



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110483515 B

(45)授权公告日 2020.08.07

(21)申请号 201910822030.3

审查员 解佳烨

(22)申请日 2019.09.02

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110483515 A

(43)申请公布日 2019.11.22

(73)专利权人 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 张于 郝小江 郭伶俐 白雪

(74)专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

代理人 马云华

(51)Int.Cl.

C07D 471/18(2006.01)

A61K 31/55(2006.01)

A61P 31/10(2006.01)

权利要求书2页 说明书14页

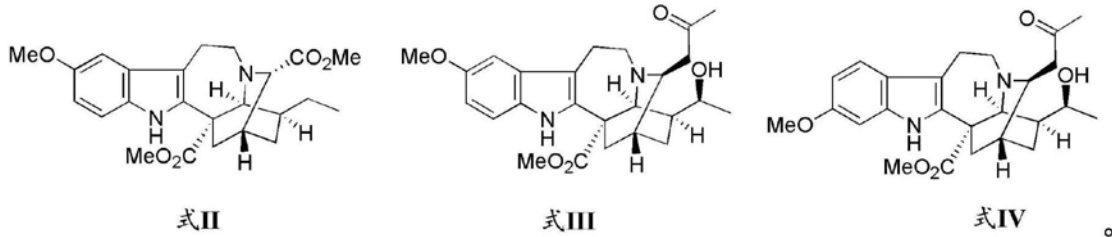
(54)发明名称

依波加生物碱或其药学上可接受的盐以及制备方法和应用、依波加生物碱药物组合物及应用

(57)摘要

本发明提供了依波加生物碱或其药学上可接受的盐以及制备方法和应用、依波加生物碱药物组合物及应用,属于药物技术领域。本发明提供的依波加生物碱对于白色念珠菌氟康唑耐药株无明显抑制活性,但是当氟康唑和依波加生物碱共同作用于白念氟康唑耐药株时,对白念氟康唑耐药株的抑制率高达99.7%,表明,本发明提供的依波加生物碱对白念氟康唑耐药株具有很强耐药逆转活性,是一类有发展潜力的可逆转白念氟康唑耐药株耐药性的候选药物。

1. 一种依波加生物碱,其特征在于,具有式II~IV所示结构中的任意一种:



2. 权利要求1所述依波加生物碱的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

将狗牙花和提取剂混合,依次进行提取和浓缩,得到浸膏;

将所述浸膏依次进行调节pH值至酸性、第一萃取、调节pH值至碱性、第二萃取和提纯,得到依波加生物碱;

所述提纯包括依次进行的第一硅胶柱层析和第一反相色谱分离,得到若干段洗脱液,将所述若干段洗脱液分别依次进行第二硅胶柱层析、第二反相色谱分离和Sephadex LH-20分离;

所述第一硅胶柱层析采用的洗脱液为石油醚和丙酮的混合溶液,所述石油醚和丙酮的体积比为20:1~1:1;

所述第一反相色谱分离采用的洗脱液为甲醇和水,所述甲醇和水的体积比为20:80~90:10;

所述第二硅胶柱层析采用的洗脱液为石油醚和丙酮的混合溶液,所述石油醚和丙酮的体积比为30:1~1:1;

所述第二反相色谱分离采用的洗脱液为乙腈和水,或者甲醇和水;所述乙腈和水的体积比为30:70~80:20,所述甲醇和水的体积比为20:80~90:10;

所述Sephadex LH-20分离采用的溶剂为甲醇。

3. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,所述提取采用的溶剂包括醇类溶剂、酮类溶剂、酯类溶剂、醚类溶剂或卤代烷类溶剂;

所述调节pH值至酸性是将体系的pH值调节为2~3;

所述第一萃取或所述第二萃取所用的有机溶剂独立的包括酯类溶剂、醚类溶剂或卤代烷类溶剂;

所述调节pH值至碱性是将体系的pH值调节为9~10。

4. 一种依波加生物碱的药学上可接受的盐,其特征在于,包括权利要求1所述依波加生物碱的药学上可接受的盐。

5. 根据权利要求4所述的依波加生物碱的药学上可接受的盐,其特征在于,所述药学上可接受的盐包括有机酸盐或无机酸盐。

6. 权利要求4~5任一项所述依波加生物碱的药学上可接受的盐的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

将依波加生物碱和酸反应,得到依波加生物碱的药学上可接受的盐;

所述酸为有机酸或无机酸。

7. 一种依波加生物碱药物组合物,其特征在于,包括权利要求1所述的依波加生物碱和/或权利要求4~5任一项所述的依波加生物碱的药学上可接受的盐。

8. 根据权利要求7所述的依波加生物碱药物组合物, 其特征在于, 还包括可药用载体和/或赋形剂。

9. 权利要求1所述依波加生物碱、权利要求4~5任一项所述依波加生物碱的药学上可接受的盐或权利要求7~8任一项所述依波加生物碱药物组合物在制备逆转白念氟康唑耐药株耐药性药物中的应用。

依波加生物碱或其药学上可接受的盐以及制备方法和应用、 依波加生物碱药物组合物及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及药物技术领域,具体涉及依波加生物碱或其药学上可接受的盐以及制备方法和应用、依波加生物碱药物组合物及应用。

背景技术

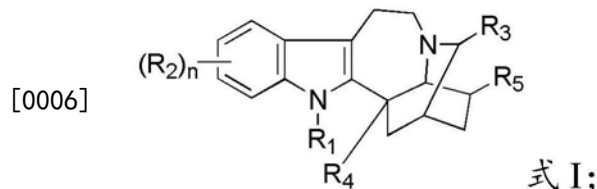
[0002] 白色念珠菌为医院感染的主要致病真菌,随着抗真菌药的广泛使用,白色念珠菌感染所致的深部真菌病例逐年增加。氟康唑作为目前用于治疗深部真菌的一线抗菌药,在临床上取得了良好的治疗效果,但近年来随着氟康唑的广泛应用,白色念珠菌的耐药性正逐年上升,给患者及社会造成了沉重的经济负担。鉴于白色念珠菌氟康唑耐药机制的复杂性和耐药形式的严峻性,研发高效、低毒、选择性更强的抗真菌药刻不容缓。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供依波加生物碱或其药学上可接受的盐以及制备方法和应用、依波加生物碱药物组合物及应用,本发明提供的依波加生物碱及其药学上可接受的盐以及依波加生物碱药物组合物具有优异的逆转白念氟康唑耐药株耐药性。

