

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2012 年 7 月 19 日 (19.07.2012)



(10) 国际公布号
WO 2012/094838 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 31/185 (2006.01) *A61P 31/18* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2011/070730
- (22) 国际申请日: 2011 年 1 月 28 日 (28.01.2011)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201110006347.3 2011 年 1 月 13 日 (13.01.2011) CN
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 南京大学 (NANJING UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省南京市汉口路 22 号, Jiangsu 210093 (CN)。苏州维赛生物医药有限公司 (VIROSEC INC.) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市工业园区星湖街 218 号纳米科技园 A3 楼 403 单元, Jiangsu 215125 (CN)。
- (72) 发明人; 及
- (75) 发明人/申请人 (仅对美国): 吴稚伟 (WU, Zhiwei) [US/CN]; 中国江苏省南京市汉口路 22 号, Jiangsu 210093 (CN)。楚鹰 (CHU, Ying) [CN/CN]; 中国江

苏省南京市汉口路 22 号, Jiangsu 210093 (CN)。邱敏 (QIU, Min) [CN/CN]; 中国江苏省南京市汉口路 22 号, Jiangsu 210093 (CN)。王芹 (WANG, Qin) [CN/CN]; 中国江苏省南京市汉口路 22 号, Jiangsu 210093 (CN)。宋红勇 (SONG, Hongyong) [CN/CN]; 中国江苏省南京市汉口路 22 号, Jiangsu 210093 (CN)。孙亦彬 (SUN, Yibin) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市工业园区星湖街 218 号纳米科技园 A3 楼 403 单元, Jiangsu 215125 (CN)。蒋海燕 (JIANG, Haiyan) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市工业园区星湖街 218 号纳米科技园 A3 楼 403 单元, Jiangsu 215125 (CN)。

(74) 代理人: 苏州创元专利商标事务所有限公司 (SUZHOU CREATOR PATENT & TRADEMARK AGENCY LTD.); 中国江苏省苏州市干将西路 93 号, Jiangsu 215002 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,

[见续页]

(54) Title: USE AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION OF LIGNOSULFONATE

(54) 发明名称: 木质素磺酸盐的用途及其药物组合物

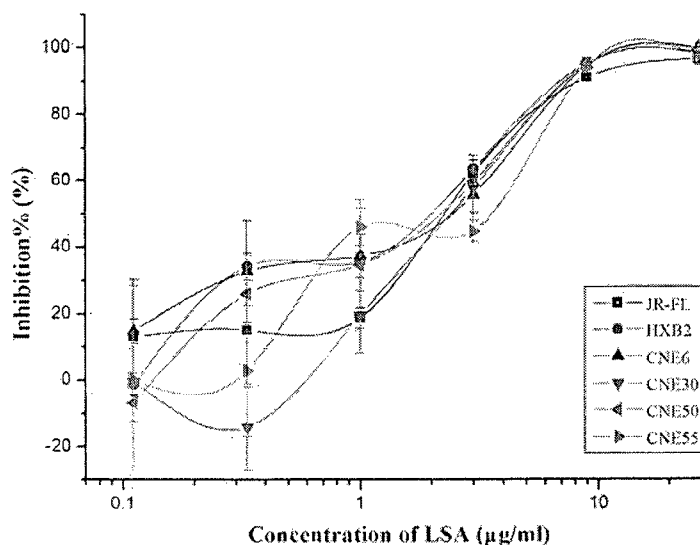


图 1 / Fig. 1

(57) Abstract: The present invention discloses the use and pharmaceutical composition of lignosulfonate. Lignosulfonate has strong activity against HIV-1 in vitro. The mechanism is mainly blocking HIV-1 virus from binding to target cells, thereby blocking its infection. Lignosulfonate also has significant inhibitory effect on the CD4 dependent and in-dependent HIV-1 infection. In addition, the result of cell fusion experiments shows that lignosulfonate has the role of inhibiting HIV-1 viral envelope protein-mediated integration. Finally, cytotoxicity experiments show that lignosulfonate has basic non-toxicity to cells in the effective antiviral concentrations. Lignosulfonate has rich source and low production costs. It can be used as a new potential anti-HIV-1 drug and antimicrobial agent.

(57) 摘要:

[见续页]



KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则 4.17 的声明:

— 发明人资格(细则 4.17(iv))

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(84) **指定国** (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR,

本发明公开了木质素磺酸盐的用途及其药物组合物, 其中木质素磺酸盐在体外具有较强的抗 HIV-1 的活性, 其作用机制主要是阻断 HIV-1 病毒与靶细胞结合, 从而阻断其感染。同时对于 CD4 依赖与非依赖型的 HIV-1 感染, 木质素磺酸盐都有明显的抑制效果。另外, 细胞融合实验结果表明木质素磺酸盐具有抑制 HIV-1 病毒包膜蛋白介导的融合过程的作用。最后, 细胞毒性试验表明其在有效抗病毒浓度下对细胞基本无毒性。木质素磺酸盐来源丰富, 生产成本低廉, 可以作为一种新型潜在抗 HIV-1 药物及杀微生物剂得到应用。

