



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102924552 B

(45) 授权公告日 2014. 09. 10

(21) 申请号 201210454520. 0

(22) 申请日 2012. 11. 14

(73) 专利权人 南京中医药大学

地址 210029 江苏省南京市汉中路 282 号

(72) 发明人 董伟 潘扬 孙钰 詹臻 彭薇

(74) 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司 32200

代理人 杨海军

(51) Int. Cl.

C07H 19/23 (2006. 01)

C12P 19/38 (2006. 01)

A61K 31/706 (2006. 01)

A61P 31/22 (2006. 01)

审查员 王丽

权利要求书1页 说明书5页

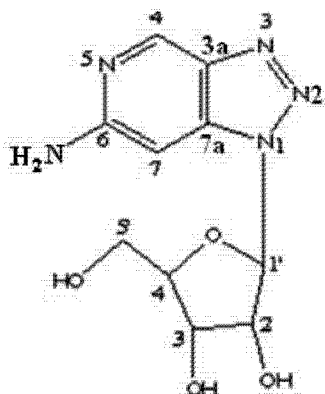
(54) 发明名称

一种具有抗疱疹病毒作用的化合物

(57) 摘要

本发明公开了一种具有抗疱疹病毒作用的化合物,该化合物的原材料易得,成本较低,可持续开发,应用前景广泛,实验结果表明,本发明分离得到的新化合物抗单纯疱疹病毒活性强,并且经毒性实验结果表明,本发明提供的有效剂量较小,毒性小,不良反应低,使用更安全;并且能和不同的赋形剂制备成不同的药物剂型,能方便临床应用。

1. 具有如下结构式的化合物在制备抗疱疹病毒药物中的应用，



2. 根据权利要求 1 所述的具有如下结构式的化合物在制备抗疱疹病毒药物中的应用，其特征在于：所述的疱疹病毒为单纯疱疹病毒 1 型或 2 型。

3. 根据权利要求 2 所述的具有如下结构式的化合物在制备抗疱疹病毒药物中的应用，其特征在于：将化合物和药学上可接受的载体制备成片剂、粉针剂、颗粒剂、胶囊、凝胶剂、乳剂、膏剂、霜剂或口服液剂型的药物。

一种具有抗疱疹病毒作用的化合物

技术领域

[0001] 本发明涉及一种化合物,具体涉及一种具有抗疱疹病毒作用的化合物。

背景技术

[0002] 人们生活节奏快,生活压力大,在免疫力低下时,容易感染疱疹病毒,其中 HSV-1 感染能引起唇疱疹、疱疹性甲沟炎和其他皮疹如外伤性疱疹、疱疹性湿疹,疱疹性角膜炎等;HSV-2 能引起生殖器疱疹、疱疹性直肠炎等,临床表现变化多样,常不典型或无症状,且可造成潜伏感染,易被人们忽视,同时也是 HSV 水平和垂直传播的重要因素。目前抗疱疹病毒的本发明提供的化合物包括:核苷类本发明提供的化合物:一代为阿昔洛韦 (ACV, 治疗 HSV 和 VZV 感染),二代为更昔洛韦、伐昔洛韦,三代为泛昔洛韦等,具有一定的疗效,但是这些本发明提供的化合物具有较大的副作用,应用受到了一定的限制,因此很有必要在现有技术的基础之上,寻找开发一种抗疱疹病毒作用强、不良反应小的本发明提供的化合物。

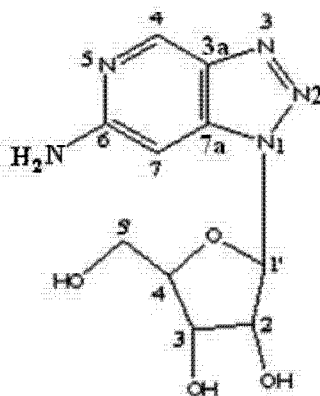
发明内容

[0003] 发明目的:本发明的目的是为了克服现有技术的不足,通过大量实验筛选,利用生物发酵技术,从巴豆中药材中分离得到一种具有抗疱疹病毒作用强、不良反应小,药源广阔的新化合物。

[0004] 技术方案:为了实现以上目的,本发明采取的技术方案为:

[0005] 一种具有抗疱疹病毒作用的化合物,其具有如下的结构式:

[0006]



[0007] 该新化合物命名为巴豆三氮唑苷,其化学名为:1-β-D-呋喃核糖-6-氨基-1,2,3-三氮唑并[5,4-d]吡啶。

[0008] 本发明提供的化合物在制备抗疱疹病毒药物中的应用。

[0009] 作为优选方案,本发明提供的化合物在制备抗疱疹病毒药物中的应用,所述的疱疹病毒为单纯疱疹病毒 1 型或 2 型。

[0010] 作为优选方案,以上所述的具有抗疱疹病毒作用的化合物在制备抗疱疹病毒药物

中的应用,根据临床需要,将化合物和药学上可接受的载体制备成片剂、粉针剂、颗粒剂、胶囊、凝胶剂、乳剂、膏剂、霜剂或口服液剂型的本发明提供的化合物。

[0011] 本发明提供的具有抗疱疹病毒作用的化合物在制成片剂时,把化合物和载体乳糖或玉米淀粉,需要时加入润滑剂硬脂酸镁,混合均匀,然后压片制成片剂。

[0012] 本发明提供的具有抗疱疹病毒作用的化合物在制成胶囊剂时,把化合物和载体乳糖或玉米淀粉混合均匀,整粒,然后装胶囊制成胶囊剂。

[0013] 本发明提供的具有抗疱疹病毒作用的化合物在制成颗粒剂时,把化合物和稀释剂乳糖或玉米淀粉混合均匀,整粒,干燥,制成颗粒剂。

[0014] 本发明提供的具有抗疱疹病毒作用的化合物的制备方法,具体包括以下步骤:

[0015] 将巴豆进行固体发酵,得到发酵巴豆后,将发酵巴豆用甲醇提取,浓缩得到的浸膏悬浮于水中,依次用乙酸乙酯和正丁醇进行萃取,得到乙酸乙酯部位、正丁醇部位,然后利用硅胶柱色谱,以二氯甲烷-甲醇体系作为洗脱剂,对所得的正丁醇部位进行梯度洗脱,薄层色谱跟踪,合并洗脱液,浓缩,纯化后得到新化合物——巴豆三氮唑苷(1- β -D-呋喃核糖-6-氨基-1,2,3-三氮唑并[5,4-d]吡啶)。

[0016] 有益效果:本发明提供的具有抗疱疹病毒作用的化合物和现有技术的药物相比具有以下优点:

[0017] 1、原材料易得,成本较低,可持续开发,应用前景广泛,实验结果表明,本发明分离得到的新化合物抗单纯疱疹病毒活性强,并且经毒性实验结果表明,本发明提供的有效剂量较小,毒性小,不良反应低,使用更安全;

[0018] 2、本发明提供的具有抗疱疹病毒作用的化合物能和不同的赋形剂制备成不同的药物剂型,能方便临床应用。

具体实施方式

[0019] 根据下述实施例,可以更好地理解本发明。然而,本领域的技术人员容易理解,实施例所描述的具体的物料配比、工艺条件及其结果仅用于说明本发明,而不应当也不会限制权利要求书中所详细描述的本发明。

[0020] 实施例1 新化合物的制备

[0021] 将巴豆进行固体发酵,得到发酵巴豆后,将发酵巴豆用50~80%浓度的甲醇回流提取3次,每次2小时,得提取液浓缩得到浸膏,将浸膏悬浮于水中,依次用6倍体积的乙酸乙酯和6倍体积的正丁醇进行萃取,得到乙酸乙酯部位、正丁醇部位,然后利用硅胶柱色谱,以二氯甲烷-甲醇体系作为洗脱剂,对所得的正丁醇部位进行梯度洗脱(100:1,100:5,100:10,100:20,100:30,100:40,100:50),薄层色谱跟踪,合并二氯甲烷-甲醇(100:30,100:40),洗脱液,浓缩,重结晶纯化后得到新化合物——巴豆三氮唑苷(1- β -D-呋喃核糖-6-氨基-1,2,3-三氮唑并[5,4-d]吡啶)。

[0022] 该化合物,白色针状结晶体,微溶于水,溶于甲醇等有机试剂。结构式及UV、IR、MS谱和¹HNMR、¹³CNMR归属分别简析如下:

[0023] 紫外光谱 λ_{CH_3OH} :209(logE=3.15),259(logE=3.20)。

[0024] 红外光谱:3328.88cm⁻¹为羟基吸收振动,1664.89cm⁻¹和1609.44cm⁻¹为芳环吸收振动,1097.28为胺的伸缩振动。

[0025] 质谱 (TOF-MS) m/z : ESI 正离子模式, 母离子为 $[M+H]^+$, 经校正后测定精确值为 268.1017, 质量允差为 -10.8 ppm ; 通过工作站数据库检索, 推断新化合物的分子式为 $C_{10}H_{13}N_5O_4$, 不饱和度为 7。

[0026] DEPT 谱 (inDMSO , δ ppm), 5 个烯碳信号: δ 156.11, 152.31, 119.32, 139.83, 149.03。5 个连氧的脂肪族碳信号: δ 87.87, 73.39, 70.60, 85.82, 61.62。

[0027] $^1\text{H-NMR}$ 谱 (DMSO , δ ppm) 中显示有两个烯氢质子: δ 8.13 (1H, s), δ 8.35 (1H, s), 芳香胺上的氢: δ 7.3 (2H, br. s), 四个脂肪族氢质子: δ 5.88 (1H, d), δ 4.60 (1H, q), δ 4.14 (1H, m), δ 3.96 (1H, q), 醇羟基上的三个氢信号: δ 5.40 (1H, d), δ 5.12 (1H, d), δ 5.38 (1H, dd), 1 个 CH_2 : δ 3.68 (1H, dt), δ 3.56 (1H, m)。

[0028] $^1\text{H}-^1\text{H-COSY}$ (inDMSO , δ ppm) 谱中, H-1' 与 H-2', H-2' 与 H-3', C-4' 与 C-3', CH_2 -5' 的相互相关, 说明它们分别两两相连。

[0029] 通过 HMBC (inDMSO , δ ppm) 来确定未知取代基的位置: H-4 和 C3a 相关, H-7, C6-NH₂ 与 C6 相关, H-4, H-1' 与 C7a 相关, H-7, H-4, H-1' 与 C7a 相关, C2'-OH, H-3' 与 C1' 相关, C2'-OH, CH_2 与 C3' 相关, C3'-OH, H2-5' 与 C4' 相关, C5'-OH, H-3' 与 C5' 相关。

[0030] 实施例 2 抗疱疹病毒实验

[0031] 1 实验方法

[0032] 1.1 化合物毒性试验

[0033] 以 10% 小牛血清 RPMI-1640 培养基培养 vero 细胞, 按 1×10^5 的浓度, 接种到 96 孔细胞培养板上, 每孔 0.2mL, 18 ~ 24h 长成单层细胞, 弃去上清, 备用。将本发明提供的化合物 (巴豆三氮唑苷) 以培养基对倍连续几个浓度, 200 μL 每孔, 每浓度 4 复孔, 培养 72h。每孔加入 20 μL 5mg/ml 的 MTT 溶液, 继续培养 4h, 倾去上清, 加入 0.2mL DMSO, 570-630nm 双波长法测 O.D 值, 计算本发明提供的化合物 TC₅₀。

[0034] 1.2 化合物抗 HSV- I 的 CPE 实验和 MTT 实验

[0035] vero 细胞按 1×10^5 的浓度, 接种到 96 孔细胞培养板上, 每孔 0.2mL, 18 ~ 24h 长成单层细胞, 弃去上清, 备用。分 3 种方式实验: ① 抗病毒感染实验: 加入 100TCID₅₀ HSV- I 20 μL , 吸附 1h, 弃去未吸附的病毒, 加入含 2% 小牛血清 RPMI-1640 各浓度本发明提供的化合物 0.2mL, 37°C 5% CO₂ 培养 72h。② 本发明提供的化合物直接杀病毒实验: 将各浓度本发明提供的化合物与病毒液按 10:1 混合, 4°C 作用 2h, 0.2mL 加入各孔 1h, 弃上清, 加入含 2% 小牛血清 RPMI-1640 0.2mL, 37°C 5% CO₂ 培养 72h。③ 本发明提供的化合物预防病毒感染实验: 每孔先加入各浓度本发明提供的化合物 0.2mL, 37°C 5% CO₂ 培养 8h 和 24h 后, 吸取上清, 加入 100TCID₅₀ HSV- I 20 μL , 吸附 1h, 弃去未吸附的病毒, 加入含 2% 小牛血清 RPMI-1640 各浓度本发明提供的化合物 0.2mL, 37°C 5% CO₂ 培养 72h。设正常细胞、病毒对照和阳性药阿昔洛韦对照, 每日观察 CPE 记录实验结果。每孔加入 20 μL 5mg/ml 的 MTT 溶液, 继续培养 4h, 倾去上清, 加入 0.2mL DMSO, 570-630nm 双波长法测 O.D 值。

