



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103819437 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 28

(21) 申请号 201410085456. 2

(22) 申请日 2014. 03. 10

(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

(72) 发明人 程永现 王心龙 方萍 吕青

(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.

C07D 307/94 (2006. 01)

A61K 31/343 (2006. 01)

A61P 13/12 (2006. 01)

A23L 1/30 (2006. 01)

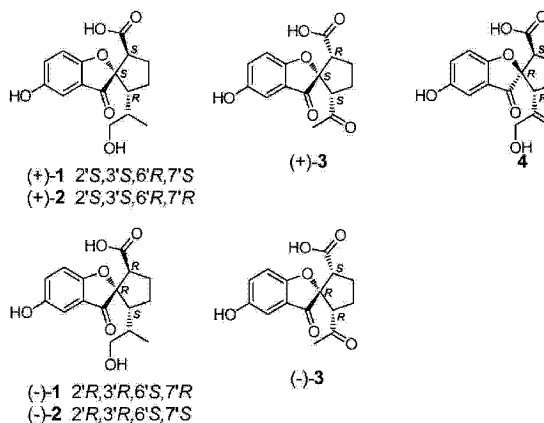
权利要求书1页 说明书8页 附图2页

(54) 发明名称

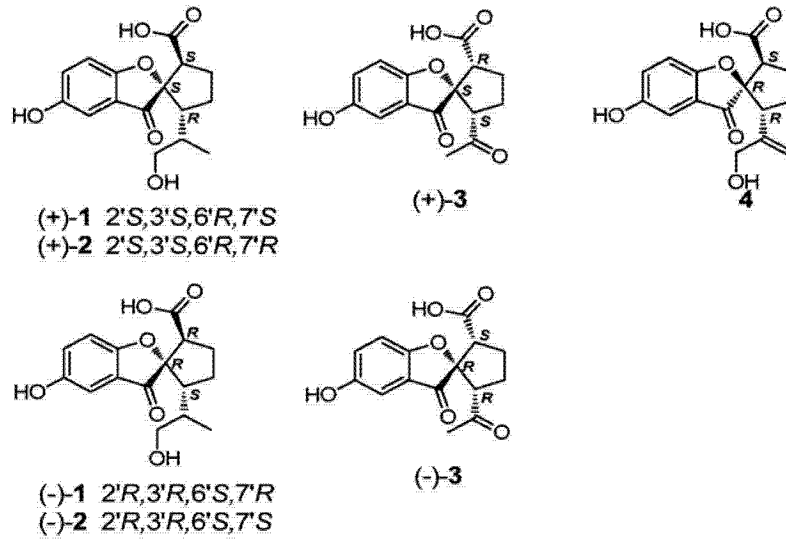
螺环赤芝素类化合物及其药物组合物和其应用

(57) 摘要

提供灵芝中获得的 7 个结构新颖的螺环杂萜化合物, 及其药物组合物, 它们的制备方法, 及其在制备治疗糖尿病性肾病或慢性肾病的药物或保健食品中的应用。本发明的化合物具有显著的抑制高糖诱导的大鼠肾系膜细胞株产生活性氧作用, 由于氧化应激在慢性肾病中普遍存在, 因此本发明提示该类化合物在慢性肾病药物中的应用前景。



1. 具有下述结构式所示的灵芝杂萜类化合物，



2. 制备权利要求 1 中的化合物的方法，取赤芝，粉碎，用 95% 乙醇回流提取 2h，合并提取液并减压回收溶剂得粗提取物，将粗提取物混悬于水中，然后用等体积乙酸乙酯萃取三次，合并萃取液，减压浓缩得乙酸乙酯萃取物，该萃取物经硅胶 200-300 目柱层析，氯仿-甲醇系统梯度 99:1, 98:2, 97:3, 96:4, 95:5, 94:6, 93:7, 92:8, 90:10, 85:15, 80:20, 50:50 洗脱，每种溶剂梯度为 1.5 倍柱体积，按照每份 500mL 收集得 7 个合并组份，其中组份 7 经 MCI gel CHP20P 柱层析，甲醇-水 (20 - 100%) 洗脱得 9 个亚组份，其中组份 7.2 经 Sephadex LH-20 (MeOH) 柱层析及反相 RP-18 柱层析 (甲醇-水, 35-50%)，最后经半制备 HPLC (甲醇-水, 40%)，依次得到化合物 4, 1, 2, 组分 7.3 经反相 RP-18 柱层析 (甲醇-水, 40-50%) 得到化合物 3，化合物 1-3 均为消旋体，它们经手型材料 HPLC 拆分获得光学纯对映体，条件分别如下：化合物 1：固定相：Daicel Chiralpak(IC)；流动相：正己烷-乙醇, 85:15；流速：1mL/min) 拆分为 (+)-1 and (-)-1.；化合物 2：固定相：Daicel Chiralpak(IC)；流动相：正己烷-乙醇, 80:20；流速：1mL/min) 拆分为 (+)-2 and (-)-2.；化合物 3：固定相：Daicel Chiralpak(AD-H)；流动相：正己烷-二氧六环, 90:10；流速：1mL/min) 拆分为 (+)-3 and (-)-3。

