



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 106957324 A

(43) 申请公布日 2017. 07. 18

(21) 申请号 201610014630. 3

(22) 申请日 2016. 01. 11

(71) 申请人 复旦大学

地址 200433 上海市杨浦区邯郸路 220 号

(72) 发明人 胡金锋 胡长玲 熊娟

(74) 专利代理机构 上海元一成知识产权代理事
务所(普通合伙) 31268

代理人 吴桂琴

(51) Int. Cl.

C07D 493/10(2006. 01)

A61P 3/10(2006. 01)

A61P 3/04(2006. 01)

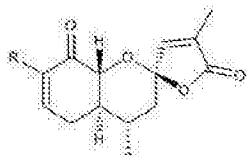
权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

倍半萜螺环内酯类化合物及其制备方法和用途

(57) 摘要

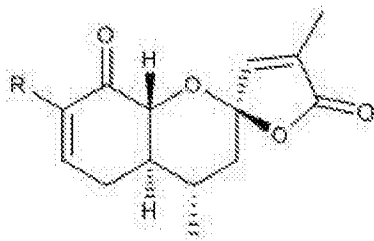
本发明属医药技术领域, 涉及倍半萜螺环内酯类化合物及其制备方法和用途, 具体涉及百山祖冷杉中倍半萜螺环内酯类化合物的制备方法及其作为蛋白酪氨酸磷酸酶 1B 抑制剂的用途。本发明从百山祖冷杉(*Abies beshanzuensis*) 的树皮中提取分离得到式(I) 的没药烷型倍半萜螺环内酯类化合物, 经生物活性测试表明该类化合物可显著抑制蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (PTP1B), 进一步可用于制备预防、延缓或治疗糖尿病、肥胖症及其并发症和其他 PTP1B 介导的疾病药物。



(I)。

Seshanzueneone C: R = CH₂OH
Beshanzueneone D: R = CH₃

1. 式(I)结构的倍半萜螺环内酯类化合物, 所述化合物为化合物 beshanzuenone C 和 beshanzuenone D;



Beshanzuenone C: $R = CH_2OH$

Beshanzuenone D: $R = CH_3$

(I)。

2. 如权利要求1所述的倍半萜螺环内酯类化合物, 其特征在于, 通过下述方法制备: 采用百山祖冷杉干燥树皮, 粉碎后用甲醇提取, 提取液浓缩, 加水悬浮, 分别用石油醚和乙酸乙酯萃取; 乙酸乙酯提取物经硅胶、Sephadex LH-20凝胶及反相半制备HPLC色谱分离制备, 得化合物 beshanzuenone C 和 beshanzuenone D。

3. 权利要求1所述的倍半萜螺环内酯类化合物作为蛋白酪氨酸磷酸酶1B抑制剂在制备药物中的用途。

4. 权利要求1所述的倍半萜螺环内酯类化合物在制备预防、延缓或治疗糖尿病、肥胖症及其他与PTP1B介导相关疾病药物中的用途。

5. 按权利要求4所述的用途, 其特征在于, 所述的糖尿病是II型糖尿病。

倍半萜螺环内酯类化合物及其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及医药技术领域,涉及倍半萜螺环内酯类化合物及其制备方法和用途,具体涉及百山祖冷杉中新型倍半萜螺环内酯类化合物的制备方法及其作为蛋白酪氨酸磷酸酶1B抑制剂的用途。本发明从百山祖冷杉(*Abies beshanzuensis*)的树皮中提取分离得到的新型没药烷型倍半萜螺环内酯类化合物,经生物活性测试表明该类化合物可显著抑制蛋白酪氨酸磷酸酶1B(PTP1B),进一步可用于制备预防或治疗PTP1B介导的疾病特别是II型糖尿病、肥胖症及其并发症的药物或该类药物的先导化合物。