[0004] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0005] 本发明提供了一种依波加生物碱,具有式I所示的结构:



[0007] 式I中, R₁包括氢、C₁₋₁₀烷基、C₁₋₁₀醛基或C₁₋₁₀酰基;

[0008] R₂包括氢、羟基、卤素、C₁₋₁₀烷氧基或C₁₋₁₀烷氧基羰基;

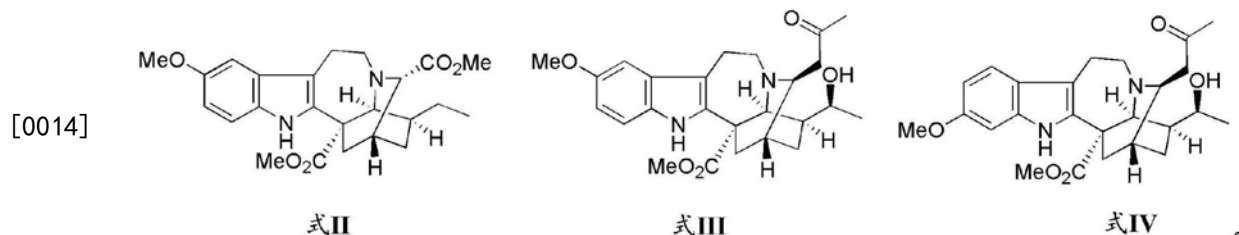
[0009] R₃包括羟基、C₁₋₁₀烷氧基或C₁₋₁₀烷氧基羰基;

[0010] R₄包括氢、羟基或C₁₋₁₀烷氧基羰基;

[0011] R₅包括C₁₋₁₀烷基或C₁₋₁₀烷基醇;

[0012] n为0~4的整数。

[0013] 优选的,所述依波加生物碱具有具有式II~IV所示结构中的任意一种:



[0015] 本发明提供了上述技术方案所述依波加生物碱的制备方法,包括以下步骤:

[0016] 将狗牙花和提取剂混合,进行提取和浓缩,得到浸膏;

[0017] 将所述浸膏依次进行调节pH值至酸性、第一萃取、调节pH值至碱性、第二萃取和提纯,得到依波加生物碱;

[0018] 所述提纯包括依次进行的第一硅胶柱层析和第一反相色谱分离,得到若干段洗脱液,将所述若干段洗脱液分别依次进行第二硅胶柱层析、第二反相色谱分离和Sephadex LH-20分离;

[0019] 所述第一硅胶柱层析采用的洗脱液为石油醚和丙酮的混合溶液,所述石油醚和丙酮的体积比为20:1~1:1;

[0020] 所述第一反相色谱分离采用的洗脱液为甲醇和水,所述甲醇和水的体积比为20:80~90:10;

[0021] 所述第二硅胶柱层析采用的洗脱液为石油醚和丙酮的混合溶液,所述石油醚和丙酮的体积比为30:1~1:1;

[0022] 所述第二反相色谱分离采用的洗脱液为乙腈和水,或者甲醇和水;所述乙腈和水的体积比为30:70~80:20,所述甲醇和水的体积比为20:80~90:10;

[0023] 所述Sephadex LH-20分离采用的溶剂为甲醇。

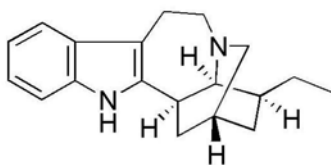
[0024] 优选的,所述提取采用的溶剂包括醇类溶剂、酮类溶剂、酯类溶剂、醚类溶剂或卤代烷类溶剂。

[0025] 所述调节pH值至酸性是将体系的pH值调节为2~3;

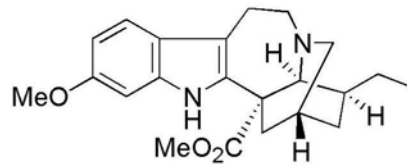
[0026] 所述第一萃取和所述第二萃取所用的有机溶剂独立的包括酯类溶剂、醚类溶剂或卤代烷类溶剂;

[0027] 所述调节pH值至碱性是将体系的pH值调节为9~10。

[0028] 本发明提供了一种依波加生物碱的药学上可接受的盐,包括上述技术方案所述依波加生物碱的药学上可接受的盐或具有式V~VIII所示结构的依波加生物碱的药学上可接受的盐;

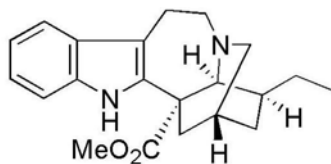


式V

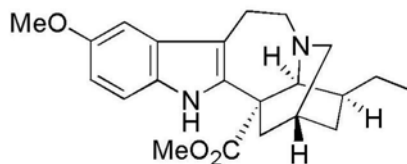


式VI

[0029]



式VII



式VIII

[0030] 优选的,所述依波加生物碱的药学上可接受的盐包括依波加生物碱的有机酸盐或依波加生物碱的无机酸盐。

[0031] 本发明提供了上述技术方案所述依波加生物碱的药学上可接受的盐的制备方法,包括以下步骤:

[0032] 将依波加生物碱和酸反应,得到依波加生物碱的药学上可接受的盐;

[0033] 所述酸为有机酸或无机酸。

[0034] 本发明提供了一种依波加生物碱药物组合物,包括上述技术方案所述的依波加生物碱和/或上述技术方案所述的依波加生物碱的药学上可接受的盐。

[0035] 优选的,所述依波加生物碱药物组合物还包括可药用载体和/或赋形剂。

[0036] 本发明还提供了上述技术方案所述依波加生物碱、上述技术方案所述依波加生物碱的药学上可接受的盐或上述技术方案所述依波加生物碱药物组合物在制备逆转白念氟康唑耐药株耐药性药物中的应用。

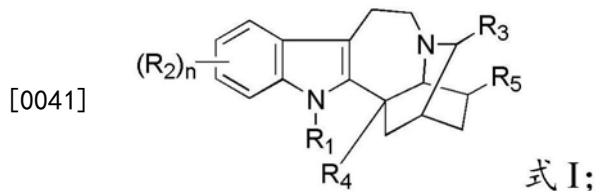
[0037] 本发明提供的依波加生物碱对于白色念珠菌氟康唑耐药株(简称白念氟康唑耐药株)无明显抑制活性,但是当氟康唑和依波加生物碱共同作用于白念氟康唑耐药株时,对白念氟康唑耐药株的抑制率在99.2%以上,这说明,本发明提供的依波加生物碱对白念氟康唑耐药株具有很强耐药逆转活性,是一类有发展潜力的可逆转白念氟康唑耐药株耐药性的候选药物。

