



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101691393 A

(43) 申请公布日 2010.04.07

(21) 申请号 200910035979.5

(22) 申请日 2009.10.15

(71) 申请人 南京大学

地址 210097 江苏省南京市汉口路 22 号

(72) 发明人 沈萍萍 卢彦 徐加发

(74) 专利代理机构 南京知识律师事务所 32207

代理人 胡锡瑜

(51) Int. Cl.

C07J 73/00 (2006.01)

C09K 11/06 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 2 页

(54) 发明名称

香豆素标记雷公藤内酯醇及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明属于生物制药技术领域,具体涉及一种香豆素标记雷公藤内酯醇及其制备方法和应用。用 4- 溴甲基 -7- 甲氧基香豆素标记雷公藤内酯醇,其分子量为 648,最大激发波长 320nm,最大发射波长 398nm,全波长光的照射下可发出黄色光,具有免疫抑制活性。制备时,先将雷公藤内酯醇 14 位羟基活化,后在丙酮溶剂中与 4- 溴甲基 -7- 甲氧基香豆素和碳酸钾反应,生成具有荧光特性的雷公藤内酯醇衍生物。将其加入活细胞中,可见细胞质有蓝色荧光,为雷公藤内酯醇的细胞定位于示踪提供了直观的证据。

1. 一种香豆素标记的雷公藤内酯醇，其特征是分子量为 648，最大激发波长 320nm，最大发射波长 398nm，在全波长光的照射下可发出黄色光，对于鼠源巨噬细胞株 ana-1 的 IC50 为 104ng/ml。

2. 根据权利要求 1 所述香豆素标记的雷公藤内酯醇的制备方法，其特征是由以下步骤构成：

1) 将雷公藤内酯醇 14 位的羟基进行衍生化活化，在 pH9-10 条件下与丁二酸酐进行酰化反应，得到 triptolide 14-succinate，以下称 mtp；

2) mtp 与 4- 溴甲基 -7- 甲氧基香豆素按照 1 : 3 的摩尔比，在 50mg/ml 碳酸钾、丙酮溶剂中反应，37℃，反应 1 小时，用大量热水洗涤产物，冷冻干燥。

3. 根据权利要求 1 所述香豆素标记的雷公藤内酯醇的细胞示踪方法，其特征是 DiI 溶液的终浓度为 5 μ M，香豆素标记的雷公藤内酯醇的终浓度为 4 μ M，37℃，细胞爬片染色时间为 30 分钟。

4. 根据权利要求 1 所述香豆素标记的雷公藤内酯醇在生物技术领域中的应用：

1) 雷公藤内酯醇及其衍生物 mtp 的细胞定位；

2) 雷公藤内酯醇及其衍生物 mtp 分子靶点的确定；

3) 雷公藤内酯醇及其衍生物 mtp 的药代动力学研究。

香豆素标记雷公藤内酯醇及其制备方法和应用

一. 技术领域

[0001] 本发明属于生物制药技术领域，具体涉及一种香豆素标记雷公藤内酯醇及其制备方法和应用。

二. 背景技术

[0002] 卫矛科雷公藤属雷公藤的根部提取物作为传统中药，用于治疗免疫性疾病，比如风湿性关节炎、肾炎、全身性红斑狼疮等已经有了几千年的历史。其中一种二萜类的化合物雷公藤内酯醇，英文 triptolide。是该提取物的主要活性成分。雷公藤内酯醇的化学分子式为 $C_{20}H_{24}O_6$ ，分子量为 360。目前，它的全合成已经获得成功。作为一种免疫抑制药物，雷公藤内酯醇具有很好的抗炎、抗肿瘤及抗生育作用，可应用于许多自身免疫性疾病的治疗，最近又显示其在器官移植抗排斥反应方面具有广阔的应用前景。

[0003] 雷公藤内酯醇作为一种药物，目前采用同位素标记的方法来研究其分子的细胞定位，但是同位素标记方法需要特殊实验条件，同时具有同位素污染产生，对实验人员也有伤害。由于目前实验手段的局限性，雷公藤内酯醇的细胞定位和分子靶点尚未明确。4-溴甲基-7-甲氧基香豆素与酸容易形成相应的酯，此类酯有很强的荧光而且相当稳定。这些衍生物的荧光光谱表明，激发光谱和荧光光谱的峰值分别位于 320-340nm 和 390-420nm 处。香豆素标记的雷公藤内酯醇产生的荧光，不仅为其体内示踪提供更加直观的证据，也可为其药代动力学研究提供新的参考。