说明书

发明名称：木质素磺酸盐的用途及其药物组合物

技术领域

本发明涉及木质素磺酸盐的用途，还涉及含有木质素磺酸盐作为有效成分的药物组合物。

背景技术

自 1981 年艾滋病(AIDS)首次被发现至今，全球死于这种疾病的人已逾 2500 万。艾滋病是感染人免疫缺陷病毒 (HIV)引起的。2009 年 UNAIDS 数据显示，截至到 2008 年，全球 HIV 感染者已超过 3340 万，2008 年全球新增感染者人数为 270 万。在世界范围内，性传播是艾滋病主要的传播途径，性病的流行是艾滋病流行的潜在危险因素。虽然艾滋病疫苗是预防和控制 HIV 最有效的方式，但到目前为止，人类仍然没有研制出能有效阻断艾滋病传播的疫苗。目前预防 HIV 性传播的措施主要是宣传教育，普及艾滋病以及其它性传播疾病的知识，推广安全套的使用，建立正确的性行为方式。实践证明使用安全套是有效的防止 HIV 性传播的措施，但由于文化、宗教、习俗、经济和男性排斥等诸多因素，安全套的使用率仍然很低；其次市场上主要是男用安全套，女性没有自主权。目前高效抗逆转录病毒疗法 (HAART) 既鸡尾酒疗法作为艾滋病患者药物治疗的标准方案，大大改变了艾滋病毒治疗景观。尽管各类抗 HIV 药物的出现显著延长了艾滋病患者的生命，但是还不能预防和完全治愈艾滋病，易出现抗药株，且抗 HIV 药物价格很高和在治疗过程中具有严重的毒副作用。

目前在世界范围内，女性感染人数稳定增长，已达到 1570 万，占总感染人数的 47%。在异性性行为中，女性感染 HIV 的机率是男性的 2~4 倍，其中年轻女性已经成为主要的感染人群。流行病学研究证明，女性生殖器官的生理结构决定了女性较男性对艾滋病易感。为使女性具有自主使用预防功能的新技术来保护自己免受感染，杀微生物剂 (microbicide) 的研究开发已被联合国艾滋病规划署 (UNAIDS) 和世界卫生组织 (WHO) 定为全球优先发展的策略，也是国际社会在艾滋病预防方面投入仅次于艾滋病疫苗的领域。研发有效、价格低廉、使用方便的抗病毒杀微生物剂对全球的 HIV/STDs 的预防具有重要意义。统计学模拟

表明,一个有效性达 60%的杀微生物剂每年可在世界范围内减少一百多万艾滋病新感染者。

随着杀微生物剂研究得到日益重视,不同种类的抗 HIV 感染的药物或化合物都应用于杀微生物剂的研究与开发。截止 2009 年 10 月,已进入临床评价的候选杀微生物剂共有 36 种,其中正在进行临床评价的候选杀微生物剂共有 21 种。杀微生物剂阻断 HIV 感染的机制主要为: 1)通过维持阴道 pH 值,增强阴道天然防疫功能; 2)非专一裂解病毒表壳或外壳; 3)特异阻断病毒与宿主细胞结合,从而阻止病毒进入靶细胞; 4)抑制病毒在细胞内或细胞间的复制,使其不能形成成熟病毒颗粒。通过非专一性破坏病毒外壳,直接杀灭 HIV 的活性物质主要是表面活性剂。其中最具代表性的是已完成临床试验的壬苯醇醚 (Nonoxynol-9, N-9)。研究表明 N-9 在破坏精子脂膜和病毒包膜的同时,由于其细胞毒性造成了阴道和子宫颈的粘膜层损伤,反而会相应增加艾滋病的传播及感染的危险 (Shattock R 等, Lancet, 2004. 363:1002-1004)。另一类受到广泛关注的活性物质是阴离子多聚化合物,其通过非专一性干扰作用,阻止病毒吸附到靶细胞上,从而阻断病毒进入靶细胞建立有效感染。其中进入临床试验或已完成临床试验的产品有, PRO 2000 (羧磺酸聚合物)、CS/Ushercell™ (硫酸纤维素) 和 Carraguard™ (角叉菜胶)。PRO 2000 为一种含有羧磺酸聚合物的水溶性凝胶,除具有抗 HIV 活性外,同时也具有抗其它性传播疾病病原体的体外活性 (Karim 等, FUTURE MICROBIOLOGY 2010, 5 (4): 527-529)。CS/Ushercell™ (硫酸纤维素) 作为一种磺化聚阴离子化合物同样具有抗 HIV 等性传播疾病病原体的体外活性,但其 3 期临床试验研究失败,原因是试验组的 HIV 感染率比安慰剂组的高 (Van Damme L 等, N Engl J Med 2008, 359:463-472)。Carraguard™ 主要成分是角叉菜胶,一种从由海藻中提取的硫酸多糖。其同类产品早已应用于食品,其安全性较高 (Howeet MK 等, Current Pharmaceutical Design, 2005, 11:3731-3746)。

