

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680039799.9

A61K 31/357 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

C07F 15/00 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

[43] 公开日 2009年3月4日

[11] 公开号 CN 101378748A

[22] 申请日 2006.9.28

[21] 申请号 200680039799.9

[30] 优先权

[32] 2005.10.24 [33] US [31] 11/256,175

[86] 国际申请 PCT/CN2006/002547 2006.9.28

[87] 国际公布 WO2007/048311 英 2007.5.3

[85] 进入国家阶段日期 2008.5.9

[71] 申请人 香港大学

地址 中国香港薄扶林道

[72] 发明人 支志明 辛伟贤 黄礼明

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张轶东 李炳爱

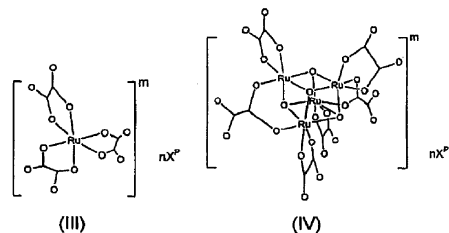
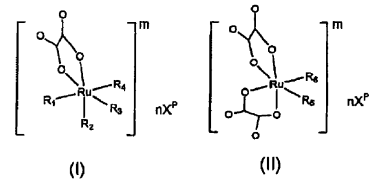
权利要求书 4 页 说明书 15 页 附图 11 页

[54] 发明名称

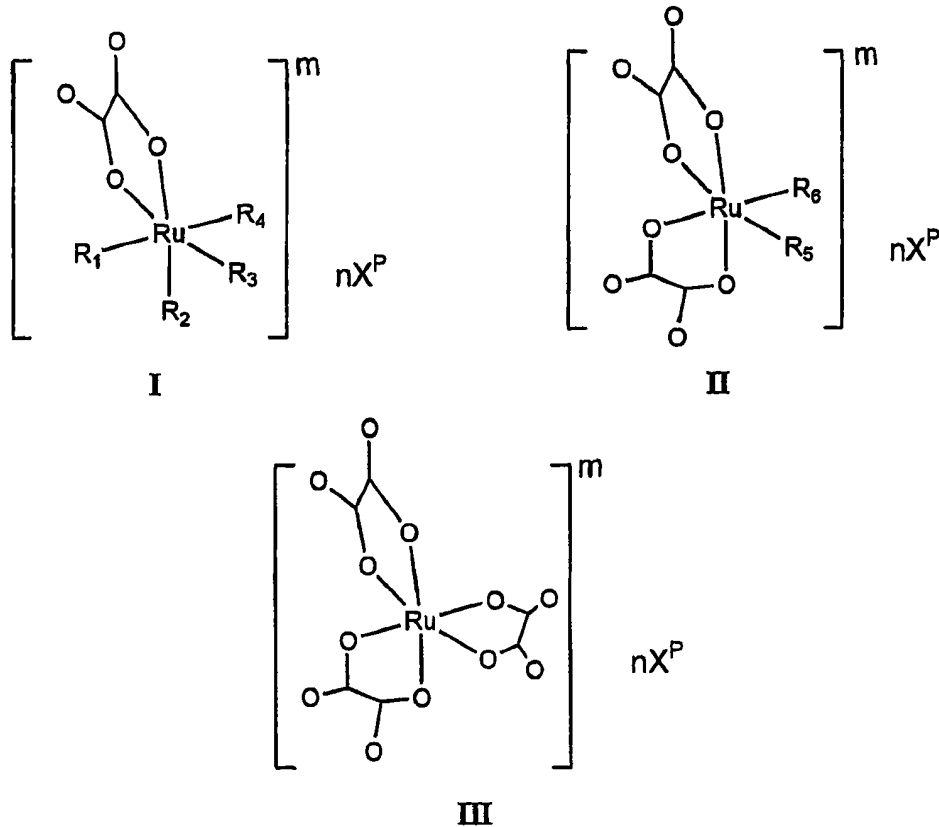
含有草酸根合钌化合物的药物组合物及其使用方法

[57] 摘要

包含一种或多种式(I、II、III和IV)草酸根合钌化合物作为活性成分的药物组合物。该药物组合物可被用于治疗被病毒感染的患者或预防治疗处于病毒感染危险中的患者。



1. 一种药物组合物,包括用于治疗或预防与病毒相关的感染的有效量草酸根合钌化合物以及药学上可接受的载体,所述草酸根合钌化合物是式 I、II 或 III 的化合物或其药学上可接受的盐:



其中:

R₁、R₂、R₃、R₄、R₅ 和 R₆ 相互独立地是草酸根、草酸、羟基或通过氧原子桥连的式 I 或 II 的重复单元;

每个 X^P 独立地是药学上可接受的抗衡离子;

m 是 7-至 0 的整数;

P 是 0 至 3+ 的整数;

n 等于 *m*/*P* 的绝对值。

2. 根据权利要求 1 的药物组合物,其中一种或一种以上的所述药学上可接受的抗衡离子被表示在式 I、II 或 III 中。

3. 一种用于治疗或预防与病毒相关的感染的方法,包括向需要的患者施用或基于细胞检测包含有效量的权利要求 1 的草酸根合钌化合

物的组合物。

4. 根据权利要求 3 的方法，其中所述病毒是人类免疫缺陷病毒 (HIV)。

5. 根据权利要求 3 的方法，其中所述病毒是人类乙肝病毒 (HBV)。

6. 根据权利要求 3 的方法，其中所述病毒是人类甲肝病毒 (HAV)、人类丙肝病毒 (HCV)、与严重急性呼吸综合征相关的冠状病毒 (SARS-CoV)、单纯疱疹病毒、人乳头状瘤病毒、人类疱疹病毒、流行性感冒病毒或猴免疫缺陷病毒 (SIV)。

7. 根据权利要求 3 的方法，其中草酸根合钆化合物在被病毒感染的细胞中显示出抗病毒活性，包括向需要的患者施用或基于细胞检测含有有效量的一种或一种以上的所述草酸根合钆化合物的组合物。

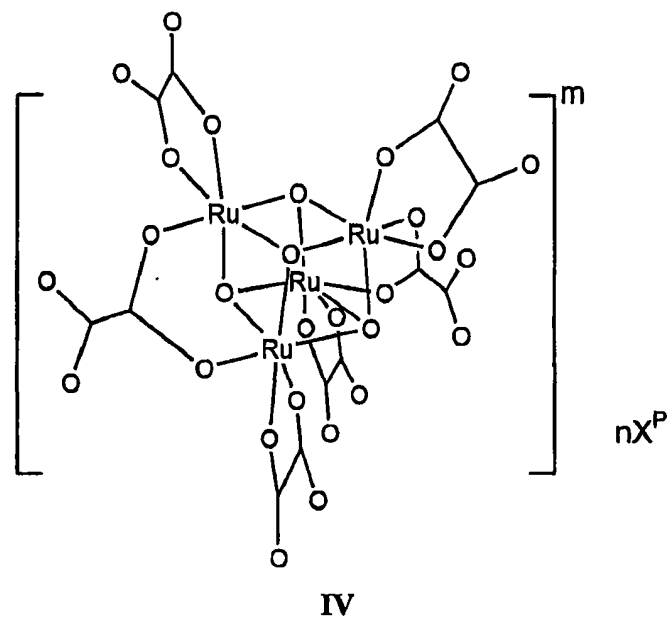
8. 根据权利要求 3 的方法，其中所述病人是任何动物界的成员。

9. 根据权利要求 3 的方法，其中所述草酸根合钆化合物在被病毒感染的细胞中显示出抗病毒活性，包括施用有效量的一种或一种以上的所述草酸根合钆化合物以进行基于细胞的检测。

10. 根据权利要求 3 的方法，其中所述细胞是指动物界任何一种动物的细胞。

11. 根据权利要求 3 的方法，其中所述草酸根合钆化合物抑制 HIV-1 逆转录酶活性。

12. 一种用于治疗或预防与病毒相关的感染的包含有效量草酸根合钆簇以及药学上可接受的载体的药物组合物，所述草酸根合钆簇是式 IV 的化合物或其药学上可接受的盐：



其中：

每个 X^P 独立地是药学上可接受的抗衡离子；

m 是 -10 至 10 的整数；

P 是 0 至 +3 的整数；

n 等于 m/P 的绝对值。

13. 根据权利要求 12 的药物组合物，其中一种或一种以上的所述药学上可接受的抗衡离子被表示在式 IV 中。

14. 一种用于治疗或预防与病毒相关的感染的方法，包括向需要的患者施用或基于细胞检测包含权利要求 12 的有效量的草酸根合钌簇的组合物。

15. 根据权利要求 14 的方法，其中所述病毒是人类免疫缺陷病毒 (HIV)。

16. 根据权利要求 14 的方法，其中所述病毒是人类乙肝病毒 (HBV)。

17. 根据权利要求 14 的方法，其中所述病毒是指人类甲肝病毒 (HAV)、人类丙肝病毒 (HCV)、与严重急性呼吸综合征相关的冠状病毒 (SARS-CoV)、单纯疱疹病毒、人乳头状瘤病毒、人类疱疹病毒、流感病毒或猴免疫缺陷病毒 (SIV)。

18. 根据权利要求 14 的方法，其中所述草酸根合钌簇在被病毒感染

染的细胞中显示出抗病毒活性，包括向需要的患者施用或基于细胞检测含有有效量的一种或一种以上的所述草酸根合钌簇的组合物。

19. 根据权利要求 14 的方法，其中所述患者是动物界的任何成员。

20. 根据权利要求 14 的方法，其中所述草酸根合钌簇在被病毒感染的细胞中显示出抗病毒活性，包括施用有效量的一种或一种以上的所述草酸根合钌簇以进行基于细胞的检测。

