

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810029122.8

[51] Int. Cl.

A61K 31/365 (2006.01)

A61K 36/185 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 17/06 (2006.01)

[43] 公开日 2008年12月10日

[11] 公开号 CN 101317841A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 37/02 (2006.01)

A61K 131/00 (2006.01)

[22] 申请日 2008.6.30

[21] 申请号 200810029122.8

[71] 申请人 杨 芑

地址 510650 广东省广州市天河区长兴路天
鹅花园 A5-505

共同申请人 杨仁洲 李远桂

[72] 发明人 杨仁洲 李远桂

[74] 专利代理机构 广州知友专利商标代理有限公司

代理人 李海波

权利要求书 2 页 说明书 13 页

[54] 发明名称

番荔枝内酯高效部位药 - 爱诺宁及其制备方法和用途

[57] 摘要

本发明公开了一种番荔枝内酯高效部位药 - 爱诺宁及其制备方法和用途, 其主要成分是由一类具有 α 、 β - 不饱和 γ - 内酯结构的双四氢咪喃环型番荔枝内酯化合物 - 布拉他辛和史可莫辛所组成, 这类成分占其总质量数 90% 或以上。本发明的制备方法对环境污染小, 简单易实施, 可以实现规模化生产。本发明提出番荔枝内酯高效部位药 - 爱诺宁可用于制备治疗恶性肿瘤、HIV 感染/艾滋病及风湿、类风湿、银屑病、红斑狼疮自身免疫性疾病的药物。在治疗恶性肿瘤、HIV 感染/艾滋病的初步临床试验中, 爱诺宁显示出许多目前中、西医药疗法都难以与之比拟的优势。

1.一种番荔枝内酯高效部位药-爱诺宁,其特征是:其主要成分是由一类具有 α 、 β -不饱和 γ -内酯结构的双四氢呋喃环型番荔枝内酯化合物-布拉他辛和史可莫辛所组成,这类成分占其总质量数90%或以上,其通过以下制备方法制备获得:番荔枝种子粉碎后的粗粉用有机溶剂或有机溶剂与水的混合物渗滤,渗滤液回收除去有机溶剂,残余水液用石油醚萃取得到番荔枝种子的粗内酯,再用酒精浸泡,除去上层油脂,酒精蒸干得到番荔枝种子的总内酯,番荔枝种子总内酯经硅胶柱层析分离,薄层层析指导合并所需馏份得到番荔枝内酯有效部位,番荔枝内酯有效部位再经反相填料柱层析,收集所需馏分,浓缩、干燥,得到番荔枝内酯高效部位药-爱诺宁。

2.权利要求1所述的番荔枝内酯高效部位药-爱诺宁的制备方法,其特征是:首先将番荔枝种子粉碎后的粗粉用有机溶剂或有机溶剂与水的混合物渗滤,渗滤液回收除去有机溶剂,残余水液用石油醚萃取得到番荔枝种子的粗内酯,再用酒精浸泡,除去上层油脂,酒精蒸干得到番荔枝种子的总内酯;然后将番荔枝种子总内酯经硅胶柱层析分离,薄层层析指导合并所需馏份得到番荔枝内酯有效部位;最后将番荔枝内酯有效部位再经反相填料柱层析,收集所需馏分,浓缩、干燥,得到番荔枝内酯高效部位药-爱诺宁。

3.根据权利要求2所述的番荔枝内酯高效部位药-爱诺宁的制备方法,其特征是:番荔枝种子的粗粉用90~98%酒精渗滤提取,浓缩回收除去其中的溶剂,得到粘稠状浸膏;粘稠状浸膏冷却后加入石油醚,放置,除去棕黑色块状沉淀物,加入水以除去其中的皂甙类成分,回收石油醚,得到番荔枝种子的粗内酯;番荔枝种子粗内酯用30~85%酒精浸泡,除去上层油脂,酒精层蒸干即得到番荔枝种子的总内酯。

4.根据权利要求2所述的番荔枝内酯高效部位药-爱诺宁的制备方法,其特征是:番荔枝种子的粗粉用丙酮和水的混合液渗滤提取,其中丙酮和水的体积比为50:50~90:10,浓缩回收除去其中的溶剂,放置,除去析出的棕黑色的块状沉淀物,加入石油醚,回收石油醚层,得到番荔枝种子粗内酯;番荔枝种子粗内酯用30-85%的酒精浸泡,除去上层油脂,酒精层蒸干即得到番荔枝种子的总内酯。

5.根据权利要求2所述的番荔枝内酯高效部位药-爱诺宁的制备方法,其特征是:番荔枝种子的总内酯经100~300目硅胶柱层析,其中番荔枝种子总内酯与

硅胶的质量比为 1:4~1:5，用石油醚-丙酮为洗脱剂进行洗脱，其中石油醚与丙酮的体积比为 95:5~70:30，薄层层析检查、指导收集所需馏分，回收溶剂，干燥即得到番荔枝内酯有效部位。

6. 根据权利要求 2 所述的番荔枝内酯高效部位药-爱诺宁的制备方法，其特征是：番荔枝内酯有效部位用 C₁₈ 反相填料柱或 C₈ 反相填料柱加压层析分离，用甲醇-水为洗脱剂进行洗脱或梯度洗脱，采用 TLC、UV 或 HPLC 指导收集所需馏份，最终得到番荔枝内酯高效部位药--爱诺宁。

