



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107674058 B

(45)授权公告日 2019.07.23

(21)申请号 201710855673.9

A61K 31/352(2006.01)

(22)申请日 2017.09.20

A61P 31/18(2006.01)

C12R 1/465(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107674058 A

(56)对比文件

CN 104087523 A,2014.10.08,

(43)申请公布日 2018.02.09

Dong-Bo Xu et al..Genotype-driven

(73)专利权人 武汉大学

isolation of enterocin with novel

地址 430072 湖北省武汉市武昌区珞珈山

bioactivities from mangrove-derived

武汉大学

Streptomyces qinglanensis 172205.《Appl

(72)发明人 洪葵 徐东波 田二丽 庄柯

Microbiol Biotechnol》.2015,第99卷第5825-

刘航 邓子新

5832页.

(74)专利代理机构 武汉科皓知识产权代理事务

所(特殊普通合伙) 42222

徐东波.基因组序列指导的Streptomyces qinglanensis 172205的天然产物发现.《中国博士学位论文全文数据库 基础科学辑》.2018,(第07期),A006-28.

代理人 彭劲松

审查员 李磊

(51)Int.Cl.

C07D 311/80(2006.01)

C12P 17/06(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页

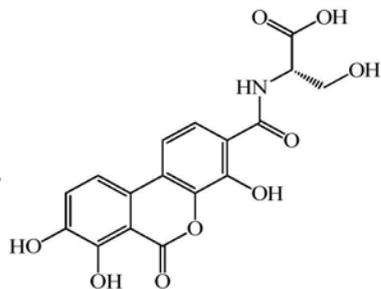
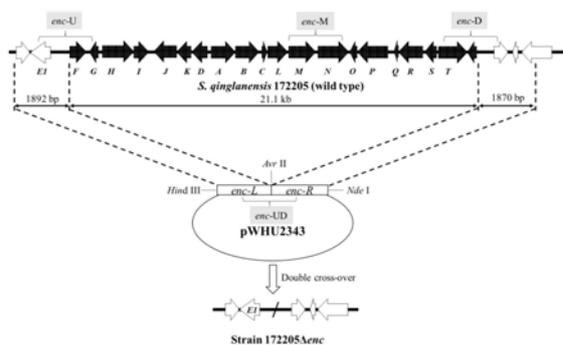
序列表2页 附图8页

(54)发明名称

抗病毒的化合物及其制备方法与应用

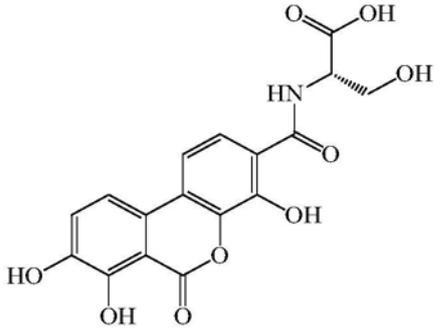
(57)摘要

本发明公开了一种抗病毒活性的化合物及其制备方法与应用。该化合物结构如式(I)所示,可通过链霉菌Streptomyces qinglanensis 1772205的enterocin基因簇缺失突变株发酵分离制备得到,采用高分辨质谱和核磁共振等光谱技术确认其结构。结构如式(I)所示化合物具有较强的抗病毒的活性,可用于制备治疗病毒的药



式 (I)

1. 一种抗病毒的化合物,其特征在于,其结构如式(I)所示:



式 (I)。

2. 一种抗病毒组合物,其特征在于,包括抗病毒有效量的权利要求1所述的式(I)所示结构的化合物。

3. 根据权利要求2所述的抗病毒组合物,其特征在于,所述组合物是一种抗人类免疫缺陷病毒的组合物,包括抗人类免疫缺陷病毒有效量的式(I)所示结构的化合物及其适宜的载体或稀释剂。

4. 权利要求1所述的式(I)所示结构的化合物在制备抗病毒的药物中的应用,其特征在于,所述病毒为人类免疫缺陷病毒。

抗病毒的化合物及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于微生物药物领域,特别涉及一种具有抗病毒活性的新化合物及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus,HIV),即艾滋病病毒,能够造成人类免疫系统的缺陷,于1981年最早在美国发现。根据世界卫生组织统计,截至2014年底,全球约有3690万人为艾滋病毒感染者,同年约200万人新感染艾滋病毒以及120万人死于艾滋病毒相关原因。由于HIV病毒变异迅速,目前至今没有有效的根治方法,但已有一些研制的药物能够抑制病毒的活性、减缓病程发展,减少感染后的死亡率和发病率。由于我国对艾滋病教育的滞后和普及不充分,国内艾滋病感染率仍呈上升趋势,造成了巨大的社会和家庭负担。目前美国食品药品监督管理局已批准二十多种药物用于艾滋病治疗,但这些药物价格昂贵,且有较强的毒副作用,会诱发病毒耐药株的产生。因此,加强对抗病毒药物的筛选工作,获得更有效、更经济、副作用小的治疗艾滋病的药物将为艾滋病的治疗和扩散提供有效的帮助。

[0003] 微生物天然产物作为重要的药物先导化合物来源,具有多样的生物活性包括抗病毒活性。链霉菌作为次级代谢产物最为丰富的一个属,被人们称为天然产物合成工厂。从链霉菌中筛选抗病毒活性的化合物将具有巨大的潜力。例如,红树林来源的链霉菌 *Streptomyces qinglanensis* 172205为一株已鉴定的链霉菌新种且该菌株已进行基因组的测序,被证实能够大量产生化合物 enterocin (Xu DB et al, Genotype-driven isolation of enterocin with novel bioactivities from mangrove-derived *Streptomyces qinglanensis* 172205, Appl Microbiol Biotechnol. 2015 Jul; 58:25-32)。如何从链霉菌中能够更简易地分离纯化具有抗病毒活性的新化合物是本发明所解决的问题。

发明内容

[0004] 本发明的首要目的在于提供一种抗病毒活性的化合物。

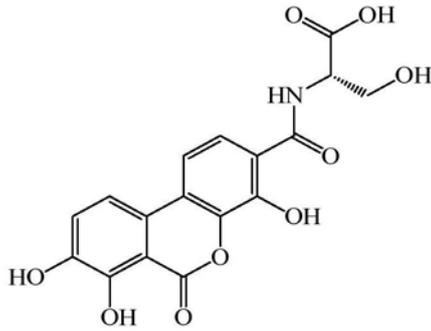
[0005] 本发明的另一目的在于提供一种制备上述抗病毒化合物的方法。

[0006] 本发明的再一目的在于提供上述抗病毒化合物作为制备抗病毒药物的用途。

[0007] 本发明的目的通过下述技术方案实现:

[0008] 一种抗病毒的化合物,其结构如式(I)所示:

[0009]



式 (I)

[0010] 一种生产式(I)所示结构的化合物的制备方法,具体包括:

[0011] 1) 链霉菌*Streptomyces qinglanensis* 172205的enterocin生物合成基因簇缺失突变菌株172205 Δ enc的构建

[0012] 本发明所用的菌种为链霉菌*Streptomyces qinglanensis* 172205,已保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心(编号:CGMCC 4.6825;保藏日期:2011年2月16日;保藏地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所);

[0013] 以链霉菌*Streptomyces qinglanensis* 172205的基因组DNA为模板,设计引物enc-L1和enc-L2,其核苷酸序列分别如SEQ NO.1、2所示,用于扩增enterocin合成基因簇上游片段enc-L,设计引物enc-R1和enc-R2,其核苷酸序列分别如SEQ NO.3、4所示,用于扩增enterocin合成基因簇下游片段enc-R;