3. 治疗糖尿病肾病或慢性肾病的药物组合物，含有治疗有效量的权利要求 1 所述的化合物和药学上可接受的载体。

4. 权利要求 1 所述的化合物在制备治疗糖尿病肾病或慢性肾病的药物中的应用。

5. 权利要求 1 所述的化合物在制备治疗糖尿病肾病或慢性肾病的保健食品中的应用。

## 螺环赤芝素类化合物及其药物组合物和其应用

### 技术领域：

[0001] 本发明属于药物技术领域，具体地，涉及灵芝中结构新颖的螺环杂萜衍生物，及其药物组合物，它们的制备方法，及其在制备治疗糖尿病性肾病或慢性肾病的药物或保健食品中的应用。

### 背景技术：

[0002] 糖尿病肾病或慢性肾病的危害、病理机制及药物研究的方法和原理，本申请人在已公开的专利公布号：CN102153630A 中均有明确的描述。众所周知，现代饮食起居生活方式变化，加之环境污染，药物滥用等因素，导致全球范围内糖尿病并发症及慢性肾病如肾纤维化多发、高发，但目前这些疾病的临床有效治疗药物还比较缺乏。

[0003] 现代研究表明糖尿病肾病和肾病的发生发展是活性氧自由基密切相关的。正常情况下，自由基在机体内扮演信号分子，维持生理需要，但病理状态下，机体活性自由基产生过量，产生危害，自由基还可激活 NF- $\kappa$ B 通路，引发机体炎症。糖尿病肾病发病过程中，高糖易诱发活性氧过量产生，活性氧过量和炎症也是其它慢性肾病的主要病理特征。因此抑制活性氧，改善机体氧化应激状态将有助于肾病干预。

[0004] 灵芝是传统中药，在东亚及美国被承认和广泛应用。目前其已被收录于美国草药药典中。我国关于灵芝的保健品众多，表明其功能备受关注。深入研究过程中，本发明从灵芝 (*Ganoderma lucidum*) 中获得 7 个结构新颖的杂萜类成分，并发现其具有明显地抑制高糖诱导的肾系膜细胞产生活性氧作用。该发明是对中医药理论进行有效运用揭示灵芝科学内涵的又一例证。现有技术中未见有本发明的化合物及其具有糖尿病肾病或慢性肾病价值治疗前景的活性的相关报道。

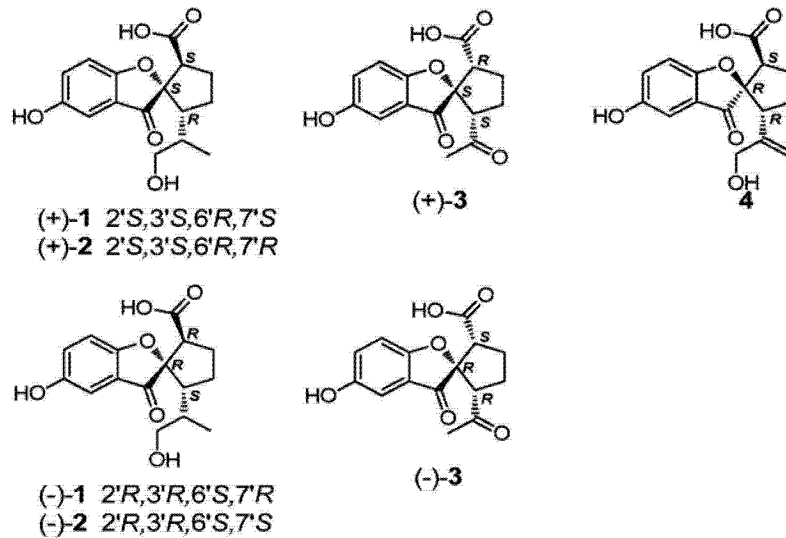
### 发明内容：

[0005] 本发明的目的在于提供灵芝中获得的 7 个结构新颖的螺环杂萜化合物，及其药物组合物，它们的制备方法，及其在制备治疗糖尿病性肾病或慢性肾病的药物或保健食品中的应用。

[0006] 本发明的上述目的是由下述的技术方案得以实现的：

[0007] 具有下述结构式的灵芝杂萜类化合物，

[0008]