[0036] 1.3 本发明提供的化合物对病毒 TKmRNA 表达的荧光定量 PCR 实验

[0037] 荧光定量 PCR 实验

[0038] 质粒以 10 倍配制连续稀释, 制备标准曲线。按 SYBRPrimescriptRT-PCR 试剂盒说明书检测目的基因, 其中上下游引物各 0.4 $\mu\text{mol/L}$, SYBR 混合液 10 μL , 模板 1 μL , 以超纯水补足至反应体系 20 μL 。反应条件为 94°C 2min; 94°C 30sec, 60°C 35sec, 40 循环。

[0039] 2 实验结果

[0040] 2.1 本发明提供的化合物对细胞的毒性

[0041] 不同浓度本发明提供的化合物对细胞的毒性主要表现在：细胞增殖减慢，胞浆颗粒增多，部分细胞脱落死亡。MTT法实验结果显示化合物对 vero 的 TC50 为 $2.96 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，本发明提供的化合物为 $1.25 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时细胞存活率为 85.8%。

[0042] 2.2 本发明提供的化合物抗 HSV- I 的 CPE 实验和 MTT 实验

[0043] 显微镜下每日观察 CPE 结果：抗病毒感染实验表明 24h 细胞对照没有病变，病毒对照明显病变，阳性对照病变轻微， $1 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 本发明提供的化合物作用下 vero 病变程度与阳性药相同，表现出较明显的抑制 HSV- I 感染的效果，并且本发明提供的化合物在 24 小时药效最强。本发明提供的化合物作用随浓度下降而降低。具体结果见表 1。

[0044] 表 1 本发明提供的化合物抗 HSV- I 的 CPE 实验

	浓度	CPE24h	CPE48h	CPE72h
[0045]	本发明提供的化合物组	+	++++	++++
	0.5	++	++++	++++
	($\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$) 0.25	++	++++	++++
	0.125	++	++++	++++
	0.0625	+++	++++	++++
	病毒组	+++	++++	++++
	阿昔洛韦	±	—	—
	细胞组	—	—	—

[0046] “—”表示细胞没有发生病变，“+”表示大约 25% 的细胞发生了病变，“++”表示大约 50% 的细胞发生病变，“+++”表示大约 75% 的细胞发生病变，“++++”表示 100% 的细胞发生病变。

[0047] 2.3 本发明提供的化合物对 HSV-1 的 TKmRNA 表达的影响

[0048] 实验结果表明，本发明提供的化合物 6h 抗疱疹病毒组与病毒组相比，HSV- I TK 明显减少， $P < 0.01$ 。12h、24h 本发明提供的化合物抗病毒组 HSV- I -TK 拷贝数也低于病毒组。具体结果见表 2。

[0049] 表 2 荧光定量 RT-PCR 检测 HSV- I -TK 拷贝数 ($n = 3$)

	组别	病毒组	本发明提供的化合物抗病毒
[0050]	6h(1×10^5)	15.13	1.172*
	12h(1×10^5)	63.92	39.7
	24h(1×10^5)	107.5	87.33
	48h(1×10^5)	25.23	51.56

[0051] *表示 6h 本发明提供的化合物抗 HSV- I 的 TKmRNA 的拷贝明显低于病毒组，

[0052] $P < 0.01$ 。

[0053] 由以上以上实验结果表明，本发明提供的化合物具有明显的抗病毒作用，并且毒性较小，具有很强的应用前景，有望开发成新的抗疱疹病毒的药物。

[0054] 以上实施方式只为说明本发明的技术构思及特点，其目的在于让熟悉此项技术的人了解本发明内容并加以实施，并不能以此限制本发明的保护范围，凡根据本发明精神实质所做的等效变化或修饰，都应涵盖在本发明的保护范围内。