



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103788038 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 14

(21) 申请号 201410085255. 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 晏永明 王心龙 曾琳洪
苗金华 方萍

(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 307/93(2006. 01)

A61K 31/365(2006. 01)

A61P 13/12(2006. 01)

A61P 3/10(2006. 01)

A23L 1/29(2006. 01)

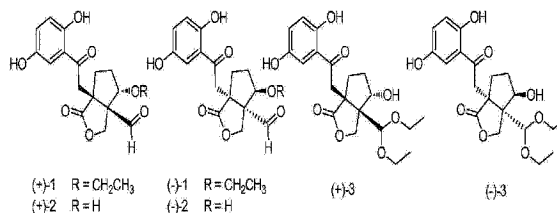
权利要求书1页 说明书10页 附图3页

(54) 发明名称

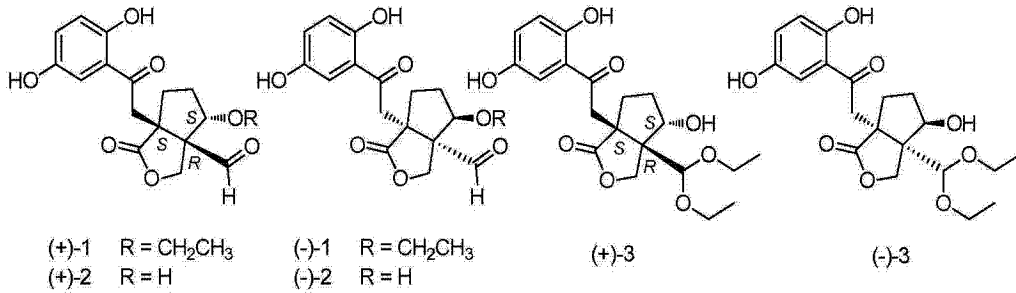
赤芝内酯类化合物及其药物组合物和其制备
方法与应用

(57) 摘要

提供从中药赤芝中纯化得到的六个杂萜类新
化合物,以它们为活性成分的药物组合物,它们的
制备方法,及其它它们在制备治疗糖尿病肾病或慢
性肾病的药物和保健食品中的应用。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
株分泌 IL-6, 纤粘连蛋白(Fibronectin), IV型胶
原蛋白和活性氧作用。显示该类化合物在制备糖
尿病肾病和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 99:1, 98:2, 97:3, 96:4, 95:5, 94:6, 93:7, 92:8, 90:10, 85:15, 80:20, 50:50 梯度洗脱，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，组份 3 经 MCI gel CHP20P 柱层析，甲醇-水 (20-100%) 洗脱得 11 个亚组份，其中组份 3.10 经 Sephadex LH-20 (MeOH) 柱层析，TLC 检测，合并相同斑点组份后经反相 RP-18 柱层析，甲醇-水 (40-60%) 洗脱，三氯化铁试剂阳性斑点合并，然后经制备薄层层析 (CHCl₃/Me₂CO, 12:1)，得化合物 3 及组份 3.10.1，该组份经半制备反相 RP-18HPLC (MeCN/H₂O, 35:65) 纯化获得化合物 1，组份 3.8 经 MCI gel CHP20P 柱层析 (MeOH/H₂O, 40-100%) 得五个亚组份，组份 3.8.1 经 Sephadex LH-20 (MeOH) 纯化，三氯化铁试剂显色跟踪，合并组份再经真空柱层析 (petroleum ether/Me₂CO, 10:1-1:1) 纯化得化合物 2，化合物 1-3 均为消旋体，化合物 1 经手性材料半制备 HPLC (n-hexane/dioxane, 70:30, 流速: 1mL/min) 纯化得化合物 (+)-1 和 (-)-1；化合物 2 同样经手性材料半制备 HPLC (n-hexane/dioxane, 60:40, 流速: 1mL/min) 获得 (+)-2 和 (-)-2；化合物 3 经手性材料半制备 HPLC (n-hexane/dioxane, 88:12, 流速: 1mL/min) 获得 (+)-3 和 (-)-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。

赤芝内酯类化合物及其药物组合物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，涉及灵芝中结构新颖的灵芝杂萜衍生物，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与细胞因子如 IL-6, MCP-1 等以及细胞外基质如 I 型、IV 型胶原、纤粘蛋白等的过度分泌密切相关。因此观察药物对高糖诱导的肾系膜细胞的细胞因子和胶原蛋白的影响，已经成为目前研究糖尿病肾病或肾纤维化药物的常用方法。现代研究已经证明糖尿病肾病或慢性肾病与氧化应激相关，氧化应激会激活 NF- κ B 信号通路，导致炎症发生，因此氧化应激与炎症是慢性肾病的主要特征。机体产生过度的活性氧与机体抗氧化系统受到损伤有关，其中 Nuclear factor erythroid2-related factor2 (Nrf2) 的激活有利于机体激活一系列抗氧化基因和酶，从而清除过多的自由基，发挥抗慢性肾病作用。因此 Nrf2 激活剂或活性氧抑制剂对慢性肾病有益。

