

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510074335.9

[51] Int. Cl.

C07C 43/253 (2006.01)

C07C 43/235 (2006.01)

C07C 69/035 (2006.01)

C07C 39/12 (2006.01)

A61K 31/085 (2006.01)

A61K 31/22 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 8 月 27 日

[11] 授权公告号 CN 100413835C

[51] Int. Cl. (续)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

[22] 申请日 1995.9.22

[21] 申请号 200510074335.9

分案原申请号 95196035.0

[30] 优先权

[32] 1994.9.30 [33] US [31] 08/316,341

[73] 专利权人 约翰斯·霍普金斯大学

地址 美国马里兰

[72] 发明人 R·C·黄 J·N·格纳布里

[56] 参考文献

WO-8803026 A1 1988.5.5

审查员 杨永明

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 李 瑛

权利要求书 3 页 说明书 19 页 附图 8 页

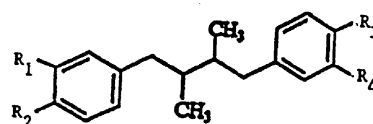
[54] 发明名称

抑制 HIV TAT 反式激活作用的化合物

[57] 摘要

本发明揭示了从杂酚油木 *Larrea tridentata* 分离、纯化及鉴别具有结构式 (I) 的一组化合物。在结构式中, R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 分别选自 $HO-$ 、 CH_3O- 和 $CH_3(C=O)O-$ 基团, 并且 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 不同时都是 $HO-$ 基团。每一种化合物都是 1, 4-双-(3, 4-二羟基苯)-2, 3-二甲基丁烷(去甲二氢愈创木酸, NDGA) 的衍生物。此外, 将 NDGA 或其衍生物加入到细胞中, NDGA 和其衍生物均可以抑制细胞内的包括 HIV 在内的慢病毒的 Tat 反式激活作用。

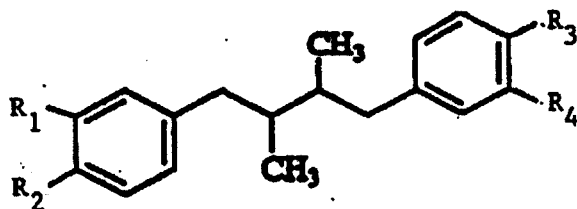
(I)



1. NDGA 在制备用于抑制慢病毒在细胞中的 Tat 反式激活作用的药物中的用途。

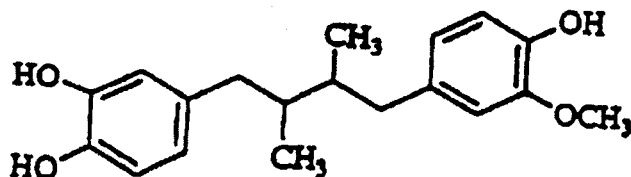
2. NDGA 在制备用于治疗 HIV 的药物中的用途。

3. 下式的化合物在制备用于治疗 HIV 的药物中的用途：

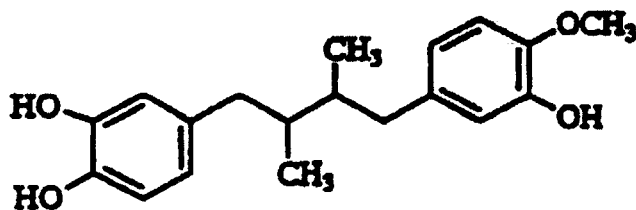


其中， R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 分别选自 $-OH$ 、 $-OCH_3$ 、 $-O(C=O)CH_3$ ，并且 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 不能同时是 $-OH$ 。

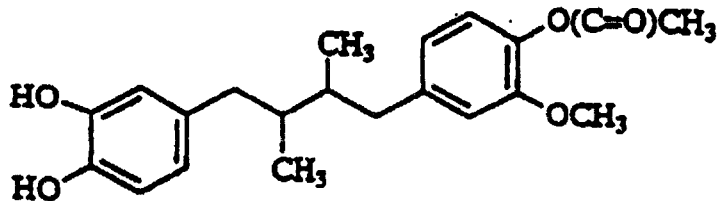
4. 根据权利要求 3 的用途，其中， R_1 和 R_2 和 R_3 均为 $-OH$ ，且 R_4 是 $-OCH_3$ ，该化合物结构式如下：



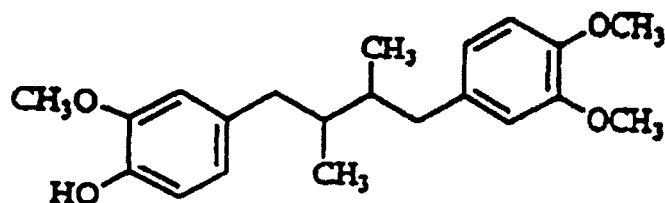
5. 根据权利要求 3 的用途，其中， R_1 和 R_2 和 R_4 均为 $-OH$ ，且 R_3 是 $-OCH_3$ ，该化合物结构式如下：



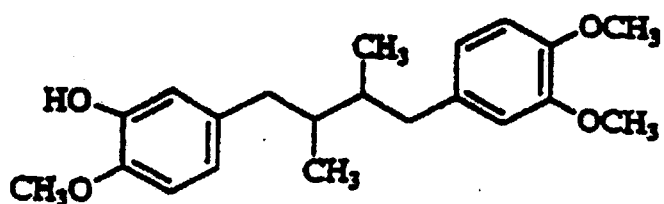
6. 根据权利要求 3 的用途，其中， R_1 和 R_2 是 $-OH$ ，且 R_3 是 $-O(C=O)CH_3$ ，且 R_4 是 $-OCH_3$ ，该化合物结构式如下：



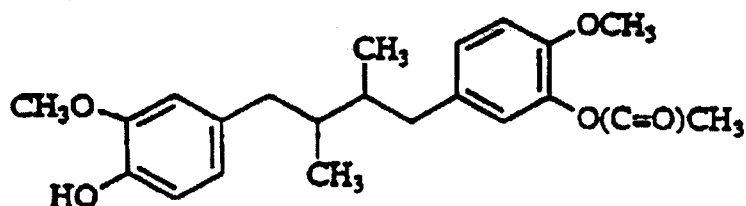
7. 根据权利要求3的用途, 其中, R_1 、 R_3 和 R_4 均为 $-OCH_3$, 且 R_2 是 $-OH$, 该化合物结构式如下:



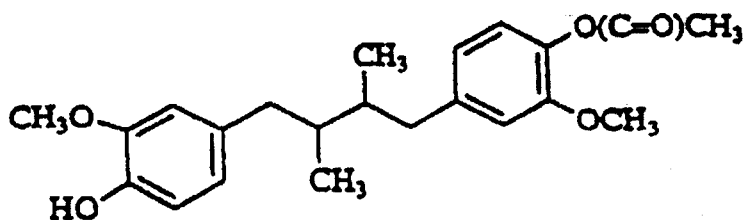
8. 根据权利要求3的用途, 其中, R_1 是 $-OH$, 且 R_2 、 R_3 和 R_4 均为 $-OCH_3$, 该化合物结构式如下:



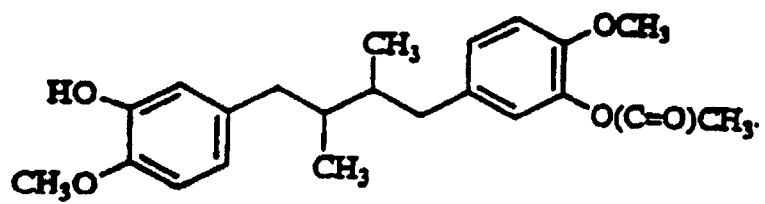
9. 根据权利要求3的用途, 其中, R_1 和 R_3 是 $-OCH_3$, R_2 是 $-OH$, 且 R_4 是 $-O(C=O)CH_3$, 该化合物结构式如下:



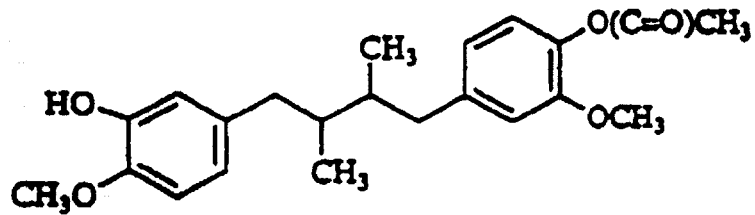
10. 根据权利要求3的用途, 其中, R_1 和 R_4 是 $-OCH_3$, R_2 是 $-OH$, 且 R_3 是 $-O(C=O)CH_3$, 该化合物结构式如下:



11. 根据权利要求3的用途, 其中, R_1 是 $-OH$, R_2 和 R_3 是 $-OCH_3$, 且 R_4 是 $-O(C=O)CH_3$, 该化合物结构式如下:



12. 根据权利要求 3 的用途, 其中, R_1 是 $-OH$, R_2 和 R_4 是 $-OCH_3$, 且 R_3 是 $-O(C=O)CH_3$, 该化合物结构式如下:



抑制 HIV TAT 反式激活作用的化合物

本案是分案申请，母案申请号为 95196035.0（国际申请号 PCT/US95/11779），申请日为 1995 年 9 月 22 日，发明名称“抑制 HIV TAT 反式激活作用的化合物”。

本发明背景

1. 本发明领域

本发明涉及 1, 4-双-(3, 4-二羟基苯)-2, 3-二甲基丁烷（去甲二氢愈创木酸，NDGA）的衍生物的分离、纯化和鉴别的方法。这些衍生物来源于杂酚油木（*Larrea tridentata*, *Zygophyllaceae*）叶片及花的分离和提取，它们与 NDGA 一起可以抑制包括 HIV 病毒的慢病毒中 Tat 的反式激活作用。

2. 相关技术

Tat 是人类免疫缺损病毒（HIV）基因表达的一个反式激活蛋白。在 HIV 基因表达中，Tat 是必不可少的两个或更多的病毒调节因子之一（Tat and Rev）。Tat 的作用是与 TAR RNA 结合，并从长末端重复（LTR）启动子方向激活转录反应。

Tat 蛋白质使转录反应的延长得以稳定，并且也已经证明 Tat 蛋白质参与了转录反应的启动。前人的许多研究证明 Tat 调控与抗体相关的 T 细胞增生的减少，对免疫反应的失败具有重大作用。Tat 还直接刺激卡波济细胞（Kaposi's cell）的生长。