HIV-1 侵入靶细胞是一个特异性的生物学过程,其需要病毒表面的包膜蛋白 gp120 与细胞受体 CD4 结合,诱导 gp120 构象发生改变,继而与细胞表面的辅助受体 CCR5 或 CXCR4 结合,使得原先被 gp120 遮蔽的融合蛋白 gp41 发生构象变化,曝露出其疏水的 N-末端融合肽序列并插入宿主细胞膜,从而启动病毒毒膜与细胞膜的融合,最终导致病毒核心结构进入细胞,建立感染。针对这一生物学过程,已有多种抑制剂被开发出来,例如针对辅助受体的抑制剂 Maraviroc

与 PSC-RANTES, 另外针对融合过程的抑制剂 T20 (已被美国 FDA 批准上市, 商品名恩夫韦定) 与 C52L 多肽也是很有希望的杀微生物剂候选药物。

发现新的具有抑制 HIV 感染作用的化合物或天然产物, 对于开发有效预防 HIV 传播的杀微生物剂具有重要意义。寻找创新性的先导化合物, 继而开发出有效阻止 HIV 感染的新型杀微生物剂或药物, 是本发明的目的。

木质素磺酸盐是亚硫酸盐法造纸木浆的副产品, 为线性高分子化合物。其属于阴离子表面活性剂, 棕黄色粉末。具有良好的扩散性, 易溶于水, 可溶于不同 pH 值的水溶液中。木质素磺酸盐在工业中具有广泛的应用, 但鲜有在医药卫生领域的应用, 尤其是作为抗病毒药物的报道。

发明内容

本发明的第一个目的是提供木质素磺酸盐的应用, 用于制备抑制 HIV-1 感染的药物;

本发明的第二个目的是提供含有木质素磺酸盐作为有效成分的抑制 HIV-1 的药物组合物, 该药物组合物还含有常规药用载体。

该药物组合物制成注射剂、片剂、胶囊剂、气雾剂、栓剂、膜剂、滴丸剂、外用搽剂, 或控释或缓释剂型或纳米制剂。

本发明与现有技术相比具有下列优点: 木质素磺酸盐在体外具有较强的抗 HIV-1 的活性, 其作用机制主要是阻断 HIV-1 病毒与靶细胞结合, 从而阻断其感染。同时对于 CD4 依赖与非依赖型的 HIV-1 感染, 木质素磺酸盐都有明显的抑制效果。另外, 细胞融合实验结果表明木质素磺酸盐具有抑制 HIV-1 病毒包膜蛋白介导的融合过程的作用。最后, 细胞毒性试验表明其在有效抗病毒浓度下对细胞基本无毒性。木质素磺酸盐来源丰富, 生产成本低廉, 可以作为一种新型潜在抗 HIV-1 药物及杀微生物剂得到应用。

附图说明

附图 1 为木质素磺酸盐抑制 HIV-1 对 CD4⁺ CCR5⁺ CXCR4⁺ GHOST X4/R5 细胞感染的曲线图;

附图 2 为木质素磺酸盐抑制 HIV-1 对 CD4⁺ Caco-2 细胞感染的曲线图;

附图 3 为木质素磺酸盐抑制 HIV-1 对 CD4⁺ C33A 细胞感染的曲线图;

附图 4 显示了木质素磺酸盐抑制 HIV-1 感染 GHOST X4/R5 细胞、CD4⁺ Caco-2 细胞、CD4⁺ C33A 细胞的 EC₅₀ 值；

附图 5 为木质素磺酸盐对多种人细胞株产生毒性的曲线图；

附图 6 显示了木质素磺酸盐对多种人细胞株的半数毒性浓度 TC₅₀ 值；

附图 7 为木质素磺酸盐 (LSA)、硫酸葡聚糖 (Dextran sulfate)、齐多夫定 (AZT)、奈韦拉平 (nevirapine) 对 HIV-1 感染的时间抑制曲线图；

附图 8 为木质素磺酸盐在不同浓度下抑制 HIV-1 病毒包膜蛋白介导的细胞融合的外观图；

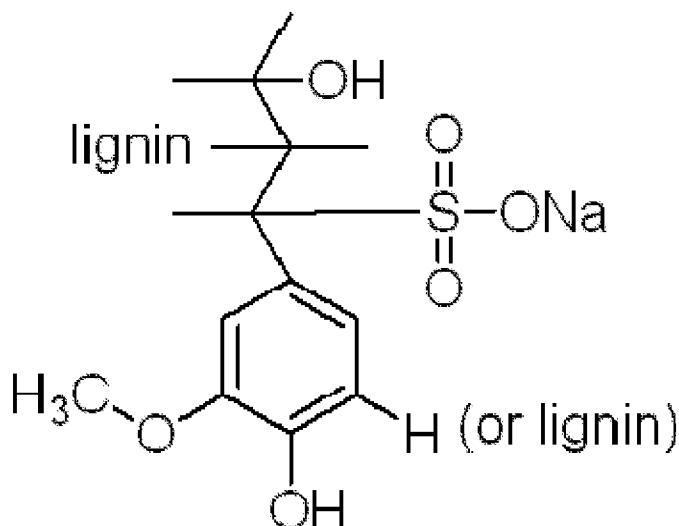
附图 9 为木质素磺酸盐在不同浓度下抑制 HIV-1 病毒包膜蛋白介导的细胞融合的柱状统计图。