[0004] 灵芝被称为仙草，中药之王，我国有近百种。灵芝自古为名贵中药，在我国已有 2000 多年应用历史，据称灵芝可治疗百病，其不仅在我国，且在东亚和美国都有应用，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，本申请人从灵芝 (*Ganoderma lucidum*) 具有扶正固本功能推测其可能含有抗糖尿病肾病或慢性肾病活性物质，灵芝的扶正固本一方面可能与多糖相关，是大家通常理解的多糖具有调节免疫力作用，但本申请人认为中医药理论的深度对于认识中医药内涵是有益的。现有文献报道赤芝可治疗多种疾病，其为什么能够广泛地治疗临床疾病，可能与其“以不变应万变”有关。“不变”意味着一方面其可以通过改善免疫作用，解决很多疾病面临的共同问题，本申请人认为灵芝的“不变”可能还与其可能含有抗氧化应激活性成分有关，氧化应激广泛存在多种疾病中，通过清除活性氧可以减轻活性氧引起的一系列病理产物，这也是一种另外意义上的扶正固本。本发明即基于此中医药理论的灵活运用。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。

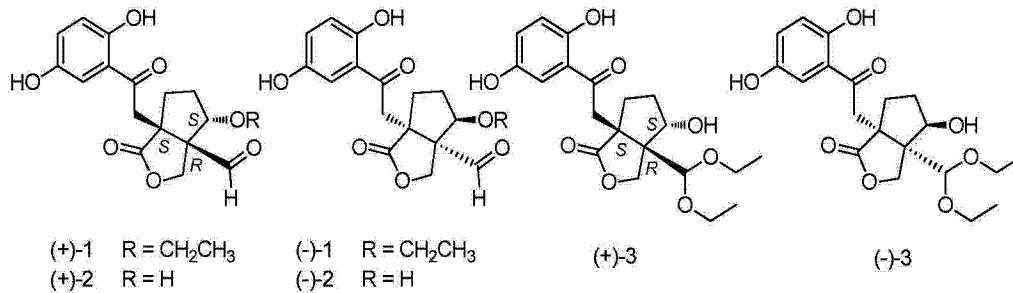
发明内容：

[0005] 本发明的目的在于提供具有抗糖尿病肾病或慢性肾病价值的化合物 1-3，该发明的化合物在制备抗糖尿病性肾病或 / 和慢性肾病的药物中的应用，以本发明化合物为活性成分的药物组合物，以及它们的制备方法。

[0006] 本发明的上述目的是由下述的技术方案得以实现的：

[0007] 具有下述结构式所示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 99:1, 98:2, 97:3, 96:4, 95:5, 94:6, 93:7, 92:8, 90:10, 85:15, 80:20, 50:50 梯度洗脱，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，组份 3 经 MCI gel CHP20P 柱层析，甲醇-水 (20 - 100%) 洗脱得 11 个亚组份，其中组份 3.10 经 Sephadex LH-20 (MeOH) 柱层析，TLC 检测，合并相同斑点组份后经反相 RP-18 柱层析，甲醇-水 (40-60%) 洗脱，三氯化铁试剂阳性斑点合并，然后经制备薄层层析 (CHCl₃/Me₂CO, 12:1)，得化合物 3 及组份 3.10.1，该组份经半制备反相 RP-18HPLC (MeCN/H₂O, 35:65) 纯化获得化合物 1，组份 3.8 经 MCI gel CHP20P 柱层析 (MeOH/H₂O, 40-100%) 得五个亚组份，组份 3.8.1 经 Sephadex LH-20 (MeOH) 纯化，三氯化铁试剂显色跟踪，合并组份再经真空柱层析 (petroleum ether/Me₂CO, 10:1-1:1) 纯化得化合物 2，化合物 1-3 均为消旋体，化合物 1 经手性材料半制备 HPLC (n-hexane/dioxane, 70:30, 流速: 1mL/min) 纯化得化合物 (+)-1 和 (-)-1；化合物 2 同样经手性材料半制备 HPLC (n-hexane/dioxane, 60:40, 流速: 1mL/min) 获得 (+)-2 和 (-)-2；化合物 3 经手性材料半制备 HPLC (n-hexane/dioxane, 88:12, 流速: 1mL/min) 获得 (+)-3 和 (-)-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中的应用。

[0012] 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。

[0013] 本发明化合物更具体的制备方法为：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 3 (51g) 经 MCI gel CHP20P 柱层析，甲醇-水 (20 - 100%) 洗脱得 11 个亚组份，其中组份 3.10 (1.1g) 经 Sephadex LH-20 (MeOH) 柱层析，TLC 检测，合并相同斑点组份后经反相 RP-18 柱层析，甲醇-水 (40-60%) 洗脱，三氯化铁试剂阳性斑点合并，然后经制备薄层层析 (CHCl₃/Me₂CO, 12:1)，得化合物

