

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

A61K 31/70

C07J 71/00

A61P 35/00

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 95111233.3

[45]授权公告日 2002年3月20日

[11]授权公告号 CN 1081036C

[22]申请日 1995.1.27 [24]颁证日 2002.3.20
[21]申请号 95111233.3
[30]优先权
[32]1994.7.29 [33]JP [31]178368/94
[73]专利权人 中国科学院成都生物研究所
地址 610041 四川省成都市人民南路四段九号
共同专利权人 东丽株式会社
[72]发明人 李宏 陈新民 川边纪雄
户上泰彦 上西宪明
[56]参考文献
美国化学文摘,118:154549 1993. 1. 1 JP04368336
植物杂志,(3) 1987. 1. 1 祝正银"峨眉山的几种中草药"
审查员 赵喜元

[74]专利代理机构 中国科学院成都专利事务所
代理人 宋树铭 淳泽

权利要求书1页 说明书12页 附图页数0页

[54]发明名称 呋甾醇类抗癌药物

[57]摘要

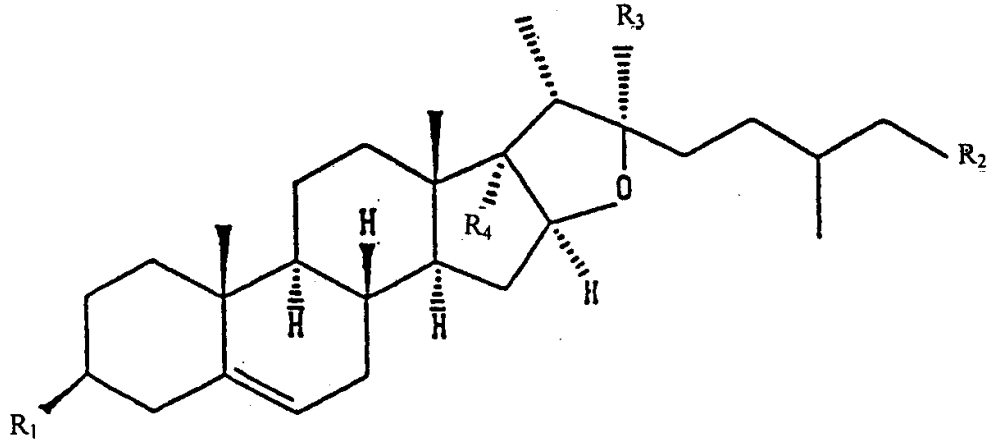
从药用植物丫蕊花中提取的呋甾醇类甾体皂甙作为有效成分的新型抗癌药能对人体的恶性黑色肿瘤细胞,人体结肠癌腺细胞,小鼠白血病细胞等有显著的抑制作用,无溶血作用,毒性较低,

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

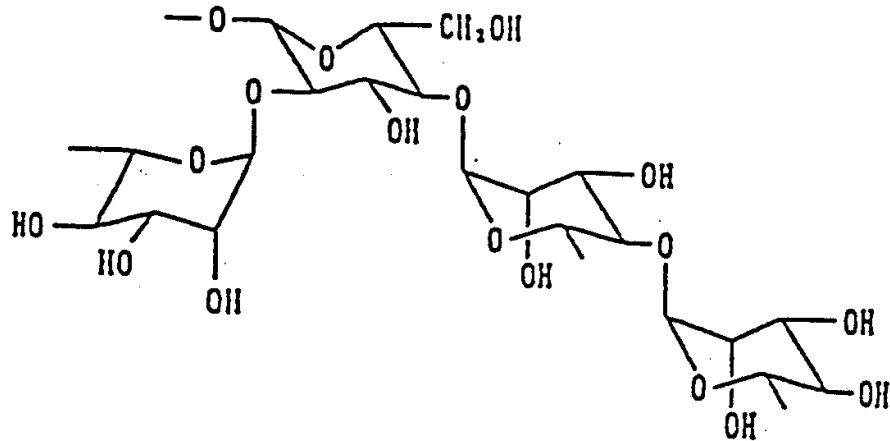
知识产权出版社出版

权 利 要 求 书

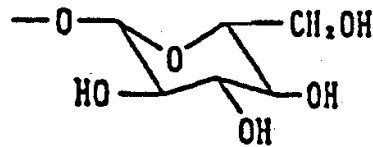
1、下述结构的化合物在制备抗癌药物中的用途，其特征是：所述化合物为呋甾醇类型甾体皂甙，其结构式为：



