



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108853068 B

(45) 授权公告日 2022.08.19

(21) 申请号 201810930362.9

C07C 37/82 (2006.01)

(22) 申请日 2018.08.15

A61P 31/10 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108853068 A

(56) 对比文件

Shinji Tokuyama, et al.. Anti-MRSA and Antifungal Compounds from the Mushroom *Albatrellus dispansus* (Lloyd) Canf. et Gilb. (Aphyllphoromycetideae). 《International Journal of Medicinal Mushrooms》. 2007, 第9卷第159-161页.

(43) 申请公布日 2018.11.23

(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 白雪 张凌

审查员 包宁疆

(74) 专利代理机构 北京千壹知识产权代理事务
所(普通合伙) 11940
专利代理师 郭士磊 刘洁

(51) Int. Cl.

A61K 31/05 (2006.01)

A61K 31/4196 (2006.01)

C07C 39/19 (2006.01)

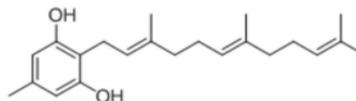
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

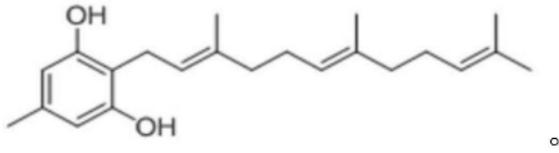
一种法尼基酚类化合物grifolin及其药物组合物和其应用

(57) 摘要

本发明提供一种法尼基酚类化合物grifolin及其药物组合物和其应用,属于药物技术领域。从黑盖地花菌(*Albatrellus yasuda*)中分离得到的法尼基酚类化合物grifolin通过体外实验研究表明,法尼基酚类化合物grifolin能够有效逆转白色念珠菌耐药性,恢复白色念珠菌氟康唑耐药株对氟康唑的敏感性,此新发现的法尼基酚类化合物grifolin的耐药逆转活性可用于真菌耐药逆转剂的研发。



1. 一种法尼基酚类化合物grifolin和氟康唑在制备抑制白色念珠菌氟康唑耐药株的药物中的应用;其中,法尼基酚类化合物grifolin的结构式如下:



。

一种法尼基酚类化合物grifolin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,具体涉及从黑盖地花菌(*A. yasuda*)中分离得到的法尼基酚类化合物grifolin,及其在制备真菌耐药逆转剂中的应用。

技术背景:

[0002] 近年来,由于器官移植、导管插管、放疗等医疗技术的应用,免疫抑制剂、广谱抗生素、激素以及抗肿瘤药物的大量使用,以及HIV感染者的增加,真菌感染发病率急剧上升,尤其是念珠菌已成为血液感染的主要致病菌,死亡率居首位。而其中,白色念珠菌感染占念珠菌病的60%-70%。临床上治疗真菌感染的药物仍然很有限,主要是两性霉素B和唑类药物。两性霉素B虽然是抗真菌治疗的金标准,但随其累积剂量的增多,可在肝脏、肾脏、心血管系统和神经系统等引发严重毒性反应,明显限制了其应用。唑类药物尤其是氟康唑,抗菌谱较广,口服生物利用度高,药物相互作用少,因而在临床上广泛应用。但其大剂量、长期使用引起白色念珠菌耐药率显著上升,导致临床治疗失败。因此,在目前研发新的抗真菌药物存在一定难度时,寻找有效的具有逆转真菌耐药性,使耐药真菌对现有抗真菌药物再次敏感的天然产物,具有十分积极的意义。