3(3.5mg) 及组份 3.10.1, 该组份经半制备反相 RP-18HPLC(MeCN/H₂O, 35:65) 纯化获得化合物 1(8mg)。组份 3.8(3g)经 MCI gel CHP20P 柱层析(MeOH/H₂O, 40-100%) 得五个亚组份。组份 3.8.1(300mg) 经 Sephadex LH-20(MeOH) 纯化, 三氯化铁试剂显色跟踪, 合并组份再经真空柱层析(petroleum ether/Me₂CO, 10:1-1:1) 纯化得化合物 2(150mg)。化合物 1-3 均为消旋体, 化合物 1 经手性材料半制备 HPLC(n-hexane/dioxane, 70:30, 流速:1mL/min) 纯化得化合物 (+)-1(3.8mg) 和 (-)-1(3.6mg); 化合物 2 同样经手性材料半制备 HPLC(n-hexane/dioxane, 60:40, 流速:1mL/min) 获得 (+)-2(1.8mg) 和 (-)-2(1.7mg); 化合物 3 经手性材料半制备 HPLC(n-hexane/dioxane, 88:12, 流速:1mL/min) 获得 (+)-3(1.3mg) 和 (-)-3(1.5mg)。

[0014] 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:

[0015] 图 1 表示化合物抑制高糖诱导的肾系膜细胞促炎症因子及细胞外基质测定实验(量效关系): 采用 USCK 公司的 ELISA 试剂盒检测大鼠系膜细胞培养上清 IL-6, Collagen IV 和 Fibronectin 的表达; 图 1A-1C 分别为化合物 1 对白细胞介素 -6、纤粘连蛋白(fibronectin)、IV 型胶原的抑制作用。*P<0.05vs 正常糖; #P<0.05vs 高糖。

[0016] 图 2 表示化合物抑制高糖诱导的肾系膜细胞促炎症因子及细胞外基质测定实验(时效关系): 采用 USCK 公司的 ELISA 试剂盒检测大鼠系膜细胞培养上清 IL-6, Collagen IV 和 Fibronectin 的表达; 图 2A-2C 分别为化合物 1 对白细胞介素 -6、纤粘连蛋白(fibronectin)、IV 型胶原的抑制作用。*P<0.05vs 正常糖; #P<0.05vs 高糖。

[0017] 图 3 表示化合物抑制高糖诱导的肾系膜细胞促炎症因子及细胞外基质测定实验(量效关系): 采用 USCK 公司的 ELISA 试剂盒检测大鼠系膜细胞培养上清 IL-6, Collagen IV 和 Fibronectin 的表达; 图 3A-3C 分别为化合物 2 对白细胞介素 -6、纤粘连蛋白(fibronectin)、IV 型胶原的抑制作用。*P<0.05vs 正常糖; #P<0.05vs 高糖。

[0018] 图 4 表示化合物抑制高糖诱导的肾系膜细胞促炎症因子及细胞外基质测定实验(时效关系): 采用 USCK 公司的 ELISA 试剂盒检测大鼠系膜细胞培养上清 IL-6, Collagen IV 和 Fibronectin 的表达; 图 4A-4C 分别为化合物 2 对白细胞介素 -6、纤粘连蛋白(fibronectin)、IV 型胶原的抑制作用。*P<0.05vs 正常糖; #P<0.05vs 高糖。

[0019] 图 5 表示化合物 2 抑制高糖诱导的肾系膜细胞活性氧产生: *P<0.05vs 正常糖; #P<0.05vs 高糖。

[0020] 图 6 表示本发明化合物的结构示意图。

具体实施方式:

[0021] 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。

[0022] 实施例 1 :

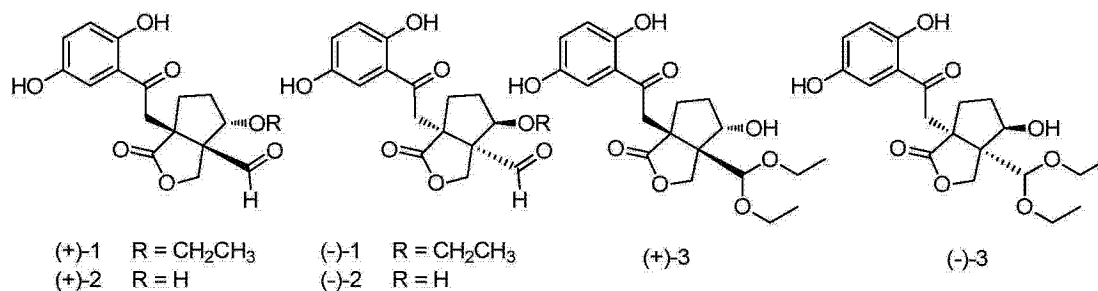
[0023] 化合物 1-3 的分离纯化 :

