



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106966886 B

(45)授权公告日 2020.06.16

(21)申请号 201710054198.5

(22)申请日 2017.01.24

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106966886 A

(43)申请公布日 2017.07.21

(83)生物保藏信息
CGMCC No. 12969 2016.10.13

(73)专利权人 宁波大学
地址 315211 浙江省宁波市江北区风华路
818号

(72)发明人 何山 丁立建 崔魏 严小军
王钦文 方芳 赵佳颖

(74)专利代理机构 宁波奥圣专利代理事务所
(普通合伙) 33226

代理人 何仲

(51)Int.Cl.

C07C 49/707(2006.01)

C12P 7/26(2006.01)

A61P 25/28(2006.01)

A61P 39/06(2006.01)

C12R 1/885(2006.01)

(56)对比文件

CN 1347317 A,2002.05.01,

CN 1409715 A,2003.04.09,

CN 1261342 A,2000.07.26,

Kentaro Yaji等.Total synthesis of xanthoc idin using FeCl₃-mediated Nazarov reaction.《Tetrahedron》.2010,第66卷9808-9813.

审查员 陈东旭

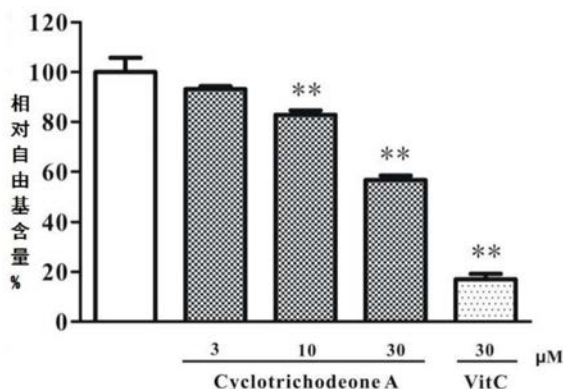
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

一种环戊烯酮类化合物及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种环戊烯酮类化合物及其制备方法和用途,特点是该环戊烯酮类化合物的结构式如I所示,其制备方法步骤包括通过保藏号为12969的海洋真菌(*Trichoderma* sp.)发酵培养获取含有新环戊烯酮类化合物的发酵液,然后将发酵液用乙酸乙酯提取,得粗浸膏,将该提取物经减压硅胶柱层析,最后反相半制备高效液相色谱分离纯化得到,该环戊烯酮类化合物具有在制备治疗阿尔茨海默氏病药物方面的用途,优点是强有力的抗氧化,抗Aβ原纤化、寡聚化特性和神经保护作用。



1. 一种环戊烯酮类化合物的制备方法,其特征在于具体包括如下步骤:

(1) 发酵生产

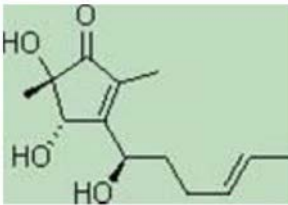
将保藏号为12969的木霉(*Trichoderma* sp.)划线复活,接种到PDA固体培养基上,在28℃培养箱中培养5天后;将PDA固体培养基培养获得的菌落接种到PDB液体培养基中,于25℃,125rpm,摇床发酵培养14天得到发酵液;

(2) 浸膏的获得

将发酵液用等体积的乙酸乙酯萃取3次,取萃取液减压浓缩除去乙酸乙酯,获得菌液粗浸膏;将萃余物菌体用甲醇浸泡3次,而后浓缩蒸干,用一定的水复溶,再用等体积的乙酸乙酯萃取3次,取萃取液减压浓缩除去乙酸乙酯,获得菌体粗浸膏,将菌液粗浸膏与菌体粗浸膏合并,得到总浸膏;

(3) 化合物的分离精制

将总浸膏用二氯甲烷和甲醇混合溶剂溶解后,加200-300目硅胶拌样,以石油醚/乙酸乙酯以体积比5:1梯度为洗脱剂梯度洗脱,对粗浸膏进行减压硅胶柱层析,收集洗脱组分,再经过半制备反相高效液相色谱得到环戊烯酮类化合物,其结构如式I所示:



式 I。

2. 根据权利要求1所述的一种环戊烯酮类化合物的制备方法,其特征在于:所述的PDA固体培养基的配方为马铃薯提取物8.0g,葡萄糖20g,蒸馏水1L,海水晶35g,琼脂20g;所述的PDB液体培养基的配方为马铃薯提取物8.0g,葡萄糖20g,蒸馏水1L,海水晶35g。

3. 根据权利要求1所述的一种环戊烯酮类化合物的制备方法,其特征在于:所述的半制备反相高效液相色谱的洗脱液为甲醇和水按体积比7:3混合而成。

一种环戊烯酮类化合物及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种环戊烯酮类化合物,尤其是涉及一种用海洋真菌制备环戊烯酮类化合物的方法以及该类化合物在制备治疗阿尔茨海默氏病药物的应用。

背景技术

[0002] 随着世界人口平均寿命的逐年增加,全球正在逐步迈入老龄化社会,因此有关老年性疾病及其药物治疗的研究备受关注。阿尔茨海默氏病(Alzheimer disease,简称AD)是发生于老年和老年前期以进行性认知障碍和记忆力损坏为主的中枢神经系统退行性疾病伴有性格改变及行为改变。统计表明,AD患者的存活期预计可达到20年,但大多数病例在确诊后仅能存活8~10年,它已经成为人类的第四号杀手。

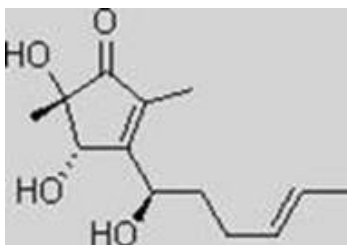
[0003] 在AD的治疗中,药物治疗占有重要的地位。在合成化学类抗AD药物中绝大多数都以天然抗AD活性成分为先导化合物,以天然产物为来源的抗肿瘤药物具有活性显著、结构独特、作用机制不同于一般的小分子化学治疗药物的优势。据报道,临床使用的抗AD药物中超过60%来源于天然,包括植物、海洋生物、微生物。由此可见,天然产物是结构新颖和作用独特的抗AD化合物的重要来源。海洋真菌因其代谢途径复杂、代谢产物种类丰富而日益受到研究者的重视。已报道的海洋真菌次级代谢产物的种类和数量呈快速上升的趋势,其中许多代谢产物具有很强的抗氧化,抗A β 原纤化特性和神经保护作用。本发明人研究得知,海洋真菌*Trichoderma* sp. (中国科学院微生物研究所,保藏编号为:CGMCC No. 12969)液体发酵的乙酸乙酯提取物有较好的抗氧化和抗神经毒活性,遂对其活性成分进行了研究。目前尚未见该化合物的化学结构及其抗氧化和抗神经毒活性的报道,因此市场上也尚未见有与此相关的药物。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是提供一种强有力的抗氧化,抗A β 原纤化、寡聚化特性和神经保护作用的环戊烯酮类化合物及其制备方法和用途。

[0005] 本发明解决上述技术问题所采用的技术方案为:一种环戊烯酮类化合物,该环戊烯酮类化合物的结构式如I所示,

[0006]



[0007] 式I。

[0008] 上述环戊烯酮类化合物的制备方法,具体包括如下步骤:

[0009] (1) 发酵生产

[0010] 将保藏号为12969的木霉(*Trichoderma* sp.)划线复活,接种到PDA固体培养基上,

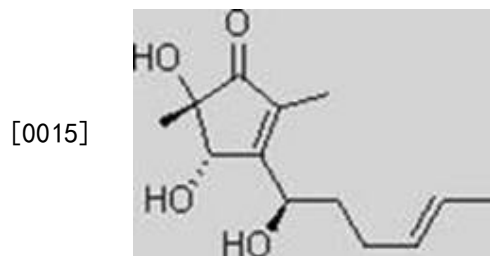
在28℃培养箱中培养5天后;将PDA固体培养基培养获得的菌落接种到PDB液体培养基中,于25℃,125 rpm,摇床发酵培养14天得到发酵液;