由于 Tat 没有明显的细胞同源物并且它是一个很重要的阳性调节因子，因此 Tat 已成为人们开发抗爱滋病（AIDS）药物的一个很有吸引力的目标（见图 1）。另一方面，与现在也得到一些 HIV 反转录酶的抑制物（AZT, DDT）或防止再次感染的潜在的蛋白酶抑制物相比，抑制病毒基因 Tat 调控的整合前病毒 DNA 表达的抑制物将在早期捕捉到病毒（Hsu et al., *Science* 254:1799-1802, 1991）。

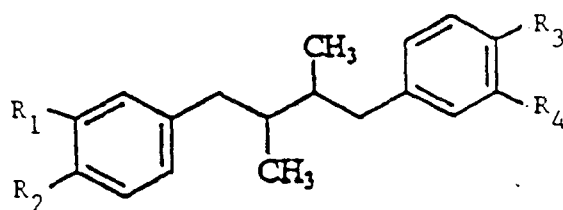
对在真核宿主细胞中转录和后期转录水平上控制基因表达的抑制物的研究，近来使对现 Tat 功能的定量评估成为可能（Sim, Ann. N. Y. Acad. Sci. 616:64-70, 1990）。为了筛选抑制物用于 Tat 调节的反式激活

作用 (Tat-TRS), 抑制物将分泌胎盘碱性磷酸酶 (SEAP) 的识别基因放入质粒 pBC12/HIV/SEAP 并置于 HIV - 1 LTR 启动子的控制之下。Tat 编码活性由另一个质粒 pBC12/CMV/t2 提供。COS 细胞与这两种质粒的短暂共转染, 使得碱性磷酸酶分泌到培养基中, 再用样品色度计分析 (Berger et al., Gene 66:1-10, 1988)。因此, 对 SEAP 的测定, 间接提供了 Tat 反式激活作用的鉴别方法。一个抑制因子应该降低 SEAP 的活性, 其原因可能是由于 Tat 蛋白质 (Tat-TRS) 引起的 HIV - I LTR 启动子的反式激活作用抑制了 SEAP mRNA 表达的结果。

本发明概述

在本发明申请中, 我们发现沙漠植物杂酚油木 (*Larrea tridentata*) 对 Tat-TRS 有抑制活性。在从热带雨林和被传统用于抗病毒感染的沙漠药用植物中所提取的几种植物成份中, 只有杂酚油木 (*Larrea tridentata*) 的叶和花的全部提取物对 Tat-TRS 有抑制作用。对慢性感染了 HIV 病毒的人成淋巴细胞, 这种提取物也可以抑制 HIV 细胞病理作用, 这一作用可以用新发现的可溶甲脂方法测定 (Weislow et al., JNCI 81:577-586, 1989)。

本发明所涉及的化合物具下述结构式:



其中 R_1 , R_2 , R_3 和 R_4 分别选自 $\text{HO}-$ 、 $\text{CH}_3\text{O}-$ 和 $\text{CH}_3(\text{C}=\text{O})\text{O}-$ 基团, 并且 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 不同时是 $\text{HO}-$ 基团。

每种化合物都是从杂酚油木的叶与花分离提取而来, 并且每种化合物都是 1, 4-双-(3, 4-二羟基苯)-2, 3-二甲基丁烷 (去甲二氢愈创木酸, NDGA) 的衍生物。

除此以外, 将 NDGA 或一种其衍生物给予细胞, NDGA 和每一种其衍生物可以抑制包括 HIV 在内的慢病毒的 Tat 反式激活作用。

附图说明

图 1 图解说明 HIV - 1 的生活史, 以及包括 Tat-TRS 抑制物在内

的可能性治疗物的不同作用位点。1 表示转录步骤, 2 表示病毒调节性的蛋白依赖性反式激活步骤。

图 2 表示在标准 SEAP 测定中诱导出的分泌碱性磷酸酶的水平。

图 3 表示在分泌碱性磷酸酶 (SEAP) 测定中, 杂酚油木叶花提取物对 Tat-TRS 的抑制活性。

图 4 表示以分析用不易损坏的毛细管交联 5% 苯甲基硅氧烷 (HP-5) 柱子的气相色谱 (GC) 方法, 分析在组分 Lo 中植物衍生的 HIV Tat 抑制物质。组分 Lo 是四种成份的混合物。各洗脱时间 (分钟) 表示在峰顶上。

图 5 表示以分析用不易损坏的毛细管交联 5% 苯甲基硅氧烷 (HP-5) 柱子的气相色谱 (GC) 方法, 分析在组分 Gr 中植物衍生物的 HIV Tat 抑制物质。组分 Gr 是一复合混合物。每一成份被洗脱下的时间 (分钟) 标在峰顶上。

图 6 表示植物衍生物中单一化合物 Malachi 4:5-6 (Mal4) 对 Tat 诱导的 SEAP 表达水平的抑制以及 NOGA 在分泌的碱性磷酸酶 (SEAP) 测定中的水平。

图 7 描述在分别两个实验中, 用 Mal4 分别处理感染了 HIV 和没有感染上 HIV 的 CEM-SS 细胞, 用 XTT 甲脂的产生进行定量用以衡量活细胞。在实验 1 中, 未经 Mal4 处理的感染了 HIV 的细胞中 XTT 甲脂的产生是 8.9%, 在实验 2 中是 7.5%。在实验 1 中, 未感染 HIV 的细胞用 · - · 表示, 感染的细胞用 × - × 表示。在实验 2 中, 未感染的细胞用 · ... · 表示, 感染的细胞用 × ... × 表示。EC₅₀ 是 4.25 μg/ml 或 13.4 μM。IC₅₀ 估计为 100 μg/ml 或 325 μM。

图 8 表示杂酚油木 NDGA 衍生物的逆流色谱 (CCC) 和分级分离过程。

最佳实施例

本发明揭示 1, 4-双-(3, 4-二羟基苯)-2, 3-二甲基丁烷或去甲二氢愈创木酸 (NDGA) 的衍生物的分离、纯化和鉴别的方法。根据下面的各种方法, 分离、纯化和鉴别 NDGA 的每一种衍生物。
材料和方法

细胞系: 在补充加入 10% 小牛胎儿血清 (FCS) 和抗菌素的 Isocove 修改过的 Dulbecco 培养基中 (Isocove's Modified Dulbecco's

Medium) (IMDM), 培养带有 SV40 原始复制段的 COS - 7 细胞。将细胞放在 37 °C, 湿润的加有 95 % O₂/5% CO₂ 的温箱中培养。

质粒: 质粒 pBC12/HIV SEAP 包含 Tat 敏感的 HIV LTR 启动子与 SEAP 识别基因, 但不具备 Tat 编码的功能, 用这种质粒表达 SEAP 的基本活性; 质粒 pBC12/CMV/t2 提供 Tat 编码的功能, 如诱发 SEAP。质粒 pBC12/RSV/SEAP 包括构造的禽内瘤病毒 (RSV) 的 Tat 非敏感的 LTR 启动子, 作为阳性对照。上述所有质粒来自杜克医学中心 (Duke Medical Center) 的 Bryan Cullen 博士。质粒 pSEAP 和 pBKCMV, 以及 HIVLTR 和 Tat DNA 购于 Clontech 和 Stratagene 公司。用大肠杆菌 (E.coli) MC1061 菌株完成质粒的转换, 该菌株来自耶鲁大学 (Yale University), 生物系的 Barbara Bachmann 博士。大肠杆菌 MC1061 菌株也可从 Clontech 公司购买到。使用 Qiagen[®] 提纯盒 (Qiagen 公司) 纯化所有质粒 DNA。

化学试剂: 二乙醇胺 (# 31589) 和 P - 硝基苯磷酸酯 (# 71768) 购于 Fluka Biochemika 公司, L - 高精氨酸 (# H - 1007) 购于 Sigma Co. 公司。脂精胺 DOGS (Transfectam[®], #E123A, Promega) 用于 DNA 转染的研究。

植物试验材料: 根据医学药理学的要求, 采集杂酚油木的叶片和花。干燥植物材料并用一个带有 3mm 筛孔的 Willy 研磨机研磨。在试验性的研究中, 用 1g 这种植物粉末, 加入氯仿: 甲醇溶液连续浸泡并提取。提取物被浓缩至残留物。所得到的总重量是 176mg 的粗提物用 3ml 己醇处理 7 次。该步骤产生 137mg 不溶于己醇的物质 (HI) 和 31mg 可溶于己醇的物质 (HS)。所有这些提取按步骤被 SiO₂ TLC 与硫酸铈炭化法检验 2 % CeSO₄ (W/V) 于 5.6 % H₂SO₄ (V/V) 中, 并用 SEAP 测定抗 Tat - TRS 的活性。

对于 SEAP 测定法, 被测试的材料溶解在以无钙/镁离子的 PBS 制备的 10 % DMSO 溶液中。离心悬浮液, 并用 Millex[®] - GS 22µm (Millipore) 的无菌过滤器过滤原液 (10mg/ml)。适当稀释原液, 使最终 DMSO 在 PBS 中的浓度为 0.2 %, 以得到各种浓度的测试化合物。

应用逆流色谱法 (CCC) 进行不同的分级分离以及活性成份的纯

化：基于上述 SEAP 检测的分馏初步结果，用 CCC 方法进一步分级分离 HI 中的活性成份。因而得到被认为具有活性的两种主要活性馏份，定为“绿色”和“黄色”组分。上述识别出主要活性组分的研究，促进了为得到大量的绿色和黄色组分物，而对大量的植物碎末材料进行全面的分级分离。这种分级分离采用了 101.4g 的植物碎末，并用己醇处理作为开始，如表 1 所述。

利用逆流液体-液体分配色谱法，使用如 Ito 和 Conway (CRC. Critical Reviews of Analytical Chemistry 17:65 et seq; 1986) 所描述的万能横轴行星式离心机 (CPC) 对氯仿：水提取后所得到有机相的主要化合物进一步分级分离。最佳溶剂体系是己醇：EtOAc: MeOH:0.5% NaCl 的混合物，它们之间的比例为 6:4:5:5，溶剂上层（有机层）为流动相。5g 有机分离的溶解到 23ml 具有两相的混合溶剂中，并使其通过回路阀放入到蛇形管中。当转速为 800rpm 时，流动相经蛇形管泵出。在流速大约为每分钟 4ml 时，固定相约损失 32%（保留下 68%）。流动相进入流出液后，收集流动相的分离物，并将其蒸发至干燥，用 TLC 检测，并相应地将其合并为五批：流头 (SF)，绿色 (Gr)，黄色 (Ye)，红色和固定相 (Stp)。然后所有这些分离物用 SEAP 方法来测定抗 Tat-TRS 的活性。