[0014] 扩增片段经胶回收后,与pMD19-T simple载体进行连接并转化至*E. coli* Top10中,利用氨苄青霉素抗性基因作为筛选标记,挑取克隆子提取质粒并进行测序验证,然后通过双酶切分别回收基因簇上下游同源片段enc-L和enc-R以及经Nde I和Hind III酶切的pYH7载体线性片段,采用三片段酶连技术通过T4DNA连接酶将三个片段进行连接并转化至*E. coli* Top10中,利用阿泊拉霉素作为筛选标记,挑取克隆子提取质粒并酶切验证,重组质粒命名为pWHU2343;

[0015] 将构建的重组质粒pWHU2343导入*E. coli* ET12567/pUZ8002中,以其作为接合转移的供体菌与野生型菌株进行接合转移;过程如下:刮取一块ISP2琼脂平板上生长2周后的链霉菌172205的孢子,加入0.5mL TES缓冲液(0.05M, pH=8.0)并洗涤孢子两次,将孢子重新悬浮于500 μ L TES缓冲液(0.05M, pH=8.0),50 $^{\circ}$ C水浴热休克10min;加入500 μ L 2 \times 孢子预萌发培养基于37 $^{\circ}$ C,220rpm预萌发4h;8000rpm转速4 $^{\circ}$ C离心5min收集孢子,去除上清后用0.5mL LB培养液重悬,作为受体菌备用;另外,从含有质粒pWHU2343的*E. coli* ET12567/pUZ8002平板上挑取单克隆接种至5mL含有卡那霉素、氯霉素和阿泊拉霉素的LB培养基中,37 $^{\circ}$ C,220rpm过夜培养;然后吸取1mL的菌液转接至50mL含有相应抗生素的LB培养液中,置于37 $^{\circ}$ C摇床中220rpm培养至OD值在0.4~0.6之间;4 $^{\circ}$ C,4000rpm离心10min,大肠菌体用20mL LB洗涤两次后,重悬于0.5mL LB培养液,作为DNA供体;随后,将大肠杆菌和孢子等体积混合后取100 μ L均匀涂布于MS(含10mM MgCl₂)平板上,吹干后倒置培养于28 $^{\circ}$ C恒温培养箱中,覆盖时间为14h,定时取出后用1mL含抗生素的无菌水(终浓度为4 μ g/mL阿泊拉霉素及25 μ g/mL萘啶酮酸)均匀覆盖培养基表面,液体吹干后重新倒置于28 $^{\circ}$ C恒温培养箱中,培养4~5d;

[0016] 接合子在含4 μ g/mL阿泊拉霉素及25 μ g/mL萘啶酮酸的MS平板上多次传代后涂布,

通过基于敲除基因簇的中间序列设计的验证引物enc-M1和enc-M2,其核苷酸序列分别如SEQ NO.5、6所示,对单克隆进行PCR筛选,筛选出无法扩增出1.9kb左右条带的候选菌株,再通过其他验证引物enc-U1和enc-U2,其核苷酸序列分别如SEQ NO.7、8所示,enc-UD1和enc-UD2,其核苷酸序列分别如SEQ NO.9、10所示,enc-D1和enc-D2,其核苷酸序列分别如SEQ NO.11、12所示,分别对候选菌株进行PCR验证,从而获得引物enc-UD能扩增出约1.8kb左右单一条带而其他引物均无法扩增出目的条带的候选菌株,即为enterocin基因簇缺失突变株172205 Δ enc;

[0017] 2) 利用enterocin基因簇缺失突变株172205 Δ enc制备式(I)所示结构的化合物

[0018] (1) 将链霉菌172205 Δ enc首先接种至ISP2液体培养基中,再转接到发酵培养基中进行发酵,28℃、200r/min振荡培养7d;发酵培养基由以下组分组成:葡萄糖20g,可溶性淀粉10g,酵母浸膏10g,蛋白胨10g,牛肉膏3g,海水素35g,CaCO₃ 2g,KH₂PO₄ 0.5g,MgSO₄ 0.5g,pH 7.5;

[0019] (2) 将步骤(1)获得的发酵液直接用乙酸乙酯振荡萃取、超声破碎,取乙酸乙酯层浓缩得粗提物;

[0020] (3) 将步骤(2)获得的粗提物在反相硅胶中用甲醇和水组成的洗脱液进行洗脱,收集洗脱液;

[0021] (4) 将步骤(3)获得的含有目的化合物的洗脱液浓缩,通过C18半制备液相分离纯化得到式(I)所示结构的化合物。

[0022] 所述的C18半制备液相分离纯化所用的流动相优选为体积比30:70的乙腈和水。

[0023] 一种抗病毒组合物,包括抗病毒有效量的前述式(I)所示结构的化合物。

[0024] 优选的,所述组合物是一种抗人类免疫缺陷病毒的组合物,包括抗人类免疫缺陷病毒有效量的式(I)所示结构的化合物及其适宜的载体或稀释剂。

[0025] 式(I)所示结构的化合物在制备抗病毒的药物中的应用。

[0026] 优选的,所述病毒为人类免疫缺陷病毒。

[0027] 本发明通过构建链霉菌Streptomyces qinglanensis 172205中enterocin生物合成基因簇的缺失突变株 Δ enc,避免了大量的enterocin干扰了其他次级代谢产物的分析判断和分离,从而能够更简易地分离纯化获得式(I)所示结构的化合物。经数据库SCI finder搜索确认式(I)所示结构的化合物为首次发现的新结构化合物。本发明还通过生物活性测试实验证明具有如式(I)所示结构的化合物具有较强的抗病毒活性,且具有良好的剂量依赖性。该化合物由于良好抗病毒作用预示可用于制备抗病毒药物。

附图说明

[0028] 图1是enterocin生物合成基因簇缺失突变株构建示意图。

[0029] 图2是enterocin生物合成基因簇缺失突变株PCR验证结果图。其中,Marker是1kb ladder plus;Water为空白对照,以无菌水代替模板;Wild为野生型172205基因组模板; Δ enc则是突变株的基因组模板;共设计4对验证引物enc-U、enc-M、enc-D和enc-UD。

[0030] 图3是本发明的化合物的紫外吸收光谱图。

[0031] 图4是本发明的化合物的红外谱图。

[0032] 图5是本发明的化合物的高分辨质谱图。

- [0033] 图6是本发明的化合物的氢谱图。
- [0034] 图7是本发明的化合物的碳谱图。
- [0035] 图8是本发明的化合物的二维核磁图谱-COSY谱图。
- [0036] 图9是本发明的化合物的二维核磁图谱-HSQC谱图。
- [0037] 图10是本发明的化合物的二维核磁图谱-HMBC谱图。
- [0038] 图11是本发明的化合物水解产物的FDAA (1-fluoro-2-4-dinitrophenyl-5-L-alanine amide) 衍生物的HPLC分析结果图。
- [0039] 图12是式(I)所示结构的化合物抗病毒活性的剂量依赖性图。

具体实施方式

[0040] 通过以下详细说明结合附图可以进一步理解本发明的特点和优点。所提供的实施例仅是对本发明方法的说明,而不以任何方式限制本发明揭示的其余内容。**【实施例1】** enterocin生物合成基因簇缺失突变株 Δenc 的构建

