



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101801186 A

(43) 申请公布日 2010.08.11

(21) 申请号	200880021693.5	<i>C11B 9/00</i> (2006.01)
(22) 申请日	2008.05.02	<i>C12N 1/14</i> (2006.01)
(30) 优先权数据		<i>A23L 1/221</i> (2006.01)
	0708611.9 2007.05.04 GB	<i>A61K 8/49</i> (2006.01)
	0723451.1 2007.11.30 GB	<i>A61K 31/365</i> (2006.01)
(85) PCT申请进入国家阶段日		<i>A61Q 19/02</i> (2006.01)
	2009.12.24	<i>A61Q 19/08</i> (2006.01)
(86) PCT申请的申请数据		<i>A61Q 19/10</i> (2006.01)
	PCT/GB2008/001544 2008.05.02	<i>A61Q 5/02</i> (2006.01)
(87) PCT申请的公布数据		<i>A61Q 5/06</i> (2006.01)
	W02008/135746 EN 2008.11.13	<i>A61Q 5/10</i> (2006.01)
		<i>A61Q 5/12</i> (2006.01)
(71) 申请人	艾克沃制药生物发明有限公司	
地址	英国奥本	
(72) 发明人	严立明 安德鲁·默恩斯·斯普拉格 凯伦·朱克斯	
(74) 专利代理机构	中科专利商标代理有限责任 公司 11021	
代理人	吴小明	
(51) Int. Cl.		
	<i>A01N 43/08</i> (2006.01)	
	<i>A01P 3/00</i> (2006.01)	
	<i>C07D 307/00</i> (2006.01)	

权利要求书 3 页 说明书 15 页 附图 11 页

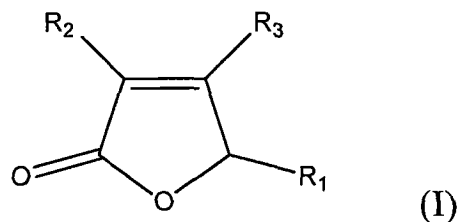
(54) 发明名称

天然生物活性化合物

(57) 摘要

本发明涉及具有细胞保护作用（如抗氧化剂、抗炎剂和/或抗真菌剂性质）的丁烯羟酸内酯化合物，其来源于海洋真菌短梗霉。

1. 根据式 (I) 的化合物作为抗真菌剂的应用,

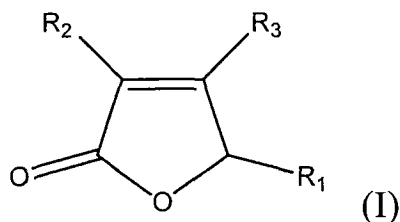


其中,

R_1 是 C_6-C_{12} 烷基,

R_2 和 R_3 独立地选自 H、烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、羧基、烷氧基羰基、羟基、氨基、硝基、烷氧基、烷硫基、甲酰基、氰基、氨基甲酰基、卤素或酮。

2. 根据式 (I) 的化合物作为芳香剂和 / 或增香剂的应用,

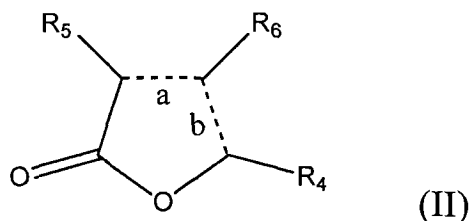


其中,

R_1 是 C_6-C_{12} 烷基,

R_2 和 R_3 独立地选自 H、烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、羧基、烷氧基羰基、羟基、氨基、硝基、烷氧基、烷硫基、甲酰基、氰基、氨基甲酰基、卤素或酮。

3. 根据式 (II) 的化合物作为抗氧化剂和 / 或抗炎剂和 / 或抗微生物剂的应用, 所述抗微生物剂不包括抗真菌剂,



其中,

R_4 是 C_1-C_{12} 烷基,

R_5 和 R_6 独立地选自 H、烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、羧基、烷氧基羰基、羟基、氨基、硝基、烷氧基、烷硫基、甲酰基、氰基、氨基甲酰基、卤素或酮,

所述虚线 a 和 b 独立地是单键或双键, 但两者不同时为双键。

4. 根据权利要求 3 的应用, 其中 R_4 是 C_6-C_{12} 烷基。

5. 根据权利要求 1-4 任一项的应用, 其中 R_1 和 R_4 是 C_6-C_{10} 烷基。

6. 根据权利要求 5 的应用, 其中 R_1 和 R_4 是正己基。

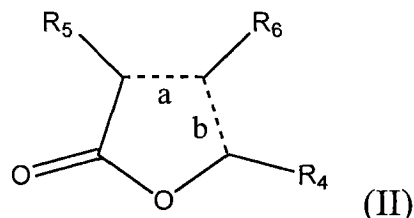
7. 根据权利要求 1 的应用, 其用作针对念珠菌属物种 (*Candida* sp)、马拉色氏菌属物种 (*Malassezia* sp)、糠秕孢子菌属物种 (*Pityrosporum* sp) 和 / 或毛癣菌属物种 (*Trichophyton* sp) 的抗真菌剂。

8. 根据前述权利要求任一项的应用, 其中根据式 (I) 或式 (II) 的化合物以 $1 \mu\text{g/ml}$ 到

100 μ g/ml 的量存在。

9. 根据权利要求 8 的应用, 其中根据式 (I) 或式 (II) 的化合物以 1 μ g/ml 到 10 μ g/ml 的量存在。

10. 根据式 (II) 的化合物用于制备药物的应用, 所述药物用于预防或治疗真菌感染、细菌感染、病毒感染、炎症病症和 / 或癌症,



其中,

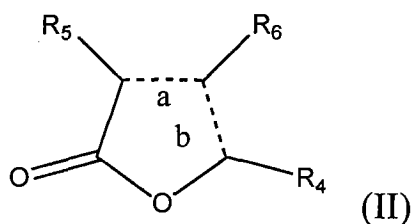
R_4 是 C_1 - C_{12} 烷基,

R_5 和 R_6 独立地选自 H、烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、羧基、烷氧基羰基、羟基、氨基、硝基、烷氧基、烷硫基、甲酰基、氰基、氨基甲酰基、卤素或酮,

所述虚线 a 和 b 独立地是单键或双键, 但不同时为双键。

11. 根据权利要求 10 的应用, 其中所述药物用于预防或治疗痤疮、头皮屑和 / 或指甲真菌。

12. 一种化妆品制剂, 其包含根据式 (II) 的化合物以及一种或多种载体成分,



其中,

R_4 是 C_1 - C_{12} 烷基,

R_5 和 R_6 独立地选自 H、烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、羧基、烷氧基羰基、羟基、氨基、硝基、烷氧基、烷硫基、甲酰基、氰基、氨基甲酰基、卤素或酮,

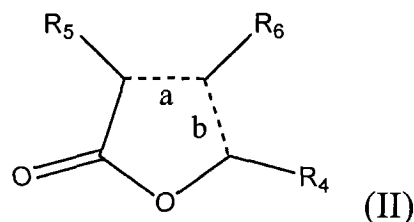
所述虚线 a 和 b 独立地是单键或双键, 但不同时为双键。

13. 根据权利要求 12 的化妆品制剂, 其选自皮肤乳剂、抗衰老乳剂、润肤乳剂、皮肤增白制剂、皮肤洗剂、洗发剂、头发调理剂、染发剂、润发油和头发摩丝。

14. 根据权利要求 2 的应用, 其中所述化合物被提供为食品 and / 或饮料的成分。

15. 根据权利要求 3 的应用, 其中所述化合物被提供为食品 and / 或饮料的抗腐败和 / 或防腐剂成分。

16. 一种制备根据式 (II) 的化合物的方法,



其中,

R_4 是 C_1-C_{12} 烷基,

R_5 和 R_6 独立地选自 H、烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、羧基、烷氧基羰基、羟基、氨基、硝基、烷氧基、烷硫基、甲酰基、氰基、氨基甲酰基、卤素或酮,

所述虚线 a 和 b 独立地是单键或双键,但不同时为双键,

所述方法包括下列步骤:

i) 提供短梗霉属物种 (*Aureobasidium* sp.) 真菌,并在适当的培养基中,在适合于生产所述化合物或化合物前体的条件下培养适当的时期;和

ii) 从得到的培养物中回收所述化合物。

17. 根据权利要求 16 的方法,其中 R_4 是 C_6-C_{12} 烷基。

18. 根据权利要求 17 的方法,其中 R_4 是正己基。

19. 根据权利要求 16-18 任一项的方法,其中 R_5 和 R_6 独立地是氢。

20. 根据权利要求 16-19 任一项的方法,其中所述虚线“a”是双键,并且所述虚线 b 是单键。

21. 根据权利要求 16-20 任一项的方法,其中所述短梗霉属真菌是海洋物种。

22. 根据权利要求 21 的方法,其中所述短梗霉属真菌是这样的短梗霉属真菌,其保藏在 CABI 生物科学 UK 中心 IMI,保藏号为 IMICC No. 394867,或其突变体或变体。

23. 根据权利要求 16-22 任一项的方法,其中所述回收步骤包括碱化步骤。

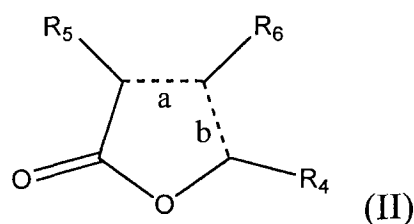
24. 根据权利要求 16-23 任一项的方法,其中所述回收步骤包括溶剂提取步骤。

25. 根据权利要求 16-24 任一项的方法,其中获得至少多于 5mg/L 培养物的量的所述根据式 (II) 的化合物。

26. 根据权利要求 25 的方法,其中所述获得的化合物的量是至少多于 10-15mg/L 培养物。

27. 短梗霉属真菌,其保藏在 CABI 生物科学 UK 中心 IMI,保藏号为 IMICCN0. 394867,或其突变体或变体。

28. 一种制备根据式 (II) 的化合物的方法,



其中,

R_4 是 C_1-C_{12} 烷基,

R_5 和 R_6 独立地选自 H、烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、羧基、烷氧基羰基、羟基、氨基、硝基、烷氧基、烷硫基、甲酰基、氰基、氨基甲酰基、卤素或酮,

所述虚线 a 和 b 独立地是单键或双键,但不同时为双键,所述方法包括下列步骤:

i) 提供直链不饱和脂肪酸,和

ii) 使所述脂肪酸内部环化从而提供所述化合物。

29. 应用或方法 3, 10, 12, 16 和 28,其中所述虚线 a 是双键并且所述虚线 b 是单键。

天然生物活性化合物

[0001] 介绍

[0002] 本发明涉及具有细胞保护作用如抗氧化剂、抗炎剂和 / 或抗真菌剂性质的丁烯羟酸内酯化合物,其来源于海洋真菌短梗霉属 (*Aureobasidium*)。

[0003] 发明背景

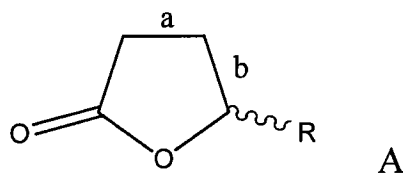
[0004] 丁烯羟酸内酯或呋喃酮是包含四个碳的一类杂环内酯。已经报道大部分的已知丁烯羟酸内酯来源于植物果实 (Rouseff, Leahy 等, 1995)。然而,也已经报道一些细菌和真菌能够产生丁烯羟酸内酯。例如,丁烯羟酸内酯是 γ -丁内酯的前体, γ -丁内酯被认为涉及链霉菌属 (*Streptomyces*) 物种中的细胞密度感受细胞-细胞信号传导系统 (Dunny 和 Leonard, 1997)。 γ -丁内酯在调节链霉菌属的形态发生、孢子形成、分化和次级代谢、重要抗生素产生中起重要作用 (Braun 等, 1995; Takano 等, 2000; Dunny 和 Leonard, 1997; Kato 等, 2007; Takano, 2006)。已经记载链霉菌属能够产生丁烯羟酸内酯抗生素化合物如 butalactin (Franco 等, 1991)。此外,还报道了一些革兰氏阴性细菌物种,例如致黄假单胞菌 (*Pseudomonas aureofaciens*) 产生 (Z)-4-羟基-4-甲基-2-(1-己烯基)-2-丁烯羟酸内酯和 (Z)-4-羟基甲基-2-(1-己烯基)-2-丁烯羟酸内酯。尽管微生物能够产生各种丁烯羟酸内酯化合物,但是尽我们所知,如下定义的根据式 (I) 的化合物尚未被报道由任何细菌或真菌物种产生。