具体实施方式

下面结合显示实验结果的附图来进一步阐述本发明。

1. 实验材料

1.1 木质素磺酸钠 (lignin sulfonate sodium, LSA), 购自 SIGMA 公司；
其分子式如下：



1.2 阳性对照样品：硫酸葡聚糖 (Dextran sulfate), 齐多夫定 (AZT), 奈韦拉平 (nevirapine) 均购自 SIGMA 公司；

1.3 MTT, 购自 SIGMA 公司, 使用时用 PBS 配制成 5 mg/ml 的溶液；

1.4 DMSO, 购自 SIGMA 公司；

1.5 PEI (linear, 25kD), 购自 Polyscience 公司, 使用时配制成 5 mg/ml 的溶液；

1.6 HIV-1 假病毒系统 (HIV-1 pseudotype virus)

1.6.1 假病毒骨架质粒: pNL4-3, 构建有萤光素酶报告基因 (luciferase reporter gene), 引自美国 Rockfeller university;

1.6.2 源自不同 HIV-1 亚型基因序列的假病毒包膜质粒, 引自清华大学艾滋病研究中心;

HIV-1 B 亚型标准毒株: JR-FL, HXB2;

HIV-1 临床分离毒株: CNE6 (B' 亚型)、CNE30 (B' C 亚型)、CNE50 (B' C 亚型) 和 CNE55 (CRF01-AE 亚型), 均分离自中国艾滋病感染者, 包括了在中国主要的 HIV-1 流行亚型;

1.7 Bright-Glo™ luciferase assay system 购自 Promega 公司;

1.8 细胞

1.8.1 人骨肉瘤细胞系 GHOST X4/R5, 表达 CD4 受体, CCR5 与 CXCR4 辅助受体;

1.8.2 人阴道上皮细胞 VK2;

1.8.3 人结肠癌上皮细胞 Caco-2, 不表达 CD4 受体;

1.8.4 人宫颈癌上皮细胞 C33A, 不表达 CD4 受体;

1.8.5 人 T 细胞系白血病细胞 MT-2, 表达 T 细胞表面受体 CD4, 用于检测 HIV-1 诱导的细胞融合作用;

1.8.6 仓鼠卵巢细胞 CHO-WT, 表达 HIV-1 包膜蛋白 gp120, 用于检测 HIV-1 诱导的细胞融合作用;

1.8.7 人胚胎肾细胞 293T, 用于包装生成 HIV-1 假病毒颗粒;

1.9 细胞培养液: DMEM high glucose +10%胎牛血清;

1.10 96 孔细胞培养板: Corning;

1.11 24 孔细胞培养板: Corning;

1.12 96 孔荧光检测板: Costar;

1.13 GloMax 96 孔化学发光酶标仪;

1.14 Infinite M200 酶标仪;

1.15 Thermo CO2 培养箱。

2. 实验方法

2.1 HIV-1 假病毒颗粒在人胚胎肾细胞 293T 细胞内的包装

使用 PEI 转染试剂，将 HIV-1 假病毒骨架质粒 pNL4-3 和不同的假病毒包膜质粒共转染至 293T 细胞，培养 48 小时后收集上清，分装冻存于 -75℃，即获得假病毒液用于后续实验。

2.2 萤光素酶法测定假病毒的感染性滴度 (TCID₅₀)

测定假病毒感染性滴度时，先梯度稀释病毒收获液，取 100 ul 加入 96 孔板，每个梯度 4 个复孔，再加入 100ul GHOST X4/R5 细胞悬液，细胞密度 10⁵ cells/ml。培养 48 小时后，利用 Bright-Glo™ luciferase assay system 试剂测定每孔的相对荧光值 (RLU)，RLU 大于 2.5 倍的背景值，判定为阳性，采用 Reed-Muench 方法计算假病毒的感染性滴度 (TCID₅₀)。

2.3 萤光素酶法测定药物的半数抑制病毒活性 (EC₅₀)

