



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105878231 A

(43) 申请公布日 2016.08.24

(21) 申请号 201510036805.6

(22) 申请日 2015.01.26

(71) 申请人 复旦大学

地址 200433 上海市杨浦区邯郸路 220 号

(72) 发明人 朱焕章 曲喜英 朱豫琪 朱晓丽

牛姗 刘一丹

(74) 专利代理机构 上海元一成知识产权代理事

务所(普通合伙) 31268

代理人 吴桂琴

(51) Int. Cl.

A61K 31/352(2006.01)

A61K 45/06(2006.01)

A61P 31/18(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图2页

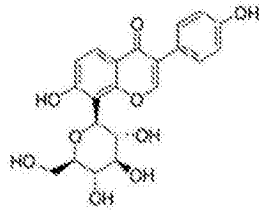
(54) 发明名称

黄酮类化合物在制备抗 HIV 潜伏的治疗药物中的用途

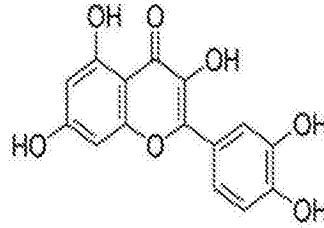
(57) 摘要

本发明属于医药领域,涉及黄酮类化合物在制备抗 HIV 潜伏的治疗药物中的用途。所述类化合物已被应用于临床试验(I 或 II 期);本发明经试验表明该类化合物具有诱导 HIV 潜伏细胞激活的作用,与 PKC 激活剂 Prostratin 和组蛋白去乙酰化酶抑制剂 VPA 联合使用具有协同激活作用,且有效浓度内对细胞毒性较低,可用于制备抗 HIV 潜伏的治疗药物,将为艾滋病的彻底治愈提供新的途径。

1. 黄酮类化合物在制备抗 HIV 潜伏的治疗药物中的用途，所述的黄酮类化合物选自槲皮素 (quercetin) 或葛根素 (Puerarin)，所述的化合物结构式为：



Puerarin



Quercetin

2. 按权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述的黄酮类化合物激活 HIV 潜伏感染细胞，并最终清除所述的潜伏病毒。

3. 按权利要求 1 或 2 所述的用途，其特征在于，所述的黄酮类化合物与抗 HIV 药物结合激活、清除潜伏病毒。

4. 按权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述的 HIV 潜伏感染细胞选自人单个核细胞，人巨噬细胞，人 CD4T 淋巴细胞，人肥大细胞，人树突细胞，人滤泡样树突细胞，人造血祖细胞，人自然杀伤细胞、人神经元或少突神经胶质细胞。

5. 按权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述的抗 HIV 药物选自：

(1) 核苷类逆转录酶抑制剂，或 (2) 非核苷类逆转录酶抑制剂，或 (3) 蛋白酶抑制剂。

6. 按权利要求 5 所述的用途，其特征在于，所述的抗 HIV 药物中：

(1) 核苷类逆转录酶抑制剂选自①齐多夫定 zidovudine，②地丹诺辛 didanosine，③扎西他滨 Zalcitabine，④司他夫定 Stavudine，⑤拉米夫定 Lamivudine，或⑥阿巴卡韦 abacavir；

(2) 非核苷类逆转录酶抑制剂选自①奈韦拉平 nevirapine，②地拉韦啉 delavird，或③依非韦伦 efavirene；

(3) 蛋白酶抑制剂选自①沙奎那韦 saquinavir，②茚地那韦 indinavir，③利托那韦 ritonavir，④奈非那韦 nelfinavir 或⑤安普那韦 amprenavir。

