



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103739575 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 23

(21) 申请号 201410010214. 7

(22) 申请日 2014. 01. 09

(71) 申请人 中国科学院昆明植物研究所
地址 650201 云南省昆明市蓝黑路 132 号

(72) 发明人 陈纪军 陈浩 耿长安 马云保
黄晓燕 张雪梅

(74) 专利代理机构 昆明协立知识产权代理事务
所(普通合伙) 53108

代理人 马晓青

(51) Int. Cl.

C07D 307/58(2006. 01)

C07D 307/68(2006. 01)

C07D 409/12(2006. 01)

A61K 31/365(2006. 01)

A61K 31/381(2006. 01)

A61P 31/20(2006. 01)

权利要求书1页 说明书9页

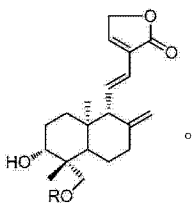
(54) 发明名称

14- 脱氧 -11, 12- 二脱氢穿心莲内酯衍生物
及其药物组合物和应用

(57) 摘要

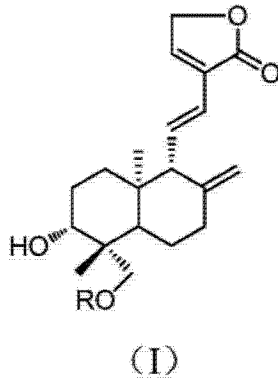
本发明属于药物技术领域, 具体涉及通式(I)
所示的 14- 脱氧 -11, 12- 二脱氢穿心莲内酯衍生物(1-4), 其药物组合物, 其制备方法, 以及该类
衍生物及其药物组合物在制备抗乙型肝炎药物中

的应用。



(I)

1. 结构式(I)所示的 14-脱氧-11,12-二脱氢穿心莲内酯衍生物(1-4),



式中, R 为 时为化合物 1-4。

2. 药物组合物, 含有权利要求 1 所述的通式(I)的 14-脱氧-11,12-二脱氢穿心莲内酯衍生物(1-4)及可药用载体或赋形剂。

3. 制备权利要求 1 所述的通式(I)的 14-脱氧-11,12-二脱氢穿心莲内酯衍生物(1-4)的方法, 其特征在于 14-脱氧-11,12-二脱氢穿心莲内酯、羧酸(桂皮酸、3,4,5-三甲氧基-桂皮酸、2-呋喃甲酸、2-噻吩甲酸), 以及 4-二甲氨基吡啶的 N,N-二甲基甲酰胺溶液中加入 N,N-二环己基碳二亚胺, 反应完全后, 反应液用 3 倍体积的乙酸乙酯稀释, 依次用稀盐酸、饱和碳酸氢钠水溶液和饱和食盐水洗涤, 经无水硫酸钠干燥后减压回收溶剂得到粗品; 粗品经硅胶柱层析, 用乙酸乙酯-石油醚洗脱得 14-脱氧-11,12-二脱氢穿心莲内酯衍生物(1-4)。

4. 权利要求 1 所述的 14-脱氧-11,12-二脱氢穿心莲内酯衍生物(1-4)在制备抗乙型肝炎药物中的应用。

5. 权利要求 2 所述的药物组合物在制备抗乙型肝炎药物中的应用。

14-脱氧-11,12-二脱氢穿心莲内酯衍生物及其药物组合 物和应用

技术领域

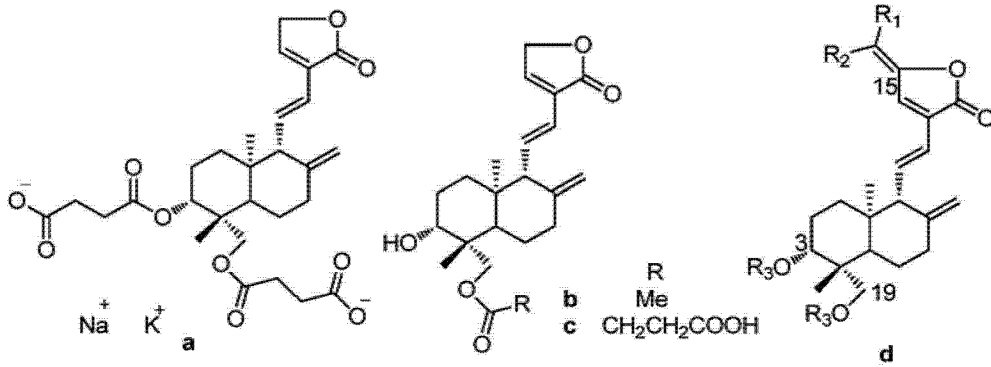
[0001] 本发明属于药物技术领域,具体地说,涉及14-脱氧-11,12-二脱氢穿心莲内酯衍生物(1-4),以其为活性成分的药物组合物,其制备方法,以及该类化合物及其药物组合物在制备抗乙型肝炎药物中的应用。