[0005] 已经从短梗霉属物种的上清液中分离被称为金担子素的一系列抗真菌环状缩肽 (Ikai, Takesako 等 1991; Yoshikawa, Ikai 等 1993; In, Ishida 等 1999)。目前,金担子素是从短梗霉属分离的仅有的抗真菌化合物。在该化学家族中的所有化合物共有类似的环状缩肽结构。没有报道通过短梗霉属物种产生丁烯羟酸内酯。

[0006] 许多丁烯羟酸内酯和 γ -丁内酯显示非常强和令人愉悦的水果芳香 (Buttery 和 Ling, 1998)。已经报道椰子醛 (5-戊基-4,5-二氢-2(3H)-呋喃酮) 及其类似物如 5-丁基-4-甲基-4,5-二氢-2(3H)-呋喃酮 (威士忌内酯) 和 5-异丁基-3-甲基-4,5-二氢-2(3H)-呋喃酮发出类似于椰子的愉悦芳香 (Sinha 等, 2004)。然而,以前未报道过呋喃-2(5H)-酮化合物发出这种类型的芳香。对化合物 5-己基呋喃-2(5H)-酮香味或芳香的测试似乎并未记载。

[0007] 授予 Kanebo 有限公司 (Kanebo Ltd) 和 Soda 芳香剂有限公司 (SodaAromatic Co. Ltd.) 的日本专利号, 2005-35929 一般描述了包含 γ -内酯的抗真菌剂 (化合物 A):

[0008]



[0009] 其中烷基 R 代表 1-12 个碳的烷基,键 "a" 和 "b" 可以是单键或双键。Kanebo 要求保护一些活性抗真菌成分,然而除了一种之外的所有化合物都是饱和的丁烯羟酸内酯 (键 "a" 和 "b" 都是单键),该另一种化合物是 5-甲基-2(3H)-呋喃酮 (键 "a" 是单键和键 "b" 是双键)。在已经提及的化合物列表中提及另一种化合物,5-甲基呋

喃-2(5H)-酮(R是甲基,键" a" 是双键并且键" b" 是单键),但是没有关于该甲基-丁烯羟酸内酯化合物的抗真菌活性的数据。另外,也没有公开任何所述化合物具有抗氧化剂,细胞保护或抗炎活性。

[0010] 促进炎症病症并且引发先天免疫反应需要表达各种各样的重要的细胞因子,其中一种是 TNF- α 。核因子 κ B(NF- κ B) 是基础的可诱导转录因子之一,所述可诱导转录因子控制那些细胞因子基因的转录从而在哺乳动物先天免疫反应中具有关键作用(Herfarth, Brand 等 2000 ;Nichols, Fischer 等 2001)。与该作用一致,不正确的调节 NF- κ B 与癌症、自身免疫疾病、败血症性休克、病毒感染和不适合的免疫形成相关。因此, NF- κ B 涉及抗炎靶标的过程(Kim, Jeong 等 2005 ;Moussaieff, Shohami 等 2007)。此外,抑制剂 κ B 激酶 β (IKK β) 使 I κ B 蛋白磷酸化,导致它们的降解和随后通过 NF- κ B 导致基因表达激活(Karin 和 Delhase, 2000 ;Yamamoto, 等, 2000)。因此, IKK β 活性也涉及调节炎症反应。

[0011] 有很少的报道比较了各种小 γ -内酯化合物在哺乳动物细胞中对 NF- κ B 的诱导或抑制的作用。在一些复杂的内酯中,倍半萜烯内酯是有效的抗炎分子,已提出其作用模式是抑制 NF- κ B 的激活(Lyss, Knorre 等 1998 ;Koch, Klaas 等 2001),倍半萜烯内酯的 α -亚甲基- γ -内酯部分是抑制活性所必需的(Hall, Lee 等 1979) ;clastolactacystin β -内酯也可以抑制 NF- κ B 的翻译(Ding, Fischer 等 1998)。然而,布雷菲德菌素 A 可以激活 NF- κ B(Lin, Boller 等 1998)。尚没有报道基于式 A 的化合物的抗炎活性或对 NF- κ B 生物合成的任何作用。

[0012] 本发明的一个目的是提供具有细胞保护作用,如抗氧化剂或谷胱甘肽引发和 / 或抗真菌剂活性和 / 或抗炎剂活性的另外的丁烯羟酸内酯化合物。

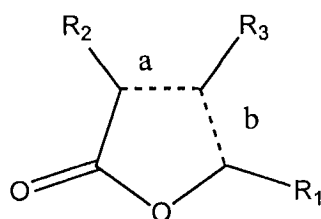
[0013] 本发明的另一个目的是提供具有愉悦味道和 / 或香味的所述化合物。

[0014] 本发明的另一个目的是从海洋短梗霉属物种(Aureobasidium sp.) 分离株中生产天然 γ -烷基丁烯羟酸内酯(包括其合乎需要的异构形式(例如 R 形式),如 5-烷基呋喃-2(5H)-酮)的方法。

[0015] 发明概述

[0016] 根据本发明的第一个方面,提供根据式 (I) 的化合物用于制备抗真菌剂、细胞保护剂和 / 或抗炎剂的应用,

[0017]



(I)

[0018] 其中,

[0019] R_1 是 C_1 - C_{40} 烷基,

[0020] R_2 和 R_3 独立地选自 H, 烷基, 烯基, 炔基, 芳基, 杂芳基, 羧基, 烷氧基羰基, 羟基, 氨基, 硝基, 烷氧基, 烷硫基, 甲酰基, 氰基, 氨基甲酰基, 卤素或酮, 虚线 a 和 b 独立地是单键或双键,但是不同时为双键。

[0021] 适合的细胞保护反应可以是这样的一种,其例如通过激活哺乳动物抗氧化剂应答元件(ARE)基因群能够诱导细胞内抗氧化剂如谷胱甘肽。适合的抗炎剂可以是这样一种,其能够抑制NF- κ B反应。

[0022] 备选地,提供根据式(I)的抗真菌细胞保护和/或抗炎化合物。

[0023] 本发明优选的式(I)的抗真菌化合物包括那些化合物,其中a是双键且R₁是C₆-C₂₈,优选地a C₆-C₂₀烷基。

[0024] 优选地R₂和/或R₃是H。

[0025] 许多主题化合物显示显著和独特的芳香和香味性质,其可视为另外的益处。

[0026] 根据本发明的第二个方面,提供根据上述式(I)的化合物,其用作芳香剂和/或增香剂。备选地,提供根据式(I)的芳香剂和/或增香剂。

[0027] 具体地,根据式(I)的化合物,其中R是正己基并具有旋光性 $[\alpha]_D^{20}-107.3(c=1.18, CHCl_3)$; {lit. $[\alpha]_D^{20}-84.1(c=1.01, CHCl_3)$ }¹,理想地显示椰子芳香和香味。

[0028] 本发明的申请人还已经鉴定了主题化合物可以备选地或另外显示细胞保护作用,如抗氧化剂和/或抗炎剂性质。

[0029] 本发明的化合物显示为环状结构。然而,不希望受理论束缚,活性形式可以是非环化形式。

[0030] 可以以组合物形式,单独地或与其他细胞保护剂、抗真菌剂和/或抗炎剂或其他活性成分或与载体一起提供所述式(I)化合物,这可以由本领域技术人员确定。

[0031] 式(I)的烷基R₁可以是支链或直链的,例如典型的支链烷基包括异丙基、异丁基、仲丁基、叔丁基、3-甲基丁基、3,3-二甲基丁基及其变体,包括其异构体。抗真菌化合物的优选烷基是直链。

[0032] 另外,R₁可以被选自下列的基团取代:烯基,炔基,芳基,杂芳基,羧基,烷氧基羰基,羟基,氨基,硝基,烷氧基,烷硫基,甲酰基,氰基,氨基甲酰基,卤素或酮。

[0033] 一般而言,本文指出的烷基和烯基可以是直链、支链或环状。炔基可以是直链或支链。

[0034] 卤素包括氟、氯、溴和碘。

[0035] 用作抗真菌剂,细胞保护剂(抗氧化剂),抗炎剂,抗微生物剂和/或香味剂/芳香剂的优选化合物是5-己基呋喃-2(5H)-酮,(也称为5-己基-5H-呋喃-2-酮或5-己基-2(5H)-呋喃酮)。该化合物在低浓度显示特别有效的抗真菌活性,例如1 μ g/ml或更低或3 μ g/ml或更低的最小抑制浓度(MIC),特别是针对白念珠菌(*Candida albicans*),卵圆糠秕孢子菌(*Pityrosporum ovale*)和糠秕马拉色氏菌(*Malassezia furfur*)。上述化合物在本文也显示是抗炎的和显示对NF- κ B的特别有效的抑制。

[0036] 可以被式(I)的主题化合物靶向的真菌包括毛癣菌属(*Trichophyton*)物种,如红色毛癣菌(*Trichophyton rubrum*),曲霉属(*Aspergillus*)物种,如烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*),念珠菌属(*Candida*)物种,如白念珠菌,糠秕孢子菌属(*Pityrosporum*)物种,如卵圆糠秕孢子菌和马拉色氏菌属(*Malassezia*)物种,如糠秕马拉色氏菌(*Malassezia furfur*)。主题化合物可以靶向其他真菌,如红色毛癣菌(*Trichophyton rubrum*)。

[0037] 要理解用于本发明的式(I)和(II)的化合物可以以取决于所述化合物使用目的浓度或剂量施用。具体地,当用在杀死真菌的方法中时,在针对靶真菌的组合物中的主题

化合物的量是少于或等于 100 μ g/ml, 如 50 μ g/ml, 优选地 1-20 μ g/ml, 最优选地 1-10 μ g/ml 例如 1-5 μ g/ml 的量级。

[0038] 要理解用于本发明的式 (I) 和 (II) 的化合物可以以各种立体异构形式存在, 并且如前文定义用于本发明的化合物包括所有的立体异构形式及其混合物, 包括对映体和外消旋混合物。本发明在其范围内包括任何所述立体异构形式或立体异构体的混合物的应用, 包括式 (I) 化合物的单独的对映体以及所述对映体的完全或部分外消旋混合物的应用。更优选的是在图 1a 中显示的形式的应用。

[0039] 海洋短梗霉属菌株 AQP1639, 分离自海洋沉积物, 当在富含碳水化合物而氮源有限的培养基中培养时产生根据式 (I) 和式 (II) 的抗真菌和抗氧化化合物。

[0040] 海洋短梗霉属物种 (*Aureobasidium* sp.) 菌株 AQP1639 由申请人在 2006 年 12 月, 根据布达佩斯条约, 保藏在 CABI 生物科学 UK 中心 (IMI) (CABI Bioscience UK Centre (IMI)), 并保藏号为 IMICC No. 394867。

[0041] 用于本发明的化合物可以使用本领域容易获得的试剂和技术、如合成有机化学方法和下面所述的那些来制备。

[0042] 可以用于批量生产主题化合物的示例性方法使用羟基化不饱和脂肪酸的内部环化。

[0043] 该环化可以使用分离的酶, 如酯酶实现。

[0044] 根据本发明的另一个方面, 提供制备根据本发明化合物的方法, 所述方法包括下列步骤:

