] 以下通过实施例对本发明作进一步详细的说明,但本发明的保护范围不受具体实施例的任何限制,而是由权利要求加以限定。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,按照常规方法和条件,或按照商品说明书选择。

[0031] 1实验材料:

[0032] 1.1实验动物:SD大鼠,SPF级,成都达硕生物科技有限公司提供。生产许可证号:SCXK(川)2015-030,在室温18-25℃、相对湿度50-60%、人工12h 昼/夜循环照明环境中用全价营养、分笼饲养,每日定时清洗笼舍,大鼠自由摄食及饮水。

[0033] 1.2主要原料、试剂:中乌宁(好医生药业集团有限公司提供,简称ZWN);丙二醛(MDA)等试剂盒购自南京建成生物公司。

[0034] 2实验方法

[0035] 2.1动物分组:SD大鼠适应性饲养3d后,按体重随机分为空白对照组、假手术组、模型组、阳性组、ZWN高剂量组、ZWN低剂量组、ZWN注射组,每组10只。

[0036] 2.2造模方法:手术建立5/6肾切除模型。禁食12h,称重,20%乌拉坦(100g/0.5ml)腹腔注射麻醉固定、备皮、消毒,在无菌条件下从距左肋骨下缘、脊柱旁开1.5cm处皮肤做一纵向切口,长约1.5cm,逐层分离筋膜、腹内外斜肌筋膜,进入后腹膜腔,分离脂肪层,暴露左侧肾脏,钝性分离脂肪囊,小心剥离肾包膜及肾上腺,注意避免损伤肾上腺,结扎左侧肾蒂,剪切掉左肾上、下极 2/3肾实质,明胶海绵压迫创面止血,解开结扎线后观察30~50s后无继续出血,将残肾还纳入腹腔,逐层缝合肌层、皮下及皮肤,局部消毒。1周后切去右肾,麻醉及手术过程相同,即建立5/6肾切除模型。假手术组2次手术均只分离肾包膜不行肾切除。

[0037] 2.3给药方式及时间:中乌宁(ZWN)高、低剂量组分别灌胃给予 ZWN4mg/kg·d、

2mg/kg·d药液;中乌宁(ZWN)注射组腹腔注射给予0.1mg/kg·d药液;阳性对照组给予依那普利溶液灌胃(10mg/kg·d),空白组、模型组、假手术组灌胃给予等体积生理盐水,每日1次,连续30d。

[0038] 2.4检测指标及方法:末次给药后24h进行血液及组织标本采集:①血液标本的采集末次给药24h后,用20%乌拉坦麻醉大鼠,置无菌手术台上,打开腹腔,暴露腹主动脉,采用无菌采血器和7号针头进行腹主动脉采血3000rpm/min,离心10min分离血清。-80℃冷冻备用。②组织标本的采集采血后,解剖动物分离双侧肾脏,在10%中性甲醛充分固定后,采用HE染色以及Masson染色,观察大鼠肾脏病理变化。各检测指标均按照试剂盒说明书进行检测。

[0039] 2.5统计方法:计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组所得数据与模型对照组比较,符合正态分布,采用SPSS 21.0单因素方差分析,不符合者采用非参数检验秩和法分析。

[0040] 3实验结果

[0041] (1) ZWN对大鼠体重变化的影响

[0042] 各组大鼠的体重在给药期间,总体呈现均有增长的趋势。连续给药30d后,模型组大鼠体重显著低于假手术组,与模型组相比,ZWN各给药组体重均有增长,其中ZWN高、ZWN低剂量组及ZWN注射组大鼠体重增加显著,动物整体状态更好。结果见表1。

[0043] 表1各组大鼠平均体重变化的影响

[0044]

组别	术前第1天体重(g)	给药第30天体重(g)
空白组	191.50±23.91	348.95±28.22
假手术组	184.15±20.02	326.47±24.15
模型组	187.60±19.13	292.81±30.43
阳性组	185.46±22.14	339.50±20.25*
ZWN高剂量组	186.45±21.98	357.34±27.78**
ZWN低剂量组	188.35±20.41	323.51±32.63
ZWN注射组	186.87±20.82	348.22±24.18*

[0045] 注:与空白组比较 $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与模型组比较* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

[0046] (2) ZWN对大鼠肾组织病理的影响

[0047] HE结果显示ZWN各给药组均有显著减轻肾小管损伤、肾间质炎症及纤维化的作用。按照表2的评分标准对各组肾脏HE结果进行评分,与空白组相比,假手术组差异不显著($P > 0.05$),模型组肾脏肾脏损伤病理分级评分显著升高,具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组相比,阳性组、ZWN高剂量组、ZWN低剂量组、ZWN注射组肾脏总分均显著降低,其中ZWN高剂量组肾脏损伤保护最显著($P < 0.05$)。评分结果见表3。

[0048] 表2肾脏毒性损伤病理分级评分标准

病变类型	病变程度	病变分级
[0049] 肾小管萎缩	无, <5%	0
	轻度, 5%-25%	1
	中度, 26%-50%	2
	重度, >50%	3
肾小管损伤/坏死	无	0
	轻度, 肾小管上皮肿胀、核脱失、刷状缘消失	1
	中度, 局灶性肾小管上皮坏死	2
肾间质炎症	重度, 大片坏死	3
	无, <5%	0
	轻度, 5%-25%	1
	中度, 26%-50%	2
[0050] 肾间质纤维化	重度, >50%	3
	无, <5%	0
	轻度, 5%-25%	1
	中度, 26%-50%	2
蛋白管型	重度, 肾小管蛋白管型>50%	3
	中度, 肾小管出现蛋白管型,26%-50%	2
	轻度, 肾小管内见均质红染的蛋白类物质,5%-25%	1
	无, <5%	0