背景技术

[0002] 乙型肝炎是乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)引起的、以肝脏病变为主并引起多器官损害的一种传染性疾病,全世界约有3.6亿慢性感染者,每年因HBV感染导致约60万人死亡。目前,乙型肝炎已经成为影响人类寿命的九大疾病之一。据2006年乙肝血清流行病学数据表明,我国乙肝病毒表面抗原携带率7.18%,即乙肝病毒表面抗原携带者0.93亿。目前临床使用的抗HBV药物主要为乙型肝炎疫苗、免疫调节剂、核苷类药物。

[0003] 乙型肝炎疫苗作为一种特殊的药物,是预防乙型肝炎感染的最重要手段,但是疫苗对已经感染者无效。临床上用于治疗慢性乙肝药物主要有免疫调节剂和核苷类药物。免疫调节剂会引起流感样症状、抑郁、中性粒细胞减少、血小板减少等不良反应。核苷类药物主要有拉米夫定(lamivudine, 3-TC)、阿德福韦酯(adefovir dipivoxil, ADV)、恩替卡韦(entecavir, ETV)、替比夫定(telbivudine, LdT),泰诺福韦(tenofovir, TDF)等。核苷类药物具有抗HBV作用强,患者耐受性良好等优点,但是停药后易复发,引起病情恶化,甚至发生肝脏失常,长期治疗易产生耐药性。因此,寻找结构新颖、新的作用机制的非核苷类药物已经成为研究热点。14-脱氧-11,12-二脱氢穿心莲内酯是爵床科穿心莲属(Andrographis)植物穿心莲(Andrographis panicuata)主要成分,具有抗炎、抗菌、抗病毒、保肝、镇痛等功效[江苏新医学院,中药大辞典,上海科学技术出版社,1995,1728-1729]。对其进行修饰得到的衍生物:14-脱氧-11,12-二脱氢穿心莲内酯琥珀酸半酯钠钾盐(a)制备为的琥宁注射液已经用于上呼吸道感染和病毒性肺炎;19-O-乙酰基-14-脱氧-11,12-二脱氢穿心莲内酯(b),19-O-丁二酸单酯-14-脱氧-11,12-二脱氢穿心莲内酯(c)具有抗炎活性。C-11、C-12双键加成衍生物具有抗HIV活性[黄文龙CN101829110A]。此前报道,对14-脱氧-11,12-二脱氢穿心莲内酯C-3,C-15,C-19修饰得到衍生物(通式d),对HBsAg、HBV DNA复制有抑制作用,选择指数(SI)小于8;鸭乙肝病毒模型测试表明该衍生物具有抗鸭乙肝病毒活性,然而其结构与本申请所要求衍生物完全不同[戴桂馥,WO2013/004171A1]。

[0004]



[0005] 目前,该类型没有本发明提供的 14-脱氧-11, 12-二脱氢穿心莲内酯衍生物(I)及其作为有效成分的药物组合物应用在制备或治疗乙型肝炎药物中的报道。

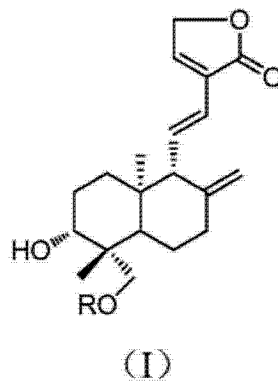
发明内容

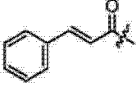
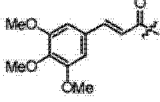
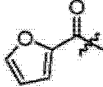
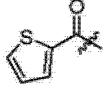
[0006] 本发明旨在提供一种新的具有药用价值的 14-脱氧-11, 12-二脱氢穿心莲内酯衍生物(I),以及含有治疗乙型肝炎有效量的化合物 14-脱氧-11, 12-二脱氢穿心莲内酯衍生物(I)及药用载体或赋形剂的用于治疗乙型肝炎药物组合物,其制备方法,该化合物或其药物组合物在制备抗乙型肝炎药物中的应用。

