

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01823924.2

[51] Int. Cl.

A61K 31/341 (2006.01)

A61K 31/365 (2006.01)

A61K 36/15 (2006.01)

A61P 13/08 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 12 月 24 日

[11] 授权公告号 CN 100444837C

[22] 申请日 2001.12.5 [21] 申请号 01823924.2

[86] 国际申请 PCT/IN2001/000214 2001.12.5

[87] 国际公布 WO2003/047608 英 2003.6.12

[85] 进入国家阶段日期 2004.7.5

[73] 专利权人 科学与工业研究委员会

地址 印度新德里

共同专利权人 阿里亚 维迪雅 萨拉公司

[72] 发明人 J·M·拉奥 P·V·斯里尼瓦斯

J·S·亚达夫 K·V·拉加万

A·K·萨克塞纳 M·尚穆加维尔

H·坎帕西 G·N·卡齐

[56] 参考文献

US6261565B1 2001.7.17

Enantioselective synthesis of (-) - Wikstro-
mol using a new approach via malic acid. Sefkow,
Michael. J. ORG. CHEM., Vol. 66 No. 7. 2001

Free radical scavenging active components from
Cedrus Deodara. Tiwari ashok k et al. JOURNAL
OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY,
Vol. 49 No. 10. 2001

Lignans of Taxus baccata. DAS B ET AL. FI-
TOTERAPIA, Vol. 66 No. 5. 1995

审查员 沈丽鸽

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄草生 林柏楠

权利要求书 3 页 说明书 18 页 附图 1 页

[54] 发明名称

用于治疗癌的新草本化学组合物

[57] 摘要

本发明涉及对乳腺癌、子宫颈癌、成神经细胞瘤、结肠癌、肝癌、肺癌、口癌、卵巢癌和前列腺癌显示有抗癌活性的、自雪松的植物提取物所获得的木脂素类的新协同组合物，所述组合物包含占 9 至 13% 重量的 (-) - 罗汉松脂素，占 75 至 79% 重量的 (-) - 南萘酚，占 7 至 11% 重量的二苄基丁内半缩醛，以及占 2.6 至 3% 重量的未确认物质；此外，协同的木脂素组合物与可药用载体组合用于抑制选自乳腺癌、子宫颈癌、成神经细胞瘤、结肠癌、肝癌、肺癌、口癌、卵巢癌和前列腺组织的多种人癌细胞系的生长。

1. 对受试者乳腺癌、子宫颈癌、成神经细胞瘤、结肠癌、肝癌、肺癌、口癌、卵巢癌和前列腺癌显示有抗癌活性的、自雪松 (Cedrus Deodara) 的植物提取物所获得的木脂素类的新协同组合物, 所述组合物包含(a)占 9 至 13%重量的(-)-罗汉松脂素, (b)占 75 至 79%重量的(-)-南茺酚, (c)占 7 至 11%重量的二苄基丁内半缩醛, 和(d)占 2.6 至 3%重量的未确认物质。