[0009] 制备上述化合物的方法,取赤芝,粉碎,用95%乙醇回流提取2h,合并提取液并减压回收溶剂得粗提取物,将粗提取物混悬于水中,然后用等体积乙酸乙酯萃取三次,合并萃取液,减压浓缩得乙酸乙酯萃取物,该萃取物经硅胶200-300目柱层析,氯仿-甲醇系统梯度99:1,98:2,97:3,96:4,95:5,94:6,93:7,92:8,90:10,85:15,80:20,50:50洗脱,每种溶剂梯度为1.5倍柱体积,按照每份500mL收集得7个合并组份,其中组份7经MCI gel CHP20P柱层析,甲醇-水(20-100%)洗脱得9个亚组份,其中组份7.2经Sephadex LH-20(MeOH)柱层析及反相RP-18柱层析(甲醇-水,35-50%),最后经半制备HPLC(甲醇-水,40%),依次得到化合物4,1,2,组分7.3经反相RP-18柱层析(甲醇-水,40-50%)得到化合物3,化合物1-3均为消旋体,它们经手型材料HPLC拆分获得光学纯对映体,条件分别如下:化合物1:固定相:Daicel Chiralpak(IC);流动相:正己烷-乙醇,85:15;流速:1mL/min)拆分为(+)-1and(-)-1.;化合物2:固定相:Daicel Chiralpak(IC);流动相:正己烷-乙醇,80:20;流速:1mL/min)拆分为(+)-2and(-)-2.;化合物3:固定相:Daicel Chiralpak(AD-H);流动相:正己烷-二氧六环,90:10;流速:1mL/min)拆分为(+)-3and(-)-3。

[0010] 治疗糖尿病肾病或慢性肾病的药物组合物,含有治疗有效量的所述的化合物和药学上可接受的载体。

[0011] 所述的化合物在制备治疗糖尿病肾病或慢性肾病的药物或保健食品中的应用。

[0012] 更具体地,本发明制备上述化合物的方法为:取赤芝(*Ganoderma lucidum*)80kg,粉碎,用95%乙醇回流提取(2×360L×2h),合并提取液并减压回收溶剂得粗提取物,将粗提取物混悬于水中,然后用等体积乙酸乙酯萃取三次。合并萃取液,减压浓缩得乙酸乙酯萃取物1.1kg。该萃取物经硅胶柱层析(硅胶200-300目,7kg),氯仿-甲醇系统梯度洗脱(99:1,98:2,97:3,96:4,95:5,94:6,93:7,92:8,90:10,85:15,80:20,50:50),每种溶剂梯度为1.5倍柱体积,按照每份500mL收集)得7个合并组份。组份7(36g)经MCI gel CHP20P柱层析,甲醇-水(20-100%)洗脱得9个亚组份,其中组份7.2(1.3g)经Sephadex LH-20(MeOH)柱层析及反相RP-18柱层析(甲醇-水,35-50%),最后经半制备HPLC(甲醇-水,40%),依次得到化合物4(46mg),1(12mg),2(14mg)。组分7.3(930mg)经反相RP-18柱层析(甲醇-水,40-50%)得到化合物3(12mg)。化合物1-3均为消旋体,它们经手型材料

HPLC拆分获得光学纯对映体。条件分别如下：化合物1：固定相：Daicel Chiralpak(IC)；流动相：正己烷-乙醇，85:15；流速：1mL/min) 拆分为 (+)-1 (4.7mg) and (-)-1 (5.2mg)。化合物2：固定相：Daicel Chiralpak(IC)；流动相：正己烷-乙醇，80:20；流速：1mL/min) 拆分为 (+)-2 (5.8mg) and (-)-2 (6.1mg)。化合物3：固定相：Daicel Chiralpak(AD-H)；流动相：正己烷-二氧六环，90:10；流速：1mL/min) 拆分为 (+)-3 (5.5mg) and (-)-3 (5.5mg)。

[0013] 本发明化合物可以单独直接应用或组合应用，也可以与其它药物包括植物提取物组成复方的形式使用，可以使用不同的药用辅料，制成多种固体制剂和液体制剂。将本发明的药物组合物以单位体重服用量的形式使用。本发明的药物可经口服和注射两种形式给药。使用量可根据给药途径、患者的年龄、体重、所治疗疾病的类型和严重程度等变化进行一次或多次使用。