21. 根据权利要求 14 的方法，其中所述细胞是指动物界中任何一种动物的细胞。

22. 根据权利要求 14 的方法，其中所述草酸根合钌簇显示出有效的抑制 Hut/CCR5 细胞中的 HIV-1(BaL)复制的作用。

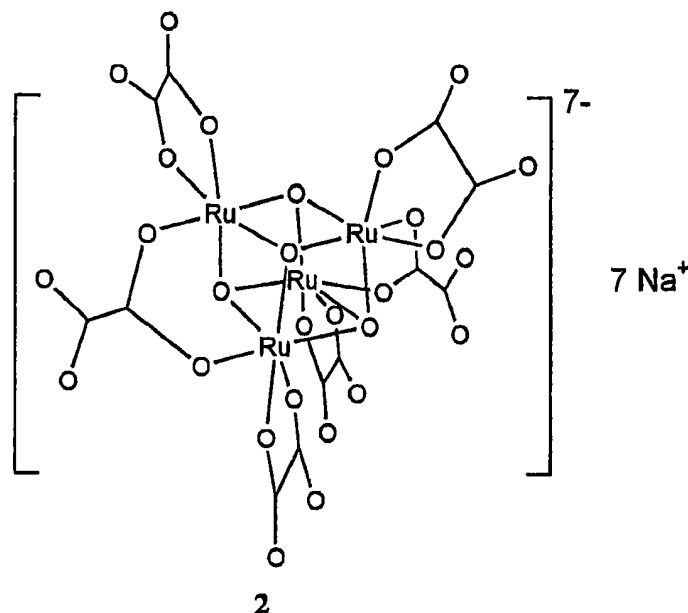
23. 根据权利要求 14 的方法，其中所述草酸根合钌簇显示出有效抑制 GHOST/CXCR4 细胞中的 HIV-1(III_B)复制的作用。

24. 根据权利要求 14 的方法，其中所述草酸根合钌簇显示出有效抑制 PBMC 细胞中的 HIV-1(III_B)复制的作用。

25. 根据权利要求 14 的方法，其中所述草酸根合钌簇显示出对于被 HIV-1 感染的 Hut/CCR5 细胞具有细胞保护的活性。

26. 根据权利要求 14 的方法，其中所述草酸根合钌簇显示出抑制 HIV-1 逆转录酶的活性。

27. 根据权利要求 14 的方法，其中在 (2) 中 m 是 7-、n 是 7、X 是 Na、P 是 1+：



含有草酸根合钆化合物的药物组合物及其使用方法

技术领域

本发明一般涉及含有草酸根合钆化合物的药物组合物。此外，本发明还涉及使用草酸根合钆化合物作为有效的抗病毒剂的用途。

背景技术

获得性免疫缺陷综合症(AIDS)于1981年首次报道于美国，AIDS流行显示出在世界范围内严重程度和时机的多样性。人类免疫缺陷病毒1型(HIV-I)是AIDS的病原体，它是由RNA遗传物质组成的逆转录病毒，抑制人免疫系统摆脱感染。目前已知的抗HIV剂可分为四种主要类型：(1)核苷类逆转录酶抑制剂；(2)非核苷类逆转录酶抑制剂；(3)蛋白酶抑制剂和(4)核苷酸还原酶抑制剂(De Clercq等人. Rev. Med. Virol. (2000), 10, 255)。首次在临床上使用的用于治疗HIV的是叠氮胸苷(AZT)(Ezzell等人. Nature, (1987), 329, 751)。AZT通过掺入到DNA链中，并导致中断链的延长，并进一步阻止基因的复制而发挥作用(<http://www.aids.org/>)。尽管AZT及其鸡尾酒治疗方案已经显示出对于HIV复制的抑制的有希望的作用，但是具有抗药性的病毒以及抗逆转录病毒毒性仍然是越来越多的临床和公众关注的起因(Deeks S. G. Lancet (2003), 362, 2002)。

基于金属化合物的药用性能已经并继续成为新药开发的感兴趣的领域(Orvig等人. Chem. Rev. (1999), 99, 2201-2203; Abrams等人. Science (1993), 261, 725-730)。在文献中，基于金属化合物表现出临床应用最显着的例子就是顺铂(Rosenberg等人. Nature (1969), 222, 385-386)。虽然对于细胞毒金属化合物有广泛的研究，但是有关研究抗病毒的基于金属化合物也正在开发中。就我们所知，有几类基于金属化合物，如已知的聚氧金属化物(polyoxometalates)(Rhule等人. Chem. Rev. (1998), 98, 327-357; Hill等人. J. Med Chem. (1990), 33, 2767-2772)、metallocyclams (Liang等人. Chem. Soc. Rev. (2004), 33, 246-266)、钒((Wong等人. Chem. Comm. (2005), 3544-3546)、锌(Aoki等人. Chem. Rev. (2004), 104, 769-787)、金(Sun等人.

ChemBioChem (2004), 5, 1293-1298)络合物展示出显著的抗 HIV 活性。然而, 关于基于钌化合物的抗病毒活性的实例是有限的(Luedtke 等人, ChemBioChem (2002), 3, 766-771; Mishra 等人, Bioorg. Med Chem. (2001), 9, 1667-1671)。

发明概述

本发明涉及混合价聚阴离子草酸根合钌簇的结构表征, 所述簇通过抑制在 Hut/CCR5 细胞中的 HIV-I(BaL)复制、抑制在 GHOST/CXCR4 和正常的人外周血单核细胞 (PBMC) 的复制和体外研究 HIV-I RT 活性来显示出有效的抗-HIV-1 活性。所述草酸根合钌簇显示出如 MTT 法揭示的对于宿主细胞的低细胞毒性。借助于 TUNEL 法, 还发现所述草酸根合钌化合物显示出对于被 HIV-1(III_B)感染的 Hut/CCR5 细胞具有细胞保护的活性。

本发明提供了一种能够抑制在 Hut/CCR5 细胞中 HIV-I(BaL)复制、抑制在 GHOST/CXCR4 和 PBMC 中 HIV-1(III_B)复制以及在体外研究中抑制 HIV-I RT 活性的新型草酸根合钌化合物 (2)。这种新型的基于金属化合物显示出对宿主细胞低细胞毒性 (如通过 MTT 法观察), 并且显示出对于被 HIV-I 感染的 Hut/CCR5 细胞的细胞保护活性 (如通过 TUNEL 法观察)。本发明提供了草酸根合钌化合物, 基于钌化合物的独特类型, 用作抗 HIV 剂的用途, 该用途通过施予需要的患者包含有效量的草酸根合钌化合物来有效抑制被 HIV 感染的 Hut/CCR5、GHOST/CXCR4、PBMC 细胞和 HIV-I RT 的活性来证实。

附图简述

图 1 举例说明 $\text{Na}_3[\text{Ru}(\text{ox})_3]$ (1)的透视图。热椭球是在 30% 的概率水平画出的。

图 2 举例说明本发明的 $\text{Na}_7[\text{Ru}_4(\mu_3\text{-O})_4(\text{C}_2\text{O}_4)_6]$ (2)透视图。为了清楚起见省略了钠抗衡离子和水。热椭球是在 30% 的概率水平画出的。

图 3 举例说明 $\text{Na}_7[\text{Ru}_4(\mu_3\text{-O})_4(\text{C}_2\text{O}_4)_6]$ (2)的模拟和实验的粉末 X 射线衍射图。

图 4 举例说明 $\text{Na}_7[\text{Ru}_4(\mu_3\text{-O})_4(\text{C}_2\text{O}_4)_6]$ (2)的 Q-TOF ESI-MS 光谱 (加入 TFA 和负离子模式)。

图 5 举例说明 $\text{Na}_7[\text{Ru}_4(\mu_3\text{-O})_4(\text{C}_2\text{O}_4)_6]$ (2) 温度依赖性磁化率。 χ -T 的温度依赖性 χ_m (a) 图和 (b) $1/\chi$ -T 图。

图 6 举例说明 $\text{Na}_7[\text{Ru}_4(\mu_3\text{-O})_4(\text{C}_2\text{O}_4)_6]$ (2) 在水溶液中的紫外可见光谱。

图 7 举例说明 $\text{Na}_7[\text{Ru}_4(\mu_3\text{-O})_4(\text{C}_2\text{O}_4)_6]$ (2) 在 (a) 3 天和 (b) 7 天的孵育期间在 Hut/CCR5 细胞中抑制 HIV-1(BaL) 的百分数。

图 8 举例说明 $\text{Na}_7[\text{Ru}_4(\mu_3\text{-O})_4(\text{C}_2\text{O}_4)_6]$ (2) 在 7 天的孵育期间在 (a) GH0ST 细胞和 (b) PBMC 中抑制 HIV-1(BaL) 的百分数。

图 9 举例说明 $\text{Na}_7[\text{Ru}_4(\mu_3\text{-O})_4(\text{C}_2\text{O}_4)_6]$ (2) 对 HIV-1 RT 活性的抑制。

图 10 举例说明 TUNEL 法显示出 $\text{Na}_7[\text{Ru}_4(\mu_3\text{-O})_4(\text{C}_2\text{O}_4)_6]$ (2) 呈现出在 7 天的孵育期间对于被 HIV-I 感染的 Hut/CCR5 细胞的细胞保护活性。

