(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110475768 B
(45)授权公告日 2023.12.01

(21)申请号 201880018995.0
(22)申请日 2018.02.19
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110475768 A
(43)申请公布日 2019.11.19
(30)优先权数据
BR1020170033180 2017.02.17 BR
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.09.18
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/BR2018/050037 2018.02.19
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/148816 EN 2018.08.23
(73)专利权人 疼痛制药实验室股份有限公司
地址 巴西圣保罗
(72)发明人 C·R·W·吉马雷斯
C·E·维托尔 L·R·佩萨
R·D·雷斯 A·马斯卡雷罗
F·H·D·S·伽马
(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
专利代理师 杨春刚 黄革生
(51)Int.Cl.
C07D 311/94(2006.01)
C07C 59/42(2006.01)
C07C 69/608(2006.01)
A61K 31/352(2006.01)
A61K 31/201(2006.01)
A61K 31/215(2006.01)
A61P 37/06(2006.01)
(56)对比文件
WO 2016128471 A1,2016.08.18
WO 2008098325 A1,2008.08.21
EP 1145709 A1,2001.10.17
CN 103690551 A,2014.04.02
WO 03094946 A1,2003.11.20
CN 103120699 A,2013.05.29
审查员 许洋洋

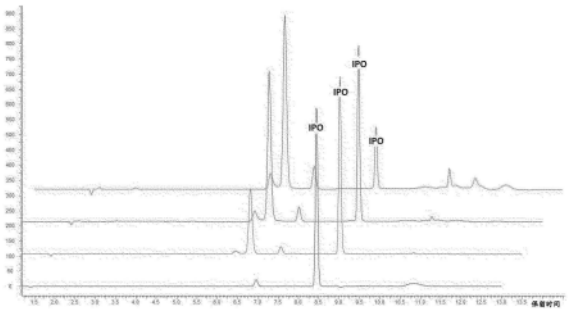
权利要求书2页 说明书15页 附图3页

(54)发明名称

作为免疫抑制剂治疗免疫疾病的富含去羟野芝麻新苷衍生物的植物提取物

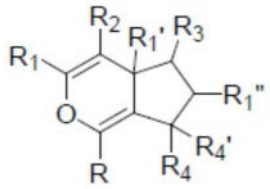
(57)摘要

本发明描述了创新的分离的化合物以及从假马鞭属植物生产具有免疫抑制活性的化合物和提取物的方法。以这种方式，本申请还描述了创新性的组合物及其用于治疗免疫疾病的用途。本发明属于药学、医学和化学领域。



CN 110475768 B

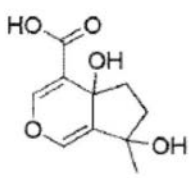
1.通式C的化合物,其是去羟野芝麻新苷衍生物,



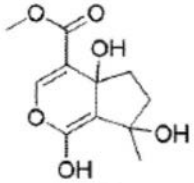
C

其中R对应于H,OH,OGlyc(糖苷);R_1,R_1',R_1"对应于H,OH;R_2对应于H,COOH,$COOCH_3$,CH_3,CHO;R_3对应于H,OH,CH_3;R_4,R_4'对应于H,OH,CH_2OH,CH_3。

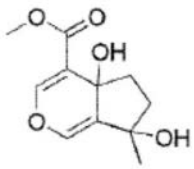
2.根据权利要求1的式C化合物,选自:



(IV)、



(V)和



(VIII)。

3.权利要求1或2中所定义的化合物在制备用于提供免疫抑制作用的药物中的用途。

4.权利要求1或2中所定义的化合物在制备用于治疗白癜风的药物中的用途。

5.药物组合物,包含权利要求1或2中定义的式C去羟野芝麻新苷衍生物和药学上可接受的载体,任选地还包含去羟野芝麻新苷。

6.制备富含权利要求1或2中所定义的式C去羟野芝麻新苷衍生物的提取物的方法,其包括以下步骤:

a)选择从假马鞭(Stachytarpheta)属植物中获得的具有2.5%至3.5%的去羟野芝麻新苷含量的输入植物生物质;

b)将来自a)的所述选择的生物质进行温度在40至80℃之间的烘箱干燥,直至获得10至12%的湿度稳定性;

c)研磨所述植物生物质;

d)通过以下步骤进行所述植物生物质的提取:

i.持续搅拌下,在70至100℃的温度下加热植物生物质;

ii.在室温下浸渍所述植物生物质;

iii.在70到100℃的温度下加热所述植物生物质。

7.根据权利要求6的制备提取物的方法,还包括以下步骤:

iv.过滤和浓缩所述提取物;

v.在喷雾干燥器中干燥1至60秒,入口温度为155至165℃,出口温度为85至95℃,与除湿器连接。

8.根据权利要求6的制备提取物的方法,其中d)第iii项的植物生物质加热发生5至30分钟。

9.根据权利要求6的制备提取物的方法,其中d)第i项的植物生物质加热发生5至15小时。

10.根据权利要求6的制备提取物的方法,其中输入植物生物质包括假马鞭属植物的地上部分。

11.根据权利要求6的制备提取物的方法,其中所述植物是蓝蝶猿尾木(Stachytarpheta cayennensis)。

12.根据权利要求6的制备提取物的方法,其中该方法包括水提取。

13.根据权利要求6-12中任一项的制备提取物的方法,包括使用方程式I从输入的植物生物质中去羟野芝麻新苷的实际含量来预测提取物中的去羟野芝麻新苷和其式C的衍生物的理论含量的步骤:

$$\text{提取物中的去羟野芝麻新苷和衍生物的\%理论含量} = \frac{\text{植物生物质中的去羟野芝麻新苷的\%实际含量} \times \text{DER}}{\left(\frac{\text{提取物中的去羟野芝麻新苷和衍生物的实际含量}}{\text{输入植物生物质中的去羟野芝麻新苷的实际含量}}\right)} \pm \text{标准偏差}$$

方程式I。

作为免疫抑制剂治疗免疫疾病的富含去羟野芝麻新苷衍生物的植物提取物

发明领域

[0001] 以下发明描述了具有免疫抑制活性的创新性分离的化合物和提取物，以及由来自假马鞭属(STACHYTARPHETA)植物的去羟野芝麻新苷(IPOLAMIIDE)和提取物制备化合物的方法。以这种方式，本申请还描述了创新性的组合物及其用于治疗免疫疾病的用途。本发明属于药学、医学和化学领域。

背景技术

[0002] 免疫系统疾病

[0003] 免疫疾病可以被认为是免疫系统的任何不平衡或不起作用。该系统主要负责通过识别和对抗有害抗原的抗体帮助身体抵御外部或未知的药剂。

[0004] 自身免疫疾病是免疫疾病的一个实例，其中生物开始产生针对其自身分子的抗体，不区分内源和外源药剂。在这种情况下，非常需要具有免疫抑制活性的药物来帮助患者缓解由这种类型的疾病引起的症状。

[0005] 除类风湿性关节炎和自身免疫性甲状腺炎外，自身免疫疾病各自罕见，但它们一起影响西方国家约5％的人口。他们的病因尚不完全清楚。在器官特异性和系统性自身免疫疾病中，观察到免疫系统区分什么是自我和非自我的能力丧失。这种称为自身耐受的能力通过中枢和外周机制维持在免疫活性B细胞和T细胞中。丧失自身耐受可能有内在或外在的原因。诸如细菌和病毒感染等环境因素，暴露于例如紫外线。杀虫剂和药物等物理和化学药剂是外在原因的例子。内在原因，即与个体本身的特征有关，通常与组织相容性分子的多态性，先天免疫的组分，如补体系统和TOLL样受体，获得性免疫的组分，如调节性淋巴细胞和细胞因子有关，此外，还与受遗传控制的激素因子外。