[0024] 赤芝(*Ganoderma lucidum*)80kg, 粉碎, 用 95% 乙醇回流提取 ($2 \times 360L \times 2h$), 合并提取液并减压回收溶剂得粗提取物, 将粗提取物混悬于适量 1% 氢氧化钠水中 (PH=13), 然后用等体积乙酸乙酯萃取三次。碱水层用稀盐酸中和, 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 (主要为酚性物质)。该酚性物质经硅胶柱层析(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 3(51g) 经 MCI gel CHP20P 柱层析, 甲醇-水 (20-100%) 洗脱得 11 个亚组份, 其中组份 3.10(1.1g) 经 Sephadex LH-20 (MeOH) 柱层析, 三氯化铁试剂显色跟踪合并, 合并组份经反相 RP-18 柱层析, 甲醇-水 (40-60%) 洗脱, 三氯化铁试剂阳性斑点合并, 然后经制备薄层层析 ($CHCl_3/Me_2CO, 12:1$), 得化合物 3(3.5mg) 及组份 3.10.1, 该组份经半制备反相 RP-18HPLC (MeCN/H₂O, 35:65) 纯化获得化合物 1(8mg)。组份 3.8 (3g) 经 MCI gel CHP20P 柱层析 (MeOH/H₂O, 40-100%) 得五个亚组份。组份 3.8.1(300mg) 经 Sephadex LH-20 (MeOH) 纯化, 三氯化铁试剂显色跟踪, 合并组份再经真空柱层析 (petroleum ether/Me₂CO, 10:1-1:1) 纯化得化合物 2(150mg)。化合物 1-3 均为消旋体, 化合物 1 经手性材料半制备 HPLC (n-hexane/dioxane, 70:30, 流速: 1mL/min) 纯化得化合物 (+)-1(3.8mg) 和 (-)-1(3.6mg); 化合物 2 同样经手性材料半制备 HPLC (n-hexane/dioxane, 60:40, 流速: 1mL/min) 获得 (+)-2(1.8mg) 和 (-)-2(1.7mg); 化合物 3 经手性材料半制备 HPLC (n-hexane/dioxane, 88:12, 流速: 1mL/min) 获得 (+)-3(1.3mg) 和 (-)-3(1.5mg)。

[0025] 化合物 1-3 的结构确证 :

[0026] 化合物 1-3 的结构式如下所示 :

[0027]



[0028] 化合物 1-3 的结构鉴定数据 :

Table 1. The ^1H NMR data of 1–3

	1 ^a	2 ^a	3 ^b
position	δ_{H} (J in Hz)	δ_{H} (J in Hz)	δ_{H} (J in Hz)
3	7.34 (brd, 1.6)	7.33 (d, 2.9)	7.15 (d, 2.9)
5	7.13 (dd, 8.8, 1.6)	7.12 (dd, 8.9, 2.9)	6.95 (dd, 8.9, 2.9)
6	6.82 (d, 8.8)	6.81 (d, 8.9)	6.74 (d, 8.9)
2'	3.80 (d, 19.3) 3.69 (d, 19.3)	3.77 (s)	3.90 (s)
4'a	2.06 overlap	2.03 m	1.88 (dd, 13.2, 6.4)
4'b	1.99 (dt, 13.6, 6.0)		1.70 (dt, 13.2, 6.0)
5'a	2.19 m	2.06 overlap	1.93 m
5'b	1.52 m	1.58 m	1.26 m
6'	4.30 (dd, 11.3, 5.8)	4.66 (dd, 11.0, 5.4)	4.51 (dd, 10.7, 6.8)
8'	9.75 (s) ^c	9.68 (s)	4.34 (s)
9'	4.99 (d, 9.7) 4.75 (d, 9.7)	4.94 (d, 9.7) 4.88 (d, 9.7)	4.74 (d, 8.9) 4.20 (d, 8.9)
<u>OCH₂CH₃</u>	3.37 (dq, 9.0, 7.0) 3.23 (dq, 9.0, 7.0)		
<u>OCH₂C₆H₅</u>	1.12 (d, 7.0)		
1-OH		11.00 (s)	
4-OH		8.35 (brs)	
1''			3.69 m, 3.44 m
2''			1.08 (d, 7.0)
1'''			3.58 m, 3.17 m
2'''			0.94 (d, 7.0)

^a ^1H NMR at 600 MHz in acetone- d_6 . ^b ^1H NMR at 600 MHz in methanol- d_4 . ^c δ_{H} 4.56 (overlapped) in methanol- d_4 .

[0029]

Table 2. ^{13}C NMR data of **1–3** (δ in ppm, J in Hz)

	1^a	2^a	3^b
Position	δ_{C} , mult	δ_{C} , mult	δ_{C} , mult
1	156.2 s	156.3 s	156.4 s
2	119.3 s	119.4 s	120.3 s
3	115.3 d	115.3 d	115.1 d
4	150.5 s	150.4 s	150.8 s
5	126.8 d	126.7 d	126.2 d
6	119.7 d	119.7 d	119.9 d
1 ^c	205.2 s	205.2 s	205.1 s
2 ^c	44.6 t	44.4 t	45.0 t
3 ^c	54.6 s	54.3 s	54.1 s
4 ^c	35.2 t	35.4 t	36.1 t
5 ^c	29.6 t	31.9 t	32.1 t
6 ^c	86.2 d	77.8 d	75.8 d
7 ^c	62.9 s	63.6 s	58.0 s
8 ^c	203.2 d ^e	203.3 d	107.3 d
9 ^c	67.2 t	66.9 t	69.5 t
10 ^c	180.8 s	181.2 s	185.6 s
OCH ₂ CH ₃	66.7 t		
OCH ₂ CH ₃	15.5 q		
1 ^{xx}			68.5 t
2 ^{xx}			15.9 q
1 ^{xxx}			66.6 t
2 ^{xxx}			15.3 q

^a ^{13}C NMR at 150 MHz in acetone-*d*₆. ^b ^{13}C NMR at 150 MHz in methanol-*d*₄. ^c δ_{C} 99.8 in methanol-*d*₄.