对受试药物进行 3 倍梯度稀释 (起始浓度 30ug/ml，共进行 6 个稀释度)，每孔加入 200 TCID₅₀ 感染剂量的假病毒液和 10⁵ cells/ml 密度的测试细胞，每个稀释度设置 2 个重复孔，每次测试设置 6 个阴性对照孔 (只加入测试细胞) 与 6 个阳性对照孔 (只加病毒与测试细胞)。培养 48 小时后，利用 Bright-Glo™ luciferase assay system 试剂测定每孔的相对荧光值 (RLU)。计算药物半数抑制浓度 (EC₅₀) 时，将药物浓度转化为 lg 浓度值，并计算每个浓度样品孔的平均 RLU。抑制率计算公式：

$$\text{抑制率} = \left[1 - \frac{\text{加药孔平均RLU} - \text{阴性孔平均RLU}}{\text{阳性孔平均RLU} - \text{阴性孔平均RLU}} \right] \times 100\%$$

EC₅₀ 计算使用 GraphPad Prism 2.0 软件，采用非线性回归分析中四参数 S 型剂量方程，分析每种药物的 EC₅₀ 值及药物抑制曲线。

2.4 MTT 法测定药物对细胞的半数毒性浓度 (TC₅₀)

将受试细胞接种于 96 孔板，每孔 100ul，密度 10⁵ cells/ml。分别加入 5 倍稀释的各浓度的受试药物 100 ul，每个浓度设置 4 个重复孔，共 8 个浓度梯度。培养 48 小时后加入 100ul MTT (5 mg/ml) 孵育 4 小时，吸弃上清，

加入 100 μ l DMSO, 溶解 0.5 小时后, 测定 OD_{562nm} 吸收值, Reed-Muench 方法计算 TC₅₀。

2.5 萤光素酶法确定药物抑制病毒的作用机制

先将 GHOST X4/R5 细胞接种于 96 孔板, 每孔 100 μ l, 密度 10^5 cells/ml。然后每孔加入 200 TCID₅₀ 感染剂量的假病毒液。在加入病毒后不同时间点(0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 24 小时)加入受试药物与培养基(阳性对照), 每个时间点设置 3 个复孔。药物浓度: Dextran sulfate 100 μ g/ml, AZT 2 μ g/ml, nevirapine 2 μ g/ml, LSA 30 μ g/ml。培养 48 小时后, 利用 Bright-Glo™ luciferase assay system 试剂测定每孔的相对荧光值(RLU)。将每个时间点的阳性对照的平均 RLU 设定为 100%, 计算不同时间点的受试药物孔的平均 RLU 与其的比值, 即得到相对感染百分数。根据不同时间点上受试药物的相对感染百分数作出受试药物时间抑制曲线。

2.6 CHO-WT—MT-2 共培养融合抑制实验

将 3×10^5 的 CHO-WT 和 MT-2 共同接种于 24 孔板中, 加入不同浓度的 LSA (30, 10, 3.3, 1.1, 0.37, 0 μ g/ml), 培养过夜后, 镜检合胞体形成并计数。

3. 实验结果

3.1 在图 1 中, 利用假病毒系统检测木质素磺酸盐抑制 HIV-1 B 亚型标准毒株 JR-FL (R5 嗜性) 和 HXB2 (X4 嗜性) 对表达 CD4 受体、CCR5 与 CXCR4 辅助受体的 GHOST X4/R5 细胞的感染, 发现其具有明显的抑制效果, 抑制 EC₅₀ 分别为 1.44 μ g/ml 和 3.31 μ g/ml, 如图 4 所示。

3.2 在图 1 中, 利用假病毒系统检测木质素磺酸盐抑制 HIV-1 临床分离毒株对表达 CD4 受体、CCR5 与 CXCR4 辅助受体的 GHOST X4/R5 细胞的感染, HIV-1 临床分离毒株包括 CNE6 (B' 亚型, R5 嗜性)、CNE30 (B' C 亚型, R5 嗜性)、CNE50 (B' C 亚型, R5 嗜性) 和 CNE55 (CRF01-AE 亚型, R5 嗜性), 发现其具有明显的抑制效果, 抑制 EC₅₀ 分别为 0.72 μ g/ml、5.05 μ g/ml、2.88 μ g/ml 和 2.71 μ g/ml, 如图 4 所示。

3.3 在图 2 和 3 中,利用假病毒系统检测木质素磺酸盐抑制 HIV-1 标准毒株 JR-FL 和 HXB2 以及多个 HIV-1 临床分离毒株对不表达 CD4 受体的 Caco-2 和 C33A 细胞的感染,发现其具有一定的抑制效果,相应的 EC_{50} 见图 4。

3.4 利用 MTT 法检测木质素磺酸盐对多个人细胞株的毒性,发现其在有效抗病毒浓度下对细胞基本无毒性,如图 5 所示,对人阴道上皮细胞(VK2)、人结肠癌上皮细胞(Caco-2)、人宫颈癌上皮细胞(C33A)、人 T 细胞系白血病细胞(MT-2)和人骨肉瘤细胞(GHOST X4/R5)的 TC_{50} 值分别为 $690.45 \mu g/ml$ 、 $1147.23 \mu g/ml$ 、 $420.78 \mu g/ml$ 、 $308.64 \mu g/ml$ 和 $726.34 \mu g/ml$,如图 6 所示。