利用 CCC 方法，使用一个行星蛇形管式离心机，该离心机也称作 Ito 多层蛇形管分离-提取器 (Ito and Conway, CRC. Critical Reviews of Analytical Chemistry 17:65 et seq, 1986) 对上述所得的绿色和黄色分离物进一步纯化。溶剂是己醇：EtOAc:MeOH:0.5% NaCl 混合物 (7:3:5:5)。200mg 绿色分离物纯化出 6.8mg 被称作 Gr 的成份，总产量大约是原始植物碎末的 0.051%。用类似的方法，从黄色分离物中可纯化出 9.3mg 被称作 Lo 的成份。这些被提纯了的成份 (Lo 和 Gr) 各自都由几种化合物组成。纯化的 Lo 和 Gr 作为“原”分离物，在测定其生物活性和用于更进一步的特征研究前，将它们保存在 4℃ 条件下。

细胞培养和 DNA 转染: COS 细胞培养在如前所述的培养基中 (Cullen, Cell 46:973-982,1986)。应用经过修改的脂精胺 (Transfectam[®], Promega # E123A) 方法, 进行 DNA 转染, 该方法最早在其它地方描述过 (Loeffler and Behr, Methods in Enzymology 217:599-618, 1993)。简单地说, DNA 转染前一天, 直径为 17mm 的平底培养平板的 Linbro[®]24 孔, 以 0.5ml 的 0.1 % 明胶无菌液预处理。该平板在无菌通风罩内放置 1 小时 (除特别指出以外, 所有转染步骤均在无菌通风罩内进行)。明胶溶液被吸出后, 用 0.5ml 补充加入 10 % 小牛胎盘血清和抗菌素 (完全培养基) 的 IMDM 培养液冲洗平板。COS 细胞以每一个 17mm 板大约 1.5×10^5 个细胞的密度接种, 并在 37 °C, 湿润的, 95 % O₂/5% CO₂ 的培养箱中培养。当 30 - 50 % 的细胞融合时, 进行 DNA 转染。按照生产厂家的建议, 将 Transfectam 制剂, DOGS 配制成在 10 % 的乙醇蒸馏水中的浓度为 1mg/0.380ml (2.38mg/ml or 3.4mM)。

在无菌试管中加入两种溶液组成的转染制剂:

a) 溶液 A 中含有 150mM 无菌 NaCl 溶液十质粒 DNAs (非选择性 / 选择性基团的比例为 2:1) : 每孔加入 0.35 μ g 的 pBC12/HIV/SEAP+0.175 μ g 的 pBC12/CMB/t2 (对 Tat 功能编码)。

b) 溶液 B 含有等体积的 150mM NaCl 和 Transfectam[®]制剂, 该制剂为 DNA 总量的 6 倍。将溶液 A 和 B 各自均化并立刻混合。

反应进行十分钟。同时, 将生长培养基从亚融合的 COS 细胞中除去, 并加 300 μ l (100 μ l 完全 IMDM 培养基 + 200 μ l 未添加血清的培养基) 于每一个孔中。在每一孔中加入相同体积的转染制剂。对照样品孔内不加 DNA, 只加入 150mM 无菌 NaCl 溶液, 其它处理相同。所有样品培养 10 到 12 小时后, 加入 700 μ l 完全培养基。将在 5 % DMSO/无 Ca-Mg 离子 PBS 中制备的测试化合物, 以不同的浓度迅速加入孔内。未经药品处理的对照样中只加入 5 % DMSO/PBS 溶液 (DMSO 最终浓度是 0.2 %)。所有样品再继续培养 48 小时后, 取出 300 μ l 每一培养样品的上清液用作 SEAP 分析。

分泌的碱性磷酸酶 (SEAP) 测定: 按照最初描述的 (Berger et al.,

Gene 66:1-10,1988) 方法进行分泌碱性磷酸酶的分析。简言之,取 250 μ l COS 细胞培养基上清液的等分试样,在 65 $^{\circ}$ C 加热 5 分钟以选择性地使内源磷酸酶失去活性 (SEAP 具热稳定性),在一小型离心机中离心 2 分钟。取 2 $\times$ SEAP 测定缓冲溶液 100 μ l (1.0M 二乙醇胺, pH9.8; 0.5mM MgCl₂; 10mM L-高精氨酸),加入到 100 μ l 的样品等分试样中。二者混合后,转移到一个 96 孔的平底培养盘中 (Corning)。将预先加热的底物溶液 (120mM P-硝基苯磷酸酯溶于 1 $\times$ SEAP 测定缓冲溶液) 20 μ l,用一个多头移液器加到已加好反应混合物的每一个孔中。在 37 $^{\circ}$ C 培养 60 分钟,每 5 分钟用 EL340i 微盘读数仪 (Bio-tek Instruments, Inc.) 在 A405 吸收波下读数,每次读数前自动振动培养盘 5 秒钟。在标准 SEAP 诱导测定中,依据吸收度的改变,以时间为横坐标作图。在筛选药物测定中,在 30 分时 SEAP 表达抑制的百分率计算如下:

$$\% \text{抑制} = 100 - [(CT^+ - C^+) \times 100]$$

其中:

C⁻: 对照样品 (无 DNA, 无药物)

CT⁻: 对照样品 (+ DNA, 无药物)

C⁺: 药物处理的样品 (无 DNA, + 药物)

CT⁺: 药物处理的样品 (+ DNA, + 药物)

最佳的转染技术: 多种多样的技术被应用于真核细胞的 DNA 转染。这些方法包括磷酸钙或阳离子聚合物与 DNA 一同沉淀,以及应用化学的方法 (洗涤剂、溶剂、酶、双嗜性聚合体) 或物理的方法 (热学、渗透压或电击、或粒子碰撞) 改变细胞膜的通透性。这些技术都有不同程度的细胞毒性,并且转染的效率不稳定。

使 DNA 顺利穿过完整无损的细胞质,被细胞摄取的先决条件是,“其 DNA 分子呈紧密状态,并将其所带的电荷包埋起来”。(Loeffler and Behr, Methods in Enzymology 217:599-618,1993)。新近应用的 Transfectam[®] 方法,已经成功地实现了上述要求。Transfectam[®] 试剂 (双十八烷基酰氨基氨基乙酰精胺) 是一种合成的阳离子脂多胺化合物,它具有一个带正电荷的领头的精胺集团并与 DNA ($K_d=10^{-5} - 10^{-7}M$) 有很强的亲和力。这一领头的精胺集团以共价链通过肽键与脂相连。这种

脂精胺分子与 DNA 分子结合，将 DNA 分子用脂肪层包埋起来。在足够多的脂精胺存在条件下，形成带正电荷的脂类包埋的小球形状的质粒 DNA，而且复合体的脂肪部分与细胞膜融合，细胞内吞作用将 DNA 摄入细胞。

用 Transfectam 试剂调控的 DNA 转染方法，已经被证明具有比其它现有方法更高的转染效率。（Barthel et al., DNA 和 Cell Biology 12 (6): 553-560, 1993）。以外，Transfectam[®]是一种性能稳定的并且基本上无细胞毒性的制剂。然而，在选用 COS 细胞系进行 DNA 转染时，要对达到理想转染的几个因素加以说明。这些因素包括转染的延续时间，Transfectam 试剂与 DNA 的比例，DNA 的浓度，以及其它稀释因子如 NaCl 的体积和离子强度。下面是得到理想转染结果时的实验条件。

a) 转染的持续时间：用 COS 细胞与固定浓度的质粒 DNA 一起培养来研究培养时间。这一研究的目的在于筛选出次最佳培养时间点以用于研究各种测试化合物对 SEAP 表达的抑制实验。诱导 SEAP 表达的时间研究结果显示（具体结果未描述），SEAP 的表达随时间的延长有一定的增加。这种诱导开始于 4 小时之内，24 小时达到最高。在 10，12 和 15 小时之间，没发现有显著的区别。因此，在所有后来药物筛选的研究中，对 SEAP 表达的抑制实验选用 12 - 15 小时作为适合的次最佳的 DNA 转染培养时间。

b) DNA 浓度：根据以前使用 Transfectam 试剂的研究结果（Loeffler and Behr, Methods in Enzymology 217:599-618, 1993），决定 DNA 在转染中的最佳浓度。对于共转染，如已经报道的（Hsu et al., Science 254:1799-1802, 1991），2:1 的比例（非选择性基因/选择性基因）被认为是最适合的。在 Linbro[®] 17mm 直径 24 孔平底培养平板中，非选择性的质粒 pBC12/HIV/SEAP 加入的浓度为每孔 0.35 μ g，对 Tat 功能编码的质粒 pBC 12/CMV/t2 浓度为每孔 0.75 μ g。

c) Transfectam 对 DNA 的比例和离子强度的确定：Transfectam[®]（DOGS）与质粒 DNA 的最佳比例和所用 NaCl 离子强度是在以前研究基础上的修改值（Loeffler and Behr, Methods in Enzymology 217:1799-1802, 1993），其确定如下所示：将原浓度为 1mg/0.400ml