黄酮类化合物在制备抗 HIV 潜伏的治疗药物中的用途

技术领域

[0001] 本发明属于医药领域,涉及黄酮类化合物在制备抗 HIV 潜伏的治疗药物中的用途。

背景技术

[0002] 研究公开了艾滋病即获得性免疫缺陷综合症,是一种由人体免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 引起的严重传染性疾病。病毒主要感染并破坏人体免疫系统最重要的 CD4⁺ T 淋巴细胞,导致免疫机能缺陷,抵抗力降低,最终由于各种机会性感染而死亡。HIV 于 1981 在临床诊断中被发现,随着人类对病毒及其感染过程的分子生物学研究以及药物研发的创新,艾滋病的治疗已经有了突飞猛进的发展。高效抗逆转录病毒疗法 (High Active Antiretroviral Therapy, HAART) 已经可以成功的将病人外周血病毒量控制在临床检测水平以下 (小于 50 拷贝 /mL),显著提高了病人的生存率和生存质量 (① Yeni, P. G. et al. Treatment for adult HIV infection: 2004 recommendations of the International AIDS Society-USA Panel. JAMA. 2004, 292:251-65。② Blankson, J. N. et al. The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. Annu Rev Med. 2002, 53:557-93) 人们曾寄希望于凭借 HAART 完全清除体内的 HIV,从而达到彻底治愈 AIDS 的目的。但遗憾的是随后的实践证明,一旦停止药物治疗,病毒载量又会反弹到治疗前水平 (Ho, D. D. Toward HIV eradication or remission: the tasks ahead. Science, 1998. 280:1866 - 1867.)。研究显示, HIV 难以在体内被完全清除的一个重要原因是病人体内存在潜伏病毒储存库。该潜伏病毒储存库主要是由长期潜伏感染的休眠记忆 CD4⁺T 细胞和在感染初期活化的 CD4⁺T 细胞被 HIV-1 感染后转化为记忆 T 细胞构成,潜伏细胞在未受刺激时不表达病毒基因,因而可以逃避机体免疫系统或抗逆转录病毒药物作用 (Chun, T. W. and Fauci, A. S. Latent reservoirs of HIV: obstacles to the eradication of virus. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96:10958-61.)。尽管感染个体携带潜伏感染细胞数量较少,但衰减率是如此之慢,以至于欲在个体生存期内仅靠 HAART 治疗将其彻底清除,至少在目前而言是不可能的。因此, HIV 潜伏感染的静息 CD4⁺T 细胞是构成机体内病毒储藏库 (reservoir) 的主要部分,同时也是目前临床治疗不能彻底清除 HIV 的巨大障碍 [Finzi, D. et al. Latent infection of CD4⁺T cells provides a mechanism for life long persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. Nature Med. 1999, 5, 512 - 517]。目前通过各种小分子化合物重激活潜伏的 HIV-1 前病毒,同时结合 HAART 达到减少潜伏病毒储存库甚至清除 HIV-1 的疗法,被称为免疫激活疗法 (Immunoactivation therapy, IAT), 该疗法已成为治疗艾滋病的主要策略 (Prins, J. M. et al. Immuno-activation with anti-CD3 and recombinant human IL-2 in HIV-1-infected patients on potent antiretroviral therapy. AIDS, 1999. 13, 2405-10.) , 也为病毒储存库的清除开辟了新的思路。

[0003] 目前用于激活 HIV-1 潜伏库的药物大致可分为以下几种:(1) 细胞因子和趋化

因子:如肿瘤坏死因子 a(TNF-a);(2) 组蛋白去乙酰化酶抑制剂:如 SAHA 和 VPA;(3) 组蛋白甲基化转移酶抑制剂:如 BIX01294;(4) DNA 甲基化转移酶抑制剂:主要是 5-Aza 以及它的衍生物;(5) 蛋白激酶 C 激活剂:如 prostratin 和 bryostatin-1;(6) 正向转录延长因子激活剂:如 HMBA 和 JQ1(S);(7) 其它未命名的物质:如 disulfiram。(Xing, S. and Siliciano, R. F. Targeting HIV latency: pharmacologic strategies toward eradication, Drug Discov Today, 2013. 18, 541-51);上述诱导剂分别与高效抗逆转录病毒疗法结合在临床上已取得了初步疗效,但仍存在着譬如激活效率不高或毒副作用等问题,所以本领域中需要开发更加安全有效的激活药物或寻求可以协同使用的药物。