背景技术

[0002] 现有技术公开了蛋白酪氨酸磷酸酶(protein tyrosine phosphatase, PTP)是调节细胞内蛋白酪氨酸残基磷酸化水平的酶家族,与细胞增殖和胞内多种信号转导过程密切相关(Fischer et al, Science 1991, 253: 401-406)。蛋白酪氨酸磷酸酶1B(protein tyrosine phosphatase 1B, PTP1B)广泛分布于多种人体组织中,全长约50 KDa,是最早被纯化和确定生物学特征的PTP家族成员之一,(Charbonneau et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989, 86: 5252-5256)。PTP1B表达的改变与人类糖尿病、肥胖症和癌症等疾病相关。

[0003] 研究公开了糖尿病(diabetes mellitus)和肥胖症(obesity)是严重威胁人类身体健康的内分泌紊乱性代谢类疾病,常伴随着外周组织细胞对胰岛素敏感性的降低(即胰岛素抵抗),引起肌肉、肝脏及脂肪组织中的糖脂代谢平衡失调。根据糖尿病的发病机制,目前一般将糖尿病分为I型糖尿病(胰岛素依赖型, IDDM)与II型糖尿病(非胰岛素依赖型, NIDDM)。其中II型糖尿病占90%以上,胰岛素抵抗是II型糖尿病发生、发展过程中的关键因素。研究表明,PTP1B可使激活的胰岛素受体和胰岛素受体底物去磷酸化,在胰岛素和瘦素的信号传导过程中起着重要的负调控作用(Kenndy et al, Science 1999, 283: 1544-1548)。PTP1B的过度表达将会导致胰岛素和瘦素信号的变化,从而导致糖尿病和肥胖症的发生。因此,PTP1B可视为治疗糖尿病和肥胖症等相关疾病的重要的药物靶点(Johnson et al., Nat. Rev. Drug. Discov. 2002, 1: 696-709)。本领域研究人员关注寻找PTP1B的特异性抑制剂,通过抑制PTP1B的活性提高外周组织对胰岛素的敏感性,进一步用于糖尿病和肥胖症的干预。另有研究发现PTP1B在包括慢性髓细胞性白血病、乳腺癌、卵巢癌和前列腺癌在内的若干癌细胞中都有过量表达和水平提高现象(Liu et al, J. Biol. Chem. 1996, 271, 31290-31295; Kenneth et al., Mol. Cell. Biol. 1998, 18, 2965-2975; Weiner et al., J. Natl. Cancer Inst. 1996, 86, 372-378),说明PTP1B在这些癌症细胞中起着调控激酶活性的作用,因此,PTP1B的抑制剂可用于治疗或预防癌症或用于减缓癌症进展;还有研究表明PTP1B抑制剂可用于治疗或预防神经退行性疾病,等。

[0004] PTP1B 作为新的药用靶点已成为近年来生物学及创新药物研究的一个热点。随着高通量筛选技术的广泛运用,目前已经发现较多种类的PTP1B抑制剂。然而迄今为止,尚未有任何PTP1B抑制剂得以成功上市成为药物,限制其成药的首要原因是PTP1B与PTP家族中

其他的酶具有相同的催化中心,在抑制PTP1B活性的同时提高其针对PTP1B的选择性极其重要。另外,目前发现的活性较高的抑制剂多带有磷酸、羧酸、磺酸等极性基团,因其具有较高的负电荷,不利于透过细胞膜,导致生物利用度差。因此寻找高效、高选择性,同时兼具良好药代动力学性质的小分子PTP1B抑制剂对于糖尿病和肥胖症等疾病的干预具有重要意义。

