



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101812079 A

(43) 申请公布日 2010.08.25

(21) 申请号 201010119068.3

(22) 申请日 2010.03.08

(83) 生物保藏信息

CCTCCM2010043 2010.02.09

(71) 申请人 中国海洋大学

地址 266100 山东省青岛崂山区松岭路 238 号

(72) 发明人 朱天骄 顾谦群 李莉媛 李德海

(51) Int. Cl.

C07D 519/00 (2006.01)

C12P 17/18 (2006.01)

A61K 31/554 (2006.01)

A61K 31/548 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页

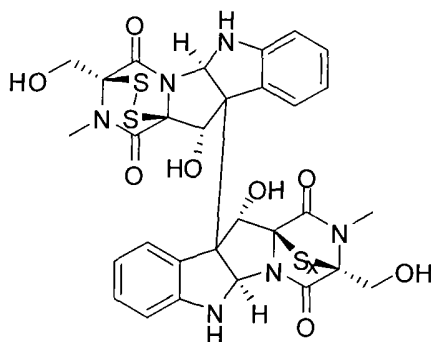
(54) 发明名称

一种含多硫键的哌嗪类化合物及其制备方法和用途

(57) 摘要

本发明涉及一种含多硫键的哌嗪类化合物的制备方法和用途。本发明用分离自南极长城站土壤样品的真菌 *Oidiodendron truncatum* GW3-13 生产出结构新颖的含多硫键的哌嗪类化合物。经实验证实,该类化合物可作为细胞增殖抑制剂或缺氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1) 靶向抗肿瘤剂。

1. 式 I 化合物



式 I

其结构特征是：含多硫键的二酮哌嗪二聚体，其中 $x = 2$ 或 3 。

本发明优选的式 I 化合物其中 $x = 3$ 。

2. 权利要求 1 所述式 I 化合物的制备方法，其特征是发酵培养 *Oidiodendron truncatum* GW3-13 (中国典型培养物保藏中心，保藏编号是：CCTCC M 2010043)，获取含有上述式 I 的发酵物，然后从发酵物中分离纯化出式 I 化合物。

3. 权利要求 2 所述的制备方法，其中将所述发酵物经硅胶柱层析，以石油醚、石油醚-氯仿，氯仿-甲醇为溶剂进行梯度洗脱，分为 7 个流份，其中第 4 个洗脱流份氯仿-甲醇 (19 : 1) 洗脱部分，再经加压硅胶柱层析，半制备反相高效液相色谱分离纯化得式 I 化合物。

4. 权利要求 1 所述的式 I 化合物在制备细胞增殖抑制剂中的用途。

5. 权利要求 1 所述的式 I 化合物在制备缺氧诱导因子 (HIF-1) 靶向抗肿瘤剂中的用途

6. 权利要求 1 所述的式 I 化合物在制备抗肿瘤药物中的用途。

一种含多硫键的哌嗪类化合物及其制备方法和用途

技术领域：

[0001] 本发明涉及用 *Oidiodendron truncatum* GW3-13(保藏编号是 :CCTCC M 2010043) 生产含多硫键的哌嗪类化合物 (ETPs) 的方法 ; 本发明还涉及该类化合物在制备细胞增殖抑制剂或缺氧诱导因子 (HIF-1) 靶向抗肿瘤剂中的用途。

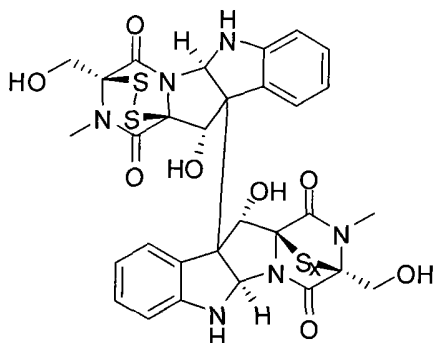
背景技术：

[0002] 本发明人曾经从 *Oidiodendron truncatum* GW3-13(保藏编号是 :CCTCC M 2010043) 液体发酵产物中发现具有明显抗肿瘤活性的含多硫键的哌嗪类化合物。研究发现所示含多硫键的哌嗪类化合物具有细胞增殖抑制活性、细胞毒活性及缺氧诱导因子 (HIF-1) 抑制活性,但是市场上尚未见有与此有关的药物。

发明内容：

[0003] 本发明旨在提供一种结构独特的具有抑制肿瘤细胞增殖作用,具有抗肿瘤活性的化合物。其结构式

[0004]