[0041] 以野生型 172205 的基因组 DNA 为模板,设计引物 enc-L1 (5' - CCTAGGCAGTTCCATCACCCCGTTTCG-3', SEQ NO.1) 和 enc-L2 (5' - AAGC TTGTCGTCGCAGCAGCAGTTCG-3', SEQ NO.2) 用于扩增 enterocin 合成基因簇上游片段 enc-L, 设计引物 enc-R1 (5' - CATATGAGAGGGCGGACGGGAAGTGC-3', SEQ NO.3) 和 enc-R2 (5' - CCTA GGGCGCCATCCCAACGGGCTAC-3', SEQ NO.4) 用于扩增 enterocin 合成基因簇下游片段 enc-R。使用 Taq Mix 酶的 20 μ L PCR 反应体系: Mix 酶 8 μ L, 引物各 1 μ L, DNA 模板 1 μ L, DMSO 1 μ L, 超纯水 8 μ L。PCR 扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C, 3min 预变性; 95 $^{\circ}$ C, 30s 变性; 60 $^{\circ}$ C (根据引物自行设置退火温度), 30s 退火; 72 $^{\circ}$ C, 2min 延伸, 循环次数为 32 次; 72 $^{\circ}$ C, 10min 后延伸; 12 $^{\circ}$ C, 终止反应。

[0042] 扩增片段经胶回收后,与 pMD19-T simple 载体进行连接并转化至 E.coli Top10 中,利用氨苄青霉素抗性基因作为筛选标记,挑取克隆子提取质粒并进行测序验证,然后通过双酶切分别回收基因簇上下游同源片段 enc-L 和 enc-R 以及经 Nde I 和 Hind III 酶切的 pYH7 载体线性片段,采用三片段酶连技术通过 T4DNA 连接酶将三个片段进行连接并转化至 E.coli Top10 中,利用阿泊拉霉素作为筛选标记,挑取克隆子提取质粒并酶切验证,重组质粒命名为 pWHU2343。

[0043] 将构建的重组质粒 pWHU2343 导入 E.coli ET12567/pUZ8002 中,以其作为接合转移的供体菌与野生型菌株进行接合转移。过程如下:刮取一块 ISP2 琼脂平板上生长 2 周后的链霉菌 172205 的孢子,加入 0.5mL TES 缓冲液 (0.05M, pH=8.0) 并洗涤孢子两次,将孢子重新悬浮于 500 μ L TES 缓冲液 (0.05M, pH=8.0), 50 $^{\circ}$ C 水浴热休克 10min。加入 500 μ L 2 \times 孢子预萌发培养基于 37 $^{\circ}$ C, 220rpm 预萌发 4h。8000rpm 转速 4 $^{\circ}$ C 离心 5min 收集孢子,去除上清后用 0.5mL LB 培养液重悬,作为受体菌备用。另外,从含有质粒 pWHU2343 的 E.coli ET12567/pUZ8002 平板上挑取单克隆接种至 5mL 含有卡那霉素、氯霉素和阿泊拉霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 220rpm 过夜培养。然后吸取 1mL 的菌液转接至 50mL 含有相应抗生素的 LB 培养液中,置于 37 $^{\circ}$ C 摇床中 220rpm 培养至 OD 值在 0.4~0.6 之间。4 $^{\circ}$ C, 4000rpm 离心 10min, 大肠菌体用 20mL LB 洗涤两次后,重悬于 0.5mL LB 培养液,作为 DNA 供体。随后,将大肠杆菌和孢子等体积混合后取 100 μ L 均匀涂布于 MS (含 10mM MgCl₂) 平板上,吹干后倒置培养于 28 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中,覆盖时间为 14h,定时取出后用 1mL 含抗生素的无菌水 (终浓度为 4 μ g/mL 阿泊拉霉素及

25 μ g/mL萘啶酮酸)均匀覆盖培养基表面,液体吹干后重新倒置于28 $^{\circ}$ C恒温培养箱中,培养4~5d。

[0044] 接合子在含4 μ g/mL阿泊拉霉素及25 μ g/mL萘啶酮酸的MS平板上多次传代后涂布,通过基于敲除基因簇的中间序列设计的验证引物enc-M1 (5'-CTCAGCAGGCGCTGGAGGGT-3', SEQ NO.5)和enc-M2 (5'-GGGCTGGGTC TCGCATCTGG-3', SEQ NO.6)对单克隆进行PCR筛选,筛选出无法扩增出1.9kb左右条带的候选菌株,再通过其他验证引物enc-U1 (5'-GGTCGAGCGTGCCTGTCCA-3', SEQ NO.7)、enc-U2 (5'-CGAGACCGTG GTGCGGGAGA-3', SEQ NO.8)、enc-UD1 (5'-CTGCTGCGCTTCGTGTTCGA-3', SEQ NO.9)、enc-UD2 (5'-GGGAGCACAGCGCTACTGG-3', SEQ NO.10)、enc-D1 (5'-GGCCGGTCAGGGTCTTCAGT-3', SEQ NO.11)和enc-D2 (5'-CACGGTCTGCGGAGGTCTCA-3', SEQ NO.12)分别对候选菌株进行PCR验证(引物设计区域见图1),从而获得引物enc-UD能扩增出约1.8kb左右单一条带而其他引物均无法扩增出目的条带的候选菌株(空白对照用于排除其他污染的可能性,而野生型模板对照只有在在使用引物enc-UD进行扩增时才无法扩增出约1.8kb左右的条带),即为enterocin基因簇缺失突变株172205 Δ enc。构建示意图见图1,突变株PCR验证结果见图2。

[0045] 【实施例2】突变株172205 Δ enc大量发酵及其发酵物样品前处理方法

[0046] 将实施例1中获得的突变株172205 Δ enc接种于ISP2液体培养基中,28 $^{\circ}$ C、200r/min培养3d,以5%接种量转接至12个装有100mL发酵培养基的摇瓶中,28 $^{\circ}$ C、200r/min继续培养7d,获得发酵液。发酵液直接采用等体积的乙酸乙酯萃取3次,期间多次进行超声并振荡,合并乙酸乙酯层,35 $^{\circ}$ C减压浓缩至干得粗提取物。所述的ISP2液体培养基由以下组分组成:葡萄糖4g/L,酵母提取物4g/L,麦芽提取物10g/L,pH值为7.2。所述的发酵培养基由以下组分组成:葡萄糖20g,可溶性淀粉10g,酵母浸膏10g,蛋白胨10g,牛肉膏3g,海水素35g, CaCO₃ 2g, KH₂PO₄ 0.5g, MgSO₄ 0.5g, pH为7.5。

[0047] 【实施例3】化合物的分离及结构确认

[0048] (1) 化合物分离

[0049] 将实施例2中获得的约1g的粗提取物溶于适量甲醇后拌入反向硅胶,采取干法上样利用反向硅胶色谱(甲醇/水洗脱体系)依次进行洗脱分离,收集含目标组分的洗脱液,浓缩后再采用流动相比例为30:70(体积比)的乙腈和水,使用C18半制备液相分离纯化,得到目的化合物(4mg)。

[0050] (2) 平面结构确认

[0051] 通过UV(图3)、IR(图4)、MS(图5)和NMR(图6-10)多种波谱学手段,确定了上述化合物的结构,其理化性质与波谱数据如下:

[0052] 淡棕色粉末;旋光度:[α]_D²⁴ = +10.85 $^{\circ}$ (c 0.129, MeOH);分子式:C₁₇H₁₃N₉;分子量:375;HRESI-MS(m/z):376.0665[M+H]⁺(calcd. for C₁₇H₁₄N₉, 376.0663);UV λ _{max}(log ϵ) MeOH:206(4.81), 224(4.78), 250(4.73), 357(4.49), 405(4.49) nm;红外光谱IR(KBr)数据:3424, 2963, 2934, 1729, 1664, 1550, 1464, 1421, 1384, 1295, 1206, 1134, 1024, 775cm⁻¹;根据化合物核磁共振数据(表1)包括氢谱(图6)、碳谱(图7)、¹H-¹H COSY(图8)、HSQC(图9)和HMBC谱(图10)确认了其平面结构,经SCI finder搜索确认该化合物为新结构的化合物。