[0030]

[0031] Linzhilactone A (1): pale yellow amorphous solid; { $[\alpha]_{\text{D}}^{27}$ +84.5 (c0.15, CHCl₃); UV (CHCl₃) λ_{max} (log ϵ) 366 (3.59), 261 (3.93), 241 (3.95) nm; CD (CHCl₃) $\Delta \epsilon_{221}$ - 2.22, $\Delta \epsilon_{369}$ +1.19; ESIMS (negative) 347 [M - H]⁻; HRESIMS (negative) 347.1136 [M - H]⁻ (calcd for C₁₈H₁₉O₇, 347.1136); (+)-linzhilactone A}; { $[\alpha]_{\text{D}}^{27}$ - 78.8 (c0.05, CHCl₃); UV (CHCl₃) λ_{max} (log ϵ) 366 (3.53), 261 (3.88), 241 (3.92) nm; CD (CHCl₃) $\Delta \epsilon_{221}$ +2.24, $\Delta \epsilon_{369}$ - 1.08; ESIMS (negative) 347 [M - H]⁻; HRESIMS (negative) 347.1136 [M - H]⁻ (calcd for C₁₈H₁₉O₇, 347.1136); (-)-linzhilactone A}.

[0032] Linzhilactone B (2): pale yellow amorphous solid; { $[\alpha]_{\text{D}}^{27}$ +57.1 (c0.07, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 367 (3.59), 258 (3.86), 227 (4.12) nm; CD (MeOH) $\Delta \epsilon_{225}$ - 1.02, $\Delta \epsilon_{369}$ +0.37; ESIMS (negative) 319 [M - H]⁻; HRESIMS (negative) 319.0823 [M - H]⁻ (calcd for C₁₆H₁₅O₇, 319.0823); (+)-linzhilactone B}; { $[\alpha]_{\text{D}}^{26}$ - 71.4 (c0.05, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 367 (3.59), 258 (3

.86), 227(4.12)nm; CD (MeOH) $\Delta \epsilon_{226} + 1.69$, $\Delta \epsilon_{369} - 1.10$; ESIMS (negative) 319 [M - H]⁻; HRESIMS (negative) 319.0827 [M - H]⁻ (calcd for C₁₆H₁₅O₇, 319.0823); (-)-linzhilactone B}.

[0033] Linzhilactone C(3): pale yellow amorphous solid; { $[\alpha]_D^{19} + 68.2$ (c0.02, MeOH); UV (CHCl₃) $\lambda_{max}(\log \epsilon)$ 367(3.54), 259(3.84), 241(3.78)nm; CD (CHCl₃) $\Delta \epsilon_{229} - 1.48$, $\Delta \epsilon_{369} + 0.78$; ESIMS (negative) 393 [M - H]⁻; HRESIMS (negative) 393.1544 [M - H]⁻ (calcd for C₂₀H₂₅O₈, 393.1555); (+)-linzhilactone C}; { $[\alpha]_D^{19} - 88.9$ (c0.03, MeOH); UV (CHCl₃) $\lambda_{max}(\log \epsilon)$ 366(3.47), 259(3.79), 241(3.73)nm; CD (CHCl₃) $\Delta \epsilon_{221} + 1.40$, $\Delta \epsilon_{369} - 0.91$; ESIMS (negative) 393 [M - H]⁻; HRESIMS (negative) 393.1541 [M - H]⁻ (calcd for C₂₀H₂₅O₈, 393.1555); (-)-linzhilactone C}.

[0034] 实施例 2:

[0035] 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。

[0036] 实施例 3:

[0037] 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。

[0038] 实施例 4:

[0039] 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。

[0040] 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。

[0041] 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。

[0042] 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

[0043]

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
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

[0044] 实施例 5：

[0045] 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：

[0046] 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。

[0047] 实施例 6：

[0048] 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。

[0049] 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。

[0050] 实施例 7：

[0051] 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。

[0052] 化合物 1 和 2 抑制肾系膜细胞株炎症因子和细胞外基质测定实验(见图 1 所示)：

[0053] 采用 Usen 公司的 ELISA 试剂盒检测大鼠系膜细胞培养上清 IL-6, Collagen IV 和 Fibronectin 表达。图 1A 为 IL-6 的化合物剂量依赖性表达；图 1B 为 Fibronectin 的化合物剂量依赖性表达；图 1C 为 Collagen IV 的化合物剂量依赖性表达。图 2A 为 IL-6 的化合物时效关系；图 2B 为 Fibronectin 的化合物时效关系；图 2C 为 Collagen IV 的化合物时效关系。