其中 R₁ 为



R₂ 为



式中的 R₃=OH, OCH₃; R₄=H, OH

2、权利要求 1 的用途,其特征是：所述癌为皮肤癌、子宫癌、肝癌、胃癌或喉头癌。

说明书

呋甾醇类抗癌药物

本发明涉及植物及其提取物。特别涉及一种具有抗癌活性的化合物及衍生物。

现在已知有多种物质对肿瘤有抑制作用,也有许多从天然界分出抗肿瘤物质的报告。对于皂甙类化合物,主要分为甾体皂甙和三萜皂甙两大类,它们在世界各国的传统药物中广泛存在。截至目前,已有许多甾体皂甙从植物中分离得到并进行了结构鉴定。根据 R. Tschesche 和 G. Wulff 所著“天然有机化学的未来”(W. Herz, H. Griesenbach, G. W. Kirby, Vienna—New York, Springer, 1973, 462—606 页)一文所述,甾体皂甙共分为四个类型,呋甾醇配糖体(furostand sapouin)是其中的一类。对于呋甾醇类甾体皂甙,宫村等人从 Paris Polyphylla SM(百合科)(Chem Pharm, Bull, 30(2), 712—718, 1982), 庄司等人从 Chamaerops humilis L, Trachycarpus Waynerianus BECC 以及 Rhaps exelsa Henry 和 R humilis BL(棕榈科)等的叶、茎、根部中分离得到,并测定了其结构。

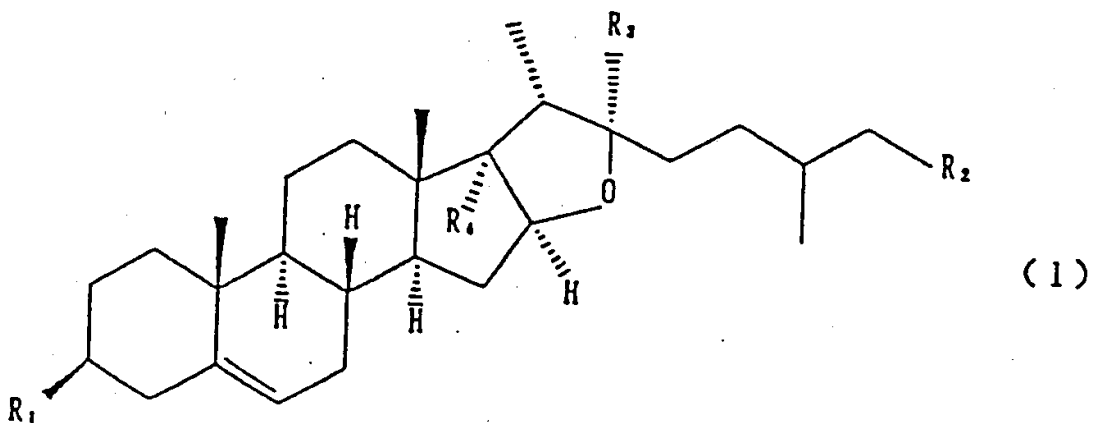
关于皂甙的抗癌活性,除 Tschesche 等,三桥等, Kupchan 等,庄司等有报道(化学领域, 35(6), 414, 1981), (日) 特许公开专利平 3—271224, 4—230696 中申请了含有薯蓣皂甙的螺甾醇配糖体的抗癌药, 4—41429 中申请了经提取及精制得到的甾体皂甙作为抗癌药, 昭 58—59921 中申请了含有甘萆茶皂甙的抗癌药外,其他虽已确定化学结构,但多未发表其生物活性。