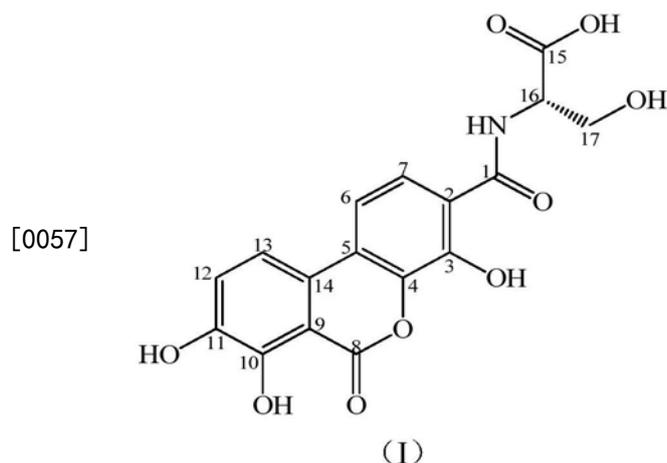
[0053] (3) 绝对构型确认

[0054] 由于化合物结构中存在一个丝氨酸残基,存在一个手性碳。因此采用经典的

Marfey试剂对水解的氨基酸产物进行衍生化并与标准品氨基酸衍生物进行HPLC检测对比,从而判断其绝对构型。具体方法如下:称取0.5mg的化合物样品,溶于0.5mL的6M HCl中并置于安剖瓶,高温进行封口。110°C油浴下进行水解反应18h;反应结束后冷却至室温,浓缩去除HCl和水后回溶至100 μ L水中。取100 μ L的样品水解产物溶液以及100 μ L的5mg/mL氨基酸标品(L-和D-丝氨酸)水溶液分别置于1.5mL离心管中,每管分别加入200 μ L 1%的FDAA丙酮溶液以及40 μ L 1M NaHCO₃水溶液,密封后于45°C反应1.5h,加入20 μ L 2M的HCl溶液终止反应,反应产物用甲醇稀释后进行HPLC检测,以FDAA、L-丝氨酸和D-丝氨酸的FDAA衍生物为对照,并利用混合针进行验证。HPLC检测条件如下:色谱柱为Agilent Eclipse XDB-C18 (250 \times 4.6mm, 5 μ m);流动相A为含有0.1% TFA的超纯水,流动相B为乙腈;流速为1.0mL/min;DAD检测器,检测波长为340nm;进样体积为2 μ L;梯度洗脱程序为:5%的流动相B平衡15min后开始进样,0~45min内流动相B的比例由5%逐渐升为30%,45~46min内流动相B的比例由30%升为100%,46~50min内流动相B比例维持在100%,50~51min内流动相B比例由100%降为5%,51~60min内流动相B的比例维持在5%,共洗脱并采集信号60min。

[0055] HPLC检测结果确认目标化合物结构中的丝氨酸的FDAA衍生物保留时间与L-丝氨酸衍生物的保留时间一致,判断丝氨酸残基构型为L型(图11),故而最终确认其绝对构型。

[0056] 该化合物的结构如式(I)所示:



[0058] 表1、化合物的¹H和¹³C NMR数据(500and 125MHz, DMSO-d₆)

	Position	δ_{H} (mult., int., J in Hz)	δ_{C}	COSY	HMBC
	1		168.32		
	2		114.54		
	3		148.78		
	4		138.23		
	5		124.51		
	6	7.74 (d, 1H, 8.7)	111.89	H-7	C-1, 2, 4, 5
	7	7.96 (d, 1H, 8.7)	123.52	H-6	C-1, 2, 3, 4, 14
	8		164.50		
	9		106.81		
	10		149.37		
[0059]	11		146.62		
	12	7.40 (d, 1H, 8.5)	123.64	H-13	C-5, 9, 10, 11,
	13	7.81 (d, 1H, 8.6)	114.65	H-12	C-8, 9, 11, 14
	14		122.74		
	15		171.38		
	16	4.55 (dd, 1H, 5.5, 11.8)	55.47	NH, H-17	C-15, 17
	17	3.85 (m, 2H)	60.77	H-16	C-15, 16
	NH	9.08 (d, 1H, 7.3)		H-16	C-1, 16, 17
	17-OH	5.12 (s)			
	3-OH	13.04 (s)			C-2, 3, 4
	10-OH	11.11 (s)			C-9, 10, 11
	11-OH	10.16 (s)			C-10, 11, 12
	15-COOH	12.91 (brs)			

[0060] 【实施例4】式(I)所示结构的化合物抗病毒的活性评价

[0061] (1) 取生长良好的TZM-BL细胞系,以每孔10000个细胞的用量在96孔板中接种细胞,37℃培养过夜。

[0062] (2) 使用细胞培养液(含10%胎牛血清和1%双抗的DMEM)对目标化合物进行稀释,设置多个浓度作用梯度,

[0063] (3) 分别将不同浓度的稀释液与HIV Bal病毒(10000copies)等体积进行混合,37℃下孵育30分钟。

[0064] (4) 将接种TZM-BL细胞的96孔板每个孔内的上清全部去除,再每孔加入100 μ l病毒与化合物的混合液体,同时设置阴性对照(只加等量病毒液,不加目标化合物稀释液)和空白对照(不加病毒和目标化合物稀释液)。37℃培养2小时后,每孔再加入100 μ l细胞培养液。

[0065] (5) 48小时后弃去上清,PBS清洗一次并弃去。每孔加入细胞裂解液(Promega, E1531)裂解细胞30分钟,用荧光素酶检测试剂盒(Promega, E1501)处理细胞裂解后的混合物,使用酶标仪检测各孔的荧光强度,计算IC₅₀。

[0066] 经计算表明,式(I)所示结构的化合物可以显著地减少HIV Bal病毒的感染,抑制病毒活性,IC₅₀为1.79 μ g/mL,且呈现良好的剂量依赖关系(图12)。

[0067] 上述实施例说明链霉菌菌株172205 Δ enc通过发酵可以产生式(I)所示结构的化合物,该化合物具有较强的抑制HIV病毒活性,可用于制备抗病毒的药物。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 武汉大学
- [0003] <120> 抗病毒的化合物及其制备方法与应用
- [0004] <160> 12
- [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 26
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 人工序列()
- [0010] <400> 1
- [0011] cctaggcagt tccatcaccc cgttcg 26
- [0012] <210> 2
- [0013] <211> 26
- [0014] <212> DNA
- [0015] <213> 人工序列()
- [0016] <400> 2
- [0017] aagcttgctg tcgcagcagc agttcg 26
- [0018] <210> 3
- [0019] <211> 26
- [0020] <212> DNA
- [0021] <213> 人工序列()
- [0022] <400> 3
- [0023] catatgagag ggcggacggg aactgc 26
- [0024] <210> 4
- [0025] <211> 26
- [0026] <212> DNA
- [0027] <213> 人工序列()
- [0028] <400> 4
- [0029] cctagggcgc catcccaacg ggctac 26
- [0030] <210> 5
- [0031] <211> 20
- [0032] <212> DNA
- [0033] <213> 人工序列()
- [0034] <400> 5
- [0035] ctcagcaggc gctggagggt 20
- [0036] <210> 6
- [0037] <211> 20
- [0038] <212> DNA