7. 根据权利要求 6 所述的番荔枝内酯高效部位药-爱诺宁的制备方法，其特征是：C₁₈ 反相填料柱或 C₈ 反相填料的粒径为 10~80um，所用的加压设备的加压范围为 0~50bar，甲醇与水的体积比为 80:20~93:7，洗脱剂流速为 1~250ml/min，UV 检测的波长为 210~280nm。

8. 权利要求 1 所述的番荔枝内酯高效部位药--爱诺宁在制备用于治疗恶性肿瘤、HIV 感染/艾滋病及风湿、类风湿、银屑病、红斑狼疮自身免疫性疾病的药物中的用途。

9. 根据权利要求 8 所述的番荔枝内酯高效部位药--爱诺宁的用途，其特征是：爱诺宁与药学上可接受的载体制成片剂、胶囊剂、喷雾剂、软膏剂、凝胶剂、注射剂、含药脂肪乳剂、微囊剂、栓剂或透皮控释贴剂，用于口服、注射或外用。

番荔枝内酯高效部位药-爱诺宁及其制备方法和用途

技术领域

本发明涉及一种由热带植物番荔枝 (*Annona squamosa* L.) 种子制备的番荔枝内酯 (Annonaceous acetogenins) 高效部位药-爱诺宁 (Annonins), 本发明还涉及一种番荔枝内酯高效部位药-爱诺宁的制备方法及其医药用途。

背景技术

番荔枝内酯 (Annonaceous acetogenins) 是一类具有 α 、 β -不饱和 γ -内酯环和 1-3 个四氢呋喃环结构的类似长链脂肪酸的天然化合物, 目前仅在番荔枝科中几个属植物中被发现。自 80 年代中期以来, 发现了约 400 个此类化合物, 由于他们有抗肿瘤、杀虫、抑制 HIV、SIV 等多种强烈的生物活性而日益为人们所关注。由于结构、性质相似, 且数目众多的番荔枝内酯类化合物往往共存于一植物中, 其生物活性的高低、植物中的含量、分离纯化的难度都有很大差异, 以及大多数植物的资源并不丰富等原因, 真正可被利用的只有布拉他辛 (bullatacin)、史可莫辛 (squamocin)。

国内曾有人提出用总内酯 (CN1224016A)、部位药 (CN1370530)、番荔枝辛 (即史可莫辛, CN1544423), 布拉他辛 (CN1460473) 及提取物 (CN1739586) 制备抗肿瘤药、杀虫剂及抗 HIV 感染/艾滋病药物, 但都存在或是成分太复杂、包含大量低活性成份, 难以控制药物的质量和药效; 或是选用史可莫辛/布拉他辛中之一, 浪费了高含量高生物活性的另一成份; 或者是分离方法复杂繁琐; 或使用如氯仿、二氯甲烷、乙酸乙酯、正己烷等有损人体健康、污染环境、损害臭氧层、价格高昂致使成本显著增加的有机溶剂; 或使用大比例硅胶作载体, 层析分离的周期较长, 难以实现规模化生产等缺点。此外, 由于生物活性极其强烈, 药物的制剂、用药安全性等问题更是目前国内外的研究难点。

发明内容

本发明的一个目的是提供一种番荔枝内酯高效部位药-爱诺宁, 其主要成分是由布拉他辛和史可莫辛所组成, 这类成分占其总质量数 90%或以上。

本发明的另一个目的提供一种方法简单、对环境污染小、可以实现规模化生产的番荔枝内酯高效部位药-爱诺宁的制备方法。

本发明还有一个目的是提供番荔枝内酯高效部位药-爱诺宁的用途，具体地说，在制备用于治疗恶性肿瘤、HIV 感染/艾滋病及风湿、类风湿、银屑病、红斑狼疮疾病的药物中的用途。

本发明提供的一种番荔枝内酯高效部位药-爱诺宁，其主要成分是由一类具有 α 、 β -不饱和 γ -内酯结构的双四氢呋喃环型番荔枝内酯化合物-布拉他辛和史可莫辛所组成，这类成分占其总质量数 90%或以上，其通过以下制备方法制备获得：番荔枝种子粉碎后的粗粉用有机溶剂或有机溶剂与水的混合物渗滤，渗滤液回收除去有机溶剂，残余水液用石油醚萃取得到番荔枝种子的粗内酯，再用酒精浸泡，除去上层油脂，酒精蒸干得到番荔枝种子的总内酯，番荔枝种子总内酯经硅胶柱层析分离，薄层层析指导合并所需馏份得到番荔枝内酯有效部位，番荔枝内酯有效部位再经反相填料柱层析，收集所需馏分，浓缩、干燥，得到番荔枝内酯高效部位药-爱诺宁。

本发明提供的荔枝内酯高效部位药-爱诺宁的制备方法是：首先将番荔枝种子粉碎后的粗粉用有机溶剂或有机溶剂与水的混合物渗滤，渗滤液回收除去有机溶剂，残余水液用石油醚萃取得到番荔枝种子的粗内酯，再用酒精浸泡，除去上层油脂，酒精蒸干得到番荔枝种子的总内酯；然后将番荔枝种子总内酯经硅胶柱层析分离，薄层层析指导合并所需馏份得到番荔枝内酯有效部位；最后将番荔枝内酯有效部位再经反相填料柱层析，收集所需馏分，浓缩、干燥，得到番荔枝内酯高效部位药-爱诺宁。