[0011] (2)浸膏的获得

[0012] 将发酵液用等体积的乙酸乙酯萃取3次,取萃取液减压浓缩除去乙酸乙酯,获得菌液粗浸膏;将萃余物菌体用甲醇浸泡3次,而后浓缩蒸干,用一定的水复溶,再用等体积的乙酸乙酯萃取3次,取萃取液减压浓缩除去乙酸乙酯,获得菌体粗浸膏,将菌液粗浸膏与菌体粗浸膏合并,得到总浸膏;

[0013] (3)化合物的分离精制

[0014] 将总浸膏用二氯甲烷和甲醇混合溶剂溶解后,加200-300目硅胶拌样,以石油醚/乙酸乙酯以体积比5:1梯度为洗脱剂梯度洗脱,对粗浸膏进行减压硅胶柱层析,收集洗脱组分,再经过半制备反相高效液相色谱得到环戊烯酮类化合物,其结构如式I所示:



[0016] 式I。

[0017] 所述的PDA固体培养基的配方为马铃薯提取物8.0 g,葡萄糖20 g,蒸馏水1 L,海水晶35 g,琼脂20 g;所述的PDB液体培养基的配方为马铃薯提取物8.0 g,葡萄糖20 g,蒸馏水1 L,海水晶35 g。

[0018] 所述的半制备反相高效液相色谱的洗脱液为甲醇和水按体积比7:3混合而成。

[0019] 上述环戊烯酮类化合物的应用,所述的环戊烯酮类化合物在制备治疗阿尔茨海默氏病药物方面的用途。

[0020] 与现有技术相比,本发明的优点在于:本发明一种环戊烯酮类化合物及其制备方法和用途,通过微生物发酵培养来获取含新环戊烯酮类化合物的发酵液,然后将菌体用甲醇浸泡、乙酸乙酯萃取,得菌体粗浸膏,将菌液用乙酸乙酯萃取,得菌液粗浸膏,将菌体粗浸膏和菌液粗浸膏合并得到总粗浸膏,将该总粗浸膏经减压正相硅胶柱层析和反相半制备高效液相色谱分离纯化得到,该环戊烯酮类化合物具有强有力的抗氧化,抗AB原纤化特性和神经保护作用,可以作为阿尔茨海默氏病的新药物成分或先导化合物。

[0021] 上述木霉(*Trichoderma* sp.),该菌为HPQJ34菌株,保藏编号为CGMCC No. 12969,于2016年10月13日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏地址为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。

附图说明

[0022] 图1为化合物I以浓度依赖性方式清除DPPH自由基。化合物I或维生素C(VitC)以指定浓度加入到0.2mM DPPH溶液中20分钟,通过评价517 nm处的吸光度来测量DPPH自由基的含量,数据表示三次单独实验的平均值±SEM;相对于对照组**p<0.01(ANOVA和Duncet试验);

[0023] 图2为化合物I显著降低A β_{1-42} 原纤维的形成。用硫代黄素T(ThT)测定法测量A β 原纤维,相对于单独A β_{1-42} 组**p<0.01(ANOVA和Duncet试验);

[0024] 图3为化合物I阻止A β_{1-42} 寡聚化。10 μ M化合物I加入到10 μ M A β_{1-42} 单体溶液液中,震荡48小时,醋酸铀染色后透射电镜观察形态;

[0025] 图4为化合物I在SH-SY5Y细胞中以浓度依赖性方式保护H₂O₂诱导的神经元不死。(A)用指定浓度的化合物I处理SH-SY5Y细胞。2小时后,将细胞暴露于200 μ M H₂O₂中。MTT测定用于测量细胞在H₂O₂中暴露24小时的细胞活力。数据表示对照组的百分比,表示三次单独实验的平均值 \pm SEM;与对照组相比^{##}p<0.01,与H₂O₂实验组相比*p<0.05和**p<0.01(ANOVA和Tukey检验);

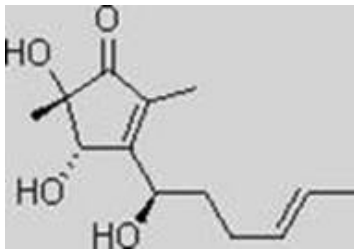
[0026] 图5 化合物I在SH-SY5Y细胞中以浓度依赖性方式保护H₂O₂诱导的神经元不死。给予SH-SY5Y细胞化合物I2小时,暴露于200 μ M H₂O₂中。24小时后,用FDA/PI双染色检查细胞。