图 11 举例说明在 $\text{Na}_7[\text{Ru}_4(\mu_3\text{-O})_4(\text{C}_2\text{O}_4)_6]$ (2) 存在下 (a) Hut/CCR5 细胞 (b) GH0ST/CXCR4 细胞和 (c) PBMC 的细胞存活率百分数。

发明详述

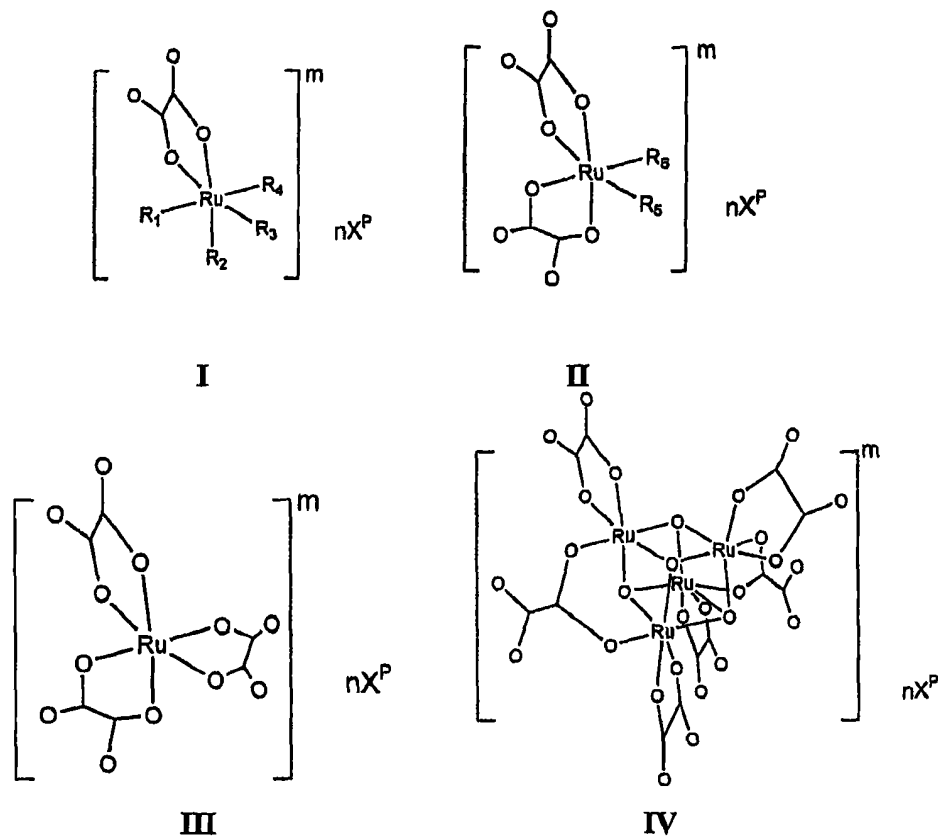
本发明涉及草酸根合钌化合物，它可以被用来作为抗病毒剂。例如，可以提供一种或多种草酸根合钌化合物，其可以具有有效地抑制 Hut/CCR5 细胞中的 HIV-1(BaL) 复制的作用、具有有效地抑制 GH0ST/CXCR4 和 PBMC 细胞中 HIV-I(III_B) 复制的作用以及在体外研究中抑制 HIV-I RT。草酸根合钌化合物还可以具有如 MTT 法揭示的对于宿主细胞的低细胞毒性。通过 TUNEL 法，草酸根合钌化合物还可以显示出对于被 HIV-1(III_B) 感染的 Hut/CCR5 具有细胞保护的活性。

本发明还涉及到使用一种或多种草酸根合钌化合物作为抗病毒剂的方法。在一个实施方式中，提供了一种通过施予如患者或施用基于细胞的检测来抑制 HIV 活性的方法以及包含有效量的草酸根合钌化合物的组合物。涉及的细胞可以是动物界中一种动物的细胞。所述细胞的非限制实例包括 Hut/CCR5、GH0ST/CXCR4 和 PBMC。

在组合物中草酸根合钌化合物的含量可以变化。在一个示例性实施方式中，草酸根合钌化合物的有效量可以为 100 ng/kg-100mg/kg，如当该组合物用于患者时。例如，草酸根合钌化合物可以为 190 ng/kg、

50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 或 5mg/kg, 如取决于患者的病症。在另一个示例性实施方式中, 草酸根合钌化合物的有效量可以为 1nM-1mM, 如当该组合物用于基于细胞检定时。例如, 草酸根合钌化合物可以是 1.9 nM、500 nM、5 μM 和 50 μM 。

本发明的草酸根合钌化合物可通过结构式 I、II、III 或 IV 或其药学上可接受的盐来表示。



本发明的草酸根合钌化合物提供了多种抗病毒效果。在一个示例性的实施方式中, 草酸根合钌化合物 I、II、III 或 IV 或其药学上可接受的盐能够在体外研究中抑制 Hut/CCR5 细胞中 HIV-1(BaL)的复制。在另一个示例性实施方式中, 草酸根合钌化合物 I、II、III 或 IV 或其药学上可接受的盐能够在体外研究中抑制 GHOST/CXCR4 细胞中 HIV-1(III_B)的复制。在另一个示例性的实施方式中, 草酸根合钌化合物 I、II、III 或 IV 或药学上可接受的盐能够在体外研究中抑制 PBMC 细胞中 HIV-1(III_B)的复制。在另一个示例性的实施方式中, 草酸根合钌化合物 I、II、III 或 IV 或药学上可接受的盐能够在体外研究中抑制 HIV-1

RT 的活性。在另一个示例性的实施方式中，草酸根合钕化合物 I、II、III 或 IV 能够显示出低细胞毒性，并对于被 HIV-1 感染的 Hut/CCR5 细胞具有细胞保护活性。

I. 定义

此处提供了药物组合物和草酸根合钕化合物用于抵抗病毒的使用。所述药物组合物包含有效量的草酸根合钕化合物以抑制逆转录酶的活性以及抵抗病毒的增殖。

应当理解，草酸根合钕化合物不会形成电荷中性络合物。例如，在阳离子金属上的净正电荷可以少于被配位的草酸根配体的绝对净负电荷。关于这一点，将有至少一个阳离子或抗衡离子配位至金属化合物上用于电荷中和。此处使用的，在此描述的短语“药学上可接受的盐”包括由带电荷的金属络合物和阳离子或抗衡离子形成的盐。

此处使用的，在此描述的“阳离子”或“抗衡离子”是指已配位到草酸根合钕化合物的带负电荷草酸配体的带正电荷的基团。阳离子非限制的实例包括 Li、Na 和 K。

此处使用的，草酸根合钕化合物可以作为单个分子或聚集的分子而存在。

此处使用的，短语“药学上可接受的载体”是指由美国联邦或州政府的监管机构批准的或列入美国药典的或其他普遍公认的药典的用于动物、哺乳动物，特别是人类的那些。药学上可接受载体的非限制性实例包括液体，例如水和油，其中油包括石油、动物油、植物油或合成油。当本发明的化合物被给予静脉注射时，水是优选的载体。盐溶液、右旋糖水溶液和甘油溶液也可以被用作液体载体，尤其是用于可注射溶液。

此处使用的，在此描述的术语“患者”是指任何动物界成员。动物的非限制性实例包括牛、猴、马、羊、猪、猫、狗、小鼠、大鼠、家兔、豚鼠，最优选人类。

如上所述，本发明涉及用于抑制在被病毒感染的细胞中病毒活性的组合物。病毒的非限制性实例包括人甲肝病毒 (HAV)、人乙肝病毒 (HBV)、人丙肝病毒 (HCV)、与严重急性呼吸综合征相关的冠状病毒 (SARS-CoV)、单纯疱疹病毒、人乳头状瘤病毒、人类疱疹病毒、

流行性感病毒、猴免疫缺陷病毒 (SIV), 最优选人类免疫缺陷病毒 (HIV)。

此处使用的, 在处描述的术语“PBMC”是指正常的人外周血单核细胞。

此处使用的, 在处描述的术语“HIV-1 RT”是指 HIV-1 逆转录酶。

此处使用的, 在处描述的术语“TUNEL 法”是指终端尿苷酰-核苷酸末端标记。

此处使用的, 在此描述的术语“GSH”是指还原性谷胱甘肽。

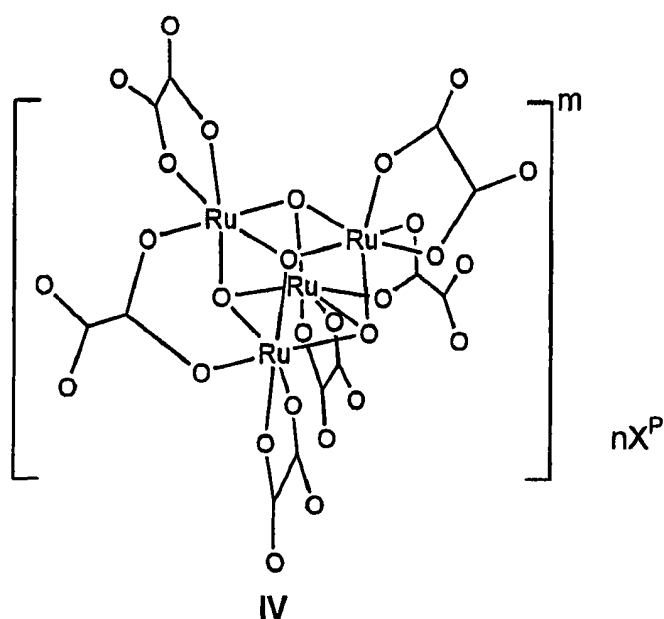
此处使用的, 在处描述的术语“MTT 法”是指 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-联苯四唑鎓溴化物法。

