



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103356608 A

(43) 申请公布日 2013. 10. 23

(21) 申请号 201310338173. X

(22) 申请日 2013. 08. 05

(71) 申请人 淄博齐鼎立专利信息咨询有限公司

地址 255086 山东省淄博市高新区万杰路
87 号裕桥工业园 301 室

(72) 发明人 高忠青

(51) Int. Cl.

A61K 31/407(2006. 01)

A61P 31/04(2006. 01)

权利要求书1页 说明书3页

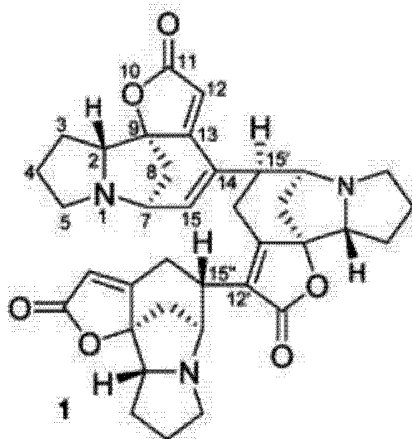
(54) 发明名称

Fluevirosines A 在制备抗幽门螺杆菌药物
中的应用

(57) 摘要

体外活性实验表明 Fluevirosines A 具有很强的抗幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 活性。Fluevirosines A 可用于急、慢性胃炎、胃、十二指肠溃疡等疾病的治疗及在制备治疗急、慢性胃炎、胃、十二指肠溃疡药物中得到应用。本发明涉及的 Fluevirosines A 在制备治疗抗幽门螺杆菌药物中的用途属于首次公开, 由于骨架类型属于全新的骨架类型, 而且不存在由其他化合物给出任何启示的可能, 具备突出的实质性特点, 同时用于幽门螺杆菌感染的防治显然具有显著的进步。

1. Fluevirosines A 在制备抗幽门螺杆菌药物中的应用, 所述化合物 Fluevirosines A 结构如式 (I) 所示:



式 (I)。

Fluevirosines A 在制备抗幽门螺杆菌药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及化合物 Fluevirosines A 的新用途,尤其涉及 Fluevirosines A 在制备抗幽门螺杆菌药物中的应用。

背景技术

[0002] 幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 是一种革兰氏阴性螺旋状细菌。研究显示,幽门螺杆菌是急、慢性胃炎以及胃、十二指肠溃疡的主要致病原因,并可能与胃癌和胃粘膜相关性淋巴样组织 (MALT) 恶性淋巴瘤发病有关。因此,寻找高效、安全的抗 Hp 活性一类新药物成为一个重要和迫切的任务。

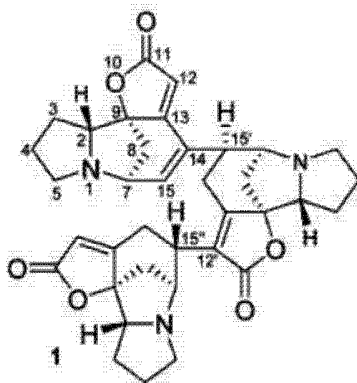
[0003] 本发明涉及的化合物 Fluevirosines A 是一个 2013 年发表(Hua Zhang, et al., Fluevirosines A-C: A Biogenesis Inspired Example in the Discovery of New Bioactive Scaffolds from *Flueggea virosa*. Organic Letters, 2013, 15(1):120 - 123.) 的新化合物,该化合物拥有全新的骨架类型,目前的用途仅仅对白血病和肺癌细胞有一定的细胞毒性 (Hua Zhang, et al., Fluevirosines A-C: A Biogenesis Inspired Example in the Discovery of New Bioactive Scaffolds from *Flueggea virosa*. Organic Letters, 2013, 15 (1):120 - 123.), 本发明涉及的 Fluevirosines A 在制备抗幽门螺杆菌药物中的用途属于首次公开。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于根据现有 Fluevirosines A 研究中未发现其具有抗幽门螺杆菌活性的报道的现状,提供了 Fluevirosines A 在制备抗幽门螺杆菌药物中的应用。