[0007] 为了实现本发明的上述目的,本发明提供了如下的技术方案:

[0008] 具结构式(I)所示的 14-脱氧-11, 12-二脱氢穿心莲内酯衍生物(1-4)

[0009]



化合物	R
1	
2	
3	
4	

[0011] 药物组合物, 含有权利要求 1 所述的通式(I) 的 14- 脱氧 -11, 12- 二脱氢穿心莲内酯衍生物(1-4) 及可药用载体和 / 或赋形剂。

[0012] 本发明制备含有 14- 脱氧 -11, 12- 二脱氢穿心莲内酯衍生物(1-4) 及其药物的方法为: 向 14- 脱氧 -11, 12- 二脱氢穿心莲内酯、羧酸(桂皮酸、3, 4, 5- 三甲氧基 - 桂皮酸, 2- 呋喃甲酸、2- 噻吩甲酸)、4- 二甲氨基吡啶的 N, N- 二甲基甲酰胺溶液中加入 N, N- 二环己基碳二亚胺, 室温搅拌 10 小时, 所得反应液用 3 倍体积的乙酸乙酯稀释, 依次用稀盐酸、饱和碳酸氢钠水溶液和饱和食盐水洗涤, 经无水硫酸钠干燥后减压回收溶剂得到粗品; 粗品经硅胶柱层析, 用乙酸乙酯 - 石油醚洗脱得 14- 脱氧 -11, 12- 二脱氢穿心莲内酯衍生物(1-4)。

[0013] 本发明提供了 14- 脱氧 -11, 12- 二脱氢穿心莲内酯衍生物(I) 在制备治疗乙型肝炎药物中的应用。

[0014] 本发明提供了含 14- 脱氧 -11, 12- 二脱氢穿心莲内酯衍生物(I) 的药物组合物在制备治疗乙型肝炎药物中的应用。

[0015] 基于本发明人的抗 HBV 筛选, 发现 14- 脱氧 -11, 12- 二脱氢穿心莲内酯衍生物具有抗 HBV 作用。14- 脱氧 -11, 12- 二脱氢穿心莲内酯衍生物是以植物中存在的 14- 脱氧 -11, 12- 二脱氢穿心莲内酯(14-deoxy-11, 12-didehydroandrographolide) 为原料, 采用化学合成方法所得到的 4 个化合物。本申请所要求保护的衍生物不同于之前的报道, 通过对 14- 脱氧 -11, 12- 二脱氢穿心莲内酯的 C-19 位进行化学修饰, 得到 4 个衍生物具有较好抗 HBV 活性, 特别对 HBV DNA 复制有较强抑制作用, 均有较高选择指数, 尤其化合物 2 选择指数大于 165.1, 具有较好安全性。

[0016] 本发明化合物用作药物时, 可以直接使用, 或者以药物组合物的形式使用。该药物组合物含有 0.1 - 99%, 优选为 0.5 - 90% 的本发明化合物, 其余为药物学上可接受的, 对人和动物无毒和惰性的可药用载体和 / 或赋形剂。

[0017] 所述的药用载体或赋形剂是一种或多种固体、半固体和液体稀释剂、填料以及药物制品辅料。将本发明的药物组合物以单位体重服用量的形式使用。本发明的药物可经注射(静注、肌注) 和口服两种形式给药。

具体实施方式

[0018] 为了更好地理解本发明的实质性内容,下面用本发明的实施例来说明本发明化合物 14-脱氧-11,12-二脱氢穿心莲内酯衍生物(I)的制备方法和药理作用结果,但不以此来限定本发明。

[0019] 化合物制备实施例 1

[0020] 原料 14-脱氧-11,12-二脱氢穿心莲内酯(14-deoxy-11,12-dehydroandrographolide)的制备:

[0021] 10 公斤穿心莲植物全草粉碎,以 30 公斤 90% 乙醇提取三次,每次 3 小时,合并乙醇提取液,浓缩至体积 10 升,浓缩液用乙酸乙酯萃取三次,每次 18 升,合并乙酸乙酯萃取液,减压回收乙酸乙酯,得 336 克乙酸乙酯萃取部分。

