



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103877562 A

(43) 申请公布日 2014.06.25

(21) 申请号 201410133341.6

(22) 申请日 2014.04.03

(71) 申请人 中国科学院昆明植物研究所
地址 650201 云南省昆明市蓝黑路 132 号
申请人 中国科学院昆明动物研究所

(72) 发明人 谭宁华 毛炳宇 赵思蒙 江世友

(74) 专利代理机构 昆明协立知识产权代理事务
所(普通合伙) 53108

代理人 马晓青

(51) Int. Cl.

A61K 38/12(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

C07K 7/64(2006.01)

C07K 1/20(2006.01)

C07K 1/16(2006.01)

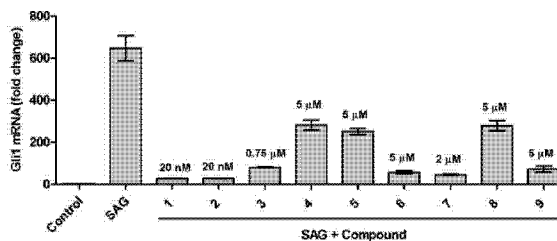
权利要求书2页 说明书9页 附图2页

(54) 发明名称

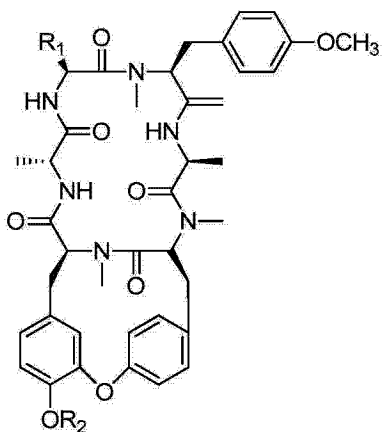
茜草科类型环肽用作为 Hedgehog 信号通路抑制剂和其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明提供茜草科类型环肽用作为 Hedgehog 信号通路的新型抑制剂,其制备方法及在制备治疗与预防 Hedgehog 信号通路异常激活的有关癌症的药物中的应用。本发明的茜草科类型环肽,由 1 个 D- α -丙氨酸,1 个 L- α -丙氨酸,3 个取代的 N-甲基-L- α -酪氨酸和一个其它类型的 L- α -氨基酸经肽键缩合而成,且 6 个氨基酸缩合成为十八元环,其中 2 个邻位的酪氨酸之间的苯环经氧桥连接形成一个十四元环。



1. 用如下结构式所示的茜草科类型环肽作为 Hedgehog 信号通路抑制剂,



	R ₁	R ₂
1	CH ₃	H
2	CH ₃	CH ₃
3	CH ₂ OH	H
4	CH ₂ CH ₂ COOH	H
5	CH ₃	β-D-glc
6	CHOHCH ₃	H
7	CH ₂ CH ₂ CONH ₂	CH ₃
8	CH ₂ OH	β-D-glc
9	CH ₂ CH ₂ COOCH ₃	H

2. 药物组合物,其中含有治疗有效量的如权利要求 1 所示的茜草科类型环肽化合物 RA-V (1)、RA-VII (2)、RA-I (3)、RA-XI (4)、RA-XII (5)、RA-XXII (6)、RA-XXIII (7)、RY-II (8) 和 Rubiyunnanin C (9) 或其药理学上容许的盐和药学上可接受的载体。

3. 权利要求 1 所述的茜草科类型环肽或其药理学上容许的盐在制备 Hedgehog 信号通路抑制剂中的应用。

4. 权利要求 1 所述的茜草科类型环肽或其药理学上容许的盐在制备治疗与预防 Hedgehog 信号通路异常激活的相关癌症的药物中的应用,所述的癌症为基底细胞癌、髓母细胞瘤、横纹肌肉瘤、痣样基底细胞癌综合征、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、转移性前列腺癌、胰腺癌、软骨肉瘤、骨肉瘤、黑色素瘤、神经胶质瘤、乳腺癌、卵巢癌、食道癌、胃癌、结肠癌、胆管癌、肝癌、膀胱癌、血管瘤、慢性髓细胞性白血病、急性淋巴细胞性白血病、多发性骨髓瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤。

5. 制备如权利要求 1 所述的茜草科类型环肽化合物 RA-V (1)、RA-VII (2)、RA-I (3)、RA-XI (4)、RA-XII (5)、RA-XXII (6)、RA-XXIII (7)、RY-II (8) 和 Rubiyunnanin C (9) 的方法,取金剑草(*Rubia alata* Wall. in Roxb.) 的根茎,经干燥、粉碎后,用甲醇回流提取 3 次,时间为 2-3 小时,提取液经减压浓缩得总浸膏,将总浸膏经硅胶柱层析,用 100:0, 10:1, 8:2, 7:3, 0:100 的氯仿 / 甲醇梯度洗脱,结合环肽 TLC 检测方法合并其中的 10:1 和 8:2 含有环肽的部分,以下的每一步骤都须结合环肽 TLC 检测方法来进行分离纯化,合并后的环肽部位再次经硅胶柱层析,用 70:1-8:2 的氯仿 / 甲醇梯度洗脱,合并含有环肽部位,得总环肽部位;总环肽部位继续经硅胶柱层析,用 30:1-1:1 的氯仿 / 丙酮梯度洗脱,按含环肽的点不同合并为 3 个组分 Fr. 1 - Fr. 3;Fr. 1 组分经硅胶柱层析,7:3-0:1 的石油醚 / 丙酮梯度洗脱,富集含环肽部位 Fr. 1-1, Fr. 1-1 组分经 Sephadex LH-20 层析,1:1 的氯仿 / 甲醇为洗脱剂,所富集的含有环肽的部分经 ODS HPLC 制备柱纯化,38% 乙腈和 4% 三氟乙酸为洗脱剂,得到 RA-V (1), RA-VII (2), RA-XXII (6), RA-XXIII (7), Rubiyunnanin C (9);Fr. 2 组分经硅胶柱层析,30:1-1:1 的氯仿 / 丙酮梯度洗脱,富集含环肽部位经 Sephadex LH-20 层析,1:1 的氯仿 / 甲醇为洗脱剂,合并含环肽部位 Fr. 2-1;Fr. 2-1 组分经 RP-18 柱层析,20%-90% 的甲醇 / 水梯度洗脱,得到 2 个亚组分 Fr. 2-1-1 和 Fr. 2-1-2,其中 Fr. 2-1-1 经 ODSHPLC 制备柱纯化,27% 乙腈和 4% 三氟乙酸为洗脱剂,得到 RA-I (3), RA-XI (4);Fr. 2-1-2 经 ODS