2. 如权利要求 1 所述的组合物, 其中乳腺癌细胞系选自 MCF-7 和 T-47-D。

3. 如权利要求 1 所述的组合物, 其中子宫颈癌细胞系选自 Hela 和 SiHa。

4. 如权利要求 1 所述的组合物, 其中成神经细胞瘤细胞系选自 SF-539、SKNMC、IMR-32、SKNSH 和 SNB-78。

5. 如权利要求 1 所述的组合物, 其中结肠癌细胞系选自 Colo-205、HCT-15、HT-29 和 SW-620。

6. 如权利要求 1 所述的组合物, 其中肝癌细胞系选自 Hep-2 和 Hep-G-2。

7. 如权利要求 1 所述的组合物, 其中肺癌细胞系选自 A-549、NCI-H23 和 HOP-18。

8. 如权利要求 1 所述的组合物, 其中口癌细胞系为 KB。

9. 如权利要求 1 所述的组合物, 其中卵巢癌细胞系选自 OVCAR-5、NIH-OVCAR-3 和 SK-OV-3。

10. 如权利要求 1 所述的组合物, 其中前列腺癌细胞系选自 DU-145 和 PC-3。

11. 如权利要求 1 所述的组合物, 其中将协同的木脂素组合物与可药用添加剂、载体、稀释剂、溶剂、填充剂、润滑剂、赋形剂、粘合剂或稳定剂组合施用于患者。

12. 如权利要求 1 所述的组合物, 其中协同的木脂素组合物可全身施

用和/或经口施用或以任何其它合适方法施用。

13. 如权利要求 1 所述的组合物, 其中受试者选自动物或哺乳动物。

14. 如权利要求 13 所述的组合物, 其中受试者为人。

15. 如权利要求 1 所述的组合物的用途, 用于制备治疗受试者乳腺癌、子宫颈癌、成神经细胞瘤、结肠癌、肝癌、肺癌、口癌、卵巢癌和前列腺癌的药物。

16. 如权利要求 15 所述的用途, 其中所用的协同的木脂素组合物与可药用添加剂、载体、稀释剂、溶剂、填充剂、润滑剂、赋形剂、粘合剂或稳定剂组合。

17. 如权利要求 15 所述的用途, 其中所述药物可全身施用和/或经口施用或以任何其它合适方法施用。

18. 如权利要求 15 所述的用途, 其中受试者选自动物或哺乳动物。

19. 如权利要求 18 所述的用途, 其中受试者为人。

20. 如权利要求 15 所述的用途, 其中被抑制的乳腺癌细胞系为 MCF-7 和 T-47-D。

21. 如权利要求 15 所述的用途, 其中被抑制的子宫颈癌细胞系为 HeLa 和 SiHa。

22. 如权利要求 15 所述的用途, 其中被抑制的成神经细胞瘤细胞系为 SF-539、SKNMC、IMR-32、SKNSH 和 SNB-78。

23. 如权利要求 15 所述的用途, 其中被抑制的结肠癌细胞系为 Colo-205、HCT-15、HT-29 和 SW-620。

24. 如权利要求 15 所述的用途, 其中被抑制的肝癌细胞系为 Hep-2。

25. 如权利要求 15 所述的用途, 其中被抑制的肺癌细胞系为 A-549 和 NCI-H23。

26. 如权利要求 15 所述的用途, 其中被抑制的口癌细胞系为 KB。

27. 如权利要求 15 所述的用途, 其中被抑制的卵巢细胞系为 OVCAR5 和 SK-OV-3。

28. 如权利要求 15 所述的用途, 其中被抑制的前列腺癌细胞系为

DU-145 和 PC-3。

29. 如权利要求 15 所述的用途，其中所述协同的组合物施用量为每天至少一次施用 10 至 500mg/kg 体重。

30. 如权利要求 15 所述的用途，其中所施用的协同的组合物量为 50 至 350mg/kg 体重。

用于治疗癌的新草本化学组合物

发明领域

本发明涉及用于治疗癌的新草本组合物。本发明特别涉及包含分离自植物雪松（*Cedrus Deodara*）的木脂素类混合物的草本制剂。

发明背景

癌或赘生物是身体系统中在任何部位以及在另外部位的恶性新生物。其特征为细胞不受控制的增殖，估计全世界每年新发生约六百万病例，这成为正在增长的公共卫生问题。在大多数国家，癌是仅次于心脏病的第二个引起死亡的原因。它可在身体的任何器官出现，但某些部位比其它部位更倾向于发作该疾病，如乳房、咽喉、肠、白细胞等。每种癌是从在某阶段产生变异的一个细胞增殖而成，它逐渐脱离所在部位的边界限制，形成一个无限增殖并以肿瘤形式出现的细胞家族。

在正常细胞向肿瘤细胞的转变期间，发生了深刻的可遗传变化，其中所述变化可允许肿瘤细胞决定其自身活性，而在很大程度上无视有机体中所有正常细胞生长的精确控制规则。该新获得的特性，已知为自主性，是对肿瘤细胞适用的最重要的特征，因为没有该特征就没有肿瘤。肿瘤细胞的另一个有区别的特征是它们缺乏功能的正确形式。癌细胞和正常细胞间存在的差别是，与正常细胞相比，癌细胞有 a) 低 pH; b) 更多的自由基特性; c) 肿瘤产生的激素肽; d) 肿瘤相关抗原; e) 较低钙离子浓度和较高钾离子浓度; f) 不同的钾同位素比率; g) 升高的甲基化核苷酸量; h) 较高浓度的血浆微生物蛋白质和粘多糖; i) 更需要外源性锌和 j) 高生物水含量。

癌的总体原因中有许多原因，如饮食、环境、职业性暴露于某些化学

物质或电磁辐射形式，通过流行病学研究已经进行了阐述。因此迫切需要对它们进行鉴别并在现代工业社会中可能的范围内从环境中消除它们。在治疗年报中，寻求征服癌的这一难题总是使科学界的所有学科，特别是自然产物化学家着迷。在 19 和 20 世纪，进行了很多研究工作以发现这个可怕疾病后面的推动力并引进了大量的药以对抗该病的威胁。

在这个关键时刻，值得简要看一看几种最强效的化学治疗剂，所述强效治疗剂对人类也对积极参与抗癌药合成和分离的研究者有极大的重要性。木脂素类已经从许多植物中分离到 (Achenbach, H., Waibel, R. 和 Meusah, I. *Phytochemistry*, 22 (3), 749-753 (1983); Nishibe, S., Hisada, S. 和 Inagaki, I. *Phytochemistry*, 10, 2231-2232 (1971); Barrero, A. F., Haidour, A. 和 Dorado, M. M. *J. Nat. Prod.* 42, 159-162 (1979))。

木脂素类生物学活性的最近研究无疑证明了这些植物化学品作为细胞毒性剂的效力 (Macrae, W. D. 和 Towers, G. H. N. *Phytochemistry* 23 (6), 1207-1220 (1984))。最近木脂素类也从人的尿和血中分离到。这个事实也表明木脂素类在人体生理学中起一定作用。

由于上述背景，本申请人将他们的注意力集中于从植物中鉴定和分离强效的细胞毒性剂。文献数据表明雪松中存在的大多数情况下为人工制品的开环异落叶松树脂酚 (Agarwal, P. K. 和 Rastogi, R. P. *Phytochemistry*, 21 (6), 1459-1461 (1982)) 是经证实的抗氧化剂。我们对雪松进行的进一步研究使我们分离了基本上包含(-)-罗汉松脂素、(-)-南萹酚和二苄基丁内半缩醛的极高产量的新木脂素混合物。雪松也是这些木脂素类的新来源。

首次报道(-)-南萹酚来自 *wikstroemia viridiflora* (Nishibe, S., Hisada, S. 和 Inagaki, I. *Phytochemistry*, 10, 2231-2232 (1971))。以前罗汉松脂素从多种来源分离到 (Nishibe, S., Hisada, S. 和 Inagaki, I. *Phytochemistry*, 10, 2231-2232 (1971); Tandon, S. 和 Rastogi, R. P. *Phytochemistry*, 15, 1789-1791 (1976))。来自西班牙冷杉 (*Abies pinsapo*) 木的二苄基丁内半缩醛[4, 4', 9-三羟基-3, 3'-二甲氧基-9, 9'-环氧木脂素]的分离以前只报道过一次 (Barrero, A. F., Haidour, A. 和 Dorado, M. M. *J. Nat. Prod.* 42, 159-162

(1979))。

记住来自雪松的木脂素类的高产量，同时也记住通常木脂素类有极好的生物学活性 (Macrae, W. D.和 Towers, G. H. N. *Phytochemistry* 23 (6), 1207-1220 (1984))。