[0005] 式 I

[0006] 其结构特征是 : 含多硫键的二酮哌嗪二聚体, 其中 $x = 2$ 或 3 。

[0007] 本发明优选的式 I 化合物其中 $x = 3$ 。

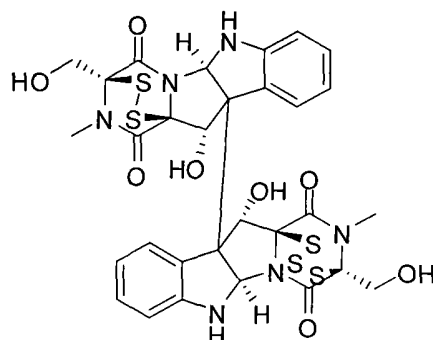
[0008] 本发明的式 I 化合物可通过微生物发酵培养来获取含有含多硫键的哌嗪类化合物的发酵物, 然后从发酵物中采用硅胶柱层析、制备 HPLC 等方法分离纯化得到。

[0009] 本发明的下述实施例中列举了利用 *Oidiodendron truncatum* GW3-13(保藏编号是 :CCTCC M 2010043) 制备本发明式 I 化合物的实例。

具体实施方式：

[0010] 在如下的实施例中所指的化合物 I 的化学结构：

[0011]



[0012] 化合物 I

[0013] 实施例 1 化合物 I 的发酵生产及分离精制

[0014] 1 发酵生产

[0015] 生产菌的发酵培养：按培养微生物的常规方法，取 *Oidiodendron truncatum* GW3-13 (保藏编号是：CCTCC M 2010043) 适量，接种到 PDA 固体斜面培养基上，在 15 摄氏度培养箱中培养 10 天。

[0016] 用接种针刮取适量孢子接种到接入装有 300ml 培养基 [山梨醇 2%、麦芽糖 2%、味精 1%、 KH_2PO_4 0.05%、 MgSO_4 0.03%、色氨酸 0.05%、酵母浸膏 0.1%、黄豆粉 0.05%、味精 0.2%] 的 1000ml 发酵三角瓶中，20℃ 左右静置培养约 30 天，获得菌丝体和发酵液。

[0017] 2 浸膏的获得

[0018] 用棉布将菌丝体和发酵液分离。将菌丝体用丙酮浸提三次，减压浓缩至不含丙酮，所得水层用等体积乙酸乙酯萃取三次，合并乙酸乙酯萃取液减压浓缩，得粗浸膏。发酵液减压浓缩为四分之一体积后，用乙酸乙酯萃取三次，合并菌丝体和发酵液的浸膏，共 35.0 克。

[0019] 3 化合物的分离精制

[0020] 浸膏 (35.0 克) 用氯仿-甲醇混合溶剂溶解后，加 300 克 200-300 目硅胶 (青岛海洋化工集团公司产品) 拌样，减压除去溶剂后，用硅胶柱层析，以石油醚、石油醚-氯仿，氯仿-甲醇为溶剂进行梯度洗脱，分为 7 个组份。Fr-4 (氯仿-甲醇 19 : 1 洗脱物)，再经加压硅胶柱层析以氯仿：甲醇 (50 : 1) 为溶剂进行洗脱，半制备反相高效液相色谱分离得化合物 I (300mg)。

[0021] 化合物 I 白色无定形粉末，分子式 $\text{C}_{30}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_8\text{S}_5$ 。

[0022] ^1H 和 ^{13}C -NMR 数据见表 1。

[0023] 表 1 化合物 I 的 ^1H 和 ^{13}C NMR 数据 (400 和 100MHz, in CDCl_3)^a

No.	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	HMBC (H→C) ^b
1		169.1	
		s	
3		74.4	
		s	
4		165.5	
		s	
5a	4.99 s	81.8	6a, 10a, 11, 11a,