[0054] 实验原理：

[0055] 采用双抗体夹心法测定标本中大鼠系膜细胞培养上清 IL-6、Fibronectin 及 Collagen IV 表达水平。用纯化的抗 IL-6、Fibronectin 及 Collagen IV 抗体包被微孔板,制成固相抗体,向包被单抗的微孔中依次加入含表达 IL-6、Fibronectin 及 Collagen IV 的待测样品,再与 HRP 标记的抗体结合,形成抗体-抗原-酶标抗体复合物,经过彻底洗涤后加底物 TMB 显色。TMB 在 HRP 酶的催化下转化成蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的 IL-6、Fibronectin 及 Collagen IV 的表达呈正相关。按照文献(Journal of Natural Products, 2011, 74, 1392-1400 ;Organic Letters, 2014, 16, 532-535)方法,用酶标仪测定吸光度(OD 值),通过标准曲线计算样品中大鼠 IL-6、Fibronectin 及 Collagen IV 浓度。

[0056] 样本处理:

[0057] 1) 细胞培养上清:无菌管收集,2,000rpm/min,离心 20min。仔细收集上清。分装冻存于 -80℃。

[0058] 2) 刮取底壁细胞,总蛋白裂解液裂解,12,000rpm/min,4℃离心 10min,收集上清,Bradford 法测量总蛋白含量。

[0059] ELISA 检测:

[0060] 操作按试剂盒说明进行:

[0061] 1) 标准品的稀释与加样:酶标包被板设标准品孔,倍比稀释(稀释后各孔加样量都为 50 μ l)加入 IL-6、Fibronectin 及 Collagen IV 的标准品。

[0062] 2) 加样:分别设空白孔(空白对照孔不加样品和酶标试剂,其余各步骤操作相同)、待测样品孔(样品稀释度为 5 倍)。轻轻晃动混匀。

[0063] 3) 温育:37℃,30min。

[0064] 4) 洗涤:弃去板中液体,甩干,洗液洗 5 次,30 秒/次。吸水纸拍干。

[0065] 5) 加酶:每孔加入 50 μ l 酶标记液,空白孔除外。

[0066] 6) 温育:37℃,30min。

[0067] 7) 洗涤:弃去板中液体,甩干,洗液洗 5 次,30 秒/次。吸水纸拍干。

[0068] 8) 显色:每孔加入底物 A、B 液各 50 μ l/孔。37℃,15min。避光。

[0069] 9) 终止:每孔加入终止液各 50 μ l/孔。

[0070] 10) 测定:以空白孔调零,酶标仪 450nm 读吸光度(OD 值)。

[0071] 11) 实验重复 3 次。

[0072] 结果计算:利用标准品定量曲线分析计算样品浓度并以细胞总蛋白含量校正(IL-6:pg/mg cell protein;Fibronectin&Collagen IV:ng/mg cell protein)。

[0073] 实施例 7:

[0074] 化合物抗肾系膜细胞活性氧实验:

[0075] 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 μ g/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。

[0076] 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- β 1, and PKC- ζ mediate high-glucose-induced vascular endothelial growth factor expression in mesangial cells.Am JPhysiol Endocrinol Metab2007;293:E1280 — E1288) 刺激,观察各项指标。

[0077] 细胞内活性氧(reactive oxygen species,ROS) 含量测定:

[0078] 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 Physiol2006;290:F345 — F356)。消化搜集细胞,与 CM-H2-DCF-DA (1 μ M) 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 $\lambda = 488\text{nm}$, 发射波长 $\lambda = 515\text{nm}$)。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 Tiamlprevents keratinocyte apoptosis by controlling ROS-mediated ERK phosphorylation. J Cell Sci2008;121:1183 — 1192)。

[0079] 统计学分析:

[0080] 所有实验重复三次。连续变量表示为均数 \pm 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。

[0081] 结果见图 5。

[0082] 以上结果说明本发明的化合物 1 和 2 对高糖诱导的肾系膜细胞株炎症因子 IL-6、Fibronectin 及 Collagen IV 均有剂量和时效依赖性的抑制作用。另外,这些化合物对活性氧具有明显的抑制作用。由于化合物 3 是由化合物 2 的醛基发生缩酮反应而来,该反应在酸性条件下可逆,因此化合物 3 在胃酸中将生成化合物 2 并与 2 形成平衡体,因此可推理化合物 3 在体内的有效性。鉴于慢性肾病及其并发症的危害,本发明所涉及的化合物预计将在慢性肾病干预过程中扮演重要角色。