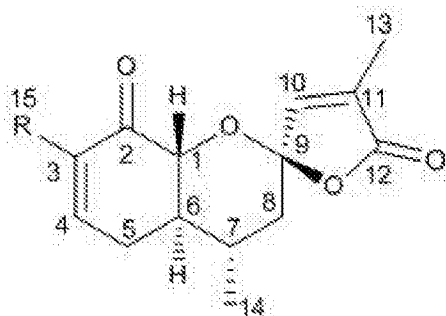
[0005] 天然产物具有结构复杂性和结构多样性的特点,是新药发现的重要来源。天然产物及其衍生物独特的化学结构,使其具有高药效和对特定靶点高选择性的优点以及潜在的独特的作用机制等优点(Newman, et al., Nat. Prod. Rep.2000, 17: 215-34; Newman et al., J. Nat. Prod. 2012, 75: 311-335)。统计表明濒危植物次生代谢产物的成药性较高,是发现具有新颖结构和独特作用机制的新药物的重要来源,在国际上引起高度重视(Ibrahim et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2013: 110, 16832-16837; Zhu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2011, 108: 12943-12948)。百山祖冷杉(*Abies beshanzuensis*)隶属松科(Pinaceae)冷杉属(*Abies*)植物,是一种常绿乔木,成年后高达30余米,是我国特有的面临濒危灭绝的珍稀树种之一,于1992年10月被列为国家珍稀树种第一批一级保护树种(Fu et al., China Plant Red Data Book, Science Press: Beijing; New York, 1992);其天然仅分布于我国浙江省庆元县百山祖南坡海拔1740 m的山脊悬岩陡坡。1987年被国际自然保护联盟(International Union for Conservation of Nature, IUCN)列为全球最濒危的12种植物之一。目前其化学成分和药理活性尚未有任何报道。

[0006] 本发明的申请人基于即能保护性地采集少许百山祖冷杉植物样品,同时积极促进利用这一濒危珍稀资源为人类服务,拟从百山祖冷杉树皮中分离得到具有抑制PTP1B活性的没药烷型倍半萜螺环内酯类化合物。

发明内容

[0007] 本发明目的是提供新的倍半萜螺环内酯类化合物及其制备方法和用途,具体涉及百山祖冷杉中新型倍半萜螺环内酯类化合物倍半萜类化合物(亦称:6/6/5 环的没药烷型倍半萜螺环内酯化合物)的制备方法及其作为蛋白酪氨酸磷酸酶1B抑制剂的用途。本发明从百山祖冷杉(*Abies beshanzuensis*)的树皮中提取分离得到的新型没药烷型倍半萜螺环内酯类化合物,经生物活性测试表明该类化合物可显著抑制蛋白酪氨酸磷酸酶1B(PTP1B),进一步可用于制备预防或治疗PTP1B介导的疾病特别是II型糖尿病、肥胖症及其并发症及其他PTP1B介导的疾病的药物或该类药物的先导化合物。

[0008] 本发明的没药烷型倍半萜类化合物具有式(I)的结构:所述化合物为化合物 beshanzuene C和beshanzuene D;



Beshanzuenone C: R = CH₂OH

Beshanzuenone D: R = CH₃

[0009] 本发明提供了上述化合物的制备方法,所述的化合物可由百山祖冷杉树皮经由本领域所涉常规的提取分离方法制备而得,其包括步骤:晾干粉碎的百山祖冷杉树皮用甲醇室温浸泡提取,提取液减压回收溶剂,合并后得浸膏;浸膏用水分散后依次用石油醚和乙酸乙酯萃取,得石油醚部分、乙酸乙酯部分和水溶性部分;乙酸乙酯部分经硅胶、Sephadex LH-20及反相半制备HPLC分离,得化合物beshanzuenone C和beshanzuenone D。

[0010] 本发明所述的化合物可通过从植物中分离纯化得到;也可经本领域技术人员熟知的化学方法合成获得。

[0011] 本发明对所得没药烷型倍半萜类化合物进行了蛋白酪氨酸磷酸酶1B(PTP1B)抑制活性实验,结果表明,所述化合物均具有显著的抑制活性,可用于制成预防、延缓或治疗由PTP1B介导的疾病,特别是II型糖尿病和肥胖症的药物或是作为该类药物的先导化合物。

[0012] 本发明所述的化合物可单独应用或者合用,亦可与药学上可接受的载体或赋形剂结合,按照常规方法制成口服或者非口服剂型。

[0013] 本发明具有如下优点:提供了两个目标化合物均为新结构化合物;该类化合物具有显著的PTP1B酶抑制活性,进一步可用于制备预防或治疗糖尿病尤其是II型糖尿病或肥胖症的药物。