[0025]

		d	10b'
6a		150.8	
7	6.74 d, 7.9	s 111.2 d	9, 10a
8	7.21 t, 7.5	131.0d	
9	6.81 t	120.3	7, 10a
10	7.72 d, 6.8	d 128.6	
10a		d 126.6	
10b		s 63.5	
11	5.75 s	s 84.5	10a
11a		d 84.4	
12	3.24 s	s 27.4	1, 3, 13
13	3.92 dd 4.13 dd	q 62.2 t	3, 4
1'		166.4	
3'		s 75.5	
4'		s 162.7	
5a'	5.07 s	s 83.0	6a', 10a', 11a', 10b, 10b'
6a'		d 148.4	
7'	6.66 d, 7.8	s 110.9	9', 10a'
8'	7.14 t, 7.4	d 130.1	
9'	6.83 t	d 120.7	7', 10a'
10'	7.72 d, 6.8	d 128.6	
10a'		d 128.9	
10b'		s 65.7	
11'	5.30 s	s 83.9	6a', 10a' 10b', 10b
11a'		d 76.1	
12'	3.09 s	s 27.0	1', 3', 13'
13'	4.17 dd 4.25 dd	q 60.2 t	3', 4'

[0026] a) 本表信号归属基于 DEPT、HMQC 及 HMBC 图谱解析结果。碳信号的多重度

[0027] 利用 DEPT 方法确定并分别用 s(单重峰)、d(二重峰)、t(三重峰)和 q(四重峰)

表示。

[0028] b) 此栏中的数字和代号分别代表在 HMBC 谱中与相应行中的 ^1H 给出耦合相关信号的 ^{13}C 核。

[0029] 实施例 2 体外抗肿瘤活性的测试

[0030] 细胞增殖抑制活性测试

[0031] 1 实验样品及实验方法

[0032] 被测样品溶液的配制测试样品为上述实施例 1 中分离精制的化合物 I 纯品。精密称取适量样品,用甲醇配制成所需浓度的溶液,供测活性。

[0033] 细胞系及细胞的继代培养采用人肺癌 A549 细胞、人肝癌 BEL-7402 细胞、人白血病 HL60 细胞及小鼠白血病 P388 细胞等癌细胞系。各种细胞均用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基,在 32℃ (P388 细胞) 或在 37℃ (A549、HL60 及 BEL-7402 细胞) 于通入 5% 二氧化碳的培养箱中继代培养。

[0034] 细胞增殖抑制活性测试方法

[0035] 丽丝胺罗丹明 B (SRB) 法取对数生长期的人肺癌 A549 细胞、人肝癌 BEL-7402 细胞,用新鲜的 RPMI-1640 培养基配制成密度为每毫升 2×10^5 个细胞的细胞悬液,按每孔 200 微升接种于 96 孔板中,每孔加入 2 微升不同浓度的样品或空白溶液,37℃ 下培养 24 小时。取药物作用下培养后的细胞,首先在光学显微镜下观察药物处理引起的形态学变化,判断有无细胞周期抑制,细胞凋亡或细胞坏死的形态学特征,继而在 4℃、3000 转 / 分钟离心 3 分钟,吸去上清。每孔细胞中加入 20% 三氯醋酸 50 微升,置于 4℃ 固定 1 小时,用水冲洗 5 次并空气干燥。每孔加入 0.4% SRB 的醋酸溶液 50 微升并在室温静置 30 分钟。用 1% 醋酸水清洗 4 次,除去未结合的游离 SRB 染料。每孔加入 150 微升 Tris 缓冲液 (10mmol/L, pH 10.5) 溶解蛋白结合染料并利用 MD 公司产 SPECTRA MAX Plus 型酶标仪测定每孔在 520nm 处的光密度 (OD) 值。在同一块 96 孔板中样品的每个浓度均设置三孔,另设三孔空白对照和无细胞调零孔 (如果药物有颜色要做相应药物浓度无细胞调零)。各孔 OD 值先做相应无细胞调零,再取三孔平均 OD 值按 $\text{IR}\% = (\text{OD}_{\text{空白对照}} - \text{OD}_{\text{样品}}) / \text{OD}_{\text{空白对照}} \times 100\%$ 式计算每个浓度下的细胞增殖抑制率 (IR%)。