此处使用的, 在此描述的术语“AZT”是指叠氮胸苷。

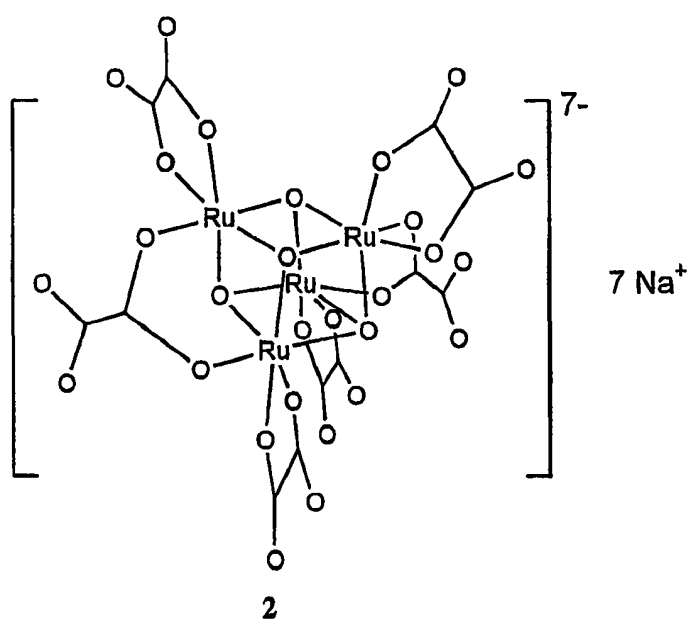
II. 草酸根合钌化合物的合成

一般而言, 发现本发明的草酸根合钌簇化合物为一类新的物质, 其可根据制备 $\text{Na}_3[\text{Ru}(\text{ox})_3]$ (1) 的工艺改变来制备(Che 等人, *Inorg. Chem.* (1985), 24, 1359)。将 $\text{K}_2[\text{RuCl}_5(\text{OH}_2)]$, 并且将草酸在室温下在水介质中搅拌 2 周。在反应期间, 观察到颜色从深黑色渐变至深褐色。2 周后, 通过加入 NaHCO_3 将反应混合物的 pH 值转变为碱性 (约 pH 值=10)。

在本发明中, 在此描述的组合物是具有下列结构 IV 的草酸根合钌簇:



下面给出了示例性合成的式 IV 草酸根合钌簇：



得到的草酸根合钌簇 $\text{Na}_7[\text{Ru}_4(\mu_3\text{-O})_4(\text{C}_2\text{O}_4)_6]$ (2) 是深绿色固体，以及以 10% 产率的钠盐形式。也获得了提供的少量的浅棕色固体 $\text{Na}_3[\text{Ru}(\text{ox})_3]$ (1)。由于 1 和 2 在水中的溶解度不同，后一组优先通过丙酮缓慢扩散至含有 2 的水溶液中而沉淀出来。反复重结晶除去不需要的 1。

III. 草酸根合钌簇的抗 HIV 活性

在本发明中描述的草酸根合钌簇 $\text{Na}_7[\text{Ru}_4(\mu_3\text{-O})_4(\text{C}_2\text{O}_4)_6]$ (2) 显示出对于 Hut/CCR5 细胞中 HIV-1(BaL)复制、对于 GHOST/CXCR4 和 PBMC 细胞中 HIV-1(III_B) 复制的有效抑制作用以及对于在体外研究的 HIV-1 RT 抑制活性。基于金属簇类型也显示出低细胞毒性, 并显示出如由 TUNEL 法观察到的对于被 HIV-1 感染的 Hut/CCR5 细胞的细胞保护活性。本发明描述了聚阴离子草酸根合钌簇、基于金属簇类型首次用作抗病毒剂, 表明了其具有有效的抗 HIV 抑制活性。

细胞抗病毒研究的非限制性实例, 包括但不限于 Hut/CCR5、GHOST/CXCR4 和 PBMC 细胞。

本发明涉及草酸根合钌簇 $\text{Na}_7[\text{Ru}_4(\mu_3\text{-O})_4(\text{C}_2\text{O}_4)_6]$ (2), 其表现出抑制 Hut/CCR5 细胞中 HIV-1(BaL)复制、抑制 GHOST/CXCR4 和 PBMC 细胞中 HIV-1(III_B)的复制以及在体外研究中对 HIV-1 RT 的抑制活性。基于金属簇类型也显示出低细胞毒性, 并显示出如由 TUNEL 法观察到的对于被 HIV-1 感染的 Hut/CCR5 细胞的细胞保护活性。

IV. 实施例

以下提出的实施例帮助理解本发明, 并且不应该被视为对此处描述和要求的本发明的具体限定。本发明的这种变型, 其中包括现在已知的或以后开发的所有等价物的替代, 这将在在所属技术领域的范围内, 并且这些配方的变化或实验设计的微小变化都落在本发明的范围内。

仪器。所有吸收光谱和 MTT 检测记录在 Perkin-Elmer Lambda 900 和 Perkin-Elme 融合 α -FP 分光光度计上。阳离子 FAB 与 EI 质谱记录在 Finnigan MAT95 质谱仪上。电喷雾电离质谱(ESI-MS)在微质谱 Q-TOF² 光谱仪上进行。¹H NMR 谱被记录在 Bruker DPX-300 或 DPX-400 NMR 光谱仪上。磁性测量在量子设计 SQUID 磁力计上进行。TUNEL 流式细胞分析使用配备有长 480、525 带和 625 长通路镜的 Coulter EPICS 流式细胞仪(Coulter, Miami, FL)上进行。样品在 488nm 下的被 15mW 气冷氩聚集激光所激发。荧光信号用 Coulter Elite 4.0 软件 (Coulter)来操作, 并通过 Winlist 1.04 和 Modfit 5011 软件 (verity Software House, Topsham, ME)来分析。

材料。所有化学品都是分析级的，并购自 Sigma- Aldrich 化学有限公司，除非另有说明。在整个实验中使用分析级有机溶剂和 Milli-Q 水。三氯化钌购自 Strem。K₂[RuCl₅(OH₂)]通过根据在 Mercer 和 Buckley 的 *Inorg. Chem.* (1965), 4, 1692 中描述的方法来进行制备的。

HIV-1(BaL) 和 HIV-1 (III_B) 储液 (p24 蛋白 300 ng/mL), Hut/CCR5 和 GHOST/CXCR4 细胞均由 D. Tao 博士 (Institute of Molecular Medicine, University of Oxford, 英国)赠与。外周血单核细胞 (PBMC) 由香港红十字会输血服务中心 (the Hong Kong Red Cross Blood Transfusion Service) 获得的白细胞层来制备。

由全血 (450 毫升) 制备的每个白细胞层单位均含有约 5 x 10⁸ 细胞。为了分离 PMBC, 将白细胞层 (15 毫升) 在无菌条件下转移到离心管 (50 毫升) 中, 并用 RPMI 培养基以 1:1 (V/V) 的比率稀释。将 Ficoll[®] 溶液 (15 毫升) 缓慢加入至被稀释的血液中, 并将该混合物在室温下在 800 rpm 下离心 25 分钟。将在界面的 PBMC 用冷 RPMI 培养基洗涤。将洗涤下的 PBMC 首先在 500rpm 下旋转 7 分钟, 然后在 250 rpm 下旋转 7 分钟, 最后在 200 rpm 下旋转以获得一个细胞丸。将 PBMC 中重新悬浮在氯化铵溶解缓冲液 (ACK 缓冲液) 中, 并在室温下孵育 5 分钟以溶解剩余的红血细胞。将 Hut/CCR5 细胞、GHOST/CXCR4 细胞和 PBMC 保持在补充有牛胚胎血清 (10%, v/v) 和 L-谷氨酰胺 (2 mM) 的 RPMI 1640 培养基 (Life Technologies 公司) 中。将青霉素 (100 单位/毫升) 和链霉素 (100 μg/毫升) 加到除 PBMC 外的全培养基中。将全细胞培养物在 37 °C 下在 5% CO₂/95 % 空气湿润气氛中孵育, 并继代培养一周两次 (除 PBMC)。

络合物 1 和 2 的鉴定是通过微量分析 (元素分析)、X 射线晶体学、FAB-MS 和紫外可见光谱 (参见图 1-6) 来进行的。

实施例 1

草酸根合钌簇 Na₇[Ru₄(μ₃-O)₄(C₂O₄)₆] (2) 的制备工艺

实施例 1 描述了示例性的草酸根合钌簇 Na₇[Ru₄(μ₃-O)₄(C₂O₄)₆] (2) 的制备和特性。

将 K₂[RuCl₅(OH₂)] (1 克, 2.7 毫摩尔) 和草酸 (1.15 克, 12.8 毫摩尔) 在去离子水 (10 毫升) 中搅拌。需要缓慢升温以使草酸完全溶

解在水溶液中。将反应混合物在常温下搅拌 2 周，观察到颜色从暗黑色变化到深褐色。完成后，将该反应混合物加热回流 2 小时并小等分地加入 NaHCO_3 。当观察到不再有气泡时，不再添加 NaHCO_3 (约 2-3g)。将混合物连续回流 3 小时并冷却到室温。通过将丙酮缓慢扩散至水反应混合物中而得到 2 的暗绿色晶体。在光学显微镜下，除了 2 的暗绿色晶体外，还有少量的浅棕色结晶固体，通过 X 射线晶体学该固体被鉴定为 $\text{Na}_3[\text{Ru}(\text{ox})_3]$ (1)。杂质 1 通过重结晶而被除去。

