



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111574486 B

(45) 授权公告日 2022. 04. 26

(21) 申请号 202010442043.0

A61P 3/06 (2006.01)

(22) 申请日 2020.05.22

A61P 9/10 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61P 3/10 (2006.01)

申请公布号 CN 111574486 A

A61P 43/00 (2006.01)

(43) 申请公布日 2020.08.25

C12P 17/06 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

(73) 专利权人 中国科学院南海海洋研究所

(56) 对比文件

地址 511458 广东省广州市南沙区海滨路
1119号

CN 1073357 A, 1993.06.23

CN 1249306 A, 2000.04.05

(72) 发明人 周雪峰 唐斓 王健娇 杨斌
林秀萍 刘永宏

WO 9934794 A1, 1999.07.15

CN 1073357 A, 1993.06.23

(74) 专利代理机构 广州科粤专利商标代理有限公司 44001

张静波等. 肝X 受体: 代谢疾病药物研发的新方向. 《中华临床医师杂志(电子版)》. 2016, 第10卷(第12期), 第1780-1783页.

代理人 朱双 刘明星

审查员 南艳

(51) Int. Cl.

C07D 311/22 (2006.01)

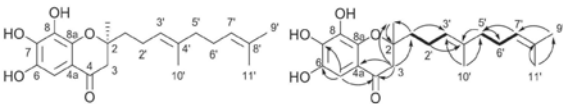
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

香叶基三羟基色酮及其在制备肝X受体激动剂中的应用

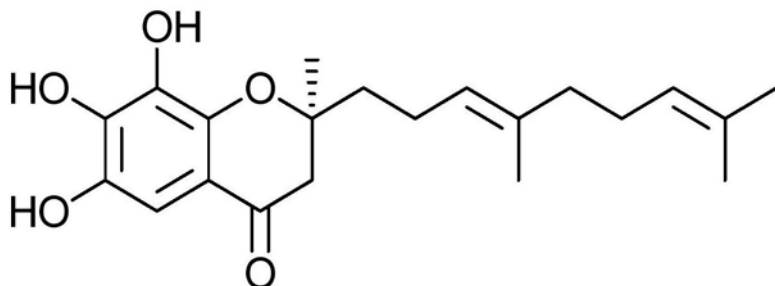
(57) 摘要

本发明公开了香叶基三羟基色酮及其在制备肝X受体激动剂中的应用。本发明从 *Pestalotiopsis neglecta* SCSIO41403 的发酵培养物中分离得到了与蛋白 LXR α 受体结合良好, 且可以显著上调 LXR α 的 mRNA 水平的新颖结构小分子 LXR α 激动剂香叶基三羟基色酮 pestalotiochromoneA, 能够将其开发用于肝X受体激动剂的药物。



1. 一种香叶基三羟基色酮的制备方法, 其特征在于, 将 *Pestalotiopsis neglecta* SCSIO41403 的发酵培养物用乙酸乙酯萃取, 萃取液经浓缩去除乙酸乙酯后得到浸膏, 浸膏经硅胶柱层析, 用石油醚/乙酸乙酯从体积比 20:1、10:1、5:1、2:1、1:1 和 0:1 梯度洗脱, 收集石油醚/乙酸乙酯体积比 5:1 洗脱流 分, 再次经过硅胶柱层析, 用石油醚/乙酸乙酯从 10:1 ~ 1:1 梯度洗脱, 收集石油醚/乙酸乙酯体积比 5:1 洗脱流 分, 经纯化后得到香叶基三羟基色酮;