#### 附图说明：

[0014] 图1为本发明7个结构新颖的螺环杂萜化合物的结构式；

[0015] 图2为本发明化合物的绝对构型示意图；

[0016] 图3表示本发明化合物抑制高糖诱导的肾系膜细胞活性氧产生：\* $P < 0.05$  vs 正常糖；# $P < 0.05$  vs 高糖。

#### 具体实施方式：

[0017] 下面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简单改进都属于本发明的范围。

[0018] 实施例1：

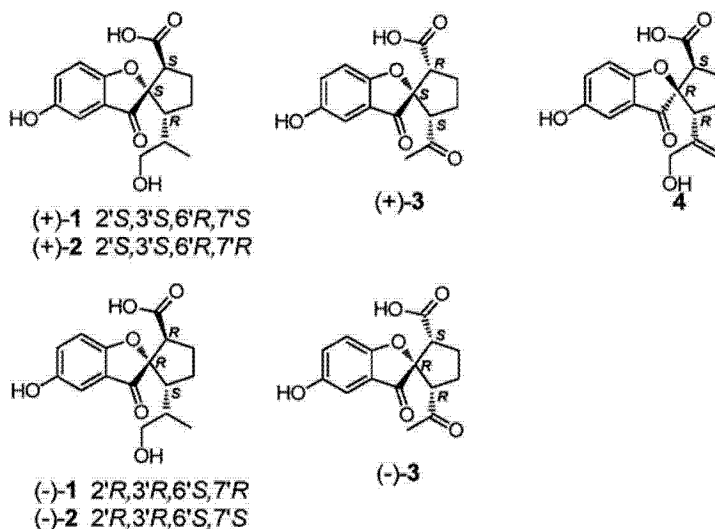
[0019] 化合物1-4的分离纯化：

[0020] 取赤芝(*Ganoderma lucidum*) 80kg，粉碎，用95%乙醇回流提取(2×360L×2h)，合并提取液并减压回收溶剂得粗提取物，将粗提取物混悬于水中，然后用等体积乙酸乙酯萃取三次。合并萃取液，减压浓缩得乙酸乙酯萃取物1.1kg。该萃取物经硅胶柱层析(硅胶200-300目，7kg)，氯仿-甲醇系统梯度洗脱(99:1, 98:2, 97:3, 96:4, 95:5, 94:6, 93:7, 92:8, 90:10, 85:15, 80:20, 50:50)，每种溶剂梯度为1.5倍柱体积，按照每份500mL收集) 得7个合并组份。组份7(36g)经MCI gel CHP20P柱层析，甲醇-水(20-100%)洗脱得9个亚组份，其中组份7.2(1.3g)经Sephadex LH-20(MeOH)柱层析及反相RP-18柱层析(甲醇-水，35-50%)，最后经半制备HPLC(甲醇-水，40%)，依次得到化合物4(46mg)，1(12mg)，2(14mg)。组分7.3(930mg)经反相RP-18柱层析(甲醇-水，40-50%)得到化合物3(12mg)。化合物1-3均为消旋体，它们经手型材料HPLC拆分获得光学纯对映体。条件分别如下：化合物1：固定相：Daicel Chiralpak(IC)；流动相：正己烷-乙醇，85:15；流速：1mL/min) 拆分为 (+)-1 (4.7mg) and (-)-1 (5.2mg)。化合物2：固定相：Daicel Chiralpak(IC)；流动相：正己烷-乙醇，80:20；流速：1mL/min) 拆分为 (+)-2 (5.8mg) and (-)-2 (6.1mg)。化合物3：固定相：Daicel Chiralpak(AD-H)；流动相：正己烷-二氧六环，90:10；流速：1mL/min) 拆分为 (+)-3 (5.5mg) and (-)-3 (5.5mg)。

[0021] 化合物的结构确证：

[0022] 化合物的结构式如下所示：

[0023]



[0024] 化合物 Spirolingzhines A-D(螺环灵芝素 A-D) 的结构鉴定数据:

[0025] Table1. The  $^1\text{H}$  NMR data ( $\delta$  in ppm).

	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	4 <sup>a</sup>
position	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)
2	6.94 (d, 2.7)	6.92 (d, 2.6)	7.04 (d, 1.7)	6.89 (d, 2.1)
3				
5	7.03 (d, 8.9)	7.00 (d, 8.8)	6.93 (d, 8.5)	6.95 (d, 8.9)
6	7.20 (dd, 8.9, 2.7)	7.18 (dd, 8.8, 2.6)	7.18 (dd, 8.5, 1.7)	7.15 (dd, 8.9, 2.1)
2'				
3'	3.22 (t, 8.7)	3.24 (t, 8.5)	3.41 (t, 8.9)	3.34 (overlap)
4'a	2.11 (m)	2.11 (m)	2.06 (overlap)	2.10 (m)
4'b	2.02 (m)	2.02 (m)	1.99 (dt, 13.6, 6.0)	
5'a	2.19 (m)	2.00 (m)	2.19 (m)	2.17 (m)
5'b	1.72 (m)	1.76 (m)	1.52 (m)	
6'	2.32 (ddd, 12.1, 9.2, 6.8)	2.38 (m)	3.46 (t, 8.9)	2.97 (m)
7'	1.75 m	1.62 (m)		
8'a	3.58 (dd, 10.7, 3.5)	3.15 (dd, 10.7, 5.7)	1.85 (s)	5.08 (s)
8'b	3.39 (dd, 10.7, 6.2)	3.03 (dd, 10.7, 7.1)		4.94 (s)
9'	0.62 (d, 6.7)	0.96 (d, 6.8)		3.82 (s)

[0027] Table2. The  $^{13}\text{C}$  NMR data.