$\text{Na}_7[\text{Ru}_4(\mu_3\text{-O})_4(\text{C}_2\text{O}_4)_6]$ (2): 产率: 10%. UV-可见(H_2O): $\lambda_{\text{max}}/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 266 (8100), 328 (3760, sh), 800 (1300, 宽峰)。ESI-MS -ve (Q-TOF) : m/z 1003.42 $[\text{Ru}_4\text{O}_4(\text{C}_2\text{O}_4)_6\cdot\text{H}_6]^-$, 1025.43 $[\text{Ru}_4\text{O}_4(\text{C}_2\text{O}_4)_6\cdot\text{H}_5\cdot\text{Na}]^-$ 1047.40 $[\text{Ru}_4\text{O}_4(\text{C}_2\text{O}_4)_6\cdot\text{H}_4\cdot\text{Na}_2]^-$, 1069.42 $[\text{Ru}_4\text{O}_4(\text{C}_2\text{O}_4)_6\cdot\text{H}_3\cdot\text{Na}_3]^-$, 1091.40 $[\text{Ru}_4\text{O}_4(\text{C}_2\text{O}_4)_6\cdot\text{H}_2\cdot\text{Na}_4]^-$, 1113.41 $[\text{Ru}_4\text{O}_4(\text{C}_2\text{O}_4)_6\cdot\text{H}\cdot\text{Na}_5]^-$, 1135.40 $[\text{Ru}_4\text{O}_4(\text{C}_2\text{O}_4)_6\cdot\text{Na}_6]^-$ $\text{C}_{12}\text{O}_{28}\text{Ru}_4\text{Na}_7$ 的分析计算值(%): C, 12.45; O, 38.7; H, 0; N, 0。测定值: C, 12.80; O, 38.42; H, 0.02; N, 0.01。

X 射线晶体学。晶体 1 和 2 是通过在室温下将丙酮扩散至含有 1 和 2 的水溶液反应混合物中而得到的 (参见图 1-2)。将尺寸为 0.4x0.25x0.2 毫米的棕色晶体 1 和尺寸为 0.25x0.2x0.1 毫米的深绿色晶体 2 放在玻璃毛细管中在 -20°C 下在 MAR 衍射仪上用于采集数据，所述的衍射仪具有 300 毫米成像板探测器，使用石墨单色 Mo-K_α 射线 ($\lambda = 0.71073\text{\AA}$)。

数据采集采用 2° 的 ϕ 振荡步骤、480 秒的曝光时间和 120 毫米的扫描距离进行。采集了 100 个图像。使用 DENZO 程序 (Otwinowski 和 Minor, In Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode, Methods in Enzymology, C. W. Carter, Sweet Jr. 和 R. M., Eds.; Academic Press: (1997); 第 276 卷, 第 307 卷) 解释图像以及进行强度积分。结构是通过在 PC 上使用 SHELXS-97 程序 (Sheldrick, SHELX97. Programs for Crystal Structure Analysis (Release 97-2), University of Goettingen, 德国, (1997)) 直接方法来解析的。2 的步进扫描 X 射线粉末衍射数据是通过使用单色 CuK_α ($\lambda = 1.5406$, 镍过滤器) 射线、在 40kV 和 30mA 操作下在 Phillips PW3710 粉末衍射仪上进行收集的 (参见图 3)。

将样品打开，并重新装载在样品支持物上用于重复数据的收集以减少粒子统计和样品的择优取向的系统误差。所有的样品不含有已知的氧化物和金属杂质，通过 ICCD 数据库匹配检索来检查它们。数据收集参数 $2-60^\circ (2\theta)$ 、步长 $=0.02^\circ$ 和扫描速度 $=0.004^\circ\text{秒}^{-1}$ 被用来优化计数统计和峰形曲线。

实施例 2

Na₇[Ru₄(μ_3 -O)₄(C₂O₄)₆](2)的磁性测定

实施例 2 描述了 Na₇[Ru₄(μ_3 -O)₄(C₂O₄)₆](2)的磁特性及混合价氧化状态。

2 的磁特性和温度磁化率在量子设计 SQUID 磁力计上进行。量子设计磁力计(MPMS-5s)装有超导磁铁(5 特斯拉)、交流磁化率测量和倒数样品选择(RSO)。温度范围是 $1.8\text{k}\leq T\leq 400\text{K}$ ，炉温为 $300\text{K}\leq T\leq 800\text{K}$ 。磁性测量：磁化强度是温度和磁场强度的函数。将样品晶体磨细至粉末，并放在支持物上用于测量。

本发明的 Na₇[Ru₄(μ_3 -O)₄(C₂O₄)₆](2)未显示出铁磁和反铁磁行为。利用居里定律，2 的居里常数为 0.347厘米^3 、磁矩为 $167\mu_B$ 。这相当于一个未配对电子(计算 $S=1/2$ ， $\mu_{\text{off}}=1.73\mu_B$)，并提出了 4 个钌原子不具有相同的氧化状态。结合 X-射线分析，推导出 2 (III、III、III、IV) 的混合价氧化状态(参见图 5)。在 2 中的混合价现也由于在水中在 800nm 左右($\epsilon=1300\text{dm}^3\text{摩尔}^{-1}\text{厘米}^{-1}$)的紫外吸收光谱中观察到的 2 的广谱吸收带而被支持，其归因于共价型带(参见图 6)。这样的共价型带也已在其它含有氧桥或羧酸根配体的钌体系中观察到(Shepherd Inorg. Chem. (1994), 33, 5262)。

实施例 3

Na₇[Ru₄(μ_3 -O)₄(C₂O₄)₆](2)的稳定性研究

实施例 3 描述了 Na₇[Ru₄(μ_3 -O)₄(C₂O₄)₆](2)的稳定性研究的结果。

在水溶液中监测了 2 的紫外吸收光谱七天。也通过紫外可见光谱对其在生理的相关介质(在 2mM GSH 的水溶液存在下)中的稳定性进行了监测。

当在水中和 2mMGSN 水溶液中放置 7 天时，观察到 2 的光谱没有明显的变化。这表明 2 在水中和生理介质中都是稳定的，并且簇的构架在溶液中是完好的。这提供了理解其在生物系统中作用的模式的机会。

实施例

抑制 Hut/CCR5 细胞中 HIV-1 (BaL) 复制

实施例 4 描述了用于测定 $\text{Na}_7[\text{Ru}_4(\mu_3\text{-O})_4(\text{C}_2\text{O}_4)_6]$ (2) 抑制 Hut/CCR5 细胞中 HIV-1(BaL) 复制作用的方法以及这些研究的结果。

将 $\text{Na}_7[\text{Ru}_4(\mu_3\text{-O})_4(\text{C}_2\text{O}_4)_6]$ (2) 的储备溶液 (10mM) 配制在无菌水中，并在生长培养基中稀释至需要的浓度。将在 24 孔板 (5×10^5 细胞/孔) 上用化合物 (400 μL) 对 Hut/CCR5 细胞在 37°C 下预处理 1 小时，随后用每板 CCR5-变 HIV-1 分离物 (每孔加入 5 μL 的 HIV-1 储液，p24 的总量 = 1500pg) 三份感染 3 小时。感染后，将细胞洗涤以除去残留的病毒培养液，并在化合物 (400 μL) 存在下培养 3 至 7 天。将培养的上清液收集，并通过 ELISA (HIV-1 p24 抗体试剂盒，Beckman Coulter) 测定病毒 p24 抗体浓度来测量病毒的复制。在浓度范围为 0.5-50 μM 的 3 个浓度下重复测试化合物三次。AZT 和 RuCl_3 也作为参照来测定。

本发明的 $\text{Na}_7[\text{Ru}_4(\mu_3\text{-O})_4(\text{C}_2\text{O}_4)_6]$ (2) 抑制 Hut/CCR5 细胞中 HIV-1 (BaL) 的复制。(参见图 7)

实施例 5

抑制 GH0ST/CXCR4 和 PBMC 细胞中 HIV-1 (III_B) 的复制

实施例 5 描述了用于测定 $\text{Na}_7[\text{Ru}_4(\mu_3\text{-O})_4(\text{C}_2\text{O}_4)_6]$ (2) 抑制 GH0ST/CXCR4 和 PBMC 细胞 HIV-1(III_B) 复制作用的方法以及这些研究的结果。

在无菌水中制备 2 的储备溶液 (10mM)，并在培养基中稀释至需要的浓度，将在 24 孔板 (5×10^5 细胞/孔) 上用化合物 (400 μL) 对 GH0ST/CXCR4 和 PBMC 细胞在 37°C 下预处理 1 小时，随后用每板 CCR5-变 HIV-1 分离物 (每孔加入 5 μL 的 HIV-1 储液，p24 的总量 = 1500pg) 三份感染 3 小时。感染后，将细胞洗涤以除去残留的病毒培

养液，并在化合物（400 μL ）存在下培养 3 至 7 天。将培养的上清液收集，并通过 ELISA（HIV-1 p24 抗体试剂盒，Beckman Coulter）测定病毒 p24 抗体浓度来测量病毒的复制。在浓度范围为 0.5-50 μM 的 3 个浓度下重复测试化合物三次。对化合物进行 3 次重复测试，还将 AZT 作为参照标准来测定。

本发明的 $\text{Na}_7[\text{Ru}_4(\mu_3\text{-O})_4(\text{C}_2\text{O}_4)_6]$ (2) 抑制 GHOST/CXCR4 和 PBMC 细胞中 HIV-1 (BaL) 复制（参见图 8）。