[0039] <213> 人工序列()
[0040] <400> 6
[0041] gggctgggtc tcgcatctgg 20
[0042] <210> 7
[0043] <211> 20
[0044] <212> DNA
[0045] <213> 人工序列()
[0046] <400> 7
[0047] ggtcgagcgt gcgctgtcca 20
[0048] <210> 8
[0049] <211> 20
[0050] <212> DNA
[0051] <213> 人工序列()
[0052] <400> 8
[0053] cgagaccgtg gtgcgggaga 20
[0054] <210> 9
[0055] <211> 20
[0056] <212> DNA
[0057] <213> 人工序列()
[0058] <400> 9
[0059] ctgctgcgct tcgtgttcga 20
[0060] <210> 10
[0061] <211> 20
[0062] <212> DNA
[0063] <213> 人工序列()
[0064] <400> 10
[0065] gggagcacag cggctactgg 20
[0066] <210> 11
[0067] <211> 20
[0068] <212> DNA
[0069] <213> 人工序列()
[0070] <400> 11
[0071] ggccggtcag ggtcttcagt 20
[0072] <210> 12
[0073] <211> 20
[0074] <212> DNA
[0075] <213> 人工序列()
[0076] <400> 12
[0077] cacggtctgc ggaggtctca 20

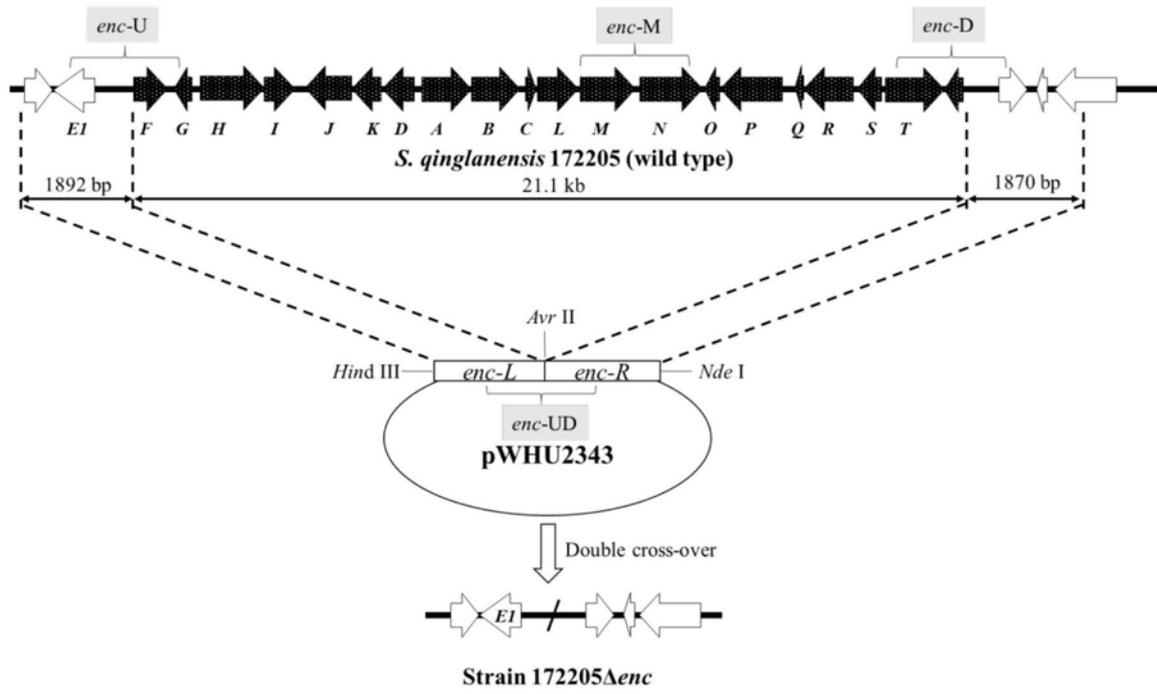


图1

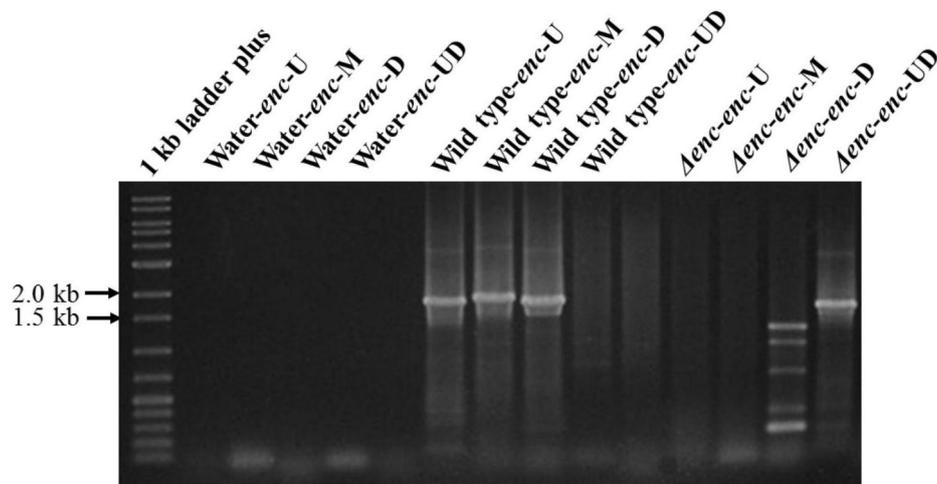


图2

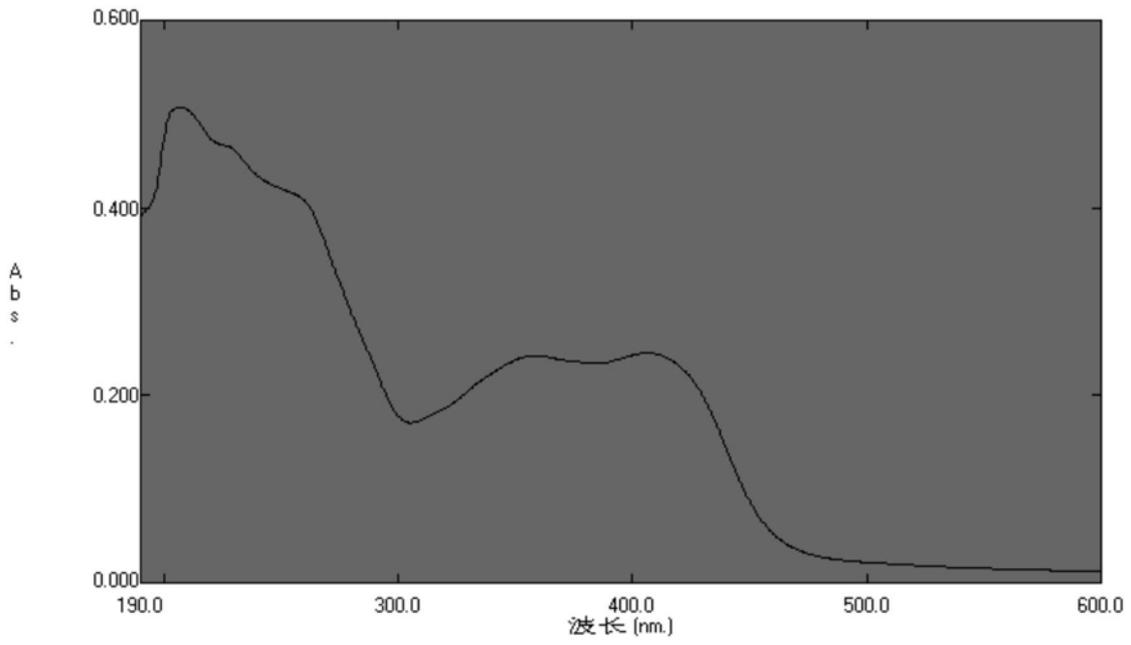


图3

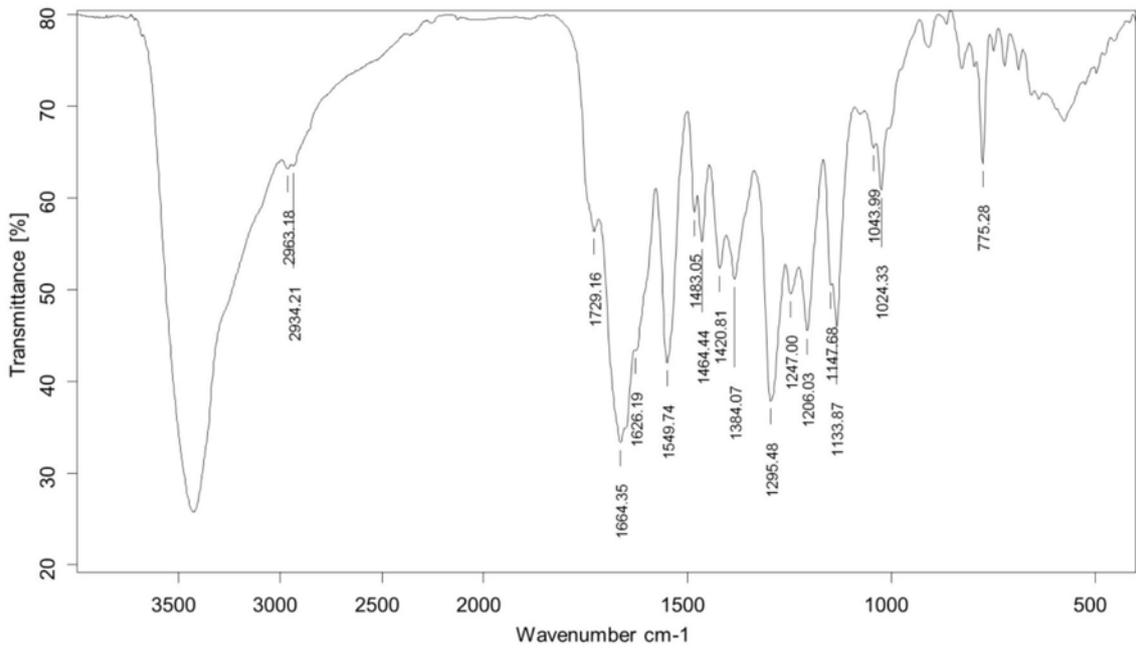


图4

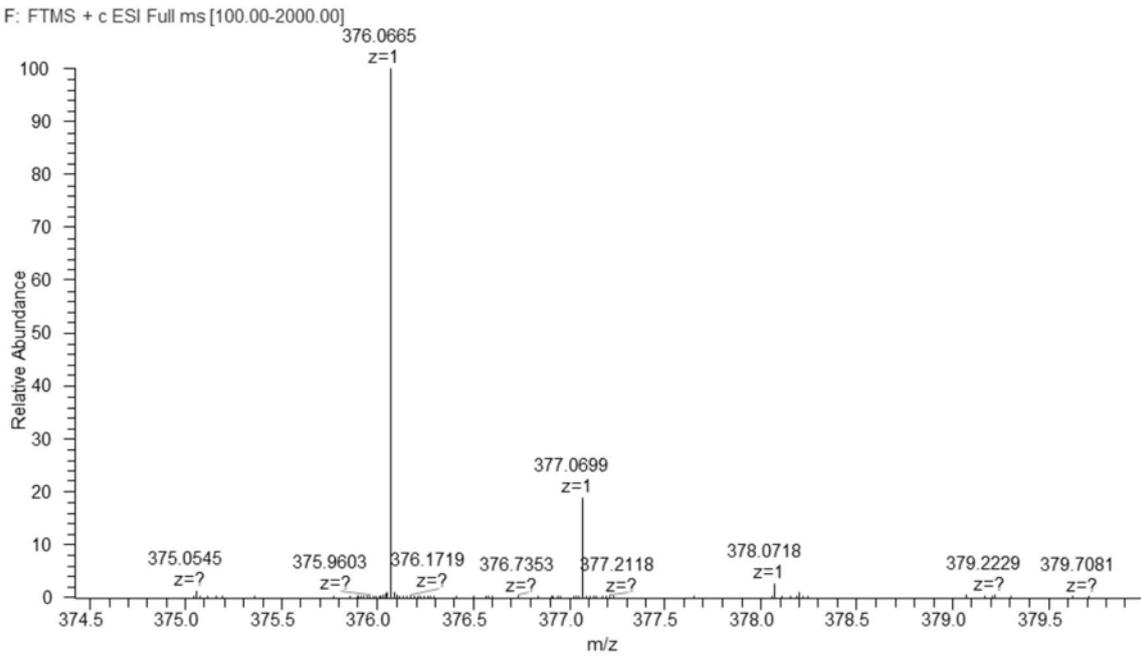