说明书

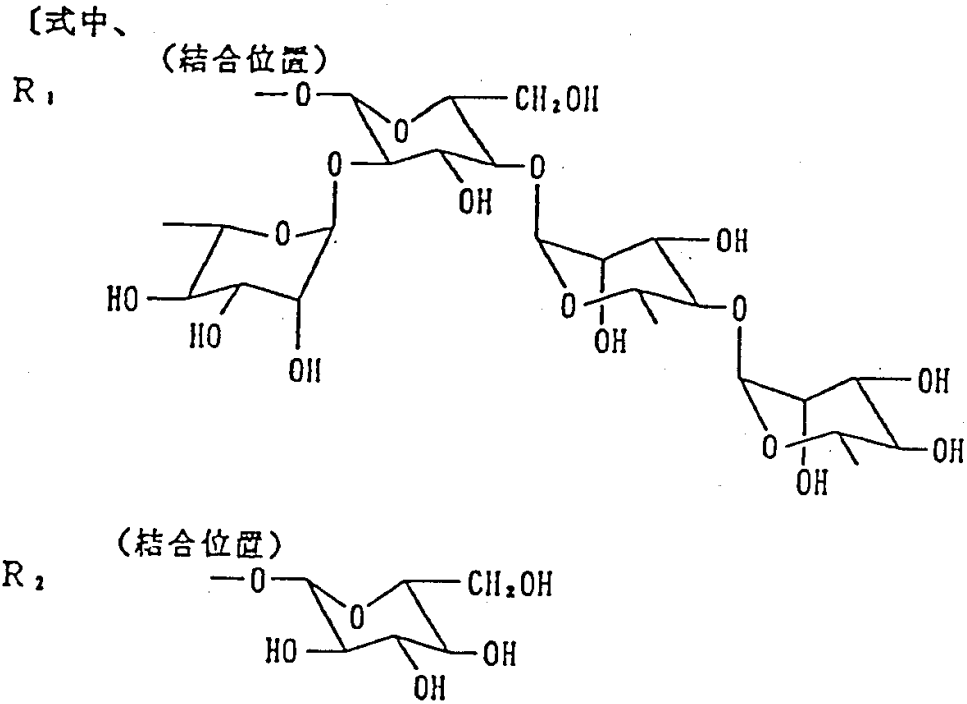
虽已开发出多种抗癌药物,但由于抗癌效果及安全性等问题,所以至今仍未有疗效显著的抗癌药。将对肿瘤细胞生长有抑制作用的物质进一步开发,提供抗癌效果及安全性均较好的抗癌新型药物就是本发明的目的。

为了实现上述目标,本发明者对中国的药用植物的粗提物进行了广泛的抗癌活性的筛选。从百合科植物丫蕊花(*Ypsilandra thibetica*)全草的粗提物中确认出有明显的抗癌活性。对其有效成分进行分离得到具有显著抗癌活性的呋甾醇类甾体皂甙。本发明是由结构式(1)所示的呋甾醇类甾体皂甙作为有效成份的新型抗癌药物。

本发明以分布在中国西部的丫蕊花全草为原料,以通常的皂甙提取方法,即用乙醇抽提,提取液浓缩后,残余物用柱层析等适当的分离方法进行精制,最后得到(1)式所示的呋甾醇类甾体皂甙。



说明书



结构式(1)中所示的甾体皂甙,其R₃=OCH₃,R₄=H的化合物为前述庄司等人已分离并进行了结构鉴定为methylproto-pb的化合物,但未报道是否有抗癌活性。结构式(1)中R₃=OCH₃,R₄=OH为一新化合物;R₃=R₄=OH也为一已知化合物,这两个化合物也未见有抗癌活性的报道。