本发明提供的制备方法工序简单，采用最常用且廉价的、对环境污染小以及对人体健康较为安全的有机溶剂作柱层析洗脱剂；层析柱使用载体硅胶与样品比例与现有技术相比更小，使得整个制备方法简单易实施，可以实现规模化生产。具体的方案包括：

1) 番荔枝种子的粗粉用 90~98%酒精渗滤提取，浓缩回收除去其中的溶剂，得到粘稠状浸膏；粘稠状浸膏冷却后加入石油醚，放置，除去棕黑色块状沉淀物，加入水以除去其中的皂甙类成分，回收石油醚，得到番荔枝种子的粗内酯；番荔枝种子粗内酯用 30~85%酒精浸泡，除去上层油脂，酒精层蒸干即得到番荔枝种子的总内酯。或，

番荔枝种子的粗粉用丙酮和水的混合液渗滤提取，其中丙酮和水的体积比为

50:50~90:10, 浓缩回收除去其中的溶剂, 放置, 除去析出的棕黑色的块状沉淀物, 加入石油醚, 回收石油醚层, 得到番荔枝种子粗内酯; 番荔枝种子粗内酯用30-85%的酒精浸泡, 除去上层油脂, 酒精层蒸干即得到番荔枝种子的总内酯。

2) 番荔枝种子的总内酯经 100~300 目硅胶柱层析, 其中番荔枝种子总内酯与硅胶的质量比为 1:4~1:5, 用石油醚-丙酮为洗脱剂进行洗脱, 其中石油醚与丙酮的体积比为 95:5~70:30, 薄层层析检查、指导收集所需馏分, 回收溶剂, 干燥即得到番荔枝内酯有效部位。

3) 番荔枝内酯有效部位用粒径为 10~80 μm 的 C_{18} 反相填料柱或 C_8 反相填料柱加压层析分离, 用甲醇-水为洗脱剂进行洗脱或梯度洗脱, 用 TLC、UV 或 HPLC 指导收集所需馏份, 其中所用的加压设备的加压范围为 0~50bar, 甲醇与水的体积比为 80:20~93:7, 洗脱剂流速为 1 ~250ml/min, UV 检测的波长为 210~280nm, 最终得到番荔枝内酯高效部位药--爱诺宁。

本发明提出了番荔枝内酯高效部位药--爱诺宁在制备用于治疗恶性肿瘤、HIV 感染/艾滋病及风湿、类风湿、银屑病、红斑狼疮自身免疫性疾病的药物中的用途。爱诺宁与药学上可接受的载体制成片剂、胶囊剂、喷雾剂、软膏剂、凝胶剂、注射剂、含药脂肪乳剂、微囊剂、栓剂或透皮控释贴剂。

本发明提出的番荔枝内酯高效部位药-爱诺宁的药用组合物可以以下面的任意方式施用: 口服, 喷雾, 直肠用药, 阴道用药, 局部用药, 静脉点滴, 肌肉注射, 腹膜内注射, 透皮给药, 其中优选透皮给药、腹膜内注射、口服或静脉点滴用药。

本发明提出的番荔枝内酯高效部位药-爱诺宁的透皮控释贴剂, 药物爱诺宁有较高的脂溶性, 透皮吸收后经皮下毛细血管、淋巴管进入体液循环, 无需口服或静脉点滴注射, 避免了口服给药可能发生的肝脏首过效应和药物在胃肠道降解或肌肉注射、点滴给药的繁琐, 具有无创伤性给药、使用方便、缓释药物、维持血药浓度持续时间长等优点。所述贴剂由以下三部分组成: 1、背衬层; 2、含药的胶粘骨架层; 3、防粘层。背衬层包括但不限于无纺布、弹力布、普通布、纸、聚氯乙烯膜、聚乙烯膜、聚丙烯膜、多层复合铝箔。防粘层可以包括但不限于硅化纸、聚乙烯膜、聚四氟乙烯膜、聚丙烯膜、聚苯乙烯膜、聚碳酸酯膜, 也可以使用表面用石蜡或甲基硅油处理过的光滑厚纸。含药的胶粘层的聚合物骨架可以

是聚异丁烯橡胶、硅橡胶、丙烯酸酯、聚丙烯酸树脂，骨架层中可加入增塑剂，增塑剂包括但不限于矿物油、癸二酸二乙酯、邻苯二甲酸乙二醇酯，琥珀酸或是他们的混合物。骨架层可以加入增粘剂，增粘剂包括但不限于多元有机酸、萜烯树脂、改性松香，或他们的混合物。骨架层还可以加入药物透皮吸收促进剂，药物透皮吸收促进剂包括但不限于油酸、月桂氮卓酮、桉叶油、 α -松油醇、薄荷油，乙醇、丙二醇，或他们的混合物。聚合物骨架层药物的含量范围为0.1%-20%。

当口服用药时，本发明药物爱诺宁可制成任意口服可接受的制剂形式，包括但不限于片剂、胶囊。其中，片剂一般使用的载体包括乳糖和玉米淀粉，也可加入润滑剂如硬脂酸镁。胶囊剂一般使用的稀释剂包括乳糖和干燥玉米淀粉。