[0045] i) 提供短梗霉属真菌, 并在适当的培养基中, 在适合于生产所述化合物或化合物前体的条件下培养适当的时期; 和

[0046] ii) 从得到的培养物中回收所述化合物。

[0047] 优选地, 所述短梗霉属物种是海洋物种。

[0048] 最优选的是根据布达佩斯条约于 2006 年 12 月 20 日保藏在 CABI 生物科学 UK 中心 IMI 的短梗霉属物种菌株, 其保藏号为 IMICC No. 394867, 或其具有产生所述主题化合物性质的突变体或变体。

[0049] 培养可以根据本领域技术人员可获得的任何适合方法进行并包括所述真菌物种的发酵。

[0050] 所述化合物的制备还可以使用获自短梗霉属物种的酶或酶的混合物实现, 其使能够进行化学反应从而形成最终的需要化合物, 任选地包括所需化合物的中间体。例如, 可以使用酶或酶的混合物进行环化反应从而形成最终的环化化合物, 所述酶例如酯酶。所述酶或酶的混合物可以用于形成中间体产物, 如非环化的化合物, 其通过进一步化学处理, 例如通过环化, 可以转化为最终的所需化合物。另外的化学处理的实例包括使中间体化合物与酸性和 / 或碱性条件接触, 例如通过使用无机酸或碱来进行。酸包括硫酸和盐酸。碱包括 I 族或 II 族金属氢氧化物, 例如氢氧化钠。

[0051] 产生的根据式 (I) 和 / 或 (II) 的化合物的量可以通过下述增加 / 优化: 培养短梗霉属物种并确定产生的化合物的水平, 随后改变培养条件并且重新测量化合物的水平。可以重复这种方法直到获得优化的条件。

[0052] 优化方法可以包括通过改变培养基中的碳氮比率来改变培养条件。

[0053] 优化方法包括使用富含一定量的碳、例如碳水化合物并且具有限制量的氮的培养基,从而获得高的碳氮比。这可以通过使用适合的生长底物实现,所述底物包含比氮成分更多量的碳水化合物,但是从所述底物中排除另外加入氮源如酵母提取物或蛋白胨。培养基的实例在 1L 海水中包含 24g 马铃薯葡萄糖基质。

[0054] 适合的碳氮比率包括 20 : 1,优选地 15 : 1,理想地 11 : 1。

[0055] 例如,淀粉源适合于提供碳水化合物,海水适合于提供限量的氮。一种合乎需要的方法包括在马铃薯葡萄糖琼脂中用天然海水预先培养适合长的时间,例如 2-3 周。在预先培养后,所述方法包括在海水中接种马铃薯葡萄糖培养液并培养适当长的时间,例如 3-4 周。

[0056] 回收所述主题化合物可能需要通过任何适合的溶剂,例如有机溶剂如乙酸乙酯等提取培养物上清液,随后使用例如无机碱如氢氧化钠,碱化提取物,所述碱可以作为水溶液提供。

[0057] 适合的 pH 条件范围在 9-11,例如 10-11。

[0058] 加入极性溶剂如醇,例如甲醇,随后用非极性溶剂,例如己烷提取,提供粗制的所需的产物,其可以接着使用技术人员可获得的技术如色谱法进一步纯化。

[0059] 本发明提供产生具有有用药用性质的天然丁烯羟酸内酯化合物的简单方法,所述药用性质包括,但不限于,抗微生物性质,抗氧化剂性质,抗炎,和 / 或抗癌性质。

[0060] 抗微生物包括抗真菌,抗细菌,和 / 或抗病毒,包括针对病原和非病原生物活性。优选地,抗微生物是指抗细菌。

[0061] 可以治疗的具体病况包括座疮、头皮屑、指甲真菌、癌症、炎性和自体免疫疾病,败血症性休克、病毒感染和不适当的免疫形成、应激、细胞因子、自由基、紫外线照射和细菌或病毒抗原突触可塑性、记忆和抗炎靶标,和调节针对感染的免疫反应。其它由白念珠菌 (*Candida albicans*),糠秕马拉色氏菌 (*Malassezia furfur*) 和红色毛癣菌 (*Trichophyton rubrum*) 导致的真菌病症也可以用本文所述的化合物处理。

[0062] 本发明还提供对本文所述的疾病、病理或病况的治疗或预防,包括向需要其的患者施用本文提出的化合物。

[0063] 所述患者典型地是动物,例如哺乳动物,尤其是人。

[0064] 主题化合物可以局部施用于患者,例如施用于皮肤。

[0065] 申请人发现,特别地,所述主题化合物对哺乳动物细胞,例如大鼠和人显示低毒性。

[0066] 申请人还发现主题化合物对大鼠和人细胞具有差别作用,提供差别细胞毒性效果,提示那些化合物在抗癌治疗中的有效性。

[0067] 所述化合物还可以用于化妆品和药用化妆品的应用,例如涉及个人护理,包括但不限于,皮肤抗老化,皮肤调节 / 平滑,改变皮肤色素沉着,如影响黑色素水平,例如用于皮肤变白,和皮肤以及头发护理。

[0068] 还提供作为食品添加剂、增香剂、防腐剂和营养添加剂的应用。

[0069] 对于根据本发明的应用,可以将化合物或生理可接受的盐、酯或本文所述的它们的其它生理功能衍生物作为药物制剂,包括化合物或其生理可接受的盐、酯或它们的其它生理功能衍生物,以及一种或多种药用载体和任选地其它治疗和 / 或预防成分。所述载体

必需是可接受的,即其与制剂的其它成分可相容并且对于其受体没有毒性。

[0070] 药物制剂包括适合于口服、局部(包括皮肤、颊和舌下)、直肠或肠胃外(包括皮下、皮内、肌内和静脉内)、鼻和肺施用,例如通过吸入的那些。如果适合,所述制剂可以方便地以分散的剂量单位存在并且可以通过药物领域中公知的任何方法制备。所有的方法包括使活性化合物与液体载体或细碎的固体载体或两者联合,并且接着如果需要使所述产品形成所需的制剂的步骤。

[0071] 其中载体是固体的适合于口服施用的药物制剂最优选地作为分别包含预定量的活性化合物的单位剂量制剂如丸剂、胶囊或片剂存在。可以通过压缩或模制,任选地用一种或多种辅助成分来制备片剂。压缩的片剂可以通过在适合的机器中压缩自由流动形式(如粉末或颗粒)的活性化合物进行制备,其任选地混合以粘合剂、润滑剂、惰性稀释剂、滑润剂、表面活性剂或分散剂。模制片剂可以通过用惰性液体稀释剂模制活性化合物来进行制备。片剂可以任选地进行包被,并且如果未包被的话,可以任选地被刻痕。胶囊可以通过填充活性化合物(单独或与一种或多种辅助成分一起混合)到胶囊壳中并接着将它们以通用方式密封来制备。扁囊剂类似于胶囊,其中活性化合物与任何辅助成分一起密封在米纸包膜中。可以将活性化合物配制为可分散的颗粒,其可以例如悬浮在水中之后进行施用,或在食物上喷洒。可以将颗粒包装在例如囊剂中。可以将其中载体是液体、适合于口服施用的制剂作为在水性或非水性液体中的溶液剂或混悬剂,或作为水包油液体乳剂存在。

[0072] 用于口服施用的制剂包括控制释放的剂型,例如片剂,其中将活性化合物在适当的释放-控制基质中配制,或用适合的释放-控制薄膜进行包被。所述制剂可以特别方便地用于预防使用。

[0073] 其中载体是固体的适合于直肠施用的药物制剂最优选地作为单位剂量栓剂存在。适合的载体包括可可脂和其他本领域常用的物质。所述栓剂可以方便地通过混合活性化合物与软化或熔融载体,随后冷却并在模具中成型来形成。

[0074] 适合于肠胃外施用的药物制剂包括活性化合物在水性或油性赋形剂中的无菌溶液或混悬液。

[0075] 可注射制剂可以适合于快速推注(bolus injection)或持续输注。所述制剂方便地在单位剂量或多剂量容器中存在,所述溶剂在引入制剂后即被封闭,直到需要使用。备选地,活性化合物可以以粉末形式存在,其在使用前与适合的赋形剂重构,所述赋形剂如无菌、无热原的水。

[0076] 还可以将活性化合物配制为长期作用的长效制剂,其可以通过肌肉注射或通过植入进行施用,例如通过皮下或肌肉施用。长效制剂可包括,例如适合的聚合或疏水物质,或离子交换树脂。所述长期作用的制剂特别方便用于预防应用。

[0077] 适合通过口腔进行肺施用的制剂是这样提供的从而使包含活性化合物和理想地具有 0.5 到 7 微米直径范围的颗粒在受者的支气管树中进行递送。

[0078] 作为一种可能性,所述制剂以精细研碎的粉末形式存在,其可以方便地以用于吸入装置的可穿通的胶囊形式存在,其适合地是例如明胶胶囊,或备选地作为自推进的制剂存在,其包含活性化合物,适合的液体或气体推进剂和任选地其它成分,如表面活性剂和/或固体稀释剂。适合的液体推进剂包括丙烷和含氯氟烃,并且适合的气体推进剂包括二氧化碳。也可以使用自推进制剂,其中活性化合物以溶液或混悬液的小滴形式分散。

[0079] 所述自推进的制剂类似于本领域已知的那些并且可以通过建立的方法进行制备。适当地,它们在这样的容器中存在,所述容器配备有手动操作或自动操作的具有需要的喷雾特征的阀门;有利地,所述阀是计量类型的,其在每次操作时,递送固定的体积例如 25-100 微升。

[0080] 作为另一种可能性,活性化合物可以以溶液或混悬液形式存在以用于雾化器或雾化吸入器,其中将加速的气流或超声搅拌用于产生用于吸入的微细的液滴薄雾。

[0081] 适合鼻施用的制剂包括通常类似于上述用于肺施用的那些的制剂。当分散时,所述制剂应该理想地具有范围在 10-200 微米的直径的颗粒从而能够在鼻腔中停留;如果适合,这可以通过使用适合颗粒大小的粉末或选择适合阀门来实现。其它适合的制剂包括粒径在 20-500 微米范围内的颗粒的粗粉末和在水性或油性溶液或混悬液中包含 0.2-5% w/v 的活性化合物的滴鼻剂,所述粗粉末用于从与鼻接近放置的容器通过鼻通道的快速吸入进行施用。

[0082] 应该理解除了前述载体成分之外,上述药物制剂可以包括适合的一种或多种另外的载体成分如稀释剂、缓冲剂、增香剂、粘合剂、表面活性剂、增稠剂、润滑剂、防腐剂(包括抗氧化剂)等,和用于使制剂与预定受体的血液等渗的目的而包含的物质。

[0083] 药用载体是本领域技术人员周知的,其包括,但不限于 0.1M 和优选地 0.05M 磷酸盐缓冲液或 0.8% 的盐水。另外,所述药用载体可以是水性或非水性溶液,混悬液和乳剂。非水性溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油和可注射的有机酯如油酸乙酯。水性载体包括水、醇/水溶液、乳剂或混悬液,包括盐水和缓冲介质。肠胃外赋形剂包括氯化钠溶液、复方氯化钠葡萄糖、葡萄糖和氯化钠,乳酸林格氏或固定油。还可以存在防腐剂和其添加剂,如例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂、惰性气体等。

[0084] 可以提供适合于局部制剂的制剂,其例如作为凝胶、乳膏或软膏剂存在。例如,可以将所述制剂应用于伤口或溃疡,直接分散在伤口或溃疡的表面上或携带在适合的支持物如绷带、纱布、网状物上,其可以应用于并且在待处理的区域上。

[0085] 还可以提供液体或粉末制剂,其可以直接喷雾或喷洒在待处理的部位,例如伤口或溃疡上。备选地,可以用制剂喷雾或喷洒载体如绷带、纱布、网状物等,接着将其应用到待处理的部位。