实施例 6

抑制 HIV-I RT 活性

实施例 6 描述了用于测定 $\text{Na}_7[\text{Ru}_4(\mu_3\text{-O})_4(\text{C}_2\text{O}_4)_6]$ (2) 抑制 HIV-I RT 活性作用的方法以及这些研究的结果。

测定不同化合物抑制 HIV-I RT 活性的作用采用商用检测盒（逆转录酶测定，化学发光，Rche）来进行。首先将络合物 2 和 AZT-TP 分别溶解在 PBS（1.3 μL ）中并与一组 HIV-I RT 在溶解缓冲液（2ng, 128.7 μL ）中在 37 $^\circ\text{C}$ （30 分钟）下混合。ELISA 检测在遵循制造商的指示（Eberle 和 Seibl J. Virol. Methods (1992), 40, 347) 下进行。一般而言，将被指示的化合物加入至试剂盒的微量板的相应孔上，并在 37 $^\circ\text{C}$ 下孵育 1 小时。然后将每孔中的溶液彻底除去，并将孔用每孔 250 μL 的洗涤缓冲液漂洗 5 次。在每次洗涤步骤期间，将洗涤缓冲液停留在孔中最少 30 秒钟。将该微量板模板用吸墨纸覆盖并干燥，之后将抗-DIG-POD 工作稀释液加入（每孔 200 μL ）在 37 $^\circ\text{C}$ 下孵育 1 小时。将该溶液丢弃，随后进行如上描述的洗涤和干燥步骤。将 POD 底物加入（每孔 200 μL ），并在室温下孵育 15 分钟。测定化学发光信号，并使用微量板化学发光计数器进行定量。基于相对于阴性对照（未处理群体）的溶液发光百分数评估 HIV-1 RT 活性。

本发明的 $\text{Na}_7[\text{Ru}_4(\mu_3\text{-O})_4(\text{C}_2\text{O}_4)_6]$ (2) 抑制了 HIV-1RT 活性（参见图 9）。

实例 7

$\text{Na}_7[\text{Ru}_4(\mu_3\text{-O})_4(\text{C}_2\text{O}_4)_6]$ (2) 在被 HIV-1 感染的 HuT/CCR5 细胞中的细胞保护活性

实施例 7 描述了用于测定在 $\text{Na}_7[\text{Ru}_4(\mu_3\text{-O})_4(\text{C}_2\text{O}_4)_6]$ (2) 对于被 HIV-I 感染的 Hut/CCR5 细胞的细胞保护作用的方法以及这些研究的结果。

TUNEL 反应优选标记在细胞凋亡期间产生的 DNA 链断裂。这是由脱氧核糖核酸末端转移酶(TdT)来标记 DNA 链断裂来进行的, 该脱氧核糖核酸末端转移酶以模板独立方式 (TUNEL 反应) 将标记的核苷催化聚合至 DNA 末端的游离 3'-OH 上。与流式细胞仪结合的 TUNEL 法 (原位细胞死亡检测试剂盒, 荧光素, Roche) 被用于测定细胞凋亡 (Gorczyca 等人, Cancer Res. (1993 年, 53, 1945)。3'-OH 末端的定量分析使用 MDADS 分析程序(Beckman Coulter)来进行。

将被 HIV-1 感染的 Hut/CCR5 细胞用 2 (0.5、5 和 50 μM) 处理 3 天。将细胞固定 (在 PBS、pH7.4 下的 4% 多聚甲醛) 和渗透 (在 0.1% 柠檬酸钠中的 0.1% Triton X-100), 然后将细胞用 PBS 漂洗两次, 并用 50 μL 的 TUNEL 反应混合物 (50 μL 酶溶液 + 450 μL 标记溶液) 在 37°C 下在湿润气氛、黑暗中标记 60 分钟。将样品用 PBS 漂洗 3 次, 并悬浮在 1 毫升含有 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PI 和 0.1% 核糖核酸酶的 PBS 中。流式细胞计数在 FACScan 细胞仪上进行。对从每一个细胞发出的红色 (PI) 和绿色 (荧光) 荧光进行测量。

本发明的 $\text{Na}_7[\text{Ru}_4(\mu_3\text{-O})_4(\text{C}_2\text{O}_4)_6]$ (2) 显示出对于被 HIV-1 感染的 Hut/CCR5 细胞的细胞保护活性 (参见图 10)。

实施例 8

在 $\text{Na}_7[\text{Ru}_4(\mu_3\text{-O})_4(\text{C}_2\text{O}_4)_6]$ (2) 存在下, 被 HIV 感染的 Hut/CCR5、GHOST/CXCR4 和 PBMC 细胞的细胞存活率百分数

实施 8 描述了用于测定在 $\text{Na}_7[\text{Ru}_4(\mu_3\text{-O})_4(\text{C}_2\text{O}_4)_6]$ (2) 存在下, 被 HIV 感染的 Hut/CCR5、GHOST/CXCR4 和 PBMC 细胞的细胞存活率百分数的方法以及这些研究的结果。

对于 Hut/CCR5、GHOST/CXCR4 和 PBMC 的细胞存活率的检测在 96 孔平底微量板上进行。将含有细胞 (每 m 毫升 1×10^6 细胞) 的补充培养基 (90 μL , 含有牛胚胎血清 (10%, v/v)、L-谷氨酰胺 (2mM)、青霉素 (100U/mL) 和链霉素 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)) 添加至 96 孔板中。随后将溶解在培养基中 (10 μL) 的浓度范围为 0.5-100 μM 的络合物 2

加入到 96 孔的每个孔中。对照孔只含有补充培养基 (100 μ L)。将微量板在 37 $^{\circ}$ C 下、在 5% CO_2 /95% 空气湿润气氛下孵育 7 天。所有的检测都与阴性对照组 (即载体对照) 和具有顺铂作为细胞毒剂的阳性对照组平行进行。

评估细胞存活率采用基于 MTT 法的改进的 Mosman 方法进行。将 10 μ L MTT 溶液 (在 1 \times PBS 中 5 毫克细胞/毫升) 加入至每个孔中, 并孵育 4 小时。在此之后, 加入 100 μ 升增溶的缓冲液 (在 0.01M HCl 中 10% SDS) 至每个孔中, 以溶解细胞, 并使形成的蓝色的甲臞络合物增溶。在过夜孵育后, 形成的甲臞采用吸收 580 nm 的过滤器通过微量板计数器 (Perkin-Elmer FusionTM α -FP) 来进行测量。在络合物浓度范围内相对于未处理的对照作为细胞存活率来计算络合物的 IC_{50} 。

本发明的 $\text{Na}_7[\text{Ru}_4(\mu_3\text{-O})_4(\text{C}_2\text{O}_4)_6]$ (2) 显示出在被 HIV-1 感染的 Hut/CCR5、GHOST/CXCR4 和 PBMC 细胞的细胞存活率/膜刚性的增加 (参见图 11)。