所述的香叶基三羟基色酮的结构式如式 (I) 所示



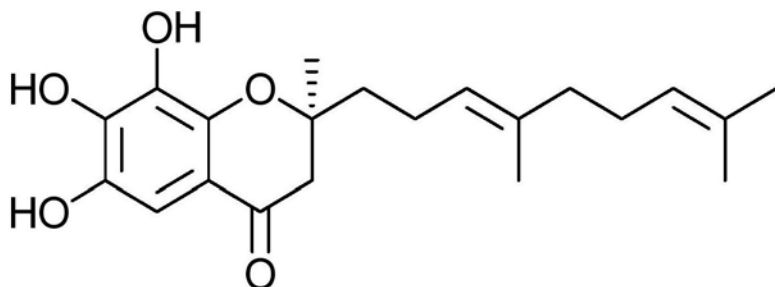
式 (I)。

2. 根据权利要求1所述的制备方法, 其特征在于, 所述的纯化是半制备HPLC纯化, 采用 SunFire™ C18 色谱柱, 柱温 40℃, CH₃CN/H₂O 梯度洗脱: 0-3min, 25% CH₃CN; 3-20min, 25% - 55% CH₃CN; 20-23min, 55% - 100% CH₃CN; 23-28min, 100% CH₃CN; 28-30min, 100% - 5% CH₃CN; 30-33min, 5% CH₃CN; 2mL/min, 保留时间为 22.5min 时分离得到香叶基三羟基色酮。

3. 根据权利要求1所述的制备方法, 其特征在于, 所述的 *Pestalotiopsis neglecta* SCSIO41403 的发酵培养物是将 *Pestalotiopsis neglecta* SCSIO41403 接种到发酵培养基中, 28℃, 180转/min, 培养7天获得的发酵培养物; 所述的发酵培养基: 每升含有甘露醇 20g、大豆蛋白胨 10g、磷酸氢二钾 0.35g、碳酸钙 0.5g 和豆油 0.5ml, 余量为水, pH 7.0。

4. *Pestalotiopsis neglecta* SCSIO41403 在制备香叶基三羟基色酮中的应用;

所述的香叶基三羟基色酮的结构式如式 (I) 所示



式 (I)。

香叶基三羟基色酮及其在制备肝X受体激动剂中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于天然产物应用技术领域,具体涉及香叶基三羟基色酮及其在制备肝X受体激动剂中的应用。

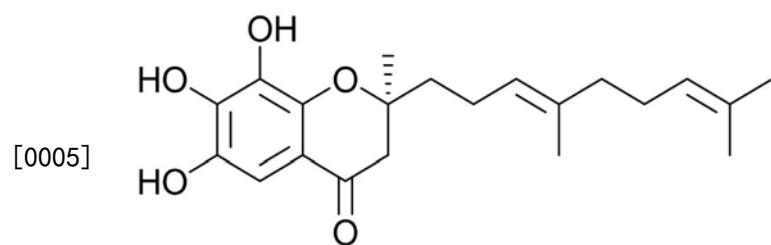
背景技术

[0002] 肝X受体(liver X receptor,LXR)属于核受体超家族成员,包含LXR α 和LXR β 两种亚型,其中,LXR α 主要分布在肝脏,而LXR β 则遍布全身组。LXR在动脉粥样硬化的发生和发展中起关键性作用,以LXRs为靶点寻找抗动脉粥样硬化的药物,对心血管疾病的治疗具有重要意义。LXRs作为胆固醇感受器,可以调节包括胆固醇流出、转运、排泄等大量与胆固醇代谢有关的基因的表达,LXR又被发现是脂代谢和糖代谢的关键转录调节因子。另外,LXR在巨噬细胞和系统水平均有抗炎作用,LXR激动剂在脑和中枢神经系统中对免疫和胆固醇稳态也有作用。因此,LXR有望作为治疗动脉粥样硬化、高胆固醇血症、II型糖尿病等的药物靶点。

发明内容

[0003] 本发明的第一个目的是提供一种具有结合LXR α 蛋白并提高LXR α 基因表达水平的、作为LXR α 激动剂的香叶基三羟基色酮pestalotiochromone A。

[0004] 本发明的香叶基三羟基色酮pestalotiochromone A,或其药用盐,其结构式如式(I)所示:



式(I)。

[0006] 本发明发现,新颖结构的化合物香叶基三羟基色酮pestalotiochromone A与蛋白LXR α 受体相互作用时结合较好,可以显著上调LXR α 的mRNA水平,作用强于同剂量的LXR α 激动剂GW3965,证实了pestalotiochromone A是自然来源的新颖结构小分子LXR α 激动剂。