[0006] 自身免疫疾病中的治疗策略主要在于使用免疫抑制剂抑制免疫系统，免疫抑制剂作用于抑制免疫发展的早期阶段。该疗法不进行选择性免疫抑制，这导致多种抗体的发展。生物制剂可用于抑制细胞因子的作用，如抗细胞因子单克隆抗体或使用与细胞因子结合并阻断其对靶细胞的作用的可溶性受体。细胞因子还通过模拟原始细胞因子作用的类似重组蛋白用于生物治疗。抗细胞因子治疗的主要治疗靶标是促炎细胞因子白细胞介素-1(IL-1)、TNFα和IL-6，并且主要的细胞因子激动剂治疗使用I型干扰素(IFN)进行。在I型干扰素家族中，IFNα和IFNβ的重组蛋白用于临床实践，主要分别用于治疗病毒性肝炎(乙型和丙型肝炎病毒)和多发性硬化。对于后者，所提出的作用机制是INFβ对IFNγ的拮抗作用，IFNγ在多发性硬化的病理生理学中具有重要意义。IFNα还用于治疗Behçet病和Churg-Strauss综合征的粘膜皮肤、眼部和神经系统表现。方妥珠单抗(Fontolizumab)是一种人源化抗IFNγ剂，已在树突状细胞异常患者中进行评估，效果良好。

[0007] 与常规疗法相比，单克隆抗体在治疗自身免疫疾病方面具有优势，因为它们是靶向疗法，具有特异性和高选择性。然而，当用常规疗法控制自身免疫疾病没有效果时，它们被用作二线治疗。除了功效受限之外，单克隆抗体还具有与成本和可及性相关的若干限制。

一些自身免疫性疾病仍然缺乏有效的患者具有良好的耐受性的治疗方法。

[0008] 几个世纪以来，天然产物已用于治疗不同的疾病。最近，在开发具有免疫抑制作用的草药产品的新研究方面已经做出了重大努力。例如，在美国进行的几项临床试验已经显示出雷公藤属(T.wilfordii)的提取物对类风湿性关节炎患者的显著益处。虽然有几种物种及其活性成分具有描述的作用机制，但在免疫学疾病的体外和体内研究以及未来的临床试验方面仍有广阔的研究领域。这些天然产物应配制为合适的药物组合物，以确保治疗自身免疫疾病的有效性。

[0009] 到目前为止，没有有效治疗药物的自身免疫疾病，更不用说从天然提取物获得的药物选择，可以通过白癜风来举例说明。白癜风通常与功能性黑素细胞的丧失有关，并且被认为是人类中最常见的获得性色素沉着症，影响至少0.5％的世界人口。其特征在于白色斑块的发展，其由表皮黑素细胞的丧失引起，其可通过对黑素细胞的特异性细胞毒性免疫应答和对其粘附系统的损害而导致细胞破坏。

[0010] 多种机制与白癜风有关，例如遗传易感性、环境激活、代谢异常和免疫和炎症反应的变化。另外，已知诸如暴露于紫外线辐射和氧化应激之类的条件会加剧这种病况。

[0011] 由于缺乏关于所述疾病的初始发作的特定知识，一些研究试图阐明该发病机理所牵涉的生物学途径。其中大多数表明与此类疾病相关的复杂性和挑战，很难找到有效的治疗方法。我们不能忘记，大多数免疫性疾病具有重要的社会影响，导致患者的高度心理压力。迄今为止，没有能够治愈白癜风的干预措施。

[0012] 以这种方式，显然需要鉴定能够以长期作用促进免疫抑制活性的新化合物。因此，本发明通过新化合物解决了免疫疾病治疗中的这一需求，所述新化合物在分离时显示出免疫抑制活性，并且包含以独特和创造性方式获得的活性化合物组的活性提取物。

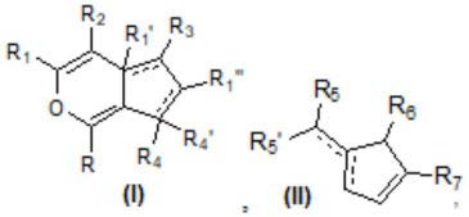
[0013] 鉴于白癜风的复杂性和缺乏科学知识，迄今为止认为，完整形式的去羟野芝麻新苷的结构可能与免疫抑制活性有关，与白癜风患者的治疗有关。然而，在本发明中，我们证明该活性源自去羟野芝麻新苷的特定衍生物和包含这些化合物的提取物，优选通过本文所述的独特和创造性的制备方法获得。实验证实，化合物和提取物两者都具有免疫抑制活性。本文通过阻断CD8+T细胞的活化和IFN-γ分泌的减少来证明该活性。鉴于最近与患者皮肤中这些成分的定量相关的临床发现，该机制已被证明对白癜风有希望。具体而言，高浓度的CD8+T细胞和IFN-γ与黑素细胞的凋亡有关，因此，这些调节是有希望的作用机制。

[0014] 从研究文献中可以推断出，没有发现预期或暗示本发明的教导的文献，因此相对于现有技术，本文提出的技术方案具有新颖性和创造性。

[0015] 发明概述

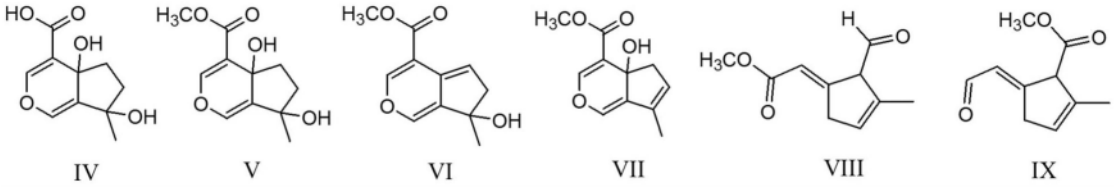
[0016] 本发明描述了衍生自去羟野芝麻新苷的创新化合物，其具有免疫抑制活性。因此，它们可用于治疗免疫疾病。另外，本发明描述了富含所述衍生自去羟野芝麻新苷的化合物的植物提取物，其通过独特的生产方法获得，也具有免疫抑制活性。

[0017] 因此，本发明的目的是包含下列通式的化合物的去羟野芝麻新苷衍生物：

[0018] 

[0019] 其中R对应于H,OH,OGlyc(糖苷);R_1,R_1',R_1"对应于H,OH;R_2对应于H,COOH,$COOCH_3$,CH_3,CHO;R_3对应于H,OH,CH_3;R_4,R_4'对应于H,OH,CH_2OH,CH_3;R_5,R_5'对应于H,CH_3,$COOCH_3$,CHO,CH_2OH;R_6对应于CHO,COOH,$COOCH_3$;R_7对应于H,CH_3;并且虚线键表示碳之间的单(C-C)或双(C=C)键(每个结构最多两个双键)。

[0020] 在一个优选的实施方案中,至少一种优选的本发明化合物可选自包含以下结构的组:

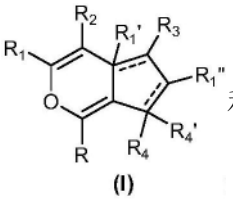
[0021] 

[0022] 在该优选实施方案中,通式(I)化合物包含式(IV)、(V)、(VI)和(VII)化合物,通式(II)化合物包含式(VIII)和(IX)化合物。

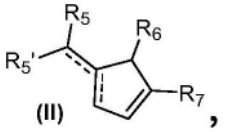
[0023] 本发明的另一个目的是治疗免疫疾病的方法,包括给患者施用足量的通式(I)和/或(II)化合物以提供免疫抑制效果。在优选的实施方案中,所述治疗方法用于治疗白癜风。

[0024] 因此,我们还可以考虑在用于治疗免疫疾病的组合物中使用至少一种通式(I)和/或(II)的化合物。

[0025] 此外,本发明的目的是一种用于治疗免疫疾病的药物组合物,其包含至少一种选自包含以下通式化合物的组的化合物:

[0026] a) 

和/或

[0027] b) 

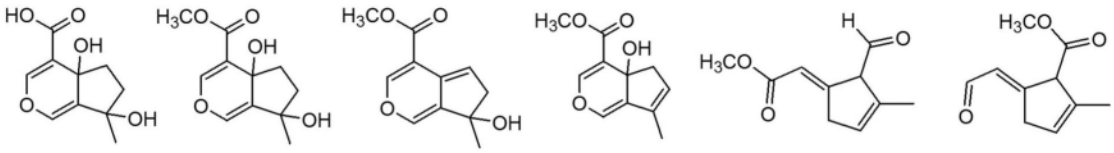
,

[0028] 其中R对应于H,OH,OGlyc(糖苷);R_1,R_1',R_1"对应于H,OH;R_2对应于H,COOH,$COOCH_3$,CH_3,CHO;R_3对应于H,OH,CH_3;R_4,R_4'对应于H,OH,CH_2OH,CH_3;R_5,R_5'对应于H,CH_3,$COOCH_3$,CHO,CH_2OH;R_6对应于CHO,COOH,$COOCH_3$;R_7对应于H,CH_3;并且虚线键表示碳之间的单(C-C)或双(C=C)键(每个结构最多两个双键);和