具体实施方式

[0027] 以下结合附图实施例对本发明作进一步详细描述。

[0028] 实施例1

[0029] 一种环戊烯酮类化合物结构式如I所示,



[0030] 式I。

[0031] 实施例2

[0032] 如I式所示的环戊烯酮类化合物的制备方法,具体包括如下步骤:

[0033] (1)发酵生产

[0034] 将保藏号为12969的木霉(*Trichoderma* sp.)划线复活,接种到PDA固体培养基(马铃薯提取物8.0 g,葡萄糖20 g,蒸馏水1 L,海水晶35 g,琼脂20 g)上,在28 $^{\circ}$ C培养箱中培养5天后;将PDA固体培养基培养获得的菌落接种到PDB液体培养基(马铃薯提取物8.0 g,葡萄糖20 g,蒸馏水1 L,海水晶35 g)的1000 mL锥形瓶中,共接种270瓶,于25 $^{\circ}$ C,125 rpm,摇床发酵培养14天得到发酵液;

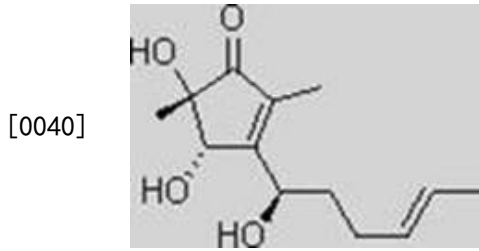
[0035] (2)浸膏的获得

[0036] 将发酵液用等体积的乙酸乙酯萃取3次,取萃取液减压浓缩除去乙酸乙酯,获得菌液粗浸膏;将萃余物菌体用甲醇浸泡3次,而后浓缩蒸干,用一定的水复溶,再用等体积的乙酸乙酯萃取3次,取萃取液减压浓缩除去乙酸乙酯,获得菌体粗浸膏,将菌液粗浸膏与菌体粗浸膏合并,得到总浸膏50 g;

[0037] (3)化合物的分离精制

[0038] 将总浸膏用二氯甲烷和甲醇混合溶剂溶解后,加200-300目硅胶拌样,以石油醚/乙酸乙酯以体积比5:1梯度为洗脱剂梯度洗脱,对粗浸膏进行减压硅胶柱层析,收集洗脱组分,再经过半制备反相高效液相色谱(洗脱液为甲醇:水=70:30,v/v)得到环戊烯酮类化合

物,其结构如式I所示:



[0041] 式I。

[0042] 该化合物I黄色油状,分子式 $C_{13}H_{20}O_4$, $[\alpha]_D^{20} = +9.66$ (c 0.01, MeOH); 阳离子HRESIMS m/z : 263.1247 $[M+Na]^+$; IR (film) ν_{max} : 3369.25, 2926.37, 1710.16, 1634.24, 1379.30, 1054.54 cm^{-1} ; 1H 和 ^{13}C -NMR数据见表1。

[0043] 表1 化合物I的 1H 和 ^{13}C NMR数据(500 and 120MHz, in MeOD)

[0044]

Position	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) (J in Hz)
1	210.38	
2	135.80	
3	171.68	
4	75.29	4.49 (H, d, 0.9)
5	74.53	
6	8.41	1.75 (3H, d, 1.0)
7	23.11	1.23 (3H, s)
8	69.40	4.72 (H, dd, 8.6, 4.9)
9	36.59	1.86 (2H, ddd, 14.2, 8.7, 5.5)
10	29.78	2.12 (2H, m)
11	131.64	5.49 (H, m)
12	126.70	5.48 (H, m)
13	18.08	1.64 (3H, d, 4.8)

[0045] 注:a)表示本表信号归属基于DEPT、 1H - 1H COSY、HSQC及HMBC图谱解析结果。氢信号多重度分别用s(单重峰)、d(二重峰)、t(三重峰)和 m(多重峰)表;b)表示此栏中的数字和代号分别代表在 1H - 1H COSY谱中与相应行中的 1H 给出偶合相关信号的 1H 核;c)表示此栏中的数字和代号分别代表在HMBC谱中与相应行中的 1H 给出偶合相关信号的 ^{13}C 核。