HPLC 制备柱纯化, 23% 乙腈和 4% 三氟乙酸为洗脱剂, 得到 RA-XII (5); Fr. 3 组分经硅胶柱层析, 20:1-8:2 的氯仿 / 甲醇梯度洗脱, 富集含环肽部位经 Sephadex LH-20 层析, 1:1 的氯仿 / 甲醇为洗脱剂, 合并含环肽部位 Fr. 3-1; Fr. 3-1 组分经 ODS HPLC 制备柱纯化, 20% 乙腈和 4% 三氟乙酸为洗脱剂, 得到 RY-II (8)。

6. 权利要求 1 中的茜草科类型环肽联合一种或多种附加的疗法如放射疗法, 或化疗法如顺铂、卡铂、长春新碱、紫杉醇、环磷酰胺、阿霉素化疗, 或联合抗体药、外科手术和 / 或联合一种或多种其它药物在制备治疗与预防 Hedgehog 信号通路异常激活的相关癌症的药物中的应用, 所述的癌症为基底细胞癌、髓母细胞瘤、横纹肌肉瘤、痣样基底细胞癌综合征、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、转移性前列腺癌、胰腺癌、软骨肉瘤、骨肉瘤、黑色素瘤、神经胶质瘤、乳腺癌、卵巢癌、食道癌、胃癌、结肠癌、胆管癌、肝癌、膀胱癌、血管瘤、慢性髓细胞性白血病、急性淋巴细胞性白血病、多发性骨髓瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤。

茜草科类型环肽用作为 Hedgehog 信号通路抑制剂和其制备方法与应用

技术领域：

[0001] 本发明属于药物技术领域，具体地，涉及一系列茜草科类型环肽用作为 Hedgehog 信号通路抑制剂，以其作为有效成分的药物组合物，其制备方法及其在癌症治疗及预防中的应用。

背景技术：

[0002] Hedgehog 信号通路是细胞内经典而重要的信号转导通路之一，该通路的激活可调节多种下游基因的转录表达，并由此影响细胞的增殖，分化，凋亡和迁移。因此，该信号通路在动物早期胚胎发育和成体组织器官的稳态平衡过程中起着重要的作用，其功能的异常紊乱与众多人类疾病密切相关，如婴儿出生缺陷和癌症的产生。

[0003] Hedgehog 信号通路最早在果蝇的遗传突变筛选中被发现参与胚胎体节极性的形成。随后很快在脊椎动物中克隆和鉴定了 Hedgehog 蛋白的同源基因 Sonic hedgehog (Shh)，Indian hedgehog (Ihh)，Desert hedgehog (Dhh)。其中研究最深入的是 Shh。

[0004] 在脊椎动物的 Hedgehog 信号转导途径中，Shh 是配体，Patched (Ptch) 是受体，Ptch 是一个 12 次跨膜蛋白，有两个同源基因：Ptch1 和 Ptch2。在没有 Shh 信号时，Ptch 抑制下游 7 次跨膜蛋白 Smoothened (Smo)，Smo 是 G 蛋白偶联受体，从而没有信号转导到下游。当 Shh 信号存在时，配体 Shh 和受体 Ptch 结合一起被胞吞，从而解除对 Smo 的抑制，Smo 激活下游的转录因子 Gli 入核，Gli 激活不同靶基因的转录表达，实现 Hedgehog 信号通路的激活。Gli 是 Hedgehog 信号通路最下游的转录因子，脊椎动物中有 3 个同源基因：Gli1, Gli2, Gli3, 都是致癌基因。Gli1 是一转录激活因子，Gli2 和 Gli3 是双功能转录因子，全长形式是转录激活因子，当被蛋白酶体部分降解修饰后的截短形式是转录抑制因子。Sufu 是一转录共抑制因子，能和三个 Gli 结合，阻止 Gli 入核从而抑制 Hedgehog 信号通路。Hedgehog 信号通路的靶基因包括 Gli1, Ptch1, Hhip1, Cyclin D, Cyclin E, N-Myc, Bcl2, VEGF, Jag2, Snail, Slug, Twist2, Bmi1, Lgr5, CD44, CD133, PTHrP 等，一方面对自身信号通路进行精细的反馈调节，另一方面调控细胞的多种功能行为如：细胞增殖、抗凋亡、血管形成，诱导和维持干细胞特性、细胞命运决定、上皮间充质转化，迁移等。

[0005] Hedgehog 信号通路在早期胚胎发育的组织器官形成过程中很活跃，但在成体组织中大部分都被沉默关闭掉，除在组织稳态维持和损伤修复过程中外，由于各种原因导致的 Hedgehog 信号通路重新激活会导致众多癌症的形成。据目前权威数据统计，三分之一的癌症中都有 Hedgehog 信号的异常激活。跟 Hedgehog 信号通路异常激活相关的癌症，根据 Hedgehog 信号通路在癌症中激活形式的不同分为三种类型：突变导致的 I 型，如痣样基底细胞癌综合征、基底细胞癌、髓母细胞癌、横纹肌肉瘤等；配体自分泌依赖的 II 型，如小细胞肺癌、胰腺癌、食管癌、胃癌、胆管癌、结肠癌、前列腺癌、乳腺癌、黑色素瘤等；配体旁分泌依赖的 III 型，如前列腺癌、胰腺癌、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、白血病等。