[0029] c)药学上可接受的载体。

[0030] 在任选的实施方案中,本发明的组合物还包含去羟野芝麻新苷化合物。

[0031] 在任选的实施方案中,本发明的组合物还可包含至少一种下列化合物:

[0032] 

IV V VI VII VIII IX

[0033] 另外，本发明描述了制备通式(I)和/或(II)化合物的方法，包括以下的步骤：在高温，在至少一种合适的溶剂存在下，使至少一种去羟野芝麻新苷化合物经受至少一个加热步骤足够的时间，以获得通式(I)和/或(II)的化合物。

[0034] 在一个优选的实施方案中，本发明的所述高温包括高于35℃，更优选35℃至165℃的温度。

[0035] 在一个优选的实施方案中，通式(I)和/或(II)的化合物的制备方法包括使至少一种去羟野芝麻新苷化合物进行至少一次水解和/或溶剂解步骤。甚至更理想地，将至少一种去羟野芝麻新苷化合物进行酸水解步骤。任选地，将至少一种去羟野芝麻新苷化合物进行碱性/碱水解步骤。

[0036] 如前所述，我们证实分离的去羟野芝麻新苷不表现出免疫抑制活性。另一方面，来自去羟野芝麻新苷的某些化合物组具有这种活性。同时，我们还指出了获得的草药用于治疗疾病的优点，因为这些化合物生产系统允许植物组分和活性化合物之间的一系列生产性相互作用(productive interactions)，通常甚至是协同的。因此，为了另外获得包含这些活性化合物的草药，我们开发了一种独特的生产方法，其允许获得富含目标化合物的提取物。如下所述，本发明的提取物生产方法包括独特的步骤，其导致提取物富含具有免疫抑制活性的去羟野芝麻新苷衍生物。我们验证了含有2.5％至3.5％的去羟野芝麻新苷的预选输入植物生物质的相关性，导致提取物富含去羟野芝麻新苷和来自去羟野芝麻新苷的化合物，去羟野芝麻新苷和衍生物的含量的约1％至约20％，优选约8.5％至约11.5％。

[0037] 如前所述，含有该化合物的植物生物质将用作提取物生产过程的原料。仅通过本发明的制备方法，可以获得富含衍生自去羟野芝麻新苷的特定化合物的提取物。这种富集的提取物还具有免疫抑制活性。

[0038] 因此，本发明的另一个目的是制备富含衍生自去羟野芝麻新苷的化合物的提取物的方法，其基本上包括以下步骤：

[0039] a)选择从假马鞭(Stachytarpheta)属植物中获得的具有2.5％至3.5％的去羟野芝麻新苷含量的输入植物生物质；

[0040] b)将来自a)的所述选择的生物质进行40至80℃的烘箱干燥，直至获得10至12％的湿度稳定性；

[0041] c)研磨所述植物生物质；

[0042] d)通过以下步骤进行所述植物生物质的提取：

[0043] i.持续搅拌下，在70至100℃的温度下加热植物生物质；

[0044] ii.在室温下浸渍所述植物生物质；

[0045] iii.在70到100℃的温度下加热所述植物生物质。

[0046] 在优选的实施方案中，本发明的制备方法还包括以下步骤：

[0047] iv.过滤和浓缩所述提取物；

[0048] v.在喷雾干燥器中干燥1至60秒，入口温度为155至165℃，出口温度为85至95℃，

与除湿器连接。

[0049] 在一个优选的实施方案中，本发明的提取方法是水性或水醇性方法，甚至更优选水性方法。

[0050] 因此，本发明的制备方法使得可以获得富含衍生自去羟野芝麻新苷的化合物的标准化提取物，优选产率为约8％至约10％。

[0051] 因此，本发明的另一个目的是富含通过上述方法获得的衍生自去羟野芝麻新苷的化合物的提取物。本发明的富含衍生自去羟野芝麻新苷的化合物的标准化提取物优选包含式(I)和/或(II)的化合物。

[0052] 本发明的植物生物质包括假马鞭属植物的所有部分。优选地，所述植物生物质包括植物的地上部分，更优选地，叶子。

[0053] 在一个优选的实施方案中，输入植物生物质包含至少一种植物生物质，其具有2.5％至3.5％的均匀含量的去羟野芝麻新苷。在一个任选的实施方案中，输入植物生物质包含一种以上的植物生物质，其中所述不同的植物生物质独立地具有不同含量的去羟野芝麻新苷，但是一起实现均匀含量的去羟野芝麻新苷(2.5％～3.5％)。

[0054] 在另一个优选的实施方案中，输入植物生物质中的去羟野芝麻新苷的实际含量可以用作预测所得提取物中的去羟野芝麻新苷和衍生物的理论含量的参数。该预测可以通过包括将方程式I应用于通过实验获得的一些参数的步骤的方法来实现，以找到输入植物生物质中的去羟野芝麻新苷的理想比例，其优选地预测8.5％至11.5％的提取物中的去羟野芝麻新苷和衍生物的含量。方程式I定义如下：

[0055] 提取物中的去羟野芝麻新苷和衍生物的％理论含量＝植物生物质中的去羟野芝麻新苷的％实际含量×DER/(<提取物中的去羟野芝麻新苷和衍生物的实际含量/输入植物生物质中的去羟野芝麻新苷的实际含量>)±标准偏差(方程式I)。

[0056] 以这种方式，可以从输入植物生物质中的去羟野芝麻新苷的实际含量预测提取物中的去羟野芝麻新苷和衍生物的理论含量。优选地，提取物中去羟野芝麻新苷和衍生物的实际含量与输入植物生物质中去羟野芝麻新苷的含量的比率在约3.0和约3.5之间。

[0057] 在一个实施方案中，甚至更优选地，本发明的植物包含蓝蝶猿尾木(Stachytarpheta cayennensis)。

[0058] 因此，本发明的另一个目的是从假马鞭属植物中获得的富含衍生自去羟野芝麻新苷的化合物的标准化提取物在制备具有免疫抑制活性的药物中的用途。

[0059] 因此，本发明的另一个目的是至少一种富含衍生自去羟野芝麻新苷的化合物的提取物的活性级分。优选地，至少一种级分包含至少一种式(I)和/或(II)的衍生自去羟野芝麻新苷的化合物。

[0060] 在任选的实施方案中，富集提取物的活性级分还包含去羟野芝麻新苷。

[0061] 因此，本发明的另一个目的是从假马鞭属植物获得的至少一种富含衍生自去羟野芝麻新苷的化合物的标准化级分用于制备具有免疫抑制活性的药物的用途。

[0062] 本领域技术人员和对本部分感兴趣的公司将容易理解本发明的这些和其他目的，并且将在下面的描述中充分详细地描述其再现。

附图说明

[0063] 图1-概述流程图描述了从蓝蝶猿尾木(Stachytarpheta cayennensis)获得的富含去羟野芝麻新苷衍生物的活性提取物的生产方法。

[0064] 图2-蓝蝶猿尾木(Stachytarpheta cayennensis)的水提取物(3、10和30μM,以去羟野芝麻新苷表示的浓度)和分离的去羟野芝麻新苷(3、10和30μM)对αCD3/CD28(A)和IFNγ产生(B)激活的CD8+T细胞增殖的作用。在相同的实验中,还评估了酸水解去羟野芝麻新苷(30μM)后产生的化合物库(IV至VIII)和五种新分离的化合物(IV至VIII)对αCD3/CD28(C)和IFNγ产生(D)激活的CD8+T细胞的增殖的作用。他克莫司(0.5μM)用作所有实验的阳性对照。数据是三次重复的平均值±SD。

[0065] 图3-去羟野芝麻新苷的酸水解对其衍生物形成的影响。完整的去羟野芝麻新苷的色谱图(蓝色);去羟野芝麻新苷在0.1N HCl中于40℃水解1小时(绿色);去羟野芝麻新苷在0.1N HCl中于40℃水解2小时(红色);去羟野芝麻新苷在0.1N HCl于40℃水解5小时(品红色)。IPO=去羟野芝麻新苷。

