



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104922146 B

(45)授权公告日 2019.05.21

(21)申请号 201410108714.4

A01N 43/16(2006.01)

(22)申请日 2014.03.21

A01P 1/00(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

审查员 孟晋东

申请公布号 CN 104922146 A

(43)申请公布日 2015.09.23

(73)专利权人 吴彰哲

地址 中国台湾基隆市

(72)发明人 吴彰哲 邱雅凰 黄宗凯 蔡佳纭

(74)专利代理机构 北京科龙寰宇知识产权代理
有限责任公司 11139

代理人 孙皓晨

(51)Int.Cl.

A61K 31/737(2006.01)

A61P 31/14(2006.01)

A23L 33/125(2016.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

马尾藻多糖在制备用于治疗或预防肠病毒
71型感染的组合物中的用途

(57)摘要

本发明公开了马尾藻多糖在制备用于治疗
或预防肠病毒71型感染的组合物中的用途。本发
明的组合物可作为医药组合物、食品添加物或清
洁卫生用品的添加物。

1. 马尾藻多糖在制备用于治疗或预防肠病毒71型感染的组合物中的用途。
2. 根据权利要求1所述的用途,其中该马尾藻多糖中,硫酸根含量达10%重量百分比以上。
3. 根据权利要求2所述的用途,其中该马尾藻多糖中,硫酸根含量达20%重量百分比以上。
4. 根据权利要求2所述的用途,其中该马尾藻多糖中,硫酸根含量达40%重量百分比以上。
5. 根据权利要求2所述的用途,其中该马尾藻多糖中,硫酸根含量达60%重量百分比以上。
6. 根据权利要求2所述的用途,其中该马尾藻多糖中,硫酸根含量达60-70%重量百分比。
7. 根据权利要求1所述的用途,其中该马尾藻多糖是从马尾藻萃取并经增加硫酸根含量的步骤处理。
8. 根据权利要求7所述的用途,其中该增加硫酸根含量的步骤是以化学法添加硫酸根而达成。
9. 根据权利要求1至8中任一项所述的用途,其中该组合物是增加对于肠病毒71型感染的抑制率。
10. 根据权利要求9所述的用途,其中该组合物是作为医药组合物或清洁卫生用品的添加物。

马尾藻多糖在制备用于治疗或预防肠病毒71型感染的组合物中的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种马尾藻多糖在制备用于治疗或预防肠病毒71型感染的组合物中的用途,其中该组合物典型地可作为医药组合物、食品添加剂及清洁卫生用品的添加物。

背景技术

[0002] 肠病毒71型属于小核糖核酸病毒科(Picornaviridae),肠病毒属(Enterovirus),是目前已知的肠病毒中最后被发现的一种。肠病毒71型感染脑髓及脑干造成突发性中枢神经的病症,如:昏睡、急躁、呼吸困难、脑炎、无菌性脑膜炎、手足口症、疱疹性咽峡炎以及心脏衰竭休克,容易造成儿童重症,对儿童危害极大。

[0003] 在物理化学特性上,肠病毒71型病毒颗粒不易受酸碱影响,故其感染力在酸性环境下,可被稳定的保留下来。由于肠病毒71型不具由脂质所形成的外套膜(envelope)结构,属于种裸病毒,故对乙醇具有耐受性,使得酒精无法发挥抑制作用。此外,一般家庭常用的清洁剂对肠病毒71型亦无杀菌效果。目前也没有药物或疫苗可以有效的对抗肠病毒71型所引起的感染。

[0004] 马尾藻(Sargassum)是褐藻中的一类海藻,属褐藻门,鹿角菜目、马尾藻科,其分布在世界许多海域,在台湾可见于北部、东北部沿岸海域以及澎湖、绿岛、兰屿等区域,特别于澎湖海域具有相当多的产量。马尾藻多糖(Sargassum polysaccharide)是从马尾藻中萃取的一种易溶于水、黏度较高的多糖类物质。有报导显示马尾藻多糖具有增强免疫力、抑制肿瘤细胞、抗氧化和抗病毒等药理活性,但对于抗病毒的药理机制尚不明确,尤其针对肠病毒少有深入探讨。