[0046] 实施例3

[0047] 神经毒活性的测试

[0048] (1)实验样品

[0049] 被测样品溶液的配制:测试样品为上述实施例2中分离纯化的化合物I纯品,精密称取适量样品,供测活性。该实验使用的指示细胞为SH-SY5Y神经细胞。

[0050] 实验方法

[0051] 1、通过DPPH自由基清除测定确定化合物I的抗氧化性质。将各种浓度的药物加入

到DPPH的甲醇溶液(0.2 mM)中。将混合物(200 μ L/孔)加入96孔板中,并在室温下摇动20分钟。用酶标仪在517 nm处测量吸光度。用维生素C作为阳性对照。使用下式计算DPPH自由基清除活性: DPPH自由基清除活性(%)=[(对照的吸光度-样品的吸光度)/对照的吸光度]×100。

[0052] 2、 $A\beta$ 原纤维化由ThT测定分析。将10 μ M单体 $A\beta_{1-42}$ 与各种浓度的药物和5 μ M ThT混合,在37 $^{\circ}$ C下培养3天。用酶标仪以440 nm作为激发波长和485 nm作为发射波长测量样品的荧光强度。

[0053] 3、 $A\beta$ 寡聚化由透射电镜观察。将10 μ M单体 $A\beta_{1-42}$ 与10 μ M药物混合,震荡48小时。醋酸铀染色后,由透射电镜观察形态。

[0054] 4、用3(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基溴化四唑(MTT)测定评估细胞活力。SH-SY5Y细胞从上海细胞生物研究所(中国科学院)获得并保存在补充有10%胎牛血清(FBS)和青霉素(100 μ g/mL)/链霉素(100 μ g/mL)的高葡萄糖修饰的Eagle培养基(DMEM)中,培养基保存在37 $^{\circ}$ C,含5%CO₂的潮湿环境中。培养基每两天更新一次。对于H₂O₂实验,将具有低血清含量(1%FBS)的DMEM中的SH-SY5Y细胞以 1×10^5 个细胞/mL的密度接种在6孔或96孔板中24小时,然后进行进一步实验。在处理细胞后向每个孔中加入10 μ L MTT溶液(5 mg/mL)。将平板放在37 $^{\circ}$ C湿润的培养箱中培养4小时。随后,向每个孔中加入100 μ L溶剂化溶液(0.01N HCl在10%SDS溶液中),然后培养16-20小时。以655 nm作为参考波长在570 nm的波长下测定样品的吸光度。由FDA通过活细胞中的酯酶活性形成的荧光素显现活细胞。通过PI染色分析非存活细胞,其仅穿透死细胞的膜。用10 μ g/mL的FDA和5 μ g/mL的PI培养15分钟后检查细胞。使用UV光学显微镜获取图像,并将其与在相差显微镜下采集的图像进行比较。

[0055] (3) 实验结果

[0056] 1、我们首先评估了化合物I对自由基清除的影响。化合物I或维生素C(VitC)以指定浓度加入到0.2mM DPPH溶液中20分钟,通过评价517 nm处的吸光度来测量DPPH自由基的含量。如图1所示,化合物I浓度依赖性地降低DPPH自由基的含量,表明化合物I可能作为有效的抗氧化剂,数据表示三次单独实验的平均值 \pm SEM,相对于对照组** $p < 0.01$ (ANOVA和Duncet试验)。化合物I的有效抗氧化作用可能是由于其羟基。许多抗氧化剂,如维生素C和维生素E,可能有助于延迟阿尔茨海默病(AD)的发病并且有助于缓解其症状。因此,化合物I作为具有强自由基清除性能的新环戊烯酮,也可用于AD的治疗。