[0004] 槲皮素 (Quercetin) 是一种从植物中提取的黄酮类化合物,化学名为 3,3',4',5,7-五羟基黄酮 (2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one 3,3',4',5,6-Pentahydroxyflavone Quercetin-3-O-rhamnoside), 研究显示其具有多种药理作用,治疗毒性较易控制。目前已被美国 FDA 批准用于 I, II 期临床试验。(① Beneficial Effects of Quercetin in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)-Full Text View-ClinicalTrials.gov。② Effect of Quercetin in Prevention and Treatment of Oral Mucositis-Full Text View-ClinicalTrials.gov)。

[0005] 葛根素 (Puerarin) 也属于黄酮类化合物,已经被证明有多种药理作用,目前已经应用到 II 期临床试验(① Puerarin Effects on Alcohol Drinking-Study Results-ClinicalTrials.gov。② The Effect of Puerarin Injection on Carotid Intima-Media Thickness in Patients With Rheumatoid Arthritis-Full Text View-ClinicalTrials.gov)。

[0006] 然而,迄今为止,尚未见有关于槲皮素 (Quercetin) 及葛根素 (Puerarin) 具有抗 HIV 潜伏治疗作用的报道。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供用于抗 HIV 潜伏治疗的化学药物。具体涉及黄酮类化合物在制备抗 HIV 潜伏的治疗药物中的用途,尤其涉及本发明的黄酮类化合物激活 HIV 潜伏感染细胞,并最终清除所述的潜伏病毒。

[0008] 为了证实所述的化学药物是否对 HIV 潜伏感染细胞有使其潜伏病毒再次激活作用,本发明的技术方案如下所述。

[0009] 本发明所用主要试剂材料如下:

[0010] 本发明选用的 HIV 潜伏感染细胞模型是由本实验室构建的,该细胞是用携带绿色荧光蛋白 (EGFP) 报告基因的 HIV-1 假病毒 (pNL4-3-EGFP) 感染人 T 淋巴细胞 Jurkat 株,通过细胞分选获得表达 GFP 阳性和阴性细胞群,该 HIV 潜伏感染模型已获得中国专利授权(朱焕章,辛清婷;刘绍辉;唐丽莎;余龙,一种筛选激活潜伏感染 HIV 化合物的 T 细胞及制备方法,专利号:ZL200810038851.X)。该细胞模型生物学特性是整合有 HIV 病毒假基因,但病毒基因并不表达(基因沉默);绿色荧光蛋白由于可在活细胞上观察特点,因而,绿色荧光蛋白作为该模型的报告基因,即作为潜伏感染细胞是否被激活的标记。

[0011] 本发明所采用的黄酮类化合物包括:槲皮素 (quercetin) 和葛根素 (Puerarin),来源于 SIGMA,货号分别为 Sigma Q4951 和 Sigma P5555,均溶于 DMSO(购自 SIGMA),储存浓

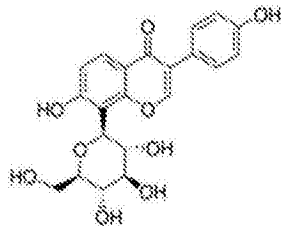
度 100mM。

[0012] 本发明中,所述的 HIV 潜伏感染细胞选自:人单个核细胞,人巨噬细胞,人 CD4T 淋巴细胞,人肥大细胞,人树突细胞,人滤泡样树突细胞,人造血祖细胞,人自然杀伤细胞、人神经元或少突神经胶质细胞,等等。

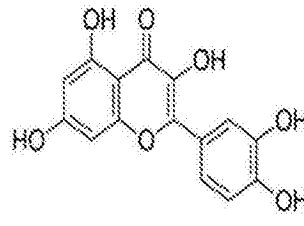
[0013] 本发明中,黄酮类化合物药物与抗 HIV 药物结合具有激活清除潜伏病毒并最终清除作用。

[0014] 本发明中,所述的黄酮类化合物具有如下化合物结构式:

[0015]



Puerarin 结构式



Quercetin 结构式

[0016] 本发明中,所述的抗 HIV 药物为:

[0017] (1) 核苷类逆转录酶抑制剂:①齐多夫定 zidovudine (AZT 或 ZDV);②地丹诺辛 didanosine (ddl, Videx);③扎西他滨 Zalcitabine (ddc);④司他夫定 Stavudine (d4T);⑤拉米夫定 Lamivudine (3TC);⑥阿巴卡韦 abacavir (1592U89Ziagen);

[0018] (2) 非核苷类逆转录酶抑制剂 (NNRTI):①奈韦拉平 nevirapine;②地拉韦啉 delavird;③依非韦伦 efavirene;

[0019] (3) 蛋白酶抑制剂:①沙奎那韦 saquinavir;②茚地那韦 indinavir;③利托那韦 ritonavir;④奈非那韦 nelfinavir;⑤安普那韦 amprenavir。

[0020] 本发明通过下述的技术方案实现:

[0021] (1) Quercetin 和 Puerarin 药物的不同浓度对 HIV 潜伏诱导激活效率的影响试验

[0022] 本发明以浓度为 5 μ M-40 μ M 的药物处理 HIV 潜伏感染细胞模型,在药物处理后的 3 天,通过对报告基因绿色荧光蛋白的荧光显微镜观察和流式细胞术检测,分析 HIV 潜伏感染细胞的激活效率,从而获得药物作用的剂量效应关系;

[0023] 结果显示,随着 Quercetin 和 Puerarin 化合物浓度的升高,细胞模型中表达绿色荧光的细胞数目增多;HIV 潜伏感染细胞经 Quercetin (20 μ M) 处理后绿色荧光阳性的细胞比例达高达 13.7%;Puerarin 在 20 μ M 浓度时荧光阳性的细胞细胞比例达 9.7%。未加诱导剂处理的 HIV 潜伏感染细胞,其荧光阳性的细胞比例仅有不到 2% 背景激活;结果表明,Quercetin 和 Puerarin 化合物具有对 HIV 潜伏感染细胞的激活作用,其较好激活浓度为 20 μ M,且具有剂量效应关系;

[0024] (2) Quercetin 和 Puerarin 药物的作用时间对 HIV 潜伏诱导激活效率的影响试验

[0025] 以 20 μ M 药物浓度处理 HIV 潜伏感染细胞模型,在药物处理后的 1 天,2 天,3 天,4 天时间内,通过对报告基因绿色荧光蛋白的荧光显微镜观察和流式细胞术检测,分析 HIV 潜伏感染细胞的激活效率,从而获得药物作用的时间效应关系;

[0026] 结果显示,Quercetin 和 Puerarin 分别处理 HIV 潜伏感染细胞模型,随着时间延伸,绿色荧光阳性的细胞数目逐渐增多,Quercetin 在处理 HIV 潜伏感染细胞模型 72h 后绿

色荧光阳性的细胞比例达最高 13%，而 Puerarin 在处理 HIV 潜伏感染细胞模型 72h 后绿色荧光阳性的细胞比例达最高 10%；表明两药物具有时间效应关系；

[0027] (3) Quercetin 和 Puerarin 对细胞的毒性作用试验

[0028] 以不同浓度的药物处理 HIV 潜伏感染细胞，在药物处理后的 72h 内通过 CCK-8 方法检测细胞的增殖活性，计算出药物对细胞的半数毒性浓度 (CC50)，从而得到药物对细胞的毒性作用；

[0029] 结果显示，Quercetin 和 Puerarin 药物对人正常细胞的半数毒性浓度分别为 $CC50 = 160 \mu M$ 和 $CC50 = 120 \mu M$ ，即 Quercetin 在浓度为 $160 \mu M$ 处理细胞时，有 50% 被处理细胞显示毒性，Puerarin 在浓度为 $120 \mu M$ 处理细胞时，有 50% 被处理细胞显示毒性，CC50 越高，其细胞毒性越低；因而，该结果表明 Quercetin 和 Puerarin 在有效浓度内对细胞毒性较低，为临床应用奠定了基础；

[0030] (4) Quercetin 和 Puerarin 与 PKC 激活剂 Prostratin 和组蛋白去乙酰化酶抑制剂 valproic acid (VPA) 协同激活作用试验