[0006] Hedgehog 信号通路还和癌症的骨转移和肿瘤干细胞的维持和分化密切相关。乳腺癌、肺癌、肾癌、结肠癌和前列腺癌都倾向于骨转移,在乳腺癌中 Hedgehog 信号能激活上调 PTHrP, PTHrP 能诱导破骨细胞的形成而促进骨吸收,为癌细胞骨转移提供基础。Hedgehog 信号还能激活许多重要的上皮间充质转化调节因子如 :Snail, Slug, Twist2, Zeb1, Zeb2, Foxc2, 上皮间充质转化是癌症转移的重要标志性特征之一。癌症的生长和传播被认为可能依赖于一小群癌干细胞,癌干细胞具有自我更新和多潜能分化的能力,而且这些细胞对化疗和放疗耐受,被认为是癌症复发的主要原因之一。在胶质瘤,乳腺癌,前列腺癌、多发性骨髓瘤和慢性髓细胞样白血病中发现 Hedgehog 信号通路能直接或间接激活上调一系列重要的干细胞标记分子如 :Bmi1, Lgr5, CD44, CD133,从而参与癌干细胞的诱导和维持。

[0007] 综上所述, Hedgehog 信号通路以多种多样的形式参与众多癌症的形成,所以知道每种癌症中 Hedgehog 通路参与的方式对于癌症的治疗和抗癌药物研发非常重要,尤其针对 Hedgehog 信号通路的抑制剂作为抗癌药的药物研发。Hedgehog 信号通路作为抗癌治疗的靶点已受到广泛重视,并且已发现许多该信号通路的抑制剂,其中大部分都针对 Smo 而发挥作用。其中, Roche 公司的 GDC-0449 (又称 vismodegib, 商品名 Erivedge), 是一种小分子靶向 Smo 抑制剂, FDA 已于 2012 年 1 月份批准其用于治疗局部晚期和已转移的基底细胞癌,是批准用于治疗转移基底细胞癌的第二个药物。但该药在临床研究中治疗髓母细胞瘤病人时,发现 Smo 出现突变而产生耐药性。所以迫切需要研发其它作用机制的新型 Hedgehog 信号通路抑制剂用于治疗相关癌症。

[0008] 现有技术中未见茜草科类型环肽作为 Hedgehog 信号通路抑制剂及用于治疗相关癌症的报道。

[0009] 茜草科类型环肽在茜草科植物中的分离纯化较为困难,最重要的原因是茜草属植物中富含蒽醌类色素,且环肽含量较低。近年从茜草属植物中分离环肽类成分已公开发表如下方法:(1) 茜草科茜草属植物小红参的根用甲醇提取后,甲醇浸膏加水混悬后用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇依次萃取,合并乙酸乙酯和正丁醇部分依次用正反相硅胶柱层析, Sephadex LH-20 凝胶柱层析, HPLC 等技术分离纯化,得到系列环肽。参见 :Fan, J. T. et al. Rubiyunnanins C-H, cytotoxic cyclic hexapeptides from *Rubia yunnanensis* inhibiting nitric oxide production and NF- κ B activation. *Bioorganic&medicinal Chemistry*, 2010, 18, 8226-8234。其缺点在于萃取对富集环肽类化合物作用不明显,工作量大且效率低。(2) 茜草科茜草属植物茜草的根用甲醇提取后,甲醇浸膏经 HP-20 大孔树脂、硅胶、活性炭、氨丙基键合硅胶色谱柱层析得到环肽富集部分。此环肽富集部分用甲醇重结晶,再结合各种层析材料包括 HPLC 对结晶或母液进行分离纯化,得到一系列环肽。参见 :Hitotsuyanagi, Y. et al. Isolation, structure determination, and synthesis of allo-RA-V and neo-RA-V, RA-series bicyclic peptides from *Rubia cordifolia* L. *Chemistry-A European Journal* 2012, 18, 2839 - 2846。其缺点在于活性炭对样品的吸附性强,氨丙基键合硅胶材料价格较贵,实验室和工业上不常用,甲醇重结晶技术可控性和重现性不好。

发明内容 :

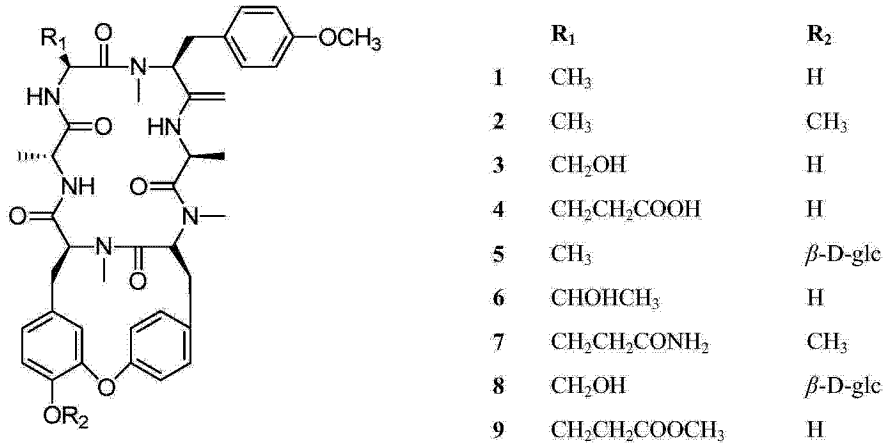
[0010] 针对现有技术存在的上述不足之处,本发明的目的在于提供一类茜草科类型环肽

化合物作为新型 Hedgehog 信号通路抑制剂;提供制备该类化合物的方法;本发明的目的还在于提供以茜草科类型环肽化合物为有效成分的药物组合物;以及在其制备治疗和预防 Hedgehog 信号通路异常激活的相关癌症的药物中的应用。

[0011] 为了实现本发明的上述目的,本发明提供了如下技术方案:

[0012] 用如下结构式所示的茜草科类型环肽作为 Hedgehog 信号通路抑制剂,

[0013]



[0014] 药物组合物,其中含有治疗有效量的上述结构式所示的茜草科类型环肽化合物 RA-V (1)、RA-VII (2)、RA-I (3)、RA-XI (4)、RA-XII (5)、RA-XXII (6)、RA-XXIII (7)、RY-II (8) 和 Rubiyunnanin C (9) 或其药理学上容许的盐和药学上可接受的载体。

