

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 31/10

A61P 31/18



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 00132008.4

[45] 授权公告日 2003 年 11 月 12 日

[11] 授权公告号 CN 1127335C

[22] 申请日 2000.11.22 [21] 申请号 00132008.4

[71] 专利权人 中国科学院昆明植物研究所

地址 650204 云南省昆明市北郊黑龙潭

共同专利权人 中国科学院昆明动物研究所

[72] 发明人 陈纪军 王易芬 郑永唐 罗士德

曹建新 唐绍宗 王惠英 刘广杰

来国防

审查员 卢立明

[74] 专利代理机构 云南协立专利事务所

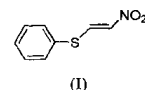
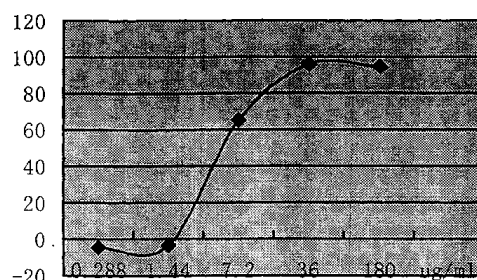
代理人 马晓青 吴 平

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

[54] 发明名称 抗艾滋病药物及其应用

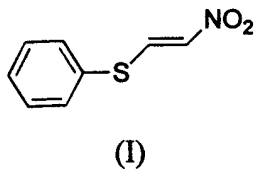
[57] 摘要

一种抗艾滋病的药物，其中含有抗艾滋病有效量的式(I)化合物反-1 硝基 2-苯硫基-乙烯用及可药用载体和/或赋形剂。同时提供一种逆转录酶抑制剂，其中含有式(I)化合物反-1 硝基 2-苯硫基-乙烯及可药用载体和/或赋形剂；式(I)化合物反-1 硝基 2-苯硫基-乙烯在制备抗艾滋病药物中的应用；式(I)化合物反-1 硝基 2-苯硫基-乙烯在制备逆转录酶抑制剂药物中的应用。

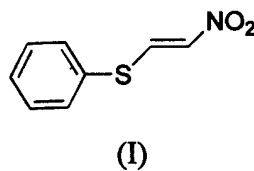


I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种抗艾滋病的药物，其中含有抗艾滋病有效量的式(I)化合物反-1 硝基 2-苯硫基-乙烯及可药用载体和/或赋形剂。



2、式(I)化合物反-1 硝基 2-苯硫基-乙烯在制备抗艾滋病药物中的应用。



抗艾滋病药物及其应用

本发明属于药物组合物技术领域，具体地，涉及一种抗艾滋病药物及其在制备逆转录酶抑制剂、抗艾滋病药物中的应用。

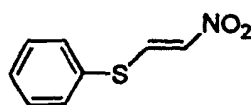
艾滋病（Acquired Immuno-deficiency Syndrome, AIDS，获得性免疫缺损综合症，简称艾滋病）是当今世界主要威胁人类健康的不可根治的致死疾病之一。导致艾滋病的病原体即人类免疫缺损病毒（Human Immunodeficiency Virus, HIV），1983 年获得分离确证，有两种亚型 HIV-1 和 HIV-2，若干变异株。HIV 繁殖过程大致可分九个步骤：吸附、穿入、脱壳、早期蛋白合成、病毒基因组核酸的复制、晚期蛋白合成、核壳体装配、病毒体成熟、释放等。从理论上说，上述过程中的每一个步骤都能作为筛选抗 HIV 药物的靶点。并且每一步骤都发现了许多相应的抑制剂，不同类型的化合物被相继研究和用于抗艾滋病病毒。然而其中病毒基因组核酸的复制和蛋白质的合成是 HIV 繁殖最关键的步骤，且需要有某些特异性酶的参与，故抗 HIV 药物的研制的热点主要集中于寻找这些特异性酶的抑制剂方面，包括逆转录酶（RT）抑制剂（它抑制 HIV 从 mRNA 转录 DNA），蛋白质合成酶抑制剂，逆转录启动因子（TAT）抑制剂等。全世界已对约 20000 个化合物进行了抗 HIV 的研究，目前已成功地研制出了逆转录酶抑制剂和蛋白酶抑制剂 14 个抗 HIV 药物。如逆转录酶抑制剂（AZT, DDC, DDI, D4T, 3TC, Nevirapine, Delavirdine, Efaviravir）和蛋白酶抑制剂药物（Sequanavir, Ritonavir, Indinavir, Nelfinavir, Amprenavir）虽然被批准用于临床，客观上延长了艾滋病患者的生命，但同时又带了严重的毒副作用如骨髓抑制和健忘等以及导致抗病毒株的出现。因而临床上急需研制出具有不同化学结构和作用机理的新类型抗 HIV 病毒的新药物。从中草药中发现天然抗 HIV 活性化合物或先导物——是目前国内外研究的重要方面和非常活跃的领域。至今发现 100 多种天然化合物具有 HIV 活性，分属于倍半萜、二萜、三萜、甾体、黄酮、香豆素、肽类、生物碱，多糖，天花粉蛋白等，其中活性较强的如：甘草甜素，金丝桃素，姜黄素，大豆皂甙，喜树碱，栗精胺，香菇多糖，天花粉蛋白等。