[0038] 本发明提供的依波加生物碱的制备方法不需要化学合成,以狗牙花为原料进行提取得到,原料来源广泛、成本低,而且避免使用大量的有机原料以及复杂的制备过程,绿色环保,操作简单。

[0039] 本发明提供的依波加生物碱的药学上可接受的盐以及依波加生物碱药物组合物对白念氟康唑耐药株具有很强耐药逆转活性,也是具有发展潜力的可逆转白念氟康唑耐药株耐药性的候选药物。

具体实施方式

[0040] 本发明提供了一种依波加生物碱,具有式I所示的结构:



[0042] 式I中, R₁包括氢、C₁₋₁₀烷基、C₁₋₁₀醛基或C₁₋₁₀酰基,优选包括氢、甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、甲醛基、乙醛基、丙醛基、甲酰基、乙酰基或丙酰基,更优选为氢;

[0043] R₂包括氢、羟基、卤素、C₁₋₁₀烷氧基或C₁₋₁₀烷氧基羰基,优选包括氢、羟基、氟、氯、溴、碘、甲氧基、乙氧基、丙氧基,甲基氧基羰基、乙基氧基羰基或丙基氧基羰基,更优选为甲氧基;

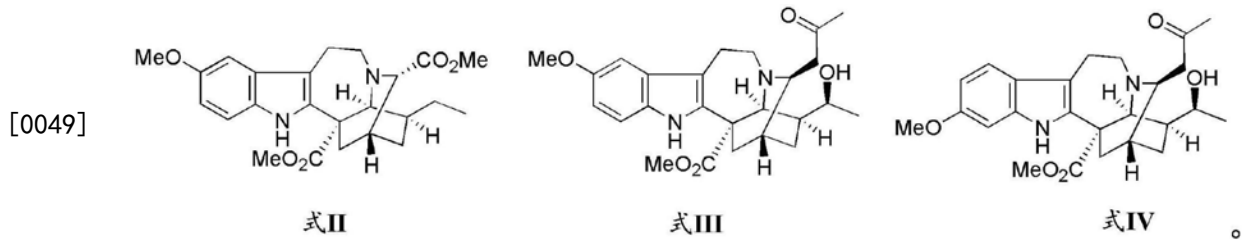
[0044] R₃包括羟基、C₁₋₁₀烷氧基或C₁₋₁₀烷氧基羰基,优选包括羟基、甲氧基、乙氧基、丙氧基,甲基氧基羰基、乙基氧基羰基或丙基氧基羰基,更优选为甲基氧基羰基;

[0045] R₄包括氢、羟基或C₁₋₁₀烷氧基羰基,优选包括氢、羟基、甲基氧基羰基、乙基氧基羰基或丙基氧基羰基,更优选为甲基氧基羰基;

[0046] R₅包括C₁₋₁₀烷基或C₁₋₁₀烷基醇,优选包括甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、乙醇基,更优选为乙基或乙醇基;

[0047] n为0~4的整数,优选为0或1。

[0048] 在本发明中,所述的依波加生物碱优选具有式II~IV所示结构中的任意一种:



[0050] 本发明提供的依波加生物碱对于白念氟康唑耐药株无明显抑制活性,但是当氟康唑和依波加生物碱共同作用于白念氟康唑耐药株时,对白念氟康唑耐药株的抑制率高达99.7%,表明,本发明提供的依波加生物碱对白念氟康唑耐药株具有很强耐药逆转活性,是一类有发展潜力的可逆转白念氟康唑耐药株耐药性的候选药物。

[0051] 在本发明中,若无特殊说明,所有的原料组分均为本领域技术人员熟知的市售商品。

[0052] 本发明提供了上述技术方案所述依波加生物碱的制备方法,包括以下步骤:

[0053] 将狗牙花和提取剂混合,进行提取和浓缩,得到浸膏;

[0054] 将所述浸膏依次进行调节pH值至酸性、第一萃取、调节pH值至碱性、第二萃取和提纯,得到依波加生物碱;

[0055] 所述提纯包括依次进行的第一硅胶柱层析和第一反相色谱分离,得到若干段洗脱液,将所述若干段洗脱液分别依次进行第二硅胶柱层析、第二反相色谱分离和Sephadex LH-20分离;

[0056] 所述第一硅胶柱层析采用的洗脱液为石油醚和丙酮的混合溶液,所述石油醚和丙酮的体积比为20:1~1:1;

[0057] 所述第一反相色谱分离采用的洗脱液为甲醇和水,所述甲醇和水的体积比为20:80~90:10;

[0058] 所述第二硅胶柱层析采用的洗脱液为石油醚和丙酮的混合溶液,所述石油醚和丙酮的体积比为30:1~1:1;

[0059] 所述第二反相色谱分离采用的洗脱液为乙腈和水,或者甲醇和水;所述乙腈和水的体积比为30:70~80:20,所述甲醇和水的体积比为20:80~90:10;

[0060] 所述Sephadex LH-20分离采用的溶剂为甲醇。

[0061] 本发明将狗牙花和提取剂混合,进行提取和浓缩,得到浸膏。

[0062] 本发明优选是对狗牙花的枝叶进行提取。在本发明中,进行所述提取前优选还包括将所述狗牙花的枝叶进行干燥。本发明对于所述干燥的温度和时间没有特殊限定,采用本领域熟知的干燥温度和时间即可。

[0063] 在本发明中,所述提取采用的溶剂优选包括醇类溶剂、酮类溶剂、酯类溶剂、醚类溶剂或卤代烷类溶剂;所述醇类溶剂优选包括C₁₋₆醇,更优选包括甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇、异丁醇、叔丁醇、正戊醇、异戊醇、环戊醇、正己醇或环己醇;所述酮类溶剂优选包括C₃₋₆酮,更优选包括丙酮、甲乙酮或甲基异丁酮;所述酯类溶剂优选包括C₃₋₆酯,更优选包括甲酸乙酯、乙酸乙酯或丙酸乙酯;所述醚类溶剂优选包括C₂₋₆醚,更优选包括甲醚或乙醚;所述卤代烷类溶剂优选包括C₁₋₆卤代烷,更优选包括二氯甲烷、氯仿或四氯乙烷。本发明优选采用甲醇或乙醇进行提取。在本发明中,所述提取采用的溶剂包括醇类溶剂、酮类溶剂、酯类溶剂、醚类溶剂或卤代烷类溶剂,更优选为甲醇。在本发明中,所述狗牙花和提取剂