	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	4 <sup>a</sup>
position	$\delta_C$ , mult	$\delta_C$ , mult	$\delta_C$ , mult	$\delta_C$ , mult
1	153.8 s	153.8 s	153.4 s	153.8 s
2	108.0 d	108.0 d	108.1 d	108.0 d
3	123.1 s	123.0 s	123.9 s	123.1 s
4	167.2 s	167.2 s	166.5 s	167.2 s
5	128.1 d	128.1 d	126.9 d	128.4 d
6	114.5 d	114.5 d	114.1 d	114.6 d
1'	205.4 s	205.8 s	201.1 s	204.5 s
2'	98.9 s	99.1 s	96.6 s	98.2 s
3'	57.8 d	58.0 d	54.3 d	56.0 d
4'	28.2 t	28.2 t	25.9 t	30.5 t
5'	30.5 t	28.3 t	25.9 t	27.8 t
6'	53.9 d	51.6 d	61.7 d	53.9 d
7'	36.7 d	36.0 d	203.3 s	145.8 s
8'	66.8 t	67.2 t	29.6 q	113.5 d
9'	17.3 q	15.2 q	170.3 s	65.4 t
10'	174.4 s	174.4 s		174.3 s

[0028]

[0029] Spirolingzhine A(1). yellowish gum;  $\{[\alpha]_D^{24}+27.8$  (c3.31, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}(\log \epsilon)$  370 (3.60), 254 (3.86), 220 (4.20) nm; CD (MeOH)  $\Delta \epsilon_{234}+5.51$ ,  $\Delta \epsilon_{327}+0.73$ ,  $\Delta \epsilon_{369}-2.25$ ; (+)-spirolingzhine A};  $\{[\alpha]_D^{24}-31.2$  (c2.63, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}(\log \epsilon)$  371 (3.60), 254 (3.87), 221 (4.20) nm; CD (MeOH)  $\Delta \epsilon_{234}-5.78$ ,  $\Delta \epsilon_{327}-1.27$ ,  $\Delta \epsilon_{369}+1.71$ ; (-)-spirolingzhine A}; EI-MS  $m/z$  306  $[M]^+$ ; HREI-MS  $m/z$  306.1105  $[M]^+$  (calcd for  $C_{16}H_{18}O_6$ , 306.1103).  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR data, see Table1 and Table2.

[0030] Spirolingzhine B(2). yellowish gum;  $\{[\alpha]_D^{24}+37.4$  (c0.65, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}(\log \epsilon)$  371 (3.52), 254 (3.79), 222 (4.11), 196 (3.88) nm; CD (MeOH)  $\Delta \epsilon_{232}+5.94$ ,  $\Delta \epsilon_{321}-2.16$ ,  $\Delta \epsilon_{366}+1.62$ ; (+)-spirolingzhine B};  $\{[\alpha]_D^{24}-43.2$  (c0.27, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}(\log \epsilon)$  371 (3.50), 254 (3.77), 220 (4.10), 196 (3.88) nm; CD (MeOH)  $\Delta \epsilon_{232}-5.01$ ,  $\Delta \epsilon_{321}+1.47$ ,  $\Delta \epsilon_{366}-1.78$ ; (-)-spirolingzhine B}; ESI-MS  $m/z$  329  $[M+Na]^+$ ; HRESI-MS  $m/z$  329.0993  $[M+Na]^+$  (calcd for  $C_{16}H_{18}NaO_6$ , 329.1001);  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR data, see Table1 and Table2.

[0031] Spirolingzhine C(3). yellowish gum;  $\{[\alpha]_D^{27}+22.9$  (c0.27, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}(\log \epsilon)$  369 (3.59), 254 (3.87), 219 (4.21) nm; CD (MeOH)  $\Delta \epsilon_{229}+7.46$ ,  $\Delta \epsilon_{284}-2.49$ ; (+)-spirolingzhine C};  $\{[\alpha]_D^{27}-29.5$  (c0.25, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}(\log \epsilon)$  369 (3.62), 254 (3.91), 219 (4.23) nm; CD (MeOH)  $\Delta \epsilon_{229}-6.71$ ,  $\Delta \epsilon_{284}+1.90$ ; (-)-spirolingzhine C}; ESI-MS  $m/z$  289  $[M-H]^-$ ; HRESI-MS  $m/z$  289.0718  $[M-H]^-$  (calcd for  $C_{15}H_{13}O_6$ , 289.0712);  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR data, see Table1 and Table2.