[0015] 所述的茜草科类型环肽或其药理学上容许的盐在制备 Hedgehog 信号通路抑制剂中的应用。

[0016] 所述的茜草科类型环肽或其药理学上容许的盐在制备治疗与预防 Hedgehog 信号通路异常激活的相关癌症的药物中的应用,所述的癌症为基底细胞癌、髓母细胞瘤、横纹肌肉瘤、痣样基底细胞癌综合征、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、转移性前列腺癌、胰腺癌、软骨肉瘤、骨肉瘤、黑色素瘤、神经胶质瘤、乳腺癌、卵巢癌、食道癌、胃癌、结肠癌、胆管癌、肝癌、膀胱癌、血管瘤、慢性髓细胞性白血病、急性淋巴细胞性白血病、多发性骨髓瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤。

[0017] 本发明还提供了制备如上所述的茜草科类型环肽化合物 RA-V (1)、RA-VII (2)、RA-I (3)、RA-XI (4)、RA-XII (5)、RA-XXII (6)、RA-XXIII (7)、RY-II (8) 和 Rubiyunnanin C (9) 的方法,取金剑草 (*Rubia alata* Wall. in Roxb.) 的根茎,经干燥、粉碎后,用甲醇回流提取 3 次,时间为 2-3 小时,提取液经减压浓缩得总浸膏,将总浸膏经硅胶柱层析,用 100:0, 10:1, 8:2, 7:3, 0:100 的氯仿 / 甲醇梯度洗脱,结合环肽 TLC 检测方法合并其中的 10:1 和 8:2 含有环肽的部分,以下的每一步骤都须结合环肽 TLC 检测方法来进行分离纯化,合并后的环肽部位再次经硅胶柱层析,用 70:1-8:2 的氯仿 / 甲醇梯度洗脱,合并含有环肽部位,得总环肽部位;总环肽部位继续经硅胶柱层析,用 30:1-1:1 的氯仿 / 丙酮梯度洗脱,按含环肽的点不同合并为 3 个组分 Fr. 1 - Fr. 3; Fr. 1 组分经硅胶柱层析,7:3-0:1 的石油醚 / 丙酮梯度洗脱,富集含环肽部位 Fr. 1-1, Fr. 1-1 组分经 Sephadex LH-20 层析,1:1 的氯仿 / 甲醇为洗脱剂,所富集的含有环肽的部分经 ODS HPLC 制备柱纯化,38% 乙腈和 4% 三氟乙酸为洗脱剂,得到 RA-V (1), RA-VII (2), RA-XXII (6), RA-XXIII (7), Rubiyunnanin C (9); Fr. 2

组分经硅胶柱层析,30:1-1:1 的氯仿 / 丙酮梯度洗脱,富集含环肽部位经 Sephadex LH-20 层析,1:1 的氯仿 / 甲醇为洗脱剂,合并含环肽部位 Fr. 2-1 ;Fr. 2-1 组分经 RP-18 柱层析,20%-90%的甲醇 / 水梯度洗脱,得到 2 个亚组分 Fr. 2-1-1 和 Fr. 2-1-2,其中 Fr. 2-1-1 经 ODS HPLC 制备柱纯化,27% 乙腈和 4%三氟乙酸为洗脱剂,得到 RA-I (3), RA-XI (4);Fr. 2-1-2 经 ODS HPLC 制备柱纯化,23% 乙腈和 4%三氟乙酸为洗脱剂,得到 RA-XII (5);Fr. 3 组分经硅胶柱层析,20:1-8:2 的氯仿 / 甲醇梯度洗脱,富集含环肽部位经 Sephadex LH-20 层析,1:1 的氯仿 / 甲醇为洗脱剂,合并含环肽部位 Fr. 3-1 ;Fr. 3-1 组分经 ODS HPLC 制备柱纯化,20% 乙腈和 4%三氟乙酸为洗脱剂,得到 RY-II (8)。

[0018] 本发明的茜草科类型环肽还可以联合一种或多种附加的疗法如放射疗法,或化疗法如顺铂、卡铂、长春新碱、紫杉醇、环磷酰胺、阿霉素化疗,或联合抗体药、外科手术和 / 或联合一种或多种其它药物治疗与预防 Hedgehog 信号通路异常激活的相关癌症,也就是在制备治疗与预防 Hedgehog 信号通路异常激活的相关癌症的药物中的应用,其中所述的癌症为基底细胞癌、髓母细胞瘤、横纹肌肉瘤、痣样基底细胞癌综合征、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、转移性前列腺癌、胰腺癌、软骨肉瘤、骨肉瘤、黑色素瘤、神经胶质瘤、乳腺癌、卵巢癌、食道癌、胃癌、结肠癌、胆管癌、肝癌、膀胱癌、血管瘤、慢性髓细胞性白血病、急性淋巴细胞性白血病、多发性骨髓瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤。

[0019] 本发明对茜草科茜草属植物金剑草进行了系统的环肽化学成分研究,利用多种分离纯化手段,包括正反相硅胶柱层析, Sephadex LH-20 凝胶层析, HPLC 制备等,从中获得了一系列茜草科类型环肽。之后在稳定转染了能对 Hh 信号特异性相应的报告基因系统的 Shh-Light II 细胞上,以 SAG 激活,采用萤光素酶双报告基因分析系统,筛选了环肽类成分对 Hedgehog 信号通路的抑制活性。发现其中 RA-V (1)、RA-VII (2)、RA-I (3)、RA-XI (4)、RA-XII (5)、RA-XXII (6)、RA-XXIII (7)、RY-II (8) 和 Rubiyunnanin C (9) 为新型 Hedgehog 信号通路抑制剂。

[0020] 本发明的所述茜草科类型环肽或其药理学上容许的盐,可以列举例如与盐酸、硝酸、硫酸、磷酸、氢溴酸等无机酸,或者马来酸、富马酸、酒石酸、乳酸、柠檬酸、乙酸、甲磺酸、对 - 苯甲磺酸、己二酸、棕榈酸、单宁酸等有机酸,锂,钠、钾等碱金属,钙、镁等碱土金属,赖氨酸等碱性氨基酸成的盐。

[0021] 本发明所述的治疗癌症的药物组合物,由茜草科类型环肽化合物与药学上可接受的载体制备的药物剂型包括片剂、胶囊、口服液、针剂、注射用冻干剂或粉针剂等。由于茜草科类型环肽可从金剑草以及同属植物中提取分离,而片剂、胶囊、口服液、针剂、注射用冻干剂或粉针剂等药物剂型的制备也是本领域的常规知识。因此,由茜草科类型环肽化合物与相应载体制备的各种药物剂型也能够由本领域技术人员实现。