三. 发明内容

[0004] 本发明需要解决的问题是提供一种用香豆素标记雷公藤内酯醇的制备及其应用的方法。

[0005] 本发明所述香豆素标记的雷公藤内酯醇是一种具有如下特征的分子：

[0006] 1) 分子量：648；2) 最大激发波长：320nm；3) 最大发射波长：398nm；4) 在全波长光

[0007] 的照射下可发出黄色光；5) 生物特性：对于鼠源巨噬细胞株 ana-1 的 IC₅₀ 为 104ng/ml。

[0008] 具有免疫抑制活性。

[0009] 本发明所述香豆素标记的雷公藤内酯醇的制备方法是：

[0010] 1) 雷公藤内酯醇的活化：将其 14 位的羟基进行衍生化活化，在 pH9-10 条件下，与丁二酸酐进行酰化反应，反应式如图 3 所示，得到 triptolide 14-succinate，以下称 mtp。

[0011] 2) 4-溴甲基-7-甲氧基香豆素标记：mtp 与 4-溴甲基-7-甲氧基香豆素，以下称 Br-Mmc，

[0012] 按照 1：3 的摩尔比在 50mg/ml 浓度的碳酸钾、丙酮溶剂中反应，37℃，反应 1 小时。

[0013] 反应方程式见图 4。用大量热水洗涤产物，冷冻干燥即可。

[0014] 香豆素标记的雷公藤内酯醇的鉴定方法：

[0015] 1) 电喷雾质谱鉴定标记产物：产物分子量为 648，见图 1。

[0016] 2) 香豆素标记的雷公藤内酯醇，具有明显荧光：最大激发波长 320nm，最大发射波长 398nm。且对照组雷公藤内酯醇与标记物 Br-Mmc 在此波长处无明显荧光。

[0017] 3) 香豆素标记的雷公藤内酯醇具有细胞毒性，可抑制免疫细胞生长。其 IC₅₀ 为 160nM；mtp 同条件下的 IC₅₀ 为 28nM；雷公藤内酯醇同条件下的 IC₅₀ 为 13.9nM。

[0018] 本发明与现有技术方法相比其有益效果是：本发明用香豆素标记雷公藤内酯醇，作为指示剂，产生的荧光效率高，不易淬灭，相当稳定，使得雷公藤内酯醇体内示踪变得直观可行。标记后雷公藤毒性的降低也为其体内示踪提供了有利的条件。本发明的主要用途为 1) 雷公藤内酯醇及其衍生物 mtp 的细胞定位；2) 雷公藤内酯醇及其衍生物 mtp 分子靶点的确定 3) 雷公藤内酯醇及其衍生物 mtp 的药代动力学研究。

四. 附图说明

[0019] 图 1. 香豆素标记的雷公藤内酯醇 ESI 谱图

[0020] 图 2. 雷公藤内酯醇细胞内荧光示踪图

[0021] 图 3. 雷公藤内酯醇的活化反应式

[0022] 图 4. 雷公藤内酯醇的香豆素标记反应式

五. 具体实施方式

[0023] 以下给出用香豆素标记雷公藤内酯醇制备及示踪的方法的实例。

[0024] 试剂：雷公藤内酯醇采购自深圳牌牌科技有限公司。4-溴甲基-7-甲氧基香豆素采购自 sigma 公司。

[0025] 香豆素标记雷公藤内酯醇制备：

[0026] 1) 取 10mg 雷公藤内酯醇，丁二酸酐 15mg，4-二甲氨基吡啶 0.33mg，溶解在 1ml 的二氯甲烷中。

[0027] 2) 用三乙胺调 pH 值在 9-10 左右。

[0028] 3) 在磁力搅拌器的搅拌下，室温反应 24 小时。

[0029] 4) 用大量温水洗涤反应物，将其中有机相烘干得到淡黄色晶体 triptolide 14-succinate。

[0030] 5) 取上述反应产物 triptolide 14-succinate 5mg，4-溴甲基-7-甲氧基香豆素 8.8mg，碳酸钾 50mg。

[0031] 6) 加入 1000ul 的丙酮溶剂中，在磁力搅拌器的搅拌下，37℃，反应 1 小时。

[0032] 7) 用大量热水洗涤产物，取有机相，烘干即得黄色的香豆素标记雷公藤内酯醇。

[0033] 香豆素标记雷公藤内酯醇细胞内示踪：

[0034] 1) Hepa1-6 细胞株培养条件：37℃，5% 二氧化碳，在含有 3% 小牛血清的 DMEM 培养基中，置于细胞培养箱中培养。

[0035] 2) 将细胞制成 1×10^5 个/ml 密度铺 6 孔板，每孔中放置一个边长 2.2cm 的盖玻片，每孔加入 2ml 的含有 2% 的小牛血清 DMEM，培养过夜，制成细胞爬片。