迄今，现有技术中没有含有式 (I) 化合物作为有效成分在抗艾滋病方面的报道，也没有该化合物在制备逆转录酶抑制剂药物中的应用的报道。

本发明的目的在于提供抗艾滋的药物，其中含有抗艾滋病有效量的式 (I) 化合物反-1 硝基 2-苯硫基-乙烯用及可药用载体和/或赋形剂，提供该化合物在制备逆转录酶抑制剂药物和在制备抗艾滋病药物中的应用。

为了实现本发明的目的，本发明提供了如下技术方案：

一种抗艾滋病的药物，其中含有抗艾滋病有效量的式 (I) 化合物反-1 硝基 2-苯硫基-乙烯用及可药用载体和/或赋形剂。



(I)

同时提供了一种逆转录酶抑制剂，其中含有权利要求 1 所公开的式 (I) 化合物反-1 硝基 2-苯硫基-乙烯及可药用载体和/或赋形剂。

本发明还提供了式 (I) 化合物反-1 硝基 2-苯硫基-乙烯在制备抗艾滋病药物中的应用以及式 (I) 化合物反-1 硝基 2-苯硫基-乙烯在制备逆转录酶抑制剂药物中的应用。

本发明化合物用作药物时，可以直接使用，或者以药物组合物的形式使用。该药物组合物含有 0.1—99%，优选为 0.5-90% 的本发明化合物，其余为药学上可接受的，对人和动物无毒和惰性的可药用载体和/或赋形剂。

所述的药用载体或赋形剂是一种或多种选固体、半固体和液体稀释剂、填料以及药物制品辅料。将本发明的药物组合物以单位体重服用量的形式使用。本发明的药物可经口服和注射（静注、肌注）两种形式给药。

为了更好地理解本发明的实质，下面将用本发明的式 (I) 化合物消旋-2-甲基-1-四氢萘酮-2-硝基乙烯（以下简称 KIBL-43）及其与药用载体或赋形剂组成的药物组合物的药理作用结果来说明本发明的实质，但本发明的内容并不局限于此。

1、反-1 硝基 2-苯硫基-乙烯对 HIV - 1 逆转录酶的抑制作用

(1) 实验方法

逆转录酶 (Reverse Transcriptase, RT) 测定非放射性 (non - radioactive)

试剂盒购自 Roche 公司。将化合物溶解于 DMSO 中。取出试剂盒中反应条，每孔滴加 20 μ l HIV - 1 RT 溶液，13 μ l 裂解缓冲液，7 μ l 溶于 DMSO 的化合物，20 μ l 含模板和核苷酸的反应缓冲液。化合物的浓度为 210 μ g/ml。设置 Foscarnet 阳性对照孔和不含化合物的阴性对照孔。置 37℃1 小时。洗涤 5 次后，每孔加入 200 μ l 抗 DIG - POD 抗体工作液。37℃温育 1 小时,洗涤 5 次。每孔滴加 200 μ l ABTS 底物反应液。室温反应 15 - 30 分钟。Bio - Tek Elx800 酶标仪测定 OD 值 (405/490nm)。以抑制 RT 活性 > 50% 的化合物判定为初筛阳性。将初筛阳性化合物用裂解缓冲液进行倍比稀释，每个浓度设二个复孔。按上述方法测定其对 RT 活性的抑制。计算出抑制 HIV - 1 RT 活性 50% 的化合物浓度 (EC₅₀, 50% effective concentration)。

(2) 结果：(见说明书附图 1)