用(1)式所示的呋甾醇类甾体皂甙对肿瘤细胞,例如人体恶性黑色肿瘤细胞,人体结肠癌细胞,小鼠白血病细胞等进行试验,结果表明(1)式呋甾醇甾体皂甙对上述肿瘤细胞的生长有显著的抑制作用(见表1),且不具溶血作用,有优良的治疗药物的特性。在实际治疗时,可以使用含有前述的各个呋甾醇类甾体皂甙的制

说明书

剂、或呋甾醇类甾体皂甙的混合物，或大量含有这些混合物的丫蕊花的有效部位或粗提物。

以大鼠经口投入提取物进行急性毒性试验，LD₅₀为903mg/kg，显示出极低的毒性。呋甾醇类甾体皂甙，或这些化合物的混合物，或含有这些化合物的粗提物，可以制成经口的或不经口的多种类型的制剂，即可制成片剂、丸剂、胶囊剂、散剂、颗粒剂、糖浆剂、注射液、软膏剂等剂型。在制造方法上，可以将有效成份与乳糖、葡萄糖、淀粉、蔗糖、饴糖、糊精、纤维素类、琼脂、硬脂酸镁、滑石、阿拉伯橡胶、明胶、水、植物油、聚烷烯二醇、液体石蜡、蜂蜜、(含水)羊毛脂、凡士林等常用医药担体混合，做成适当的剂型。必要时可加入保存剂、安定化剂、乳化剂等。另外，对肿瘤的种类和部位无特别限定，可在皮肤癌、子宫癌、肝癌、肺癌、胃癌、喉头癌等均可应用。本发明中甾体皂甙的用量，依患者的年龄、病状、体重而定，通常按成人计算，皂甙的投药量为日0.1—200 mg/kg体重的程度为宜。

实施例：

(1) 呋甾醇类甾体皂甙的制备。

将生长在中国四川的百合科植物丫蕊花(*Ypsilandra thibetica*)的全草，用5%水—95%乙醇抽提后经减压除去溶剂得到黑褐色固体。取100克这种提取物，用正丁醇在水中提取7次得到正丁醇提取部份40g，用反相柱层析进行分离得到各流份。按后

说明书

述方法进行抗癌作用的药理评价,得到12.5g活性部份。将这些活性部份用硅胶柱层析进行两次层析,用同样的药理评价方法得1.5g活性部份。接着用液—液离心分配层析(CPC)分离得到三个活性部份: FrB(88mg), FrD(280mg)和 Frb(251)mg,为单一成份)。FrB及FrD再分别用硅胶柱层析,各自得到单一的活性成分FrB'(44mg)和FrD'(132mg)。

FrB', mp184—186°C, 淡黄色粉末状固体, $[\alpha]_D^{25} -90.4^\circ$ 质谱(负离子FAB/MS)测定出分子量为1203。由糖组分的分析得知存在2分子的葡萄糖和3分子的鼠李糖。经甲基化分析得知葡萄糖为3取代(1, 2, 4位)及1取代体。鼠李糖为2取代(1, 4位)及1取代体。以NMR分析(1H , ^{13}C DEPT, $^1H-^{13}C$ COSY, HOMOIAHA, NOESY, ROE SY等)的综合结果,确定分子式为 $C_{55}H_{96}O_{26}$, 结构如(1)式中 $R_3=OCH_3$, $R_4=H$ 所示的化合物。此化合物即官F等(Chem, Pharm, Bull, 30, 712, 1982; 32, 259, 1984;)庄司等(Chem, Pharm, Bull, Bull, 34, 82, 1986;)官村等(Chem pharm, Bull30, 712, 1982;)所报道的化合物methyl proto—pb。

FrD', mp. 184— $H_{96}O_{27}$ 。白色粉末状固体。 $[\alpha]_D^{25} -94.3^\circ$ 负离子FAB/MS测定出分子量为1224NMR测定的谱图与前述methylproto—pb的数据进行比较,得知分子式为 $C_{55}H_{96}O_{27}$ 。其结构式为(1)式中 $R_3=OCH_3$, $R_4=OH$ 所示的化合物。是一种新的化合物