[0031] 基于每个 HIV 潜伏感染细胞状态并不完全一样，因而，HIV 潜伏机制是不一样的；为了最大化激活 HIV 潜伏感染细胞并减少毒性，本发明中对 Quercetin 和 Puerarin 与 PKC 激活剂 Prostratin 和 VPA 的协同激活作用进行检测分析；

[0032] 结果显示，每个药物或联合处理 HIV 潜伏感染细胞 72 小时后，对报告基因绿色荧光蛋白的流式细胞术检测，其绿色荧光阳性的细胞比例分别为 Quercetin (14.3%)，Prostratin (22.6%)，VPA (11.4%)；Quercetin+Prostratin (63.1%)，Quercetin+VPA (44%)；Puerarin (10.2%)，Puerarin+Prostratin (53.8%)，Puerarin+VPA (34.4%)；未加药物 (Mock) 组 (2%)；结果表明，无论是 Quercetin 与 Prostratin 或与 VPA 药物结合处理细胞，其激活细胞效率皆比两药处理后绿色荧光阳性细胞比例数总和高，同样，Puerarin 也获得了类似结果，说明，Quercetin 和 Puerarin 与 PKC 激活剂 Prostratin 及 VPA 有协同激活作用。

[0033] 本发明的实验结果和实验数据，显示出 Quercetin 和 Puerarin 不仅具有高的诱导激活作用，而且对细胞毒性较低；与 PKC 激活剂 Prostratin 和组蛋白去乙酰化酶抑制剂 VPA 联合使用，具有协同诱导激活作用。因而，所述的黄酮类化合物可用于制备抗 HIV 潜伏的治疗药物，所述的 Quercetin 和 Puerarin 将为 HIV 潜伏感染病毒诱导激活和最终清除提供一个新途径和手段。

附图说明

[0034] 图 1 为 Quercetin 和 Puerarin 化合物的不同浓度对 HIV 潜伏诱导激活效率的影响，其中，药物终浓度分别为 $5 \mu M$ ， $10 \mu M$ ， $20 \mu M$ ， $40 \mu M$ ；处理细胞 72 小时后进行流式细胞术检测，分析荧光细胞所占比例。

[0035] 图 2 为 Quercetin 和 Puerarin 化合物的作用时间对 HIV 潜伏诱导激活效率的影响，其中显示了，在终浓度为 $20 \mu M$ 药物处理细胞 24h，48h，72h，96h 后，流式细胞术分析荧光细胞所占比例。

[0036] 图 3 为 Quercetin 和 Puerarin 对细胞的毒性作用，其中显示了，以终浓度为 $5 \mu M$ ， $10 \mu M$ ， $20 \mu M$ ， $40 \mu M$ ， $80 \mu M$ ， $160 \mu M$ 的 Quercetin 和 Puerarin 处理 HIV 潜伏感染细胞模型，

CCK-8 方法检测细胞的活性。

[0037] 图 4 显示了 Quercetin 和 Puerarin 与 PKC 激活剂 Prostratin 和组蛋白去乙酰化酶抑制剂 valproic acid (VPA) 协同激活作用。

具体实施方式

[0038] 实施例 1. Quercetin 和 Puerarin 化合物的作用浓度对 HIV 潜伏诱导激活效率的影响

[0039] 按每孔 2×10^4 个细胞将 C11 细胞种植于 96 孔板, 每孔加入 100ul 含 10% FBS (Gibco) 的 1640 培养基 (Gibco)。24 小时后, 加入不同浓度的 Quercetin 和 Puerarin, 使终浓度分别为 $5 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $20 \mu\text{M}$, $40 \mu\text{M}$ 。每个浓度至少 3 个复孔, 每个实验重复 3 次, 药物处理细胞 72 小时后, 在荧光显微镜下观察细胞 GFP 表达情况, 并收集细胞进行流式细胞术检测, 分析荧光细胞所占比例;