[0005] 因此,针对肠病毒71型,仍有需要找出可有效对抗其感染的活性成分,特别是来自日常生活的天然食材,不但可达治疗功效,亦有无毒及容易取得的优点。

发明内容

[0006] 本发明提供了一种马尾藻多糖在制备用于治疗或预防肠病毒71型感染的组合物中的用途。

[0007] 在部分具体实施例中,本发明的马尾藻多糖可经硫酸化处理,使得处理后的马尾藻多糖中,硫酸根含量达10%(w/w)以上、20%(w/w)以上、40%(w/w)以上、或60%(w/w)以上。在一特定具体实施例中,本发明的马尾藻多糖中,硫酸根含量达60-70%(w/w)。

[0008] 具体而言,本发明的组合物可增加对于肠病毒71型感染的抑制率,例如,降低细胞感染肠病毒71型的比例、抑制肠病毒71型的RNA合成以及抑制肠病毒71型引起的细胞病变及细胞凋亡。

[0009] 本发明的各个具体实施例的细节说明如后。本发明的其他特征将会经由以下各个具体实施例中的详细说明及权利要求而清楚呈现。

[0010] 无须进一步的阐述,相信本发明所属技术领域中的技术人员基于前述说明即可利

用本发明至最广的程度。因此,可以理解以下的说明仅仅是作为例示说明之用,而非以任何方式限制其余的揭露内容

附图说明

[0011] 图1显示马尾藻多糖的HPLC图谱,其中图1(A)为马尾藻多糖标准品的HPLC图谱,及图1(B)为硫酸化马尾藻多糖的HPLC图谱。

[0012] 图2显示不同浓度的马尾藻多糖标准品及硫酸化马尾藻多糖对于肠毒病71型的抑制效果。

具体实施方式

[0013] 本发明分析马尾藻多糖,首次证实其针对肠病毒71型的感染有良好的抑制效果,尤其是增加硫酸根含量的马尾藻多糖,可进一步提高其抑制肠病毒71型的效果。马尾藻多糖无毒且容易取得,相较于有毒性且昂贵的化学药物接受度高,特别是针对高危险的婴幼儿而言。因此,本发明对于肠病毒71型所引起的疾病的治疗及防治做出了巨大贡献。

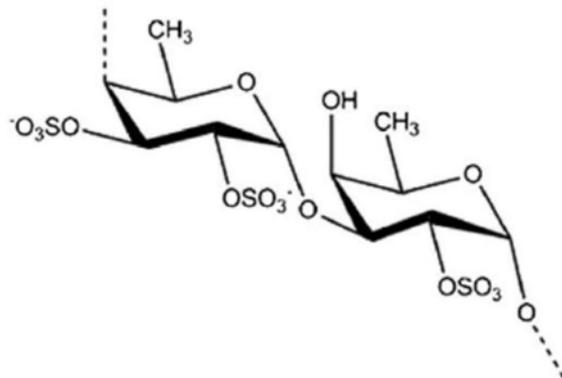
[0014] 除非另有指明,所有在此处使用的技术性和科学性术语具有如同本发明所属领域技术人员一般所了解的意义。

[0015] 本文所使用的“一”一词,如未特别指明,是指至少一个(一个或一个以上)的数量。

[0016] 在一方面,本发明是揭示一种马尾藻多糖在制备用于治疗或预防肠病毒71型感染的组合物中的用途。

[0017] 马尾藻多糖是由马尾藻萃取而得的多糖,从化学上来说,它是一种以“岩藻糖”为主的多糖体,是由岩藻糖(fucose)及硫酸盐(sulphate)组成的水溶性杂聚多糖成分,其中岩藻糖以 α -(1 \rightarrow 2)、 α -(1 \rightarrow 3)或 α -(1 \rightarrow 4)互相键结成主键,而硫酸盐结合在C-2或C-4的还原端上。具体而言,其具有的化学结构如下式(I):

[0018] 式(I)



[0019] 马尾藻多糖可由商业上获得,也可通过常规方法从马尾藻萃取而得,例如,以热水浸泡藻体使其软化(例如,浸泡于约100℃左右的热热水约1-3小时),经酵素或酸化步骤处理,然后离心、过滤,收集上清液。萃取后取得的上清液可进一步冷冻干燥,以利保存。在部分具体实施例中,本发明使用的马尾藻多糖,其分子量范围为50kDa至1,000kDa、250kDa至950kDa、或450kDa至850kDa。在一特定具体实施例中,本发明使用的马尾藻多糖具分子量约800kDa。