(2.38mg/ml) 的 Transfectam 原液, 配在 10 % (v/v) 酒精的蒸馏水中, 每一微克所用 DNA 需要 6 倍体积 (μl) 的原液。由以下关系式决定 150mM NaCl 的一个适当体积, 以保证该溶液的最佳离子强度。

$$\text{NaCl 体积 } (\mu\text{l}) = \text{Transfectam 体积 } (\mu\text{l}) / 0.6$$

在选择了上述最佳反应条件后, 在标准测定中 Tat 所诱导出的 SEAP 水平的结果如图 2 如示。概括地说, 在补充加有 10 % 小牛胎血清 (FCS) 和抗菌素的 Isocove 修改过的 Dulbecco 培养基中 (IMDM) 培养 COS 细胞。细胞以每孔大约 1.5×10^5 个细胞的浓度, 接种到 17mm 直径 Cinbro[®]24 孔平底培养平板中, 做三组重复样品, 接种后在 37 °C, 加湿并在 95 % O₂ 5 % CO₂ 的培养箱中培养, 直到细胞达到 50 % 融合。次融合细胞用脂精胺的方法进行转染 (Loeffler and Behr, Methods in Enzymology 217:599-618, 1993)。吸干次融合细胞的培养基, 重新加入 300 μl 新鲜培养基 (IMDM 加 3 % FCS)。对 COS 细胞进行三种处理的转染。处理 1 为只加入质粒 pBC12/HIV/SEAP (0.35 μg /孔), 处理 2 为以 0.175 μg /孔的浓度加入质粒 pBC12/CMV/t2 (对 Tat 功能编码) + pBC12/HIV/SEAP (0.35 μg /孔), 处理 3 为只加入缓冲溶液 (无 DNA 对照样器)。该培养平板在培养 12 到 15 小时之后, 加入 700 μl 完全培养基 (IMDM 含 10 % FCS)。再培养 48 小时之后, 取 250 μl 该细胞培养的上清液的等份试样, 并在 65 °C 加热 5 分钟, 使细胞内的磷酸酶失去活性 (SEAP 具热稳定性)。这些样品在一小型离心机内离心 2 分钟。并加入 100 μl 2 $\times$ SEAP 测定缓冲溶液 (1.0M 二乙醇胺, pH9.8; 0.5mM MgCl₂; 10mM L-亮精氨酸) 加入到 100ml 样品的等份试样中。将溶液混合后移入一个 96 孔平底的培养板中 (Corning)。用一多头滴定器将 20 μl 预先加热的底物溶液 (120mM 硝基苯磷酸盐溶于 1 $\times$ SEAP 测定缓冲溶液) 滴加到含有上述反应混合液的每一孔中。该培养板在 37 °C 条件下培养 60 分钟, 每 5 分钟用一台 EL340i 微盘读数仪 (Bio-tek Instruments, Inc.) 在 A405 吸收波下读数, 每次读数前自动振动培养盘 5 秒钟。象以前所描述的一样 (Berger et al., Gene 66:1-10, 1988), 吸收度的改变被换算为 SEAP 的表达水平的 mU 单位, 并对照时间作图。

实验结果表明, 在一小时之后, 诱导的 SEAP 水平比较无 DNA 的对照样品, 或只用非选择性基团 (HIV/SEAP) 的诱导水平增加了几乎 65 倍。

以检测为指导的应用逆流色谱法分离杂酚油木提取物的活性成份: 如上所述, 应用逆流色谱法 (CCC) 对杂酚油木提取成分进行不同的分级分离及纯化, 分离得到两大组分 (表 1)。用 SiO_2 TLC 方法从绿色分离物中分离到 6.8mg 的被称为 Gr 的成份, 总收获率大约是开始植物碎末重量的 0.051%。从黄色分离物 (Ye) 中分离出 9.3mg 被称为 Lo 的成份。

杂酚油木叶和花的提取物对 Tat - TRS 活性的抑制作用: 用几种植物提取物进行 SEAP 测定试验发现, 只有从杂酚油木 *Larrea tridentata* 叶和花的提取物显示出对 HIV Tat 蛋白质活性有明显的抑制作用。如图 3 所示, 杂酚油木对 SEAP 的表达有依据剂量的抑制作用。概括地说, 用三组重复的 COS 细胞应用上述脂精胺方法, 以 2:1 的比例转染混合质粒 pBC12/HIV/SEAP 和 pBC12/CMV/t2 (Tat 功能编码)。转染后, 细胞培养 12 - 15 小时。杂酚油木的提取母液 (10mg/ml) 以 10 % DMSO 无 Ca/镁离子的 PBS 溶液制备, 并用一个 Millex[®] - GS 22 μm 的过滤器 (Millipore) 进行无菌过滤。将适当浓度的杂酚油木的提取液加到已转染 DNA 的细胞液中, 使样品中 DMSO 的最终浓度为 0.2 %, 并将样品再培养 48 小时。SEAP 测定, 从每孔中取 250 μl COS 细胞培养液的上清液, 并在 65 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 分钟, 使细胞内的磷酸酶失去活性 (SEAP 具有热稳定性)。用一小型离心机离心样品 2 分钟。从离心后的样品中各取出 100 μl 上清液, 将 100 μl 2 $\times$ SEAP 测定缓冲溶液 (1.0M 二乙醇胺, pH9.8; 0.5mM MgCl_2 ; 10mM L - 高亮精氨酸) 加入到 100 μl 样品的等份试样中。将溶液混合后移入到一个 96 孔平底的培养平板中 (Corning)。用一多头滴定器将 20 μl 预先加热的底物溶液 (120mM 硝基苯磷酸盐溶于 1 $\times$ SEAP 测定缓冲溶液) 滴加到含有上述反应混合液的每一孔中。该培养板在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 60 分钟, 每 5 分钟用 EL340i 微盘读数仪 (Bio -tek Instruments, Inc.) 在 A405 吸收度下读数, 每次读数前仪器会自动振动培养板 5 秒钟。在 30 分钟时, SEAP 表达的抑制百

分比计算如下:

$$\% \text{抑制作用} = 100 - \left[\frac{(CT^+ - C^+)}{(CT^- - C^-)} \times 100 \right]$$

其中:

C^- : 对照样品 (无 DNA, 无药物)

CT^- : 对照样品 (+ DNA, 无药物)

C^+ : 药物处理的样品 (无 DNA, + 药物)

CT^+ : 药物处理的样品 (+ DNA, + 药物)

如图 3 中所看到的, 当浓度是 $20\mu\text{g/ml}$ 时, 开始出现抑制作用; 当浓度是 $600\mu\text{g/ml}$ 时, 抑制作用达到最大值。对于这种粗提物质, 它的 EC_{50} (抑制 50 % 时的浓度) 估计为 $110\mu\text{g/ml}$ 。随着这些活性成份被进一步纯化, 这种 (些) 活性成份的活性作用逐渐增加, 比较最原始的总的粗提物的 21 %, 经分离后的有机相分离物其活性提高了三倍 (68 %)。

HIV 细胞药理作用的抑制: 一种抑制 Tat 反式激活作用的化合物, 应该能阻断 HIV 的复制。因而杂酚油木提取物被送到国家癌症研究所 (NCI), 用甲脂溶解测定方法试验该提取物对 HIV 细胞病理机制的抑制作用 (Weislow et al., JNCI 81:577-586, 1989)。用 CEM - SS 细胞 (ATCC, Rockville, MD) 与产生 HIV 的 H9 细胞一起培养。HIV 病毒侵染寄生 CEM - SS 细胞, 在一周内, 病毒在 CEM - SS 细胞内复制并杀死多数细胞。如果该药物能抑制 HIV 的在细胞内的繁殖, 那么 CEM - SS 细胞就可以避免由于 HIV 的存在而死亡。四唑翁制剂是由于活细胞的代谢减弱而得到一种带颜色的甲脂产物, 在 450nm 的色度计 ϕ 可以测量到。

在实验中, 将三组 CEM - SS 细胞 (5000) 加入到 96 孔微滴定板中。将适当浓度的测试化合物加到 5 % DMSO 无钙/镁离子的 PBS 溶液, 最终液体体积为 $100\mu\text{l}$ 。对照样品中只加化合物的介质 (PBS)。五分钟后, 将 500 高度侵染性 HIV - I 的 H₉ 细胞或正常的 H₉ 细胞加入到已含有适当浓度药物的孔中。该微滴板在 37°C , 95 % O_2 /5 % CO_2 条件

培养 6 在后, 加入 50 μ l XTT 与甲硫酸 N - 甲基吩嗪翁 (PMS) 的混合物。之后再培养 4 小时, 观察其颜色的变化 (XTT 甲脂产物)。将微滴板封好, 用一台微盘读数仪在 OD450 测定样品, 在读数之前读数仪自动摇动滴板, 使孔内成份混合均匀。每一数值代表三次读数的平均。在测试化合物存在的条件下, 未侵染的细胞与 HIV 感染了的细胞其两次重复数据的平均值之间没有显著差异。相反, 感染了 HIV 的样品在有测试化合物或没有测试化合物存在的条件下, 两次重复数据的平均值之间有显著性差异 ($P < 0.05$)。

上述研究结果归纳在表 2 之中, 浓度为 0.75 μ g/ml 的 Gr 成份对 HIV 的抵御为 58 % (细胞成活率), 而 Gr 不存在时, 只有 15 % 的细胞成活。在成份 Lo 只有 0.187 μ g/ml 这么低时, 也显示了对 HIV 细胞病理活性的更强抑制。在有 HIV 侵染的样品中, 成活细胞是 87 %, 该百分比与没有加入侵染的 HIV 对照样品的结果 (89 %) 很接近; 相反, 在没有成份 Lo, 侵染 HIV 存在时, 成活细胞只为 14 %。所用的这些化合物的浓度, 不会对细胞造成毒害。

表 2. 在溶解性甲 测定法中, 杂酚油木提取

化合物对 HIV - 1 细胞病理机制的抑制作用

不杀死细胞并用 XXT 甲 产物测定在第六天时成活细胞的百分率

测试样品	可最大程度抵御 HIV 的测试样品的浓度	未感染加测试样品	感染 HIV 加测试样品	感染 HIV 无测试样品
	μ g/ml			
绿色分离物	0.187	59	67	16
成分 Gr	0.75	80	67	16
- 重复				
成分 Gr	0.75	70	48	14
黄色分离物	0.187	60	57	14
成分 Lo	0.187	91	86	14
- 重复				
成分 Lo	0.187	89	87	14

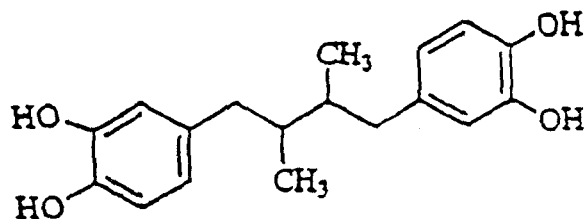
杂酚油木提取物活性成份的结构说明：确定已经纯化了的从植物提取的活性组分的化学性质，主要采用质谱仪和 $H -$ 与 $C -$ 的核磁共振 (NMR) 的方法。发现成份 L_0 是四种相关化合物的混合体 (L_1 , L_2 , L_3 和 L_4)。应用气相色谱 (GC) 方法，该方法用一个分析用不含换坏的毛细管并以 5 % 苯甲基硅氧烷 (HP - 5) 交联成的柱子，该柱子与一台质谱质相连接，对上述混合物的每一峰值进行分离和鉴别。GC 研究发现，第一化合物 (L_1) 占混合成份的 6 %；第二化合物 (L_2) 占总混合成份的 76 % ($MW = 316$)；第三化合物 (L_3) 与 L_2 为异构体并占总混合成份的 9 % ($MW = 316$)；第四化合物 (L_4) 占总混合成份的 9 % ($MW = 358$)。这些化合物从柱子中流出的时间标在图中的峰值处 (图 4)。