的用量优选为1g: (20~30) mL,更优选为1g: (20~25) mL。

[0064] 在本发明中,所述提取的温度优选为60~70℃,更优选为65~70℃;所述提取的时间优选为3~4h,更优选为3h;所述提取的次数优选为3~4次,更优选为3次。

[0065] 本发明对于所述浓缩没有特殊限定,采用本领域熟知的浓缩方式即可,具体如减压蒸馏。

[0066] 得到浸膏后,本发明将所述浸膏依次进行调节pH值至酸性、第一萃取、调节pH值至碱性、第二萃取和提纯,得到依波加生物碱。

[0067] 在本发明中,所述调节pH值至酸性优选是将体系的pH值调节为2~3,更优选为2.5~3。本发明对于所述调节pH值至酸性采用的酸没有特殊限定,采用本领域熟知的酸即可,具体如盐酸、硫酸或硝酸,更优选为盐酸;所述盐酸的浓度优选为5~10wt%,更优选为5wt%。

[0068] 在本发明中,所述第一萃取和第二萃取所用的有机溶剂独立的优选包括酯类溶剂、醚类溶剂或卤代烷类溶剂;所述酯类溶剂优选包括C₃₋₆酯,更优选包括甲酸乙酯、乙酸乙酯或丙酸乙酯;所述醚类溶剂优选包括C₂₋₆醚,更优选包括甲醚或乙醚;所述卤代烷类溶剂优选包括C₁₋₆卤代烷,更优选包括二氯甲烷、氯仿或四氯化乙烷。本发明优选采用石油醚、乙酸乙酯进行第一萃取。在本发明中,所述第一萃取的方式优选为采用石油醚和乙酸乙酯分别萃取3~4次。在本发明中,所述第二萃取所用的溶剂更优选为氯仿。在本发明中,所述浸膏和第一萃取采用的有机溶剂的用量比优选为1g: (20~30) mL,更优选为1g: (20~25) mL。在本发明中,所述浸膏和第二萃取采用的有机溶剂的用量比优选为1g: (20~30) mL,更优选为1g: (20~25) mL。

[0069] 在本发明中,所述调节pH值至碱性优选是将体系的pH值调节为9~10,更优选为9.5~10。本发明对于所述调节pH值至碱性采用的碱溶液没有特殊限定,采用本领域熟知的碱溶液即可,具体如碳酸钠溶液、碳酸钾溶液、氢氧化钠溶液或氢氧化钾溶液,更优选为碳酸钠溶液。

[0070] 在本发明中,所述第一硅胶柱层析优选采用梯度洗脱方。

[0071] 在本发明中,所述第一反相色谱分离和第二反相色谱分离采用色谱柱独立的优选为C-18柱。

[0072] 在本发明中,所述若干段洗脱液优选包括依次洗脱出来的FrA、FrB和 FrC三部分。

[0073] 在本发明中,优选根据所述依波加生物碱的结构选择所述硅胶柱层析和所述反相色谱分离的条件。在本发明中,所述具有式V和式VII所示结构的依波加生物碱优选从所述FrA部分提取得到。在本发明中,所述具有式V所示结构的依波加生物碱的提纯条件:所述第二硅胶柱层析采用的洗脱液中石油醚和丙酮的体积比优为30:1~10:1;所述第二反相色谱分离采用的洗脱液优选为乙腈和水,所述乙腈和水的体积比优选为30:70~80:20。在本发明中,所述具有式VII所示结构的依波加生物碱的提纯条件:所述第二硅胶柱层析采用的洗脱液中石油醚和丙酮的体积比优为20:1~10:1;所述第二反相色谱分离采用的洗脱液优选为乙腈和水,所述乙腈和水的体积比优选为 40:60~70:30。

[0074] 在本发明中,所述具有式II、式VI和式VIII所示结构的依波加生物碱优选从所述FrB部分提取得到。在本发明中,所述具有式II所示结构的依波加生物碱的提纯条件:所述第二硅胶柱层析采用的洗脱液中石油醚和丙酮的体积比优为20:1~5:1;所述第二反相色

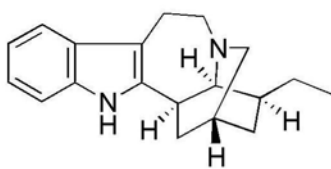
谱分离采用的洗脱液优选为甲醇和水,所述甲醇和水的体积比优选为20:80~80:20。在本发明中,所述具有式VI所示结构的依波加生物碱的提纯条件:所述石油醚和丙酮的体积比优选为20:1~5:1;所述反相色谱分离采用的洗脱液优选为甲醇和水,所述甲醇和水的体积比优选为30:70~50:50。在本发明中,所述具有式VIII所示结构的依波加生物碱的提纯条件:所述第二硅胶柱层析采用的洗脱液中石油醚和丙酮的体积比优选为20:1~10:1;所述第二反相色谱分离采用的洗脱液优选为甲醇和水,所述甲醇和水的体积比优选为25:75~55:45。

[0075] 在本发明中,所述具有式III和式IV所示结构的依波加生物碱优选从所述FrC部分提取得到。在本发明中,所述具有式III所示结构的依波加生物碱的提纯条件:所述第二硅胶柱层析采用的洗脱液中石油醚和丙酮的体积比优选为10:1~1:1;所述第二反相色谱分离采用的洗脱液优选为甲醇和水,所述甲醇和水的体积比优选为30:70~70:30。在本发明中,所述具有式IV所示结构的依波加生物碱的提纯条件:所述第二硅胶柱层析采用的洗脱液中石油醚和丙酮的体积比优选为10:1~5:1;所述第二反相色谱分离采用的洗脱液优选为甲醇和水,所述甲醇和水的体积比优选为30:70~70:30。

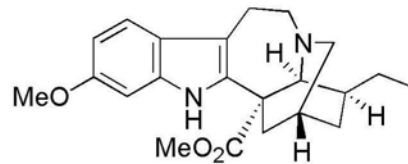
[0076] 本发明对于所述硅胶柱层析、反相色谱C-18分离和Sephadex LH-20分离的操作没有特殊限定,采用本领域熟知的硅胶柱层析、反相色谱C-18分离和Sephadex LH-20分离的操作方式即可。