[0051] 表3大鼠肾组织损伤评分统计结果($\bar{X} \pm SD$)

[0052]

分组	肾脏损伤评分
空白组	0.00 ± 0.00
假手术组	0.00 ± 0.00
模型组	3.96 ± 1.15**
阳性组	2.81 ± 1.60 [△]
ZWN低剂量组	3.04 ± 2.04 [△]
ZWN高剂量组	2.56 ± 1.07 ^{△△}
ZWN注射组	2.77 ± 1.52 [△]

[0053] 注:假手术组、模型组分别与空白组相比, $0.01 < *P < 0.05$, $**P < 0.01$;

[0054] 用药组与模型组相比, $0.01 < ^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ 。

[0055] (3) ZWN对大鼠肾组织纤维化的影响

[0056] Masson染色结果分析显示,与空白组相比,假手术组肾脏纤维化比率相近,模型组肾脏纤维化比率明显升高,具有显著性差异($P < 0.05$);与模型组相比,高剂量组纤维化比率明显降低,具有显著性($P < 0.05$),提示ZWN高剂量组、ZWN注射组抗肾纤维化作用显著;ZWN低剂量组及阳性组纤维化比率均降低,但差异不显著($P > 0.05$),结果见表4及图1、图2。

[0057] 表4 ZWN对大鼠肾组织损伤Masson染色评分统计结果($\bar{X}\pm SD$)

分组编号	平均值±标准差 (%)
空白组	23.14±6.19*
[0058] 假手术组	22.61±6.75*
模型组	51.59±15.07
阳性组	29.06±8.78
ZWN 低剂量组	34.80±9.16
[0059] ZWN 高剂量组	25.15±7.14 [△]
ZWN 注射组	26.11±6.32 [△]

[0060] 注:模型组和假手术组分别与空白组与相比,*P<0.05,**P<0.01;

[0061] 用药组与模型组相比,[△]P<0.05,^{△△}P<0.01。

[0062] (4) ZWN对血清MDA的影响

[0063] 血清MDA检测结果显示,与空白组比较,假手术组大鼠血清MDA值有所升高(P<0.05),模型组大鼠的血清MDA值升高更显著(P<0.01),提示手术操作以及5/6肾脏切除均能引起脂质过氧化反应增强。与模型组比较,ZWN各用药组及阳性药物组对模型大鼠血清MDA水平均有降低作用,ZWN高剂量组、ZWN注射组降低血清MDA水平显著,研究结果提示ZWN对肾脏功能的改善作用与抗氧化应激有一定关系。结果见表5。

[0064] 表5 ZWN对模型大鼠血清MDA的影响($\bar{X}\pm S$)

[0065]

组别	MDA (nmol/L)
空白组	3.35±3.26**
假手术组	7.41±6.29**
模型组	14.66±6.50
阳性组	9.53±2.83 [△]
ZWN高剂量组	9.15±3.46 [△]
ZWN低剂量组	11.66±4.41
ZWN注射组	9.68±2.91 [△]

[0066] 注:与空白组比较*P<0.05,**P<0.01;与模型组比较比较[△]P<0.05,^{△△}P<0.01;

[0067] 综合以上结果,ZWN具有显著抗肾炎及抗肾纤维化作用,可保护肾脏组织损伤。



图1

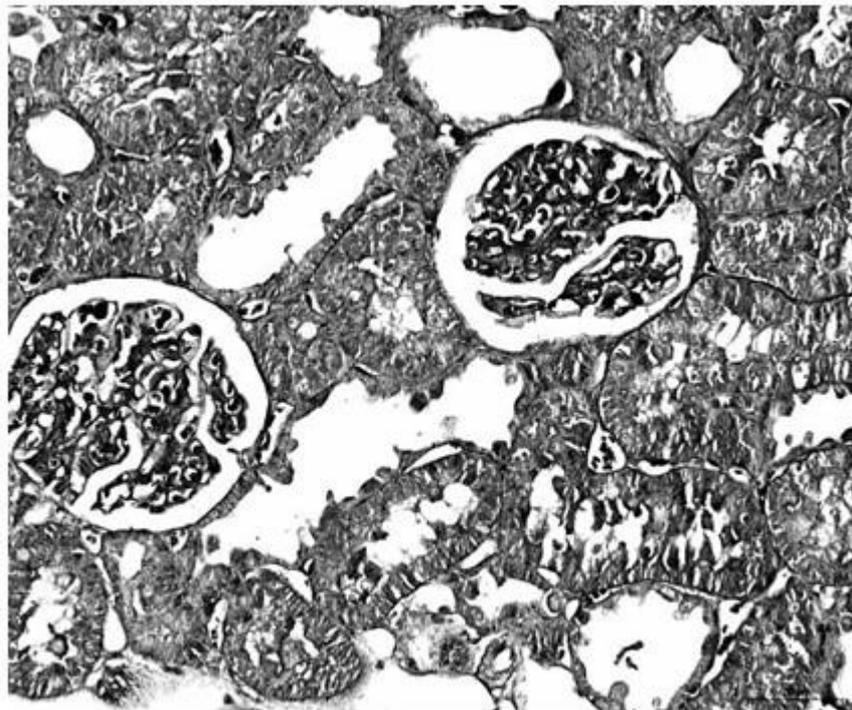


图2