[0020] 较佳地,可进行增加硫酸根含量的步骤,以增加马尾藻多糖的硫酸根含量。在部分具体实施例中,本发明可采用化学方法添加硫酸根,例如,加入氯磺酸-二甲基甲酰胺

(Chlorosulfonic acid-N,N-dimethylformamide, HClSO₃/DMF) 试剂进行反应, 反应后以碱(如NaOH)中和, 然后离心、过滤, 收集上清液。在部分具体实施例中, 本发明的马尾藻多糖中硫酸根含量达10%(w/w)以上、20%(w/w)以上、40%(w/w)以上、或60%(w/w)以上。在一特定具体实施例中, 本发明使用的马尾藻多糖中硫酸根含量达60-70%(w/w)。

[0021] 本发明的组合物可依传统上的常规方法, 与任何一种或多种载体调配而成。例如, 将马尾藻多糖与适当载体混合, 再将其制成所需剂型。

[0022] 本文所使用的“载体”一词意指用以携带马尾藻多糖形成所欲调配物形式的非活性成分, 包括任何标准药理学上可接受的载体, 其可与调配物的活性成分相容, 且对欲施用的个体无害, 例如, 水、生理盐水、甘油、乙醇、葡萄糖水、葡聚糖、乳糖、蔗糖、甘露醇、其类似物或以上的组合。

[0023] 本发明的组合物尚可包括黏结剂、润滑剂、抗氧化剂、填充剂及保藏剂。可用的黏结剂包括阿拉伯胶、海藻酸钠、乙基纤维素、洋菜、明胶、淀粉、羟纤维素、羟丙基纤维素、其类似物或以上的组合。可用的润滑剂包括硬脂酸、硬脂酸钙、硬脂酸镁、滑石、氢化油、腊、其类似物或以上的组合。可用的抗氧化剂包括生育醇、二丁基羟基甲苯、丁基羟基甲氧苯、抗坏血酸、其类似物或以上的组合。可用的填充剂包括微晶纤维素、乳糖、甘露醇、其类似物或以上的组合。可用的保藏剂包括苯甲酸及其盐类、山梨酸及其盐类、对羟基苯甲酸酯类、去水醋酸钠、过氧化氢、次氯酸钠、其类似物或以上的组合。

[0024] 在一具体实施例中, 本发明的组合物是作为医药组合物, 其可依投与途径调配成各种剂型。举例而言, 本发明的医药组合物可调配成为胶囊或锭剂, 以进行口服投药。胶囊可含有任何标准的医药可接受性物质, 例如, 明胶或纤维素。锭剂可根据常规方法, 将组合物与固态载体及润滑剂共同压制而调配。本发明的医药组合物亦可调配成注射剂型, 所使用的载体包括水溶液、等张盐水或葡萄糖液或是其他熟知的医药可接受性载体。本发明的医药组合物尚可调配成乳膏、油剂、凝胶、乳液或喷雾剂, 供局部施用。

[0025] 在另一具体实施例中, 本发明的组合物是作为食品添加剂。马尾藻多糖取自天然食材, 不具毒性, 可直接添加至食品或营养品中, 简单达成预防保健的功效, 例如, 添加至奶粉或其他乳制品中提供婴幼儿食用。

[0026] 在又一具体实施例中, 本发明的组合物是作为清洁卫生用品的添加物, 例如, 可添加至脸部、身体或手部清洁用品、或环境消毒液、或并入口罩、清洁纸巾、卫生纸或棉花棒。

[0027] 实施例1: 马尾藻多糖之制备

[0028] 将马尾藻以流水清洗并烘干, 再进行研磨。接着配制5%(w/w)的马尾藻水溶液进行热水萃取法: 首先将马尾藻水溶液浸泡于热水浴(约100℃左右, 浸泡约1-3小时)使藻体软化, 再以酵素或酸水解处理, 反应完成后进行高速离心, 之后过滤并收集上清液。将该上清液移至-80℃, 再以真空冻结干燥机(LABCONCO)进行冷冻干燥, 获得马尾藻多糖。

[0029] 实施例2: 硫酸化反应

[0030] 将上述萃得到的马尾藻多糖以硫酸根化学法处理增加硫酸根含量: 于马尾藻多糖中添加氯磺酸-二甲基甲酰胺(Chlorosulfonic acid-N,N-dimethylformamide, HClSO₃/DMF)试剂进行反应, 反应后以NaOH调成中性, 随后进行高速离心, 之后过滤并收集上清液。将该上清液移至-80℃, 再以真空冻结干燥机进行冷冻干燥, 即得硫酸化马尾藻多糖。