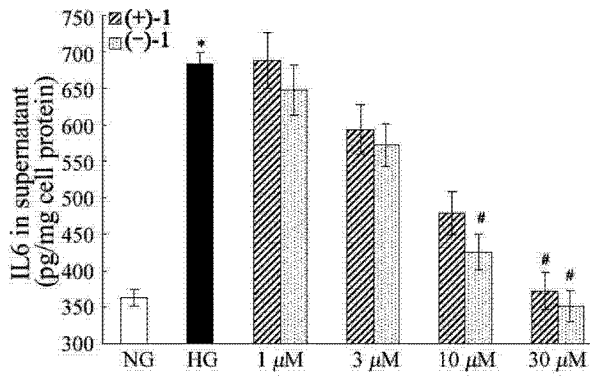


图 1A

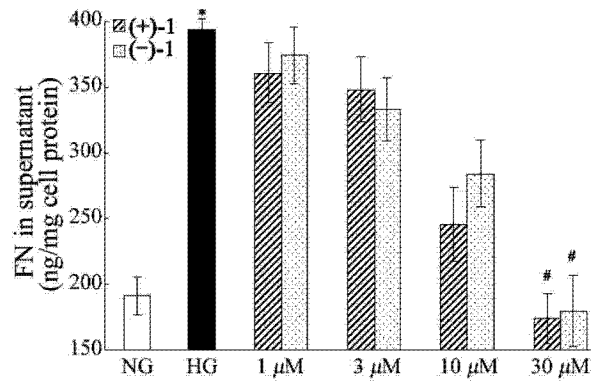


图 1B

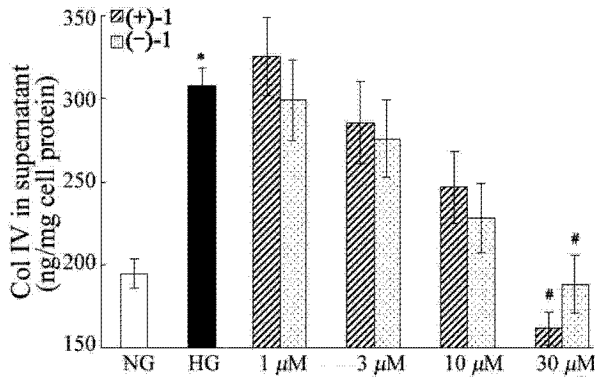


图 1C

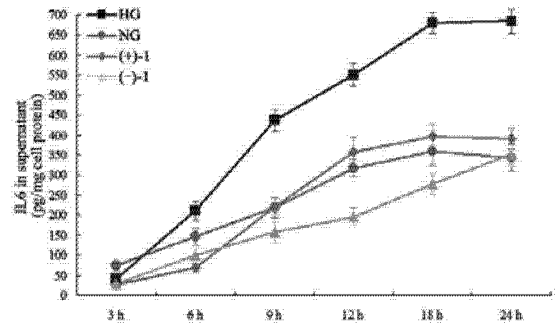


图 2A

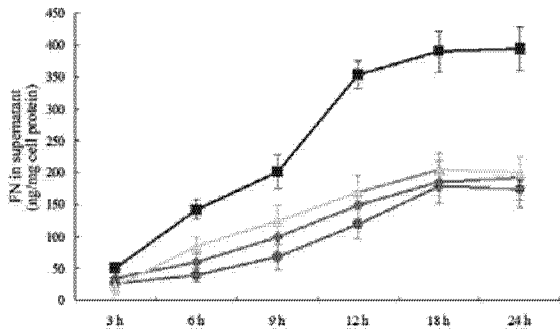


图 2B

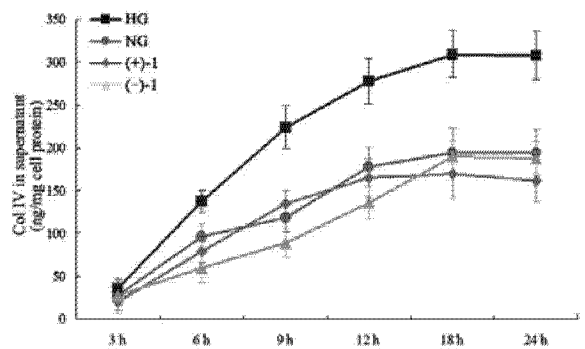


图 2C

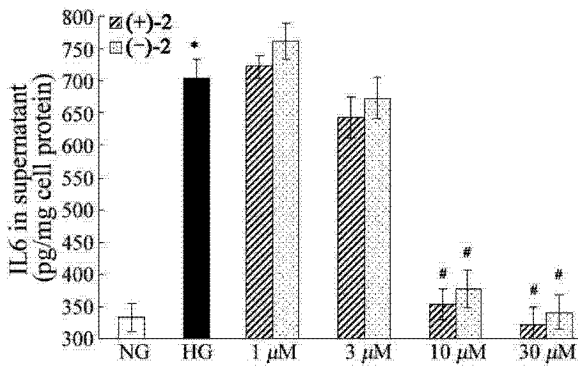


图 3A