[0007] 因此,本发明的第二个目的是提供所述的香叶基三羟基色酮pestalotiochromone A,或其药用盐在制备肝X受体激动剂中的应用。

[0008] 本发明的第三个目的是提供一种肝X受体激动剂,其包括香叶基三羟基色酮pestalotiochromone A,或其药用盐作为活性成分。

[0009] 本发明的第四个目的是提供一种香叶基三羟基色酮pestalotiochromone A的制备方法,是从Pestalotiopsis neglecta SCSIO41403的发酵培养物中分离制备得到的。

[0010] 优选,所述的制备方法,包括以下步骤:

[0011] 将Pestalotiopsis neglecta SCSIO41403的发酵培养物用乙酸乙酯萃取,萃取液

经浓缩去除乙酸乙酯后得到浸膏,浸膏经硅胶柱层析,用石油醚/乙酸乙酯从体积比20:1、10:1、5:1、2:1、1:1和0:1梯度洗脱,收集石油醚/乙酸乙酯体积比5:1洗脱馏分,再次经过硅胶柱层析,用石油醚/乙酸乙酯从10:1~1:1梯度洗脱,收集石油醚/乙酸乙酯体积比5:1洗脱馏分,经纯化后得到香叶基三羟基色酮pestalotiochromone A。

[0012] 所述的纯化是半制备HPLC纯化,采用SunFire™ C18色谱柱,柱温40℃,CH₃CN/H₂O梯度洗脱:0-3min,25%CH₃CN;3-20min,25%-55%CH₃CN;20-23min,55%-100%CH₃CN;23-28min,100%CH₃CN;28-30min,100%-5%CH₃CN;30-33min,5%CH₃CN;2mL/min,保留时间为22.5min时分离得到香叶基三羟基色酮pestalotiochromone A。

[0013] 所述的Pestalotiopsis neglecta SCSIO41403的发酵培养物是将Pestalotiopsis neglecta SCSIO41403接种到发酵培养基中,28℃,180转/min,培养7天获得的发酵培养物;所述的发酵培养基:每升含有甘露醇20g、大豆蛋白胨10g、磷酸氢二钾0.35g、碳酸钙0.5g和豆油0.5ml,余量为水,pH 7.0。

[0014] 本发明的第五个目的是提供Pestalotiopsis neglecta SCSIO41403在制备香叶基三羟基色酮pestalotiochromone A中的应用。

[0015] 本发明从Pestalotiopsis neglecta SCSIO41403的发酵培养物中分离得到了与蛋白LXR α 受体结合良好,且可以显著上调LXR α 的mRNA水平的新颖结构小分子LXR α 激动剂pestalotiochromone A,能够将其用于作为肝X受体激动剂。

[0016] 本发明涉及的真菌Pestalotiopsis neglecta SCSIO41403,于2020年3月27日保藏于广东省微生物菌种保藏中心(GDMCC),地址:广州市先烈中路100号大院59号楼5楼,其保藏编号为GDMCC No:60987(该保藏信息公开于专利申请CN202010258928.5中)。

附图说明

[0017] 图1是香叶基三羟基色酮pestalotiochromone A (PCA) 的化学结构式及重要的二维核磁1H-1H COSY和HMBC相关信息。

[0018] 图2是香叶基三羟基色酮pestalotiochromone A (PCA) 的实验ECD和计算ECD曲线对比图。

[0019] 图3是香叶基三羟基色酮pestalotiochromone A (PCA) 与肝X受体 α 配体结合域(T090复合物)的分子对接分析;(a) PCA与LXR α 配体结合口袋的三维结构;(b) PCA与LXR α 配体结合模式的二维推测结构;计算机分析结果显示PCA与肝X受体 α 结合较好。

[0020] 图4是香叶基三羟基色酮pestalotiochromone A (PCA) 与肝X受体 α (LXR α) 的作用;(a) PCA与LXR α 受体的蛋白-小分子相互作用实验 (SPR),实验结果显示PCA与LXR α 受体结合较好;(b) PCA共培养后的ACHN细胞中LXR α 的mRNA水平,结果以平均值 $\pm$ SD表示(n=9,****p<0.0001),实验结果显示PCA可以显著上调LXR α 的mRNA水平,证实PCA是LXR α 激动剂。