发明目的

本发明的主要目的涉及用于治疗人癌细胞的草本组合物。

本发明的另一目的涉及获自植物源的用于治疗人癌细胞的草本组合物。

本发明的另一目的涉及分离自雪松的木脂素混合物对多种人癌细胞系的体外细胞毒性。

又本发明的另一目的涉及分离自雪松的单一木脂素类对多种人癌细胞系的体外细胞毒性。

又本发明的另一实施方案涉及从植物源即雪松分离活性木脂素混合物的方法。

又本发明的另一目的涉及获得自植物雪松的用于抑制人癌细胞生长的协同木脂素组合物。

又本发明的另一目的涉及包含分离自植物雪松的用于抑制人癌细胞生长的单一木脂素类的组合物。

又本发明的另一实施方案涉及治疗患癌哺乳动物，特别是患癌人类的方法。

发明概述

因此，本发明提供了对乳腺癌、子宫颈癌、成神经细胞瘤、结肠癌、肝癌、肺癌、口癌、卵巢癌和前列腺癌显示有抗癌活性的、自雪松的植物提取物所获得的木脂素类的新协同组合物，所述组合物包含

(a) 占 9 至 13%重量范围的(-)-罗汉松脂素，

(b) 占 75 至 79%重量范围的(-)-南蒯酚，

(c) 占 7 至 11% 重量范围的二苄基丁内半缩醛, 和

(d) 占 2.6 至 3% 重量范围的未确认物质;

此外, 木脂素的协同组合物可与可药用载体组合用于抑制多种人癌细胞系。

发明详述

尝试了确立分离自雪松的木脂素混合物的抗癌活性。与木脂素混合物相比, 分离自雪松木的氯仿提取物的单独组分显示了有较低活性水平, 这确立了协同原则。

因此, 本发明提供了对乳腺癌、子宫颈癌、成神经细胞瘤、结肠癌、肝癌、肺癌、口癌、卵巢癌和前列腺癌显示有抗癌活性的, 获自雪松的植物提取物的木脂素类的新协同组合物。所述组合物包含

(a) 占 9 至 13% 重量范围的(-)-罗汉松脂素,

(b) 占 75 至 79% 重量范围的(-)-南萜酚,

(c) 占 7 至 11% 重量范围的二苄基丁内半缩醛, 和

(d) 占 2.6 至 3% 重量范围的未确认物质;

在另一实施方案中, 其中协同的木脂素类组合物在浓度范围为 30-100 μ g/ml 抑制乳腺癌细胞生长达 80%。

又在另一实施方案中, 乳腺癌细胞系选自 MCF-7 和 T-47-D。

又在另一实施方案中, 其中协同的木脂素类组合物在浓度范围为 30-100 μ g/ml 抑制子宫颈癌细胞生长达 89%。

又在另一实施方案中, 子宫颈癌细胞系选自 Hela 和 SiHa。

又在另一实施方案中, 其中协同的木脂素类组合物在浓度范围为 30-100 μ g/ml 抑制成神经细胞瘤细胞生长达 89%。

又在另一实施方案中, 其中成神经细胞瘤细胞系选自 SF-539、SKNMC、IMR-32、SKNSH 和 SNB-78。

又在另一实施方案中, 其中协同的木脂素组合物在浓度范围为 30-100 μ g/ml 抑制结肠癌细胞生长达 97%。

又在另一实施方案中，其中结肠癌细胞系选自 Colo-205、HCT-15、HT-29 和 SW-620。

又在另一实施方案中，其中协同的木脂素类组合物在浓度范围为 30-100 μ g/ml 抑制肝癌细胞生长达 73%。

又在另一实施方案中，其中肝癌细胞系选自 Hep-2 和 Hep-G-2。

又在另一实施方案中，其中协同的木脂素组合物在浓度范围为 30-100 μ g/ml 抑制肺癌细胞生长达 83%。

又在另一实施方案中，其中肺癌细胞系选自 A-549、NCI-H23 和 HOP-18。

又在另一实施方案中，其中协同的木脂素组合物在浓度范围为 30-100 μ g/ml 抑制口癌细胞生长达 100%。

又在另一实施方案中，其中口癌细胞系为 KB。

又在另一实施方案中，其中协同的木脂素组合物在浓度范围为 30-100 μ g/ml 抑制卵巢癌细胞生长达 96%。

又在另一实施方案中，其中卵巢癌细胞系选自 OVCAR-5、NIH-OVCAR-3 和 SK-OV-3。

又在另一实施方案中，其中协同的木脂素组合物在浓度范围为 30-100 μ g/ml 抑制前列腺癌细胞生长达 98%。

又在另一实施方案中，其中前列腺组织的癌细胞系选自 DU-145 和 PC-3。

又在另一实施方案中，其中木脂素的协同组合物与可药用添加剂、载体、稀释剂、溶剂、填充剂、润滑剂、赋形剂、粘合剂或稳定剂组合向患者施用。

又在另一实施方案中，其中协同的木脂素组合物可全身施用和/或经口施用或以任何其它合适方法施用。

又在另一实施方案中，其中受试者选自动物或哺乳动物，优选人。

本发明另一个实施方案涉及对主要选自乳腺癌、子宫颈癌、成神经细胞瘤、结肠癌、肝癌、肺癌的癌细胞系显示抗癌活性的组合物，所述组合

物包含药有效量的(-)-南荑酚或含有(-)-南荑酚的制剂。

本发明的另一实施方案，其中所用癌细胞系选自乳房细胞 MCF-7 和 ZR-75-1；子宫颈细胞 SiHa；成神经细胞瘤细胞 SKNMC 和 IMR-32；结肠细胞 colo-205、HT-29 和 SW-620；肝细胞 Hep-2；和肺细胞 A-549。