[0057] 2、以前的研究表明 $A\beta$ 肽会在AD患者的脑中积累。 $A\beta$ 肽可以形成高毒性的寡聚体和原纤维,这被认为是AD的关键致病因素。 $A\beta$ 寡聚体和原纤维可以进一步聚集成斑块,这是AD的标志。因此,优选抑制 $A\beta$ 纤维化、寡聚化形成的药物可能对AD治疗产生疾病缓解的作用。我们进一步测量了化合物I对 $A\beta$ 原纤维和寡聚体形成的影响。将 $A\beta_{1-42}$ 单体(20 μ M)在指示浓度下与化合物I一起培养3天,用酶标仪以440 nm作为激发波长和485 nm作为发射波长测量样品的荧光强度。用硫代黄素T(ThT)测定法测量 $A\beta$ 原纤维。由图2可知,化合物I显著降低 $A\beta_{1-42}$ 原纤维的形成,相对于单独 $A\beta_{1-42}$ 组** $p < 0.01$ (ANOVA和Duncet试验)。由图3可知,化合物I阻止 $A\beta_{1-42}$ 寡聚化。10 μ M化合物I加入到10 μ M $A\beta_{1-42}$ 单体溶液液中,震荡48小时,醋酸铀染色后透射电镜观察形态。

[0058] 如图2、3所示,与单独培养的 $A\beta$ 单体相比,化合物I和 $A\beta$ 单体的共培养导致 $A\beta$ 原纤

维和寡聚体的形成减少。这些结果表明化合物I可以有效抑制A β 原纤维、寡聚体的形成,并且可能有益于AD的治疗。

[0059] 3、除A β 原纤维外,氧化应激在AD发病机制中也起重要作用。过氧化氢(H₂O₂)是广泛使用的神经毒素,用H₂O₂建立氧化应激诱导的神经毒性模型可以诱导细胞内活性氧增加,并通过作用于许多细胞内的大分子来促进神经毒性。我们调查了化合物I对H₂O₂诱导的SH-SY5Y细胞神经元损失的神经保护作用。SH-SY5Y细胞用化合物I预处理2小时,随后用H₂O₂处理SH-SY5Y细胞24小时。通过MTT测定法测定细胞活力。图4显示化合物I以浓度依赖性的方式显著降低H₂O₂诱导神经元的死亡,这表明该化合物是有效的神经保护剂。只用50 μ M化合物I处理SH-SY5Y细胞26小时,这对细胞没有细胞毒性(该数据未显示),这表明该化学物质是相当安全的。活细胞和死细胞的荧光素二乙酸酯(FDA)/碘化丙啶(PI)双染色进一步证实,30 μ M和50 μ M的化合物I显著地保护了SH-SY5Y细胞中的H₂O₂诱导的神经元不死亡(图5)。

[0060] 由上述可知化合物I显著地清除了2,2-二苯基-1-苦肼基的自由基,并显著地减少了在体外的 β -淀粉样蛋白(A β)的纤维化。此外,化合物I显著地减少了H₂O₂诱导的SH-SY5Y细胞的神经毒性。这些发现表明,化合物I作为一种新发现的环戊烯酮,具有有效的抗氧化,抗A β 原纤维化特性和神经保护作用,可作为治疗阿尔茨海默氏病的药物或先导化合物。

[0061] 上述说明并非对本发明的限制,本发明也并不限于上述举例。本技术领域的普通技术人员在本发明的实质范围内,作出的变化、改型、添加或替换,也应属于本发明的保护范围。