[0022] 将 336 克乙酸乙酯部分以丙酮溶解,吸附于 600 克硅胶上,室温挥发至干,过 60-100 目筛,备用。取 3000 克柱层析硅胶(200-300 目,青岛美高公司),湿法以乙酸乙酯-石油醚(40:60)混合溶剂填充于玻璃色谱柱中(柱直径 18cm,填充硅胶高度 28cm),上样后,以乙酸乙酯-石油醚(40:60-60:40,体积比)混合溶剂洗脱,流速 100mL/min,每 3 升为一流份,经 TLC 薄板检查(青岛美高公司,展开剂:乙酸乙酯-石油醚,60:40),将含有 14-脱氧-11,12-二脱氢穿心莲内酯的流份合并,回收溶剂得 14-脱氧-11,12-二脱氢穿心莲内酯粗品 70 克。

[0023] 将 14-脱氧-11,12-二脱氢穿心莲内酯粗品 70 克以 80% 乙醇溶解,加入 600 毫克活性炭,回流一个小时,滤出活性炭,回收溶液得到 62 克粗品,再用 60 毫升甲醇溶解,室温下结晶,过滤出晶体,50 毫升甲醇溶解后重结晶,得到 14-脱氧-11,12-二脱氢穿心莲内酯 45 克。经波谱数据(^1H NMR, ^{13}C NMR, MS)鉴定,以及与标准品对照,确认所得为 14-脱氧-11,12-二脱氢穿心莲内酯,作为以下制备 14-脱氧-11,12-二脱氢穿心莲内酯衍生物的原料使用。

[0024] 19-0-桂皮酰基-14-脱氧-11,12-二脱氢穿心莲内酯(化合物 1)的制备:

[0025] 在 10mL 圆底烧瓶中加入 0.57mmol (200mg)14-脱氧-11,12-二脱氢穿心莲内酯、0.28mmol (14mg)4-二甲胺基吡啶(DMAP)和 0.7mmol (103mg)桂皮酸,然后加入 5 毫升无水 N,N-二甲基甲酰胺(DMF),搅拌溶解后,冰浴条件下再加 0.7mmol (144mg)N,N-二环己基碳二亚胺(DCC)搅拌,反应温度升至室温。TLC 检测 14-脱氧-11,12-二脱氢穿心莲内酯反应完后,反应液加入 30mL 乙酸乙酯溶解,依次用稀盐酸、饱和碳酸氢钠水溶液、饱和食盐水溶液洗涤三次,经无水硫酸钠干燥后减压回收溶剂得粗品,经硅胶柱层析,用乙酸乙酯-石油醚(30:70)洗脱得化合物 19-0-桂皮酰基-14-脱氧-11,12-二脱氢穿心莲内酯 170 毫克。

[0026] HRESIMS 在 LCMS-IT-TOF 质谱仪(Shimadzu, Kyoto, Japan)上测定,核磁共振谱(^1H 和 ^{13}C NMR)在 Bruker AM400 ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$, 400M Hz/100M Hz)超导核磁共振波谱仪(Bruker, Bremerhaven, Germany)测定,以 TMS (四甲基硅烷)为内标。柱色谱硅胶(200~300 目)和薄层色谱硅胶 GF254 均为青岛美高集团有限公司生产。反应试剂购自 Alfa Aesar、百灵威以及 Acros 公司。

[0027] 19-0-桂皮酰基-14-脱氧-11,12-二脱氢穿心莲内酯(1)结构数据:

[0028] 分子式 : $C_{29}H_{34}O_5$

[0029] 分子量 :462

[0030] 性状 :白色无定型粉末

[0031] 图谱数据 :