[0036] 四氮唑盐 (MTT) 法取对数生长期的人白血病 HL60 细胞和小鼠白血病 P388 细胞,将细胞密度调至每毫升 2×10^5 个细胞,按每孔 200 微升接种于 96 孔细胞培养板中,于 37℃ 通入 5% CO_2 的培养箱中培养 4 小时。每孔加样品液或空白液各 2 微升,培养 24 小时后,每孔加 MTT 液 (MTT 的每毫升 5 毫克生理盐水溶液) 10 微升,继续培养 4 小时,37℃、2000 转 / 分钟离心 8 分钟,吸去上清。每孔加入 DMSO 各 100 微升,在微量振荡器上振荡 15 分钟,至结晶完全溶解后,利用 MD 公司产 SPECTRA MAX Plus 型酶标仪测定每孔在 570nm 处的吸光值 (OD 值)。在同一块 96 孔板中样品的每个浓度均设置三孔,另设三孔空白对照和无细胞调零孔 (如果药物有颜色要做相应药物浓度无细胞调零)。各孔 OD 值先做相应无细胞调零,再取三孔平均 OD 值按 $\text{IR}\% = (\text{OD}_{\text{空白对照}} - \text{OD}_{\text{样品}}) / \text{OD}_{\text{空白对照}} \times 100\%$ 式计算每个浓度下的细胞增殖抑制率 (IR%)。

[0037] 2 实验结果

[0038] 细胞增殖抑制活性测试结果

[0039] 在 SRB 法或 MTT 法测试中,不同浓度的化合物 I 对人肺癌 A549 细胞、人肝癌

BEL-7402 细胞、人白血病 HL60 细胞的增殖抑制结果见表 2。

[0040] 表 2 不同浓度的化合物 I 对癌细胞增殖的抑制率 (%)

	细胞株	化合物 I				
		1x10 ⁻⁴ M	1x10 ⁻⁵ M	1x10 ⁻⁶ M	1x10 ⁻⁷ M	1x10 ⁻⁸ M
[0041]	A549	98.6	98.1	56.4	1.0	3.1
	BEL-7402	98.4	97.0	90.0	-3.8	-5.0
	HL60	81.8	84.4	85.8	86.9	30.8

[0042] 3 结论

[0043] 化合物 I 具有较明显的肿瘤细胞增殖抑制作用,可作为细胞增殖抑制剂或抗肿瘤剂用于抗肿瘤的研究。

[0044] 实施例 3 体外缺氧诱导因子 -1 (HIF-1) 抑制活性测试

[0045] 1 实验样品及实验方法

[0046] 被测样品溶液的配制测试样品为上述实施例 1 中分离精制的化合物 I 纯品。精密称取适量样品,用 DMSO 配制成所需浓度的溶液,供测活性。

[0047] 细胞系及细胞的继代培养采用人乳腺癌 T47D 细胞系。细胞用含 10% FBS 和 L- 谷氨酰胺的 DMEM/F-12 培养基,并加入 50U/ml 青霉素和 50 μg/ml 链霉素,于通入 5% 二氧化碳的培养箱中 37℃ 继代培养。

[0048] 缺氧诱导因子 HIF-1 抑制活性测试方法

[0049] 人乳腺癌 T47D 细胞,用 pTK-HRE3-luc reporter 转染后培养至对数生长期,用新鲜的含 10% FBS 和抗生素的 DMEM/F-12 培养基配制成密度为每毫升 4.5×10^5 个细胞的细胞悬液,按每 100 微升接种于 96 孔板中,37℃ 培养 24h。不同浓度的样品用含抗生素的 DMEM/F-12 培养基稀释后,每孔加入 100 微升继续培养 30min。然后细胞在自然缺氧条件 (1% O₂/5% CO₂/94% N₂) 或化学诱导缺氧条件 (10 μM 1,10-phenanthroline 诱导) 下培养,以正常氧条件 (5% CO₂/95% air) 为对照,16h 后溶解细胞,以微孔板闪烁计数器检测荧光素酶活性。抑制率由以下公式计算得到:

[0050]
$$IR\% = (1 - \text{light output}_{\text{treated}} / \text{light output}_{\text{induced}}) \times 100\%$$

[0051] 2 实验结果

[0052] 在 HIF-1 抑制活性测试中,不同浓度的化合物 I 对人乳腺癌 T47D 细胞的 HIF-1 抑制结果见表 3。

[0053] 表 3 不同浓度的化合物 I 对 T47D 细胞 HIF-1 的抑制率 (%)

	缺氧条件	化合物 I			
		1x10 ⁻⁵ M	3x10 ⁻⁶ M	1x10 ⁻⁶ M	3x10 ⁻⁷ M
[0054]	自然缺氧	100	100	94	26
	化学诱导缺氧	100	99	95	15

[0055] 3 结论

[0056] 化合物 I 具有较明显的缺氧诱导因子 (HIF-1) 抑制作用,可作为肿瘤靶向抑制剂

或靶向抗肿瘤剂用于抗肿瘤的研究。