又在本发明的另一实施方案中，其中所述组合物在浓度约为 100 μ g/ml 抑制乳腺癌细胞生长达 51%。

又在本发明的另一实施方案中，其中所述组合物在浓度约 100 μ g/ml 抑制宫颈癌细胞生长达 37%。

又在本发明的另一实施方案中，其中所述组合物在浓度约 100 μ g/ml 抑制成神经细胞瘤细胞生长达 56%。

又在本发明的另一实施方案中，其中所述组合物在浓度约 100 μ g/ml 抑制结肠癌细胞生长达 67%。

又在本发明的另一实施方案中，其中所述组合物在浓度约 100 μ g/ml 抑制肝癌细胞生长达 46%。

又在本发明的另一实施方案中，其中所述组合物在浓度约 100 μ g/ml 抑制肺癌细胞生长达 56%。

又在本发明的另一实施方案中，其中所述组合物抑制剂与可药用载体、添加剂、稀释剂、溶剂、填充剂、润滑剂、赋形剂、粘合剂或稳定剂组合向患者施用。

又在另一实施方案中，所述组合物可全身施用和/或经口施用或以任何其它合适方法施用。

又在另一实施方案中，其中受试者选自动物或哺乳动物，优选人。

本发明另一个实施方案提供了对主要选自乳腺癌、宫颈癌、成神经细胞瘤、结肠癌、肝癌、肺癌的癌细胞系显示抗癌活性的组合物，所述组合物包含药有效量的(-)-罗汉松脂素或含有(-)-罗汉松脂素的制剂。

又在另一实施方案中，其中所用的癌细胞系选自乳腺癌细胞 MCF-7 和 ZR-75-1；宫颈癌细胞 SiHa；成神经细胞瘤细胞 SKNMC 和 IMR-32；结肠癌细胞 Colo-205、HT-29 和 SW-620；肝癌细胞 Hep-2；和肺癌细胞 A-549。

又在另一实施方案中，其中含有(-)-罗汉松脂素的组合物在浓度约100 μ g/ml抑制乳腺癌细胞生长达62%。

又在另一实施方案中，其中上述组合物在浓度约100 μ g/ml抑制子宫颈癌细胞生长达63%。

又在另一实施方案中，其中上述组合物在浓度约100 μ g/ml抑制成神经细胞瘤细胞生长达77%。

又在另一实施方案中，其中上述组合物在浓度约100 μ g/ml抑制结肠癌细胞生长达93%。

又在另一实施方案中，其中上述组合物在浓度约100 μ g/ml抑制肝癌细胞生长达64%。

又在另一实施方案中，其中上述组合物在浓度约100 μ g/ml抑制肺癌细胞生长达65%。

又在另一实施方案中，其中上述组合物与可药用载体、添加剂、稀释剂、溶剂、填充剂、润滑剂、赋形剂、粘合剂和稳定剂组合向患者施用。

又在另一实施方案中，其中上述组合物可全身施用或经口施用。

又在另一实施方案中，其中受试者选自动物或哺乳动物，优选人。

本发明另一个实施方案涉及用于从雪松的植物提取物中分离协同的木脂素组合物的方法，该方法包括下列步骤：

(a)使植物雪松呈粉状，

(b)在索格利特抽提器中依次用烃类溶剂然后用卤化溶剂对粉状植物进行提取，

(c)分别对烃类溶剂提取物和卤化溶剂提取物进行浓缩，和

(d)将卤化溶剂提取物通过在吸附剂上用有机溶剂混合物洗脱的层析进行纯化以产生占提取物1至2%重量的(-)-罗汉松脂素，10至14%重量的(-)-南蒯酚，1至2%重量的二苄基丁内半缩醛，0.2至0.3%重量的未确认物质，以上所述物质一起组成协同的木脂素组合物。

在本发明的另一实施方案中，步骤(a)中植物部分为木以及在步骤(b)中烃类溶剂选自己烷和石油醚，优选己烷。

又在本发明的另一实施方案中，卤化溶剂选自四氯化碳、二氯甲烷或氯仿，优选氯仿。

又在本发明的另一实施方案中，在步骤(c)中提取物在真空下浓缩以及用硅胶作为吸附剂并用不同比例的氯仿-甲醇混合物洗脱实施纯化以得到纯的化合物(-)-南茛菪酚、(-)-罗汉松脂素、二苄基丁内半缩醛和未确认物质，以上所述物质一起组成协同的木脂素组合物。

本发明的另一个实施方案提供了治疗主要患有乳房癌、子宫颈癌、成神经细胞瘤、结肠癌、肝癌、肺癌、口癌、卵巢癌和前列腺癌患者的方法，所述方法包括向患者施用药学有效量的木脂素组合物的协同组合物。