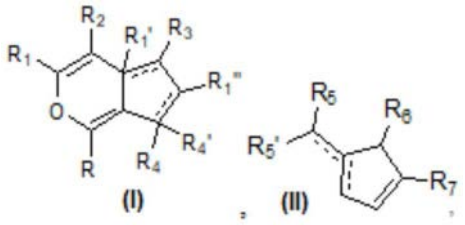
[0066] 图4-从本申请要求保护的制备方法获得的蓝蝶猿尾木(Stachytarpheta cayennensis)提取物的色谱图。该图说明了去羟野芝麻新苷标记物及其特定衍生物的保留时间:5.5;9.7;12.0;14.3;17.3分钟。IPO=去羟野芝麻新苷。

[0067] 发明详述

[0068] 本文所示的实施例仅用于举例说明实施本发明的几种方式之一,但不限制其范围。

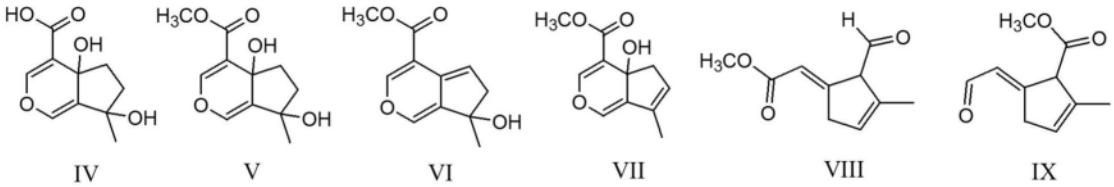
[0069] 活性化合物

[0070] 本发明提供了创新的化合物组,包括以下通式:

[0071] 

[0072] 其中R对应于H,OH,OGlyc(糖苷);R_1,R_1',R_1"对应于H,OH;R_2对应于H,COOH,$COOCH_3$,CH_3,CHO;R_3对应于H,OH,CH_3;R_4,R_4'对应于H,OH,CH_2OH,CH_3;R_5,R_5'对应于H,CH_3,$COOCH_3$,CHO,CH_2OH;R_6对应于CHO,COOH,$COOCH_3$;R_7对应于H,CH_3;并且虚线键表示碳之间的单(C-C)或双(C=C)键(每个结构最多两个双键)。

[0073] 实施例1:通式(I)和(II)的化合物包含以下结构。

[0074] 

[0075] 上述那些结构举例说明了式(I)和/或(II)中包括的化学结构骨架。

[0076] 免疫系统疾病

[0077] 本发明的术语“免疫病症”包括免疫系统的任何功能障碍。通常,疾病的特征在于免疫系统的组分受到影响或免疫系统的活性水平。在本发明中,优选地,免疫病症是指具有

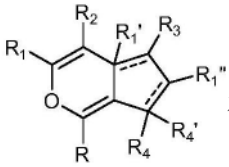
一些自身免疫证据的疾病。在本发明中，我们可以认为白癜风甚至更优选地选自可能的免疫疾病。

[0078] 免疫疾病的治疗方法

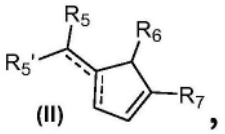
[0079] 本发明描述了治疗免疫病症的方法，包括给予患者足够量的通式(I)和/或(II)化合物以提供免疫抑制作用。应当注意，为了本专利申请的目的，免疫病症的治疗可以使用去羟野芝麻新苷衍生物和/或含有去羟野芝麻新苷衍生物的级分和/或提取物来实现，其中任何一种都具有免疫抑制活性。在优选的实施方案中，治疗方法用于治疗白癜风。

[0080] 包含衍生自去羟野芝麻新苷的分离的化合物的药物组合物。

[0081] 在一个实施方案中，本发明的药物组合物包含单独或组合使用的分离的去羟野芝麻新苷衍生物，用于治疗免疫病症，其中所述化合物包含至少一种选自下组的化合物：

[0082] a)  和/或

(I)

[0083] b)  ，

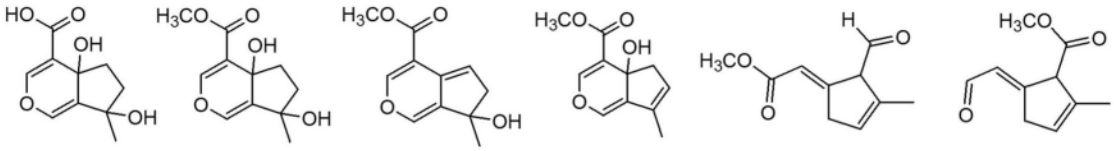
(II)

[0084] 其中R对应于H,OH,OGlyc(糖苷)；R_1,R_1’,R_1”对应于H,OH；R_2对应于H,COOH,$COOCH_3$,CH_3,CHO；R_3对应于H,OH,CH_3；R_4,R_4’对应于H,OH,CH_2OH,CH_3；R_5,R_5’对应于H,CH_3,$COOCH_3$,CHO,CH_2OH；R_6对应于CHO,COOH,$COOCH_3$；R_7对应于H,CH_3；并且虚线键表示碳之间的单(C-C)或双(C=C)键(每个结构最多两个双键)；和

[0085] c)药学上可接受的载体。

[0086] 在任选的实施方案中，上述药物组合物还包含去羟野芝麻新苷化合物。

[0087] 在优选的实施方案中，所述的本发明药物组合物包含以下化合物：

[0088] 

IV V VI VII VIII IX

[0089] 在该优选实施方案中，通式(I)化合物包含式(IV)、(V)、(VI)和(VII)化合物，通式(II)化合物包含式(VIII)和(IX)化合物。

[0090] 为了实现它们的活性，通式(I)和/或(II)的化合物应当施用于动物有机体，哺乳动物，特别是人，优选以药物组合物的形式。即，与适用于每种给药途径的药学上可接受的载体混在一起。

[0091] 本发明的药物组合物含有一种或多种本文提出的化合物作为活性成分，其与一种或多种药学上可接受的载体混在一起。通常将活性成分与至少一种载体混合、稀释或包封。

[0092] 当载体是稀释剂时，它可以是固体、半固体或液体形式，充当活性成分的载体、赋形剂或介质。因此，组合物可以是片剂、丸剂、粉末、小药囊、悬浮液、乳液、溶液、气溶胶(固体或液体介质)、乳膏、硬胶囊或软胶囊、栓剂、可注射溶液的形式。

[0093] 在本发明中，优选将任何与通式(I)和/或(II)化合物不同的物质视为药学上合适的载体，其已经有意添加到其中以产生适合给药途径的药物剂型。适用于制备药物组合物的药物赋形剂的非限制性实例描述于Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations-Vol.1-6-2004-Sarfaraz K.Niazi-CRC Press eRemington's Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing。

[0094] 包含通式(I)和/或(II)化合物的组合物的给药途径的非限制性实例是局部、口服、肠胃外、经鼻、直肠、透粘膜、透皮途径。

[0095] 应根据所选择的给药途径、患者的年龄、体重和状况以及治疗的病症的严重程度来计划和计算欲采用的本发明化合物的治疗剂量。通常，本发明化合物以治疗有效剂量给药。有效剂量可以从体外或动物模型得到的剂量-反应曲线外推。通常，临床医生将给予化合物直至达到合适的剂量以达到所需效果。

[0096] 活性化合物的制备方法

[0097] 本发明详细描述了通式(I)和/或(II)的活性化合物的制备方法。基本上，分离化合物的制备方法包括使至少一种去羟野芝麻新苷化合物在高温下在合适的溶剂中进行至少一个加热步骤足够的时间以获得通式(I)和/或(II)的衍生自去羟野芝麻新苷的化合物的步骤。

[0098] 在任选的实施方案中，本发明的组合物还包含去羟野芝麻新苷化合物。

[0099] 在优选的实施方案中，本发明的溶剂包含水。

[0100] 另外，本发明描述了通式(I)和/或(II)化合物的制备方法，包括使至少一种去羟野芝麻新苷化合物在高温下在合适的溶剂中进行加热步骤足够的时间以获得通式(I)和/或(II)的衍生自去羟野芝麻新苷的化合物的步骤。