[0003] 地花菌属(*Albatrellus*)真菌是担子菌纲(*Basidiomycetes*),多孔菌目(*Polyporales*),地花菌科(*Albatrellaceae*)的高等真菌。该属真菌主要分布于北美、东亚和欧洲,国内共报道了17个种。黑盖地花菌(*A. yasuda*)为地花菌属(*Albatrellus*)的一种,主要分布于我国云南、四川、西藏和福建等地。地花菌属高等真菌以产生结构特征为法尼基酚类的grifolin衍生物而闻名。这些化合物可分为两类:grifolin单体和二聚体。grifolin单体具有广泛的生物活性,如抗氧化、抗微生物、色氨酸酶抑制剂、促进黑色素合成、VR-1受体抑制、体外诱导肿瘤细胞凋亡、TNF- α 抑制、抗艾滋病、抑制RAW264.7细胞中NO释放等活性。但是关于grifolin的逆转真菌耐药性活性未见报道。本发明发现grifolin的新活性,即能够逆转白色念珠菌耐药株对氟康唑的耐药性。基于该活性的真菌耐药逆转剂的研发和应用定能为耐药真菌感染者带来福音。

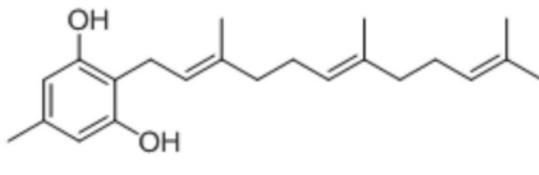
发明内容:

[0004] 本发明的目的在于提供一种来源黑盖地花菌(*A. yasuda*)的法尼基酚类化合物grifolin,及其药物组合物在制备真菌耐药逆转剂中的用途。

[0005] 为了实现本发明的上述目的,本发明提供了如下的技术方案:

[0006] 如下结构式所示的化合物grifolin在制备真菌耐药逆转剂中的应用,

[0007]



[0008] 本发明同时提供了一种药物组合物,其含有所述的法尼基酚类化合物grifolin作

为有效成分,至少还包含一种药学上可接受的载体。

[0009] 本发明还提供了所述的法尼基酚类化合物grifolin在制备真菌耐药逆转剂中的应用。

[0010] 所述的法尼基酚类化合物grifolin在逆转白色念珠菌耐药性中的应用。

[0011] 所述的法尼基酚类化合物grifolin在恢复白色念珠菌氟康唑耐药株对氟康唑的敏感性中的应用。

[0012] 本发明所述的法尼基酚类化合物grifolin通过下述方法制备:

[0013] 将黑盖地花菌 (*A. yasuda*) 新鲜子实体用乙醇在室温下浸泡,减压蒸干得到浸膏250g。提取物用正相硅胶进行粗分,用石油醚/乙酸乙酯梯度洗脱。乙酸乙酯/丙酮(20:1,v/v)得到的片段1经正相硅胶柱氯仿/乙酸乙酯(10:1,v/v)洗脱得到化合物grifolin。

[0014] 化合物grifolin为黄色油状物,其分子式为 $C_{22}H_{32}O_2$ 。 1H -NMR ($CDCl_3$): 6.24 (2H, s, H-1 and H-3), 5.28 (1H, t, $J=7.0$ Hz, H-2'), 5.09 (2H, m, H-6' and H-10'), 3.40 (2H, t, $J=7.0$ Hz, H-1'), 2.21 (3H, s, H-8), 2.14~1.96 (8H, m, H-4', H-5', H-8' and H-9'), 1.69 (3H, s, H-12'), 1.61 (3H, s, H-13'), 1.59 (3H, s, H-14'), 1.96 (3H, s, H-15'); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$): 154.8 (s, C-4 and C-6), 138.9 (s, C-3'), 137.5 (s, C-2), 135.4 (s, C-7'), 131.2 (s, C-11'), 124.4 (d, C-10'), 123.6 (d, C-6'), 121.6 (d, C-2'), 110.4 (s, C-5), 109.0 (d, C-1 and C-3), 39.6 (t, C-4'), 39.5 (t, C-8'), 26.6 (t, C-5'), 26.3 (t, C-9'), 25.6 (q, C-12'), 22.1 (t, C-1'), 21.0 (q, C-8), 17.6 (q, C-13'), 16.2 (q, C-15'), 16.0 (q, C-14')。以上数据与文献报道一致。