[0077] 本发明提供的依波加生物碱的制备方法不需要化学合成,以狗牙花为原料进行提取得到,原料来源广泛、成本低,而且避免使用大量的有机原料以及复杂的制备过程,绿色环保,操作简单。

[0078] 本发明提供一种依波加生物碱的药学上可接受的盐,所述依波加生物碱包括上述技术方案所述依波加生物碱或具有式V~VIII所示结构中的任意一种的依波加生物碱或其药学上可接受的盐;

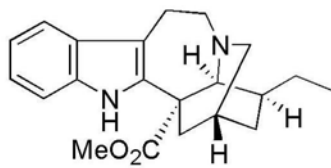


式V

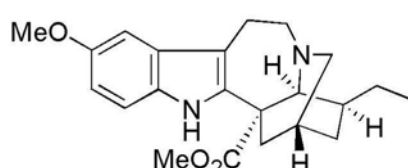


式VI

[0079]



式VII



式VIII

[0080] 在本发明中,所述依波加生物碱的药学上可接受的盐包括依波加生物碱的有机酸盐或依波加生物碱的无机酸盐;所述依波加生物碱的有机酸盐优选包括依波加生物碱的酒石酸盐、依波加生物碱的柠檬酸盐、依波加生物碱的甲酸盐、依波加生物碱的乙酸盐或依波加生物碱的乙二酸盐;所述依波加生物碱的无机酸盐优选包括依波加生物碱的盐酸盐、依波加生物碱的氢溴酸盐、依波加生物碱的硝酸盐或依波加生物碱的硫酸盐。

[0081] 本发明提供了上述技术方案所述依波加生物碱的药学上可接受的盐的制备方法,

包括以下步骤：将依波加生物碱和酸反应，得到依波加生物碱的药学上可接受的盐；所述酸为有机酸或无机酸。在本发明中，所述有机酸优选包括酒石酸、柠檬酸、甲酸、乙酸或乙二酸；所述无机酸优选包括盐酸、氢溴酸、硝酸或硫酸。

[0082] 本发明提供的依波加生物碱的药学上可接受的盐对白念氟康唑耐药株也具有很强耐药逆转活性，也是具有发展潜力的可逆转白念氟康唑耐药株耐药性的候选药物。

[0083] 本发明提供了一种依波加生物碱药物组合物，包括上述技术方案所述的依波加生物碱和/或上述技术方案所述的依波加生物碱的药学上可接受的盐。

[0084] 在本发明中，所述依波加生物碱药物组合物还包括可药用载体和/或赋形剂。在本发明中，所述依波加生物碱药物组合物优选包括依波加生物碱和/或其药学上可接受的盐、药用载体和/或赋形剂。在本发明中，所述依波加生物碱药物组合物中依波加生物碱和/或其药学上可接受的盐的质量百分含量优选为0.1~99%，更优选为0.5~90%；所述依波加生物碱药物组合物中药用载体和/或赋形剂的总质量百分含量优选为1~99.9%，更优选为10~99.5%。

[0085] 本发明对于所述药用载体或所述赋形剂没有特殊限定，采用本领域熟知的药用载体或赋形剂即可，具体如固体、半固体或液体稀释剂，填料或药物制品辅剂中的一种或多种。在本发明中，所述依波加生物碱药物组合物的制剂种类优选包括液体制剂、固体制剂、喷剂或雾剂；所述液体制剂优选包括注射剂、混悬剂、乳剂、溶液剂或糖浆剂；所述固体制剂优选包括片剂、胶囊剂、颗粒剂或冲剂。本发明中对于所述依波加生物碱药物组合物的制备方法没有特殊限定，采用本领域熟知的制备方法即可。

[0086] 在本发明中，所述依波加生物碱药物组合物的给药方式优选为注射、口服、舌下给药或粘膜透析；所述注射优选包括静脉注射、静脉滴注、肌肉注射、腹腔注射或皮下注射。

[0087] 在本发明中，所述依波加生物碱药物优选以单位体重服用量的形式使用。在本发明中，所述单位体重服用量优选为5~20mg/kg。

[0088] 本发明还提供了上述技术方案所述依波加生物碱、具有式V~VIII所示结构的依波加生物碱、上述技术方案所述依波加生物碱的药学上可接受的盐或上述技术方案所述依波加生物碱药物组合物在制备逆转白念氟康唑耐药株耐药性药物中的应用。在本发明中，所述依波加生物碱或其药学上可接受的盐或依波加生物碱药物组合物在作为逆转白念氟康唑耐药株耐药性药物使用时，优选与氟康唑配合使用。

[0089] 下面将结合本发明中的实施例，对本发明中的技术方案进行清楚、完整地描述。显然，所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

[0090] 实施例1

[0091] 狗牙花干燥枝叶10kg，用50L甲醇加热至68℃回流提取3次，每次提取3h，合并提取液，减压蒸馏回收甲醇，得到浸膏。

[0092] 将所述浸膏用2000mL 5%的盐酸水溶液混合，并调节pH值至2，分别用2000mL石油醚和2000mL乙酸乙酯各萃取3次，然后用饱和碳酸钠溶液调节pH值至9，用氯仿萃取，得到总碱(70g)。

[0093] 将所述总碱采用石油醚/丙酮梯度洗脱(石油醚/丙酮=30:1~10:1, v/v)，然后反

相色谱C-18分离(甲醇/水=20:80~90:10,v/v),得到FrA、FrB和 FrC三部分。

[0094] FrA部分依次采用硅胶柱层析、反相色谱C-18分离和Sephadex LH-20 分离得到具有式V和式VII所示结构的依波加生物碱;

[0095] 其中,具有式V所示结构的依波加生物碱的提纯条件:硅胶柱层析采用石油醚/丙酮梯度洗脱(石油醚/丙酮=30:1~10:1,v/v),反相色谱C-18分离(乙腈/水=30:70~80:20,v/v),Sephadex LH-20(甲醇)分离,得到具有式 V所示结构的依波加生物碱(0.12g,收率0.0012%,纯度98%,无色油状);

[0096] 具有式VII所示结构的依波加生物碱的提纯条件:硅胶柱层析采用石油醚/丙酮梯度洗脱(石油醚/丙酮=20:1~10:1,v/v),反相色谱C-18分离(乙腈/水=40:60~70:30,v/v),Sephadex LH-20(甲醇)分离,得到式VII所示结构的依波加生物碱(0.5g,收率0.005%,纯度98%,无色油状)。