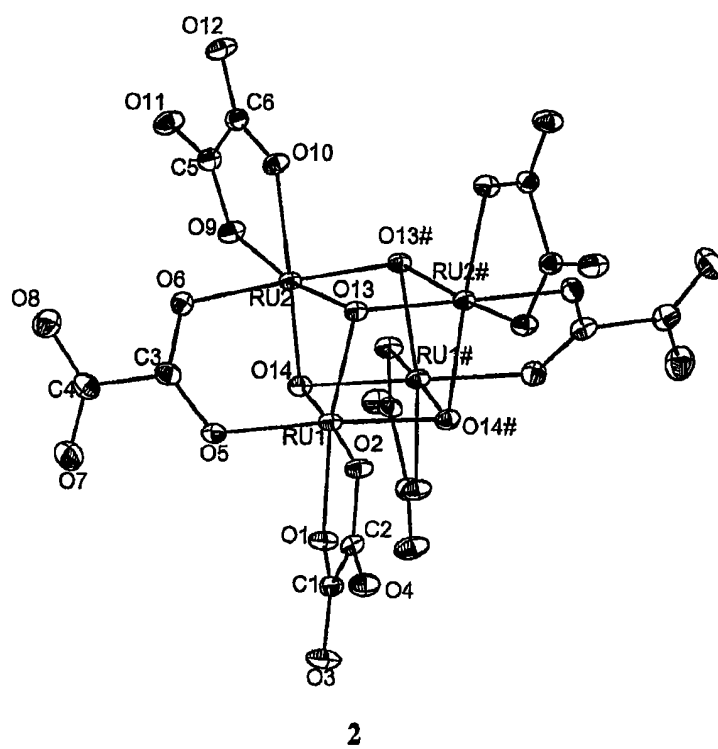


图 2

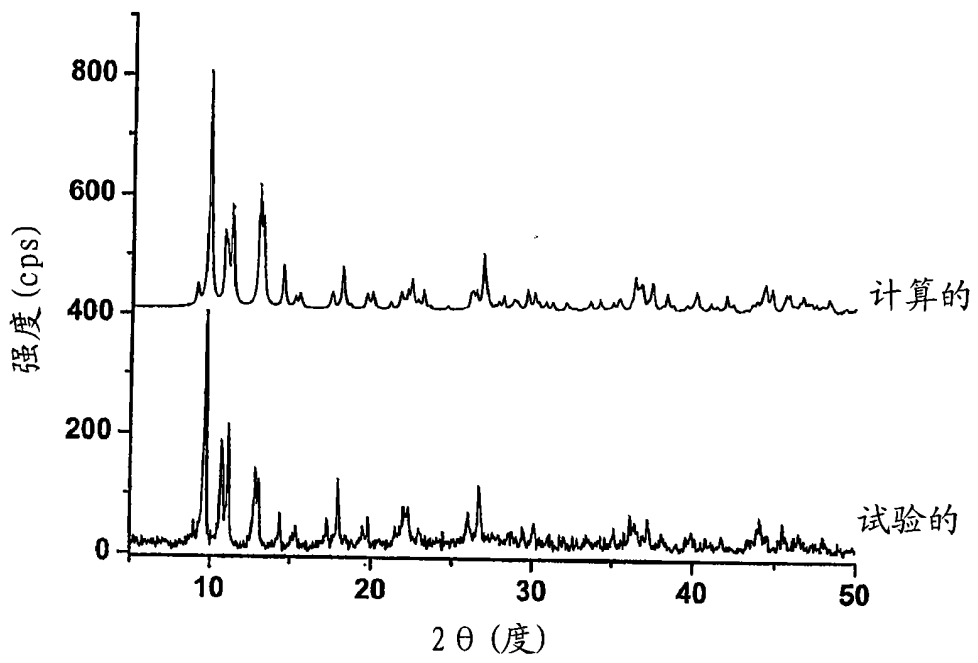


图 3

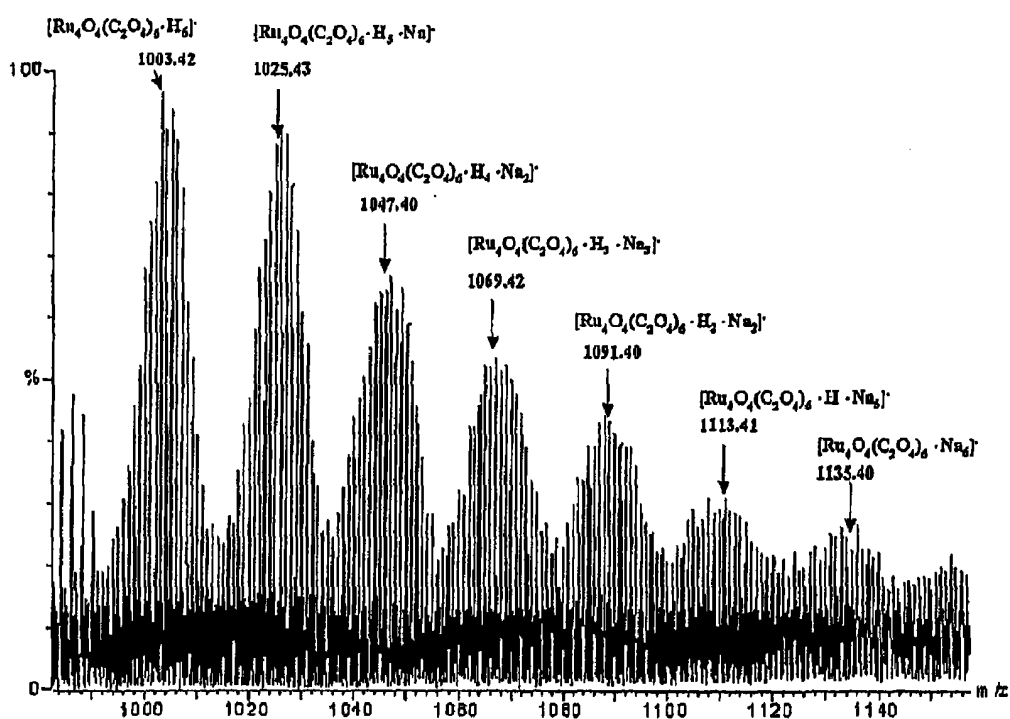
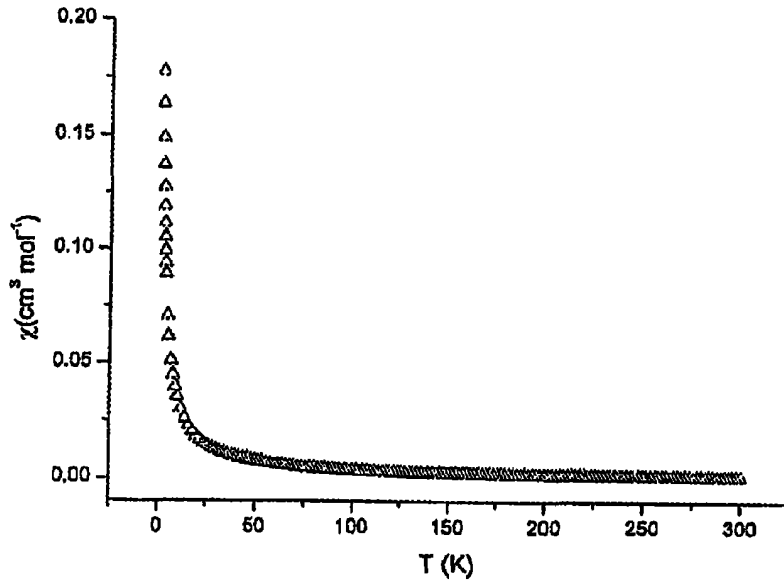
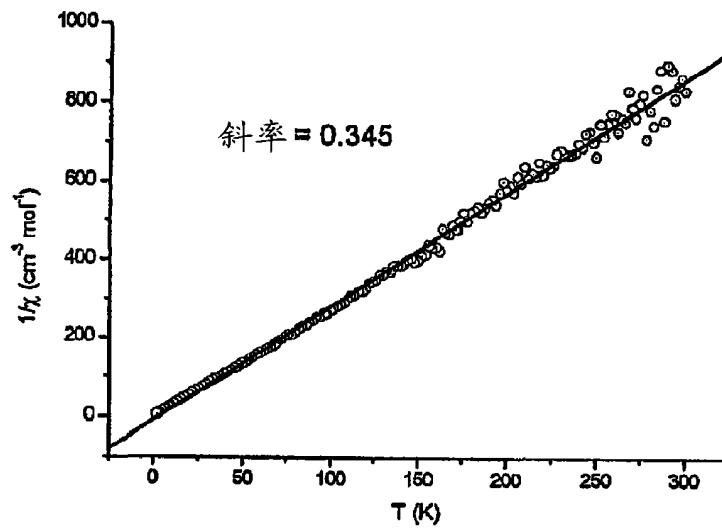


图 4



(a)



(b)