图5

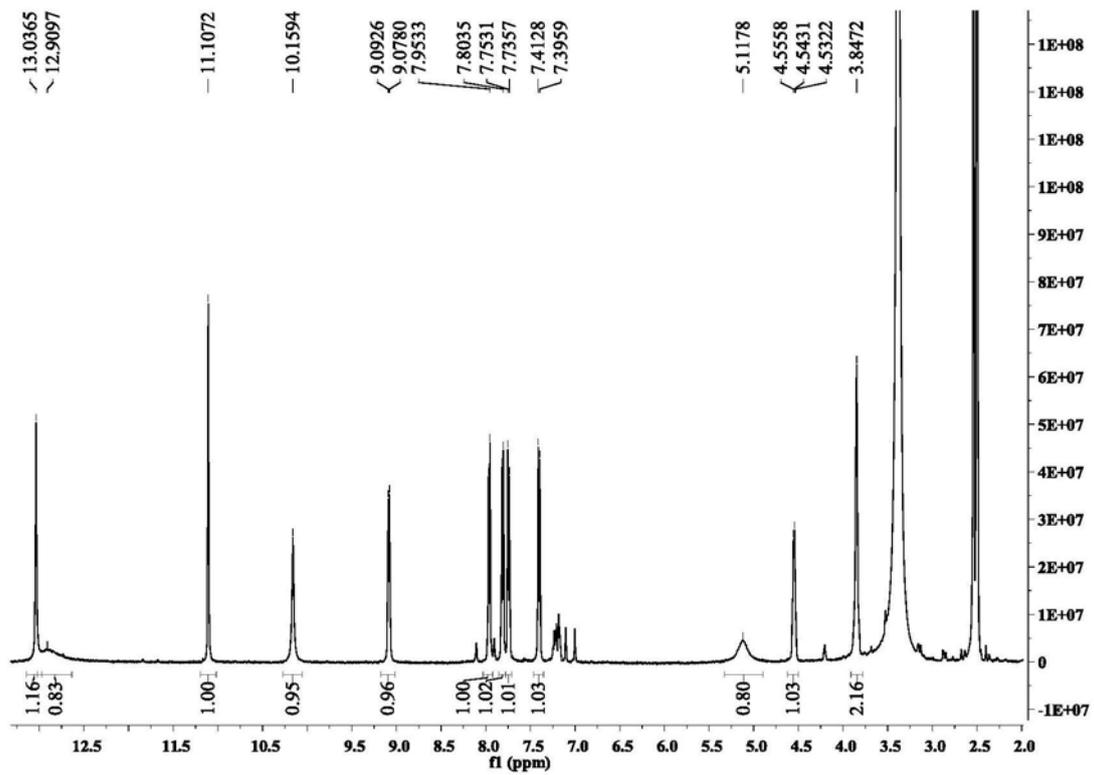


图6

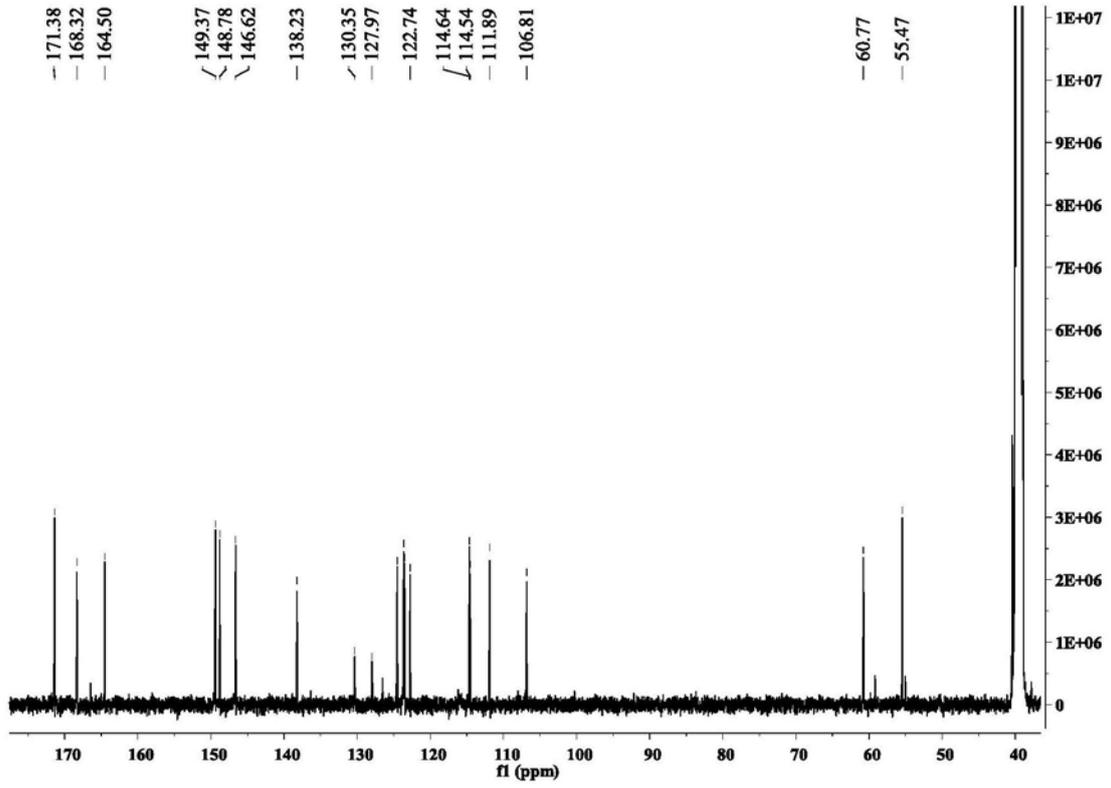


图7

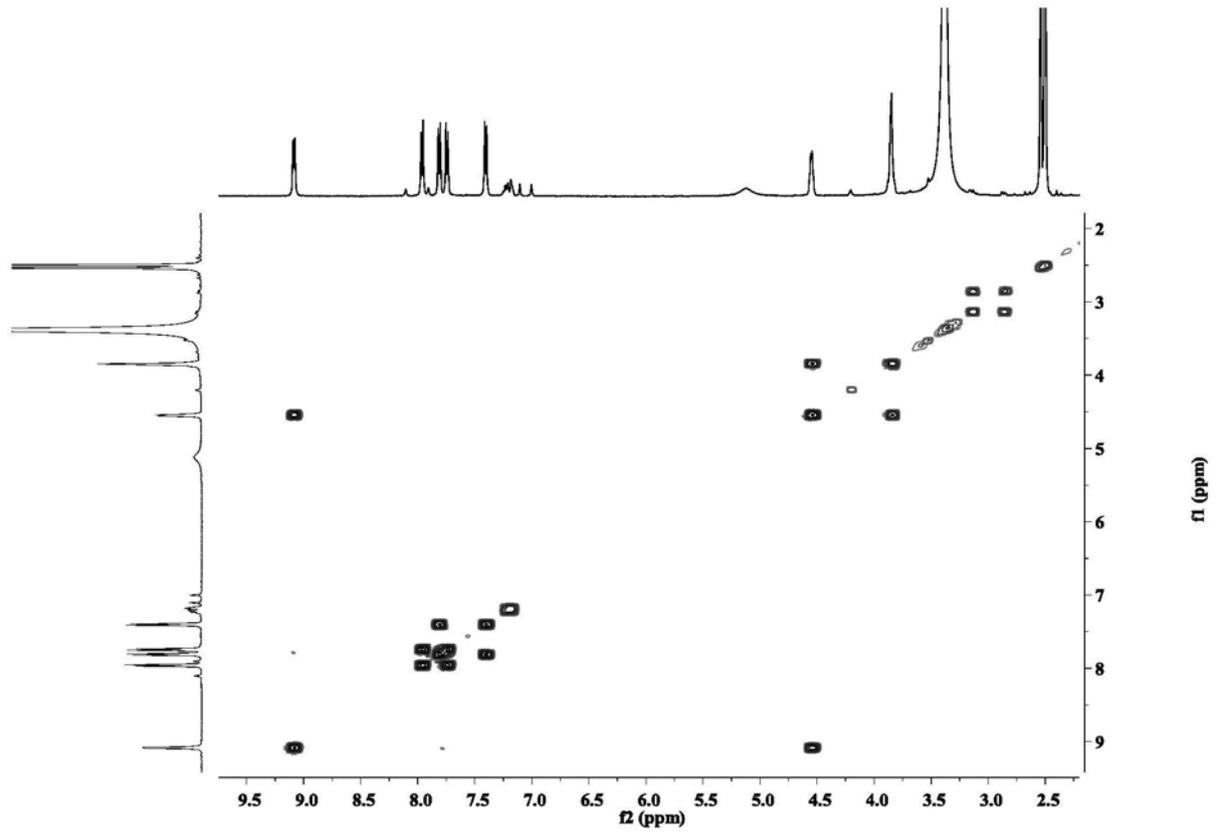


图8

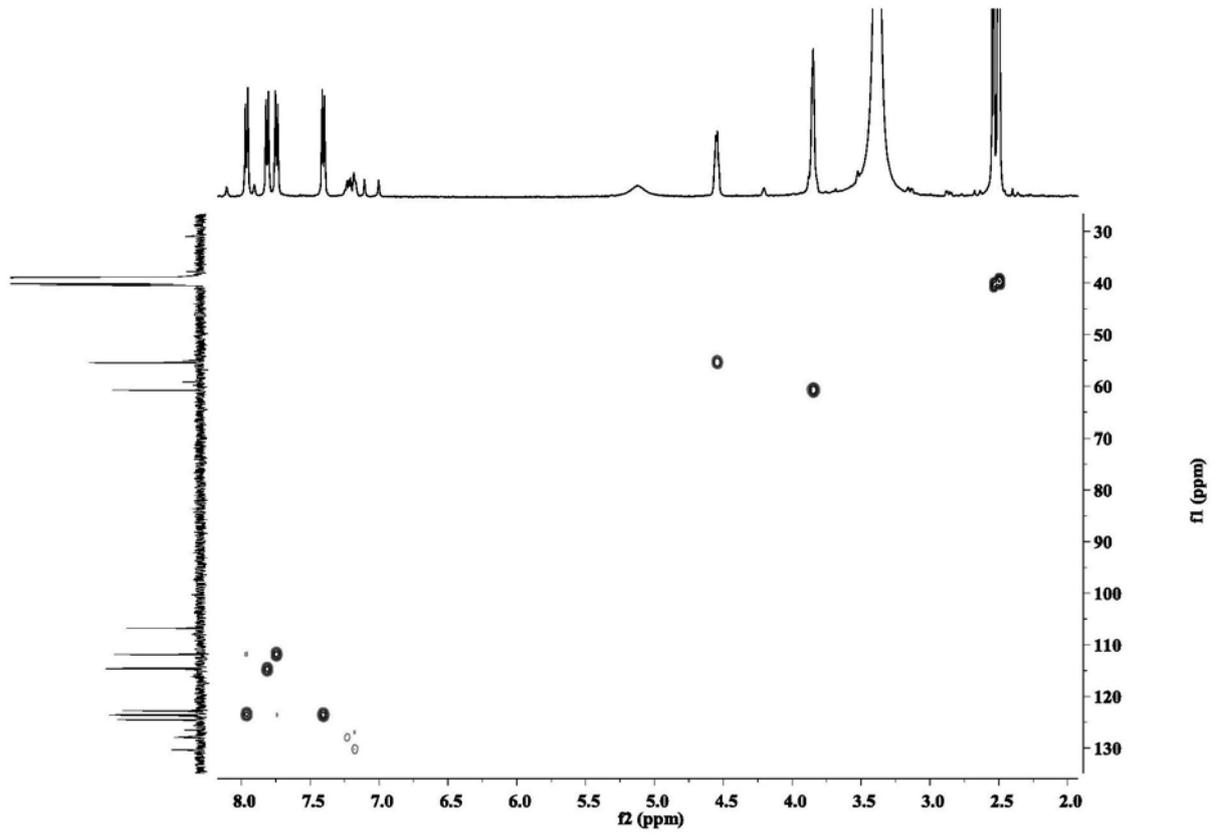


图9

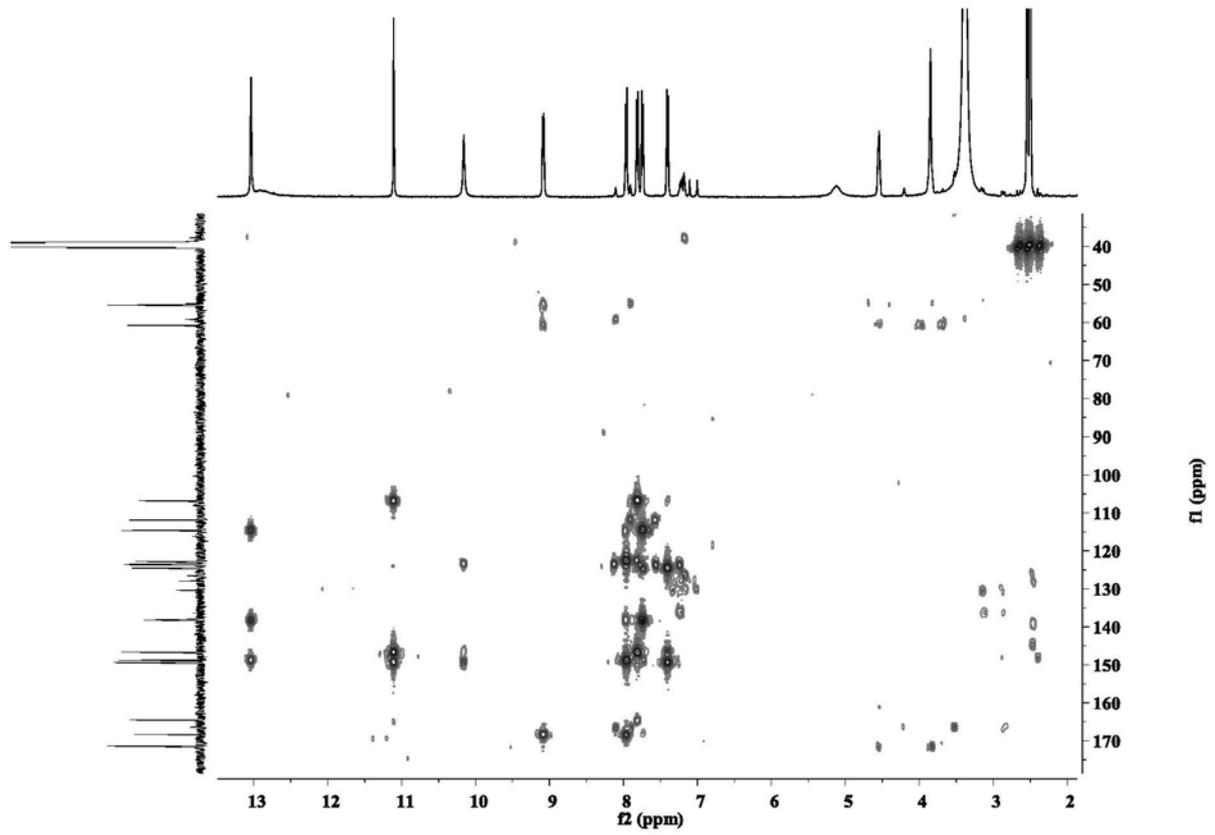


图10

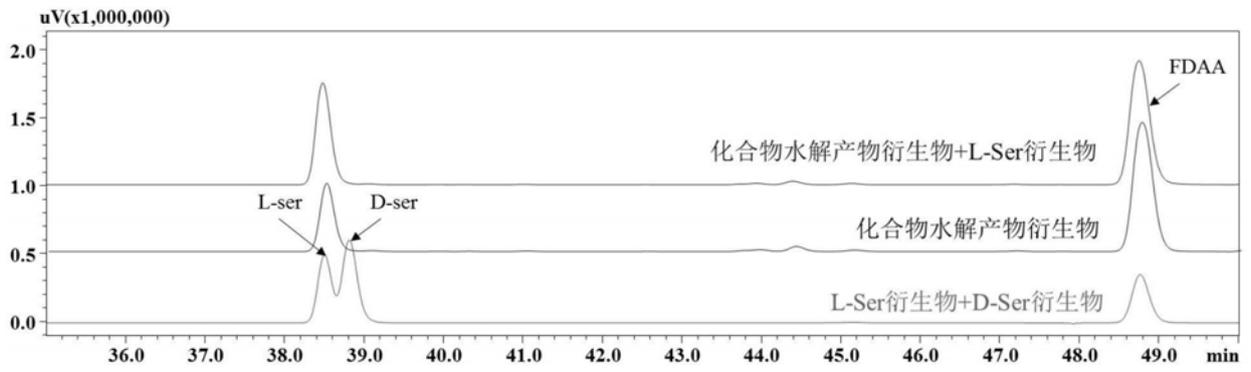


图11

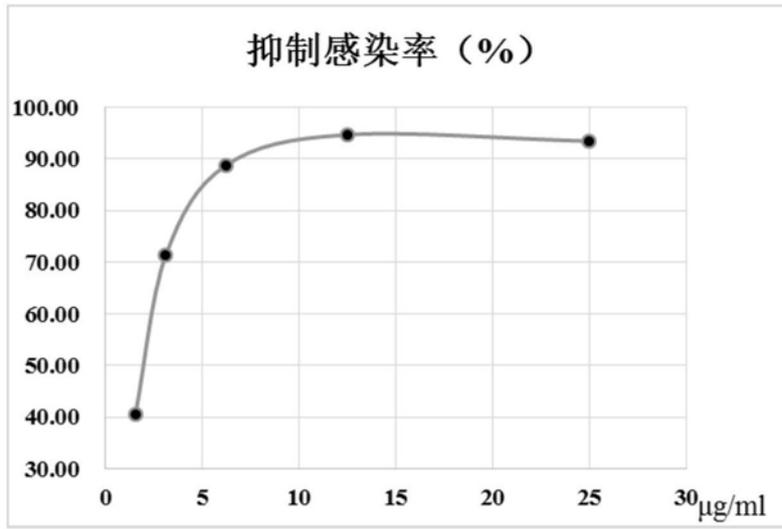


图12