当直肠用药时，本发明药物爱诺宁一般可制成栓剂，其通过药物与一种适宜的非刺激性赋形剂混合而制得。该赋形剂室温下呈固态，在直肠中融化释放出药物。赋形剂包括可可脂、蜂蜡、聚乙二醇和他们与羊毛脂的混合物。

当皮肤局部用药时，本发明药物爱诺宁可制成适当的软膏或霜剂的形式，药物溶解于一种或多种载体中。软膏剂可使用的载体包括但不限于：矿物油，凡士林，丙二醇，聚氧化乙烯、聚氧化丙烯乳化蜡；霜剂可使用的载体包括但不限于矿物油，脱水山梨糖醇单硬脂酸酯，吐温-60，吐温-80，十六烷酯蜡和水。

本发明药物爱诺宁还可以注射剂形式用药，包括含药脂肪乳剂。脂肪乳剂的载体可以是含10%或20%大豆油、卵磷脂、甘油和水乳化制得的脂肪乳。

本发明药物爱诺宁使用剂量和使用方法取决于诸多因素，包括患者的年龄、性别、体重、健康状况、病种及严重程度。优选的使用剂量介于0.2-200ug/kg/天。

具体实施方式

以下列举具体实施例对本发明进行说明。需要指出的是，实施例只用于对本发明作进一步说明，不代表本发明的保护范围，其他人根据本发明的提示做出的非本质的修改和调整，仍属于本发明的保护范围。

实施例 1

番荔枝种子总内酯的制备：取事先洗净、晾干的番荔枝种子 4kg，粉碎成粗粉，置于预先加入 95%-98%酒精 6000ml 的渗滤器中，浸泡，时间可根据外界气温变化调整。通常为 48 小时后开始放出渗滤液，收集、合并渗滤液约 12000ml。减压回收溶剂至残余物中无酒精，稍冷，加入石油醚 1000ml 溶解、放置，除去析

出的棕黑色块状沉淀物；加入水 500ml 以除去其中少量的皂甙。石油醚层浓缩、回收，得到番荔枝种子的粗内酯，粗内酯中含有大量无内酯环和四氢呋喃环结构，生物活性很低的番荔枝内酯的生源前体化合物。粗内酯加入 85%酒精 1000ml 溶解、提取，放出酒精层后，上层油脂层继续用 85%酒精 1000ml 提取，共三次。合并酒精层，回收至无酒精为止，放置、干燥，得到番荔枝种子的总内酯 150g。

实施例 2

番荔枝种子总内酯的制备：洗净、晾干的番荔枝种子 4kg，粉碎成粗粉，置于预先加入丙酮-水 (V/V, 90:10) 混合液 6000ml 的渗滤器中，浸泡，时间可根据气温变化调整。通常 48 小时后开始放出渗滤液，收集、合并渗滤液约 12000ml，减压回收溶剂至无丙酮，放置，除去析出的黑色块状物，加入石油醚 1000ml，除去水层后，减压回收至无石油醚蒸出为止，得到番荔枝种子的粗内酯。粗内酯用 85%酒精 1000ml 溶解、提取，共三次，合并酒精层，回收至无酒精为止，放置、干燥，得到番荔枝种子的总内酯 148g。

实施例 3

番荔枝内酯有效部位的制备：番荔枝种子的总内酯中，仍然含有大量活性低的单四氢呋喃型的番荔枝内酯及番荔枝内酯在植物体内的次生降解产物，必需除去。由实施例 1 的 4kg 原料所得到的总内酯 150g，与 200-300 目硅胶 225g 充分拌和、晾干；另取 200-300 目硅胶 375g 干法装柱，拌样硅胶置于柱顶。顺次用丙酮-石油醚 V/V (ml 数) 的混合液：5:95(5000ml)，7:93(10000ml)，10:90 (10000ml)，12:88(10000ml)，15:85(10000ml)，20:80(5000ml)，30:70(5000ml) 洗脱，每份接收 1000ml。用 TCL 指导合并含有布拉他辛、史可莫辛的馏份（第 20-37 份），得到番荔枝内酯有效部位 40.5g。

实施例 4

番荔枝内酯有效部位的制备：由实施例 2 的 4kg 原料所得到的总内酯 148g，与 200-300 目硅胶 222g 拌和、晾干；另取 200-300 目硅胶 370g 干法装柱，拌样硅胶置于柱顶。顺次用丙酮-石油醚 V/V (ml 数) 混合液：5:95 (5000ml)，7:93(10000ml)，10:90(10000ml)，12:88(10000ml)，15:85(10000ml)，20:80(5000

ml), 30:70(5000ml)洗脱, 每份接收 1000ml。用 TCL 指导合并含有布拉他辛、史可莫辛的馏份(第 21-39 份), 得到番荔枝内酯有效部位 41.7g。