[0097] FrB部分依次采用硅胶柱层析、反相色谱C-18分离和Sephadex LH-20 分离得到具有式II、式VI和式VIII所示结构的依波加生物碱;

[0098] 其中,具有式II所示结构的依波加生物碱的提纯条件:硅胶柱层析采用石油醚/丙酮梯度洗脱(石油醚/丙酮=20:1~5:1,v/v),反相色谱C-18分离(甲醇/水=20:80~80:20,v/v),Sephadex LH-20(甲醇)分离,得到具有式 II所示结构的依波加生物碱(0.10g,收率0.001%,纯度98%,无色油状);

[0099] 具有式VI所示结构的依波加生物碱的提纯条件:硅胶柱层析采用石油醚/丙酮梯度洗脱(石油醚/丙酮=20:1~5:1,v/v),反相色谱C-18分离(甲醇/水=30:70~50:50,v/v),Sephadex LH-20(甲醇)分离,得到具有式VI 所示结构的依波加生物碱(0.045g,收率0.00045%,纯度98%,无色油状);

[0100] 具有式VIII所示结构的依波加生物碱的提纯条件:硅胶柱层析采用石油醚/丙酮梯度洗脱(石油醚/丙酮=20:1~10:1,v/v),反相色谱C-18分离(甲醇/水=25:75~55:45,v/v),Sephadex LH-20(甲醇)分离,得到具有式VIII 所示结构的依波加生物碱(0.06g,收率0.0006%,纯度98%,无色油状)。

[0101] FrC部分依次采用硅胶柱层析、反相色谱C-18分离和Sephadex LH-20 分离得到具有式III和式IV所示结构的依波加生物碱;

[0102] 其中,具有式III所示结构的依波加生物碱的提纯条件:硅胶柱层析采用石油醚/丙酮梯度洗脱(石油醚/丙酮=10:1~1:1,v/v),反相色谱C-18分离(甲醇/水=30:70~70:30,v/v),Sephadex LH-20(甲醇)分离,具有式III 所示结构的依波加生物碱(0.05g,收率0.0005%,纯度98%,无色油状)

[0103] 具有式IV所示结构的依波加生物碱的提纯条件:硅胶柱层析采用石油醚/丙酮梯度洗脱(石油醚/丙酮=10:1~5:1,v/v),反相色谱C-18分离(甲醇/水=30:70~70:30,v/v),Sephadex LH-20(甲醇)分离,得到具有式IV 所示结构的依波加生物碱(0.035g,收率0.00035%,纯度98%,无色油状)。

[0104] 具有式II所示结构的依波加生物碱的结构表征数据: $[\alpha]_D^{19}$:129.4(c 0.05, MeOH);UV(MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 284(4.02), 221(4.49) nm;IR(KBr) ν_{\max} 3386, 2953, 2928, 1727, 1486, 1456, and 1258 cm^{-1} ;ESIMS 427[M+H]⁺;HRESIMS m/z 427.2237(calcd for C₂₄H₃₀N₂O₅ [M+H]⁺, 427.2227);¹H NMR(CDCl₃, 600 MHz)和¹³C NMR(CDCl₃150 MHz)数据如表1和2所示。

[0105] 具有式III所示结构的依波加生物碱的结构表征数据: $[\alpha]_D^{19} + 4.0$ (c 0.32, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 209 (4.34), 222 (4.37), 283 (3.90) nm; IR (KBr) ν_{\max} 3419, 2945, 1722, 1629, 1461 cm^{-1} ; ESIMS m/z 441 [M+H]⁺; HRESIMS m/z 441.2383 [M+H]⁺ (calcd for C₂₅H₃₂N₂O₅, 441.2384); ¹H NMR (CDCl₃, 600MHz) 和 ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) 数据如表1和2所示。

[0106] 具有式IV所示结构的依波加生物碱的结构表征数据: $[\alpha]_D^{19} - 8.4$ (c 0.37, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 209 (4.44), 225 (4.46), 298 (3.79) nm; IR (KBr) ν_{\max} 3425, 2931, 1722, 1628, 1484, 1454 cm^{-1} ; ESIMS m/z 439 [M-H]⁻; HRESIMS m/z 439.2230 [M-H]⁻ (calcd for C₂₅H₃₂N₂O₅, 439.2238); ¹H NMR (CDCl₃, 600MHz) 和 ¹³C NMR (CDCl₃, 150MHz) 数据如表1和2所示。

[0107] 具有式V所示结构的依波加生物碱的结构表征数据:C₁₉H₂₄N₂; ESIMS:m/z 281 [M+H]⁺; ¹H-NMR (500MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.35 (2H, m, H-3), 3.28 (2H, m, H-5a), 3.17 (2H, m, H-5b), 3.19 (2H, m, H-6a), 3.00 (2H, m, H-6b), 7.08 (1H, m, H-10), 7.08 (1H, m, H-11), 7.23 (1H, d, J=8.0Hz, H-12), 1.89 (1H, d, J=5.5Hz, H-14), 1.41 (2H, m, H-15), 2.67 (2H, dd, J=12.0, 3.5 Hz, H-17a), 1.98 (2H, m, H-17b), 0.89 (3H, t, J=7.5Hz, H-18), 1.25 (1H, m, H-20), 2.03 (1H, m, H-21), 7.65 (1H, s, NH); ¹³C NMR (CDCl₃, 150MHz) 数据如表2所示。

[0108] 具有式VI所示结构的依波加生物碱的结构表征数据:C₂₂H₂₈N₂O₂; ESIMS:m/z 369 [M+H]⁺; ¹H-NMR (500MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2.96 (2H, m, H-3a), 2.81 (2H, d, J=2.0Hz, H-3b), 3.22 (2H, m, H-5), 3.35 (2H, m, H-6), 7.33 (1H, dd, J=13.5, 8.0Hz, H-9), 6.74 (1H, m, H-10), 6.75 (2H, d, J=8.0Hz, H-12), 1.89 (2H, d, J=5.5Hz, H-14), 1.46 (2H, m, H-15), 2.53 (2H, d, J=2.0Hz, H-17), 0.89 (3H, t, J=7.0Hz, H-18), 1.53 (5H, m, H-20), 3.53 (1H, s, H-21), 3.71 (3H, s, OMe), 3.82 (3H, s, H-OMe), 7.67 (1H, s, NH); ¹³C NMR (CDCl₃, 150MHz) 数据如表2所示。