[0032] Spirolingzhine D(4). yellowish gum;  $[\alpha]_D^{27}+165.9$  (c2.36, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}(\log \epsilon)$  372 (3.62), 254 (3.90), 217 (4.22) nm; CD (MeOH)  $\Delta \epsilon_{234}+7.83$ ,  $\Delta \epsilon_{321}-3.45$ ,  $\Delta \epsilon_{367}+3.79$ ; EI-MS  $m/z$  304  $[M]^+$ ; HREI-MS  $m/z$  304.0956  $[M]^+$  (calcd for

$C_{16}H_{16}O_6$ , 304.0947);  $^1H$  and  $^{13}C$ NMR data, see Table 1 and Table 2.

[0033] 化合物的结构经 X-ray 单晶衍射得到进一步确证, 其数据如下:

[0034] Crystal data of (-)-1:  $C_{16}H_{18}O_6$ ,  $M=306.30$ , orthorhombic,  $a = 6.0152(5) \text{ \AA}$ ,  $b = 12.8178(9) \text{ \AA}$ ,  $c = 18.0567(13) \text{ \AA}$ ,  $\alpha = 90.00^\circ$ ,  $\beta = 90.00^\circ$ ,  $\gamma = 90.00^\circ$ ,  $V = 1392.20(18) \text{ \AA}^3$ ,  $T=100(2)K$ , space group  $P2_12_12_1$ ,  $Z=4$ ,  $\mu(\text{CuK}\alpha) = 0.941 \text{ mm}^{-1}$ , 7105 reflections measured, 2393 independent reflections ( $R_{\text{int}}=0.0571$ ). The final  $R_1$  values were 0.0491 ( $I > 2\sigma(I)$ ). The final  $wR(F^2)$  values were 0.1261 ( $I > 2\sigma(I)$ ). The final  $R_1$  values were 0.0496 (all data). The final  $wR(F^2)$  values were 0.1265 (all data). The goodness of fit on  $F^2$  was 1.100. Flack parameter = 0.0(2). The Hooft parameter is 0.11(10) for 916 Bijvoet pairs. The deposition number CCDC963799 for (-)-1 can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre via [www.ccdc.cam.ac.uk/data\\_request/cif](http://www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif).

[0035] 化合物 1-4 的绝对构型均参照下述文献方法, 采取下述参考文献 [1]-[5] 中量子化学计算的方法得以确证, 如图 2 所示。

[0036] [1] P. J. Stephens, N. Harada, Chirality 2010, 22, 229-233.

[0037] [2] T. Bruhn, A. Schaumlöffel, Y. Hemberger, G. Bringmann, SpecDis version 1.53. Würzburg, Germany: University of Würzburg; 2012

[0038] [3] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr. J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, Gaussian09, Revision C.01; Gaussian, Inc., Wallingford CT: 2010.

[0039] [4] T. Lu, F. Chen, J. Comput. Chem. 2012, 33, 580-592.

[0040] [5] M. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, J. Mol. Graph. 1996, 14, 33-38

[0041] 实施例 2:

[0042] 实施例 1 中化合物中的任一种, 按常规法加注射用水, 精滤, 灌封灭菌后可制成注射液。

[0043] 实施例 3:

[0044] 实施例 1 中化合物中的任一种, 将其溶于无菌注射用水中, 用无菌漏斗过滤, 分



装,低温冷冻干燥后无菌熔封即得粉针剂。

[0045] 实施例 4 :

[0046] 实施例 1 中化合物中的任一种,按常规法配以各种药用辅料可制成片剂。

[0047] 使用实施例 1 中化合物中的任一种作为药物活性成分,使用几种赋形剂作为制备组合药物片剂的辅料成分,按照一定比例配比制成每片含有药物成分 1-100mg 的片剂样品,表 1 给出普通片剂的配方比例。

[0048] 将一定数量实施例 1 中化合物中的任一种原料与赋形剂辅料制备成不同剂量片剂制剂(如表 1):将几种赋形剂辅料与原料药均匀混合,加入 1% 羟甲基纤维素钠溶液适量制成软料,过筛制粒,湿粒烘干并过筛整粒,加入硬脂酸镁和滑石粉混合均匀后压片即得。

[0049] 表 1 实施例 1 中化合物中的任一种组合药物片剂的原料药和辅料配方

[0050]

原辅料名称	配方用量						
	配方 1	配方 2	配方 3	配方 4	配方 5	配方 6	配方 7

[0051]

实施例 1 中化合物中的任一种(mg)	5.0	10.0	20.0	30.0	40.0	50.0	60.0
乳糖(mg)	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
淀粉(mg)	35	30	25	20	15	10	5
低取代羟丙基纤维素(mg)	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
微晶纤维素(mg)	1.0	1.0	1.0	3.0	3.0	3.0	3.0
滑石粉(mg)	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
硬脂酸镁(mg)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
1%羟甲基纤维素钠(mg)	适量	适量	适量	适量	适量	适量	适量