Frb, mp198—202°C, 白色粉末状固体。 $[\alpha]_D^{25} -87.5^\circ$ 。

说 明 书

负离子FAB/MS测得分子量为1210。根据NMR的测定, 确定分子式为 $C_{55}H_{96}O_{27}$ 。其结构式为(1)式中 $R_3=R_4=OH$ 所示的化合物亦为一已知化合物。上述各化合物的物理性质分析数见下表。

结构式(1)所示的甾醇类甾体皂甙的 ^{13}C 化学位移(CD_3OD)和原子团及C上的 1H 化学位移(CD_3OD)值。

δ (ppm): s: 单峰; d: 双峰; t: 三重峰; q: 四重峰

1. 式(1) ($R_3=OCH_3$, $R_4=H$) 所示的化合物

^{13}C 化学位移	原子团	1H 化学位移 (J (H_2))
16.17	-CH ₃	1.003 d (J=7.1)
16.87	-CH ₃	0.835 s
17.35	-CH ₃	0.949 d (J=6.9)
17.90	-CH ₃	1.241 d (J=6.1)
18.04	-CH ₃	1.250 d (J=6.1)
18.61	-CH ₃	1.293 d (J=6.1)
19.09	-CH ₃	1.048 s
21.99	-CH ₂ -	1.45-1.60
29.03	-CH ₂ -	1.16. 1.58
30.80	-CH ₂ -	1.60. 1.92
31.42	-CH ₂ -	1.62. 1.82
32.81	-CH ₂ -	1.26. 1.97
32.83	-CH<	1.64
33.22	-CH ₂ -	1.55. 2.02
35.05	-CH<	1.73
38.09	>C<	-
38.62	-CH ₂ -	1.07. 1.87
39.57	-CH ₂ -	2.29. 2.44
40.89	-CH ₂ -	1.17. 1.77
41.22	-CH<	2.175
41.88	>C<	-
47.71	-CH ₃	3.142

说 明 书

51. 77	-CH<	0. 94
57. 80	-CH<	1. 12
62. 00	-CH2-	3. 65, 3. 80 (J=11. 5)
62. 90	-CH2-	3. 67, 3. 86 (J=11. 8)
65. 09	-CH<	1. 73
69. 16	-CH<	4. 037 (J=6. 1)
69. 83	-CH<	4. 115 (J=6. 1)
70. 50	-CH<	3. 70 (J=6. 1)
71. 79	-CH<	3. 285 (J=10. 0)
72. 19	-CH<	3. 93 (J=3. 5)
72. 45	3-CH<	3. 93 (J=3. 5), 3. 60 (J=9. 3)
		3. 67 (J=9. 5)
72. 95	-CH<	3. 78 (J=3. 5)
72. 98	-CH<	3. 78 (J=9. 0)
73. 90	-CH<	3. 40 (J=9. 5)
74. 00	-CH<	3. 40 (J=9. 0)
75. 22	-CH<	3. 187 (J=9. 3)
76. 08	-CH2-	3. 38, 3. 72
76. 72	-CH<	3. 32 (J=2. 0, J=4. 1)
77. 93	-CH<	3. 26 (J=2. 1, J=5. 6)
78. 02	-CH<	3. 57 (J=9. 0)
78. 21	-CH<	3. 35 (J=9. 0)
79. 37	-CH<	3. 60
79. 52	-CH<	3. 40 (J=8. 5)
79. 63	-CH<	3. 53 (J=9. 0)
80. 90	-CH<	3. 55 (J=9. 0)
82. 50	-CH<	4. 366
100. 57	-CH<	4. 493 (J=7. 8)
102. 38	-CH<	5. 188 (J=1. 7)
102. 67	-CH<	4. 836 (J=1. 9)
103. 20	-CH<	5. 175 (J=1. 7)
104. 64	-CH<	4. 239 (J=7. 8)
114. 00	>C<	-
122. 66	-CH=	5. 375
141. 99	>C=	-