实施例 5

番荔枝内酯高效部位药-爱诺宁的制备: 所得到的番荔枝内酯有效部位仍然含有一些单四氢呋喃环型及一些由不饱和内酯环异构化为饱和内酯环的双四氢呋喃环型番荔枝内酯。他们的生物活性相对较低。由实施例 3 得到的番荔枝内酯有效部位 40.5g, 取 15g 用甲醇-水(83:17)300ml 溶解, 用 C_{18} 填料柱加压分离, C_{18} 填料柱内径×长度为 70×920mm, C_{18} 填料的粒径为 40-63 μ m, 用甲醇-水(83:17)洗脱, UV 检测(波长 220nm)指导收集所需馏分, 减压蒸除溶剂, 干燥, 得到番荔枝内酯高效部位药-爱诺宁 8.2g, 高生物活性成分布拉他辛和史可莫辛的含量 92.33%。

实施例 6

番荔枝内酯高效部位药-爱诺宁的制备: 由实施例 4 得到的番荔枝内酯有效部位 41.7g, 取 15g 用甲醇-水(83:17)300ml 溶解, C_{18} 填料柱加压分离, C_{18} 填料柱内径 X 长度为 70X920mm, C_{18} 填料的粒径为 40-63 μ m, 用甲醇-水(83:17)洗脱, UV 检测(波长 220nm)指导收集所需馏份, 减压蒸除溶剂, 干燥, 得到番荔枝内酯高效部位药-爱诺宁 8.25g, 布拉他辛和史可莫辛的含量 90.52%。

实施例 7

本发明番荔枝内酯高效部位药-爱诺宁抗肿瘤药理试验:

(1) 爱诺宁对人癌细胞株的体外抑制作用

爱诺宁体外对人肺癌细胞株(A549)、结肠癌细胞株(HT-29)、乳腺癌细胞株(MCF-7)、肝癌细胞株(Bel)进行了抑制作用试验, 结果如下:

表一 对 4 种人癌细胞株的体外抑制作用

细胞株	爱诺宁 IC ₅₀ (ug/ml)	阿酶素 IC ₅₀ (ug/ml)
A549	5.4×10^{-4}	7.1×10^{-3}
HT-29	3.7×10^{-4}	6.5×10^{-3}
MCF-7	2.8×10^{-3}	>10
Bel	1.8×10^{-4}	4.9×10^{-2}

结果表明, 本发明的番荔枝内酯高效部位药-爱诺宁对人癌细胞株的体外抑

制作用比阳性对照药阿霉素强。

(2) 小鼠急性毒性试验

小鼠急性毒性试验，KM 品系小鼠，以 Bliss 法计算 LD₅₀ 和 95%可信限为：

肌肉注射：LD₅₀=0.5832 (0.5134-0.6753) mg/kg

腹腔注射：LD₅₀= 0.295 (0.253-0.368) mg/kg

(3) 爱诺宁对小鼠移植性肿瘤的抑制作用

爱诺宁（乳剂）采用腹腔注射（ip）给药，以小鼠肝癌（HepS）和小鼠肉瘤（S-180）两种移植性肿瘤进行体内抑制肿瘤试验。爱诺宁设 3 个剂量组，对照为脂肪乳，阳性药物对照为环磷酰胺（CTX），给药时间 10 天，结果见表 2 和 3。各剂量组未见死亡，也未见消瘦、腹泻、松毛等毒性表现。

表二 爱诺宁腹腔注射对小鼠移植性肝癌 HepS 的抑制作用

组别	给药剂量 mg/(kg. d)	给药时间(d)	平均抑瘤率 ($\bar{x} \pm s$)/%	P 值
CTX	18	10	43.95 ± 3.39	< 0.01
低剂量组	0.015	10	37.78 ± 9.57	< 0.05
中剂量组	0.03	10	51.53 ± 5.35	< 0.01
高剂量组	0.06	10	55.11 ± 5.59	< 0.01

表三 爱诺宁腹腔注射对移植性小鼠肉瘤 S-180 的抑制作用

组别	给药剂量 mg/(kg. d)	给药时间(d)	平均抑瘤率 ($\bar{x} \pm s$)/%	P 值
CTX	18	10	58.43 ± 4.08	< 0.01
低剂量组	0.015	10	41.26 ± 2.53	< 0.01
中剂量组	0.03	10	52.7 ± 3.27	< 0.01
高剂量组	0.06	10	57.42 ± 3.63	< 0.01

实施例 8

爱诺宁抗 SIV 细胞培养试验：爱诺宁用无水乙醇配制成 1ug/ml 的原药液，用注射用水稀释成 10⁻²ug/ml 药液，再用培养液作系列稀释，CEMx174 细胞共同培养 3-5 天，选取对细胞基本无毒的浓度进行试验。正式试验：药物系列稀释，与 SIVmac 和 CEMx174 细胞共同培养 3 天换同等稀释度药物培养液 1 次，6 天记录细胞病变（CPE），培养上清作系列病毒滴定，细胞涂片作荧光抗原细胞计数。同样作 AZT 阳性对照药（2uM）和 SIVmac 病毒对照。

结果判定标准：以荧光阳性细胞抑制率、病毒产量下降 log₂ 的倍数（均与 SIVmac 比较）和细胞病变程度互相参考判定。

病毒对照空荧光细胞数—加药孔荧光细胞数

抗原细胞抑制率 (%) = -----X 100%

病毒对照孔荧光细胞数

表四 爱诺宁抗 SIV 细胞培养试验结果

原始浓度	稀释度	细胞毒性	抗原细胞抑制率 (%)	病毒滴度下降 log ₂	细胞病变 (CPE)	结果判定
1ug/ml	10 ⁻⁵	+	94.3	2 ⁸	—	高度抑制
	10 ⁻⁶	+	53.9	2 ⁵	+	中度抑制
	10 ⁻⁷	—	20.0	2 ⁰	+++	无抑制
AZT	2uM	—	94.1	2 ⁷	+	高度抑制