[0031] 实施例3: 硫酸根含量分析

[0032] 使用商业上可取得的马尾藻多糖标准品或待测的硫酸化马尾藻多糖样品,将其溶于浓度1N的0.5ml HCl中,于100℃反应1小时后,以烘箱蒸干至无水分。加入0.5ml的去离子水(ddH₂O)回溶后,再加入2ml无水酒精、1ml的氯化钡缓冲液(BaCl₂buffer,其含有2M的醋酸10ml、0.05M的氯化钡2ml、0.02M的碳酸氢钠8ml,并以无水酒精定量至100ml)以及1.5ml玫瑰棕酸钠溶液(Na-rhodizonate solution,其含有0.25mg/ml的Na₂C₆O₆、100mg抗坏血酸,并以无水酒精定量至100ml)混匀。进行避光反应20分钟,最后测量A520并换算成硫酸根含量。利用上述方法检测马尾藻多糖标准品及待测的硫酸化马尾藻多糖样品,其硫酸根含量如表1所示。

[0033] 表1

	组别	硫酸根含量 (%)
[0034]	马尾藻多糖标准品	6.95 ± 0.25
	硫酸化马尾藻多糖	67.61 ± 2.18

[0035] 实施例4:多糖分子量分析

[0036] 以普鲁兰(Pullulan)为标准品(标准品的分子量自大至小依次为788kDa、404kDa、212kDa、112kDa、47.3kDa、22.8kDa、11.8kDa及5.9kDa),取20μL进行HPLC分子量分析。GPC分离管柱(OHpak SB-804HQ)操作条件为流速0.8ml/min,冲提液为去离子水,并以蒸发光散射检测器(Evaporative Light Scattering Detector,ELSD)进行多糖体分子量分布分析。分析后的图谱以EC2000GPC软件计算出滞留时间(retention time)对多糖分子量(Mw)的标准曲线作为马尾藻多糖分子量分析的依据。

[0037] 图1显示马尾藻多糖的HPLC图谱结果,其中图1(A)是马尾藻多糖标准品的HPLC图谱,图1(B)是硫酸化马尾藻多糖的HPLC图谱,经比对标准曲线后可得马尾藻多糖分子量约落在约800kDa,又其中图1(B)的滞留时间向右移,表示经硫酸化反应后,因硫酸根的添加,导致分子量增加。

[0038] 实施例5:细胞及病毒培养

[0039] 肠病毒71型的病毒株是取自一名于2001年7月间因肠病毒71型重症死亡的两岁大女婴的喉头检体,该病毒株为MEL701,由中兴大学陈全木老师实验室提供。

[0040] 另一方面,将非洲绿猴肾细胞(African green monkey kidney cells;VERO细胞,ATCC CCL-18),培养于RPMI-1640培养液中(含2%FBS,pH7.0),当细胞生长约八分满时进行继代培养。先移除细胞培养液,以磷酸缓冲液(phosphate buffer saline,PBS)洗去残留的血清和细胞代谢物,再加入胰蛋白酶与乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid,EDTA)作用3至5分钟,以胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)中止反应并用细胞培养液冲下细胞,收集于离心管中,离心,去除上清液收集细胞沉淀,再以培养液回溶之后,进行作细胞计数。

[0041] 将MEL701病毒株接种于VERO细胞(含2%FBS RPMI-1640培养液)中,以倒立式显微镜观察细胞型态,当出现80%以上细胞病变现象(cytopathic effect,CPE)时,收集含病毒的培养液,储存于-80℃冰箱,供后续实验之用。