[0005] 所述化合物 Fluevirosines A, 结构如式(I)所示:

[0006]



[0007] 式(I)

[0008] Fluevirosines A 的体外实验表明,Fluevirosines A 具有很强的抗幽门螺旋杆菌活性,纸片法显示其抑菌圈直径为 17mm (ATCC43504)。用琼脂稀释法显示它能完全抑制 5 个随机的临床菌株 (Hp001、Hp003、Hp004、Hp018 和 Hp036) 和 1 个标准菌株 (ATCC43504) 的生长,最小抑菌浓度 (MIC) 均为 0.31 μ g/ml。用氨苄西林作阳性对照,其对 6 株测试菌完全抑

制的最小浓度(MIC)为 $3.5 \mu\text{g/ml}$ 。

[0009] 本研究结果显示, Fluevirosines A 的抑制幽门螺旋杆菌活性的能力比氨苄西林强, 说明对于与幽门螺旋杆菌密切相关的急、慢性胃炎、胃、十二指肠溃疡等疾病来讲, Fluevirosines A 是一个极具开发潜力的化合物。它可直接用于相应疾病的治疗以及相关药物的制备。

[0010] 本发明涉及的 Fluevirosines A 在制备治疗抗幽门螺杆菌药物中的用途属于首次公开, 由于骨架类型属于全新的骨架类型, 而且不存在由其他化合物给出任何启示的可能, 具备突出的实质性特点, 同时用于幽门螺杆菌感染的防治显然具有显著的进步。

具体实施方式

[0011] 本发明所涉及化合物 Fluevirosines A 的制备方法参见文献 (Hua Zhang, et al., Fluevirosines A-C: A Biogenesis Inspired Example in the Discovery of New Bioactive Scaffolds from Flueggea virosa. Organic Letters, 2013, 15(1):120 - 123.)

[0012] 以下通过实施例对本发明作进一步详细的说明, 但本发明的保护范围不受具体实施例的任何限制, 而是由权利要求加以限定。

[0013] 实施例 1: 本发明所涉及化合物 Fluevirosines A 片剂的制备:

[0014] 取 5 克化合物 Fluevirosines A, 加入糊精 195 克, 混匀, 常规压片制成 1000 片。

[0015] 实施例 2: 本发明所涉及化合物 Fluevirosines A 胶囊剂的制备:

[0016] 取 5 克化合物 Fluevirosines A, 加入淀粉 195 克, 混匀, 装胶囊制成 1000 粒。

[0017] 下面通过药效学实验来进一步说明其药物活性。

[0018] Fluevirosines A 的药理实验

[0019] 1) 供试菌株

[0020] 幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 标准菌株 ATCC43504 购于美国菌种保存中心 (American Type Culture Collection, ATCC)。15 株 Hp 临床菌株采自江苏省人民医院消化科、江苏省中医院检验科和南京市儿童医院胃镜室接受胃镜检查的患者; 在连续胃镜检查中对消化性溃疡、十二指肠球炎或疣状胃炎的患者, 先经快速尿素酶实验确定为 Hp 阳性者, 再取胃窦黏膜 1-2 块, 切碎后接种于含 8% 马血清、三甲氧苄氨嘧啶 (trimethoprim, TMP) 1.25g/L、多粘菌素 (polymyxin) B2500U/L、万古霉素 (vancomycin) 10mg/L 的 Columbia 选择性琼脂培养基中, 于 37 °C 在微氧环境下 (5%O₂, 10%CO₂ 和 85%N₂) 培养 72 小时。收集细菌, 经涂片革兰氏染色, 氧化酶、触酶和尿素酶鉴定为阳性后, 传代纯培养, 所得菌株作为实验菌株。