3.5 利用假病毒系统确定木质素磺酸盐抑制 HIV-1 感染 GHOST X4/R5 细胞的作用方式和原理,在图 7 中,比较受试药物时间抑制曲线,发现木质素磺酸盐(LSA)与硫酸葡聚糖(Dextran sulfate)的曲线走向相似,可以推测木质素磺酸盐的作用方式与硫酸葡聚糖相似,是通过阻止 HIV-1 病毒进入细胞来实现抑制病毒的。

3.6 利用 CHO-WT—MT-2 共培养融合检测木质素磺酸盐抑制 gp120 和 CD4 介导的细胞融合效果,发现木质素磺酸盐能有效抑制 CHO-WT 与 MT-2 细胞的融合,如图 8 和 9 所示,从木质素磺酸盐抑制 HIV-1 病毒包膜蛋白介导的融合过程,进一步说明木质素磺酸盐是阻止 HIV-1 病毒进入细胞来实现抑制病毒的。

我们的研究表明,木质素磺酸盐在体外具有很强的抗 HIV-1 的活性,其作用机制主要是阻断 HIV-1 病毒与靶细胞结合,从而阻断其感染。同时对于 CD4 依赖与非依赖型的 HIV-1 感染,木质素磺酸盐都有明显的抑制效果。另外,细胞融合实验结果表明木质素磺酸盐具有抑制 HIV-1 病毒包膜蛋白介导的融合过程的作用。最后,细胞毒性试验表明其在有效抗病毒浓度下对细胞基本无毒性。木质素磺酸盐来源丰富,生产成本低廉,可以作为一种新型潜在抗 HIV-1 药物及杀微生物剂得到应用。

在制备抑制 HIV-1 感染的药物组合物时,将木质素磺酸盐作为有效成分,并加上常规的药用载体。该药物组合物可制成注射剂、片剂、胶囊剂、气雾剂、栓剂、膜剂、滴丸剂、外用搽剂,或控释或缓释剂型或纳米制剂。

权利要求书

- 1、木质素磺酸盐在制备抑制 HIV-1 感染的药物中的应用。
- 2、药物组合物，其中含有木质素磺酸盐作为有效成分，并含有常规药用载体。
- 3、如权利要求 2 所述的药物组合物，制成注射剂、片剂、胶囊剂、气雾剂、栓剂、膜剂、滴丸剂、外用搽剂，或控释或缓释剂型或纳米制剂。