[0040] 结果显示, 随着 Quercetin 和 Puerarin 化合物浓度的升高, 细胞模型中表达绿色荧光的细胞数目增多, 且均在 $20 \mu\text{M}$ 达到最高; HIV 潜伏感染细胞经 Quercetin ($20 \mu\text{M}$) 处理后绿色荧光阳性的细胞比例达高达 13.7%; Puerarin 在 $20 \mu\text{M}$ 浓度时荧光阳性的细胞比例达 9.7%; 未加诱导剂处理的 HIV 潜伏感染细胞, 其荧光阳性的细胞比例仅有不到 2% 背景激活; 结果提示, Quercetin 和 Puerarin 化合物皆具有对 HIV 潜伏感染细胞的激活作用, 其较好激活浓度范围为 5-40 μM , 且具有剂量效应关系。

[0041] 实施例 2. Quercetin 和 Puerarin 化合物的作用时间对 HIV 潜伏诱导激活效率的影响

[0042] 按每孔 2×10^4 个 C11 细胞种植于 96 孔板, 每孔加入 100ul 含 10% FBS (Gibco) 的 1640 培养基 (Gibco), 24 小时后, 加入终浓度为 200nM 的 MGCD0103 和 MS275。在药物处理细胞 24h, 48h, 72h, 96h 后, 在荧光显微镜下观察细胞 GFP 表达情况, 并收集细胞进行流式细胞术检测, 分析荧光细胞所占比例, 每个时相点至少 3 个复孔, 每个实验重复 3 次, 分析比较诱导激活诱导激活动力学特点;

[0043] 结果显示, Quercetin 和 Puerarin 分别处理 HIV 潜伏感染细胞模型, 随着时间延伸, 绿色荧光阳性的细胞数目逐渐增多, Quercetin 在处理 HIV 潜伏感染细胞模型 72h 后绿色荧光阳性的细胞比例达最高 13%, 而 Puerarin 在处理 HIV 潜伏感染细胞模型 72h 后绿色荧光阳性的细胞比例达最高 10%, 表明两药物具有时间效应关系。

[0044] 实施例 3. Quercetin 和 Puerarin 对细胞的毒性作用

[0045] 按每孔 2×10^4 个 C11 细胞种植于 96 孔板, 每孔加入 100ul 含 10% FBS (Gibco) 的 1640 培养基 (Gibco)。24 小时后, 分别加入不同浓度的 Quercetin 和 Puerarin, 使终浓度分别为 $5 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $20 \mu\text{M}$, $40 \mu\text{M}$, $80 \mu\text{M}$, $160 \mu\text{M}$ 。每个浓度至少 3 个复孔, 每个实验重复 3 次, 药物处理细胞 72 小时后, 在每孔中加入 CCK-8 试剂 10 μL (购自 Dojindo), 细胞培养基孵育 0.5-4h, 于酶标仪上 450nm 处测 OD 值, 计算 $\text{CC50} = (\text{实验组 OD 值} / \text{对照组 OD 值}) \times 100\%$;

[0046] 结果显示, Quercetin 和 Puerarin 药物对人正常细胞的半数毒性浓度分别为 $\text{CC50} = 160 \mu\text{M}$ 和 $\text{CC50} = 120 \mu\text{M}$, CC50 越高, 其细胞毒性越低, 因而, 结果表明在正常有效浓度范围内 Quercetin 和 Puerarin 对细胞毒性较低, 为临床应用奠定了基础。

[0047] 实施例 4. Quercetin 和 Puerarin 与 PKC 激活剂 Prostratin 和组蛋白去乙酰化酶抑制剂 valproic acid(VPA) 的协同激活作用

[0048] 按每孔 2×10^4 个细胞将 C11 细胞种植于 96 孔板, 每孔加入 100ul 含 10% FBS(Gibco) 的 1640 培养基 (Gibco), 24 小时后, 分别加入浓度为 $20 \mu\text{M}$ 的 Quercetin 和 Puerarin, 以及 Quercetin 和 Puerarin 分别与 200nM 的 Prostratin 或 2mM 的 VPA 联合处理, 每个浓度至少 3 个复孔, 每个实验重复 3 次, 药物处理细胞 72 小时后, 在荧光显微镜下观察细胞 GFP 表达情况, 并收集细胞进行流式细胞术检测, 分析荧光细胞所占比例;