组份 Gr 包括五种化合物。应用气相色谱 (GC) 方法，该方法以分析用不会损坏的毛细管交联 5 % 苯甲基硅氧烷 (HP - 5) 而成的柱子与一台质谱仪相连接，对上述混合物的每一峰值进行分析和鉴别。该 GC 研究发现，十五种化合物中的四种 (G_1 , G_2 , G_3 和 G_4) 是木酚素，并与 L 化合物结构相关。这些化合物从柱子中流出的时间在图中的峰处标出 (图 5)。

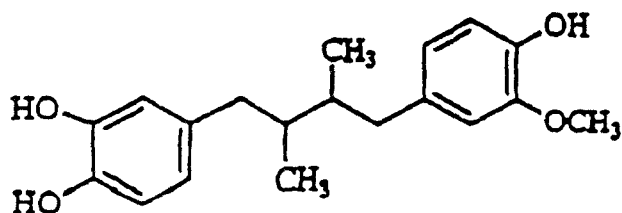
这八种 (L_1 , L_2 , L_3 , L_4 , G_1 , G_2 , G_3 和 G_4) 化合物的化学结构描述如下：

L_1 的成份是 $C_{18}H_{22}O_4$ ，已经确认出该化合物与以前已知的一化学品相同，为 1, 4 - 双 - (3, 4 - 二羟基苯) - 2, 3 - 二甲基丁烷 (去甲二氢愈创木酸, NDGA, Merck Index, 10th Edition, #6534)。

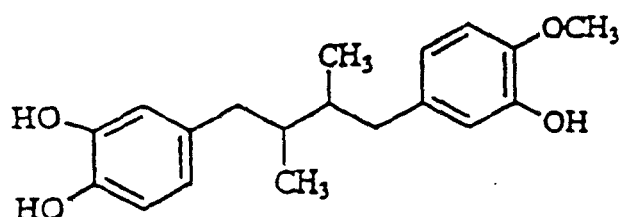
L_1 的化学结构式如下：



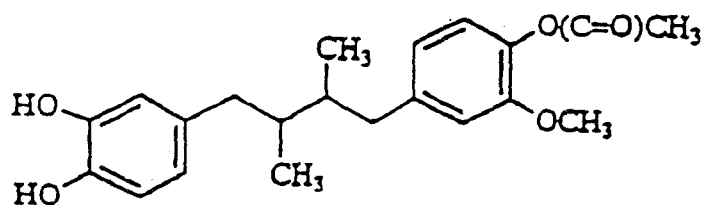
L_2 由 $C_{19}H_{24}O_4$ 组成，并被确认为 3 - O - 甲基 - NDGA 或 1 - (3, 4 - 二羟基苯) - 4 - (3 - 甲氧基 - 4 - 羟基苯) - 2, 3 - 二甲基丁烷。3 - O - 甲基 - NDGA 结构式如下：



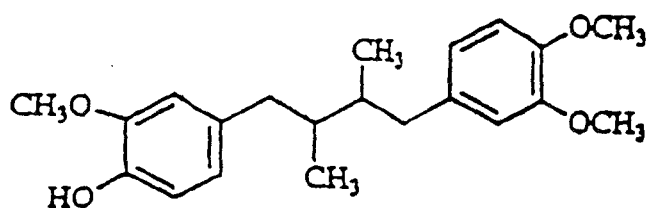
L_3 也含有 $C_{19}H_{24}O_4$, 并被确认为 4-O-甲基-NDGA 或 1-(3, 4-二羟基苯)-4-(3-羟基-4-甲氧苯基)-2, 3-二甲基丁烷。4-O-甲基-NDGA 还被记载为 Malachi 4:5-6 或 Mal4。4-O-甲基-NDGA 结构式如下:



L_4 由 $C_{21}H_{26}O_5$ 组成, 并被确认为 3-O-甲基-4-O-乙酰基-NDGA 或 1-(3, 4-二羟基苯)-4-(3-甲氧基-4-乙酸苯基)-2, 3-二甲基丁烷。3-O-甲基-4-O-乙酰基-NDGA 结构式如下:

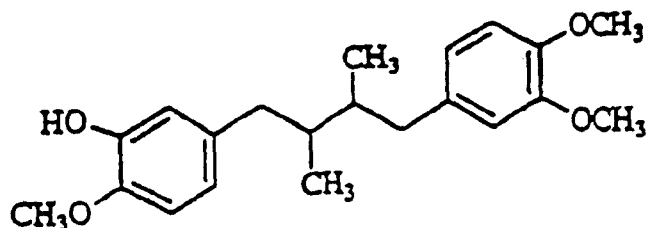


G_1 的分子量为 344, 由 $C_{21}H_{22}O_4$ 组成, 并被确认为 3, 3', 4-三-O-甲基-NDGA 或 1-(3-羟基-4-甲氧基苯基)-4-(3, 4-二甲氧基苯基)-2, 3-二甲基丁烷。3, 3', 4-三-O-甲基-NDGA 结构式如下:



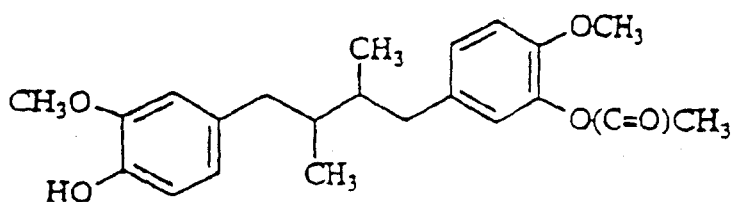
G_2 的分子量是 344, 由 $C_{21}H_{22}O_4$ 组成, 被确认为 3, 4, 4'-三-O-甲基-NDGA 或 1-(3-甲氧基-4-羟基苯基)-4-(3, 4-二甲氧基苯基)-2, 3-二甲基丁烷。

4-二甲氧基苯)-2,3-二甲基丁烷。该3,4,4'-三-O-甲基-NDGA的结构式如下:



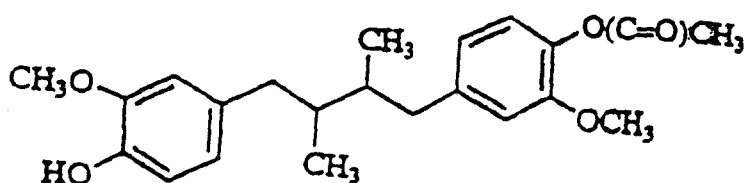
G_3 和 G_4 的分子量都是 372, 由 $C_{22}H_{28}O_5$ 组成。 G_3 是 3', 4-二-O-甲基-3-O-乙酰基-NDGA (如 G_{3A}) 或 3, 3'-二-O-甲基-4-O-乙酰基-NDGA (如 G_{3b})。3', 4-二-O-甲基-3-O-乙酰基-NDGA 也被称作 1-(3-甲氧基-4-羟基苯基)-4-(3-乙酰氧基-4-甲氧基苯基)-2,3-二甲基丁烷, 其结构式如下:

G_{3a} :



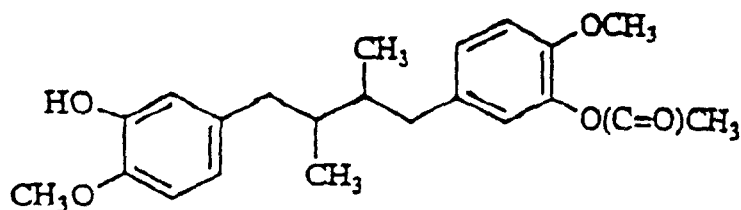
3, 3'-二-O-甲基-4-O-乙酰基-NDGA 也称作为 1-(3-甲氧基-4-羟基苯)-4-(3-甲氧基-4-乙酰氧基苯)-2,3-二甲基丁烷, 结构式如下:

G_{3b} :



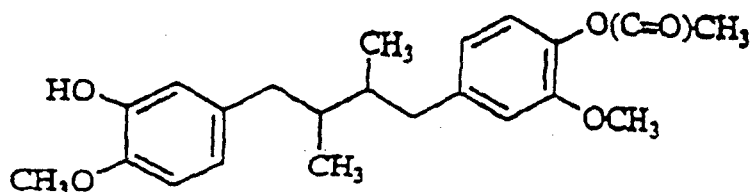
类似地, G_4 为 4, 4'-二-O-甲基-3-O-乙酰基-NDGA (如在 G_{4a} 中) 或 3, 4'-二-O-甲基-4-O-乙酰基-NDGA (如在 G_{4b} 中)。4, 4'-二-O-3-O-乙酰基-NDGA 也被称作 1-(3-羟基-4-甲氧基苯基)-4-(3-乙酰氧基-4-甲氧基苯基)-2,3-二甲基丁烷, 其结构式如下:

G4a :



3, 4'-二-O-甲基-4-O-乙酰基-NDGA 也称为 1-(3-羟基-4-甲氧基)-4-(3-甲氧基-4-乙酰氧基苯)-2, 3-二甲基丁烷, 其结构式如下:

G4b :



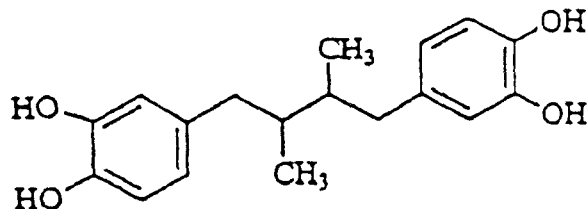
除上面所述的分离和纯化方法以外, 每种所揭示出的 NDGA 的衍生物也可以应用 Ikeya 等 (Chem. Pharm. Bull. 27 (7): 1583 - 1588, 1979) 的方法, 通过对 NDGA 甲基化和/或乙酰化的化学合成方法而得到。