反-1 硝基 2-苯硫基-乙烯对 HIV-1RT 的抑制活性数据

μ g/ml	0.288	1.44	7.2	36	180	EC ₅₀
抑制率%	4.8	3.6	64.9	95.9	94.4	5.0 μ g/ml

2、反-1 硝基 2-苯硫基-乙烯对 C8166 细胞的毒性测定

(1) 测定方法：采用 MTT 法对样品 CC₅₀ 的测定

(2) 样品的制备：将反-1 硝基 2-苯硫基-乙烯样品用 RPMI - 1640 稀释为 1000 μ g/mL 的浓度，用 0.22 μ M 膜过滤。

(3) 实验操作：

取板每孔+100 μ L 培养基进行 2 倍梯度稀释+100 μ L C8166 细胞 (3×10^5 /mL),培养 72 小时 (37℃ CO₂5%),吸出上清 100 μ L +20 μ L MTT,继续温育 4 小时 (37℃ CO₂5%) +100 μ L, 10% SDS 放培养箱中过夜 (18 小时)。

(4) OD 值测定

用 Elx - 800 酶标仪测定 OD 值波长 490nm。

(5) 实验结果：计算不同浓度的抑制%率、再算出抑制 50% C8166 细胞的毒性值 (CC₅₀, 50% cytotoxic concentration)。(见说明书附图 2)。

反-1 硝基 2-苯硫基-乙烯对 C8166 细胞的毒性测定

μg/ml	15.6	31.3	62.5	125	250	500	CC50
抑制率%	-17.3	-10.3	-6.5	30.7	78.3	104.2	155μg/ml

3、反-1 硝基 2-苯硫基-乙烯对 HIV 的治疗指数 (Selective Index, SI)

$$SI = CC50 \div EC50 = 155 \mu\text{g/ml} \div 5.0 \mu\text{g/ml} = 31$$

从上述实验结果可以证实：本发明的反-1 硝基 2-苯硫基-乙烯对 HIV 逆转录酶具有抑制作用，它对 C8166 细胞的毒性低，选择指数高，可用于与逆转录酶有关的疾病如艾滋病等。

图 1 是反-1 硝基 2-苯硫基-乙烯对 HIV-1RT 的抑制活性数据图；

图 2 是反-1 硝基 2-苯硫基-乙烯对 C8166 细胞的毒性测定图。

下面结合实施例进一步对本发明实质内容进行说明，但本发明的内容并不局限于此。

实施例 1：按照文献 Ono N et al, J. Org. Chem., 1986, 51:2139 进行合成反-1 硝基 2-苯硫基-乙烯：

(1) 1-硝基-2-苯硫基-乙烷的制备

将 1-乙氧基-2-硝基乙烷 (532 mg, 4 mmol)，硫酚 (440 mg, 4 mmol) 溶于乙腈中 (10 mL)，于 0℃ 加入三乙胺 (410 mg, 4 mmol)，于室温搅拌 30 分钟，该溶液倾入 1M 盐酸中，然后以乙酸乙酯萃取，回收溶剂后，得 1-硝基-2-苯硫基-乙烷 700 mg (得率 95%)。NMR (CDCl₃) 2.43 (t, J = 8 Hz, 2H), 4.56 (t, J = 8 Hz, 2H), 7.58 (m, 5H)。

(2) 反-1-硝基-2-苯硫基-乙烯的制备

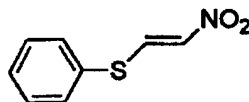
硝基-2-苯硫基-乙烷 (630 mg, 3.4 mmol) 溶于 5 mL 二氯甲烷中，于 0℃ 加入二氯亚砷 (0.290 mL, 3.6 mmol) 于室温下搅拌 5 分钟，除去挥发性物质得残渣，该残渣溶于二氯甲烷中，于室温下加入三乙胺 (350 mg, 3.6 mmol) 于 0℃ 搅拌 30 分钟，该混合液倾入水中，以 1M 盐酸洗有机层，蒸去有机层溶剂，经制备薄层分离得化合物 1-硝基-2-苯硫基-乙烷 500 mg (得率 83%) IR 1505 cm⁻¹; NMR (CDCl₃) 6.67 (d, J = 12 Hz, 1H), 7.24 – 7.56 (m, 5H), 8.19 (d, J = 12 Hz,

12 Hz, 1H) 。

结构：如右图所示

分子式：C₉H₇NO₂S

性状：黄色小针晶



将所合成的反-1 硝基 2-苯硫基-乙烯与赋形剂重量比为 9:1 的比例加入赋形剂，制成粉剂。

实施例 2：

按实施例 1 的方法先制得反-1 硝基 2-苯硫基-乙烯，按其于赋形剂重量比为 5:1 的比例加入赋形剂，制成粉剂。

实施例 3：

按实施例 1 的方法先制得反-1 硝基 2-苯硫基-乙烯，按其于赋形剂重量比为 5:1 的比例加入赋形剂，制粒压片。

实施例 4：

按实施例 1 的方法先制得反-1 硝基 2-苯硫基-乙烯，将其溶于无菌注射用水中，搅拌使溶，用无菌抽滤漏斗过滤，再无菌精滤，分装于 2ml 安瓿中，低温冷冻干燥后无菌熔封得粉针剂。