[0052] 实施例 5 :

[0053] 实施例 1 中化合物中的任一种按常规法配以各种药用辅料可制成胶囊剂 :

[0054] 含有实施例 1 中化合物中的任一种作为有效成分的药物组合胶囊制剂的制备,使用实施例 1 中化合物中的任一种作为药物活性成分、使用几种赋形剂作为制备组合药物胶囊剂的辅料成分,按照一定比例配比制成每粒胶囊中含有化合物成分 1-100mg 的胶囊制剂。

[0055] 实施例 6 :

[0056] 取 1 份实施例 1 制得的化合物任一种,分别与 20 份聚合度为 300 的醋酸乙烯酯树脂,2 份邻苯二甲酸丁酯,3 份巴西棕蜡和 20 份麦芽糖,在捏机中于 50℃ 混合 3 分钟,再加入 50 份砂糖,1 份薄荷,混炼均匀后在 50℃ 恒温下,从挤出机中挤出口香糖,切割成规定厚度,作为功能食品。

[0057] 为了更好地理解本发明,下面结合本发明化合物与药用辅料或赋形剂组成的药物组合物的药理作用作为具体试验例进行说明,但并不以此来限定本发明。

[0058] 实施例 7:

[0059] 本发明化合物及其与药用辅料组成的药物组合物的抗糖尿病肾病或慢性肾病的药理作用。

[0060] 本发明化合物抗肾系膜细胞活性氧实验:

[0061] 参照文献方法(Wei XF, Zhou QG, Hou FF et al. Advanced oxidation protein products induce mesangial cell perturbation through PKC-dependent activation of NADPH oxidase. *Am J Physiol Renal Physiol*2009;296:F427 — F437),大鼠系膜细胞株(HBZY-1, Life-Science Academy of Wuhan University, Wuhan, China)在 37℃条件下,培养在 pH 值为 7.4 的 DMEM(Invitrogen, Carlsbad, CA)培养液中,培养液中加入 10% 胎牛血清(Invitrogen, Carlsbad, CA), 2mM 谷氨酰胺, 100U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素。细胞融合达到 80%时,采用含有 0.5% 胎牛血清的培养液饥饿 24 小时,使细胞同步化于 G0 期,用于后续实验。

[0062] 为了检测化合物的作用,系膜细胞首先与不同浓度的化合物预孵育 1 小时,然后以 5.6mM(normal glucose, NG)或 25mM(high glucose, HG)的 D-葡萄糖(Xia L, Wang H, Munk S et al. Reactive oxygen species, PKC-β1, and PKC-ζ mediate high-glucose-induced vascular endothelial growth factor expression in mesangial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*2007;293:E1280 — E1288)刺激,观察各项指标。

[0063] 细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量测定:

[0064] 细胞内 ROS 含量采用荧光探针 carboxymethyl-H2-dichlorofluorescein diacetate(CM-H2-DCF-DA, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)染色,流式细胞仪检测(Xia L, Wang H, Goldberg HJ et al. Mesangial cell NADPH oxidase upregulation in high glucose is protein kinase C dependent and required for collagen IV expression. *Am J Physiol Renal Physiol*2006;290:F345 — F356)。消化搜集细胞,与 CM-H2-DCF-DA (1 μM)孵育 30 分钟。以流式细胞仪(BD FACSCalibur system, Franklin Lakes, NJ)测定荧光强度(激发波长 λ=488nm, 发射波长 λ=515nm)。每组 ROS 含量用各组细胞荧光强度与正常糖浓度培养的细胞荧光强度的比值表示,结果以细胞总蛋白含量进行校正(Rygiel TP, Mertens AE, Strumane K et al. The Rac activator Tiam1 prevents keratinocyte apoptosis by controlling ROS-mediated ERK phosphorylation. *J Cell Sci*2008;121:1183 — 1192)。

[0065] 统计学分析:

[0066] 所有实验重复三次。连续变量表示为均数 ± 标准差,采用单因素方差分析进行比较,SPSS13.0 进行统计学分析。方差齐时采用 Student-Newman-Keuls 法进行比较,方差不齐时采用 Dunnett's T3 法进行比较。双尾检验 P 值小于 0.05 认为具有统计学差异。结果见图 3。

[0067] 以上结果说明本发明的化合物 1、2 和 4 对高糖诱导的肾系膜细胞株产生的活性氧具有明显的抑制作用。由于氧化应激是糖尿病肾病和慢性肾病的主要发病机制之一,因此本结果提示螺环灵芝素 A-D 对于糖尿病肾病或慢性肾病具有重要的应用价值。