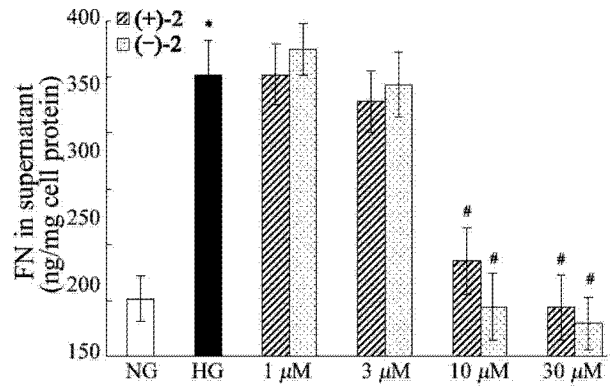


图 3B

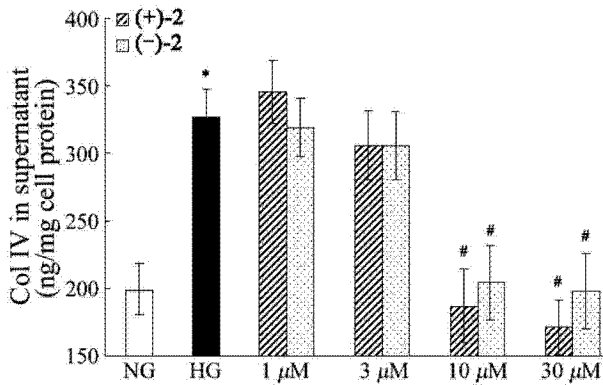


图 3C

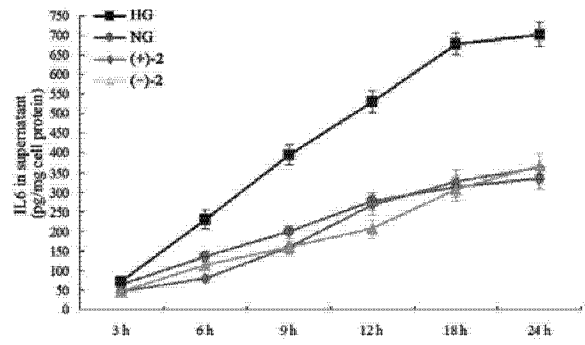


图 4A

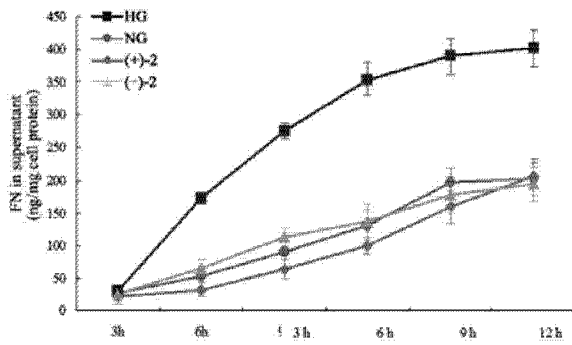


图 4B

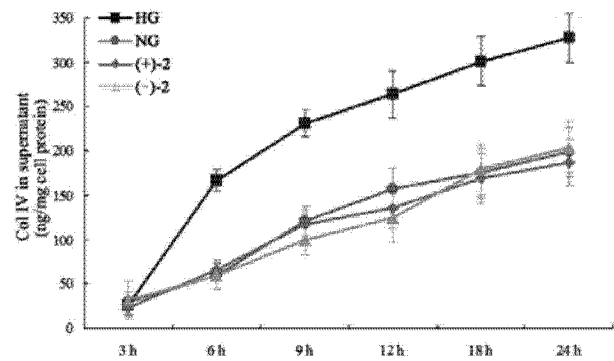


图 4C

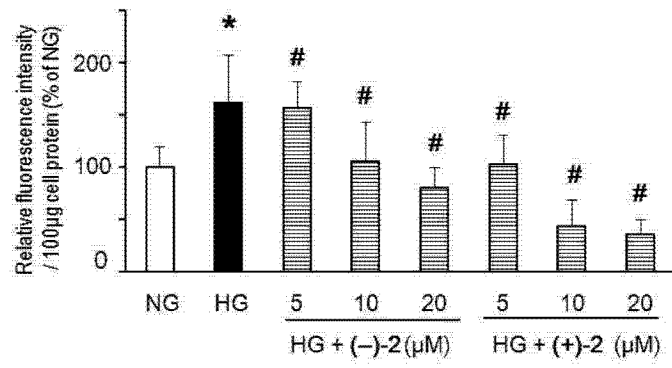


图 5

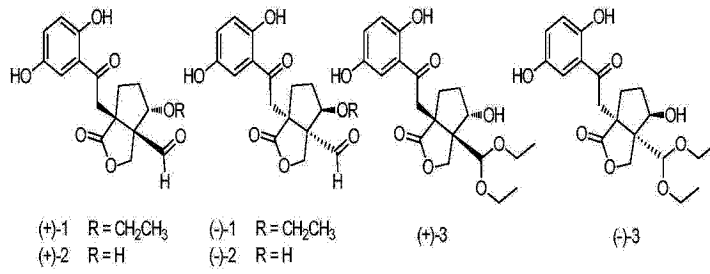


图 6