大量提纯 Lo 组分以及从 Lo 组分中提纯两种纯化物 (L₂ 和 L₃): 对一大批植物材料应用大规模 CCC 分级分离方法, 以得到大量的组份 Lo。总共称取 110g 植物碎末, 先用 700ml 己醇处理 5 次, 去掉溶于己醇的物质 (1.17g)。干燥不溶于己醇的物质 (HI 组分), 并用 800ml 氯仿: 甲醇溶液连续浸渍三次。这样总共得到 20g 提取物 (Jex), 并将其与前一批得到的 7.6g HI 组份合并在一起, 因此共得到 27.6g 植物粗提物。将其分为 10g 和 17.6g 两批做进一步分离。这两批样品先分别在己醇: EtoAc: MeOH: 0.5% NaCl 其比例为 6:4:5:5 的溶剂系统中过大容量可能横轴 CPC (Shinomiya et al., J.Chromatogr 644: 215-229, 1993), 其上层 (有机层) 作为流动相。完全根据 TLC 的图形将所得到的分离物放在一起, 从两次 CCC 的分离中共确定出四种主要的组份, 它们是绿色组分 (Gr) (1.12g), 组份 Lo (2.87g), 末尾组分 (1.78g), 和最后固定相 SP (20.84)。所得到整个 2.87g 的 Lo 组份用己醇: EtoAc:

MeOH: H₂O 其比例为 7:3:5:5 的系统在大型三联体 CPC 中进一步分离, 水质层作为流动相。根据脱流出的先后顺序及 TLC 图形, 四个分离物分别定为 LYI (0.375g), LYII (0.113g), LYIII (0.280g)和 LYIV (2.80g)。这些分离物以 10 μ g/ml 的浓度进行抗 Tat-TRS 活性的测定。根据测试的结果, 选择 LYI 做进一步提纯。

从组份 Lo 中的 LYI 分离物中分离纯净的 L₂ 和 L₃ 化合物: 采用前面已经改善了的条件, 如: 三联体 CPC 用 Hex: CHCl₃: MeOH: 10mM NaCl 其比例为 1:4:4:2 的溶剂系统来进一步较少疏水性的 LYI 组份。得到经 NMR 和质谱仪确定的 148mg L₃ 类似物和 109.3mg 的纯净 L₂oL₃ (Malachi 4:5-6) 和 L₂ 的结构式前面已有描述。

化合物 L₂ 和 L₃ 都是以前已定名的化学品 1, 4 - 双 - (3, 4 - 二羟基苯) - 2, 3 - 二甲基丁烷(去甲二氢愈创木酸, NDGA, Merck Index, 10th Edition ,#6534) 的衍生物。MDGA 的结构式与前所述 L₁ 的结构式相同, 如下:



NDGA 和它的衍生物的抗 - HIV 活性 (Tat 调控 HIV 反激活的抑制作用) 以前不为人知。NDGA 和其衍生物 Malachi 4:5-6(Mal4) 的抗 - HIV 反式激活作用的活性比较见图 6 所示。概括地说, 用上面已经描述过的脂精胺方法对两组重复的亚融合态的 COS 细胞, 分别同时转染质粒 pBC12/HIV/SEAP 和 pBC12/CMB/t2 (Tat 功能编码)。然后培养转染细胞 12 到 15 小时。先将所要测试的化合物溶解到 10 % DMSO/无钙 - 镁离子的 PBS 溶液中, 再将其以适当的浓度加到已转染了的细胞中, 使 DMSO 的最终浓度为 0.2 %。样品培养 48 小时之后, 每一样品取 250 μ l 的细胞培养上清液, 用图 3 中的标准测定曲线进行 SEAP 分析。在 30 分钟时 SEAP 表达抑制百分率的计算方法如下:

$$\% \text{抑制作用} = 100 - [(CT^+ - C^+) / (CT^- - C^-) \times 100]$$

其中: C⁻: 对照样品 (无 DNA, 无药物)

CT⁻: 对照样品 (+ DNA, 无药品)

C⁺: 药物处理样品 (无 DNA, + 药物)

CT⁺: 药物处理样品 (+ DNA, + 药物)

图中每一点代表两组数据的平均值。Mal4 和 NDGA 其浓度分别是 8 μ g/ml (25 μ M) 和 6 μ g/ml (20 μ M), 它们的 EC₅₀ 值之间没有显著性差异。EC₅₀ 是指在未处理的对照细胞中, Tat 调控的 HIV 反式激活作用降低到 50 % 时, 所测试的化合物的抑制浓度。

比较 Mal4 和 NDGA 所产生的 HIV 反式激活作用的抑制见表 3。

表 3: 天然化合物 Mal4 和 NDGA 对 HIV
启动子活性的反式激活作用的抑制

测试化合物	Tat 诱导 Seap 表达的抑制(%抑制/测试化合物的浓度)							
	%	μ m	%	μ m	%	μ m	%	μ m
Mal4	13.6	9.5	60.4	31.3	92	62.7	100	95
NDGA	17.0	9.9	73.8	32.6	88.1	65.2	92.9	99

化合物 NDGA 和 Mal4 如图 6 所示测定。对照样品做四次重复。30 分钟后的抑制百分比和 OD₄₀₅ 值是:

C⁻: 对照样品 (无 DNA, 无药物): 0.091

CT⁻: 对照样品 (+ DNA, 无药物): 0.805

图 7 所示的是 Mal4 处理 CEM - SS 细胞后, 作为衡量细胞成活的 XTT 甲脂产物的数量。图中的每一点表示经过连续 Mal4 稀释的感染或未感染 HIV 的 CEM - SS 靶细胞 (10⁴/M 孔)。EC₅₀ 表示 Mal4 的浓度 (如 13.4 μ M) 将感染培养物的 XTT 甲脂产生量增加 (即保护) 到未感染、未处理的培养细胞的 50 % 的 Mal4 的浓度 (例如, 13.4 μ M)。IC₅₀ 表示将未感染的培养细胞的 XTT 甲脂产量降低到未处理、未感染的对照细胞的 50 % 的 Mal4 抑制或毒性浓度 (例如, 325 μ M, 估计值)。未处理的感染对照细胞的 XTT 甲脂产量是未处理的未感染对照细胞的 9 %。对 HIV - 1 细胞致病作用的溶解性甲脂检测按照 Weislow et al., JNCI 81:577-586, 1989 所述的程序进行。