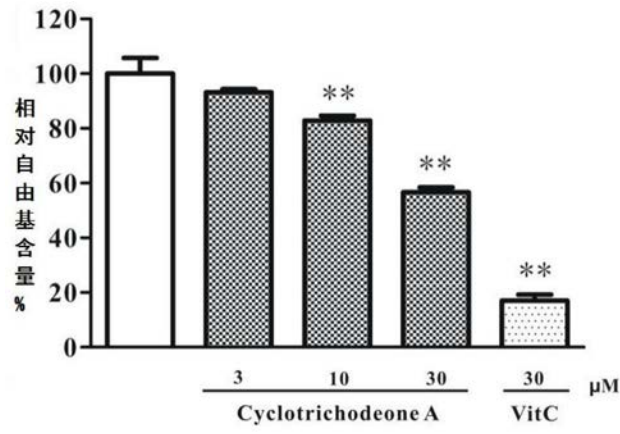


图1

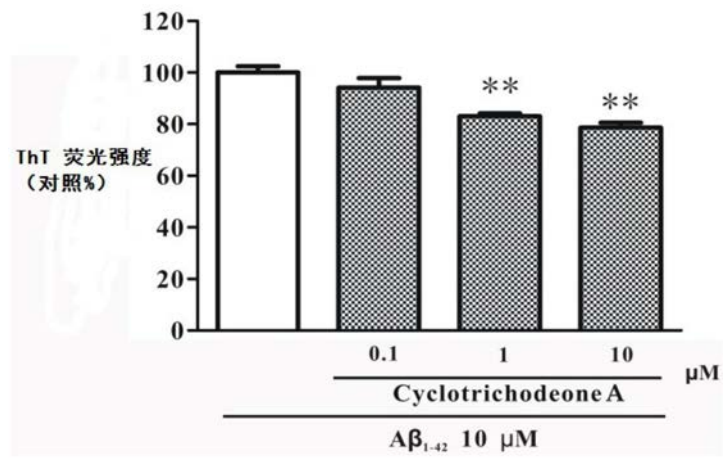


图2

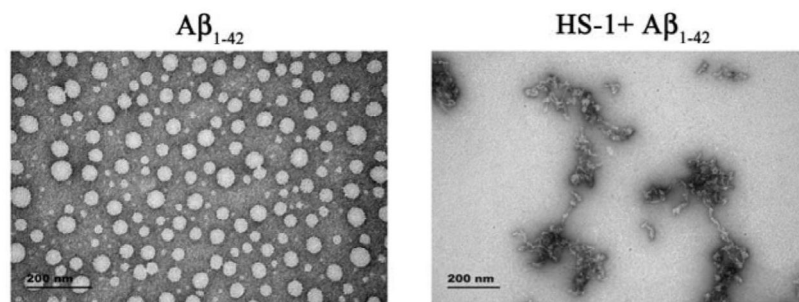


图3

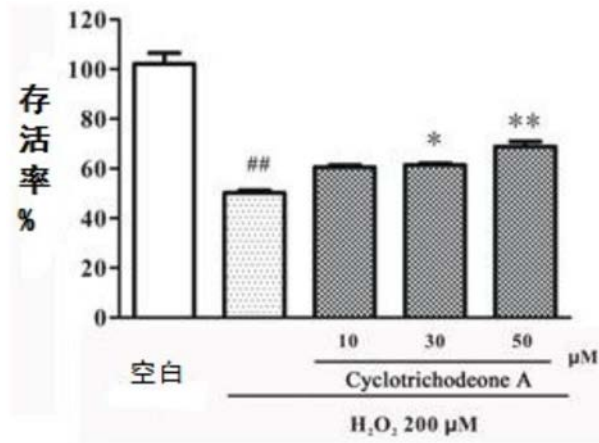


图4

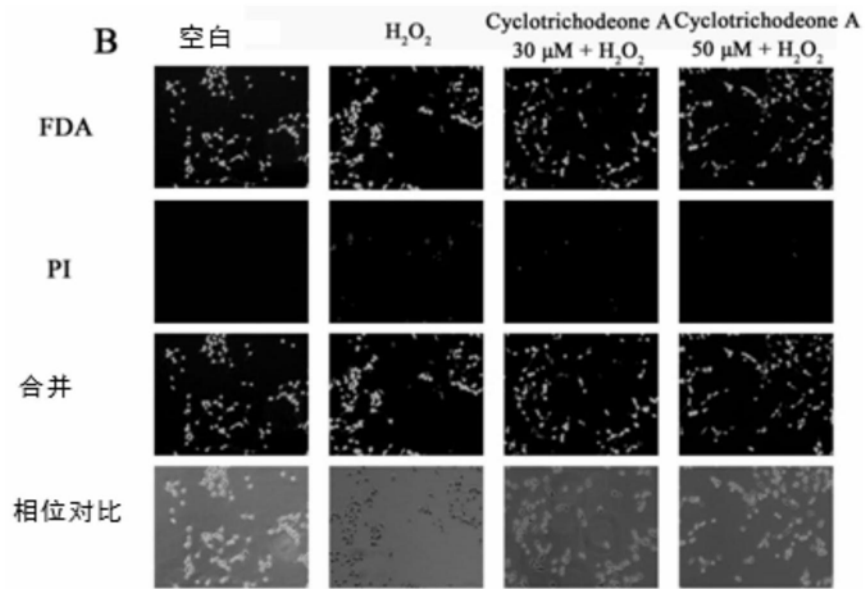


图5