说 明 书

2. 式(1) ($R_3=OCH_3$, $R_4=OH$) 所示的化合物

^{13}C 化学位移	原子团	1H 化学位移 (J (Hz))
9.77	-CH ₃	0.920 (d, J=7.1)
17.28	-CH ₃	0.956 (d, J=6.6)
17.63	-CH ₃	0.853
17.88	-CH ₃	1.240 (d, J=6.1)
18.02	-CH ₃	1.250 (d, J=6.1)
18.60	-CH ₃	1.293 (d, J=6.1)
19.88	-CH ₃	1.049
21.72	-CH ₂ -	1.53, 1.62
20.93	-CH ₂ -	1.15, 1.62
30.80	-CH ₂ -	1.62, 1.90
31.24	-CH ₂ -	1.69, 1.73
32.11	-CH ₂ -	1.25, 2.03
32.86	-CH ₂ -	1.35, 1.69
33.24	-CH ₂ -	1.55, 2.01
33.25	-CH<	1.64
35.05	-CH<	1.75
38.05	>C<	-
38.63	-CH ₂ -	1.08, 1.89
39.55	-CH ₂ -	2.292, 2.444
43.54	-CH<	2.357 (q, J=7.1)
46.26	>C<	-
47.53	-CH ₃	3.172
51.53	-CH<	0.94
53.97	-CH<	1.71
62.00	-CH ₂ -	3.65, 3.79
62.90	-CH ₂ -	3.66, 3.86
69.17	-CH<	4.038 (d, q, J=6.1, J=9.5)
69.83	-CH<	4.116 (d, q, J=6.1, J=9.5)
70.49	-CH<	3.70
71.78	-CH<	3.28
72.20	-CH<	3.925
72.46	3-CH<	3.60, 3.66, 3.93

说 明 书

72.96	-CH<	3.78
72.98	-CH<	3.75
73.90	-CH<	3.39
74.00	-CH<	3.39
75.23	-CH<	3.184 (d, d, J=7.8, J=9.0)
76.06	-CH2-	3.38, 3.73
76.73	-CH<	3.31
77.94	-CH<	3.25
78.03	-CH<	3.57
78.21	-CH<	3.35
79.35	-CH<	3.59
79.51	-CH<	3.39
79.64	-CH<	3.53
80.89	-CH<	3.54
90.92	-CH<	3.958 (t, J=7.2)
91.70	>C<	-
100.55	-CH<	4.494 (d, J=7.8)
102.33	-CH<	5.188 (d, J=1.7)
102.68	-CH<	4.834 (d, J=1.7)
103.21	-CH<	5.174 (d, J=1.7)
104.66	-CH<	4.238 (d, J=7.8)
114.72	>C<	-
122.64	-CH=	5.379 (d, J=5.4)
141.95	>C=	-

3. 式(1) ($R_3=R_4=OH$) 所示的化合物

^{13}C 化学位移	原子团	1H 化学位移 (J (H ₂))
9.67	-CH ₃	0.920 (d, J=7.2)
17.38	-CH ₃	0.941 (d, J=6.6)
17.62	-CH ₃	0.847
17.90	-CH ₃	1.249 (d, J=6.1)
18.02	-CH ₃	1.238 (d, J=6.1)
18.61	-CH ₃	1.292 (d, J=6.1)
19.88	-CH ₃	1.049