附图说明:

[0015] 图1为本发明化合物grifolin的结构示意图;

[0016] 图2为氟康唑(1000 μ g/mL)和grifolin单用及合用对白念氟康唑耐药株的抑制作用;

[0017] 图3为氟康唑(5 μ g/mL)和grifolin单用及合用对白念氟康唑耐药株的抑制作用。

[0018] 图4为氟康唑(5 μ g/mL)对grifolin诱导白念氟康唑耐药株的抑制作用。

具体实施方式:

[0019] 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。

[0020] 实施例1:

[0021] 将黑盖地花菌 (*A. yasuda*) 新鲜子实体用乙醇在室温下浸泡,减压蒸干得到浸膏250g。提取物用正相硅胶进行粗分,用石油醚/乙酸乙酯梯度洗脱。乙酸乙酯/丙酮(20:1,v/v)得到的片段1经正相硅胶柱氯仿/乙酸乙酯(10:1,v/v)洗脱得到化合物grifolin。

[0022] 化合物grifolin为黄色油状物,其分子式为 $C_{22}H_{32}O_2$ 。 1H -NMR ($CDCl_3$): 6.24 (2H, s, H-1 and H-3), 5.28 (1H, t, $J=7.0$ Hz, H-2'), 5.09 (2H, m, H-6' and H-10'), 3.40 (2H, t, $J=7.0$ Hz, H-1'), 2.21 (3H, s, H-8), 2.14~1.96 (8H, m, H-4', H-5', H-8' and H-9'), 1.69 (3H, s, H-12'), 1.61 (3H, s, H-13'), 1.59 (3H, s, H-14'), 1.96 (3H, s, H-15'); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$): 154.8 (s, C-4 and C-6), 138.9 (s, C-3'), 137.5 (s, C-2), 135.4 (s, C-7'), 131.2 (s, C-11'), 124.4 (d, C-10'), 123.6 (d, C-6'), 121.6 (d, C-2'), 110.4 (s, C-5), 109.0 (d, C-1 and C-3), 39.6

(t,C-4'), 39.5 (t,C-8'), 26.6 (t,C-5'), 26.3 (t,C-9'), 25.6 (q,C-12'), 22.1 (t,C-1'), 21.0 (q,C-8), 17.6 (q,C-13'), 16.2 (q,C-15'), 16.0 (q,C-14')。以上数据与文献报道一致。

[0023] 实施例2:

[0024] 氟康唑 (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和grifolin单用及合用对白念氟康唑耐药株的抑制实验:

[0025] 实验试剂:氟康唑、DMSO购自Sigma公司;葡萄糖、琼脂粉、氯霉素购自Scientific Research Special公司。

[0026] 实验方法:将倍比稀释的grifolin (128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 分别与1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氟康唑混合均匀后加入96孔板,每个浓度设置3个重复孔;向各孔加入白色念珠菌氟康唑耐药株菌液,菌液终浓度为 1×10^5 CFU/mL;37 $^{\circ}\text{C}$ 培养24h,酶标仪测定625nm下的OD值。实验同时设置培养基空白对照、白色念珠菌氟康唑耐药株对照、氟康唑 (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 对照及grifolin (128 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 对照。

[0027] 抑制率 (%) = $(1 - \text{实验孔OD}_{625\text{nm}} / \text{对照孔OD}_{625\text{nm}}) \times 100\%$

[0028] 实验结果:grifolin (128 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 对白念氟康唑耐药株无抑制作用,氟康唑 (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 对白念氟康唑耐药株抑制率仅为41.587%。氟康唑 (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和不同浓度的grifolin (128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 共同作用于白念氟康唑耐药株时,显示非常强的抑制作用,抑制率均大于80%。具体实验数据见表1。