具体实施方式

[0021] 以下实施例是对本发明的进一步说明,而不是对本发明的限制。

[0022] 实施例1:真菌Pestalotiopsis neglecta SCSIO41403发酵和香叶基三羟基色酮pestalotiochromone A的分离

[0023] 将种子培养基各组分(麦芽糖6.25g,麦芽提取物6.25g,酵母提取物1g,蛋白胨

6.25g, 磷酸二氢钾1.25g) 溶解于1L蒸馏水中, 1M NaOH溶液调节pH至7.0。配制4L体积后将其分装于500ml三角瓶(200ml/瓶, 20瓶), 每瓶加入10-15颗玻璃珠以避免菌丝振摇成团, 棉塞封口包扎后放入高压灭菌锅121℃灭菌30min。待灭菌种子培养基冷却后, 从保存斜面挑取真菌*Pestalotiopsis neglecta* SCSIO41403菌丝体接种入瓶中种子培养基, 25℃下摇床振摇(180转/min)。

[0024] 种子发酵液培养3天后, 按10% v/v的接种量接种种子发酵液于5L发酵罐中进行大量发酵。所用的发酵培养基: 每升含有甘露醇20g、大豆蛋白胨10g、磷酸氢二钾0.35g、碳酸钙0.5g和豆油0.5ml, 余量为水, pH 7.0; 其配制方法是将各成分混合, 1M NaOH溶液调节pH至7.0, 灭菌制得。除分装体积不同, 且不添加玻璃珠外, 其它配置步骤与种子发酵液一致, 发酵体积共计40L (1L/罐, 40罐), 培养条件为28℃, 180转/min, 培养7天, 获得发酵液。

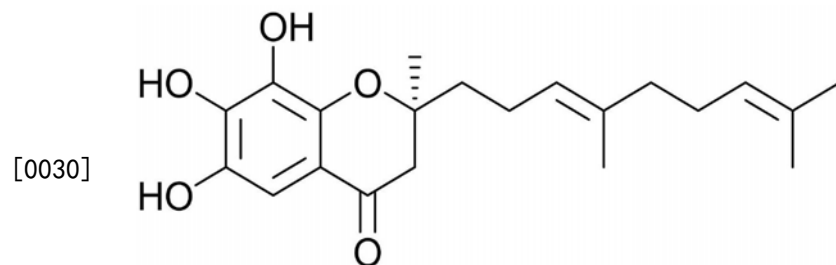
[0025] 发酵液用乙酸乙酯萃取3次, 减压回收溶剂得到提取物浸膏。提取物浸膏(10g)以少量甲醇溶解后硅胶拌样, 进行中压硅胶柱层析(200-300目), 洗脱液为石油醚/乙酸乙酯从体积比20:1、10:1、5:1、2:1、1:1和0:1梯度洗脱, 顺序得到6个洗脱部位Fr.a-Fr.f。Fr.c (石油醚/乙酸乙酯体积比5:1洗脱馏分)再次经过硅胶柱层析, 用石油醚/乙酸乙酯从10:1~1:1梯度洗脱, 收集石油醚/乙酸乙酯体积比5:1洗脱馏分, 经半制备HPLC纯化, 采用SunFireTMC18色谱柱, 柱温40℃, CH₃CN/H₂O v/v梯度洗脱: 0-3min, 25%CH₃CN; 3-20min, 25%-55%CH₃CN; 20-23min, 55%-100%CH₃CN; 23-28min, 100%CH₃CN; 28-30min, 100%-5%CH₃CN; 30-33min, 5%CH₃CN; 2mL/min, 保留时间为22.5min时分离得到纯化合物香叶基三羟基色酮*pestalotiochromone A* (PCA)。

[0026] 实施例2:*Pestalotiochromone A* (PCA) 的结构鉴定

[0027] 对化合物PCA进行结构分析测试, 得到以下理化性质数据:

[0028] PCA: 黄色油状; $[\alpha]_D^{25} -15.6$ (c 0.56, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 202 (4.32), 301 (3.72) nm; IR (film) $\nu_{\max}$ 3377, 2927, 1662, 1616, 1471, 1319, 1205, 1043, 1016, 914 cm⁻¹; ECD (c 0.2mM, MeOH) $\lambda_{\max}$ ($\Delta \epsilon$) 203 (+1.80), 267 (-0.10), 302 (+0.17); ¹H和¹³C NMR数据见表1; HRESIMS m/z 359.1865 [M-H]⁻ (计算值为C₂₁H₂₈O₅, 359.1864)。