在本发明的另一实施方案中，其中所述协同的木脂素组合物与可药用载体组合应用。

又在本发明的另一实施方案中，其中协同的木脂素组合物可全身施用和/或经口施用或以任何其它合适的方法施用。

又在本发明的另一实施方案中，其中受试者选自动物或哺乳动物，优选人。

又在本发明的另一实施方案中，其中所述协同的木脂素组合物在30-100 μ g/ml浓度范围抑制乳腺癌细胞的生长达80%。

又在本发明的另一实施方案中，被抑制的乳腺癌细胞系为MCF-7和T-47-D。

又在本发明的另一实施方案中，其中协同的木脂素组合物在30-100 μ g/ml浓度范围抑制子宫颈癌细胞的生长达81%。

又在本发明的另一实施方案中，被抑制的子宫颈癌细胞系为Hela和SiHa。

又在本发明的另一实施方案中，其中协同的木脂素组合物在30-100 μ g/ml浓度范围抑制成神经细胞瘤细胞的生长达92%。

又在本发明的另一实施方案中，其中被抑制的成神经细胞瘤细胞系为SF-539、SKNMC、IMR-32、SKNSH和SNB-78。

又在本发明的另一实施方案中，其中协同的木脂素组合物在

30-100 μ g/ml 浓度范围抑制结肠癌细胞的生长达 95%。

又在本发明的另一实施方案中，其中被抑制的结肠癌细胞系为 Colo-205、HCT-15、HT-29 和 SW-620。

又在本发明的另一实施方案中，其中协同的木脂素组合物在 30-100 μ g/ml 浓度范围抑制肝癌细胞的生长达 73%。

又在本发明的另一实施方案中，其中被抑制的肝癌细胞系为 Hep-2。

又在本发明的另一实施方案中，其中协同的木脂素组合物在 30-100 μ g/ml 浓度范围抑制肺癌细胞的生长达 92%。

又在本发明的另一实施方案中，其中被抑制的肺癌细胞系为 A-549 和 NCI-H23。

又在本发明的另一实施方案中，其中所述协同的木脂素组合物在 30-100 μ g/ml 浓度范围抑制口癌细胞的生长达 99%。

又在本发明的另一实施方案中，其中被抑制的口癌细胞系为 KB。

又在本发明的另一实施方案中，其中协同的木脂素组合物在 30-100 μ g/ml 浓度范围抑制卵巢癌细胞的生长达 96%。

又在本发明的另一实施方案中，其中被抑制的卵巢细胞系为 OVCAR5 和 SK-OV-3。

又在本发明的另一实施方案中，其中协同的木脂素组合物在 30-100 μ g/ml 浓度范围抑制前列腺癌细胞的生长达 98%。

又在本发明的另一实施方案中，其中被抑制的前列腺癌细胞系为 DU-145 和 PC-3。

又在本发明的另一实施方案中，其中协同的木脂素组合物与可药用添加剂、载体、稀释剂、溶剂、填充剂、润滑剂、赋形剂、粘合剂或稳定剂组合向患者施用。

又在本发明的另一实施方案中，其中被施用的协同组合物的量为每天至少施用一个剂量的 10 至 500mg/kg 体重。

又在本发明的另一实施方案中，其中被施用的协同组合物的量优选地为 50 至 350mg/kg 体重。

本发明的另一个实施方案涉及治疗主要患有乳腺癌、子宫颈癌、成神经细胞瘤、结肠癌、肝癌、肺癌、口癌、卵巢癌和前列腺癌患者的方法，所述方法包括向患者施用药学有效量的(-)-南茛菪酚或含有(-)-南茛菪酚的组合物。

又在本发明的另一实施方案中，其中所述组合物抑制乳腺癌细胞、子宫颈癌细胞、成神经细胞瘤细胞、结肠癌细胞、肝癌细胞和肺癌细胞的生长分别达 51%、37%、56%、67%、46%和 56%。

又在另一实施方案中，其中癌细胞系选自乳腺癌细胞 MCF-7 和 ZR-75-1；子宫颈癌细胞 SiHa；成神经细胞瘤细胞 SKNMC 和 IMR-32；结肠癌细胞 Colo-205、HT-29 和 SW-620；肝癌细胞 Hep-2；和肺癌细胞 A-549。

又在另一实施方案中，其中组合物单独应用或与可药用载体组合应用。

又在另一实施方案中，其中组合物可全身施用和/或经口施用或以任何其它合适方法施用。

又在另一实施方案中，其中受试者选自动物或哺乳动物，优选人。

又在另一实施方案中，其中被施用的组合物量为一天至少一次施用 10 至 500mg/kg 体重。

又在另一实施方案中，其中被施用的组合物量优选地为一天至少一次施用 75 至 300mg/kg 体重。

又在另一实施方案中，其中(-)-南茛菪酚与可药用载体、添加剂、稀释剂、溶剂、填充剂、润滑剂、赋形剂、粘合剂和稳定剂组合向患者施用。

本发明的另一个实施方案涉及治疗主要患有乳腺癌、子宫颈癌、成神经细胞瘤、结肠癌、肝癌、肺癌患者的方法，所述方法包括向患者施用药学有效量的(-)-罗汉松脂素或包含(-)-罗汉松脂素的组合物。

本发明的另一实施方案，其中所述组合物抑制乳腺癌细胞、子宫颈癌细胞、成神经细胞瘤细胞、结肠癌细胞、肝癌细胞、肺癌细胞的生长分别达 62%、63%、77%、93%、64%和 65%。

又在另一实施方案中，其中癌细胞系选自乳腺癌细胞 MCF-7 和 ZR-75-1；子宫颈癌细胞 SiHa；成神经细胞瘤细胞 SKNMC 和 IMR-32；结

肠癌细胞 Colo-205、HT-29 和 SW-620; 肝癌细胞 Hep-2; 和肺癌细胞 A-549。

又在另一实施方案中, 所述组合物单独应用或与可药用载体组合应用。

又在另一实施方案中, 所述组合物可全身施用或经口施用。

又在另一实施方案中, 其中受试者选自动物或哺乳动物, 优选人。

又在另一实施方案中, 被施用的组合物量为一天至少施用一次 10 至 500g/kg 体重。

又在另一实施方案中, 被施用的组合物量优选地为一天至少施用一次 75 至 300mg/kg 体重。

又在另一实施方案中, 所述组合物与可药用载体、添加剂、稀释剂、溶剂、填充剂、润滑剂、赋形剂、粘合剂和稳定剂组合向患者施用。

本发明具体体现了从全新来源分离新的细胞毒性混合物。木脂素混合物在体外显著抑制许多代表不同器官的人癌细胞系 (乳腺癌: MCF-7 和 T-47-D, 子宫颈癌: Hela 和 SiHa, 成神经细胞瘤: SF-539、SKNMC、IMR-32、SKNSH 和 SNB-78; 结肠癌: Colo-205、HCT-15、HT-29 和 SW-620, 肝癌: Hep-2, 肺癌: A-549 和 NCI-H23, 口癌: KB, 卵巢癌: OVCAR5 和 SK-OV-3, 以及前列腺癌: DU-145 和 PC-3) 的生长。