图 5

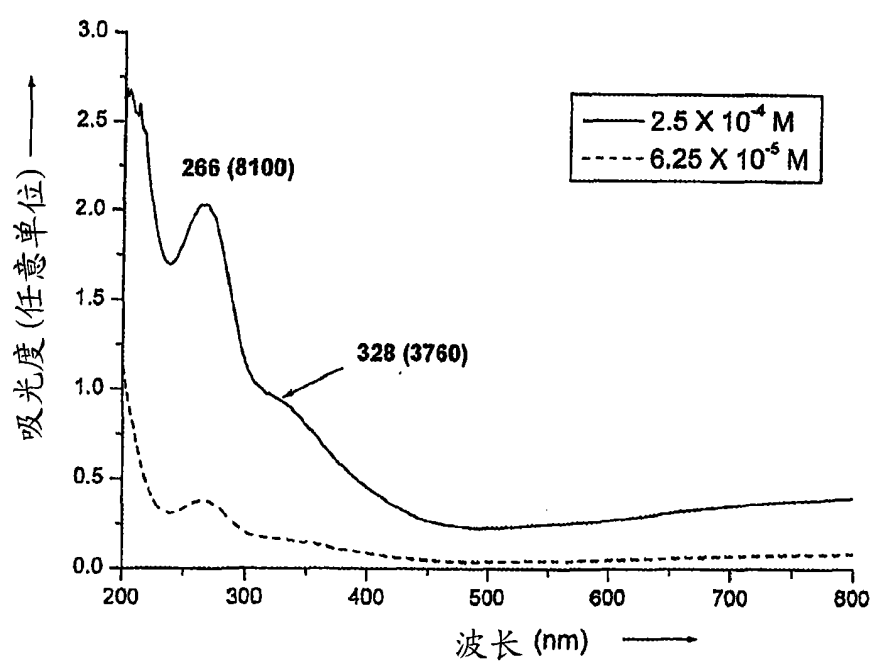


图 6

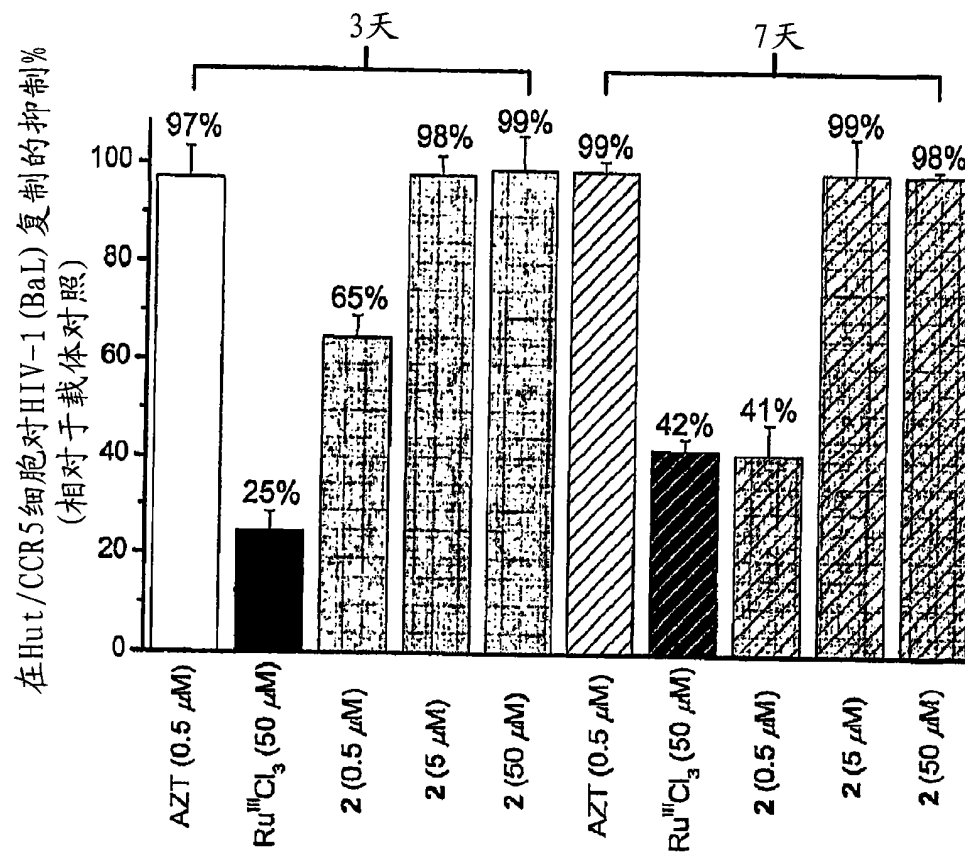


图 7

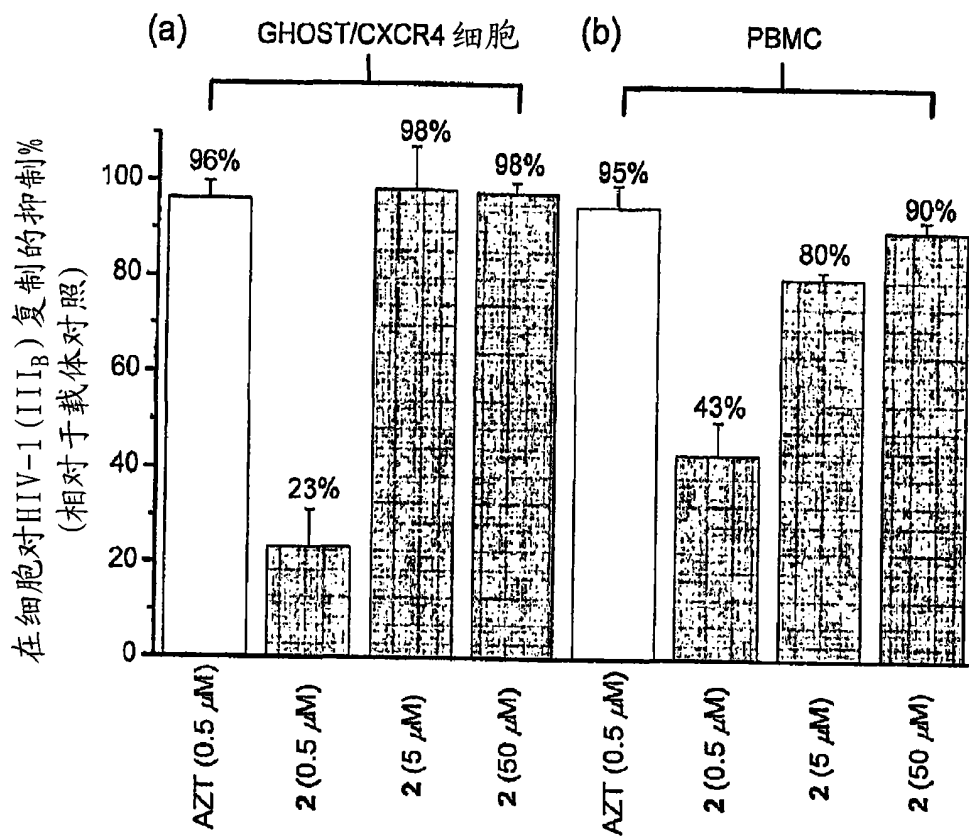


图 8

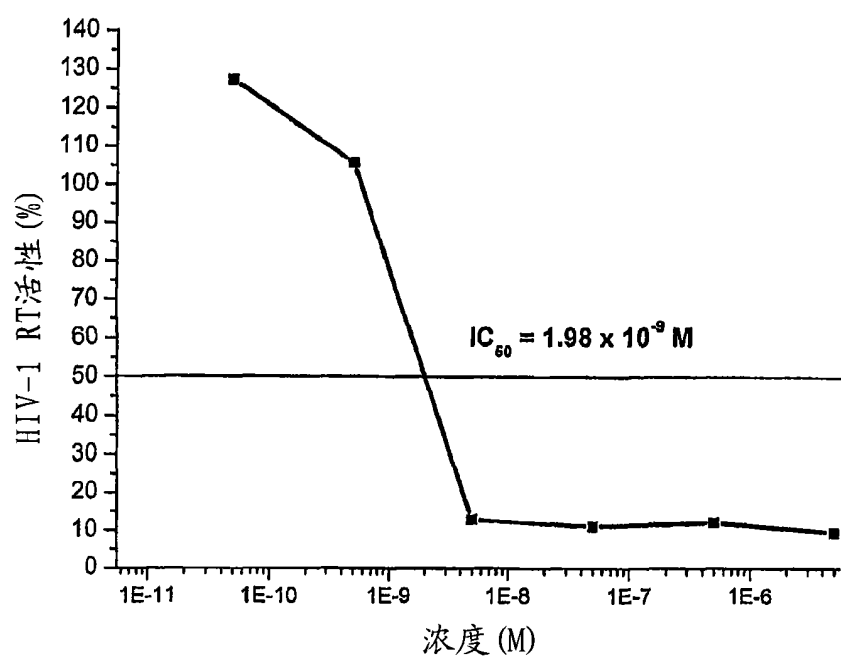


图 9

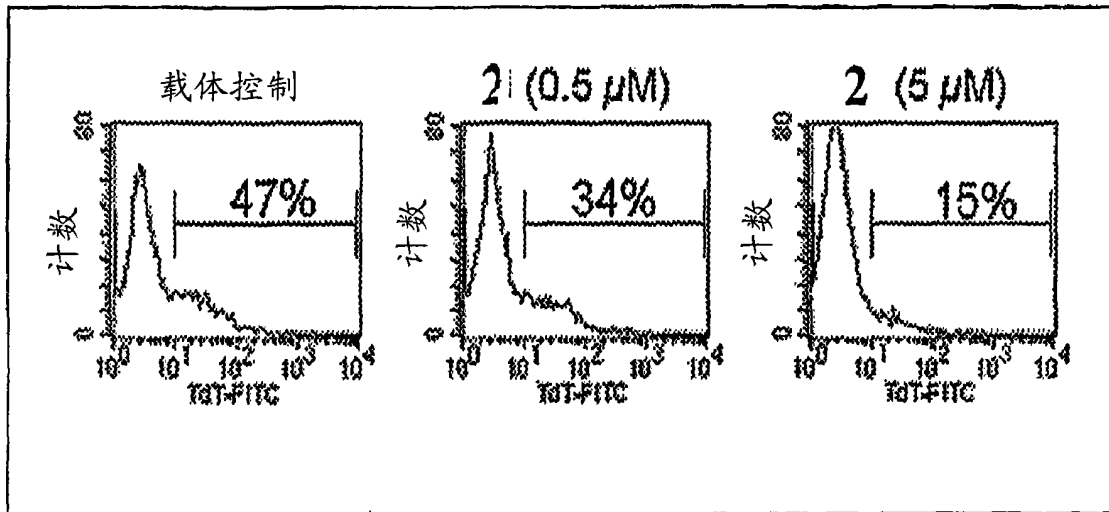


图 10

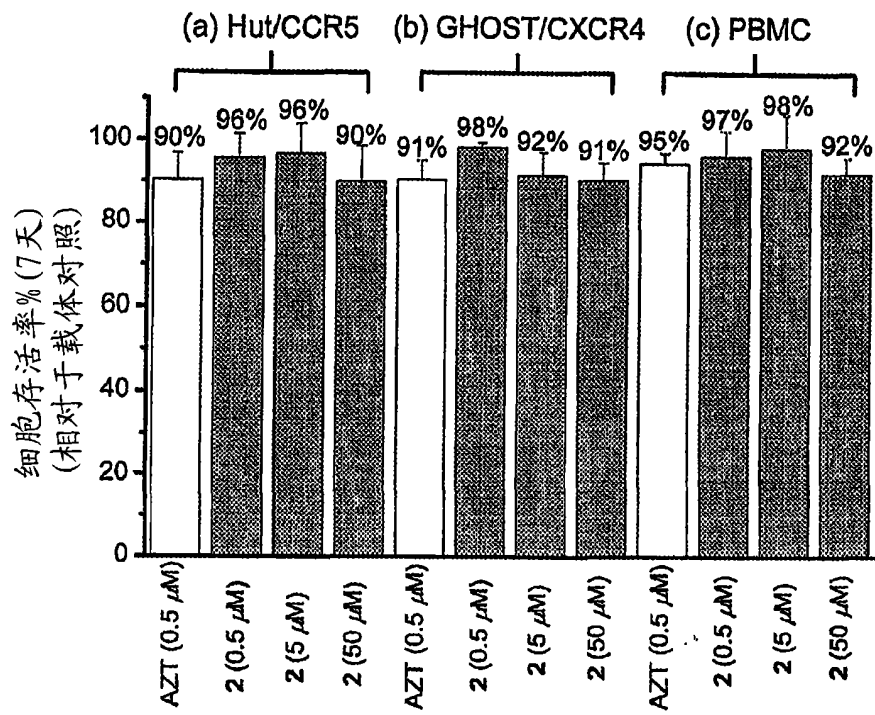


图 11