[0029] 根据HRESIMS数据推测其分子式为C₂₁H₂₈O₅。¹³C NMR (表1) 显示亚甲基[δ C 48.2 (C-3)]和羰基[δ C 194.2 (C-4)]信号, 表明PCA为4-色酮衍生物。单峰芳香质子信号[δ H 6.78 (1H, s, H-5)]和低场区碳信号[δ C 141.5 (C-6), 143.6 (C-7), 135.0 (C-8)]则表明PCA中C-6, C-7和C-8位被羟基取代。侧链的NMR数据分析为香叶基侧链结构, 该推论可由具体的1H-1H COSY和HMBC相关信号加以证实(图1)。通过比较计算ECD图谱(图2), 确定PCA的绝对构型为2S。因此, PCA化学结构鉴定为如图1所示的香叶基三羟基色酮化合物, 命名为*pestalotiochromone A* (PCA), 其结构式如式(I)所示:



式(I)。

[0031] 香叶基三羟基色酮pestalotiochromone A的化学结构式及重要的二维核磁¹H-¹H COSY和HMBC相关信息见图1。

[0032] 表1 PCA的¹H和¹³CNMR数据 (¹H 500MHz, ¹³C 125MHz, CD3OD)

No	PCA	
	δC, type	δH (J in Hz)
2	82.7, C	
3	48.2, CH ₂	2.64, d (16.7) 2.69, d (16.7)
4	194.2, C	
4a	113.1, C	
5	102.1, CH	6.78, s
6	141.5, C	
7	143.6, C	
8	135.0, C	
8a	145.4, C	
1'	39.4, CH ₂	1.79, m; 1.67, m
2'	23.3, CH ₂	2.13, m
3'	124.9, CH	5.10, t (7.3)
4'	136.6, C	
5'	40.7, CH ₂	1.95, t (7.4)
6'	27.7, CH ₂	2.04, m
7'	125.3, CH	5.05, t (7.1)
8'	132.2, C	
9'	25.8, CH ₃	1.63, s
10'	17.7, CH ₃	1.56, s
11'	15.9, CH ₃	1.55, s
2-CH ₃	24.6, CH ₃	1.44 s
6-COOH		

[0035] 实施例3:Pestalotiochromone A (PCA) 作用肝X受体α活性测定

[0036] 为了寻找潜在的LXR激动剂,我们通过高性能计算机的分子对接分析对进行筛选。使用Schrödinger2017-1软件进行对接,从可用的晶体结构(PDB ID:1UHL)中检索出与T090形成复合物的LXR α 配体结合域,按照Maestro软件包中的Protein Prepare Wizard工作流程进行构建。使用Grid生成程序选择键合位点,然后再使用默认参数下的Glide(XP模式)将制备的配体灵活对接到受体上。研究分析LXR α 配体结合域与化合物PCA之间的分子相互作用。结果发现,PCA可与LXR α 受体结合域进行结合(图3),结合自由能值(S值)为-11.113。在二维结合模型中,色酮结构上三羟基与LXR α 的活性位点残基THR302或HID421形成氢键相互作用。由此推测色酮结构上三羟基具有促进PCA与LXR α 受体蛋白结合的作用。

[0037] 体外表面等离子体共振 (SPR) 分析用于测量LXR α 受体和配体的亲和相互作用。将LXR α 蛋白固定于CM5芯片上。以50 μ L/min的流速注入不同稀释浓度的受试化合物,持续180s后用50mM NaOH作为清洗液使芯片再生。用GT Biacore T100在25 $^{\circ}$ C采集数据,使用Biacore Evaluation Software 2.0计算蛋白与小分子之间的亲和力KD值。用LXR强激动剂GW3965作为阳性对照。PCA与LXR α 受体结合作用较佳,呈剂量依赖型,解离平衡常数(KD)为6.2 μ M,优于LXR强效激动剂GW3965的KD值(20.6 μ M)(图4a)。