爱诺宁在药物浓度只有 10⁻⁵ug/ml 时对抗原细胞的抑制率与 AZT 2uM 时相当。显示其抑制作用远远超过 AZT。

实施例 9

爱诺宁抗急性 SIV 感染猴体内试验

药物：含爱诺宁脂肪乳 (5ug/ml)。空白对照：10%脂肪乳。阳性对照：AZT。

恒河猴：12 只，5-6kg/只，4-8 岁外观健康，体检无浅表淋巴结肿大，血清学检测 SIV、SRV 和 STLV 病毒抗体阴性，结核菌阴性、痢疾菌阴性。设爱诺宁低、高剂量组、AZT 组和病毒对照组，每组各 3 只。用 SIVmac251 病毒液 5MID₁₀₀ (5 个 100%猴感染剂量) 静脉注射感染。

治疗试验：猴感染 1 小时后给药，低剂量组 3ug/只/次，高剂量组 9ug/只/次，腹腔注射，日 2 次，连用 8 周。AZT 组：200mg/只/天，口服，连用 4 周。停药后各组观察至 105 天。试验猴的血浆病毒和全血病毒滴度检查结果见表五和六。

表五 各组猴感染 (治疗) 后血浆病毒滴度 (TCID₅₀/ml)

组别	猴号	7 天	10 天	14 天	17 天	21 天	28 天	42 天	56 天	79 天	105 天
低剂量	1	5	25	5	5	625	125	—	—	—	—
	2	—	5	25	625	5	—	—	—	—	—
	3	—	5	625	25	625	—	—	—	—	—
高剂量	4	—	5	625	3125	5	—	—	—	—	—
	5	—	25	125	5	25	—	—	—	—	—
	6	5	—	125	25	25	—	—	—	—	—
AZT 组	7	—	—	125	5	—	125	—	—	—	—
	8	—	—	25	625	—	5	5	—	—	—
	9	—	5	25	15625	—	—	5	5	5	5
对照组	10	—	125	3125	125	625	625	125	5	25	5
	11	5	3125	3125	3125	25	5	5	—	5	—
	12	—	5	125	125	5	—	—	—	—	—

表六 各组猴感染治疗后全血病毒滴度 (TCID/ml)

组别	猴号	7天	10天	14天	17天	21天	28天	42天	56天	79天	105天
低剂量	1	625	15625	3125	3125	15625	625	15625	—	—	—
	2	625	15625	3125	3125	125	125	125	—	125	125
	3	625	15625	3125	15625	78125	625	125	—	5	5
高剂量	4	5	15625	15625	3125	3125	125	5	—	125	—
	5	125	15625	625	3125	625	25	5	—	—	—
	6	125	15625	15625	3125	78125	15625	625	125	25	5
AZT组	7	5	3125	15625	78125	625	3125	125	15625	—	—
	8	25	15625	390625	390625	15625	3125	15625	15625	625	25
	9	625	3125	15625	3125	15625	15625	625	125	125	125
对照组	10	625	3125	3125	78125	3125	15625	15625	15625	3125	625
	11	625	3125	625	15625	15625	625	5	625	25	125
	12	625	15625	15625	15625	3125	125	125	3125	—	—

由表五、六可以看出爱诺宁治疗 SIV 感染猴, 无论是血浆病毒滴度还是全血病毒滴度的下降都优于阳性对照药 AZT, 表明爱诺宁在猴体内有确切治疗作用。

实施例 10

爱诺宁的含药脂肪乳剂的制备:

(1) 供体外药效学及小鼠急性毒性试验的含药脂肪乳的制备:

配方: A. 爱诺宁	500mg
B. 注射用大豆油	100g
C. 卵磷脂	25g
D. 甘油	20g
E. 注射用纯净水	加至 1000ml

上述配方中 A 加入 B、C 中热溶解, 再加入 D 和 E 制备初乳后用乳匀机多级乳化, 得到含爱诺宁的脂肪乳剂, 每 ml 含爱诺宁 0.5mg。

(2) 供猴体内试验及人治疗用的含药脂肪乳剂的制备:

配方: A. 爱诺宁	5mg
B. 大豆油	100g
C. 卵磷脂	25g
D. 甘油	20g
E. 注射用纯净水	加至 1000ml

上述配方中 A 加入 B、C 中热溶解, 再加入 D 和 E 制备初乳后用乳匀机多级

乳化，得到含爱诺宁的脂肪乳，每 ml 含爱诺宁 5ug.