[0101] 在一个优选的实施方案中，高浓度的本发明的式(I)和/或(II)化合物是从各自的生产过程所用的去羟野芝麻新苷含量的完全转化(100％)获得的。

[0102] 甚至更优选地，本发明的高浓度包含混合物中约0.5％至约45％的各化合物(IV至VIII)。在这种情况下，所述浓度包含化合物IV的约1％至约5％，优选为4％；化合物V约15至约25％，优选19％；约35％至约45％的化合物VII，优选37％；约0.5％至约4％的化合物VIII或其异构体(例如化合物IX)，优选2％。

[0103] 在一个优选的实施方案中，本发明的高温包括高于35℃，更优选35℃至165℃的温度。

[0104] 在另一个优选的实施方案中，本发明的溶剂包含其他合适的溶剂。

[0105] 在一个优选的实施方案中，衍生自去羟野芝麻新苷的活性化合物的制备方法包括水解或溶剂解去羟野芝麻新苷的步骤。

[0106] 甚至更优选地，去羟野芝麻新苷的水解可以是酸型。在适合于水解去羟野芝麻新苷的酸中，可以提及盐酸、盐酸、硫酸、硝酸、磷酸和乙酸，对它们中的任何一种没有任何特定限制。在优选的实施方案中，在本发明中使用盐酸。

[0107] 在任选的实施方案中，去羟野芝麻新苷的水解可以是碱/碱性类型。在适合于去羟野芝麻新苷的碱/碱水解的碱中，可以提及碱金属氢氧化物，对它们中的任何一种没有特别限制。在优选的实施方案中，在本发明中使用氢氧化钠。

[0108] 在甚至更优选的实施方案中，在酸性介质中水解之后在碱/碱性介质中水解。例

如,我们可以提及生产过程,包括将至少一种去羟野芝麻新苷化合物进行高温和0.1N(eq/L)的盐酸处理,然后温育不同的时间间隔,其范围为0至120分钟。。然后通过使用优选0.1N氢氧化钠的中和过程中断水解。

[0109] 在任选的实施方案中,通式(I)和/或(II)的化合物的制备方法包括在碱性介质中水解去羟野芝麻新苷的步骤,用氢氧化钠水溶液0.1N进行,在40℃下保持2小时。

[0110] 富含去羟野芝麻新苷衍生物的活性级分/提取物的生产方法

[0111] 本发明人证实,本发明的某些分离的活性化合物可通过分子设计和合成技术获得。同时,我们还指出了获得的草药用于治疗疾病的优点,因为这些化合物生产系统允许植物组分和活性化合物之间的一系列生产性相互作用,通常甚至是协同的。因此,为了另外获得包含这些活性化合物的草药,我们开发了一种独特的生产方法,其允许获得富含目标化合物的提取物。

[0112] 如下所述,本发明的提取物生产方法包括独特的步骤,其导致提取物富含具有免疫抑制活性的去羟野芝麻新苷衍生物。我们验证了含有2.5%至3.5%的去羟野芝麻新苷的预选输入植物生物质的相关性,导致提取物富含约8.5%至约11.5%的去羟野芝麻新苷和衍生自去羟野芝麻新苷的化合物。如前所述,含有去羟野芝麻新苷的植物生物质将用作提取物生产过程的原料。仅通过本发明的制备方法,可以获得富含衍生自去羟野芝麻新苷的特定化合物的提取物。这种富集的提取物还具有免疫抑制活性。

[0113] 因此,本发明提供了从假马鞭属植物生产富含去羟野芝麻新苷衍生物的标准化提取物的方法。

[0114] 因此,本发明的另一个目的是一种生产富含衍生自去羟野芝麻新苷的化合物的提取物的方法,基本上包括以下步骤:

[0115] a)选择从假马鞭(Stachytarpheta)属植物中获得的具有2.5%至3.5%的去羟野芝麻新苷含量的输入植物生物质;

[0116] b)将来自a)的所述选择的生物质进行40至80℃的烘箱干燥,直至获得10至12%的湿度稳定性;

[0117] c)研磨所述植物生物质;

[0118] d)通过以下步骤进行所述植物生物质的提取:

[0119] i.持续搅拌下,在70至100℃的温度下加热植物生物质;

[0120] ii.在室温下浸渍所述植物生物质;

[0121] iii.在70到100℃的温度下加热所述植物生物质。

[0122] 在优选的实施方案中,本发明的制备方法还包括以下步骤:

[0123] iv.过滤和浓缩所述提取物;

[0124] v.在喷雾干燥器中干燥1至60秒,入口温度为155至165℃,出口温度为85至95℃,与除湿器连接。

[0125] 在一个优选的实施方案中,本发明的提取方法是水性或水醇性方法,甚至更优选水性方法。

[0126] 因此,本发明的制备方法使得可以获得富含衍生自去羟野芝麻新苷的化合物的标准化提取物,优选产率为约8%至约10%。

[0127] 因此,本发明的另一个目的是富含通过上述方法获得的衍生自去羟野芝麻新苷的

化合物的提取物。本发明的富含衍生自去羟野芝麻新苷的化合物的标准化提取物优选包含式(I)和/或(II)的化合物。

[0128] 本发明的植物生物质包括假马鞭属植物的所有部分。优选地，所述植物生物质包括植物的地上部分，更优选地，叶子。

[0129] 在一个优选的实施方案中，输入植物生物质包含至少一种植物生物质，其具有2.5％至3.5％的均匀含量的去羟野芝麻新苷。在一个任选的实施方案中，输入植物生物质包含一种以上的植物生物质，其中所述不同的植物生物质独立地具有不同含量的去羟野芝麻新苷，但是一起实现均匀含量的去羟野芝麻新苷(2.5％-3.5％)。

[0130] 在另一个优选的实施方案中，输入植物生物质中的去羟野芝麻新苷的实际含量可以用作预测所得提取物中的去羟野芝麻新苷和衍生物的理论含量的参数。该预测可以通过包括将方程式I应用于通过实验获得的一些参数的步骤的方法来实现，以找到输入植物生物质中的去羟野芝麻新苷的理想比例，其优选地预测8.5％至11.5％的提取物中的去羟野芝麻新苷和衍生物的含量。方程式I定义如下：

[0131] $$\text{提取物中的去羟野芝麻新苷和衍生物的％理论含量} = \frac{\text{植物生物质中的去羟野芝麻新苷的％实际含量} \times \text{DER}}{\left(\frac{\text{提取物中的去羟野芝麻新苷和衍生物的实际含量}}{\text{输入植物生物质中的去羟野芝麻新苷的实际含量}}\right)} \pm \text{标准偏差。}$$

[0132] 以这种方式，可以从输入植物生物质中的去羟野芝麻新苷的实际含量预测提取物中的去羟野芝麻新苷和衍生物的理论含量。优选地，提取物中去羟野芝麻新苷和衍生物的实际含量与输入植物生物质中去羟野芝麻新苷的含量的比率在约3.0和约3.5之间。

[0133] 本发明进一步要求保护标准化的提取物，其富含衍生自从述生产方法获得的来自假马鞭属植物的去羟野芝麻新苷的化合物。

[0134] 在一个实施方案中，甚至更优选地，本发明的植物包含蓝蝶猿尾木(Stachytarpheta cayennensis)。

[0135] 来自假马鞭属植物的标准化提取物优选通过上述制备方法获得，得到富含去羟野芝麻新苷和衍生自去羟野芝麻新苷的化合物的提取物，去羟野芝麻新苷和衍生物的含量为约1％至约20％，优选约8.5％至约11.5％。

[0136] 因此，本发明的另一个目的是含有衍生自去羟野芝麻新苷的化合物的假马鞭属植物的标准化提取物在制备具有免疫抑制活性的药物中的用途。更具体地，含有通式(I)和/或(II)的衍生自去羟野芝麻新苷的假马鞭属植物的标准化提取物用于制备具有免疫抑制活性的药物。

[0137] 因此，本发明的另一个目的是至少一种富含衍生自去羟野芝麻新苷的化合物的提取物的活性级分。优选地，至少一种级分包含至少一种式(I)和/或(II)的衍生自去羟野芝麻新苷的化合物。