[0029] 表1氟康唑 (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和grifolin单用及合用对白念氟康唑耐药株的抑制作用

	氟康唑浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	grifolin 浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	抑制率 (%)
	1000	-	41.587 \pm 0.133
	-	128	-5.909 \pm 0.353
	1000	128	90.899 \pm 0.733
[0030]	1000	64	90.445 \pm 0.866
	1000	32	89.786 \pm 0.067
	1000	16	87.526 \pm 0.399
	1000	8	87.338 \pm 0
	1000	4	83.667 \pm 3.196

[0031] 实验结果表明,化合物grifolin (128 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 单独作用于白念氟康唑耐药株时并无抑制活性,但与氟康唑 (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 共同作用时,对白念氟康唑耐药株的抑制率是氟康唑 (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 单独作用的至少2倍。说明grifolin显著逆转了白念氟康唑耐药株的耐药性。由于氟康唑 (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 浓度较高,抑制率没有呈现出浓度依赖性,因而进行了实施例3的实验。

[0032] 实施例3:

[0033] 氟康唑 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和grifolin单用及合用对白念氟康唑耐药株的抑制实验:

[0034] 实验试剂:氟康唑、DMSO购自Sigma公司;葡萄糖、琼脂粉、氯霉素购自Scientific Research Special公司。

[0035] 实验方法:将倍比稀释的grifolin (128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 分别与5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氟康唑混合均匀后加入96孔板,每个浓度设置3个重复孔;向各孔加入白色念珠菌氟康唑耐药株菌

液,菌液终浓度为 1×10^5 CFU/mL;37℃培养24h,酶标仪测定625nm下的OD值。实验同时设置培养基空白对照、白色念珠菌氟康唑耐药株对照、氟康唑(5μg/mL)对照及grifolin(128μg/mL)对照。

[0036] 抑制率(%) = $(1 - \text{实验孔OD}_{625\text{nm}} / \text{对照孔OD}_{625\text{nm}}) \times 100\%$

[0037] 实验结果:grifolin(128μg/mL)对白念氟康唑耐药株无抑制作用,氟康唑(5μg/mL)对白念氟康唑耐药株抑制率仅为27.071%。氟康唑(5μg/mL)和不同浓度的grifolin(128μg/mL-4μg/mL)共同作用于白念氟康唑耐药株时,显示非常强的抑制作用,且呈浓度依赖性,即随grifolin浓度降低,抑制作用逐渐减弱。具体实验数据见表2。

[0038] 表2氟康唑(5μg/mL)和grifolin单用及合用对白念氟康唑耐药株的抑制

	氟康唑浓度(μg/mL)	grifolin浓度(μg/mL)	抑制率(%)
	5	-	27.071±1.174
	-	128	-6.248±0.824
	5	128	81.714±0.222
[0039]	5	64	81.479±0
	5	32	76.002±0.197
	5	16	58.472±0.370
	5	8	51.585±0.392
	5	4	46.342±1.427

[0040] 实验结果表明,化合物grifolin(128μg/mL)单独作用于白念氟康唑耐药株时并无抑制活性,但与氟康唑(5μg/mL)共同作用时,对白念氟康唑耐药株的抑制率显著提高,且呈浓度依赖性。即使是较低浓度(4μg/mL)的grifolin与氟康唑(5μg/mL)共同作用于白念氟康唑耐药株,其抑制率仍是氟康唑(5μg/mL)单独作用的1.71倍,进一步说明grifolin作为耐药逆转剂具备一定优势和潜力。

[0041] 实施例4:

[0042] 氟康唑(5μg/mL)对grifolin诱导处理的白念氟康唑耐药株的抑制实验:

[0043] 实验试剂:氟康唑、DMSO购自Sigma公司;葡萄糖、琼脂粉、氯霉素购自Scientific Research Special公司。

[0044] 实验方法:以128μg/mL的grifolin连续诱导处理白念氟康唑耐药株4代。检测氟康唑对grifolin诱导后的各代白念氟康唑耐药株的抑制活性。取96孔培养板,氟康唑终浓度为5μg/mL,加入grifolin诱导处理的白念氟康唑耐药株,终浓度为 1×10^5 CFU/mL,每个浓度设置3个重复孔,37℃培养24h,酶标仪测定625nm下的OD值。

[0045] 抑制率(%) = $(1 - \text{实验孔OD}_{625\text{nm}} / \text{对照孔OD}_{625\text{nm}}) \times 100\%$

[0046] 实验结果:氟康唑(5μg/mL)对grifolin诱导处理的白念氟康唑耐药株抑制率呈现逐代上升趋势,具体数据见表3。

[0047] 表3氟康唑(5μg/mL)对grifolin诱导处理的白念氟康唑耐药株的抑制作用

[0048]	氟康唑浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	抑制率 (%)			
		诱导 1 代	诱导 2 代	诱导 3 代	诱导 4 代
	5	23.432 \pm 0.811	35.907 \pm 2.911	37.832 \pm 1.100	44.467 \pm 4.911

[0049] 实验结果表明:以grifolin诱导处理白念氟康唑耐药株,可逆转白念氟康唑耐药株的耐药性,使白念氟康唑耐药株对氟康唑敏感性逐代上升。该结果再次验证了grifolin的耐药逆转活性。

[0050] 实施例5:

[0051] 按实施例1制得化合物grifolin 50mg,将其溶解于2mL丙二醇中,过滤所得溶液在无菌条件下装入安瓿瓶中。

[0052] 实施例6:

[0053] 按实施例1制得化合物grifolin,按其与赋形剂重量比为9:1的比例加入赋形剂,制成粉剂。

[0054] 实施例7:

[0055] 按实施例1制得化合物grifolin,按其与赋形剂重量比为1:1的比例加入赋形剂,制粒压片。

[0056] 实施例8:

[0057] 按实施例1制得化合物grifolin,按常规胶囊制剂方法制成胶囊。

[0058] 实施例9:

[0059] 按实施例1制得化合物grifolin,按常规口服液制法制成口服液。

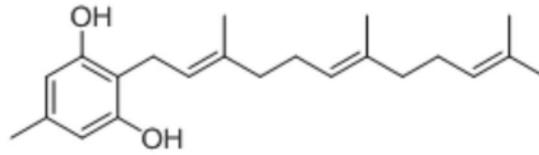


图1

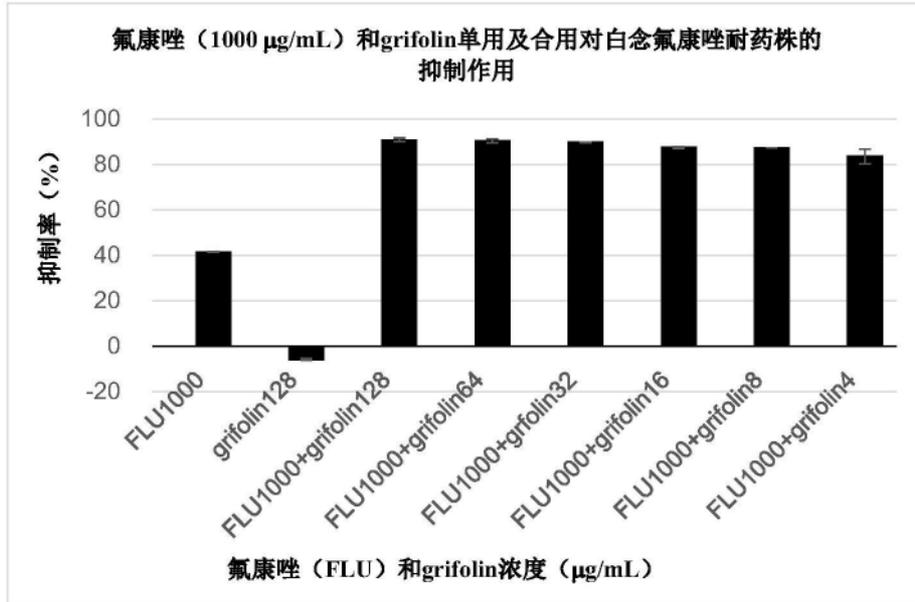


图2

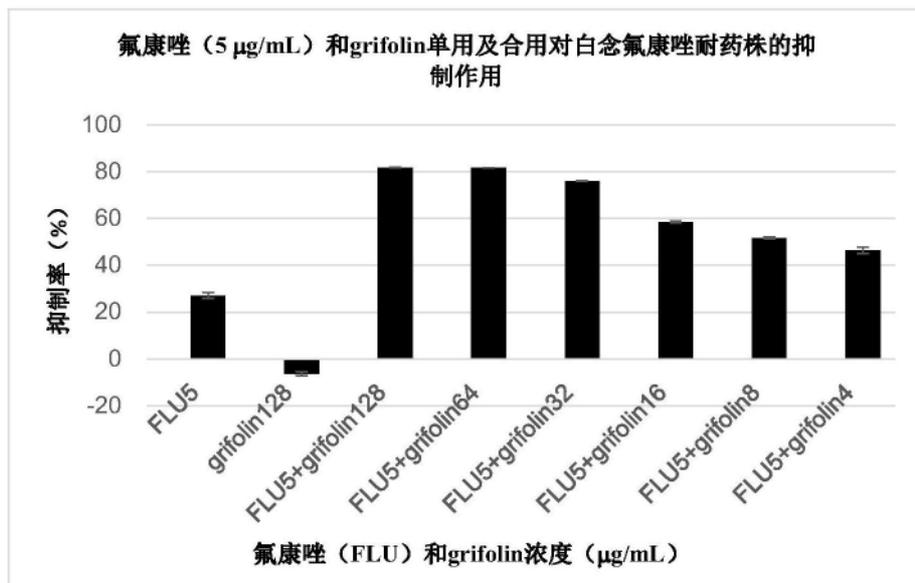


图3

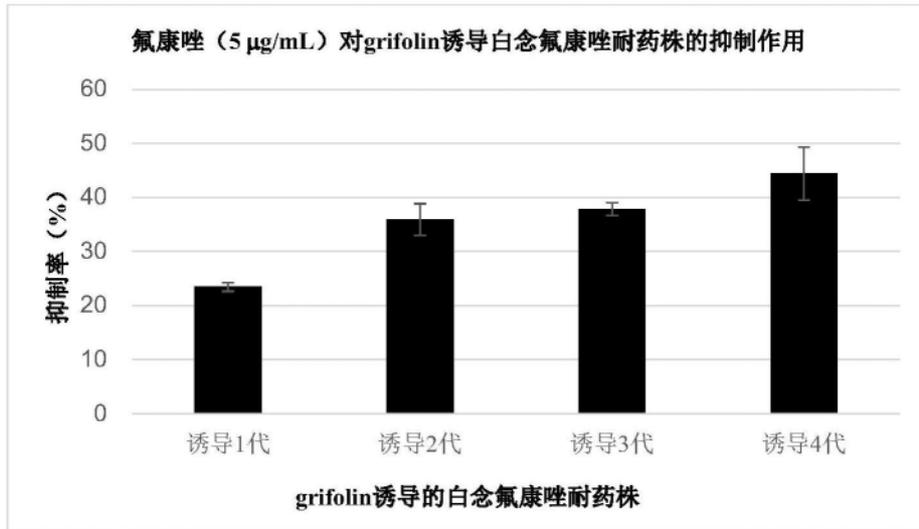


图4