[0036] 3) 用 DMSO 溶解 DiI(一种商品化的细胞膜红色荧光染料), 浓度为 1mM; 用 DMSO 溶解香豆素标记的雷公藤内酯醇, 浓度为 1mM。

[0037] 4) 将 3) 步骤中的两种溶液分别加入 2) 步骤中的含有细胞爬片的 6 孔板中, 使得 DiI 溶液的终浓度为 5 μ M, 香豆素标记的雷公藤内酯醇的终浓度为 4 μ M, 37°C, 培养 30min。

[0038] 5) 将细胞爬片置于荧光显微镜中观察, 可见 DiI 在细胞膜部位发出红色荧光, 雷公藤发出的蓝色荧光主要位于胞质部位, 见图 2。

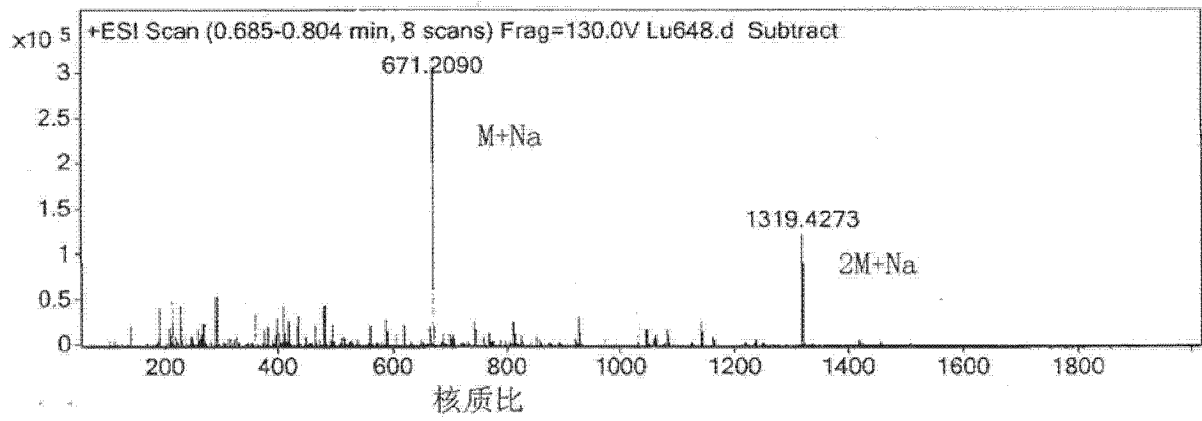


图 1

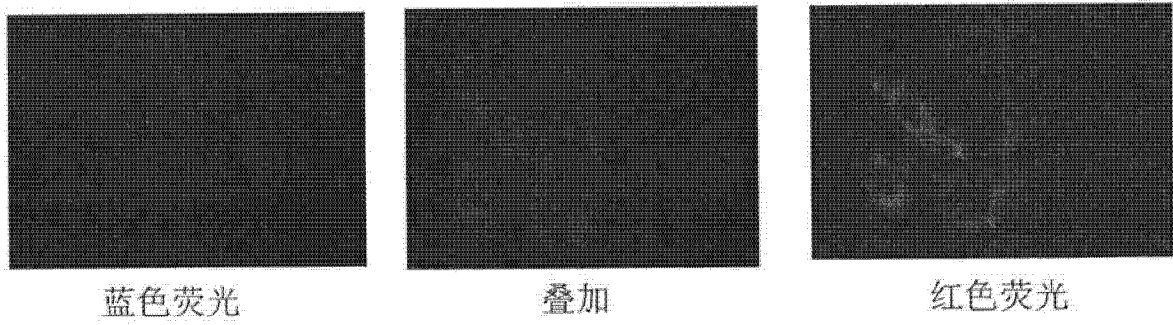


图 2

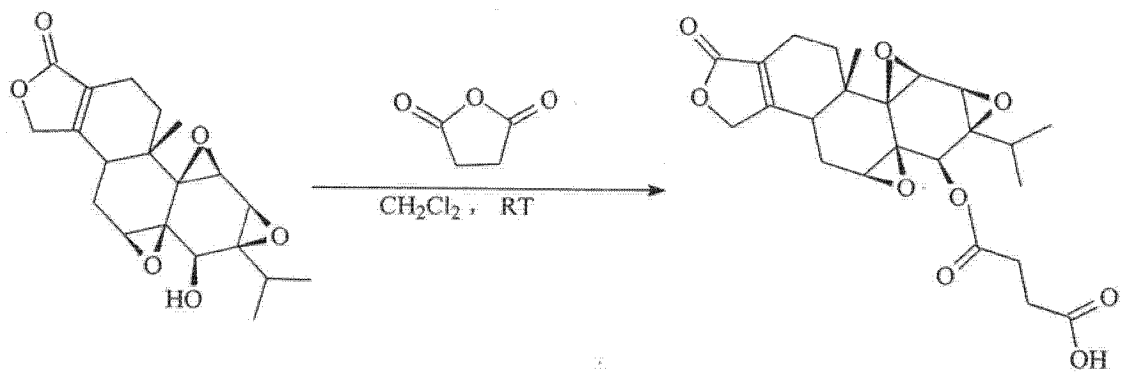


图 3

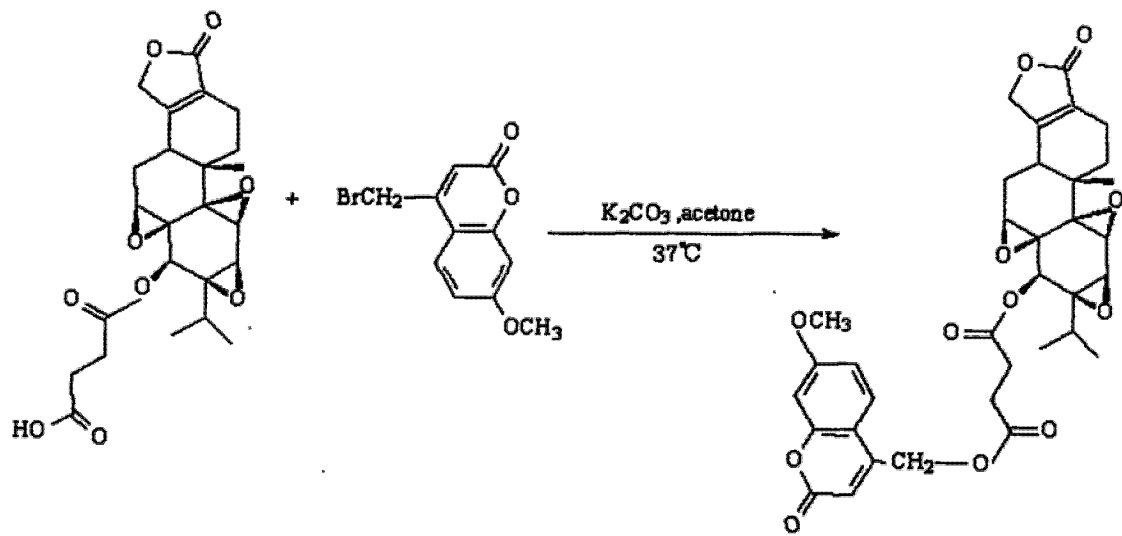


图 4

专利名称(译)	香豆素标记雷公藤内酯醇及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN101691393A	公开(公告)日	2010-04-07
申请号	CN200910035979.5	申请日	2009-10-15
[标]申请(专利权)人(译)	南京大学		
申请(专利权)人(译)	南京大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京大学		
[标]发明人	沈萍萍 卢彦 徐加发		
发明人	沈萍萍 卢彦 徐加发		
IPC分类号	C07J73/00 C09K11/06 G01N33/533 G01N21/64		
其他公开文献	CN101691393B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物制药技术领域，具体涉及一种香豆素标记雷公藤内酯醇及其制备方法和应用。用4-溴甲基-7-甲氧基香豆素标记雷公藤内酯醇，其分子量为648，最大激发波长320nm，最大发射波长398nm，全波长光的照射下可发出黄色光，具有免疫抑制活性。制备时，先将雷公藤内酯醇14位羟基活化，后在丙酮溶剂中与4-溴甲基-7-甲氧基香豆素和碳酸钾反应，生成具有荧光特性的雷公藤内酯醇衍生物。将其加入活细胞中，可见细胞质有蓝色荧光，为雷公藤内酯醇的细胞定位于示踪提供了直观的证据。