[0138] 在任选的实施方案中，富集提取物的活性级分还包含去羟野芝麻新苷。

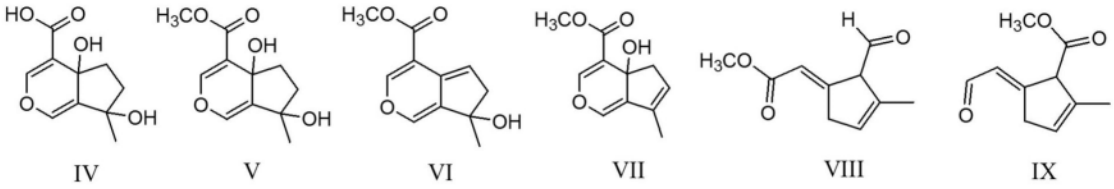
[0139] 因此，本发明的另一个目的是从假马鞭属植物获得的至少一种富含衍生自去羟野芝麻新苷的化合物的标准化级分用于制备具有免疫抑制活性的药物的用途。

[0140] 实施例-优选实施方案

[0141] 实验部分中描述的实施例的唯一目的是举例说明实施本发明的几种方式之一，但不限制其范围。

[0142] 活性化合物的生产和鉴定过程

[0143] 通过使去羟野芝麻新苷化合物在40℃和100℃下经受0.1N盐酸1小时、2小时和5小时来获得分离的本发明化合物。图3显示了40℃的条件。从该实验中，我们可以观察到来自该水解的几种产物，并且基于色谱图，鉴定了几种去羟野芝麻新苷衍生物，例如，如下所述的结构，如图3所示。

[0144] 

[0145] 或者，可以通过在0.1至1N之间改变盐酸浓度来进行水解，并且实验温度可以在35℃至165℃之间变化。此外，水解时间可在1分钟至24小时之间变化，以促进形成更高浓度的某些去羟野芝麻新苷衍生物。

[0146] 获得提取物的方法

[0147] 根据本发明，获得富含去羟野芝麻新苷衍生物的蓝蝶猿尾木(Stachytarpheta cayennensis)水提取物的方法主要包括以下步骤：图1的流程图中所解释说明的生产标准化提取物的步骤，以获得用于开发免疫学临床前研究的材料。

[0148] 首先，优选通过对蓝蝶猿尾木(Stachytarpheta cayennensis)进行基因分型选择的种子在温度、湿度和光照的受控环境中进行接种两个月的过程。接种在多孔(expanded)的聚苯乙烯托盘中进行，填充有基质，并在受控浇灌的情况下保持在该受保护的环境中。幼苗在10到15天内开始出现。托盘保持在这些条件下，直到幼苗达到永久移植大小和理想条件。

[0149] 将具有大约5至8cm高度和2至3对最终叶的幼苗移植到生长地点，其优选地具有30℃的年平均温度，年平均相对湿度小于55％。其中土壤优选但不限于特定化学和物理土壤分析的结果，例如酸度、钙、氮和在所有区域中使用有机肥料。

[0150] 种植幼苗后，第一次收获在6个月后进行，每4个月另一次再生长，从而保证灌木的优化生命周期，目的是使输入的植物生物质中的去羟野芝麻新苷含量最大化。

[0151] 种植后，在限定的温度和湿度条件下，通过温室干燥过程稳定植物生物质。将植物在干燥器中用热交换器、强制空气循环干燥，温度范围为50至70℃，优选60℃。干燥包括使热空气通过植物，除去湿气，直到植物生物质在10％至12％的湿度下稳定。在优选的实施方案中，干燥时间为8至20小时。

[0152] 如图1所示，通过具有1800RPM和19mm筛的锤磨机对植物生物质进行研磨过程，在室温下获得50至150kg/小时的生产率。研磨后，将植物生物质在80至90℃的温度下进行水性萃取，并持续搅拌15分钟。使用的提取溶液的量应该是所使用的植物生物质的10倍，从而保证在植物生物质中彻底提取感兴趣的物质。

[0153] 在前一步骤之后，将材料在室温下进行浸渍过程10小时。随后，将材料再次在80至90℃下加热15分钟。

[0154] 在具有40um的聚酯网的旋转过滤器上过滤材料。在过滤步骤之后，将材料在“Bernauer”蒸发器和/或降膜蒸发器上浓缩至总固体的约30％。

[0155] 将该步骤的产物在喷雾干燥器中进行干燥，入口温度在155至165℃之间，出口温度在85至95℃之间，与除湿器(优选Bry-Air型)连接，持续20至40秒，旨在获得可能的最低

残留湿度(表1)。该方法实质上改善了富集提取物的质量,因为在植物提取物/衍生物的保质期内,材料中的残余湿度最初损害了感兴趣组分的稳定性。该提取过程产生10至12:1的比例,产率在8至10%之间变化。

[0156] 表1-仅干燥后和除湿器干燥后的提取物中的湿度含量

[0157]

用SD干燥后的提取物中的湿度含量	用SD+除湿器干燥后的提取物中的湿度含量
4.61%	1.77%

[0158] 上述提取方法保证了去羟野芝麻新苷的彻底提取,以确保提取物的免疫抑制活性,这是由于在该方法中产生的去羟野芝麻新苷衍生物的存在。因此,有必要建立输入植物生物质的过程控制,使得提取物中的去羟野芝麻新苷和衍生物的实际含量在8.5和11.5%之间,如表2所示。植物生物质中的去羟野芝麻新苷的控制确保了通过本文所述方法产生的在提取物中具有免疫抑制活性的去羟野芝麻新苷衍生物的存在。

[0159] 表2-植物生物质和提取物中的去羟野芝麻新苷的含量。

[0160]

输入植物生物质中去羟野芝麻新苷的实际含量	提取物中去羟野芝麻新苷和衍生物的理论含量	提取物中去羟野芝麻新苷和衍生物的实际含量[a]	输入植物生物质的选择
1.57%	5.23% (4.44 - 6.02)	4.47%	没有选择
2.20%	7.33% (6.23 - 8.43)	7.62%	没有选择
3.00%	10% (8.5 - 11.5)	10.80%	选择
3.30%	11% (9.35 - 12.65)	11.20%	选择
3.07%	10.2% (8.67 - 11.73)	8.90%	选择
3.65%	12.2% (10.37 - 14.03)	12.40%	没有选择

[0161] [a]去羟野芝麻新苷及其衍生物在提取物中的理论含量和实际含量之间的一致性证明了方程式I的适用性。

[0162] 由此,可以确定用于预测富集的活性提取物中的伊拉酰胺及其衍生物的理论含量的方法。为此目的,使用方程来从植物生物质中的去羟野芝麻新苷的实际含量预测通过提取过程获得的含量(理论)(方程式I)。

[0163] $$\text{提取物中的去羟野芝麻新苷和衍生物的\%理论含量} = \frac{\text{植物生物质中的去羟野芝麻新苷的\%实际含量} \times \text{DER}}{\left(\frac{\text{提取物中的去羟野芝麻新苷和衍生物的实际含量}}{\text{输入植物生物质中的去羟野芝麻新苷的实际含量}}\right)} \pm \text{标准偏差}$$

[0164] 在上述等式中,DER可以理解为获得1千克天然提取物所需的植物生物质。在,提取物中去羟野芝麻新苷和衍生物的实际含量/输入植物生物质中去羟野芝麻新苷的含量之间的比率优选为约3.0至约3.5。

[0165] 因此,以预期的方式,使用上述方程,可以仅选择植物生物质(其去羟野芝麻新苷的含量通过分析方法,例如HPLC获得),预测在提取物中8.5至11.5%的足够的理论含量的去羟野芝麻新苷和衍生物,并丢弃不会投射此范围的那些。以一种创新的方式,在本发明中已经证实,提取物中的去羟野芝麻新苷和衍生物的实际含量与输入植物生物质中的去羟野芝麻新苷的含量之间的关系优选为3.0-3.5。

[0166] HPLC分析包括制备样品溶液和标准品及其洗脱步骤,如下:

[0167] 1.溶液制备

[0168] 1.1-甲酸溶液0.1%(流动相A):在含有约800ml超纯水的1000mL容量瓶中,加入1ml甲酸。用超纯水填充烧瓶容量并充分均化。

[0169] 1.2-甲酸稀释溶液:甲醇(1:1):在烧杯中,将50mL的0.1%甲酸溶液与50mL甲醇混合。

[0170] 2.样品制备:

[0171] 原料(草药):称取1.0g研磨的草药并转移至琥珀色250ml锥形瓶中或用铝箔覆盖。加入50mL蒸馏水并在80℃回流下萃取2小时。将溶液用纸过滤到50mL容量瓶中并装满蒸馏水。将其通过0.22OR0.45μm膜过滤至HPLC小瓶。