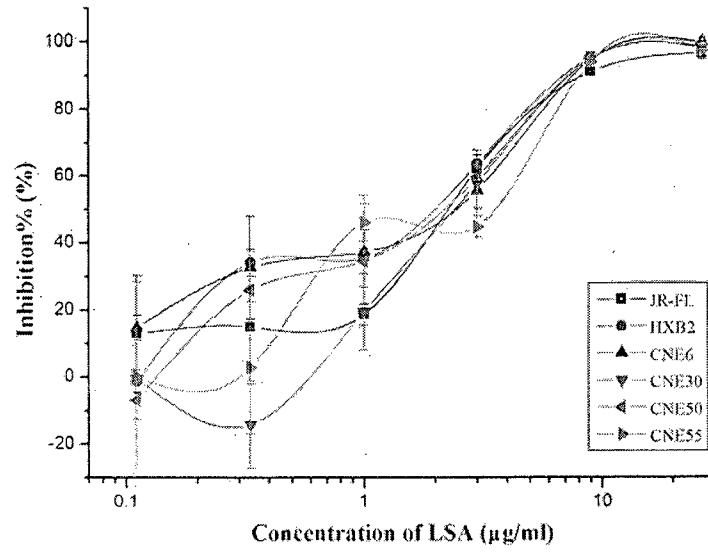


图 1

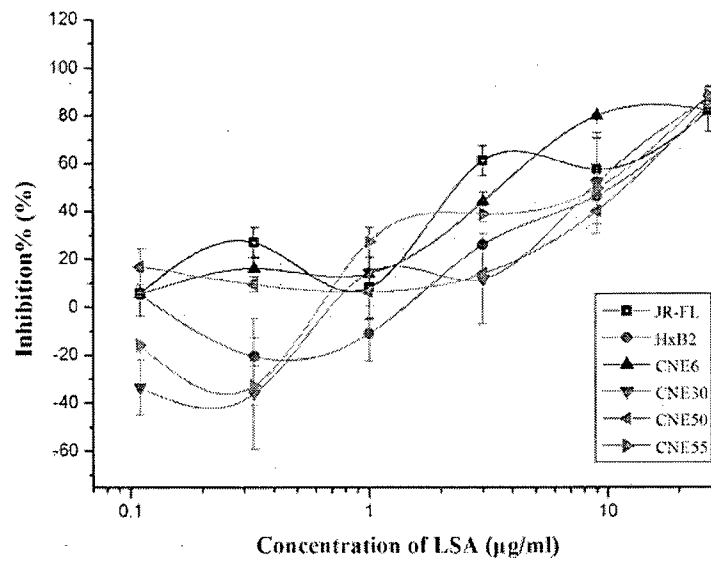


图 2

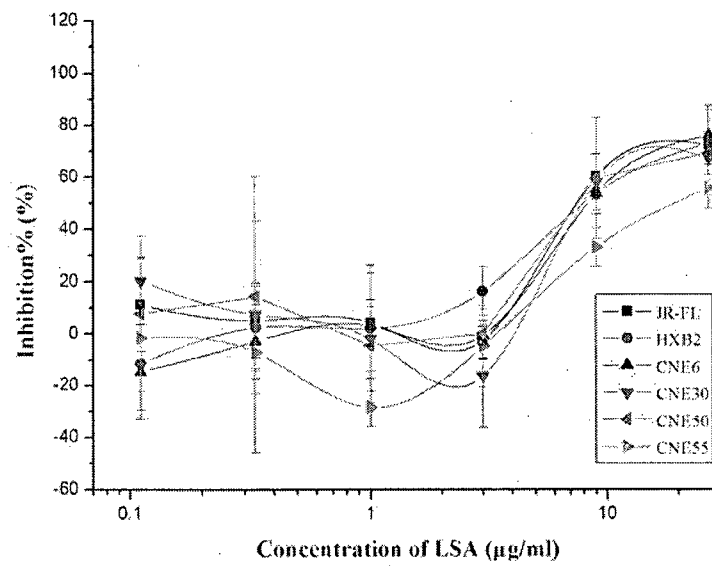


图 3

EC ₅₀ value of anti-HIV-1 effect of LSA (µ g/ml)			
	Ghost(3) X4-Hi5	C33A	Caco-2
JR-FL	1.44299	17.131	8.08956
HXB2	3.31089	10.77288	8.07794
CNE6	0.71715	17.06199	4.66908
CNE30	5.05487	17.50047	7.47889
CNE50	2.88295	16.91008	9.41740
CNE55	2.70973	18.89692	4.34033

图 4

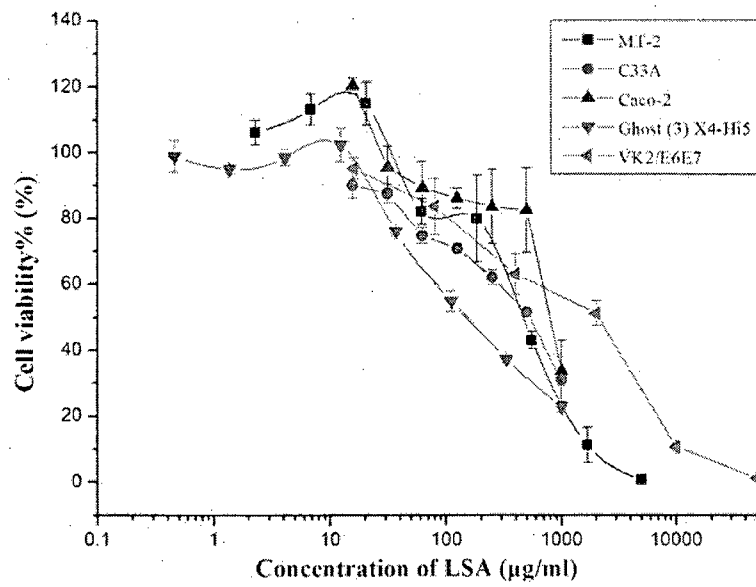


图 5

Cell line	TC ₅₀ value (μg/ml)
MT-2	308.64303
C33A	420.77992
Caco-2	1147.23354
Ghost (3) X4-Hi5	726.34152
VK2	690.45319