[0032] 1H NMR($CDCl_3$, 400MHz) : δ 0.76 (3H, s, H-20), 1.08 (3H, s, H-18), 3.21 (1H, dd, J=10.4, 5.1Hz, H-3), 4.22 (1H, d, J=11.8Hz, H-19a), 4.27 (1H, d, J=11.8Hz, H-19b), 4.40 (1H, brs, H-17a), 4.65 (1H, brs, H-17b), 4.72 (2H, s, H-15), 6.00 (1H, d, J=15.8Hz, H-12), 6.31 (1H, d, J=15.7Hz, H-2), 6.74 (1H, dd, J=15.8, 10.1Hz, H-11), 7.14 (1H, s, H-14), 7.41 (2H, d, J=7.1Hz, H-5 and H-9), 7.53 (1H, d, J=15.7Hz, H-3). ^{13}C NMR($CDCl_3$, 100MHz) : δ 14.9 (C-20), 22.3 (C-18), 23.6 (C-6), 27.0 (C-2), 36.4 (C-7), 38.3 (C-1), 38.5 (C-10), 42.3 (C-4), 54.3 (C-5), 61.4 (C-9), 65.2 (C-19), 69.8 (C-15), 78.3 (C-3), 108.6 (C-17), 117.3 (C-2), 120.8 (C-12), 127.8 (2C, C-6, 8), 128.6 (2C, C-5, 9), 128.7 (C-13), 130.2 (C-7), 133.9 (C-4), 135.4 (C-11), 143.6 (C-3), 144.9 (C-14), 147.9 (C-8), 167.2 (C-1), 172.8 (C-16). HRESIMS : 计算值 $C_{29}H_{34}O_5 [M+H]^+$ 463.2479, 实验值 463.2503.

[0033] 化合物制备实施例 2-4

[0034] 依照实施例 1 在 10mL 圆底烧瓶中加入 0.4mmol (200mg) 14-脱氧-11,12-二脱氢穿心莲内酯、0.2mmol (24mg) 4-二甲氨基吡啶 (DMAP) 和 0.7mmol 相应酸, 然后加入 5 毫升无水 N,N-二甲基甲酰胺, 搅拌溶解后, 冰浴条件下再加 0.7mmol (144mg) N,N-二环己基碳二亚胺 (DCC) 搅拌, 反应温度升至室温。TLC 检测 14-脱氧-11,12-二脱氢穿心莲内酯反应完后, 反应液过滤, 依次用稀盐酸、饱和碳酸氢钠水溶液、饱和食盐水溶液洗涤三次, 经无水硫酸钠干燥后, 减压回收溶剂得到粗品, 经硅胶柱层析, 用乙酸乙酯-石油醚 (30:70-40:60) 洗脱得化合物, 制备以下结构 14-脱氧-11,12-二脱氢穿心莲内酯衍生物 (2-4) :

[0035] 化合物 2、3、4 结构确定数据 :

[0036] 19-O- (3,4,5-三甲氧基) 桂皮酰基-14-脱氧-11,12-二脱氢穿心莲内酯 (2)

[0037] 分子式 : $C_{32}H_{40}O_8$

[0038] 分子量 :552

[0039] 性状 :白色无定型粉末

[0040] 图谱数据 :

[0041] 1H NMR($CDCl_3$, 400MHz) : δ 0.76 (3H, s, H-20), 1.08 (3H, s, H-18), 3.79 (3H, s, H-OMe), 3.81 (6H, s, H-OMe), 4.46 (1H, brs, H-17a), 4.71 (1H, brs, H-17b), 4.74 (2H, s, H-15), 6.05 (1H, d, J=15.7Hz, H-12), 6.26 (1H, d, J=15.9Hz, H-2), 6.67 (2H, s, H-5 and H-9), 6.81 (1H, dd, J=15.7, 10.1Hz, H-11), 7.14 (1H, s, H-14), 7.49 (1H, d, J=15.9Hz, H-3). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100MHz) : δ 15.5 (C-20), 22.5 (C-18), 23.5 (C-6), 27.6 (C-2), 36.6 (C-7), 38.4 (C-1), 38.7 (C-10), 42.7 (C-4), 54.7 (C-5), 56.1 (2 \times OMe), 60.9 (OMe), 61.5 (C-9), 65.0 (C-19), 69.7 (C-15), 79.0 (C-3), 105.1 (2C, C-5, 9), 109.1 (C-17), 117.0 (C-2), 121.2 (C-12), 129.0 (C-13), 129.7 (C-4), 135.6 (C-11), 139.9 (C-7), 143.4 (C-14), 145.2 (C-3), 148.0 (C-8), 153.3 (2C, C-6, 8), 167.0 (C-1), 172.4 (C-16). HRESIMS : 计算值 $C_{32}H_{40}O_8 [M+H]^+$ 553.2796, 实验值 553.2820.