[0022] 上文中所述的药学上可接受的载体是指药学领域常规的药物载体,例如:稀释剂、赋形剂如水等,填充剂如淀粉、蔗糖等;黏合剂如纤维素衍生物、藻酸盐、明胶和聚乙烯吡咯烷酮;湿润剂如甘油;崩解剂如琼脂、碳酸钙和碳酸氢钠;吸收促进剂如季铵化合物;表面活性剂如十六烷醇;吸附载体如高岭土和皂黏土;润滑剂如滑石粉、硬脂酸钙和硬脂酸镁、以及聚乙二醇等。另外还可以在组合物中加入其它辅剂如香味剂、甜味剂等。

[0023] 本发明化合物可以以组合物的形式通过口服、鼻吸入、直肠或肠胃外给药的方式施用于需要这种治疗的患者。用于口服时,可将其制成常规的固体制剂如片剂、粉剂、粒剂、

胶囊等,制成液体制剂如水或油悬浮剂或其他液体制剂如糖浆、酞剂等;用于肠胃外给药时,可将其制成注射用的溶液、水或油性悬浮剂等。本发明药物组合物的各种剂型可以按照药学领域的常规生产方法制备。例如使活性成分与一种或多种载体混合,然后将其制成所需的剂型。

[0024] 本发明的药物组合物优选含有重量比为 0.1%~99.5%的活性成分,最优选含有重量比为 0.5%~95%的活性成分。

[0025] 本发明化合物的施用量可根据用药途径、患者的年龄、体重、所治疗的疾病的类型和严重程度等变化,其日剂量可以是 0.01~10mg/kg 体重,优选 0.1~5mg/kg 体重。可以一次或多次施用。

附图说明:

[0026] 图 1 为本发明的金剑草中茜草科类型环肽的制备方法流程图;

[0027] 图 2 为本发明的茜草科类型环肽抑制 Hedgehog 信号通路靶基因 Gli1mRNA 转录水平的活性实验;

[0028] 图 3 为本发明的茜草科类型环肽抑制 Hedgehog 信号通路靶基因 Ptch1mRNA 转录水平的活性实验。

具体实施方式:

[0029] 下面结合附图,用本发明的实施例来进一步说明本发明的实质性内容,但并不以此来限定本发明。根据本发明的实质对本发明进行的改进都属于本发明的范围。

[0030] 实施例 1:

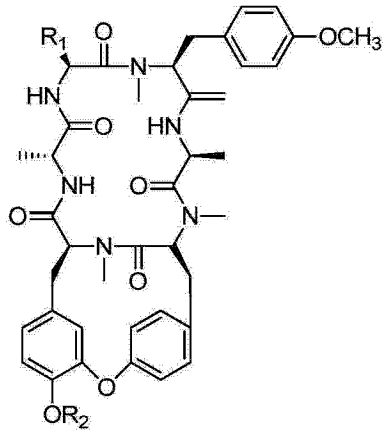
[0031] 茜草科类型环肽 RA-V (1)、RA-VII (2)、RA-I (3)、RA-XI (4)、RA-XII (5)、RA-XXII (6)、RA-XXIII (7)、RY-II (8) 和 Rubiyunnanin C (9) 的制备方法:

[0032] 取金剑草的根茎(10kg),经干燥、粉碎后,用甲醇回流提取 3 次(30L×3 次),时间为 3h、3h 和 2h。提取液经减压浓缩得总浸膏 1.3kg。将总浸膏经硅胶柱层析,用氯仿/甲醇梯度洗脱(100:0,10:1,8:2,7:3,0:100),结合环肽 TLC 检测方法合并其中的 10:1 和 8:2 含有环肽的部分。以下的每一步骤都须结合环肽 TLC 检测方法来进行分离纯化。合并后的环肽部分(527g)再次经硅胶柱层析,用氯仿/甲醇(70:1-8:2)梯度洗脱,合并含有环肽部位,得总环肽部位(259g)。总环肽部位继续经硅胶柱层析,用氯仿/丙酮(30:1-1:1)梯度洗脱,按含环肽的点不同合并为 3 个组分 Fr. 1 - Fr. 3。Fr. 1 (24g) 组分经硅胶柱层析,石油醚/丙酮(7:3-0:1)梯度洗脱,富集含环肽部位 Fr. 1-1, Fr. 1-1 (2.7g) 组分经 Sephadex LH-20 层析,氯仿/甲醇(1:1)为洗脱剂,所富集的含有环肽的部分经 ODS HPLC 制备柱纯化,38% 乙腈和 4% 三氟乙酸为洗脱剂,得到 RA-V (1) (106mg), RA-VII (2) (30mg), RA-XXII (6) (1.3mg), RA-XXIII (7) (9mg), Rubiyunnanin C (9) (31mg)。Fr. 2 (30g) 组分经硅胶柱层析,氯仿/丙酮(30:1-1:1)梯度洗脱,富集含环肽部位经 Sephadex LH-20 层析,氯仿/甲醇(1:1)为洗脱剂,合并含环肽部位 Fr. 2-1。Fr. 2-1 (2.4g) 组分经 RP-18 柱层析,20%-90% 的甲醇/水梯度洗脱,得到 2 个亚组分(Fr. 2-1-1 - Fr. 2-1-2)。Fr. 2-1-1(800mg) 亚组分经 ODS HPLC 制备柱纯化,27% 乙腈和 4% 三氟乙酸为洗脱剂,得到 RA-I(3)(100mg), RA-XI (4) (460mg)。Fr. 2-1-2 (430mg) 亚组分经 ODS HPLC 制备柱纯化,23% 乙腈和 4% 三

氟乙酸为洗脱剂,得到 RA-XII (5) (320mg)。Fr. 3 (13g) 组分经硅胶柱层析,氯仿/甲醇 (20:1-8:2) 梯度洗脱,富集含环肽部位经 Sephadex LH-20 层析,氯仿/甲醇 (1:1) 为洗脱剂,合并含环肽部位 Fr. 3-1。Fr. 3-1 (30mg) 组分经 ODS HPLC 制备柱纯化,20% 乙腈和 4% 三氟乙酸为洗脱剂,得到 RY-II (8) (12mg)。