本发明涉及包含(-)-罗汉松脂素、(-)-南蒾酚、二苄基丁内半缩醛和未确认物质的协同组合物, 所述协同组合物对癌细胞系提供显示增强细胞毒性的出乎意料结果, 所述增强细胞毒性的出乎意料结果通过对选自乳腺癌、子宫颈癌、成神经细胞瘤、结肠癌、肝癌、肺癌、口癌、卵巢癌和前列腺癌组织的癌细胞系的显著细胞毒性结果而证实。实际上, 组合物是协同的, 因为活性是显著的并且组合物的该惊人的被增强活性不可能从仅仅集中单一成分特性而预料到。换句话说, 组合物不具有它的成分简单相加的特性, 而是具有增强的活性, 所述增强的活性进一步证实了所分离的协同组合物的功效。此外, 成分的量对组合物增强的活性也有作用/贡献。

下列实施例仅以阐述的方式给出, 不用于限制本发明的范围。

附图简述

图 1 代表(-)-罗汉松脂素[1]; (-)-南茛酚[2]和二苄基丁内半缩醛[3]的结构式。

实施例 1

单一组分的分离和鉴定:

将雪松的干木片弄成粉状(200g)并装入索格利特抽提器中。粉末首先用己烷然后用氯仿进行提取。氯仿提取物在真空下进行浓缩并将残留物装入硅胶柱上(网孔 60-120, 对 10g 残留物用 3.5cm 直径的柱子, 柱子装到 60cm 长)。最初柱子用氯仿然后用氯仿中含 3% 的甲醇进行洗脱以得到(-)-罗汉松脂素。

柱子用氯仿中含 5% 的甲醇进一步洗脱产生(-)-南茛酚。

柱子进一步用氯仿中含 7% 的甲醇洗脱产生二苄基丁内半缩醛。

罗汉松脂素的产量约为 1-2%; (-)-南茛酚的产量约为 10-14%; 二苄基丁内半缩醛的产量约为 1-2%。

分子 1、分子 2 和分子 3 的特征

(-)-罗汉松脂素

1. 分子式: $C_{20}H_{22}O_6$

2. 1H -NMR: 2.53 (4H, m), 2.95 (2H, br), 3.86 (6H, s), 4.2-4.4 (2H, m), 5.5 (2H, -OH), 6.4-6.8 (6H, m)

3. ^{13}C -NMR: 34.48 (C-8), 38.1(C-8'), 40.90 (C-7), 46.60 (C-7'), 55.74 (2-OMe), 71.31 (O-CH₂), 111.011, 111.53, 114.11, 114.40, 121.21, 121.95, 129.45, 129.70, 144.30, 144.43, 146.58, 146.68 (12* Ar-C), 178.94 (-CO-)

4. MS: 358(M⁺)

5. IR: cm⁻¹ 3560 (-OH), 1765 (-内酯)

6. $[\alpha]_D^{25} = -37.50^\circ$

(-)-南茛酚

1. 分子式: $C_{20}H_{22}O_7$

2. ¹H-NMR: 2.40-3.20(5H, m), 3.85 (6H, d), 3.95 (2H, bd) 5.60 (2-OH), 6.5-6.8 (6H,m)

3. ¹³C-NMR: 31.5 (C-7), 41.9 (C-8), 43.74 (C-7'), 55.94 (2-OMe), 70.26(-O-CH₂), 76.33(08'), 111.55, 112.81, 114.35, 114.56, 116.82, 121.42, 123.12, 126.20, 130.35, 144.27, 144.95, 146.59(12xAr-C), 178.66 (-CO).

4. MS-374(M⁺)

5. [α]_D = -30.90 °C

二苺基丁内半缩醛

1. 分子式: C₂₀H₂₄O₆

2. ¹H NMR: 6.42-6.81 (H-2, m), 6.42-6.81(H-5, m), 6.42-6.81 (H-6, m), 2.37-2.80 (H-7, m), 1.94-2.18 (H-8, m), 5.23 (H-9a, m), 6.42-6.81(H-9b, m), 6.42-6.81 (H-2', m), 6.42-6.81(H-5', m), 2.37-2.81(H-6', m), 2.37-2.81 (H-7'a, m), 1.94-2.18 (H-7'b, m), 4.00-4.09(H-8', t), 3.47-3.57 (H-9'a, m), 3.76 (-OMe, s), 3.83 (-OMe, s).

3. MS-360 (M⁺)

实施例 2

(-)-罗汉松脂素对人癌细胞系的体外细胞毒性:

人癌细胞系获自国家细胞科学中心, Pune, 印度, 或获自国家癌研究所, Frederick, MD, 美国。细胞在含有完全生长培养基 (含 2mM 谷氨酰胺、100μg/ml 链霉素的 RPMI-1640 培养基, pH7.4, 过滤除菌并在应用前添加 10% 无菌胎牛血清和 100 单位/ml 青霉素) 的组织培养瓶中, 于 37°C 含 5%CO₂ 的空气和 90% 相对湿度的二氧化碳孵箱 (WTB binder, 德国) 中生长。通过用胰酶 (PBS 中含 0.05% 胰酶和 0.02% EDTA) 处理自细胞瓶中收获未长满单层的细胞, 并用完全生长培养基悬浮。通过台盼蓝排除技术 97% 以上有细胞活力的细胞用于测定细胞毒性。

用 DMSO (二甲基亚砷) 溶解(-)-罗汉松脂素以获得 20mg/ml 的母液。母液用包含 50μg/ml 庆大霉素的完全生长培养基进行系列稀释以获得 200、

60 和 20 $\mu\text{g/ml}$ 三个工作检验溶液。

制备在完全生长培养基中有所需细胞密度的人癌细胞系悬液并制备 96 孔组织培养板的每种细胞系的细胞悬液 (每孔 100 μl)。每种细胞系另设三个孔作为对照。对每种细胞系每个实验和每个实验组也包括只含等量完全生长培养基的两个空白孔作为对照。培养板于 37 $^{\circ}\text{C}$ 含 5% CO_2 的空气和 90% 相对湿度的二氧化碳孵箱中进行孵育。