[0086] 用于兽医应用的治疗制剂可以方便地以粉末或液体浓缩形式存在。根据标准的兽医制剂实践,可以将常规水溶性赋形剂,如乳糖或蔗糖结合到粉末中从而改善它们的物理性质。因此,本发明特别适合的粉末包含 50 到 100% w/w 和优选地 60 到 80% w/w 的活性成分和 0 到 50% w/w 和优选地 20 到 40% w/w 的常规兽医用赋形剂。可以将这些粉末例如通过中间体预先混合的方式来加入动物饲料,或在动物饮水中稀释。

[0087] 本发明的液体浓缩物适当地包含化合物或其衍生物或盐,并且可以任选地包含兽医用水混溶性溶剂,例如聚乙二醇、丙二醇、甘油、甘油甲缩醛或与至多 30% v/v 的乙醇混合的所述溶剂。可以将液体浓缩物施用于动物的饮用水。

[0088] 可以根据本领域技术人员获得的方法提供用于个人护理和药物化妆品应用的制剂。例如,所述活性化合物可以在这样的制剂中用于局部应用,所述制剂如皮肤乳剂(例如面霜(facial cremes)),洗剂(例如,洗面剂(facial washes)),染发水(rinse),洗发剂,调理剂,染发剂,润发油(pomades),摩丝等。化合物的气味添加剂、防腐剂或抗氧化剂作用

提供对于这些应用的特别的适应性。技术人员能够提供根据所述应用的所述制剂的余下成分。例如,典型的成分可以包括水、醇、湿润剂、表面活性剂、油、蜡、胶凝剂、着色剂等。

[0089] 另外的应用包括单独地或包含在制剂中作为食品添加剂提供活性化合物从而给食品和 / 或饮料提供抗氧化性质、抗腐败、防腐和 / 或香味。所述活性化合物还可以以适合的形式,例如片剂形式,作为营养添加剂进行提供。

[0090] 有用地,本文所述的化合物可以作为用于制备另外的化合物的中间体或底物提供,所述另外的化合物特别是生物活性化合物,如具有上述性质的那些,特别地用于个人护理、化妆品、食品和营养应用的那些。

[0091] 现在,参考下列非限制性实施例和附图描述本发明。

[0092] 附图简述

[0093] 图 1 是 5-己基呋喃-2(5H)-酮(称为 P1639C)的化学结构;

[0094] 图 1a 显示 5-己基呋喃-2(5H)-酮(称为 P1639C)的旋光性;

[0095] 图 2a 是图表,其显示由 tBHQ 对 ARE-驱动的萤光素酶活性的激发;

[0096] 图 2b 是图表,其显示由 5-己基呋喃-2(5H)-酮(P1639C)对 ARE-驱动的萤光素酶活性的激发;

[0097] 图 2c 是图表,其显示 4-癸内酯(decanolide)对 ARE-驱动的萤光素酶活性的激发;

[0098] 图 2d 是图表,其显示 2(5H)-呋喃酮对 ARE-驱动的萤光素酶活性的激发;

[0099] 图 3a 显示化合物 P1639C 的 COSY nmr 关联;

[0100] 图 3b 显示化合物 P1639C 的 HMBC nmr 关联;

[0101] 图 4a 显示化合物 P1639C 的质子-NMR 光谱;

[0102] 图 4b 显示化合物 P1639C 的 ^{13}C -NMR 光谱;

[0103] 图 5 是由化合物 P1639C 的 LR 质谱测定法得到的图表;

[0104] 图 6a-c 是使用体外人肝细胞模型进行毒性测定得到的三张图表,其中将人肝细胞暴露于不同浓度的化合物 P1639C(图 6c)以及他莫昔芬(图 6a)和氯丙嗪(图 6b)达 3 小时。

[0105] 图 7a&b 是使用体外哺乳动物细胞模型显示化合物 P-1639 抑制 NF- κ B 抗炎活性的能力的两张图表。将细胞暴露于各种浓度的 P1639C 以及 P1639C 的化学类似物。

[0106] 图 7a 是各种浓度的 p1639C 的抗炎活性和细胞毒性。所述抗炎测定法使用 NF- κ B 活性的抑制进行检验。p1639C 的抗炎活性显示显著的剂量依赖性反应。0.5mM 浓度的 p1639C 可以几乎完全抑制 NF- κ B 介导的炎性反应,并且 0.02mM 可以抑制 50%。此外,针对测试细胞没有观察到显著的细胞毒性。仅细胞:没有炎性激发;TNF- α :炎症由 TNF- α 激发并将其用作 100%炎性反应(阴性对照);SEAP:已知的炎性反应增强剂;Bay-11:用作阳性对照的已知抗炎剂。

[0107] 图 7b. 比较 p1639C 和具有类似结构的其它已知的丁烯羟酸内酯的 NF- κ B 抑制活性。所述结果显示 p1639C 是其中仅有的活性化合物。所有的测试丁烯羟酸内酯并未显示显著的细胞毒性。所有已知的测试丁烯羟酸内酯也是 0.05mM 的浓度。

[0108] 图 8a-d 显示已知的抗氧化剂叔丁基氢醌(tBHQ, a), p1639C(5-己基-2(5H)-呋喃酮, b), 4-癸内酯(5-己基-2(3H)-呋喃酮, c) 和 2(5H)-呋喃酮(d) 的抗氧化剂激发作

用。

[0109] 图 9 显示在存在不同浓度的抗坏血酸或 p1639C 化合物时,关于甲萘醌和连苯三酚的电子顺磁共振 (EPR) 信号形成的时程。

[0110] 发明详述

实施例

[0111] 为了举例说明本发明而给出下面的实施例,所述实施例不应该被视为限制本发明的范围。

[0112] I. 产生天然 R 异构体 γ -烷基丁烯羟酸内酯

[0113] 用于生产 γ -烷基丁烯羟酸内酯的优选方法包括在用天然海水制备的富含碳水化合物培养基 (例如,在 1L 天然海水中 24g 马铃薯葡萄糖培养基) 培养海洋短梗霉属物种 (*Aureobasidium* sp.) 菌株 AQP 1639。用 AQP 1639 生产 γ -烷基丁烯羟酸内酯还需要搅动的浮游生物混悬液培养,伴随充足的氧供应,以及对来源于粗制天然产物的乙酸乙酯提取物的碱化作用。在非优化培养条件下产生的 γ -烷基丁烯羟酸内酯,5-己基呋喃-2(5H)-酮 (称为 P1639C;图 1) 的产率是约 10 ~ 15mg/L。

[0114] 将 AQP1639 在用天然海水制备的马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA, Oxoid) 中预先培养。在制备平板之前,将生长培养基在 121°C 高压灭菌 15 分钟。将 AQP1639 接种在 PDA 海水平板上,并将其培养 2-3 周直到深色节分生孢子变得明显。将预先培养的菌落用于接种马铃薯葡萄糖培养液 (PDB, Oxoid),所述培养液也使用来源于相同来源的天然海水进行制备,随后将其在 220rpm 的速度,在 30°C 摇瓶培养 20 天。进行培养直到在烧瓶壁的气 / 液界面形成可见的黑色的生物膜,其通常要经过 3-4 周的时间。在该阶段在气 / 液界面可见深色的油。将显示抗微生物活性的培养上清液的乙酸乙酯提取物进行干燥并使用在室温的 0.5M NaOH 水溶液进行碱化 (20°C ~ 24°C),直到油样物质完全溶解在水中。接着,将 MeOH 加入碱化溶液并充分混合,随后进行己烷提取。接着,将己烷提取物完全蒸发,并再次在 2ml 己烷中重构。接着,将己烷重构物加载到二氧化硅 Sep-Pak® 柱上从而使用 100% 己烷,90% 己烷:10% EtOAc 和 80% 己烷:20% EtOAc 进行抗真菌活性指导的分级分离。合并活性级分并将其在 EtOAc 中重构,接着进一步使用 C18-HPLC 和等度 70% MeOH:30% H₂O 进行纯化。合并活性级分并使用 NMR 光谱学和质谱测定法表征所述结构。

[0115] II. P1639C 的表征

[0116] P1639C 显示 m/z 191.2 ($M+Na$)⁺ 的 LRMS。仔细分析 NMR 数据 (表 2),显示 C₉H₁₄O₂ 的分子式。不饱和数为 3 提示在系统中存在一个环。将 COSY 和 HMBC 关联 (图 3),产生已知的丁烯羟酸内酯型,5-己基呋喃-2(5H)-酮 (Mukku, 2000) 化合物。该化合物产生类似于可可油的愉悦芳香,并且是已知的 2,6-二甲基-5-氧代-庚酸的类似物,所述 2,6-二甲基-5-氧代-庚酸是一种在食物、醇饮料、香水和药品中广泛应用的香料 (Sinha, 2004)。使用 PerkinElmer, 343 型偏光计在 589nm 记录旋光性测量。

[0117] 表 1. 关于 P1639C 在 400MHz 的 ¹H-NMR 和在 CDCl₃ 中在 100MHz 的 ¹³C

[0118]

C #	¹³ C mult	¹ H δ/ppm, mult, J (Hz)	COSY	HMBC
1	164.78 (s)			H-2, H-3,
2	121.6 (d)	5.96 (1H, 9.6, 2.4)	H-3	H-4
3	145.2 (d)	6.83 (1H, 10.0, 0.4)	H-2, H-5	H-2, H-4, H-5
4	78.2 (d)	4.38 (1H, m)	H-5, H-6A, H6B	
5	29.6 (d)	2.29 (2H, m)		
6	35.0 (t)	A: 1.75 (1H, m)	H-6B, H-4	H-3, H-5, H-7A, H-7B
		B: 1.60 (1H, m)	H-6A, H-4	
7	24.7 (t)	A: 1.75 (1H, m)	H-7B	H-4
		B: 1.60 (1H, m)	H-7A	
8	31.7 (t)	1.27 (2H, m)		H-9, H-7A, H-7B
9	22.7 (t)	1.27 (2H, m)	H-8, H-10	H-10
10	24.2 (q)	0.85 (3H, t, 7.2, 6.8)	H-9	H-8, H-7A, H-7B

[0119] III. 抗氧化剂激发测定法 (A. R. E)

[0120] 使用抗氧化剂报道细胞系进行抗氧化剂测定法,从而确定 P1639C 是否上调保护性抗氧化剂基因群,所述保护性抗氧化剂基因群在抗氧化剂应答元件 (ARE) 的控制下。将细胞系 ARE32 用 8 个浓度的 P1639C 和阳性对照叔丁基氢醌 (tBHQ) 温育 24 小时,并测量萤光素酶活性 (萤光素酶测定系统 (Luciferase Assay System), Promega)。与没有任何氧化诱导的正常细胞相比, P1639C 增强 ARE- 驱动的萤光素酶活性的诱导高达 18 倍 (在 30 μM 的浓度下) (图 2b)。因此,由 AQP1639 产生的丁烯羟酸内酯 P1639C 显示有效的抗氧化剂激发活性。

[0121] 还在 p1639C (5- 己基 -2 (5H) - 呋喃酮), 4- 癸内酯 (5- 己基 -2 (3H) - 呋喃酮) 和 2 (5H) - 呋喃酮之间进行 ARE 比较。如在图 8 中所显示,化合物 p1639C 显示:用 30 μM 的 p1639C 处理使 ARE- 驱动基因表达的激发高达 18 倍。然而,使用 ARE- 驱动基因表达方法,4- 癸内酯或 2 (5H) - 呋喃酮并没有显示显著的抗氧化剂激发作用。

[0122] 进行另外的抗氧化剂测定法:

[0123] 竞争性 EPR 抗氧化剂测定法

[0124] 该测定法的基础是评估不同浓度的 (100-2000 μM) 测试化合物与标准浓度的自旋阱 (spin trap) (tempone-H; 50 μM) 竞争羟基或超氧化物自由基的能力。就我们所知,这是首次区分对于不同的以氧为中心的自由基 (oxygen-centred radical) 的清除能力的测定法。