虽然本发明已经按照现在认为是最佳和最实际的方案进行了描述,

但应该理解的是本发明并不应该仅限于这些实例，与此相反，不离开本发明的实质和附属的权利要求书的范围的其它变型和修饰都是本发明所包含的。

因此，应该理解的是在不脱离权利要求书所限定的本发明的创新方面的前提下，可以有众多的 NDGA 衍生物的变型，以及对 Tat 反式激活的抑制方法。

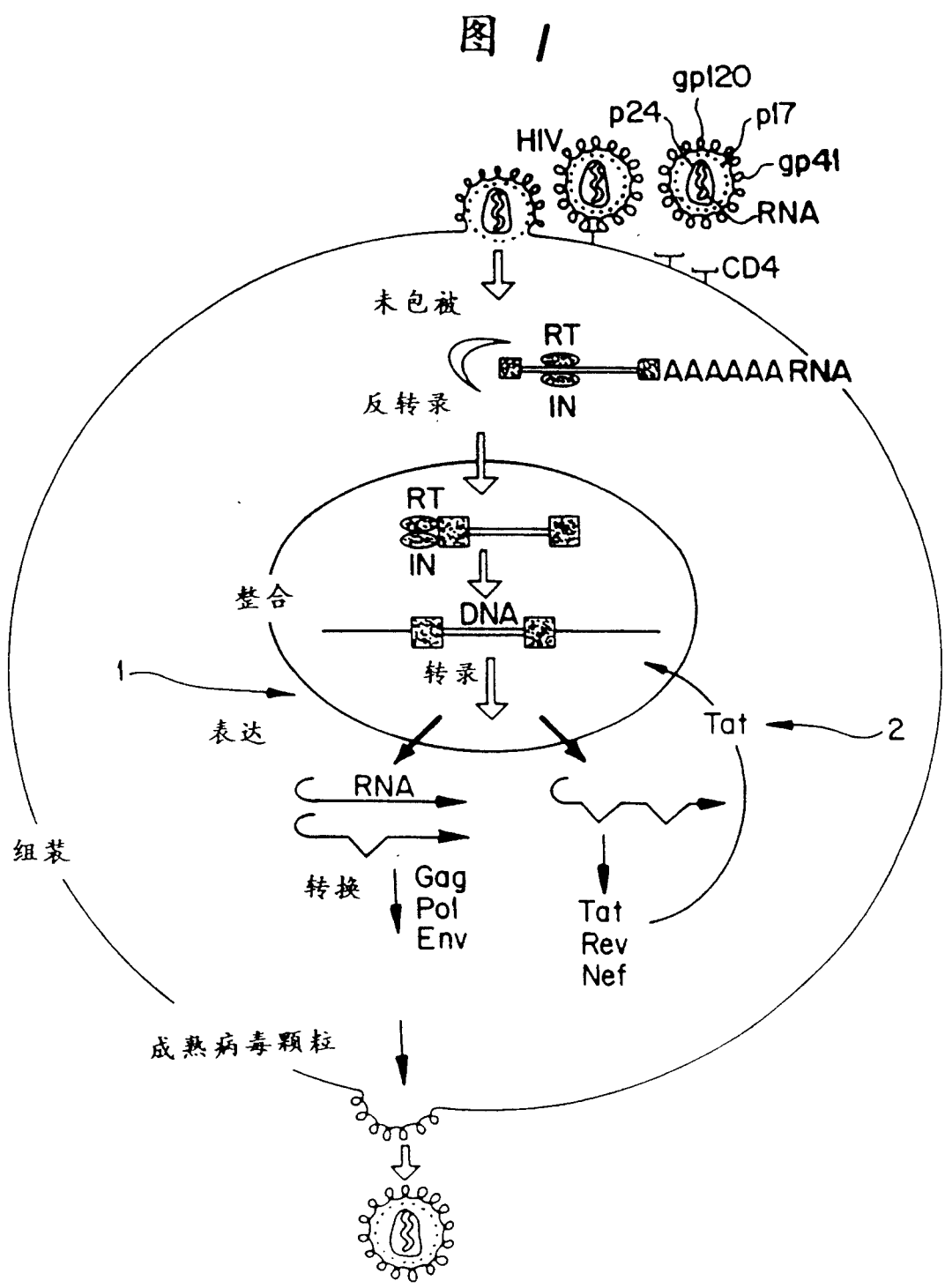


图 2

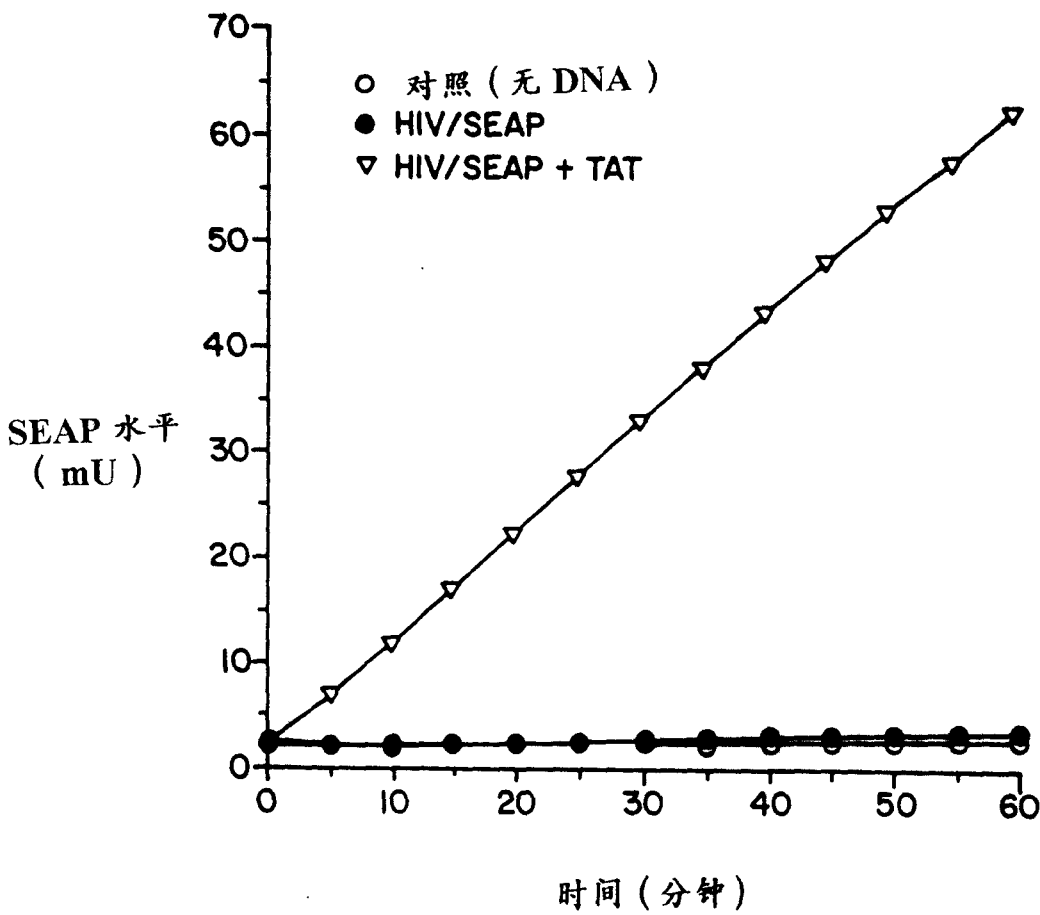


图 3