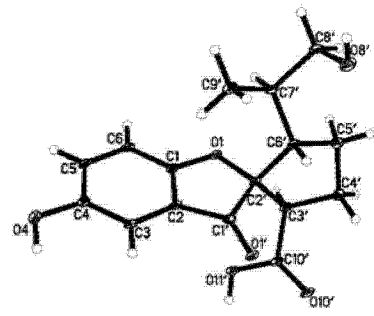
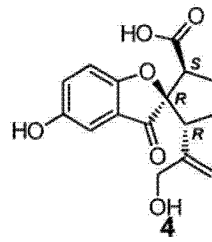
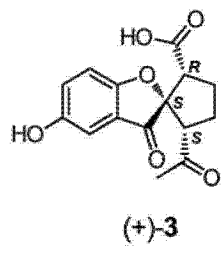
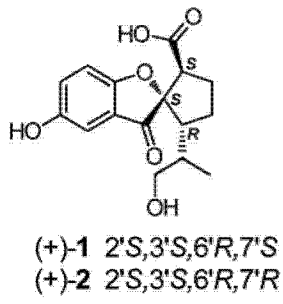


图 2

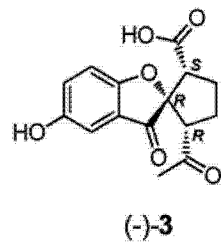
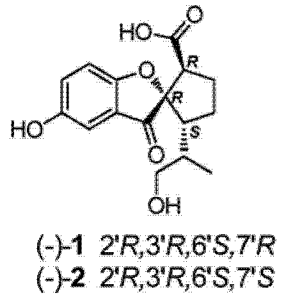


图 1

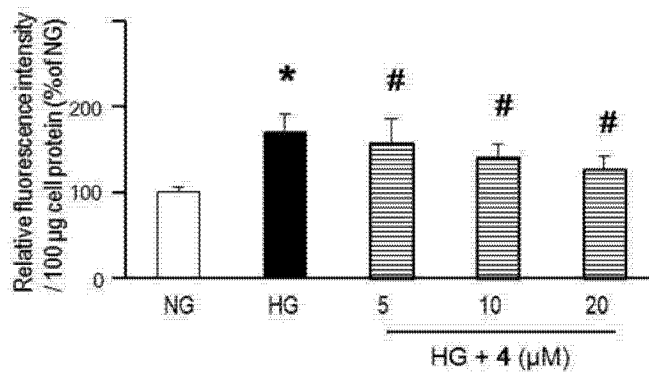
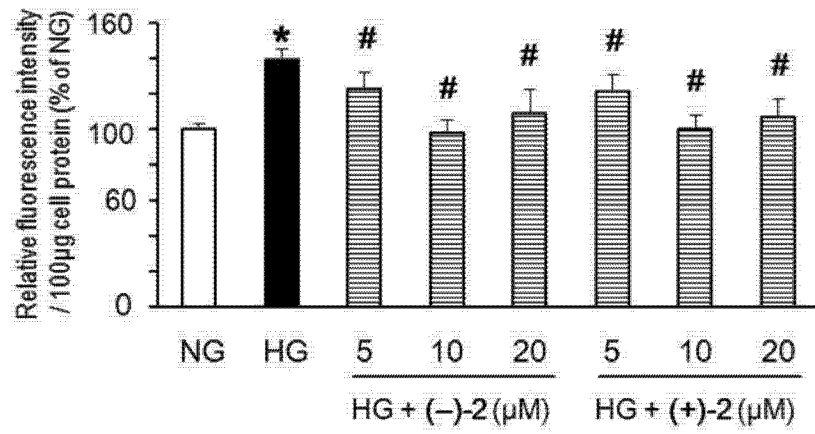
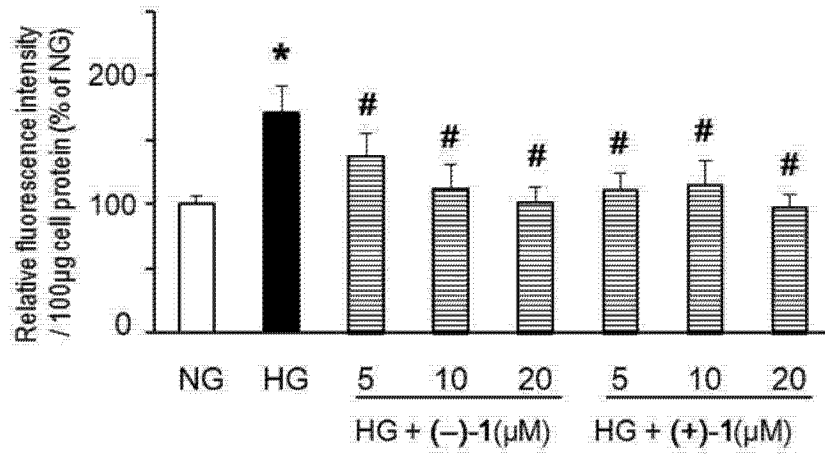


图 3