[0125] 在缺乏抗氧化剂时, tempone-H 与以氧为中心的自由基反应从而以一个速率产

生自旋信号,所述速率通过产生自由基的化合物(对于 $\cdot\text{OH}$ 是甲萘醌和对于超氧化物是连苯三酚)的浓度进行确定。包含具有等价速率常数的抗氧化剂来与 OH 或超氧化物反应(其与 tempone-H 的浓度相同($50\text{ }\mu\text{M}$)),将有效竞争自由基并在给定时间点减少信号达 $\sim 50\%$ 。通过监测多种不同浓度的测试化合物针对固定浓度的 tempone-H 的作用,可以建立浓度-作用曲线,从所述曲线可以推导出对于每种测试化合物的 IC_{50} (减少对照的 50% 的信号所需要的浓度)。接着可以将测试化合物与已知试剂(在该情形中是抗坏血酸)进行比较并且可以根据对于每种目的自由基($\cdot\text{OH}$ 和 O_2^-)的清除能力进行分级。 IC_{50} 越低,抗氧化剂越有效。

[0126] 结果

[0127] 与甲萘醌($150\text{ }\mu\text{M}$; OH 发生剂)或连苯三酚($150\text{ }\mu\text{M}$ O_2^- 发生剂)一起温育(60 分钟, 37°C) tempone-H($50\text{ }\mu\text{M}$), 导致 EPR 信号的时间依赖性增加(图 1a 和 b)。在温育混合物中包含抗坏血酸($50\text{--}300\text{ }\mu\text{M}$) 导致信号形成的浓度依赖性减少(图 1); 计算曲线下面积 50% 的减少, 针对 $\cdot\text{OH}$ 是 $\sim 70\text{ }\mu\text{M}$ (IC_{50}), 针对 O_2^- 是 $130\text{ }\mu\text{M}$ 。用测试化合物 p 1639C 进行的等价实验导致 EPR 信号的较缓慢的减少(对于 $\cdot\text{OH}$ 实验计算的 IC_{50} 为 $\sim 900\text{ }\mu\text{M}$, 而对于 O_2^- 是 $\sim 725\text{ }\mu\text{M}$)。

[0128] 解释

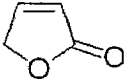
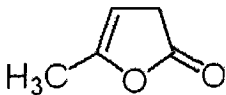
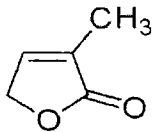
[0129] 化合物 p 1639C 针对 $\cdot\text{OH}$ 和 O_2^- 两者具有直接的抗氧化剂作用(到类似的程度)。该试剂的效力低于抗坏血酸针对两种自由基种类的效力(~ 1 个数量级)。

[0130] IV. 抗真菌活性测定

[0131] 将白念珠菌(*Candida albicans*)和糠秕马拉色氏菌(*Malassezia furfur*)用于进行在包含 0.2% 酵母提取物的马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基中的抗真菌测定法。记录最小抑制浓度(MIC)(表 1)。

[0132] 表 1. 比较 P1639C 与一些丁烯羟酸内酯的抗微生物活性

[0133]

	R-基团	双键	白念珠菌 (μg)	糠秕马拉 色氏菌 (μg)	MRSA (μg)
2(5H)-呋喃酮 	C0	C _{2,3}	>10	>10	>20
5-甲基-2(3H)-呋喃酮 (α -当归内酯, C1) 	C1	C _{3,4}	5-7	5-7	>20
5-甲基-2(5H)-呋喃酮 (C1) 	C1	C _{2,3}	5-7	5-7	>20
3-甲基-2(5H)-呋喃酮 	C1	C _{2,3}	5-7	5-6	>20
P1639C 	C6	C _{2,3}	1-1.5	<1	>10

[0134] P1639C 显示针对白念珠的抗真菌活性, MIC 为 $1-1.5 \mu\text{g/ml}$; 显示针对糠秕马拉色氏菌的抗真菌活性, MIC 为 $0.8 \mu\text{g/ml}$ 。使用各种丁烯羟酸内酯化合物比较抗真菌活性显示: γ 侧链的长度对抗真菌活性具有显著影响。结果显示, 侧链越长, 其具有的抗真菌活性越好。然而, 考虑到内酯化合物的水溶性, 具有 C5 和 C8 之间碳数目的 γ 侧链是优选的。关于抗真菌活性, 在 C2 和 C3 之间或 C3 和 C4 之间的双键并未显示对于活性具有显著影响。

[0135] V. 抗炎测定法

[0136] 基于 NF κ B 表达和 IKK β 活性进行抗炎测定法。使用 PRINCESS® NINANF κ B 测定试剂盒测试 NF κ B 表达。将 P1639C 和其它的相关内酯化合物补充到哺乳动物细胞培养物中, 其中用 TNF- α 刺激 NF κ B。该测定法还与体外细胞毒性测定法联用。使用 5-20mU 的 IKK β 测试 IKK β , 将其在 50mM Tris (pH7.5), 0.1mM EGTA, 1mg/ml BSA, 0.1%, β -巯基乙醇中进行稀释。以包含 50mM Tris (pH7.5), 0.1mM EGTA, 0.1%, β -巯基乙醇, 300 μM 底物肽,

10mM 硬脂酸镁和 0.005mM[33P-g-ATP] (500-1000cpm/pmol) 的最终体积 25.5 μ l, 针对底物肽 (LDDRHDSGLDSMKDEEY) 测定所述激酶, 并且将其在室温温育 30 分钟。通过加入 5 μ l 的 0.5M(3%) 正磷酸终止测定。在 p81 滤板上收集磷酸化的肽并通过闪烁计数测量磷酸化水平。

[0137] 将 P1639C 以 0.001mM, 0.002mM, 0.005mM, 0.01mM, 0.02mM, 0.05mM, 0.1mM, 0.2mM 和 0.5mM 的一系列浓度补充到哺乳动物细胞培养物中。将提供在 Princess NINA 试剂盒中的 SEAP 用作刺激对照从而显示细胞中的正常炎性反应, 而将 5 μ M 最终浓度的 BAY11-7082 用作抑制 NF- κ B 活性的阳性对照。将具有 TNF- α 的细胞用作阴性对照。在加入灭活缓冲液和 MUP 溶液后, 通过 450nm 发射 (360nm 激发) 测量对补充的化合物的细胞反应。

[0138] 通过用刃天青温育细胞并针对上述 650nm 的参考测量值测定在 600nm 的吸光度来进行细胞的生存力测定。

[0139] 还检验与 p1639C 共有类似结构的内酯化合物的抗炎活性。在这些内酯之间比较具有侧链长度的单键和双键 (图 7a&b)。此外, 当存在 50 μ M P1639C 时, IKK β 磷酸化活性降低到 64% $\pm$ 2%, 这支持 P1639C 的抗炎活性。

[0140] VI. 毒理学研究

[0141] 使用体外人肝细胞模型进行毒理学测定, 其中使人肝细胞与不同浓度的化合物 P1639C 以及他莫昔芬和氯丙嗪接触 3 小时。将细胞内 ATP 的消耗率用作测量由每种化合物观察的毒性水平的参数。他莫昔芬和氯丙嗪都激发细胞内 ATP 水平的适度的减少率, 这提示毒性的适度水平。然而, 在接触化合物 P1639C 后, 在人肝细胞中并未观察到显著的 ATP 消耗, 这提示化合物在人肝细胞中具有低毒性 (图 6a-c)。

[0142] 因此, 本申请人已经发现, 特别地来自 AQP1639 培养上清液的乙酸乙酯提取物的碱化作用产生了一系列的 γ -烷基丁烯酸内酯, 具体地, 有效的抗真菌化合物 5-己基咪喃-2(5H)-酮, 其还具有强烈的椰子芳香, 和强烈的抗氧化作用, 并且在人肝细胞毒性模型中具有低毒性。

[0143] 参考文献

[0144] Braun, D., N. Pauli, 等. (1995). " New butenolides from the photoconductivity screening of *Streptomyces antibioticus* (Waksman and Woodruff) (来自链霉菌抗生素光电导性筛选的新的丁烯酸内酯) Waksman 和 Henrici 1948. " FEMS Microbiol Lett (FEMS 微生物通信) 126(1) :37-42。

[0145] Buttery, R. G. and L. C. Ling (1998). " Additional studies on flavor components of corn Tortilla chips. (对玉米玉蜀黍饼片的香味成分的另外的研究) " J. Agric. Food Chem. (农业食品化学杂志) 46(7) :2764-69。

[0146] Ding, G. J., P. A. Fischer, 等. (1998). " Characterization and quantitation of NF-kappaB nuclear translocation induced by interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha. Development and use of a high capacity fluorescence cytometric system. (由白介素-1 和肿瘤坏死因子- α 诱导的 NF- κ B 核易位的表征和量化。高容量荧光血细胞计数系统的发展和应用) " J Biol Chem (生物化学杂志) 273(44) :28897-905。

[0147] Franco, C. M., U. P. Borde, 等. (1991). " Butalactin, a new butanolide antibiotic. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activity.

(Butalactin, 一种新的丁烯羟酸内酯抗生素。分类、发酵、分离和生物学活性) " J Antibiot(Tokyo) (抗生素杂志 (东京))44(2) :225-31。

[0148] Hall, I. H., K. H. Lee, 等 . (1979). " Anti-inflammatory activity of sesquiterpene lactones and related compounds. (倍半萜烯内酯和相关化合物的抗炎活性) " J Pharm Sci (药物科学杂志)68(5) :537-42。

[0149] Herfarth, H., K. Brand, 等 . (2000). " Nuclear factor-kappa B activity and intestinal inflammation in dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice is suppressed by gliotoxin. (胶霉毒素抑制小鼠中糖酐酯钠 (DSS) 诱导的大肠炎中的核因子 -KB 活性和肠炎症) " Clin Exp Immunol 120(1) :59-65。

[0150] Ikai, K., K. Takesako, 等 . (1991). " Structure of aureobasidin A. (金担子素 A 的结构) " J Antibiot(Tokyo) (抗生素杂志 (东京))44(9) :925-33。

[0151] In, Y., T. Ishida, 等 . (1999). " Unique molecular conformation of aureobasidin A, a highly amide N-methylated cyclic depsipeptide with potent antifungal activity: X-ray crystal structure and molecular modeling studies. (金担子素 A 的独特分子构象, 具有有效抗真菌活性的高度酰胺 N- 甲基化环状羧肽 :X- 射线晶体结构和分子建模研究) " J Pept Res (肽研究杂志)53(5) :492-500。

[0152] Karin, M. 和 M. Delhase (2000). The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B : key elements of proinflammatory signalling (I KB 激酶 (IKK) 和 NF-KB : 促炎性信号传导的关键元件) Semin Immunol 12(1) :85-98。

[0153] Kato, J. Y., N. Funa, 等 . (2007). " Biosynthesis of {gamma}-butyrolactone autoregulators that switch on secondary metabolism and morphological development in Streptomyces (打开链霉菌中次级代谢和形态学发展的 γ - 丁内酯自动调节剂的生物合成). " Proc Natl Acad Sci USA (美国国家科学院院报)104(7) :2378-83。

[0154] Kim, S. J., H. J. Jeong, 等 . (2005). " Anti-inflammatory activity of gumiganghwaltang through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in peritoneal macrophages. (通过抑制腹膜巨噬细胞中核因子 -KB 激活的 gumiganghwaltang 的抗炎活性) " Biol Pharm Bull 28(2) :233-7。

[0155] Koch, E., C. A. Klaas, 等 . (2001). " Inhibition of inflammatory cytokine production and lymphocyte proliferation by structurally different sesquiterpene lactones correlates with their effect on activation of NF-kappa B. (通过结构不同的倍半萜烯内酯抑制炎性细胞因子产生和淋巴细胞增殖与它们对 NF-KB 激活的作用相关) " Biochem Pharmacol 62(6) :795-801。

[0156] Lin, Z. P., Y. C. Boller, 等 . (1998). " Prevention of brefeldin A-induced resistance to teniposide by the proteasome inhibitor MG-132 : involvement of NF-kappa B activation in drug resistance. (通过蛋白酶体抑制剂 MG-132 预防布雷菲德菌素 A- 诱导的对替尼泊苷的抗性 : 涉及 NF-KB 在药物抗性中的激活) " Cancer Res (癌症研究)58(14) :3059-65。

[0157] Lyss, G., A. Knorre, 等 . (1998). " The anti-inflammatory sesquiterpene

lactonehelenalin inhibits the transcription factor NF-kappaB by directlytargeting p65. (抗炎倍半萜烯内酯堆心菊脑通过直接靶向 p65. 抑制转录因子 NF-K B) " J Biol Chem (生物化学杂志) 273(50) :33508-16。

[0158] Moussaieff, A., E. Shohami, 等 . (2007). " Incensole Acetate, a Novelanti-inflammatory compound Isolated from Boswellia Resin, InhibitsNuclear Factor(NF)-kappa B Activation. (Incensole Acetate, 一种从 Boswellia 树脂分离的新的抗炎化合物, 抑制核因子 (NF)-KB 激活) " Mol Pharmacol。

[0159] Nichols, T. C., T. H. Fischer, 等 . (2001). " Role of nuclear factor-kappa B(NF-kappa B) in inflammation, periodontitis, and atherogenesis. (核因子 -KB 在炎症、牙周炎和动脉粥样硬化生成中的作用) " Ann Periodontol 6(1) :20-9.