[0172] 3.标准品制备:

[0173] 去羟野芝麻新苷标准品100ppm:称量1.0mg去羟野芝麻新苷标准品并转移至琥珀色10mL容量瓶中。加入5ml稀释剂,将其在超声波浴中放置10分钟或直至完全溶解。加入稀释剂,然后进行均质化。对所述去羟野芝麻新苷标准进行Karl Fischer湿度分析。

[0174] 4.HPLC分析:

[0175] 4.1参数/设备

[0176] -色谱柱:Zorbax SB-C18(250mm x 4mm;5um)

[0177] -流动相:(A)0.1%甲酸;

[0178] (B)甲醇。

[0179] 表3-去羟野芝麻新苷洗脱梯度

[0180]

时间(min)	(%)A	(%)B
0	80	20
27	58	42
32	58	42
32.1	0	100
36	0	100
36.1	80	20

45	80	20

[0181] -流速:1.0mL/min

[0182] -检测:254nm。

[0183] -分析时间:45分钟

[0184] -进样体积:30μL

[0185] 4.2-去羟野芝麻新苷(IPOLAMIIDE)含量的计算

[0186] 去羟野芝麻新苷的含量(%)＝A样品×M标准×P标准×D样品×(100-U标准)；

[0187] A标准x M样品x D标准x 10000/100；

[0188] 其中：

[0189] A样品:样品中的去羟野芝麻新苷的峰面积

[0190] M标准:标准去羟野芝麻新苷的质量,mg

[0191] P标准:以小数(in decimal)表示的标准的纯度

[0192] D样品:以mL计稀释样品

[0193] A标准:标准中的去羟野芝麻新苷的峰面积

[0194] M样品:以g表示的所使用的样品的质量

[0195] D标准:以L表示的标准品的稀释

[0196] U标准:由Karl Fischer量化的标准的湿度

[0197] 10000:单位转换

[0198] 提取物中的含量的结果基于干燥给出,即,湿度被折算。因此,提取物质量的计算是：

[0199] M样品＝质量×(100-U样品)/100；

[0200] 其中：

[0201] 质量＝干提取物的质量(克)

[0202] U样品＝以百分比表示的干燥提取物的湿度,根据iT2-052。

[0203] 5.去羟野芝麻新苷衍生物的HPLC分析

[0204] 5.1-参数/设备

[0205] -色谱柱:Eclipse XDB Agilent-C18(150X 4.6MM)5MICRONS

[0206] -流动相:(A)0.1％甲酸缓冲液；

[0207] (B)乙腈

[0208] 表4-去羟野芝麻新苷衍生物洗脱梯度

[0209]

时间(min)	(%)A	(%)B
0	95	5
5.00	90	10
8.00	80	20
10.00	90	10
12.00	95	5

[0210] -流速:1.2mL/min

[0211] -检测:DAD(205-280nm)。

[0212] -分析时间:15分钟

[0213] -进样体积:20μL

[0214] 5.2去羟野芝麻新苷衍生物的含量计算

[0215] 为了分析给定的去羟野芝麻新苷衍生物(Y),我们将其提交给具有确定浓度的溶液。该浓度与色谱图中观察到的面积直接相关。与色谱图的总面积相比,该面积乘以先前定义的浓度,得到样品中所述衍生物(Y)的百分值,如下所示:

[0216] $$样品浓度\ X\ \frac{衍生物Y面积}{总面积}\ X\ 100 = \%\ 衍生物Y含量$$

[0217] (∑衍生物的含量=%样品中去羟野芝麻新苷的总含量。)

[0218] 生物/免疫抑制活性

[0219] 如下所述进行蓝蝶猿尾木(Stachytarpheta cayennensis)水提取物以及去羟野芝麻新苷及其衍生物的体外生物活性的评价。

[0220] 在涉及CD8+T细胞和IFNγ的实验体外免疫模型中研究了蓝蝶猿尾木(Stachytarpheta cayennensis)、去羟野芝麻新苷和衍生物的提取物。本研究的目的是评估提取物和其他物质(分离或混合)是否通过阻断CD8+T细胞的活化和随后的IFNγ分泌而起作用。

[0221] 通过Ficoll-Hystopaque离心从白细胞层分离来自健康志愿者的外周血单核细胞(PBMCs)。随后,使用CD8+T细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotec,#130-096-495)分离人CD8+T细胞。将这些细胞(3×10^5个细胞/孔)在RPMI+10%FBS培养基中培养,用αCD3/CD28(1μg/mL)活化,并用不同浓度的蓝蝶猿尾木(Stachytarpheta cayennensis)水提取物(标准化为10%的去羟野芝麻新苷)、分离的去羟野芝麻新苷和通过酸水解获得的去羟野芝麻新苷衍生物处理,研究它们对阻止CD8+T细胞活化和IFNγ分泌的作用。为了评估细胞增殖,将溴脱氧尿苷(BrdU)(一种常用于增殖试验的胸苷类似物)用作增殖的标记物。具体地,根据制造商的说明,通过Biotrak ELISA系统(GE Healthcare,RPN250)评估BrdU的掺入。定量干扰素γ的方法包括使用人IFNγELISAReady-SET-Go试剂盒(eBiosciences88-7316-88)并遵循制造商的说明书。如图2的图表组所示,富含去羟野芝麻新苷衍生物的蓝蝶猿尾木(Stachytarpheta cayennensis)的水提取物阻断了由αCD3/CD28诱导的CD8+T细胞的活化。分离的去羟野芝麻新苷对αCD3/CD28诱导的CD8+T细胞增殖和IFNγ的分泌没有影响。然而,其酸水解获得的混合物形式的衍生自去羟野芝麻新苷的化合物显着降低了CD8+T细胞增殖和IFNγ的分泌。从该混合物中分离的去羟野芝麻新苷衍生物也显示出CD8+T细胞增殖和IFNγ分泌的统计学显着降低。他克莫司是一种众所周知的免疫抑制剂,用作参照化合物并作为实验的阳性对照。他克莫司获得的效果类似于水解的去羟野芝麻新苷在细胞增殖和IFNγ产生中获得的效果。

[0222] 因此,结果显示免疫抑制活性来自去羟野芝麻新苷衍生物而不是来自完整分子。重要的是要强化通过分离的去羟野芝麻新苷的酸水解的实验条件获得的化合物存在于蓝蝶猿尾木(Stachytarpheta cayennensis)的水提取物中,如图4所示。然而,这些化合物的存在是由于本发明中所使用的提取方法。

[0223] 本领域技术人员将理解本文提供的知识,并且可以在所呈现的实施方案和其他实施方案中复制本发明,这些都落入所附权利要求的范围内。

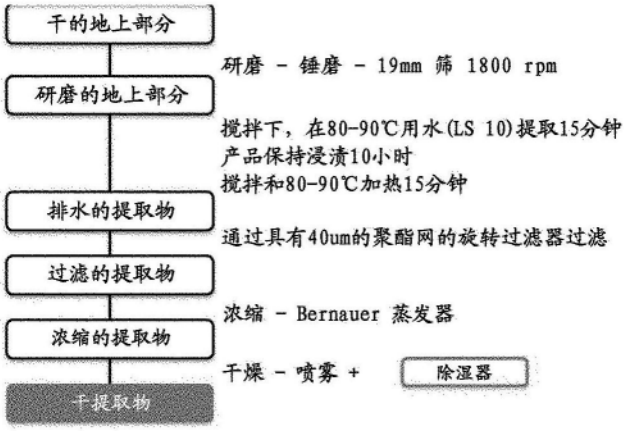

干的地上部分
研磨 - 锤磨 - 19mm 筛 1800 rpm
研磨的地上部分
搅拌下，在80-90℃用水(LS 10)提取15分钟
产品保持浸渍10小时
搅拌和80-90℃加热15分钟
排水的提取物
通过具有40um的聚酯网的旋转过滤器过滤
过滤的提取物
浓缩 - Bernauer 蒸发器
浓缩的提取物
干燥 - 喷雾 +
除湿器
干提取物