具体实施方式

[0014] 下面实施例对本发明作进一步阐述,但这些实施例绝非对本发明有任何限制。本领域技术人员在本说明书的启示下对本发明实施中所作的任何变动都将落在权利要求书的范围内。

[0015] 下述制备例中,比旋光测试通过JASCO P-1020旋光仪完成;紫外和红外光谱数据分别通过Shimadzu UV-2550紫外光谱仪和Nicolet AVATAR 360型红外光谱仪获得;NMR用Bruker Avance II 400型仪测定;LR-MS由Agilent 1100 Series LC/MSD G1946D 型仪测定,HR-MS由AB Sciex TripleTOF 5600型仪测定;所使用的硅胶和薄层板为烟台康比诺公司生产,Sephadex LH-20凝胶为瑞士GE Healthcare Bio-Sciences 公司生产;半制备HPLC为Waters e2695,配备2998 PDA和2424蒸发光散射双检测器以及SunFire ODS (5 μm, 250 × 10 mm) 半制备柱;所有试剂均为上海国药集团化学试剂有限公司生产。

[0016] 实施例1:制备没药烷型倍半萜螺环内酯类化合物

取百山祖冷杉树皮500 g,粉碎后用90%甲醇室温冷浸提取5次,合并提取液,减压浓缩,

得浸膏30 g。浸膏用水分散后依次用石油醚与乙酸乙酯萃取,得乙酸乙酯部分12.0 g。乙酸乙酯部分经100-200目硅胶柱层析,以石油醚:乙酸乙酯15:1-0:1及乙酸乙酯:甲醇 15:1-0:1梯度洗脱,得到6个组分(Fr.1-Fr.6)。亚组分Fr.6经过半制备型HPLC进一步分离,以55%甲醇等度洗脱(流速:3 mL/min),分别得到化合物beshanzuenone C(3.0 mg, t_R = 8.4 min)和beshanzuenone D(1.5 mg, t_R = 16.0 min);

化合物beshanzuenone C和beshanzuenone D为新没药烷型倍半萜类化合物,它们的光谱及理化数据如下:

Beshanzuenone C:淡黄色无定形粉末; $[\alpha]_D^{20}$ +20 (c 0.06, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 238 (2.6) nm; CD (c 2.2×10^{-3} M, MeOH), λ_{max} ($\Delta \epsilon$) 217 (+10.3), 239 (-2.4) nm; IR (KBr) ν_{max} 3482, 2949, 2864, 2843, 1756, 1654, 1453, 1412, 1053, 1032, 1017, 693 cm^{-1} ; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1.03 (3H, d, J = 6.8 Hz, Me-14), 1.62 (1H, dd, J = 13.8, 12.4 Hz, H-8 β), 1.77 (1H, dd, J = 13.8, 4.2 Hz, H-8 α), 1.80 (1H, m, H-6), 1.93 (3H, d, J = 1.6 Hz, Me-13), 2.15 (1H, m, H-7), 2.21 (1H, ddd, J = 17.0, 11.2, 2.0 Hz, H-5 β), 2.80 (1H, ddd, J = 17.0, 5.6, 5.6 Hz, H-5 α), 4.24 (1H, br d, J = 13.6 Hz, H-15), 4.33 (1H, br d, J = 13.6 Hz, H-15), 4.49 (1H, d, J = 12.8 Hz, H-1 β), 6.87 (1H, q, J = 1.6 Hz, H-10), 6.90 (1H, br dd, J = 5.6, 2.0 Hz, H-4). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 78.6 (C-1), 195.4 (C-2), 137.4 (C-3), 143.9 (C-4), 28.9 (C-5), 44.0 (C-6), 31.4 (C-7), 39.7 (C-8), 104.5 (C-9), 146.4 (C-10), 132.6 (C-11), 171.4 (C-12), 10.5 (C-13), 18.1 (C-14), 61.4 (C-15); (+) ESIMS m/z 279 $[M + H]^+$, 301 $[M + Na]^+$, (-) ESIMS m/z 277 $[M - H]^-$; HRESIMS m/z 301.1049 $[M + Na]^+$ (calcd for $C_{15}H_{18}O_5Na$, 301.1046, Δ = 0.8 ppm).