[0042] 19-O- (2-呋喃甲酰基)-14-脱氧-11,12-二脱氢穿心莲内酯 (3)

[0043] 分子式 : $C_{25}H_{30}O_6$

[0044] 分子量 :426

[0045] 性状 :白色无定型粉末

[0046] 图谱数据 :

[0047] 1H NMR($CDCl_3$, 400MHz) : δ 0.84(3H, s, H-20), 1.19(3H, s, H-18), 2.31(1H, d, J=9.8 Hz, H-9), 3.33(1H, dd, J=11.4, 4.6Hz, H-3), 4.34(1H, d, J=11.1, H-19a), 4.51(1H, brs, H-17a), 4.74(1H, brs, H-17b), 4.76(2H, s, H-15), 6.09(1H, d, J=15.7Hz, H-12), 6.47(1H, dd, J=3.5, 1.7Hz, H-4), 6.84(1H, dd, J=15.7, 10.1Hz, H-11), 7.18(1H, s, H-14), 7.11(1H, d, J=3.5Hz, H-3), 7.54(1H, dd, J=1.7, 0.8Hz, H-5). ^{13}C NMR($CDCl_3$, 100MHz) : δ 15.4(C-20), 22.6(C-18), 23.6(C-6), 27.6(C-2), 36.6(C-7), 38.5(C-1), 38.7(C-10), 42.7(C-4), 54.6(C-5), 61.6(C-9), 65.5(C-19), 69.7(C-15), 78.9(C-3), 109.1(C-17), 111.9(C-4), 118.0(C-3), 121.2(C-12), 129.0(C-13), 135.6(C-11), 143.3(C-14), 144.5(C-5), 146.5(C-2), 148.0(C-8), 158.6(C-1), 172.4(C-16). HRESIMS :计算值 $C_{25}H_{30}O_6Na[M+Na]^+$ 449.1935, 实验值 449.1951.

[0048] 19-0- (2- 噻吩甲酰基) -14- 脱氧 -11, 12- 二脱氢穿心莲内酯(4)

[0049] 分子式 : $C_{25}H_{30}O_5S$

[0050] 分子量 :442

[0051] 性状 :白色无定型粉末

[0052] 图谱数据 :

[0053] 1H NMR($CDCl_3$, 400MHz) : δ 0.94(3H, s, H-20), 1.17(3H, s, H-18), 4.80(2H, s, H-15), 6.14(1H, dd, J=15.7, 9.9Hz, H-11), 6.30(1H, d, J=15.7Hz, H-12), 7.57(1H, m, H-4). ^{13}C NMR($CDCl_3$, 100MHz) : δ 15.4(C-20), 22.8(C-18), 23.8(C-6), 24.4(C-2), 36.6(C-7), 38.2(C-1), 38.6(C-10), 41.8(C-4), 55.9(C-5), 61.6(C-9), 64.8(C-19), 69.6(C-15), 78.7(C-3), 109.4(C-17), 117.3(C-4), 121.4(C-12), 129.0(C-13), 129.5(C-3), 135.5(C-11), 143.4(C-14), 144.9(C-5), 147.8(C-8), 153.3(C-2), 166.9(C-1), 172.2(C-16). HRESIMS :计算值 $C_{25}H_{29}O_5S[M-H]^-$ 441.1741, 实验值 441.1753.

[0054] 下面的抗乙型肝炎病毒药理试验例用来说明本发明的 14- 脱氧 -11, 12- 二脱氢穿心莲内酯衍生物的药理作用结果 :

[0055] 试验例 1 :

[0056] 本发明上述的化合物制备实施例得到的化合物 14- 脱氧 -11, 12- 二脱氢穿心莲内酯衍生物(I) (化合物 1、2、3、4) 在 HepG2. 2. 15 细胞模型上对乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)、e 抗原(HBeAg) 和 HBV DNA 复制的抑制作用以及其对细胞的毒性 :

[0057] 1 材料和方法

[0058] 1.1 材料 :本发明制备实施例得到的化合物 14- 脱氧 -11, 12- 二脱氢穿心莲内酯衍生物(化合物 1-4) ;泰诺福韦(江西晨阳药业有限公司) 作阳性对照药 ;HBV 转染的 Hep G2. 2. 15 细胞(自行传代培养) ;细胞培养液 :高糖培养液添加 10% 胎牛血清, 0.03% L - 谷氨酰胺, 100mg/L G418, 105IU/L 青霉素, 100mg/L 链霉素, 用 5% Na_2CO_3 调 pH 至 6.8 - 7.0 ;高糖 DMEM (GIBICO) ;G418 (GIBICO) ;胎牛血清(天津血研所) ;L - 谷氨酰胺 (AMRESCO) ;青霉素, 链霉素(石药集团中诺药业(石家庄) 有限公司) ;HBsAg 和 HBeAg 试剂盒(安图生物工程公司)。