[0109] 具有式VII所示结构的依波加生物碱的结构表征数据:C₂₁H₂₆N₂O₂; ESIMS:m/z 339 [M+H]⁺; ¹H-NMR (500MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2.90 (1H, dd, J=8.5, 4.0Hz, H-3a), 2.80 (1H, d, J=8.5Hz, H-3b), 3.15 (1H, m, H-5a), 3.04 (1H, m, H-5b), 3.40 (1H, m, H-6a), 3.21 (1H, m, H-6b), 7.49 (1H, dd, J=7.5, 1.5Hz, H-9), 7.09 (1H, ddd, J=13.5, 7.5, 3.0Hz, H-10), 7.15 (1H, ddd, J=8.0, 7.5, 1.5Hz, H-11), 7.25 (1H, dd, J=7.5, 1.5Hz, H-12), 1.89 (1H, m, H-14), 1.76 (1H, m, H-15a), 1.36 (1H, m, H-15b), 2.59 (1H, d, J=6.5Hz, H-17a), 1.91 (1H, m, H-17b), 0.91 (3H, t, J=4.5Hz, H-18), 1.58 (1H, m, H-19a), 1.51 (1H, m, H-19b), 1.35 (1H, m, H-20), 3.56 (1H, br s, H-21), 3.71 (3H, s, OMe), 7.93 (1H, br s, NH); ¹³C NMR (CDCl₃, 150MHz) 数据如表2所示。

[0110] 具有式VIII所示结构的依波加生物碱的结构表征数据:C₂₂H₂₈N₂O₃; ESIMS:m/z 369 [M+H]⁺; ¹H-NMR (500MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2.96 (1H, m, H-3), 3.20 (1H, m, H-5), 3.36 (1H, m, H-6), 6.92 (1H, d, J=6.0Hz, H-9), 6.80 (1H, dd, J=9.5, 6.0Hz, H-11), 7.14 (1H, d, J=6.0Hz, H-12), 1.87 (2H, s, H-14), 1.43 (2H, m, H-15), 2.47 (2H, d, J=6.0Hz, H-17), 0.89 (3H, t, J=4.0Hz, H-18), 1.31 (3H, m, H-20), 3.54 (1H, s, H-21), 3.71 (3H, s, 10-OMe), 3.83 (3H, s, CO₂Me), 7.68 (1H, s, NH); ¹³C NMR (CDCl₃, 150MHz) 数据如表2所示。

[0111] 表1具有式II、III和IV所示结构的依波加生物碱的¹H NMR数据

	position	II ^a	III ^b	IV ^b
	3	3.55 (s)	3.36 (m)	3.37 (dd, 10.0, 4.0)
	5a	3.48 (s)	3.34 (m)	3.33 (dd, 11.0, 6.0)
[0112]	5b	3.19 (m)	3.13 (m)	3.11 (m) ^c
	6a	3.06 (m)	3.12 (m)	3.11 (m) ^c
	6b	3.98 (m)	3.03 (m)	3.04 (m)
	9	6.90 (d, 2.4)	6.89 (d, 2.0)	7.30 (d, 8.0)
	10			6.76 (dd, 8.0, 2.0)
	11	6.81 (dd, 8.8, 2.4)	6.82 (dd, 8.5, 2.0)	
	12	7.13 (d, 8.8)	7.14 (d, 8.5)	6.73 (d, 2.0)
	14	2.23 (m)	1.86 (br s)	1.86 (br s)
	15a	1.60 (br s)	1.95 (m)	1.95 (m)
	15b	1.08 (dd, 13.0, 6.6)	1.39 (m)	1.38 (m) ^c
	17a	2.67 (d, 13.6)	2.62 (dd, 14.0, 2.0)	2.60 (br d, 13.5)
	17b	2.00 (dt, 13.6, 2.4)	2.09 (m)	2.09 (m)
	18	0.89 (t, 7.5)	1.10 (d, 6.0)	1.10 (d, 6.0)
	19a	1.67 (m)	4.15 (q, 6.0)	4.14 (q, 6.0)
	19b	1.49 (m)		
[0113]	20	1.30 (m)	1.39 (m)	1.39 (m) ^c
	21	3.55 (s)	3.85 (s)	3.83 (s)
	22a		2.76 (dd, 17.5, 9.0)	2.77 (dd, 18.0, 9.5)
	22b		2.65 (dd, 17.5, 3.5)	2.63 (dd, 18.0, 3.5)
	23	3.71 (s)		
	24		2.12 (s)	
	NH		7.68 (s)	7.67 (s)
	CO ₂ Me	3.68 (s)	3.72 (s)	3.72 (s)
	OMe-10	3.84 (s)	3.84 (s)	
	OMe-11			3.83 (s)

^a600 MHz, acetone-*d*₆. ^b500 MHz, CDCl₃. ^cOverlapped.

[0114] 表2具有式II~VIII和IV所示结构的依波加生物碱的¹³C NMR数据

position	II ^a	III ^b	IV ^b	V ^b	VI ^b	VII ^b	VIII ^b
[0115] 2	137.0	136.3	134.1	141.8	136.1	136.6	137.5
3	57.0	54.7	54.6	49.9	51.3	51.6	51.5
5	52.8	50.6	50.6	54.1	53.0	53.2	53.1
6	21.8	21.7	21.6	20.6	22.2	22.1	22.2
7	110.1	109.5	109.6	109.2	110.0	110.4	110.1
8	129.0	128.8	122.7	129.6	123.1	128.8	129.2
9	100.7	100.7	119.1	117.8	109.1	118.5	100.8
10	154.1	154.2	94.2	119.1	119.1	119.2	154.0
11	122.1	112.5	156.8	120.9	156.5	121.9	111.8
12	111.4	111.3	109.3	110.0	94.2	110.3	111.1
13	130.5	130.6	136.3	134.6	135.2	135.5	130.5
14	30.8	30.3	30.3	26.4	27.4	27.4	26.8
15	28.5	18.4	18.4	34.1	32.1	32.1	32.0
16	54.7	53.9	53.8	41.9	55.7	55.1	55.1
17	37.0	37.8	37.8	32.0	36.5	36.5	36.5
[0116] 18	11.7	20.3	20.3	11.9	11.7	11.7	11.5
19	26.6	71.6	71.6	27.7	26.7	26.8	26.8
20	38.5	39.3	39.3	41.4	39.2	39.2	27.3
21	63.1	60.8	60.8	57.6	57.6	57.5	57.5
22	174.8	44.9	44.8				
23	52.7	207.6	207.7				
24	174.2	31.1	31.8				
CO ₂ Me	175.2	174.8	174.9		175.9	175.9	175.8
	51.6	53.1	53.0		52.6	52.7	52.6
OMe-10	56.0	56.0					56.1
OMe-11			55.7		55.0		

^a150 MHz, acetone-*d*₆. ^b125 MHz, CDCl₃. ^c125 MHz, acetone-*d*₆. ^d150 MHz.