[0038] 为了进一步研究PCA对LXR α 的作用,通过定量聚合酶链反应(qPCR)方法检测PCA对细胞中的LXR α 的mRNA水平的影响。体外培养ACHN细胞,分别:(1)加入终浓度为10 μ M的PCA化合物(处理组), (2)加入终浓度为10 μ M的GW3965(阳性对照), (3)不加任何试剂(Control);共培养48小时。使用RNAprep纯组织试剂盒(中国天根生物科技有限公司),分别提取处理组、阳性对照、Control组的ACHN细胞裂解物中的总RNA。使用PrimeScript RT试剂盒(日本Takara公司)和SYBR Green PCR预混液(美国Promega公司)进行qPCR检测,按试剂盒说明书操作。 β -肌动蛋白作为对照基因,以评估LXR α 的相对mRNA水平。。结果显示,PCA可以显著上调LXR α 的mRNA水平(图4b),作用强于同剂量的GW3965,证实了PCA是LXR α 激动剂。

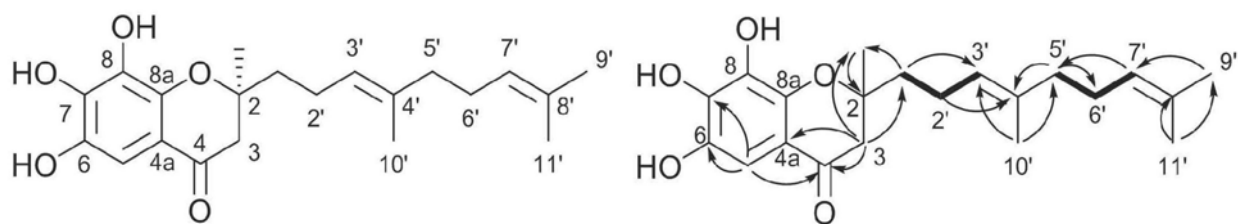


图1

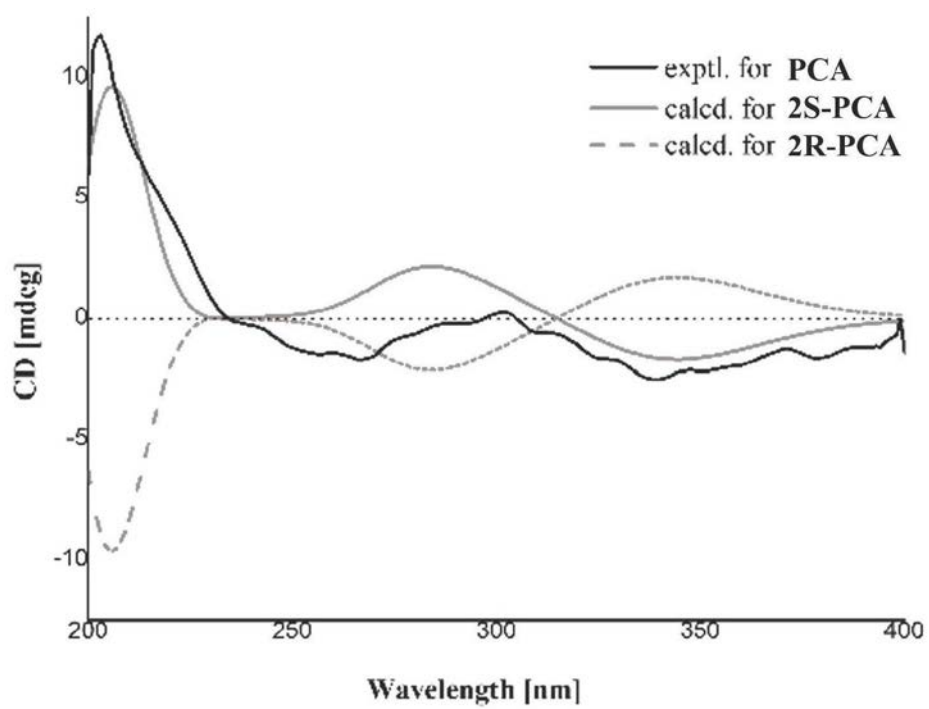


图2

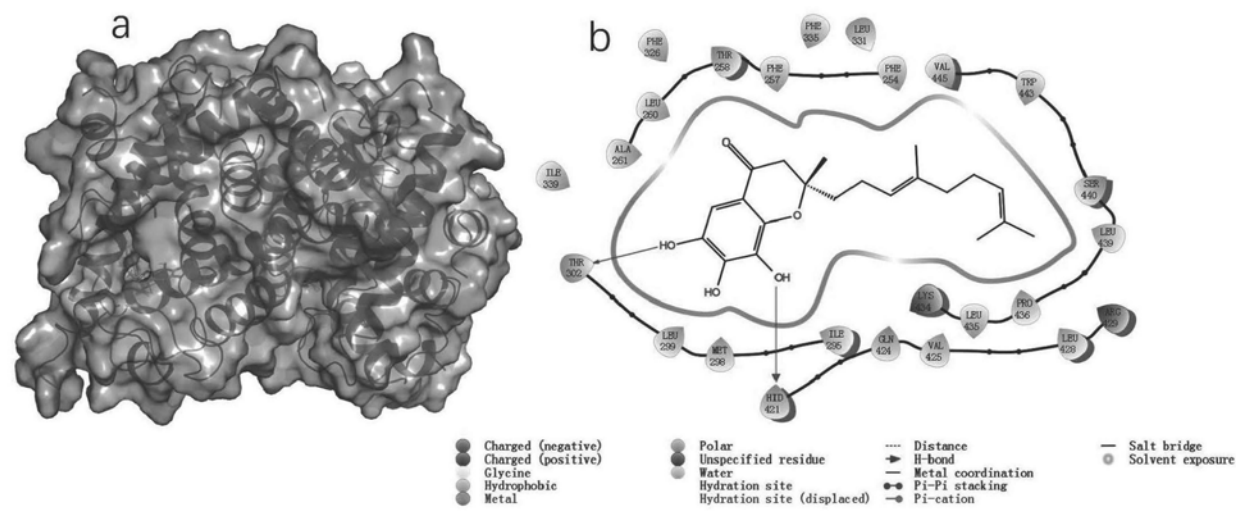


图3

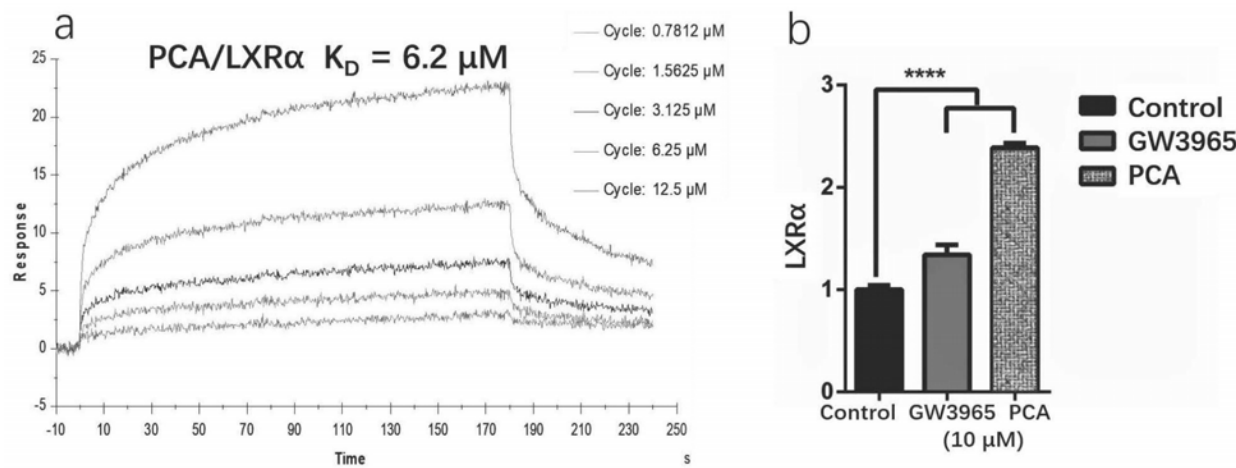


图4