[0021] 2) 菌株培养

[0022] 我们采用微需氧袋 (购自南京医科大学) 进行 HP 的菌株培养, 它可通过化学反应产生 Hp 所需要的微需氧环境。

[0023] 3) 生物活性测定

[0024] 采用纸片法 (Microbiological paper method) 测定化合物对幽门螺杆菌的抑制作用, 用琼脂稀释法来测定供试样品的最低抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC)。

[0025] I. 纸片法实验

[0026] (A) 准备培养基将配制好的 Columbia 培养基经高压蒸汽灭菌后,冷却至 50-60℃,加 8% 马血清或绵羊血,混匀倾注于已经灭菌的培养皿中,每皿 7-10ml,培养基厚度为 1.5mm(无菌操作)。

[0027] (B) 转接实验菌(涂菌)用微量取样器取稀释好的 108CFU/ml (10D660=108CFU/ml) Hp 的菌悬液 0.1ml 均匀地涂抹在适宜的培养皿表面。倒置于 37℃ 烘干箱中 15min 后取出,目的使琼脂表面干燥,备用。

[0028] (C) 贴样品纸片用微量取样器取 6 μ l 待测样品(质量浓度 2mg/ml) 注入已经灭菌的圆滤纸片上。用无菌镊子镊取含样品的纸片和对照空白纸片,按无菌操作分别纸片紧贴于含菌琼脂表面,每隔一定距离贴一张纸片。每种菌做 3 皿,所得结果求其平均值。

[0029] (D) 培养将各平皿置于微需氧袋中,封口,打开气体发生器,再置于 37℃ 培养箱中培养 72h。

[0030] (E) 测抑菌圈直径取出平板后,分别测量各纸片周围抑菌圈直径的大小。参照对照组的的结果,可得出待测样品敏感实验的结果。重复三次。

[0031] II. 琼脂稀释法测定 MIC

[0032] (A) 药物平板的制备首先将测试的化合物用二甲基亚砜(DMSO) 溶液配制成 0.5mg/ml 的母液,再用无菌水稀释,最终配成 10.0,8.0,6.0,4.5,4.0,3.5,3.0,2.5,2.0,1.5,1.0,0.5 和 0.25 μ g/ml 的浓度系列,DMSO 在介质中的浓度小于 1%。将 1ml 配制好的测试化合物溶液与保温于 50℃ 的 9ml 哥伦比亚培养基另加 1ml 保温于 50℃ 的马血清充分混匀,浇制入培养皿中冷却即成。

[0033] (B) 转接实验菌(涂菌)用微量取样器吸取稀释好的 1×108 CFU/ml Hp 的菌悬液 0.1ml 均匀地涂抹在培养皿表面,倒置于 37℃ 烘干箱中 15min 后取出,目的使琼脂表面干燥,备用。

[0034] (C) 确定 MIC 将待测培养皿在微需氧袋(含 :85%N₂, 10%CO₂ 和 5%O₂) 中,保温 37℃ 培养 72 小时,观察 Hp 生长情况,与空白组相对照,以完全没有菌生长的样品最低浓度为最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC) 值。阳性对照为氨苄西林(Ampicillin)。

[0035] 3、Fluevirosines A 的药理实验结果

[0036] Fluevirosines A 的体外实验表明,Fluevirosines A 具有很强的抗幽门螺旋杆菌活性,纸片法显示其抑菌圈直径为 17mm(ATCC43504)。用琼脂稀释法显示它能完全抑制 5 个随机的临床菌株(Hp001、Hp003、Hp004、Hp018 和 Hp036) 和 1 个标准菌株(ATCC43504) 的生长,最小抑菌浓度(MIC)均为 0.31 μ g/ml。用氨苄西林作阳性对照,其对 6 株测试菌完全抑制的最小浓度(MIC) 为 3.5 μ g/ml。

[0037] 结论 :Fluevirosines A 抑制幽门螺旋杆菌活性的能力比氨苄西林强,说明对于与幽门螺旋杆菌密切相关的急、慢性胃炎、胃、十二指肠溃疡等疾病来讲,Fluevirosines A 是一个极具开发潜力的化合物。它可直接用于相应疾病的治疗以及相关药物的制备。