[0049] 结果显示, 每个药物或联合处理 HIV 潜伏感染细胞 72 小时后, 对报告基因绿色荧光蛋白的流式细胞术检测, 其绿色荧光阳性的细胞比例分别为: Quercetin(14.3%), Prostratin(22.6%), VPA(11.4%); Quercetin+Prostratin(63.1%), Quercetin+VPA(44%), Puerarin(10.2%), Puerarin+Prostratin(53.8%), Puerarin+VPA(34.4%); 未加药物 (Mock) 组 (2%); 结果表明, 无论是 Quercetin 与 Prostratin 或与 VPA 药物结合处理细胞, 其激活细胞效率皆比两药处理后绿色荧光阳性细胞比例数总和高, 同样, Puerarin 也获得了类似结果, 说明, Quercetin 和 Puerarin 与 PKC 激活剂 Prostratin 和组蛋白去乙酰化酶抑制剂 VPA 有协同激活作用。

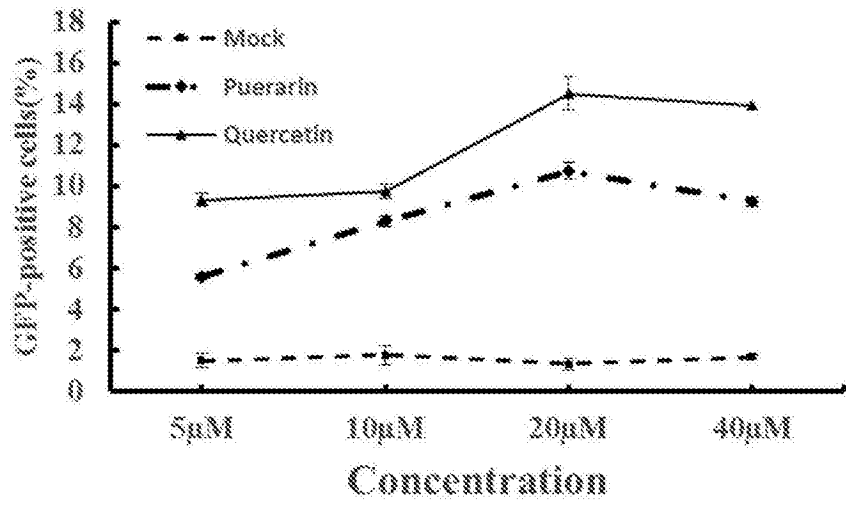


图 1

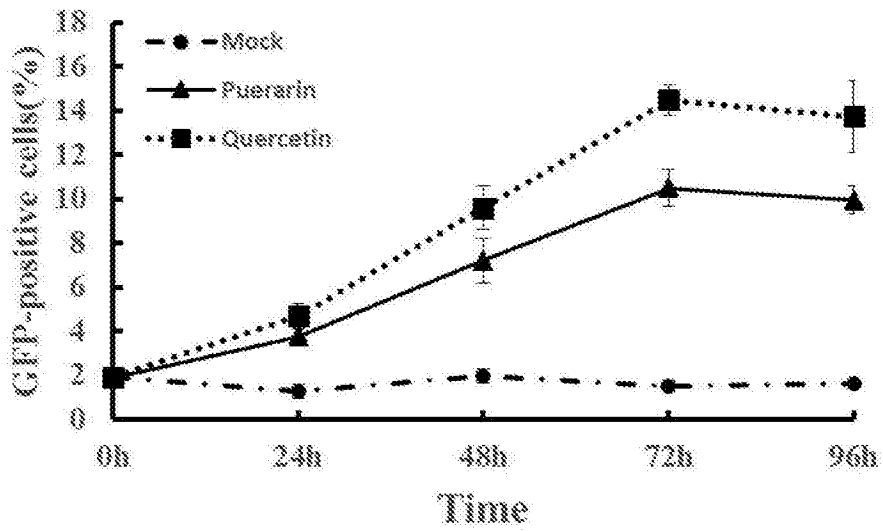


图 2

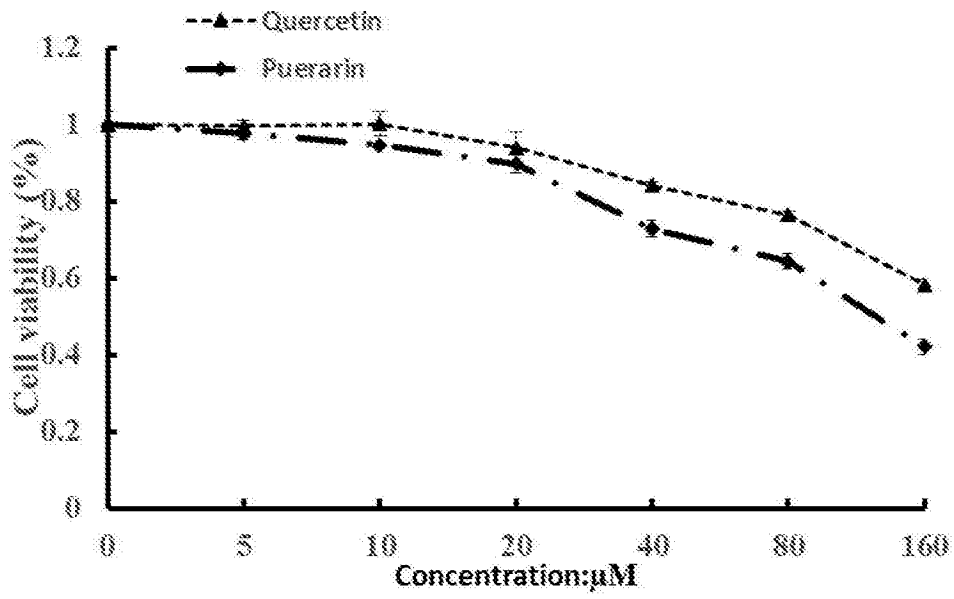


图 3

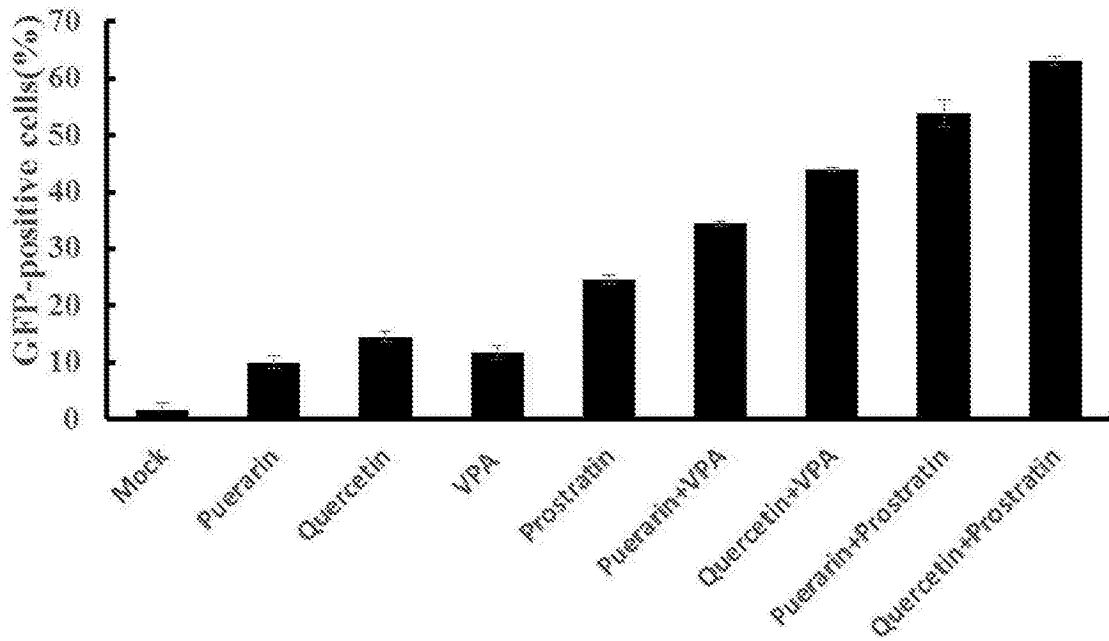


图 4