[0033] 上述化合物的结构式如下所示:

[0034]



	R ₁	R ₂
1	CH ₃	H
2	CH ₃	CH ₃
3	CH ₂ OH	H
4	CH ₂ CH ₂ COOH	H
5	CH ₃	β -D-glc
6	CHOHCH ₃	H
7	CH ₂ CH ₂ CONH ₂	CH ₃
8	CH ₂ OH	β -D-glc
9	CH ₂ CH ₂ COOCH ₃	H

[0035] 实施例 2:

[0036] 本发明的茜草科类型环肽 RA-V (1)、RA-VII (2)、RA-I (3)、RA-XI (4)、RA-XII (5)、RA-XXII (6)、RA-XXIII (7)、RY-II (8) 和 Rubiyunnanin C (9) 在 Shh Light II 细胞中以 SAG (Smo 激动剂) 激活, 系统检测所有环肽对 Hedgehog 信号通路的抑制活性。实验原理、方法和结果如下:

[0037] 实验原理: 双荧光素酶报告基因是检测信号通路活性常用的系统, 荧光素在荧光素酶催化下发出荧光, 通过荧光发光微孔板读数仪检测发光强度体现信号通路活性的强弱。Shh Light II 细胞是在 NIH3T3 成纤维细胞中稳定转染了两个荧光素酶报告基因, 一个是 Gli 依赖的萤火虫荧光素酶 (8xGliBS-Firefly Luciferase) 特异反映 Hedgehog 通路信号的强弱, 另一个是持续激活的海肾荧光素酶 (TK-Renilla Luciferase) 作为内参。SAG 是针对 Smo 特异的激动剂, Shh light II 细胞在 SAG 激活下能高表达萤火虫荧光素酶而体现出高强度的荧光, 当有特异 Hedgehog 信号通路的抑制剂时荧光被减弱。

[0038] 实验方法: (1) 细胞培养: Shh Light II 细胞 (购自 ATCC) 的培养基: DMEM 含有 10% 新生牛血清, 400 μ g/mL geneticin, 150 μ g/mL zeocin, 100U/mL penicillin, 和 0.1mg/mL streptomycin。Shh Light II 长到 70-80% 汇合度时就需要传代, 尽量不要长满。(2) 化合物处理: 做 Hedgehog 信号通路抑制剂活性筛选时, 将 Shh Light II 细胞传到白壁透明底的 96 孔板中, 每孔 10,000 个细胞, 三天后达到最大密度。换上含 0.5% 血清的 DMEM 培养基同时加上 100nM 的 SAG 和环肽, 每孔 150 μ L 培养基, 环肽以 10 μ M, 3 μ M, 1 μ M, 0.3 μ M, 0.1 μ M 类似这样的梯度稀释, 每个样品三孔一组。(3) 荧光素酶活性检测: 30 小时后从培养箱取出 96 孔板, 吸去培养基, 每孔加 50 μ L PLB 裂解液, 在震荡仪上充分裂解 30 分钟。在荧光发光微孔板读数仪 Fluoroskan Ascent FL (Thermo Fisher) 上, 通过软件设定程序每孔分别自动加 50 μ L 荧光底物: 萤火虫荧光素和海肾荧光素, 并分别测发光强度。荧光素底物采用的是 Promega 公司的双报告基因试剂盒。(4) 半效抑制浓度 IC₅₀ 的计算: 检测到的萤火虫荧

光素发光强度除以海肾荧光素的发光强度的比值(Firefly/Renilla)作为 Hedgehog 信号通路的信号强弱值。在数据处理软件 Graphpad Prism5 软件中用四参数对数非线性回归分析,分别拟合出每个环肽的剂量-效应曲线,以 Control 未激活组为 0%,SAG 激活组为 100%,软件自动计算出 IC₅₀ 值。

[0039] 实验结果(见表 1):

[0040] 表 1 茜草科类型环肽 1-9 对 Hedgehog 信号通路的抑制作用

[0041]

compound	1	2	3	4	5	6	7	8	9
IC ₅₀ (μM)	0.00124	0.00168	35.23	1.02	1.39	0.87	0.17	2.25	0.78

[0042] 实验结果表明,化合物 1-9 具有显著地抑制 Hedgehog 信号通路的活性,其中 RA-V (1)和 RA-VII (2)活性最强,IC₅₀ 值为 1nM 左右,比已上市的 Hedgehog 抑制剂 GDC-0449 还要强。不同结构的环肽活性不同,体现其结构和活性上是对应的,提示环肽作用靶点的特异性,所以茜草科类型环肽为一类新型的 Hedgehog 信号通路天然抑制剂。

[0043] 实施例 3:

[0044] 本发明的茜草科类型环肽 RA-V (1)、RA-VII (2)、RA-I (3)、RA-XI (4)、RA-XII (5)、RA-XXII (6)、RA-XXIII (7)、RY-II (8) 和 Rubiyunnanin C (9) 在 NIH3T3 细胞中以 SAG 激活,通过荧光定量 PCR 检测所有环肽对 Hedgehog 信号通路的抑制活性。实验原理、方法和结果如下:

[0045] 实验原理:荧光定量 PCR 是检测基因 mRNA 含量最为准确的方法之一。Hedgehog 信号通路的靶基因 Gli1 和 Ptch1 同时也是该通路中的重要成分,通过荧光定量 PCR 检测 Hedgehog 通路靶基因的 Gli1 和 Ptch1 mRNA 的含量是反映该通路激活程度的重要指标之一。