孵育 24 小时后向所有孔包括实验组的空白孔中加入不同浓度(100 μl) (-)-罗汉松脂素的工作检验溶液。向对照组中加入等量的完全生长培养基。

加入检验材料等后,将培养板进一步(于 37 $^{\circ}\text{C}$ 含 5% CO_2 的空气和 90% 相对湿度的二氧化碳孵箱中)孵育 48 小时,然后通过所有孔的培养基上轻轻铺一层 50 μl TCA (50%三氯乙酸)使细胞生长停止。培养板于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育一小时以固定孔底细胞。将所有孔内液体轻轻吸出并弃去。将培养板用蒸馏水洗五次以除去 TCA、生长培养基、低分子量代谢物、血清蛋白质等。将培养板风干。

细胞的生长通过用硫罗丹明 B 染料 (SRB) 染色进行检测。将 SRB 溶液 (100 μl , 在 1%乙酸中含 0.4%SRB) 加入每孔中并将培养板于室温孵育 30 分钟。未结合的 SRB 通过用 1%乙酸将孔洗五次快速除去并将培养板风干。向所有孔中加入 Tris-缓冲液 (100 μl 0.01M, pH10.4) 并将培养板在机械搅拌器上轻轻搅动 5 分钟。在 ELISA 读数仪上记录 540nm 的光密度。

有检验材料存在时细胞的生长通过用实验组的平均 OD 值减去各自空白组的平均 OD 值而确定。同样,对没有检验材料存在时(对照组)细胞的生长和有阳性对照存在时细胞的生长也进行了测定。认为没有检验材料存在时细胞的生长为 100%,对有检验材料存在时细胞生长的百分率进行测定并依次计算抑制百分率。

测定了(-)-罗汉松脂素对人乳腺癌 (MCF-7 和 ZR-75-1)、成神经细胞瘤 (SK-N-MC 和 IMR-32)、子宫颈癌 (SiHa)、结肠癌 (Colo-205、HT-29 和 SW-620)、肝癌 (HEP-2) 和肺癌 (A-549) 细胞系的体外细胞毒性。表 1 对结果进行了总结。显示(-)-罗汉松脂素对所研究的人癌细胞系细胞生

长的抑制是剂量依赖的。在 100 μ g/ml 时抑制率在 54-93%之间变动。它对人结肠癌细胞系 Colo-205 作用最大，对乳腺癌细胞系 MCF-7 作用最小。

实施例 3

(-)-南茛菪酚对人癌细胞系的体外细胞毒性:

人癌细胞系的生长和收获及细胞毒性的测定正如实施例 1，除了应用的检验材料为(-)-南茛菪酚，所述(-)-南茛菪酚溶于 DMSO 制备与并实施例 1 中同样浓度的三个工作检验浓度。

测定了(-)-南茛菪酚对人乳腺癌 (MCF-7 和 ZR-75-1)、成神经细胞瘤 (SK-N-MC 和 IMR-32)、子宫颈癌 (SiHa)、结肠癌 (Colo-205、HT-29 和 SW-620)、肝癌 (HEP-2) 和肺癌 (A-549) 细胞系的体外细胞毒性。表 1 对结果进行了总结。显示(-)-南茛菪酚对所研究的人癌细胞系细胞生长的抑制是剂量依赖的。在 100 μ g/ml 时抑制率在 32-67%之间变动。它对人结肠癌细胞系 Colo-205 作用最大，对结肠癌细胞系 HT-29 作用最小。

实施例 4

分离来自雪松的包含木脂素混合物的新化学组合物的方法:

将雪松的干木粉 (200g) 装入索格利特抽提器中。首先用己烷然后用氯仿对粉进行提取。氯仿提取物在真空下浓缩。浓的浆状残留物用乙酸乙酯 (约 50g 残留物用约 60ml 乙酸乙酯) 进行溶解。将上述残留物在乙酸乙酯中的溶液滴加至己烷 (约 5L) 中。过滤分离的固体。木脂素混合物的产量约为 20g。

木脂素混合物的组合物通过 HPLC 对三批进行分析并在表 2 对结果进行了总结。HPLC 应用的柱子为 ODS，流速为 1.5ml，在 225nm 波长处测定。

实施例 5

分离自雪松的木脂素混合物对人癌细胞系的体外细胞毒性:

人癌细胞系的生长和收获及细胞毒性的测定根据实施例 1,除了应用的检验材料为分离自雪松的三种木脂素混合物,所述三种木脂素混合物分别溶于 DMSO 并制备与实施例 1 同样浓度的三个工作检验浓度。

测定了获自三批的三种木脂素混合物对人乳腺癌(MCF-7 和 T-47-D)、宫颈癌细胞(Hela 和 SiHa)成神经细胞瘤(SF-539、SK-N-MC、IMR-32、SK-N-SH 和 SNB-78)、结肠癌(Colo-205、HCT-15、HT-29 和 SW-620)、肝癌(HEP-2 和 HEP-G-2)、肺癌(A-549、HOP-18 和 NCI-H23)、口癌(KB)、卵巢癌(NIH-OVCAR-3、OVCAR-5 和 SK-OV-3)和前列腺癌(DU-145 和 PC-3)体外细胞毒性,其中所述三种木脂素混合物的组分示于表 2。表 3 对结果进行了总结。显示木脂素混合物对所研究的人癌细胞系细胞生长的抑制是剂量依赖的。所有三种混合物显示或多或少相似的活性模式。在 100 μ g/ml 时抑制率在 37 至 100%之间变动。所有三种混合物对人口癌细胞系 KB 作用最大,并显示对宫颈癌细胞系(SiHa)、成神经细胞瘤细胞系(SK-N-MC)、结肠癌细胞系(Colo-205、HCT-15、HT-29 和 SW-620)、卵巢癌细胞系(OVCAR-5)和前列腺癌细胞系(PC-3)有非常高的抑制作用。发现所有应用的结肠癌细胞系对木脂素混合物高度敏感,木脂素混合物对结肠可能有组织特异性。观察到对肝癌细胞系 Hep-G-2、肺癌细胞系 HOP-18 和卵巢癌细胞系 NIH-OVCAR-3 有最佳作用。