实施例 5：

按实施例 1 的方法先制得反-1 硝基 2-苯硫基-乙烯，按常规口服液制法制成口服液。

实施例 6：

按实施例 1 的方法先制得反-1 硝基 2-苯硫基-乙烯，按常规注射液制法加注射用水，精滤，灌装灭菌制成注射液。

实施例 7：

按实施例 1 的方法先制得反-1 硝基 2-苯硫基-乙烯，按其于赋形剂重量比为 5:1 的比例加入赋形剂，制成胶囊。

实施例 8：

按实施例 1 的方法先制得反-1 硝基 2-苯硫基-乙烯，按其于赋形剂重量比为 3:1 的比例加入赋形剂，制成胶囊。

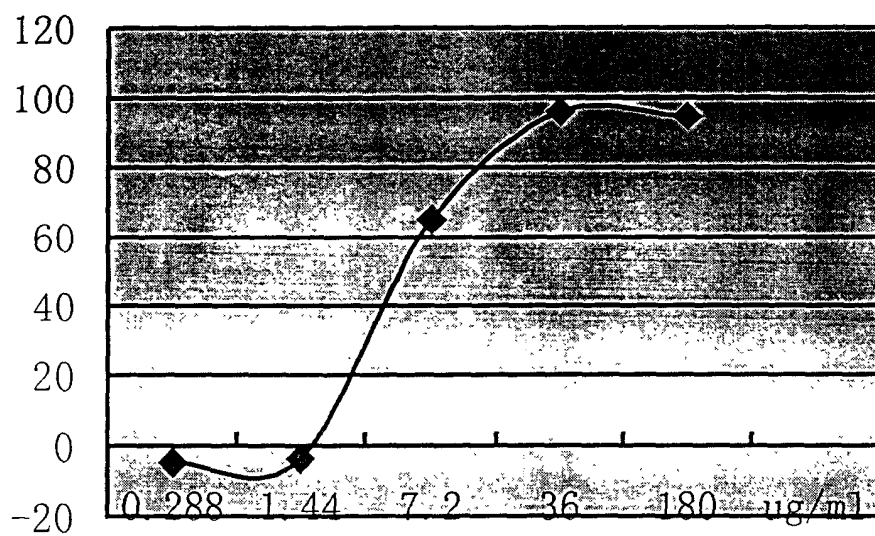


图 1

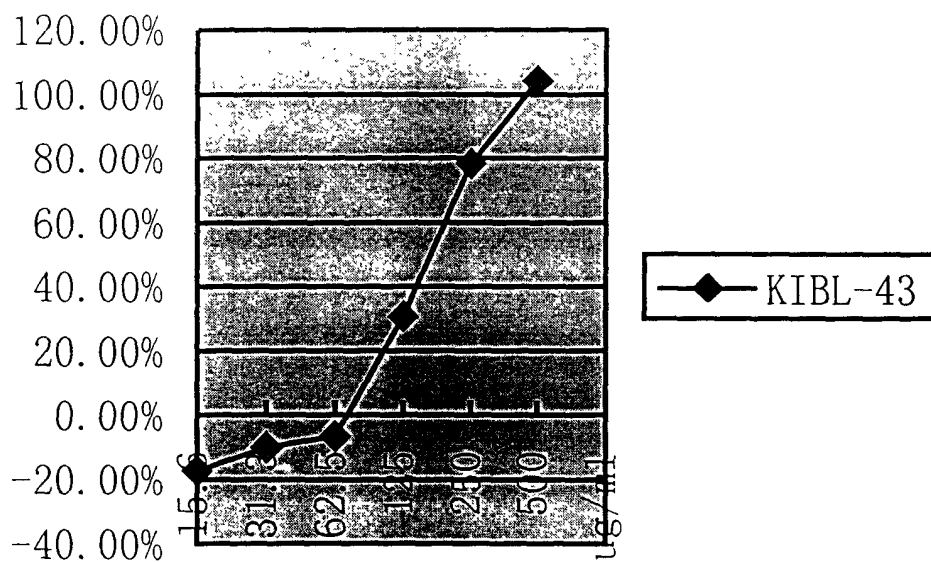


图 2