[0059] 1.2Hep G2.2.15 细胞,用高糖 DMEM 液培养,培养液添加 10% 胎牛血清,0.03%L-谷氨酰胺,100mg/L G418,10⁵IU/L 青霉素,100mg/L 链霉素,5%NaHCO₃ 调 pH 至 6.8-7.0。

[0060] 1.3 仪器:酶标仪 Bio-RAD680 (美国);CO₂ 培养箱 Thermo Forma3310 (美国);倒置生物显微镜 XD-101 型(南京)等。

[0061] 1.4 实验过程

[0062] 1.4.1HBsAg 和 HBeAg 抑制活性的测定:

[0063] 利用 ELISA (酶联免疫吸附试验)法,测定样品对 HBsAg 和 HBeAg 抑制活性。Hep G2.2.15 细胞接种于 48 孔板,3×10⁴ 细胞每孔,加入生长培养基,于 5% CO₂,37℃ 培养箱中培养 72h,吸除原培养基,加入不同浓度待测样品溶液,于 5% CO₂,37℃ 培养箱中培养 72h。取上清液,分别利用 HBsAg 和 HBeAg 试剂盒检测。利用酶标仪测定溶液在的吸光度值(490nm)。

[0064] 抑制率 $\eta_{\text{inhibitory}} = (A_{\text{细胞对照组}} - A_{\text{供试样品组}}) / (A_{\text{细胞对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100$

[0065] $IC_{50} = \text{Anti} \lg [(50 - <50\% \text{抑制率}) / (>50\% \text{抑制率} - <50\% \text{抑制率}) \times \lg (\text{稀释倍数}) + \lg (<50\% \text{抑制率的浓度})]$

[0066] $SI = CC_{50} / IC_{50}$

[0067] 1.4.2HBV DNA 复制抑制活性的测定:

[0068] Hep G2.2.15 细胞接种于 24 孔细胞板,5×10⁵ 个每孔,于 5% CO₂,37℃ 培养箱中培养 72h。更换为含药培养基,培养 48h 后再次更换一次含药培养基,继续培养 48h。使用血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒 (TIANamp Gemomic DNA Kit, TIANGEN, China) 提取 DNA。用荧光定量 PCR 的方法定量检测 HBV DNA 载量。1 μL DNA 样品用 20 μL 2×SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) 以及 2 条 HBV 特异的引物作为 PCR 扩增体系:前引物 (5' GGA ACC TCT ATG TAT CCC TCC3'), 后引物 (5' TCC GTC CGA AGG TTT GGT AC3')。扩增以及检测用 Mastercycler Ep Realplex System 定量 PCR 仪 (Eppendorf, Mastercycler Eprealplex, German) 在 95℃ 预热 2 分钟,并按 95℃ (20 秒),58℃ (15 秒),72℃ (20 秒) 的条件重复进行 40 个循环的反应。根据结果计算药物的抑制百分率和 IC₅₀ 值,计算方法与 1.4.1 相同。

[0069] 1.4.3 细胞毒性测定:

[0070] 根据 Mosmann 建立的 MTT 法检测药物的细胞毒性。具体方法是:Hep G2.2.15 细胞接种于 48 孔板,3×10⁴ 细胞每孔,加入生长培养基,于 5% CO₂,37℃ 培养箱中培养 72h,吸除原培养基,加入不同浓度待测样品溶液,于 5% CO₂,37℃ 培养箱中培养 72h。吸除上清后(用于两抗测定),每孔加入浓度为 0.4mg/mL 的 MTT,0.3mL,于 5%CO₂,37℃ 孵育 4h。吸除上清液,每孔中加入 0.3mL 二甲基亚砜,于 37℃ 孵育 10min,在酶标仪上测定溶液在的吸光度值(490nm)。根据结果计算药物对细胞的破坏百分率:

[0071] 破坏率 $\eta_{\text{destroy}} = (A_{\text{细胞对照组}} - A_{\text{供试样品组}}) / (A_{\text{细胞对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100$

[0072] $CC_{50} = \text{Anti} \lg [(50 - <50\% \text{破坏率}) / (>50\% \text{破坏率} - <50\% \text{破坏率}) \times \lg (\text{稀释倍数}) + \lg (<50\% \text{破坏率的浓度})]$