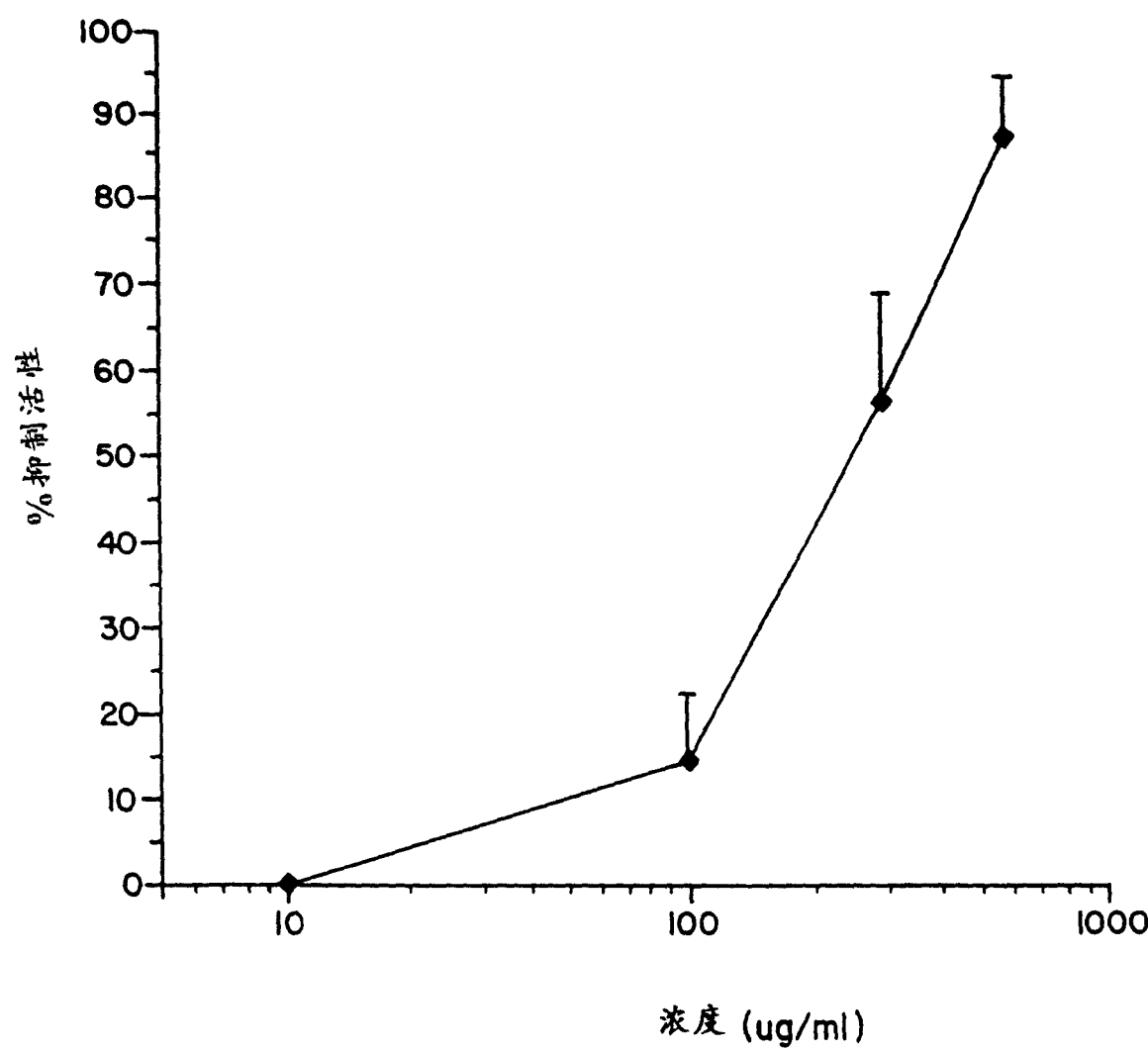


图 4

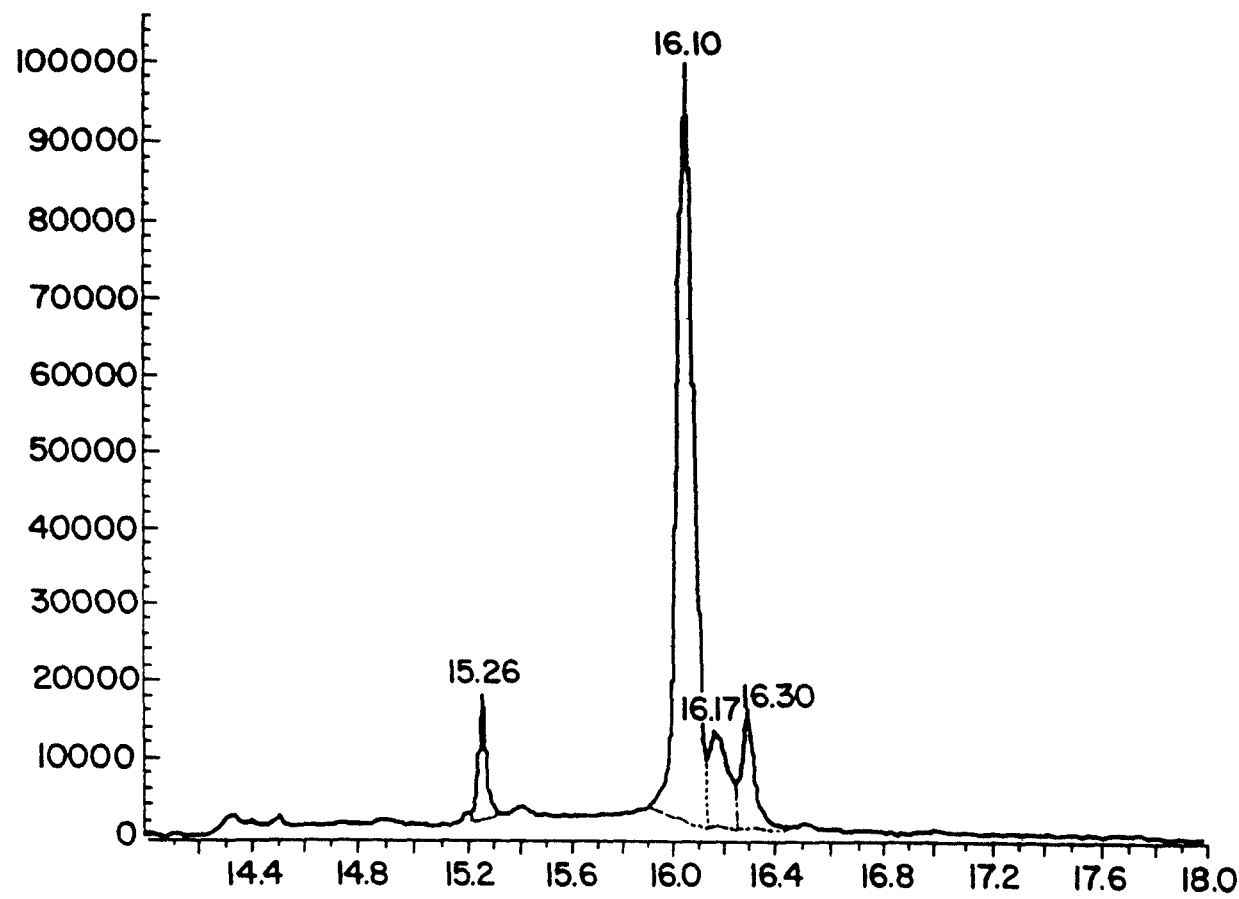


图 5

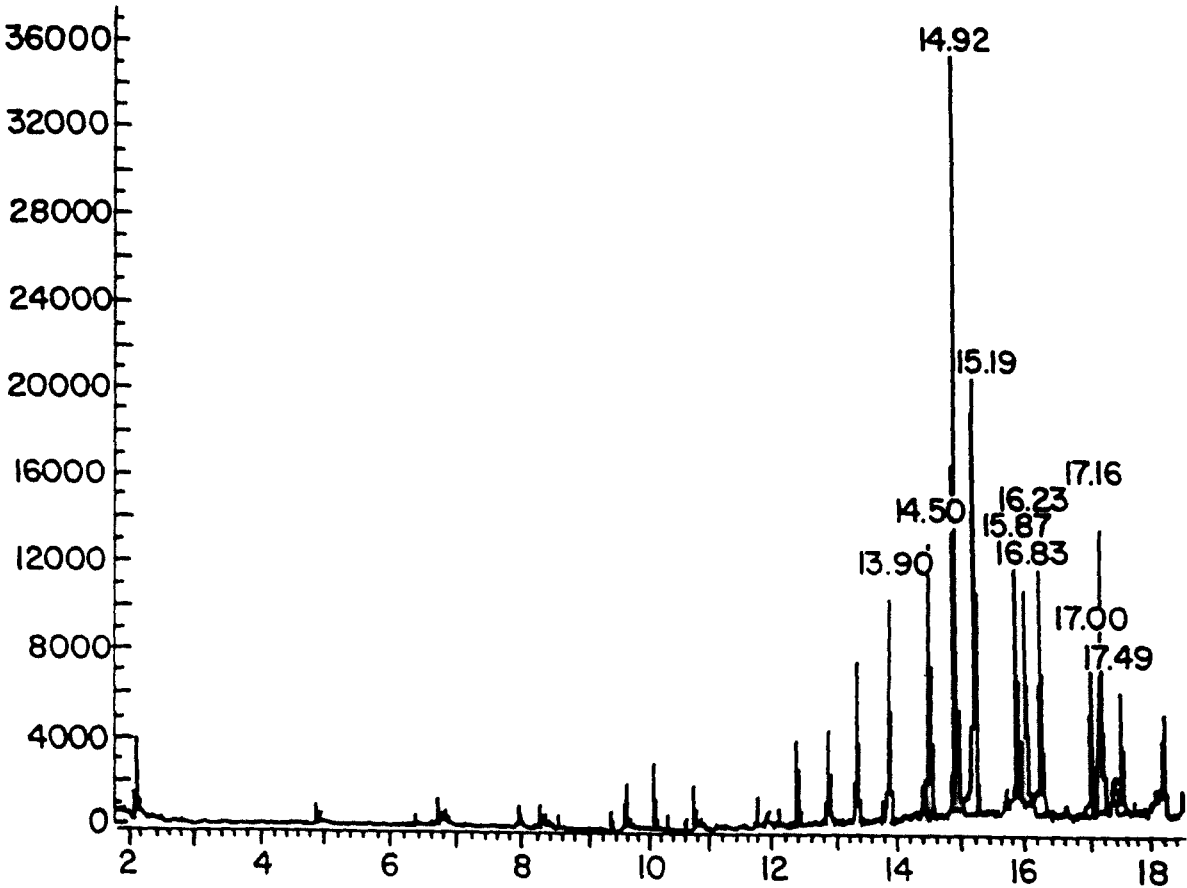
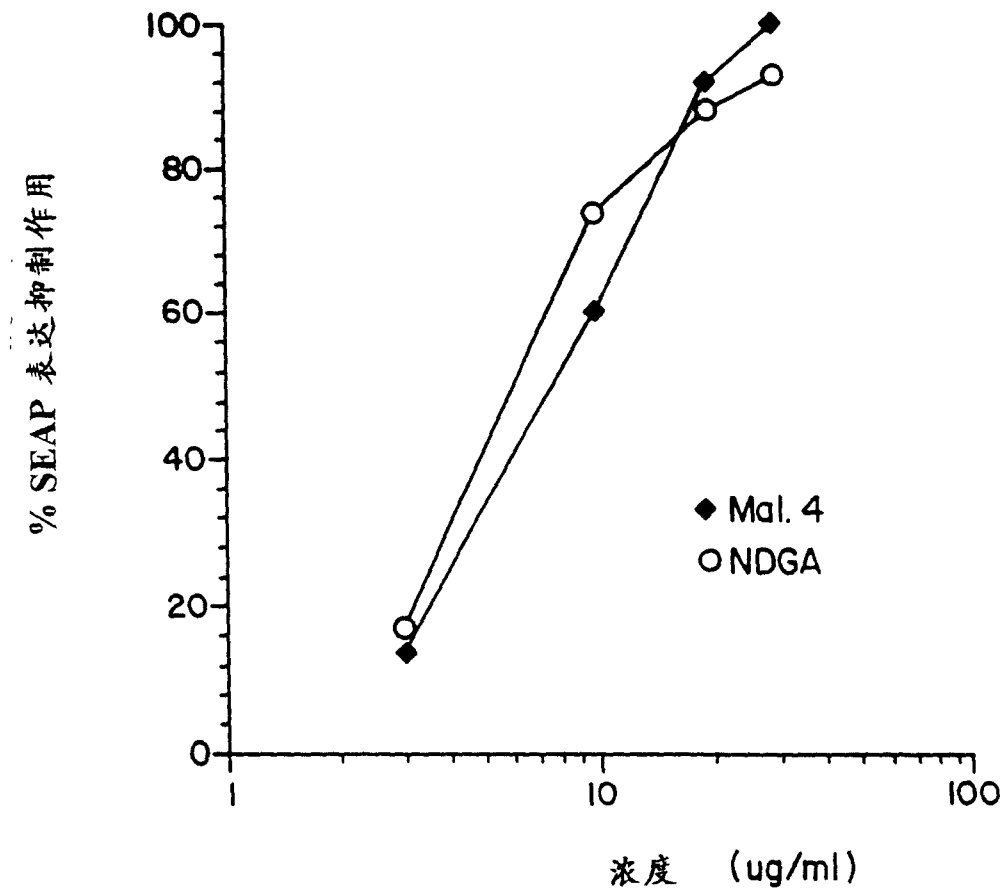


图 6



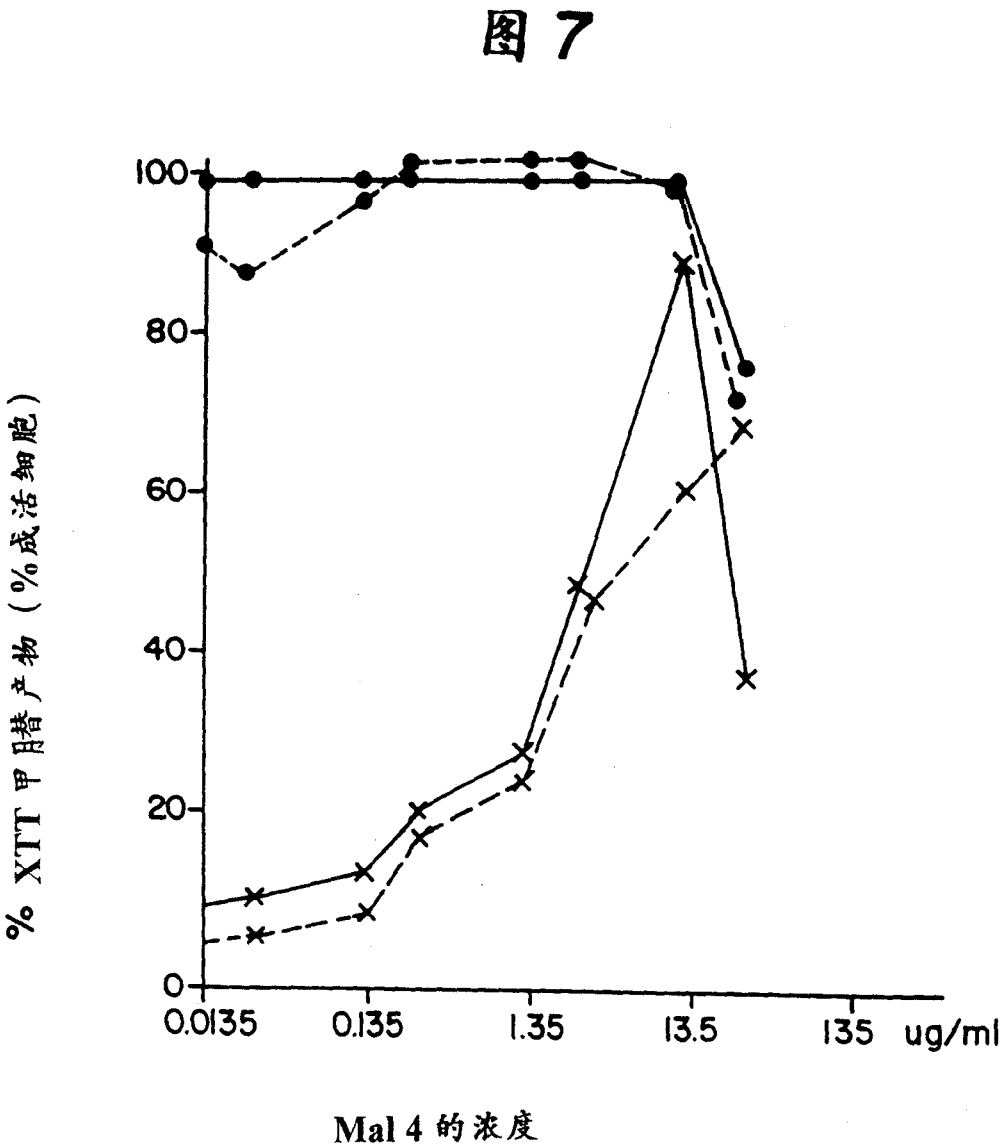


图 8

表 1：杂酚油木 NDGA 衍生物的逆流色谱（CCC）和分级分离