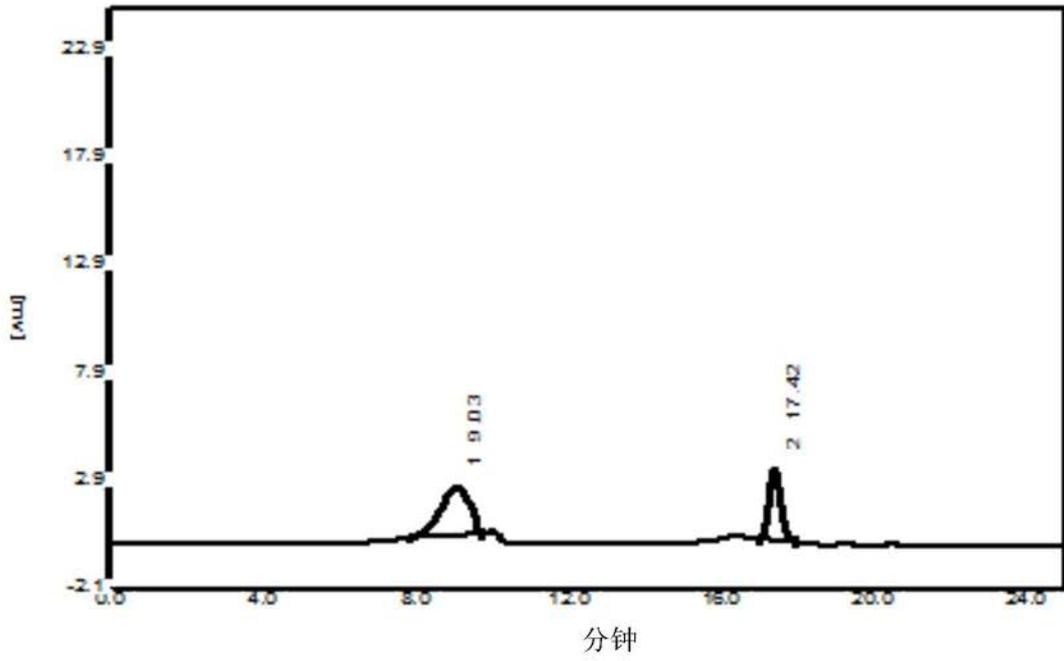
[0042] 实施例6:病毒斑抑制试验

[0043] 将VERO细胞种于6孔培养皿中(1×10^5 细胞/孔),置于含5%CO₂的37℃培养箱中,待细胞培养至六、七分满,抽掉培养液,以PBS冲洗细胞一次。将马尾藻多糖标准品及硫酸化马尾藻多糖(取硫酸根含量为67.6%的样品)以RPMI-1640培养液(不含胎牛血清)分别稀释成不同浓度,各自与细胞于37℃下培养作用1小时后,再加入病毒液(50PFU/孔),于37℃下感染1小时。最后加入含2%琼脂糖胶(agarose)的RPMI-1640培养液,待其凝固,置于含5%CO₂的37℃培养箱中培养四至五天后,以10%的福尔马林固定,挖除凝胶,以1%的结晶紫染色,以自来水冲洗后计数病毒斑数目。

[0044] 病毒斑抑制率(%)的计算方式为: $(VC - VCS) / VC \times 100\%$,其中VC是未加入马尾藻多糖标准品或硫酸化马尾藻多糖的对照病毒感染组的病毒斑数;以及VCS是加入马尾藻多糖标准品或硫酸化马尾藻多糖的实验病毒感染组的病毒斑数。实验数据由三次独立实验所获得,以平均值±标准误差(mean±SEM)显示。

[0045] 图2显示病毒斑抑制试验结果。结果显示,马尾藻多糖展现良好的对抗肠病毒71型感染的效果,抑制率达约30-45%,尤其马尾藻多糖增加硫酸根含量后,抗病毒效果又再提升约28-47%,即抑制率提升至约60-80%以上,抗病毒效果相当优异。

(A)



(B)