说 明 书

21. 77	-CH ₂ -	1. 52, 1. 65
28. 42	-CH ₂ -	1. 25, 1. 67
30. 81	-CH ₂ -	1. 60, 1. 92
32. 25	-CH ₂ -	1. 24, 2. 02
32. 96	-CH ₂ -	1. 37, 1. 69
33. 14	-CH<	1. 63
33. 25	-CH ₂ -	1. 57, 2. 01
34. 95	-CH<	1. 75 *
36. 77	-CH ₂ -	1. 70, 1. 70
38. 06	>C<	-
38. 63	-CH ₂ -	1. 08, 1. 89
39. 55	-CH ₂ -	2. 28, 2. 44
43. 58	-CH<	2. 255 (d, J=9. 2)
46. 07	>C<	
51. 54	-CH<	0. 94
53. 91	-CH<	1. 68
62. 00	-CH ₂ -	3. 65, 3. 80
62. 85	-CH ₂ -	3. 67, 3. 87
69. 17	-CH<	4. 036 (d, d, J=6. 1, J=9. 5)
69. 82	-CH<	4. 114 (d, d, J=6. 1, J=9. 5)
70. 49	-CH<	3. 70
71. 76	-CH<	3. 28
72. 20	-CH<	3. 922 (d, q, J=1. 7, J=3. 4)
72. 46	3-CH<	3. 60, 3. 66, 3. 932 (d, q, J=1. 7, J=3. 4)
72. 96	-CH<	3. 78
72. 99	-CH<	3. 74
73. 90	-CH<	3. 39
74. 01	-CH<	3. 39
75. 24	-CH<	3. 181 (d, d, J=7. 8, J=9. 0)
76. 06	-CH ₂ -	3. 39, 3. 73
76. 73	-CH<	3. 31
77. 94	-CH<	3. 25
78. 04	-CH<	3. 57
78. 18	-CH<	3. 34
79. 35	-CH<	3. 58

说 明 书

79.50	-CH<	3.39
79.65	-CH<	3.53
80.91	-CH<	3.54
90.95	-CH<	4.152 (t, J=7.2)
91.59	>C<	-
100.55	-CH<	4.493 (d, J=7.8)
102.38	-CH<	5.187 (d, J=1.7)
102.68	-CH<	4.832 (d, J=1.7)
103.21	-CH<	5.174 (d, J=1.7)
104.65	-CH<	4.233 (d, J=7.8)
112.44	>C<	-
122.64	-CH=	5.377
141.95	>C<	-

(2) 抗癌活性的测定。

在加入了上记(1)式中的甾体皂甙的培养基中进行肿瘤细胞的培养,由于甾体皂甙具有良好的水溶性,故直接将样品加入培养基中。培养基内含10%牛胎儿血清。肿瘤细胞分别为人体恶性黑色肿瘤细胞HMV--1,人体结肠腺癌细胞LS180,小鼠白血病细胞L1210,培养器为美国产24孔培养过滤器。甾体皂甙在加进孔穴的培养基后直接加入肿瘤细胞。在37℃、5%的CO₂培养箱中培养6天,在第6天时用计数器测定细胞数目,其结果如表1所示。三种呋甾醇类甾体皂甙均显示很强的抗癌活性。

说 明 书

表1 呋甾醇类甾体皂甙抗癌活性试验

结构(1)所示化合物			IC50(μg/ml)		
R ₃	R ₄	HMV-	LS-180	L1210	
OCH ₃	H	0.3	0.3	0.3	
OCH ₃	OH	3.3	0.7	2.6	
OH	OH	0.9	0.3	2.6	

(3) 溶血作用

红血球为羊红血球(绵羊血,日本SLC公司制)以Sigma公司市售的皂甙为对照品,在0.85%缓冲液的食盐水中加入羊红血球后,分别加入上记(1)式中的甾体皂甙及对照品,室温中放置30分钟,于700GF离心5分钟,取出上清液于500nm(L-2000型,日立公司制)F测定吸光度,其结果,溶血作用的IC50值,市售皂甙对照品为20 μg/ml。上记(1)式中的三种皂甙,即R₃=OCH₃, R₄=H; R₃=OCH₃, R₄=OH; R₃=R₄=OH的化合物均未发现溶血作用。

甾体皂甙的抗肿瘤制剂仍未商品化,但实践证明:本发明的呋甾醇类甾体皂甙作为新的抗癌药物将是有效的。