实施例 11

爱诺宁缓释透皮贴剂的制备

(1) 以聚丙烯酸树脂压敏胶为骨架的爱诺宁贴剂的制法：取聚丙烯酸树脂 II 1000 重量份，溶于 2000 重量份的乙醇中，加入柠檬酸三乙酯 200 重量份，癸二酸二乙（丁）酯 120 重量份，丙二醇 60 重量份，爱诺宁 8 重量份，使溶解分散均匀，涂布，60°C 下 20 分钟挥发除去溶剂，复合背衬层、防粘层，根据治疗病种所需剂量要求切割成合适大小的贴剂。

(2) 以丙烯酸酯压敏胶为骨架的爱诺宁贴剂的制法：取取固体含量为 30% 的丙烯酸酯压敏胶（乙酸乙酯为溶剂）1000 重量份，加入爱诺宁 2 重量份，癸二酸二乙（丁）酯重量 30 份，改性松香 20 重量份，丙二醇 14 重量份，桉叶油 10 重量份，使溶解分散均匀，涂布，60°C 下 20 分钟挥发除去溶剂，复合背衬层、防粘层，根据剂量要求切割成合适大小的贴剂。

根据实施例 10 制备的爱诺宁的含药脂肪乳，进行了抗 HIV/艾滋病的初步临床试验观察，患者均经两次血清 HIV 初筛阳性，最终经 WB 确认试验证实为 HIV 阳性感染者，病例数 3 人，均为经血液传播感染。用药观察 90 天，剂量：2.5 支/人/次，10ug/2ml/支，日 2 次静脉点滴。治疗期连续用药 6 天，休息 1 天。治疗前 2 人有反复发热，1 人有二月反复腹泻，脓血便，另 1 人也有腹泻。实际上已有相关艾滋病综合征出现。治疗 10 多天后发热、腹泻、脓血便均消失。治疗 90 天一例病毒载量有显著下降，另一例 CD₄ T 细胞数显著上升（比治疗前升 140 个/ul,升幅达 70%）。治疗期间无任何不适，三人的血、尿常规等检查均正常，食欲、精神状态良好，有 2 人的体重有明显增加。此外，2 人多年的风湿病、腰腿痛，在用药 10 多天后消失。

根据实施例 11 制备的爱诺宁贴剂，进行了抗 HIV 感染/艾滋病的初步临床试验观察，病例数 30 人，均为经确认试验证实的 HIV 感染者，全部为经静脉血液感染的特殊人群，患者中有无症状期、进展期及艾滋病相关综合征（ARC）期。对这类特殊人群的治疗，患者的依从性是最大的难题，但在用爱诺宁治疗中，除 1 例违法被拘，2 例违反规定除名外，其余 27 人都能够始终配合治疗至试验终止。

试验治疗 150 天，每日用药 2 次，每次 4-6 贴，治疗期间无一人因不良反应中断治疗，用药剂量相当安全的。治疗前：有发热一个月以上的 12 人，用药 1-2 周后恢复正常；水样腹泻 6 人，治疗 10 余天后停止；盗汗 9 人，用药 10 余天后减少或消失；多年肌肉疼痛、全身性疼痛 9 人，用药 1-3 周内症状减轻或消失；皮疹 3 人，用药半月后消退；颈、腹股沟淋巴结肿大 2 人，30-50 天消失；风湿关节痛 5 人，用药一月内疼痛消失，活动自如。此外，记忆力下降，头痛，出现早期认知障碍 4 人，用药后有所改善；进行期寻常型银屑病 1 人，全身皮损严重，需每日注射药物否则全身痒痛难熬，用药后痒止，10 天后皮损开始逐渐消退。患者中原有的乏力、厌食、眠差、全身不适感也都有显著好转。治疗 60 天患者体重增加 2kg 以上者 17 人，其中增加 4kg 2 人，5kg 2 人，8kg 1 人，11.5kg 1 人。部分患者 CD₄ T 细胞数显著上升，其中升幅达 20% 以上的 6 人，最高达 249% (升 831 个/u1)。HIV 感染/艾滋病是免疫功能进行性受损害的疾病，随着病情发展，CD₄ T 细胞数呈下降趋势，如果疾病没用得到控制、HIV 的复制没有被抑制，患者的 CD₄ T 细胞数是不可能出现大幅度增加的。

根据实施例 11 制备的爱诺宁贴剂，进行了抗恶性肿瘤的初步临床试验观察，患者为经细胞学确诊的恶性肿瘤患者，其中非小细胞肺癌 (NSCLC) 25 例，小细胞肺癌 1 例，鼻咽癌 4 例，脑胶质细胞瘤 1 例，恶性淋巴瘤 1 例，皮肤癌 1 例，共 33 例。这些患者大多数都是经三级医院正规放、化疗治疗无效后，抱着试一试的心理参与试验的，其中相当多例有远处 (脑、淋巴、胸膜、脊椎、肋骨、肝等) 甚至全身性广泛转移，有的还出现胸、腹水，已到了终末期。治疗一疗程为 40 天，日用药 1-2 次，每次 4 贴。治疗过程中未见不良反应。NSCLC 25 例中，日用药 2 次，每次 4 贴的有 16 例，治疗后因未留联系方式而无法追踪的 6 例，CT 或 X-光片检查肺原发病灶肿瘤及淋巴转移完全消失的 5 例，用药 10 天死亡 1 例 (其转移淋巴结有所缩小)，其余 4 例都有不同程度的好转，如肿瘤缩小 50% 以上，放射性肺炎、放射性纤维化得到控制和减轻，胸水减少，纵隔淋巴结肿大消失，胸痛减轻或消失，呼吸改善等。日用药 1 次，每次 4 贴的患者 9 例，治疗前原肺叶或段不张 (因此影像学无法确切给出肿瘤大小) 2 例，治疗后肺叶或段部分复张，表明病灶肿瘤有显著缩小；1 例肿瘤缩小 30%，原有中等量胸水完全被吸收；1 例原肿瘤 4X5cm 并有肺段不张，治疗后肿瘤破碎不成形，肺段复张；