图1

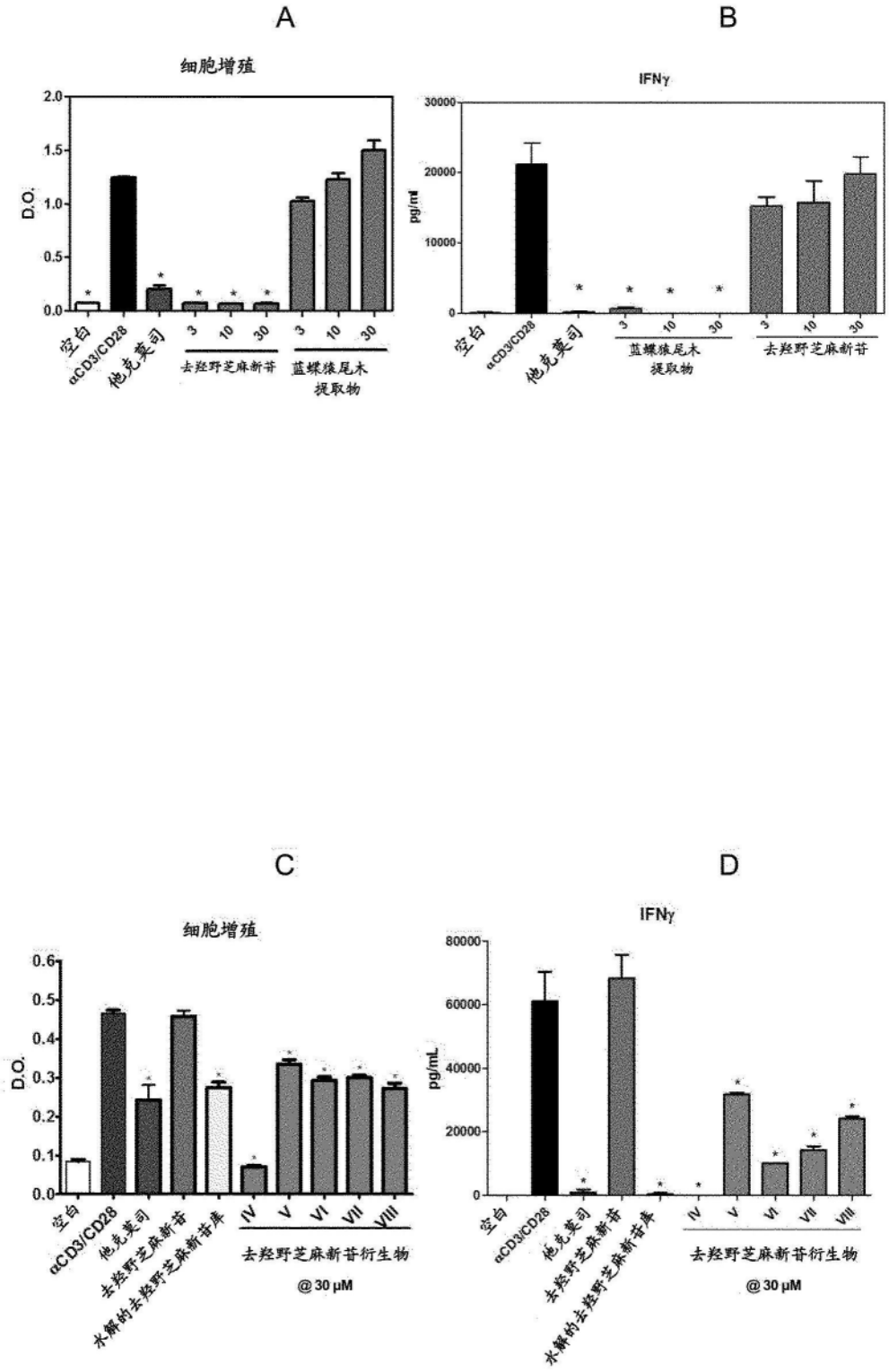

A
细胞增殖
D.O.
空白
αCD3/CD28
他克莫司
去羟野芝麻新苷
蓝蝶猿尾木提取物
B
IFNγ
pg/mL
空白
αCD3/CD28
他克莫司
蓝蝶猿尾木提取物
去羟野芝麻新苷
C
细胞增殖
D.O.
空白
αCD3/CD28
他克莫司
去羟野芝麻新苷
水解的去羟野芝麻新苷库
去羟野芝麻新苷衍生物
@30 μM
D
IFNγ
pg/mL
去羟野芝麻新苷衍生物
@30 μM

图2

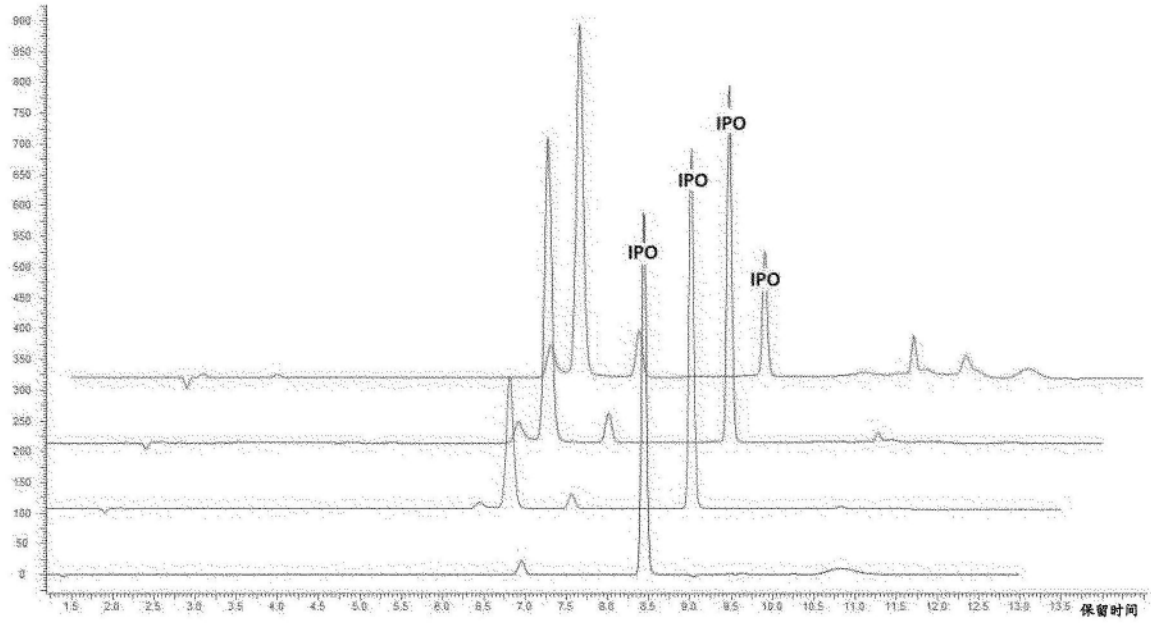


图3

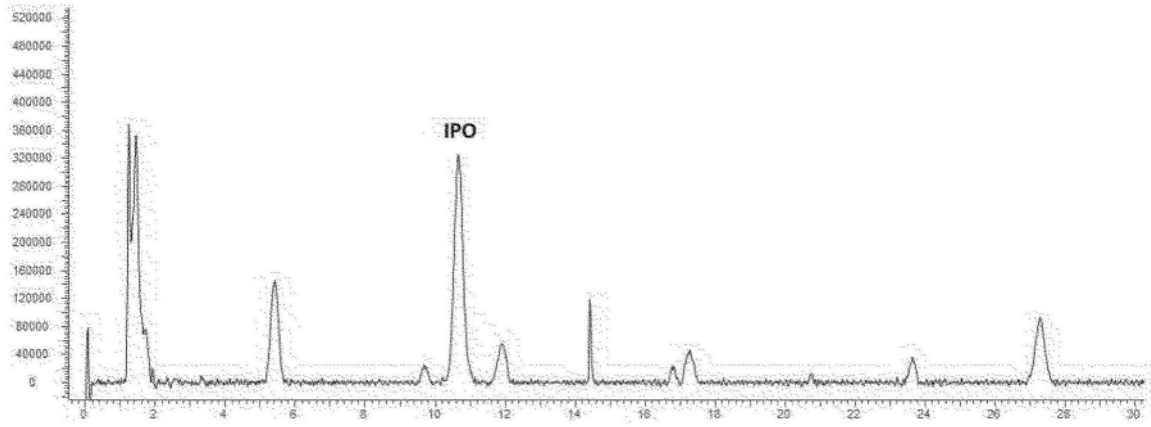


图4