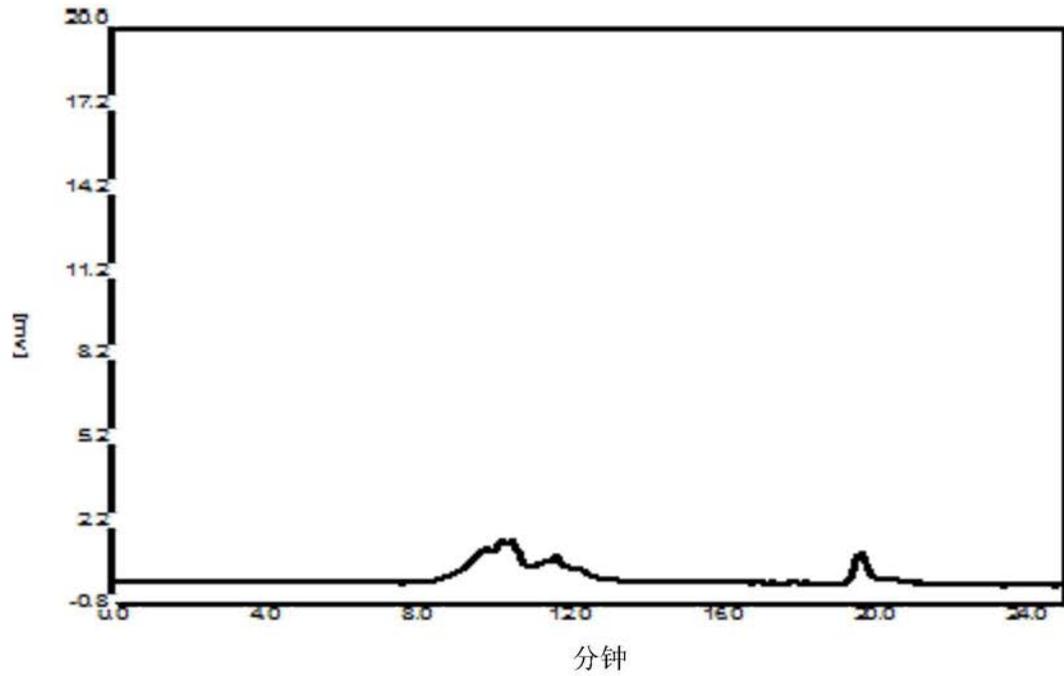


图1

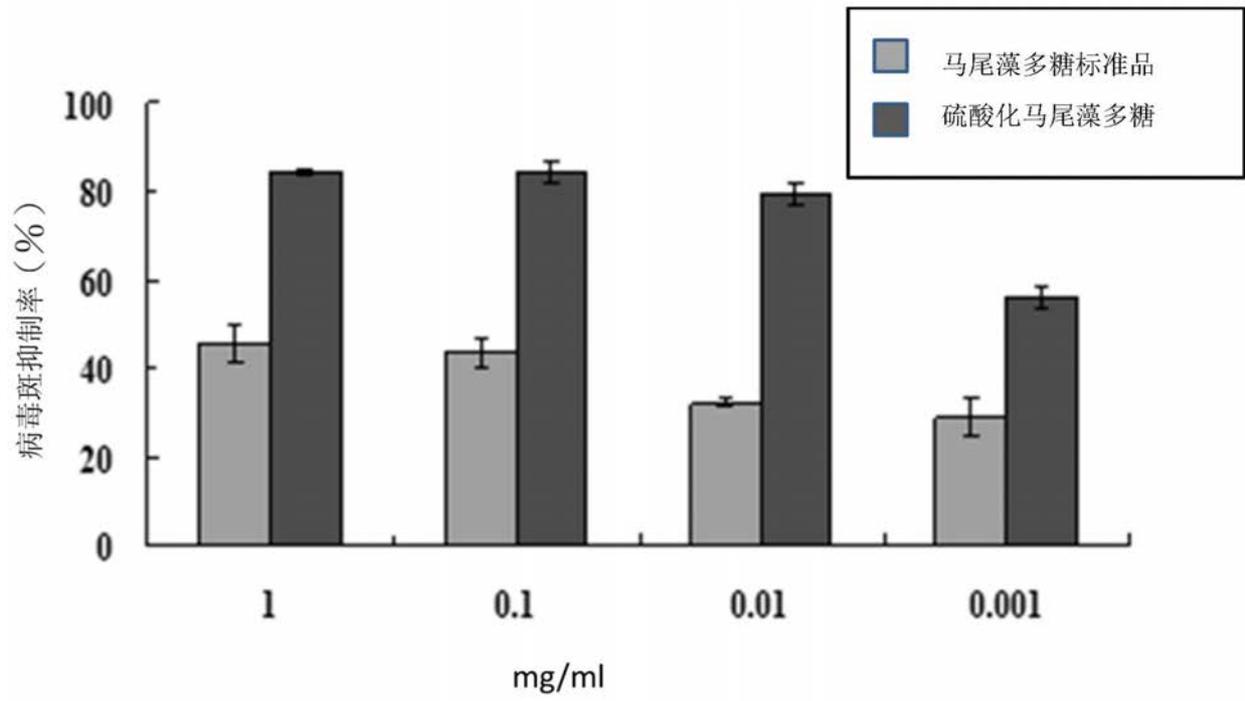


图2