Beshanzuenone D: 白色无定形粉末; $[\alpha]_D^{20}$ +13 (c 0.06, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 236 (2.2) nm; CD (c 2.3×10^{-3} M, MeOH), λ_{max} ($\Delta \epsilon$) 217 (+21.7), 239 (-5.3) nm; IR (KBr) ν_{max} 2948, 2864, 2836, 1754, 1653, 1454, 1413, 1051, 1032, 1017, 672 cm^{-1} ; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1.01 (3H, d, J = 6.4 Hz, Me-14), 1.60 (1H, dd, J = 13.6, 12.4 Hz, H-8 β), 1.76 (1H, dd, overlapped, H-8 α), 1.76 (1H, m, H-6), 1.82 (3H, br s, Me-15), 1.92 (3H, d, J = 1.6 Hz, Me-13), 2.16 (1H, m, overlapped, H-7 β), 2.16 (1H, ddd, overlapped, H-5 β), 2.70 (1H, ddd, J = 17.0, 5.6, 5.6 Hz, H-5 α), 4.45 (1H, d, J = 12.8 Hz, H-1 β), 6.68 (1H, m, H-4), 6.87 (1H, q, J = 1.6 Hz, H-10). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 78.8 (C-1), 195.0 (C-2), 134.8 (C-3), 142.5 (C-4), 29.1 (C-5), 44.1 (C-6), 31.4 (C-7), 39.7 (C-8), 104.6 (C-9), 146.6 (C-10), 132.5 (C-11), 171.5 (C-12), 10.5 (C-13), 18.1 (C-14), 15.7 (C-15); (+) ESIMS m/z 263 $[M + H]^+$, 285 $[M + Na]^+$, (-) ESIMS m/z 261 $[M - H]^-$; HRESIMS m/z 285.1105 $[M + Na]^+$ (calcd for $C_{15}H_{18}O_4Na$, 285.1097, Δ = 2.8 ppm)。

[0017] 实施例2:蛋白酪氨酸磷酸酶1B抑制活性测定

采用分子生物学的方法,构建基因重组的hGST-PTP1B-BL21 *E. coli* 人类PTP1B工程菌,经纯化后的hGST-PTP1B重组蛋白能水解底物para-Nitrophenyl Phosphate (pNPP) 的

磷脂键,得到的脱磷酸产物pNP在波长405 nm处有很强的光吸收,因此可通过直接检测405 nm处光吸收的变化以观察酶活性变化以及化合物对酶活性的抑制情况;初筛选择所述化合物浓度为20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时对PTP1B酶活性的百分抑制率进行考察,试验结果表明beshanzueone C和beshanzuenone D的抑制率分别高于65%和85%;进一步测定 IC_{50} 值:样品临用前溶于DMSO配成合适浓度,3倍稀释,7个稀释度,三复孔,取2 μL 样品溶液加入到标准的测活体系(30 nM GST-hPTP1B, 2 mM pNPP, 50 mM 3-吗啉丙磺酸 (MOPS), pH 6.5, 2 mM DTT, 1mM EDTA, 2% DMSO);反应温度为30 $^{\circ}\text{C}$,在VERSAmax上动态测量405 nm处的光吸收,时间为3 min,其动力学曲线一级反应的斜率作为酶的活性指标;以相对活性对化合物浓度作图,按公式 $v/v_0 = 100/(1+b*[I]/\text{IC}_{50})$ 拟合得到 IC_{50} 值,实验重复三次,结果取三次的平均值;阳性对照齐墩果酸(oleanolic acid) IC_{50} 值为1.52 $\mu\text{g}/\text{ml}$;测试结果表明,所述两个化合物均表现出显著的抑制活性,表明本发明所述化合物可用于制备治疗糖尿病、肥胖症及其并发症的药物或是作为该类药物的先导化合物。

[0018] 表1显示了化合物1和2抑制PTP1B的 IC_{50} 值。

[0019] 表1.

化合物	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Beshanzuenone C	16.6 $\pm$ 2.45
Beshanzuenone D	10.6 $\pm$ 2.11