[0073] 2. 结果:对 HBsAg, HBeAg 的抑制作用结果以选择指数 (Sective Index, SI, $SI = CC_{50} / IC_{50}$, 为评价药物临床应用前景的参数) 来评价,其中 SI>2 为无毒有效,1<SI<2 为有毒有效,SI<1 为有毒无效。具体结果见表 2:

[0074] 表 2 14- 脱氧 -11, 12- 二脱氢穿心莲内酯衍生物(I)对 Hep G2. 2. 15 细胞的毒性作用,对 HBsAg、HBeAg 和 HBV DNA 的抑制活性

化合物	CC ₅₀ (μ M)	HBsAg		HBeAg		HBV DNA	
		IC ₅₀ (μ M)	SI	IC ₅₀ (μ M)	SI	IC ₅₀ (μ M)	SI
[0075] 1	182.99	18.01	10.2	28.94	6.3	14.63	15.5
2	>1705.50	--	--	200.87	>8.5	10.33	>165.1
3	92.35	19.15	4.6	77.46	1.2	9.34	9.9
4	557.22	162.40	3.4	29.19	19.1	22.13	25.2
泰诺福韦	>1716.28	1389.42	>1.2	1237.86	>1.4	0.71	>2417.3

[0076] 3. 结论:实验结果显示,化合物 14- 脱氧 -11, 12- 二脱氢穿心莲内酯衍生物在体外 Hep G2. 2. 15 细胞中,对 HBV DNA 的复制有较强的抑制作用,特别 19-0- (3, 4, 5- 三甲氧基)桂皮酰基 -14- 脱氧 -11, 12- 二脱氢穿心莲内酯(2)SI 值大于 165.1 ;此外,19-0- (2- 咪喃甲酰基)-14- 脱氧 -11, 12- 二脱氢穿心莲内酯(3)抑制 HBsAg ;化合物 19-0- (2- 噻吩甲酰基) -14- 脱氧 -11, 12- 二脱氢穿心莲内酯(4)对 HBeAg 有较好的抑制作用。

[0077] 制剂实施例

[0078] 制剂实施例 1 :

[0079] 按制备实施例 1 的方法先制得 14- 脱氧 -11, 12- 二脱氢穿心莲内酯衍生物,用少量的 DMSO 溶解后,按常规加注射用水,精滤,灌封灭菌制成注射液。

[0080] 制剂实施例 2 :

[0081] 按制备实施例 1 的方法先制得 14- 脱氧 -11, 12- 二脱氢穿心莲内酯衍生物,用少量的 DMSO 溶解后,将其溶于无菌注射用水中,搅拌使溶解,用无菌抽滤漏斗过滤,再无菌精滤,分装于安瓿中,低温冷冻干燥后无菌熔封得粉针剂。

[0082] 制剂实施例 3 :

[0083] 按制备实施例 1 的方法先制得 14- 脱氧 -11, 12- 二脱氢穿心莲内酯衍生物,按其与赋形剂重量比为 9 :1 的比例加入赋形剂,制成粉剂。

[0084] 制剂实施例 4 :

[0085] 按制备实施例 1 的方法先制得 14- 脱氧 -11, 12- 二脱氢穿心莲内酯衍生物,按其与赋形剂重量比为 5 :1 的比例加入赋形剂,制粒压片。

[0086] 制剂实施例 5 :

[0087] 按制备实施例 1 的方法先制得 14- 脱氧 -11, 12- 二脱氢穿心莲内酯衍生物,按常规口服液制法制成口服液。

[0088] 制剂实施例 6 :

[0089] 按制备实施例 1 的方法先制得 14- 脱氧 -11, 12- 二脱氢穿心莲内酯衍生物,按其与赋形剂重量比为 5 :1 的比例加入赋形剂,制成胶囊。

[0090] 制剂实施例 7 :

[0091] 按制备实施例 1 的方法先制得 14-脱氧-11, 12-二脱氢穿心莲内酯衍生物, 按其与赋形剂重量比为 3 :1 的比例加入赋形剂, 制成胶囊。

[0092] 制剂实施例 8 :

[0093] 按制备实施例 1 的方法先制得 14-脱氧-11, 12-二脱氢穿心莲内酯衍生物, 按其与赋形剂重量比为 5 :1 的比例加入赋形剂, 制成颗粒剂。