本发明的优点

1. 获自雪松的木脂素混合物显示了对多种细胞系的抗癌活性。
2. 与如果单独应用单一组分相比,木脂素混合物显示了增强的抗癌活性。

表 1: (-)-罗汉松脂素和南茛菪酚对人癌细胞系的体外细胞毒性

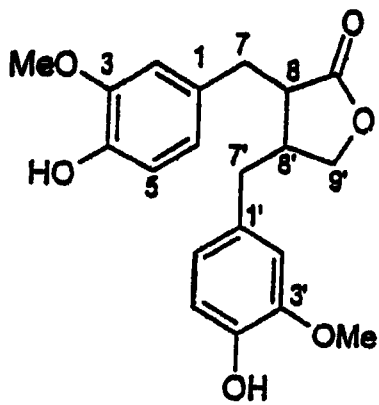
		生长抑制百分率					
		(-)-罗汉松脂素 ($\mu\text{g/ml}$)			(-)-南茛菪酚 ($\mu\text{g/ml}$)		
		10	30	100	10	30	100
乳腺癌	MCF-7	10	36	54	7	26	51
乳腺癌	ZR-75-1			62			37
成神经细胞瘤	SKNMC			75			44
成神经细胞瘤	IMR-32			77			56
子宫颈癌	SiHa	10	29	63	16	21	37
结肠癌	Colo-205	15	28	93	5	27	67
结肠癌	HT-29		10	74		6	32
结肠癌	SW-620		11	68	14	20	50
肝癌	Hep-2			64			46
肺癌	A-549	19	33	65	21	37	56

表 2: 三批木脂素混合物的 HPLC 分析

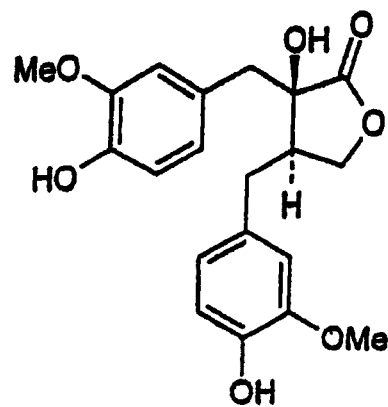
	HPLC 分析的相对百分率			
	(-)-罗汉松脂素	(-)-南茛菪酚	二苜基丁内半缩醛	未确认物质
混合物 1	12.20	77.30	7.70	2.80
混合物 2	10.50	76.30	10.27	3.00
混合物 3	10.90	78.20	8.30	2.60

表 3: 分离自雪松的木脂素混合物对人癌细胞系的体外细胞毒性

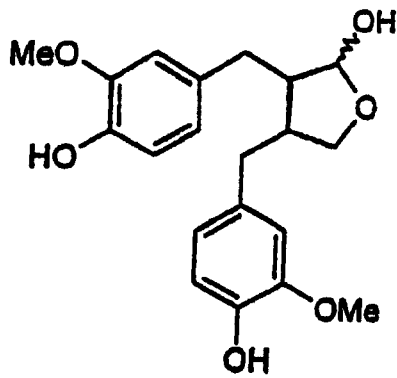
组织	细胞系	生长抑制百分率								
		混合物 1 ($\mu\text{g/ml}$)			混合物 2 ($\mu\text{g/ml}$)			混合物 3 ($\mu\text{g/ml}$)		
		10	30	100	10	30	100	10	30	100
乳腺癌	MCF-7	39	63	72	53	63	66	38	65	71
乳腺癌	T-47-D	43	71	80	57	76	77	43	70	75
子宫颈癌	Hela	11	64	65	23	69	69	20	71	73
子宫颈癌	SiHa	38	69	89	67	85	88	44	70	89
成神经细胞瘤	SF-539	23	72	81	37	76	83	10	71	84
成神经细胞瘤	SKNMC	71	90	91	83	90	90	77	90	92
成神经细胞瘤	IMR-32	-	-	86	-	-	96	-	-	89
成神经细胞瘤	SKNSH	9	62	78	10	65	79	14	72	87
成神经细胞瘤	SNB-78	26	58	70	46	59	80	28	54	70
结肠癌	COLO-205	40	85	95	83	94	98	38	85	94
结肠癌	HCT-15	24	73	89	45	89	93	21	75	97
结肠癌	HT-29	33	76	88	75	85	93	21	78	93
结肠癌	SW-620	12	54	89	8	62	89	14	62	95
肝癌	Hep-2	-	-	70	-	-	73	-	-	71
肝癌	Hep-G-2	14	18	37	11	23	51	19	23	59
肺癌	A-549	31	63	83	37	80	82	32	67	83
肺癌	HOP-18	2	18	47	9	51	65	0	21	44
肺癌	NCI-H23	35	88	76	57	72	95	28	74	92
口癌	KB	41	87	100	43	87	99	51	85	99
卵巢癌	NIH-OVC AR-3	6	38	44	36	42	48	13	42	37
卵巢癌	OVCAR-5	7	44	83	14	76	93	5	50	96
卵巢癌	SK-OV-3	6	48	70	17	64	83	2	51	79
前列腺癌	DU-145	9	63	81	17	73	81	7	69	82
前列腺癌	PC-3	45	91	93	77	92	96	53	94	98



(-)-罗汉松脂素(1)



(-)-南莞酚(2)



二苄基丁内半缩醛木脂素(3)