[0160] Rouseff, R. L., M. M. Leahy, 等 . (1995). Fruit flavors: biogenesis, characterization, and authentication(水果香料: 生物发生、表征和鉴定). Washington, DC, American Chemical Society(美国化学协会)。

[0161] Takano, E., T. Nihira, 等 . (2000). " Purification and structural determination of SCB1, a gamma-butyrolactone that elicits antibiotic production in Streptomyces coelicolor(在天蓝色链霉菌中激发抗生素产生的 SCB1, 一种 γ -丁内酯的纯化和结构确定) A3(2). " J Biol Chem(生物化学杂志) 275(15) :11010-6.

[0162] Yamamoto, Y., M. J. Yin, 等 . (2000). IkappaB kinase alpha(IKKalpha) regulation of IKKbeta kinase activity(IKB 激酶 α (IKKalpha) 调节 IKK β 激酶活性). Mol Cell Biol(分子细胞生物学) 20(10) :3655-66。

[0163] Yoshikawa, Y., K. Ikai, 等 . (1993). " Isolation, structures, and antifungalactivities of new aureobasidins. (新的金担子素的分离、结构和抗真菌活性) " J Antibiot(Tokyo)(抗生素杂志(东京)) 46(9) :1347-54。

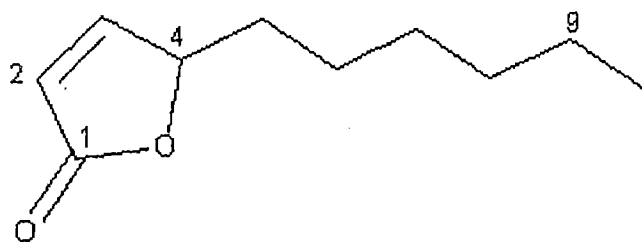


图 1

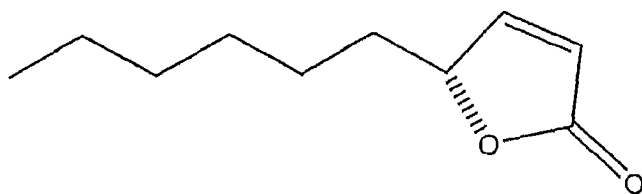


图 1a

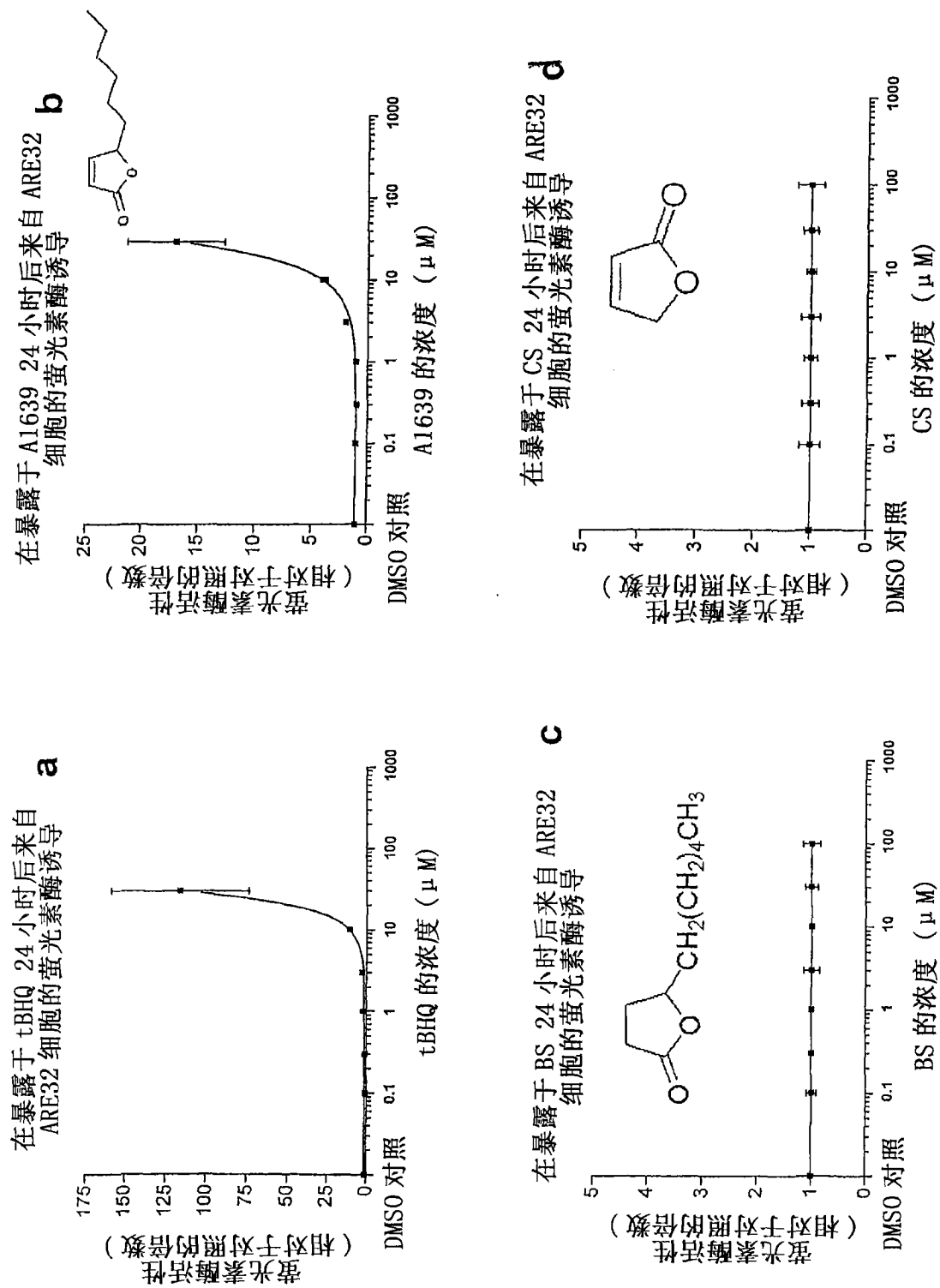


图 2

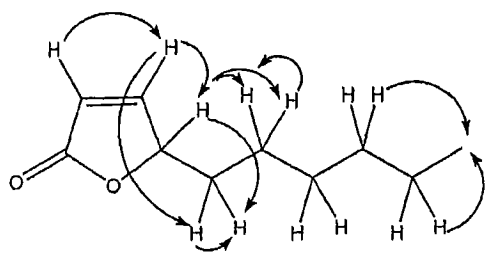


图 3a

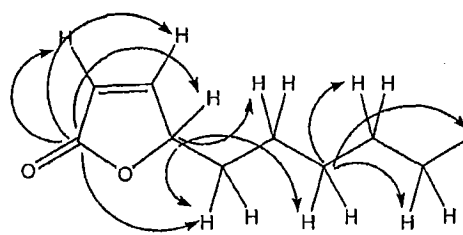


图 3b

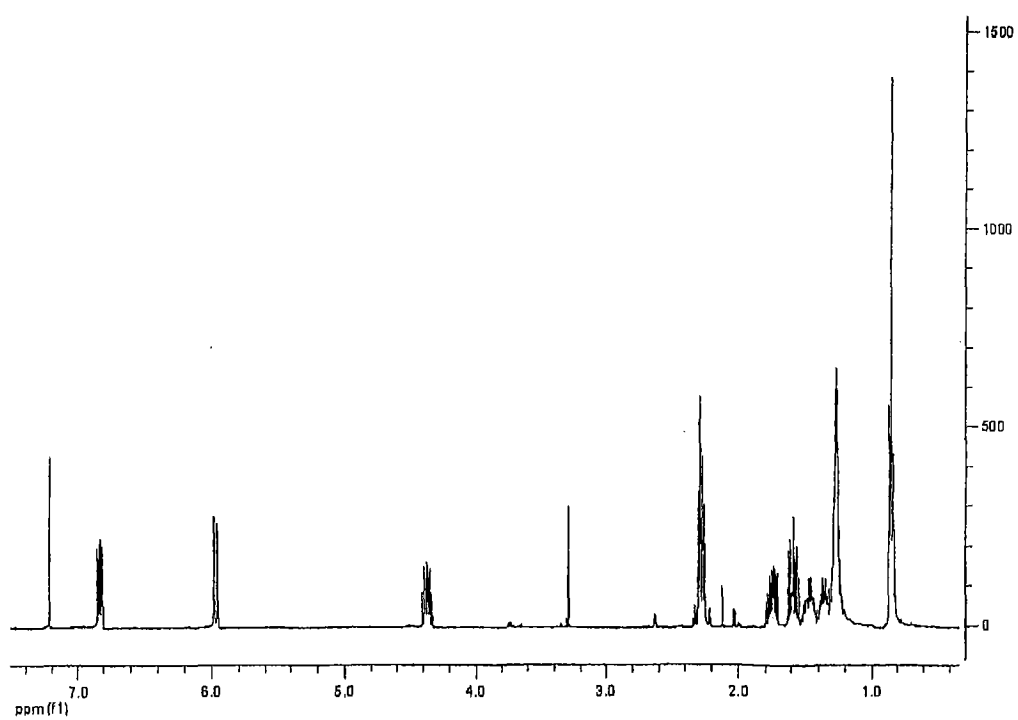


图 4a

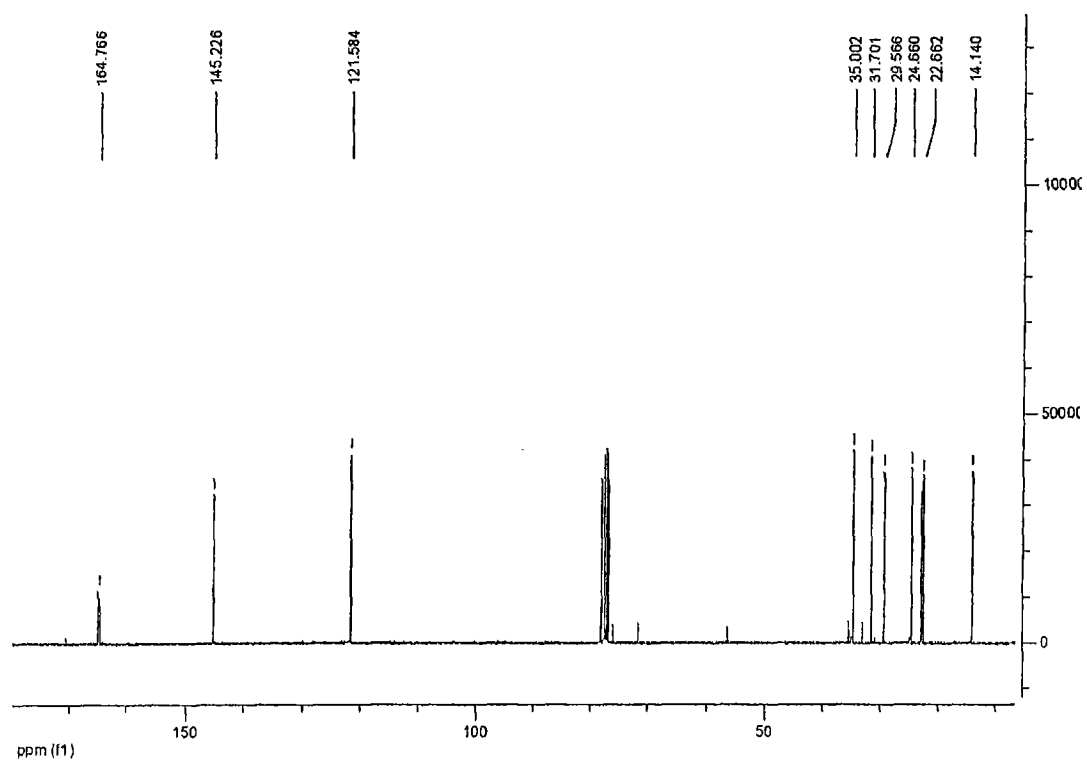


图 4b

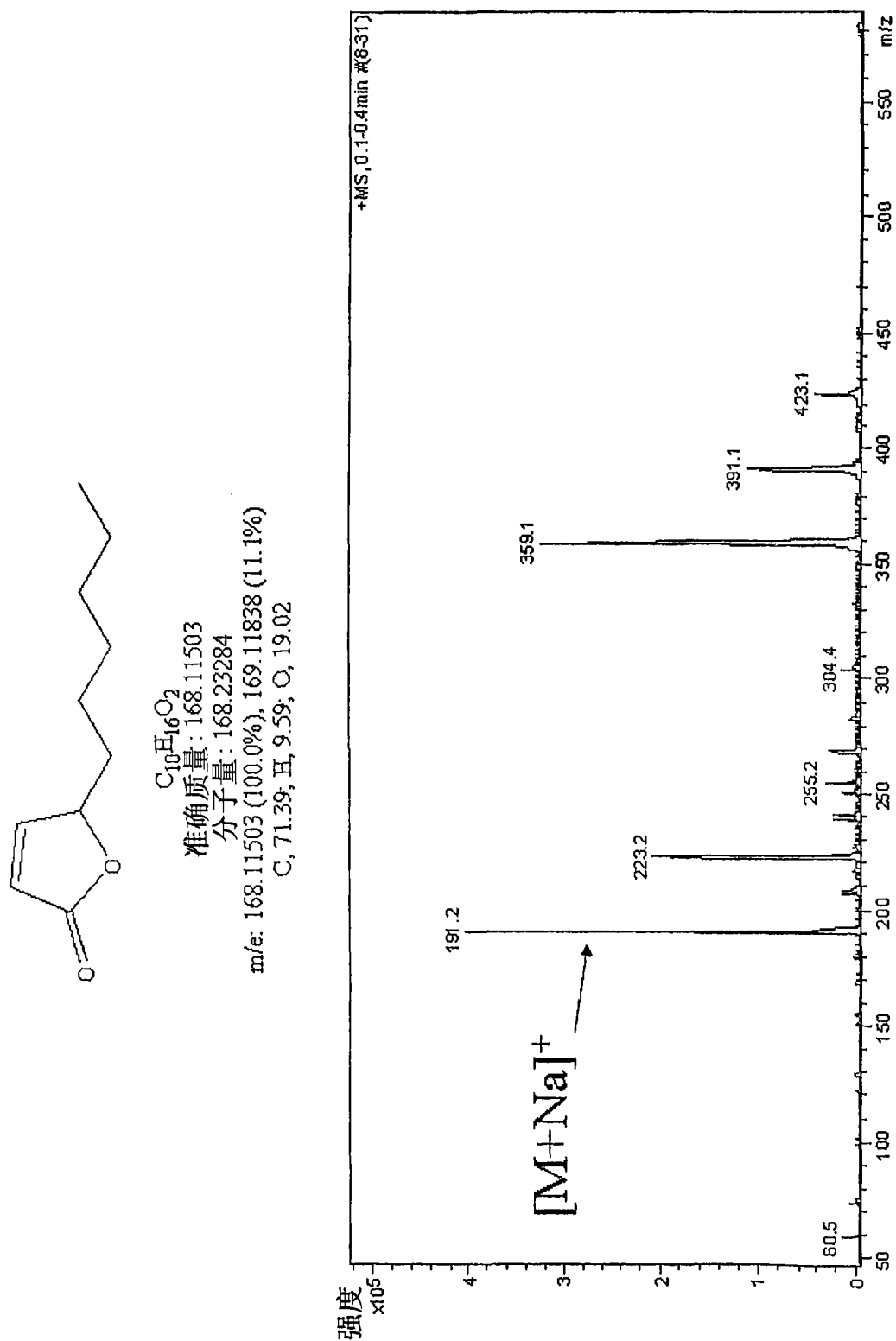


图 5

CXR0504: 在暴露于他莫西芬 3 小时后来自人肝细胞的 ATP 消耗

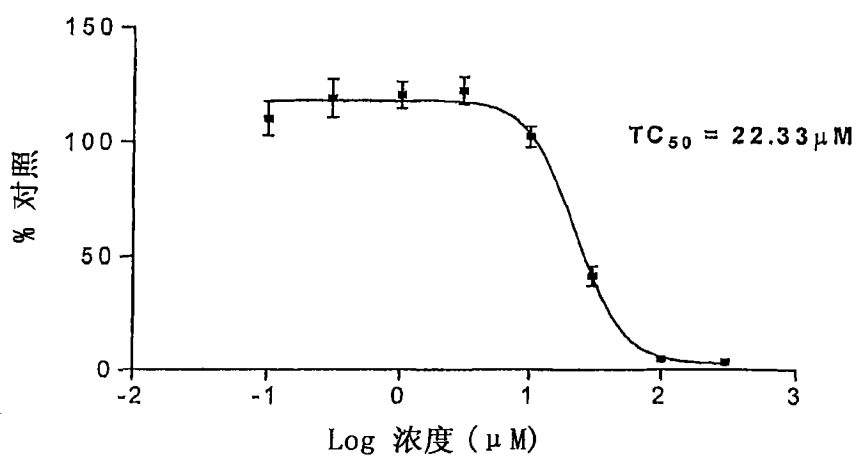


图 6a