[0046] 实验方法:(1)细胞培养:NIH3T3 细胞培养在含 10% 新生牛血清的 DMEM 中,NIH3T3 细胞同样不能长的太密,70-80% 时就传代。(2)化合物处理:将细胞传到 6 孔板中,每孔 2x10⁵ 个细胞,长到最大密度后,换为 0.5% 血清的 DMEM,同时加上 100nM 的 SAG 和相应浓度的各个环肽,每孔 2mL 培养基,孵育 30 小时后提取 RNA。(3)细胞总 RNA 的提取:吸去培养基,用 PBS 洗一遍细胞,洗的过程小心别吹起细胞,再吸干净 PBS,每孔加 1mL Trizol 反复吹打几次充分裂解细胞,将 Trizol 转移到新的 1.5mL EP 管。再根据 Trizol 提取 RNA 的标准操作方法纯化出总 RNA,并测浓度。(4)mRNA 逆转录为 cDNA:每个样品取 1μg 的 RNA,用 Fermentas 的逆转录试剂盒在 PCR 仪上反应得到 cDNA,再用水稀释 5 倍。(5)荧光定量 PCR 检测 mRNA 水平:以 cDNA 为模板,加相应 Hedgehog 通路的靶基因 Gli1, Ptch1 和内参基因 Gapdh 特异的引物,用 Roche 的 LightCycler480SYBR Green I Master 试剂盒混合加好后,在 Roche 的 LightCycler480 荧光定量 PCR 仪上检测,每个样品四个孔重复。引物由 TAKARA 公司合成,PAGE 方式纯化,引物序列如下:

[0047] Gapdh 正向引物:5' -TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3',

[0048] Gapdh 反向引物:5' -TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3',

[0049] Gli1 正向引物:5' -CCAAGCCAACTTTATGTCAGGG-3'

[0050] Gli1 正向引物:5' -AGCCCGCTTCTTTGTTAATTTGA-3'

[0051] Ptch1 正向引物:5' -CGAGACAAGCCCATCGACATTA-3'

[0052] Ptch1 正向引物 :5' -AGGGTCGTTGCTGACCCAAG-3'

[0053] (6)数据分析 :用 $2^{-\Delta\text{CT}}$ 计算出 mRNA 的相对量,在 Graphpad Prism5 软件中作出柱状图,以 Control 未激活组为 1。

[0054] 实验结果见图 2。实验结果表明,化合物 1-9 具有显著地抑制 Hedgehog 信号通路的活性,其中 RA-V (1) 和 RA-VII (2) 活性最强,20nM 时就能彻底抑制 Hedgehog 信号通路靶基因 Gli1mRNA 的转录水平。不同结构的环肽活性不同,体现其结构和活性上是对应的,提示环肽作用靶点的特异性,所以茜草科类型环肽为一类新型的 Hedgehog 信号通路天然抑制剂。

[0055] 实验结果见图 3。实验结果表明,化合物 1-9 具有显著地抑制 Hedgehog 信号通路的活性,其中 RA-V (1) 和 RA-VII (2) 活性最强,20nM 时就能彻底抑制 Hedgehog 信号通路靶基因 Ptch1mRNA 的转录水平。不同结构的环肽活性不同,体现其结构和活性上是对应的,提示环肽作用靶点的特异性,所以茜草科类型环肽为一类新型的 Hedgehog 信号通路天然抑制剂。

[0056] 实施例 4 :

[0057] 实施例 1 所得化合物 1-9,加入 4% 的硫酸乙醇溶液,PH=4,过滤,干燥,制成硫酸盐化合物 1-9。

[0058] 实施例 5 :

[0059] 实施例 1 所得化合物 1-9,加入 4% 的盐酸溶液,PH=4,过滤,干燥,制成盐酸盐化合物 1-9。

[0060] 实施例 6 :

[0061] 实施例 1 所得化合物 1-9,加入 4% 的酒石酸溶液,PH=4,过滤,干燥,制成酒石酸盐化合物 1-9。

[0062] 实施例 7 :

[0063] 实施例 1 所得化合物 1-9,加入 4% 的柠檬酸溶液,PH=4,过滤,干燥,制成柠檬酸盐化合物 1-9。

[0064] 实施例 8 :

[0065] 片剂 :实施例 1 所得化合物 1-9 或实施例 4-7 所得的盐 10mg,乳糖 180mg,淀粉 55mg,硬脂酸镁 5mg。

[0066] 制备方法 :将化合物或其盐、乳糖和淀粉混和,用水均匀湿润、把湿润后的混合物过筛并干燥,再过筛,加入硬脂酸镁,然后将混合物压片,每片重 250mg,化合物含量为 10mg。

[0067] 实施例 9 :

[0068] 安瓿剂 :实施例 1 所得化合物 1-9 或实施例 4-7 所得的盐 2mg,氯化钠 10mg。

[0069] 制备方法 :将化合物或其盐和氯化钠溶解于适量的注射用水中,过滤所得溶液,在无菌条件下装入安瓿瓶中。

[0070] 实施例 10 :

[0071] 注射用冻干剂 :实施例 1 所得化合物 1-9 或实施例 4-7 所得的盐 10mg,碳酸氢钠 2mg,甘露醇 252mg。

[0072] 制备方法 :将碳酸氢钠、甘露醇,加注射用水溶解,加活性炭吸附 30min 除热原,

过滤除去活性炭,在滤液中加入化合物或其盐,超声处理使溶解,用 1N 盐酸调节 PH 为 5.0-7.0,微孔滤膜滤过,加注射用水,分装,冷冻干燥,上塞,轧盖,即得。

[0073] 实施例 11:

[0074] 胶囊剂:实施例 1 所得化合物 1-9 或实施例 4-7 所得的盐 10mg,乳糖 187mg,硬脂酸镁 3mg。

[0075] 制备方法:将化合物或其盐与助溶剂混和,过筛,均匀混合,把得到的混合物装入硬明胶胶囊,每个胶囊重 200mg,活性成分含量为 10mg。

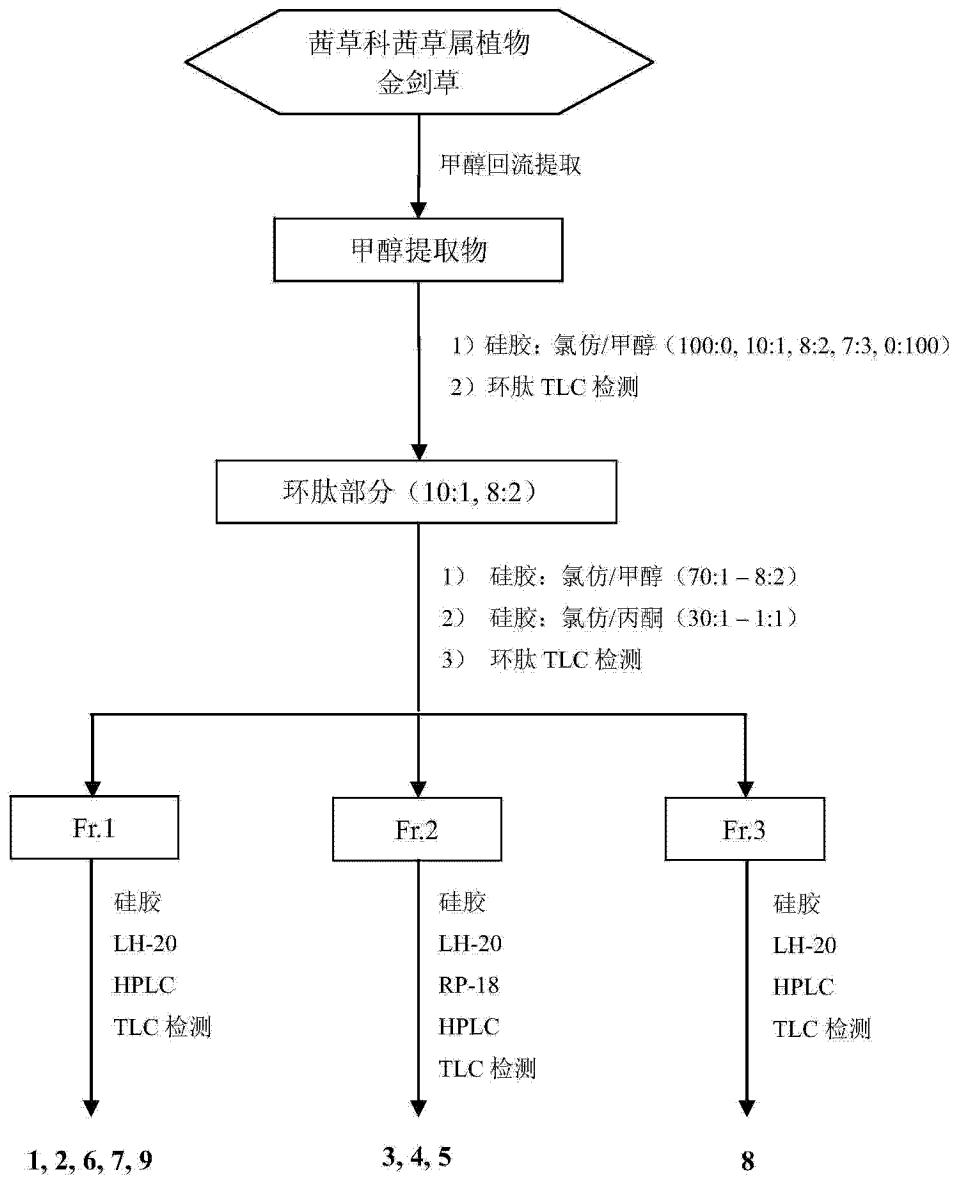


图 1

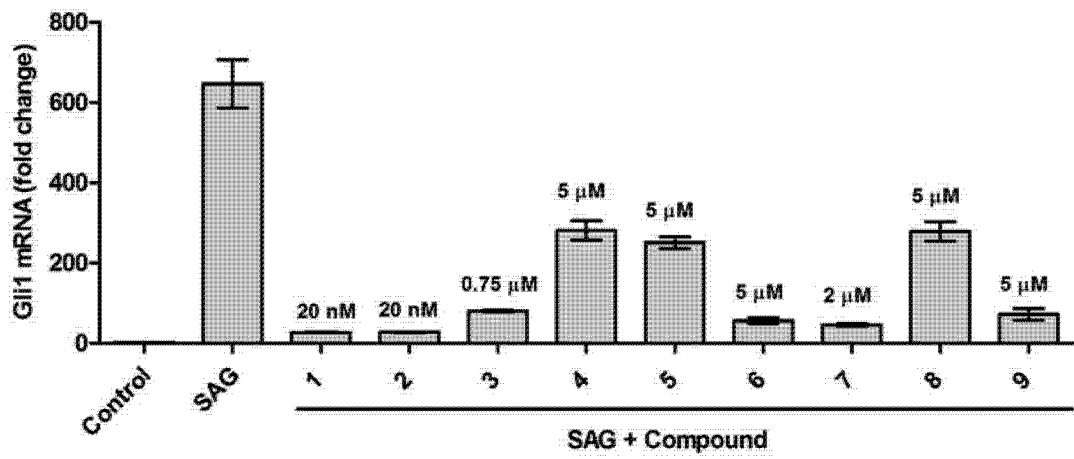


图 2

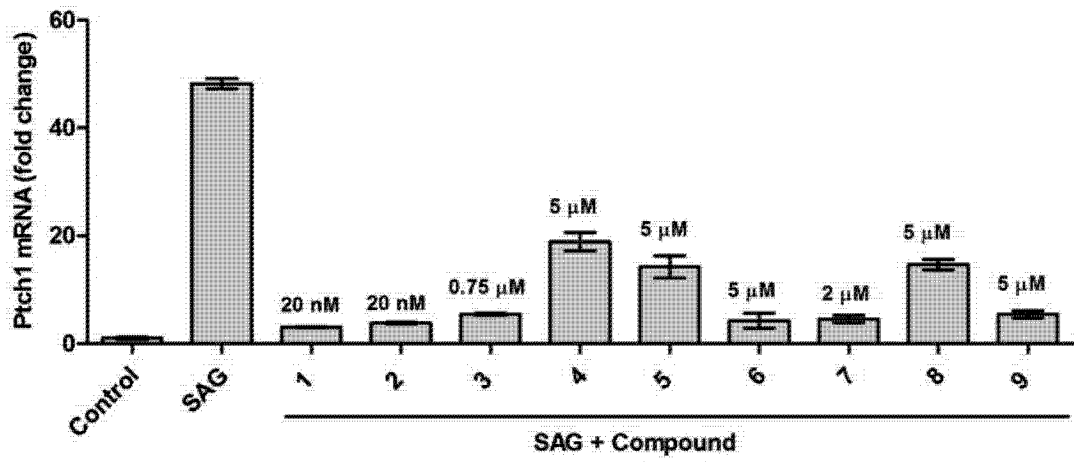


图 3