1 例肺癌术后发现纵隔淋巴结转移及颅内多发转移，治疗后淋巴结缩小为原 1/4(未作脑 CT 检查)；1 例咳嗽、纳差、痰血，左下肺不张，纤维化，治疗后，咳减少，痰血消失，肺复张，纤维化减轻；1 例被认为已属时日无多、全身转移、疼痛不已卧床不起的患者，在增加剂量后也显著好转，可以活动，疼痛基本无碍生活。其余 2 例也有好转。

此外，还结合用爱诺宁的片剂治疗食管癌 8 例，贲门癌 1 例，治愈（肿瘤消失）4 例，好转（肿瘤缩小，阻塞食道开通）2 例，无效 3 例（食道阻塞太长，患者无法进食时间太久）。其余病种的病例太少，不作介绍。

布拉他辛、史可莫辛等番荔枝内酯类化合物的作用机制是阻断线粒体呼吸链的电子转移，从而抑制细胞内的 ATP 的合成。根据这一机理，申请人在九十年代初提出：番荔枝内酯类化合物阻断肿瘤细胞/被 HIV 感染的细胞内的 ATP 的合成，随着 ATP 不断被消耗，细胞内的 H^+ 不断累积，细胞的 Phi 下降，使细胞内依赖于 H^+ 、 Ca^{++} 浓度的核酸内切酶、蛋白酶被激活，从而诱导肿瘤细胞/被 HIV 感染的细胞走向凋亡。申请人的这一设想也被后来的试验所证实（《癌症》2000 年 19 卷 12 期 P1098-1100）。众所周知，在细胞凋亡启动后，细胞的核酸内切酶、蛋白酶被激活，并将细胞和病毒的 DNA、RNA、蛋白质一一降解，产生比原有 DNA、RNA 数目多几千倍的 DNA、RNA、蛋白质的片断，结果肿瘤不断缩小、消失。细胞凋亡不同于细胞坏死死亡，不会产生毒素，患者不会出现肿瘤热等反应。根据何大一教授等提出的 HIV 感染 CD_4 T 细胞数动力学，HIV 进入靶细胞后复制子病毒，约需要 1-1.5 天的时间才会有新一代病毒出芽形成具有感染能力的子代病毒，而没有经过获取细胞的胞膜出芽的 HIV-RNA、蛋白质和酶，对细胞没有感染能力。由布拉他辛、史可莫辛诱导细胞凋亡试验，药物作用后的 6 小时在琼脂凝胶电泳中就可以观察到 DNA 降解形成的典型的梯形带。HIV 进入靶细胞后需要 1-1.5 天时间才开始释放子代病毒，这个时间极为宝贵，他使药物有充分的时间诱导被 HIV 感染的细胞凋亡和清除 HIV-RNA。爱诺宁使 HIV 的 DNA、RNA 和蛋白质被切割成数目众多的碎片，这些碎片都可以被目前检测 HIV 的 RNA 和 HIV 的蛋白质（如 P24）的方法检测出来，即这些没有感染能力的碎片都会被当成 HIV 粒子来对待。因此，沿用目前的检测方法可能不适用于这类诱导被感染细胞凋亡、清除体内病毒的药物。从前述爱诺宁的含药脂肪乳及爱诺宁贴剂治疗 HIV 感染/艾滋病的初

步临床试验观察可以看出,爱诺宁同时具有抗病毒疗法的药物可以降低 HIV 病毒载量,又具有中医药治疗 HIV 感染/艾滋病的长处—改善患者的临床症状和生存质量。此外,爱诺宁与目前中、西医药疗法治疗 HIV 感染/艾滋病相比较,还具有以下优势:1,爱诺宁不参与 DNA、RNA、蛋白质的转录、合成,不会导致组织细胞 DNA、RNA、蛋白质结构的变异或改变。2,药物的靶点不是病毒粒子或其酶系,因此病毒无法通过变异来逃避药物清除或对抗药物的作用;药物对 HIV 的不同亚型、变异毒株、抗药性毒株都将有效。3,药物进入体内的剂量是微克级,在猴体内、人体内的试验未见任何不良反应,疗效卓著。4,药物具有高脂溶性,很容易通过淋巴循环进入淋巴结等淋巴器官,有利于清除隐匿在淋巴器官中的 HIV。5,爱诺宁适用于早期、无症状 HIV 感染及已出现艾滋病相关综合征的患者,可以让大多数的患者得到及时治疗。6,特别是爱脑宁的贴剂,无须口服、注射给药,患者完全可以在家治疗,可以节约大量的人力,物力。7,患者的依从性高,特别适合艾滋儿童治疗。8、药物诱导被 HIV 感染的细胞凋亡,在凋亡过程中,已整合到细胞染色体内的 HIV-DNA 及 RNA 都被核酸内切酶降解,清除,因此,爱诺宁有可能清除患者体内的 HIV,治愈患者。