图 6

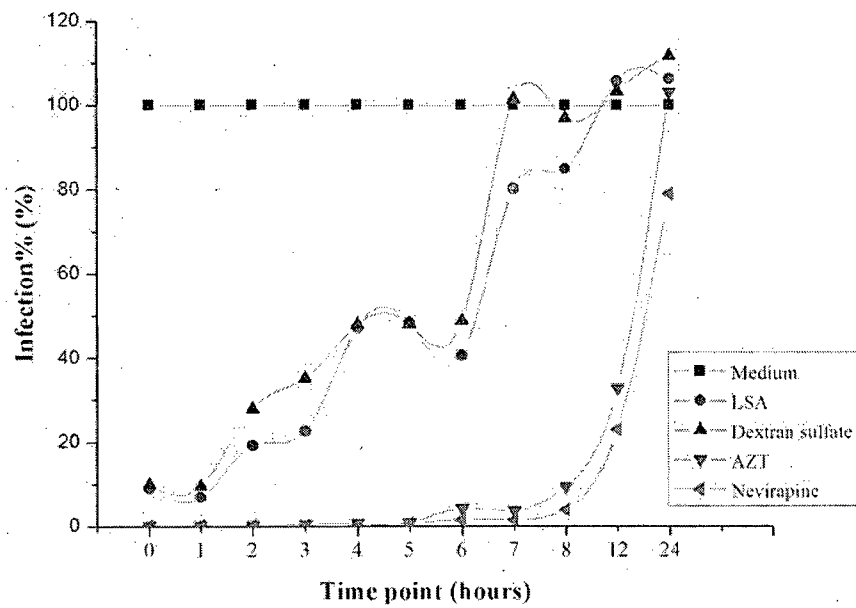


图 7

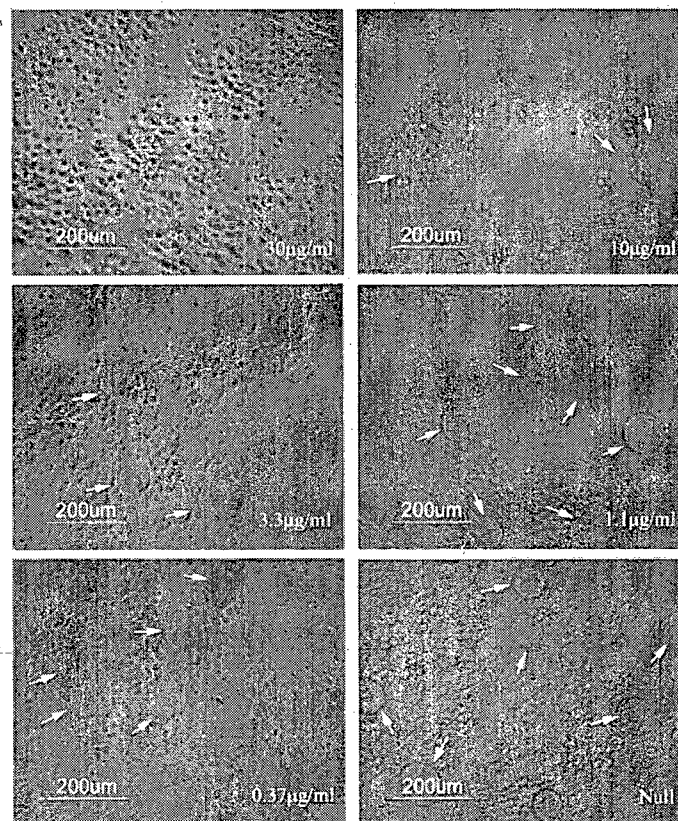


图 8

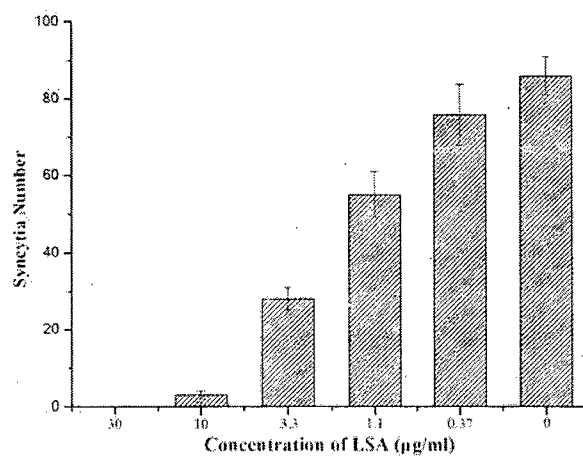


图 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/070730

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI; EPODOC; CNKI; CNPAT; lignosulfonate, aids, immunodeficiency, HIV

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP2000-191520A (SAKU-I) , 11 Jul. 2000 (11.07.2000) the claims, paragraphs 0025—0037, 0048 of the description	1-3

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

01 Sep. 2011 (01.09.2011)

Date of mailing of the international search report

20 Oct. 2011 (20.10.2011)

Name and mailing address of the ISA/CN
The State Intellectual Property Office, the P.R.China
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China
100088
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

LV Qing

Telephone No. (86-10)62411198

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2011/070730

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP2000-191520A	11.07.2000	none	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/070730

Continuation of: CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/185 (2006.01)i

A61P31/18 (2006.01)i

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2011/070730

A. 主题的分类

参见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: A61K, A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

WPI; EPODOC; CNKI; CNPAT; 木质素磺酸盐, 艾滋病, 免疫缺陷, HIV

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	JP2000-191520A (佐久間 和夫), 11.07 月 2000 (11.07.2000) 权利要求, 说明书第 0025—0037, 0048 段	1—3

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

01.09 月 2011(01.09.2011)

国际检索报告邮寄日期

20.10 月 2011 (20.10.2011)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

吕青

电话号码: (86-10) **62411198**

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2011/070730

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
JP2000-191520A	11.07.2000	无	

续：主题的分类

A61K31/185(2006.01)i

A61P31/18(2006.01)i