CXR0504: 在暴露于氯丙嗪 3 小时后来自人肝细胞的 ATP 消耗

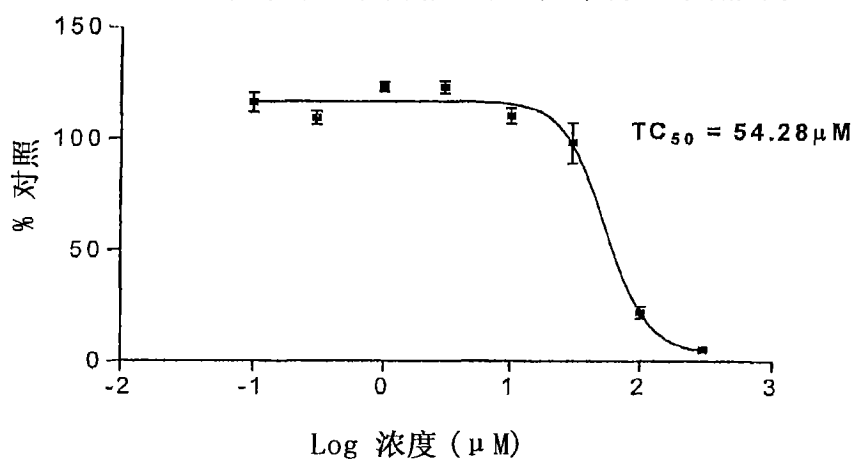


图 6b

CXR0504: 在暴露于 P1639C 3 小时后来自人肝细胞的 ATP 消耗

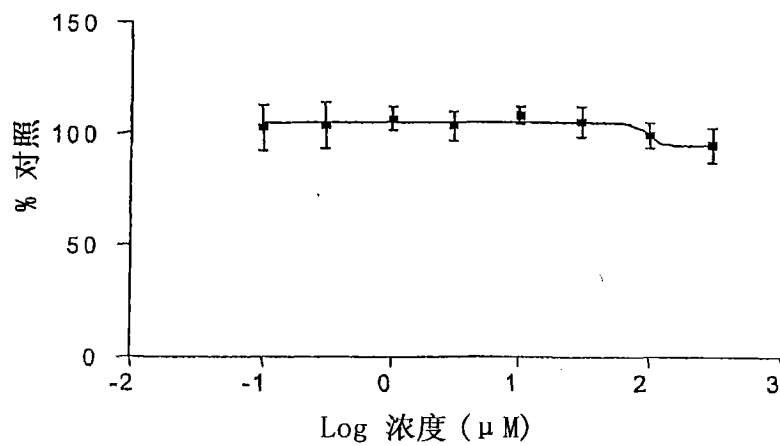


图 6c

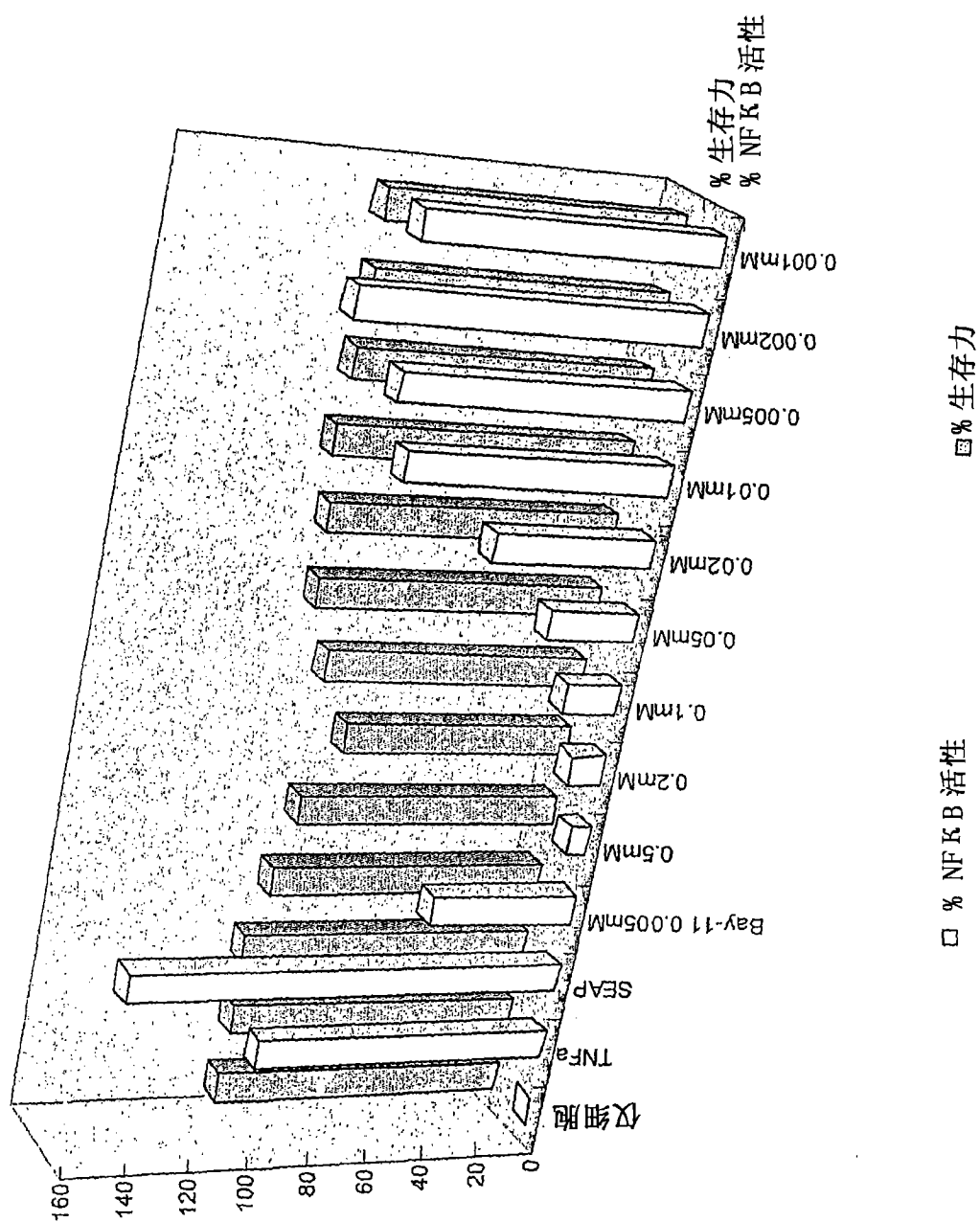


图 7a

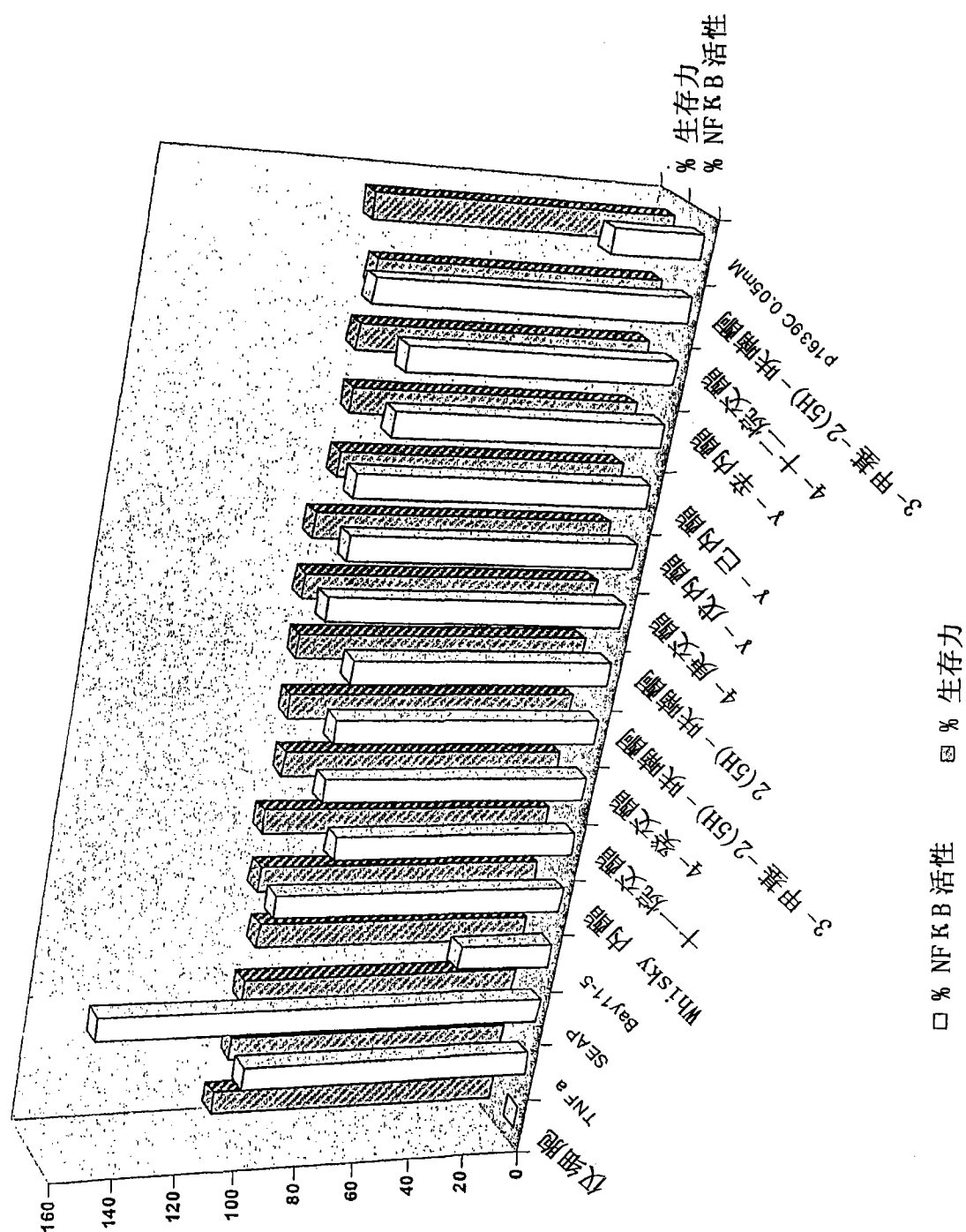


图 7b

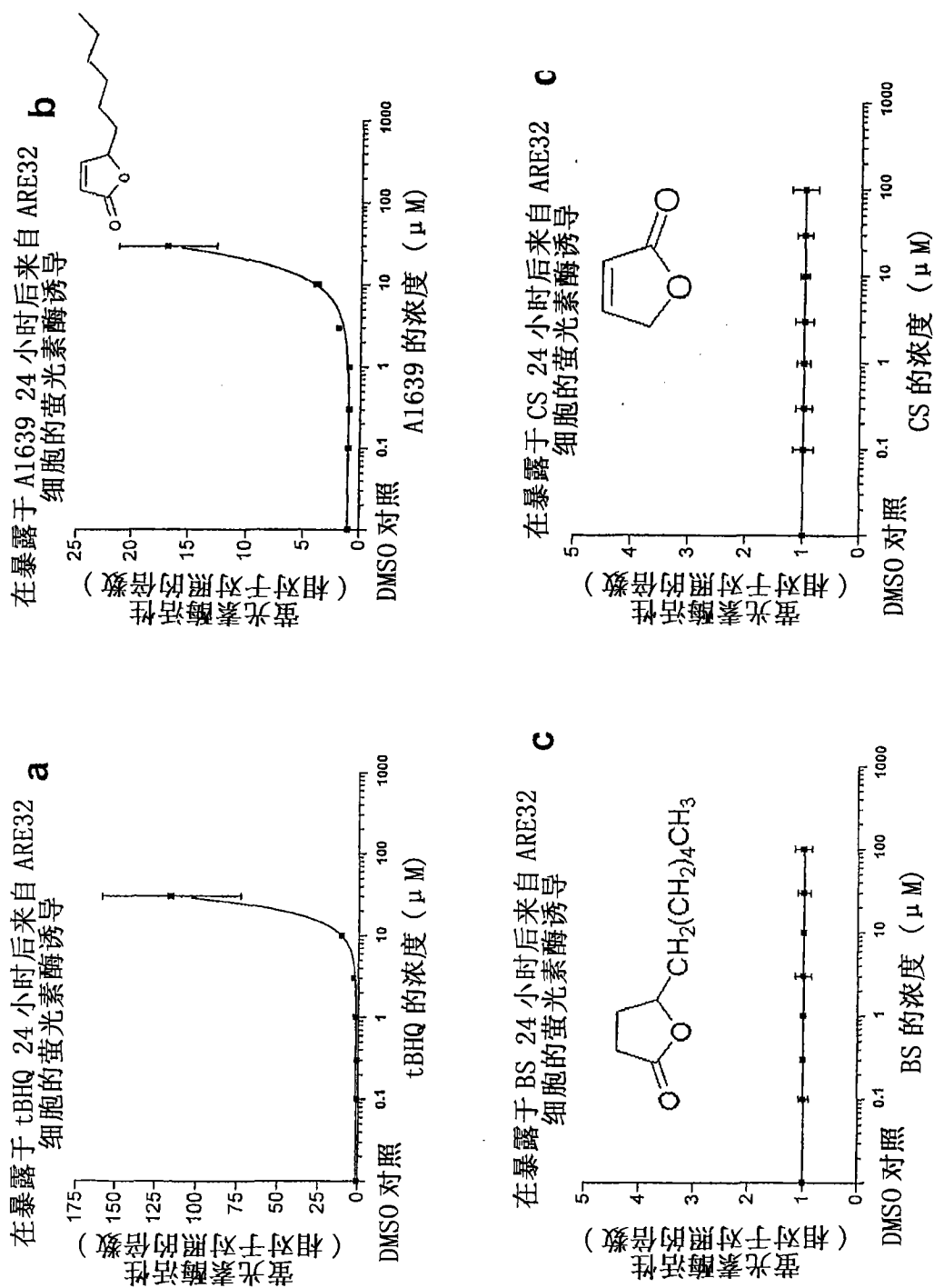
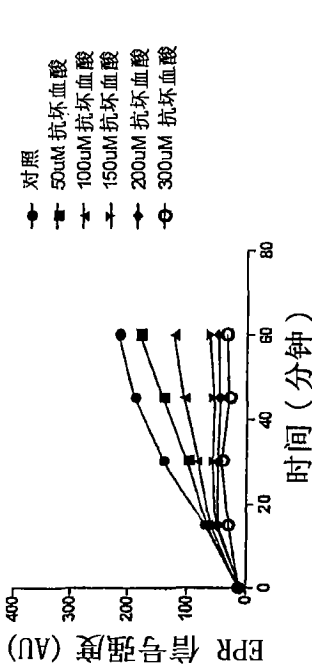
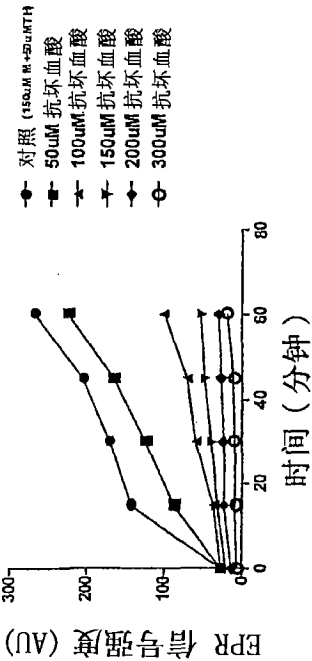


图 8

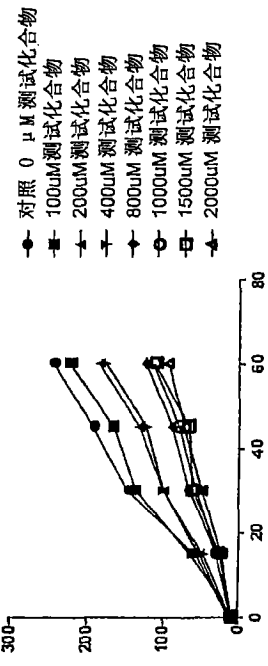
具有连苯三酚 150 μ M 和 TemponeH 50 μ M 的抗坏血酸



具有甲萘醌 150 μ M 和 TH 50 μ M 的抗坏血酸



具有连苯三酚 150 μ M 和 TemponeH 50 μ M 的 1639



具有甲萘醌 150 μ M 和 TemponeH 50 μ M 的 1639

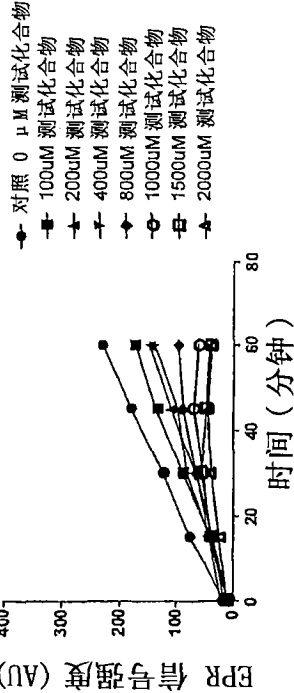


图 9