- [0117] 由表1和表2可知,本发明成功制备得到有式II~VIII所示结构的依波加生物碱。
- [0118] 实施例2
- [0119] 将实施例1制备的依波加生物碱和注射用水混合均匀,依次进行精滤、灌封灭菌,得到依波加生物碱注射液。
- [0120] 实施例3
- [0121] 依波加生物碱的医学上可接受的盐:
- [0122] 将实施例1制备的依波加生物碱分别和质量浓度为4%的酒石酸、柠檬酸、甲酸、乙酸、乙二酸、盐酸、氢溴酸、硝酸、硫酸反应,分别得到依波加生物碱的酒石酸盐、柠檬酸盐、依波加生物碱的甲酸盐、依波加生物碱的乙酸盐、依波加生物碱的乙二酸盐、依波加生物碱的盐酸盐、依波加生物碱的氢溴酸盐、依波加生物碱的硝酸盐、依波加生物碱的硫酸盐。
- [0123] 实施例4
- [0124] 将实施例1制备的依波加生物碱溶于无菌注射用水中,搅拌至依波加生物碱溶解,经无菌抽滤漏斗过滤和无菌精滤后分装于安瓿中,然后低温冷冻干燥后无菌熔封,得到依波加生物碱药物组合物粉针剂。
- [0125] 实施例5
- [0126] 将实施例1制备的依波加生物碱与赋形剂按照质量比为9:1混合均匀,进行低温冷冻干燥和灭菌,得到依波加生物碱药物组合物粉剂。
- [0127] 实施例6
- [0128] 将实施例1制备的依波加生物碱和赋形剂按照质量比分别为1:5、1:5.5、1:6、1:6.5、1:7、1:7.5、1:8、1:8.5、1:9、1:9.5、1:10混合均匀,制粒压片,得到依波加生物碱药物组合物片剂。
- [0129] 实施例7
- [0130] 将实施例1制备的依波加生物碱采用常规口服液的制备方法,制备得到依波加生物碱药物组合物口服液。
- [0131] 实施例8
- [0132] 将实施例1制备的依波加生物碱和赋形剂按照质量比为5:1混合均匀,分别采用常规的胶囊剂、颗粒剂和冲剂的制备方法,制备得到依波加生物碱药物组合物胶囊、依波加生物碱药物组合物颗粒剂和依波加生物碱药物组合物冲剂。
- [0133] 实施例9
- [0134] 将实施例1制备的依波加生物碱和赋形剂按照质量比为3:1混合均匀,分别采用常规的胶囊剂、颗粒剂和冲剂的制备方法,制备得到依波加生物碱药物组合物胶囊、依波加生物碱药物组合物颗粒剂和依波加生物碱药物组合物冲剂。
- [0135] 测试例
- [0136] 将实施例1制备的依波加生物碱溶解于DMSO中,得到浓度为128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的依波加生物碱溶液,将依波加生物碱溶液加入到96孔培养板中,加入白念氟康唑耐药株菌液,使白念氟康唑耐药株菌液的终浓度为 1×10^5 CFU/mL,实验同时设置培养基空白对照组(D1)、白念氟康唑耐药株对照组以及两性霉素B对照组,在37°C条件下培养24h,用酶标仪测定625nm下各样品的OD值,计算各样品的抑制率,抑制率(%) = $(1 - \text{样品OD值} / \text{白念氟康唑耐药株对照组OD值}) \times 100\%$,抑制率结果如表3所示。

[0137] 表3对白念氟康唑耐药株的抑制作用

样品	样品浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	抑制率 (%)
两性霉素 B	0.25	100.161 \pm 0.053
II	128	9.732 \pm 3.832
III	128	-2.571 \pm 1.385
[0138] IV	128	-4.08 \pm 0.981
V	128	19.176 \pm 1.021
VI	128	0.612 \pm 2.039
VII	128	-0.082 \pm 2.943
VIII	128	0.572 \pm 3.982

[0139] 由表3可知,依波加生物碱对于白念氟康唑耐药株无明显抑制活性。

[0140] 将128 $\mu\text{g/mL}$ 的依波加生物碱溶液与5 $\mu\text{g/mL}$ 的氟康唑混合均匀,加入到96孔培养板中,向各孔加入白念氟康唑耐药株菌液,白念氟康唑耐药株菌液的终浓度为 $1 \times 10^5 \text{CFU/mL}$,实验同时设置培养基空白对照组、白念氟康唑耐药株对照组、两性霉素B对照组和氟康唑对照组,在37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养24h,用酶标仪测定625nm下各样品的OD值,计算各样品的抑制率,抑制率(%) = (1-样品OD值/白念氟康唑耐药株对照组OD值) \times 100%,抑制率结果如表4所示。

[0141] 表4氟康唑和依波加生物碱混合物对白念氟康唑耐药株的抑制作用

样品	样品浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	氟康唑浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	抑制率 (%)
氟康唑	0	5	2.054 \pm 0.327
II	128	5	84.522 \pm 2.872
III	128	5	84.864 \pm 1.366
[0142] IV	128	5	71.89 \pm 3.751
V	128	5	91.718 \pm 3.751
VI	128	5	99.429 \pm 0.231
VII	128	5	99.511 \pm 0.231
VIII	128	5	99.47 \pm 0.058

[0143] 由表4可知,以5 $\mu\text{g/mL}$ 氟康唑和128 $\mu\text{g/mL}$ 的依波加生物碱共同作用于白念氟康唑耐药株时,对白念氟康唑耐药株的抑制率在70%以上,抑制率最高可达99.742%,表明,本发明提供的依波加生物碱对白念氟康唑耐药株耐药性具有很强耐药逆转活性,是一类有发展潜力的可逆转白念氟康唑耐药株耐药性的候选药物。

[0144] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。